

**Neele Appel**

**Spezifische Tumorthherapie durch Rezeptorvermittelte RNA Interferenz**

**2017**

Biologie

**Spezifische Tumorthherapie durch Rezeptorvermittelte RNA Interferenz**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von  
*Neele Appel*  
aus *Osnabrück*  
2017

Dekan:	Prof. Dr. Christian Klämbt
Erster Gutachter:	Prof. Dr. Wolfgang E. Berdel
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. Wolf-Michael Weber
Tag der mündlichen Prüfung:	19.01.2018
Tag der Promotion:	09.02.2018

## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>1</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>4</b>
<b>1.1 Krebsentstehung und Behandlungsstrategien.....</b>	<b>4</b>
<b>1.2 Das Kolorektalkarzinom .....</b>	<b>7</b>
<b>1.3 Das Ewing Sarkom .....</b>	<b>9</b>
<b>1.4 Die RNA Interferenz und die Auslöser miRNA und siRNA.....</b>	<b>11</b>
<b>1.5 siRNA-Einsatz in der Krebstherapie.....</b>	<b>14</b>
1.5.1 siRNA-Transport über Liposomen.....	15
1.5.2 Nanopartikel .....	16
1.5.3 siRNA-Transport über Antikörper-Konjugate .....	17
<b>1.6 Verwendete Zielrezeptoren für Antikörper im Rahmen dieser Arbeit .....</b>	<b>19</b>
1.6.1 Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) .....	20
1.6.2 Insulin-like Growth Factor 1 Receptor (IGF-1R).....	22
1.6.3 CD99-Rezeptor.....	24
<b>1.7 Eingesetzte monoklonale Antikörper als siRNA-Shuttle.....</b>	<b>24</b>
1.7.1 Der EGFR Antikörper Cetuximab .....	24
1.7.2 Der IGF-1R Antikörper GR11L .....	25
1.7.3 Der CD99 Antikörper hCD99 .....	25
1.7.4 Der IGF-1R Antikörper A12 V1.....	25
<b>1.8 Verwendete siRNAs .....</b>	<b>25</b>
<b>1.9 Ziele der Arbeit .....</b>	<b>26</b>
1.9.1 Ansatz Kolorektalkarzinom .....	27
1.9.2 Ansatz Ewing Sarkom.....	28
1.9.3 Kolokalisation von siRNA mit Endosom oder Lysosom.....	29
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>30</b>
<b>2.1 Material .....</b>	<b>30</b>
2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterial.....	30
2.1.2 Puffer, Lösungen, Medien .....	35
2.1.3 Chemikalien .....	39
2.1.4 Plasmide.....	41
2.1.5 Eingesetzte siRNA .....	41
2.1.6 Primer .....	42
2.1.7 Zelllinien.....	43
2.1.8 Enzyme.....	43
2.1.9 Antikörper .....	43
2.1.10 Kits .....	45
<b>2.2 Methoden .....</b>	<b>46</b>
2.2.1 Produktion des humanen IGF-1R Antikörpers A12.....	46
2.2.2 Kopplung von Protamin an Antikörper.....	50
2.2.3 Überprüfung der siRNA-Bindemöglichkeit mittels Band-Shift Assay .....	52
2.2.4 Überprüfung Rezeptorinternalisierung mittels FACS .....	54
2.2.5 Coomassiefärbung der Proteingele .....	56
2.2.6 Alexa488-siRNA-Internalisierung.....	57
2.2.7 Behandlungseinfluss von Antikörper-Protamin-siRNA-Komplex auf Koloniebildung der Zielzellen im Colony Formation Assay .....	58
2.2.8 Überprüfung des Behandlungseinflusses von Antikörper-Protamin-siRNA-Komplex auf den Stoffwechsel der Zielzellen mit Hilfe des MTS Assays .....	60

2.2.9 Behandlung der Tumorzellen mit dem Antikörper-siRNA-Komplex für Western Blot, Annexin V- oder BrdU-Assays .....	62
2.2.10 Annexin V Assay - Behandlungseinfluss von Antikörper-Protamin-siRNA-Komplex auf die Apoptose von Zielzellen.....	63
2.2.11 BrdU Assay - Behandlungseinfluss von Antikörper-Protamin-siRNA-Komplex auf den Zellzyklus der Zielzellen .....	63
2.2.12 Nachweis des Proteinknockdowns nach Antikörper-siRNA-Komplex-Behandlung mit Hilfe eines Western Blots.....	64
2.2.13 Nachweis des mRNA-Knockdowns nach Antikörper-siRNA-Komplex-Behandlung mit Hilfe der Real-Time-PCR.....	67
2.2.14 <i>In vivo</i> Xenograft für den Nachweis der Tumorstillung nach Antikörper-siRNA-Komplex-Behandlung.....	69
2.2.15 Nachweis des Proteinknockdowns nach A12-V1-EWS/FLi1-siRNA-Komplex-Behandlung im Tumor mit Hilfe eines Western Blots.....	70
2.2.16 Klonierung des A12-V1 Produktionsvektors pcDNA3.1(+)/A12-Version-1-G2A-EGFP .....	71
2.2.17 Immunfluoreszenzfärbungen für die Untersuchung der Kollokalisierung von fluoreszierender siRNA mit frühen Endosomen oder Lysosomen.....	75
2.2.18 Zellkultur .....	76
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>78</b>
<b>3.1 Antikörper- und rezeptorvermittelter siRNA-Einsatz im KRAS-mutierten Kolorektal-karzinom .....</b>	<b>78</b>
3.1.1 EGFR-Antikörper Cetuximab bindet siRNA und initiiert Rezeptorinternalisierung von EGFR .....	78
3.1.2 EGFR-Antikörper Cetuximab-Protamin transportiert fluoreszierende siRNA in Kolorektalkarzinomzellen .....	80
3.1.3 Knockdown von KRAS auf Proteinebene und Wachstumsreduktion von Kolorektalkarzinomzellen nach <i>in vitro</i> Behandlung mit Cetuximab-Protamin-KRAS-esiRNA .....	82
3.1.4 Die Cetuximab-Protamin-KRAS-esiRNA-Behandlung wirkt sich auf die Zell-proliferation aus, weitere Nachweise durch zusätzliche Viabilitäts-, Proliferations- und Apoptoseassays.....	85
3.1.5 Wachstumsreduktion von subkutanen Kolorektalkarzinomen in CD1 Nacktmäusen nach Cetuximab-Protamin-KRAS-esiRNA Behandlung <i>in vivo</i> .....	88
<b>3.2 Antikörper- und rezeptorvermittelter siRNA-Einsatz in der Ewing Sarkom Therapie.....</b>	<b>91</b>
3.2.1 Der IGF1-R Antikörper GR11L als Transportmöglichkeit für siRNAs in Ewing Sarkom Zellen .....	91
3.2.2 Der CD99 Antikörper hCD99 als Transportmöglichkeit für siRNAs in Ewing Sarkom Zellen99	
3.2.3 Der selbstproduzierte IGF-1R Antikörper A12 V1 als Transportmöglichkeit für siRNAs in Ewing Sarkom Zellen.....	109
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>124</b>
4.1 Einsatz von siRNA in der Krebstherapie .....	124
4.2 siRNA-Therapie beim Kolorektalkarzinom.....	129
4.3 siRNA-Therapie beim Ewing Sarkom .....	133
4.4 Zusammenfassung .....	137
4.5 Ausblick.....	138
<b>5. Summary .....</b>	<b>140</b>
<b>6. Danksagung .....</b>	<b>141</b>
<b>7. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>143</b>
<b>8. Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>149</b>
<b>9. Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>151</b>

<b>10. Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>152</b>
<b>11. Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>154</b>

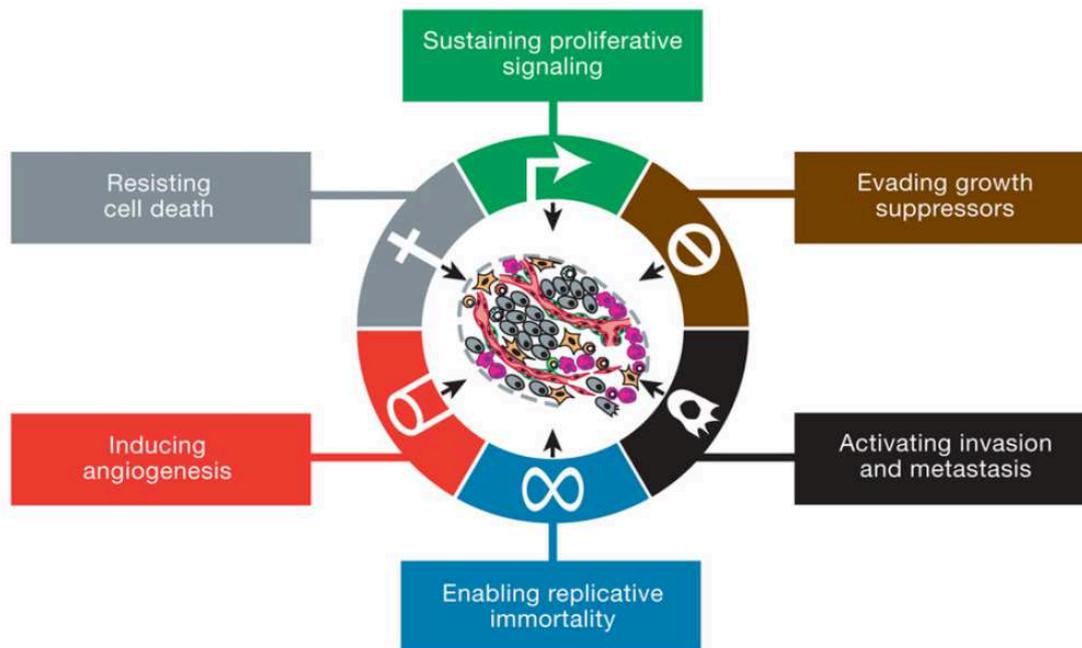
# 1. Einleitung

## 1.1 Krebsentstehung und Behandlungsstrategien

Eine gesunde Körperzelle in einem Gewebeverband teilt sich, differenziert sich, altert bis zu einem bestimmten Zeitpunkt und stirbt dann den programmierten Zelltod, die Apoptose. Die Zellteilung ist dabei ein hochregulierter Prozess, der an vielen Stellen in der Zelle und durch Zell-Zellkommunikation untereinander reguliert und kontrolliert wird <sup>[15]</sup>. Bei einer Krebszelle ist dieser hochregulierte intrazelluläre Kontrollprozess gestört <sup>[5,15,44]</sup>. Die Ursache liegt in einer Mutation oder in epigenetischen Aberrationen. Bei den Mutationen, die zu der Entstehung von Krebszellen führen, handelt es sich meistens um Mutationen in Protoonkogenen oder Tumorsuppressorgenen <sup>[44]</sup>. Protoonkogene sind Vorstufen von Onkogenen, die in ihrer ursprünglichen Form keinen Krebs auslösen. Erst wenn es zu einer Mutation innerhalb eines solchen Gens kommt, entwickelt es das Potential Krebs auszulösen <sup>[15,44]</sup>. Die Proteine, für die diese Gene codieren, sind vor allem Bausteine, die an der Regulation der Zellproliferation beteiligt sind, wie Wachstumsfaktoren, Transkriptionsfaktoren, Komponenten intrazellulärer Signalweiterleitung oder Rezeptoren. Durch eine Mutation in diesen Protoonkogenen wird die Zellteilung und damit auch unkontrolliertes Zellwachstum angeregt <sup>[15,44]</sup>. Tumorsuppressorgene hingegen codieren für Proteine, die für die Kontrolle der Zellteilung zuständig sind und so die Proliferation von Zellen im richtigen Rahmen halten <sup>[15,44]</sup>. Entsteht eine Mutation in einem Tumorsuppressorgen, durch die das abgelesene Protein die Zellteilung nicht mehr hemmen kann, kommt es zu unkontrolliertem Zellwachstum <sup>[15,44]</sup>. Somit führen sowohl Mutationen in Protoonkogenen als auch Mutationen in Tumorsuppressorgenen zu der unkontrollierten Teilung von körpereigenen Zellen und Krebs entsteht. Doch unkontrolliertes Zellwachstum ist nicht der einzige Faktor, der Krebs beschreibt. Hanahan und Weinberg haben sechs Merkmale aufgestellt, die die Entstehung eines malignen Tumors beschreiben (siehe Abbildung 1) <sup>[5]</sup>. Das erste und auch bedeutendste Merkmal ist, dass Krebszellen ihre Proliferation konstant aufrecht halten. Die Produktion von Zellwachstums- und Proliferationsignalen unterliegen in gesunden Zellen einer strikten Kontrolle. Diese Kontrolle über die Anregung zur Zellteilung haben Krebszellen durch Mutationen in Protoonkogenen verloren. Es kommt zu unkontrolliertem Zellwachstum und zu unkontrollierter Proliferation <sup>[5,44]</sup>. Dieses Merkmal führt direkt zum zweiten Kennzeichen der Tumorentstehung. Tumoren sind in der Lage sich der Hemmung der Proliferation zu entziehen. Dafür sind die Mutationen in den Tumorsuppressorgenen verantwortlich. Erreichen gesunde Zellen ihr Proliferationsmaximum, wird die Proliferation durch Tumorsuppressoren gehemmt. In Krebszellen funktioniert dieser Kontrollmechanismus nicht und die unkontrollierte Zellproliferation kann nicht

## 1. Einleitung

gestoppt werden <sup>[5]</sup>. Doch sie entziehen sich nicht nur der Hemmung der Zellteilung, sondern sind auch nicht empfänglich für Apoptosesignale und es kommt so in Krebszellen nicht zur Einleitung des programmierten Zelltodes. Das ist Punkt drei in Hanahan und Weinbergs Aufzählung.



**Abbildung 1: Sechs Merkmale der Tumorentstehung**

Zu den sechs Merkmalen der Krebsentstehung gehören nach Hanahan und Weinberg unkontrolliertes Zellwachstum, das Entziehen der Proliferationshemmung, das Umgehen der Apoptose, Unsterblichkeit der Zellen, eigene Angiogenese und das Eindringen in andere Gewebe und die damit verbundene Metastasierung. *Entnommen aus [5]*

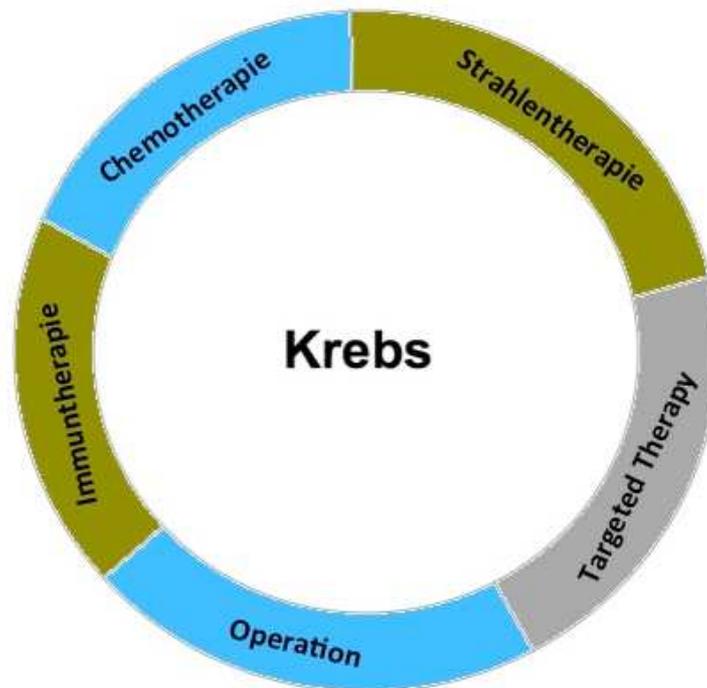
Punkt vier ist das Erreichen eines unsterblichen Zustands. Gesunde Körperzellen teilen sich bis zu einem gewissen Zeitpunkt und altern bis sie schließlich sterben. Bei einer Krebszelle setzt dieser Alterungsprozess, der mit dem Tod der Zelle endet, nicht ein. Um die Versorgung der Tumorzellen zu gewährleisten kommt es bei der Entstehung eines Tumors zur Angiogenese. Das ist das fünfte Merkmal der Krebsentstehung. Der Tumor bildet Blutgefäße aus, die sich mit dem Blutkreislaufsystem des Erkrankten verbinden, um mit ausreichend Nährstoffen versorgt zu sein. Das sechste Merkmal ist die Fähigkeit der Metastasierung. Die Zellen eines malignen Tumors sind in der Lage in andere Gewebe einzudringen und dort ebenfalls Tumoren, Metastasen, auszubilden. So kann der ganze Körper von Krebszellen befallen werden <sup>[5,44]</sup>.

Diese sechs Merkmale der Tumorentstehung stellen in ihrer Reihenfolge gleichzeitig den Verlauf einer Krebserkrankung dar.

Für die Behandlung einer Krebserkrankung gibt es aktuell fünf Hauptbehandlungsstrategien. Die erste Wahl ist meist die operative Entfernung des Tumors. Doch nicht immer ist ein Tumor gut zugänglich für eine Operation oder die Resektion des Tumors kann nur teilweise erfolgen und ein Rest der bösartigen Zellen verbleibt im Körper. An dieser Stelle kommen dann die vier weiteren

## 1. Einleitung

Behandlungsansätze zum Einsatz. Zu diesen Strategien gehören die Chemotherapie, die Strahlentherapie, die Immuntherapie und mittlerweile auch die sogenannte *Targeted Therapy* <sup>[i,ii]</sup>.



**Abbildung 2: Die fünf Hauptbehandlungsansätze von Krebs**

Zu den fünf Hauptbehandlungsansätzen von Krebs gehören die operative Entfernung eines Tumors, die Chemotherapie, die Strahlentherapie, die Immuntherapie und mittlerweile auch die sogenannte *Targeted Therapy*.

Bei der Chemotherapie werden dem Patienten Zytostatika verabreicht, die sich gegen sich teilende Zellen richten und deren Zelltod herbeiführen. Dabei kommt es häufig zu Nebenwirkungen in Form von Haarausfall und Übelkeit, da sich die Zytostatika gegen alle sich teilenden Zellen des Körpers richten und damit auch Haarfollikel oder Epithelzellen des Darms treffen <sup>[15,44]</sup>.

Bei der Strahlentherapie werden ionisierende und hochenergetische Strahlen wie Röntgen- oder Gammastrahlen genutzt. Sie werden direkt auf den Tumor gerichtet und erzeugen Schäden wie zum Beispiel Doppelstrangbrüche in der DNA der Tumorzellen. Die Schädigung der DNA erfolgt in einem solchen Ausmaß, dass die Zellen ihre Teilungsfähigkeit verlieren <sup>[45]</sup>.

Bei einer Immuntherapie wird die Immunantwort des Körpers in die Bekämpfung des Tumors mit einbezogen. Es wird unterschieden zwischen aktiver und passiver Immunisierung. Bei der aktiven Immunisierung nimmt der Patient ein Medikament ein, das zu einer verstärkten Immunantwort des Körpers führt und sich so auch gegen die Krebszellen richtet. Die Immunantwort soll dabei so groß ausfallen, dass die Tumorzellen zum Wachstumsstillstand gezwungen werden oder sogar absterben. Bei der passiven Immunisierung werden die Tumorzellen durch die Einnahme von bestimmten Antikörpern für das Immunsystem markiert und können so von Immunzellen abgebaut werden. Doch Antikörper dienen nicht nur der Markierung von Tumorzellen, wenn sie an der richtigen Stelle eines

## 1. Einleitung

Rezeptors binden, können sie auch ganze Proliferationssignalwege inhibieren und so zu einem Wachstumsstillstand verhelfen <sup>[i,ii,44]</sup>.

Dieser Ansatz gehört zum fünften und neuesten Therapieansatz, der *Targeted Therapy*. Diese Therapiestrategie zielt auf die Bekämpfung der Krebszellen ab, indem sie deren Unterschiede zu gesunden Körperzellen ausnutzt. Dies geschieht meistens auf Gen-Ebene, da hier die Mutationen sitzen, die eine gesunde Körperzelle in eine Krebszelle wandeln <sup>[i]</sup>. Das Einschleusen von Toxinen in Krebszellen über Rezeptoren, die diese Krebszellen überexprimiert auf ihrer Oberfläche tragen, gehört ebenfalls zu den Strategien der *Targeted Therapy* <sup>[i]</sup>.

In den meisten Fällen ist eine Therapiestrategie allein nicht ausreichend, um den Krebs zu bekämpfen, weshalb meist mehrere Behandlungsstrategien so kombiniert werden, dass sie zum größtmöglichen Erfolg in der Bekämpfung der Krebserkrankung führen <sup>[i,ii,15,44]</sup>. Der Therapieansatz, der in dieser Arbeit vorgestellt wird, gehört zu der *Targeted Therapy* und wird in Abschnitt 1.5.3 näher beschrieben.

Da jede Körperzelle von einer Mutation betroffen sein kann, gibt es ein großes Feld von Krebsformen. In dieser Arbeit wird ein neuer Therapieansatz bei zwei verschiedenen Krebsformen angewendet. Die Etablierung des Therapieansatzes findet an soliden Tumoren statt. Die erste Krebsform ist dabei das Kolorektalkarzinom. Ein besonderes Augenmerk wird dabei auf Kolorektalkarzinome mit einer KRAS-Mutation gelegt. Die zweite Krebsform ist das Ewing Sarkom, eine Knochenkrebsform, die hauptsächlich bei Kindern und jungen Erwachsenen auftritt.

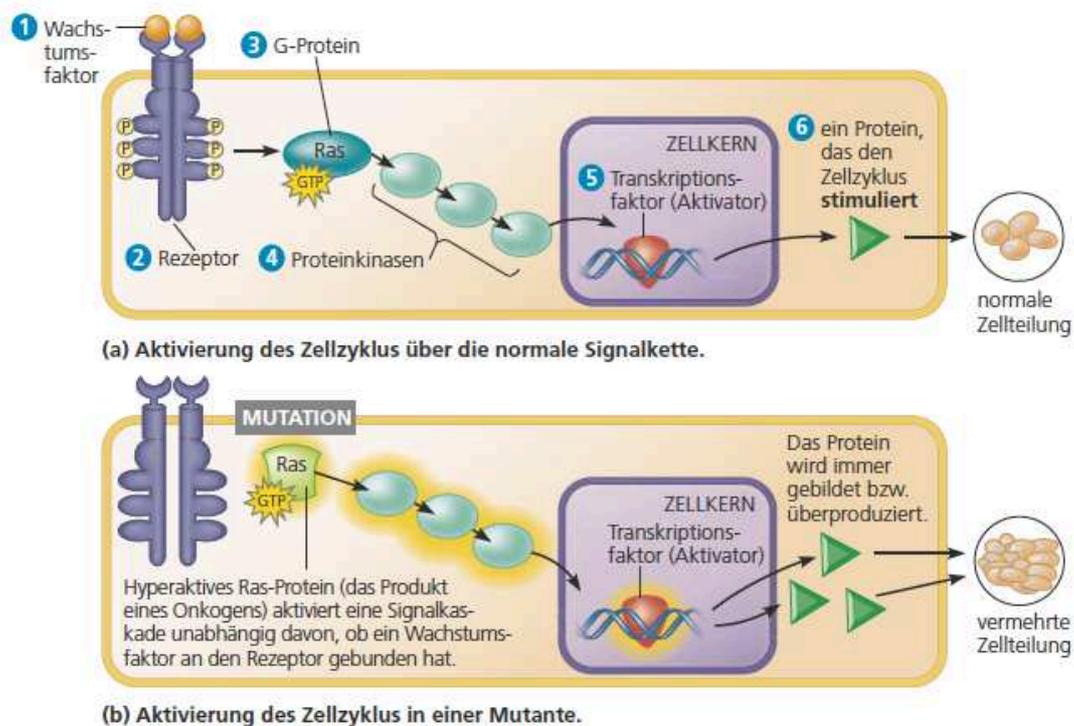
### 1.2 Das Kolorektalkarzinom

Die erste Krebsform, die in dieser Arbeit behandelt wird, ist das Kolorektalkarzinom (CRC) mit einer Mutation im *KRAS*-Gen. Im Allgemeinen erkranken jährlich bis zu 2 Millionen Menschen weltweit am Kolorektalkarzinom <sup>[46]</sup>. CRC gehört neben Lungenkrebs, Prostatakrebs und Brustkrebs zu den häufigsten Krebserkrankungen weltweit <sup>[48]</sup>. Das Durchschnittsalter von Kolorektalkarzinompatienten liegt bei ca. 70 Jahren. Bei 35 - 45 % der Erkrankten ist dabei das *KRAS*-Gen mutiert <sup>[39,47]</sup>. Die häufigsten Mutationen betreffen dabei Codon 12 und 13 <sup>[39,47]</sup>. Die Mutationen, die in dieser Arbeit behandelt werden, sind G13D und G12V (siehe Tabelle 6).

Operation und Chemotherapie sind die erste Wahl für die Behandlung eines Kolorektalkarzinoms <sup>[46]</sup>. In den Jahren 2004 und 2007 wurden unter anderem zwei Antikörper von der FDA für die Behandlung von CRC zugelassen <sup>[47]</sup>. Bei den beiden Antikörpern handelt es sich um Cetuximab (2004) und Panitumumab (2007). Beide Antikörper sind gegen den EGF-Rezeptor gerichtet, blockieren seine Ligandenbindung, hemmen die Signalweiterleitung des Rezeptors und inhibieren somit die Zellteilung der Kolorektalkarzinomzellen <sup>[47]</sup>. Diese Möglichkeit der *Targeted Therapy* bot

## 1. Einleitung

eine vielversprechende weitere Behandlungskomponente, da bei 80 % der CRC-Patienten EGFR auf der Zelloberfläche überexprimiert ist. Doch erste klinische Studien wiesen eine geringe Gesamteffizienz auf, bis man herausfand, dass KRAS-mutierte Tumore resistent gegen diese Antikörpertherapie sind <sup>[47]</sup>. KRAS ist als kleine GTPase ein Teil der RAS/RAF/MEK/ERK-Signalkaskade, die durch die Aktivierung des EGF-Rezeptors in Gang gesetzt wird und die Proliferation anregt (siehe Abbildung 3a) <sup>[22]</sup>. Cetuximab und Panitumumab blockieren den Signalweg direkt am Rezeptor. In seiner mutierten Form ist KRAS dauerhaft aktiviert und leitet permanent das Signal zur Zellteilung weiter (siehe Abbildung 3b) <sup>[39,47]</sup>. Die mutierten Krebszellen sind somit resistent gegen die Antikörpertherapie, da sie durch den dauerhaft aktivierten Zustand die Inhibition des *downstream*-Signalwegs durch Cetuximab oder Panitumumab verhindern.



**Abbildung 3: Die Auswirkung einer KRAS-Mutation auf die Proliferation**

In der Wildtypform (a) ist KRAS Teil der Signalkaskade, die die Zelle zur Proliferation animiert. Initiiert wird dieser Signalweg durch die Bindung eines Wachstumsfaktors an den Rezeptor. In seiner mutierten Form ist KRAS (b) dauerhaft aktiviert und leitet das Signal zur Proliferation weiter, auch ohne dass eine Bindung eines Liganden an den Rezeptor erfolgt ist. Es kommt zur unkontrollierten Zellteilung. *Entnommen aus [15]*

In dieser Arbeit soll ein Weg gefunden werden, die KRAS-Mutation durch den Einsatz von siRNAs auszuschalten und die Zellen somit wieder sensitiv für die Cetuximab Behandlung zu machen. Die siRNA soll dabei an einen Antikörper gekoppelt in die Zelle transportiert werden und dort im Cytoplasma in den Weg der RNA Interferenz eingehen.

### 1.3 Das Ewing Sarkom

Das Ewing Sarkom wurde erstmals 1920 von dem Pathologen James Ewing (1866 - 1943) beschrieben <sup>[49]</sup>. Dabei handelt es sich um eine Knochenkrebsform, von der vorwiegend Kinder, Jugendliche und junge Erwachsene im Alter zwischen 12 - 17 Jahren betroffen sind. Es ist die zweithäufigste Knochenkrebsform, die in diesem Altersbereich auftritt <sup>[50,51]</sup>. Ein Ewing Sarkom wird in den meisten Fällen mit Hilfe eines Röntgenbilds diagnostiziert. Typisch für diesen soliden malignen Tumor sind Knochendestruktionen und die Ausbildung einer sogenannten *onion skin*. Dabei handelt es sich um zwiebelschalenartige Kalkablagerungen am Knochen <sup>[52]</sup>. Dies ist in Abbildung 4 dargestellt.



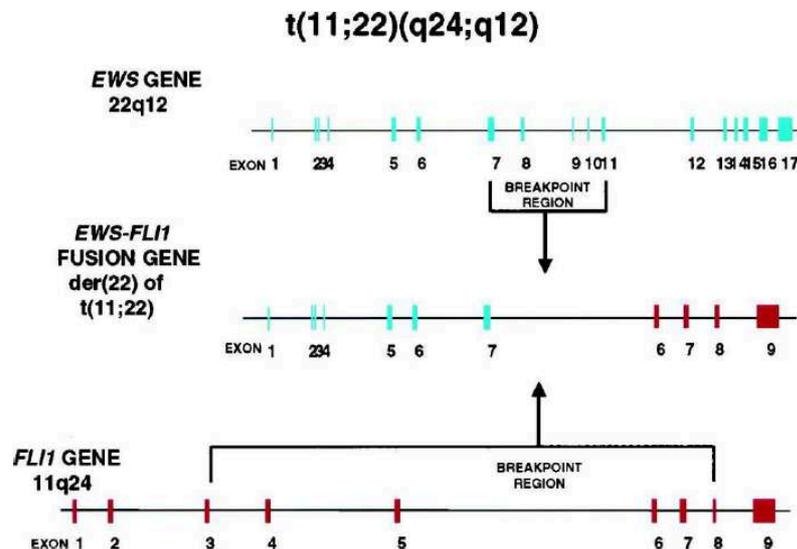
**Abbildung 4: Das Ewing Sarkom**

Dargestellt ist die sogenannte *onion skin*. Diese Kalkablagerungen sind ein typisches Bild bei einem Ewing Sarkom. Entnommen aus <sup>[52]</sup>.

Die Ursache des Ewing Sarkoms liegt in einer chromosomalen Translokation. Dabei verlagern sich Chromosomenabschnitte an eine andere Stelle des Chromosomensatzes oder zwei Chromosomen fusionieren <sup>[55]</sup>. Beim Ewing Sarkom führt die Translokation zu der Bildung eines Fusionsproteins. Die beiden Fusionspartner sind dabei meist ein EWS-Protein und ein Transkriptionsfaktor der ETS-Familie. Das EWS-Protein ist ein RNA-Bindeprotein und spielt somit eine wichtige Rolle in RNA-Modifizierungsprozessen und RNA-Verarbeitungsvorgängen <sup>[51-55]</sup>. Transkriptionsfaktoren der ETS-Familie fungieren vor allem in Feldern wie Zelldifferenzierung, Zellzykluskontrolle, Zellproliferation und Apoptose. In ca. 85 % der Ewing Sarkom Fälle entsteht durch eine Translokation zwischen den Chromosomen 22 und 11 ein Fusionsgen zwischen EWS und FLI1, also zwischen dem RNA-Bindeproteingen und dem Transkriptionsfaktorgen FLI1 (siehe Abbildung 5) <sup>[53]</sup>. Die Translokation wird dabei folgendermaßen bezeichnet:  $t(11;22)(q24;q12)$  <sup>[51]</sup>. FLI1 ist auch als Protoonkogen bekannt. Durch eine Mutation in diesem Gen kann es zu einer Überproduktion des vom Gen

## 1. Einleitung

codierten Transkriptionsfaktors und somit zu einer unkontrollierten Proliferation der Zellen kommen<sup>[51]</sup>. Im Fall des Ewing Sarkoms agiert das Protein des EWS/FLi1-Fusionsgens wie ein Masterregulator, der die Transkription der Zelle dauerhaft ankurbelt. Es kommt zu unkontrolliertem Zellwachstum<sup>[50]</sup>.



**Abbildung 5: Die Haupttranslokation des Ewing Sarkoms**

In über 85 % der Fälle weisen Ewing Sarkome die Translokation  $t(11;22)(q24;q12)$  auf. Aus ihr resultiert die Bildung des EWS/FLi1-Fusionsproteins. Entnommen aus [53]

Bislang wird vor allem neben der Chirurgie die Chemo- und Strahlentherapie in der Behandlung des Ewing Sarkoms eingesetzt. Bei lokalisierter Erkrankung kommt einem operativen Eingriff ein wichtiger Stellenwert zu<sup>[55]</sup>. Einzigartig an dieser Erkrankung ist, dass sie tatsächlich in den meisten Fällen durch genau diese eine einzige Translokation, die zur Bildung des EWS/FLi1 Fusionsproteins führt, hervorgerufen wird<sup>[53]</sup>. Bei den restlichen ca. 10 - 15 % der Erkrankten wird ein Ewing Sarkom ebenfalls durch eine Translokation hervorgerufen, dabei handelt es sich lediglich um unterschiedliche Interaktionspartner bei der Fusion zweier Gene. EWS ist bei der Translokation mit einem weiteren Mitglied der ETS-Transkriptionsfaktorfamilie fusioniert: ERG. Diese Translokation ergibt sich in folgendem Schema:  $t(21;22)(q22;q12)$ <sup>[51]</sup>. Beide Fusionen weisen gleiche klinische Phänotypen der Erkrankung auf<sup>[51]</sup>.

Das Ewing Sarkom bringt daher als nahezu monokausale genetische Erkrankung eine ideale Voraussetzung für den *Targeted Therapy* Ansatz mit, der in dieser Arbeit überprüft werden soll. Da mittels RNA Interferenz und somit auf genetischer Ebene gearbeitet wird, könnte genau dieses Fusionsgen EWS-FLi1 ein perfektes Ziel für den siRNA-Einsatz darstellen. Der Einsatz einer siRNA genau über dem Bruchpunkt der Fusion des EWS- und des FLi1-Gens könnte die Bildung des Fusionsproteins inhibieren und so die Zellteilung hemmen.

### 1.4 Die RNA Interferenz und die Auslöser miRNA und siRNA

RNA Interferenz ist ein RNA abhängiges biologisches Phänomen, bei dem die Expression bestimmter Zielgene in Zellen unterdrückt werden kann. Ursprünglich dient die RNA Interferenz als wichtiges Abwehrorgan von fremder RNA, beispielsweise Virus-RNA und ist an der Regulation der Genexpression beteiligt. Dieses Phänomen ist eine Form des *Gene Silencing*. Für die Entdeckung der RNAi wurde im Jahre 2006 der Nobelpreis verliehen <sup>[15]</sup>.

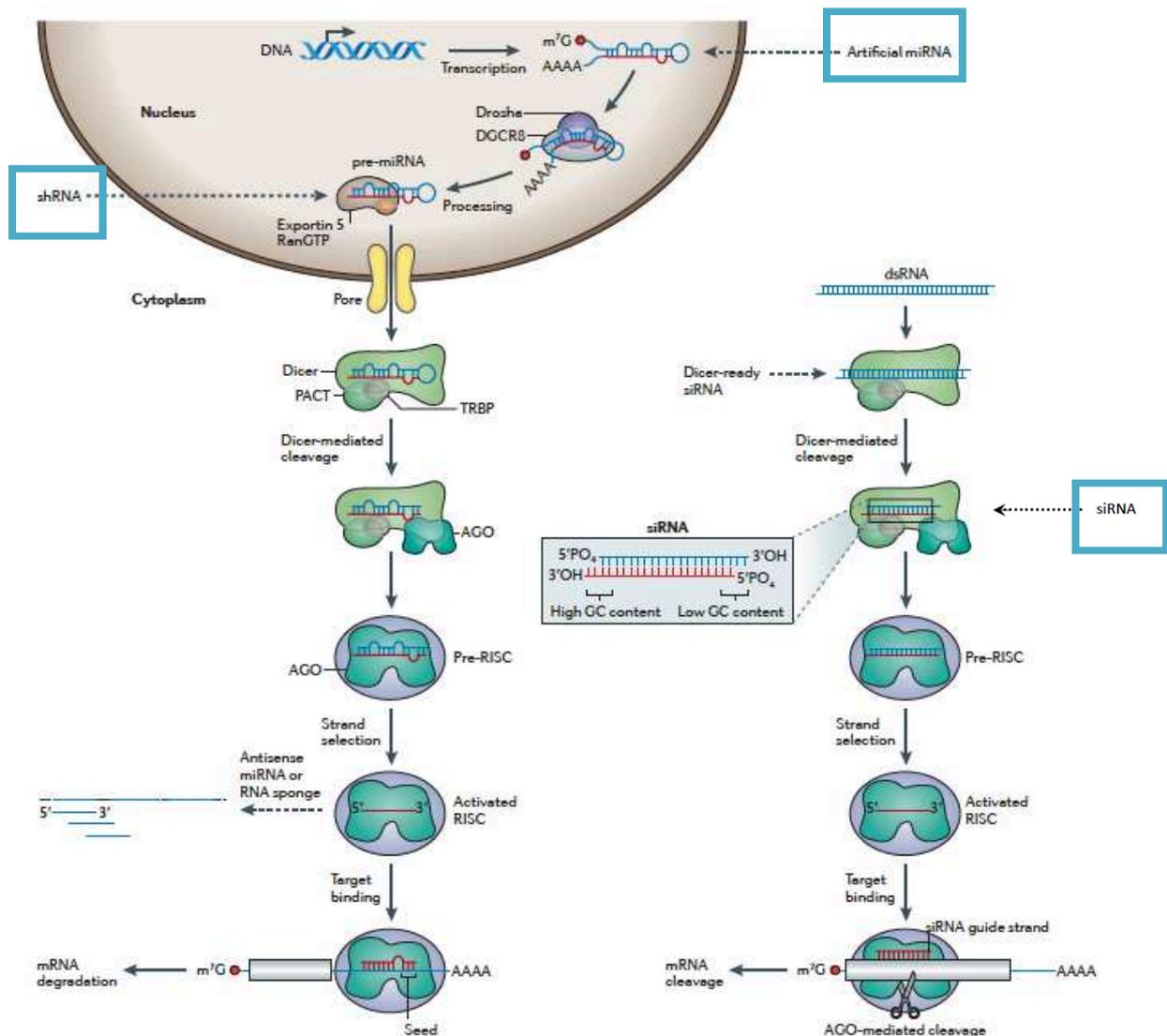
Für die Unterdrückung der Expression gibt es posttranskriptional zwei Möglichkeiten, entweder die Translation der mRNA wird verhindert oder es kommt zur Degradation der mRNA des Zielgens. Ausgelöst wird die RNA Interferenz durch doppelsträngige RNAs, die komplementär zum Zielgen sind. Bei den doppelsträngigen RNA-Molekülen unterscheidet man hauptsächlich zwischen miRNA und siRNA <sup>[3,6,9]</sup>.

MicroRNAs (miRNA) sind kleine nicht codierende RNAs, die die Genexpression in Pflanzen und Tieren regulieren und ca. 1-3% des Genoms einnehmen <sup>[6,9]</sup>. Sie entstehen aus einem nicht codierenden RNA-Strang, der von der RNA-Polymerase II transkribiert wird <sup>[9]</sup>. Der RNA-Strang, der dabei entsteht wird als pri-miRNA beschrieben und besteht aus 100 bis 1000 Nukleotiden <sup>[10]</sup>. Er weist eine charakteristische Haarnadelstruktur auf, die von einem Mikroprozessorkomplex erkannt wird <sup>[7]</sup>. Dieser Komplex besteht aus der Ribonuklease III Endonuklease Drosha und DGCR8, einem Protein mit doppelsträngiger RNA-Bindestelle <sup>[7]</sup>. Drosha-DGCR8 bindet die pri-miRNA und schneidet diese in etwa 70 Basenpaar große pre-miRNAs, die Vorläufer der miRNA <sup>[9]</sup>. Die pre-miRNAs werden anschließend durch Exportin 5 aus dem Nukleus ins Cytoplasma transportiert und dort von TRBP (TAR-RNA-Binding-Protein) erneut gebunden. TRBP bildet zusammen mit PACT (PKR Activating Protein, PKR ist eine RNA-abhängige Proteinkinase) und der zweiten Ribonuklease III Dicer einen Komplex. Dieser Dicer-Komplex verarbeitet die pre-miRNA zu der eigentlichen ca. 21 Basenpaar großen miRNA <sup>[7,9]</sup>. Anschließend bindet ein RNA-Bindeprotein der Argonautenfamilie (AGO) die miRNA und geht eine Verbindung mit dem pre-RISC Komplex ein <sup>[7]</sup>. Bei RISC handelt es sich um den *RNA-induced Silencing Complex*. Die von AGO gebundene miRNA besteht aus dem sogenannten *guide*-Strang, der als Vorlage für die abzubauen mRNA dient und dem *passenger*-Strang, der keine Funktion trägt. Durch das Entfernen des *passenger*-Strangs mit Hilfe des AGO-Proteins wird der pre-RISC aktiviert, kann in seiner aktiven RISC-Form die komplementäre Ziel-mRNA erkennen und leitet somit die Translationshemmung oder die Degradation der Ziel-mRNA ein <sup>[7]</sup>.

Die Besonderheit der miRNAs liegt in der sogenannten *seed*-Region. miRNAs weisen häufig Fehlpaarungen mit der Ziel-mRNA auf. Auffallend ist aber, dass die Basen 2-8 meistens komplementär sind. Diese Basen 2-8 werden als *seed*-Region bezeichnet <sup>[7]</sup>. Ob die Translation gehemmt oder die mRNA ganz abgebaut wird, hängt von der Komplementarität der Basenpaarung

## 1. Einleitung

zwischen miRNA und mRNA ab. Je besser die miRNA mit der komplementären mRNA übereinstimmt, desto wahrscheinlicher ist ein Abbau der mRNA <sup>[4,7]</sup>.



**Abbildung 6: Die RNA Interferenz**

RNAi kann über drei verschiedene RNA-Moleküle ausgelöst werden. Dazu gehören miRNA, shRNA und siRNA. Sie treten an verschiedenen Stellen in den Weg der RNAi ein. miRNAs und shRNAs gehen im Zellkern in die RNAi ein und werden von dort über Exportin 5 in das Cytoplasma der Zelle transportiert. Im Cytoplasma werden die RNA Moleküle von einem Protein der Argonautenfamilie gebunden und zum *RNA-induced silencing complex* (RISC) geleitet. Der *guide*-Strang der RNA dient dem RISC dabei als Vorlage für die zu inhibierende Ziel-mRNA. SiRNAs dagegen gelangen direkt in das Cytoplasma und werden dort ebenfalls von AGO gebunden und zum RISC weitergeleitet, wo sie dann als Vorlage für die abzubauen mRNA fungieren. siRNAs weisen im Vergleich zu miRNAs und shRNAs eine größere Kompatibilität zu der Ziel-mRNA auf. Je größer die Kompatibilität, desto wahrscheinlicher ist die Translationsinhibition durch einen gezielten Abbau der Ziel-mRNA. Entnommen und modifiziert aus [7]

Wie in Abbildung 6 zu erkennen ist, treten *small interfering RNAs* (siRNAs) an einer anderen Stelle in den Weg der RNAi ein <sup>[7]</sup>. siRNAs entstehen aus doppelsträngiger RNA im Cytoplasma. Die doppelsträngige RNA wird von dem bereits bekannten Dicer-Komplex gebunden und zu siRNAs mit einer Größe von 20 - 24 Nukleotiden zugeschnitten <sup>[7]</sup>. Gelangen siRNAs dieser Größe in das

## 1. Einleitung

Cytoplasma, werden sie von AGO gebunden und lagern sich mit dem pre-RISC zusammen. Bei dem Weg der siRNA spielt das Argonautenprotein Ago2 eine wichtige Rolle <sup>[8]</sup>. Die siRNAs bestehen ebenfalls aus dem *guide*-Strang und dem *passenger*-Strang. Das Abspalten des nicht-targetierenden Strangs erfolgt in diesem Fall durch Ago2 und versetzt pre-RISC dadurch in seine aktive RISC-Form <sup>[8]</sup>. Doch Ago2 spaltet nicht nur den *passenger*-Strang ab, es ist nach erfolgreicher Aktivierung auch am Schneiden der Ziel-mRNA beteiligt, was zur Degradation der mRNA führt <sup>[8]</sup>.

Sobald die mRNA aus dem RISC zum weiteren Abbau entlassen wurde, bindet dieser RISC Komplex mit dem noch gebundenen *guide*-Strang der miRNA oder siRNA die nächste mRNA und beginnt von Neuem mit der Inhibition der Translation <sup>[4,7,8,9]</sup>.

Die beiden doppelsträngigen RNA-Moleküle miRNA und siRNA codieren selbst für keine Proteine, sie dienen lediglich als regulatorische Einheiten, die in Zellen als Vorlage für die abzubauen mRNA gebildet werden. Künstlich hergestellt können beide Moleküle in der Zelle die gleichen Effekte hervorrufen wie ihre natürlichen Vorgänger <sup>[7]</sup>. Für die endogene miRNA wird dabei die sogenannte *small-hairpin* RNA (shRNA) verwendet <sup>[11]</sup>. Die Sequenz für shRNAs wird mit Hilfe eines Plasmids in den Nukleus der Zelle gebracht, meistens wird dafür ein lentivirales Vektorsystem verwendet <sup>[4,11]</sup>. Die Sequenz wird dort von der RNA-Polymerase II oder III abgelesen und es entsteht ein RNA-Strang mit einer Haarnadelstruktur, die die pri-miRNA imitiert <sup>[10]</sup>. Ab diesem Punkt wird die pri-shRNA wie die pri-miRNA behandelt und über den Drosha-Komplex geschnitten, mit Exportin 5 in das Cytoplasma überführt und anschließend vom Dicer in die shRNA-Form gebracht, die dann vom RISC erkannt wird <sup>[7]</sup>.

Bei der siRNA ist der Umweg über ein Vektorsystem nicht notwendig. Die 20-24 Nukleotid langen RNA-Moleküle können speziell gegen das Zielgen entworfen und dann über eine Transfektion in das Cytoplasma der Zellen gebracht werden. Dort werden sie dann, wie in Abbildung 6 zu sehen, von den AGO-Proteinen gebunden und direkt in den pre-RISC eingebracht <sup>[4,7,10]</sup>.

Beide artifiziellen Formen der regulatorischen RNAs haben Vor- und Nachteile. Für die shRNAs muss zunächst ein geeignetes Vektorsystem etabliert werden. Das bedeutet, die Sequenz wird in einen lentiviralen Vektor kloniert und die Zellen dann mit den shRNA-Plasmid enthaltenen Viren infiziert. So wird die Sequenz für die entsprechende shRNA stabil in das Genom der Zelle verankert und weitervererbt <sup>[11]</sup>. Diese Plasmide können auch transient über eine Transfektion in die Zellen gebracht werden. Sie haben den gleichen Effekt, verdünnen sich aber mit der Zellproliferation langsam aus der Zellpopulation heraus <sup>[11]</sup>. siRNAs dagegen können direkt in das Cytoplasma der Zellen transfiziert werden und sind somit schneller einsatzbereit und schneller zugänglich für die RNAi in der Zelle. Diese schnelle Bereitstellung erzeugt jedoch gleich zwei Nachteile. Zum einen ist eine große Menge freier siRNA und damit RNA in den Zellen mit unerwünschten Nebenwirkungen verbunden und zum anderen ist die siRNA wieder nur transient in die Zellen gebracht und verdünnt

## 1. Einleitung

sich ebenfalls während der Zellteilung heraus. Hinzukommt, dass freie ungeschützte siRNA in den Zellen schnell von Nukleasen abgebaut wird <sup>[11]</sup>. Dafür stimmt die siRNA in ihrer Sequenz zu 100 % mit der Ziel-mRNA überein, was zu einer sichereren Degradation der mRNA führt <sup>[4]</sup>.

Die Wahl, ob für die Herunterregulierung eines Gens siRNA oder shRNA verwendet werden soll, hängt damit von verschiedenen Faktoren ab <sup>[11]</sup>. Welcher Zelltyp wird verwendet? Wie viel Zeit darf bis zum Einsatz der regulatorischen RNA vergehen? Und soll eine stabile oder transiente Integration der regulatorischen RNAs erreicht werden? Im Fall dieser Arbeit geht es um den Einsatz von regulatorischer RNA in einem neuen Krebstherapieansatz, der Anwendung in Patienten finden soll. Die stabile Integration eines Vektors in das Genom einer Zelle scheidet dabei aus, denn beispielsweise eine virale Transduktion von betroffenen Zellen eines Patienten ist dabei bereits aus Gründen der biologischen Sicherheit keine Option. Die nicht erfolgte stabile Integration als gentherapeutische Maßnahme kann jedoch mit mehreren aufeinander folgenden Behandlungen der Patienten mit siRNA kompensiert werden. An dieser Stelle kommt das vorgeschlagene Transportsystem von siRNAs über monoklonale Antikörper, das in dieser Arbeit etabliert und in seiner Anwendung überprüft werden soll, zum Einsatz. Die siRNA wird hier nicht in Zellen transfiziert, sondern über einen Antikörpercarrier in die Zellen transportiert. Die funktionelle Abfolge wird im nachfolgenden Abschnitt genauer erläutert.

### 1.5 siRNA-Einsatz in der Krebstherapie

Nach der Entdeckung der RNA Interferenz im Jahr 1998 wurde schnell deutlich, was diese Entdeckung für neue Einflussmöglichkeiten auf Gen-Ebene mit sich bringt <sup>[12]</sup>. Die RNAi ist ein Werkzeug, mit dem durch den Einsatz von nur 20-24 Basenpaaren die Genexpression von bestimmten Zielgenen ausgeschaltet werden kann. Die Transfektion dieser regulatorischen RNAs in Zielzellen mit Hilfe von Calciumphosphat-Kopräzipitation oder Lipofektion wurde *in vitro* schnell adaptiert <sup>[30]</sup>. Ein Problem besteht allerdings bis heute darin, die siRNA außerhalb der Zellkultur *in vivo* in Zellen zu transportieren. siRNAs besitzen als RNAs eine negative Eigenladung und auch die Zellmembran ist negativ geladen <sup>[15,30]</sup>. Dieser Zustand schließt eine passive Diffusion der siRNAs durch die Zellmembran aus. Und auch das Einbringen von siRNAs durch chemische Reagenzien in Form der Transfektion oder Transduktion kann *in vivo* nicht angewendet werden. Hinzu kommt, dass „nackte“ anionische siRNA im Körper unerwünschte Nebenwirkungen mit sich bringen <sup>[30,35]</sup>. Freie siRNAs können in den Endosomen von den *Toll-like-Rezeptoren* (TLR) 7 und 8 als Nebenerscheinungen einer möglichen Infektion erkannt werden und so die angeborene Immunabwehr des Körpers aktivieren <sup>[30,31]</sup>. Ein weiterer Faktor ist die Proteinkinase R. Sie dient in Zellen zur Erkennung doppelsträngiger RNA von Viren und löst ebenso eine Immunantwort aus. Da

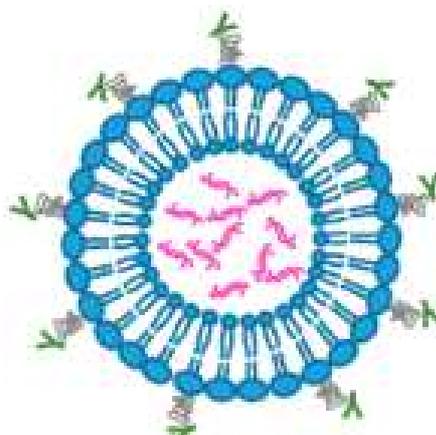
## 1. Einleitung

siRNAs ebenfalls doppelsträngig eingesetzt werden, könnte die Proteinkinase R hier zu einer Immunreaktion führen<sup>[30]</sup>. Deshalb wird ein Carriersystem für die siRNA benötigt, das die siRNA stabil und zielgerichtet in die Zellen bringt.

Es gibt einige Ansätze, die sich erfolgreich mit genau diesem Transport in die Zielzellen auseinandersetzen. Dabei geht es zum einen um den Schutz und zum anderen um den zielgerichteten Transport der siRNA an ihren Wirkort. Zu den drei wichtigsten Ansätzen gehört die Verpackung der siRNA in Liposomen, die Verpackung in Nanopartikel und die Bildung eines Konjugats aus siRNA und beispielsweise einem Antikörper<sup>[2,3,13,30]</sup>.

### 1.5.1 siRNA-Transport über Liposomen

Bei dem Lipid-basierten Transport von siRNAs werden kationische und neutrale Lipide verwendet, die durch ihre Zusammenlagerung ein kationisches Liposom mit einer Lipiddoppelschicht bilden (siehe Abbildung 7)<sup>[13]</sup>. Lipide bestehen aus einem positiv geladenen und hydrophilen Kopfteil und einem hydrophoben Schwanzteil. Dadurch entsteht die Lipiddoppelschicht des Liposoms in wasserhaltigen Lösungen<sup>[15]</sup>. Durch den positiv geladenen Kopfbereich dieser Lipide ist ein Liposom sowohl außerhalb, als auch innerhalb positiv geladen. So kann die negativ geladene siRNA in dem Liposom aufgenommen werden und ist vor dem enzymatischen Abbau im Körper geschützt<sup>[13,30]</sup>. Die Verwendung von Liposomen zum Transport von DNA ist bereits seit langem aus der Lipofektion bekannt und wird häufig für die Transfektion von DNA in Zielzellen verwendet. Die am häufigsten verwendeten kationischen Lipide für die Ausbildung eines solchen Lipoplexes sind 1,2-Di-Octadecenyl-3-trimethylammoniumpropan (DOTMA), [N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)-propyl]-N,N,N-trimethylammonium-methylsulfat (DOTAP), 3β[N-(N',N'-dimethyl aminoethan)-carbamoyl] Cholesterol (DCChol) und Dioctadecylamidoglycylspermin (DOGS)<sup>[13,32]</sup>.



**Abbildung 7: Immunliposome als siRNA-Carriersystem**

Ein Immunliposom besteht aus einer Lipiddoppelschicht aus kationischen Lipiden. Er trägt Polyethylenglykol auf der

## 1. Einleitung

Oberfläche, an das Antikörper, gerichtet gegen bestimmte Zelloberflächenrezeptoren, gebunden werden können, die einen zielgerichteten Transport der siRNA zu den Zielzellen garantiert. Die negativ geladene siRNA wird im positiv geladenen Liposom eingeschlossen und so in die Zielzellen transportiert. *Entnommen und modifiziert aus [13]*

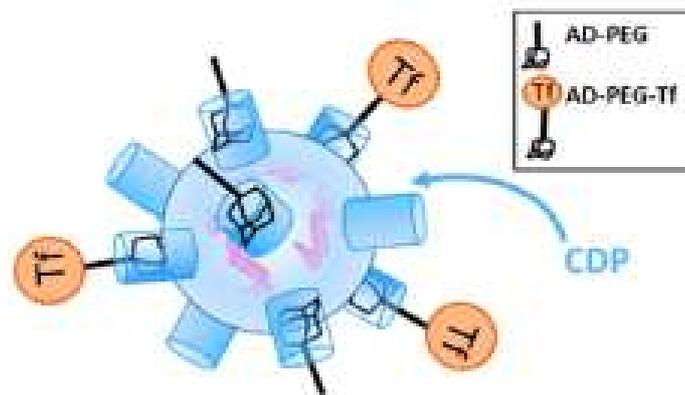
Die Liposomen werden obendrein mit Polyethylenglykol (PEG) dekoriert. PEG gibt dem Liposom zusätzliche Stabilität, reduziert eventuelle Immunreaktionen des Körpers und bietet eine Bindestelle für Antikörper, die gegen bestimmte Zelloberflächenrezeptoren gerichtet sind, um den Liposomen eine Zellspezifität zu geben <sup>[13,30,33]</sup>. Durch die Antikörper auf der Oberfläche werden die Liposomen zu Immunliposomen und erreichen so zielgerichtet ihre Zielzellen <sup>[13]</sup>. Angedockt an den Rezeptor, werden die Immunliposomen in die Zelle aufgenommen und erreichen im Cytoplasma ihren Wirkort. Durch die Antikörper, die spezifisch gegen bestimmte Rezeptoren gerichtet sind und die spezifische Sequenz der siRNA erreichen diese Immunliposomen eine bispezifische/duale Spezifität. Sie gelangen nur in Zellen, die den entsprechenden Rezeptor auf der Oberfläche zeigen und durch die siRNA können *Targets* in der Zelle erreicht werden, die andere Zielzellen nicht enthalten <sup>[13,30]</sup>. Liposomen erreichen einen Durchmesser von ca. 120 nm <sup>[33]</sup>. Die Arbeitsgruppe um Josep Taberero hat solche Liposomen ohne Antikörperdekoration gefüllt mit siRNAs gegen VEGF und dem Kinesin-Spindel-Protein (KSP) in einer klinische Studie der Phase I getestet <sup>[65]</sup>. Die Bildung solcher Liposome ist im Vergleich zu Nanopartikeln ein technisch aufwendiger Prozess <sup>[30]</sup>. Daher setzen einige Arbeitsgruppen auf den Einsatz von polymerbasierten Nanopartikeln.

### 1.5.2 Nanopartikel

Eine weitere siRNA-Transportform verläuft über polymerbasierte Transportsysteme, sogenannte Nanopartikel. Bei polymer-basierten Nanopartikeln ist die siRNA nicht von Lipiden, sondern von natürlichen oder synthetischen Polymeren umgeben (siehe Abbildung 8) <sup>[30]</sup>. Zu den natürlichen Polymeren gehören Chitosan, Atellocollagen und kationische Polypeptide. Die synthetischen Polymere sind Polyethylenimin (PEI), Poly-L-Lysin (PLL) oder auch Cyclodextrin-basierende Polymere (Cyclodextrin-containing-polymers, CDP) <sup>[30]</sup>. Besonders bekannt sind dabei Cyclodextrin-basierende Nanopartikel <sup>[13,30]</sup>. Cyclodextrin ist ein synthetisches, kationisches Polymer, das, genau wie die Lipide bei den Immunliposomen, die siRNA in sich einschließt und sie so vor enzymatischem Abbau schützt <sup>[13,30]</sup>. Die Forschung an diesen Nanopartikeln ist bereits so weit vorangeschritten, dass sie Teil einer klinischen Studie zur Therapie beim malignen Melanom sind <sup>[35]</sup>. In dieser Studie werden die CDP-Nanopartikel als CALAA-01 bezeichnet und besitzen einen Durchmesser von 70 nm <sup>[35]</sup>. Sie sind damit kleiner als die Immunliposomen. Im Allgemeinen kann der Durchmesser von Nanopartikeln zwischen 1-1000 nm variieren <sup>[13]</sup>. Ein weiterer Vorteil im Vergleich zu den Liposomen ist, dass die Bildung von Nanopartikeln durch einfaches Zusammengeben der einzelnen Reagenzien und der

## 1. Einleitung

siRNA erreicht wird. Werden die Reagenzien gemischt, lagern sich die Polymere von allein um die siRNA <sup>[30]</sup>. Zu den Reagenzien bei CALAA-01 gehören die CDPs, die siRNA, PEG, Admantan (AD) und Transferrin. AD verankert PEG auf der Oberfläche der Nanopartikel. An PEG bindet das Transferrin. Transferrin dient hier als zell determinierendes Protein. Es bindet am Transferrinrezeptor und bringt so die Nanopartikel zu den Zielzellen. Allgemein können bei Nanopartikeln auch Antikörper gegen bestimmte Rezeptoren an das PEG gebunden werden <sup>[30]</sup>. So ist auch bei diesem polymerbasierten Transportsystem die duale Spezifität durch Antikörper und siRNA gegeben.



### Abbildung 8: siRNA-Transport über polymer-basierte Nanopartikel

Werden Nanopartikel für den siRNA-Transport eingesetzt, bestehen die Nanopartikel dabei aus natürlichen oder synthetischen Polymeren, die die siRNA schützend umgeben. Auf der Oberfläche ist über Admantan gekoppelt an Polyethylenglykol ein richtungsweisender anti-Rezeptor-Antikörper oder in diesem Fall Transferrin als Direktion gebunden. So gelangen die Nanopartikel zu den Zielzellen und werden über die Endozytose des Zielrezeptors in die Zielzellen mit aufgenommen. *Entnommen aus [13]*

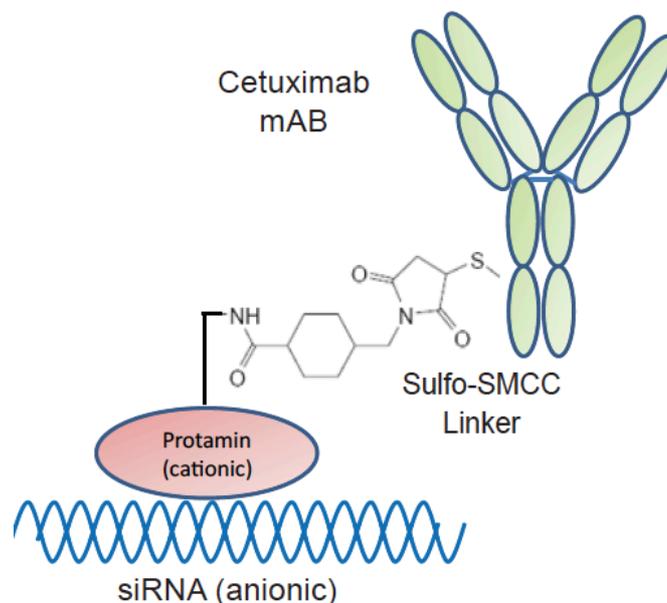
### 1.5.3 siRNA-Transport über Antikörper-Konjugate

Dieser Ansatz des siRNA Transports ist technisch weniger komplex. Die siRNA wird dabei nicht von einer schützenden Hülle umgeben, sondern hierbei direkt über elektrostatische Wechselwirkungen an den zell determinierenden Antikörper gekoppelt <sup>[1,2,3,34,36]</sup>. Das Molekül, an das die siRNA gekoppelt wird, muss nicht zwingend ein Antikörper sein. Es können auch Liganden der Zielrezeptoren eingesetzt werden. Bei den Liganden handelt es sich meist um Peptide oder Lipide <sup>[3]</sup>. Ein Beispiel ist dabei die Verbindung der siRNAs mit Cholesterin <sup>[7]</sup>. Dabei wird die siRNA an Cholesterin gekoppelt und dieses wiederum an LDL („low density lipoprotein“) oder HDL („high density lipoprotein“). LDL und HDL binden Cholesterin im Blut und transportieren es zu den Zellen. Angedockt an die entsprechenden Rezeptoren schleusen sie so die siRNA in die Zelle <sup>[7,30]</sup>.

## 1. Einleitung

Für den Transport von siRNAs mit Antikörpern werden hauptsächlich monoklonale Antikörper verwendet. Dadurch, dass sie nur ein Zielobjekt erkennen, ist der Transport zielgerichteter als bei polyklonalen Antikörpern <sup>[1,2,30]</sup>.

Der Ansatz des siRNA-Transports über monoklonale Antikörper wird auch in der vorliegenden Arbeit eingesetzt. Für die Kopplung wird ein kationisches Polypeptid verwendet: Protaminsulfat <sup>[1,2]</sup>. Protamin ist ein evolutionär hochkonserviertes Peptid, das Nukleinsäuren bindet und kondensiert. Es wird unter anderem aus Lachsspermien gewonnen, dort hat es ebenfalls die Aufgabe genomische DNA zu binden und auf kleinstmöglichem Raum zu verpacken <sup>[82]</sup>. Aufgrund dieser Eigenschaften wurde es in vielen Fällen als Agens für Transfektionen eingesetzt <sup>[82]</sup>. Für die Ausbildung des Antikörper-Protamin-Konjugats wird ein bispezifischer Linker eingesetzt. Im vorliegenden Fall wurde Sulfosuccinimidyl 4-[N-maleimidomethyl]-cyclohexane-1-carboxylate, kurz sulfo-SMCC, eingesetzt. Während des Kopplungsverfahrens bildet sulfo-SMCC zunächst über eine Aminofunktion des Protamins mit diesem eine Bindung aus. Im zweiten Kopplungsschritt werden das Protamin-sulfo-SMCC und der Antikörper über eine stabile Thioetherbindung zwischen einer Maleimidgruppe des sulfo-SMCC und einer Sulfhydrylgruppe des Antikörpers verbunden <sup>[2]</sup>. Für die Disulfidbrücke werden freie Cysteine des Antikörpers genutzt. In der Regel sind es nach dem Ellmann-Test 0,5 - 2 Cysteine pro IgG <sup>[13]</sup>. Anschließend erfolgt die Kopplung der siRNA an den Antikörper-Protamin-Komplex (siehe Abbildung 9) <sup>[2]</sup>.



