
Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie

Vorstand: Prof. Dr. Stefan Endres

Medizinische Klinik und Poliklinik IV

Klinikum der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Martin Reincke

**Tumorzellspezifisches Targeting von
therapeutischen Nukleinsäuren mittels *virus-like particles*
zur Immuntherapie von Tumoren**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Lorenz Kocheise

aus Ulm

2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Max Schnurr

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Marion Subklewe
Prof. Dr. Tobias Feuchtinger

Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter: Dr. Lars König
Prof. Dr. Simon Rothenfuß

Dekan: Prof. Dr. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 19.05.2022

Meinen Eltern

1 Einleitung	1
1.1 Allgemeine Einleitung	1
1.2 Therapeutische Nukleinsäuren	3
1.3 <i>Virus-like particles</i> (VLPs)	11
1.4 Zielsetzung dieser Dissertation	15
2 Material und Methoden	16
2.1 Material	16
2.2 Zellbiologische Methoden	23
2.3 Molekularbiologische Methoden	26
2.4 Proteinbiochemische Methoden	29
2.5 Software und statistische Methoden	33
3 Ergebnisse	34
3.1 Die Transfektion von Nukleinsäuren mittels VLPs	34
3.2 VLPs als Transportvehikel für therapeutische Nukleinsäuren	41
3.3 Tumorspezifisches Retargeting der VLPs	46
4 Diskussion	55
4.1 Die Transfektion von Nukleinsäuren mittels VLPs	55
4.2 Modifikation des VLP-Tropismus	59
5 Zusammenfassung	61
Literaturverzeichnis	62
Verzeichnis der Abkürzungen	69
Lebenslauf	70
Danksagung	71
Eidesstattliche Versicherung	72

1 Einleitung

1.1 Allgemeine Einleitung

1.1.1 Immuntherapie maligner Erkrankungen

Mit einer prognostizierten Inzidenz von 538.336 Fällen für das Jahr 2020 und 217.615 jährlichen Todesfällen stellt Krebs die zweithäufigste Todesursache in Deutschland dar (Quante et al. 2016). In den vergangenen Jahrzehnten fußte die Therapie maligner Erkrankungen im Wesentlichen auf drei Säulen: der Chirurgie, der Strahlentherapie und der Chemotherapie. In den vergangenen Jahren konnte sich jedoch eine neue Therapieform als vierte Säule der Krebstherapie etablieren: die Tumorimmuntherapie.

Obwohl die experimentellen Ursprünge der Tumorimmuntherapie bis in das vorletzte Jahrhundert reichen (Bruns et al. 1887, Coley et al. 1891, Ehrlich et al. 1909), sollte erst in den 1950er Jahren durch Macfarlane Burnet und Lewis Thomas eine Theorie der Interaktion von Immunsystem und Tumor erarbeitet werden. Hierbei wurde postuliert, dass das Immunsystem das gesunde Körpergewebe überwache und neu entstehende Tumorzellen zerstöre (Burnet et al. 1957, Thomas et al. 1959). Dieses Konzept der *cancer immunosurveillance* konnte nach gegenteiligen experimentellen Befunden in den 1970er Jahren (Stutman et al. 1974) erst mit der Entwicklung geeigneterer Forschungsmethoden zur Jahrtausendwende endgültig bewiesen werden (Shankaran et al. 2001).

Alle Krebsarten akkumulieren während ihrer Entstehung eine Vielzahl an unterschiedlichsten DNA-Mutationen in unterschiedlichsten zellulären Signalwegen wie z.B. dem MAP-Kinase-Signalweg (Stratton et al. 2009, Hanahan et al. 2011). Die resultierenden veränderten Aminosäuresequenzen stellen sogenannte Neoantigene dar, welche im restlichen Körper in dieser Form nicht vorkommen. Diese für die Krebszellen hochspezifischen Antigene werden auch als *tumor-specific antigen* (TSA) bezeichnet. Es leuchtet also ein, dass

Krebszellen, die diese unphysiologischen Proteine exprimieren und dem Immunsystem über das HLA-System präsentieren, zur Aktivierung von spezifischen T-Lymphozyten führen können. Folglich sollte es dem Immunsystem möglich sein, mit sich ständig verändernden Krebszellen durch immer neue Permutationen des eigenen Lymphozyten-Repertoires Schritt zu halten.

Neben TSAs exprimieren Tumore durch genetische und epigenetische Modifikationen auch Proteine, welche von gesunden Zellen nur spärlich oder zu bestimmten Entwicklungszeitpunkten - wie z.B. der Embryonalperiode - hergestellt werden. Die daraus entstehenden Antigene bezeichnet man auch als *tumor-associated antigens* (TAA). Es zeigte sich schon früh, dass auch diese Antigene durch das Immunsystem als fremd erkannt werden können und eine Immunantwort provozieren (van der Bruggen et al. 1991). Dass diese tumorassoziierten Proteine als sogenannte therapeutische Targets fungieren können, wurde durch die klinische Zulassung der gegen CD20 bzw. ERBB2 (HER2) gerichteten monoklonalen Antikörper Rituximab und Trastuzumab 1997 bzw. 1998 demonstriert. Tumorantigene wurden auch für die hier vorliegende Arbeit als mögliche Zielstrukturen eines tumorspezifischen Targetings herangezogen.

Es zeigte sich, dass Tumorzellen im Zuge der Tumorprogression nicht etwa durch Antigenverlust komplett „unsichtbar“ für das Immunsystem werden, sondern eine Immuntoleranz - insbesondere des T-Zellkompartiments - aktiv vom Tumor induziert wird (Willimsky et al. 2005). Eine heterogene Gruppe von Proteinen, die sogenannten Immun-Checkpoints, spielen hierbei eine Schlüsselrolle. Zu den prominentesten Vertretern dieser Gruppe zählt das *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein* (CTLA-4) (Brunet et al. 1987) sowie insbesondere der *programmed death-ligand 1* (PD-L1) (Dong et al. 1999). Mit der klinischen Zulassung der monoklonalen Antikörper Ipilimumab 2011 sowie Pembrolizumab und Nivolumab 2014, sogenannten Immun-Checkpoint-Inhibitoren, welche diese immunsuppressiven Mechanismen durchbrechen, gelang der Tumorimmuntherapie der klinische Durchbruch. Die beeindruckenden Langzeittherapiefolge dieser neuartigen Therapieform,

insbesondere im malignen Melanom (Larkin et al. 2019), rückten die antitumorale Immunantwort in das Zentrum des onkologischen Interesses.

Noch profitiert nur ein Teil aller Patienten von den Erfolgen der Immuntherapie (Kalbasi et al. 2020). Immer klarer wurde in den letzten Jahren jedoch, dass sich Tumore in dieser Hinsicht besser durch ihre individuelle Immunbiologie (Thorsson et al. 2018, Camus et al. 2009) beschreiben lassen als durch die traditionelle Einteilung nach Ursprungsgewebe sowie TNM-Klassifikation (Pagès et al. 2018). Konzeptuell können Tumore hierbei auf einem Spektrum von immunologisch „heiß“ bis immunologisch „kalt“ beschrieben werden. Diverse Aspekte der Tumor-Immunologie wie z.B. die Qualität und Quantität von Neoantigenen, oder die Art der Infiltration durch verschiedene Immunzellen sollen so auf einzelne immunologische Gruppen zurückgeführt werden (Galon et al. 2019). Wie durch Liganden von Mustererkennungsrezeptoren das angeborene Immunsystem im Tumor aktiviert und eine adaptive Immunantwort provoziert werden kann, soll im Folgenden besprochen werden.

1.2 Therapeutische Nukleinsäuren

1.2.1 Immunstimulatorische RNA

Über Jahre schien die klonale Expansion von Lymphozyten nach Kontakt mit ihrem Antigen eine befriedigende Antwort auf den Ablauf einer adaptiven Immunantwort zu liefern. Die Anwesenheit von körperfremden Antigenen sollte diesen Modellen nach zwangsläufig zu einer T- und B-Lymphozyten-basierten Immunantwort führen. Im offenen experimentellen Widerspruch hierzu stand die Beobachtung, dass *in vitro* und *in vivo* oftmals ein inflammatorisches Adjuvant notwendig war, um eine suffiziente Immunantwort zu initiieren. Die spezifische Erkennung eines Antigens durch den T- bzw. B-Zellrezeptor eines Lymphozyten schien eine notwendige, aber keine hinreichende Bedingung für eine klonale Immunantwort zu sein. Charles Janeway spekulierte, dass sogenannte Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*; PRRs) evolutionär konservierte Infektionszeichen im Gewebe erkennen müssen, um eine potente

Immunantwort gegen fremde Antigene zu aktivieren (Janeway et al. 1989). Diese Jahre später tatsächlich entdeckten Rezeptoren, welche Teil des angeborenen Immunsystems sind, finden sich in allen Zellen des Immunsystems, aber in geringerem Ausmaß auch in allen anderen Zellen unseres Körpers. Mittels PRRs kann unser Körper sogenannte *pathogen-* oder *danger-associated molecular patterns* (PAMPs oder DAMPs) erkennen und damit einen unphysiologischen Gewebezustand identifizieren und eine Immunreaktion zur Wiederherstellung der Gewebehomöostase initiieren (Medzhitov et al. 2008, Matzinger et al. 1994). Heute sind eine Vielzahl von unterschiedlichen PRRs bekannt, welche eine große Bandbreite an unterschiedlichen molekularen Mustern erkennen können (Kaur et al. 2019). Die bekanntesten Proteinfamilien stellen hierbei die *Toll-like receptors* (TLRs), *C-type lectin receptors* (CLRs), *NOD-like receptors* (NLRs), und die *RIG-I-like receptors* (RLRs) dar. Es verwundert also nicht, dass es gravierende Unterschiede in der Expression von PRRs in den verschiedenen menschlichen Geweben und Immunzellen gibt (www.proteinatlas.org).

Unsere Arbeitsgruppe hat sich in den vergangenen Jahren intensiv mit der Familie der RLRs beschäftigt. Da diese von besonderer Bedeutung für die hier vorliegende Arbeit sind, sollen sie im Folgenden näher beschrieben werden. Die ubiquitär exprimierte zytosolische RLR-Proteinfamilie besteht aus den Proteinen *retinoic acid inducible gene 1* (RIG-I), *probable ATP-dependent RNA helicase DHX58* (LGP2) und *melanoma differentiation antigen 5* (MDA5), wobei lediglich RIG-I und MDA5 zur Auslösung einer Immunantwort befähigt sind (Zou et al. 2009). Es lässt sich mutmaßen, dass der RLR-Signalweg durch seine physiologische Funktion der Erkennung virusbefallener Zellen (Yoneyama et al. 2004) besonders geeignet für die Provokation immunogenen Zelltods und die Initiierung einer zytotoxischen T-Zell-Antwort ist (Iurescia et al. 2018).

Unsere Arbeitsgruppe beschäftigt sich hierbei insbesondere mit RIG-I und versucht, dieses Protein als therapeutische Zielstruktur nutzbar zu machen. 2006 wurde in unserer Abteilung entdeckt, dass kurze doppelsträngige RNAs (dsRNA) mit einer 5'-Triphosphatgruppe (ppp-RNA) Liganden für RIG-I sind (Hornung et al. 2006). Kurz darauf wurden bereits künstlich hergestellte RNA-Oligonukleotide erfolgreich auf ihre Wirksamkeit als Tumorthérapeutikum in Mäusen überprüft

(Poeck et al. 2008). Unsere Arbeitsgruppe konnte unter anderem zeigen, dass eine intratumorale Aktivierung des RLR-Signalweges zu einem immunogenen Zelltod führt, der mit einer antitumoralen Lymphozytenantwort einhergeht (Duewell et al. 2014).

