

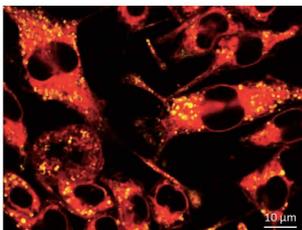


Olga Dürr (Autor)

Lipophile Polyaminderivate als Leberspezifische Wirkstofftransporter

Olga Dürr

**Lipophile Polyaminderivate als
Leber-spezifische Wirkstofftransporter**



Cuvillier Verlag Göttingen
Internationaler wissenschaftlicher Fachverlag

<https://cuvillier.de/de/shop/publications/6190>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen,
Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>



2 Einleitung

2.1 Drug-Delivery und Organ-Targeting

Bei der Entwicklung neuer pharmakologisch wirksamer Substanzen spielt neben der Optimierung der Pharmakodynamik auch die der Pharmakokinetik eine immer wichtigere Rolle. Mithilfe von Hochdurchsatz-Screening-Verfahren ist es zwar möglich eine Vielzahl von Wirkstoffen in *in vitro*-Systemen zu testen, viele dieser Substanzen zeigen aber *in vivo* lediglich eine geringe Bioverfügbarkeit. So wird z.B. die zelluläre Aufnahme eines Wirkstoffes nach oraler Applikation sowohl von seiner Löslichkeit im polaren extrazellulären Medium als auch durch seine Fähigkeit biologische Membranen passieren zu können entscheidend beeinflusst. Lipinski formulierte die Kriterien für eine gute orale Bioverfügbarkeit einer chemischen Substanz in Form der *Lipinski's rule of five*, wonach ein Wirkstoff

- nicht mehr als fünf Donatoren in Form von Wasserstoffbrückenbindungen (z.B. OH- oder NH-Gruppen),
- nicht mehr als zehn Akzeptoren in Form von Wasserstoffbrückenbindungen (z.B. O- oder N-Atome),
- eine Molekülmasse kleiner 500 g/mol und
- einen Verteilungskoeffizient (log P) zwischen Oktanol und Wasser kleiner fünf

besitzen muss.^[1]

Neben der eigentlichen Herstellung steigen seit einigen Jahren ebenfalls die Bemühungen, potentielle Wirkstoffe nicht nur systemisch sondern gezielt in bestimmte Gewebe zu applizieren. Ein solches Organ-Targeting führt zur Akkumulation des Wirkstoffes in einem bestimmten Gewebe oder Organ (Abbildung 1). Besitzt der Wirkstoff keine Organspezifität muss häufig eine höhere Dosis des Wirkstoffes verabreicht werden, um sicherzustellen, dass die für die Wirkung benötigte Konzentration im Zielorgan erreicht wird. Diese „Überdosierung“ kann in anderen Organen ungewollte Wechselwirkungen, Nebenwirkungen oder toxische Effekte hervorrufen, da der Wirkstoff auch dort für längere Zeit verweilen kann.^[2] Die Erkennung der Zielstruktur kann beim Targeting auf der Ebene von ganzen Organen, bestimmten Zellen in Organen oder spezifischen Zellbestandteilen erfolgen. Hierfür wird die eigentliche Verbindung mit einer weiteren Verbindung, dem sogenannten Transporter, kovalent verknüpft oder komplexiert. Dieser ist für die Erkennung und Wechselwirkung mit dem Zielorgan zuständig und ermöglicht die Aufnahme des Wirkstoffes in das Zielorgan.

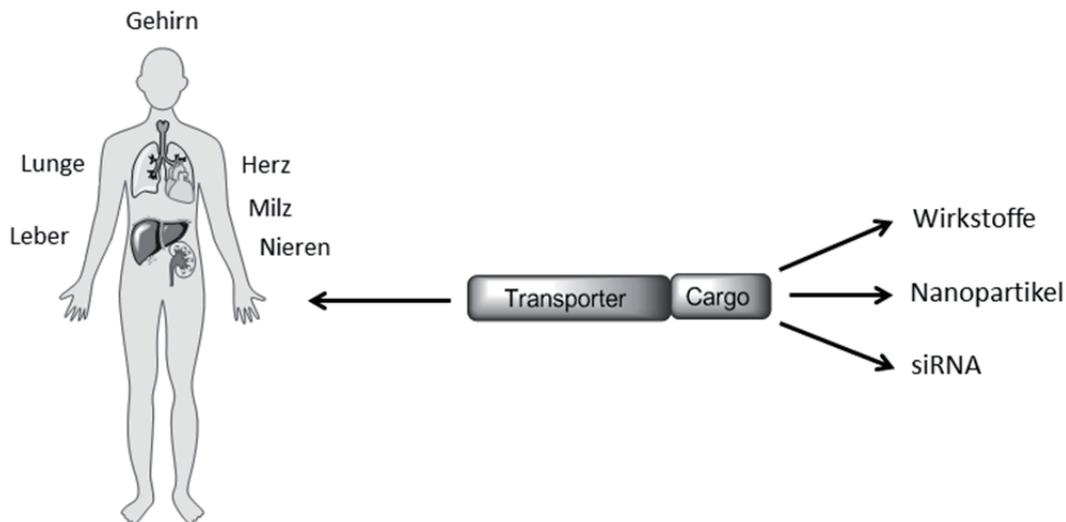


Abbildung 1: Organ-Targeting von molekularen Transportern.