**Abbildung 9: Bindung von siRNA an einen monoklonalen Antikörper**

Diese Abbildung zeigt beispielhaft die Bildung eines Antikörper-siRNA-Konjugats mit dem monoklonalen EGFR-Antikörper Cetuximab. Über den bispezifischen Linker sulfo-SMCC ist das positiv geladene Protamin an den Antikörper gekoppelt. Die Bindung der siRNA an das Protamin erfolgt über elektrostatische Wechselwirkungen. *Entnommen aus [13]*

## 1. Einleitung

Wie bei den beiden Transportstrategien, bei denen Immunliposomen und Nanopartikel eingesetzt werden, gibt es bei diesem Ansatz ebenfalls die duale Spezifität aus rezeptorabhängiger Internalisierung und spezifischer siRNA<sup>[1,2,13]</sup>. Die Größe dieses Transportkomplexes liegt bei etwa 10 nm und ist damit deutlich kleiner, als die beiden anderen Transportvehikel aus Kapitel 1.5.1 und 1.5.2. Obwohl die siRNA bei diesem Ansatz nicht von einer Lipid- oder sonstigen Schutzhülle umgeben ist, schützt die Bindung an das Protamin die siRNA vor enzymatischem Abbau<sup>[13,34]</sup>. Durch den Antikörper ist die siRNA maskiert und wird auch vom Immunsystem nicht erkannt. Da die eingesetzten IgGs in den meisten Fällen humanisierte Antikörper sind, ist auch keine Immunantwort des Körpers zu erwarten<sup>[1,30]</sup>. Wie bei den anderen beiden Ansätzen mit Immunliposomen und Nanopartikeln ist hierbei ebenfalls die Bindung des Antikörpers an den Rezeptor für die Initiierung der Internalisierung des Rezeptors verantwortlich.

Bei der rezeptorabhängigen siRNA-Therapie in der Krebstherapie liegt das Ziel darin, möglichst ausschließlich die Krebszellen mit der siRNA-Behandlung zu treffen. Da Krebszellen aus körpereigenen Zellen entstehen, können die siRNA-enthaltenden Komplexe auch in gesunde Körperzellen gelangen und wenn die siRNA nicht spezifisch gegen eine mutierte Form eines Gens gerichtet ist, auch hier Schaden anrichten. Durch die duale Spezifität der rezeptorabhängigen siRNA-Therapie kann dem entgegengewirkt werden. Dies kann durch die Verwendung von ausschließlich auf Krebszellen exprimierten Rezeptoren oder auf Krebszellen überexprimierten Rezeptoren erreicht werden. Außerdem wird die Spezifität durch die Verwendung von siRNAs gerichtet gegen bestimmte Mutationen in Krebszellen, die in gesunden Zellen nicht zur RNAi führen, erhöht.

Zusammenfassend lässt sich zum Thema siRNA-Transport sagen: Je determinierender der Eingangsrezeptor auf der Oberfläche der Zielzellen ist, desto unspezifischer darf die siRNA sein. Umgekehrt gilt es genauso: Je spezifischer die siRNA, desto unspezifischer darf der Internalisierungsrezeptor sein.

### **1.6 Verwendete Zielrezeptoren für Antikörper im Rahmen dieser Arbeit**

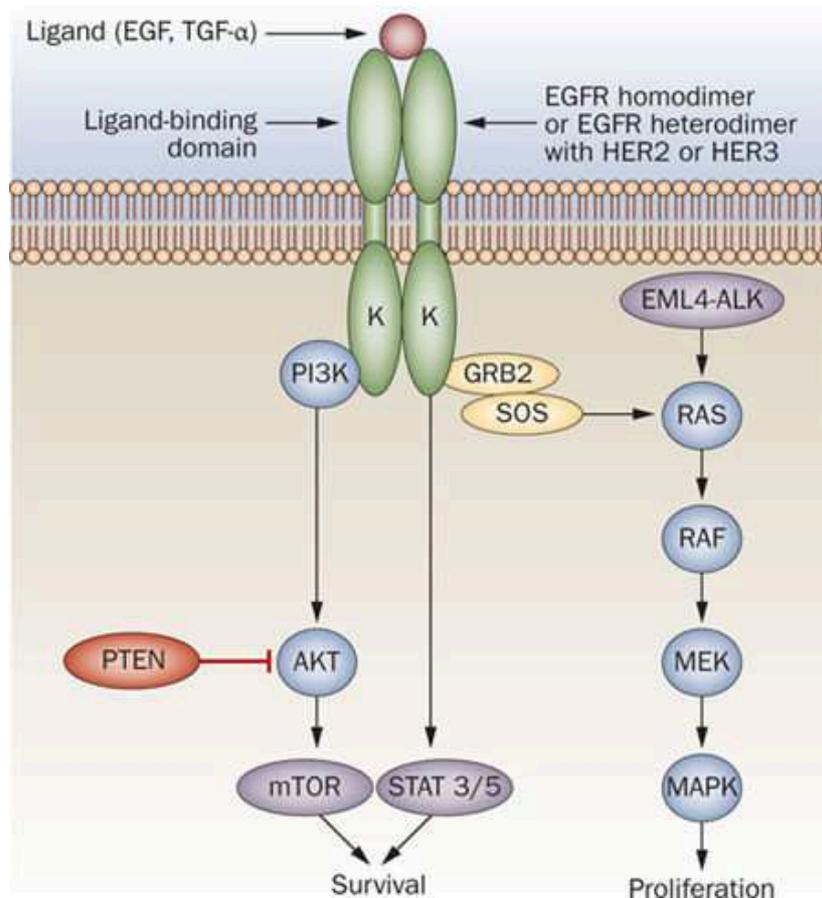
Rezeptoren werden in dem in dieser Arbeit beschriebenen Therapieansatz als Eintrittspforte für die siRNA in die Zielzellen verwendet. Durch die Bindung eines monoklonalen Antikörpers wird der Rezeptor zur Internalisierung in die Zelle angeregt und transportiert so den Antikörper mit der gebundenen siRNA in die Zelle. In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Krebsformen untersucht, das Kolorektalkarzinom und das Ewing Sarkom. Für das Kolorektalkarzinom wird der Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) als kennzeichnender Rezeptor verwendet. Beim Ewing Sarkom wird

## 1. Einleitung

auf den Insulin-like-Growth-Factor-1-Receptor (IGF-1R) und den CD99-Rezeptor zurückgegriffen. Die einzelnen Rezeptoren werden im Folgenden genauer beschrieben.

### 1.6.1 Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)

Der *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) ist ein integraler Membranrezeptor, der zu der Klasse der Rezeptor-Tyrosinkinasen gehört <sup>[16-20]</sup>. Genauer gesagt gehört EGFR zu der ErbB Familie <sup>[16-21]</sup>. Typischerweise liegt die Bindestelle des Liganden außerhalb der Zelle, während der Teil des Rezeptors, der in das Cytoplasma ragt, als Tyrosinkinase fungiert <sup>[15]</sup>. Bevor der Ligand an die Bindestelle andockt, liegen diese Rezeptoren als Monomere in der Plasmamembran vor. Durch die Bindung des Signalmoleküls kommt es zur Dimerisierung des Rezeptors <sup>[15]</sup>. Typisch für Tyrosinkinasen löst die Bindung des Liganden eine Autophosphorylierung des Rezeptors aus, die den Anstoß für die Signalweiterleitung in Form einer Phosphorylierungskaskade innerhalb der Zelle gibt <sup>[15]</sup>. Durch die Ausbildung eines Dimers werden die membranständigen Tyrosinkinasen durch den Umsatz von ATP zu ADP und die damit verbundene Freisetzung einer Phosphatgruppe aktiviert. In ihrer aktivierten Form setzen die Tyrosinkinasen verschiedene Signaltransduktionswege in Gang. Dabei setzt ein Signalmolekül meist mehrere Signaltransduktionswege in Bewegung (siehe Abbildung 10) <sup>[15,16,19]</sup>.



**Abbildung 10: Der Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)**

Der EGF-Rezeptor gehört zu den Rezeptor Tyrosinkinasen und besteht aus zwei Monomeren. Durch die Bindung des Liganden EGF kommt es zur Dimerisierung des Rezeptors und damit zur Aktivierung mehrerer Signalwege, die zum Beispiel das Signal zur Proliferation an den Zellkern weiterleiten. Entnommen aus [14]

EGFR ist auf nahezu allen Epithelzellen zu finden <sup>[16]</sup>. Die normale Verteilung des Rezeptors auf der Zelloberfläche liegt bei 4.000 - 100.000 Rezeptoren pro Zelle. In Krebszellen ist dieser Rezeptor häufig überexprimiert und weist eine Rezeptorzahl von über 10.000.000 pro Zelle auf <sup>[20]</sup>. Für den hier vorgestellten Therapieansatz ist die hohe Rezeptordichte von Vorteil, da diese die Tumorzellen zuverlässig auszeichnet und somit determiniert. Für die Zelle bedeutet die hohe Rezeptoranzahl eine höhere Aktivierung der Zellproliferation <sup>[20]</sup>.

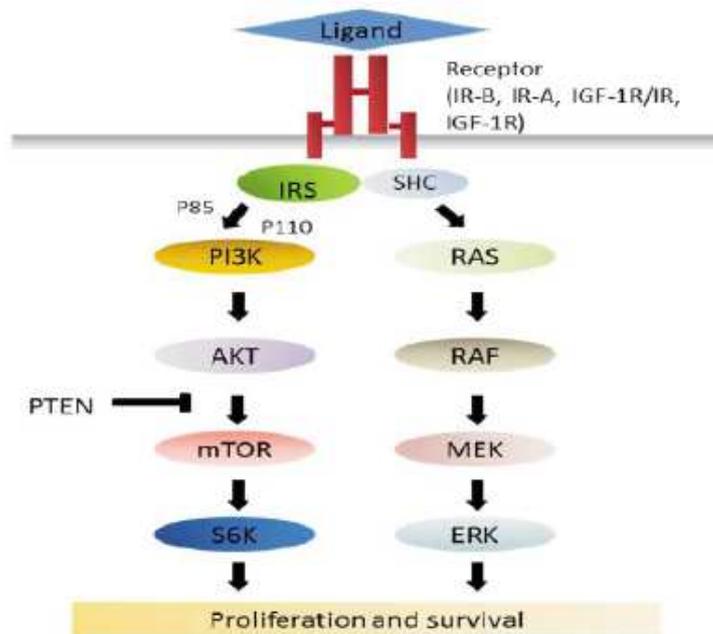
Durch die Bindung des natürlichen Liganden EGF werden über den EGF-Rezeptor viele Signaltransduktionswege aktiviert <sup>[21]</sup>. Für diese Arbeit ist zunächst lediglich der RAS/RAF/MEK/ERK-Signalweg von Bedeutung. Der RAS/RAF/MEK/ERK-Signalweg gibt den Anstoß für viele physiologische Aktivitäten der Zellen. Dazu gehören Wachstum, Proliferation, Differenzierung, Migration und die Inhibition von Apoptose <sup>[20]</sup>. Durch die Aktivierung des EGF-Rezeptors bindet dieser GRB2 (Growth Factor Receptor Binding Protein 2) was seinerseits wiederum SOS1 (Son of Sevenless 1) bindet. SOS ist ein „Guanine nucleotide exchange factor“ (GEF) <sup>[20,23]</sup>. GEFs aktivieren kleine GTPasen, indem sie deren gebundenes GDP in GTP tauschen <sup>[15,23]</sup>. So auch in diesem Signalweg. SOS sorgt dafür, dass die GTPasen der RAS-Familie durch den Austausch von GDP gegen GTP in ihren aktiven Zustand

## 1. Einleitung

übergehen. Dieser Schritt setzt die Signalkaskade in Gang <sup>[23]</sup>. RAS aktiviert dann RAF, RAF aktiviert MEK und ERK wird von MEK aktiviert <sup>[18-20]</sup>. Die ersten beiden Punkte der Kaskade RAS und RAF sind direkt zwei Protoonkogene, die den Signalweg einleiten <sup>[20]</sup>. Eine Mutation in einer dieser Familien führt in den meisten Fällen zu einem unkontrollierten Wachstum der Zellen <sup>[18]</sup>. Zu der RAS-Familie gehören HRAS, NRAS und KRAS, die in diesem Signalweg eine wichtige Rolle spielen <sup>[17,23]</sup>. In Abschnitt 1.2 wurde bereits auf die KRAS-Mutation und ihre Wirkung auf den Einsatz von Cetuximab als Behandlungsreagenz für EGFR-positive Kolorektalkarzinompatienten eingegangen. Die dort beschriebene Mutation sorgt dafür, dass KRAS als GTPase das gebundene GTP nicht mehr abspalten kann, die GTPase somit durchgängig aktiv ist und der Zelle dauerhaft das Signal zur Proliferation weiterleitet <sup>[20]</sup>.

### 1.6.2 Insulin-like Growth Factor 1 Receptor (IGF-1R)

Der Rezeptor, der in dieser Arbeit als erstes bei der Behandlung des Ewing Sarkoms verwendet wird, ist der *Insuline-like Growth Factor 1 Receptor* (IGF1-R). Dieser Rezeptor wird mit verschiedenen Krebsformen in Verbindung gebracht. Dazu gehören Brustkrebs, Lungenkrebs, Prostatakrebs und einige Weichteilsarkome, sowie die Knochenkrebsform Ewing Sarkom <sup>[25]</sup>. Ewing Sarkom Zelllinien, die auf den IGF-1R hin getestet wurden, zeigen eine Rezeptordichte von 13.000 - 40.000 Rezeptoren pro Zelle <sup>[25]</sup>. Tumorproben von Ewing Sarkom Patienten wurden ebenfalls auf diesen Rezeptor hin untersucht und alle Tumoren zeigten IGF-1R auf ihrer Oberfläche <sup>[25]</sup>. Das sind vielversprechende Zahlen um diesen Rezeptor als Eingangspforte für die Antikörper-siRNA-Behandlungskomplexe zu verwenden.



**Abbildung 11: Der Insulin-like Growth Factor-1 Receptor (IGF-1R)**

Der Insulin-like Growth Factor Receptor (IGF-1R) gehört zu den Rezeptor Tyrosinkinasen. Er besteht aus zwei Monomeren, die sich zu einem Dimer zusammenlagern, sobald der natürliche Ligand IGF-1 bindet. Die Bindung des Liganden löst die Weiterleitung eines Signals über eine Phosphorylierungskaskade aus. Dazu gehört der RAS/RAF/MEK/ERK-Signalweg und der PI3K/AKT-Signalweg. IGF-1R ähnelt dem Insulinrezeptor im Körper. Entnommen aus [41]

Der IGF-1 Rezeptor ist wie der EGFR ebenfalls ein Tyrosinkinaserzeptor <sup>[24-26]</sup>. Er besteht aus zwei identischen Monomeren, die sich nach der Aktivierung durch den IGF-1 Liganden zu einem Homodimer zusammenlagern <sup>[24]</sup>. Der Rezeptor besitzt, wie der EGFR auch, eine extrazelluläre Domäne, die aus der Plasmamembran mit der Ligandenbindestelle herausragt. Es folgt eine Transmembrandomäne zur Verankerung des Rezeptors in der Zellmembran und die intrazelluläre Tyrosinkinasedomäne, die nach Aktivierung des Rezeptors die Signalkaskade in Gang setzt <sup>[26]</sup>. Der Ligand IGF-1 ist der Wachstumsfaktor *Insulin-Like-Growth-Factor 1* <sup>[25]</sup>. Die Aktivierung von IGF-1R löst ebenfalls die Phosphorylierungskaskade des RAS/RAF/MEK/ERK-Pathways aus und zudem den PI3K-AKT-Signalweg und regt die Zelle damit zum Wachstum und zur Proliferation an (siehe Abbildung 11) <sup>[26]</sup>. Dieser Rezeptor ist außerdem aus einigen klinischen Studien bekannt, bei denen versucht wird, die Signalwege über monoklonale Antikörper gerichtet gegen IGF-1R zu inhibieren <sup>[41]</sup>. Da dieser Rezeptor lediglich als Shuttle für das Antikörper-siRNA-Konstrukt dienen soll, spielt die genaue Signalkaskade zunächst eine untergeordnete Rolle für den antikörpervermittelten siRNA-Transport in die Ewing Sarkom Zellen.

### 1.6.3 CD99-Rezeptor

Neben dem IGF-1-Rezeptor wird beim Ewing Sarkom auch CD99 als Zutrittsmöglichkeit in die Zelle in Betracht gezogen. CD99, auch als MIC2 bezeichnet, ist ein integrales Membranglycoprotein mit einer Größe von ca. 32 kDa <sup>[27]</sup>. Dieses Zelloberflächenprotein ist vor allem auf Leukozyten und auch auf Ewing Sarkom Zellen zu finden <sup>[27,28]</sup>. Antikörper gegen CD99 werden deshalb oft als Marker für Ewing Sarkom Zellen eingesetzt <sup>[27]</sup>. Des Weiteren ist bekannt, dass durch die EWS-FLi1 Mutation in Ewing Sarkom Zellen die Expression von CD99 auf der Zelloberfläche erhöht ist <sup>[29]</sup>. Aus diesem Grund wurde CD99 in dieser Arbeit ebenfalls als potentieller Rezeptor für die Internalisierung von Antikörper-siRNA-Komplexen in Ewing Sarkom Zellen in Erwägung gezogen. Über die genaue Funktion dieses Membranproteins ist noch nichts bekannt.

## 1.7 Eingesetzte monoklonale Antikörper als siRNA-Shuttle

In den vorherigen Abschnitten wurde bereits beschrieben, dass in dieser Arbeit Antikörper eingesetzt werden, um siRNAs in bestimmte Zielzellen zu transportieren. Dabei werden Zellen zwei verschiedener Krebsarten behandelt und der Transport wird über drei verschiedene Rezeptoren vermittelt. Um die siRNA zu transportieren und die Rezeptoren zur Internalisierung anzuregen, wurden vier verschiedene monoklonale Antikörper eingesetzt, die im Folgenden vorgestellt werden.

### 1.7.1 Der EGFR Antikörper Cetuximab

Cetuximab ist ein monoklonaler humaner Antikörper, der gegen den EGF-Rezeptor gerichtet ist <sup>[1,2,13,38,39]</sup>. Er bindet an der extrazellulären Domäne des Rezeptors und unterdrückt so die Downstream Signalweiterleitung in die Zelle. Gleichzeitig löst Cetuximab durch seine Bindung die Internalisierung des Rezeptors aus. Cetuximab ist seit 2009 von der *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) zugelassen und wird in der *Targeted Therapy* z.B. von Kolorektalkarzinompatienten mit KRAS Wildtyp eingesetzt <sup>[38]</sup>. Durch die Unterdrückung des *Downstreamsignalings* wird die Proliferation der Zellen gehemmt. Weisen Patienten eine KRAS Mutation auf, ist der Tumor resistent gegen die  $\alpha$ EGFR Behandlung <sup>[39]</sup>. An dieser Stelle setzt der in dieser Arbeit vorgestellte Therapieansatz an.

### 1.7.2 Der IGF-1R Antikörper GR11L

GR11L ist ein gegen die IR3-Untereinheit des IGF-1-Rezeptors gerichteter muriner monoklonaler Antikörper. GR11L wird vornehmlich als Detektionsantikörper für den IGF-1-Rezeptor eingesetzt. Durch seine Bindung an den IGF-1R wird aber zusätzlich die Internalisierung des Rezeptors ausgelöst<sup>[2,40]</sup>. Aus diesem Grund wird er für den Transport von siRNAs in die Zielzellen eingesetzt.

### 1.7.3 Der CD99 Antikörper hCD99

Für den CD99-Rezeptor als Eingangspforte wird ein muriner monoklonaler anti-human-CD99 Antikörper eingesetzt. Er wird als hCD99 bezeichnet und wird hauptsächlich als Detektionsantikörper für den CD99-Rezeptor verwendet<sup>[73]</sup>. Im Zuge dieser Arbeit konnte allerdings seine Fähigkeit für die Initiierung der Rezeptorinternalisierung nachgewiesen werden.

### 1.7.4 Der IGF-1R Antikörper A12 V1

Bei dem A12 V1 handelt es sich um einen von unserer Gruppe selbst produzierten Antikörper, der die Sequenz des IMCA12 besitzt, eines monoklonalen humanisierten Antikörpers gegen den IGF-1-Rezeptor der Firma Imclone. IMCA12 wird auch als Cixutumumab bezeichnet und ist bereits Teil einer klinischen Studie Phase II für die Inhibition des IGF-1R-Signalwegs<sup>[41,42]</sup>. In dieser Arbeit wird der A12 Version 1 eingesetzt. Seine genaue Produktion und Beschaffenheit wird in Abschnitt 2.2.1 beschrieben. Aus der klinischen Studie mit dem IMCA12-Antikörper ist bereits die Interaktion des Antikörpers mit dem IGF-1R bekannt und die Initiierung der Rezeptorinternalisierung durch den selbstproduzierten A12 V1 konnte im Laufe dieser Arbeit nachgewiesen werden.

## 1.8 Verwendete siRNAs

Für die Behandlung der Kolorektalkarzinomzelllinien in dieser Arbeit wird eine besondere Form der siRNA eingesetzt. Es handelt sich dabei um esiRNA der Firma Eupheria (Dresden, Deutschland) gegen das mutierte *KRAS*-Gen. Dabei wird ein langer doppelsträngiger RNA-Strang gegen die cDNA des Zielgens synthetisiert, der dann durch die RNase III aus *E.coli* in 18-25 Basenpaar große siRNAs verdaut wird<sup>[43]</sup>. Der Unterschied von esiRNAs zu einer einzelnen entworfenen siRNA ist, dass die siRNA lediglich 20 - 24 Basenpaare des Zielgens überspannt. Bei der esiRNA überspannen die 20-24 Basenpaar großen RNA Abschnitte erhebliche Bereiche des kompletten Gens, die dafür geeigneten

## 1. Einleitung

Bereiche mit individueller Sequenz werden dabei extra mit einem eigens dafür kreierte Programm definiert <sup>[43]</sup>.

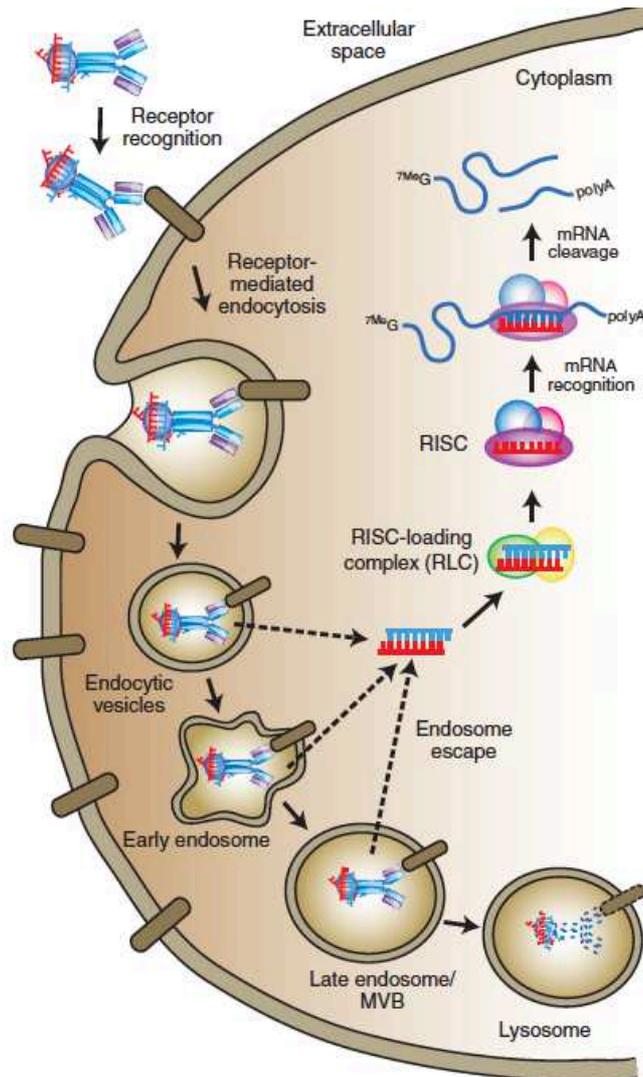
Bei dem Ansatz zum Ewing Sarkom liegt die Sachlage etwas anders. Das Ewing Sarkom ist eine monokausale Erkrankung, bei der die Ursache der Erkrankung in 85 % der Fälle in der pathologischen Bildung Fusionsproteins EWS/FLi1 liegt. Hier wird eine siRNA eingesetzt, die sich direkt über den Bruchpunkt (siehe Abbildung 5) des Fusionsgens legt. So wird hier nur die mRNA des Fusionsproteins abgebaut und nicht die mRNA der einzelnen Gene EWS und FLi1. Beide sind überlebenswichtig für die Zelle <sup>[51]</sup>.

Als Kontrolle wird beim Kolorektalkarzinom eine scrambled-esiRNA eingesetzt, die gegen GFP gerichtet ist und somit keinen Angriffspunkt in den Zielzellen findet. Beim Ewing Sarkom wird eine scrambled-siRNA eingesetzt, die aus den gleichen Basen wie die EWS/FLi1-siRNA besteht, jedoch so angeordnet, dass sie ebenfalls keine kompatible Sequenz in Ewing Sarkom Zellen findet.

### 1.9 Ziele der Arbeit

Zusammengefasst liegt das Ziel dieser Arbeit in der spezifischen Tumorthherapie durch rezeptorvermittelte RNA Interferenz. Dabei sollen siRNAs, gekoppelt an ein Antikörper-Protamin-Transportsystem, über Rezeptorinternalisierung in Krebszellen geschleust werden und dort in den Weg der RNA Interferenz eintreten (siehe Abbildung 12). Die siRNA richtet sich hierbei gegen mutierte Proteine oder onkogene Fusionsproteine, die in den Krebszellen zu unkontrollierter Zellteilung führen. Durch den Knockdown dieser Proteine soll die Proliferation der Tumorzellen inhibiert werden oder im idealen Fall sogar zu deren Apoptose führen. Eine mögliche Perspektive bei diesem Therapieansatz ist es, ein Baukastenprinzip zu entwickeln, bei dem jeder Patient eine individuell auf ihn zugeschnittene Therapie mit siRNAs bekommt. Diese würde sich je nach Krebsform, Rezeptorbeschaffenheit der Krebszelloberfläche und Mutationen individuell aus verschiedenen Antikörpern und siRNAs zusammensetzen.

Die vorliegende Arbeit ist dafür in zwei Teile aufgeteilt. Im ersten Teil der Arbeit soll die rezeptorvermittelte siRNA-Therapie am Beispiel des KRAS-mutierten Kolorektalkarzinoms dargestellt und etabliert werden. Im zweiten Teil der Arbeit soll dieser Therapieansatz auf eine zweite Krebsform, das Ewing Sarkom, übertragen werden.



**Abbildung 12: siRNA-Transport in Krebszellen durch monoklonale Antikörper**

Antikörper, gerichtet gegen einen bestimmten Rezeptor, können durch ihre Bindung die Internalisierung dieses Rezeptors initiieren und so in eine Zelle gelangen. siRNAs gekoppelt an einen Antikörper-Protamin-Komplex können so in eine Zelle geschleust werden. Dabei nimmt die Zelle den Antikörper gebunden an den Rezeptor durch Endozytose auf. Die siRNA ist in der Lage aus dem frühen Endosom zu entkommen und kann dann im Cytoplasma in den RISC Komplex aufgenommen werden und über RNAi zum Abbau der Ziel-mRNA führen. *Entnommen aus [3]*

### 1.9.1 Ansatz Kolorektalkarzinom

Die Idee für den Einsatz von siRNA in der Kolorektalkarzinomtherapie fundiert auf der Cetuximab-Resistenz von KRAS-mutierten CRC-Patienten. Cetuximab oder auch Panitumumab werden als EGFR-Inhibitoren für Darmkrebs bereits eingesetzt und zeigen gute Ergebnisse in der Hemmung des Tumorwachstums durch die Blockade des EGFR-Signalwegs <sup>[47]</sup>. Patienten, die eine KRAS-Mutation aufweisen, zeigen eine Resistenz gegen diese Antikörperbehandlung, weil KRAS als Teil des EGFR-Signalwegs in seiner mutierten Form dauerhaft aktiviert, somit rezeptor-unabhängig ist und dadurch dauerhaft das Signal zur Proliferation an den Zellkern weiterleitet. Durch diese *downstream-*

## 1. Einleitung

Mutation verhindern die CRC-Zellen die Wirkung der EGFR Antikörper und ihre Inhibition der Signalweiterleitung. Im ersten Abschnitt der Arbeit sollen nun esiRNAs gerichtet gegen die mutierte KRAS Form in die CRC-Zellen geschleust werden, das mutierte KRAS ausschalten und die Zellen so wieder sensitiv für die Cetuximab- oder Panitumumab-Behandlung machen. Von Cetuximab ist bekannt, dass seine Bindung an den EGF-Rezeptor nicht nur den Signalweg hemmt, sondern auch die Internalisierung des Rezeptors initiiert <sup>[39,47]</sup>. Aus diesem Grund soll ein Transportsystem entwickelt werden, bei dem Cetuximab als Shuttle für die KRAS-esiRNA in die Zielzellen dient. Dafür muss zunächst die Internalisierung des Rezeptors nach Antikörperbindung und der tatsächliche Transport der esiRNA in die Zelle überprüft werden. In einem nächsten Schritt wird die Wirkung der esiRNA im Vergleich zu einer Kontroll-esiRNA in verschiedenen Assays, die die Zellproliferation, den Stoffwechsel der Zellen und die Apoptose der Zellen untersuchen, überprüft. Auch der Knockdown des Zielproteins in den Zellen soll mit Hilfe eines Western Blots nachgewiesen werden. Am Ende dieses Projektteils steht ein *in vivo* Experiment, das Aufschlüsse über die Wirkung des Therapieansatzes auf Tumorwachstum und die Verträglichkeit dieser Therapieform in einem humanen Xenograft-Modell in immundefizienten Mäusen geben soll.

### 1.9.2 Ansatz Ewing Sarkom

In der Theorie sollte der in dieser Arbeit beschriebene Therapieansatz nach dem Baukastenprinzip funktionieren. Nachdem erste Erfolge bei der Behandlung des Kolorektalkarzinoms mit diesem rezeptorvermittelten esiRNA-Ansatz beobachtet werden konnten, wurde nach einer weiteren Krebsform gesucht, bei der dieser Ansatz Anwendung finden könnte. Als interessantester Kandidat rückte das Ewing Sarkom in den Fokus. Ausgelöst durch eine Translokation, die in der Bildung eines Fusionsproteins endet, dass die Zellproliferation vorantreibt, sollte dieses Gen sich durch eine siRNA, die direkt über dem Bruchpunkt des Fusionsgens ansetzt, gut targetieren lassen. Bekannt ist, dass Ewing Sarkom Zellen den IGF-1-Rezeptor und CD99 auf ihrer Oberfläche überexprimieren. Aus diesem Grund sollen die beiden Rezeptoren auf ihre Internalisierungsfähigkeit nach einer Antikörperbindung hin überprüft werden.

Bei diesem Ansatz werden zunächst drei verschiedene Antikörper als Transportvehikel für die siRNA getestet. Dabei handelt es sich um den kommerziell erwerbbaaren IGF-1R Antikörper GR11L, den ebenfalls kommerziellen  $\alpha$ humanCD99 Antikörper hCD99 und nachdem die beiden vorangegangenen Antikörper nach längerem Gebrauch einige Limitierungen aufwiesen, noch einen dritten selbstproduzierten IGF1-R Antikörper A12.

Wie beim Kolorektalkarzinom soll zunächst die Internalisierung der Rezeptoren und der tatsächliche Transport der siRNA in die Zellen für alle drei Antikörper überprüft werden. Zusätzlich muss eine

## 1. Einleitung

siRNA ausgewählt werden, die zur Herunterregulation des Fusionsproteins EWS/FLi1 führt. Die Funktionalität der siRNA soll auf mRNA-Level und Protein-Level untersucht werden und ihre Wirkung auf den Stoffwechsel und die Zellproliferation der Zielzellen *in vitro*. Beim hCD99 Antikörper wird die unterstützende Wirkung von Chloroquin als *Endosomal Escape* Hilfe zusätzlich untersucht. Am Ende soll auch in diesem Projektteil der Arbeit ein *in vivo* Experiment stehen.

Dieser Ansatz unterscheidet sich vom Kolorektalkarzinomansatz dadurch, dass hier die siRNA nicht eingesetzt wird um die Zellen zugänglicher für eine andere Behandlung zu machen, sondern das Ziel ist es, allein durch die Behandlung mit der siRNA die Tumorzellen in ihrem Wachstum und ihrer Zellteilung zu stören oder gar die Apoptose einzuleiten.

### **1.9.3 Kolokalisation von siRNA mit Endosom oder Lysosom**

Über das Verbleiben der siRNA nach der Aufnahme in die Zelle ist noch nicht viel bekannt. Das Entkommen aus den Endosomen wird stark beforscht und ist doch noch nicht endgültig bekannt. Aus diesem Grund soll in einem Nebenprojekt überprüft werden, ob die siRNAs das Endosom verlassen oder ob sie zum Teil im Lysosom landen und dort abgebaut werden. Dafür wird mit fluoreszierender siRNA und Markern für frühe Endosomen und Lysosomen gearbeitet.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

In den nachfolgenden Unterkapiteln werden alle verwendeten Geräte, Verbrauchsmaterialien, Zelllinien, Zellkulturmedien und diverse andere benötigte Materialien aufgeführt.

#### 2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

**Tabelle 1: Geräte und Verbrauchsmaterialien derdurchgeführten Experimente**

Geräte/Verbrauchsmaterialien	Hersteller
1 L Glasflasche	Schott AG, Mainz, Deutschland
100 Menzel Deckgläser 24 x 50 mm	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
4K10 Zentrifuge	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA
7500 Fast Real-Time PCR-System	Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA
Äkta pure Chromatografie System	GE General Electric, Boston, Massachusetts, USA
Amersham Imager 600	GE General Electric, Boston, Massachusetts, USA
Autoklav VX 95	Systec GmbH, Linden, Deutschland
Axio Lab A.1, Durchlichtmikroskop	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
AxioCam MRm, Mikroskopkamera	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Biofuge Primo R, Zentrifuge	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Biophotometer	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Biopur Combitips 1 ml, 5 ml, 10 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Biosphere Filter Tip 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Cat ST5 Wippe	CAT Ingenieurbüro, allrechten-Dottingen, Deutschland
Cellstar Cell Culture Dishes, PS, 100 x 20 mm	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Costar Stripette 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml Einwegpipetten	Corning Inc., New York, USA
Digital Electronic Caliper	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Digital Monochrome Thermal Printer P19D	Mitsubishi Motors, Tokio, Japan
Durchflusszytometer FACSCalibur™	BD Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey,

## 2. Material und Methoden

	USA
Durchlichtmikroskop CKX41	Olympus <sup>®</sup> , Tokio, Japan
Economic Cooler	Robert Bosch GmbH, Stuttgart Deutschland
Einmalkanüle Supra 200x	Ehrhardt Medizinprodukte GmbH, Geislingen, Deutschland
Epichem 3 Darkroom	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland
Falcon <sup>™</sup> 14 ml Polypropylene Round Bottom Tube	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Falcon <sup>™</sup> 15 ml High Clarity Polypropylene Conical Tube	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Falcon <sup>™</sup> 5 ml Polystyrene Round Bottom Tube with Cell Strainer Cap	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Falcon <sup>™</sup> Cell strainer, 70 µm, Nylon	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Falcon <sup>™</sup> Conical Tube, 50 ml, Polypropylene	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Falcon <sup>™</sup> Culture Slides, 8 chamber, PS, Tissue culture treated glass slide	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Feather Disposal Scalpel	Feather Safety Razor Co., Osaka, Japan
Filtropur S, 0,2 µm	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Filtropur V50, 0,45 µm, 500 ml, Vacuum Filter	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Fraction Collector F9-R	GE General Electric, Boston, Massachusetts, USA
Heracell <sup>™</sup> 240 Inkubator	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Herasafe Sicherheitsbank	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
HiTrap <sup>™</sup> Protein G, 5 ml, HP	GE General Electric, Boston, Massachusetts, USA
IKA <sup>®</sup> Schüttler, KS 3000i control	IKA <sup>®</sup> GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
IKA <sup>®</sup> Schüttler, KS 4000i control	IKA <sup>®</sup> GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Illustra <sup>™</sup> Sephadex G-50	GE General Electric, Boston, Massachusetts, USA
Infinity 2 Mikroskopkamera	Lumenera Corporation, Ottawa, Ontario, Kanada
Integra Absaugsystem	INTEGRA Biosciences GmbH, Biebertal, Deutschland
Invitrogen Novex Mini Cell X Cell Sure Lock <sup>™</sup> Electrophoresis Cell	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA

## 2. Material und Methoden

Kapillarspitzen 200 µl	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Kimtech Science Präzisionswischtücher	Kimberly Clark Professional, Roswell, Kanada
Leukofix <sup>®</sup>	BSN edical GmbH, Hamburg, Deutschland
Liebherr Comfort -20	Liebherr, Bulle, Schweiz
Mastercycler Nexus Gradient, PCR-Maschine	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
MColorpHast pH 5,0 – 10,0	Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA
Mettler Toledo Five Easy Plus pH-Meter	Mettler-Toledo, Columbus, Ohio, USA
MF26 Eismaschine	Scotsman Ice Systems, Vernon Hills, Illinois, USA
MicroAmp Fast Optical 96-Well, Reaction Plate mit Barcode	Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA
MicroAmp Optical Adhesive Film	Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA
Millipack Express 20 Filter	Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA
MilliQ	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien, USA
Mini-Protean <sup>®</sup> TGF stain-free <sup>™</sup> Gels	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien, USA
Mini-Protean <sup>®</sup> -Tetrasystem	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien, USA
Mini-Sub <sup>®</sup> Cell GT Gelelektrophoresekammer	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien, USA
Multiscreen-HV 96-Well Plate	Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA
NanoDrop Spectrophotometer ND-1000	PEQLAB Biotechnologier GmbH, Erlangen, Deutschland
Novex NuPage 10 % Bis-Tris Gele 1,0 mm x 12-Well	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Novex NuPage Gradientengele	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Optimax Film Prozessor, Entwicklermaschine	PROTEC HmbH & Co. KG, Oberstenfeld, Deutschland
Orbitalschüttler Rocky 3D	Labortechnik Fröbel GmbH, Lindau, Deutschland
Parafilm <sup>®</sup>	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA
Pasteurpipetten aus Glas	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland

## 2. Material und Methoden

PCR Single Cap, 8er soft-Stripes, 0,2 ml, farblich gemischt	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
PCR Soft Tubes, 0,2 ml, farblos	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Petrischale mit Nocken 92 x 16 mm	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
PhosphoSTOP EASYpack	Roche, Basel, Schweiz
Pipetboy Pipettierhilfe	INTEGRA Biosciences GmbH, Biebertal, Deutschland
Pipetgirl Pipettierhilfe	INTEGRA Biosciences GmbH, Biebertal, Deutschland
Pipette Eppendorf Research 2,5 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
PowerPac 300	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien, USA
PowerPac 3000	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien, USA
PowerPac Basic	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien, USA
Ready Gel Cell Gelelektrophoresekammer	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien, USA
Reagiergefäß 2,0 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße 0,6 ml	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Reaktionsgefäße 1,6 ml farblos	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Reaktionsgefäße, 1,6 ml, amber	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Röhre, 5 ml, 75 x 12 mm, PS	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Safe 2020 Sicherheitswerkbank	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Sanyo -80 Ultra Low, Gefrierschrank	San'yō Denki, Moriguchi, Japan
Schülke Wipes Spendereimer	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland
Schutzbrille Max Safety A1	HHW GmbH&Co.KG, Viernheim, Deutschland

## 2. Material und Methoden

Sharpsafe – Clinical Waste	Frontier Medical Group, Blackwood, Großbritannien
Spritze 5 ml, 10 ml, 25 ml, Discardit II	BD Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA
Spritze Omnifix®-F, 1 ml	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Hypodermic Needle-Pro® Needle with Needle Protection Device, 27G x ½“ / 0,4 x 2 mm	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Spülmaschine Innova 700	VWR International, Pennsylvania, USA
Steritop Vacuum Bottle Top Filter 0,22 µm, 500 ml	Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA
Stickstofftank	Tec-Lab GmbH, Taunusstein, Deutschland
Sulfo-SMCC No Weigh Format	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Thermo Fast 96 PCR Detection Plate, Sequenzierung	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
ThermoLab Wasserbad	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
Thermomixer Comfort	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Trans-Blot Turbo Mini Format 0,2 µm PVDF	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien, USA
Trans-Blot® Turbo™ Transfer System	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien, USA
Ultra Low Freezer	New Brunswick™, Eppendorf, Hamburg, Germany
Ultra-Turrax T8	IKA® GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
UV-Systeme	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland
Vakuumpumpe	Dunn Labortechnik, Asbach, Deutschland
Vasco Sensitive S Handschuhe	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Victor™ X3, Multimode Plate Reader	Perkin Elmer Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Vortex Genie 2	Bender & Hobein GmbH, Ismaning, Deutschland
Wash Cloth Folded	Tork SCA Hygiene Products AFH GmbH, Mannheim, Deutschland
Wasserbad	Memmert GmbH /Co. KG, Schwabach,

## 2. Material und Methoden

	Deutschland
Zeba™ Spin Desalting Columns, 7K MWCO, 5 ml	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Zeiss Stemi 2000 Binokular	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Zellkultur Multiwellplatte 6, 12, 24, 48, 96 PS Cellstar F-Boden	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Zellkulturflasche 25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> , 175 cm <sup>2</sup>	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Zellschaber S	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

### 2.1.2 Puffer, Lösungen, Medien

Tabelle 2: Puffer, Lösungen, Medien und ihre Zusammensetzung

Puffer/Lösung	Hersteller
0,1 % PBS-Tween	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 9,55 g PBS</li> <li>- 1 l ddH<sub>2</sub>O</li> <li>- 1 ml Tween 20</li> </ul>
0,1 % TBS-Tween	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 100 ml 10x TBS</li> <li>- 900 ml ddH<sub>2</sub>O</li> <li>- 1 ml Tween 20</li> </ul>
0,1 M Natriumtetraborat pH 8,5	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 1,91 g Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub></li> <li>- 50 ml ddH<sub>2</sub>O</li> <li>- pH 8,5 (HCl)</li> </ul>
0,2 % Triton X 100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 40 µl Triton X 100</li> <li>- 1960 µl ddH<sub>2</sub>O</li> </ul>
1 M Tris-HCl pH 8,5	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 6 g Tris</li> <li>- pH 8,5 (HCl)</li> </ul>
1 mg/ml INT	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 50 mg Iodonitrotetrazolium chloride</li> <li>- 50 ml ddH<sub>2</sub>O</li> </ul>
10 % Natriumazid	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 5 g Natriumazid</li> <li>- 50 ml ddH<sub>2</sub>O</li> </ul>
10 x TBS	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 88 g NaCl</li> <li>- 24 g Tris</li> <li>- 2 l ddH<sub>2</sub>O</li> <li>- pH 7,6</li> </ul>
1x Tris/Glycine/SDS-Puffer	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien, USA
20 mg/ml Protaminsulfat	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 0,2 g Protaminsulfat</li> <li>- 10 ml ddH<sub>2</sub>O</li> </ul>

## 2. Material und Methoden

4x PFA	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 2 g Paraformaldehyd</li> <li>- 50 ml ddH<sub>2</sub>O, 70 °C zum Lösen</li> <li>- 5 Tropfen 1N NaOH</li> <li>- pH 7,4</li> </ul>
5 % Milch PBS/Tween	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 1 g Milchpulver</li> <li>- 20 ml PBS/Tween</li> </ul>
5 % BSA in PBS/Tween + 0,02 % Natriumazid	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 5 g BSA</li> <li>- 100 ml 0,1 % PBS/Tween</li> <li>- 200 µl 10 % Natriumazid</li> </ul>
50 x TAE	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 242 g Tris Base</li> <li>- 51,1 ml Eisessig</li> <li>- 100 ml EDTA (0,5 M) pH 8,0</li> <li>- ad 1 l ddH<sub>2</sub>O</li> <li>- autoklavieren</li> </ul>
50 µg/ml Propidium Iodid	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 0,5 mg Propidium Iodid</li> <li>- 10 ml PBS</li> </ul>
5x Sequencing Buffer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Albumin Standard	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Amersham ECL <sup>TM</sup> Prime Western Blotting Detection Reagent	GE General Electric, Boston, Massachusetts, USA
Aqua ad iniectabilia, 10 ml	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Big Dye <sup>TM</sup> 3.1	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Chloroquin	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA
Ciprofloxacin KABI 200 mg/ 100 ml	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland
Denaturing Solution	2 M HCl
Dimethyl sulfoxide 250 ml	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
dNTP's	New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA
Dulbecco's Modified Eagle's Medium high Glucose	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA
Fetal Bovine Serum	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
G418	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri,

## 2. Material und Methoden

	USA
Geneticin	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA
Gibco <sup>®</sup> DMEM, ohne Phenolrot	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Gibco <sup>®</sup> IMDM (1x)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Gibco <sup>®</sup> RPMI 1640 ohne Phenolrot	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Glycin-HCl pH 2,5	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 100 mM Glycin</li> <li>- HCl</li> <li>- pH2,5</li> </ul>
Hoechst 33342	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
HT Supplement (50x), Gibco	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Invitrogen HiMark <sup>™</sup> Pre Stained HMW Protein Standard	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Invitrogen NuPage LDS Sample Buffer (4x)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Invitrogen Random Primer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Invitrogen RNase Out	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Invitrogen Sample Reducing Agent (10x)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Invitrogen SeeBlue <sup>®</sup> Plus 2 Pre Stained Standard	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
L-Glutamine 200 mM	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
M-MLV Reverse Transcriptase	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
M-MLV Reverse Transcriptase 5x Reaction Buffer	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
NEBuffer 2.1	New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA
Novex NuPAGE MOPS SDS Running Buffer (20x)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA

## 2. Material und Methoden

	Massachusetts, USA
PBS-2% FCS	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 500 ml Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</li> <li>- 10 ml FCS</li> </ul>
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA
PowerCHO2 chemically defined serum free CHO-Medium with HEPES	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Precision Plus Protein Western C Standard	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien, USA
ProCHO4, protein-free CHO-Medium with HEPES	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Q5 Polymerase	New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA
Q5 Puffer	New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA
Quick Coomassie	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
RIPA All in	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 400 µl Phosphatase Inhibitor</li> <li>- 1 Tablette PhosphoSTOP</li> <li>- 9,6 ml RIPA stock</li> </ul>
RIPA stock	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 15 ml NaCl (5 M)</li> <li>- 5 ml NP<sub>4</sub>O</li> <li>- 25 ml DOC (10 %)</li> <li>- 5 ml SDS (10 %)</li> <li>- 25 ml Tris (1 M)</li> <li>- 425 ml ddH<sub>2</sub>O</li> </ul>
RPMI 1640 Medium	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA
SOC-Medium	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 10 ml SOB-Medium</li> <li>- 100 µl MgCl<sub>2</sub> (2 M)</li> <li>- 100 µl MgSO<sub>4</sub> (1 M)</li> <li>- 10 µl Glucose (2 M)</li> </ul>
T4 DNA Ligase	New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA
T4 DNA Ligasepuffer	New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA
TaqMan <sup>®</sup> 2x Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA
TaqMan <sup>®</sup> Gene Expression EWS-Fli1 Fusion (HS03024497_ft)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA

## 2. Material und Methoden

Trypsin 10x	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Ultraglutamine	Lonza Group, Basel, Schweiz
Western Blotting Luminol Reagent ImmunoCruz	Santa Cruz Biotechnologies, Inc., Dallas, Texas, USA

### 2.1.3 Chemikalien

Tabelle 3: Eingesetzte Chemikalien

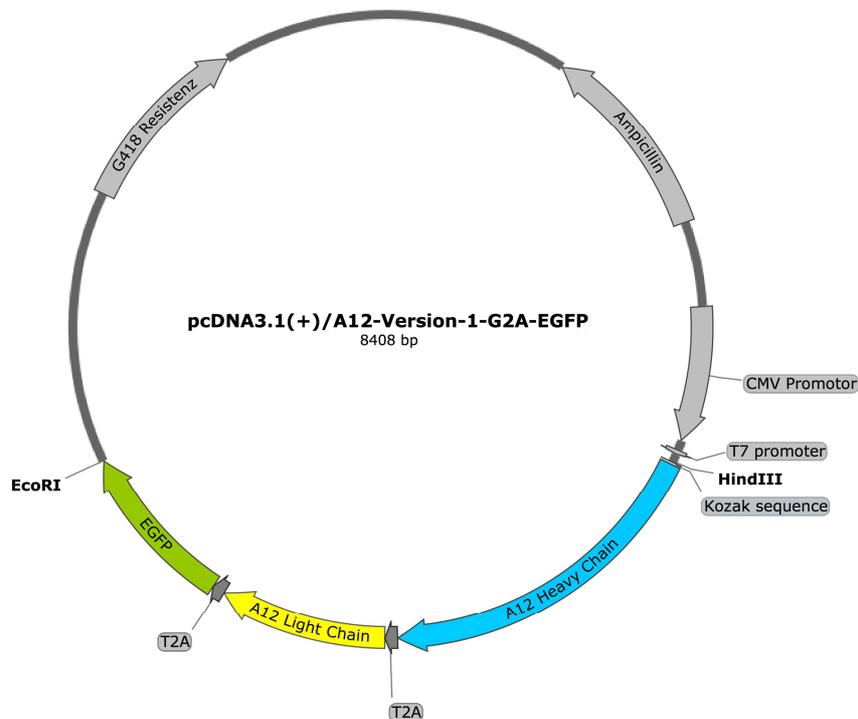
Chemikalie	Hersteller
2-Propanol	Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA
Bacto Agar	BD Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA
Bovine Serum Albumin	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA
Dako Fluorescence Mounting Medium	Dako North America, Inc., Carpinteria, Kalifornien, USA
Difco Agar Noble	BD Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA
Ethanol 99,9%	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA
Glycerol	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA
Glycin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Incidin Plus	Ecolab Deutschland GmbH, Monheim am Rhein, Deutschland
Iodonitrotetrazolium chloride (INT)	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA
LE Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Luria Broth	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA

## 2. Material und Methoden

Milchpulver	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
NaCl	Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA
Natriumazid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
PBS Dulbecco	Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA
Polyethylenimine linear (MW 25.000)	Polysciences Inc., Warrington, Pennsylvania, USA
Protamin Sulfate, Salmon Milt, Calbiochem	Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA
Quick Coomassie Stain, 1L	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Tris	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Triton X 100	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA
Tween	Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA

### 2.1.4 Plasmide

Für die Produktion des IGF-1R Antikörpers A12 V1 wird die Sequenz des Antikörpers in ein pcDNA3.1(+) Plasmid kloniert. Das Antikörperkonstrukt ist über die beiden Restriktionsschnittstellen HindIII und EcoRI in den Vektor kloniert.



**Abbildung 13: Produktionsvektor A12 V1**

Der IGF-1R Antikörper A12 V1 wird mit Hilfe des dargestellten Plasmids pcDNA3.1(+)/A12-Version-1-G2A-EGFP produziert. Die schwere Kette des Antikörpers ist dabei über ein G2A Peptid von der leichten Kette getrennt und die leichte Kette wiederum durch ein G2A Peptid von dem Fluoreszenzsignal EGFP.

### 2.1.5 Eingesetzte siRNA

**Tabelle 4: Die eingesetzten siRNAs, ihre Sequenz und der Hersteller**

esiRNA/siRNA	Sequenz	Hersteller
AllStar Alexa Fluor 488 siRNA	n.n.	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Targetsequenz der esiRNA KRAS	5'-AGGCCTGCTGAAAATGACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGGTGGCGTAGGCAAGAGTGCCTTGACGATACAGCTAATTCAGAATCATTTTGTGGACGAATATGATCCAACAATAGAGGATTCCTACAGGAAGCAAGTAGTAATTGATGGAGAAACCTGTCTCTTGGATATTCTCGACACAGCAGGTC AAGAGGAGTACAGTGAATGAGGGACCAGTACATGAGGACTGGGGAGGGCTTTCTTTGTGTATTGCCATAAATAACTAAATCATTGAA GATATTCACCATTATAGAGAACAAATTAAGAGTTAAGGACTCTGAA GATGTACCTATGGTCCTAGTAGGAAATAAATGTGATTTGCCTTAGAA CAGTAGACACAAAACAGGCTCAGGA-3'	Eupheria Biotech GmbH, Dresden, Deutschland

## 2. Material und Methoden

Targetsequenz der esiRNA GFP/scrm	5'-GTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCCGGGGTGGTGCCCATCCTGG TCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTTCAGCGGTCCGGCGA GGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTG CACCACCGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCACCCCTCGTGACCACCCCTG ACCTACGGCGTGCAAGTCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGC ACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCAC CATCTTCTTCAAGGACGAGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAG TTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGAC TTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTAC AACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCA AGGTGAACCTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGC TCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCT GCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGAC CCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCG CCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTA-3'	Eupheria Biotech GmbH, Dresden, Deutschland
Sense-Sequenz der siRNA EWS/FLi1	5'-GGCAGCAGAACCCUUCUUAUUUU-3'	Microsynth AG, Balgach, Schweiz
Sense-Sequenz der siRNA EWS/FLi1 scrm	5'-GGCCGACACCGUCAUUUAAUUTT-3'	Microsynth AG, Balgach, Schweiz

### 2.1.6 Primer

Tabelle 5: Eingesetzte Primer für die Klonierung von pcDNA3.1(+)/A12-Version-1-G2A-EGFP

Name	Sequenz	Hersteller
1 Kozak HC ohne Stop G2A for	5'-CCAAGCTGGCTAGCGTTTAAACTT AAGCTTGCCGCCACCATGGGATGG-3'	BioLegend, San Diego, CA, USA
1 Kozak HC ohne Stop G2A rev	5'-GCCGGTCTTCTCCTTTTACCCGGA GACAGGGAGAG-3'	BioLegend, San Diego, CA, USA
1 A12 LC G2A for	5'-GTCTCCGGGTAAAAGGAGGAAGA GGGGCAGCGGCGAGGGCAGGGGCA GCCTGCTGACCTGCGGCGACGTGGA GGAGAACCCCGGCCCATGGGATGG TCATGTATCAT CC-3'	BioLegend, San Diego, CA, USA
1 A12 LC G2A rev	5'-GCCCTCTTCTCCTAGAGCATTCT GCAGGGGC-3'	BioLegend, San Diego, CA, USA
1 EGFP STOP for	5'-TGCAGAATGCTCTAGGAGGAAGA GGGGCAGCGGCGAGGGCAGGGGCA GCCTGCTGACCTGCGGCGACGTGGA GGAGAACCCCGGCCCATGGTGAAGC AAGGGCGAG-3'	BioLegend, San Diego, CA, USA
1 EGFP STOP rev	5'-CCGCCACTGTGCTGGATATCTGCA GAATTCCTACTTGTACAGCTCGTCCAT-3'	BioLegend, San Diego, CA, USA
T7 for	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'	BioLegend, San Diego, CA, USA
BGH rev	5'-TAGAAGGCACAGTCGAGG-3'	BioLegend, San Diego, CA, USA
A12 for	5'-CACAGCTTCTTGACCATCA-3'	BioLegend, San Diego, CA, USA

### 2.1.7 Zelllinien

Tabelle 6: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Art	Mutation	Medium
A673	Ewing Sarkom	EWS/FLi1 t(11;22)(q24;q12)	DMEM 10 % FCS, 1 % PenStrep, 1 % Glu
EW8	Ewing Sarkom	EWS/FLi1 t(11;22)(q24;q12)	RPMI 10 % FCS, 1 % PenStrep, 1 % Glu
TC-71	Ewing Sarkom	EWS/FLi1 t(11;22)(q24;q12)	IMDM 10 % FCS, 1 % PenStrep, 1 % Glu
SKNM-C	Ewing Sarkom	EWS/FLi1 t(11;22)(q24;q12)	RPMI 10 % FCS, 1 % PenStrep, 1 % Glu
SYO	Synovialsarkom	SSX/SS18	DMEM 10 % FCS, 1 % PenStrep, 1 % Glu
SW480	Kolorektalkarzinom	KRAS G12V	RPMI 10 % FCS, 1 % PenStrep, 1 % Glu
DLD-1	Kolorektalkarzinom	KRAS G13D	RPMI 10 % FCS, 1 % PenStrep, 1 % Glu
HCT116	Kolorektalkarzinom	KRAS G13D	DMEM 10 % FCS, 1 % PenStrep, 1 % Glu
HT19	Kolorektalkarzinom	BRAF V600E	IMDM 10 % FCS, 1 % PenStrep, 1 % Glu
CHO-S	Chinese Hamster Ovary	-	RPMI 10 % FCS, 1 % PenStrep, 1 % Glu / PowerCHO 4 % Ultraglutamine, 2 % HT Supplement

### 2.1.8 Enzyme

Tabelle 7: Eingesetzte Restriktionsenzyme

Restriktionsenzym	Sequenz	Hersteller
HindIII	A---AGCTT TTCGA---A	New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA
EcoRI	G---AATC CTTAA---G	New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA
NheI	G---CTAGC CGATC---G	New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA

### 2.1.9 Antikörper

Tabelle 8: Eingesetzte Western Blot Antikörper

Antikörper	Verdünnung	verdünnt in	Sekundärantikörper	Hersteller
αhulgG-HRP	1:100	5 % BSA in 0,1 % PBS/Tween	-	Abcam, Cambridge, Großbritannien
KRAS	1:500	5 % BSA in 0,1 % PBS/Tween	Goat-anti-Mouse	Abcam, Cambridge,

## 2. Material und Methoden

				Großbritannien
FLi1 C-19	1:2000	5 % BSA in 0,1 % PBS/Tween	Goat-anti-Rabbit	Santa Cruz Biotechnologies, Inc., Dallas, Texas, USA
FLi1 F-12	1:2000	5 % BSA in 0,1 % PBS/Tween	Goat-anti-Rabbit	Santa Cruz Biotechnologies, Inc., Dallas, Texas, USA
phospho-ERK	1:2000	5 % BSA in 0,1 % TBS/Tween	Goat-anti-Rabbit	Cell Signaling Technology, Cambridge, Großbritannien
total-ERK	1:5000	5 % BSA in 0,1 % PBS/Tween	Goat-anti-Rabbit	Cell Signaling Technology, Cambridge, Großbritannien
cMyc	1:1000	5 % BSA in 0,1 % PBS/Tween	Goat-anti-Rabbit	Cell Signaling Technology, Cambridge, Großbritannien
Actin	1:10.000	5 % BSA in 0,1 % PBS/Tween	Goat-anti-Mouse	Cell Signaling Technology, Cambridge, Großbritannien

**Tabelle 9: Eingesetzte Immunfluoreszenz Antikörper**

<b>Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
Alexa Fluor 594 Donkey anti rabbit IgG	1:1000	BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
BD Pharmingen PE Annexin V	1:100	BD Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA
Cy3 Donkey anti Rabbit IgG	1:100	BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
BD Pharmingen PE Goat anti Mouse IgG	1:100	BD Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA
EEA1 (C45B10) Rabbit	1:100	Cell Signaling Technology, Cambridge, Großbritannien
LAMP1 (D2D11) XP Rabbit	1:100	Cell Signaling Technology, Cambridge, Großbritannien
EGFR-FITC	1:5	Santa Cruz Biotechnologies, Inc., Dallas, Texas, USA
Goat-anti-Rabbit-HRP	1:10.000	Abcam, Cambridge, Großbritannien
Goat-anti-Mouse-HRP	1:10.000	Abcam, Cambridge, Großbritannien

## 2. Material und Methoden

**Tabelle 10: Eingesetzte Antikörper für die siRNA-Antikörper-Behandlung**

Antikörper	Konzentration	Konzentration gekoppelt	Hersteller
Anti-IGF-1R (Ab-1) Mouse mAb $\alpha$ IR3 GR11L 0,1 mg/ml	0,625 $\mu$ M	0,32 $\mu$ M	Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA
Purified Anti-human CD99 – hCD99 0,5 mg/ml	3,13 $\mu$ M	1,96 $\mu$ M	BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
Erbitux <sup>®</sup> 5 mg/ml, $\alpha$ EGFR, Cetuximab	31,25 $\mu$ M	18,8 $\mu$ M	Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA
A12 Version 1, 0,2 mg/ml	1,25 $\mu$ M	0,78 $\mu$ M	Eigenproduktion

### 2.1.10 Kits

**Tabelle 11: Verwendete Kits**

Kit	Hersteller
5'Prime Fast Plasmid Mini Kit	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
E.coli Transformation Buffer Set Mix&Go	Zymo Research, Irvine, Kalifornien, USA
FITC Mouse Anti BrdU-Set	BD Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA
HiFi DNA Assembly Kit	New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA
NEBuilder <sup>®</sup> HiFi DNA Assembly Cloning Kit	New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA
NucleoBond Xtra Maxi (50 Preps)	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
PE Annexin V Apoptosis Detection Kit	BD Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Quiaquick <sup>®</sup> Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Quiaquick <sup>®</sup> PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
RNeasy <sup>®</sup> Mini Kit (250)	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland

### 2.2 Methoden

Im Folgenden werden die verwendeten Methoden dieser Arbeit beschrieben.

#### 2.2.1 Produktion des humanen IGF-1R Antikörpers A12

Für die Produktion des IGF-1R Antikörpers A12-V1 werden *Chinese Hamster Ovary* Zellen verwendet, die an Suspensionswachstum adaptiert sind (CHO-S). Die Produktion erfolgt zunächst über eine transiente Genexpression (TGE). Um die Ausbeute an Antikörper zu erhöhen wurde anschließend ein stabiler Klon mit hoher A12-V1 Produktionsrate selektioniert.

##### 2.2.1.1 Kultivierung der CHO-S-Zellen für die Produktion des IGF-1R Antikörpers A12

CHO-S Zellen werden nach dem Auftauen zunächst in RPMI mit 10 % FCS adhärent gehalten. Ein Tag vor der Transfektion mit dem Produktionsplasmid werden die Zellen auf ein synthetisches PowerCHO Medium ohne FCS umgestellt. Das Weglassen des FCS sorgt dafür, dass die Zellen ihr adhärentes Wachstum einstellen und in ein Suspensionswachstum übergehen. Das Wachstum in Suspension ermöglicht eine höhere Zelldichte pro Milliliter Medium. Die Zellen werden alle drei Tage in einem Verhältnis von 1:10 gesplittet. Alle Arbeiten mit den CHO-S Zellen werden unter der Sterilbank durchgeführt.

##### 2.2.1.2 Transfektion der CHO-S Zellen mit dem Produktionsplasmid pCDNA3.1(+)-A12-HC-G2A-LC-G2A-GFP und Produktion des IGF-1R Antikörpers A12

Die Menge der Transfektionsreagenzien hängt von der Anzahl der zu transfizierenden Zellen ab (siehe Tabelle 12,13,14). An dieser Stelle wird als Beispiel die Transfektion für 200 Millionen Zellen erklärt. Die CHO-S Zellen in PowerCHO werden gezählt und 200 Millionen Zellen für 5 min bei 400 x g abzentrifugiert. Der Mediumüberstand wird verworfen und die Zellen in 100 ml Transfektionsmedium ProCHO aufgenommen. Die Zellen werden anschließend in eine 1 l Glasflasche mit Schraubverschluss, die zuvor autoklaviert und sterilisiert wurde, überführt.

