

Ein Peptid-Cobaltocenium-Biokonjugat mit verbesselter Aufnahme in Zellen und Anreicherung im Zellkern

Fozia Noor, Annette Wüstholtz, Ralf Kinscherf und Nils Metzler-Nolte*

Der gezielte Transport von Diagnostika oder Wirkstoffen in bestimmte Zellkompartimente ist von erheblicher Wichtigkeit für die Diagnose und Behandlung von Krankheiten, insbesondere wenn man bedenkt, dass die biologischen Zielstrukturen dieser Verbindungen in aller Regel ebenfalls eindeutig lokalisiert sind (wie beispielsweise die DNA im Zellkern).

In der letzten Zeit ist der Bioorganometallchemie einige Aufmerksamkeit zuteil geworden,^[1–3] nicht zuletzt weil neue Organometallverbindungen vielversprechende Leitstrukturen gegen Tumorzellen darzustellen scheinen. So berichteten Schmalz und Mitarbeiter über Nucleosidanaloge mit einer $\{\text{Fe}(\text{CO})_3(\text{butadien})\}$ -Struktureinheit, die Apoptose zu induzieren vermögen.^[4] Ein Ferrocenderivat des bekannten Wirkstoffs Tamoxifen, Ferrocifen, zeigt eine gute cytostatische Aktivität, selbst bei hormonunabhängigen Zelllinien, die auf Tamoxifen naturgemäß nicht ansprechen.^[5,6] Weitere Beispiele sind $\{\text{Ru}(\text{aren})\}$ -Komplexe,^[7] verschiedene $\{\text{Co}(\text{CO})_2(\text{alkin})\}$ -Derivate^[8–11] und Titanocendichlorid, das bereits in klinischen Studien getestet wurde.^[12–15]

Für die meisten dieser Verbindungen ist eine Wechselwirkung mit der DNA als Wirkmechanismus vorgeschlagen worden. Obwohl die Aufnahme der Verbindungen in den Zellkern somit eine unabdingbare Voraussetzung für diesen Wirkmechanismus darstellt, wird sie üblicherweise stillschweigend vorausgesetzt und ist unseres Wissens für diese Verbindungen bisher nicht zweifelsfrei nachgewiesen worden. Eine derartige Annahme ist jedoch durchaus fragwürdig, da dem Transport jeder Verbindung in den Zellkern mindestens drei Barrieren entgegenstehen: die äußere Zellmembran, die Kernmembran sowie – für den Fall einer aktiven Aufnahme – noch die Endosomen selbst. Insbesondere Transportphänomene durch die Kernmembran sind in den letzten Jahren intensiv untersucht worden,^[16–19] wobei sowohl mechanistische Fragestellungen als auch medizinische Anwendungen im Mittelpunkt des Interesses standen.^[20,21] Ganz allgemein stellen Membranen eine erhebliche Hürde für viele Verbin-