Eine gewebspezifische Applikation durch gezieltes Targeting ist aber nur begrenzt möglich und beschränkt sich häufig auf konjugierte polykationische Drug Delivery-Systeme mit organspezifischen peptidischen Rezeptorliganden oder Aptameren.^[3-5] Solche polykationischen Drug Delivery-Systeme haben den Vorteil, dass sie viele Wirkstoffe, die aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften nicht in der Lage sind zelluläre Membranen zu penetrieren, ausreichend zu verpacken oder zu solubilisieren. Hierzu werden meist kationische Liposomen, Antikörper, dendrimere Strukturen sowie Ligand-modifizierte Nanostrukturen wie z.B. Polyplexe aus Polyethylenimininen für eine *in vivo* Applikation verwendet.^[6, 7] Bereits 1965 publizierten Ryser *et al.* ihre Entdeckung der polykationischen Peptide, die in der Lage sind zelluläre Plasmamembranen zu durchqueren.^[8] Solche Zellpenetrierende Peptide (*cell penetrating peptides*, CPPs) wurden bereits unter anderem für die Applikation von therapeutischen Wirkstoffen, Oligonukleotiden, DNA, RNA, siRNA, Nanopartikeln, Liposomen und Quantum Dots eingesetzt (Übersichtsartikel siehe Brooks *et al.*^[9]).^[10-12] Sie zeichnen sich durch eine kurze Aminosäuresequenz aus, die auf sogenannten Protein-Transduktionsdomänen (PTD) basiert.^[13] Viele CPPs verfügen über mehrere kationische Arginin- und/oder Lysinseitenketten, sodass sie unter physiologischen Bedingungen eine positive Gesamtladung aufzeigen.^[14] Diese ermöglicht es ihnen mit negativen Bestandteilen der Zelle wie z.B. Phosphatgruppen oder Polysacchariden der Biomembran, RNA sowie DNA zu interagieren. Es wird angenommen, dass CPPs hauptsächlich über Endozytose aufgenommen werden. Bei hydrophilen CPPs wird jedoch auch der Mechanismus eines direkten Transportes durch den Lipidbilayer der Zellmembran diskutiert.^[15] Nachteile bei der Verwendung von CPPs als molekulare Transporter zeigten sich jedoch in ihrer geringen Pharmakokinetik.^[16, 17] Dies liegt vor allem an ihrem schnellen Abbau durch Peptidasen.



Intensive Forschungen in den letzten Jahren zeigten, dass sich auch CPP-Mimetika wie β -Peptide,^[18] Peptide^[19, 20] und Polyamine^[21] als molekulare Transporter eignen. Diese zeigen im Gegensatz zu CPPs eine wesentlich höhere Stabilität gegenüber einem enzymatischen Abbau durch Peptidasen und damit eine größere Stabilität *in vivo*. Zellpenetrierende Peptide (*cell penetrating peptides*, CCPo) wurden bereits in unterschiedlichen Zellsystemen getestet. So konnten Eggenberger *et al.*, Schröder *et al.* und Birtalan *et al.* zeigen, dass in einigen Fällen durch Modifikation der Seitenketten die Aufnahme in eukaryontische oder prokaryontische Zellen und das Targeting in unterschiedliche Zellkompartimente beeinflusst werden kann.^[22-24] Auch die Klasse der Polyamin-basierten Mimetika stellt eine vielversprechende Möglichkeit dar, Wirkstoffe gezielt zu applizieren. Sie basieren auf einem Spermidin- oder Spermin-Grundgerüst. Durch kombinatorische Synthese können zusätzlich eine Vielzahl von unterschiedlichen Seitenkettenmodifikationen vorgenommen werden. Auch die Kupplung mit Wirkstoffen und Cargos ist möglich. Zudem zeichnen sie sich durch eine gute Verträglichkeit im Organismus aus.^[25]

2.2 Polyamine

2.2.1 Vorkommen und Funktion von Polyaminen in der Zelle

Polyamine sind niedermolekulare, positiv geladene Verbindungen, die ubiquitär in allen lebenden Zellen vorkommen.^[26] Sie können in die Gruppe der Indolabkömmlinge (Serotonin, Tryptamin), der Imidazolderivate (Histamin) und der aliphatischen Amine unterteilt werden. Aliphatische Polyamine setzen sich aus 1,3-Diaminopropyl- und 1,4-Diaminobutyl-Einheiten zusammen (z.B. Putrescin, Spermidin und Spermin, Abbildung 3). Die Bezeichnung Spermin (*N,N'*-Bis(3-aminopropyl)butan-1,4-diamin) und Spermidin (*N*-(3-Aminopropyl)butan-1,4-diamin) ist auf den ersten Nachweis dieser Polyamine in Seminalplasma zurückzuführen.^[27] Putrescin (1,4-Butandiamin) wird unter anderem bei der Eiweißzersetzung während des Verwesungsprozesses von Fleisch (engl. *putrefying flesh*) gebildet. Aufgrund des typischen Verwesungsgeruches wurde es fälschlicher Weise den Ptomainen (Leichengiften) zugeordnet.^[28]

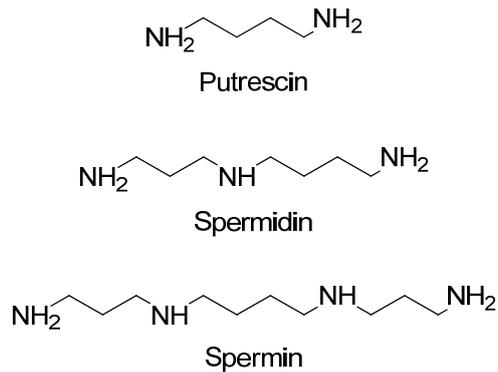


Abbildung 2: Die wichtigsten natürlichen Polyamine mit aliphatischem Rückgrat.

Trotz ihrer geringen Strukturdiversität zeigen diese Polyamine aber als Stoffwechselprodukte eine ubiquitäre Verteilung in Lebewesen und Mikroorganismen in millimolaren Mengen.^[29] Die Menge an freien Polyaminen ist jedoch im Vergleich dazu gering, da ein Großteil über ionische Wechselwirkungen an unterschiedliche negativ geladene Zellbestandteile gebunden ist.^[30] Neben der endogenen Biosynthese werden Polyamine auch exogen über die Nahrung aufgenommen und von Darmbakterien intraluminal sezerniert.^[31] Diese werden durch die Mucosa resorbiert und gelangen in den enterohepatischen Kreislauf. Unter physiologischen Bedingungen (pH 7,4) liegen sowohl die endständigen als auch die intramolekularen Aminogruppen protoniert vor,^[26, 32, 33] wobei die Ladung aber nicht als Punktladung vorliegt sondern über das gesamte Molekül delokalisiert ist.^[34] Solche protonierten Polyamine in der Lage mit anionischen und zwitterionischen Biomolekülen elektrostatisch in Wechselwirkung zu treten. DNA, RNA, Phosphatgruppen der Phospholipide, negativ geladene Aminosäuren wie Aspartat und Glutamat stellen dabei mögliche Interaktionspartner dar.^[30, 34] Durch die Bildung von stabilen Komplexen zwischen Polyaminen und Phosphatgruppen der Nucleinsäuren kommt es zu einer Kondensierung der DNA, wodurch eine Degradation durch denaturierende Faktoren wie z.B. hohe Temperaturen, Wassermangel und osmotische Belastungen verhindert werden kann.^[26, 37-39] Zudem spielen Polyamine eine wichtige Rolle in zahlreichen biochemischen Prozessen wie der Regulierung von Transkription, Translation, Enzymaktivitäten, Ionenkanälen und Apoptose. Es konnte zudem gezeigt werden, dass Polyamine essentiell für die Zellproliferation und Zelldifferenzierung sind und damit das Gewebewachstum von normalem und Tumorgewebe beeinflussen.^[35, 36] Die Syntheserate und die Gesamtmenge von Polyaminen korreliert proportional mit der Höhe der Zellproliferation.