Die Transfektion erfolgt mit 1,25 µg des Produktionsplasmids pro eine Million Zellen. Das entspricht bei 200 Millionen Zellen einer Menge von 250 µg von pCDNA3.1(+)/A12-Version-1-G2A-EGFP. Die 250 µg DNA werden auf 5 ml mit sterilfiltriertem 150 mM NaCl aufgefüllt. Von dem Transfektionsreagenz Polythylenimin (PEI) werden 5 µg pro eine Million Zellen eingesetzt. Bei diesem Ansatz werden deshalb 1 ml einer 1 g/l PEI-Lösung zusammen mit 4 ml des 150 mM NaCl

## 2. Material und Methoden

verwendet. Die 5 ml DNA-Lösung und die 5 ml PEI-Lösung werden tropfenweise zusammengegeben und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, damit das Plasmid und das Polyethylenimin sich verbinden können. Anschließend wird das Gemisch tropfenweise zu den 200 Millionen CHO-S Zellen in ProCHO hinzugegeben. Die Glasflasche wird am Flaschenhals abgeflammt, mit autoklavierter Laborwatte verschlossen und für 4 Stunden bei 37°C in einem Schüttelinkubator inkubiert. Nach der Inkubationszeit werden 100 ml PowerCHO unter der Sterilbank zu den transfizierten Zellen gegeben, der Flaschenhals wird erneut abgeflammt und die Flasche mit einem neuen Wattestopfen verschlossen. Danach erfolgt die Produktionsphase des Antikörpers. Dafür werden die Zellen für 6 Tage im Schüttelinkubator bei 31°C inkubiert. Bei dieser Temperatur stellen die Zellen ihre Proliferation zum größten Teil ein und produzieren hauptsächlich den IGF-1R Antikörper A12 V1. Um eventuelle Kontaminationen über diesen langen Produktionszeitraum zu vermeiden, wird nach drei Tagen 1 % Anti-Anti unter der Sterilbank und unter Erneuerung des Wattestopfens hinzugefügt. Im Zuge dieses Öffnens der Flasche wird ebenfalls ein Milliliter der Zellsuspension entnommen. Der Milliliter wird abzentrifugiert und im Vergleich zu untransfizierten CHO-S Zellen im FL1-Kanal auf GFP am FACS gemessen. So kann die GFP Intensität der Zellen überprüft werden. Im Durchschnitt liegt der Transfektionserfolg bei ca. 20 % GFP-positiven Zellen (Ergebnisse nicht gezeigt).

Die Transfektion findet in einer 1 Liter Glasflasche statt. Um den Gasaustausch von O<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> mit der Umgebung zu gewährleisten, da die Schüttelinkubatoren einen CO<sub>2</sub> Zufluss haben, sollte eine 1 Liter Flasche nicht mit mehr als 300 ml und damit auch mit nicht mehr als 300 Millionen Zellen befüllt werden. So steht genug Luft über dem Medium um die Zellen ausreichend mit Sauerstoff zu versorgen. Genügend CO<sub>2</sub> bekommen die Zellen durch das CO<sub>2</sub>-gepufferte Transfektionsmedium.

**Tabelle 12: Eingesetzte Plasmidmenge pro Zellzahl und Transfektion von CHO-S Zellen**

Zellzahl in Millionen Zellen	DNA in µg	150 mM NaCl	Total
100	125	2,5 ml	2,5 ml
200	250	5 ml	5 ml
300	375	7,5 ml	7,5 ml
400	500	10 ml	10 ml
500	625	12,5 ml	12,5 ml

## 2. Material und Methoden

**Tabelle 13: PEI-Menge pro Zellzahl und Transfektion**

Zellzahl in Millionen Zellen	PEI	150 mM NaCl	Total
100	0,5 ml	2 ml	2,5 ml
200	1 ml	4 ml	5 ml
300	1,5 ml	6 ml	7,5 ml
400	2 ml	8 ml	10 ml
500	2,5 ml	10 ml	12,5 ml

**Tabelle 14: Mediummenge pro Zellzahl und Transfektion in einer 1 l Flasche**

Zellzahl in Millionen Zellen	ProCHO (für Transfektion)	PowerCHO (on top nach Transfektion)	Total	Flasche
100	50 ml	50 ml	100 ml	500 ml
200	100 ml	100 ml	200 ml	500 ml
300	150 ml	150 ml	300 ml	1 l
400	200 ml	200 ml	400 ml	1-2 l
500	250 ml	250 ml	500 ml	2 l

### 2.2.1.3 Proteinaufreinigung des IGF-1R Antikörpers A12 V1 mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (HPLC)

Nach 6-tägiger Produktion wird die Zellsuspension in 50 ml Falcontubes überführt und die Zellen für 5 min bei 400 x g abzentrifugiert. Wenn sich nicht alle Zellen am Boden abgesetzt haben und der Überstand noch leicht trüb erscheint, kann dieser Schritt wiederholt oder die Zentrifugationsgeschwindigkeit auf 1000 oder mehr g erhöht werden. Die 200 ml Überstand werden nach Zentrifugation mit einem SteriTop-Sterilfilter sterilfiltriert und mit 0,01 % Natriumazid versetzt um nachträgliches Kontaminieren des Antikörperüberstands zu verhindern.

Um den Antikörper aus dem ProCHO/PowerCHO-Medium zu reinigen, wird der Überstand zunächst 1:1 mit PBS verdünnt und anschließend mit Hilfe der Äkta pure auf eine ProteinG-Sepharose-Säule aufgetragen. Die Elution des Antikörpers erfolgt mit einem Glycin-HCl-Puffer mit einem pH von 2,5. Vor der Elution wird 150 µl Tris-HCl mit einem pH von 8,5 in die Auffangbehälter vorgelegt um direkt

## 2. Material und Methoden

nach der Elution eine Umgebung mit dem pH-Wert 7,0 für den Antikörper zu gewährleisten. Die Elution erfolgt in 1,5 ml Fraktionen. Die Fraktionen mit den höchsten Absorptionseinheiten (AU) werden vereinigt und mit Hilfe von *Zeba Spin Desalting Columns* gefiltriert und so in PBS umgepuffert (Gelfiltration siehe Abschnitt 2.2.2.3). Für die Konzentrationsbestimmung des nun in PBS vorliegenden, aufgereinigten IGF-1R Antikörpers A12 V1 wird eine OD280 Bestimmung am NanoDrop vorgenommen.

### 2.2.1.4 Überprüfung des aufgereinigten IGF-1R Antikörpers A12 V1

Um die Größe des Antikörpers und die Reinheit der Aufreinigung zu überprüfen wird der aufgereinigte Antikörper auf ein 10 %-iges Bis-Tris Gel aufgetragen und anschließend Coomassie gefärbt. Dafür werden 20 µl des Antikörpers mit 5 µl 4x LDS versetzt und eine weitere Probe mit zusätzlichen 2,5 µl Reducing Agent um auch die Einzelteile des Antikörpers beurteilen zu können. Zum Vergleich werden die gleichen Proben eines kommerziell erwerbbaaren Antikörpers, in diesem Fall Cetuximab, genauso angesetzt. Alle vier Proben werden für 5 min bei 95°C aufgeköcht und anschließend auf das Gel aufgetragen. Das Gel wird zunächst bei 80 V gestartet, bis alle Proben gleichmäßig aus den Taschen gewandert sind. Dann wird die Voltzahl auf 140 V erhöht und für ca. 1,5 h laufen gelassen. Anschließend wird das Gel entnommen, einmal für 5 min in ddH<sub>2</sub>O gewaschen und danach für 15 min in ca. 25 ml QuickCoomassie-Stain angefärbt. Zum dann folgenden Entfärben wird das Gel erneut in ddH<sub>2</sub>O überführt und für ca. 1 Stunde bei Raumtemperatur schüttelnd entfärbt. Die blauen Banden können nun ausgewertet werden.

### 2.2.1.5 Selektion eines stabilen A12 V1 Produktionsklons – Dot Blot

Im Durchschnitt liegt die Transfektionsrate der TGE von CHO-S bei 20 %. Aus dem Überstand werden ungefähr 0,5 mg Antikörper herausgereinigt. Um die Effizienz und die Antikörperausbeute zu steigern wird deshalb eine stabile Produktionslinie aus einem Einzelklon selektioniert. Dafür werden zunächst nach den sechs Tagen Produktion fünf Milliliter der Zellsuspension abgenommen und auf RPMI umgesetzt. Durch das Umsetzen werden die mit dem Produktionsplasmid transfizierten Zellen wieder adhären. Das RPMI Medium wird zusätzlich mit 2 mg/ml G418 versetzt. Durch G418 sterben die Zellen, die das Produktionsplasmid nicht aufgenommen haben. Dadurch, dass die Zellen nun wieder adhären wachsen, können die toten Zellen einfach abgenommen und die überlebenden Zellen mit neuem Medium versorgt werden. Nach ungefähr zwei Wochen unter G418 werden die Zellen noch einmal auf GFP Positivität hin bei der FACS Facility gesortet. Nach einer weiteren

## 2. Material und Methoden

Wachstumswoche werden die Zellen erneut auf GFP hin sortiert. Diesmal jedoch als Einzelzellsort. Dabei wird jeweils eine einzelne Zelle in ein 96-Well gesortet. Insgesamt vier 96-Well Platten werden dafür vorbereitet. In jedes Well werden 100 µl Medium vorgelegt, damit die Einzelzellen nicht austrocknen. Die vier Platten unterscheiden sich dabei in der Grünintensität. Die Zellen werden anschließend mit weiteren 100 µl Medium versorgt und für zwei Wochen bei 37°C inkubiert. Danach wird jedes Well auf seine Zelldichte hin überprüft. Insgesamt 70 Einzelzellen, die GFP-positiv sind, sind in den 2 Wochen angewachsen und bilden einen geschlossenen Monolayer am Boden des 96-Well aus. Von den Überständen dieser 70 Klone wird dann ein Dot Blot angefertigt. Dafür werden 4 µl jedes Überstands auf eine Nitrozellulosemembran aufgebracht. Zur Kontrolle werden noch 2 µl des bereits aufgereinigten A12 mit auf die Membran gegeben. Anschließend wird die Membran für 30 Minuten getrocknet. Danach wird die Nitrocellulose Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur in 5%-Milch geblockt, anschließend dreimal für jeweils 10 Minuten mit PBS-1%-Tween gewaschen und dann für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur mit einem Antikörper gegen humane IgG-Antikörper inkubiert. Bei den Einzelklonen, die A12 V1 produzieren, müsste der Überstandspunkt als dunkler Punkt im entwickelten Dot Blot zu sehen sein. Der Klon, der den deutlichsten Punkt ausbildet, wird als stabiler Produktionsklon im weiteren Verlauf verwendet.

Der auserwählte Produktionsklon wird anschließend expandiert und sobald 300 Millionen Zellen erreicht sind, werden die Zellen abgenommen und in PowerCHO-Medium in eine 1 Liter Glasflasche überführt. Die Glasflasche wird wie bei der transienten Transfektion mit einem Wattestopfen verschlossen und für 6 Tage bei 31°C für die Produktion inkubiert. Die Aufreinigung des Antikörpers aus diesem Überstand erfolgt wie in Abschnitt 2.2.1.3 beschrieben. Der stabile Klon produziert in den 6 Tagen in 300 Milliliter Überstand ungefähr 8 mg vom A12. Das sind 16-Mal so viel wie eine einfache Transfektion schafft.

### 2.2.2 Kopplung von Protamin an Antikörper

Für den Transport von siRNAs in die Zielzellen müssen die verwendeten monoklonalen Antikörper so modifiziert werden, dass Protamin irreversibel über einen chemischen Linker an die Antikörper konjugiert ist. Da die Antikörper, die in dieser Arbeit eingesetzt werden, in unterschiedlichen Lösungen gelagert werden und verschiedene Konzentrationen aufweisen, unterscheidet sich das Kopplungsverfahren von dem EGFR Antikörper Cetuximab, dem hCD99 Antikörper und den IGF-1R Antikörpern GR11L und A12 V1. Die Kopplung der Antikörper erfolgt mit einem Two-Step-Kopplungsverfahren.

### 2.2.2.1 Kopplung von Protamin an den chemischen Linker sulfo-SMCC

Der erste Schritt der Protaminkopplung an die Antikörper besteht in der Kopplung des Protamins an den chemischen Linker sulfo-SMCC. Dafür wird sulfo-SMCC zunächst in 200 µl ddH<sub>2</sub>O gelöst. Das SMCC-Pulver wird so lange resuspendiert, bis eine klare Lösung erreicht ist. Protamin wird in der Zwischenzeit aufgetaut. Ein Teil des Protaminsulfats lagert sich nach dem Auftauen zähflüssig am Boden des E-Cups ab. Durch Erhitzen des 20 mg/ml Protaminsulfats unter heißem Wasser muss dieser Teil vor der Weiterverwendung unbedingt wieder in Lösung gebracht werden. Die Kopplung von sulfo-SMCC an Protamin erfolgt über eine der Aminofunktionen des Protamins. Damit jedes Protamin mit sulfo-SMCC verbunden wird, wird sulfo-SMCC im 10-50-fachen Überschuss eingesetzt. Für die Kopplungsreaktion werden Protaminsulfat, sulfo-SMCC, Carbonatpuffer und ddH<sub>2</sub>O zusammengegeben. Das zusätzliche Wasser wirkt dem Ausfallen von Protamin-sulfo-SMCC entgegen und der Carbonatpuffer sorgt für den richtigen Reaktions-pH. Dieser sollte für diese erste Kopplungsreaktion bei 7-9 liegen. In dieser Arbeit wird mit einem pH von 7 gearbeitet. Da die Antikörper, die nachher an den Protamin-sulfo-SMCC-Komplex gebunden sind, sich in ihrer Konzentration unterscheiden, variieren auch die Zusammensetzungen von Protamin und sulfo-SMCC. Die genauen Volumina sind pro Antikörper im Folgenden dargestellt. Sie sind berechnet auf die Kopplung von jeweils 1 ml des jeweiligen Antikörpers.

**Tabelle 15: Kopplungsansätze von Protamin und sulfo-SMCC der verschiedenen monoklonalen Antikörper**

Reagenz	Cetuximab	GR11L	hCD99	A12-V1
Protamin 20 mg/ml	240 µl	60 µl	133 µl	133 µl
sulfo-SMCC 10 mg/ml	100 µl	240 µl	100 µl	100 µl
0,1 M Carbonatpuffer	50 µl	60 µl	33 µl	33 µl
ddH <sub>2</sub> O	250 µl	570 µl	333 µl	333 µl
Gesamt	640 µl	930 µl	599 µl	599 µl

Für die Zusammengabe der Reagenzien wird Wasser vorgelegt um eine Präzipitation von Protamin mit sulfo-SMCC zu vermeiden. Nachdem alle Reagenzien zusammengegeben sind wird der pH mit Hilfe eines pH-Teststreifens überprüft. Liegt der pH bei 7 kann das Protamin-sulfo-SMCC-Gemisch für 2 h bei RT zum Koppeln inkubiert werden.

### 2.2.2.2. Kopplung von Protamin-sulfo-SMCC an die Antikörper

Die zweite Kopplungsreaktion ist die Ausbildung einer stabilen Thioetherbindung zwischen einer Maleimidgruppe des sulfo-SMCCs und einer Sulfhydryl-Gruppe (freies Cystein) des Antikörpers. Für das Verhältnis ist die Konzentration des Antikörpers maßgeblich. Bei einer Konzentration von unter 1 mg/ml wird sulfo-SMCC im 40 – 80-fachen Überschuss eingesetzt (Herstellervorgabe Pierce). Bei einer Konzentration des Antikörpers von 1 – 4 mg/ml wird ein 20-facher Überschuss an sulfo-SMCC verwendet und bei 5 – 10 mg/ml verringert sich der Überschuss auf 5 – 10-fach. Nach der zweistündigen Inkubation des Protamin-sulfo-SMCC-Komplexes wird 1 ml des Antikörpers zugefügt und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

### 2.2.2.3 Gelfiltration Antikörper-Protamin-Komplex

Bevor der Antikörper-Protamin-Komplex nach der über Nacht Inkubation verwendet werden kann, muss er zunächst gelfiltriert werden, um das meiste überschüssige Protamin-sulfo-SMCC zu separieren. Dafür werden Zeba Spin Säulen (Pierce) verwendet. Für die Vorbereitung der Säulen werden sie zunächst geöffnet, in ein 15 ml Falcon überführt und für 2 min bei 1000 x g zentrifugiert um die Lagerungsflüssigkeit herauszuwaschen. Anschließend wird die Säule mit 2,5 ml PBS befüllt und erneut für 2 min bei 1000 x g zentrifugiert. Dieser Schritt wird für die Äquilibration der Säule mit PBS 3 weitere Male wiederholt. Danach wird die Säule noch einmal trocken zentrifugiert um überschüssiges PBS, das nicht in die Probe gelangen soll loszuwerden. Anschließend wird die Säule in ein neues Falcon Tube überführt, der Antikörper-Protamin-Komplex auf die Säule gegeben und bei 1000 x g für 2 min zentrifugiert. Jetzt liegt der Antikörper in einer Umgebung vor, in der er für die folgenden *in vitro* und *in vivo* Assays eingesetzt werden kann.

### 2.2.3 Überprüfung der siRNA-Bindemöglichkeit mittels Band-Shift Assay

Mit Hilfe des Band-Shift Assays wird ermittelt, wie viele siRNAs ein einzelner Antikörper im besten Fall transportieren kann. Dafür werden die Antikörper-Protamin-Komplexe in verschiedenen Verhältnissen mit einer scrambled-siRNA für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit aufsteigender Konzentration auf ein Agarosegel aufgetragen. Die siRNA läuft dabei durch das Agarosegel und ist bei ca. 25 Basenpaaren zu erkennen. Die siRNA, die an den Antikörper gekoppelt ist, bleibt zusammen mit diesem aufgrund der Größe und der Ladungsaufhebung in der Tasche des

## 2. Material und Methoden

Agarosegels hängen. Zusätzlich wird in einer Reihe als Kontrolle nur freie siRNA aufgetragen. Bei dem Verhältnis, bei dem wieder freie siRNA sichtbar wird, ist der Antikörper mit siRNA gesättigt.

Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper werden alle durch ihre unterschiedlichen Konzentrationen unterschiedlich gekoppelt. Aus diesem Grund fallen auch die molekularen Verhältnisse von Antikörper zu siRNA so unterschiedlich aus. Im Folgenden sind die unterschiedlichen Ansätze für die vier behandelten Antikörper mit allen Konzentrations- und Volumenangaben aufgetragen. Die siRNA besitzt in diesem Assay bei allen Antikörpern eine Konzentration von 15  $\mu\text{M}$ .

**Tabelle 16: Pipettierschema Band Shift Cetuximab 18,8  $\mu\text{M}$**

molekulares Verhältnis Antikörper:siRNA	-	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
siRNA $\mu\text{mol/L}$	15	15	15	15	15	15	15
EGFR-mAK Cetuximab $\mu\text{mol/L}$	-	15	7,5	3,75	1,9	0,94	0,47
siRNA $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$
Cetuximab $\mu\text{l}$	-	0,8 $\mu\text{l}$	0,4 $\mu\text{l}$	0,2 $\mu\text{l}$	0,1 $\mu\text{l}$	0,05 $\mu\text{l}$	0,025 $\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O $\mu\text{l}$	9 $\mu\text{l}$	8,2 $\mu\text{l}$	8,6 $\mu\text{l}$	8,8 $\mu\text{l}$	8,9 $\mu\text{l}$	8,95 $\mu\text{l}$	8,975 $\mu\text{l}$

**Tabelle 17: Pipettierschema Band Shift GR11L 0,32  $\mu\text{M}$**

molekulares Verhältnis Antikörper:siRNA	-	1:5	1:10	1:15	1:20	1:40
siRNA $\mu\text{mol/L}$	15	15	15	15	15	15
IGF-1R-mAK GR11L $\mu\text{mol/L}$	-	3	1,5	1	0,75	0,37
siRNA $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$
GR11L $\mu\text{l}$	-	9,4 $\mu\text{l}$	4,68 $\mu\text{l}$	3,13 $\mu\text{l}$	2,34 $\mu\text{l}$	1,17 $\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O $\mu\text{l}$	9 $\mu\text{l}$	-	4,72 $\mu\text{l}$	6,27 $\mu\text{l}$	7,06 $\mu\text{l}$	8,23 $\mu\text{l}$

## 2. Material und Methoden

**Tabelle 18: Pipettierschema Band Shift hCD99 1,96  $\mu$ M**

molekulares Verhältnis Antikörper:siRNA	-	1:5	1:10	1:20	1:40	1:80
siRNA $\mu$ mol/L	15	15	15	15	15	15
CD99-mAK hCD99 $\mu$ mol/L	-	3	1,5	0,75	0,37	0,19
siRNA $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l
hCD99 $\mu$ l	-	1,53 $\mu$ l	0,77 $\mu$ l	0,38 $\mu$ l	0,19 $\mu$ l	0,095 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O $\mu$ l	9 $\mu$ l	7,47 $\mu$ l	8,23 $\mu$ l	8,62 $\mu$ l	8,81 $\mu$ l	8,905 $\mu$ l

**Tabelle 19: Pipettierschema Band Shift A12 V1 mit 0,78  $\mu$ M**

molekulares Verhältnis Antikörper:siRNA	-	1:5	1:10	1:20	1:40	1:80
siRNA $\mu$ mol/L	15	15	15	15	15	15
IGF-1R-mAK A12 V1 $\mu$ mol/L	-	3	1,5	0,75	0,37	0,19
siRNA $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l
A12 V1 $\mu$ l	-	3,85 $\mu$ l	1,925 $\mu$ l	0,9625 $\mu$ l	0,48 $\mu$ l	0,24 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O $\mu$ l	9 $\mu$ l	5,15 $\mu$ l	7,075 $\mu$ l	8,04 $\mu$ l	8,52 $\mu$ l	8,76 $\mu$ l

Die siRNA Stoffmenge bleibt konstant, während die Stoffmenge der jeweiligen Antikörper entsprechend dem molekularen Verhältnis angepasst wird. Die siRNA wird als Konstante eingesetzt um die freie siRNA vergleichen zu können. Bevor die 10  $\mu$ l Antikörper-siRNA-Proben auf ein 1 %-iges Agarosegel aufgetragen werden, werden sie mit 2  $\mu$ l Probenaufgabenpuffer versetzt. Das Gel wird für 45 Minuten bei 100 Volt laufen gelassen und anschließend für 20 Minuten in einer Ethidiumbromidlösung inkubiert, bevor eine Aufnahme von dem Gel auf einem UV-Tisch gemacht wird.

### 2.2.4 Überprüfung Rezeptorinternalisierung mittels FACS

Für die Überprüfung der Rezeptorinternalisierung wird eine durchflusszytometrische „FACS“ (*Fluorescence-Activated-Cell-Sorting*)-Analyse durchgeführt. Die Vorgehensweise ist im Grunde für alle vier Antikörper gleich. Es werden jedoch unterschiedliche Primär- und Sekundärantikörper verwendet. Für das FACS werden zunächst die Zellen abgenommen und gezählt. Als

## 2. Material und Methoden

Kolorektalkarzinomzelllinie werden DLD-1 Zellen verwendet, für den Ewing Sarkom Ansatz werden A673 oder SKNM-C Zellen genutzt. Insgesamt werden jeweils drei Ansätze gemessen. Die Tabellen 20 bis 23 zeigen ein Schema für die verschiedenen Ansätze und Antikörper.

Für jeden Ansatz werden  $5 \times 10^5$  Zellen benötigt. Die Zellen werden in ein FACS Tube überführt und für 5 Minuten bei  $400 \times g$  zentrifugiert. Das Medium wird abgegossen und die Zellen mit 1 ml PBS durch erneutes Abzentrifugieren für 5 min bei  $400 \times g$  gewaschen. Beim Abgießen des Überstands nach dem 2. Waschschrift, werden etwa 100  $\mu$ l PBS in den FACS Röhrchen belassen, darin werden die Zellen inkubiert. Nach jedem Inkubationsschritt werden die Zellen zweimal mit PBS für 5 min bei  $400 \times g$  gewaschen. Für die vier eingesetzten Internalisierungsantikörper gibt es einige Unterschiede. Die erste Inkubation ist, bei allen vier Antikörper, der Internalisierungsschritt. Bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  internalisieren die Rezeptoren nicht, bei dieser Temperatur verharren die Zellen in ihrem derzeitigen Zustand. Erst bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , wenn die Zelle ihrem normalen Stoffwechsel nachgehen kann, können die Rezeptoren nach Bindung des Antikörpers in die Zellen internalisieren. Die Internalisierungszeiten sind unterschiedlich für die verschiedenen Rezeptoren. Der EGF-Rezeptor internalisiert nach eigenen Erfahrungen bereits nach einer Stunde bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , die CD99- und IGF-1-Rezeptoren dagegen internalisieren nach 3 h (Daten nicht gezeigt). Die Zellen werden also erst mit dem Therapieantikörper inkubiert und um die verbliebenen Rezeptoren auf der Zelloberfläche sichtbar zu machen anschließend mit einem sekundären Antikörper, der gegen den ersten Antikörper gerichtet ist oder gegen ein anderes Epitop des entsprechenden Rezeptors. Beim EGF-Rezeptor gibt es einen FITC-gelabelten EGFR Antikörper, der ein anderes Epitop erkennt. Bei den Antikörpern GR11L und hCD99 gibt es so einen bereits gelabelten Antikörper nicht, deswegen werden hier, die verbliebenen Rezeptoren, an die der Antikörper gebunden hat, die aber noch nicht internalisiert sind, mit einem PE-gelabelten Sekundärantikörper (*Goat-anti-Mouse*, GAM) gegen murine IgGs als zweites inkubiert. Der humanisierte A12 V1 wird noch einmal anders behandelt. Da es ein humanisierter Antikörper ist, wird er nicht vom dem Sekundärantikörper GAM erkannt. Hier müssen die Zellen daher nach der Internalisierungsininkubation zunächst mit dem GR11L inkubiert werden. Der GR11L besitzt ein anderes Epitop als der A12. Er bindet somit bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  ebenfalls die verbliebenen Rezeptoren. Der GR11L wird dann mit dem Sekundärantikörper GAM sichtbar gemacht.

Die eingesetzten Volumina von Cetuximab-Protamin, GR11L-Protamin, hCD99-Protamin und A12-V1-Protamin entsprechen jeweils einer Endkonzentration von 60 nM auf den Zellen. Das ist die Konzentration, die in den folgenden *in vitro* und *in vivo* Assays eingesetzt wird. Nach jedem Inkubationsschritt werden die Zellen zweimal mit 1 ml PBS für 5 min bei  $400 \times g$  gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift werden die Zellen in 200  $\mu$ l PBS aufgenommen und im entsprechenden Kanal im FACS Calibur gemessen. Die Daten werden anschließend analysiert.

## 2. Material und Methoden

**Tabelle 20: Rezeptorinternalisierungs-FACS Cetuximab 18,8  $\mu$ M**

Probe	1. Inkubation	2. Inkubation
ungefärbt	-	-
Positivkontrolle EGFR-FITC	-	20 $\mu$ l EGFR-FITC, 45 min, 4 °C
Internalisierung Cetuximab	0,3 $\mu$ l Cetuximab-Protamin, 1 h, 37 °C	20 $\mu$ l EGFR-FITC, 45 min, 4 °C

**Tabelle 21: Rezeptorinternalisierungs-FACS GR11L 0,32  $\mu$ M**

Probe	1. Inkubation	2. Inkubation
ungefärbt	-	-
Positivkontrolle GR11L-Protamin 4 °C	18,75 $\mu$ l GR11L-Protamin, 3 h, 4 °C	2 $\mu$ l Goat-anti-Mouse-PE Sekundärantikörper, 45 min, 4 °C
Internalisierung GR11L-Protamin 37 °C	18,75 $\mu$ l GR11L-Protamin, 3 h, 37 °C	2 $\mu$ l Goat-anti-Mouse-PE Sekundärantikörper, 45 min, 4 °C

**Tabelle 22: Rezeptorinternalisierungs-FACS hCD99 1,96  $\mu$ M**

Probe	1. Inkubation	2. Inkubation
ungefärbt	-	-
Positivkontrolle hCD99-Protamin 4 °C	3 $\mu$ l hCD99-Protamin, 3 h, 4 °C	2 $\mu$ l Goat-anti-Mouse-PE Sekundärantikörper, 45 min, 4 °C
Internalisierung hCD99-Protamin 37 °C	3 $\mu$ l hCD99-Protamin, 3 h, 37 °C	2 $\mu$ l Goat-anti-Mouse-PE Sekundärantikörper, 45 min, 4 °C

**Tabelle 23: Rezeptorinternalisierungs-FACS A12 V1 0,78  $\mu$ M**

Probe	1. Inkubation	2. Inkubation	3. Inkubation
ungefärbt	-	-	-
Positivkontrolle A12-V1-Protamin 4 °C	7,7 $\mu$ l A12-V1-Protamin, 3h, 4 °C	10 $\mu$ l GR11L, 1 h, 4 °C	2 $\mu$ l Goat-anti-Mouse-PE Sekundärantikörper, 45 min, 4 °C
Internalisierung A12-V1-Protamin 37 °C	7,7 $\mu$ l A12-V1-Protamin, 3h, 37 °C	10 $\mu$ l GR11L, 1 h, 4 °C	2 $\mu$ l Goat-anti-Mouse-PE Sekundärantikörper, 45 min, 4 °C

### 2.2.5 Coomassiefärbung der Proteingele

Durch die Kopplung des Antikörpers an das positiv geladene Protamin gewinnt der Antikörper leicht an Molekulargewicht. Das einzelne Protaminsulfat liegt bei ungefähr 6 kDa. Dieser Größen-

## 2. Material und Methoden

unterschied kann auf einem SDS-Gel mit anschließender Coomassiefärbung dargestellt werden. Dieses Gel wird für alle vier verwendeten Antikörper gleich durchgeführt.

Als Beispiel wird hier der A12 V1 erklärt. 20 µl des Antikörpers mit und ohne Protamin werden mit 5 µl des 4 x LDS-Puffers versetzt und für 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Anschließend werden die beiden Proben auf ein 10 % Bis-Tris Gel aufgetragen und eine Spannung von 80 V angelegt, bis die Proben die Taschen gleichmäßig verlassen haben. Dann wird die Spannung auf 140 V erhöht und das Gel für 1,5 h laufen gelassen. Wenn die Lauffront der Proben das Ende des Gels erreicht haben, wird das Gel aus der Kammer gelöst und für 5 min in ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Nach dem Waschschrift wird das Gel mit 25 ml der QuickCoomassie-Lösung versetzt und für 15 min angefärbt. Wenn die Banden der Antikörper noch nicht sehr deutlich zu erkennen sind, kann dieser Schritt bis auf über Nacht ausgedehnt werden. Anschließend wird das Gel erneut mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen bis das Gel bis auf die Banden entfärbt ist. Danach wird das Gel eingescannt und die Bandenhöhe und die Antikörpergröße kann analysiert werden.

### 2.2.6 Alexa488-siRNA-Internalisierung

In Punkt 2.2.4 wurde bereits getestet, ob die verwendeten Antikörper zu einer Internalisierung des Rezeptors führen. Für einen bildgebenden Beweis, dass nicht nur der Antikörper-Protaminkomplex, sondern auch die siRNA in die Zellen gelangt, wird siRNA konjugiert mit einem Alexa-Fluor-488-Fluoreszenzfarbstoff, an den Antikörper-Protaminkomplex gekoppelt.

Die Zellen werden für diese Behandlung einen Tag vorher mit einer Zellzahl von  $2 \times 10^4$  in 200 µl in einem Well eines 8er chamber slides ausgesät. Sie werden über Nacht bei 37°C inkubiert, damit sie sich am Boden des chamber slides absetzen können. Am nächsten Tag erfolgt die Behandlung mit dem Antikörper-Protaminkomplex. Der Antikörper-Protaminkomplex wird mit einer Endkonzentration von 60 nM auf den Zellen eingesetzt. Die siRNA wird in einem Verhältnis von Antikörper zu siRNA von 1:10 verwendet. Dieser Versuch wird für alle vier Therapieantikörper gleich durchgeführt. Als Zellen für den Kolorektalkarzinomansatz werden HCT116 eingesetzt. Für das Ewing Sarkom werden A673 und SKNM-C Zellen verwendet. Für ein 8-Well ergibt sich für den IGF-1R Antikörper A12 V1 als Beispiel folgende Rechnung:

## 2. Material und Methoden

Konzentration Alexa-Fluor-488-siRNA: 20  $\mu\text{M}$

Konzentration A12-Protamin: 0,78  $\mu\text{M}$

$$\frac{\text{gewünschtes Volumen} * \text{gewünschte Konzentration Antikörper}}{\text{tatsächliche Konzentration Antikörper}}$$

= einzusetzendes Antikörpervolumen

Beispiel:

$$\frac{200 \mu\text{l} * 0,06 \mu\text{M}}{0,78 \mu\text{M}} = 15,4 \mu\text{l Antikörper}$$

$$\frac{200 \mu\text{l} * 0,6 \mu\text{M}}{20 \mu\text{M}} = 6 \mu\text{l Alexa488 - siRNA}$$

Der Antikörper-Protaminkomplex und die siRNA werden zusammengegeben und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden die 21,4  $\mu\text{l}$  Behandlungsreagenz auf die Zellen gegeben, das Medium auf 200  $\mu\text{l}$  frisch aufgefüllt und die Zellen über Nacht bei 37°C behandelt. Als Kontrolle wird jeweils ein Well mitgeführt, in dem die Zellen nur mit der Alexa488-siRNA inkubiert werden ohne den Antikörper. Am nächsten Tag wird das Medium abgenommen, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit 100  $\mu\text{l}$  eiskaltem 4%-PFA für 20 min bei RT fixiert. Das PFA wird dann abgenommen und die Zellen erneut mit PBS gewaschen. Es folgt eine 10 minütige Inkubation mit einer 1:10.000 Verdünnung Hoechst Farbstoff, der den Zellkern anfärbt. Anschließend werden die Zellen erneut gewaschen. Danach kann der Kammeraufsatz auf dem Objektträger abgelöst werden und die Zellen werden mit einem Tropfen Dako Mounting Medium und einem Deckglas eingedeckelt. Dann kann die Aufnahme der Antikörper-siRNA-Komplexe mit Hilfe des Zeiss Fluoreszenzmikroskops Axio überprüft werden.

### 2.2.7 Behandlungseinfluss von Antikörper-Protamin-siRNA-Komplex auf Koloniebildung der Zielzellen im Colony Formation Assay

Um zu überprüfen ob die siRNA gebunden an den Antikörper-Protaminkomplex eine Wirkung auf das klonale, verankerungsunabhängige (*anchorage-independent*) Zellwachstum der Zielzellen hat, wird der sogenannte *Colony Formation Assay* oder auch *Soft-Agar Assay* durchgeführt. Der *Colony Formation Assay* wird für alle verwendeten Antikörper und Zelllinien bis auf die

## 2. Material und Methoden

Vorbehandlungsdauer und die funktionelle siRNA gleich ausgeführt. Dabei werden die Zielzellen mit 60 nM Antikörper-siRNA-Komplex vorbehandelt und anschließend im technischen Triplikat im 96-Well in 0,7 % Soft-Agar ausgesät. Bei diesem Prozentsatz wird der Agar fest, so dass die Zellen an ihrem derzeitigen Ort fixiert werden, aber nicht so fest, dass ein Wachstum der Zellen nicht mehr möglich ist. Die siRNA wird für die Behandlung in 5-fachem molaren Überschuss zum Antikörper-Protamin eingesetzt. Da alle Antikörper, die für das Ewing Sarkom eingesetzt werden, mehr als 10 siRNAs transportieren können, wird hier die siRNA in 10-fachem molaren Überschuss eingesetzt. Da der Soft-Agar sehr zähflüssig ist, werden alle vorangehenden Berechnungen auf einen vierfachen anstatt einen dreifachen Ansatz berechnet. Vor der Behandlung werden die Zellen von den Zellkulturflaschen mit Trypsin abgelöst und gezählt. Es werden 1000 Zellen pro 96-Well ausgesät um am Ende des Versuchs eine repräsentative Koloniezahl zu erreichen. 4000 Zellen der jeweiligen Zelllinie werden pro Bedingung in ein Eppendorfgefäß überführt. Hinzu kommt der Behandlungsansatz, der sich für IGF-1R Antikörper A12 V1 als Beispiel wie folgt berechnet:

Konzentration scrambled/EWS-FLI1 siRNA: 40  $\mu$ M

Konzentration A12-Protamin: 0,78  $\mu$ M

$$\frac{\text{gewünschtes Volumen} * \text{gewünschte Konzentration Antikörper/siRNA}}{\text{tatsächliche Konzentration Antikörper/siRNA}}$$

$$= \text{einzusetzendes Antikörper -/siRNA - volumen}$$

Beispiel:

$$\frac{120 \mu\text{l} * 0,06 \mu\text{M}}{0,78 \mu\text{M}} = 9,23 \mu\text{l Antikörper}$$

$$\frac{120 \mu\text{l} * 0,6 \mu\text{M}}{20 \mu\text{M}} = 1,8 \mu\text{l siRNA}$$

Der Antikörper, konjugiert an Protamin, und die siRNA werden vor der Vorbehandlung für zwei Stunden bei RT oder über Nacht bei 4 °C aneinander gekoppelt. Anschließend werden für die Vorbehandlung die Zellen und das Behandlungsreagenz zusammengegeben, auf 120  $\mu$ l mit Medium aufgefüllt und für 1 h für den Cetuximab und für 3 h für A12 bei 37°C inkubiert. Nach der Vorbehandlung werden 432  $\mu$ l Medium zu den 120  $\mu$ l Zellen gegeben. Anschließend wird 3 %-iger

## 2. Material und Methoden

Agar Noble aufgekocht und 168 µl des Soft-Agars, das entspricht am Ende 0,7 % Agar, zu den Zellen gegeben. Die nun 720 µl werden gut resuspendiert und jeweils 180 µl in ein 96-Well überführt. Nachdem der Agar fest geworden ist, werden 70 µl Zellkultur-Medium als Überstand zugegeben um die Versorgung der Zellen zu gewährleisten. Die Inkubation eines solchen Assays beträgt ca. eine Woche bei 37°C, je nachdem, wann Kolonien in zählbarer Größe zu erkennen sind. Nach der Inkubationszeit wird das Restmedium vom Agar abgesaugt und die Färbelösung INT (Iodonitrotetrazoliumchlorid) wird mit jeweils 20 µl auf die 96-Wellen verteilt. Es erfolgt eine erneute Inkubation über Nacht bei 37 °C. Am darauffolgenden Tag können die Kolonien am Binokular-Mikroskop gezählt werden.

Für den hCD99-P Antikörper tritt noch eine Besonderheit auf. Hier wird zur Unterstützung der Liberalisierung der siRNA aus den intrazellulären Vesikeln nach der Vorbehandlung eine zusätzliche Behandlung mit Chloroquin vorgenommen im Vergleich zu den nur mit dem Antikörper-siRNA Komplex behandelten Zellen. Dafür werden die 120 µl Zellen mit 1,2 µl 1 M Chloroquin versetzt und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend werden die Zellen, die mit Chloroquin behandelt wurden und die ohne Chloroquinbehandlung im Vergleich für 5 min bei 400 x g abzentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen um die Zellen keinem weiteren Chloroquin auszusetzen und dann werden die Zellen mit 120 µl frischem Medium versorgt. Das Aussäen in Soft-Agar erfolgt ab hier wie oben beschrieben.

### **2.2.8 Überprüfung des Behandlungseinflusses von Antikörper-Protamin-siRNA-Komplex auf den Stoffwechsel der Zielzellen mit Hilfe des MTS Assays**

Bei einem MTS-Assay ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-Assay) wird die Stoffwechselaktivität der mitochondrialen Atmungskette der Zellen unter verschiedenen Behandlungsansätzen analysiert. MTS ist ein RedOx-Farbstoff, der Elektronen aus der Atmungskette aufnehmen kann. Dieser Assay wurde in dieser Arbeit mit dem Cetuximab und dem hCD99 durchgeführt.

Allgemein werden für einen MTS-Assay die verwendeten Zellen abgelöst, gezählt und anschließend im technischen und biologischen Triplikat in einer 96-Well Platte ausgesät. Pro Well werden dafür  $1 \times 10^4$  Zellen ausgesät. Die Zellen werden mit 100 µl Medium versorgt. Die Behandlung der Zellen mit verschiedenen Behandlungsansätzen erfolgt an vier aufeinanderfolgenden Tagen. Die genaue Behandlung mit Cetuximab und hCD99 wird in Abschnitt 2.2.8.1 und Abschnitt 2.2.8.2 beschrieben. Am Tag fünf wird das Medium erneuert und 20 µl der MTS-Lösung zu den Zellen gegeben. Als Kontrolle werden drei leere Wells ebenfalls mit Medium und MTS-Lösung versetzt. Die Zellen werden für 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend wird der Farbumschlag des Mediums bei einer

## 2. Material und Methoden

optischen Dichte von 450 nm am Victor X3 gemessen. Je größer der Farbumschlag und damit die Absorption, desto stoffwechselaktiver sind die Zellen. Dieses ist ein Surrogatparameter für die Viabilität der Zellen.

### 2.2.8.1 MTS-Assay bei Cetuximab behandelten Zellen

Für den MTS-Assay des Cetuximab-Protamin Antikörpers werden verschiedene Antikörper-Stoffmengen mit jeweils 5-fachem molaren esiRNA-Überschuss getestet. Insgesamt ergeben sich dabei fünf verschiedene Konzentrationen, die jeweils mit der KRAS-esiRNA versetzt werden und als Kontrolle mit der scrm-esiRNA. Die Daten gelten jeweils für ein technisches Triplikat. Behandelt werden die Zellen mit 0 nM, 65 nM, 125 nM, 250 nM und 500 nM Antikörperkonjugat in der Endkonzentration auf den Zellen. Für die Behandlung wurde das Medium von den Zellen abgesaugt, das Behandlungsreagenz auf die Zellen gegeben und das Medium auf 100 µl aufgefüllt. Für die viertägige Behandlung wird der Antikörper-esiRNA Komplex täglich frisch gekoppelt. Dafür werden Antikörper und siRNA gemischt und für zwei Stunden bei RT inkubiert, bevor sie in die 96-Wellen überführt werden. Die Ergebnisse dieser Behandlung sind in Abschnitt 3.1.1.4 dargestellt.

### 2.2.8.2 MTS-Assay bei hCD99 behandelten Zellen

Bei dem MTS Assay für den hCD99-Protamin geht es nicht um die Konzentration des Antikörpers, sondern um den Einsatz von Chloroquin, bei welcher Inkubationszeit mit Chloroquin ein Effekt durch die siRNA auf den Stoffwechsel der Zellen zu erkennen ist. Das Behandlungsschema dafür ist in Tabelle 24 dargestellt. Die Daten beziehen sich auf ein technisches Triplikat. Bei diesem MTS Assay werden die Zellen an Tag eins, nachdem sie ausgesät wurden direkt mit PBS, hCD99-Protamin-scrm-siRNA oder hCD99-Protamin-EWS/FLi1-siRNA behandelt. Die Behandlung liegt bei einer Endkonzentration von 60 nM auf den Zellen und einem molekularen Verhältnis von Antikörper zu siRNA von 1:10. Am darauffolgenden Tag werden die Zellen 24 h nach der ersten Behandlung gar nicht, für 10 min oder für 30 min mit 10 µM Endkonzentration Chloroquin auf den Zellen behandelt. Chloroquin wird dabei zu dem Medium dazugegeben. Anschließend wird das Medium abgesaugt, die Zellen werden einmal mit 100 µl PBS gewaschen und anschließend mit neuem Medium und der zweiten Behandlung versorgt. Dieser Behandlungsvorgang wiederholt sich viermal bevor die Zellen mit der MTS-Lösung versetzt, bei 37 °C inkubiert und photometrisch analysiert werden.

## 2. Material und Methoden

**Tabelle 24: Behandlungsschema MTS-Assay hCD99 inklusive Chloroquinbehandlung**

Chloroquin-behandlung	Probe	hCD99-P 60 nM Endkonzentration	scrm-/EWS-FLi1-siRNA 600 nM Endkonzentration	1 M Chloroquin
0 min	PBS	-	-	-
	scrm	9,2 µl	4,5 µl	-
	EWS/FLi1	9,2 µl	4,5 µl	-
10 min	PBS	-	-	1 µl
	scrm	9,2 µl	4,5 µl	1 µl
	EWS/FLi1	9,2 µl	4,5 µl	1 µl
30 min	PBS	-	-	1 µl
	scrm	9,2 µl	4,5 µl	1 µl
	EWS/FLi1	9,2 µl	4,5 µl	1 µl

### 2.2.9 Behandlung der Tumorzellen mit dem Antikörper-siRNA-Komplex für Western Blot, Annexin V- oder BrdU-Assays

Die Behandlung der Zellen mit den Antikörper-siRNA-Komplexen verläuft bei drei verschiedenen Versuchen identisch, deswegen wird die Behandlung der Zellen an dieser Stelle für einen Western Blot aus Zelllinienlysaten, für den AnnexinV-Assay und für den BrdU-Assay zusammengefasst. Dafür werden pro Bedingung  $1 \times 10^5$  Zellen in ein 6-Well mit 1,5 ml Medium ausgesät. Bei dieser Zellzahl können die Zellen für 5 Tage in dem Well wachsen, ohne dabei zu dicht zu werden. Nachdem die Zellen sich abgesetzt haben und fest auf dem Boden des 6-Wells verankert sind, findet die erste Behandlung statt. Dafür wurde der jeweilige Antikörper zuvor für zwei Stunden bei RT oder über Nacht bei 4 °C mit der entsprechenden siRNA inkubiert, damit die siRNA sich an das Protamin binden kann. Dieser Kopplungsvorgang wird für jede Behandlung neu angesetzt. Die Zellen werden an vier aufeinanderfolgenden Tagen mit den jeweiligen Bedingungen behandelt. Am fünften Tag werden die Zellen für den jeweiligen Assay dann abgenommen oder weiterverwertet. Die Vorgehensweise ist in den folgenden Abschnitten beschrieben. Die Antikörper werden mit einer Endkonzentration von 60 nM auf den Zellen verwendet. Die verwendeten siRNAs werden im 5-fachen Überschuss eingesetzt. Für die Antikörper hCD99 und A12 V1 wurden keine Western Blots, AnnexinV- oder BrdU-Assays aufgrund von Antikörpermangel durchgeführt.

### **2.2.10 Annexin V Assay - Behandlungseinfluss von Antikörper-Protamin-siRNA-Komplex auf die Apoptose von Zielzellen**

Der Annexin V Assay ist ein Apoptoseassay. Mit Hilfe dieses Assays lassen sich Aussagen darüber treffen, ob die Zellen durch die verschiedenen Behandlungsansätze in einen apoptotischen Zustand gezwungen werden können. Das Annexin V-Kit von Becton Dickinson liefert dafür alle Proteine und Puffer. Für den Assay werden die Zellen nach der viermaligen Behandlung (siehe Abschnitt 2.2.9) von dem 6-Well abgelöst und durch einen *Cell Strainer*, um die Zellen zu vereinzeln, in ein FACS-Röhrchen überführt. Die Zellen werden für 5 min bei 400 x g zentrifugiert und der Mediumsüberstand wird verworfen. Anschließend werden die Zellen in 1 ml PBS aufgenommen, kurz gevortext und erneut für 5 min bei 400 x g gewaschen. Nach der Zentrifugation wird der Überstand abgegossen und die Zellen in 100 µl Annexin V Binding-Buffer resuspendiert. In jede Probe werden dann 2 µl des Phycoerythrin(PE)-gelabelten Annexin V und 2 µl des 7AAD gegeben. Die Proben werden gevortext und für 30 min auf Eis und im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation werden die Zellen direkt am FACS analysiert. Es erfolgt kein weiterer Waschschrift. Das PE-gelabelte Protein Annexin V ist ein Protein, das Phosphatidylserine (PS) bindet. Durch das Phycoerythrin kann es im FACS erkannt werden. Phosphatidylserine befinden sich bei gesunden Zellen nur auf der Innenseite der Zellmembran. Gehen Zellen in ein frühapoptotisches Stadium ein, gelangen einige PS nach außen und können dort von dem Protein Annexin V erkannt werden. 7-Aminoactinomycin (7AAD) ist ein Protein, das sich zwischen Cytosin und Guanin in die DNA lagert und dadurch seine Fluoreszenzeigenschaft verändert. Diese Fluoreszenz kann auch im FACS gemessen werden. Das Protein kann allerdings nur in die Zellen gelangen, wenn die Membran bereits so permeabilisiert ist, dass sie durchlässig für 7AAD wird. Frühapoptotische Zellen wären damit Annexin V positiv, weil erste PS sich schon auf der Außenseite der Zellmembran befinden und 7AAD negativ, weil, dass 7AAD noch nicht bis in die Zellen zur DNA vordringen kann.

### **2.2.11 BrdU Assay - Behandlungseinfluss von Antikörper-Protamin-siRNA-Komplex auf den Zellzyklus der Zielzellen**

Der BrdU Assay gibt Aufschlüsse darüber, in welchem Zellzyklusstadium sich die behandelten Zellen befinden. Dafür wird Bromdesoxyuridin (BrdU), ein Thymidinanalogon, verwendet, das während der Zellteilung in die DNA mit eingebaut wird und anschließend über einen BrdU-Antikörper detektiert werden kann. Je mehr BrdU in den Zellen nachgewiesen werden kann, desto mehr Zellen befinden sich in der S-Phase, sie sind somit proliferativer. Der BrdU-Assay ist damit auch ein Proliferationsassay.

## 2. Material und Methoden

Für diesen Assay wird nach der Behandlungsperiode von 5 Tagen das Medium von den Zellen abgenommen und 2 ml neues Medium auf die Zellen gegeben. Dem Medium werden 40 µl 1 mM BrdU zugesetzt und die Zellen anschließend für 2 h bei 37 °C inkubiert. In dieser Zeit können die Zellen das Thymidinanalogon in ihre DNA einbauen. Nach der 2-stündigen Inkubation werden die Zellen abgelöst und jede Bedingung durch einen *Cell Strainer* in ein eigenes FACS Röhrchen überführt. Die Zellen werden dann für 5 min bei 600 x g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 400 µl *Denaturing Solution* resuspendiert. So werden die Zellen für 20 min bei RT inkubiert. Es folgt ein Zentrifugationsschritt für 5 min bei 600 x g. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 600 µl PBS aufgenommen. Zum Waschen wird erneut zentrifugiert. Das dabei entstehende Pellet wird in 600 µl 0,1 M Natriumtetraborat pH 8,5 resuspendiert und 2 min bei RT inkubiert. Die Zellen werden anschließend erneut bei 600 x g für 5 min abzentrifugiert und mit 600 µl PBS noch einmal gewaschen. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 100 µl PBS aufgenommen. Zu den 100 µl PBS werden 10 µl des FITC-gelabelten αBrdU-Antikörpers gegeben. Die Proben werden gevortext und bei RT für 1 h im Dunkeln inkubiert. Danach wird erneut mit 600 µl PBS bei 600 x g für 5 min gewaschen. Das Pellet wird dann in 250 µl 50 µg/ml Propidiumiodid (PI) aufgenommen und erneut für 1 h bei RT inkubiert. PI ist ein Nukleinsäureinterkalator, ein Farbstoff, der nur in solche Zellen gelangt und sie anfärbt, deren Membran bereits permeabel ist. PI ist damit auch ein Nachweis für das Apoptosestadium einer Zelle. Nach der Propidiumiodidinkubation können die Zellen direkt ohne einen weiteren Waschschrift am FACS analysiert werden.

### **2.2.12 Nachweis des Proteinknockdowns nach Antikörper-siRNA-Komplex-Behandlung mit Hilfe eines Western Blots**

Ein Western Blot von Antikörper-siRNA behandelten Zellen wird für Cetuximab-Protamin und GR11L-Protamin durchgeführt. Für den Western Blot werden die Zellen nach der Behandlungsreihe aus Abschnitt 2.2.9 von dem 6-Well abgelöst und in ein Eppendorfgefäß überführt. Die Zellen werden dann für 5 min bei 400 x g abzentrifugiert. Anschließend wird das Zellpellet in 400 µl RIPA all in aufgenommen. Es folgt eine 30-minütige Inkubation der Zellen auf Eis. Die Inkubation mit RIPA all in sorgt dafür, dass die Zellmembran sich auflöst und die Proteine der Zelle in den Überstand entlassen werden. Nach der Inkubation werden die Proben für 10 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Dadurch können sich die Zelltrümmer am Boden des Reaktionsgefäßes absetzen. Die Proteine verbleiben im Überstand. Der Überstand wird nach der Zentrifugation in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Bevor die Proteine auf ein SDS-Gel aufgetragen werden können, wird ein BCA-Assay mit dem Pierce BCA Assay Kit durchgeführt. Dafür werden BCA Reagenz A und BCA Reagenz B in einem Verhältnis von 50:1 vermischt und die Proben sowie die Standardreihe in folgenden Ansätzen mit dem BCA Reagenz vermenget:

## 2. Material und Methoden

**Tabelle 25: BCA-Assay für Western Blot**

Ansatz	BSA Standard 2 mg/ml	BCA Reagenz	Lysat	RIPA	Gesamt
Standard 4 mg/ml	10 µl	390 µl	-	-	400 µl
Standard 2 mg/ml	5 µl	395 µl	-	-	400 µl
Standard 1 mg/ml	2,5 µl	397,5 µl	-	-	400 µl
Standard 0,5 mg/ml	1,25 µl	398,75 µl	-	-	400 µl
Standard 0,25 mg/ml	0,625 µl	399,375 µl	-	-	400 µl
Blank	-	395 µl	-	5 µl	400 µl
Lysat	-	395 µl	5 µl	-	400 µl

Die Ansätze werden für 30 min bei 37 °C inkubiert. Je violetter der Ansatz in dieser Zeit wird, desto mehr Protein enthält die Probe. Nach der Inkubation wird die Proteinmenge am NanoDrop bestimmt. Für den Western Blot werden jeweils 15 µg der Lysate aufgetragen. Bevor die Lysate auf ein Mini-Protean TGF Stain-Free Gel aufgetragen werden, werden sie mit Reducing Agent und 4x LDS versetzt. Als Beispiel wird der GR11L-Protamin Western Blot gezeigt:

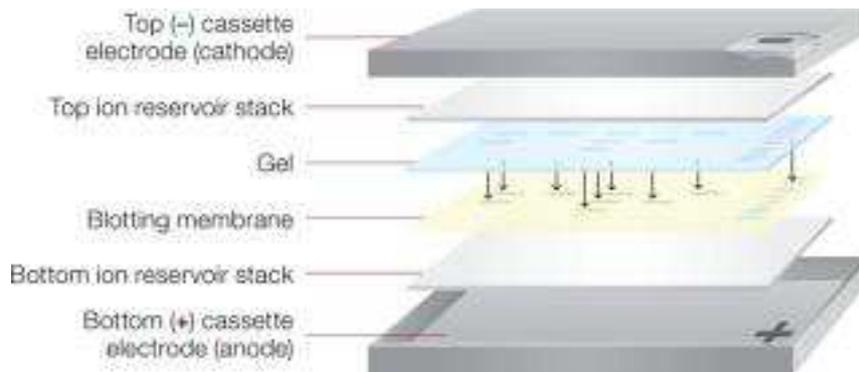
**Tabelle 26: Probenvorbereitung Western Blot A673 nach GR11L-P-siRNA-Behandlung**

Lysat	15 µg	4xLDS	Reducing Agent (10x)	RIPA	Gesamt
PBS (1,062 mg/ml)	14,1 µl	10 µl	4 µl	11,9 µl	40 µl
GR11L-P (0,987 mg/ml)	15,2 µl	10 µl	4 µl	10,8 µl	40 µl
GR11L-P-scrn-siRNA (1,009 mg/ml)	14,9 µl	10 µl	4 µl	11,1 µl	40 µl
GR11L-P-EWS/FLi1-siRNA 1 (0,986 mg/ml)	15,2 µl	10 µl	4 µl	10,8 µl	40 µl
GR11L-P-EWS/FLi1-siRNA 2 (1,585 mg/ml)	9,5 µl	10 µl	4 µl	16,5 µl	40 µl
GR11L-P-EWS/FLi1-siRNA 3 (0,570 mg/ml)	26,3 µl	10 µl	4 µl	-	40,3 µl

Die Lysate und Reagenzien werden zusammen gegeben und für 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Anschließend werden die Proben auf Eis gelagert, bis sie auf das Gel aufgetragen werden. In die erste

## 2. Material und Methoden

Tasche des Gels werden 10 µl des *SeeBlue Plus 2 Pre Stained Standards* gegeben. Nachdem die Proben aufgetragen sind, wird das Gel zunächst an eine Spannung von 80 V angelegt, bis die Proben die Taschen gleichmäßig verlassen haben. Dann kann die Spannung auf 140 V erhöht und das Gel für 1,5 h laufen gelassen werden. Anschließend wird das Gel aus der Kammer entnommen und nach folgendem Schema zum Blotten vorbereitet:



**Abbildung 14: Proteintransfer auf eine PVDF-Membran**

Für die Übertragung von Proteinen von einem Gel auf eine PVDF-Membran wird folgendes Schema befolgt. Auf die Anode kommt ein Filterpapier, es folgt die PVDF-Membran, darauf liegt das Gel mit den Proteinen. Es folgt ein erneutes Filterpapier und die Kathode. Zum Blotting wird an die Kassette eine Spannung angelegt. *Entnommen aus [xiii]*

Die Kassette mit Gel und PVDF-Membran wird in das TransBlot Turbo Transfersystem gesteckt und die Proteine in 7 min auf die PVDF-Membran geblottet. Anschließend wird das Gel verworfen und der Marker auf der Membran mit einem Kugelschreiber nachgezogen, falls der Standard durch die folgenden Waschschriffe verblasst. Die Membran wird nun für 10 min mit 0,1 %-PBS-Tween (PBS-T) auf einem Schüttler bei RT gewaschen. Es folgt eine Inkubation mit 5 % Milch/PBS-Tween für eine Stunde bei Raumtemperatur, anschließend wird 3 x für 10 min mit PBS-T gewaschen. Nach dem Waschen kann der Primärantikörper in 5% BSA/PBS-Tween auf die Membran gegeben werden und über Nacht bei 4 °C schüttelnd inkubieren. Am nächsten Tag wird der Blot 6 x für 5 min mit PBS-Tween gewaschen, bevor der Sekundärantikörper in 5% BSA/PBS-Tween auf die Membran gegeben und für 1 h bei RT inkubiert wird. Die Antikörper und ihre eingesetzten Konzentrationen sind in Tabelle 8 angegeben. Nach der Sekundärantikörperinkubation wird die Membran erneut 6 x für 5 min mit PBS-T gewaschen. Danach wird sie für 1 min mit der Proteinseite in ECL Prime inkubiert um die Biolumineszenzreaktion zu starten. Der Blot kann dann im Amersham Imager/Optimax Film Prozessor entwickelt werden.

Nach dem Entwickeln kann nach einem erneuten Waschen für 10 min mit PBS-Tween, um das Entwicklungsreagenz abzuwaschen, der nächste Primärantikörper auf die Zellen gegeben werden. Dabei ist zu beachten, dass der nächste Primärantikörper ein Protein detektiert, das eine andere

## 2. Material und Methoden

Größe, als das erste detektierte Protein besitzt oder einen anderen Zweitantikörper benötigt. Ist das nicht der Fall muss die Membran vor dem nächsten Antikörper für 5 min mit 5 M NaOH gestripped werden, dann wird die Membran 3 x für 5 min mit PBS-Tween gewaschen und anschließend kann der nächste Primäantikörper auf die Membran gegeben werden.

### **2.2.13 Nachweis des mRNA-Knockdowns nach Antikörper-siRNA-Komplex-Behandlung mit Hilfe der Real-Time-PCR**

Mit einer Real-Time-PCR soll die Wirkung der funktionellen EWS/FLi1-siRNA auf mRNA-Level untersucht werden. Dafür werden Zellen der Ewing Sarkom Zelllinie EW8 mit  $5 \times 10^4$  Zellen pro Bedingung in ein 24-Well ausgesät und mit 250  $\mu$ l Medium versorgt. Es werden drei verschiedene Bedingungen untersucht: Behandlung mit PBS als Kontrolle, Behandlung mit GR11L-P-scram-siRNA ebenfalls als Kontrolle und der Einsatz der funktionellen siRNA mit GR11L-P-EWS/FLi1-siRNA. Es werden 60 nM Endkonzentration des Antikörpers auf den Zellen eingesetzt und die siRNA wird im 10-fachen Überschuss verwendet.

Die Behandlung erfolgt an vier aufeinanderfolgenden Tagen. Für eine Behandlung werden siRNA und Antikörper-Protamin-Komplex zwei Stunden vorher zusammengegeben und bei RT inkubiert. Dann wird das Medium von den Zellen genommen, das Behandlungsreagenz zugefügt und mit Medium auf 250  $\mu$ l aufgefüllt. Am Tag fünf werden die Zellen abgenommen und für 5 min bei 400 x g abzentrifugiert. Der Mediumüberstand wird verworfen und das Pellet in 200  $\mu$ l RLT-Puffer aus dem Qiagen RNeasy Mini Kit aufgenommen. Bis zur weiteren Verwendung werden die Proben bei -20 °C aufbewahrt.

Mit Hilfe des Qiagen RNeasy Mini Kits wird die RNA nach Anleitung aus den Zellen isoliert. Anschließend wird am NanoDrop die RNA Konzentration bestimmt, die aus den Zellen gewonnen werden konnte. Nach der RNA Isolierung wird die RNA in cDNA umgeschrieben. Dafür werden 15,75  $\mu$ l der verschiedenen RNA-Proben mit *RNase out* und *Random Primer* versetzt. RNase Out soll den Abbau der RNA bis zur Transkription in cDNA verhindern.

Sobald die Proben mit RNase Out und den Random Primern versetzt sind, werden sie für 5 min bei 70 °C inkubiert. Es folgt ein zweiter Inkubationsschritt für 5 min auf Eis und eine dritte Inkubation für 10 min bei RT. Anschließend werden die Proben mit der reversen Transkriptase M-MLV-RT und dem Transkriptasenpuffer M-MLV-Puffer (5x), sowie dNTPs versetzt und für 1 h bei 42 °C inkubiert, damit die RNA in cDNA transkribiert werden kann.

Nach der einstündigen Inkubation wird die reverse Transkriptase für 15 min bei 70 °C in den Proben inaktiviert. Zum Abschluss wird die entstandene cDNA mit 25  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O verdünnt und kann so direkt für die Real-Time PCR eingesetzt werden.

## 2. Material und Methoden

Die Proben für die RT-PCR werden jeweils im Duplikat eingesetzt. Es werden zwei verschiedene Primer/Probes eingesetzt. Die eine richtet sich gegen die EWS/FLi1-mRNA, die zweite gegen das Housekeepingprotein ABL und seine mRNA. Um den mRNA-Gehalt in den behandelten Zellen untereinander und in unbehandelten Zellen zu vergleichen, muss für jede Probe eine Standardreihe mit unbehandelten EW8 Zellen mitgeführt werden. Für die Standardreihe wird die eingesetzte cDNA als 100 %, 25 %, 6,25 %, 1,56 %, 0,39 % und 0,098 % verdünnt und mit jeweils 2,5 µl in ein Well der 96-Well Analyseplatte vorgelegt. Auch die Standardreihe wird als Duplikat mitgeführt. Von den behandelten Zellen wird die cDNA ebenfalls mit 2,5 µl in die Analyseplatte vorgelegt. Ein Belegungsschema für eine solche Platte sieht demnach wie folgt aus:

**Tabelle 27: Belegungsschema 96-Well Platte RT-PCR**

Primer/ Probe		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>abl Standard</b>	A	100	100	25	25	6,25	6,25	1,56	1,56	0,39	0,39	0,098	0,098
<b>EWS/FLi1 Standard</b>	B	100	100	25	25	6,25	6,25	1,56	1,56	0,39	0,39	0,098	0,098
<b>abl</b>	C	PBS	PBS	scrm	scrm	E/F	E/F						
<b>EWS/FLi1</b>	D	PBS	PBS	scrm	scrm	E/F	E/F						

Zu der cDNA kommen anschließend die jeweiligen Primer und Probes, sowie die Polymerase und die dNTPs, die in einem Taqman Mix zusammengefasst sind. Die Reagenzien dafür werden in einem Mastermix zusammengestellt. Die Tabellen 28 und 29 zeigen den Mastermix für abl und EWS/FLi1. Der Mastermix wird jeweils für zwei zusätzliche Proben angesetzt.

**Tabelle 28: Mastermix abl**

<b>abl</b>	<b>20 x</b>
Taqman-Mix	125 µl
Primer 1	6 µl
Primer 2	6 µl
Probe	6 µl
ddH <sub>2</sub> O	57 µl
Gesamt	200 µl

## 2. Material und Methoden

**Tabelle 29: Mastermix EWS/FLi1**

<b>EWS/FLi1</b>	<b>20 x</b>
Taqman-Mix	125 µl
Primer/Probe	12,5 µl
ddH <sub>2</sub> O	62,5 µl
Gesamt	200 µl

Der abl- und der EWS/FLi1 Mastermix wird zusammengemischt und jeweils 10 µl auf die cDNA gegeben. Die Analyseplatte wird mit einer Klebefolie verschlossen und ist somit bereit für den RT-PCR Lauf im Taqman. Es wird das Standardprogramm genutzt. Nach dem Lauf können die Daten der RT-PCR analysiert werden. Dabei wird der abl-Wert von den EWS/FLi1 Werten abgezogen um eine Aussage über die relative Reduktion von EWS/FLi1 auf mRNA-Ebene treffen zu können.