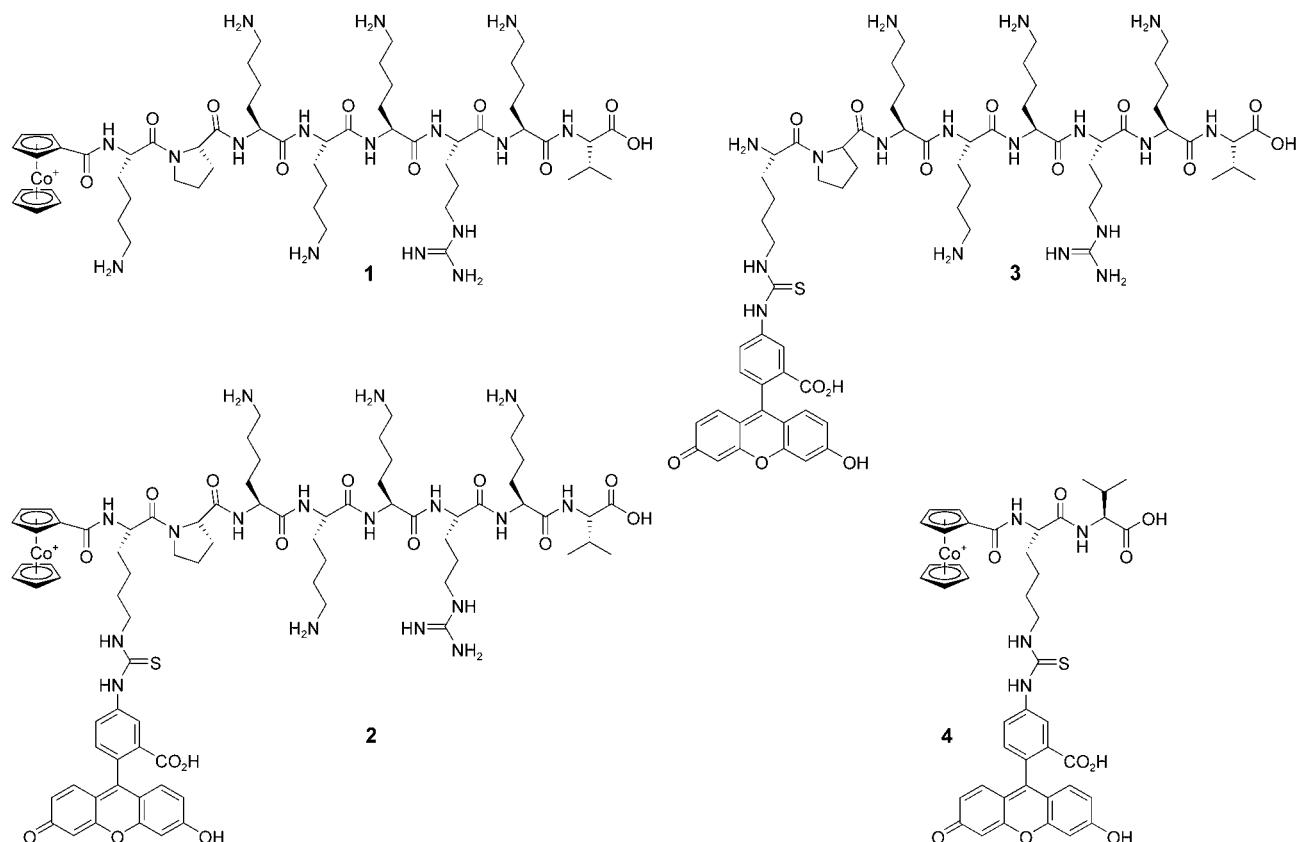
dungen dar. Niedermolekulare Verbindungen, zu denen die meisten pharmazeutischen Wirkstoffe gehören, können durch passive Diffusion in das Zellinnere gelangen. Andererseits besteht die Möglichkeit, dass sie durch P-Glycoproteine wieder aus der Zelle hinausbefördert werden, bevor sie den Zellkern erreichen können. Für Biokonjugate von Peptiden mit radioaktiven Metallen ist eine erhöhte rezeptorvermittelte Aufnahme in das Cytoplasma von Zellen, jedoch noch nicht in den Zellkern, nachgewiesen worden.^[22–25] Es gibt jedoch praktisch keine Untersuchungen über die intrazelluläre Lokalisierung von nicht-radioaktiven Metallkomplexen.

Wir berichten hier über ein Peptid-Biokonjugat einer nicht-radioaktiven Organometallverbindung, das genau für diese spezifische Aufnahme in den Zellkern entworfen wurde. Hierfür wurde das Kernlokalisationssignal (nuclear localization signal, NLS) des viralen Antigens SV40 T mit der Aminosäuresequenz H-Pro-Lys-Lys-Arg-Lys-Val-OH gewählt.^[26,27] In Proteinen dient dieses Heptapeptid als „Adressaufkleber“, mit dem der Zellkern als Bestimmungs-ort angezeigt wird. Die Sequenz bewirkt zudem für eine Vielzahl von Substraten den aktiven Transport durch die Poren der Kernmembran hindurch.^[18] Allerdings ist dieser Kerntransport nur für solche NLS-Konjugate möglich, die sich bereits im Cytoplasma befinden.^[28,17] Die NLS-Sequenz hat keinerlei positiven Einfluss auf die Aufnahme von Konjugaten in die Zellen. Selbst wenn solche Konjugate in Endosomen inkorporiert werden, so werden sie üblicherweise nicht im Zellinneren freigesetzt, sondern im Gegenteil nach einiger Zeit wieder über die äußere Zellmembran hinausbefördert.^[29] Um diesem Dilemma zu entgehen, sind kompliziertere Konstrukte eingesetzt worden, beispielsweise NLS-Konjugate mit Goldclustern oder lipophilen Peptiddomänen mit Affinität für Zellmembranen.^[30,29]