Aus der Natur sind außerdem zahlreiche Polyaminkonjugate bekannt. Dabei handelt es sich z.B. um Polyamine, die eine immunsuppressive Wirkung (Desoxyspergualin)^[40] zeigen, antibakterielle Eigenschaften aufweisen (Squalamin,^[41] Edein A,^[42] Guanidospermidin und



Glycocinnamoylspermidin), Bestandteil von Alkaloiden sind (Kukoamin A) oder Spinnen- und Wespentoxinen^[43, 44] darstellen (Abbildung 3, Übersichtsartikel siehe Hahn und Schepers^[25]).

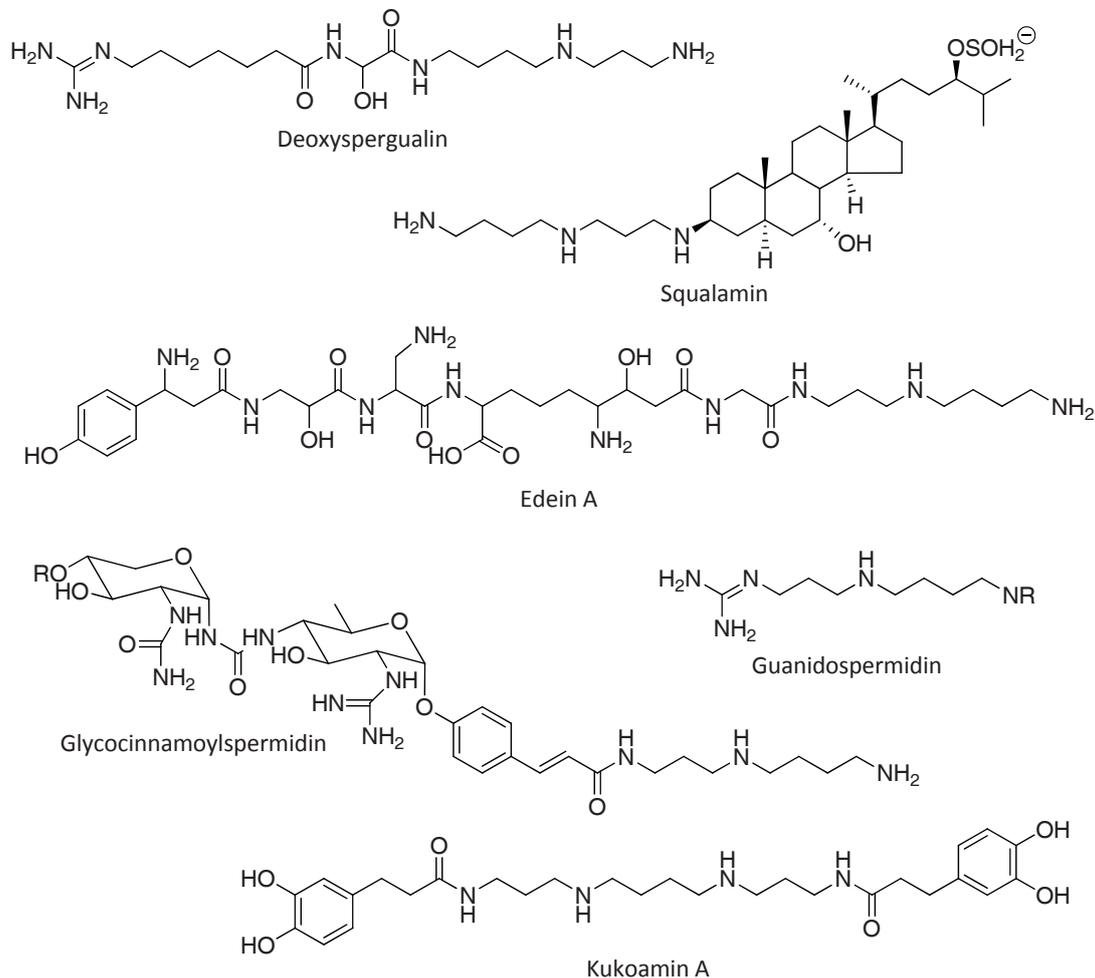


Abbildung 3: Beispiele für natürliche Polyaminkonjugate.^[25]

2.2.2 Biosynthese von Polyaminen

Die zelluläre Konzentration von Polyaminen unterliegt einer strikten Balance zwischen Aufnahme/Ausscheidung und Anabolismus/Katabolismus.^[45] Eine Quelle für aliphatische Polyamine in Eukaryonten und Prokaryonten ist die endogene Synthese. Viele Mikroorganismen und höhere Pflanzen sind in der Lage mithilfe des Enzyms Arginindecaboxylase aus *L*-Arginin Agmatin zu synthetisieren, welches durch Hydrolyse zu Putrescin umgewandelt wird (Abbildung 4). Cadaverin entsteht durch die Decarboxylierung von Lysin.

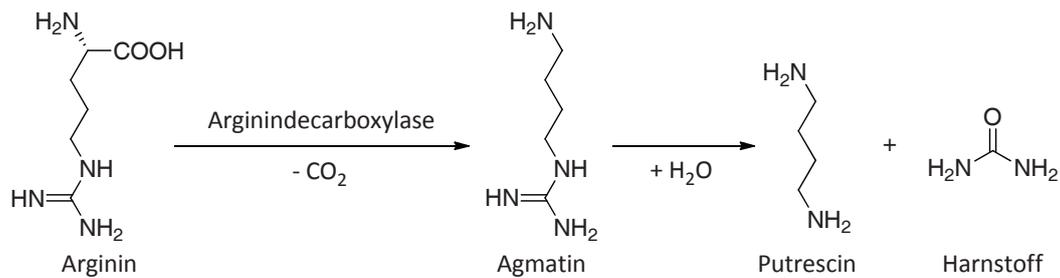


Abbildung 4: Biosynthese von Putrescin in pflanzlichen Zellen.