Sowohl RIG-I als auch MDA5 interagieren nach Aktivierung mit dem Adapterprotein *mitochondrial antiviral-signaling protein* (MAVS) (Belgnaoui et al. 2011, Seth et al. 2005, Kawai et al. 2005), welches eine komplexe Signalkaskade auslöst, die ultimativ zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren *interferon regulatory factor 3* (IRF3) (Hiscott et al. 1999), IRF7 und *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF- κ B) (Sun et al. 2017) führt (Abbildung 1). Diese Transkriptionsfaktoren führen zur Expression proinflammatorischer Zytokine wie z.B. Interleukin-6 (IL-6), IP-10 (CXCL10), aber insbesondere auch Typ-I Interferonen (IFN). Typ-I Interferone führen nun über den *interferon- α/β receptor* (IFNAR) zu einer autokrinen und parakrinen Sensibilisierung der umliegenden Zellen für RLR-Liganden (Ivashkiv et al. 2014) und zur Expression von hunderten *interferon-stimulated genes* (ISGs) (Rusinova et al. 2013). Eine Induktion pro-apoptischer Effektorproteine führt nun ultimativ zum immunogenen Zelltod (Boehmer et al. 2021) und zur Freisetzung von weiteren Tumor-Neoantigenen in das umliegende Gewebe.

Derzeit befinden sich ppp-RNA-Oligonukleotide, welche als RIG-I-Liganden fungieren, in Kombination mit PD-1/PD-L1 Checkpoint-Inhibitoren, in den ersten Phasen der klinischen Testung (Song et al. 2020 sowie NCT03291002, clinicaltrials.org). Gängige Praxis ist es hierbei immer noch, dass diese RNA-Moleküle durch entsprechende Komplexierung mittels Lipofektion unspezifisch in Tumorzellen wie auch körpereigenen Zellen transfiziert werden. Voraussetzung für die Therapie im Menschen ist deshalb eine lokale Injektion in den Tumor. Disseminierte Tumorzellen und Metastasen können so nicht erreicht werden. Sollte es gelingen, ein tumorzellspezifisches Transportsystem für diese therapeutischen RNA-Oligonukleotide zu entwickeln, könnte sich die therapeutische Potenz dieses Ansatzes steigern.

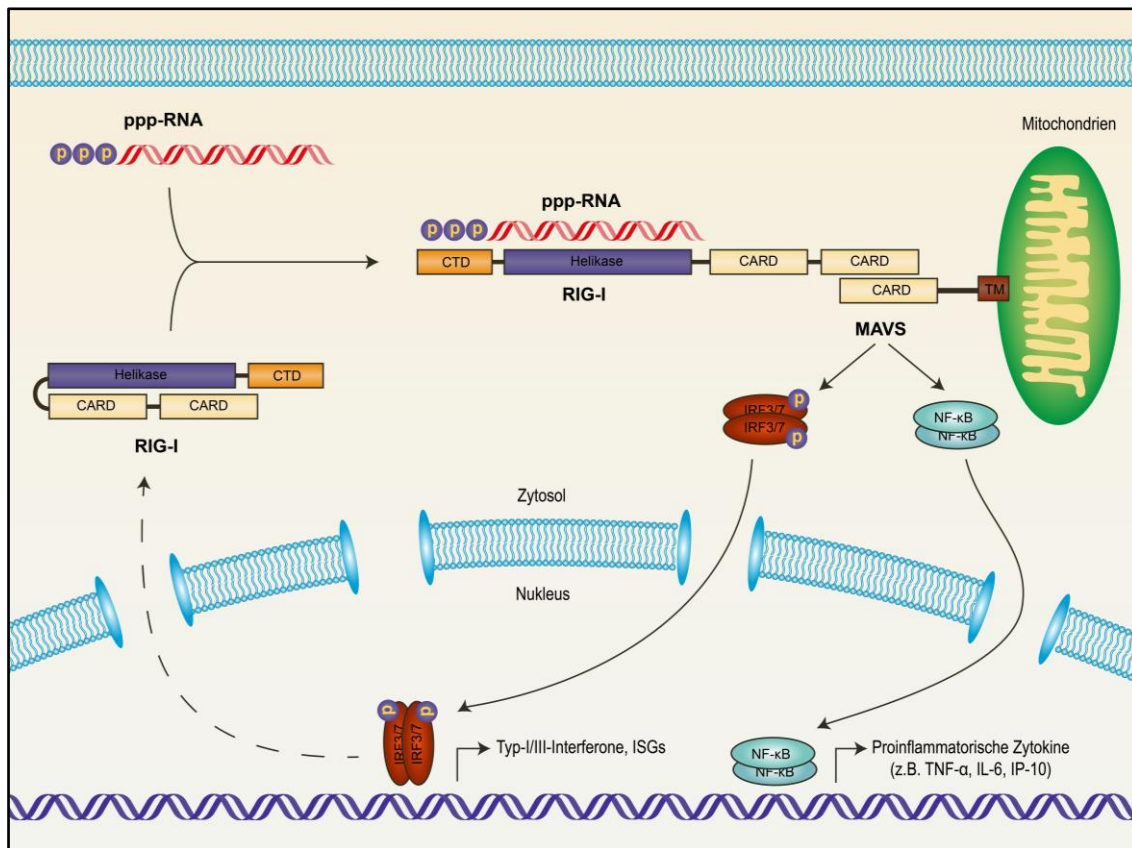


Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung der RIG-I-Aktivierung durch ppp-RNA. Die C-terminal regulatory domain (CTD) sowie die Helikasen-Proteindomänen des Proteins RIG-I binden an zytosolische ppp-RNA. Die darauffolgende Konformationsänderung des Proteins ermöglicht die Multimerisierung der *caspace activating and recruiting domains* (CARD)-Domänen verschiedener RIG-I-Moleküle und eine Interaktion mit der CARD-Domäne des mitochondrialen Membranprotein MAVS. MAVS bildet durch Rekrutierung weiterer Proteine das sogenannte MAVS-Signalsom. Die dadurch angestoßene Signalkaskade mündet schließlich in der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren IRF3, IRF7 und NF-κB. Während IRF3 und IRF7 durch die Produktion von Typ-I und Typ-III Interferonen eine sekundäre autokrine und parakrine Produktion von hunderten *interferon-stimulated gene* (ISGs) anstoßen, löst die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB zusätzlich die Transkription einer Vielzahl proinflammatorischer Zytokine aus. Die Expression von ISGs, wie z.B. RIG-I selbst, sensibilisiert benachbarte Zellen für ppp-RNA und führt zu einer zweiten verstärkten Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine im umliegenden Gewebe (eigene Abbildung).

1.2.2 Small interfering RNA

Die RNA-Interferenz (RNAi) ist ein seit den 90er Jahren bekannter Mechanismus, mit dem eukaryontische Zellen Gene zielgerichtet herunterregulieren bzw. ihre Translation regulieren können. Dieser natürliche Mechanismus war Ausgangspunkt für eine neue Technologie, das sogenannte *gene knockdown* mittels *small interfering RNA* (siRNA) (Elbashir et al. 2001). Hierzu werden künstliche doppelsträngige RNA-Fragmente mit einer Länge von meist 19 bis 23 Basenpaaren synthetisiert, welche zu einem spezifischen Transkriptionsprodukt

komplementäre Basensequenzen besitzen. Eine transfizierte siRNA wird nun in der Zielzelle auf den sogenannten RISC (*RNA-induced silencing complex*) geladen und führt dort zur Degradation der komplementären RNA-Sequenz. In der Theorie ist es so möglich, die Translation jedes beliebigen Gens temporär zu inhibieren (Wilson et al. 2013).

Es sollte sich zeigen, dass dieser siRNA-Ansatz mit einer RIG-I-Aktivierung kombiniert werden kann. So ist es möglich, eine siRNA mit einer 5'-Triphosphatgruppe auszustatten, ohne dass diese ihre *knockdown*-Aktivität verliert. In einem solchen bispezifischen Molekül können zwei therapeutische Konzepte synergistisch verbunden werden. Sowohl die apoptotische Wirkung von ppp-RNAs als auch die immunstimulatorische Wirkung dieser RIG-I-Liganden konnte in verschiedenen Mausmodellen erfolgreich durch eine bispezifische ppp-siRNA verstärkt werden (Poeck et al. 2008, Ellermeier et al. 2013). Während Poeck et al. mit einer gegen *apoptosis regulator Bcl-2* bispezifischen ppp-RNA die pro-apoptotische Wirkung dieser RNA auf die Tumorzellen verstärken wollten, haben Ellermeier et al. durch *knockdown* des immunsuppressiven Zytokins *transforming growth factor beta* (TGF- β 1) gezeigt wie sich immunsuppressive Mechanismen des Tumors mittels bispezifischer RNAs besser durchbrechen lassen.

Mit der Zulassung von Patisiran, ein Arzneistoff zur Behandlung der hereditären ATTR-Amyloidose, im Jahr 2018 hat die siRNA-Technologie endgültig den Sprung in die klinische Anwendung geschafft. Eine große Herausforderung von siRNA-basierten Therapien bleibt allerdings weiterhin der spezifische Transport in die gewünschte Zielzelle, insbesondere die unspezifische Endozytose durch die Leber stellt hierbei ein Hindernis dar. Es verwundert also nicht, dass mit Patisiran und Givosiran die zwei ersten Zulassungen von siRNA-Therapien in den Stoffwechsel der Leber eingreifen (Adams et al. 2018, Balwani et al. 2020). Wie auch schon im Fall von immunstimulatorischen RNAs könnte ein zellspezifisches Transportsystem die Nützlichkeit von siRNA deutlich verbessern.

1.2.3 Zellspezifisches Targeting von therapeutischen Nukleinsäuren

Zentrales Problem sämtlicher RNA- und DNA-basierter Therapien ist der Transport der therapeutischen Nukleinsäure in die Zielzelle. Nukleinsäuren sind große polare Makromoleküle, welche nicht durch die Zellmembran diffundieren können. Die zur Lösung dieses Problems verwendeten Vektoren lassen sich in virale und nicht-virale Transportsysteme unterteilen.

Die Mehrzahl der aktuellen gentherapeutischen Ansätze in klinischen Studien bedienen sich viraler Vektoren zum Einbringen von DNA in die Zielzelle (Shim et al. 2018). Virale Vektoren sind durch Milliarden Jahre von Evolution perfekt für den effektiven Transport genetischer Information über die Zellmembran optimiert. Unterschiedliche virale Vektoren wurden in den vergangenen Jahren zum *gene delivery* verwendet, wobei Adenoviren, Adeno-assoziierte Viren und Retroviren im Mittelpunkt des aktuellen Interesses stehen (Goswami et al. 2019). Die inhärenten Probleme der einzelnen viralen Vektoren unterscheiden sich je nach verwendetem Virus. Ein häufiges Problem stellen jedoch die Immunogenität viraler Vektoren, der unzureichende virale Tropismus, Sicherheitsbedenken sowie Produktionsprobleme dar (Kaygisiz et al. 2020). Die milliardenfache Verwendung der SARS-CoV-2-Impfstoffe *Vaxzevria*[®] und *COVID-19 Vaccine Janssen*[®] konnte jedoch die Sicherheit und Effektivität des viralen *gene delivery* von Adenoviren eindrucksvoll unter Beweis stellen. Im Bereich der Tumorimmuntherapie wurde das modifizierte onkolytische Herpes-simplex Virus Typ 1 Talimogen laherparepvec (T-Vec), welches den humanen *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) exprimiert, bereits 2015 zugelassen (Andtbacka et al. 2019). Die *ex vivo*-Modifikation humaner T-Zellen mit einem sogenannten *chimeric antigen receptor* (CAR) mittels Retroviren stellt einen weiteren besonders wirksamen klinischen Erfolg der gentherapeutischen Tumorimmuntherapie dar (Maude et al. 2018). Jedoch kann kein viraler Vektor alle an ihn gestellten Anforderungen vollständig erfüllen, so dass für verschiedene therapeutische Anwendungsfälle unterschiedliche Vektorsysteme zur Anwendung kommen. Die Erweiterung dieses Vektorreservoirs stellt folglich eine wichtige Aufgabe der gentherapeutischen Forschung dar.