Wir präsentieren in dieser Arbeit erstmals die Möglichkeit, Organometallverbindungen wie das Cobaltocenium-Ion durch Konjugation mit dem NLS-Peptid gezielt in den Zellkern zu befördern. Die weitaus meisten Metallocen-Biokonjugate enthalten Ferrocen als Organometallverbindung.^[31] Das nahezu isostrukturelle Cobaltocenium-Ion hat ein wesentlich höheres Redoxpotential und zeigt auch größere chemische Stabilität. Wir nahmen daher an, dass Cobaltocenium-Biokonjugate mindestens genauso gut, wenn nicht sogar noch besser für physiologische Studien geeignet sein sollten. Die Fluoreszenzmikroskopie an lebenden Zellen zeigte überraschenderweise eine endosomale Aufnahme unseres Konjugats in die Zellen, gefolgt von rascher Freisetzung in das Cytoplasma. Wir konnten durch Kontrollexperimente belegen, dass diese rasche Aufnahme und Freisetzung im Zellinneren alleine durch die Cobaltoceniumgruppe in dem Konjugat bewirkt wird.

Das Cobaltocenium-NLS-Konjugat **1** (Cc-Lys-NLS, Schema 1; Cc = Cobaltoceniumcarbonsäure) wurde am Wang-Harz durch Festphasen-Peptidsynthese (solid-phase peptide synthesis, SPPS) synthetisiert. Am N-Terminus wurde ein zusätzlicher Lysinrest eingeführt. Nach der Peptidsynthese wurde die N-terminale Fmoc-Schutzgruppe (Fmoc = 9-Fluorenylmethoxycarbonyl) abgespalten und Cobaltoceniumcarbonsäure nach Aktivierung durch TBTU (TBTU = 2-(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-1,3,3-tetramethyluronio-

[*] F. Noor, A. Wüstholtz, Prof. Dr. N. Metzler-Nolte
Institut für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie
Universität Heidelberg
Im Neuenheimer Feld 364, 69120 Heidelberg (Deutschland)
Fax: (+49) 6221-54-6441
E-mail: Nils.Metzler-Nolte@urz.uni-heidelberg.de
Priv.-Doz. Dr. R. Kinscherf
Institut für Anatomie und Zellbiologie
Universität Heidelberg
Im Neuenheimer Feld 307, 69120 Heidelberg (Deutschland)
Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter
<http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.



Schema 1. In dieser Arbeit hergestellte und eingesetzte Verbindungen 1–4 (siehe *Experimentelles* und Hintergrundinformationen für Details zur Synthese und analytische Daten).

um-tetrafluoroborat) angekuppelt. Bei der Abspaltung vom Harz durch konzentrierte Trifluoressigsäure (TFA) wurden in einem Schritt auch alle Schutzgruppen an den Seitenketten der Aminosäuren entfernt. Die HPLC-Analyse zeigte ein Hauptprodukt, das durch semipräparative HPLC gereinigt und vollständig charakterisiert werden konnte (siehe Hintergrundinformationen). Verbindung 1 ist in Wasser und an Luft stabil und kann tagelang bei Raumtemperatur unzersetzt aufbewahrt werden.

Das MALDI-TOF-Massenspektrum von **1** zeigt das intensivste Signal bei m/z 1225.5 für $[M]^+$ sowie weitere Signalgruppen für $[M+K]^+$ und $[M+K+Na-H]^+$. Auch das ^1H -NMR-Spektrum von **1** zeigt charakteristische Signale, insbesondere das typische Muster des monosubstituierten Metallocens um $\delta = 6$ ppm mit einer Intensitätsverteilung von 5:2:1:1 (Abbildung 1). Die Verbindung **1** geht eine quasi-reversible Einelektronenreduktion bei -1.38 V ein (gegen Ferrocen/Ferrocenium in Acetonitril), die der Cobaltoceniumgruppe zugeordnet werden kann. Das NLS-Peptid alleine ist elektrochemisch inaktiv.

Um das Metallkonjugat in Zellen sichtbar zu machen, wurde Fluoresceinisothiocyanat (FITC) als Marker eingeführt. Hierzu wurde ein N-terminaler Lysinrest mit einer N_e -4-Methyltrityl(Mtt)-Schutzgruppe eingeführt. Das Metallocen wurde wie bei **1** angekuppelt, danach wurde die Mtt-geschützte Lysin-Seitenkette mit verdünnter TFA entschützt. Die Reaktion mit FITC am Harz ergibt das intensiv orangefarbene Cc-Lys(FITC)-NLS-Konjugat **2**.