Säugetiere nutzen *L*-Ornithin, eine nicht-proteinogene Aminosäure, als Ausgangsverbindung für die Synthese von Putrescin (Abbildung 5). Dabei wird *L*-Ornithin im Harnstoffzyklus durch das Enzym Arginase aus *L*-Arginin synthetisiert und anschließend mithilfe der *L*-Ornithin-decarboxylase (ODC) zu Putrescin decarboxyliert. Aufgrund ihrer kurzen Halbwertszeit von 10 – 20 min stellt die ODC ein Schlüsselenzym und somit einen limitierenden Faktor der Polyaminsynthese dar.^[46] Da Tumorzellen eine hohe Aktivität der ODC besitzen, sind sie in der Lage große Polyaminmengen zu synthetisieren und zu proliferieren.^[28] Ein ODC-Inhibitor ist α -Difluoromethylornithin (DFMO). Durch die Bildung eines reaktiven Intermediats im aktiven Zentrum des Enzyms wird dieses irreversibel blockiert und damit inaktiviert. In weiteren Reaktionen werden Spermidin und Spermin durch Beteiligung der Spermidin- und Sperminsynthese gebildet. Die bei dieser Reaktion transferierte Propylamineinheit stammt aus *S*-Adenosylmethionin, welches durch die *S*-Adenosyl-*L*-Methionin-Decarboxylase zu Methylthioadenosin reagiert. Anschließend können Spermidin und Spermin durch die Spermidin-/Spermin- N^1 -Acetyltransferase (SSAT) acetyliert und aus dem Zytoplasma der Zelle exportiert werden.^[47] Acetylierte Polyamine können auch unter Einwirkung von PAO zu 3-Acetamidopropanal oxidiert werden. Das bei dieser Reaktion gebildete Wasserstoffperoxid ist in der Lage die SSAT-Aktivität zu induzieren und dadurch oxidativen Stress und Zelltod auszulösen.

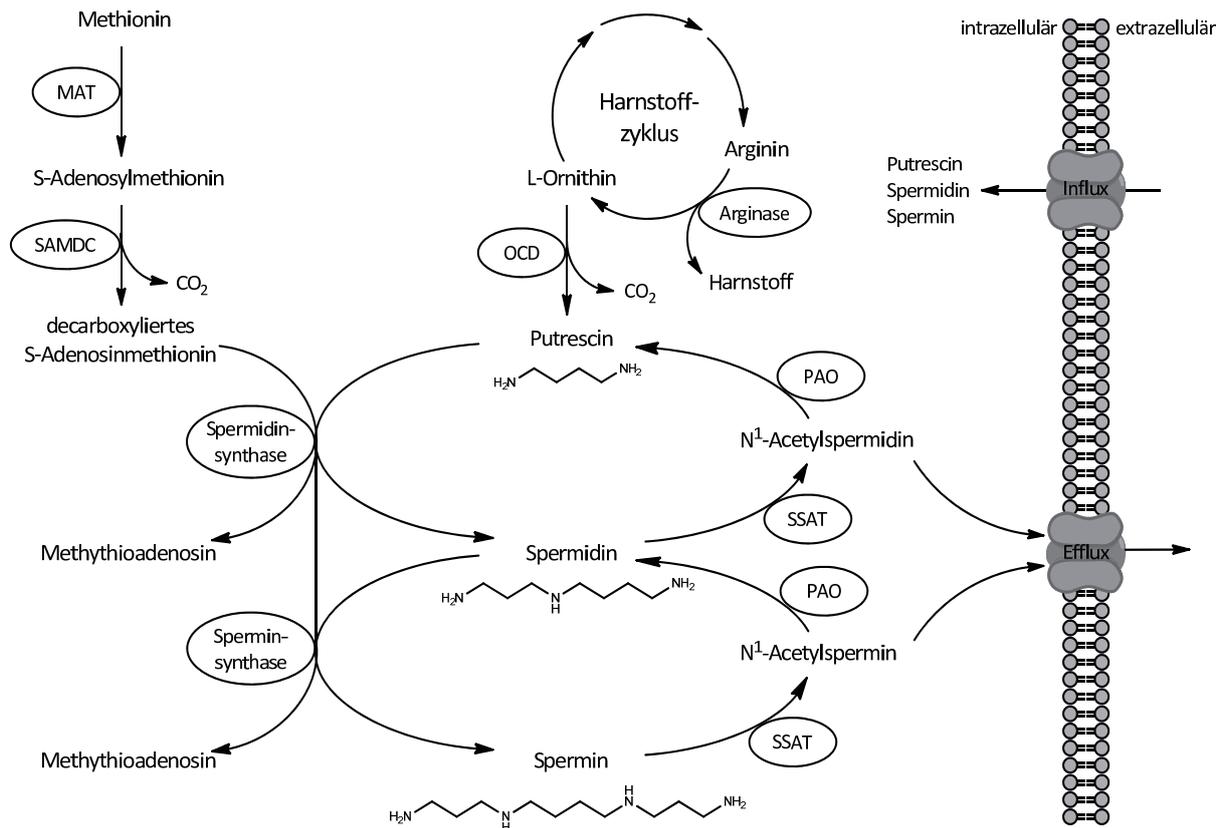


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Polyaminmetabolismus in Säugerzellen (nach Wallace *et al.*^[47]). Methioninadenosyltransferase (MAT), *L*-Ornithindecaboxylase (ODC), *S*-Adenosylmethionindecaboxylase (SAMDC), Spermidin-/Spermin-*N*¹-Acetyltransferase (SSAT), Polyaminoxidase (PAO).