In den vergangenen Jahrzehnten wurde eine Vielzahl an nicht-viralen Methoden wie z.B. Elektroporation oder Gold-Nanopartikel, zum *gene delivery* entwickelt. Die meiste Forschungsarbeit wurde allerdings auf dem Gebiet der kationischen Polymere und Lipid-basierten Ansätze geleistet. Unterschiedliche kationische Polymere, wie z.B. Poly-L-Lysine (PLL), Chitosan oder Polyethyleneimine (PEI) sollen hier exemplarisch genannt werden. PEI stellt hierbei nach wie vor den Referenzstandard des Felds dar (Helal et al. 2017). Ein Komplex aus PEI und Nucleinsäuren kann durch Interaktion seiner positiv geladenen Oberfläche mit negativ geladenen Zellmembrananteilen zur Endozytose der komplexierten Nucleinsäuren führen. Anschließend dienen die Amin-Gruppen des Polymers als pH-Puffer – der sogenannte „Protonen-Schwamm-Effekt“ – und verhindern so die pH-Wert-Senkung durch einströmende H_3O^+ Ionen ins Innere des Endosoms. Der nachfolgende Ausgleichstrom an Chlorid-Ionen führt über einen passiven Wassereinstrom zum Platzen des Endosoms und zur Freisetzung der Nucleinsäuren in das Zytosol (Bus et al. 2018). Dieser effiziente *endosomal escape* trägt allerdings gleichfalls zur Toxizität des Polymer-basierten *delivery* bei. Hauptproblem der meisten kationischen Polymere stellt hierbei diese Korrelation zwischen Transfektionseffizienz und Toxizität dar, welche die Nützlichkeit dieser Ansätze *in vivo* einschränkt.

Frühe Lipid-basierte *in vivo*-Ansätze wie Liposomen, welche aus umhüllten Nucleinsäuren in einer sphärenförmigen Lipiddoppelschicht mit kationischer äußerer Membran bestehen, zeigten ähnliche ausgeprägte Toxizitätsprobleme (Wahane et al. 2020). Mit multivalenten kationischen Lipiden komplexierte Nucleinsäuren stellen mittlerweile jedoch den Goldstandard der *in vitro*-Transfektion dar (Helal et al. 2017). Der Durchbruch gelang dem Lipid-basierten *in vivo-delivery* mit Hilfe sogenannter Helfer-Lipide, welche die Verpackung von Nucleinsäuren in sogenannten Lipid-Nanopartikeln (LNPs) ermöglichten (Guevara et al. 2020). Diese LNPs zeichnen sich durch einen wasserfreien Kern und eine deutlich reduzierte Toxizität aus. Auf Basis dieser Technologie hergestellte SARS-CoV-2 mRNA-Impfstoffe *Comirnaty*[®] und *Spikevax*[®] konnten ihre Sicherheit und Wirksamkeit im Zuge der COVID-19-Pandemie ebenfalls weltweit unter Beweis stellen.

Während sich die Sicherheit und Transfektionseffizienz nicht-viraler Vektoren stetig verbessert, stellt das zellspezifische Targeting nach wie vor eine große Herausforderung für diese Technologie dar. Ein besonders interessanter immuntherapeutischer Ansatz wurde durch Kranz et al. beschrieben. Durch ein geeignetes Verhältnis von RNA zu Lipiden gelang die Herstellung sogenannter RNA-LPX, welche präferentiell durch dendritische Zellen phagozytiert werden und so eine hochpotente *in vivo*-Vakzinierung ermöglichen (Kranz et al. 2016). Die kovalente Kopplung mittels Antikörperfragmenten, *cell-targeting peptides* (CPPs), Aptamere oder N-acetylgalactosamine (GalNAc) sind einige Beispiele für Funktionalisierung viraler und nicht-viraler Vektoren für ein zellspezifisches Targeting (Helal et al. 2017, Guevara et al. 2020). Gemeinsames Ziel dieser Ansätze ist es durch geeignete Oberflächenmodifikation des Vektors eine spezifische Bindung an einen bestimmten Zelltyp zu erreichen.

Obwohl sich in präklinischen Modellen und frühen klinischen Studien einige Erfolge dieser Targeting-Ansätze zeigten, hat sich im klinischen Alltag keiner dieser Technik als Standard etablieren können (Roberts et al. 2020). Der sichere und zellselektive Transport genetischen Materials ist bis heute eines der wesentlichen Probleme gentherapeutischer Forschung. Die therapeutische Nützlichkeit der Gentherapie wird deshalb wesentlich von der Weiterentwicklung und Neuentwicklung neuer viraler und nicht-viraler Vektorsysteme abhängig sein. *virus-like particles* (VLP), welche über die evolutionär optimierte Proteinstruktur eines Virus verfügen, ohne virale Nukleinsäuren zu transportieren, stellen ein vielversprechendes Bindeglied zwischen viralen und nicht-viralen Vektoren dar (Le et al. 2021). Im Folgenden soll auf eine vom John Cunningham-Virus (JC-Virus) abgeleitete VLP-Technologie näher eingegangen werden.

1.3 *Virus-like particles*

1.3.1 Das John Cunningham Virus

Das humane Polyomavirus 2, oder auch John-Cunningham-Virus (JC-Virus) genannt, gehört zur Familie *Polyomaviridae* aus der Gattung Polyomavirus. Das humane JC-Virus zeigt hierbei eine fast ubiquitäre Verbreitung in der Bevölkerung (Paz et al. 2018). Das JC-Virus ist ein unbehülltes, etwa 45 nm großes, doppelsträngiges DNA-Virus mit einem Erbgut von etwa 5.000 Basenpaaren. Das Kapsid des JC-Virus ist ikosaedrisch und besteht aus 72 Protein-Pentameren, welche selbst wiederum aus fünf *major capsid protein VP1* (VP1) bestehen. Weitere Bestandteile des Inneren des Virus-Kapsids sind *minor capsid protein VP2* (VP2) und *minor capsid protein VP3* (VP3). Nicht relevant für die Struktur des Virus-Kapsids sind das im JC-Virus-Erbgut kodierte *Agnoprotein*, das *Large T* und *Small T Antigen* (Frisque et al. 1984).

Der Tropismus des JC-Virus ist noch nicht abschließend geklärt, es wird jedoch vermutet, dass das VP1 an eine lineare sialysierte Pentasaccharidsequenz namens LSTc (NeuNAc- α 2,6-Gal-b1,4-GlcNAc-b1,3-Gal-b1,4-Glc) auf der Oberfläche von Zellen bindet und die Aufnahme in die Zelle durch die 5-HT₂ Rezeptorfamilie (insbesondere durch den 5-HT_{2A}-Rezeptor) unterstützt wird (Neu et al. 2010, Assetta et al. 2013). Während der Infektion einer neuen Wirtszelle wird das JC-Virus mittels Clathrin-vermittelter Endozytose in die Wirtszelle aufgenommen, um im Anschluss mittels retrograden Transportes in das Endoplasmatische Retikulum der Wirtszelle zu gelangen. Von dort gelangt das JC-Virus in den Nukleus der infizierten Zelle und beginnt mit der Transkription und Replikation seines Genoms (Melissa S. Maginnis et al. 2016). Großes Interesse erweckte das JC-Virus, da es bei immunsupprimierten Individuen als Auslöser der progressiven multifokalen Leukenzephalopathie (PML) identifiziert werden konnte. Es zeigte sich, dass es chronisch persistierenden Viruspartikeln hierbei durch wenige Mutationen des VP1-Kapsids gelingt, der Antikörper-vermittelten Neutralisierung durch das Immunsystem zu entkommen (Ray et al. 2015).

1.3.2 *Virus-like particles* als Derivat des John Cunningham Virus

Über den C-Terminus ist das VP1-Protein in der Lage mit anderen VP1-Proteinen zu interagieren und stabile Pentamere zu bilden (Abbildung 2). Der C-Terminus enthält außerdem eine basale Kernlokalisierungssequenz, während der nach innen gerichtete N-Terminus sequenzunabhängig mit DNA-Molekülen interagieren kann (Melissa S. Maginnis et al. 2016). Tatsächlich wurde in den letzten zwei Jahrzehnten das VP1-Protein diverse Male rekombinant hergestellt und aufgereinigt. Dabei zeigte sich, dass dieses in der Lage ist, sich spontan zu sogenannten *virus-like particles* zusammenzulagern (Schmidt et al. 2000, Goldmann et al. 1999, Norkiene et al. 2015, Sasnauskas et al. 2002). Da die komplette Außenseite des JC-Virus von 360 VP1-Proteinen gebildet wird, sind spontane Zusammenlagerungen von VP1-Proteinen, wie in elektronenmikroskopischen Aufnahmen gezeigt, morphologisch mit dem JC-Virus identisch. Hierbei lassen sich aus VP1-Proteinen nicht nur leere Kapsid-Strukturen bilden, sondern auch Nukleinsäuren ins Innere der VLPs verpacken. Hierzu können die leeren VLPs zunächst durch Zugabe von 1,4-Dithiothreitol (DTT) und EGTA in einzelne VP1-Proteine dissoziiert werden. DTT dient hierbei zur Reduktion intermolekularer VP1-Disulfidbrücken. Nach der Reduktion dieser chemischen Verbindungen werden nun zwischen den Pentameren gelegene Calcium-Ionen zugänglich (Chen et al. 2001). Mittels des für Calcium spezifischen Chelators EGTA können diese für die Stabilität des Kapsids entscheidende Ionen effektiv komplexiert werden (Li et al. 2003). Nach Inkubation mit dem gewünschten Nukleinsäuren-Cargo kann das Virus-Kapsid wieder zusammengefügt werden, indem EGTA mittels Dialyse entfernt und neue Calcium-Ionen hinzugefügt werden. Die Innenseite des VP1-Proteins interagiert hierbei mit den negativ geladenen Nukleinsäuren und stellt so eine Verpackung dieser im Inneren des VLPs sicher (Goldmann et al. 1999). Es bleibt unklar, ob nach der Zusammensetzung zu einem VLP eine erneute spontane interpentamere Disulfidbrückenbildung unter oxidierenden Bedingungen stattfindet. Aus der Literatur ist jedoch bekannt, dass eine Reduktion der Disulfidbrücken des VP1-Proteins zu keinerlei Reduktion der Infektiosität des JC-Virus führt, so dass für die VLP-Technologie kein Nachteil durch eventuelle freie Thiolgruppen zu befürchten ist (Nelson et al. 2012). Höchstwahrscheinlich

findet nach Erreichen des endoplasmatischen Retikulums durch das VLP eine endogen vermittelte Isomerisation von sowohl freien Thiolgruppen als auch von Kapsid-Disulfidbrücken mit Proteinen des endoplasmatischen Retikulums statt. Interessanterweise unterscheidet sich das JC-Virus hierbei von nahverwandten Viren wie dem BK-Virus, was die besondere Eignung des JC-VP1-Proteins als VLP-Plattform unterstreicht. Aktuell werden unterschiedliche Expressions- und Aufreinigungssysteme sowie unterschiedliche JC-Virus-Stämme genutzt. Dabei konnte die therapeutische Anwendung von VLPs bereits über verschiedene Arbeitsgruppen hinweg gezeigt werden (Chou et al. 2010, Fang et al. 2015, Wang et al. 2004, Gleiter et al. 2003, Chen et al. 2010).

1.3.3 *Virus-like particles* des Deutschen Primatenzentrums

Die von der AG Gruber am Deutschen Primatenzentrum in Göttingen bezogenen VLPs wurden erstmals 1999 (Goldmann et al. 1999) beschrieben und in den letzten Jahren therapeutisch im Tiermodell getestet (Hoffmann et al. 2016, Hoffmann et al. 2018). Abweichend vom Wildtyp-Stamm verfügt das in Göttingen verwendete VP1-Protein über eine heterologe Kernlokalisierungssequenz, welche auf den Sequenzen des SV40- und BK-Virus basiert.

Die AG Gruber konnte zudem in zwei nicht-onkologischen Fragestellungen die therapeutische Eignung der von ihnen produzierten VLPs bestätigen. Patentierte Daten der AG Gruber (WIPO PCT: WO2009036933A2) weisen zudem darauf hin, dass die Lysine K60 und K164 (Abbildung 2) dazu genutzt werden können, über einen chemischen Crosslinker Antikörperfragmente - sogenannte *single-chain variable fragment* (scFv) - an die Außenseite des VLPs zu koppeln, und so den natürlichen Tropismus zu inhibieren und gleichzeitig ein Retargeting gegen die Antigene der Antikörperfragmente zu ermöglichen. Hierzu wird ein *amine-to-sulfhydryl* Crosslinker mit flexiblem Polyethylenglycol (PEG) *spacer* verwendet. Um ein Protein-Cross-Linking des scFv zu ermöglichen, wurde die Aminosäuresequenz Serin-Glycin-Cystein C-terminal des scFv positioniert. Eine interessante Alternative zu diesem Ansatz wurde in der Literatur beschrieben, in

der ein Retargeting des SV40-Polyomavirus durch Modifikation von Teilabschnitten des VP1-Proteins gelang (Sun et al. 2016).