Nach Abspaltung vom Harz und HPLC-Reinigung bestätigen die ^1H -NMR-Spektren die erwartete Zusammensetzung der Konjugate (Abbildung 1). Die Spektren der Cobaltocenium-Konjugate **1** (Mitte) und **2** (oben) zeigen die Cp-Signale um etwa $\delta = 6$ ppm zusätzlich zu den Signalen des NLS-Peptids (unten). Darüber hinaus weist nur das FITC-Konjugat **2** Signale im Arenbereich auf, die von dem Fluoreszenzfarbstoff herrühren.

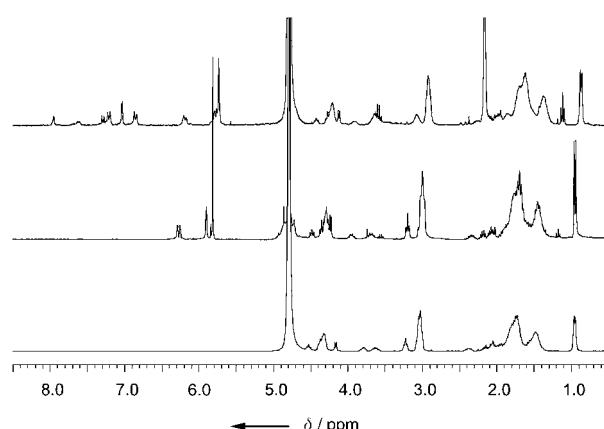


Abbildung 1. ^1H -NMR-Spektren von Cc-Lys(FITC)-NLS **2** (oben), Cc-Lys-NLS **1** (Mitte) und H-Lys-NLS (unten) in D_2O .

Es ist denkbar, dass der Fluoreszenzfarbstoff die biologischen Eigenschaften des Konjugates stärker beeinflusst als das Metallocen. Daher haben wir als Vergleichssubstanzen für die biologischen Experimente ein fluoreszenzmarkiertes NLS-Derivat ohne Metallocen (*H*-Lys(FITC)-NLS) **3** und ein verkürztes Metallocen-Dipeptid (*Cc*-Lys(FITC)-Val) **4** synthetisiert. Alle Verbindungen wurden mit SPPS in hinreichenden Mengen für die Zellaufnahmestudien erhalten und durch HPLC, MALDI-TOF-Massenspektrometrie und ¹H-NMR-Spektroskopie charakterisiert (siehe Hintergrundinformationen). Aufgrund der Lichtempfindlichkeit des Fluorescein-Farbstoffs wurden sie im Dunkeln aufbewahrt und zeitnah eingesetzt.

Wir verwendeten eine humane Leberkrebszelllinie (HepG2) für die Zellaufnahmestudien, da sie einen relativ großen Zellkern und vergleichsweise schwierig zu überwindende Zellmembranen aufweist.^[29] Die HepG2-Zellen wurden 24 h bei 37°C mit den Verbindungen **2–4** (1 mM) inkubiert und danach mit RPMI-Medium (RPMI = Roswell Park Memorial Institute) gewaschen, das 10% FBS (FBS = Fötales Rinderserum) enthielt, um alle an der Außenseite der Zellen anhaftenden Metall-Peptid-Konjugate abzulösen. Die Zellen wurden sodann zweimal mit PBS (PBS = phosphatgepufferte Salzlösung) gewaschen und 5 min mit dem Farbstoff Hoechst 33342 zur Anfärbung der Zellkerne inkubiert, gefolgt von dreimaligem Waschen mit PBS. Schließlich wurde 15 min mit dem Endosomen-Marker FM 4-64 inkubiert. Nach weiterem dreimaligem Waschen wurden die Zellen unter dem Mikroskop untersucht. Für andere kleine kationische Peptide wie Arg-reiche Sequenzen oder Tat-Peptide ist gezeigt worden, dass die Fixierung dieser Zellen vor ihrer mikroskopischen Untersuchung eine Umverteilung der Peptide auslöst, wodurch eine Lokalisierung im Zellkern vorgetäuscht wird.^[32,33] Wir haben daher in dieser Arbeit lebende Zellen unter dem Mikroskop untersucht (Abbildung 2). Während und nach den Untersuchungen wurde die Integrität der Zellwand durch Ausschluss von Propidiumiodid überprüft.