2.2.3 Chemische Synthese von Polyaminderivaten

Polyamine stellen aufgrund ihrer guten zellulären Aufnahme und Verträglichkeit^[48] eine vielversprechende Klasse molekularer Transporter dar. Ziel ist es jedoch eine Spezifität solcher Verbindungen durch chemische Modifikationen zu erreichen und ein Targeting in unterschiedliche Zellorganellen, Zellen oder Gewebe zu ermöglichen. Polyamine können über mehrere primäre und sekundäre Aminogruppen verfügen, die im Molekül auch symmetrisch angeordnet sein können. Die chemische Synthese von derivatisierten Polyaminverbindungen, welche über unterschiedliche Modifikationen der einzelnen Aminogruppen verfügen, gestaltet sich deshalb oft schwierig.^[49] Es sind nur wenige Reaktionen einer direkten Derivatisierung von einzelnen Aminen innerhalb einer Polyaminverbindung bekannt (Übersichtsartikel siehe Kuksa *et al.*^[50]). Eine selektive und gerichtete Reaktion kann am besten durch die Verwendung orthogonaler Schutzgruppen erreicht werden. Diese sind in der Lage zwischen primären und sekundären Aminen zu unterscheiden. Die Abfolge der verwendeten Schutzgruppen (engl. *protection group*, PG) und ihre Entfernung durch die Verwendung bestimmter Abspaltreagenzien bestimmt die

Position der Modifikation. So muss vor der Modifizierung des primären Amins das sekundäre Amin durch orthogonale Schutzgruppen geschützt werden. Erst dann kann das primäre Amin freigesetzt und derivatisiert werden (Abbildung 6).^[51, 52]

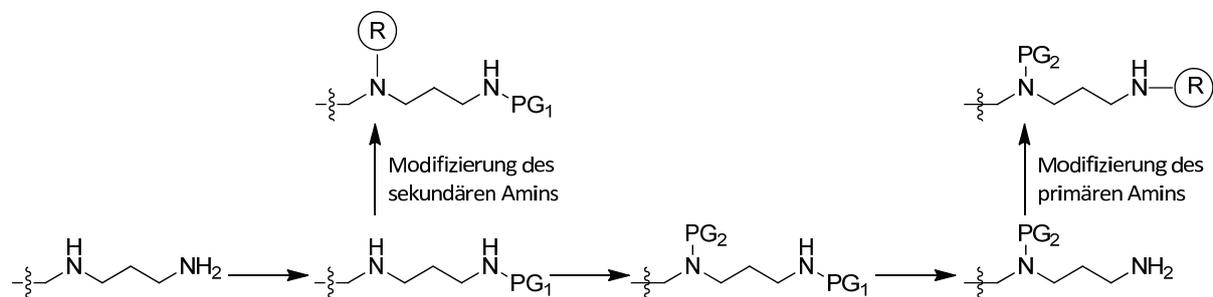


Abbildung 6: Schematische Darstellung der selektiven Derivatisierung von primären und sekundären Aminen unter Verwendung von orthogonalen Schutzgruppen (PG).^[25]

Eine individuelle Derivatisierung der einzelnen sekundären Amine kann durch die schrittweise Verlängerung des Polyaminrückgrates und die anschließende Einführung von orthogonalen Schutzgruppen an jedem sekundären Amin erreicht werden.^[53-55] Eine solche komplexe Synthesestrategie wird jedoch durch die Anzahl der orthogonalen Schutzgruppen und ihre Vereinbarkeit mit der Alkylierungsmethode beschränkt (Abbildung 7).^[25, 53]

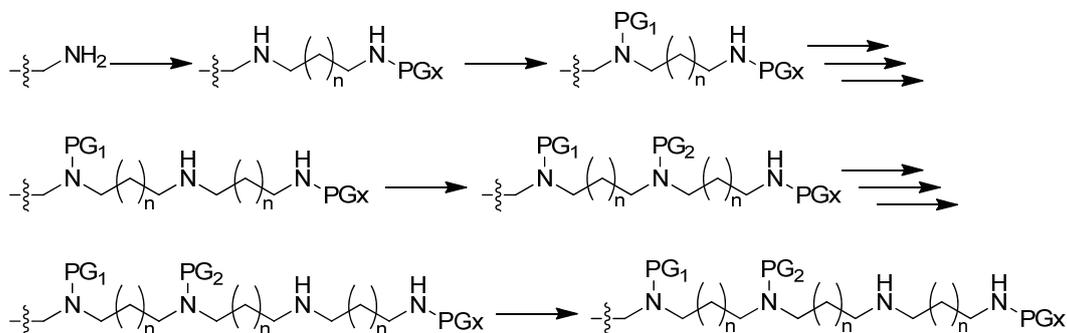


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Derivatisierung von sekundären Aminen durch die schrittweise Alkylierung mit geschützten primären Aminen und dem Einsatz von orthogonalen Schutzgruppen.^[56]

Hahn *et al.* gelang es durch kombinatorische Reaktionsansätze an der Festphase zellgängige amphiphile Polyamine und Polyaminkonjugate zu synthetisieren, die mit Biomakromolekülen wie Nukleinsäuren (z.B. DNA, RNA, siRNA), therapeutisch interessanten Molekülen, Nanopartikeln oder kleinen Molekülen gekuppelt werden können und dadurch als molekulare Transporter für die Transfektion von Zellen mit diesen Biomolekülen dienen können.^[56] Eine allgemeine Struktur dieser Transporter ist in Abbildung 8 gezeigt. Die Synthese dieser Verbindungen wird entscheidend durch das verwendete Harz, den Linker, die orthogonalen Schutzgruppen an den primären und sekundären Aminen und den



biokompatiblen Kupplungslinker beeinflusst. Die richtige Wahl dieser Reaktionsparameter ermöglicht den Einsatz von milden Reaktionsbedingungen, welche eine ungewollte Abspaltung des Biomakromoleküls vom Polyaminderivat oder Nebenreaktionen verhindern.^[57]

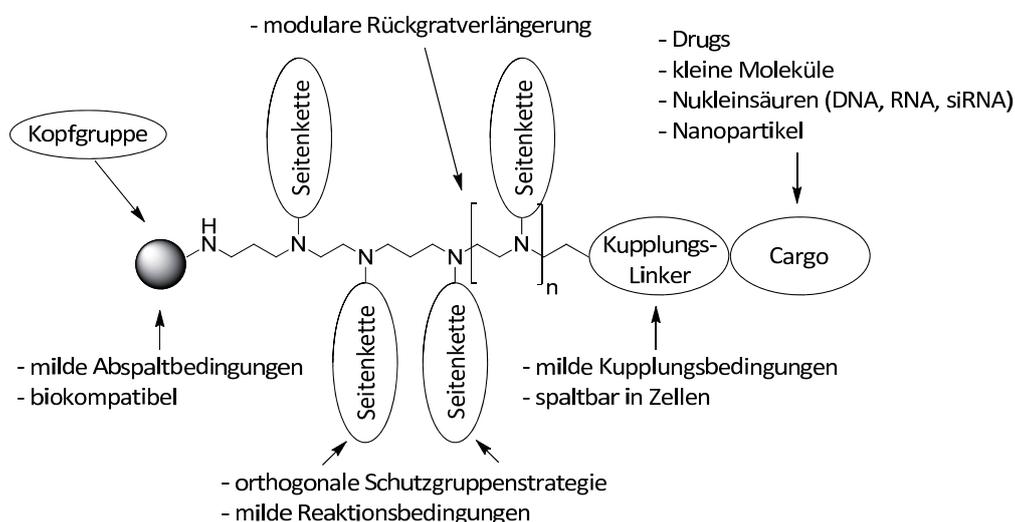


Abbildung 8: Struktur und Charakteristika der durch kombinatorische Festphasensynthese synthetisierten molekularen Polyaminderivate.