### **2.2.14 *In vivo* Xenograft für den Nachweis der Tumorwachstumshemmung nach Antikörper-siRNA-Komplex-Behandlung**

Die *in vivo* Experimente dieser Arbeit werden mit dem Cetuximab-Protamin Konstrukt und dem A12-V1-Protamin Konstrukt durchgeführt. Eingesetzt werden CD1 Nacktmäuse im Alter von mindestens 8 Wochen. Für das Cetuximab-Protamin Konstrukt werden mit den HCT116, SW480, DLD-1 und HT29 vier verschiedene Kolorektalkarzinomzelllinien eingesetzt. Für A12-V1-Protamin reicht die Menge des selbstproduzierten Antikörpers erst einmal für nur eine Ewing Sarkom Zelllinie, die SKNM-C. Den Mäusen werden  $1 \times 10^7$  Zellen der jeweiligen Zelllinie subkutan in die rechte Flanke injiziert. Der wachsende Tumor stört die Mäuse an dieser Stelle am wenigsten. Pro Zelllinie werden 18 Mäuse eingesetzt. Nach der Injektion der Tumorzellen wird das Wachstum täglich kontrolliert. Sobald die Tumore sichtbar sind und eine Größe von ca.  $100 \text{ mm}^3$  erreicht haben, wird mit der Behandlung der Mäuse begonnen. Für die Behandlung mit Cetuximab werden die 18 Mäuse pro Zelllinie in jeweils drei Behandlungsgruppen à 6 Mäuse aufgeteilt. Die Behandlungsgruppen sind Cetuximab-Protamin, Cetuximab-P-scrn-esiRNA (scrm, scrambled Kontrolle) und Cetuximab-P-KRAS-esiRNA. Die Behandlung erfolgt mit 4 mg/kg und das Gewicht der Maus wird mit 25 g eingeordnet. Diese Antikörpermenge entspricht ungefähr den 60 nM, die in den *in vitro* Assays vornehmlich eingesetzt werden. Die esiRNA wird in diesem Fall im 5-fachen Überschuss eingesetzt. Die esiRNA wird vor der Behandlung für zwei Stunden bei RT an den Antikörper gekoppelt. Das Behandlungsreagenz wird den Mäusen intraperitoneal injiziert.

Für das *in vivo* Experiment mit dem A12 V1 sind ebenfalls drei unterschiedliche Behandlungsansätze verfolgt worden. Hier wird die erste Gruppe von sechs Mäusen mit PBS behandelt, die zweite mit

## 2. Material und Methoden

A12-V1-P-scrn-siRNA und die dritte mit der funktionellen EWS/FLi1-siRNA und A12-V1-Protamin. Der hier eingesetzte A12 soll aus einer einzigen Aufreinigungscharge stammen, damit die Behandlungen untereinander vergleichbar sind. Die gekoppelte A12 Charge hat hier eine Konzentration von 2  $\mu\text{M}$ . Da der A12 V1 in diesem Fall der limitierende Faktor ist, wird auf eine Behandlungsgruppe, die nur mit dem Antikörper-Protamin-Komplex behandelt wird, verzichtet. Dafür wird PBS als Kontrollgruppe eingesetzt um das ungehinderte Tumorwachstum darzustellen. Des Weiteren werden in diesem *in vivo* Versuch mit 2 mg/kg behandelt um mindestens vier Behandlungen mit dem Antikörper-siRNA-Komplex zu garantieren. Das entspricht ungefähr 30 nM Antikörper und ist damit die Hälfte der Menge, die in den *in vitro* Assays eingesetzt wurde.

Sobald die Tumoren im Schnitt eine Größe von 100-200  $\text{mm}^3$  erreichen, beginnen die Behandlungen. Die Mäuse werden dafür bei den Cetuximab-Behandlungen alle drei Tage gewogen, die Tumorgröße wird mit Hilfe eines digitalen Messschiebers bestimmt und die Mäuse erhalten ihre Behandlung i.p. injiziert. Bei den A12-Behandlungen erfolgt die Behandlung in einem zwei-Tage-Rhythmus. Sobald die Tumore, in der Regel die Tumore der Kontrollgruppen, eine Größe von 1500  $\text{mm}^3$  übersteigen, wird das *in vivo* Experiment für alle Gruppen beendet. Die Mäuse werden nach dem in unseren zentralen Tierversuchseinrichtungen standardisierten Verfahren in tiefer Narkose getötet, die Tumoren werden ein letztes Mal gemessen und dann entnommen. Anschließend wird das Tumorgewicht bestimmt und die Tumoren, wie zum Beispiel für einen Western Blot, für die weitere Verarbeitung vorbereitet.

### **2.2.15 Nachweis des Proteinknockdowns nach A12-V1-EWS/FLi1-siRNA-Komplex-Behandlung im Tumor mit Hilfe eines Western Blots**

Der A12 V1 Western Blot aus den Tumoren unterscheidet sich von dem Western Blot im vorherigen Abschnitt durch die Vorbereitung der Lysate. Nachdem die Tumoren entnommen wurden, werden sie in mehrere Stücke geteilt und gewogen. Anschließend werden die Tumoren ungefähr 1:10 mit RIPA all in versetzt, das heißt ein 0,085 g Tumor wird mit 850  $\mu\text{l}$  RIPA versetzt. Um den Tumor zu zerkleinern und die Zellen aufzuschließen wird zunächst ein Ultra-Turrax verwendet, bis der Tumor komplett zerkleinert ist. Danach werden die Lysate über Nacht eingefroren und am nächsten Tag auf Eis aufgetaut. Es folgt ein kurzer Zentrifugationsschritt von 5 min bei 13.000 rpm.

Um sicher zu gehen, dass alle Zellen des Tumors aufgeschlossen werden, werden die Lysate vor dem BCA Assay geschallt. Jede Probe wird 3 x für 10 s einer Amplitude von 25 % im Ultraschallgerät ausgesetzt. Es folgt eine erneute Zentrifugation für 5 min bei 13.000 rpm und 4 °C bevor der Überstand mit den Proteinen in ein neues Eppendorfgefäß überführt wird. Da der Proteingehalt erfahrungsgemäß in diesen Lysaten immer noch sehr hoch ist, werden sie noch einmal 1:1 mit RIPA all in verdünnt bevor sie wie in Abschnitt 2.2.12 beschrieben in den BCA Assay eingehen. Ab diesem

## 2. Material und Methoden

Punkt verläuft der Western Blot wie bereits in 2.2.12 beschrieben, nur das 20 µg Protein pro Probe eingesetzt werden.

### 2.2.16 Klonierung des A12-V1 Produktionsvektors pcDNA3.1(+)/A12-Version-1-G2A-EGFP

Für die Produktion des IGF-1R Antikörpers A12 V1 wurde in einem ersten Versuch die Sequenz des Antikörpers in einem Stück ohne GFP am Ende des Konstrukts verwendet. Bei dem Konstrukt wurde nur die schwere Kette produziert und die GFP Intensität korrelierte nicht mit der A12-Produktionseffizienz (Ergebnisse nicht gezeigt). Aus diesem Grund wird in einem neuen Ansatz die schwere Kette von der leichten Kette durch ein G2A Peptid getrennt und ebenfalls die leichte Kette von dem GFP (siehe Abbildung 13). Dadurch, dass das GFP als letztes abgelesen wird, muss die Antikörpersequenz davor abgelesen worden sein. Das Antikörperinsert besteht aus drei Einzelteilen, der schweren Kette, der leichten Kette und dem EGFP. Die Einzelteile werden zunächst in einer PCR mit Hilfe einer Q5 Polymerase vervielfältigt. Für die drei Einzelteile werden drei verschiedene Primerpaare aus forward und reverse Primer verwendet (siehe Tabelle 6). Der PCR-Ansatz setzt sich folgendermaßen zusammen:

**Tabelle 30: PCR Ansatz für die Klonierung des A12 V1 Produktionsvektors**

Q5 Puffer (5x)	5 µl
dNTP's (? M)	0,5 µl
Primer forward 1:10	1,25 µl
Primer reverse 1:10	1,25 µl
Q5 Polymerase	0,25 µl
ddH <sub>2</sub> O	15,75 µl
DNA 2 ng (1:100)	1 µl
<b>Gesamt</b>	<b>25 µl</b>

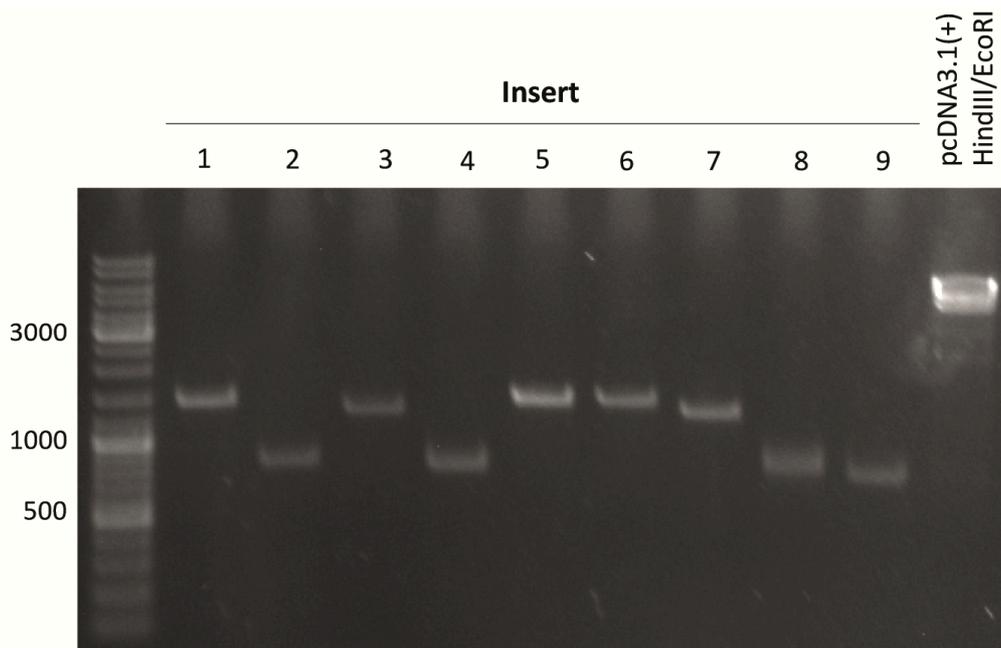
## 2. Material und Methoden

Die Reagenzien werden zusammengegeben und mit folgendem PCR Programm inkubiert:

**Tabelle 31: PCR Programm A12 V1 Produktionsvektor**

95 °C	2 min	
95 °C	30 s	30 x
60 °C	30 s	
72 °C	3 min	
72 °C	10 min	
4 °C	hold	

Anschließend werden die entstandenen Proben mit dem Qiagen PCR Purification Kit nach Anleitung aufgereinigt und auf ein 1 %-iges Agarosegel aufgetragen. Das Gel wird bei einer Spannung von 100 V laufen gelassen. Es folgt eine 20 minütige Inkubation des Gels in einem Ethidiumbromidbad, bevor die passenden Banden auf dem UV-Tisch mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten werden. Mit Hilfe des Qiagen Gel Extraction Kits werden die einzelnen Bestandteile des Antikörperkonstrukts nach Anleitung aus dem Gel isoliert und 5 µl des Konstrukts zur Kontrolle erneut auf ein 1 %-iges Agarosegel aufgetragen. Zusätzlich wird das Backbone, der pcDNA3.1(+) Vektor, mit auf das Gel aufgetragen. Dieser wurde zuvor bei 37 °C für eine Stunde mit den beiden Restriktionsenzymen HindIII und EcoRI geöffnet. Dieses Agarosegel wird ebenfalls für 45 min bei 100 V laufen gelassen, bevor die DNA im Ethidiumbromidbad angefärbt wird. Dieses Gel ist ein sogenanntes Ligationsgel und dient der Verhältnisbestimmung, in dem der Vektor und die Inserts für die Ligation eingesetzt werden sollen.



**Abbildung 15: Ligationsgel für die Ligation des Produktionsplasmids pcDNA3.1(+)/A12-Version-1-G2A-EGFP**

Auf dem Agarosegel sind neun verschiedene Inserts aufgetragen und das durch die Restriktionsenzyme HindIII und EcoRI geöffnete Plasmid pcDNA3.1(+). Insert 5 ist die schwere Kette, Insert 4 zeigt die leichte Kette von A12 und Insert 2 ist das am Ende angefügte GFP.

Da drei Inserts gleichzeitig zu einem Konstrukt in den Vektor ligiert werden sollen, wird für die Ligation das HiFi DNA Assembly Kit verwendet. Der Ligationsansatz setzt sich dafür folgendermaßen zusammen:

**Tabelle 32: Ligation des A12 V1 Produktionsvektors**

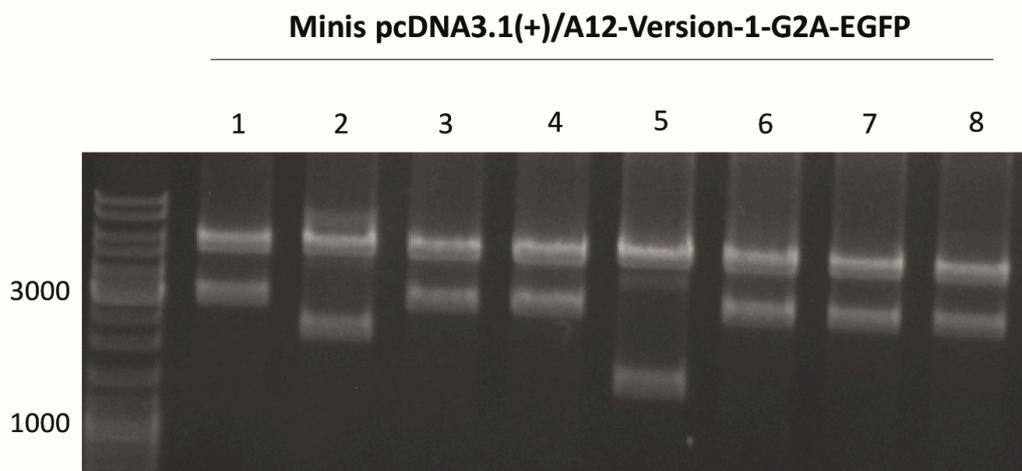
pcDNA3.1(+)	1 µl
HindIII/EcoRI	
Insert Nr. 2	3 µl
Insert Nr. 4	3 µl
Insert Nr. 5	3 µl
Assembly Master Mix	10 µl
<b>Gesamt</b>	<b>20 µl</b>

Der Ligationsansatz wird für 15 min bei 50 °C inkubiert. Anschließend erfolgt die Transformation des Ligationsansatzes in Z-kompetente Bakterien. Dafür werden die Bakterien auf Eis aufgetaut. Vom Ligationsansatz werden 2 µl zu den Bakterien gegeben und die Bakterien mit dem Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgt ein Hitzeschock für 45 s bei 42 °C, anschließend werden die Bakterien erneut für 2 min auf Eis inkubiert, dann mit 1 ml SOC Medium versetzt und für 1 h bei 37 °C

## 2. Material und Methoden

geschüttelt. Danach werden die *E.coli* für 2 min bei 2.000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wird bis auf 50 µl abgenommen und das Bakterienpellet in den 50 µl Restmedium resuspendiert und auf eine LB-Platte mit Ampicillin ausplattiert. Die LB-Amp-Platte wird über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Mit den in diesem Fall 10 angewachsenen Kolonien werden jeweils 3 ml LB-Amp-Medium angeimpft und über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Aus diesen Mini Kulturen wird das Plasmid mit Hilfe des 5'Prime Fast Plasmid Mini Kits nach Anleitung isoliert. Die 10 isolierten Plasmide aus den Minis werden erneut mit HindIII und EcoRI kontrollverdaut und anschließend auf ein Agarosegel aufgetragen.



**Abbildung 16: Kontrollverdau Minis pcDNA3.1(+)/A12-Version-1-G2A-EGFP**

Die Minis wurden mit den Restriktionsenzymen HindIII und EcoRI kontrollverdaut. Die passenden Banden von 3031 Basenpaaren und 5377 Basenpaaren sind bei den Minis 1,3,4,6,7 und 8 zu erkennen.

Die Minis 1, 3, 4, 6, 7 und 8 passen vom Kontrollverdauemuster von zwei Fragmenten mit 3031 und 5377 Basenpaaren. Aus Plasmid 7 wird eine Maxi angeimpft. Dabei wird der Rest der Minikultur, die nicht für die Plasmidisolierung verwendet wurde, in 400 ml LB-Amp-Medium gegeben und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wird das Plasmid aus der Maxikultur mit dem NucleoBond Xtra Maxi Kit isoliert.

Um zusätzlich zu überprüfen, ob das Plasmid die richtige Sequenz aufweist, wird es sequenziert. Die Sequenzierung wird mit drei verschiedenen Primern durchgeführt. Ein forward-Primer (T7), ein reverse-Primer (BGH rev) und ein Primer, der forward mittig im A12-Konstrukt ansetzt (A12 for). Der Sequenzierungsansatz setzt sich folgendermaßen zusammen:

## 2. Material und Methoden

**Tabelle 33: Sequenzierungsansatz des A12 V1 Produktionsvektors**

Big Dye 3.1	0,5 µl
Primer 1:100 (T7/BGH rev/A12 for)	1,5 µl
Sample Buffer (5x)	2 µl
ddH <sub>2</sub> O	5 µl
DNA Template 300 ng	1 µl
<b>Gesamt</b>	<b>10 µl</b>

Die Sequenzierungsproben werden bei folgendem PCR-Programm laufen gelassen:

**Tabelle 34: Sequenzierprogramm des A12 V1 Produktionsvektors**

96 °C	4 min	
96 °C	20 s	35 x
50 °C	10 s	
60 °C	2 min	
4 °C	hold	

Nach der PCR werden die Proben aufgereinigt. Dafür wird Sephadex in eine dafür vorgesehene Filterplatte gegeben und mit 300 µl ddH<sub>2</sub>O versetzt. Sephadex wird für 2 h bei Raumtemperatur quellen gelassen. Anschließend wird die Filterplatte für 5 min bei 910 x g abzentrifugiert. Der Sephadexstempel wird danach erneut mit 200 µl ddH<sub>2</sub>O versetzt und noch einmal für 5 min bei 910 x g gewaschen. Die Sequenzierproben werden mit 10 µl ddH<sub>2</sub>O verdünnt und auf die Sephadexplatte gegeben. Die Sephadexplatte mit den Proben wird auf eine dafür vorgesehene Sequenzierplatte gesetzt und die Proben für 5 min bei 910 x g in die Sequenzierplatte zentrifugiert. Die Probenplatte wird dann mit einer selbstklebenden Alufolie bedeckt und zur Sequenzierung abgegeben. Das Plasmid pcDNA3.1(+)/A12-Version-1-G2A-EGFP konnte fehlerfrei sequenziert werden und kann somit für die Produktion des A12 V1 Antikörpers eingesetzt werden.

### **2.2.17 Immunfluoreszenzfärbungen für die Untersuchung der Kolokalisation von fluoreszierender siRNA mit frühen Endosomen oder Lysosomen**

Um die Kolokalisation der aufgenommenen fluoreszierenden siRNA mit frühen Endosomen oder Lysosomen zu überprüfen, wird eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Dafür werden wie in Abschnitt 2.2.6 Zellen, in diesem Fall SKNM-C, in *chamber slides* ausgesät und mit A12-V1-P-

## 2. Material und Methoden

Alexa488-siRNA über Nacht inkubiert. Es wird ein Well des 8er *chamber slides* für die EEA1-Färbung und ein Well für die LAMP1-Färbung vorbereitet.

Am nächsten Tag wird das Medium abgenommen und die Zellen einmal vorsichtig, damit sie sich nicht ablösen, mit 400 µl PBS gewaschen. Anschließend wird 400 µl 4 x PFA zugegeben und die Zellen werden für 20 min bei RT fixiert. Es folgt ein PBS-Waschschritt. Um die Antikörper, gerichtet gegen das Protein EEA1 und gegen LAMP1, in die Zelle zu bekommen, wird die Membran der SKNM-C mit Hilfe von 50 µl 0,2 % Triton X 100 für 5 min bei RT permeabilisiert. Anschließend werden die Zellen erneut mit PBS gewaschen und die Inkubation mit dem Primärantikörper findet statt. Dafür wird der  $\alpha$ EEA1-Antikörper 1:100 und der  $\alpha$ LAMP1-Antikörper 1:200 in PBS eingesetzt. Für ein Well werden 50 µl verwendet. Die Inkubation der Zellen mit den Primärantikörpern erfolgt für 1,5 h in einer Feuchtkammer. Dafür wird ein Stück Zelltork mit Wasser befeuchtet und zu den *chamber slides* unter den Plastikdeckel einer 15 cm Schale gelegt. Nach den 1,5 h werden die Wells einmal mit PBS gewaschen und mit dem Sekundärantikörper versorgt. Bei dem Sekundärantikörper handelt es sich um einen Cy3-gelabelten Donkey-Anti-Rabbit Antikörper, der mit einer Konzentration von 1:100 verwendet wird. Für die Inkubation mit dem Sekundärantikörper werden 0,5 µl Cy3-DAR und 0,5 µl einer 1:100 verdünnten Hoechst-Lösung zu 49 µl PBS gegeben. Inkubiert werden die Zellen damit für 30 min bei RT wieder in der Feuchtkammer. Anschließend werden die Zellen noch einmal mit PBS gewaschen und die Kammern können von dem Objektträger abgelöst werden. Die Zellen werden mit einem Tropfen Dako Mounting Medium und einem Deckgläschen eingedeckelt. Um das Austrocknen der Proben und das Ablösen des Deckgläschen beim Mikroskopieren mit einem Upright Mikroskop zu verhindern, wird rund um das Deckgläschen eine dünne Schicht klaren Nagellacks verteilt. Zum Trocknen werden die Objektträger ein bis zwei Stunden im Kühlschrank gelagert, bevor die Zellen mikroskopiert werden können. Aufgenommen werden der grüne Fluoreszenzkanal für die Alexa488-siRNA-Vesikel, der rote Fluoreszenzkanal für die Cy3-Färbung der Proteine EEA1 und LAMP1, sowie der blaue Fluoreszenzkanal für die Hoechst-gefärbten Zellkerne. Die Kolokalisation der siRNA mit den frühen Endosomen oder den Lysosomen wird dann anhand der Overlays analysiert.

### 2.2.18 Zellkultur

Bis auf die CHO-S Zellen, deren Kultur in Abschnitt 2.2.1 beschrieben ist, sind alle verwendeten Zelllinien adhärenente Zellen. Die Zelllinien und ihr jeweiliges Kulturmedium sind in Tabelle 6 gezeigt. Die Haltung stimmt bei allen 9 adhärenenten Zelllinien überein. Sie werden jeweils in einer 75 mm<sup>2</sup> Zellkulturflasche in 13 ml Medium kultiviert. Sie werden zweimal die Woche 1:10 gesplittet um zu verhindern, dass sie in ihrer Zellkulturflasche zu dicht werden und sterben. Dafür wird das Medium von den Zellen abgesaugt und die Zellen einmal mit 10 ml PBS gewaschen. Anschließend werden die

## 2. Material und Methoden

Zellen mit 2 ml 1 x Trypsin versetzt. Das Trypsin wird so verteilt, dass alle Zellen mit Trypsin bedeckt sind, anschließend werden die Zellen mit dem Trypsin bei 37 °C zwischen 1 und 10 min inkubiert. Während die EW8 sich sehr schnell ablösen, brauchen die DLD-1 10 min, damit das Trypsin alle Verbindungen der Zellen zu ihrem Untergrund löst. Für ein Splittverhältnis von 1:10 werden zu den 2 ml Trypsin, in denen sich nun die Zellen befinden, 8 ml Medium gegeben. Durch das FCS im Medium wird die Trypsinreaktion gestoppt. Die Zellen werden mit dem Medium von dem Flaschenboden gespült und durch mehrmaliges resuspendieren gegen den Flaschenboden vereinzelt. Von der Zellsuspension wird ein Milliliter in der Flasche belassen, mit 12 ml Medium aufgefüllt und zurück in den Inkubator gestellt. Die 9 ml Zellsuspension, die übrig geblieben sind, werden für die *in vitro* Versuche verwendet, in 10 % DMSO/FCS eingefroren oder verworfen. Nach diesem Prinzip der Trypsinierung werden die Zellen für alle *in vitro* Assays abgelöst. Die Trypsinmenge passt sich dabei der Zellkulturflaschengröße oder -plattengröße an. Für die *in vivo* Experimente werden die Zellen in einem hohen Maßstab expandiert. Dafür werden 125 mm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen verwendet.

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Antikörper- und rezeptorvermittelter siRNA-Einsatz im KRAS-mutierten Kolorektalkarzinom

Für das Überwinden der Cetuximab-Resistenz in KRAS-mutierten Kolorektalkarzinomen sollen siRNAs gerichtet gegen KRAS mit Hilfe des Cetuximab-Protamin-Komplexes in die Zellen geschleust werden. Die Wirkung dieser Behandlungsstrategie wird im Folgenden erklärt.

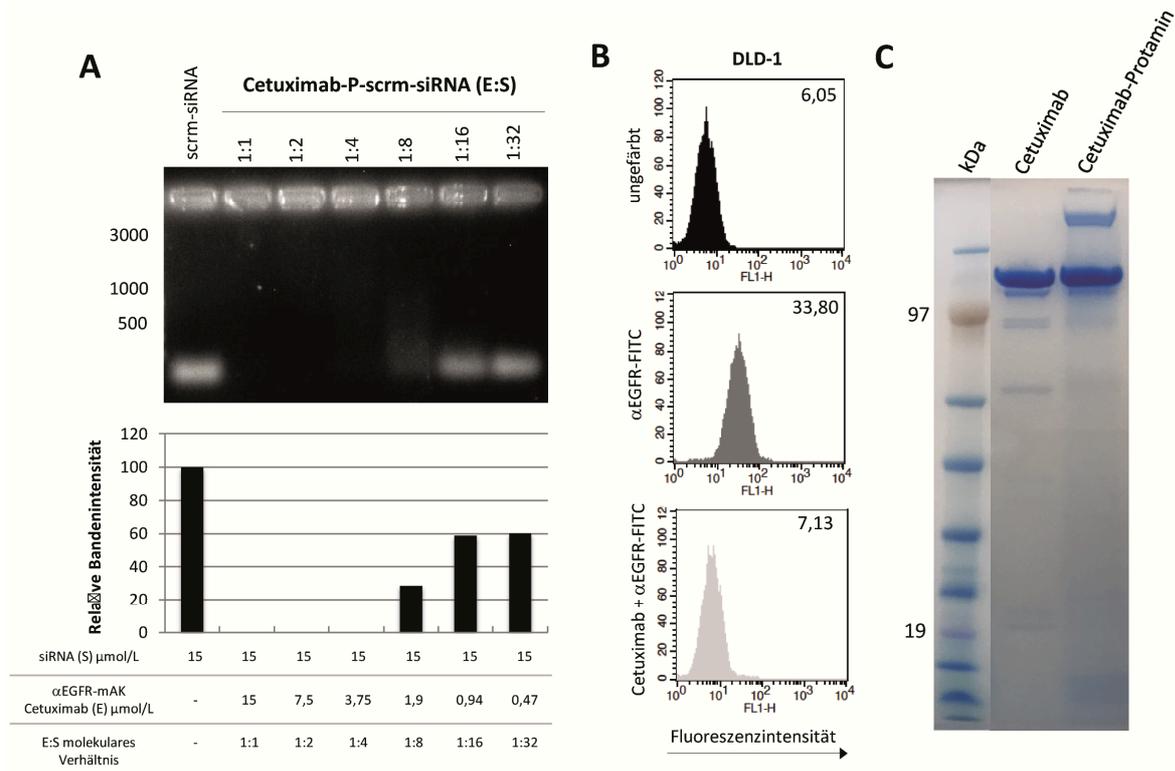
#### 3.1.1 EGFR-Antikörper Cetuximab bindet siRNA und initiiert Rezeptorinternalisierung von EGFR

Der erste Schritt für die Etablierung eines Antikörpers als Transportvehikel für siRNAs liegt in der Bestimmung der siRNA-Bindeeigenschaften und der Überprüfung der Internalisierungseigenschaften. Für die siRNA-Bindemöglichkeit wird mit dem an Protamin gekoppelten EGFR-Antikörper Cetuximab deshalb wie in 2.2.3 beschrieben ein Band-Shift Assay durchgeführt. Dafür wird der Antikörper-Protaminkomplex mit verschiedenen siRNA-Konzentrationen inkubiert und mit steigender siRNA-Konzentration im Vergleich zu einer freien siRNA-Kontrolle auf ein Agarosegel aufgetragen. In Abbildung 17 A ist ein solches Agarosegel dargestellt. In der ersten Reihe ist die freie siRNA zu erkennen. Es folgen die Antikörper-siRNA Verbindungen in den molekularen Verhältnissen 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 und 1:32. Ist ein Antikörper-Protamin-Komplex gesättigt mit siRNAs, tritt die Bande mit freier siRNA wieder auf. In diesem Fall ist das bei einem Verhältnis von Antikörper zu siRNA von 1:8 der Fall. Bei 1:16 ist die siRNA Bande wieder deutlich zu erkennen. In dem darunterliegenden Diagramm ist die relative Bandenintensität nach einer Densitometriebestimmung aufgetragen. Auch hier ist zu erkennen, dass gleichbleibende siRNA-Mengen ab einem Verhältnis von 1:16 wieder auftreten. Der an Protamin gekoppelte Antikörper Cetuximab hat damit eine Bindekapazität von etwa acht siRNAs pro Antikörper. Für die folgenden Versuche werden jeweils fünf siRNAs pro Antikörper eingesetzt.

Diese siRNAs sollen nun in die Zelle gelangen. Dafür wird die Internalisierung dieses Antikörpers in die Zelle mit einem in Abschnitt 2.2.4 beschriebenen Internalisierungs-FACS überprüft (siehe Abbildung 17 B). Als Beispiel ist die Kolorektalkarzinomzelllinie DLD-1 dargestellt. Die Fluoreszenzintensität steht hierbei für die relative Rezeptoranzahl auf der Zelloberfläche. Ungefärbte DLD-1 zeigen im FACS eine Fluoreszenzintensität von 6,05. Die Positivkontrolle, DLD-1 Zellen gefärbt mit dem EGFR-FITC Antikörper, weist eine relative Rezeptordichte von 33,8 auf ihrer Oberfläche auf. Im dritten Diagramm, DLD-1 zuerst mit Cetuximab inkubiert und anschließend mit dem  $\alpha$ EGFR-FITC

### 3. Ergebnisse

gegengefärbt, sinkt die Rezeptoranzahl auf 7,13 und damit annähernd auf den ungefärbten Zustand der Zellen. Der EGFR-FITC Antikörper bindet ein anderes Epitop als Cetuximab. So kann er verbliebene EGF-Rezeptoren nach dem Inkubationsschritt mit Cetuximab auf der Zelloberfläche erkennen. Dieses Internalisierungs-FACS zeigt, dass Cetuximab-Protamin durch seine Bindung an den EGF-Rezeptor, dessen Internalisierung initiiert. Fast alle EGF-Rezeptoren sind nach der einstündigen Inkubation mit Cetuximab von der Zelloberfläche verschwunden.



**Abbildung 17: Internalisierungs- und siRNA-Bindeeigenschaften des Cetuximab-Protaminkonjugats über den chemischen Linker sulfo-SMCC.**

**A** Bei dem dargestellten Band-Shift Assay wurde der an Protamin gekoppelte EGFR-Antikörper Cetuximab-Protamin (Cetuximab-P) mit verschiedenen siRNA-Konzentrationen inkubiert und mit steigender siRNA-Konzentration auf ein Agarosegel aufgetragen. Cetuximab-Protamin besitzt eine Bindekapazität von 8 siRNAs pro Antikörper. **B** Mit Hilfe dieser FACS-Histogramme wird die Internalisierungseigenschaft von Cetuximab-Protamin dargestellt. Ungefärbte DLD-1 Zellen zeigen eine relative EGFR-Rezeptordichte auf ihrer Oberfläche von 6,05. DLD-1, die nur mit dem EGFR-FITC behandelt wurden als Positivkontrolle, liegen bei einer Fluoreszenzintensität von 33,8. Nach einstündiger Inkubation mit Cetuximab-Protamin liegt die relative Rezeptordichte bei 7,13. Nahezu 100 % der Rezeptoren sind internalisiert. **C** Das Coomassiegele zeigt den EGFR-Antikörper Cetuximab in seiner ungekoppelten Form und gekoppelt an Protaminsulfat. Die gekoppelte Form zeigt eine Zunahme in der Proteingröße im Vergleich zur ungekoppelten Form.

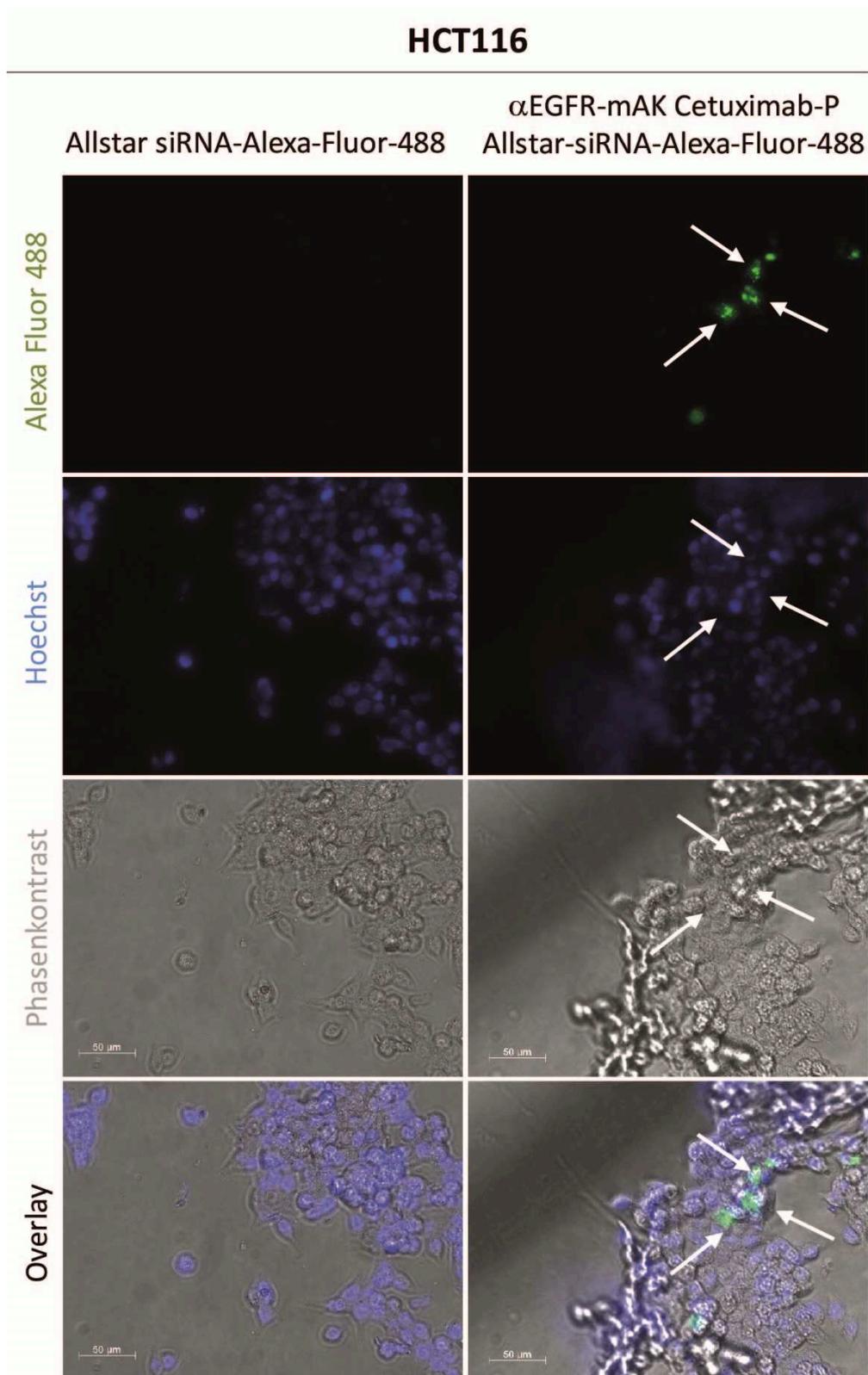
Als dritter Schritt nach jeder Kopplung wird der gekoppelte Antikörper im Vergleich zu seiner ungekoppelten Form auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen und mittels Coomassielösung angefärbt. Der ungekoppelte Cetuximab liegt als IgG bei 160 kDa. Wie in Abbildung 17 C zu erkennen, gewinnt die Protamin-gekoppelte Form an Größe. Außerdem ist unten im Gel bei der gekoppelten Form überschüssiges Protamin zu sehen, das die Gelfiltration nicht vollständig entfernen konnte. Dieses

### 3. Ergebnisse

Bandenmuster und die Größenänderung lassen auf eine erfolgreiche Konjugation von Protamin an den EGFR-Antikörper Cetuximab schließen.

#### **3.1.2 EGFR-Antikörper Cetuximab-Protamin transportiert fluoreszierende siRNA in Kolo- rektalkarzinomzellen**

Der zweite Schritt in der Etablierung eines Antikörpers als Transportvehikel für siRNAs ist nach der Überprüfung der siRNA-Bindekapazität und der Internalisierungsfähigkeit die visuelle Bestätigung der Internalisierung.



**Abbildung 18: Internalisierung von fluoreszierender siRNA gekoppelt an den EGFR-Antikörper Cetuximab-Protamin in Kolorektalkarzinomzellen**

Die Abbildung zeigt HCT116-Zellen, die in der rechten Spalte mit dem Cetuximab-Protamin-Allstar-siRNA-Alexa-Fluor-488 Komplex behandelt wurden und als Negativkontrolle in der linken Spalte nur mit der grün fluoreszierenden Allstar-siRNA-Alexa-Fluor-488. In der oberen Zeile sind siRNA gefüllte Vesikel in den Zellen zu erkennen, die mit dem Cetuximab-Protamin-Alexa488-siRNA Komplex behandelt wurden. In der Zeile ohne Antikörper sind keine grünen Vesikel zu sehen.

### 3. Ergebnisse

Dafür wird grün-fluoreszierende Allstar-Alexa-Fluor-488-siRNA (Alexa488-siRNA) an den Antikörper gekoppelt und Zellen damit über Nacht behandelt. Als Kontrolle werden Zellen nur mit der siRNA ohne Antikörper versetzt. Vergleicht man in Abbildung 18 die zwei Behandlungsansätze miteinander, sind bei den Zellen, behandelt mit Cetuximab-Protamin-Alexa488-siRNA, grüne Punkte im Fluoreszenzbild zu erkennen. Diese grünen Punkte treten in der Kontrollbehandlung ohne Antikörper links nicht auf. Bei den grünen Punkten handelt es sich um Vesikel, die die Alexa488-siRNA-Antikörper-Komplexe enthalten. Ca. 20 % der Zellen zeigen diese Einschlüsse der fluoreszierenden siRNA. In den Overlays in der letzten Zeile, bestehend aus der Fluoreszenzaufnahme, einer Hoechst-Zellkernfärbung und dem Phasenkontrast der Zellen, zeigt sich, dass die Vesikel in den Zellen lokalisiert sind. Die Internalisierung von siRNA mit Hilfe des Cetuximab-Protamin-Komplexes ist damit funktional.

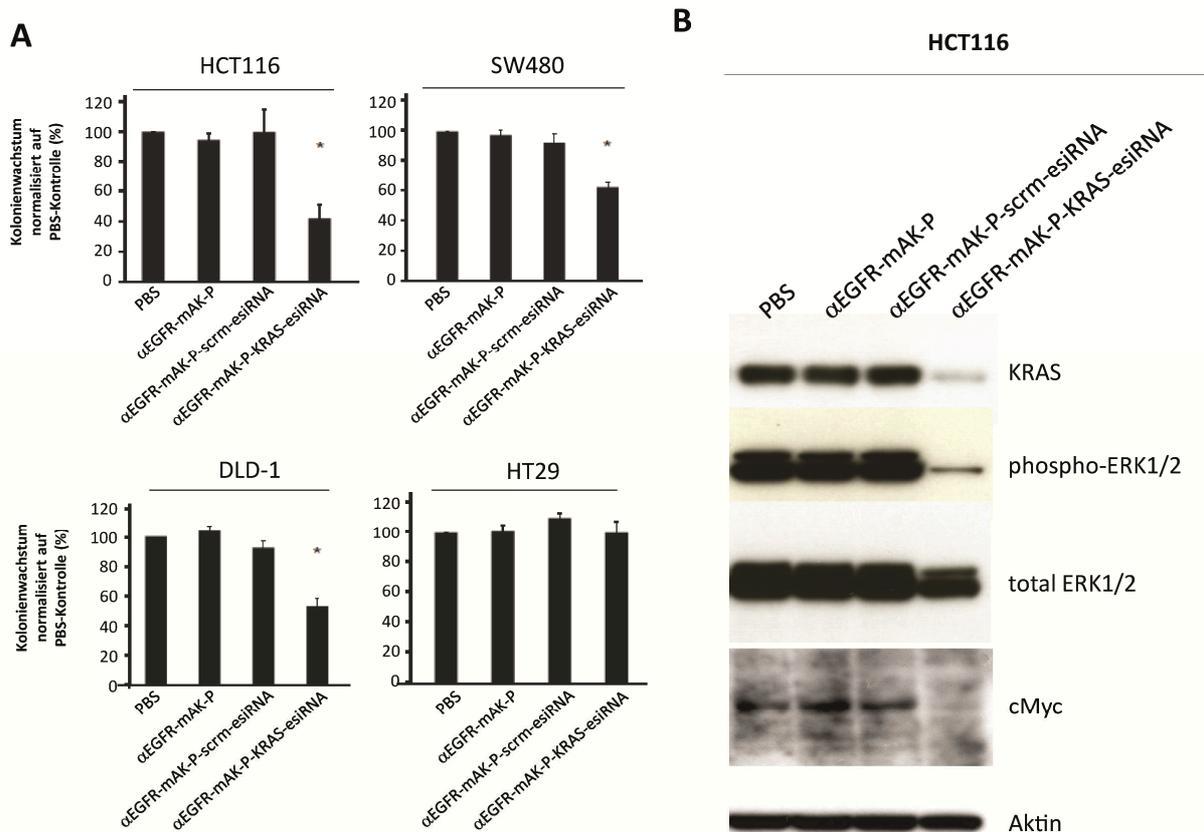
#### **3.1.3 Knockdown von KRAS auf Proteinebene und Wachstumsreduktion von Kolorektalkarzinomzellen nach *in vitro* Behandlung mit Cetuximab-Protamin-KRAS-esiRNA**

Nachdem die Funktionalität des Cetuximab-Protamin-Komplexes in Abschnitt 3.1.1 und 3.1.2 nachgewiesen wurde, folgt nun der Einsatz von funktioneller siRNA. Cetuximab ist ein monoklonaler Antikörper, der bereits in der Immuntherapie von Kolorektalkarzinomen seinen Einsatz findet <sup>[x]</sup>. Cetuximab bindet an der EGF-Bindestelle des EGF-Rezeptors und blockiert somit die Interaktion von Rezeptor und Ligand. Ohne EGF wird die Signalkaskade von dem EGF-Rezeptor ausgehend nicht in Gang gesetzt und die Zelle in ihrer Proliferation gestört. Weisen Kolorektalkarzinompatienten allerdings eine KRAS-Mutation auf, sind sie resistent gegen die Cetuximab-Behandlung (siehe Abschnitt 1.2). KRAS ist eine kleine GTPase in der RAF/MEK/ERK-Kaskade ausgehend vom EGF-Rezeptor. In seiner mutierten Form ist dieser molekulare Schalter dauerhaft „angeschaltet“. So kann es durch die Rezeptorbindung von Cetuximab nicht zu einer Inhibition der Signalkaskade kommen. Aus diesem Grund wird im Folgenden eine KRAS-esiRNA verwendet. Diese esiRNAs sind gegen KRAS gerichtet und sorgen für die Degradation der KRAS-mRNA. Das KRAS-Level in der Zielzelle sollte dadurch sinken und die Zelle sollte gleichzeitig wieder sensitiv für die Cetuximab-Behandlung werden.

Als erster Test, welche Auswirkung die Cetuximab-Protamin-KRAS-esiRNA Behandlung auf die Proliferation der Kolorektalkarzinomzelllinien hat, wird als dritter Schritt der Antikörperetablierung ein Colony Formation Assay durchgeführt (siehe Abschnitt 2.2.7). Dabei werden Zellen mit vier verschiedenen Behandlungsansätzen vorinkubiert und anschließend in Soft-Agar ausgesät. Die Zellen wachsen dann für ca. sieben Tage bei 37°C. Wenn die entstandenen Kolonien eine gut sichtbare Größe erreicht haben, werden sie gefärbt und abschließend gezählt. Für diesen und die folgenden

### 3. Ergebnisse

Versuche wurden vier verschiedene Kolorektalkarzinomzellen ausgewählt. Die HCT116, SW480 und die DLD-1 Zellen tragen alle eine KRAS-Mutation (siehe Tabelle 6). Die HT29 dagegen sind bezüglich KRAS Wildtyp, durch eine BRAF-Mutation aber trotzdem resistent gegen die Cetuximab-Therapie. Sie fungieren als Kontrollzelllinie in dieser Arbeit. Behandlungsansätze sind in diesem Versuch eine PBS-Kontrollgruppe, eine Gruppe nur mit dem Cetuximab gekoppelt an Protamin behandelt, eine Gruppe behandelt mit Cetuximab-Protamin und einer scrambled-esiRNA, die kein Zielgen hat, als Kontrolle und die vierte Gruppe behandelt mit Cetuximab-Protamin gekoppelt an die funktionelle KRAS-esiRNA.



**Abbildung 19: Effekt von EGFR Antikörper Cetuximab-Protamin-KRAS-esiRNA auf die Proliferation von Kolorektalkarzinomzelllinien mit einer KRAS Mutation und der Effekt der KRAS-esiRNA Behandlung auf Proteinebene**

**A** Im Colony Formation Assay wird der Effekt der Cetuximab-Protamin-KRAS-esiRNA auf das klonale Wachstum der Zellen in Form von Koloniebildung überprüft. Behandelt wurden HCT116, SW480, DLD-1 und HT29 Zellen mit PBS, Cetuximab-Protamin allein, Cetuximab-Protamin-scram-esiRNA und Cetuximab-Protamin-KRAS-esiRNA. Die Koloniezahl ist dabei normalisiert auf die PBS-Kontrolle. Bei den KRAS-mutierten Zelllinien HCT116, SW480 und DLD-1 ist eine signifikante Reduktion der Kolonien auf ca. 50 % im Vergleich zu den Kontrollgruppen zu erkennen. Die nicht KRAS-mutierte Kontrollzelllinie HT29 weist diese Reduktion in der Koloniebildung nicht auf. **B** Für die Überprüfung des Effekts der Cetuximab-Protamin-KRAS-esiRNA Behandlung auf Proteinebene wurden HCT116 Kolorektalzellen für fünf Tage mit dem Antikörper-siRNA-Komplex behandelt. Die dargestellten Western Blots zeigen verschiedene Stufen der KRAS-abhängigen Signalkaskade des RAF/MEK/ERK-Wegs. Zu sehen ist, dass durch die Behandlung mit der KRAS-esiRNA im ersten Western Blot KRAS als Protein im Vergleich zu den Kontrollen reduziert ist. Durch das Ausschalten von KRAS durch die esiRNA sind auch die folgenden Schritte der Signalkaskade reduziert. Total-ERK und phospho-ERK zeigen beide einen Knockdown nach KRAS-esiRNA-Behandlung. Auch das cMyc-Level sinkt in den Zellen. Aktin zeigt, dass von dieser Behandlung nur die Einheiten der RAF/MEK/ERK-Kaskade betroffen sind. Das Aktin-Level ist in allen vier Behandlungsbedingungen gleich. (z.T. entnommen aus [1])

### 3. Ergebnisse

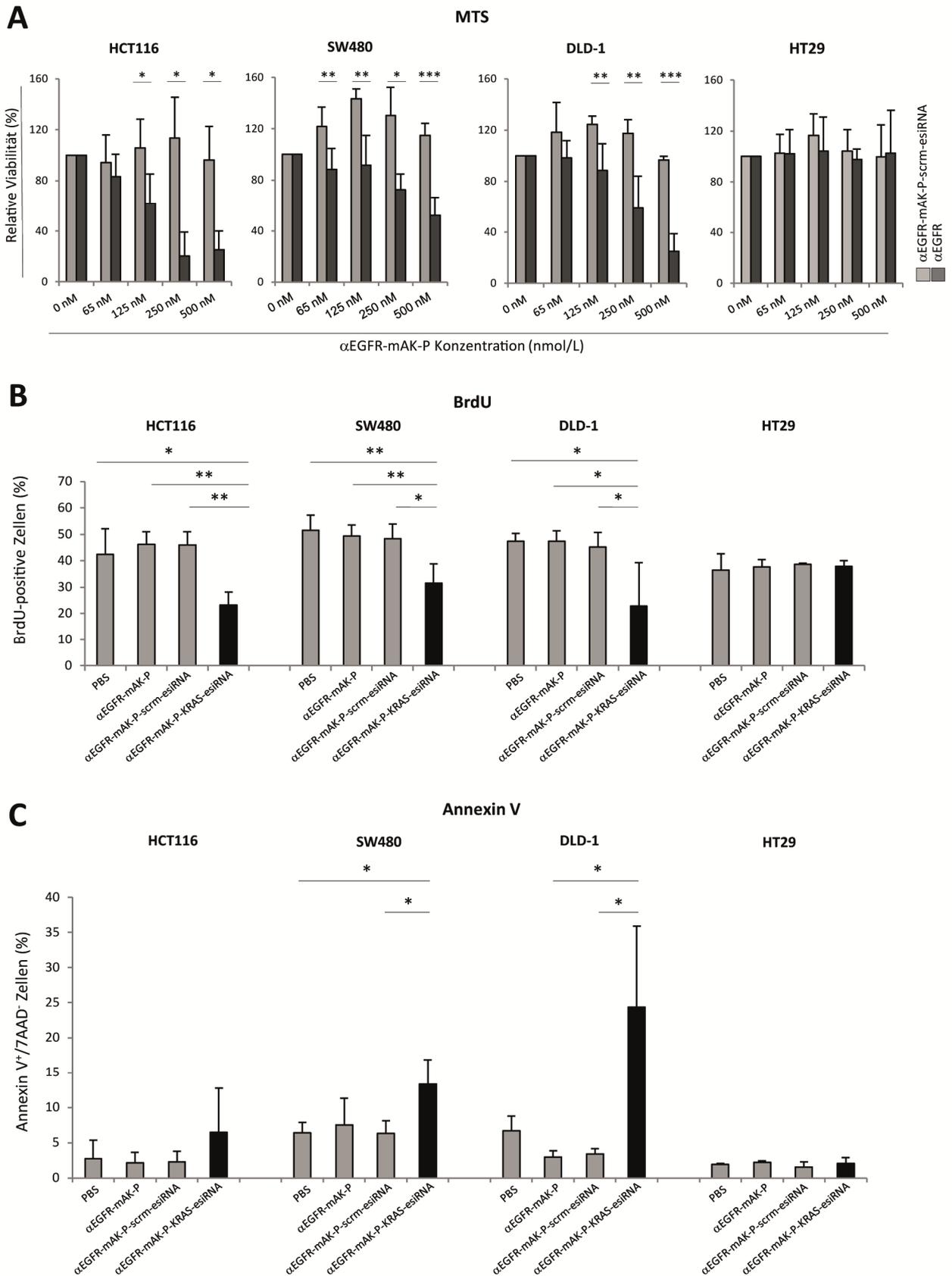
Die in Abbildung 19 A abgebildeten Diagramme zeigen die Anzahl an gewachsenen Kolonien normalisiert auf die PBS-Kontrolle in Prozent. Die Zelllinie HCT116 zeigt in den drei Kontrollgruppen PBS, Cetuximab allein und Cetuximab-Protamin-scrambled-esiRNA ungefähr die gleiche Anzahl an Kolonien in Prozent. Die Zellen, die mit Cetuximab-P-KRAS-esiRNA behandelt wurden dagegen, zeigen eine signifikante Reduktion in ihrem Wachstum auf ca. 40 %. Die SW480 Zellen zeigen denselben Effekt, mit einer Wachstumsabnahme um über 40 %. Auch die dritte KRAS-mutierte Zelllinie DLD-1 reagiert auf die KRAS-esiRNA-Behandlung mit einer signifikanten Reduktion auf ca. die Hälfte. Bei den nicht KRAS-mutierten HT29 Zellen ist kein Unterschied im Wachstum zwischen allen vier Behandlungsansätzen zu erkennen. Der Einsatz des Cetuximab-Protamin-KRAS-esiRNA-Komplexes zeigt somit Wirkung. Die siRNA gelangt in die Zelle durch das Antikörper-Carrier-System, führt hier zu einer Degradation der KRAS-mRNA und dadurch zu einem geringeren KRAS-Level in der Zelle. Durch die Reduktion von KRAS in den Zellen, werden diese erneut sensitiv für Cetuximab und beide Effekte schlagen sich in verringerter Zellproliferation und somit in einem verringerten Wachstum nieder.

Das KRAS wirklich „ausgeknockt“ wird, ist deutlich in dem Western Blot in Abbildung 19 B zu erkennen. Für den Western Blot wurden HCT116 Zellen über fünf Tage mit den vier Behandlungsansätzen täglich behandelt. Am Tag fünf wurden die Zellen abgenommen und zu Lysaten verarbeitet. Verschiedene Proteine, die zu dem RAF/MEK/ERK-Signalweg gehören, wurden auf der Membran sichtbar gemacht. An erster Stelle wurde KRAS angefärbt. Deutlich zu erkennen ist, dass die Zellen, die mit dem Cetuximab-P-KRAS-esiRNA-Komplex behandelt wurden, einen klaren KRAS-Knockdown auf Proteinebene zeigen. Im Vergleich zu den drei vorangehenden Kontrollen mit PBS, Cetuximab allein und der scrambled-esiRNA fällt die KRAS-Bande sichtlich schwächer aus. Der gleiche Effekt ist bei den nachfolgenden Proteinen zu finden. Auch die phospho-ERK- und total-ERK-Bande ist deutlich schwächer bei Zellen, die mit der KRAS-esiRNA behandelt worden sind. Das gilt auch für das Protein cMyc. Wird der Blot gegen Aktin als Housekeepingprotein entwickelt, sind vier gleich starke Banden zu sehen. Beide ERK-Formen und cMyc kommen in der RAS/RAF/MEK/ERK-Kaskade nacheinander nach KRAS vor (siehe Abbildung 10). Der Knockdown von KRAS hat somit Folgen für den gesamten Signalweg und sorgt gleichzeitig für die Herunterregulation dieser Proteine. Dieser Western Blot zeigt, dass die KRAS-esiRNA durch den Antikörpertransport in die Zellen gelangt und durch Eingehen in den RNAi-Weg zur Degradation der mRNA und damit zum Protein-Knockdown der mutierten KRAS-Form führt. Die Kontrollansätze zeigen diese Reduktion des KRAS-Levels auf Proteinebene nicht. Somit ist die Reduktion von KRAS in dem behandelten Ansatz auf die spezifische Wirkung der KRAS-esiRNA zurückzuführen.

#### **3.1.4 Die Cetuximab-Protamin-KRAS-esiRNA-Behandlung wirkt sich auf die Zellproliferation aus, weitere Nachweise durch zusätzliche Viabilitäts-, Proliferations- und Apoptoseassays**

Der Colony Formation Assay ist ein guter Ansatz, um den Einfluss der Antikörper-siRNA-Kombinationsbehandlung auf die Zellen zu testen. Zudem gilt er als maßgeblich prädiktiv für die *in vivo* Tumorigenität einer Zelle und für einen Behandlungserfolg im Tiermodell und kann somit Hinweise zur therapeutischen Effizienz geben. Um diese Aussage zur Proliferationsbeeinflussung zu unterstützen, werden weitere Proliferations- und Apoptoseassays durchgeführt. Da wäre als erstes der MTS-Assay. Bei diesem Assay werden die Zellen im 96-Well über fünf Tage mit den Behandlungsansätzen Cetuximab-P-scrn-esiRNA versus Cetuximab-P-KRAS-esiRNA mit steigender Konzentration behandelt. Die Antikörperkonzentrationen verdoppeln sich dabei von 0 nM ausgehend auf 65 nM, 125 nM, 250 nM und abschließend 500 nM. Die esiRNA-Konzentration wird jeweils fünf-fach auf die jeweilige Antikörperkonzentration berechnet. Je stoffwechselaktiver und damit viabler die Zellen sind, desto stärker fällt der Farbumschlag der MTS-Lösung aus. Der Farbumschlag wird photometrisch bestimmt und die Absorptionswerte auf die 0 nM Kontrolle normalisiert. In den Diagrammen in Abbildung 20 A ist die Behandlung mit Cetuximab-P-scrn-esiRNA in hellgrau abgebildet, die Cetuximab-P-KRAS-esiRNA Behandlung in dunkelgrau. Vergleicht man nun die relative Viabilität dieser beiden Behandlungsansätze mit steigender Konzentration ist bei den HCT116 ab 125 nM Antikörperkonzentration eine signifikante Abnahme der Vitalität bei den KRAS-esiRNA behandelten Zellen zu erkennen. Dieser Effekt verstärkt sich mit weiter steigender Konzentration. Bei 125 nM zeigen die Zellen, die die KRAS-esiRNA bekommen haben, noch ca. 60 % Viabilität im Vergleich zu der scrambled-esiRNA Kontrolle. Bei 250 nM und 500 nM sinkt dieser Wert sogar unter 30 %. Die DLD-1 Zellen zeigen diesen Effekt ebenfalls ab einer Konzentration 125 nM. Allerdings ist hier der größte Unterschied zwischen scrn-esiRNA und KRAS-esiRNA erst bei 500 nM zu erkennen. Da sinkt die Vitalität der KRAS-esiRNA-Zellen auf 30%. Bei den SW480 ist eine signifikante Reduktion der Stoffwechselaktivität bereits bei 65 nM zu erkennen. Mit der höchsten Antikörperkonzentration von 500 nM wird hier ein Rückgang der Viabilität auf ca. 50 % erreicht. Im Vergleich zu den KRAS-mutierten Zelllinien, zeigt die BRAF-mutierte Kontrollzelllinie HT29 in allen fünf Antikörperkonzentrationsansätzen keinen Unterschied zwischen einer Behandlung mit scrn-esiRNA und KRAS-esiRNA. Die Cetuximab-P-KRAS-esiRNA Behandlung wirkt sich somit auf den Stoffwechsel und damit auf die Proliferation der KRAS-mutierten Zellen aus. Mit steigender Antikörperkonzentration sind die Zellen weniger vital. Die KRAS-esiRNA öffnet durch ihren Einfluss auf das KRAS-Level in der Zelle den Weg für die Cetuximab-Wirkung. Die Proliferationsfähigkeit nimmt ab.

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 20: Wirkung der EGFR Antikörper Cetuximab-Protamin-KRAS-esiRNA-Behandlung auf die Viabilität und Proliferation von fünf verschiedenen Kolorektalkarzinom Zelllinien**

**A** MTS-Assay. Bei den HCT116, ist ab einer Antikörperkonzentration von 125 nM Endkonzentration auf den Zellen ein signifikanter Rückgang in der Vitalität verglichen mit der scrambled Kontrolle (hellgrau) zu erkennen. Bei der zweiten

### 3. Ergebnisse

Kolorektalkarzinomzelllinie SW480 setzt der vorher genannte Effekt schon bei 65 nM Antikörperkonzentration ein. Die DLD-1-Zelllinie zeigt eine signifikante Abnahme der Vitalität ab 125 nM. Die HT29-Zellen zeigen keine dezimierte Vitalität. Signifikanz: \*,  $P < 0,05$ ; \*\*,  $P < 0,01$ ; \*\*\*,  $P < 0,001$  **B** BrdU-Assay. Bei den HCT116 Zellen liegt die Zahl der BrdU-positiven Zellen bei den PBS, den Cetuximab-Protamin und den Cetuximab-P-scrn-esiRNA behandelten Zellen bei 45 %. HCT116, die mit dem Cetuximab-KRAS-esiRNA-Komplex behandelt wurden, zeigen einen signifikant geringeren Wert von 20 % positiven Zellen. Bei den SW480 liegen die Kontrollzellen bei 50 % BrdU-Positivität, bei dem KRAS-esiRNA behandelten Ansatz reduziert sich diese Zahl auf 30 %. Bei den DLD-1 nimmt der Prozentsatz signifikant von 50 % auf 25 % ab. Die BRAF-mutierte Kontrollzelllinie HT29 zeigt bei allen vier Behandlungsansätzen mit 50 % die gleiche Prozentzahl an BrdU-positiven Zellen. Signifikanz: \*,  $P < 0,05$ ; \*\*,  $P < 0,01$  **C** AnnexinV-Assay. HCT116 zeigen ca. 7 % frühapoptotische Zellen nach Cetuximab-P-KRAS-esiRNA Behandlung. Die drei Kontrollansätze übersteigen keine 2 %. Bei der SW480-Zelllinie zeigen die Kontrollen ca. 7 % frühapoptotische Zellen. Bei den KRAS-esiRNA Zellen steigt dieser Wert signifikant auf 15 %. DLD-1-Zellen zeigen eine signifikante Apoptoserate von 25 % im Vergleich zu den Kontrollbehandlungen, die zwischen 2 % und 5 % liegen. Die KRAS-Wildtyp Zelllinie HT29 lässt in allen vier Bedingungen keinen Anstieg der Apoptoserate über 2 % erkennen. Signifikanz: \*,  $P < 0,05$

In Abbildung 20 B wird die Auswirkung der KRAS-esiRNA Behandlung auf die DNA-Synthese im Zellzyklus und damit die Proliferation anhand des BrdU-Inkorporations-Assays dargestellt. Je mehr BrdU-positive Zellen eine Bedingung aufweist, desto zellteilungsaktiver sind die Zellen. Die Analyse bezieht sich immer auf die Anzahl an BrdU-positiven Zellen von 10.000 gemessenen Zellen insgesamt. Die Kolorektalkarzinomzelllinie HCT116 liegt bei den Kontrollbehandlungen mit PBS, Cetuximab-Protamin allein und Cetuximab-Protamin-scrn-esiRNA bei ca. 45 % BrdU-positiven Zellen pro zehntausend gemessenen Zellen. Bei der Cetuximab-P-KRAS-esiRNA Behandlung sinkt der Anteil an Zellen, die Bromdesoxyuridin in ihre DNA eingebaut haben, signifikant auf 25 %. Die SW480 Zelllinie zeigt ebenfalls einen signifikanten Unterschied zwischen den Cetuximab-P-KRAS-esiRNA behandelten Zellen zu den drei Kontrollgruppen von ca. 20 %. Bei den DLD-1 Zellen ist die signifikante Reduktion der BrdU-positiven Zellen auf 20 % im Vergleich zu den Kontrollgruppen bei den drei KRAS-mutierten Zelllinien am größten. Die Kontrollzelllinie HT29 zeigt keine Abnahme an Bromdesoxyuridin in den zehntausend gemessenen Zellen bei Cetuximab-P-KRAS-esiRNA behandelten Zellen. Die Cetuximab-P-esiRNA Behandlung hat damit einen nachweislichen Effekt auf die Proliferation der Zellen. Sie arretieren in der G1 Phase und erreichen nicht die S-Phase um Bromdesoxyuridin in ihre DNA einzubauen.

Der Effekt auf die Stoffwechselaktivität und Proliferation wurde nun in zwei Assays gezeigt, die Zellen, die mit der Cetuximab-P-KRAS-esiRNA in Kontakt kommen, sind in der Proliferation gehemmt. Doch sind sie nur gehemmt oder kommt es tatsächlich zur Apoptose der Zellen?