Nach Inkubation mit **2** zeigten die Zellen drei Arten von Fluoreszenz: Homogen verteilte schwache grüne Fluoreszenz im Cytoplasma, intensive punktuelle Fluoreszenz im Cytoplasma, und intensivere grüne Fluoreszenz im Kern (Abbildung 2 A). Abbildungen 2B und C zeigen die Lokalisierung der Endosomen (rot, Abbildung 2B) und der Zellkerne (blau, Abbildung 2C) in denselben Zellen. Abbildungen 2D und E sind überlagerte Bilder, die die Colokalisierung in verschiedenen Kompartimenten der Zelle verdeutlichen. Die Daten zeigen eindeutig, dass Verbindung **2** gut von den Zellen aufgenommen wird und mit dem Marker FM 4-64 in Endosomen colokalisiert ist. Dieser Befund weist auf eine aktive Aufnahme des Konjugats über Endosomen hin. Nachdem die Verbindung aus den Endosomen in das Cytoplasma gelangt

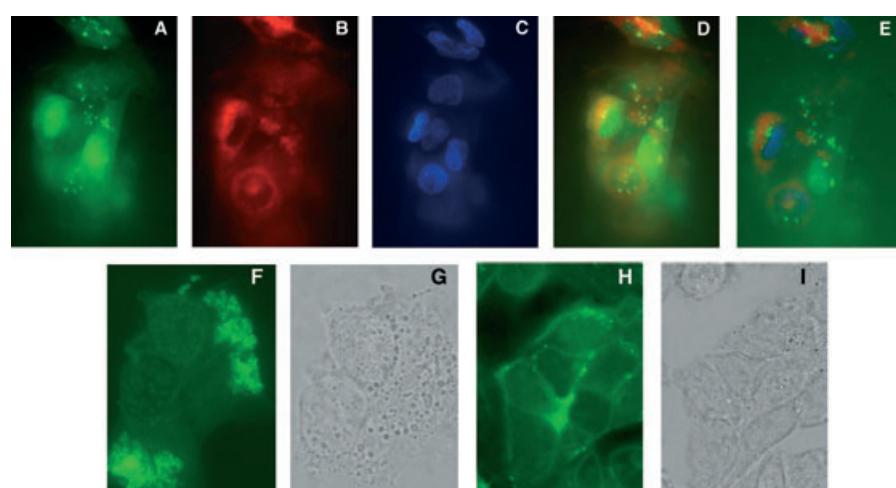


Abbildung 2. Lokalisierung von fluoreszenzmarkiertem Cobaltocenium-NLS (**2**) in lebenden HepG2-Zellen (A–E) und Verteilung der Konjugate **3** und **4** in lebenden HepG2-Zellen (F–I). Die HepG2-Zellen wurden mit den Biokonjugaten **2**, **3** und **4** (alle 1 mM) inkubiert, 5 min mit dem Farbstoff Hoechst 33342 (25 µg ml⁻¹) zum Anfärben der Zellkerne und 15 min mit dem Endosomen-Marker FM 4-64 (10 µM) behandelt. A) Biokonjugat **2** in unfixierten Zellen (grüne Fluoreszenz). B) Endosomen-Marker FM 4-64 in unfixierten Zellen (rote Fluoreszenz). C) Kernfärbung durch Hoechst 33342 (blaue Fluoreszenz). D) Colokalisierung von Biokonjugat **2** und FM 4-64 (Überlagerung der Bilder A and B). Gelbe Punkte zeigen die Lokalisierung von **2** in Endosomen. E) Colokalisierung von **2**, FM 4-64 und Hoechst 33342 (Überlagerung der Bilder A, B und C). F) Konjugat **3** in unfixierten HepG2-Zellen. G) Lichtmikroskopiebild der Zellen von (F). H) Konjugat **4** in unfixierten HepG2-Zellen. I) Lichtmikroskopiebild der Zellen von (H). (630-fache Vergrößerung, siehe Text und Hintergrundinformationen für Diskussion und experimentelle Details).

ist, reichert sie sich im Zellkern an, wie dies für Konjugate mit dem NLS-Peptid zu erwarten ist.

Die Verbindungen **3** und **4** hingegen zeigen wesentlich geringere Fluoreszenz im Cytoplasma und praktisch keine Fluoreszenz im Zellkern. Bei den mit der metallfreien Verbindung **3** inkubierten Zellen fanden wir, dass die Verbindung zum weit überwiegenden Teil in Endosomen eingeschlossen ist; daher ist im Cytoplasma nur sehr wenig Fluoreszenz zu erkennen (Abbildung 2F und G). Das Metallocen-Dipeptid **4** wiederum scheint durch passive Diffusion durch die Zellmembran zum geringen Teil in das Cytoplasma zu gelangen, findet von dort aber keinen Zutritt in den Zellkern (Abbildung 2H und I).