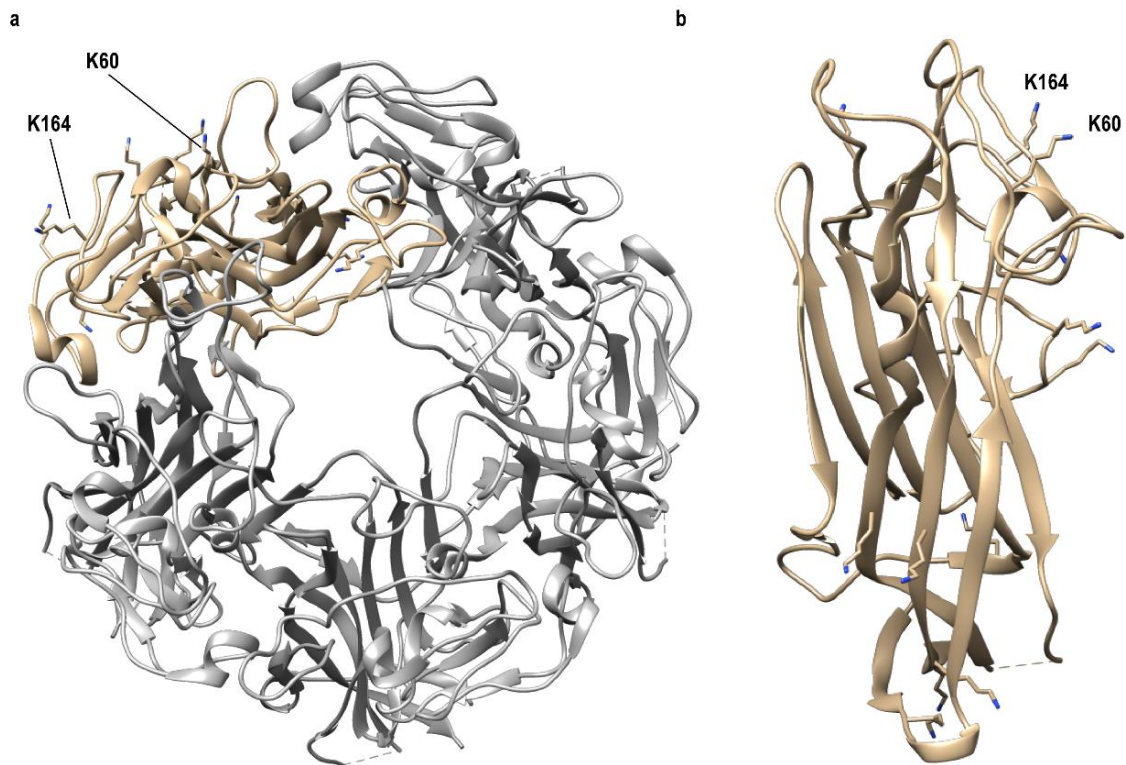


Abbildung 2: Modifizierte Außendarstellung des VP1-Proteins des JC-Virus (a) als Pentamer, bestehend aus fünf identischen VP1-Proteinen, wobei eines der fünf VP1-Proteine farblich gesondert dargestellt wurde und alle Lysine sichtbar gemacht wurden. Bei den Aminosäuren auf Position 60 und 164 handelt es sich um Lysine (K), welche eine chemische Kopplung des VLP-Kapsids an ein Antikörperfragment ermöglichen. **(b)** Isolierte Darstellung des VP1-Proteins in der Seitenansicht. Die Darstellung des VP1-Proteins (eigene Abbildung) erfolgte mittels des Programms *UCSF Chimera* auf Grundlage von Röntgenstrukturanalysen. Die Daten der Röntgenstrukturanalyse (Neu et al. 2010) wurden aus der *Protein Data Bank* (PDB) bezogen. Das hier dargestellte VP1-Protein unterscheidet sich in einigen Aminosäuren vom in dieser Arbeit verwendeten VP1-Protein.

1.4 Zielsetzung dieser Dissertation

1.4.1 *Virus-like particles* als Transportvehikel für therapeutische Nukleinsäuren in der Tumorthherapie

Ziel dieser Arbeit war es zwei Aspekte der VLP-Technologie näher zu untersuchen:

A. Die Eignung der VLPs für das tumorzellspezifische Einschleusen von Nukleinsäuren sollte geprüft werden. Mittels geeigneter Reporter-Systeme sollten die VLPs in unterschiedlichen Tumorentitäten *in vitro* getestet werden. Von zentralem Interesse war insbesondere die Eignung der VLPs für den Transport immunstimulatorischer ppp-RNA.

B. Das tumorzellspezifische Retargeting der VLPs durch Manipulation des natürlichen Tropismus des VP1-Proteins stellt das zweite Ziel dieser Arbeit dar. Zu diesem Zweck ist die kovalente Kopplung von Antikörperfragmenten (scFv) mittels eines chemischen Crosslinkers an die Außenseite des VLPs in der Literatur beschrieben. In der vorliegenden Arbeit mussten hierfür geeignete scFv identifiziert werden, deren Aminosäuresequenzen für ein chemisches Cross-Linking modifiziert und diese modifizierten-scFv anschließend rekombinant hergestellt werden. Ergänzend zu diesem Ansatz sollten tumorassoziierte DNA-Promoter-Elemente zur tumorspezifischen Transkription therapeutischer Nukleinsäuren verwendet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Alpha Imager HP gel imager	Alpha Innotech, Kasendorf, Deutschland
BD FACSCanto II	BD Biosciences, New Jersey, USA
BD LSRFortesse™	BD Biosciences, New Jersey, USA
CO2-Inkubator für Zellkultur (BBD 6220)	Heraeus, Hanau, Deutschland
Laminare Flow für Zellkultur	Heraeus, Hanau, Deutschland
Leica TCS SP5 X Konfokalsystem	Leica Microsystems GmbH, Deutschland
Mithras LB940 Plattenlesegerät	Berthold GmbH, Bad Wildbad, Deutschland
Nanodrop 2000c	Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA
NanoPhotometer	Implen GmbH, München, Deutschland
pH-Meter	WTW, Weilheim, Deutschland
Lichtmikroskop Axiovert 40C	Zeiss New York, USA
GeneTouch Thermal Cycler TC-E-96GA	Biozym Scientific GmbH, Hessen, Deutschland
ÄKTAmicro	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
HisTrap HP, 5 x 1 ml	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
Owl™ Dual-Gel Vertical Electrophoresis Sys.	Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA
Owl™ EasyCast™ B3	Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA
ChemiDoc™ Touch Imaging System	Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, USA
Dionex DNAPac PA200, 8 µm, 4 x 250 mm	Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA
Slide-A-Lyzer® MINI Dialysis Units	Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA
MWCO: 10.000	
ZelluTrans/Roth Dialysiermembran T2	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
MWCO: 6.000 – 8000	

2.1.2 Chemikalien

Ammoniumperoxodisulfat (SDS Gele)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Biozyme LE Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hessen, Deutschland
Bovines Albumin Fraktion V, ≥98 %, pulv.	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Calciumchlorid (Anhydrid)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Coelenterazin	Promega, Mannheim, Deutschland
Coomassie® Brillantblau G250	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

1,4-Dithiothreit (DTT)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure (EGTA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol absolut ≥99,8%	VWR International LCC, Pennsylvania, USA
D-(+)-Glucose ≥99,5%	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Glycerin ROTIPURAN® ≥ 99,5 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Guanidin Hydrochlorid ≥ 99,7 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES) ≥ 99,5 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
LB-Agar	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
LB-Medium	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Methanol ≥99 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Milchpulver, Blotting-Grade	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumazid	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natronlauge 50%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ni-NTA Agarose	Qiagen, Venlo, Niederlande
PBS Pulver	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Rotiphorese 50x TAE Puffer	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
D-(+)-Saccharose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin-Hydrochlorid (TCEP)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
2,2,2-Trichlorethanol	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Polyoxyethylen-20-sorbitanmonolaurat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

2.1.3 Reagenzien und Proteine

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium)	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
RPMI-1640	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium	Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA
Phosphate-Buffered Saline (PBS)	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Fetal Bovine Serum	Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA
Trypsin (10x)	Lonza Group AG, Basel, Schweiz

L-Glutamin Lösung	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Penicillin-Streptomycin	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Chloramphenicol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Deoxynukleotide (dNTPs) Lösung	New England Biolabs, Massachusetts, USA
eBioscience™ Fixable Viability Dye	Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA
Fixable Viability Dye	Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA
Klenow Fragment, exo–	Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA
Lipofectamine® RNAiMAX	Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA
Q5® High-Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs, Massachusetts, USA
RT-qPCR Sonden (Universal ProbeLibrary)	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz
Restriktionsenzyme (SpeI, SphI, DpnI)	New England Biolabs Massachusetts, USA
T4 DNA Ligase	New England Biolabs, Massachusetts, USA
SERVA DNA Stain Clear G	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland

Antigen (Klon)	Fluorochrom	Isotyp, Spezies	Kat. #	Hersteller
ASGPR (8D7)	PE	IgG1κ, Maus	563655	BD Bioscience
IgG1κ Isotyp (MOPC-31C)	PE	IgG1κ, Maus	550617	BD Bioscience
Anti-6x-His-Tag (GG11-8F3.5.1)	FITC	IgG1κ, Maus	130-092-675	MACS Miltenyi
<i>Human TruStain FcX</i>	-	-	422302	BioLegend

2.1.4 Bakterienstämme und Tumorzelllinien

2.1.4.1 Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Herkunft
Mach-I	F ⁻ φ80(lacZ)ΔM15 ΔlacX74 hsdR(rK-mK+) ΔrecA1398 endA1 tonA	Thermo Fisher Scientific
DH5α	F ⁻ φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(rK ⁻ , mK ⁺) phoA supE44 λ ⁻ thi-1 gyrA96 relA1	Thermo Fisher Scientific
Stellar™ Competent Cells	- F ⁻ , endA1, supE44, thi-1, recA1, relA1, gyrA96, phoA, φ80d lacZΔ M15, Δ(lacZYA-argF) U169, Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC), ΔmcrA, λ-	Takara Bio Inc., Shiga, Japan
BL21(DE3)	F ⁻ ompT hsdS _B (r _B ⁻ , m _B ⁻) gal dcm (DE3)	Thermo Fisher Scientific

2.1.4.2 Tumorzelllinien

In dieser Arbeit wurden die humanen Tumorzelllinien Huh7, Hep3B, HepG2 (Hepatozelluläres Karzinom, Mike Helms, Sanofi), SK-BR-3 (Mammakarzinom, Theresa Kolben, LMU Klinikum), 1205Lu (Malignes Melanom, Robert Besch, LMU Klinikum), SUIT-2-MSLN, Panc1 (Pankreaskarzinom, Sebastian Kobold, LMU Klinikum), PDX-AML-Zellen (AML, Irmela Jeremias, LMU Klinikum) und HeLa (Zervixkarzinom, ATCC, USA) verwendet.