Für die Festphasensynthese etablierten Hahn *et al.* Polystyrolharze mit den säurelabilen Linkern wie 2-Chlorotrytylchlorid- bzw. 4-Alkoxytrytyl-Polystyrolharz (Abbildung 9). Diese ermöglichen die Abspaltung des Polyamins vom Harz unter Verwendung von 0,5 – 1% bzw. <0,5% TFA.^[56]

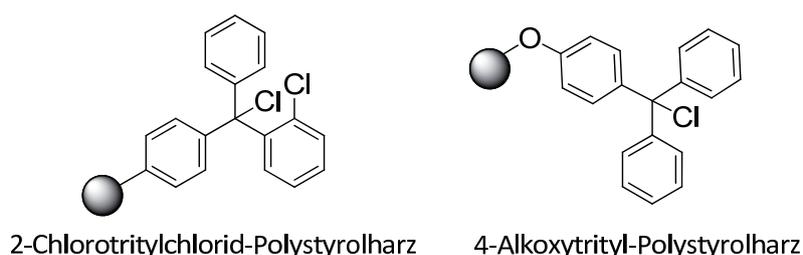


Abbildung 9: Verwendete Harze mit säurelabilen Linkern für die Synthese von Polyaminkonjugaten mit gekuppelten Biomakromolekülen.

Die Festphasensynthese eines Polyaminrückgrates stellt eine Kombination aus Flüssig- und Festphasensynthese dar und kann mithilfe unterschiedlicher Strategien durchgeführt werden.^[58, 59] Eine Möglichkeit für die Elongation des Rückgrates besteht in der Verwendung von kleinen Bausteinen, wodurch eine große Diversität zwischen den einzelnen Aminogruppen erreicht werden kann. Während jedes Reaktionsschrittes muss jedoch mit einem Verlust an Ausbeute gerechnet werden. Bei der Verwendung von größeren, mit



orthogonalen Schutzgruppen versehenen Polyaminbausteinen (z.B. Spermidin- oder Sperminbausteinen) wird die Anzahl der Reaktionsschritte minimiert. Die Schützung der Amingruppen muss aber im Vorfeld während einer Flüssigphasensynthese erfolgen.^[51, 60] Der Einsatz von Allyloxycarbonyl- (Aloc) und Nitrobenzenesulfonyl- (oNs) Schutzgruppen führt zu einer gleichzeitigen Schützung der endständigen primären und der sekundären Aminogruppen und ermöglicht die kovalent Bindung an das Harz. Dadurch wird sowohl eine Quervernetzung der Polyamine untereinander verhindert als auch eine hohe Ausbeute und Reinheit der Produkte erzielt (Abbildung 10).^[61, 62]

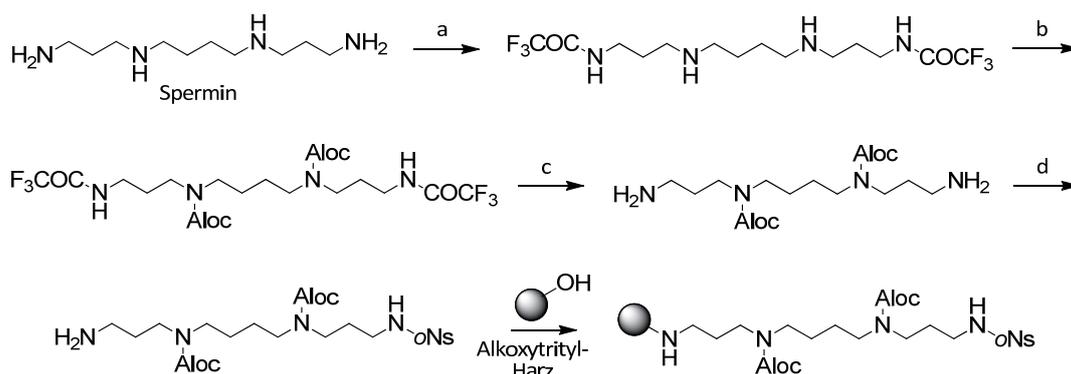


Abbildung 10: Synthese eines geschützten Polyaminbausteins und anschließende Kupplung an das Harz. (a) TFAA (3,5 Äq.), MeOH, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$; (b) Aloc-Cl (5 Äq.), Et₃N (5 Äq.), $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis rt; (c) NaOH_{conc}/H₂O (4:3), rt; (d) oNs-Cl (0,6 Äq.), Collidin (1 Äq.), rt.^[61]

Eine selektive Verlängerung des Polyaminrückgrates erfolgt durch Fukuyama-Alkylierungen und eine Einführung von Substituenten an den sekundären Aminen durch reduktive Aminierungen. Die Einführung von großen Resten wie z.B. Adamantylgruppen ist jedoch aus sterischen Gründen nur eingeschränkt möglich.^[61-63]

Die hier beschriebene Festphasensynthese von Polyaminderivaten zeichnet sich durch milde Abspaltungsbedingungen sowie biokompatible Schutzgruppen aus und setzt damit auch milde biokompatible Kupplungsbedingungen des Cargos an das Polyaminrückgrat voraus. Die chemoselektive Umwandlung des primären Amins in ein Thiol erfolgt mit Hilfe des Traut's Reagenz (2-Iminothiolan-Hydrochlorid) im organisch-wässrigen Milieu unter milden Bedingungen.^[64] Für die Kupplung von Biomakromolekülen mit synthetischen Verbindungen, wie hier z.B. Polyaminen, stellen vor allem Thiolreste eine geeignete Reaktionsgruppe dar. Die Reaktion eines Thiols mit einem Maleimidrest in einer Michael-Addition resultiert in einem säurelabilen Thioether. Dieser kann intrazellulär in den Lysosomen bei dem dort vorherrschenden pH-Wert von 4,4 wieder gespalten werden, wodurch das Cargo freigesetzt und seine Wirkung entfalten werden kann. Im reduzierenden Milieu des Zytoplasmas können Disulfidbindungen, die zuvor aus zwei Thiolresten hervorgegangen sind, gespalten werden.^[64, 65]