Alle drei Verbindungen zeigen auch extrazellulär punktuelle Fluoreszenz, die an der äußeren Zellmembran lokalisiert zu sein scheint. Eine solche Assoziation mit der Zellmembran ist charakteristisch für kationische Peptide und der erste Schritt vor der Aufnahme in Zellen. Von dort wird nur das Konjugat **2** in nennenswertem Maße internalisiert, wohingegen die Zellmembran eine Barriere für **4** und in etwas geringerem Maße auch für **3** darstellt. Wie oben beschrieben, scheint das metallfreie Konjugat **3** jedoch selbst nach Aufnahme in Endosomen diese nicht verlassen zu können. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen früherer Untersuchungen, dass zellgängige Peptide nach Endocytose häufig in Endosomen eingeschlossen bleiben,^[29,33–37] was schließlich ihre Lokalisierung im Kern verhindert. Es ist gezeigt worden, dass NLS-vermittelter Transport in den Zellkern nur aus dem Cytoplasma heraus möglich ist. Für diesen Mechanismus ist es also absolut notwendig, dass die

NLS-Konjugate im Zellinneren aus den Endosomen, möglicherweise über späte Endosomen und Lysosomen,^[38,39] wieder freigesetzt werden. Genau dies ist in unserem Beispiel nur dem Konjugat **2** möglich.

Wir haben in dieser Arbeit über die erste Synthese eines Cobaltocenium-Peptidkonjugats mit einer Kernlokalisierungssequenz (NLS) durch Festphasen-Peptidsynthese berichtet. Die Biokonjugate sind aufgrund der ausgezeichneten Stabilität der Cobaltoceniumgruppe unter physiologischen Bedingungen sehr gut für biologische Studien geeignet. Das Cobaltocenium-NLS-Konjugat reichert sich signifikant im Zellkern von HepG2-Zellen an. Unseres Wissens ist dies die erste Studie zur intrazellulären Lokalisierung nicht-radioaktiver Organometall-Biokonjugate.^[25] Dilworth und Mitarbeiter berichteten über die intrazelluläre Verteilung eines Zink-bis(thiosemicarbazone)-Komplexes.^[40] Darüber hinaus zeigt sich, dass die metallorganische Gruppe in unseren Konjugaten essenziell für die aktive Aufnahme des Biokonjugats in das Cytoplasma durch Endozytose ist. Das metallorganische Biokonjugat **2** zeigt somit eine interessante Kombination von metallvermittelter Zellaufnahme und peptidvermitteltem Kerntransport. Dass Organometallverbindungen zu einer verbesserten Aufnahme von Biokonjugaten führen können, ist eine neue und unerwartete Facette der Bioorganometallchemie. Sie könnte von erheblichem Nutzen sein, da die Cobaltoceniumgruppe relativ klein, chemisch stabil und dabei einfach zu handhaben ist. Wir untersuchen, inwieweit dies eine generelle Eigenschaft von Organometallverbindungen sein könnte, und prüfen mögliche Anwendungen für weitere biologische Untersuchungen.