Diese Fragestellung wird mit dem AnnexinV-Apoptoseassay überprüft. In den Balkendiagrammen in Abbildung 20 C ist nun der Prozentsatz an AnnexinV-positiven und 7AAD-negativen Zellen, bezogen auf die gemessene Gesamtzellzahl, aufgetragen. Die Kombination von AnnexinV-Positivität und 7AAD-Negativität ist ein Zeichen für ein frühapoptotisches Stadium der analysierten Zellen (siehe Abschnitt 2.2.10). Für die erste Zelllinie, den HCT116, sind die drei Kontrollgruppen mit jeweils ca. 2 % AnnexinV+/7AAD- Zellen vertreten. Bei den Zellen behandelt mit Cetuximab-P-KRAS-esiRNA steigt

### 3. Ergebnisse

dieser Wert auf ungefähr 7 % an. Die Kontrollen bei den SW480 zeigen 7 % frühapoptotische Zellen an. Die Cetuximab-P-KRAS-esiRNA Behandlung lässt diesen Wert signifikant auf ungefähr 15 % ansteigen. Mit 25 % Zellen im frühapoptotischen Stadium zeigen die DLD-1 nach KRAS Behandlung einen deutlich höheren Wert als die anderen KRAS-mutierten Zelllinien. Die Kontrollen liegen bei den DLD-1 lediglich zwischen 2 und 5 %. Nicht mehr als 2 % Apoptose ist bei den BRAF-mutierten ©29 in allen vier Behandlungsansätzen zu entdecken.

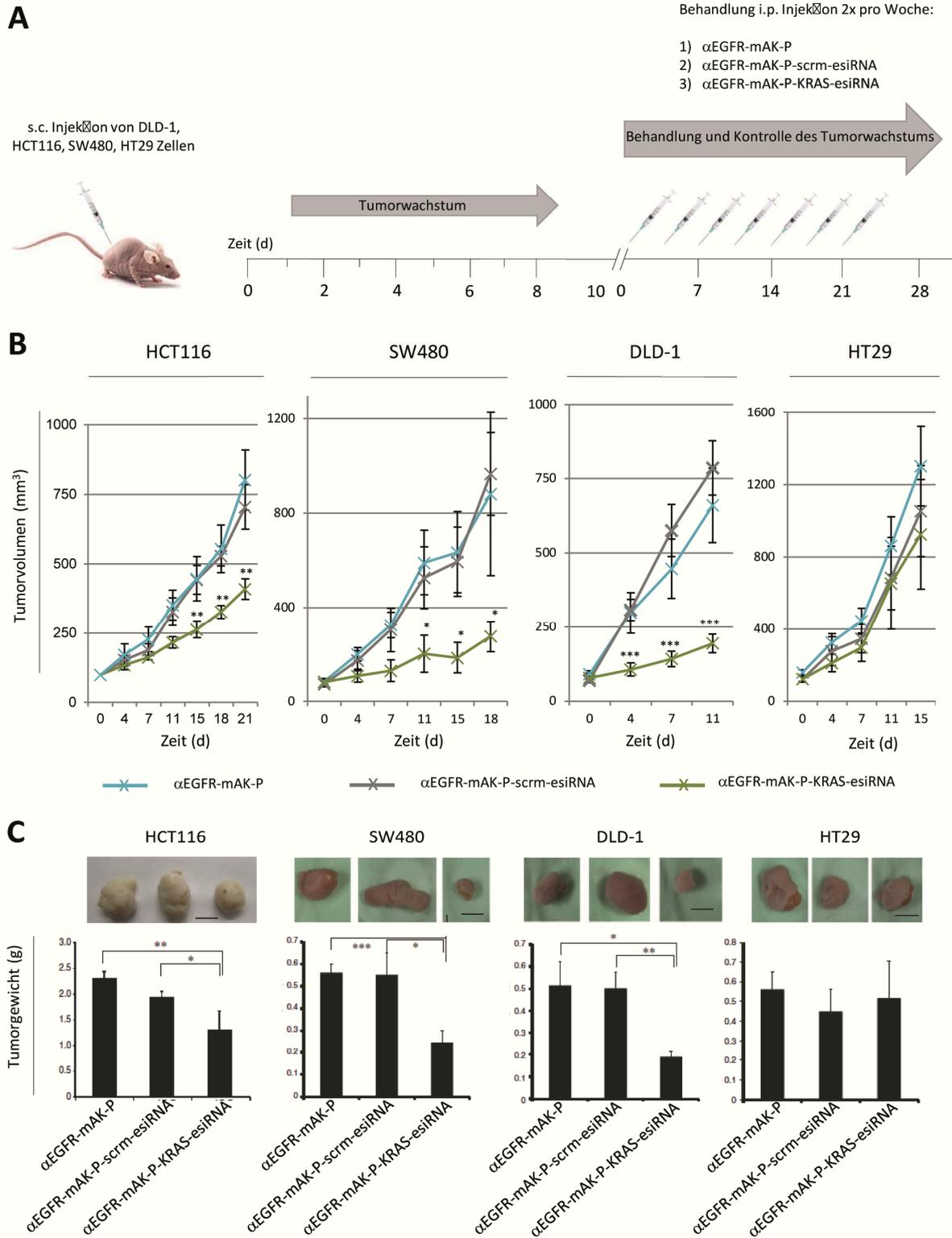
Nach diesen in Abschnitt 3.1.4 durchgeführten Experimenten lässt sich zusammenfassen, dass durch den Knockdown von KRAS in den KRAS-mutierten Zellen diese nach erfolgreichem Ausschalten von KRAS wieder sensitiv auf den Antikörper Cetuximab reagieren und dadurch in ihrer Proliferation gestört und sogar in die Apoptose getrieben werden.

#### **3.1.5 Wachstumsreduktion von subkutanen Kolorektalkarzinomen in CD1 Nacktmäusen nach Cetuximab-Protamin-KRAS-esiRNA Behandlung *in vivo***

Nach den vorangegangenen *in vitro* Versuchen und der damit verbundenen Erkenntnis, dass die in dieser Arbeit vorgestellte Behandlungsstrategie die Proliferation von KRAS-mutierten Kolorektalkarzinomzelllinien beeinflusst, werden die gewonnenen Erkenntnisse in einem *in vivo* Experiment angewendet. Um den direkten Vergleich zu den *in vitro* Ergebnissen ziehen zu können, wurden im *in vivo* Experiment die vier Zelllinien HCT116, SW480, DLD-1 und HT29 verwendet. Pro Zelllinie wurden 18 CD1 Nacktmäuse eingesetzt. Jeder Maus wurden  $1 \times 10^7$  Zellen der entsprechenden Zelllinie subkutan injiziert. Nachdem die Tumoren unter der Haut gut sichtbar waren, dies war meistens bei einer Größe von etwa  $100 \text{ mm}^3$  der Fall, wurden die Nacktmäuse den Behandlungsansätzen entsprechend in drei Gruppen bestehend aus je 6 Mäusen zusammengesetzt. Eine Gruppe wurde mit dem EGFR Antikörper Cetuximab gekoppelt an Protamin allein behandelt, die zweite Gruppe mit der Cetuximab-Protamin-scrn-esiRNA Kontrolle. Die dritte Gruppe bekam den Antikörper gekoppelt an die funktionelle KRAS-esiRNA. Die Injektion des Behandlungsreagenz erfolgte intraperitoneal. Erreichten die Tumoren in den Kontrollgruppen  $1500 \text{ mm}^3$  und Cetuximab-Protamin-scrn-esiRNA eine Größe von über  $1500 \text{ mm}^3$ , wurde der Versuch beendet. In Abbildung 21 B ist für die vier Zelllinien das Tumorwachstum in  $\text{mm}^3$  angegeben. Beginnend mit den HCT116 ist ab der fünften Behandlung bei dieser Zelllinie ein signifikanter Größenunterschied zwischen den Tumoren, die mit Cetuximab-P-KRAS-esiRNA behandelt wurden und den beiden Kontrollen Cetuximab-Protamin allein und Cetuximab-P-scrn-esiRNA zu erkennen. Durch den Einsatz der KRAS-esiRNA liegt die durchschnittliche Tumorgöße nach 21 Tagen und 7 Behandlungen hier bei ca.  $400 \text{ mm}^3$ , während die Kontrollen auf eine Größe von ca.  $750 \text{ mm}^3$  angewachsen sind. Bei den SW480 ergibt sich unter den verschiedenen Behandlungsansätzen ein noch deutlicheres Bild. KRAS-esiRNA behandelte

### 3. Ergebnisse

Tumore unterscheiden sich bereits ab der vierten Behandlung von den Kontrollgruppen und am Ende des Versuchs, nach nur sechs Behandlungen, sind diese Tumoren mit einer mittleren Größe von unter  $300 \text{ mm}^3$  deutlich kleiner als die der Kontrollgruppen mit ungefähr  $900 \text{ mm}^3$ .



**Abbildung 21: *In vivo* Behandlung von Kolorektalkarzinom-Xenografts mit EGFR Antikörper Cetuximab-Protamin-KRAS-esiRNA in CD1 Nacktmäusen**

**A** Für das *in vivo* Experiment werden pro Kolorektalkarzinomzelllinie 18 CD1 Nacktmäuse mit jeweils  $1 \times 10^7$  Zellen der jeweiligen Zelllinie subkutan transplantiert. Alle drei Tage werden die Mäuse mit den jeweiligen Behandlungsansätzen

### 3. Ergebnisse

Cetuximab-Protamin ( $\alpha$ EGFR-mAK-P), Cetuximab-Protamin-scrn-esiRNA ( $\alpha$ EGFR-mAK-P-scrn-esiRNA), Cetuximab-Protamin-KRAS-esiRNA ( $\alpha$ EGFR-mAK-P-KRAS-esiRNA) behandelt. **B** Die dargestellten Diagramme repräsentieren die Veränderung des Tumolvolumens während der Zeit der Behandlung bei den vier eingesetzten Kolorektalkarzinomzelllinien. Bei den HCT116-Zellen ist ab der fünften Behandlung eine signifikante Reduktion des Tumorwachstums im Vergleich zu den beiden Kontrollgruppen mit dem Antikörper allein und der scrambled-esiRNA-Behandlung zu erkennen. Bei den DLD-1 ist dieser Wachstumseinbruch bereits nach der ersten Behandlung signifikant. Die SW480-Tumoren zeigen eine signifikante Reduktion im Tumolvolumen ab der vierten Behandlung. Bei den HT29-Tumoren dagegen ist während der Behandlungsphase kein signifikanter Wachstumsunterschied zwischen den drei Behandlungsgruppen zu finden. Signifikanz: \*,  $P < 0,05$ ; \*\*,  $P < 0,01$ ; \*\*\*,  $P < 0,001$  **C** Neben dem Tumolvolumen wird nach Beendigung des *in vivo* Experiments das Gewicht der Tumoren bestimmt. Die Cetuximab-P-KRAS-esiRNA Gruppe zeigt signifikant leichtere und damit kleinere Tumoren, als die beiden Kontrollgruppen. Bei der HT29 Kontrollzelllinie gibt es keine signifikanten Unterschiede im mittleren Tumorgewicht. Signifikanz: \*,  $P < 0,05$ ; \*\*,  $P < 0,01$ ; \*\*\*,  $P < 0,001$ . (z.T. entnommen aus [1])

Bei den DLD-1 musste das Experiment aufgrund der schnell wachsenden Tumore in den Kontrollgruppen Cetuximab-Protamin ( $\alpha$ EGFR-mAK-P) und Cetuximab-Protamin-scrn-esiRNA ( $\alpha$ EGFR-mAK-P-scrn-esiRNA) nach vier Behandlungen abgebrochen werden. Allerdings tritt bei dieser Zelllinie der signifikante Tumorgrößenunterschied schon nach der ersten Behandlung ein. Die Cetuximab-Protamin-KRAS-esiRNA ( $\alpha$ EGFR-P-KRAS-esiRNA) behandelten Tumoren übersteigen in den 11 Behandlungstagen die Größe von 100-200 mm<sup>3</sup> nicht, während die Kontrollgruppen auf über 700-750 mm<sup>3</sup> ansteigen. Bei den als Kontrolle mitgeführten BRAF-mutierten HT29 wird das Experiment nach 15 Tagen abgebrochen, da die Tumore in der Cetuximab-Protamin-Gruppe die Größe von 1500 mm<sup>3</sup> und damit das zulässige Tumolvolumen überschreiten. In allen drei Behandlungsgruppen gibt es keine signifikanten Größenunterschiede unter den Tumoren.

Diese Beobachtungen und Ergebnisse werden durch die Darstellung des durchschnittlichen Tumorgewichts und durch Bilder repräsentativer Tumoren pro Gruppe in Abbildung 21 C untermauert. Das durchschnittliche Tumorgewicht von Cetuximab-P-KRAS-esiRNA behandelten HCT116-Tumoren liegt bei unter 1,5 g, während die Kontrollen mit 2 g für Cetuximab-P-scrn-esiRNA Behandlung und 2,3 g für die alleinige Cetuximab-Behandlung signifikant höher ausfällt. Das ist ein Gewichtsunterschied von fast einem Gramm. Auch in den abgebildeten Tumoren ist der Größenunterschied zu erkennen. Bei den SW480 liegen die Kontrollgruppen bei einem Tumorgewicht von etwa 0,55 g. Die Cetuximab-P-KRAS-esiRNA behandelte Gruppe liegt mit 0,25 g deutlich darunter. Bei dieser Zelllinie sind die Tumoren etwa halb so schwer, was sich in den abgebildeten Beispieltumoren widerspiegelt. Den deutlichsten Gewichtsunterschied weisen wie schon in dem Tumolvolumen vorher die DLD-1-Tumoren auf. Die Kontrollen liegen bei 0,5 g nach 11 Tagen Behandlungszeit. Die Cetuximab-P-KRAS-esiRNA behandelten Tumoren liegen mit einem Gewicht von durchschnittlich unter 0,2 g signifikant unter den Kontrollen. Bei dieser Zelllinie sind die Tumoren nach nur vier Behandlungen weniger als halb so groß wie die unbehandelten Tumoren. Die Fotos der Tumorbeispiele zeigen diesen Größenunterschied ebenfalls. Bei der HT29 Kontrolle liegen die

### 3. Ergebnisse

Tumorgewichte aller drei Behandlungsgruppen bei 0,45 bis 0,55 g. Es ist kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen zu erkennen.

Zusammengefasst lässt sich zu dem *in vivo* Versuch sagen, dass die Behandlung mit dem Antikörper-KRAS-esiRNA-Komplex das Wachstum dieser Tumoren unterdrückt. Sie wachsen in derselben Zeit nur halb so schnell wie die mitgeführten Kontrollgruppen. Zusätzlich ist zu erwähnen, dass bei den verschiedenen Zelllinien und allen Behandlungsansätzen die Mäuse nicht an Gewicht verloren und sich auch im Verhalten nicht verändert haben. Die Injektion des Antikörpers und der Antikörper-esiRNA-Komplexe scheint somit keine Nebenwirkungen bei den CD1-Nacktmäusen hervorzurufen.

### **3.2 Antikörper- und rezeptorvermittelter siRNA-Einsatz in der Ewing Sarkom Therapie**

In 3.1 wurde der Antikörper-siRNA Therapieansatz am Kolorektalkarzinom angewandt, um eine Cetuximabresistenz zu überwinden und eine Cetuximab vermittelte therapeutische siRNA Wirkung zu erzielen. Bei dem Ewing Sarkom sollen die Antikörper gegen den IGF1-Rezeptor beziehungsweise den CD99-Rezeptor erst einmal nur als Eingangsmittel in die Zelle verwendet werden. Die eigentliche Therapie liegt in der Herunterregulation des EWS/Fli1 Fusionsproteins durch die spezifische EWS/Fli1 siRNA. Die Etablierung eines Antikörpers dafür stellt hier den ersten Schritt dar. Welcher Antikörper am geeignetsten ist, wurde im Folgenden eruiert. Zur Auswahl stehen zu Beginn der IGF-1R Antikörper GR11L und der CD99-Antikörper hCD99. Es folgt der selbstproduzierte IGF-1R Antikörpers A12 V1.

#### **3.2.1 Der IGF1-R Antikörper GR11L als Transportmöglichkeit für siRNAs in Ewing Sarkom Zellen**

Nach dem *in vivo* Versuch mit dem EGFR Cetuximab kam die Frage auf, ob sich dieser Ansatz auch auf andere Krebsformen adaptieren lässt und dieser Therapieansatz wie eine Art Baukastensystem genutzt werden kann. Bei dem Baukastenprinzip würden Antikörper und siRNA gegen verschiedene onkogene Signalmoleküle auf den Patienten passend zugeschnitten werden. Damit entsteht ein personalisierter Therapieansatz, bei dem je nach Rezeptorausstattung der Tumorzellen der Antikörper ausgewählt wird und, bestimmt durch die relevanten onkogenen Moleküle, die passende siRNA gegen das jeweilige treibende Onkogen. Bei dem Kolorektalkarzinomansatz ist die Besonderheit, dass die siRNA auch genutzt wird, um eine Sensitivität gegenüber dem als Shuttle verwendeten Antikörper wieder herzustellen. In dem im Folgenden beschriebenen Therapieansatz für das Ewing Sarkom ist das nicht der Fall. Es wurden zwar einige Antikörper in der Immuntherapie für das Ewing Sarkom getestet, doch es gab bisher keine wirklich wirksamen Ergebnisse in der

### 3. Ergebnisse

Monotherapie mit den jeweiligen Antikörpern (siehe Abschnitt 4.2). Einer dieser Antikörper ist der IGF-1R Antikörper GR11L. Er zeigt keine hemmende Wirkung auf die Proliferation von Ewing Sarkom Zellen, da wir diesen aber lediglich als Shuttle nutzen wollen, um siRNA in die Zellen zu schleusen, ist dies kein hinderlicher Grund, der gegen den Einsatz des Antikörpers spricht. Kennzeichnend für das Ewing Sarkom ist, dass es in 85 % der Fälle durch eine einzige Translokation, die zu der Bildung des Fusionsproteins EWS/Fli1 führt, hervorgerufen wird. Könnte man diese Translokation mit einer siRNA „targetieren“ und die Degradation der mRNA erreichen, dürften die Zellen nicht mehr stark proliferieren. Der Fortschritt zu diesem Therapieansatz wird im Folgenden dargestellt.

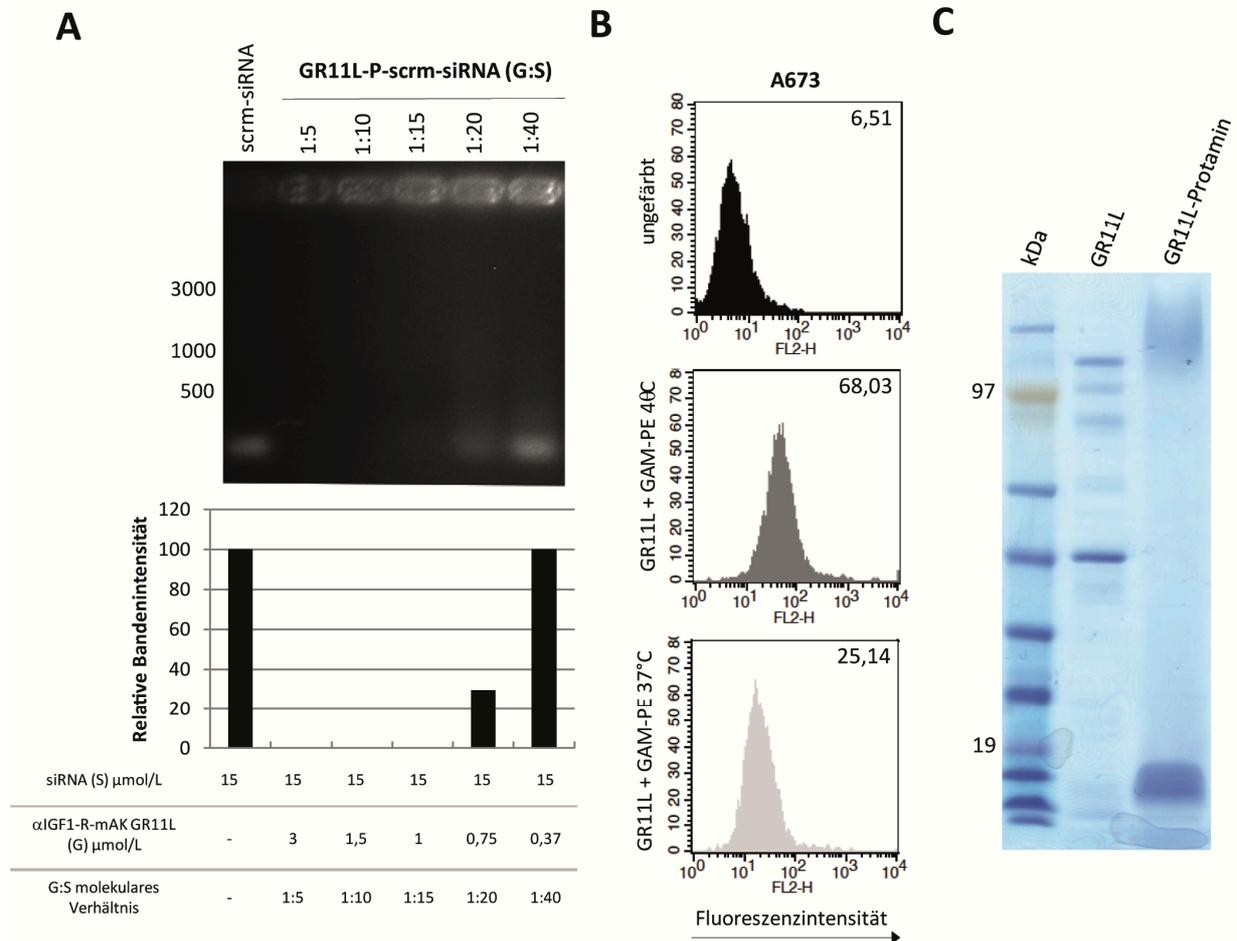
#### **3.2.1.1 Der IGF1-R Antikörper GR11L bindet siRNA und initiiert die Internalisierung des IGF1-Rezeptors in Ewing Sarkom Zellen**

Vor dem Einsatz des IGF-1R Antikörpers GR11L in *in vitro* Behandlungen wurden zunächst, wie schon beim Cetuximab gezeigt, die siRNA-Bindeeigenschaften und die Internalisierungseigenschaften überprüft. In Abbildung 22 A ist dazu der Band-Shift Assay gezeigt. GR11L gekoppelt an Protamin wurde wie auch Cetuximab mit verschiedenen siRNA-Konzentrationen inkubiert. Die Ansätze wurden dann mit steigender Konzentration auf ein Agarosegel aufgetragen. Auf dem Gel und der dazugehörigen Densitometriebestimmung ist zu erkennen, dass erst bei 20 siRNAs pro Antikörper langsam wieder freie siRNA im Gel erscheint. Bei 1:40 ist die Intensität der Bande dieselbe wie bei der freien siRNA Kontrolle. Die siRNA-Bindekapazität für den GR11L liegt damit zwischen 15 und 20 siRNAs pro IgG-Molekül. Das ist doppelt so viel wie bei dem EGFR Antikörper in Abschnitt 3.1.1. Für die folgenden Versuche wird die siRNA in 10-fachem Überschuss zum Antikörper eingesetzt. Die maximale Bindekapazität wird damit noch nicht ganz ausgeschöpft.

Bezüglich der Initiierung einer Rezeptorinternalisierung wurde mit der Ewing Sarkom-Zelllinie A673 ein Internalisierungs-FACS durchgeführt. In den Histogrammen in Abbildung 22 B steht die Fluoreszenzintensität auf der x-Achse repräsentativ für die Rezeptordichte auf der Zelloberfläche. Ungefärbte A673 haben einen Fluoreszenzintensitätswert von 6,51. Um die IGF-1-Rezeptoren auf der Oberfläche sichtbar zu machen, werden die Zellen für die IGF-1-R Positivkontrolle für eine Stunde bei 4°C mit dem GR11L inkubiert. Da dieser ungelabelt ist, wird GR11L durch einen PE-gelabelten Goat-anti-Mouse-Sekundärantikörper markiert. Die Rezeptordichte auf der Zelloberfläche der A673 liegt bei 68,03. In Ermangelung eines direkt gelabelten IGF-1R-Antikörpers, der ein separates Epitop bindet wie beim EGF-Rezeptor in Abschnitt 3.1.1, werden hier nach einer dreistündigen Inkubation bei 37°C die restlichen IGF1-Rezeptoren, die noch GR11L gebunden haben, aber noch nicht internalisiert sind, durch den Goat-anti-Maus-Sekundärantikörper (GAM), detektiert. Nach drei Stunden bei 37°C sind, bei einem Wert von 25,14, noch weniger als die Hälfte der Rezeptoren auf der

### 3. Ergebnisse

Oberfläche vertreten. Der IGF-1-Rezeptor zeigt im Allgemeinen eine langsamere Internalisierungskinetik als der EGF-Rezeptor aus Abschnitt 3.1.



**Abbildung 22: Internalisierungs- und siRNA-Bindeeigenschaften des IGF1-R Antikörpers GR11L gekoppelt an Protamin über den chemischen Linker sulfo-SMCC.**

**A** Band-Shift Assay. Der IGF-1R-Antikörper GR11L ( $\alpha\text{IGF1-R-mAK GR11L}$ ) gekoppelt an Protamin wurde mit verschiedenen siRNA-Konzentrationen inkubiert und anschließend mit steigender siRNA-Konzentration auf ein Agarosegel aufgetragen. Vergleicht man die Banden im Agarosegel mit den dazu bestimmten Densitometrien, ist zu erkennen, dass bei einem Antikörper zu siRNA Verhältnis von 1:20 erste freie siRNAs zu erkennen sind. GR11L-P bindet somit zwischen 15 und 20 siRNAs. **B** Mit Hilfe eines Internalisierungs-FACS wird die Antikörper-induzierte IGF-1-Rezeptorinternalisierung überprüft. Ungefärbte A673 Ewing Sarkom Zellen zeigen in den dargestellten Histogrammen eine Fluoreszenzintensität von 6,51. Die Positivkontrolle erreicht einen Wert von 68,03. Bei 37°C findet die Internalisierung statt und die Fluoreszenzintensität sinkt um 70 % auf 25,14. **C** Das dargestellte Coomassiegefärbte Gel zeigt den IGF-1R Antikörper GR11L in seiner ungekoppelten Form in der mittleren Reihe (linke Reihe, Größenmarker) und in der an Protamin gekoppelten Form in der rechten Reihe. In der rechten Reihe ist die typische Wolke der an Protamin gekoppelten Form des Antikörpers zu sehen, die in ihrer Größe größer ist, als die Hauptbande des ungekoppelten Antikörpers. Die zweite Bande, die in der zweiten Reihe unter 19 kDa zu sehen ist, ist freies Protamin.

Das abgebildete Coomassie-gefärbte Polyacrylamidgel in Abbildung 22 C zeigt den GR11L noch einmal in seiner ungekoppelten und an Protamin-gekoppelten Form. Die Bande des gesamten IgG-Proteins liegt in der mittleren Reihe bei 160 kDa und ist klar abgegrenzt zu erkennen. Bei der gekoppelten Form entsteht etwas größer eine diffuse, wolkige Bande. Diese Bande ist typisch für die

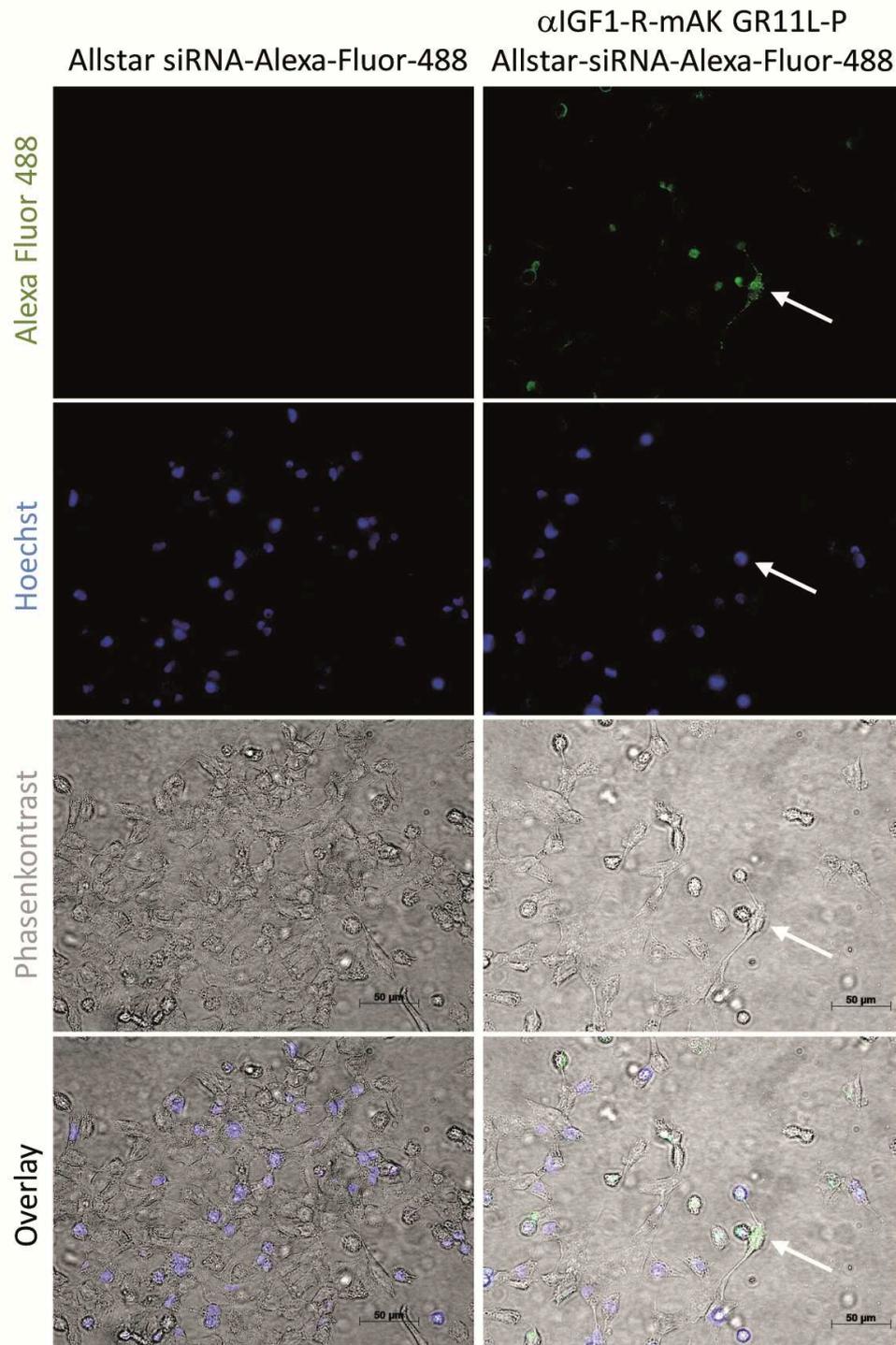
### 3. Ergebnisse

gekoppelten Formen der Antikörper und deutet auf eine erfolgreiche Kopplung hin. Die zweite Bande, die bei der gekoppelten Form unter der 19 kDa Bande entsteht, ist freies Protamin, das nicht gebunden hat und bei einem Gelfiltrationsschritt aus der Antikörperlösung entfernt wird (siehe Abschnitt 2.2.2.3). Der IGF-1R Antikörper GR11L gilt nach den Ergebnissen, die in Abbildung 22 zusammengetragen sind, als guter Kandidat für den Einsatz in dem Ewing Sarkom Therapieansatz, da er bis zu 20 siRNAs binden kann und eine Rezeptorinternalisierung initiiert. Um diese Internalisierung erweitert nachzuweisen, wird im folgenden Abschnitt die Internalisierung des Antikörpers beladen mit fluoreszierende siRNA gezeigt.

#### **3.2.1.2 IGF-1R-Antikörper GR11L transportiert fluoreszierende siRNA in Ewing Sarkom Zellen**

Um sicher zu gehen, dass der Antikörper die siRNA in die Zelle bringt, wird grün fluoreszierende Allstar-Alexa-Fluor-488-siRNA an den GR11L mit Protamin gekoppelt und die Ewing Sarkom Zelllinie A673 mit dem Komplex inkubiert. Nach einer Hoechst-Färbelösung für Zellkerne am darauffolgenden Tag werden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Als Kontrolle wurden die gleichen Zellen nur mit der siRNA ohne Antikörper als Shuttle inkubiert. Abbildung 23 zeigt, dass die Zellen, die nur mit der grünen siRNA behandelt wurden, keine Fluoreszenz aufweisen. Zellen, die mit GR11L-P-Alexa88-siRNA inkubiert wurden, zeigen die grünen Vesikel, die den Antikörper-siRNA-Komplex enthalten. Im Overlay aus Fluoreszenzaufnahme, Hoechst-Zellkernfärbung und Phasenkontrast in der untersten Zeile ist deutlich zu erkennen, dass diese grünen Vesikel sich in den Zellen befinden. Der GR11L ist damit in der Lage siRNA in die Ewing Sarkom Zellen zu transportieren.

## A673



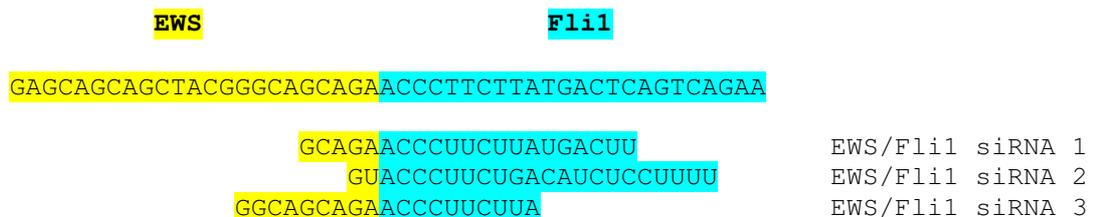
**Abbildung 23: Internalisierung von fluoreszierender siRNA gekoppelt an den IGF-1R Antikörper GR11L**

Die rechte Spalte zeigt A673 Ewing Sarkom Zellen, die mit dem IGF-1R Antikörpers GR11L-P-Allstar-siRNA-Alexa-Fluor-488-Komplex ( $\alpha$ IGF1-R-mAK GR11L-P) behandelt wurden. In der linken Spalte wurden diese Zellen nur mit der Allstar-siRNA-Alexa-Fluor-488 behandelt. Vergleicht man die Bilder in der ersten Zeile, sind im rechten Bild bei den Zellen, die mit dem Antikörper-siRNA-Komplex behandelt wurden, grüne Vesikel zu erkennen. Zellen, die nur mit der siRNA behandelt wurden im linken Bild, weisen diese grün fluoreszierenden Vesikel nicht auf. In der untersten Zeile in den Overlays ist zu erkennen, dass die grünen Vesikel in der rechten Spalte sich in den Zellen befinden.

### 3. Ergebnisse

#### 3.2.1.3 Die Behandlung von Ewing Sarkom Zelllinien mit GR11L-Protamin-EWS/FLi1-siRNA führt zu geringerer Proliferation und zum Knockdown von EWS/FLi1 in den Zellen

Nach dem Nachweis, dass GR11L als Transportvehikel für siRNAs in IGF-1R-positive Zellen geeignet ist, folgte der Einsatz von funktioneller siRNA. Dafür standen drei siRNAs zur Auswahl, die jeweils etwas versetzt den Bruchpunkt des EWS/FLi1 Fusionsgens überspannen (Abbildung 24).



**Abbildung 24: Eingesetzte siRNAs gegen das Fusionsgen EWS/FLi1**

Es werden drei verschiedene siRNAs, entworfen gegen das EWS/FLi1-Fusionsgen, verwendet. Sie überspannen den Bruchpunkt zwischen dem EWS-Protein und dem FLi1-Protein auf drei unterschiedliche Weisen. EWS/FLi1 siRNA 3 zeigt einen Knockdown-Effekt auf Proteinebene. (siehe Abbildung 25).

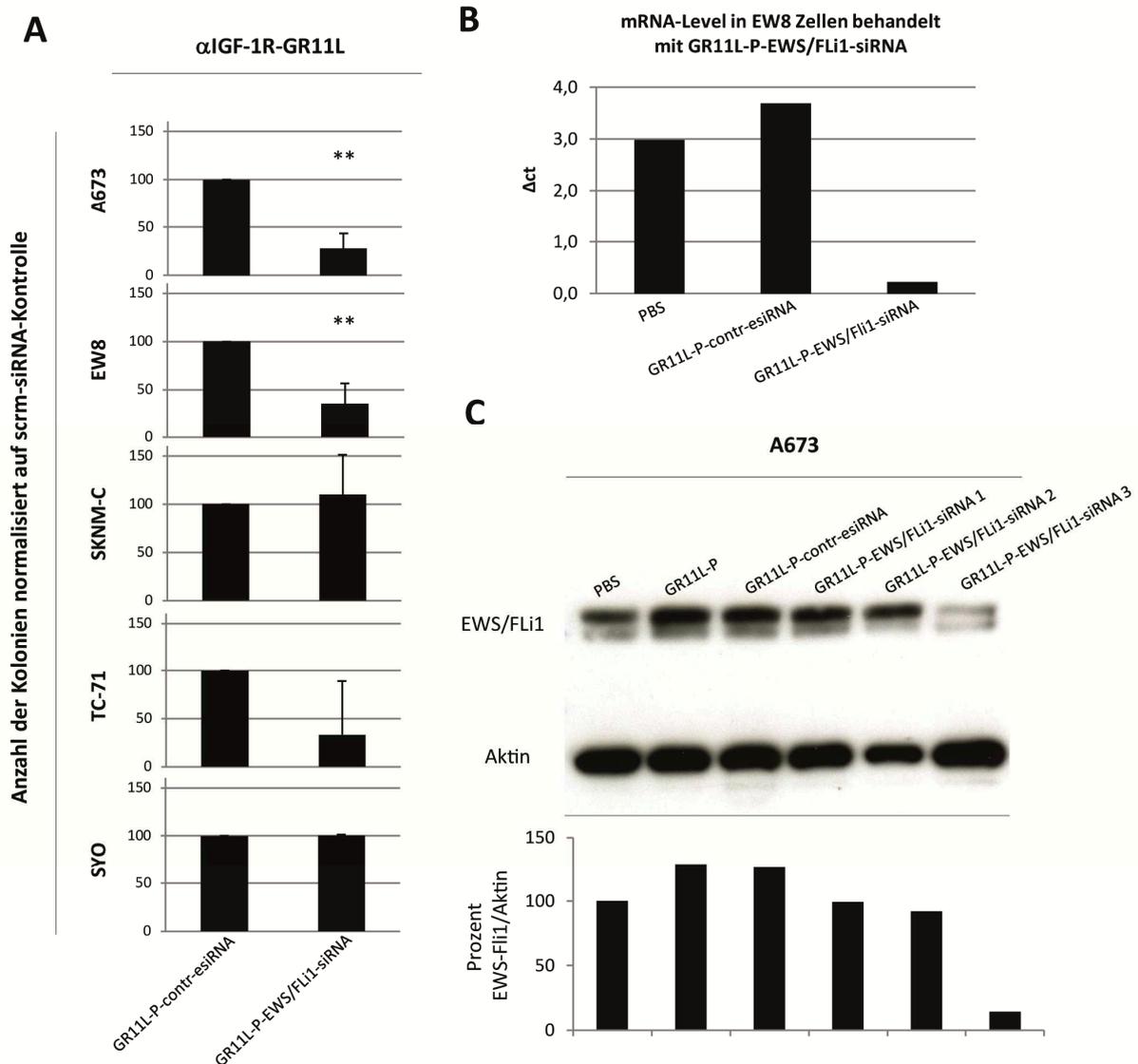
Die Wirkung dieser drei siRNAs wurde mit Hilfe eines Western Blots überprüft. Dafür wurden A673 Zellen für fünf Tage täglich mit den Ansätzen PBS, GR11L-Protamin alleine, GR11L-P-scrn-siRNA und GR11L-P-EWS/FLi1-siRNA 1-3 behandelt und Lysate dieser Zellen für einen Western Blot verwendet. Die Membran wurde dann zunächst mit einem Antikörper gegen FLi1 inkubiert und anschließend zur Kontrolle mit einem Antikörper gegen Aktin. FLi1 zeigt sich als Doppelbande (siehe Abbildung 25 C). Die untere Bande ist das native FLi1, die obere Bande ist das EWS/FLi1 Fusionsprotein. Vergleicht man die Banden des Blots in Abbildung 25 C miteinander, ist zu erkennen, dass die FLi1-Bande in den Zellen, die mit dem GR11L-Protamin und der dritten EWS/FLi1-siRNA behandelt wurden, deutlich schwächer ausfällt, als die Banden der anderen Behandlungsansätzen. Die unter der Membran dargestellte Densitometriebestimmung EWS/FLi1 im Verhältnis zu Aktin unterstützt diese Beobachtung. Im Vergleich zu dem Kontrollprotein Aktin ist EWS/FLi1 nach Behandlung mit der EWS/FLi1-siRNA-3 reduziert. Da diese siRNA zu einem Knockdown des Ewing Sarkom Fusionsproteins auf Proteinebene führt, wird sie für alle weiteren *in vitro* Versuche verwendet. Die anderen beiden EWS/FLi1 siRNAs zeigen in diesem Western Blot keinerlei Effekt auf die Produktion des Fusionsproteins.

Nachdem der Knockdown von EWS/FLi1 auf Proteinebene gezeigt wurde, wurden Zellen der Ewing Sarkom Zelllinie EW8 genau wie die A673 für den Western Blot für fünf Tage mit dem GR11L-P-EWS/FLi1-siRNA-3 Komplex behandelt. Als Kontrollen fungieren in diesem Fall Zellen, die nur mit PBS oder mit GR11L-Protamin-scrambled-siRNA behandelt wurden. Nach den fünf Behandlungstagen werden die Zellen abgenommen, die RNA isoliert und in cDNA umgewandelt. Die dazugehörige Real-Time-PCR zeigt in Abbildung 25 B, dass das mRNA-Level von EWS/FLi1 in den GR11L-P-EWS/FLi1-

### 3. Ergebnisse

siRNA behandelten Zellen im Vergleich zu den beiden Kontrollen deutlich reduziert ist. Auf der y-Achse ist der  $\Delta$ ct-Wert aufgetragen. Bei den Kontrollen liegt dieser Wert bei 3,0 oder höher. Bei den Zellen, die mit EWS/FLi1-siRNA behandelt wurden, steigt dieser Wert nicht über 0,2. Die Behandlung mit der Bruchpunkt siRNA führt damit sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene zu einem Knockdown von EWS/FLi1.

Der nächste Schritt war nun die Überprüfung der Wirkung auf die Proliferation der Zellen. Sollte das Fusionsprotein nicht mehr gebildet oder verringert gebildet werden, müsste die Proliferation der Zellen abnehmen. Dafür wird wie in Abschnitt 2.2.7 beschrieben, ein Colony Formation Assay durchgeführt. Für den Assay werden fünf verschiedene Zelllinien ausgewählt. Dazu zählen die Ewing Sarkom Zelllinien A673, EW8, SKNM-C und TC-71, sowie die Synovialsarkom Zelllinie SYO.



**Abbildung 25: Effekt des IGF-1R Antikörpers GR11L-Protamin-siRNA Komplex Behandlung auf mRNA- und Proteinlevel, sowie Einfluss auf Zellproliferation in Ewing Sarkom Zelllinien**

**A** Um den Effekt der GR11L-P-EWS/FLi1-siRNA Behandlung auf die Proliferation der Ewing Sarkom Zelllinien A673, EW8,

### 3. Ergebnisse

SKNM-C und der Negativkontrolle SYO zu verdeutlichen, wurden die Zelllinien mit dem GR11L-P-siRNA-Komplex ( $\alpha$ IGF1-R-mAK GR11L) mit scrambled (contr-) oder EWS/FLi1-siRNA drei Stunden vorbehandelt, in Soft-Agar ausgesät und für sieben Tage bei 37°C inkubiert. Auf der y-Achse aufgetragen ist die Anzahl der Kolonien normalisiert auf die scrambled-siRNA-Kontrolle. Die A673 Zellen zeigen eine signifikante Reduktion der Koloniezahl der EWS/FLi1-siRNA behandelten Zellen auf unter 30 % im Vergleich zur scrambled Kontrolle. Bei den EW8 Zellen ist ebenfalls eine signifikante Reduktion auf unter 40 % zu erkennen. SKNM-C behandelte Zellen zeigen im biologischen Triplikate keinen Rückgang der Proliferation, TC-71 wiederum zeigen ähnlich wie die EW8 eine Reduktion auf unter 40 % verglichen mit der scrambled-Kontrolle. Die als Negativkontrolle eingesetzten SYO Zellen unterscheiden sich nicht im Wachstum. Signifikanz \*\*,  $P < 0,01$  **B** Hier wurden EW8 Ewing Sarkom Zellen über fünf Tage jeden Tag mit dem GR11L-P-siRNA Komplex mit scrambled- und EWS/FLi1-siRNA behandelt. Anschließend folgte die Analyse des mRNA-Levels mittels Real-Time-PCR. In dem dargestellten Diagramm ist auf der y-Achse der  $\Delta$ ct-Wert angegeben. Vergleicht man die Kontrollen PBS und GR11L-P-contr-esiRNA mit der EWS/FLi1-siRNA behandelten Probe, sieht man eine deutliche Reduktion der mRNA auf ca. 0,2. **C** Bei diesem Western Blot Ansatz wurden drei verschiedene EWS/FLi1-siRNAs auf ihre Wirkung hin getestet. Vergleicht man die Banden und die dazugehörigen Densitometrien ist zu erkennen, dass die dritte EWS/FLi1-siRNA zu einem Knockdown des EWS/FLi1 Fusionsproteins führt. Ins Verhältnis gesetzt zu der Aktin Bande, sinkt die Stärke der EWS/FLi1-3-siRNA-Bande auf ca. 20 %. (z.T. entnommen aus [2])

Die vier Ewing Zelllinien tragen alle die Translokation  $t(11,22)(q24,q12)$  mit dem Bruchpunkt 1, der in 85 % der Patienten auftritt. Die SYOs werden als Kontrollzelllinie eingesetzt. Diese Sarkom Zelllinie zeigt die gleiche Oberflächenrezeptorbeschaffenheit wie die Ewing Sarkom Zellen und ihre Überproliferation wird ebenfalls durch eine Translokation und das dadurch produzierte Fusionsprotein SSX/SS18 hervorgerufen. Sie dürften somit nicht auf die EWS/FLi1-siRNA reagieren, die siRNA sollte über den GR11L-Protamin-Komplex aber trotzdem die Zellen erreichen. In Abbildung 25 A sind die Diagramme zu den Colony Formation Assays der verschiedenen Zelllinien aufgeführt. Abgebildet werden Zellen, die mit den GR11L-Protamin-Komplexen mit der EWS/FLi1-siRNA und der scrambled-siRNA als Kontrolle behandelt wurden. Auf der y-Achse ist die Anzahl der Kolonien normalisiert auf die scrambled-siRNA-Kontrolle in Prozent aufgeführt. Das erste Balkendiagramm zeigt das Kolonienwachstum von A673 Zellen. Die scrambled siRNA Kontrolle ist als 100 % normalisiert. Im Vergleich dazu weisen die EWS/FLi1 behandelten Zellen im biologischen Triplikate ein Wachstum von nur 25 % auf. Das ist eine signifikante Reduktion um 75 %. Die EW8 Zellen zeigen ein ganz ähnliches Bild. Hier nimmt die Anzahl an gewachsenen Kolonien signifikant auf ca. 37 % ab, sobald die Zellen mit GR11L-P-EWS/FLi1-siRNA behandelt wurden. Die nächste Ewing Sarkom Zelllinie SKNM-C zeigt diesen Effekt nicht. Beide siRNA-Behandlungen stimmen in ihrem Koloniewachstum ungefähr überein und es ist kein signifikanter Unterschied zu erkennen. Bei der vierten Ewing Sarkom Zelllinie, den TC-71, ist der Rückgang des Koloniewachstums nach EWS/FLi1-siRNA Behandlung wieder zu erkennen. Hier sinkt die Prozentzahl an gewachsenen Kolonien auf unter 40 %. Bei der mitgeführten Kontrollzelllinie SYO liegen die scrambled-siRNA und die EWS/FLi1-siRNA behandelten Zellen bei exakt der gleichen Kolonienzahl. Hier hat die funktionelle siRNA somit eine Auswirkung auf die Proliferation der Zellen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass drei der vier Ewing Sarkomzelllinien nach der Behandlung mit der EWS/FLi1-siRNA eine deutlich geringeres klonales Wachstum aufweisen. Deutlich weniger als

### 3. Ergebnisse

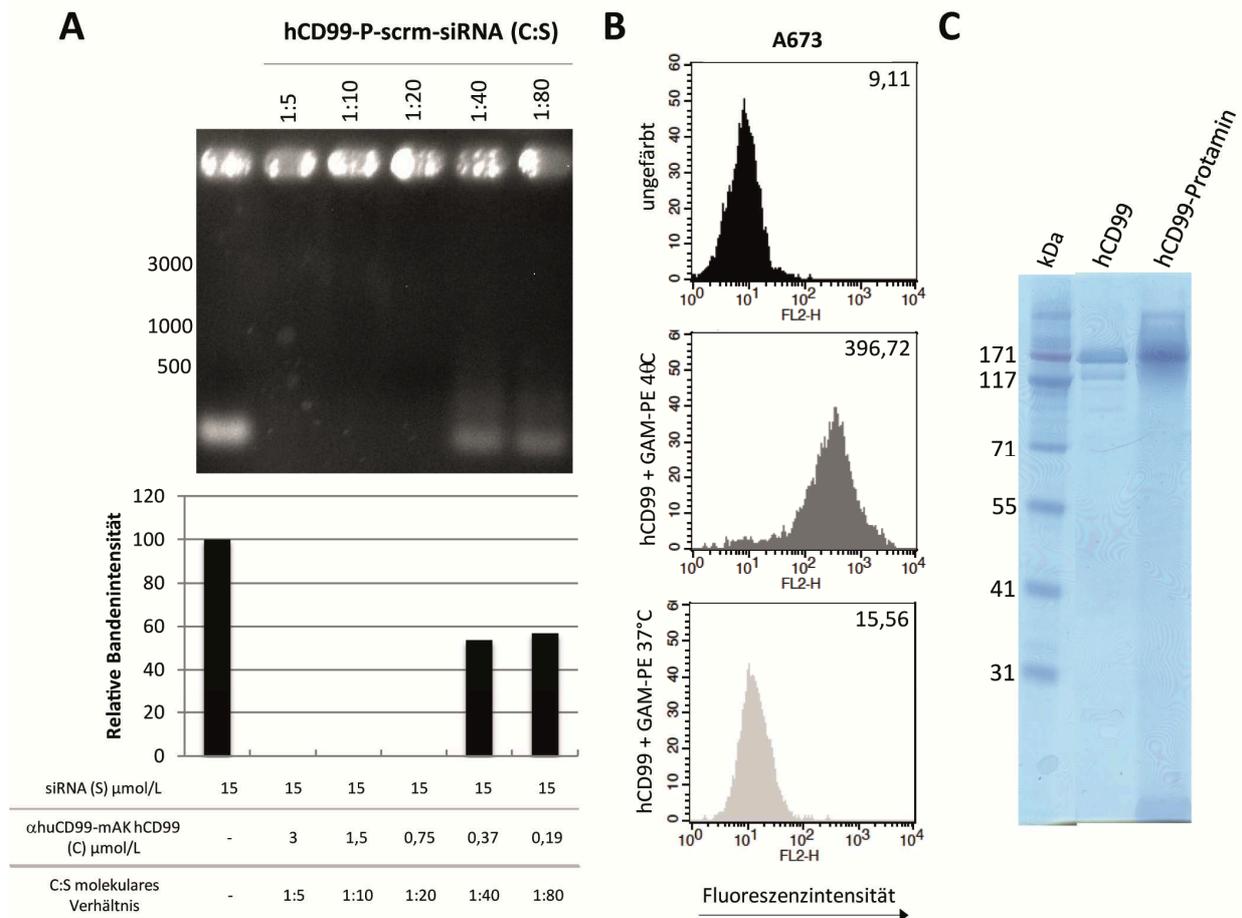
die Hälfte der Zellen wächst auf die Koloniegröße an, die bei der scrambled-Kontrolle erzielt wird. An dieser Stelle müssten, wie in Abschnitt 3.1.4 beschrieben, nun weitere *in vitro* Assays folgen, die Aussagen über das Apoptosestadium und die Stoffwechselaktivität der behandelten Zellen geben können. Hier wird die Limitierung des GR11L sehr deutlich. GR11L ist ein kommerziell erwerblicher Antikörper, der in geringen Mengen bereits hohe Kosten verursacht. Um Assays wie Annexin V, BrdU oder MTS durchführen zu können, werden große Mengen von diesem Antikörper, der in einer sehr geringen Konzentration geliefert wird, benötigt. Für diese Assays und für ein unausweichliches *in vivo* Experiment ist dieser Antikörper zu teuer und gerade für einen Mausversuch zu gering konzentriert, da hier die Applikationsvolumina begrenzt sind. Als Alternative zu diesem Antikörperansatz wird deshalb in dem nachfolgenden Abschnitt der CD99-Antikörper hCD99 und damit auch der CD99-Rezeptor als Alternative Eintrittspforte in Ewing Sarkom Zellen vorgestellt.

#### **3.2.2 Der CD99 Antikörper hCD99 als Transportmöglichkeit für siRNAs in Ewing Sarkom Zellen**

Im Folgenden wird die Etablierung des hCD99-Antikörpers als potentielles siRNA-Shuttle in Ewing Sarkom Zellen gezeigt.

##### **3.2.2.1 Der CD99-Antikörper hCD99 bindet siRNA und initiiert die Internalisierung des IGF-1-Rezeptors auf Ewing Sarkom Zellen**

Auch bei diesem Antikörper werden für die Etablierung zunächst die siRNA-Bindeeigenschaften und die Internalisierungsfähigkeit getestet. In Abbildung 26 A ist der dazugehörige Band-Shift Assay abgebildet. Bei dem hCD99-Protamin Antikörper ist ab einem molekularen Verhältnis von Antikörper zu siRNA von 1:40 freie siRNA in dem Agarosegel zu erkennen. Die siRNA-Bindekapazität liegt damit zwischen 20 und 40 siRNAs pro Antikörper. Der hCD99 könnte damit mehr siRNAs transportieren als der Cetuximab-Protamin aus Abschnitt 3.1 und der GR11L-Protamin aus Abschnitt 3.2.1. Für die Versuche mit hCD99-Protamin wird die siRNA wie beim GR11L auch im zehnfachen Überschuss eingesetzt. Dass der hCD99 Rezeptoren auch zur Internalisierung anregt, wird in Abbildung 26 B deutlich. Als Ewing Sarkom Zelllinie werden hier wieder die A673 Zellen verwendet. Ungefärbte A673 liegen mit ihrer Fluoreszenz und damit mit ihrer CD99-Rezeptordichte auf der Oberfläche bei 9,11. Die Positivkontrolle zeigt hier eine relative CD99-Dichte von 396,72. Dieser Wert liegt deutlich über der Fluoreszenzintensität von IGF-1-Rezeptoren auf der Oberfläche von A673 (siehe Abbildung 22). Die restlichen Rezeptoren, die nach der Inkubation bei 37°C noch von dem Sekundärantikörper erkannt werden, erreichen einen Wert von 15,56. Damit sind die meisten Rezeptoren durch die Behandlung mit hCD99 internalisiert.



**Abbildung 26: Internalisierungs- und siRNA-Bindeeigenschaften des CD99 Antikörpers hCD99 gekoppelt an Protamin über den chemischen Linker sulfo-SMCC**

**A** Der CD99 Antikörper hCD99 ( $\alpha\text{huCD99-mAK hCD99}$ ) gekoppelt an Protamin wird mit steigenden siRNA Konzentrationen inkubiert und anschließend auf ein Agarosegel aufgetragen. Die siRNA-Bindefähigkeit des hCD99-Protamin liegt zwischen 20 und 40 siRNAs. **B** Mit Hilfe eines Internalisierungs-FACS wird die durch hCD99-P induzierte CD99-Rezeptorinternalisierung auf der Ewing Sarkom Zelllinie A673 überprüft. In ungefärbter Form weisen A673 Zellen im FACS eine relative Fluoreszenzintensität von 9,11 auf. Die Positivkontrolle inkubiert mit hCD99-Protamin und einem Goat-Anti-Mouse-PE Sekundärantikörper, zeigt eine relative Rezeptorzahl auf der Zelloberfläche von 396,72. **C** Auf dem Coomassiegefärbten Gel sind der hCD99 in seiner ungekoppelten und in der Protamin-gekoppelten Form gegenübergestellt. Die Hauptbande des Antikörpers liegt bei 160 kDa. Bei der gekoppelten Form lässt sich die typische „Kopplungswolke“ bei 170 kDa erkennen. Am unteren Rand des Gels lässt sich in der gekoppelten Form restliches ungebundenes Protamin ausmachen.

In Abbildung 26 C ist der Antikörper noch einmal in seiner ungekoppelten Form und als hCD99-Protamin-Konjugat auf ein Gel aufgetragen und mit Coomassie angefärbt. Vergleicht man beide Formen ist die ungekoppelte Form wie der GR11L bei einer Größe von ca. 160 kDa zu erkennen. Die gekoppelte Form liegt etwas darüber und zeigt ebenfalls die typische „Kopplungswolke“ als Resultat einer diffusen Verteilung von Protaminmolekülen auf dem Antikörper. Nicht abgetrenntes Protamin ist auch bei diesem Coomassiegefärbten Gel unten rechts am Rand zu erkennen. Abschließend lässt sich zu der gesamten Abbildung 26 sagen, dass der hCD99 in seiner Protamin-gekoppelten Form zwischen 20 und 40 siRNAs transportieren kann und die Internalisierung des CD99-Rezeptors auslöst. Im nächsten

### 3. Ergebnisse

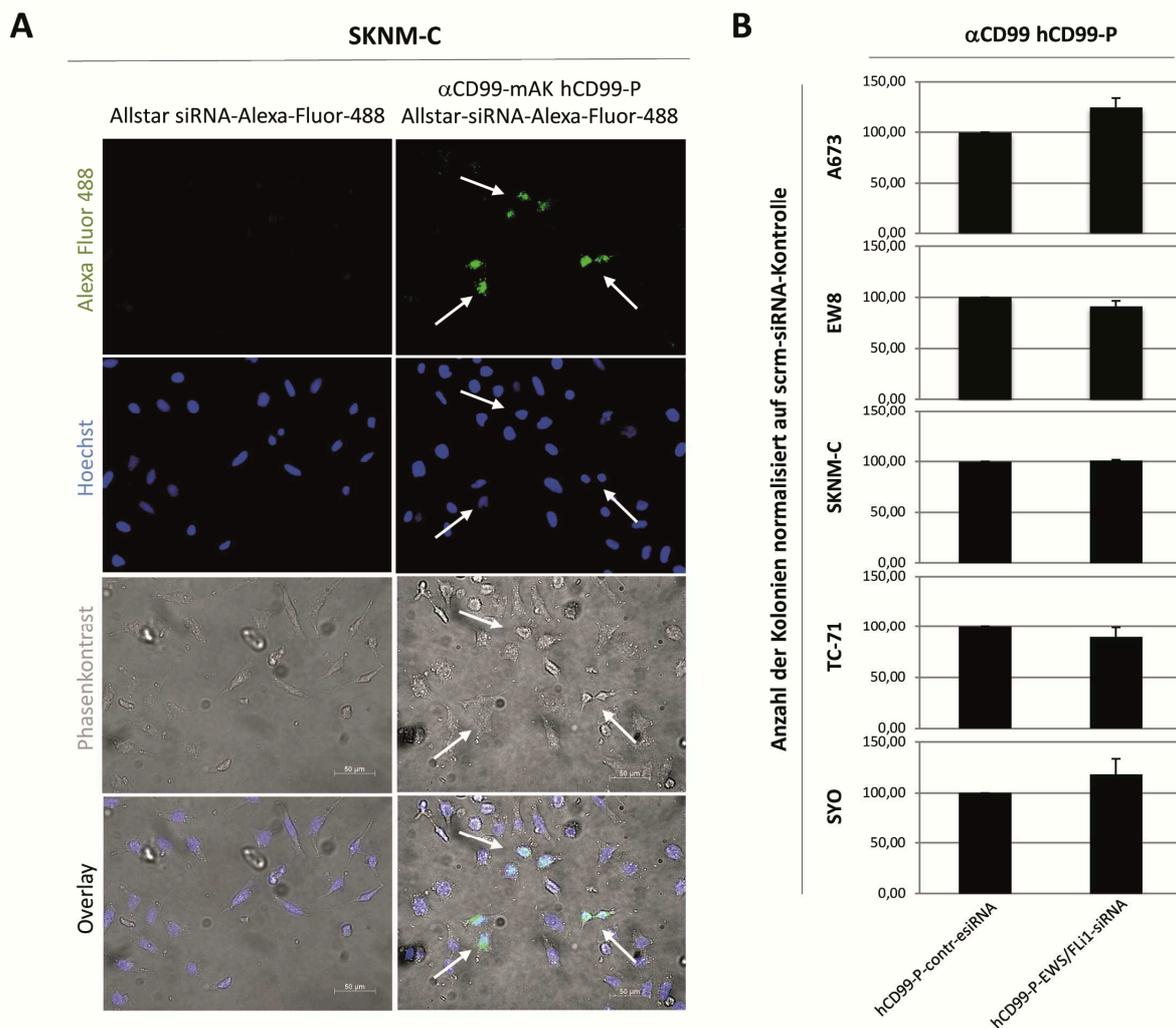
Abschnitt wird die grün fluoreszierende siRNA wieder eingesetzt um die Lokalisation der siRNA in der Zelle sichtbar zu machen.

#### **3.2.2.2 hCD99-Protamin transportiert fluoreszierende siRNA in Ewing Sarkom Zellen, hCD99-Protamin-EWS/FLI1-siRNA führt aber zu keiner Proliferationsreduktion**

Die visuelle Überprüfung der Internalisierung wird auch für den hCD99 Antikörper durchgeführt. In diesem Fall wurden SKNM-C mit der Allstar-siRNA-Alexa-Fluor-488 allein inkubiert und mit hCD99-Protamin-Alexa488-siRNA. Die siRNA wird in einem molekularen Verhältnis von Antikörper zu siRNA von 1:10 eingesetzt. Die erste Zeile in Abbildung 27 A zeigt die Fluoreszenzaufnahmen ca. 24 Stunden nach Beginn der Behandlung. Ohne Antikörper ist links keine Fluoreszenz zu erkennen. In der rechten Spalte bei den Zellen, die den Antikörper hCD99 plus die fluoreszente siRNA bekommen haben, sind die bereits bekannten grünen Vesikel in den Zellen zu erkennen. Die Vesikel erscheinen etwas größer als bei den Cetuximab- und GR11L- Behandlungen. In den Overlays in der letzten Zeile ist zu erkennen, dass die Vesikel sich in den Zellen befinden. Die Internalisierung der fluoreszierenden siRNA in die Zellen war damit erfolgreich.

Direkt im Anschluss an diesen Internalisierungsversuch werden die Zellen, wie bei dem vorangegangenen Antikörper GR11L, mit dem Antikörper hCD99 und funktioneller siRNA im Colony Formation Assay behandelt um den Einfluss der siRNA auf die Proliferation in Form des klonalen Wachstums zu überprüfen. Die Vorbehandlung der Zellen findet mit hCD99-P-EWS/FLI1-siRNA und als Kontrolle mit hCD99-P-scrn-siRNA für eine Stunde bei 37°C statt, anschließend werden die Zellen in Soft-Agar ausgesät und für ca. eine Woche bei 37°C wachsen gelassen. Verwendet werden hier wieder fünf verschiedene Sarkomzelllinien, die Ewing Sarkom Linien A673, EW8, TC-71 und SKNM-C, sowie die Synovial Sarkom Zelllinie SYO als Negativkontrolle. In Abbildung 27 B sind die Ergebnisse zu den Colony Formation Assay aufgetragen. Die y-Achse zeigt die Anzahl der Kolonien normalisiert auf die scrambled-siRNA-Kontrolle in Prozent. Vergleich man die Balken aller fünf Zelllinien ist zu erkennen, dass alle Balken bei ungefähr 100 Prozent liegen. Für jede Zelllinie ist ein biologisches Triplikate aufgetragen, doch keine Zelllinie scheint auf die Behandlung mit der funktionellen EWS/FLI1-siRNA zu reagieren.

Da nach hCD99-P-EWS/FLI1-siRNA Behandlung keine signifikante Reduktion im Koloniewachstum zu erkennen, die Internalisierung mit fluoreszenter siRNA allerdings nachweisbar ist, lässt sich vermuten, dass mit dem hCD99 Antikörper die siRNA in die Zelle gelangt, es aber nicht zu einem Entlassen der siRNA aus den Endosomen kommt. Sollte das der Fall sein, müsste der *Endosomal Escape* der siRNAs unterstützt werden, z.B. durch eine zusätzliche Behandlung mit Chloroquin.