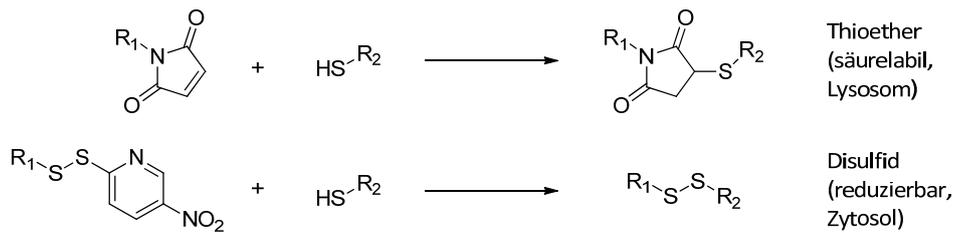


Abbildung 11: Beispiele für biokompatible Kupplungsmethoden zur Verknüpfung von Biomakromolekülen, Nanostrukturen und kleinen Molekülen mit synthetischen Verbindungen. R₁: Biomakromoleküle und andere Cargos, R₂: Transportermoleküle z.B. zellpenetrierende Peptide (CPPs), Peptoide (CPPos), Polyamine.

Hahn *et al.* ist es bereits gelungen, unterschiedliche Cargos an den Polyamintransporter zu koppeln,^[21] wobei das Polyaminrückgrat häufig die Löslichkeit der Verbindung in biologischen Systemen erhöht. Folgende Verbindungen eignen sich als Cargos (siehe Abbildung 12):

- Fluorophore wie NBD, die Untersuchungen *in vitro* und *in vivo* ermöglichen
- natürliche Toxine z.B. der Spinne
- antitumoraktive Wirkstoffe wie Indomethacin (Cox-Inhibitor), Porphyrin- oder Doxorubicinreste
- lipophile Reste, die den Polyaminen häufig antimikrobielle Eigenschaften verleihen
- antioxidativ wirkende Terylenrest
- Magnetresonanzpartikel (SPIO Beads)

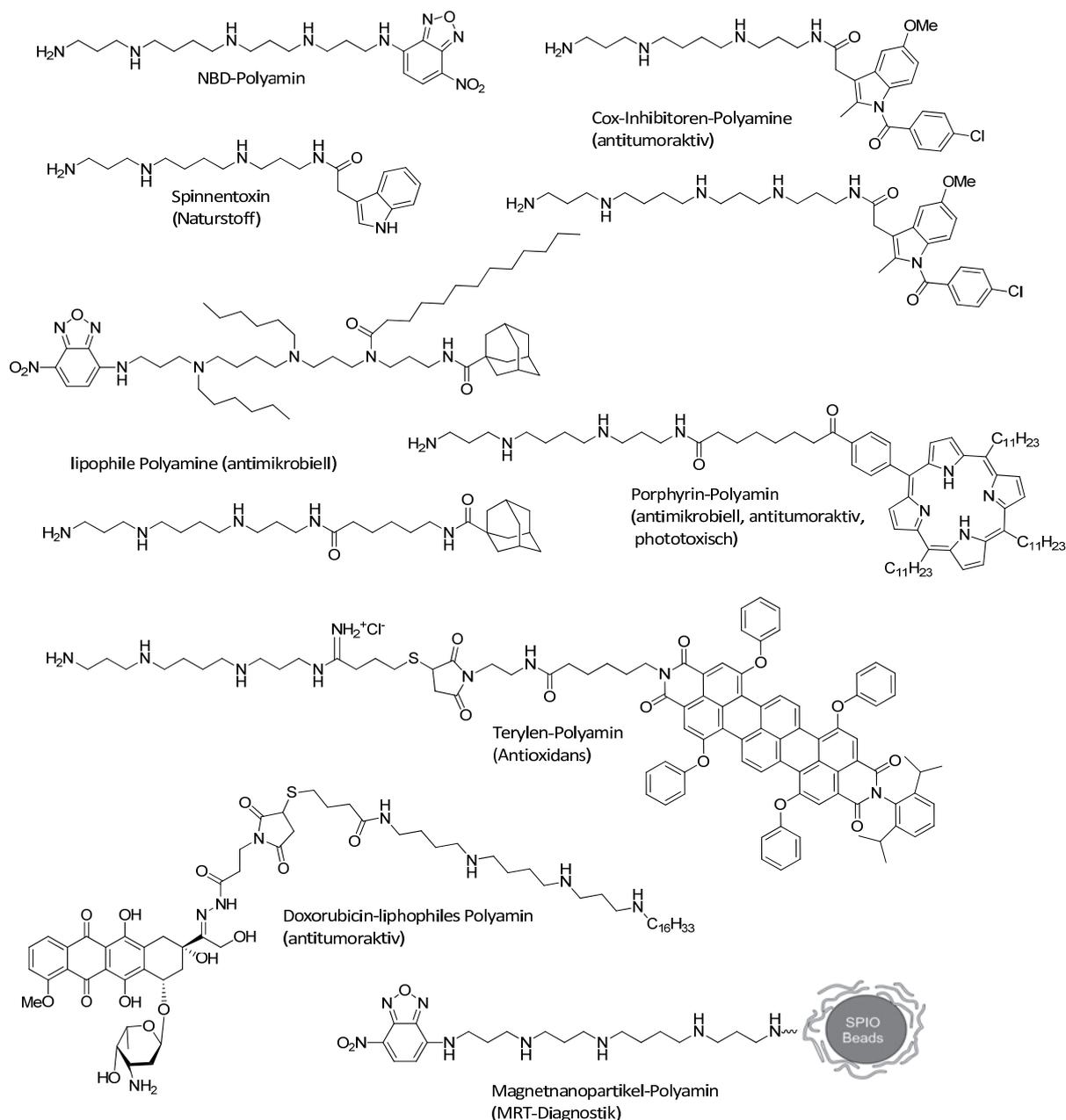


Abbildung 12: Beispiele für Polyaminkonjugate mit bioaktiven und therapeutisch aktiven Molekülen.^[62-64]