Experimentelles

Die Biokonjugate wurden mit der Fmoc-Strategie nach SPPS-Standardsmethoden hergestellt. Mit Valin beladenes Wang-Harz (Fmoc-Val, 300 mg, 0.51 mmol g⁻¹) wurde 1 h in DMF (DMF = Dimethylformamid) gequollen. Die Aminosäuren (Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH und Fmoc-Pro-OH; Boc = *tert*-Butoxycarbonyl, Pbf = 2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl) wurden in dreifachem Überschuss nach 1 min Voraktivierung mit TBTU und HOBr (HOBr = N-Hydroxybenzotriazol) zugegeben. Fmoc-Schutzgruppen wurden durch Piperidin (20% in DMF) abgespalten. Am Ende der NLS-Sequenz (PKKKRKV) wurde Fmoc-Lys(Mtt)-OH als Linker und Ankergruppe für die Fluoreszenzmarkierung in den Verbindungen **2**, **3** und **4** angefügt. Cobaltoceniumcarbonsäure wurde nach der gleichen Vorschrift wie die Aminosäuren, jedoch mit längerer Reaktionszeit, gekuppelt; die erfolgreiche Kupplung des Metallocens ist an der Gelbfärbung des Harzes erkennbar. Das Harz wurde mehrfach mit DMF und CH₂Cl₂ gewaschen und mit MeOH geschrumpft. Vor dem Abspalten des Biokonjugats wurde das Harz sorgfältig unter Vakuum über KOH getrocknet. Zur Abspaltung wurde zum Harz eine Mischung aus 95% TFA, 2.5% TIS (TIS = Triisopropylsilan) und 2.5% H₂O zugegeben. Das Biokonjugat wurde mit kaltem Diethylether ausgefällt, getrocknet und lyophilisiert. Rohausbeute: 120 mg (für **1**). Nach der Reinigung durch präparative HPLC wird **1** als schwachgelber Feststoff erhalten, der sich in Wasser und Ethanol gut löst. MALDI-TOF-MS: *m/z*: 1225.5 [M⁺] (ber. für C₅₇H₉₈CoN₁₆O₁₀; *m/z*: 1225.7 [M⁺]). Square-Wave-Voltammetrie (MeCN, 0.1 M Bu₄NPF₆, FcH/FcH⁺): E_{1/2} = -1.38 V. ¹H-NMR (D₂O, 300.13 MHz, 25 °C): δ = 6.29 (s, 1 H, C₅H₄), 6.25 (s, 1 H, Cp), 5.89 (pseudo-t, 2 H, C₅H₄), 5.81 (s, 5 H, Cp), 4.5–4.1 (überlappende m, 8 H, alle H_a), 3.96 (m, 1 H, H_{δ,Pro}), 3.62 (m, 1 H, H_{δ,Pro}), 3.19 (pseudo-t, 2 H,

H_{δ,Arg}), 2.95–2.85 (m, 10 H, H_{ε,Lys}), 2.4–2.0 (m, 5 H, H_{β,Pro}, H_{γ,Pro}, H_{β,Val}), 1.96–1.34 (m, 34 H, H_β, H_γ, H_δ (alle Lys), H_{β,Arg}, H_{γ,Arg}), 0.93 ppm (d, J = 7 Hz, 6 H, CH_{3,Val}).

Hintergrundinformationen: Angaben zur Synthese und analytische Daten für **1–4**, HPLC und MS, sowie Details zur Zellkultur und Mikroskopie.

Eingegangen am 4. November 2004

Online veröffentlicht am 10. März 2005

Stichwörter:

Bioanorganische Chemie · Bioorganometallchemie · Cobalt · Fluoreszenzmikroskopie · Metallocene · Peptide