**Abbildung 27: Internalisierung grün fluoreszierender siRNA durch den CD99 Antikörper hCD99 gekoppelt an (αCD99 hCD99-P oder αCD99-mAK hCD99-P) und der Effekt auf die Zellproliferation von Sarkomzelllinien nach hCD99-Protamin-EWS/FLI1-siRNA Behandlung**

**A** Die Bilder zeigen in der linken Spalte SKNM-C Zellen behandelt mit Alexa488-siRNA, in der rechten Spalte sind die SKNM-C behandelt mit dem hCD99-P-Alexa488-siRNA Komplex. In der ersten Zeile ist zu erkennen, dass die Zellen, die mit dem Antikörper und der siRNA behandelt wurden, siRNA enthaltende Vesikel zeigen. Zellen, die nur mit der Alexa488-siRNA in Kontakt gekommen sind, zeigen diese vesikulären Strukturen nicht. **B** Um die biologische Wirkung nach Internalisierung der siRNA zusammen mit dem hCD99-Protamin weiter zu überprüfen, werden fünf verschiedene Sarkomzelllinien mit dem hCD99-Protamin-siRNA Komplex in Form eines Colony Formation Assays behandelt. Auf der Y-Achse ist die Anzahl der Kolonien normalisiert auf die scrambled-siRNA Kontrolle (im Bild: scrambled=contr) angegeben. In den dargestellten Diagrammen ist zu erkennen, dass es keine signifikante Reduktion der Koloniezahl im Vergleich zu der Koloniezahl der Proben mit scrambled-siRNA Behandlung gibt.

### 3.2.2.3 Der Einsatz von Chloroquin führt zur Freisetzung der siRNA in den cytoplasmatischen Raum

Um das Entlassen der internalisierten siRNA ins Cytoplasma der Zellen zu erzwingen wird ein Medikament verwendet, dass sonst aus der Malariatherapie bekannt ist: Chloroquin. Chloroquin ist dafür bekannt, dass es Vesikelmembranen, insbesondere die von Endosomen, durchlässig werden lässt. Zur ersten Überprüfung ob die Vesikel mit Chloroquin wirklich zum Platzen gebracht werden

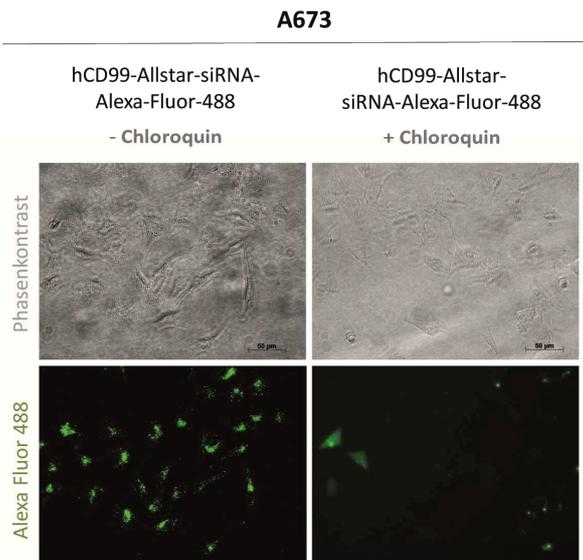
### 3. Ergebnisse

können, wird die Internalisierung von fluoreszierender siRNA wiederholt. In Abbildung 28 A ist in der linken Spalte die Alexa488-siRNA-Internalisierung mit hCD99-Protamin in A673 Zellen ohne Chloroquin gezeigt. In der rechten Spalte wurden die Zellen mit Chloroquin behandelt. Vergleicht man die beiden Fluoreszenzaufnahmen miteinander sind in dem Bild unten links wieder die typischen grünen Vesikel in den Zellen zu erkennen. In dem Bild unten rechts lösen sich diese Vesikel auf und die grüne siRNA verteilt sich über die gesamte Zelle. Dabei ist die Form der Zelle sehr gut zu erkennen. Chloroquin unterstützt somit die Freisetzung der fluoreszenten siRNA.

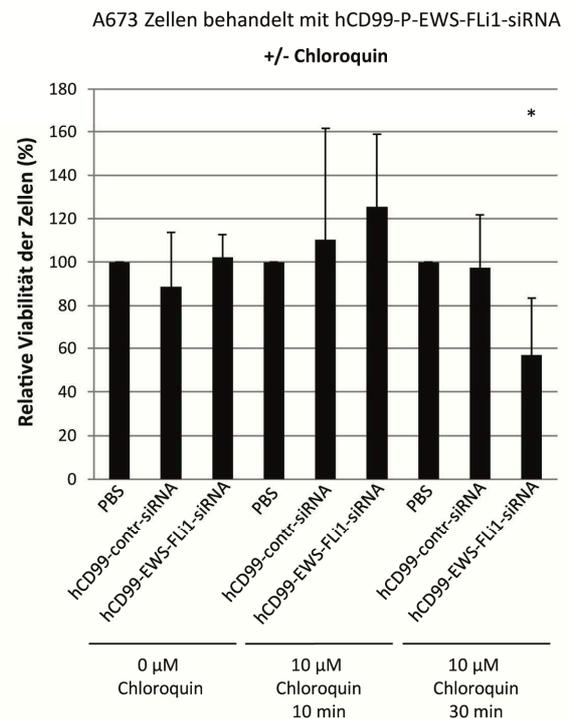
In hohen Dosen und bei langer Behandlung ist Chloroquin toxisch für die Zellen. Deswegen wird Chloroquin in einer geringen Konzentration von 10  $\mu$ M eingesetzt. Um die genaue Behandlungsdauer herauszufinden wird ein MTS-Assay durchgeführt. Der MTS-Assay wurde bereits in Abschnitt 3.1.4 verwendet und lässt Aussagen über die Stoffwechselaktivität und damit über Viabilität und Proliferation zu. In diesem Fall werden Zellen der Ewing Sarkom Zelllinie A673 im technischen und biologischen Triplikate mit den drei Behandlungsansätzen PBS, hCD99-Protamin-scram-siRNA und hCD99-Protamin-EWS/FLi1-siRNA über vier Tage behandelt. Eine dieser Dreierbehandlungsgruppen wird ohne Chloroquin eingesetzt, eine zweite Dreiergruppe bekommt 10  $\mu$ M Chloroquin für 10 Minuten und die dritte Gruppe wird für 30 Minuten mit 10  $\mu$ M Chloroquin behandelt. In Abbildung 28 B ist das Ergebnis des MTS-Assays aufgetragen. Die y-Achse zeigt die relative Viabilität der Zellen in Prozent. Die Behandlungen sind jeweils auf die mitgeführten PBS-Kontrollen normalisiert. Die Zellen, die nicht mit Chloroquin behandelt wurden, zeigen alle etwa 100% Vitalität oder auch Stoffwechselaktivität. Auch die Zellen, die für 10 Minuten mit 10  $\mu$ M Chloroquin behandelt wurden zeigen keine Reduktion in der Vitalität der Zellen. Die Zellen, die mit der EWS/FLi1-siRNA behandelt wurden, zeigen sogar einen Anstieg auf 120 % proliferierender Zellen. Erst bei einer Behandlung von mindestens 30 Minuten mit Chloroquin zeigt sich eine signifikante Abnahme in der Stoffwechselaktivität von EWS/FLi1-siRNA behandelten Zellen auf unter 60 %. Die mitgeführten Kontrollen PBS und hCD99-P-scram-siRNA liegen hier beide bei 100 %. Anhand dieses Ergebnisses werden die folgenden *in vitro* Versuche mit und ohne Chloroquinbehandlung im Vergleich und mit 10  $\mu$ M Chloroquin für 30 Minuten durchgeführt. Den Anfang machen erneute Colony Formation Assays der Sarkomzelllinien mit der Unterstützung von Chloroquin.

### 3. Ergebnisse

**A**



**B**



**Abbildung 28: Chloroquinbehandlung der Zellen unterstützt das Entkommen der siRNA aus dem Endosom.**

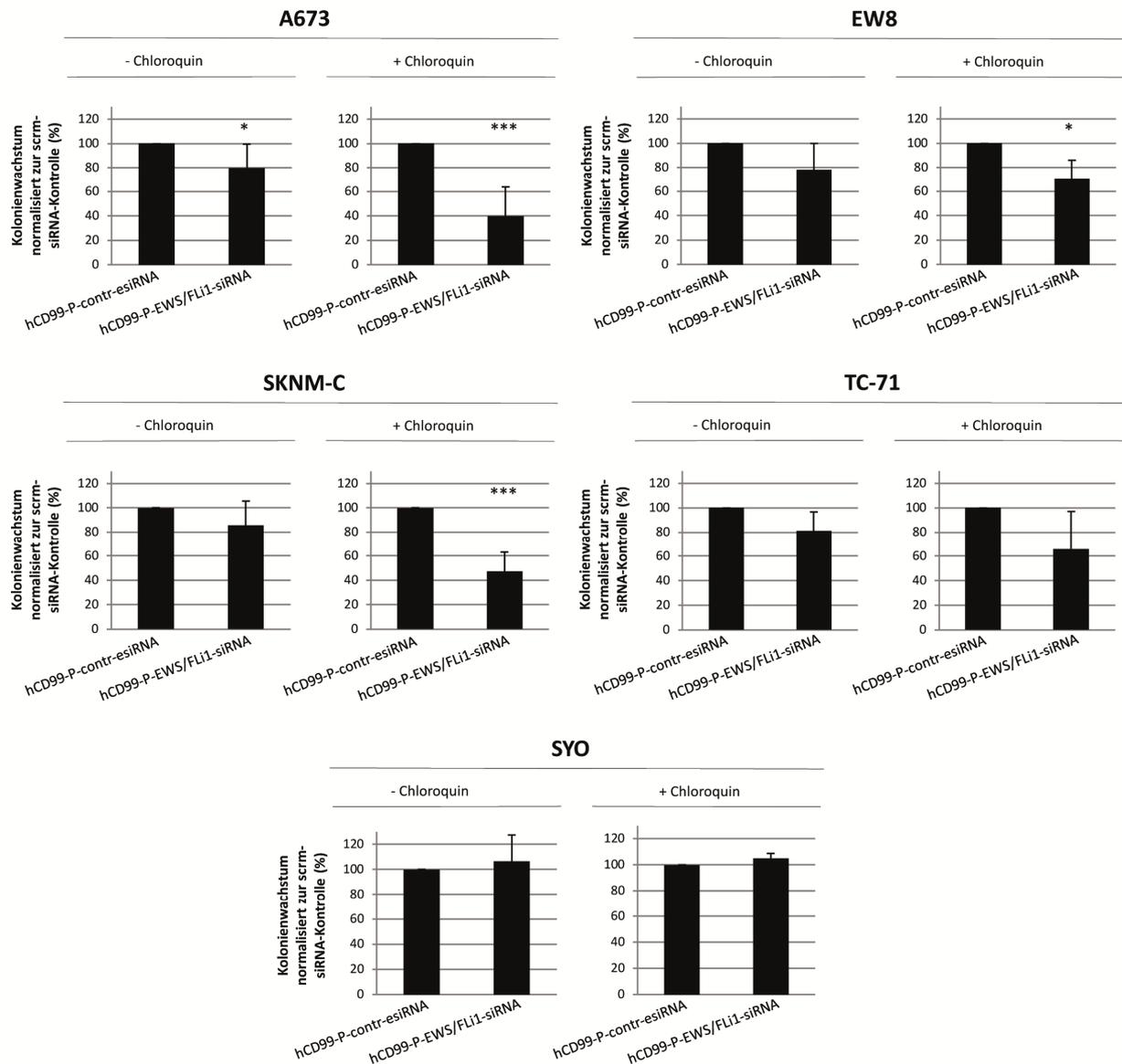
**A** In der dargestellten Abbildung wurden A673 Ewing Sarkom Zellen mit hCD99-Protamin-Alexa488-siRNA behandelt. In der ersten Spalte sind in der Alexa Fluor488 Darstellung erneut die grünen Vesikel, die die grün fluoreszierende siRNA enthalten, zu sehen. In der rechten Spalte wurden diese Zellen für 30 min mit 10 µM Chloroquin behandelt. Die vesikulären Strukturen haben sich im rechten Bild aufgelöst und die grüne Fluoreszenz füllt die ganze Zelle aus. **B** Zur Bestimmung der Behandlungsdauer wurde ein MTS-Assay durchgeführt. Vergleicht man die verschiedenen Bedingungen im dargestellten Diagramm, so zeigt sich kein Effekt auf die Viabilität der Zellen in den ersten acht Bedingungen. Die Viabilität sinkt signifikant auf unter 60 % bei einer Chloroquinbehandlung von 30 min und vorangegangener hCD99-P-EWS/FLi1-siRNA Behandlung. Signifikanz \*,  $P < 0,05$

#### 3.2.2.4 Ewing Sarkom Zelllinien zeigen einen Proliferationsrückgang nach hCD99-P-EWS/FLi1- und anschließender Chloroquinbehandlung

In diesem Abschnitt wird nun der Einfluss der hCD99-Protamin-EWS/FLi1-siRNA Komplexe auf die Proliferation in Form des klonalen Wachstums der Ewing Sarkom Zelllinien erneut unter Einsatz von Chloroquin als *Endosomal Escape* Hilfe analysiert. Der dafür vorgesehene Assay ist wieder der *Colony Formation Assay*. Die Assays verlaufen im technischen und biologischen Triplikate. Die verschiedenen Ewing Sarkom Zelllinien wurden jeweils im doppelten Ansatz mit hCD99-P-siRNA als Kontrolle und mit dem funktionellen hCD99-P-EWS/FLi1 Komplex vorbehandelt. Nach dreistündiger Vorbehandlung bei 37 °C wurde jeweils einer der doppelten Ansätze mit 10 µM Chloroquin versetzt und für weitere 30 Minuten bei 37 °C behandelt. Nach dieser Inkubationszeit werden alle Proben einmal abzentrifugiert um das Chloroquin auszuwaschen und die Zellen in frischem Medium aufgenommen. Mit der Negativkontrolle ohne Chloroquin wird ebenso verfahren. Anschließend

### 3. Ergebnisse

werden die Zellen in Soft-Agar ausgesät und für weitere sieben Tage bei 37 °C inkubiert. Es folgt die Färbung und Zählung der entstandenen Kolonien.



**Abbildung 29: Effekt von hCD99-P-EWS/FLI1-siRNA-Behandlung auf die Proliferation von Ewing Sarkom Zelllinien mit Chloroquin als Endosomal Escape-Unterstützung.**

Die dargestellten Diagramme zeigen den Effekt von hCD99-Protamin-EWS/FLI1-siRNA Behandlung mit und ohne Chloroquinunterstützung auf das klonale Wachstum fünf verschiedener Sarkomzelllinien. Auf der y-Achse ist bei allen gezeigten Diagrammen die Koloniezahl normalisiert auf die scrambled-siRNA (im Bild: scrambled=contr) Kontrolle aufgetragen. Die A673 zeigen eine signifikante Reduktion der Koloniezahl um etwa 20 % bei EWS/FLI1-siRNA behandelten Zellen ohne den Einsatz von Chloroquin. Mit der Verwendung von Chloroquin kann diese Reduktion sinkt das Koloniewachstum signifikant auf unter 50%. Die zweite Ewing Sarkom Zelllinie EW8 zeigt ohne Chloroquin keinen signifikanten Rückgang in der Proliferation. Durch Chloroquin wächst eine signifikant kleinere Menge an Kolonien durch die hCD99-Protamin-EWS/FLI1-siRNA Behandlung. Die Proliferation liegt hier bei ca. 70 %. Bei den SKNM-C ohne Chloroquin ist keine signifikante Abnahme im Koloniewachstum zu entdecken. Bei SKNM-C Zellen, die mit Chloroquin behandelt wurden, dezimiert sich das prozentuale Koloniewachstum signifikant auf unter 50 %. Bei der vierten Ewing Sarkom Zelllinie TC-71 ist das Koloniewachstum mit und ohne Chloroquinbehandlung nicht signifikant vermindert. Die Synovialsarkom

### 3. Ergebnisse

Kontrollzelllinie SYO zeigt keinerlei Unterschied im Koloniewachstum zwischen den unterschiedlich behandelten Ansätzen. Signifikanz: \*,  $P < 0,05$ ; \*\*\*,  $P < 0,001$

Im vorangegangenen Abschnitt wurden bereits Colony Formation Assays ohne Chloroquin gezeigt, diese Assays wurden für diese Versuchsreihe wiederholt, damit alle Zellen mit der gleichen Charge an gekoppeltem Antikörper behandelt werden. In manchen Fällen können sich die gekoppelten Antikörper leicht in ihrer siRNA-Bindekapazität unterscheiden. Um diese Fehlerquelle auszuschließen wurden diese Assays wiederholt um den Effekt nur auf Chloroquin als Unterschied zu fokussieren. In allen in Abbildung 29 dargestellten Diagrammen ist wieder die Anzahl der gebildeten Kolonien bezogen auf die scrambled-siRNA-Kontrolle als Balken in Prozent dargestellt. Beginnend mit den A673 lässt sich bei den Colony Formation Assays ohne Chloroquin eine signifikante Reduktion im Koloniewachstum bei den EWS/FLi1-siRNA behandelten Zellen erkennen. Im Vergleich zur scrambled-siRNA-Kontrolle sinkt die Koloniezahl um 20 % auf 80 %. Somit ist ein kleiner Effekt auf die Proliferation zu erkennen. Geht man jedoch ein Diagramm weiter und schaut sich im Vergleich die gleichen Colony Formation Assays mit Chloroquinzusatz an, erhöht sich diese Abnahme des Koloniewachstums um das Dreifache. Durch die zusätzliche Behandlung mit Chloroquin sinkt die Koloniezahl auf 40 % im Vergleich zur Kontrolle. Auch bei den EW8 ist der Rückgang der Koloniebildung erst mit der Chloroquinzugabe signifikant. Ohne Chloroquin sinkt durch die EWS/FLi1-siRNA Behandlung allein die Zahl der Kolonien um 20 %. Dieser Wert ist allerdings nicht signifikant. Mit Chloroquin gibt es eine signifikante Reduktion auf ca. 70 % im Vergleich zur scrambled-Kontrolle. Die nächste Zelllinie sind die SKNM-C. Hier ergibt sich das gleiche Bild. Ohne Chloroquinzusatz ist kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden siRNA-Behandlungsansätzen zu entdecken. Erst mit der Chloroquinzusatzbehandlung büßen die Zellen die Hälfte der Kolonien ein und die Koloniezahl bei den hCD99-P-EWS/FLi1-siRNA behandelten Zellen sinkt auf unter 50 %. Die TC-71 sind die vierte Ewing Sarkom Zelllinie in der Abbildung 29. Sowohl mit, als auch ohne Chloroquinbehandlung ist durch die EWS/FLi1-siRNA Behandlung keine signifikante Reduktion des Wachstums festzustellen. Dennoch sind es ohne Chloroquinbehandlung 20 % weniger Kolonien im Vergleich zur Kontrolle und mit Chloroquin sogar fast 40 % weniger. Obwohl die Werte nicht signifikant sind, ist trotzdem eine stärkere Kolonieabnahme bei der Gruppe mit extra Chloroquin zu verzeichnen. Als letztes sind noch die Synovialsarkom Zellen der SYO Zelllinie zu betrachten. Diese Kontrollzelllinie mit ihrer abweichenden Translokation reagiert auf keinen der Behandlungsansätze, weder auf die siRNA, noch auf die Chloroquinbehandlung. In allen vier verschiedenen Zellen liegt die relative Koloniezahl bei etwa 100 %.

Abschließend lässt sich zu diesem Experiment sagen, dass durch die zusätzliche Vorbehandlung mit Chloroquin in einem nicht-toxischen Dosisbereich die Reduktion des Koloniewachstums durch die siRNA Behandlung deutlich gesteigert werden kann. Bei den A673 ist die Abnahme an Kolonien dreimal so hoch wie bei der Kontrolle ohne Chloroquin. Um dieses Ergebnis zu unterstützen wurde

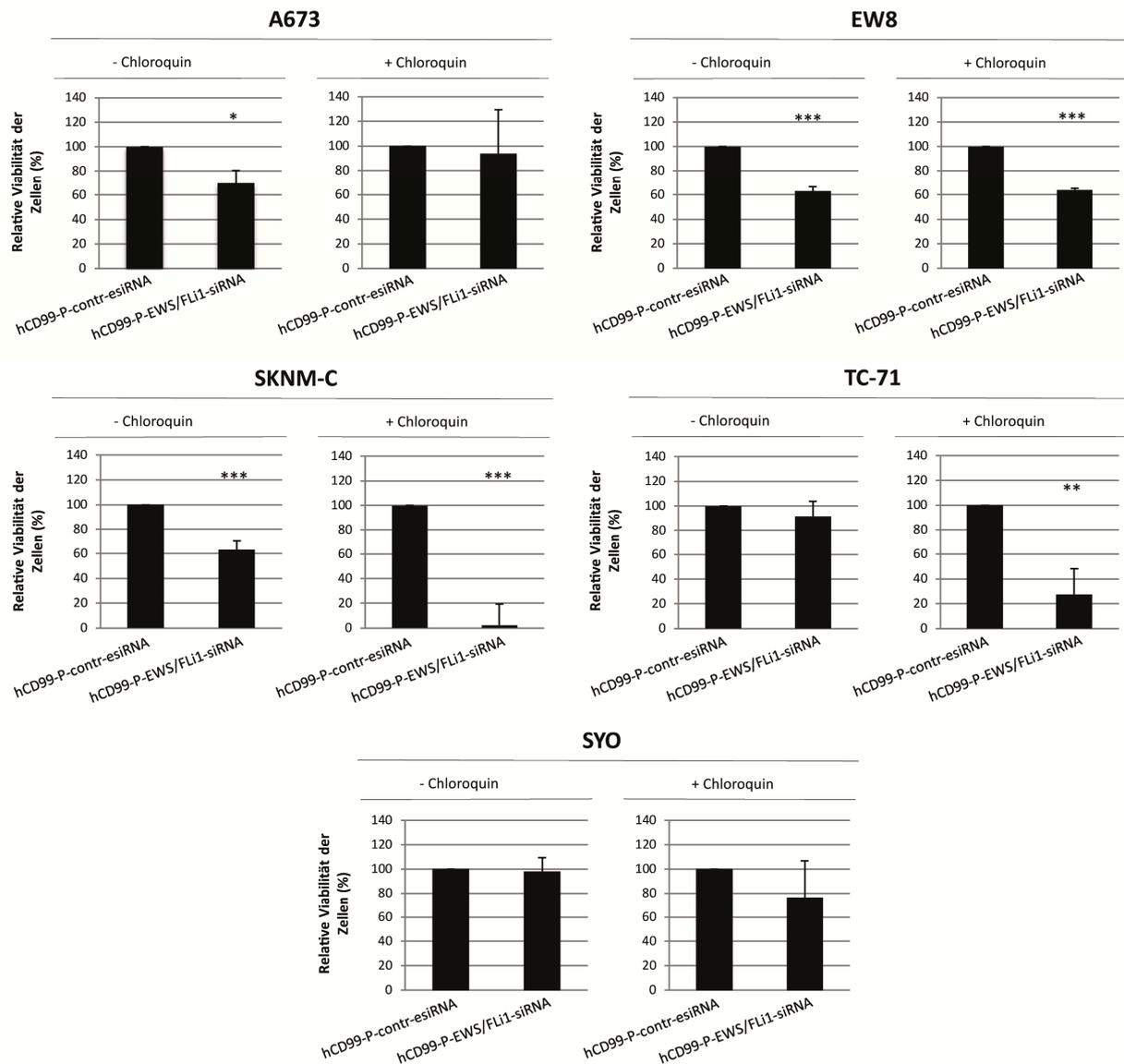
### 3. Ergebnisse

noch ein Blick auf den Stoffwechsel der Zellen nach EWS/FLi1-siRNA und Chloroquinbehandlung geworfen.

#### **3.2.2.5 Effekt der hCD99-Protamin-EWS/FLi1-siRNA Behandlung auf Ewing Sarkom Zelllinien mit und ohne Chloroquinbehandlung im MTS-Assay**

Für die Überprüfung wie die Zellen in ihrem Stoffwechsel auf die Behandlung mit hCD99-Protamin-EWS/FLi1-siRNA reagieren kommt wieder der MTS-Assay zum Einsatz. Die Bedingungen stimmen mit denen aus Abschnitt 3.1.4 überein. Die vier Ewing Zelllinien und die eine Synovialsarkom Zelllinie werden mit dem hCD99-siRNA Komplex mit scrambled oder EWS/FLi1-siRNA behandelt und dazu zusätzlich einmal mit und ein Ansatz ohne Chloroquin. Die Behandlung findet an vier aufeinanderfolgenden Tagen statt und am letzten Tag erfolgt die halbstündige Inkubation mit der MTS-Lösung. Der Farbumschlag wird photometrisch bestimmt. In Abbildung 30 sind als erstes wieder die A673 aufgetragen. Die y-Achse der Diagramme stellt die relative Zellviabilität bezogen auf die scrambled-siRNA-Kontrolle in Prozent dar. Berechnet wurde sie aus der gemessenen Absorption. Bei den A673 liegt die Zellviabilität ohne Zusatz von Chloroquin bei ca. 70 % bei den EWS/FLi1-siRNA Zellen, verglichen mit der scrambled-Kontrolle. Dieser Rückgang ist signifikant. Bei dem Ansatz mit Chloroquinzugabe steigt die Stoffwechselaktivität auf fast 100 % an. In diesem Fall hat die zusätzliche Chloroquinbehandlung nach drei unabhängigen Experimenten keinen signifikanten Nutzen. Bei den EW8 Zellen ist der Effekt der EWS/FLi1-siRNA bei den Ansätzen mit und ohne Chloroquin gleich. In beiden Fällen sinkt nach Behandlung mit der funktionellen siRNA die relative Vitalität der Zellen auf ca. 60 %. Diese Reduktion ist beide Male signifikant. Auch hier ergibt sich kein zusätzlicher Nutzen durch das eingesetzte Chloroquin. Das ändert sich bei der dritten Ewing Sarkom Zelllinie SKNM-C. Bereits ohne den Zusatz der Chloroquinbehandlung sinkt die Vitalität der Zellen auf fast 60 % allein durch die Inkubation mit hCD99-P-EWS/FLi1-siRNA.

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 30: Effekt von hCD99-Protamin-EWS/FLI1-siRNA Behandlung auf die relative Viabilität (MTS-Assay) von fünf verschiedenen Sarkomzelllinien mit Chloroquin als Endosomal Escape-Unterstützung**

Auf der y-Achse ist in allen angezeigten Diagrammen die relative Viabilität in % angegeben. Die erste Ewing Sarkom Zelllinie A673 zeigt in diesem Fall in der Behandlung mit hCD99-P-EWS/FLI1-siRNA ohne Chloroquinzusatz eine leichte signifikante Abnahme der Vitalität um 25 %. Bei der zusätzlichen Behandlung mit Chloroquin ist keine Reduktion in der relativen Viabilität zu erkennen. Bei der EW8 Ewing Sarkom Zelllinie zeigen die Zellen mit und ohne Chloroquinbehandlung eine signifikante Verminderung der Vitalität auf 60% bei EWS/FLI1-siRNA Behandlung. Bei den SKNM-C ist ohne Chloroquinzusatz bereits eine signifikante Reduktion des Stoffwechsels auf 60 % zu erkennen. Mit Hilfe von Chloroquin wird die Vitalität auf nahezu 0% reduziert. Die vierte Ewing Sarkom Zelllinie TC-71 zeigt bei hCD99-P-EWS/FLI1-siRNA behandelten Zellen ohne zusätzliche Chloroquinbehandlung keine Abnahme in der Vitalität der Zellen. Durch den Zusatz von Chloroquin reduziert sich die Viabilität der Zellen im Vergleich zur scrambled (im Bild: scrambled=contr) Kontrolle signifikant auf unter 30 %. Die Kontrollzelllinie SYO zeigt mit und ohne Chloroquin keinen signifikanten Rückgang in der Zellviabilität nach scrambled-siRNA und EWS/FLI1-siRNA Behandlung. Signifikanz: \*,  $P < 0,05$ ; \*\*,  $P < 0,01$ ; \*\*\*,  $P < 0,001$

### 3. Ergebnisse

Kommt eine Chloroquinbehandlung dazu, ist keine signifikante Stoffwechselaktivität mehr in den Zellen zu messen. Eine deutliche Abnahme der Vitalität ist auch bei den TC-71 zu erkennen. Ohne Chloroquin gleichen die EWS/FLI1-siRNA behandelten Zellen mit etwa 95 % Vitalität fast der scrambled-siRNA-Kontrolle. Mit Chloroquin sinkt dieser Ansatz signifikant auf unter 30 %. Bei diesen Zellen und bei den SKNM-C scheint Chloroquin bei dem Entlassen der siRNA ins Cytoplasma eine große Rolle zu spielen. Die letzte Zelllinie sind wieder die SYO. Bei diesen Kontrollzellen ist ohne den Einsatz von Chloroquin kein Unterschied zwischen den siRNA-Behandlungsansätzen zu erkennen. Mit Chloroquin sinkt die Stoffwechselaktivität der EWS/FLI1 behandelten Zellen auf knapp unter 80 %. Dieser Rückgang ist allerdings nicht signifikant.

Fasst man die Ergebnisse zur Stoffwechselaktivität zusammen, so ist der Nutzen der zusätzlichen Behandlung der Zellen mit Chloroquin nicht bei allen vier Ewing Sarkom Zelllinien gleich ausgeprägt. Bei zwei der vier Zelllinien scheint Chloroquin eine große Hilfe beim *Endosomal Escape* zu sein. Für die A673 und die EW8 ist kein Vorteil durch die Chloroquinbehandlung, was die Stoffwechselaktivität und damit auch die Proliferation der Zellen betrifft, zu erkennen. Der Ansatz den CD99-Rezeptor als Eintrittspforte für die siRNAs zu verwenden, weist somit einige Unsicherheiten auf. Aus diesem Grund wird im nächsten Abschnitt ein dritter Antikörper als Transportmöglichkeit für siRNAs in Ewing Sarkom Zellen in Betracht gezogen.

#### **3.2.3 Der selbstproduzierte IGF-1R Antikörper A12 V1 als Transportmöglichkeit für siRNAs in Ewing Sarkom Zellen**

Bei der Etablierung eines geeigneten Transportantikörpers für siRNAs in Ewing Sarkom Zellen sind einige ungeahnte Hindernisse aufgetreten. Der IGF-1R Antikörper GR11L schien gut zu funktionieren, war durch seinen Preis und seine geringe Konzentration, in der er geliefert wurde, allerdings stark limitiert verfügbar. Der zweite Ansatz, einen anderen Rezeptor als Eintrittspforte zu verwenden, zeigt ebenfalls seine Unsicherheiten. Der CD99 Antikörper hCD99 gelangt mit der siRNA zusammen in die Zellen, die siRNA entkommt dann aber aus einem unbekanntem Grund nicht aus den Aufnahmevesikeln ins Cytoplasma an ihren Wirkort für die RNAi. Dieses Problem kann durch den Einsatz von einer zusätzlichen Behandlung mit Chloroquin umgangen werden, die Chloroquinbehandlung selbst schafft allerdings ein neues Problem. Wenn dieser Therapieansatz *in vivo* in CD1 Nacktmäusen getestet werden soll, muss durch den Zusatz an Chloroquin die Anzahl der zu testenden Gruppen verdoppelt werden, damit es zu jedem Antikörper-siRNA-Behandlungsansatz eine Testgruppe mit und ohne Chloroquin gibt und um zusätzliche Wirkungen des Chloroquins zu erkennen und nicht fehlerhaft mit der Wirkung der siRNA-Therapie in Verbindung zu bringen. Hinzukommt, dass auch dieser Antikörper zwar kommerziell erwerblich, aber ebenfalls teuer und für

### 3. Ergebnisse

*in vivo* Versuche somit indiskutabel ist. Und ein weiterer Punkt, der gegen den GR11L und den hCD99 spricht ist, dass beide Antikörper murine Antikörper sind. Dieser Fakt könnte zu ungewollten Nebenwirkungen in Patienten führen, wenn dieser Therapieansatz erste Einsätze im Menschen finden sollte. Das Immunsystem könnte auf den Mausantikörper im Körper reagieren und somit könnte es sein, dass sich die Wirkung der siRNA nicht entfalten kann.

Es muss also noch eine weitere Alternative gefunden werden. Das führt zu dem dritten Ansatz in der Etablierung des Antikörper-siRNA-Therapiesystems in Ewing Sarkom Zellen. Der dritte Antikörper, der in dieser Arbeit vorgestellt wird, ist ein selbstkonzipierter und -produzierter humaner IgG, gerichtet gegen den IGF-1-Rezeptor. Er leitet sich von dem IMCA12 Klon der ehemaligen Firma Imclone (jetzt Lilly) ab und wird von unserer Arbeitsgruppe mit A12 V1 betitelt. Da mit dem GR11L die vielversprechenderen Ergebnisse erzielt werden konnten, entschlossen wir uns diesen Rezeptor wieder als Eingang in die Zellen zu nutzen. Dadurch fällt der zusätzliche Einsatz von Chloroquin weg. Der A12 V1 besitzt ein anderes Epitop als der GR11L. Im folgenden Abschnitt wird die Produktion und der Einsatz als siRNA-Shuttle in Ewing Sarkom Zellen erklärt.

#### **3.2.3.1 Selektion und Eigenproduktion des IGF-1R Antikörpers A12 V1 E7**

Der A12 V1 hat seinen Namen von seinem Ursprungsklon dem IMCA12, daher A12 und V1 für Version eins. Diese Version ist allerdings nicht die erste Version des Antikörpers die getestet wurde. Insgesamt wurden sieben verschiedene Plasmide kloniert, bis mit der Version eins von G2A Peptid getrennten Antikörpersequenzen ein Konstrukt kreiert wurde, das einen vollständigen und funktionsfähigen humanen full IgG hervorgebracht hat (Vor-Ergebnisse der IgG-Produktionsklon-Entwicklung nicht gezeigt). In Abbildung 31 A ist dieses Konstrukt dargestellt. Ein CMV-Promotor leitet das Ablesen der Antikörpersequenz ein. Es folgt eine Kozak-Sequenz, die für die Initiation wichtig ist und eine erprobtes Sekretionspeptid, das für die spätere Sekretion des Antikörpers in den Überstand sehr wichtig ist. Dann kommt die eigentliche Sequenz der schweren Kette des Antikörpers, gefolgt von einem G2A Peptid. Dieses Peptid ist ein selbstspaltendes Peptid. Das heißt, die Sequenz wird in einem Polypeptidstrang transkribiert und translatiert und anschließend durch dieses Peptid an den entsprechenden Stellen durch eine Peptidasefunktion geschnitten. Danach kann sich der Antikörper in seine Quartärstruktur falten und sezerniert werden. In dem Konstrukt folgt auf das erste G2A Peptid die Kozak Sequenz der leichten Kette und dann die leichte Kette, die wiederum von einem weiteren G2A Peptid von GFP getrennt ist. Die Produktion von GFP aus der GFP-cDNA am Ende des Konstrukts dient als visuelle Kontrolle, dass die Zelle auch wirklich den Antikörper produziert. Da dem ganzen Antikörper nur ein CMV-Promotor vorgeschaltet ist und das GFP am Ende steht, muss die Antikörpersequenz vor dem GFP abgelesen werden. Das bedeutet, grüne Zellen

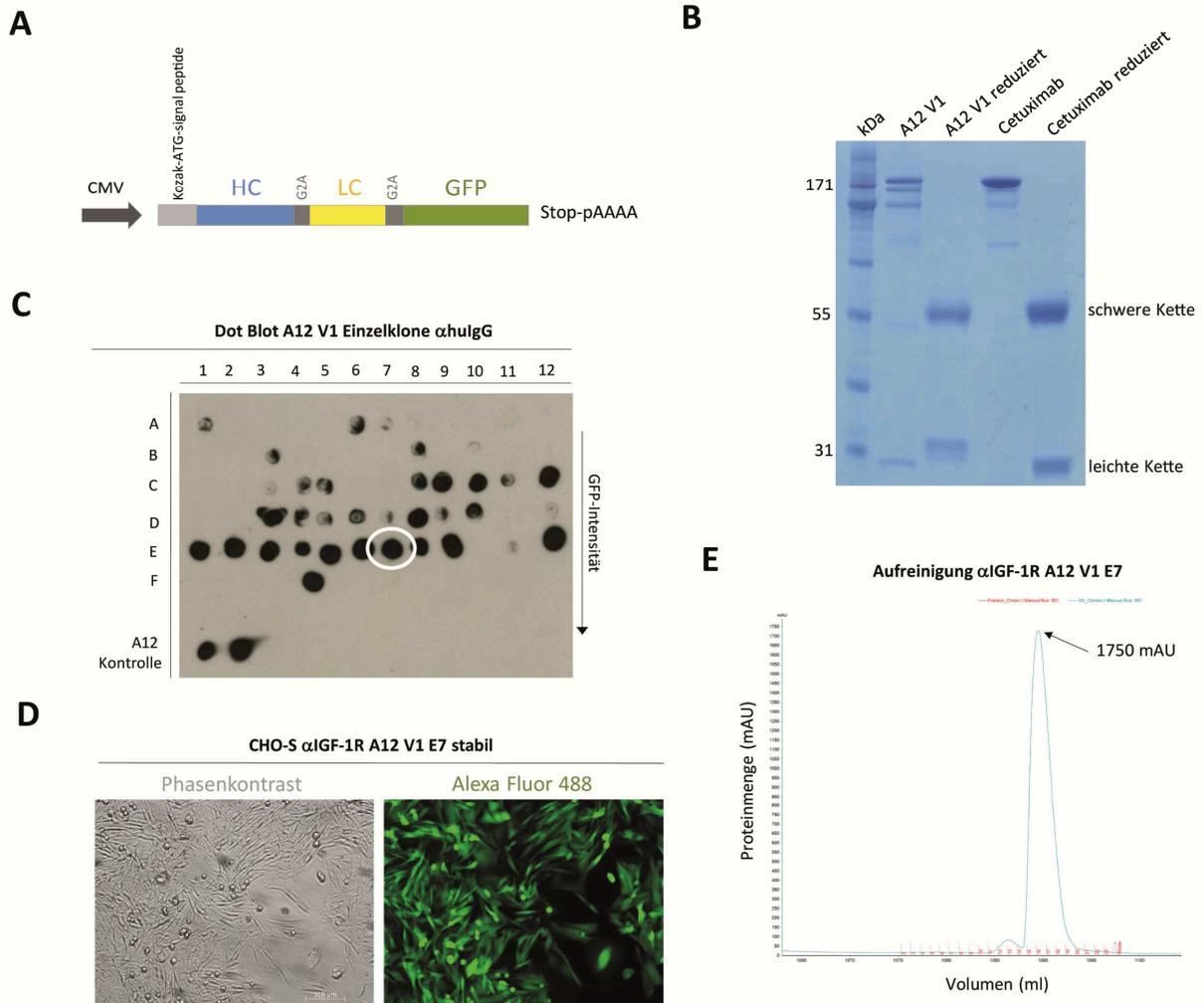
### 3. Ergebnisse

sprechen zwangsläufig für Antikörper-produzierende Zellen. Das Konstrukt ist eingebettet in das Produktionsplasmid pcDNA3.1 (+) (siehe Abbildung 13).

Der A12 V1 wird in sogenannten CHO-S Zellen produziert. Diese Form der Chinese Hamster Ovary Zellen wächst adhärent auf einer Zellkulturflasche, wenn sie mit Medium, das FCS enthält, versorgt werden. Fällt das FCS zugunsten eines chemisch definierten Mediums weg, lösen die Zellen sich ab und gehen in Suspension über. Für eine Produktion von Antikörpern ist diese Adaption der Zellen an die Suspension von Vorteil, da die Zellen in viel höheren Konzentrationen gehalten werden können als in Adhärenz.

Für die Produktion des Antikörpers wurden CHO-S Zellen mit dem Produktionsplasmid pCDNA3.1(+)/A12-Version-1-G2A-EGFP bei 37°C transfiziert und anschließend für sechs Tage schüttelnd bei 31°C zur Produktion gehalten. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert und der Überstand mit dem Antikörper abgenommen. Nach Sterilfiltration des Antikörperüberstands wurde der Antikörper mit Hilfe einer Protein G Säule aus dem Überstand aufgereinigt. Um die Aufreinigung zu überprüfen wurde der aufgereinigte A12 V1 zusammen mit dem kommerziellen IgG Cetuximab auf ein Gel aufgetragen und Coomassie gefärbt. Wie in Abbildung 31 B zu erkennen ist, weisen beide Antikörper in ihrer oxidierten und reduzierten Form das gleiche Bandenmuster auf. Die leichte Kette ist bei der reduzierten Form des A12 etwas größer als die des Cetuximab. Sonst liegen die Banden aber auf der gleichen Höhe.

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 31: Produktion des IGF-1R Antikörpers A12 V1 E7 in CHO-S Zellen**

**A** Dargestellt ist das Produktionskonstrukt für den IGF1-R Antikörper A12 V1 ( $\alpha$ IGF-1R A12 V1). Das Konstrukt beginnt mit einem CMV-Promotor, gefolgt von einer Kozaksequenz und einem Signalpeptid, dann folgt die Sequenz für die schwere Kette (HC) des IGF1-R Antikörpers A12. Die Sequenz der schweren Kette ist durch ein G2A-Peptid von der leichten Kette getrennt. Als Reportergen für die Erfolgsbestimmung der Transfektion ist über ein G2A-Peptid noch das grün fluoreszierende Protein GFP angehängt. Das Konstrukt wird am Stück translatiert und durch die G2A-Peptide an diesen Stellen gespleißt. Als Backbone für das A12-Produktionskonstrukt dient das Plasmid pCDNA3.1(+). **B** Aufgetragen ist der A12 V1 in seiner nach der Protein G Sepharose-Reinigung vorliegenden Form, dann die reduzierte Form des A12 V1. Im Vergleich dazu ist der Cetuximab in seiner nativen und seiner reduzierten Form in den darauffolgenden zwei Reihen aufgetragen. **C** Dot Blot. Der Überstand von Einzelklonen wurde auf eine Nitrozellulosemembran gespottet. Zu erkennen ist, dass die Ausbeute an A12 mit steigender GFP-Intensität zunimmt. Der CHO-S-Klon E7 wird für alle weiteren Versuche verwendet. **D** Die Bilder zeigen die GFP-Positivität des A12 V1 E7 Klon auf der Zellkulturplatte. **E** Der A12 V1 E7 wird aus dem Überstand mit Hilfe einer Protein G-Säule aufgereinigt. Bei dieser Elution entsteht über 5 ml ein geradliniger Peak mit dem eluierten Antikörper aus 300 ml CHO-S-A12-V1-E7 Überstand. Der Peak erreicht eine Höhe von 1750 mAU, das entspricht ca. 8 mg Antikörper aus 300 ml Überstand.

In der Regel findet die Produktion in 1 Liter Glasflaschen statt, die rotationsgeschüttelt werden. Pro Flasche können 300 Millionen Zellen in 300 ml Medium transfiziert und gehalten werden. Bei einer Transfektion von 300 Millionen Zellen waren nach der Transfektion um die 12-19 % GFP-positiv. Dies wurde über ein FACS im FL1-Kanal überprüft und führte zu einer Ausbeute von etwa 0,5 mg aus den 300 ml Überstand. Das reichte gerade für das Coomassiegel, nicht aber für weitere Studien. Deshalb wurde die Selektion eines Produktionsklons untersucht. Dafür wurden die transfizierten Zellen auf

### 3. Ergebnisse

GFP sortiert. Aus dieser Gesamtkultur aus grünen CHO-S Zellen wurde dann ein Einzelzellsort in 96-Well Platten vorgenommen. Dabei wurde in jedes Well von vier 96-Well Platten eine einzelne grüne CHO-S Zelle sortiert. Die vier Platten unterschieden sich dabei in der Fluoreszenz-Intensität der Zellen. Die Zellen wurden anschließend für zwei Wochen angezogen, wenn sie den Boden des 96-Well Wells ausgefüllt haben, wurde direkt aus dem Überstand 4 µl Überstand entnommen und auf eine Nitrozellulosemembran geträufelt. Nicht jede Zelle ist dabei zu einer Kolonie angewachsen. In diesem Fall sind 70 verschiedene Klone entstanden, deren Überstände aufgetragen wurden. Die Nitrozellulosemembran wurde danach getrocknet, Protein-geblockt und mit einem hulgG-HRP Antikörper gefärbt. Dieser Versuch wird als Dot Blot bezeichnet und der Ergebnisblot ist in Abbildung 31 C zu sehen. Die Intensität des GFPs der Zellen nimmt dabei von Zeile A nach E hin zu. Unter den Einzelklonen ist unten auf dem Blot als Kontrolle der A12 nach einer Aufreinigung aufgetragen. Je mehr A12 V1 die Einzelzellklone produzieren, desto dunkler ist der aufgetragene Überstandspunkt. Dabei fällt auf, dass die GFP-Intensität und die produzierte Antikörpermenge im Überstand korreliert. Je mehr GFP, desto höher ist die Intensität des Dots. In den letzten zwei Reihen sind elf Klone mit einer sehr hohen Antikörperkonzentration im Überstand zu erkennen. Alle diese Klone wurden weiter expandiert und dann eingefroren. Der Klon in Zeile E Spalte 7 wurde weiter in Kultur gehalten und für die Produktion unseres A12 V1 Antikörpers selektiert. In Abbildung 31 D ist eine Fluoreszenz-Mikroskopaufnahme dieses Klons zu sehen. Das Phasenkontrastbild zeigt die Produktionszellen CHO-S-A12-V1-E7 in ihrer adhärenenten Form. Daneben ist die Fluoreszenzaufnahme gezeigt. Die Zellen sind zu 100 % stabil GFP-positiv und stammen aus einer Einzelzelle. Nachdem der Klon E7 ausgewählt wurde, wurde er auf das Produktionsmedium ohne FCS umgesetzt und expandiert. Anschließend wurden 300 Millionen Zellen des Klons in eine Glasflasche überführt und für sechs Tage bei 31 °C geschüttelt. Bei dieser Temperatur liegt das Hauptaugenmerk der Zelle auf der Produktion des Antikörpers. Nach den sechs Tagen wurde der Überstand abgenommen, steril filtriert, 1:1 mit PBS versetzt und über eine Protein-G-Säule gereinigt. Das Protein G in der Säule bindet den produzierten IgG aus dem Überstand. Der Antikörper lässt sich anschließend mit einem sauren Glycin-HCl-Puffer pH 2,5 von der Säule eluieren. In Abbildung 31 E ist die Elution des Antikörpers in Form eines Diagramms dargestellt. Die Kurve zeigt die Absorptionseinheiten in mAU während der Elution. Die Zahl stieg, sobald der Antikörper sich von der Säule löst. Über 5 ml hinweg bildete sich ein gleichmäßiger Peak. Der höchste Wert, der erreicht wurde, lag bei 1750 mAU. Bei vorherigen Aufreinigungen, die nur aus den 12 % transfizierten CHO-S Zellen gelaufen sind, wurden meist nur 120 mAU erreicht. Durch die Verwendung des stabilen E7 Klons konnte die Ausbeute somit um ein Vielfaches erhöht werden. Die 1750 mAU entsprechen einer Antikörperausbeute von ca. 8 mg aus 300 ml Überstand. Für einen *in vivo* Einsatz ist diese Menge bereits ausreichend. Das einzige Problem

### 3. Ergebnisse

ist, dass der Antikörper ausfällt sobald er eine Konzentration von 1 mg/ml übersteigt. Aus diesem Grund muss die Aufreinigung in kleineren Schritten erfolgen.

Nach der Aufreinigung des Antikörpers wird zunächst der pH-Wert überprüft und gegebenenfalls auf einen pH von 7 eingestellt. Die Umgebung darf für den Antikörper nicht zu sauer sein. Es folgt eine Gelfiltration des Antikörpers um ihn für die vorgesehenen Experimente in PBS vorliegen zu haben. Anschließend wird der Antikörper wie in 2.2.2 beschrieben an Protamin gekoppelt.

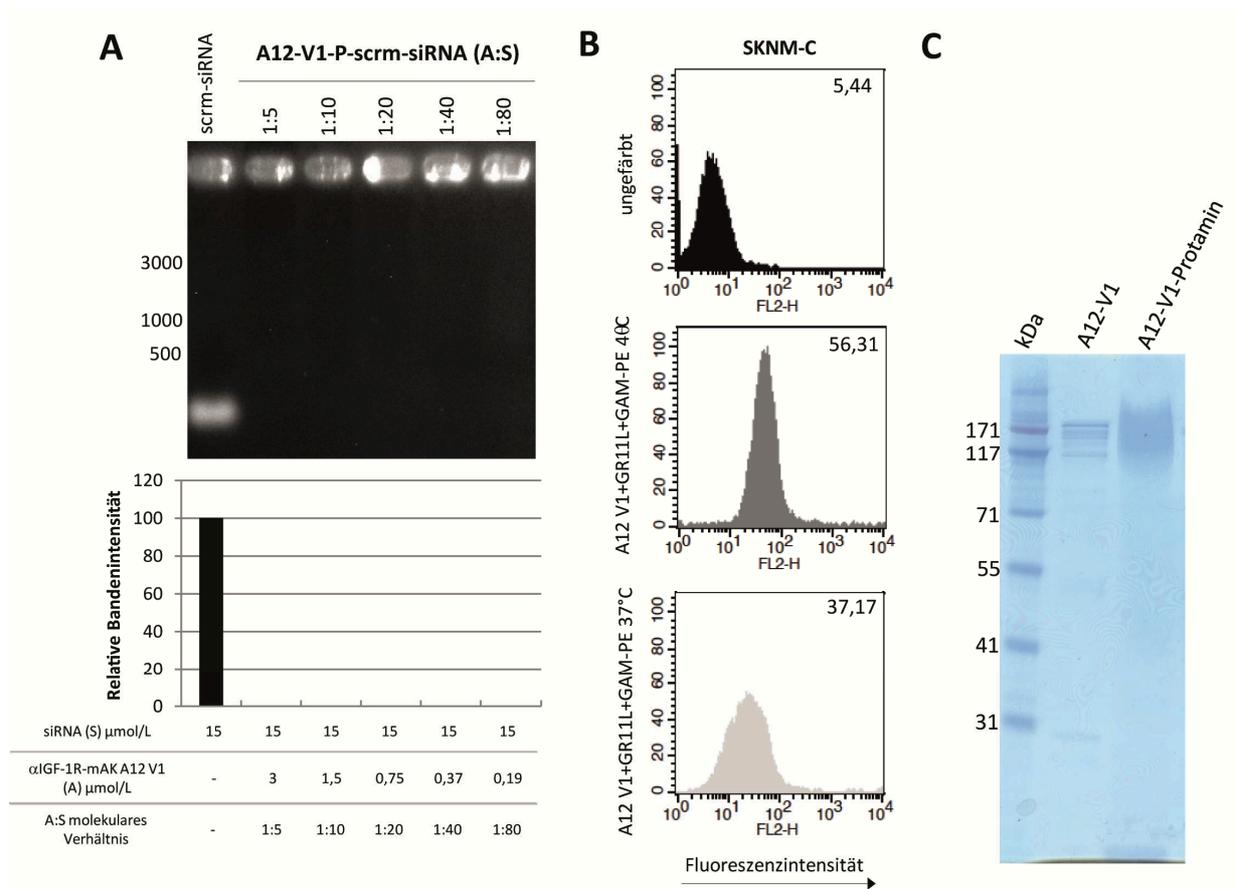
#### **3.2.3.2 Der IGF-1R Antikörper A12 V1 E7 gekoppelt an Protamin bindet siRNAs und initiiert die Internalisierung des IGF1-Rezeptors**

Der IGF-1R Antikörper A12 V1 E7 ist die dritte Option einen Antikörper als siRNA-Shuttle in die Ewing Sarkom Zelllinien zu etablieren. Doch funktioniert der selbstproduzierte humane  $\alpha$ IGF-1R Antikörper A12 V1 E7 auch wie ein kommerzieller IgG? Dieser Frage wurde nach dem schon bekannten Prinzip der Überprüfung der siRNA-Bindeeigenschaften und der Internalisierungseigenschaften des Antikörpers nachgegangen. Zuerst wurde dafür ein Band-Shift Assay mit dem A12 V1 durchgeführt. Der A12-Protamin wurde dafür mit verschiedenen siRNA Konzentrationen inkubiert und anschließend auf ein Agarosegel aufgetragen.

In der ersten Reihe des Agarosegels in Abbildung 32 A ist die freie siRNA ohne Antikörper als Kontrolle aufgetragen. Die Bande ist bei ca. 25 Basenpaaren zu erkennen. Es folgen die sich verdoppelnden Konzentrationsverhältnisse von Antikörper zu siRNA von 1:5, 1:10, 1:20, 1:40, und 1:80. Sogar bei 1:80 ist keine wiederkehrende Bande von freier siRNA zu erkennen. Der A12 gekoppelt an Protamin ist somit in der Lage über 80 siRNAs pro Antikörper zu transportieren. Das ist weit mehr, als mit dem GR11L oder dem hCD99 Antikörper bisher möglich war. Letztendlich eingesetzt werden 5-10 siRNAs pro Antikörper in den *in vitro* Assays, was tatsächlich deutlich unter der Kapazität liegt. Der IGF-1-Rezeptor ist, verglichen mit dem CD99-Rezeptor mit weniger Rezeptoren auf der Oberfläche vertreten. Doch mit dieser hohen siRNA-Bindekapazität sollte sich der Unterschied an siRNAs, die in die Zelle gelangen können, ausgleichen.

A12 V1 ist außerdem in der Lage, eine Internalisierung des IGF-1-Rezeptors auszulösen (siehe Abbildung 32 B). Ungefärbte SKNM-C Ewing Sarkom Zellen zeigen ein Fluoreszenzsignal von 5,44. Für die Positivkontrolle bei 4 °C werden die SKNM-C zunächst mit dem A12 V1 inkubiert und anschließend zunächst mit dem GR11L gegengefärbt. Die nicht internalisierten Rezeptoren, die GR11L gebunden haben, werden durch einen PE-gelabelten Goat-Anti-Mouse Antikörper detektiert. Bei der Positivkontrolle liegt dieser Wert bei 56,31. Nach der Inkubation mit A12 V1 bei 37 °C sinkt die Rezeptoranzahl auf der Oberfläche um ca. 40 % auf einen Wert von 37,17.

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 32: Internalisierungs- und siRNA-Bindeeigenschaften des IGF-1R Antikörpers A12 V1 E7 gekoppelt an Protamin über den chemischen Linker sulfo-SMCC**

**A** Band-Shift Assay. Der IGF-1R-Antikörper A12 V1 ( $\alpha$ IGF-1R-mAK A12 V1) gekoppelt an Protamin wurde mit verschiedenen siRNA-Konzentrationen inkubiert und anschließend auf ein Agarosegel aufgetragen. Vergleicht man die Banden im Agarosegel mit den dazu bestimmten Densitometrien, ist zu erkennen, dass selbst bei einem molekularen Verhältnis von Antikörper zu siRNA von 1:80 keine freie siRNA auftritt. A12 V1 ist somit in der Lage über 80 siRNAs auf einmal zu transportieren. **B** Mit Hilfe eines Internalisierungs-FACS wird die Antikörper-induzierte IGF1-Rezeptorinternalisierung überprüft. SKNM-C Ewing Sarkom Zellen zeigen in den dargestellten Histogrammen eine Fluoreszenzintensität von 5,44 bei ungefärbten SKNM-C Zellen. Die relative Rezeptordichte der Positivkontrolle A12 V1 4 °C erreicht einen Wert von 56,31. Bei 37°C findet die Internalisierung statt und die Fluoreszenzintensität sinkt auf 37,17. Damit sinkt die Rezeptordichte nach Inkubation mit A12 V1 auf der Zelloberfläche der Ewing Sarkom Zellen um ca. 40 %.

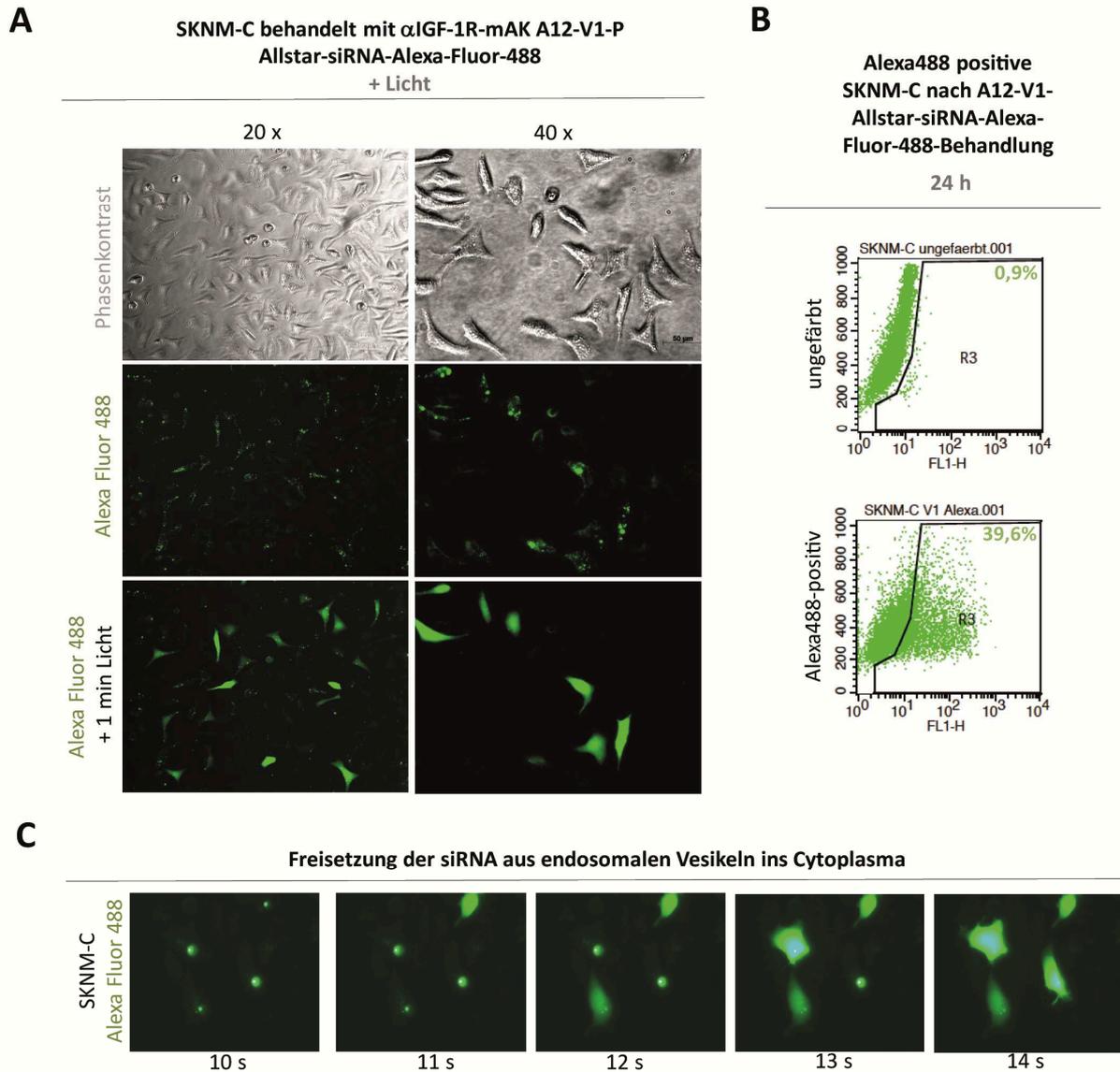
**C** Das Coomassiegefärbte Gel zeigt wieder die ungekoppelte Form des Antikörpers verglichen mit seiner an Protamin gekoppelten Form. Bei der gekoppelten Form des IGF-1R A12 V1 ist wieder die typische Antikörperwolke zu erkennen. Dieses Mal deutlich ausgeprägter als bei den anderen eingesetzten Antikörpern. Diese Beobachtung korreliert mit der höheren siRNA Bindekapazität des Konjugats. Abschließend lässt sich in diesem Abschnitt sagen, dass der A12 V1 gute Voraussetzungen für den Transport von siRNAs in die Ewing Sarkom Zellen zeigt.

#### **3.2.3.3 Der IGF-1R Antikörper A12 V1 E7 gekoppelt an Protamin führt zur Internalisierung von fluoreszierender siRNA**

Die Internalisierung des IGF1-Rezeptors ausgelöst durch den selbstproduzierten A12 V1 und die Bindekapazität von ungefähr 80 siRNAs konnte im vorherigen Abschnitt nachgewiesen werden. Wie auch bei den anderen Antikörpern wird deshalb fluoreszente siRNA eingesetzt um den Transport der siRNAs in die Zellen visuell zu bestätigen. Dafür wurden in diesem Fall SKNM-C Ewing Sarkom Zellen ausgesät und über Nacht mit dem  $\alpha$ IGF-1R-mAK-A12-V1-Allstar-siRNA-Alexa-Fluor-488-Komplex behandelt. Die dazugehörigen Mikroskopaufnahmen sind in Abbildung 33 A aufgeführt. Die linke Spalte zeigt die Zellen mit einer 20-fachen Vergrößerung. Die rechte Spalte zeigt die Zellen etwas näher durch eine 40-fache Vergrößerung. In der ersten Zeile sind die Phasenkontrastaufnahmen der SKNM-C Zellen dargestellt. Darunter, die schon bekannten grünen Vesikel, die durch die Internalisierung der grün fluoreszierenden siRNA entstehen.

Bei diesem Antikörper konnte nun ein Phänomen beobachtet werden, dass wir so vorher noch nicht beobachtet haben. Exponiert man die Zellen für ca. eine Minute unter der Fluoreszenzlampe, beginnen die Vesikel schlagartig zu platzen und die Antikörper-siRNA-Komplexe verteilen sich binnen Sekunden über das gesamte Cytoplasma der Zellen. In Abbildung 33 C ist dieses Entlassen der siRNA in die Zelle als Zeitreihe dargestellt. Dieses Phänomen erbringt, deutlicher als in den Internalisierungsfluoreszenzen der anderen Antikörper zuvor, den Beweis, dass die Antikörper-Protamin-Komplexe die siRNA tatsächlich in die Zellen shutteln. Warum genau die Vesikel durch den Lichtimpuls platzen, ist noch nicht bekannt. Eine Vermutung ist, dass durch das Fluoreszenzlicht ein Motiv, das sich in der Antikörpersequenz verbirgt, in Schwingung gerät. Diese Schwingung führt dann letztendlich zur Destabilisierung der Endosomenmembran und zum Platzen der Vesikel. Bewiesen ist diese Vermutung noch nicht. Auch ist der Lichteinfluss für die Destabilisierung keinesfalls obligatorisch, sondern beschleunigt diese nur.

Davon abgesehen ist mit dem A12 V1 die höchste Internalisierung von fluoreszierender siRNA zu erkennen. Jeweils fünf siRNAs sind bei diesem Versuch an einen Antikörper gekoppelt. In Abbildung 33 B sind die Alexa488-positiven Zellen im FL1-Kanal des FACS-Geräts bestimmt worden. Im Vergleich zu einer ungefärbten Kontrolle der SKNM-C steigt hier in den dargestellten Histogrammen die Zahl der Alexa488-siRNA-tragenden Zellen auf fast 40 % an. Das bedeutet, mit dem Antikörper werden durch eine Behandlung ca. 40 % der Zellen getroffen. Der nächste Schritt, der an dieser Stelle folgt ist wieder der Einsatz von funktioneller EWS/FLi1-siRNA.