2.2.4 Zelluläre Aufnahme von Polyaminderivaten

Die zelluläre Polyaminkonzentration wird neben der *de novo* Synthese^[66] auch durch die Aufnahme von Polyaminen aus der Nahrung^[28] und die bakterielle Synthese im Verdauungstrakt^[67] beeinflusst. Nahezu alle Zellen sind in der Lage Polyamine aufzunehmen und zu sekretieren. Gewebe wie die Prostata, Tumore und normale schnell proliferierende Gewebe mit einem hohen Polyaminbedarf nehmen große Mengen aus ihrer Umgebung auf.^[68-70] Alle humanen Zellen verfügen über ein Transportsystem für Polyamine wie Spermidin, Spermin und Putrescin (*polyamine transport system*).^[71] Dieses Transportsystem



ist vor allem in schnell proliferierenden Zellen stark vertreten. Es scheint aber trotz der strukturellen Ähnlichkeiten der natürlichen Polyamine keine große Spezifität zu besitzen.^[72] Zahlreiche Polyamin-basierende Verbindungen, die auch über komplexe Seitenketten verfügen können, werden ebenfalls mithilfe dieses Transportsystems in Zellen aufgenommen.^[73-75]

Biologische Membranen setzen sich aus zahlreichen anionischen und zwitterionischen Verbindungen zusammen. Positiv geladene Polyaminderivate sind der Lage mit Strukturen wie Proteoglycanen, negativ geladenen Proteinen und Phospholipiden in elektrostatische Wechselwirkungen zu treten. Für ihre Aufnahme werden unterschiedliche Mechanismen diskutiert. Eine Möglichkeit stellt die Aufnahme über Endozytose dar, wobei diese aber nicht auf eine Form der Endozytose beschränkt werden kann (Abbildung 13).^[76] In Abhängigkeit von der Struktur der Polyaminverbindungen werden diese durch Phagozytose, Clathrin-abhängige bzw. Clathrin-unabhängige Endozytose, Caveolin-vermittelte Endozytose oder Makropinozytose in abgeschnürten Vesikeln in die Zelle aufgenommen. Die Effizienz der Aufnahme wird dabei durch die Größe der internalisierten Moleküle beeinflusst.^[76-79] Der Mechanismus des intrazellulären Transportes der endozytierten Vesikel ist noch nicht vollständig geklärt. Um den Transport näher zu untersuchen, gibt es erste Kollokalisierungsstudien mit vesikelspezifischen Proteinen. Dazu eignen sich insbesondere Rab GTPasen, die zur Ras Superfamilie gehören und in sekretorische und endozytotische Prozesse involviert sind.^[80] Durch die Rekrutierung von Effektorproteinen sind sie an Prozessen wie Vesikelbildung, Vesikeltransport und Membranfusion beteiligt. Jede Rab GTPase ist in bestimmten intrazellulären Membranen lokalisiert, sodass GTPasen als Marker für diese Organelle verwendet werden können.^[81] Rab5 ist in der Membran von frühen Endosomen, frühen Phagosomen, Caveosomen und Makropinosomen zu finden. Es steuert die Endozytose und endosomale Fusion von Clathrin-gebundenen Vesikel (*clathrin-coated vesicles*, CCVs), die Makropinozytose und die Reifung von frühen Phagosomen. Rab7 ist ein Marker für späte Endosomen und vermittelt die Reifung von späten Endosomen und Phagosomen sowie ihre Fusion mit Lysosomen. Das schnelle endozytische Recycling von frühen Endosomen wird durch Rab4 reguliert. Rab11 ist in den Prozess des langsamen endozytischen Recyclings über Recycling-Endosomen involviert.^[76]

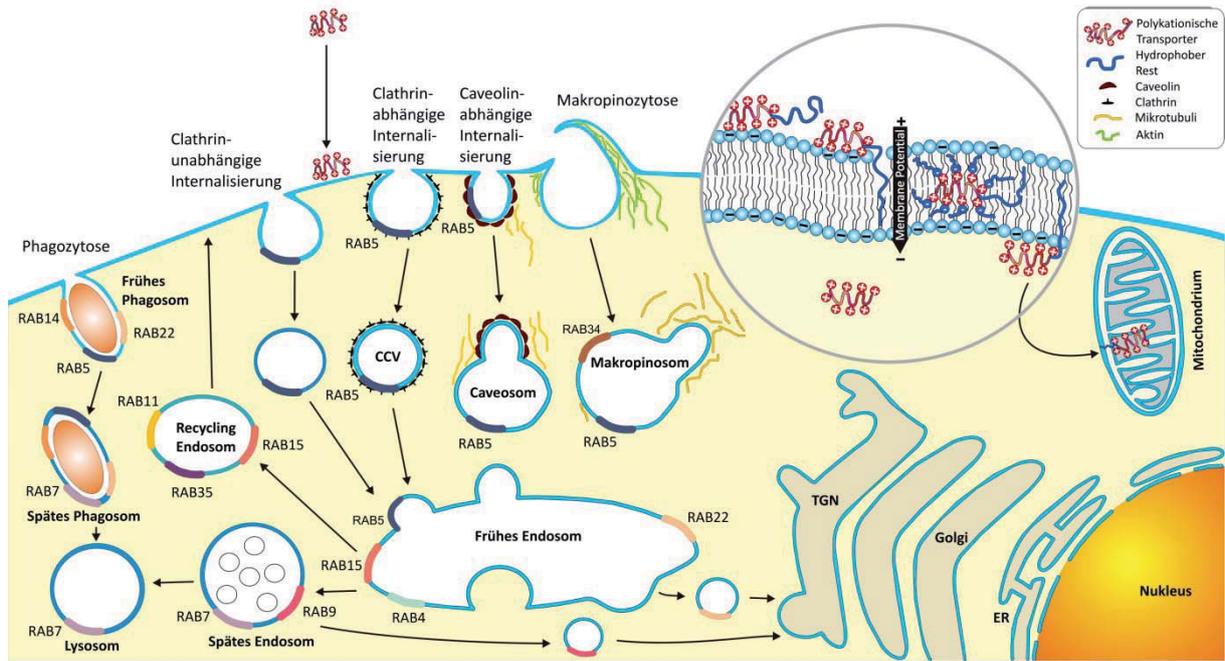


Abbildung 13: Schematische Darstellung der vesikulären Aufnahme und Transportwege von polykationischen molekularen Transportern wie CPPs, CPPos und Polyaminen (modifiziert nach Stenmark^[76]).