- [1] G. Jaouen, A. Vessières, I. S. Butler, *Acc. Chem. Res.* **1993**, *26*, 361–369.
- [2] N. Metzler-Nolte, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 1072–1076; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 1040–1044.
- [3] D. R. van Staveren, N. Metzler-Nolte, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **2002**, 1406–1407.
- [4] D. Schlawe, A. Majdalani, J. Velicky, E. Heßler, T. Wieder, A. Prokop, H.-G. Schmalz, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 1763–1766; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1731–1734.
- [5] G. Jaouen, S. Top, A. Vessières, G. Leclercq, J. Quivy, L. Jin, A. Croisy, *C. R. Acad. Sci. Ser. IIc* **2000**, *3*, 89–93.
- [6] a) S. Top, A. Vessières, G. Leclercq, J. Quivy, J. Tang, J. Vaissermann, M. Huché, G. Jaouen, *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 5223–5236; b) G. Jaouen, S. Top, A. Vessières, G. Leclercq, M. J. McGlinchey, *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11*, 2505–2517.
- [7] R. E. Morris, R. E. Aird, P. del Socorro Murdoch, H. Chen, J. Cummings, N. D. Hughes, S. Parsons, A. Parkin, G. Boyd, D. I. Jodrell, P. J. Sadler, *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 3616–3621.
- [8] M. Jung, D. E. Kerr, P. D. Senter, *Arch. Pharm.* **1997**, *330*, 173–176.
- [9] K. Schmidt, M. Jung, R. Keilitz, B. Schnurr, R. Gust, *Inorg. Chim. Acta* **2000**, *306*, 6–16.
- [10] T. Roth, C. Eckert, H.-H. Fiebig, M. Jung, *Anticancer Res.* **2002**, *22*, 2281–2284.
- [11] I. Ott, B. Kircher, R. Gust, *J. Inorg. Biochem.* **2004**, *98*, 485–489.
- [12] H. Köpf, P. Köpf-Maier, *Angew. Chem.* **1979**, *91*, 509; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1979**, *18*, 477–478.
- [13] P. Köpf-Maier, B. Hesse, R. Voigtlander, H. Köpf, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **1980**, *97*, 31–39.
- [14] A. Harstrick, H.-J. Schmoll, G. Sass, H. Poliwoda, Y. Rustum, *Eur. J. Cancer* **1993**, *29A*, 1000–1002.
- [15] J. R. Boyles, M. C. Baird, B. G. Campling, N. Jain, *J. Inorg. Biochem.* **2001**, *84*, 159–162.
- [16] D. Görlich, I. W. Mattaj, *Science* **1996**, *271*, 1513–1518.
- [17] Y. Yoneda, A. Kametaka, T. Sekimoto, *Acta Histochem. Cytochem.* **2002**, *35*, 435–440.
- [18] S. Nakielny, G. Dreyfuss, *Cell* **1999**, *99*, 677–690.
- [19] D. Görlich, U. Kutay, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **1999**, *15*, 607–660.
- [20] R. Cartier, R. Reszka, *Gene Ther.* **2002**, *9*, 157–167.
- [21] D. A. Jans, C. K. Chan, S. Huebner, *Med. Res. Rev.* **1998**, *18*, 189–223.
- [22] S. Liu, D. S. Edwards, J. A. Barrett, *Bioconjugate Chem.* **1997**, *8*, 621–636.
- [23] a) M. Langer, R. La Bella, E. Garcia-Garayoa, A. G. Beck-Sickinger, *Bioconjugate Chem.* **2001**, *12*, 1028–1034; b) P. Bläuer-enstein, E. G. Garayoa, D. Rüegg, A. Blanc, D. Tourwé, A. G. Beck-Sickinger, P. A. Schubiger, *Cancer Biother. Radiopharm.* **2004**, *19*, 181–188.

- [24] M. Henze, J. Schuhmacher, A. Dimitrakopoulou-Strauss, L. G. Strauss, H. R. Macke, M. Eisenhut, U. Haberkorn, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2004**, *31*, 466–.
- [25] K. E. Bullok, M. Dyszlewski, J. L. Prior, C. M. Pica, V. Sharma, D. Piwnica-Worms, *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 1226–1237.
- [26] C. M. Feldherr, R. E. Lanford, D. Akin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 11002–11005.
- [27] E. Conti, M. Uy, L. Leighton, G. Blobel, J. Kuriyan, *Cell* **1998**, *94*, 193–204.
- [28] Y. Yoneda, M. Hieda, E. Nagoshi, Y. Miyamoto, *Cell Struct. Funct.* **1999**, *24*, 425–433.
- [29] A. G. Tkachenko, H. Xie, D. Coleman, W. Glomm, J. Ryan, M. F. Anderson, S. Franzen, D. L. Feldheim, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4700–4701.
- [30] L. Chaloin, P. Vidal, P. Lory, J. Méry, N. Lautredou, G. Divita, F. Heitz, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *243*, 601–608.
- [31] D. R. van Staveren, N. Metzler-Nolte, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 5931–5985.
- [32] M. Lundberg, M. Johansson, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *291*, 367–371.
- [33] J. P. Richard, K. Melikov, E. Vives, C. Ramos, B. Verbeure, M. J. Gait, L. V. Chernomordik, B. Lebleu, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 585–590.
- [34] M. Lundberg, S. Wikström, M. Johansson, *Mol. Ther.* **2003**, *8*, 143–150.
- [35] S. Console, C. Marty, C. Garcia-Echevarria, R. Schwendener, K. Ballmer-Hofer, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 35109–35114.
- [36] S. D. Kramer, H. Wunderli-Allenspach, *Biochim. Biophys. Acta* **2003**, *1609*, 161–169.
- [37] G. Drin, S. Cootin, E. Blanc, A. R. Rees, J. Temsamani, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 31192–31201.
- [38] M. Sachse, G. Ramm, G. Strous, J. Klumperman, *Histochem. Cell Biol.* **2002**, *117*, 91–104.
- [39] J. Gruenberg, H. Stenmark, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, *5*, 317–323.
- [40] A. R. Cowley, J. Davis, J. R. Dilworth, P. S. Donnelly, R. Dobson, A. Nightingale, J. M. Peach, B. Shore, D. Kerr, L. Seymour, *Chem. Commun.* **2005**, 845–847.