**Abbildung 33: Internalisierung fluoreszierender siRNA mit Hilfe des IGF1-R Antikörpers A12 V1 und Triggern der Freisetzung der siRNA durch Lichteinfluss**

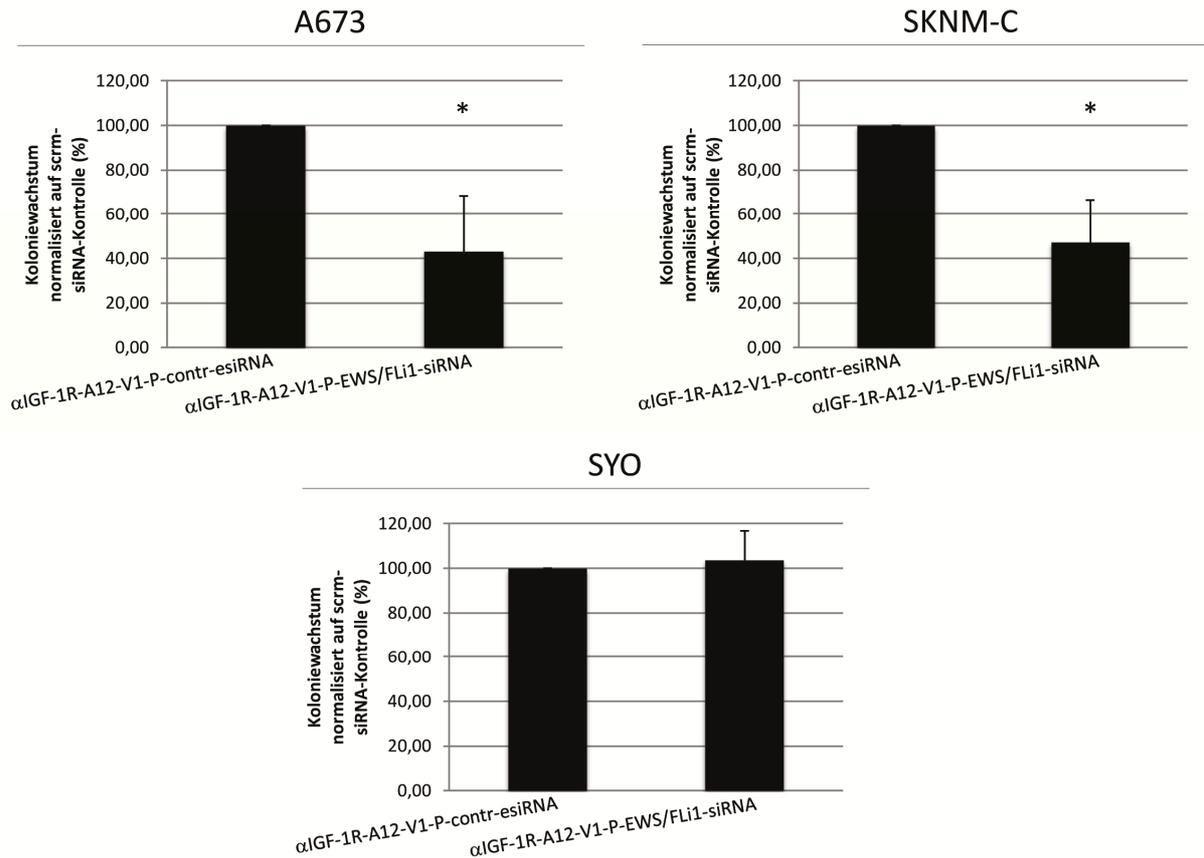
**A** Dargestellt sind SKNM-C Ewing Sarkom Zellen behandelt über Nacht mit IGF1-R A12 V1-P-Allstar-siRNA-Alexa-Fluor-488. Die beiden Spalten zeigen zwei verschiedene Vergrößerungen der Zellen. Die mittlere Zeile zeigt die aufgenommene Alexa488-siRNA in Vesikeln in den Zellen. Werden diese Zellen für ca. eine Minute mit der Fluoreszenzlampe bestrahlt, platzen die siRNA-gefüllten Vesikel und entlassen die siRNA in das Cytoplasma der Zelle. **B** Im Vergleich zu unbehandelten SKNM-C nahmen 39,6 % der SKNM-C, die mit dem A12-V1-P-Alexa488-siRNA Komplex behandelt wurden, grüne Fluoreszenz auf. Bei einer über Nacht Behandlung wurden somit ca. 40 % der Zellen mit der Behandlung erreicht. **C** In diesem Abbildungsteil wird die Freisetzung der aufgenommenen Alexa488-siRNA nach ein-minütiger Lichtreizaussetzung festgehalten. Innerhalb von 5 Sekunden öffnet sich der Alexa488-siRNA Vesikel und entlässt die siRNA ins Cytoplasma, wo sie sich langsam systematisch vom Vesikelpunkt ausgehend im Cytoplasma der Zelle verteilt.

#### **3.2.3.4 Effekt der A12-V1-EWS/FLi1-siRNA Behandlung auf die Proliferation von Ewing Sarkom Zellen**

Nach erfolgreicher Internalisierung der A12-V1-Protamin-Alexa488-siRNA-Komplexe in Ewing Sarkom Zellen wurde in Colony Formation Assays die EWS/FLi1-siRNA an den A12-V1-Protamin gekoppelt und Zellen im Vergleich zu einer scrambled-Kontrolle damit behandelt. In diesem Fall wurden zunächst drei verschiedene Sarkomzelllinien getestet. Die zu diesem Zeitpunkt produzierte Menge an A12 reichte zunächst nur für drei verschiedene Zelllinien, damit alle mit der gleichen Antikörpercharge behandelt werden konnten. Verwendet wurden dafür als Ewing Sarkom Zelllinien die A673 und die SKNM-C und als Kontrolle wieder die Synovialsarkom Zelllinie SYO. In Abbildung 34 sind die Diagramme der Colony Formation Assays dargestellt. Da es sich bei diesem Target um den IGF-1-Rezeptor handelt und bei dem GR11L kein Chloroquin eingesetzt wurde, wurde es auch in diesem Ansatz zunächst weggelassen. Die Zellen wurden also wieder für drei Stunden mit dem A12-V1-Protamin-EWS/FLi1-siRNA Komplex und als Kontrolle mit A12-V1-Protamin-scram-siRNA vorbehandelt. Anschließend findet die Aussaat in Soft Agar und die Inkubation für ungefähr sieben Tage bei 37°C statt. Danach wurden die gebildeten Kolonien gefärbt und gezählt. Auf der y-Achse der Diagramme ist wieder die Koloniezahl normalisiert auf die scrambled-Kontrolle in Prozent aufgetragen. Bei den A673 schlägt die Behandlung mit der EWS/FLi1-siRNA an und die Koloniezahl reduziert sich auf ca. 42 %. Bei den SKNM-C ergibt sich das gleiche Bild. Bei diesen Zellen sinkt die Anzahl der Kolonien auf etwa 43 %, verglichen mit der scrambled Kontrolle. Bei der SYO Kontrollzelllinie zeigen beide Behandlungsansätze keinen Effekt auf das Koloniewachstum.

Das Fazit zu diesem Versuch ist, dass der IGF-1R Antikörper A12 V1 E7 gekoppelt an Protamin die funktionelle EWS/FLi1-siRNA in die Zellen bringt, die siRNA aus den Aufnahmevesikeln liberalisiert werden kann und in den RNA Interferenz Weg einght. Die Degradation der EWS/FLi1-mRNA führt dann zu einer Proliferationsabnahme der Zellen um über die Hälfte, verglichen mit der Kontrolle.

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 34: Effekt von IGF-1R Antikörper A12 V1-Protamin-EWS/FLi1-siRNA Behandlung auf die Proliferation von drei verschiedenen Sarkomzelllinien**

Die dargestellten Diagramme zeigen die Auswertung von Soft-Agar Assays von drei verschiedenen Sarkomzelllinien, die mit dem IGF-1R Antikörper A12 V1-Protamin und scrambled (=contr) siRNA versus EWS/FLi1-siRNA behandelt wurden. Auf der y-Achse ist das Koloniewachstum normalisiert auf die scrambled-Kontrolle in Prozent angegeben. Die Ewing Sarkom Zelllinie A673 zeigt bei den Zellen, die der EWS/FLi1-siRNA ausgesetzt wurden eine signifikante Reduktion im Koloniewachstum auf fast 40 %. Bei der zweiten Ewing Sarkom Zelllinie, den SKNM-C, zeigt sich die gleiche Reaktion auf die Behandlung. Bei der Synovialsarkom Kontrollzelllinie wachsen bei beiden Behandlungsansätzen gleich viele Kolonien. Signifikanz: \*,  $P < 0,05$

#### 3.2.3.5 Der IGF-1R Antikörper A12 V1 E7-Protamin und EWS/FLi1-siRNA führen *in vivo* zu einem verlangsamten Tumorwachstum

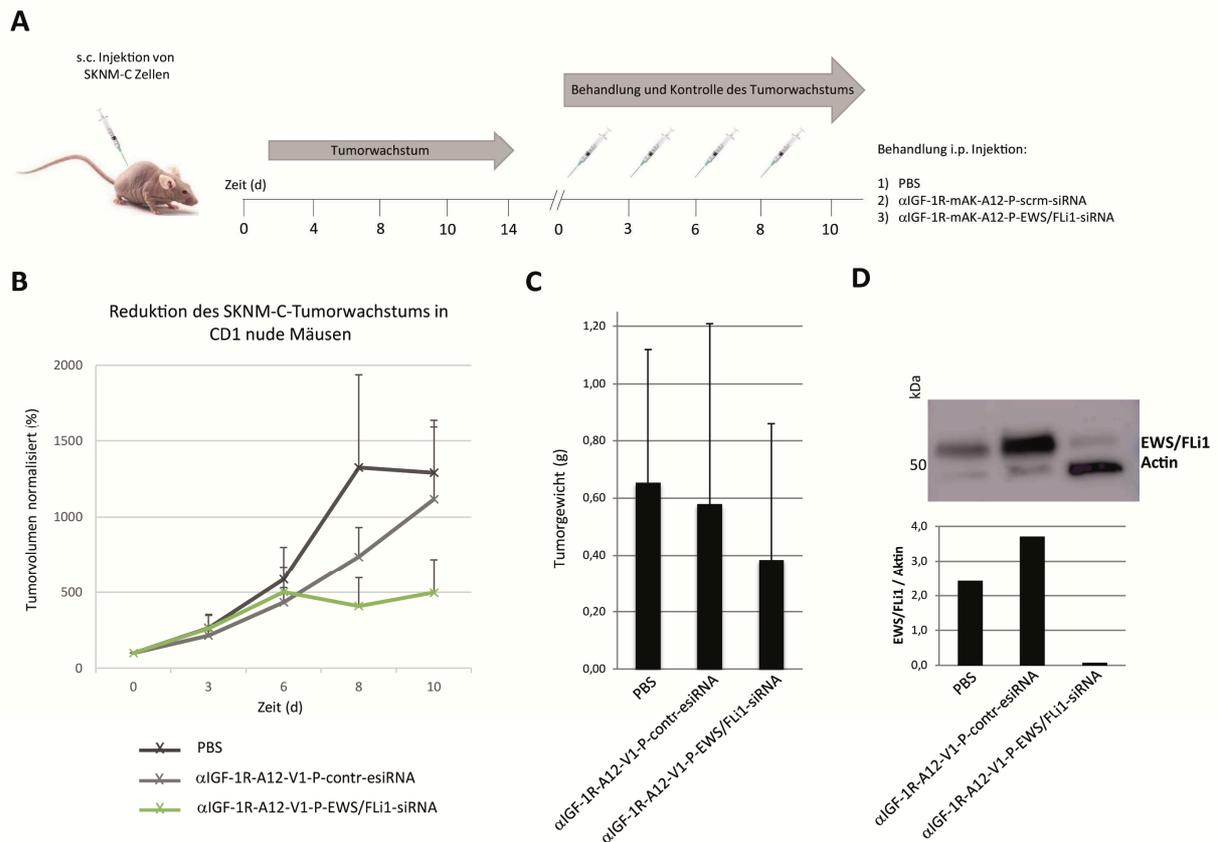
In den vorangegangenen Abschnitten zum Thema Ewing Sarkom wurde deutlich, dass die eingesetzte EWS/FLi1-siRNA zu einem Knockdown von EWS/FLi1 auf mRNA-Level und auch auf Proteinlevel führt. Focus dieser Arbeit war es, den passenden Antikörper als Transportvehikel für die siRNA zu finden. Mit dem IGF-1R Antikörper A12 V1 E7 können wir einen Lösungsvorschlag präsentieren. Er zeigt von allen drei getesteten Antikörpern die beste Internalisierung und siRNA-Bindekapazität (siehe Abbildung 32). Aus diesem Grund wurde nach den Colony Formation Assays die nächste neu produzierte Charge A12 V1 nicht für weitere *in vitro* Assays verwendet, sondern, da die Menge für ein fokussiertes *in vivo* Experiment ausreichte, direkt dafür eingesetzt. Für diesen Versuch wurden 18 CD1 Nacktmäuse mit  $1 \times 10^7$  Zellen einer Ewing Sarkom Zelllinie transplantiert. Dafür wurde wie bei

### 3. Ergebnisse

dem Cetuximab-Experiment die rechte Flanke verwendet. Eingesetzt wurden für diesen Versuch die SKNM-C, da sie mit 40 % getroffenen Zellen nach nur einer Behandlung die höchste Internalisierung der vier Ewing Sarkom Zelllinien aufweisen und außerdem das stabilste Wachstum in der Zellkultur zeigen. Die Mäuse wurden alle zwei Tage auf das Tumorstadium hin überprüft. Nach ca. zwei Wochen waren bei allen Mäusen Tumoren zu erkennen und die Behandlung konnte starten. Dafür wurden die 18 Mäuse in drei Gruppen aufgeteilt. Eine Gruppe wurde dabei mit PBS als Kontrolle behandelt, die zweite Gruppe erhielt als Kontrolle den A12-V1-Protamin gekoppelt an scrambled-siRNA und die dritte Gruppe wurde mit der funktionellen EWS/FLI1-siRNA gebunden an den A12-V1 behandelt. Die Injektion erfolgte intraperitoneal. Bis die ersten Tumoren ein Volumen von 1500 mm<sup>3</sup> überschritten und der Versuch beendet werden musste, wurden die CD1 Nacktmäuse alle zwei Tage gewogen, die Tumorstadiumgröße wurde bestimmt und die i.p. Behandlung erfolgte (siehe Abbildung 35 A). Das Wachstum der drei Behandlungsgruppen ist in Abbildung 35 B dargestellt. In dem Diagramm ist das Tumorstadiumvolumen normalisiert auf die Anfangsstadiumgröße der einzelnen Tumoren dargestellt. Die schwarze Linie ist die Tumorstadiumgröße der PBS Kontrollgruppe. Hellgrau sind die Tumoren der scrambled-siRNA Kontrolle und in grün sind die EWS/FLI1-siRNA behandelten Tumoren abgebildet. Vergleicht man die drei Wachstumskurven ist bis zur zweiten Behandlung ein Anstieg aller Tumoren auf etwa 500 % zu erkennen. Ab diesem Behandlungspunkt entwickeln sich die Kurven auseinander. Die PBS-Tumoren wachsen stetig bis auf 1300 % an. Die scrambled-siRNA Kontrolle zeigt ebenfalls ein stetiges Wachstum bis auf eine Größe von etwa 1200 % am Ende des Experiments. Bei den Tumoren, die mit der EWS/FLI1-siRNA behandelt wurden, stagniert das Wachstum ab dieser Behandlung. Bis zum Ende des Experiments überschreiten sie die Größenzunahme auf 500 % nicht. Es scheint, als wären sie durch die Behandlung in ihrem Wachstum gestoppt.

Verglichen mit den Kontrollen sind die Tumoren weniger als halb so groß. Nach dem Versuch wurden die Tumoren entfernt und gewogen. Auch bei den mittleren Tumorgewichten ist der Unterschied der EWS/FLI1-siRNA Gruppe zu den Kontrollen zu erkennen. Die PBS Tumore liegen im Schnitt bei 0,65 g, die scrambled-siRNA Tumore bei etwas 0,59 g. Die Tumoren, die mit der funktionellen siRNA behandelt wurden, liegen mit durchschnittlich 0,38 g deutlich darunter. Der Einsatz des A12-V1-Protamin-EWS/FLI1-siRNA Komplexes zeigt hier in diesem *in vivo* Experiment seine Wirkung auf die Proliferation der Ewing Sarkom Zellen. Zum Abschluss des *in vivo* Versuchs wurden aus den Tumoren Lysate gewonnen und Western Blots durchgeführt. Das Ergebnis dazu ist in Abbildung 35 D gezeigt. Die Lysate wurden auf ein Gel aufgetragen und auf eine Membran geblottet. Die Membran wurde

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 35: Erste *in vivo* Behandlungen von SKNM-C Tumoren in CD1 Nacktmäusen mit dem IGF-1R Antikörper A12 V1 gekoppelt an EWS/FLi1-siRNA**

**A** Für das *in vivo* Experiment mit dem IGF1-R Antikörper A12 V1 werden 18 CD1 Nacktmäusen jeweils  $1 \times 10^7$  SKNM-C Zellen injiziert. Sobald die Tumoren eine sichtbare Größe erreicht haben, beginnt die Behandlung. Die Mäuse werden alle zwei Tage intraperitoneal behandelt. **B** Das dargestellte Diagramm zeigt den Verlauf des Tumorwachstums während der Behandlungszeit. Vergleicht man die drei Kurven ist zu erkennen, dass alle Tumoren nach zwei Behandlungen noch ungefähr die gleiche Größe um 500 % aufweisen. Nach der dritten Behandlung steigt die Tumorgröße der PBS Gruppe am meisten an, danach folgt die scrambled Gruppe (im Bild: scrambled=contr). Kein Wachstum dagegen zeigen die EWS/FLi1-siRNA behandelten Tumoren. **C** Im Mittel liegen die PBS-behandelten Tumoren mit 0,65 g und die scrambled-siRNA Tumoren mit 0,59 g nah beieinander. Die Tumoren, die mit der EWS/FLi1-siRNA behandelt wurden liegen mit 0,38 g im Schnitt deutlich unter den Tumorgewichten der anderen beiden Kontrollgruppen. **D** Um den Effekt der siRNA auf Proteinebene zu überprüfen wurde ein Western Blot durchgeführt und auf die Proteine EWS/FLi1 und Aktin hin entwickelt. Im Vergleich der drei Behandlungsgruppen ist zu erkennen, dass die EWS/FLi1-siRNA behandelten Tumoren eine deutlich schwächere EWS/FLi1-Bande im Western Blot zeigen, als die Kontrollgruppen PBS und scrambled siRNA. Die Densitometrieanalyse vom Western Blot darunter bestätigt, dass im Verhältnis zu Aktin deutlich weniger EWS/FLi1 aufzuweisen ist in der EWS/FLi1-Gruppe.

mit einem FLi1-Antikörper (FLi1 F12, Santa Cruz) gefärbt und als Kontrolle auch Aktin als Housekeeping Protein. Der Blot dazu zeigt, dass die EWS/FLi1-siRNA behandelten Tumore eine deutlich schwächere FLi1-Bande zeigen als die beiden Behandlungskontrollgruppen mit PBS und scrambled-siRNA. Im Vergleich dazu war in dieser Behandlungsgruppe die Aktin-Bande sogar stärker, es ist also in dieser Spur mit einer höheren Beladung zu rechnen. Die dazugehörige Densitometrie, bei der die FLi1-Banden auf die Aktin-Kontrollbande normalisiert wurden, zeigt, dass in den Tumorzellen, die mit der funktionellen EWS/FLi1-siRNA behandelt wurden, deutlich weniger FLi1

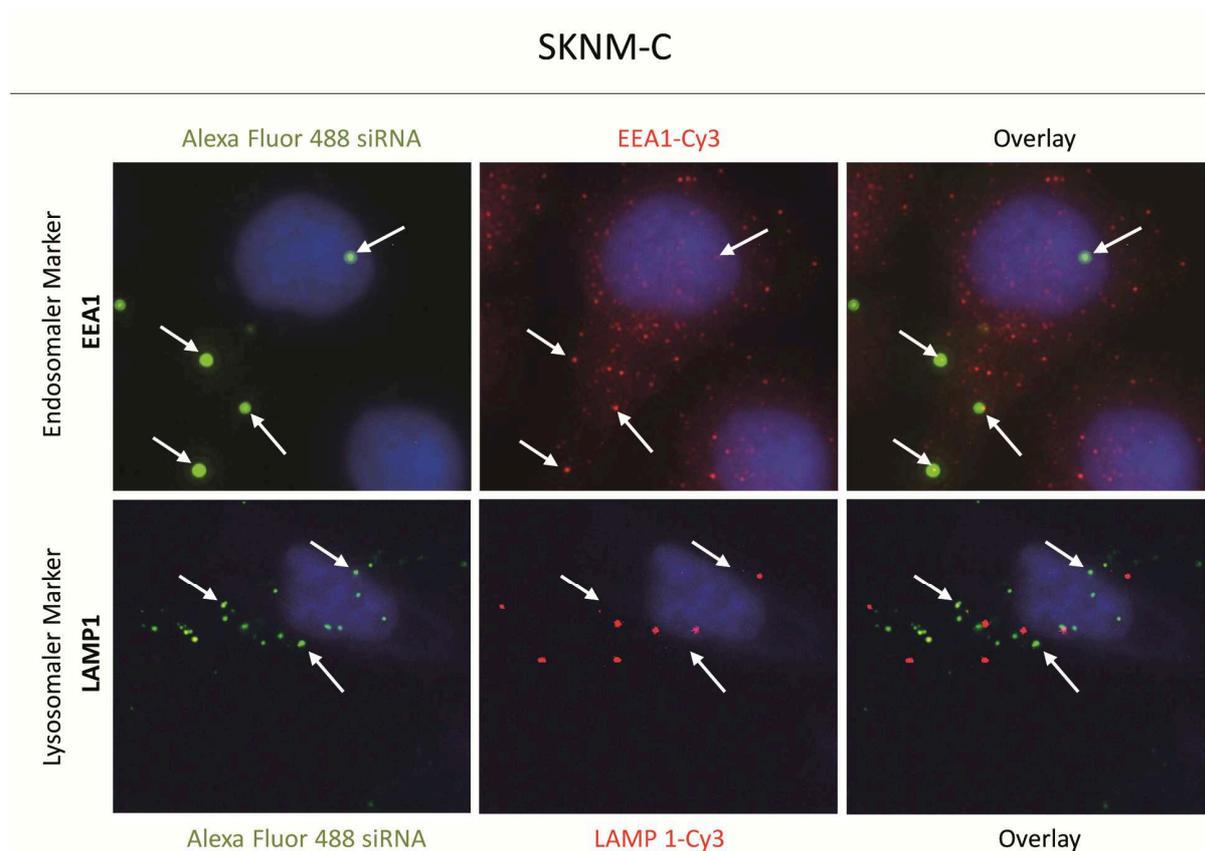
### 3. Ergebnisse

vorhanden ist. Dieser Therapieansatz hat somit sein Ziel in diesem *in vivo* Experiment erreicht, EWS/Fli1 ist herunterreguliert und die Zellen zeigen eine geringere Proliferation als die Kontrollgruppen. Außerdem sind die scrambled siRNA Tumore auch ein wenig kleiner als die PBS Kontrolle. Der A12 Antikörper alleine könnte auch einen Effekt auf die Proliferation der Tumore haben, da ja auch andere IGF-1R Antikörper in klinischen Studien schon Verwendung fanden. Allerdings liegt die Abweichung der beiden Kontrollen noch innerhalb der Standardabweichung.

#### **3.2.3.6 Die aufgenommenen Antikörper-siRNA Komplexe ko-lokalisieren mit dem frühen Endosom der Zellen**

Nachdem die Aufnahmen der Vesikeldestabilisierung durch die Lichtreaktion gemacht wurden, trat verstärkt das Interesse auf, in welchem subzellulären Kompartiment genau die siRNA-Antikörperkomplexe aufgenommen werden und wie die siRNA weiter prozessiert wird. Dafür wurde ein Marker für frühe Endosomen EEA1 (early endosome antigen 1) und ein Marker für die Lysosomen der Zelle LAMP1 (Lysosomal-associated membrane protein 1) ausgewählt. Die Überprüfung erfolgte über eine Immunfluoreszenz-Mikroskopie. Dafür wurden SKNM-C Zellen über Nacht auf einem *chamber slide* mit dem A12-V1-P-Alexa488-siRNA Komplex behandelt. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit PFA fixiert und mit Triton X 100 wurde die Membran permeabel für die Immunfluoreszenzantikörper gemacht. Eine Gruppe wurde dafür mit einem Primärantikörper gegen das frühe endosomale Protein EEA1 gefärbt und der zweite Ansatz mit einem Primärantikörper gegen das lysosomale Protein LAMP1. Beide wurden mit einem Cy3-tragenden Sekundärantikörper gegengefärbt. Die Zellkerne wurden durch eine Hoechst-Färbung sichtbar gemacht und anschließend wurden die Zellen eingedeckelt.

In Abbildung 36 sind die Fluoreszenzaufnahmen der verschiedenen Ansätze zu sehen. In der oberen Zeile ist die endosomale EEA1-Färbung angezeigt. Darunter ist die lysosomale LAMP1-Färbung zu sehen. In der ersten Zeile sind jeweils die Fluoreszenzaufnahmen des grünen Kanals abgebildet. Diese Bilder sind Overlays aus der Zellkernfärbung und den Alexa488-siRNA-enthaltenden Vesikeln. Mit weißen Pfeilen ist die Lokalisation von Alexa488-siRNA-Vesikeln markiert. Die zweite Spalte zeigt die Färbungen mit dem Cy3-Sekundärantikörper. In der ersten Zeile sind hier Vesikel dargestellt, die das Protein EEA1 enthalten. Es handelt sich damit um frühe Endosomen der Zellen. In der Zeile darunter hat der Sekundärantikörper Vesikel angefärbt, die LAMP1 enthalten, es handelt sich dabei um die Lysosomen der Zellen. In der letzten Spalte ist jeweils das Overlay aus den vorangegangenen Bildern zu sehen. Vergleicht man die Positionen, auf die die Pfeile in Abbildung 35 zeigen, ist bei den frühen



**Abbildung 36: Subzelluläre Lokalisation der Antikörper-siRNA Komplexe nach der Internalisierung**

Um zu überprüfen in welchen Vesikeln die siRNA nach ihrer Aufnahme in die Zelle verbleibt, wurden zwei verschiedene Immunfluoreszenzfärbungen vorgenommen. Die obere Zeile zeigt die Färbung mit dem endosomalen Marker EEA1. In der unteren Zeile wurden die SKNM-C mit dem lysosomalen Marker LAMP1 gefärbt. Im ersten Bild oben links sind die grünen Vesikel in SKNM-C Zellen zu erkennen nach der Behandlung mit Alexa488-siRNA. Im Bild rechts daneben ist die Färbung gegen EEA1 dargestellt. Im dazugehörigen Overlay rechts oben ist diese Kolokalisation von Alexa488-siRNA und den Endosomen zu sehen. In der Lamp1-Färbung in der Mitte unten sind an den Stellen der grünen Vesikel keine rot angefärbten Lysosomen zu erkennen. Auch im Overlay rechts unten lässt sich keine Kolokalisation von siRNA und Lysosomen erkennen.

Endosomen und den grünen siRNA-Vesikeln eine Ko-Lokalisation zu erkennen. Bei den Lysosomen ist das nicht der Fall. Hier gibt es keine Übereinstimmungen von siRNA-Vesikel-Position und Lysosomposition. Diese Immunfluoreszenzfärbungen zeigen, dass die siRNA-Komplexe die Aufnahmevesikel verlassen, bevor sie zu Lysosomen werden. Das ist ein gutes Zeichen, da die siRNA dann in ihren vorhergesehenen Weg der RNA Interferenz einget und nicht im Lysosom, ohne ihre Wirkung entfalten zu können, abgebaut wird.

### 4. Diskussion

Die Suche nach geeigneten Behandlungen für Krebserkrankungen nimmt eins der größten Forschungsfelder weltweit ein. Die Tatsache, dass potentiell jede sich teilende Körperzelle durch eine plötzlich auftretende Mutation zu einer Tumorzelle werden kann, führt zu der Notwendigkeit im Bereich der Krebstherapie vielfältig und äußerst flexibel zu sein. Die bisherigen Behandlungsstrategien sind, wie bereits in der Einleitung beschrieben, die operative Entfernung des Tumors, Chemotherapie, Strahlentherapie und Immuntherapie. Diese vier Strategien reichen durch die vielfältigen Krebsformen allerdings immer noch nicht aus um jede Tumorart erfolgreich zu behandeln und gesunde Körperzellen in der Therapie zu verschonen. Als neuester Ansatz reiht sich deshalb seit einigen Jahren auch die *Targeted Therapy* in die Standardbehandlungen ein <sup>[i,ii]</sup>. Hierbei soll die Therapie einer Krebserkrankung ganz individuell auf einen Patienten zugeschnitten sein. Zu der Gruppe der *Targeted Therapies* gehören Substanzen, die das Wachstum und die Verbreitung von Krebszellen hemmen <sup>[xiv,83]</sup>. Zu den Substanzen gehören vor allem chemisch synthetisierte kleine Moleküle wie Hormone, Signaltransduktionsinhibitoren, Angiogeneseinhibitoren, Modulatoren der Genexpression und Moleküle, die die Apoptose einleiten. Neben diesen sogenannten *small molecules* werden aber auch gentechnisch hergestellte monoklonale Antikörper eingesetzt, entweder direkt als wirkender Faktor oder als Transportmolekül für zytotoxische Substanzen <sup>[xiv]</sup>. Ziel dieser Arbeit ist es, die rezeptorvermittelte siRNA-Therapie über den antikörpervermittelten siRNA-Transport als zielgerichteten Zweig der *Targeted Therapies* zu etablieren. Möglich machen diesen Ansatz monoklonale Antikörper als Tumorzell-determinierende Agenzien. Nach ihrer Entdeckung 1975 haben sie schnell Eingang in die Forschung gefunden. Sei es zur Therapie oder als Diagnostika in Form von Immunhistochemie-Färbungen.

#### 4.1 Einsatz von siRNA in der Krebstherapie

Bis heute wurden siRNAs in 52 verschiedenen klinischen Studien auf Basis des Prinzips der RNAi untersucht <sup>[xv]</sup>. Eingesetzt werden und wurden die siRNAs dabei für die Therapie verschiedenster Krankheiten und unter anderem auch für die Behandlung diverser Krebserkrankungen <sup>[56-62]</sup>. Im Jahre 2004 wurde unmodifizierte siRNA zum ersten Mal im Menschen in klinischen Studien eingesetzt <sup>[35]</sup>. Hierbei wurde die siRNA bei Patienten mit dem Syndrom der choroidalen Neovaskularisation (CNV) direkt ins Auge injiziert. Die Versuche zeigten schnell, dass die Applikation freier siRNA zu viele immunologische Nebenwirkungen mit sich brachte und somit keinen Effekt der RNA Interferenz erkennen ließ <sup>[35]</sup>. Daraufhin wurde viel investiert, um die siRNA zu verpacken und ein geeignetes

## 4. Diskussion

Transportsystem zu entwickeln <sup>[30-37,61,62]</sup>. Die drei wichtigsten Ansätze sind in der Einleitung bereits beschrieben worden: Nanopartikel, Immunliposome und Liganden/Antikörper-Konjugate.

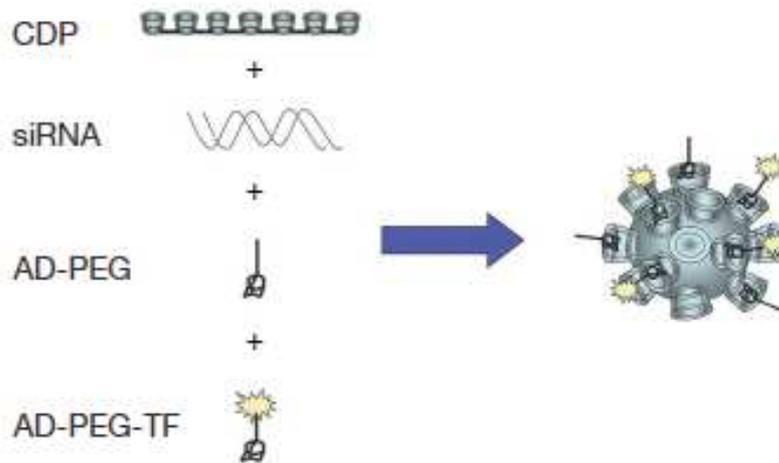
Eine der ersten klinischen Studien, die sich mit dem Einsatz von siRNA in der Krebstherapie beschäftigt hat, ist die CALAA-01 Studie von Calando Pharmaceuticals (NCT00689065), die in der Einleitung bereits angesprochen wurde <sup>[iii,35,63]</sup>. Diese Studie lief in den Jahren 2008 bis 2013 und ist allgemein die erste klinische Studie, die sich mit dem siRNA-Transport über Nanopartikel beschäftigt. Ihren ersten Einsatz fand sie für das maligne Melanom. In die Studie eingeschlossen wurden allerdings auch Patienten mit Prostatumoren, Gastrointestinaltumoren und neun andere Tumorentitäten <sup>[iii,63]</sup>.

Der CALAA-01-Nanopartikel besteht dabei aus vier verschiedenen Molekülen. Dazu gehört als erstes CDP, ein lineares Cyclodextrin-Polymer. Cyclodextrin kommt eigentlich als ringförmiges Molekül vor. Durch die hier verwendete lineare Form kann das CDP sich so zusammenlagern, dass es einen Hohlraum bildet und die siRNA einschließen kann <sup>[35]</sup>. Das zweite Molekül des Nanopartikels stellt die siRNA selbst dar. In diesem Experiment ist die Ziel-RNA der siRNA das Gen für die Ribonukleotidreduktase, Untereinheit M2 (RRM2). Das dritte Molekül ist eine Verbindung zwischen Polyethylenglykol (PEG) und Admantan (AD). Admantan verankert PEG auf der Oberfläche des Nanopartikels. Das offene PEG-Molekül dient als Anlagerungspunkt für 5 nm große Goldpartikel, die diagnostisch zur Färbung der Nanopartikel verwendet werden und so die Nanopartikel sichtbar machen. Bei dieser Färbemethode wird ein Goldpartikel über eine Thiolgruppe an das PEG gelagert. Das vierte und letzte Molekül des Nanopartikels CALAA01 ist die AD-PEG-Verbindung, an die ein humanes Transferrinprotein gekoppelt ist. Dieses Transferrinprotein ermöglicht den Eintritt der siRNA in die Krebszelle <sup>[35]</sup>. Obwohl ubiquitär exprimiert, ist der Transferrinrezeptor in Krebszellen auf der Oberfläche oft überexprimiert. Der Eintritt der siRNA soll so ermöglicht werden, dass das Transferrin auf der Oberfläche von CALAA01 an einen Transferrinrezeptor der Krebszelle andockt, diesen Rezeptor aktiviert und über Endozytose mit dem aktivierten Rezeptor in die Zelle aufgenommen wird und so zur Ziel-RNA gelangt <sup>[4,35]</sup>. Die Nachteile des breit gestreuten Expressionsspektrums werden dabei in Kauf genommen.

Die Arbeitsgruppe um Mark E. Davis konnte nachweisen, dass durch diese Vorgehensweise die siRNA an ihren Wirkort gelangt und dass neben dem mRNA-Level von RRM2 auch das Proteinlevel der Untereinheit M2 deutlich reduziert ist <sup>[35]</sup>. Die CALAA-01 Nanopartikel besitzen einen Durchmesser von ca. 70nm <sup>[35]</sup>. Das Zielprotein, die Ribonukleotidreduktase, besteht aus zwei identischen Untereinheiten und spielt eine wichtige Rolle in der Zellteilung. Sie synthetisiert Desoxyribonukleotide aus Ribonukleotiden und ist somit eine wichtige Verbindung der Nukleotid-Synthese in der Zelle <sup>[4,35,63]</sup>. Deshalb ist die Ribonukleotidreduktase ein potentielles Ziel für die Krebstherapie. Wenn sie ausgeschaltet ist, sollte die Zellproliferation der Krebszellen sich deutlich

#### 4. Diskussion

verlangsamen. Aus diesem Grund setzte Davis et al. siRNA gegen die Untereinheit M2 der Ribonukleotidreduktase ein.



**Abbildung 37: Cyclodextrin-basierter Nanopartikel CALAA-01**

Der Cyclodextrin-basierte Nanopartikel CALAA-01 setzt sich zusammen aus dem synthetischen Polymer Cyclodextrin, Admantan (AD), Polyethylen glykol (PEG) und Transferrin als richtungweisendes Molekül. Entnommen aus [35]

Am Ende der Studie wurde jedoch eine etwas ernüchternde Bilanz gezogen. Auffällig waren Leber- und Nierentoxizität, die entweder mit dem gesamten Nanopartikel oder einem seiner Bestandteile zusammenhängen müssen. Die gewählte siRNA gegen die Untereinheit M2 der Ribonukleotidreduktase könnte dabei eine Rolle spielen, da der Transferrinrezeptor, der als Eingang in die Zellen verwendet wird, ubiquitär exprimiert ist, gelangt die siRNA auch in gesunde Zellen und führt dort zu einer Herunterregulation der Untereinheit M2 <sup>[63]</sup>. Dieser Umstand könnte die hohe Toxizität erklären. Um die Nebenwirkungen zu verringern, müsste eine spezifischere siRNA eingesetzt werden, die ihre Wirkung lediglich in Tumorzellen entfaltet. Außerdem konnte in dieser klinischen Studie zusammengefasst das Potential, dass zuvor in *in vivo* Experimenten beobachtet wurde, nicht erreicht werden <sup>[63]</sup>.

Immunliposome sind bis heute noch nicht in eine klinische Studie eingegangen. Dafür aber einige nicht-targetierte Liposombehandlungsstrategien. Die Firma Alnylam Pharmaceuticals hat davon gleich zwei vielversprechende Studien initiiert. Die beiden Studien befassten sich mit der Therapie von Hepatokarzinomen und liefen unter den Namen ALN-PKL1 und ALN-VSP02 (NCT01158079) <sup>[iv]</sup>. Der siRNA Transport verlief dabei über sogenannte SNALPs. SNALP ist die Abkürzung für *stable nucleic acid lipid particle* und ist im Grunde eine Lipiddoppelschicht, die sich um die siRNA legt <sup>[64]</sup>. Sie besteht aus kationischen und neutralen Lipiden und trägt auf ihrer Oberfläche Polyethylenglykol.

#### 4. Diskussion

SNALPs weisen einen Durchmesser von ca. 120nm auf und schützen die siRNA auf ihrem Weg zum Einsatzort <sup>[65]</sup>.

Die erste Studie, die hier beschrieben wird, läuft unter der Bezeichnung ALN-PKL1. Dabei ist es Adam Judge und seiner Arbeitsgruppe gelungen mit dem Einsatz von siRNA gegen das Enzym PKL-1 eine neue Therapiemöglichkeit bei Leberkrebs zu eröffnen <sup>[65]</sup>.

Die zweite klinische Studie von Alnylam trägt die Bezeichnung ALN-VSP02 <sup>[iv]</sup>. Die Grundlage dafür ist die Forschung von Josep Taberero und seiner Arbeitsgruppe, die die Wirkung von siRNA, die als Ziel-mRNA die mRNA von VEGF und des Kinesin Spindle Proteins (KSP) hat, untersuchen <sup>[64]</sup>. Der „Vascular Endothelial Growth Factor“ (VEGF) spielt eine wichtige Rolle bei der Angiogenese und auch bei der Tumorangiogenese. In Tumoren ist häufig eine Überexpression an VEGF zu finden, aber auch ohne Überexpression ermöglicht die intensive VEGF-Ausschüttung Tumorzellen und Tumoren, sich einen eigenen Zugang zum Blutkreislaufsystem zu schaffen. Die siRNA in den SNALPs gegen die VEGF-mRNA sollte somit die Angiogenese eines Tumors verringern. Die zweite siRNA wird gegen die mRNA von KSP eingesetzt. KSP gehört zur Superfamilie der Kinesine und ist damit ein Mikrotubuli-assoziiertes Motorprotein. KSP im speziellen ist ein essentieller Faktor während der Mitose von gesunden Zellen und Tumorzellen. Es sorgt dafür, dass die Centrosomen voneinander getrennt werden und sich die mitotischen Spindeln bilden können. Die Inhibition von KSP resultiert in einer unvollständigen Mitose und führt zu deren Stillstand. Das macht KSP zu einem vielversprechenden Zielgen in Krebstherapien <sup>[67]</sup>.

In Tiermodellen konnte der erfolgreiche Einsatz dieser siRNA-Strategie bereits nachgewiesen werden, so dass der nächste Schritt diese klinische Studie der Phase I ist, in der die Wirkung am Menschen beobachtet wird <sup>[64]</sup>. Die siRNA-umschließenden SNALPs enthalten in einem 1:1-Verhältnis siRNA gegen VEGF und KSP, also einen dualen Ansatz. Der Durchmesser von ALN-VSP02 liegt zwischen 80 und 100 nm und ähnelt damit den Nanopartikeln <sup>[65]</sup>.

Bei den präklinischen Versuchen an Tiermodellen handelte es sich um Mäuse, denen humane Lebertumorzellen transplantiert wurden. Diese Mäuse wurden nach einer Tumorbildung einmalig mit einer Dosis von 4 mg/kg der ALN-VSP02 behandelt. Bereits 24 h nach der ersten Behandlung konnten im Vergleich zu den Kontrollmäusen 50 % weniger mRNA von VEGF und KSP in den Mäusen nachgewiesen werden. Der Nachweis erfolgte über ein 5'RACE-Assay. Des Weiteren konnte 48 h nach der Behandlung in den Lebertumoren festgestellt werden, dass die Tumorzellen in ihrer Mitose arretiert sind und ihren Spindelapparat falsch aufbauten. Bei einem weiteren Experiment, in dem nur die siRNA gegen VEGF eingesetzt wurde, konnte ein deutlicher Rückgang in der Ausbildung von mikrovaskulären Strukturen innerhalb des Tumors gezeigt werden. Das Ergebnis ist vergleichbar mit den Resultaten eines Versuchs, in dem ein Antikörper gegen VEGF eingesetzt wird <sup>[64]</sup>.

#### 4. Diskussion

Zusammenfassend lässt sich hier sagen, dass der wiederholte Einsatz von ALN-VPS in einem Behandlungszeitraum von drei Wochen eine 50 %-ig höhere Überlebensrate bei den Modellmäusen ermöglicht, verglichen mit Kontrollmäusen, dadurch dass Tumorzellen in ihrer Mitose gestört werden und ihnen die Möglichkeit zur eigenen Blutversorgung genommen wird. Es gibt also eine deutliche Wirkung der siRNAs auf Lebertumorzellen. Nach diesen Ergebnissen konnten die ALN-VSP-SNALPs in eine klinische Studie der Phase I eingehen <sup>[64]</sup>.

ALN-PKL1 und ALN-VPS02 zeigen beide einen Erfolg in der Bekämpfung der Tumore. Über diese Delivery-Form der SNALPs konnte die siRNA ohne eine starke Immunantwort auszulösen in die Tumorzellen gelangen und sie bis zu einem gewissen Maß an ihrer weiteren Ausbreitung hindern.

Bei dem TKM-080301 Medikament sind es gleich drei Studien (NCT01437007, NCT01262235, NCT02191878), die bereits für den siRNA Transport über Liposome (LNP = Lipid-Nanopartikel) in viele verschiedene Krebsarten bekannt sind <sup>[v,vi,vii,57,58,61]</sup>. Zu den targetierten Tumoren gehören Kolorektalkarzinome, Pankreaskarzinome, Brustkrebs und Eierstockkrebs mit Lebermetastasen in der ersten Studie, Hepatokarzinome allgemein in der zweiten Studie und in der dritten Neuroendokrine Tumore (NET) und Adrenocorticale Karzinome (ACC) <sup>[v,vi,vii]</sup>. Die Studien werden gesponsert von der Arbutus Biopharma Corporation. Die eingesetzte siRNA-delivery Technologie über die LNPs wurde dabei zusammen mit der Firma Tekmira Pharmaceuticals entwickelt <sup>[viii]</sup>. Die LNPs bestehen aus PEG (Polyethylenglykol-)ylierten Lipiden, Aminolipiden, strukturgebenden Lipiden, Cholesterol und der eingesetzten siRNA <sup>[ix]</sup>. Die siRNA ist dabei, wie bei der ALN-PKL1 Studie, gegen die *Polo-like Kinase 1* (PKL1) gerichtet. PKL1 ist ein Enzym, das von großer Bedeutung bei der Zellteilung ist. Diese Kinase phosphoryliert bestimmte Zellzyklusproteine im Zellkern und führt so eine wichtige regulatorische Funktion in der Zellteilung aus. Bei vielen Tumorarten ist PKL1 überexprimiert <sup>[66]</sup>. Bei einer Inhibition von PKL1 konnte sowohl mitotischer Stillstand, als auch Apoptose von Tumorzellen beobachtet werden <sup>[61,66]</sup>. PKL1 ist damit ein gutes Ziel für eine siRNA-Therapie. Im Rahmen dieser Studien konnte bei fünf von sechs Patienten eine Reduktion der Tumorgröße beobachtet werden <sup>[61]</sup>.

Auch wenn diese Ansätze bereits in klinische Studien eingegangen sind und schon gute Ergebnisse vorweisen, gibt es trotzdem noch einige Limitierungen, die aus dem Weg geräumt oder einfach verbessert werden müssen: Da wären die Toxizität der Nanopartikel zu benennen und auch ihre Größe von 70 nm. SNALPs sind mit 120 nm sogar fast doppelt so groß. Ein Antikörper-siRNA-Konjugat liegt beispielsweise bei lediglich 10 nm und weist somit einen deutlichen Größenvorteil hinsichtlich der Gewebezugänglichkeit gegenüber den anderen siRNA-Transportmolekülen auf. Hinzu kommt, dass die LNPs aus den klinischen Studien noch nicht zielgerichtet in Tumore transportiert werden,

## 4. Diskussion

das birgt die Gefahr, dass auch gesunde Körperzellen von der Behandlung betroffen werden, wenn die siRNA nicht spezifisch genug und gegen generelle Housekeeping-Faktoren gerichtet ist.

Trotzdem lässt sich zusammengefasst sagen, dass der Ansatz der Targeted Therapy und die Behandlung auf Gen-Ebene gerade in der TKM-PKL1 Studie großes Potential zeigt. Es besteht die Hoffnung, dass dieses Potential mit dem vorliegenden Baukastensystem für rezeptorvermittelte RNA Interferenz noch gesteigert werden kann.

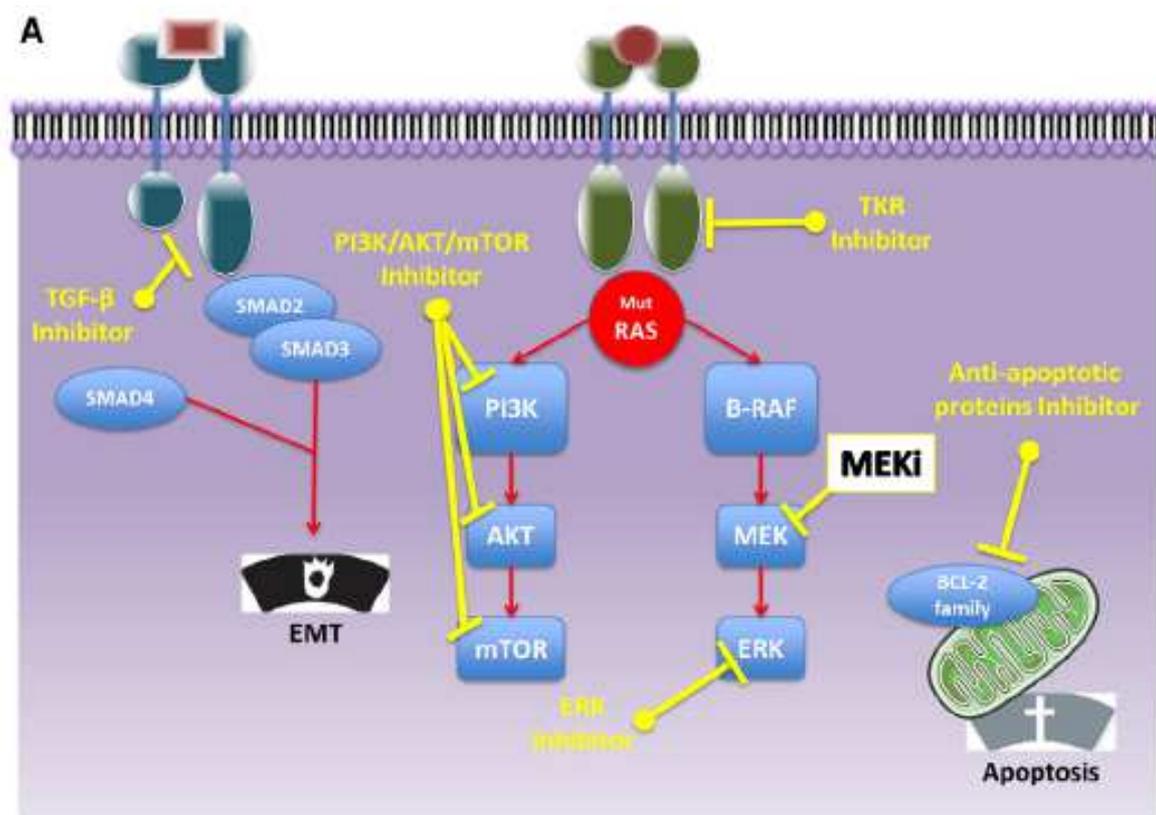
### 4.2 siRNA-Therapie beim Kolorektalkarzinom

In der Kolorektalkarzinomtherapie sind bis heute die operative Entfernung des Tumors und die Chemotherapie die ersten Strategien für die Behandlung dieser Tumorerkrankung. Doch auch die Inhibition des *Epidermal-Growth-Factor*-Rezeptors (EGFR) über den Antikörper Cetuximab ist Teil der Targeted Therapy für Kolorektalkarzinome und gehört mittlerweile zu den Standardbehandlungen. Cetuximab gerichtet gegen EGFR ist ein gut untersuchter monoklonaler Antikörper, der in 790 verschiedenen klinischen Studien Eingang gefunden hat <sup>[x]</sup>. Dabei wird er nicht nur in der Behandlung von Kolorektalkarzinomen, sondern allgemein bei Tumoren, die den EGF-Rezeptor exprimieren eingesetzt. Dazu gehören beispielsweise auch nicht-kleinzellige Lungenkarzinome (NSCLC), sowie Kopf-Hals-Karzinome. In den verschiedenen Studien wird Cetuximab entweder allein oder meistens in Kombination mit einem Zytostatikum eingesetzt. Für Patienten mit einer KRAS-Mutation oder auch mit einer BRAF-Mutation ist dieser Therapieansatz keine Option, da die Mutationen eine Resistenz gegen initialen Cetuximab auslösen. In der mutierten Form sind KRAS und BRAF dauerhaft aktiviert, leiten dadurch das Signal zur Proliferation konstant an den Zellkern weiter und behindern so die *upstream* ansetzende Inhibition des EGFR-Signalwegs. Oft treten diese Mutationen sekundär 9-18 Monate nach Beginn der Cetuximab Behandlung durch einen Mechanismus der Klonselktion auf <sup>[39]</sup>. Durch die Behandlung mit Cetuximab haben die KRAS-mutierten Zellen einen Wachstums-Vorteil gegenüber den KRAS-Wildtyp- Zellen und formen einen Cetuximab-resistenten Tumor. Die Prognose für Patienten mit einer KRAS-Mutation ist deutlich schlechter im Vergleich zu KRAS-Wildtyp-Patienten. Die Fünf-Jahres-Überlebensrate bei metastasierendem CRC liegt bei 11 % <sup>[69]</sup>. Ein Screening der Patienten auf diese Mutationen ist damit essentiell um die optimale Behandlungsstrategie zu entwickeln.

Da 35 - 45 % aller Kolorektalkarzinompatienten eine KRAS-Mutation aufweisen, müssen alternative Therapien eingesetzt werden <sup>[47,69]</sup>. Eine Möglichkeit ist dabei beispielsweise chemische Inhibitoren gegen den MEK-Pathway einzusetzen <sup>[69,70]</sup>. In BRAF-mutierten CRC-Zellen führt der Einsatz von *small-molecule*-MEK-Inhibitoren nachweislich zur Apoptose dieser Zellen. Bei Zellen mit mutiertem BRAF wird durch die MEK-Inhibitoren, der Signalweg unterbrochen und es kommt zum Proliferationsstopp

#### 4. Diskussion

oder sogar zur Apoptose der Zellen <sup>[70]</sup>. Für die KRAS-mutierten Kolorektalkarzinome liegt der Fall wieder etwas anders. Wird hier MEK inhibiert, wird dieser Signalweg gehemmt, KRAS aktiviert jedoch als *overflow*-Mechanismus weitere parallele Signalwege wie den PI3K-Pathway (siehe Abbildung 38). Somit umgehen diese Zellen die Inhibition und das Signal zur Proliferation wird trotzdem an den Zellkern weitergeleitet und kann dann nur durch eine Inhibition von Intermediaten des PI3K Weges gestoppt werden <sup>[70]</sup>. Dieser Umstand macht deutlich, wie schwierig das zielgerichtete Behandeln von KRAS mutierten CRC-Zellen ist. Es müssten daher mehrere Inhibitoren in Kombination eingesetzt werden um die Wirkung des mutierten KRAS aufzuheben. Eine gleichzeitige Hemmung von RAF, MEK und PI3K wäre dabei denkbar <sup>[70]</sup>.



**Abbildung 38: Alternative Behandlungsstrategien bei Patienten mit einer KRAS-Mutation**

Alternativ zu Chemotherapie und Resektion des Tumors werden verschiedene Inhibitoren anderer Signalwege eingesetzt um die Wirkung der KRAS-Mutation einzudämmen. Dazu gehören vor allem MEK-Inhibitoren, ERK-Inhibitoren und Inhibitoren des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs. Entnommen aus [70]

Eine weitere Möglichkeit wäre die Hemmung von KRAS selbst. Bei diesem Ansatz wird mit verschiedenen Molekülen gearbeitet, die so mit dem *Guanine-Nucleotide-Exchange-Factor* (GEF) interagieren, dass KRAS in einen inaktiven Zustand versetzt wird <sup>[69]</sup>. Zu diesem Ansatz gehört auch der Einsatz von Farnesyltransferaseinhibitoren (FTI). FTIs sollen post-translational die Verankerung von KRAS in der Plasmamembran verhindern und so die Funktion von KRAS beeinträchtigen. Was in

#### 4. Diskussion

erster Linie vielversprechend klingt, musste in klinischen Studien allerdings aufgrund von zu geringen Effekten und zu hoher Toxizität eingestellt werden, das Molekül KRAS gilt seitdem als sprichwörtlich „undruggable“<sup>[69]</sup>. Auch die MEK, PI3K und KRAS Inhibitoren zeigen keine überzeugenden Erfolge in der Behandlung und sind limitiert durch die von ihnen ausgelöste Toxizität<sup>[68]</sup>.

Die Suche nach einer möglichen Inhibition von KRAS muss somit fortgesetzt werden, da das Protein selbst aber praktisch nicht für zielgerichtete Therapien beeinflussbar ist, müssen andere Wege gegangen werden. An dieser Stelle setzt die hier vorgelegte Arbeit an: Über die KRAS esiRNA soll die mRNA des mutierten KRAS erst gar nicht abgelesen und das Protein nicht gebildet werden. Das würde zur Hemmung des Signalwegs führen und die Zellen gleichzeitig wieder sensitiv für die Cetuximab Behandlung machen. Die Ergebnisse zeigen zunächst *in vitro*, dass die siRNAs über den EGFR-Antikörper Cetuximab gekoppelt an Protamin in die Zellen transportiert werden und das ein Antikörper, dabei bis zu acht siRNAs transportieren kann. Es konnte gezeigt werden, dass die Koloniebildung der behandelten Zellen und damit ihre Proliferation im Vergleich zu den Kontrollgruppen deutlich eingeschränkt ist. Auch auf Proteinebene wurde nachgewiesen, dass es zu einem Knockdown von KRAS kommt und dadurch gleichzeitig auch zu einer Reduktion der nachfolgenden Komponenten im RAS/RAF/MEK/ERK-Signalweg. Mit Hilfe des MTS-Assays wurde der verringerte Stoffwechsel dieser KRAS-esiRNA behandelten Zellen nachgewiesen und über den Annexin V Assay ihr Eingang in ein frühapoptotisches Stadium. Auch die BrdU-positiven Zellen und damit die proliferierenden Zellen nehmen im Vergleich zu den Kontrollgruppen ab. Am Ende konnte auch im *in vivo* Experiment gezeigt werden, dass durch diesen antikörperunterstützten, rezeptorvermittelten Einsatz von esiRNA gegen KRAS in drei Kolorektalkarzinomzelllinien, die eine KRAS-Mutation aufweisen, das Wachstum der CRC Tumoren deutlich nachlässt, während eine Kolorektalkarzinomzelllinie mit einer BRAF-Mutation diesen Effekt nicht zeigt. Zusammengefasst sind die Ergebnisse für diesen hier bearbeiteten Therapieansatz sehr vielversprechend.

Die Verwendung von siRNAs gegen KRAS findet auch in anderen Arbeitsgruppen bereits ihren Einsatz. Die Arbeitsgruppe um Dr. Scott W. Lowe aus New York beispielsweise nutzt KRAS siRNA ebenfalls im Kolorektalkarzinom um KRAS auszuschalten und erzielt damit große Fortschritte in der Wachstumshemmung von KRAS-mutierten CRC-Tumoren *in vivo*<sup>[68]</sup>. Der Transport der siRNA erfolgt dabei über Nanopartikel aus dem Polymer Cyclodextrin. Der zielgerichtete Transport wird über Transferrin möglich, das, wie bei der CALAA-01 Studie, an den Nanopartikel gekoppelt ist, an den Transferrinrezeptor bindet und so die Internalisierung in die CRC Zelle initiiert. Lowe geht sogar einen Schritt weiter und appliziert nicht nur KRAS siRNA, sondern ganze *libraries* aus siRNAs, die sich gegen mehrere Untereinheiten des RAS/RAF/MEK-Pathways richten, zum Beispiel siRNAs gegen A/B/C-RAF und PI3K. Die Kombinationen der siRNAs erzielten meist einen noch besseren Effekt in der

#### 4. Diskussion

Proliferationshemmung <sup>[68]</sup>. Diese siRNA gefüllten Nanopartikel wurden bereits *in vivo* getestet, fanden aber noch keinen Eingang in eine klinische Studie.

Trotzdem gibt es auch zwei klinische Studien, in der KRAS siRNA bereits eingesetzt wird. Das Behandlungsreagenz dieser Studien wird als siG12D-LODER bezeichnet <sup>[xi,61,71]</sup>. Hintergrund dieser Studien ist die Behandlung von KRAS-mutierten Pankreaskarzinomen mit einer gegen die KRAS Mutation G12D gerichteten siRNA. KRAS ist bei 90 % der Pankreaskarzinompatienten mutiert, das targetieren dieser Mutation ist damit von großem Interesse. Bei siG12D-LODER handelt es sich um eine biologisch abbaubare polymere Matrix, in die anti-KRAS-G12D-siRNA eingebettet ist. Sie wird endoskopisch im Pankreas in Tumornähe platziert und gibt hier topisch über vier Monate die KRAS siRNA frei <sup>[71]</sup>. Diese Behandlung wurde in Kombination mit einer Chemotherapie eingesetzt und die durchschnittliche Überlebensrate konnte auf 16 Monate erhöht werden, während mit Chemotherapie alleine behandelte Patienten ein durchschnittliches Überleben von 11-13 Monaten erzielen <sup>[61]</sup>. Der Einsatz der siRNA verzögert in diesen Studien somit erfolgreich das Tumorwachstum. Durch die polymere Matrix ist die freie siRNA vor dem enzymatischen Abbau durch RNAsen geschützt und kann regelmäßig über einen Zeitraum von vier Monaten an die Tumorzellen abgegeben werden. Ein Pellet von siG12D-LODER hat eine Reichweite von ca. 2 mm, dies ist ein außerordentlich kleiner Radius und somit für größere Tumore nicht anwendbar <sup>[61]</sup>.

Verglichen mit diesen beiden siRNA-Applikationen ergeben sich einige Unterschiede zu dem Ansatz, der in dieser Arbeit behandelt wird. Lowe und seine Arbeitsgruppe verwenden den Transferrinrezeptor als Eingang in die Zelle und sie nutzen Cyclodextrinpolymer-basierende Nanopartikel. Die *in vivo* Experimente zeigen zwar eine Reduktion des Tumorwachstums. Allerdings sind diese Nanopartikel aufgebaut wie die der CALAA-01 Studie <sup>[35,68]</sup>. Von diesen Nanopartikeln ist mittlerweile bekannt, dass sie Leber- und Nierentoxizität zeigen <sup>[63]</sup>. Ein großer Fortschritt dieses Ansatzes ist allerdings, das Lowe et al. in der Lage ist ganze *libraries* an siRNAs zu transportieren und somit neben KRAS auch andere Untereinheiten des RAS/RAF/MEK/ERK-Weges zu targetieren. Dafür setzten sie zusätzlich siRNAs gegen PI3K und A/B/C-RAF ein <sup>[68]</sup>. Wir hoffen mit unserer Strategie des Antikörpertransports zwei Vorteile zu haben: Zum einen sollte die Toxizität geringer sein, da es sich um einen humanen Antikörper handelt, der für den siRNA-Transport eingesetzt wird und er nicht toxisch für den Körper sein sollte. Und zum anderen kann Cetuximab direkt wieder inhibierend wirken, wenn die siRNA übermittelt wurde und KRAS in den Zellen ausgeschaltet ist.

Dadurch, dass Cetuximab 8 siRNAs binden kann, wäre auch hier der Einsatz einer siRNA *library* denkbar. In Abschnitt 4.5 wird diese Möglichkeit mit dem Antikörperkonstrukt ebenfalls mehrere siRNAs erfolgreich zu transportieren dargestellt. Bei den Studien mit der langsam abbaubaren Matrix, die in regelmäßigen Abständen siRNA entlässt, sehen die Ergebnisse sehr vielversprechend aus <sup>[61,71]</sup>.

## 4. Diskussion

Die siRNA ist vor dem Abbau geschützt und dadurch, dass das siG12D-LODER-Pellet endoskopisch platziert wird und dann über vier Monate wirkt, sind keine mehrfachen Behandlungen notwendig. Mit Toxizität hat dieser Ansatz keine Probleme<sup>[71]</sup>. Der Radius, in dem dieses Pellet wirken kann ist mit 2 mm dagegen eher gering und wie viel siRNA nach dem Entlassen tatsächlich in die Zellen gelangt ist nicht ganz erforscht<sup>[61,71]</sup>. Im Gegensatz zu diesem topischen Applikationsprinzip kann der hier vorgestellte Antikörpertransport der siRNA hingegen die siRNA zielgerichtet und vor allem systematisch über den Blutstrom in die Zielzellen transportieren und so vergrößert sich der Radius der getroffenen Zellen.

### 4.3 siRNA-Therapie beim Ewing Sarkom

Die Hauptbehandlungsstrategie des Ewing Sarkoms ist momentan die Chemotherapie in Kombination mit der operativen Entfernung des Tumors und Strahlentherapie<sup>[41,72-74]</sup>. Mit dieser Behandlungsstrategie liegt die Überlebensrate derzeit bei ca. 60 - 70 %<sup>[74]</sup>. Bei Patienten, die bereits Metastasen aufweisen, liegt die Überlebensrate deutlich niedriger und Patienten mit einem Rezidiv zeigen eine Überlebensrate von nur 9 %<sup>[72,81]</sup>. Es besteht daher ein dringender Bedarf an neuen Behandlungsansätzen, die die Überlebensrate signifikant erhöhen. Der erste Ansatz dazu ist die Inhibition des IGF-1-Rezeptors. Die Rolle von IGF-1R und seiner Überexpression auf der Oberfläche von Ewing Sarkom Zellen ist bereits bekannt, deswegen besteht ein Behandlungsversuch darin, den Rezeptor zu blockieren und damit die Signalweiterleitung zur Proliferation in den Zellen zu unterbinden<sup>[73,77,78]</sup>. Durch die Bindung eines IGF-1R-Antikörpers wie beispielsweise GR11L soll der Rezeptor und damit auch die Aktivierung des RAS/RAF/MEK/ERK-Signalwegs unterbunden werden. Erste *in vivo* Versuche der AG Scotlandi zeigten dabei einen signifikant inhibitorischen Effekt auf die Proliferation der Zellen<sup>[77,78]</sup>. In klinischen Studien, die darauf folgten, konnten diese Effekte jedoch nicht reproduziert werden, nur eine ganz geringe Minderheit der Patienten sprach auf die Therapie an und die klinischen Studien wurden daraufhin eingestellt<sup>[72,74]</sup>. Diese Ergebnisse decken sich mit den Meta-Analyse der Arbeitsgruppe um Jiajun Du. Du et. al. verglichen 17 verschiedene klinische Studien, die sich mit der Inhibition des IGF-1-Rezeptors durch die monoklonalen  $\alpha$ IGF-1R-Antikörper Ganitumab, Dalotuzumab, Cixutumumab (IMCA12), Teprotumumab und Figitumumab<sup>[84]</sup>. In keiner dieser Studien konnte ein signifikanter inhibitorischer Effekt auf das Tumorwachstum durch die alleinige Antikörpertherapie erzielt werden. Die Antikörpertherapien zeigten sogar in einigen Studien Toxizität in Form von Hyperglykämie und Neutropenie<sup>[84]</sup>. Die IGF-1R-Antikörper scheiden damit als alleinige Therapie für das Ewing Sarkom aus. In einigen klinischen Studien sind Antikörper gerichtet gegen IGF-1R jedoch immer noch aktiv. Sie werden dabei meistens in Kombination mit einem Chemotherapeutikum eingesetzt<sup>[73]</sup>.