2.1.5 Plasmide und Oligonukleotide

2.1.5.1 Plasmide

Backbone	Insert		Quelle
	scFv	C-Terminus	
pEX-A2	ASGPR	6x-His-Tag	Eurofins
pEX-A2	CLEC12A		Eurofins
pEX-A2	FAP		Eurofins
pOrigin	Mesothelin		AG Kobold
pAK400	CD33	6x-His-Tag	AG Hopfner, LMU
pAK400	ASGPR	6x-His-, SGC-Terminus	Diese Arbeit
pAK400	CD33	6x-His-, Myc-Tag, SGC-Terminus	Diese Arbeit
pAK400	ASGPR	6x-His-, Myc-Tag, SGC-Terminus	Diese Arbeit
pAK400	CLEC12A	6x-His-, Myc-Tag, SGC-Terminus	Diese Arbeit
pAK400	FAP	6x-His-, Myc-Tag, SGC-Terminus	Diese Arbeit
pAK400	Mesothelin	6x-His-, Myc-Tag, SGC-Terminus	Diese Arbeit
pGEM	CAG-EGFP		AG Gruber, DPZ
pDRIVE	hAFP-Lucia		Invitrogen

2.1.5.2 Klonierungsprimer

Primer-Bezeichnung	Sequenz (5' - 3' Richtung)
pSec.Infusion.fwd	TGA GTT TAA ACC CGC TGA TCA GCC
pSec.Infusion.rev	CGC GTC ACC AGT GGA ACC T
pAK400.CD33.Infusion.SGC.pSec.fwd	TCC ACT GGT GAC GCG GAC ATT CAG CTC ACT CAG AGT CC
pAK400.CD33.Infusion.SGC.pSec.rev	GCG GGT TTA AAC TCA ACA TCC AGA ATG ATG GTG ATG ATG GTG ATC GGC
pAK400.CD33.Q5Mut.SGC.fwd	CCC GAA TGA TGG TGA TGA TGG TG
pAK400.CD33.Q5Mut.SGC.rev	ATG TTA GTA AGC TTG ACC TGT G
pSyn.ASGPR.Infusion.pAK400.fwd	ATC GGC CCC CGA GGC CGC TCT CTT GAT CTC TAC CTT AGT ACC TTG G
pSyn.ASGPR.Infusion.pAK400.rev	GCC CAG CCG GCC ATG GCG GAA GTG CAG TTG TTG GAA T
pAK400.Infusion.fwd	GCG GCC TCG GGG G
pAK400.Infusion.rev	CGC CAT GGC CGG CTG
pAK400.CD33.Q5Mut.SGC.fwd	CCC GAA TGA TGG TGA TGA TGG TG
pAK400.CD33.Q5Mut.SGC.rev	ATG TTA GTA AGC TTG ACC TGT G
pAK400.ASGPR.SGC.Q5Mut.Myc.fwd	GAA GAG GAT CTG AAT AGC GCC GTC GAC CAC CAT CAT CAC CAT CAT TC
pAK400.ASGPR.SGC.Q5Mut.Myc.rev	TGA GAT GAG TTT TTG GTT CCC CAG ACC CTC TCT TGA TCT CTA CCT TAG
pAK400.ASGPR.SGC.Q5Mut.Myc.fwd	GAAGAGGATCTGAATAGCGCCGTCGACC ACCATCATCACCATCATTC
pAK400.CD33.SGC.Q5Mut.Myc.rev	TGA GAT GAG TTT TTG TTC CCC AGA CCC GCT AGA CAC TGT CAC CAG
pSyn.CLEC12A.SGC.Q5Mut.MYC.fwd	GGA TCT GAA TAG CGC CGT CGA CCA CCA TCA TCA CCA TCA TTC G
pSyn.CLEC12A.SGC.Q5Mut.MYC.rev	TCT TCT GAG ATG AGT TTT TGT TCC CCA GAC CCT CGC TTG
pSyn.CLEC12A.SGC.MYC.Infusion.- pAK400.fwd	GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG GTT CAG CTG
pSyn.CLEC12A.SGC.MYC.Infusion.- pAK400.rev	CAC AGG TCA AGC TTA TCA ACA TCC CGA ATG ATG G
pAK400.Infusion2.fwd	TAA GCT TGA CCT GTG AAG TGA AAA
pAK400.Infusion2.rev	GGC CGG CTG GGC

pAK400.Infusion3.fwd	CAC CCA TCA TCA CCA TCA TTC GGG
pAK400.Infusion4.fwd	GGG TCT GGG GAA CAA AAA CTC ATC T
pSyn.FAP.Infusion.pAK400.SGC.-MYC.fwd	CGG CCC AGC CGG CCA TGG CGG AAG TGC AGC TCC TGG AAT CTGG
pSyn.FAP.Infusion.pAK400.SGC.-MYC.rev	GAA TGA TGG TGA TGA TGG TGC CC
pOrigin.Mesothelin.Infusion.pAK400.fwd	CGG CCC AGC CGG CCA TGG CGG CCC AGG TGC AGC TGC AGC AG
pOrigin.Mesothelin.Infusion.pAK400.rev	TGA GAT GAG TTT TTG TTC CCC AGA CCC TTT TAT TTC CAA CTT TGT CCC AGC ACC G

2.1.5.3 *In vitro*-Transkription: Primer und RNA-Produkte

Beschreibung	Sequenz (5'-3' Richtung)
Template Sequenz 1, <i>class III</i> -Promoter	GCG CTA TCC AGC TTA CGT AGA GCT CTA CGT AAG CTG GAT AGC GCT ATA GTG AGT CGT ATT A
Template Sequenz 2, <i>class III</i> -Promoter	AGA TCA CCC TCC TTA AAT ACT CGA GTA TTT AAG GAG GGT GAT CTT ATA GTG AGT CGT ATT A
Template Sequenz 2, <i>class II</i> -Promoter	AGA TCA CCC TCC TTA AAT ACT CGA GTA TTT AAG GAG GGT GAT CTA ATA GTG AGT CGT ATT A
T7 <i>in vitro</i> -Transkription Primer; <i>class III</i> -Promoter	TAA TAC GAC TCA CTA TA
T7 <i>in vitro</i> -Transkription Primer; <i>class II</i> -Promoter	TAA TAC GAC TCA CTA TT
ppp-RNA; <i>hairpin</i> (Sequenz 1)	3p-GCG CUA UCC AGC UUA CGU AGA GCU CUA CGU AAG CUG GAU AGC GC
ppp-RNA; <i>hairpin</i> (Sequenz 2)	3p-AGA UCA CCC UCC UUA AAU ACU CGA GUA UUU AAG GAG GGU GAU CU
OH-dsRNA; (Sequenz 1)	GCG CUA UCC AGC UUA CGU A dTdT (Metabion)
Zytotoxische siRNA (Zelltod)	Allstar Hs Cell Death Control siRNA, Kat. # 1027299, Qiagen
Cy3-RNA (Sequenz 1)	Cy3-GCG CUA UCC AGC UUA CGU A (Metabion)

2.1.6 Kits

Human IP-10 ELISA

Mouse IP-10 ELISA

CellTiter-Blue® Cell Viability Assay

GeneJET Plasmid Miniprep Kit

Becton Dickinson, New Jersey, USA

Lifespan Biosciences, Seattle, USA

Promega, Mannheim, Deutschland

Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA

PureYield™ Plasmid Maxiprep System	Promega, Mannheim, Deutschland
Total RNA Kit, peqGold	PEQLAB Biotechnologie GmbH, USA
Gel Extraction Kit, peqGOLD	PEQLAB Biotechnologie GmbH, USA
Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit	New England Biolabs, Massachusetts, USA
MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kit	Lonza Group AG, Basel, Schweiz
In-Fusion HD Cloning Kits	Takara Bio Inc., Shiga, Japan
RNA Clean-Up and Concentration Kit	Norgen Biotek, Thorold, Kanada
HiScribe™ T7 High Yield RNA Synthesis Kit	New England Biolabs, Massachusetts, USA
DC™ Protein Assay	Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, USA

2.1.7 Puffer

Puffer-Lösung	Bestandteile
SDS-PAGE: <i>Resolving gel</i> 10%	25% TRIS HCL (1,5 M, pH 8,8), 10% Acrylamid, 0,1% APS, 0,04% TMED, gelöst in dH ₂ O
SDS-PAGE: <i>Resolving gel</i> 12%	25% TRIS HCL (1,5 M, pH 8,8), 12% Acrylamid, 0,1% APS, 0,04% TMED, gelöst in dH ₂ O
SDS-PAGE: <i>Stacking gel</i> 5%	25% TRIS HCL (1,5 M, pH 8,8), 5,2% Acrylamid, 0,1% APS, 0,1% TMED, gelöst in dH ₂ O
SDS-PAGE: <i>Running buffer</i>	1g/l SDS, 3g/l TRIS, 14,4g/l Glycin, gelöst in dH ₂ O
Coomassie-Lösung	0.5% <i>Coomassie blue G-250</i> , 50% Methanol, 10% Essigsäure, gelöst in dH ₂ O
Coomassie-Entfärbe-Lösung	40% Methanol, 10% Essigsäure, gelöst in dH ₂ O
LB-Medium	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Natriumchlorid, gelöst in dH ₂ O
LB-Agar	Trypton 10 g/l, Hefeextrakt 5 g/l, 10 g/l Natriumchlorid, Agar 15 g/l, gelöst in dH ₂ O
Bakterielles Autoinduktionsmedium	9,58 g/l Trypton, 4,79 g/l Hefeextrakt, 0,5 g/l Glycerol, 0,5 g/l Glukose, 2 g/l α-Lactose-Monohydrate, 4,42 g/l Na ₂ HPO ₄ , 3,4 g/l KH ₂ PO ₄ , 2,68 g/l NH ₄ Cl, 0,71 g/l Na ₂ SO ₄ , 0,24 g/l MgSO ₄ , 25 mg/l Chloramphenicol, gelöst in dH ₂ O
Periplasmatischer Extraktionspuffer I	30mM TRIS, 1mM EDTA, 20% Sucrose, gelöst in dH ₂ O
Periplasmatischer Extraktionspuffer II	5 mM MgSO ₄ gelöst in dH ₂ O
Dialysepuffer A	20 mM HEPES, 150 mM NaCl, gelöst in dH ₂ O (pH 7,4)
HPLC-Puffer A	20 mM HEPES, 150 mM NaCl, gelöst in dH ₂ O (pH 7,4)
HPLC-Puffer B	20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 500 mM Imidazol, gelöst in dH ₂ O (pH 7,4)

HPLC-Puffer C	0,02 M Na ₃ PO ₄ , gelöst in dH ₂ O (pH 11 mit H ₃ PO ₄ einstellen)
HPLC-Puffer D	0,02 M Na ₃ PO ₄ , 1 M NaBr, gelöst in dH ₂ O (pH 11 mit H ₃ PO ₄ einstellen)
<i>Reassembly</i> -Puffer	20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl ₂ , gelöst in dH ₂ O (pH 7,4)
<i>Disassembly</i> -Puffer	20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 15 mM EGTA, 15 mM DTT, gelöst in dH ₂ O (pH 7,4)

2.1.8 Zusätzliche Verbrauchsmittel

Zellkulturplatten, Zellkulturflaschen, Falcons und weitere Plastikmaterialien wurden von den Becton Dickinson (Firmen Lakes, USA), Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland) und Corning (Corning, USA) bestellt.

2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Kultivierung von Tumorzelllinien

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Tumorzelllinien wurden in einem CO₂-Inkubator bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ unter sterilen Bedingungen kultiviert. Alle Zelllinien wurden monatlich mittels *MycoAlert™ Kit* auf Mykoplasmen-Infektionen überprüft. Die Tumorzelllinien wurden gemäß Herkunftsangabe bei Erreichen einer kritischen Zellzahl passagiert. Adhärente Zellen wurden mittels einer 1xTrypsin-Lösung abgelöst. Die Anzahl lebender Zellen wurde mittels eines Trypanblau-Ausschlusstests ermittelt. Hierzu wurde die Zahl der Lebendzellen in einer Trypanblau enthaltenden Zellsuspension in einer Neubauer-Zählkammer lichtmikroskopisch ermittelt. Für die Bestimmung der Vitalität im Multiwell-Format wurde der *CellTiter-Blue® Cell Viability Assay* nach Herstellerangaben verwendet.

2.2.1.2 Transfektion von Oligonukleotiden

Für die Transfektion mit Oligonukleotiden wurde *Lipofectamin® RNAiMax Transfection Reagent* verwendet. Die zu transfizierenden Zellen wurden 16 h vor Transfektion in geeigneter Dichte ausgesät, sodass die Zellkonfluenz zum Zeitpunkt der Transfektion 70-80% betrug. Abweichend von den Herstellerangaben wurde dabei RNAiMax gemäß der nachfolgenden Formel verwendet.

$$RNAiMax\ Menge = \frac{Verwendete\ RNA\ Menge\ (nmol)}{0,041\ (nmol)} \times Koeffizient\ Z\ (\mu l)$$

Zelllinie	Koeffizient Z für verschiedene Zelllinien
1205Lu	1
SK-BR-3	2,5
Huh7	1,5

2.2.1.4 Transfektion von DNA

Zur Transfektion von Plasmiden wurde *TransIT-X2® Dynamic Delivery System* gemäß Herstellerprotokoll verwendet.