## 4. Diskussion

Der nächste eigene Ansatz befasst sich mit dem CD99 Rezeptor. Da auch von diesem Rezeptor bekannt ist (siehe Abschnitt 1.6.3), dass er auf Ewing Sarkom Zellen überexprimiert wird, wurden präklinisch Antikörper gegen dieses CD99 Oberflächenmolekül eingesetzt <sup>[73,79]</sup>. CD99 soll außerdem in hohem Maße die Apoptose der Zellen einleiten können <sup>[73]</sup>. Die Arbeitsgruppe um Katia Scotlandi konnte zeigen, dass durch den Einsatz eines CD99 Antikörpers die Zahl der Lungen- und Knochenmetastasen in Mäusen deutlich verringert wurden <sup>[79]</sup>. In einer klinischen Studie hat der CD99-Antikörper allerdings keine Anwendung erzielt, da CD99 ebenfalls sehr hoch auf Pankreaszellen und Zellen der hämatopoetischen Linie zu finden ist und somit die Gefahr der Toxizität in anderen Geweben zu hoch ist <sup>[73]</sup>.

Die Applikation von sogenannten Nanocapsules mit Oligonukleotiden gerichtet gegen EWS/FLi1 ist eine weitere Behandlungsoption des Ewing Sarkoms. Im Jahre 2000 hat die Arbeitsgruppe um Patrick Couvreur bereits Oligonukleotide gegen EWS/FLi1 in Nanocapsules in Tumoren in Mäusen injiziert und dabei eine Reduktion des Tumorwachstums erzielt <sup>[80]</sup>. Die Nanocapsules bestehen dabei aus Poly-Isobutylcyanoacrylat und ähneln den in Abschnitt 4.1 und 4.2 beschriebenen Nanopartikeln. Eine Applikation am Menschen ist damit bis jetzt nie zustande gekommen <sup>[80]</sup>.

Es gibt allerdings einen RNA Interferenz Ansatz, der Teil einer klinischen Studie ist <sup>[xii,81]</sup>. Sie basiert auf Daten einer Publikation, die die Behandlung von subkutanen SKNM-C-Tumoren mit einer shRNA gegen EWS/FLi1 vorstellt. Das Plasmid, auf der die shRNA gegen EWS/FLi1 codiert ist, ist dabei in einem kationischen Liposom verpackt und wird *in vivo* intravenös injiziert. Die Mäuse wurden zweimal wöchentlich mit den Lipoplexen behandelt und es konnte eine deutliche Reduktion im Tumorwachstum verzeichnet werden <sup>[81]</sup>. Aus der klinischen Studie sind noch keine Ergebnisse bekannt, da sie erst 2016 gestartet wurde <sup>[xii]</sup>.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zum Thema Ewing Sarkom Therapie reiht sich als neuer Ansatz in die *Targeted Therapy* ein. Mit einer einzigen Translokation, die in 85 % der Ewing Sarkom Zellen vorkommt, kann diese Erkrankung ausgelöst werden. Die mRNA des daraus resultierenden Fusionsproteins bietet theoretisch die perfekte Angriffsstelle für eine siRNA Therapie. Dafür wird die siRNA direkt über den Bruchpunkt entworfen (siehe Abbildung 24). Die Schwierigkeit, diese siRNA zielgerichtet in Zellen zu transportieren wurde im Laufe dieser Arbeit sehr deutlich. Drei verschiedene Antikörper wurden untersucht, bevor ein geeigneter Kandidat als Transportvehikel für ein *in vivo* Experiment zur Verfügung stand.

Begonnen wurde mit dem  $\alpha$ IGF-1R Antikörper GR11L. Er zeigte direkt am Anfang, dass er zur Internalisierung des Rezeptors führt. Mit bis zu 15 siRNAs pro Antikörper nach der Protaminkonjugation hatte er eine fast doppelt so hohe Transportkapazität wie der Cetuximab. Auch der Transport von fluoreszenter siRNA in die Zellen wurde nachgewiesen und der Einsatz der

#### 4. Diskussion

funktionellen siRNA gegen EWS/Fli1 führte zu einem Knockdown des Fusionsproteins sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Level. Im Proliferationsassay konnte nachgewiesen werden, dass durch die Behandlung der Zellen *in vitro* mit dem GR11L-Protamin-EWS/Fli1-siRNA-Komplex, die Proliferation von Ewing Sarkom Zellen gehemmt werden konnte. Limitierend sind in diesem Fall der Preis und die Konzentration des Antikörpers. Für einen *in vivo* Versuch ist GR11L, so wie er zu erwerben ist, zu gering konzentriert und das benötigte Injektionsvolumen würde das erlaubte Injektionsvolumen einer Maus überschreiten. Aus diesem Grund konzentrierten wir uns auf den zweiten Rezeptor, der ebenfalls in Ewing Sarkom Zellen überexprimiert ist: CD99. CD99 ist auf der Zelloberfläche von Ewing Sarkom Zellen deutlich stärker exprimiert als IGF-1R und der Antikörper hCD99 löst die Internalisierung dieser Oberflächenmoleküle aus. Er ist außerdem in der Lage mit 20 siRNAs mehr zu transportieren als GR11L. Nach der Behandlung von Zellen mit fluoreszenter siRNA gekoppelt an hCD99 konnte internalisierte fluoreszierende siRNA beobachtet werden, doch der Einsatz von funktioneller siRNA mit hCD99 zeigte keine Hemmung des Zellwachstums. Da die Anzahl und Form der internalisierten Vesikel allerdings Probleme mit dem sogenannten *Endosomal Escape* vermuten ließen, wurde Chloroquin eingesetzt. Chloroquin, eigentlich eingesetzt als Malariamedikament, ist dafür bekannt, dass es ein *Endosomal Escape* unterstützen kann <sup>[75]</sup>. Durch den Einsatz von Chloroquin und der EWS/Fli1-siRNA gebunden an hCD99-Protamin kam es zu einer Reduktion der Proliferation und des Stoffwechsels der Zellen, was anhand von Colony Formation Assays und dem MTS Assay überprüft wurde. Doch Chloroquin selbst zeigt bereits in nur leicht erhöhten Dosen eine hohe Zelltoxizität und könnte somit auch in der Maus für Nebenwirkungen sorgen <sup>[76]</sup>. Bei einer *in vivo* Applikation könnten unerwünschte Nebenwirkungen auftreten, da CD99 ubiquitär auch auf den hämatopoetischen Linien vertreten ist und falls hCD99 allein einen Effekt auf die Apoptose hat, könnte dies ebenfalls zu einem Problem *in vivo* werden.

Die elegantere und sicherere Variante wäre daher ein Antikörper, der das endosomale „*Targeting*“ der siRNA-Fracht unterstützt und idealerweise auch die Liberalisierung der Fracht aus den vesikulären Strukturen ermöglicht, damit die siRNA zuverlässig in den RNAi-Prozess einfließen kann und nicht im Zuge eines lysosomalen Abbaus degradiert wird. Da bei den umfangreichen *in vitro* und *in vivo*-Tests der potentiellen Carrierantikörper die Konzentration und die ständige Verfügbarkeit der Konjugate eine wichtige Rolle spielen, wurde zudem ein Antikörper entworfen und produziert, der auf der Sequenz des IMCA12 Antikörpers der ehemaligen Firma Imclone (heute Lilly) basiert. Die Schwierigkeit an dieser Stelle bestand darin, ein Plasmid zu entwerfen, das zur Produktion eines intakten vollen IgG Antikörpers führt und sowohl schwere als auch leichte Ketten in perfekter Balance exprimiert wird. Diese Balance ist wichtig um einen möglichst großen Anteil an stabilen und funktionstüchtigen Antikörpern herzustellen, da unvollständige oder falsch gefaltete IgGs in der

#### 4. Diskussion

Produktion in aller Regel abgebaut werden oder sogar toxische Reaktionen in den Produktionszellen hervorrufen können.

Zum Erreichen dieses Ziels werden unterschiedliche Mechanismen des *Genetic Engineering* angewandt: Zunächst wurden leichte und schwere Kette auf zwei unterschiedlichen Plasmiden codiert, die ko-exprimiert werden mussten, mit allen inhärenten Nachteilen eine molaren Imbalance. Weiterhin gibt es Konstrukte, die auf der Wirkung der viralen *Internal Ribosomal Entry Sites* (IRES) beruhen, die die Translation eines durchgehenden Stücks mRNA in mehreren Peptiden ermöglichen und so äquimolare Mengen der leichten und schweren Kette sicherstellen. Neuerdings werden auch die selbstspießenden Peptide (G2A) des *Foot and Mouth Disease Virus* als genetische Tools angewandt, um ein translatiertes langes Polypeptid in mehrer Untereinheiten zu zerteilen <sup>[85]</sup>. Letztere Strategie wurde in dieser Arbeit verwendet und führte zur Produktion des  $\alpha$ IGF-1R-Antikörpers A12 Version 1 (siehe Abbildung 31).

Nach der Etablierung eines stabilen Produktionsklons konnte der Antikörper aus dem Überstand der Produktionszellen isoliert, charakterisiert und an Protamin gekoppelt werden. Dieser Antikörper führt wie der GR11L zur Internalisierung des IGF-1-Rezeptors, hat eine siRNA Bindekapazität von über 80 siRNAs und ist in der Lage, fluoreszierende siRNAs in die Zellen zu transportieren. Interessant an diesem Antikörperkomplex ist, dass wenn Zellen hiermit behandelt werden und dem Licht des Fluoreszenzmikroskops für etwa eine Minute ausgesetzt sind, werden die einschließenden Endosomen destabilisiert und die siRNA verteilt sich daraufhin im gesamten Cytoplasma der Zellen. Die Vermutung dahinter ist, dass ein Teil des Antikörpers ein Motiv besitzt, das die Endosomen zunächst beispielsweise durch den sogenannten *Proton Sponge* Effekt destabilisiert und dann durch die Anregung durch das intensive Fluoreszenzlicht energetisch angeregt wird und so zum Platzen der Vesikel führt. Dieser Prozess findet allerdings auch ohne Lichtzufuhr statt, ist dann nur langsamer. Bei dem *Proton Sponge* Effekt verursachen die eingeschlossenen Komponenten oder bestimmte Sequenzen der Komponenten im Endosom einen hohen  $H^+$  Protoneneinstrom in das Endosom, was zu einem Wassereinstrom und damit erst zum Anschwellen und dann zum Platzen der Endosomen führt <sup>[86]</sup>. Potentielle Sequenzen für diesen Effekt könnten neben dem IgG Backbone auch die G2A Peptide sowie die Furin-Sites *upstream* der Spaltstellen darstellen <sup>[13]</sup>. Tatsächlich sind all diese Sequenzen viralen Ursprungs und ein ganz zentraler Mechanismus des viralen Zyklus, der bei der Freisetzung des Virus aus subzellulären Vesikeln der Wirtszellen, die von verschiedenen kurzen viralen Peptidsequenzen katalysiert wird, wirkt <sup>[13]</sup>. Das genannte *Genetic Engineering* scheint hier einen solchen Einfluss auf die Freisetzung zu haben und auch Protamin selbst wird als *Endosomal Escape Promotor* in Form eines *Proton Sponge* diskutiert <sup>[13]</sup>. Diese Entdeckung der „platzenden Vesikel“ unterstreicht noch einmal, dass die siRNAs tatsächlich in die Zelle transportiert werden. Im Anschluss daran konnte nach einer Behandlung mit der funktionellen EWS/Fli1 siRNA gekoppelt an

## 4. Diskussion

den A12-V1 im Colony Formation Assay eine deutliche signifikante Reduktion der Proliferation festgestellt werden. Auf diese *in vitro* Ergebnisse hin wurde die nächste Charge des Antikörpers, die aufgrund ihrer hohen Konzentration ein *in vivo* Experiment zuließ, für die therapeutische Behandlung von SKNM-C-Xenograft Tumoren in CD1 Mäusen verwendet. Auch *in vivo* konnte gezeigt werden, dass die Tumoren, die die EWS/FLi1 siRNA erhalten haben, in ihrem Volumen kleiner waren im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auch auf Proteinebene innerhalb der Tumore konnte ein Knockdown von EWS/FLi1 gezeigt werden.

Ähnliche Ergebnisse erzielten auch der Einsatz der Nanocapsules mit der shRNA oder die Lipoplexe gefüllt mit EWS/FLi1 siRNA, die sich bereits in einer klinischen Studie befinden. Hier reiht sich auch der Ansatz ein, der mit diesem Antikörpershuttle siRNAs in Ewing Sarkom Zellen transportiert. Dieser Therapieansatz könnte zwei Vorteile gegenüber den beiden vorher genannten RNAi-Ansätzen haben. Zum einen wird keine shRNA verwendet, wie bei den Nanocapsules, denn siRNAs gelangen leichter und schneller in den Weg der RNAi <sup>[87]</sup>. Der zweite Vorteil dieser Methode ist, dass es ein zielgerichteter Transport in die Ewing Sarkom Zellen ist. Bei den Lipoplexen ist das nicht der Fall. Hier werden die kationischen Liposome intravenös injiziert und müssen dann den Tumor finden, vielleicht erreicht dabei nur ein Bruchteil der Liposome tatsächlich ihren Wirkort. Unser Therapieansatz könnte damit durch seine Größe und die duale Selektionsebene von spezifischem Antikörper und Mutations-spezifischer siRNA noch einmal deutlich effizienter sein, als der Transport über Nanocapsules und Liposome.

### 4.4 Zusammenfassung

Das Thema dieser Arbeit lautet „Spezifische Tumorthherapie durch Rezeptorvermittelte RNA Interferenz“. Der Transport von funktionellen siRNAs in Tumorzellen durch ein Antikörper-Shuttle-System, das die Internalisierung des Rezeptors auslöst und so in die Zelle gelangt, konnte im Rahmen dieser Arbeit für zwei verschiedene Krebsformen nachgewiesen werden. Über Cetuximab-Antikörper kann esiRNA gegen KRAS erfolgreich in Kolorektalkarzinomzellen transportiert werden und führt so zu einer Reduktion des Tumorwachstums durch das Ausschalten der onkogenen KRAS-Mutation. So kann auch die Resistenz der Zellen gegen Cetuximab in eine erneute Sensitivität umgewandelt werden und ein darüber hinausgehender Therapieeffekt erzielt werden.

Für das Ewing Sarkom kamen gleich drei Antikörper als mögliche Transportvehikel für die siRNA in die Zellen in Frage. Der A12 V1 ist dabei der vielversprechendste Kandidat. Die Behandlung von Ewing Sarkom Tumoren mit der EWS/FLi1-siRNA gekoppelt an den A12-V1-Protamin führt ebenfalls zu einer

## 4. Diskussion

Hemmung des Tumorwachstums. Die Aufgabenstellung der Arbeit ist damit für beide Krebsformen erfüllt.

### 4.5 Ausblick

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit konnten viele Erkenntnisse über den Therapieansatz der Antikörpervermittelten RNAi in der Krebsbehandlung erlangt werden, die direkt zu neuen therapeutischen Ideen und Ansätzen führen. Allein innerhalb unserer Arbeitsgruppe gibt es mittlerweile Vorarbeiten des rezeptorvermittelten Einsatzes von siRNA in der Therapie für sechs verschiedene Krebsentitäten. Dazu gehören das Rhabdomyosarkom, Non-Hodgkin-Lymphome, das Synovialsarkom, Leukämie, Kolorektalkarzinom und das Ewing Sarkom. Dabei unterscheiden sich die Ansätze für die sechs Formen zum Teil in dem Einsatz des Antikörpers oder in der siRNA. Die Therapie sollte bestenfalls nach einem Baukastenprinzip funktionieren: Die Auswahl an nutzbaren Rezeptoren, gegen die ein Antikörper eingesetzt werden kann, richtet sich dabei nach dem Tumortyp, der behandelt werden soll. Zweitens muss ermittelt werden, welche Mutationen die Zielzelle aufweist, und es werden zielgerichtete siRNAs ausgewählt.

Da Krebszellen meistens mehr als eine tumortreibende Mutation aufweisen, sollten verschiedene Kombinationen von siRNAs eingesetzt werden. Für das Kolorektalkarzinom wurden dafür bereits Vorarbeiten geleistet, bei denen zusätzlich zur KRAS siRNA noch PI3K- und BRAF- siRNA eingesetzt werden. Insbesondere für die PI3K siRNA in Kombination mit der KRAS siRNA ist da ein additiver Effekt zu erkennen <sup>[88]</sup>.

Für das Ewing Sarkom werden ebenfalls zusätzliche inhibitorische siRNAs neben der gegen das initiale Onkogen EWS/Fli1 gesucht. Es wurden dabei bereits siRNAs gerichtet gegen CD99, SYK, EZH2 und cMyc getestet. Alle vier erzielten jedoch allein oder in Kombination nicht den Effekt, den die EWS/Fli1-siRNA isoliert bewirkt. In diesem Bereich muss damit weiter nach kooperativen siRNAs zusätzlich zur EWS/Fli1 siRNA gesucht werden. Wenn solche „siRNA-Cocktails“ größere Effekte erzielen, bedeutet das eine deutliche Effizienzsteigerung des therapeutischen Baukastenprinzips. Dann könnten zunächst alle potentiell onkogenen Mutationen eines Patienten bestimmt und die Therapie dann spezifisch angepasst werden. So wäre diese Therapieform gleichzeitig als individualisierter Therapieansatz zu verstehen.

Ein weiterer Punkt, der direkten Einfluss auf die Effizienz der Behandlung haben kann, ist die applizierte Antikörper-Dosis. Mit 4 mg/kg Antikörper liegen die hier gezeigten Cetuximab-Mengen deutlich unterhalb der Konzentration, die in der Monotherapie in publizierten Mausmodellen als wirksam erachtet wurden. Hier wurden bis zu 40 mg/kg appliziert. Ebenfalls deutlich höher liegen die Dosierungen mit bis zu 400 mg/m<sup>2</sup> Körperoberfläche, die beim Patienten in der Mono- oder

#### 4. Diskussion

Kombinationstherapie eingesetzt werden. Wie genannt, sind die hier vorgestellten Dosierungen beträchtlich geringer, aber trotzdem wirksam, vielleicht könnten höhere Konzentrationen einen besseren Effekt erzielen.

Der nächste Schritt wäre der Einsatz des Therapieansatzes in einer klinischen Studie um Erkenntnisse über die Wirkung dieser Therapie im Patienten zu erlangen. Da die Tumoren durch diese Behandlungen in den Mäusen in ihrem Wachstum aufgehalten wurden, jedoch noch nicht rückläufig waren, wäre vermutlich die Kombination mit einem Chemotherapeutikum nötig oder die Dosierung könnte, wie gesagt, erhöht werden

Die Entdeckung, dass die siRNA-enthaltenden Vesikel, nachdem sie der Fluoreszenzlampe ausgesetzt waren, geradezu explodieren, wirft ebenfalls neue Fragen auf. Kann man sich dieses Phänomen *in vivo* zu nutzen machen? Und funktioniert das bei anderen Antikörpern auch? Oder hängt dieses Phänomen in erster Linie mit dem Umstand zusammen, das die Kontroll-siRNAs für das *Tracking* mit einem Fluoreszenz-Tag versehen ist?

Wie und wann die siRNA aus den Endosomen entkommt, ist ebenfalls noch nicht eindeutig erklärbar. In diesem Bereich wären eventuelle weitere Immunfluoreszenz-Färbungen der Zellen über einen gewissen Zeitraum hilfreich um den genauen Verbleib der siRNA zu ermitteln und vor allem die Carrierantikörper mit möglichst effizienten Peptidsequenzen auszustatten, die eine Destabilisierung der Vesikel und nachfolgendes *Endosomal Release* unterstützen.

Doch an erster Stelle steht für die Fortsetzung dieser Arbeit, der Einsatz des Therapieansatzes in einer Patientenbehandlung, um die Adaptierfähigkeit der rezeptorvermittelten siRNA-Therapie am Menschen zu überprüfen.

## 5. Summary

Cancer belongs to the major causes of death in the world. The treatment of cancer is still a major challenge. Nowadays, the five main treatment strategies of cancer are chemotherapy, radiation, immunotherapy, surgery and targeted therapy. These therapies are often used in combinations of each other depending on the cancer entity. Despite all efforts and some progress being made, a complete individualized therapeutic approach is still missing.

Aim of this work is the development of a new strategy in cancer treatment using RNA interference (RNAi) exhibiting the possibility of an individualized therapy depending on patients and even tumor specific molecular lesions. Therefore, we used RNAi in form of siRNA's. siRNA's are small interfering RNA molecules from 20 to 24 nucleotides and they initiate RNAi enabling a down regulation gene expression.

The main obstacles in siRNA therapy are a) the protection of the siRNA from enzymatic degradation and b) the specific delivery of siRNA molecules into target cells to enable a systemic application. To apply siRNA in therapeutic scenarios, a number of different stabilizing and supportive agents such as immunoliposomes, artificial nanoparticles or antibody/ligand conjugates have been used.

In this study we made use of the specificity of antibodies for guiding the siRNA to the specified target cells and transfer them to the tumor cell cytoplasm by receptor internalization processes. We coupled these antibodies to protamine, which is able to bind and carry multiple nucleic acids.

The first part of this project is focused on the monoclonal EGFR-antibody Cetuximab to deliver KRAS-esiRNA in KRAS-mutated colorectal cancer cells. The anti-KRAS-siRNA should mediate overcoming the Cetuximab resistance of KRAS-mutated colorectal cancer cells and execute an additional therapeutic effect. KRAS-mutated CRC cells treated with the Cetuximab-Protamin-KRAS-esiRNA-complex showed a decreased cell proliferation, reduced metabolic activity, cells were arrested in the G1-phase of the cell cycle and led to apoptosis. Last and most important, the systemic treatment of CRC tumors by Cetuximab/siRNA combinations in CD1 nude mice lead to a significant reduction in tumor growth.

The second part of this project aimed to adapt this new therapeutic approach to a second cancer entity: Ewing Sarcoma (ES). The Ewing Sarcoma is caused by a translocation, that monogenetically leads to the production of the EWS/FLi1 fusion protein. This fusion protein provides an ideal target for the siRNA-therapy approach. Main goal of the adaption to ES was the establishment of a monoclonal antibody as carrier for the fusion-specific siRNAs into the target cells. The first proof-of-concept IGF-1R antibody GR11L lead to a significant reduction in colony formation after GR11L-Protamin-EWS/FLi1-siRNA treatment *in vitro* and also occurs in protein knockdown of EWS/FLi1. But limitations of this antibody did not allow an *in vivo* experiment.

The second tested antibody was the CD99-antibody hCD99, an epitope, that is highly expressed on ES cells. This antibody was able to deliver siRNAs into target cells, but the endosomal escape of siRNAs was an issue and only seen with the supportive application of chloroquine. The third antibody was the IGF-1R antibody A12 V1 produced in our own facility. It delivered siRNAs into the target cells, lead to a significant reduction in colony formation and the tumor growth in an *in vivo* experiment could be inhibited by A12-V1-P-EWS/FLi1-siRNA treatment.

In conclusion, we were able to show reduced tumor cell growth and proliferation of colorectal cancer cells and Ewing Sarcoma cells *in vitro* and *in vivo* by delivery of siRNAs designed against mutated KRAS and EWS/FLi1 via monoclonal antibodies against EGFR, IGF-1R and CD99 into the target cells.

## 6. Danksagung

Zuallererst möchte ich Prof. Dr. Wolfgang E. Berdel danken, dass er mein Erstgutachter und damit Doktorvater geworden ist. Ich habe mich bei Ihnen in den letzten drei Jahren mehr als gut aufgehoben gefühlt. Die regelmäßigen Meetings und Lagebesprechungen zum Forschungsfortschritt haben mich immer sehr beeindruckt. Obwohl Sie die Verantwortung für so viele Mitarbeiter tragen, wussten Sie stets über jedes Projekt im Detail Bescheid und hatten für jede Frage eine Lösung parat. Das würde ich mir gerne zum Vorbild nehmen.

Prof. Dr. Wolf-Michael Weber, als mein Zweitgutachter, möchte ich vor allem dafür danken, dass ich an der Betreuung seiner Praktika teilnehmen durfte. Diese Praktikumswochen im Jahr haben mir sehr viel Freude bereitet und ich hatte das Gefühl einiges von Ihnen zum Thema Lehre und Umgang mit den Studenten zu lernen! Es ist schade, dass die drei Jahre der Praktikumsbetreuung so schnell vorbeigegangen sind. Vielen vielen Dank dafür!

Prof. Dr. Rupert Hallmann danke ich für das stets offene Ohr, dass ich sehr gerne in Anspruch genommen habe. In unseren Besprechungen hatte ich immer das Gefühl, dass Sie meinen Blick auf meine Arbeit immer noch einmal in eine andere Richtung gelenkt haben, durch die sich neue und interessante Ideen entwickelt haben. Und auch für die Tipps rund um „was kommt denn eigentlich nach dem Doktor“ bin ich sehr dankbar!

Mein allergrößter Dank gilt meiner Arbeitsgruppe! Vielen vielen Dank Dr. Sebastian Bäumer, Dr. Nicole Bäumer, Lisa Terheyden, Annika Schulze, Matthias Alex, Annika Gumnior, Felix Sümpelmann und im Herzen zählen auch Annette Westermann und Oliver Klaas dazu. Danke Bata und Nicole, dass ihr mir die Möglichkeit gegeben habt in eurer Arbeitsgruppe zu diesem in meinen Augen unglaublich spannenden Thema, meine Doktorarbeit zu schreiben. Mit euch konnte ich, wenn es sein musste Tag und Nacht über dieses Thema sprechen und neue Ansätze entwickeln, wenn es mal wieder keinen Ausweg gab. Danke auch, dass ihr mich bei meiner Arbeit so unterstützt habt, ich weiß, es ist nicht immer einfach meine Begeisterung in richtige Fachwissenschaft umzuwandeln, für die Geduld danke ich euch sehr.

Der gesamten Arbeitsgruppe mit Bata, Nicole, Lisa, Annika, Matthias, Annika, Felix, Annette und Olli danke ich auch für die tolle Atmosphäre im Labor. Nicht nur die Arbeitsatmosphäre,

## 6. Danksagung

sondern auch die zwischenmenschliche Atmosphäre mit euch hat mich jeden Tag gerne ins Labor kommen lassen, das ist wirklich keine Selbstverständlichkeit und ich hoffe es folgen noch viele solcher Tage.

Lisa muss ich noch einmal extra Danke sagen, dass du all dein Wissen mit mir geteilt und auch bei der hundertsten Nachfrage noch die Nerven bewahrt hast, um es mir erneut zu zeigen. Ich habe sehr sehr viel von dir gelernt!

Und wenn wir beide Mal nicht weiter wussten, wie etwas funktioniert, war auch stets die Arbeitsgruppe Lenz oder unsere liebe Claudi zur Stelle um auszuhelfen. Vielen Dank, das Miteinander untereinander zwischen den Arbeitsgruppen ist ebenfalls nicht selbstverständlich und hat mich mehr als einmal deutlich voran gebracht!

Am Ende möchte ich noch meiner Familie und meinen Freunden danken. Es ist nicht leicht einer begeisterten Biologin den ganzen Tag zuzuhören, wenn sie über ihre Arbeit redet. Ich danke euch, dass ihr es immer wieder aufs Neue mitmacht! ☺

Besonders danke ich dabei meinen Eltern und meinen Geschwistern. Ohne eure Unterstützung in den letzten Jahren, wäre ich nicht so weit gekommen. Ihr seid meine feste Stütze, auf die ich immer bedingungslos bauen kann. Danke!

Ich danke euch allen von Herzen!

## 7. Literaturverzeichnis

1. Bäumer, S., Bäumer, N., Appel, N., Terheyden, L., Fremerey, J., Schelhaas, S., ... Müller-Tidow, C. (2015). Antibody-mediated delivery of anti-KRAS-siRNA in vivo overcomes therapy resistance in colon cancer. *Clinical Cancer Research*, 21(6), 1383–1394.
2. Appel, N., Bäumer, N., Terheyden, L., Buchholz, F., Rossig, C., Müller-Tidow, C., ... Bäumer, S. (2016). Antibody-coupled siRNA as an efficient method for in vivo mRNA knockdown. *Nature Protocols*, 11(1), 22–36. <http://doi.org/10.1038/nprot.2015.137>
3. Dominska, M., & Dykxhoorn, D. M. (2010). Breaking down the barriers: siRNA delivery and endosome escape. *Journal of Cell Science*, 123(Pt 8), 1183–9. <http://doi.org/10.1242/jcs.066399>
4. Stevenson, M. (2003). Dissecting HIV-1 through RNA interference. *Nature Reviews. Immunology*, 3(11), 851–8. <http://doi.org/10.1038/nri1227>
5. Hanahan, D., & Weinberg, R. a. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–74. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
6. Brennecke, J., Stark, A., Russell, R. B., & Cohen, S. M. (2005). Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biology*, 3(3), 0404–0418.
7. Davidson, B. L., & McCray, P. B. (2011). Current prospects for RNA interference-based therapies. *Nature Reviews. Genetics*, 12(5), 329–40. <http://doi.org/10.1038/nrg2968>
8. Wang, Z., Rao, D. D., Senzer, N., & Nemunaitis, J. (2011). RNA interference and cancer therapy. *Pharmaceutical Research*, 28(12), 2983–95. <http://doi.org/10.1007/s11095-011-0604-5>
9. Zhao, Y., & Srivastava, D. (2007). A developmental view of microRNA function. *Trends in Biochemical Sciences*, 32(4), 189–197. <http://doi.org/10.1016/j.tibs.2007.02.006>
10. Torrecilla, J., Rodríguez-Gascón, A., Solinís, M. Á., & Del Pozo-Rodríguez, A. (2014). Lipid nanoparticles as carriers for RNAi against viral infections: Current status and future perspectives. *BioMed Research International*, 2014. <http://doi.org/10.1155/2014/161794>
11. Moore, C. B., Guthrie, E. H., Huang, M. T., & Taxman, D. J. (2010). RNA Therapeutics. *Methods*, 629(2), 141–158. <http://doi.org/10.1007/978-1-60761-657-3>
12. Fire, A., & Mello, C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 391, 1998, S. 806-811
13. Bäumer, N., Berdel, W. E., & Bäumer, S. (2017). Immunoprotein-Mediated siRNA Delivery. *Molecular Pharmaceutics*, 14(5), 1339–1351. <http://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.6b01039>
14. Janku, F., Stewart, D., & Kurzrock, R. (2010). Targeted therapy in non-small-cell lung cancer - is it becoming a reality? *Nature Reviews Clinical Oncology*, 7,(401-414)
15. Campbell (2016), Biologie, Pearson
16. Wells, A. (1999). EGF receptor, *31*(1999), 637–643.
17. Frattini, M., Saletti, P., Molinari, F., & De Dosso, S. (2015). EGFR signaling in colorectal cancer: a clinical perspective. *Gastrointestinal Cancer: Targets and Therapy, Volume 5*, 21. <http://doi.org/10.2147/GICTT.S49002>
18. Krasinskas, A. M. (2011). EGFR Signaling in Colorectal Carcinoma. *Pathology Research International*, 2011, 932932. <http://doi.org/10.4061/2011/932932>
19. Normanno, N., De Luca, A., Bianco, C., Strizzi, L., Mancino, M., Maiello, M. R., ... Salomon, D. S. (2006). Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene*, 366(1), 2–16. <http://doi.org/10.1016/j.gene.2005.10.018>

## 7. Literaturverzeichnis

20. Wee, P., & Wang, Z. (2017). Epidermal growth factor receptor cell proliferation signaling pathways. *Cancers*, 9(5), 1–45. <http://doi.org/10.3390/cancers9050052>
21. Miyamoto, Y., Suyama, K., & Baba, H. (2017). Recent advances in targeting the EGFR signaling pathway 144ft he144 treatment of metastatic colorectal cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(4). <http://doi.org/10.3390/ijms18040752>
22. Kolch, W. (2000). Meaningful relationships: the regulation oft he Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem. J.* (2000), 351, 289-305
23. Downward, J. (2003). Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 3(1), 11–22. <http://doi.org/10.1038/nrc969>
24. Street, K., & Aviv, T. (2001). Insulin-like growth factor 1 ( IGF-1 ): a growth hormone, 1, 311–316.
25. O'Neill, A., Shah, N., Zitomersky, N., Ladanyi, M., Shukla, N., Uren, A., ... Toretsky, J. (2013). Insulin-like growth factor 1 receptor as a therapeutic target in ewing sarcoma: lack of consistent upregulation or recurrent mutation and a review 144ft he clinical trial literature. *Sarcoma*, 2013, 450478. <http://doi.org/10.1155/2013/450478>
26. Belfiore, A., & Malaguarnera, R. (2011). Insulin receptor and cancer. *Endocrine-Related Cancer*, 18(4), 125–147. <http://doi.org/10.1530/ERC-11-0074>
27. Ventura, S., Aryee, D. N. T., Felicetti, F., De Feo, A., Mancarella, C., Manara, M. C., ... Scotlandi, K. (2015). CD99 regulates neural differentiation of Ewing sarcoma cells through miR-34a-Notch-mediated control of NF-κB signaling. *Oncogene*, 35(October), 1–11. <http://doi.org/10.1038/onc.2015.463>
28. Choi, E. Y., Park, W. S., Jung, K. C., Ha, S., Kim, Y. Y., Lee, W. J., & Park, S. H. (1998). Engagement of CD99Induces Up-Regulation of TCR HC Class I and II Molecules on the Surface of Human Thymocytes. *The Journal of Immunology*, (1998), 161, 749-754
29. Riggi, N., Cironi, L., Provero, P., Suva, M.-L., Kaloulis, K., Garcia-Echeverria, C., ... Stamenkovic, I. (2005). Development of Ewing's Sarcoma from Primary Bone Marrow-Derived Mesenchymal Progenitor Cells. *Cancer Res*, 65(24), 11459–11468. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1696>
30. Oh, Y.-K., & Park, T. G. (2009). siRNA delivery systems for cancer treatment. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61(10), 850–62. <http://doi.org/10.1016/j.addr.2009.04.018>
31. Shen, H., Sun, T., & Ferrari, M. (2012). Nanovector delivery of siRNA for cancer therapy. *Cancer Gene Therapy*, 19(6), 367–73. <http://doi.org/10.1038/cgt.2012.22>
32. Rezaee, M., Oskuee, R., Nassirli, H., Nikouei, B. (2016) Progress in the development of lipopolyplexes as efficient non-viral gene delivery systems. *J. Controlled Release* 2016, 236, 1-14
33. Rossi, J. J. (2005). RNAi therapeutics: SNALPing siRNAs in vivo. *Gene Therapy*, 13(7), 583–584. <http://doi.org/10.1038/sj.gt.3302661>
34. Song, E., Zhu, P., Lee, S.-K., Chowdhury, D., Kussman, S., Dykxhoorn, D. M., ... Lieberman, J. (2005). Antibody mediated in vivo delivery of small interfering RNAs via cell-surface receptors. *Nature Biotechnology*, 23(6), 709–17. <http://doi.org/10.1038/nbt1101>
35. Davis, M. E., Zuckerman, J. E., Choi, C. H. J., Seligson, D., Tolcher, A., Alabi, C. a, ... Ribas, A. (2010). Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles. *Nature*, 464(7291), 1067–70. <http://doi.org/10.1038/nature08956>
36. Sioud, M. (2005). RNAi Therapy: Antibodies guide the way. *Gene Therapy*, 13(3), 194–195. <http://doi.org/10.1038/sj.gt.3302634>
37. Petrocca, F., & Lieberman, J. (2011). Promise and challenge of RNA interference-based therapy for cancer. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal 144ft he American Society of Clinical Oncology*, 29(6), 747–54. <http://doi.org/10.1200/JCO.2009.27.6287>

## 7. Literaturverzeichnis

38. Seshacharyulu, P., Ponnusamy, M., Haridas, D., Jain, M., Ganti, A., & Batra, S. (2013). Targeting the EGFR signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 16(1), 15–31. <http://doi.org/10.1517/14728222.2011.648617.Targeting>
39. Misale, S., Yaeger, R., Hobor, S., Scala, E., Liska, D., Valtorta, E., ... Siena, S. (2014). Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature*, 486(7404), 532–536. <http://doi.org/10.1038/nature11156.Emergence>
40. Aleksic, T., Chitnis, M. M., Perestenko, O. V, Gao, S., Thomas, P. H., Turner, G. D., ... Macaulay, V. M. (2011). Europe PMC Funders Group Type 1 IGF receptor translocates 145ft he nucleus of human tumor cells. *Cancer Research*, 70©, 6412–6419. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-0052.Type>
41. Chen, H. X., & Sharon, E. (2013). IGF-1R as an anti-cancer target - trials and tribulations, *Chinese Journal of Cancer* (2013), 32, 242–252.
42. Higano C, Alumkal J, Ryan C, et al. (2009) A phase II study evaluating the efficacy and safety of single agent IMC A12, a monoclonal antibody (mAb), against the insulin like growth factor 1 receptor (IGF-IR), as monotherapy in patients with metastatic, asymptomatic castration resistant prostate cancer. *J Clin Oncol*, 2009, 27 suppl: abstr 5142.
43. Planck, M., Cell, M., Dresden, G., Theis, M., & Buchholz, F. (n.d.). for RNAi Screening.
44. Weinberg, Robert A.: *The Biology of Cancer* (2013), Garland Science
45. Bamberg, M., Molls, M., Sack, H. (2008) Radioonkologie 1- Grundlagen. *Zuckschwerdt verlag München* 2008, 2. Auflage
46. Brenner, H., Kloor, M., Pox, CP. (2014) Colorectal Cancer. *Lancet*, 2014, 383(9927), 1490-502
47. Tan, C., & Du, X. (2012). KRAS mutation testing in metastatic colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 18(37), 5171–5180. <http://doi.org/10.3748/wjg.v18.i37.5171>
48. Stewart, B. and Wild, C.P. (eds.), International Agency for Research on Cancer, W. (2014). World Cancer Report 2014. *The Health Well*. <http://doi.org/9283204298>
49. Ewing, J. (1984). Diffuse Endothelioma of Bone. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, NA;(185), 25. <http://doi.org/10.1097/00003086-198405000-00001>
50. Owen, L. a, Kowalewski, A. a, & Lessnick, S. L. (2008). EWS/FLI mediates transcriptional repression via NKX2.2 during oncogenic transformation in Ewing’s sarcoma. *PloS One*, 3(4), e1965. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0001965>
51. Ginsberg, B. J. P., Alava, E. De, Ladanyi, M., Wexler, L. H., Kovar, H., Paulussen, M., ... Barr, F. G. (1999). EWS-FLI1 a n d EWS-ERG G e n e F u s i o n s A r e A s s o c i a t e d W i t h Similar Clinical Phenotypes in Ewing ’ s Sarcoma, 17(6), 1809–1814.
52. Iwamoto, Y. (2007). Diagnosis and Treatment of Ewing ’ s Sarcoma, 37(2), 79–89.
53. Kelleher, F. C., & Thomas, D. M. (2012). Molecular pathogenesis and targeted therapeutics in Ewing sarcoma/primitive neuroectodermal tumours. *Clin Sarcoma Res*, 2(1), 6. <http://doi.org/10.1186/2045-3329-2-6>
54. Griffith, Wessler, Lewontin, Gelbart, Suzuki, Miller (2004): *Introduction to genetic analysis, Eight Edition*
55. Grohar, P. J., & Helman, L. J. (2013). Prospects and challenges 145ft he development of new therapies for Ewing sarcoma. *Pharmacology & therapeutics*, 137(2), 216–24. Doi:10.1016/j.pharmthera.2012.10.004
56. Segura, T. (2014). siRNA application in nanomedicin, 1–16. <http://doi.org/10.1002/wnan.81.siRNA>
57. Kanasty, R., Dorkin, J. R., Vegas, A., & Anderson, D. (2013). Delivery materials for siRNA therapeutics. *Nature Materials*, 12(11), 967–77. <http://doi.org/10.1038/nmat3765>

## 7. Literaturverzeichnis

58. Zuckerman, J. E., & Davis, M. E. (2015). Clinical experiences with systemically administered siRNA-based therapeutics in cancer. *Nature Reviews Drug Discovery*, 14(12), 843–856. <http://doi.org/10.1038/nrd4685>
59. Manuscript, A. (2012). Current progress in clinical trials, 6(9), 1130–1146. <http://doi.org/10.1002/biot.201100054>.Current
60. Ozcan, G., Ozpolat, B., Coleman, R. L., Sood, A. K., & Medicine, R. (1950). Preclinical and clinical development of siRNA-based therapeutics, 108-119.<http://doi.org/10.1016/j.addr.2015.01.007>. Preclinical
61. Bobbin, M. L., & Rossi, J. J. (2016). RNA Interference (RNAi)-Based Therapeutics: Delivering on the Promise? *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 56(1), 103–122. <http://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010715-103633>
62. Guo, W., Chen, W., Yu, W., Huang, W., & Deng, W. (2013). Small interfering RNA-based molecular therapy of cancers. *Chinese Journal of Cancer*, 32(9), 488–493. <http://doi.org/10.5732/cjc.012.10280>
63. Zuckerman, J. E., Gritli, I., Tolcher, a., Heidel, J. D., Lim, D., Morgan, R., ... Yen, Y. (2014). Correlating animal and human phase Ia/Ib clinical data with CALAA-01, a targeted, polymer-based nanoparticle containing siRNA. *Proceedings 146ft he National Academy of Sciences*, 111(31), 11449–11454. <http://doi.org/10.1073/pnas.1411393111>
64. Rossi, J. J. (2005). RNAi therapeutics: SNALPing siRNAs in vivo. *Gene Therapy*, 13(7), 583–584. doi:10.1038/sj.gt.3302661
65. Taberero, J., Shapiro, G. I., LoRusso, P. M., Cervantes, A., Schwartz, G. K., Weiss, G. J., ... Burris, H. a. (2013). First-in-humans trial of an RNA interference therapeutic targeting VEGF and KSP in cancer patients with liver involvement. *Cancer discovery*, 3(4), 406–17. doi:10.1158/2159-8290.CD-12-0429
66. Judge, A. D., Robbins, M., Levi, J., Hu, L., Fronda, A., Ambegia, E., ... Maclachlan, I. (2009). Technical advance Confirming the RNAi-mediated mechanism of action of siRNA-based cancer therapeutics in mice, 119(3), 661–673. doi:10.1172/JCI37515DS1
67. Marra, E., Palombo, F., Ciliberto, G., & Aurisicchio, L. (2013). Kinesin spindle protein SiRNA slows tumor progression. *Journal of cellular physiology*, 228(1), 58–64. doi:10.1002/jcp.24103
68. Yuan, T. L., Fellmann, C., Lee, C. S., Ritchie, C. D., Thapar, V., Lee, L. C., ... Lowe, S. W. (2014). Development of siRNA payloads to target KRAS-Mutant cancer. *Cancer Discovery*, 4(10), 1182–1197. <http://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0900>
69. Knickelbein, K., & Zhang, L. (2015). Mutant KRAS as a critical determinant 146ft he therapeutic response of colorectal cancer. *Genes and Diseases*, 2(1), 4–12. <http://doi.org/10.1016/j.gendis.2014.10.002>
70. Neuzillet, C., Tijeras-Raballand, A., De Mestier, L., Cros, J., Faivre, S., & Raymond, E. (2014). MEK in cancer and cancer therapy. *Pharmacology and Therapeutics*, 141(2), 160–171. <http://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.10.001>
71. Golan, T., Hubert, A., Shemi, A., Segal, A., Dancour, A. et al. (2013) A Phase I trial of a local delivery of siRNA against k-ras in combination with chemotherapy for locally advanced pancreatic adenocarcinoma. *J. Clin. Oncol.* 31(Suppl.):4037
72. Ozaki, T. (2015). Diagnosis and treatment of Ewing sarcoma 146ft he bone: a review article. *Journal of Orthopaedic Science*, 20(2), 250–263. <http://doi.org/10.1007/s00776-014-0687-z>
73. Jain, S., Kapoor, G. (2010) Chemotherapy in Ewing’s sarcoma. *Indian J. Orthop.*, 2010, Oct-Dec; 44(4): 369-377.

## 7. Literaturverzeichnis

74. Van De Luijngaarden, A. C. M., Versleijen-Jonkers, Y. M. H., Roeffen, M. H. S., Schreuder, H. W. B., Flucke, U. E., & Van Der Graaf, W. T. A. (2013). Prognostic and therapeutic relevance 147ft he IGF pathway in Ewing's sarcoma patients. *Targeted Oncology*, 8(4), 253–260. <http://doi.org/10.1007/s11523-012-0248-3>
75. Lönn, P., Kacsinta, A. D., Cui, X.-S., Hamil, A. S., Kaulich, M., Gogoi, K., & Dowdy, S. F. (2016). Enhancing Endosomal Escape for Intracellular Delivery of Macromolecular Biologic Therapeutics. *Nature Publishing Group*, 6(March 2016), 32301. <http://doi.org/10.1038/srep32301>
76. Erazo-Oliveras, A., Muthukrishnan, N., Baker, R., Wang, T. Y., & Pellois, J. P. (2012). Improving the endosomal escape of cell-penetrating peptides and their cargos: Strategies and challenges. *Pharmaceuticals*, 5(11), 1177–1209. <http://doi.org/10.3390/ph5111177>
77. Scotlandi, K., Maini, C., Manara, M. C., Benini, S., Serra, M., Cerisano, V., ... Picci, P. (2002). antisense strategy against Ewing ' s sarcoma cells, (2002), 296–307.
78. Scotland, K., Benini, S., Nanni, P., Lollini, P., Nicoletti, G., Landuzzi, L., ... Bologna, U. (1998). Blockage of Insulin-like Growth Factor-I Receptor Inhibits the Growth of Ewing ' s Sarcoma in Athymic Mice1. *Cancer Research*, 33258, 4127–4132.
79. Scotlandi, K., Baldini, N., Cerisano, V., Manara, M. C., Benini, S., Serra, M., ... Picci, P. (2000). CD99 Engagement : An Effective Therapeutic Strategy for Ewing Tumors CD99 Engagement : An Effective Therapeutic Strategy for Ewing Tumors 1, 5134–5142.
80. Lambert, G., Bertrand, J. R., Fattal, E., Subra, F., Pinto-Alphandary, H., Malvy, C., ... Couvreur, P. (2000). EWS Fli-1 Antisense Nanocapsules Inhibits Ewing Sarcoma-Related Tumor in Mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 279(2), 401–406. <http://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3963>
81. Rao, D. D., Jay, C., Wang, Z., Luo, X., Kumar, P., Eysenbach, H., ... Nemunaitis, J. (2016). Preclinical Justification of pbi-shRNA EWS/FLI1 Lipoplex (LPX) Treatment for Ewing's Sarcoma. *Molecular Therapy*, 24(8), 1412–1422. <http://doi.org/10.1038/mt.2016.93>
82. Sorigi, F., Bhattacharya, S., & Huang, L. (1997). Protamine sulfate enhances lipid-mediated gene transfer. *Gene Therapy*, 4(1997), 961–968. <http://doi.org/10.1038/sj.gt.3300484>
83. Padma, V.V. (2015) An overview of targeted cancer therapy. *BioMedicine*, 5(2015), 1-6.
84. Qu, X., Wu, Z., Dong, W., Zhang, T., Wang, L., Pang, Z., ... Du, J. (2017). Update of IGF-1 receptor inhibitor (ganitumab, dalotuzumab, cixutumumab, teprotumumab and figitumumab) effects on cancer therapy. *Oncotarget*, 8(17), 29501–29518. <http://doi.org/10.18632/oncotarget.15704>
85. Chng, J., Wang, T., Nian, R., Lau, A., Hoi, K. M., Ho, S. C. L., ... Bi, X. (2015). Cleavage efficient 2A peptides for high level monoclonal antibody expression in CHO cells Cleavage ef fi cient 2A peptides for high level monoclonal antibody expression in CHO cells, 862(February 2016), 403–412. <http://doi.org/10.1080/19420862.2015.1008351>
86. Varkouhi, A. K.; Scholte, M.; Storm, G.; Haisma, H. J. (2011) Endosomal escape pathways for delivery of biologicals. *J. Controlled Release* 2011, 151, 220-228
87. Chng, J., Wang, T., Nian, R., Lau, A., Hoi, K. M., Ho, S. C. L., ... Bi, X. (2015). Cleavage efficient 2A peptides for high level monoclonal antibody expression in CHO cells Cleavage ef fi cient 2A peptides for high level monoclonal antibody expression in CHO cells, 862(February 2016), 403–412. <http://doi.org/10.1080/19420862.2015.1008351>
88. Bäumer, N.; Rehkämper, J.; Appel, N.; Terheyden, L.; Berdel, W. E.; Bäumer, S. (2017) Downregulation of PIK3CA via antibody-siRNA-complexes suppresses tumor growth. *Submitted*

## Internetquellen

- (i) <https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/treatment-types.html>
- (ii) <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types>
- (iii) <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT00689065?term=NCT00689065&rank=1>
- (iv) <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01158079?term=NCT01158079&rank=1>
- (v) <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01437007?term=NCT01437007&rank=1>
- (vi) <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01262235?term=NCT01262235&rank=1>
- (vii) <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02191878?term=NCT02191878&rank=1>
- (viii) <http://investor.arbutusbio.com/releasedetail.cfm?releaseid=889197>
- (ix) <http://arbutusbio.com/our-science/lnp-delivery-platform.php>
- (x) [https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=Cetuximab&cntry1=&state1=&recrs=8&ved=0ahUKEwiSwb6Ep\\_jVAhWKYVAKHUs6BCYQjRwIBw&url=http%3A%2F%2Fprod2.biotechniques.com%2Fprotocols%2F2012\\_Protocol\\_Guide%2Ftrans-Blot-Turbo-Transfer-System%2Fbiotechniques-325107.html&psig=AFQjCNEDZV8VyQbmOLegULC2UfdzDiz3\\_Q&ust=1503953902025951](https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=Cetuximab&cntry1=&state1=&recrs=8&ved=0ahUKEwiSwb6Ep_jVAhWKYVAKHUs6BCYQjRwIBw&url=http%3A%2F%2Fprod2.biotechniques.com%2Fprotocols%2F2012_Protocol_Guide%2Ftrans-Blot-Turbo-Transfer-System%2Fbiotechniques-325107.html&psig=AFQjCNEDZV8VyQbmOLegULC2UfdzDiz3_Q&ust=1503953902025951)
- (xi) <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=siG12D-LODER&cntry1=&state1=&Search=Search>
- (xii) <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02736565?term=pbi-shRNA&rank=2>
- (xiii) [https://www.google.de/url?sa=i&rct=j&q=&esrc=s&source=images&cd=&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwiSwb6Ep\\_jVAhWKYVAKHUs6BCYQjRwIBw&url=http%3A%2F%2Fprod2.biotechniques.com%2Fprotocols%2F2012\\_Protocol\\_Guide%2Ftrans-Blot-Turbo-Transfer-System%2Fbiotechniques-325107.html&psig=AFQjCNEDZV8VyQbmOLegULC2UfdzDiz3\\_Q&ust=1503953902025951](https://www.google.de/url?sa=i&rct=j&q=&esrc=s&source=images&cd=&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwiSwb6Ep_jVAhWKYVAKHUs6BCYQjRwIBw&url=http%3A%2F%2Fprod2.biotechniques.com%2Fprotocols%2F2012_Protocol_Guide%2Ftrans-Blot-Turbo-Transfer-System%2Fbiotechniques-325107.html&psig=AFQjCNEDZV8VyQbmOLegULC2UfdzDiz3_Q&ust=1503953902025951)
- (xiv) <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/targeted-therapies/targeted-therapies-fact-sheet>
- (xv) [https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=siRNA&cntry1=&state1=&recrs=8&ved=0ahUKEwiSwb6Ep\\_jVAhWKYVAKHUs6BCYQjRwIBw&url=http%3A%2F%2Fprod2.biotechniques.com%2Fprotocols%2F2012\\_Protocol\\_Guide%2Ftrans-Blot-Turbo-Transfer-System%2Fbiotechniques-325107.html&psig=AFQjCNEDZV8VyQbmOLegULC2UfdzDiz3\\_Q&ust=1503953902025951](https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=siRNA&cntry1=&state1=&recrs=8&ved=0ahUKEwiSwb6Ep_jVAhWKYVAKHUs6BCYQjRwIBw&url=http%3A%2F%2Fprod2.biotechniques.com%2Fprotocols%2F2012_Protocol_Guide%2Ftrans-Blot-Turbo-Transfer-System%2Fbiotechniques-325107.html&psig=AFQjCNEDZV8VyQbmOLegULC2UfdzDiz3_Q&ust=1503953902025951)

## 8. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Sechs Merkmale der Tumorentstehung
- Abbildung 2: Die fünf Hauptbehandlungsansätze von Krebs
- Abbildung 3: Die Auswirkung einer KRAS-Mutation auf die Proliferation
- Abbildung 4: Das Ewing Sarkom
- Abbildung 5: Die Haupttranslokation des Ewing Sarkoms
- Abbildung 6: Die RNA Interferenz
- Abbildung 7: Immunoliposome als siRNA-Carriersystem
- Abbildung 8: siRNA-Transport über polymer-basierte Nanopartikel
- Abbildung 9: Bindung von siRNA an einen monoklonalen Antikörper
- Abbildung 10: Der Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)
- Abbildung 11: Der Insulin-like Growth Factor-1 Receptor (IGF-1R)
- Abbildung 12: siRNA-Transport in Krebszellen durch monoklonale Antikörper
- Abbildung 13: Produktionsvektor A12 V1
- Abbildung 14: Proteintransfer auf eine PVDF-Membran
- Abbildung 15: Ligationsgel für die Ligation des Produktionsplasmids pcDNA3.1(+)/A12-Version-1-G2A-EGFP
- Abbildung 16: Kontrollverdau Minis pcDNA3.1(+)/A12-Version-1-G2A-EGFP
- Abbildung 17: Internalisierungs- und siRNA-Bindeeigenschaften des Cetuximab-Protaminkonjugats über den chemischen Linker sulfo-SMCC.
- Abbildung 18: Internalisierung von fluoreszierender siRNA gekoppelt an den EGFR-Antikörper Cetuximab-Protamin in Kolorektalkarzinomzellen
- Abbildung 19: Effekt von EGFR Antikörper Cetuximab-Protamin-KRAS-esiRNA auf die Proliferation von Kolorektalkarzinomzelllinien mit einer KRAS Mutation und der Effekt der KRAS-esiRNA Behandlung auf Proteinebene
- Abbildung 20: Wirkung der EGFR Antikörper Cetuximab-Protamin-KRAS-esiRNA-Behandlung auf die Viabilität und Proliferation von fünf verschiedenen Kolorektalkarzinom Zelllinien
- Abbildung 21: *In vivo* Behandlung von Kolorektalkarzinom-Xenografts mit EGFR Antikörper Cetuximab-Protamin-KRAS-esiRNA in CD1 Nacktmäusen
- Abbildung 22: Internalisierungs- und siRNA-Bindeeigenschaften des IGF1-R Antikörpers GR11L gekoppelt an Protamin über den chemischen Linker sulfo-SMCC.
- Abbildung 23: Internalisierung von fluoreszierender siRNA gekoppelt an den IGF-1R Antikörper GR11L
- Abbildung 24: Eingesetzte siRNAs gegen das Fusionsgen EWS/FLI1

## 8. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 25: Effekt des IGF-1R Antikörpers GR11L-Protamin-siRNA Komplex Behandlung auf mRNA- und Proteinlevel, sowie Einfluss auf Zellproliferation in Ewing Sarkom Zelllinien
- Abbildung 26: Internalisierungs- und siRNA-Bindeeigenschaften des  $\alpha$ CD99 Antikörpers hCD99 gekoppelt an Protamin über den chemischen Linker sulfo-SMCC
- Abbildung 27: Internalisierung grün fluoreszierender siRNA durch den CD99 Antikörper hCD99 gekoppelt an ( $\alpha$ CD99 hCD99-P oder  $\alpha$ CD99-mAK hCD99-P) und der Effekt auf die Zellproliferation von Sarkomzelllinien nach hCD99-Protamin-EWS/FLi1-siRNA Behandlung
- Abbildung 28: Chloroquinbehandlung der Zellen unterstützt das Entkommen der siRNA aus dem Endosom.
- Abbildung 29: Effekt von hCD99-P-EWS/FLi1-siRNA-Behandlung auf die Proliferation von Ewing Sarkom Zelllinien mit Chloroquin als *Endosomal Escape*-Unterstützung.
- Abbildung 30: Effekt von hCD99-Protamin-EWS/FLi1-siRNA Behandlung auf die relative Viabilität (MTS-Assay) von fünf verschiedenen Sarkomzelllinien mit Chloroquin als *Endosomal Escape*-Unterstützung
- Abbildung 31: Produktion des IGF-1R Antikörpers A12 V1 E7 in CHO-S Zellen
- Abbildung 32: Internalisierungs- und siRNA-Bindeeigenschaften des IGF-1R Antikörpers A12 V1 E7 gekoppelt an Protamin über den chemischen Linker sulfo-SMCC
- Abbildung 33: Internalisierung fluoreszierender siRNA mit Hilfe des IGF1-R Antikörpers A12 V1 und Triggern Freisetzung der siRNA unter Lichteinfluss
- Abbildung 34: Effekt von IGF-1R Antikörper A12 V1-P-EWS/FLi1-siRNA Behandlung auf die Proliferation von drei verschiedenen Sarkomzelllinien
- Abbildung 35: Erste *in vivo* Behandlungen von SKNM-C Tumoren in CD1 Nacktmäusen mit dem IGF-1R Antikörper A12 V1 gekoppelt an EWS/FLi1-siRNA
- Abbildung 36: Subzelluläre Lokalisation der Antikörper-siRNA Komplexe nach der Internalisierung
- Abbildung 37: Cyclodextrin-basierter Nanopartikel CALAA-01
- Abbildung 38: Alternative Behandlungsstrategien bei Patienten mit einer KRAS-Mutation

## 9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte und Verbrauchsmaterialien derdurchgeführten Experimente

Tabelle 2: Puffer, Lösungen, Medien und ihre Zusammensetzung

Tabelle 3: Eingesetzte Chemikalien

Tabelle 4: Die eingesetzten siRNAs, ihre Sequenz und der Hersteller

Tabelle 5: Eingesetzte Primer für die Klonierung von pcDNA3.1(+)/A12-Version-1-G2A-EGFP

Tabelle 6: Verwendete Zelllinien

Tabelle 7: Eingesetzte Restriktionsenzyme

Tabelle 8: Eingesetzte Western Blot Antikörper

Tabelle 9: Eingesetzte Immunfluoreszenz Antikörper

Tabelle 10: Eingesetzte Antikörper für die siRNA-Antikörper-Behandlung

Tabelle 11: Verwendete Kits

Tabelle 12: Eingesetzte Plasmidmenge pro Zellzahl und Transfektion von CHO-S Zellen

Tabelle 13: PEI-Menge pro Zellzahl und Transfektion

Tabelle 14: Mediummenge pro Zellzahl und Transfektion in einer 1 l Flasche

Tabelle 15: Kopplungsansätze von Protamin und sulfo-SMCC der verschiedenen Antikörper

Tabelle 16: Pipettierschema Band Shift Cetuximab 18,8 µM

Tabelle 17: Pipettierschema Band Shift GR11L 0,32 µM

Tabelle 18: Pipettierschema Band Shift hCD99 1,96 µM

Tabelle 19: Pipettierschema Band Shift A12 V1 mit 0,78 µM

Tabelle 20: Rezeptorinternalisierungs-FACS Cetuximab 18,8 µM

Tabelle 21: Rezeptorinternalisierungs-FACS GR11L 0,32 µM

Tabelle 22: Rezeptorinternalisierungs-FACS hCD99 1,96 µM

Tabelle 23: Rezeptorinternalisierungs-FACS A12 V1 0,78 µM

Tabelle 24: Behandlungsschema MTS-Assay hCD99 inklusive Chloroquinbehandlung

Tabelle 25: BCA-Assay für Western Blot

Tabelle 26: Probenvorbereitung Western Blot A673 nach GR11L-P-siRNA-Behandlung

Tabelle 27: Belegungsschema 96-Well Platte RT-PCR

Tabelle 28: Mastermix abl

Tabelle 29: Mastermix EWS/Fli1

Tabelle 30: PCR Ansatz für die Klonierung des A12 V1 Produktionsvektors

Tabelle 31: PCR Programm A12 V1 Produktionsvektor

Tabelle 32: Ligation des A12 V1 Produktionsvektors

Tabelle 33: Sequenzierungsansatz des A12 V1 Produktionsvektors

Tabelle 34: Sequenzierprogramm des A12 V1 Produktionsvektors

## 10. Abkürzungsverzeichnis

7AAD	7-Aminocytinomycin
A	Adenin
A12 V1-P	A12 V1-Protamin
AD	Admantan
AGO	Argonautenprotein
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Bovine Serum Albumine
C	Cytosin
CDP	Cyclodextrin Containing Polymer
Cetuximab-P	Cetuximab-Protamin
CRC	Colorectal Cancer
DGCR8	Microprozessor Complex Subunit
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP's	Nukleosidtriphosphate
E-Cup	Eppendorfggefäß
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EEA1	Early Endosome Antigen 1
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ErbB	Rezeptor Tyrosinkinase Familie
ERG	ETS-related Gene
ERK	Extracellular Signal Regulated Kinase
ETS	Transcription Factor Family
EWS	RNA Binding Protein
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	Fötales Kälberserum (Fetal Calve Serum)
Fli1	Friend Leukemia Integration 1 Transcription Factor
G	Guanin
g	gravitation
GAM	Goat anti Mouse
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	GTP-Exchange Factor
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GR11L-P	GR11L-Protamin
GRB2	Growth Factor Receptor Bound Protein 2
GTP	Guanosintriphosphat
hCD99-P	hCD99-Protamin
HDL	High Density Lipoprotein
IGF-1	Insulin-like Grpwth Factor
IGF-1R	Insulin-like-Growth Factor 1 Receptor
kDa	Kilodalton
KRAS	Kirsten Rat Sarcoma Virus
KSP	Kinesin Spindle Protein
LAMP1	Lysosomal Associated Membrane Protein 1
LDL	Low Density Lipoprotein
m	Milli/Meter
mAB	monoklonaler Antikörper
MEK	Mitogen Activated Protein Kinase
miRNA	micro RNA

## 10. Abkürzungsverzeichnis

mRNA	messenger RNA
NaCl	Natriumchlorid
PACT	dsRNA Binding Protein
PBS	Phosphate Buffered Saline
PE	Phycoerythrin
PEG	Polyethylenglykol
PEI	Polyethylenimin
pH	Potentia Hydrogenii
PLL	Poly-L-Lysin
PS	Phosphatidylserin
RAF	Rapidly Accelerated Fibrosarcoma Protein
RAS	Rat Sarcoma Protein
RISC	RNA induced silencing complex
RNAi	RNA Interferenz
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	sodiumdodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis
siRNA	small interfering RNA
SOS 1	Son of Sevenless Homolog 1
sulfo-SMCC	(sulfosuccinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate
T	Thymin
TGE	transiente Genexpression
TLR	Toll-Like-Receptor
TRBP	TAR RNA Binding Protein
U	Uracil
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
α	anti
μ	mikro

## 11. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die Dissertation mit dem Titel „Spezifische Tumorthherapie durch Rezeptorvermittelte RNA Interferenz“ in dem Labor für Molekulare Hämatologie und Onkologie der Medizinischen Klinik A unter der Anleitung von Univ. Prof. Dr. med. Wolfgang E. Berdel

- selbstständig angefertigt,
- nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Quellen und Materialien angefertigt,
- keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen,
- sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Prüfungsarbeit oder zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt habe.

Mir ist die Promotionsprüfungsordnung des Fachbereichs 13 Biologie der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät vom 29.11.2007 mit der letzten Änderung vom 9.8.2016 bekannt.

---

Ort, Datum

---

Neele Appel