2.2.2 Mikroskopie

Lichtmikroskopische und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen erfolgten am LED-Fluoreszenzmikroskop *Axiovert 40C*. Es wurden die gleichen Belichtungszeiten verwendet, wenn unterschiedliche experimentelle Bedingungen fluoreszenzmikroskopisch verglichen werden sollten.

2.2.3 Durchflusszytometrie

Zur Anfärbung von Oberflächenproteinen auf Zellen mittels Antikörper wurden zunächst Zellen 5×10^4 – 5×10^5 Zellen in FACS-Röhrchen mit PBS gewaschen und anschließend in 100 μ l PBS mit 0,5 μ l (1:200) fluorochrom-konjugiertem Antikörper für 15 min bei 4°C inkubiert. Es folgten zwei weitere Waschschr

PBS. Als Kontrolle wurden dieselben Zellsuspensionen mit unspezifischen, aber Isotyp-identischen fluorochrom-konjugierten Antikörpern derselben Spezies und derselben Konzentration angefärbt, um unspezifische Bindung zu messen. Zur Affinitätstestung von scFv erfolgte zunächst eine Inkubation mit 0,1 g/l scFv für 30 min bei 4°C. Nach zwei Waschrissen mit PBS erfolgte eine Inkubation mit einem FITC-markierten anti-6x-His-Antikörper nach dem oben beschriebenen Vorgehen. Falls erforderlich wurden die Fc-Rezeptoren der untersuchten Zelllinien vor der Färbung mit anti-CD16/32-Antikörpern blockiert. Eine Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen erfolgte durch Inkubation mit einem *Fixable Viability Dye* in einer Konzentration von 1:5000. In der vorliegenden Arbeit wurden die FACS Geräte *BD FACSCanto II* und *BD LSRFortessa* verwendet. Die Auswertung erfolgte mit der Software *FlowJo*.

2.2.4 Enzyme-linked immunosorbent assay

Humanes IP-10 in Zellkulturüberständen wurde mittels ELISA (siehe Kits) bestimmt. Hierbei wurden abweichend von den Herstellerangaben jeweils nur die halben Volumina verwendet.

2.2.5 Luciferase-Assay

Zur Abschätzung der Translationseffizienz in transfizierten Zellen diente die Bestimmung der Luciferase-Aktivität. Um die *Lucia*-Aktivität in verschiedenen Zellkulturüberständen zu vergleichen, wurde 50 µl Zellkulturüberstand mit 20 µl Substrat vermischt. Hierbei bestand das Substrat aus 1:800 Coelenterazin, welches in destillierten Wässern (dH₂O) verdünnt wurde. Sofort nach Zugabe des Coelenterazins wurde die Lumineszenz der Proben mit einem *Mithras LB940* Plattenlesegerät bestimmt. Alle Proben wurden anschließend normalisiert, wobei die schwächste Probe eine *relative fluorescence unit* (RFU) von eins erhielt.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Polymerase-Kettenreaktion und Klonierung

2.3.1.1 Polymerase-Kettenreaktion

In der vorliegenden Arbeit wurden PCRs mittels der *Q5[®] High-Fidelity DNA Polymerase* durchgeführt. Hierbei wurde nach Herstellerangaben vorgegangen. Es wurden standardmäßig 100 ng DNA und 30 Zyklen zur Replikation verwendet.

2.3.1.2 Gelelektrophorese

Zur Größenaufftrennung verschiedener DNAs wurde eine Gelelektrophorese verwendet. Hierzu wurden ein 1% Agarose-Gel und eine Spannung von 110 Volt verwendet. Mittels eines *Loading Dye* konnte die aufgetrennte DNA unter UV-Beleuchtung sichtbar gemacht werden. Mit einem *Gel Extraction Kit* konnte die DNA aus dem Agarose-Gel isoliert werden.

2.3.1.3 Klonierungsstrategie

In dieser Arbeit wurden zwei Klonierungsstrategien verwendet. Zur Insertion, Deletion oder Substitution von weniger als 30 Basenpaaren in ein bestehendes Plasmid wurde das *Q5-Mutagenese Kit* nach Herstellerangaben verwendet. Geeignete Primer mit einer homogenen Schmelztemperatur (T_m -Wert) wurden mit dem Online-Tool *NEBaseChanger[™]* ermittelt. Zur Insertion oder Substitution größerer DNA-Abschnitten wurde das *In-Fusion[®] HD Cloning Kit* verwendet. Es wurde dabei nach Herstellerangabe vorgegangen. Primer mit einem homogenen T_m -Wert wurden mittels der Software *SnapGene* generiert.

2.3.1.4 Kultivierung von Bakterien

Plasmid inokulierte *E. coli*-Stämme wurden zum Zweck der Selektion auf einer Agar-Platte ausgestrichen, welche ein geeignetes Antibiotikum (Chloramphenicol 25 µg/ml oder Ampicillin 100 µg/ml) zur Selektion enthielt. Nach 16 h Inkubation bei 37°C wurden diese Platten auf bakterielle Kolonien überprüft. Jeweils eine Kolonie diente zum Animpfen von 3 ml LB-Medium, welches anschließend bei 37°C und 180 rpm, 16 h inkubiert wurde. In einem Verhältnis von 1:100 konnten hiermit größere Volumina an LB-Medium inokuliert werden, die anschließende Inkubation erfolgte wiederum bei 16 h bei 37°C inkubiert.

2.3.1.5 Vervielfältigung von Plasmiden

Für die Gewinnung geringer Plasmidmengen (< 10 µg) wurden 3 ml Bakterienkultur gemäß des *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* aufgereinigt. Für größere Plasmidmengen wurden bis zu 300 ml Bakterienkultur mittels des *PureYield™ Plasmid Maxiprep System* aufgereinigt. Es wurde dabei jeweils nach Herstellerangaben verfahren.

2.3.2 Herstellung von ppp-RNA

2.3.2.1 *In vitro*-Transkription

Die T7 *in vitro*-Transkription (IVT) erfolgte in drei Schritten. Zunächst wurde das IVT DNA-Template mit einem entsprechenden T7 Promoter-Primer hybridisiert. Hierzu wurde ein Reaktionsansatz für 10 min auf 90°C erhitzt und anschließend bei -0,01°C/sec auf 4°C heruntergekühlt.

Reaktionsansatz zur Primerhybridisierung (*primer annealing*)

- 20% siRNA-Puffer (30 mM HEPES, 100 mM KCl, 1 mM MgCl₂)
- 25% T7 Promoter Primer (100 µM)
- 25% DNA Template (100 µM)
- 30% dH₂O

Im zweiten Schritt wurde der durch den T7 Promoter Primer gebildete Gegenstrang mittels Polymerase-Kettenreaktion aufgefüllt. Ein entsprechender Reaktionsansatz wurde hierzu 30 min bei 37°C inkubiert, 10 min bei 70°C inaktiviert und anschließend bei 4°C gelagert

Reaktionsansatz zum Auffüllen des Gegenstrangs

- 20 µl hybridisiertes DNA-Template
- 2 µl Klenow Fragment, exo- (20 Units/µl)
- 2,5 µl Klenow-Fill-in-Puffer (10x)
- 1 µl dNTP (2,5 mM)

Nun erfolgte die T7 *in vitro*-Transkription mittels *HiScribe™ T7 High Yield RNA Synthesis Kit*. Hierzu wurde der folgende Reaktionsansatz 16 h bei 42°C inkubiert und anschließend bei 4°C zur Weiterverwendung gelagert.

Reaktionsansatz (sogenannter „doppelter Ansatz“)

- 30 µl dH₂O
- 6 µl DNA-Template nach PCR mit Klenow-Fragment
- 4 µl Enzymmix für RNA-Polymerase
- 20°µl NTP-Buffer Mix (6,7 mM pro NTP)

Abschließend wurden 2 µl DNase I zum Transkriptionsansatz gegeben und bei 37°C 30 min inkubiert und anschließend bei 75°C über 10 min inaktiviert. Das Transkriptionsprodukt wurde anschließen bei 4°C bis zur Aufreinigung gelagert.

2.3.2.2 Aufreinigung der Transkriptionsprodukte

Zur Aufreinigung der transkribierten RNA wurde das *RNA Clean-Up and Concentration Kit* verwendet. Hierbei wurde pro Aufreinigungssäule ein doppelter IVT-Ansatz nach Herstellerangaben aufgereinigt. Um die Zahl der Sekundärstrukturen zu minimieren, wurde das gereinigte RNA-Produkt erneut für 5 min auf 80°C erhitzt und anschließend sofort auf Eis abgekühlt. Die RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.3.2.3 Analyse von Oligonukleotiden mittels HPLC

Die Analytik von RNA-Oligonukleotiden erfolgte mittels HPLC. Hierzu wurde die *Dionex DNAPac PA200* Säule verwendet. Bei einer konstanten Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min des HPLC-Puffer-C wurden 1 bis 3 µg RNA eingesetzt. Anschließend wurde der Volumenanteil des HPLC-Puffer-D über einen Zeitraum von 6 *column volume* (CV) gleichmäßig von 0% auf 45% erhöht. Dies entsprach ungefähr einem Zeitraum von 19 min. Anschließend wurde die Konzentration von HPLC-Puffer-D für 1 CV auf 95% erhöht und anschließend wieder für 1 CV auf 1% gesenkt. Die entsprechenden Konzentrationsänderung benötigten einen 0,1 CV langen Gradienten. Die RNA wurde hierbei durch eine Absorptionmessung bei 260 nm detektiert.

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Expression rekombinanter Proteine

2.4.1.1 Bakteriell Expressionssystem

Zur bakteriellen Expression der in dieser Arbeit beschriebenen scFvs wurde der bakterielle periplasmatische Expressionsvektor pAK400 verwendet. Die oxidierende Umgebung im Periplasma ermöglicht die Ausbildung intramolekularer Disulfidbrücken innerhalb des scFv, welche für die Stabilität des scFv notwendig sind. Zu diesem Zweck wurde der *E. coli*-Stamm-BL21 mit einem Plasmid transformiert und in einer 3 ml Kultur unter Chloramphenicol-Selektionsdruck (25 µg/ml) vervielfältigt. Mit dieser Kultur wurden im Folgenden 200 – 1000 ml Autoinduktionsmedium inokuliert. Anschließend wurde dieses bei 37°C und 180 rpm bis zur OD₆₀₀ (*optical density* bei einer Wellenlänge von 600 nm) 0,7 inkubiert. Anschließend wurde die Temperatur auf 18°C gesenkt und die Kultur für weitere 12 bis 16 h bei 180 rpm inkubiert. Nun folgte der periplasmatische Aufschluss der bakteriellen Kultur. Hierzu wurden die Bakterien bei 8000 x g für 15 min bei 18°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und nach Hinzugabe von 10 ml des

periplasmatischen Extraktionspuffers I pro 50 ml bakterieller Kultur wurde das Bakterienpellet resuspendiert und für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein erneuter 15-minütiger Zentrifugationsschritt bei 4°C und 8000 x g. Der Überstand wurde gesammelt und im weiteren Text als *periplasmatischer Überstand I* bezeichnet. Im nächsten Schritt wurden das Bakterienpellet in 100 ml des periplasmatischen Extraktionspuffers II resuspendiert und 5 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde auch dieser Überstand gesammelt und im weiteren Text als *periplasmatischer Überstand II* bezeichnet. Beide Überstände wurden nun anschließend zweimal für 15 min bei 8000 x g und 4°C zentrifugiert und vorsichtig abgenommen, um verbleibende bakterielle Kontaminationen zu minimieren. Abschließend wurden beide Überstände mittels einer Dialysemembran mit einem *molecular weight cut-off* (MWCO) von 6.000-8.000 kDa für 16 h zweimalig in einem Verhältnis von 1:50 bei 4°C gegen den Dialysepuffer (Puffer A) dialysiert.

2.4.1.2 Aufreinigung von rekombinanten Proteinen

Über *Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie* (IMAC) erfolgte die Aufreinigung rekombinanter Proteine. Eine *HisTrap*[™] Säule wurde in die ÄKTA eingespannt und anschließend mit dem periplasmatischen Überständen durchspült. Anschließend wurde die Säule mit einer Mischung der HPLC-Puffer A und B gewaschen und die rekombinanten Proteine anschließend mit dem HPLC-Puffer B eluiert. Nach einem Optimierungs-Verfahren wurden hierbei das richtige Verhältnis an Puffer A zu Puffer B ermittelt. Eine Imidazol-Konzentration von 30 mM (5% Puffer B) war hierbei ausreichend, um alle detektierbaren Verunreinigungen zu entfernen. Hierbei wurde mit dem HPLC-Puffer gewaschen, bis im Ausfluss der ÄKTA keine Änderung der UV-Absorption bei 280 nm detektierbar war. Im letzten Schritt wurden die auf der Säule gebundenen scFv nun mit dem HPLC-Puffer B (Imidazol-Konzentration 500 mM) eluiert und gegen den Dialysepuffer A im Verhältnis 1:500 dialysiert.

2.4.3 Proteinanalytik

2.4.3.1 SDS-PAGE

Die *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) erfolgte bei 100 Volt bei nicht begrenzter Stromstärke. Für die Stoffkonzentrationen des *resolving gel*, *stacking gel* und des *running puffer* wird auf die obige Tabelle verwiesen.

2.4.3.2 Coomassie-Färbung

Zur Proteinfärbung einer SDS-PAGE wurde diese 20 min lang in einer Coomassie-Lösung geschwenkt und anschließend dreimal 20 min mit einer Entfärbelösung inkubiert. Anschließend erfolgte die Entfärbung in dH₂O über 16 h.

2.4.3.3 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde in dieser Arbeit der DC™ Protein Assay verwendet.

2.4.3.4 Bestimmung der Dissoziationskonstante K_D

Für die Bestimmung der Dissoziationskonstante K_D eines scFv wurde eine monovalente Bindung (im Verhältnis 1:1) von scFv zu scFv-Antigen angenommen. Antigen-exprimierende Tumorzellen wurden mit titrierten scFv-Konzentrationen bei 4°C inkubiert. Anschließend erfolgte der durchflusszytometrische Nachweis gebundener scFv per Fluorochrom-markierten Antikörper. Die *median fluorescence intensity* (MFI) dieser Titrationskurve wurde auf die höchste gemessene MFI normalisiert. Es erfolgte die Subtraktion der niedrigsten MFI zur Kompensation unspezifischer Antikörper-Bindungen an die Tumorzellen. Die sich ergebende hyperbolische Kurve konnte mit der Formel $f(x) = B_{\text{Max}} \cdot x / (K_D + x)$ abgeschätzt werden, wobei B_{Max} der maximalen Anzahl an Bindestellen entspricht. Durch eine nichtlineare

Regressionsanalyse dieser Kurve mittels des Statistikprogramms *GraphPad PRISM®* erfolgte die Ermittlung der Dissoziationskonstante in Mikrogramm pro Liter. Anschließend erfolgte eine Umrechnung in Nanomol pro Liter anhand des theoretisch errechneten molekularen Gewichts des Proteins.

2.4.4 *Virus-like particles*

2.4.4.1 Beladung der *virus-like particles*

Zur Generierung von VLPs wurden zunächst rekombinante VP1-Proteine in *Disassembly*-Puffer für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die zu verpackenden Nukleinsäuren hinzugegeben und für weitere 30 min inkubiert. Hierbei wurde die Konzentration der Nukleinsäuren so gewählt, dass sich das Volumen maximal auf das Doppelte erhöhte. Anschließend wurde der *Disassembly*-Puffer mittels Dialyse im Verhältnis 1:5000 durch den *Reassembly*-Puffer ersetzt. Die Dialyse erfolgte über 16 h bei 4°C mittels eines *Slide-A-Lyzer®* bei einem MWCO von 10.000 kDa.

2.4.4.2 Transfektion der *virus-like particles*

Zur Transfektion der VLPs wurde das Zellkulturmedium abgenommen und durch Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium ersetzt. Sofern nicht anders angegeben wurde das Opti-MEM nach 24 h wieder durch DMEM mit 10% FCS ersetzt.

2.5 Software und statistische Methoden

2.5.1 Verwendete Software

GraphPad PRISM®	GraphPad Software, La Jolla, USA
SnapGene	GSL Biotech LLC, Chicago, USA
ImageLab	Image Lab, Berkeley, USA
UCSF Chimera	RBVI UCSF, USA
Flowjo	FlowJo LLC, Ashland, Oregon
Adobe Illustrator	Adobe Systems, San Jose, USA
Microsoft Office 365	Microsoft, Redmond, WA, USA
EndNote	Clarivate Analytics, Philadelphia, USA

2.5.3 Test auf statistische Signifikanz

Statistische Signifikanzen werden in dieser Arbeit mittels * gekennzeichnet. Hierbei entsprachen die Signifikanzniveaus $p < 0,05$, $p < 0,01$ und $p < 0,001$ den Markierungen *, ** und ***. Die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte mit dem einseitigen ANOVA-Test mit Dunnett-Korrektur. Sämtliche statistischen Berechnungen erfolgten mit dem Programm *GraphPad PRISM®*.

3 Ergebnisse

3.1 Die Transfektion von Nukleinsäuren mittels VLPs

Die spezifische Transfektion von Tumorzellen stellt nach wie vor eine bedeutende Hürde bei der klinischen Entwicklung von Nukleinsäure-basierten Therapien dar. In dieser Arbeit wird das tumorzellspezifische Einschleusen von Nukleinsäuren mittels VLPs, basierend auf dem Kapsidprotein VP1 des JC-Virus, als mögliche Technologieplattform untersucht. Zunächst sollte die Frage geklärt werden, ob sich die VLPs zur Transfektion unterschiedlicher adhärenter und nicht-adhärenter Tumorzellen eignen. Hierzu wurde die Verpackung von Reporter-DNA und -RNA in VP1-Proteinen zu funktionellen VLPs etabliert, das Verhältnis von Nukleinsäure zu VP1-Protein und Transfektionsmengen titriert und die Aufnahmekinetik in verschiedenen Zielzellen analysiert.

3.1.1 Transfektion von DNA mittels VLPs

Um die erfolgreiche Transfektion von DNA in die Zelle zu demonstrieren, wurde eine DNA-Kassette verwendet, welche für das *enhanced green fluorescent protein* (eGFP) unter der Kontrolle eines *CMV early enhancer/chicken beta actin* (CAG)-Promoters kodiert. Der CAG-Promoter stellt hierbei die Expression des eGFP in einer großen Bandbreite von humanen Zellen sicher (Hitoshi et al. 1991). Eine entsprechende DNA-Kassette wurde mittels Restriktionsenzymen aus Plasmid-DNA linearisiert, aufgereinigt und in VP1-Proteinen zu funktionellen VLPs verpackt. Durch Komplexierung von Calcium-Ionen mit dem Chelatbildner EGTA und einer Reduktion intermolekularer Disulfidbrücken durch DTT konnte das VP1-Protein einer Interaktion mit eGFP-DNA zugänglich gemacht werden. Eine anschließende Membran-Dialyse des VP1-DNA-Gemisch ermöglichte einen Austausch des EGTA und DTT durch Calcium-Ionen, welche eine spontane Zusammenlagerungen des VP1-DNA-Gemischs zu VLPs auslöste (siehe Kapitel 1.3.2). Anschließend wurde die adhärenthe hepatozelluläre Karzinom (HCC)-Zelllinie Huh7 mit eGFP-DNA beladenen VLPs

transfiziert (Abbildung 3). Nach 72 h zeigte sich fluoreszenzmikroskopisch das stärkste GFP-Signal, während eine Kontrolltransfektion mit VP1-Proteinen ohne DNA keine Fluoreszenz zeigte (Daten nicht gezeigt). Von einer erfolgreichen Transfektion durch VLPs und der Freisetzung der verpackten DNA in der Zelle mit anschließender Transkription kann folglich ausgegangen werden.

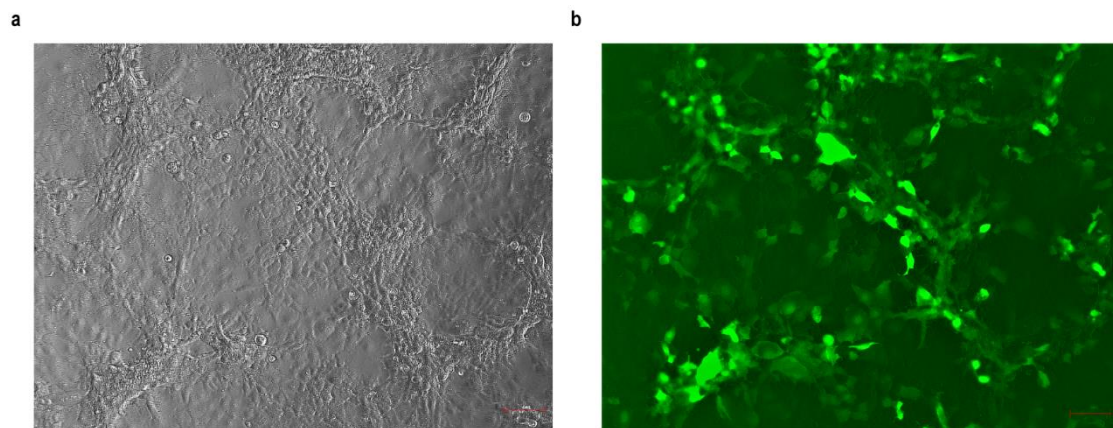


Abbildung 3: Transfektion von Huh7-Zellen mit einer eGFP-kodierenden DNA-Kassette mittels VLPs. Die Zellen wurden mit 20 µg/ml VLPs (400 ng/ml DNA) transfiziert und 72 h nach Transfektion mikroskopiert. **(a)** Durchlichtmikroskopie **(b)** Fluoreszenzmikroskopie im GFP-Kanal (grün). Gezeigt ist ein repräsentativer Versuch (n=4).

3.1.2 Transfektion von RNA mittels VLPs

Die Fähigkeit der VLPs, RNA zu transportieren, wurde mit Cyanin-Farbstoff markierter RNA (Cy3-RNA) getestet. In diesem Experiment wurden als Zielzellen nicht-adhärenente Tumorzellen gewählt, bei welchen die Transfektion mittels herkömmlicher Methoden wie Lipofektion eine besondere Herausforderung darstellt (Chong et al. 2021). Eine hämatologische Tumorentität schien besonders geeignet, die Möglichkeiten der VLP-Technologie zu ermitteln. Im Rahmen von vorherigen Arbeiten hatten wir *patient-derived xenograft* (PDX)-AML-Zellen (Vick et al. 2015) bereits erfolgreich als Leukämie-Modell zur Untersuchung von therapeutischen RNAs verwendet (Ruzicka et al. 2020). Es erfolgte die Verpackung von Cy3-RNA in VLPs und die anschließende Transfektion von zweier humaner (PDX)-AML-Zelllinien, AML-388 und AML-393. Nach 24 h zeigte sich in den AML-Zellen das Cy3-Signal im

Fluoreszenzmikroskop (Abbildung 4), was auf eine erfolgreiche Transfektion schließen lässt.

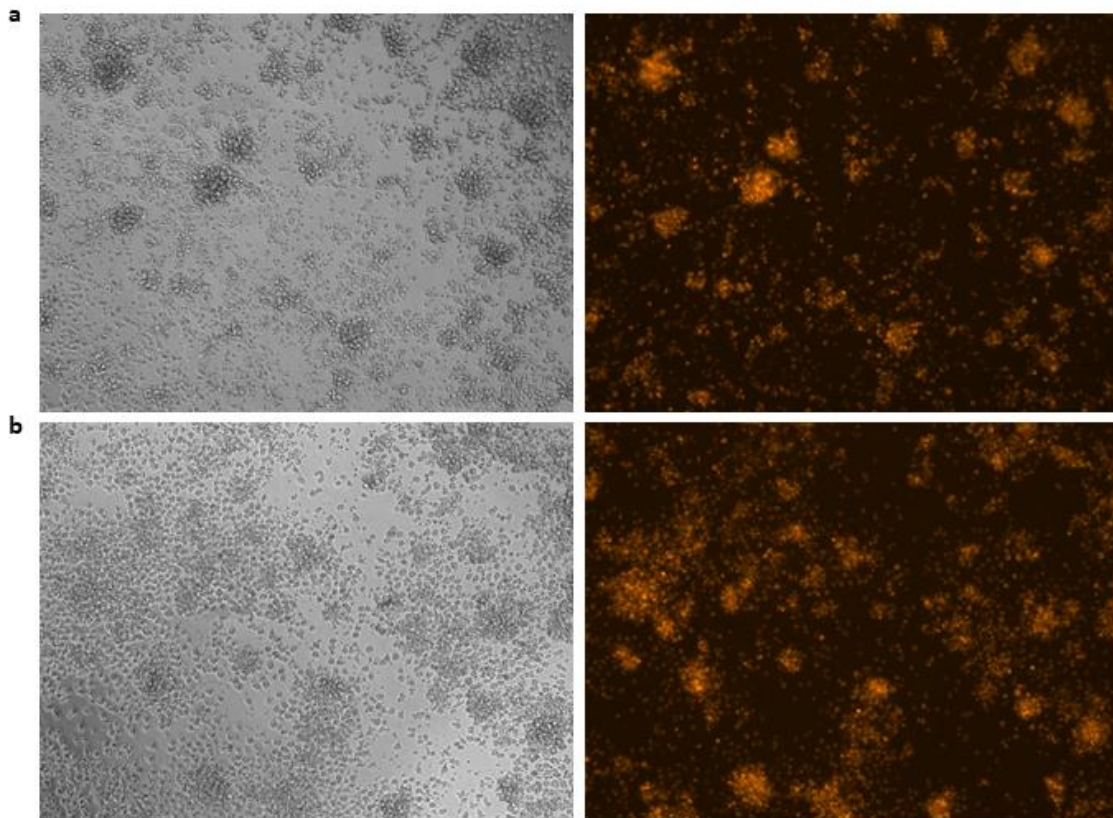


Abbildung 4: Transfektion von humanen PDX-AML-Zellen mit Cy3-RNA mittels VLPs. (a) AML-393 und (b) AML-388 wurden mit 20 µg/ml VLPs (1600 ng/ml RNA) transfiziert und 24 h nach Transfektion mikroskopiert, dargestellt mittels Durchlichtmikroskopie und Fluoreszenzmikroskopie im Cy-3 Kanal (orange). Gezeigt ist ein repräsentativer Versuch von zwei (AML-388) respektive drei (AML-393) Versuchen.

Die fluoreszenzmikroskopischen Analysen zeigen, dass sowohl DNA als auch RNA erfolgreich mittels VLPs in adhärenente und nicht-adhärenente Tumorzellen transportiert werden können. Im nächsten Schritt wurde der Verpackungs- und Aufnahmeprozess genauer charakterisiert.

3.1.3 Dosis-Wirkungs-Beziehung der DNA-VLPs

In dieser Versuchsreihe wurde die Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen eingesetzter VLP-Dosis und eGFP-Expression in verschiedenen humanen Tumorzelllinien untersucht. Hierzu wurden drei Zelllinien unterschiedlicher Tumorentität - Huh7 (HCC), 1205Lu- (Melanom) und SK-BR-3-Zellen

(Mammakarzinom) - mit 0, 2, 10, 20, 40 oder 80 $\mu\text{g/ml}$ eGFP-DNA-beladenen VLPs transfiziert und die eGFP-Expression nach 72 h durchflusszytometrisch quantifiziert (Abbildung 5). Es zeigte sich eine dosisabhängige Zunahme der Transfektionseffizienz, die einzig bei Huh7 ab 40 $\mu\text{g/ml}$ ein Maximum erreicht hat.

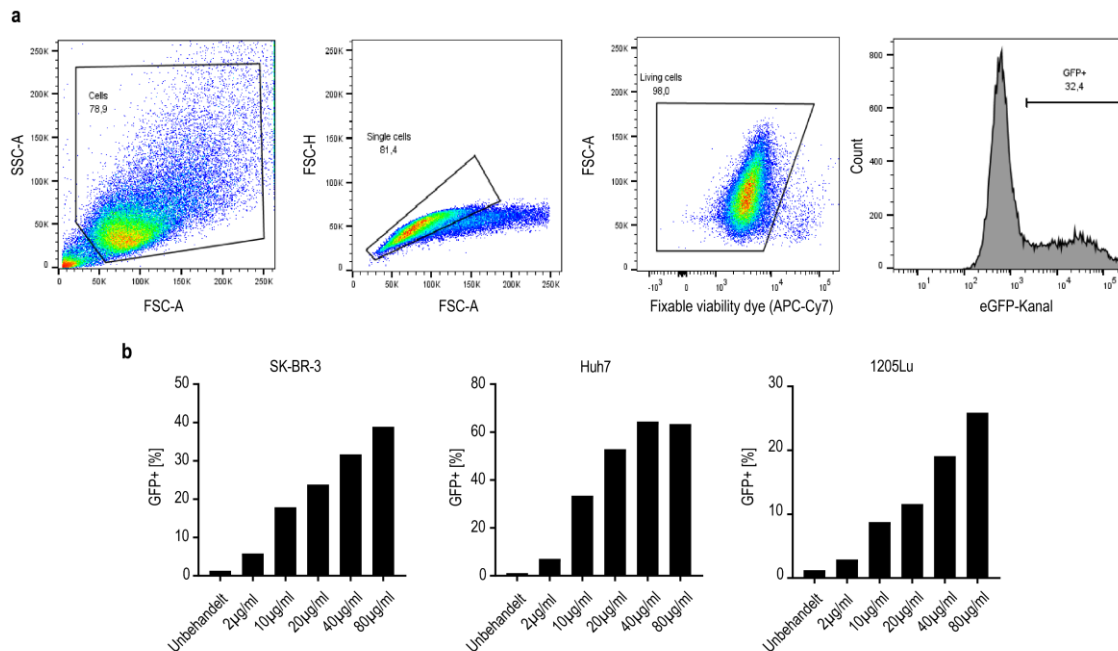


Abbildung 5: (a) Exemplarische Gating-Strategie zur Ermittlung eGFP-positiver Zellen 72 h nach Transfektion mit 5 $\mu\text{g/ml}$ VLPs. Hierzu erfolgte die Identifikation der Tumorzellen mittels Vorwärtsstreulicht (FCS-A) und Seitwärtsstreulicht (SSC-A) und die Exklusion von Zellfragmenten. Anschließend erfolgte der Ausschluss von Dubletten mittels Analyse der maximalen Signalstärke (FCS-H) und der Fläche unter der Signalstärkekurve (FCS-A) des Vorwärtsstreulichts. Tote Zellen wurden durch einen *Fixable Viability Dye* angefärbt und im APC-Cy7-Kanal identifiziert. Anschließend wurde Anhand der unbehandelten Zellpopulation ein Schwellenwert für eGFP-positiv Zellen im eGFP-Kanal (FITC) festgelegt. **(b)** SK-BR-3, Huh7 und 1205Lu wurden mit unterschiedlichen Dosen VLPs transfiziert. Die DNA-Menge betrug immer 1:100 der VP1-Protein Menge (n=3 für 1205Lu und Huh7: Unbehandelt, 10 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$ und 40 $\mu\text{g/ml}$; n=1 restliche Bedingungen).

Neben der Effizienz der Transfektion wurden die Zellen lichtmikroskopisch auf morphologische Veränderungen hin untersucht. Dabei zeigte sich nach 24 h in Huh7- und 1205Lu-Zellen in Abhängigkeit von der eingesetzten VLP-Konzentration die Ausbildung von intrazellulären Vesikeln (Abbildung 6), welche sich nach 48 h und 72 h teilweise zurückbildeten. In SK-BR-3-Zellen wurden keine morphologischen Veränderungen beobachtet.

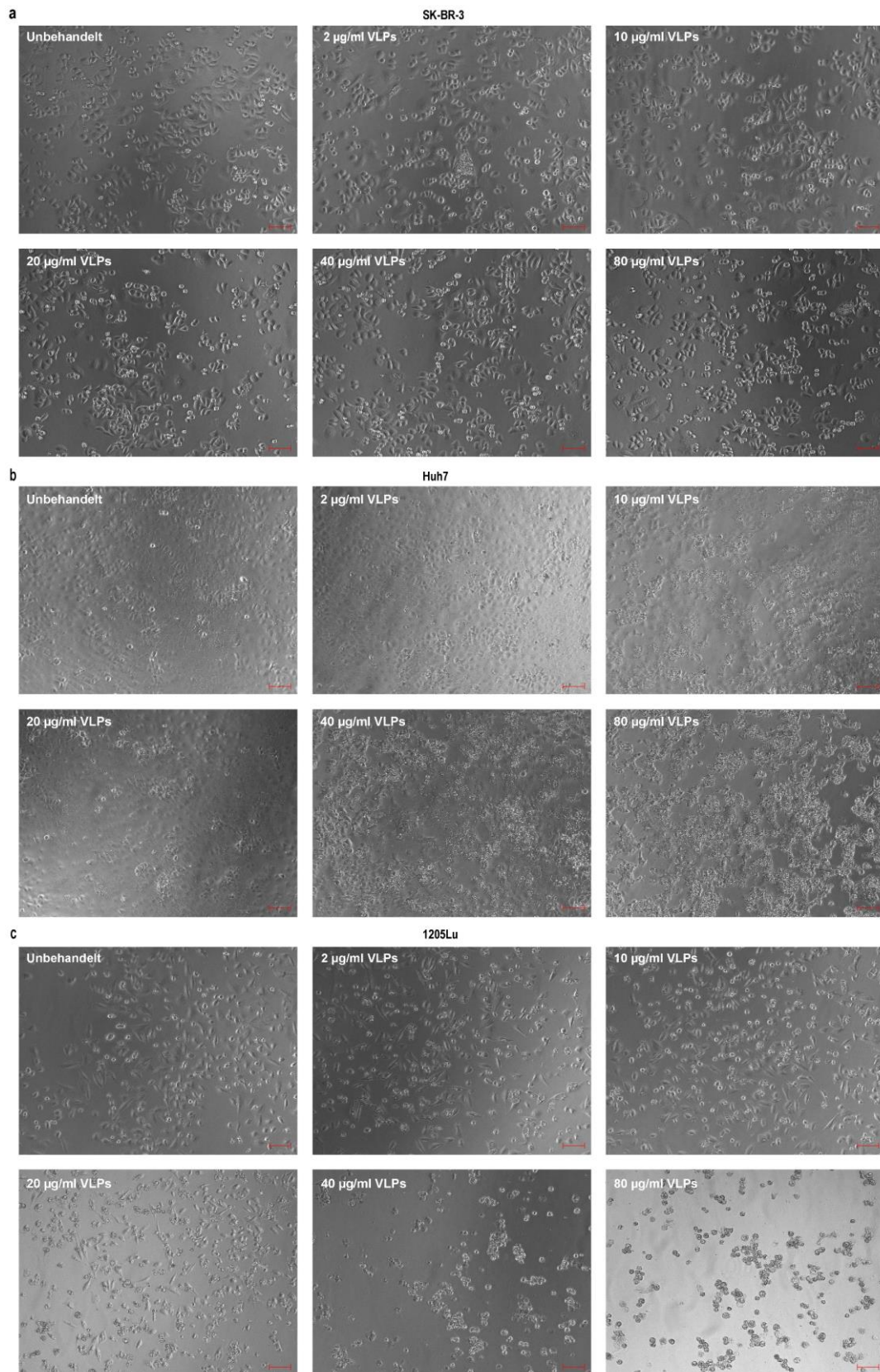


Abbildung 6: Toxizität und morphologische Veränderungen dreier Zelllinien nach Transfektion mit unterschiedlichen Konzentrationen an VLPs. Transfektion von **(a)** SK-BR-3, **(b)** Huh7 und **(c)** 1205Lu mit ansteigenden VLP-Konzentrationen. Gezeigt sind durchlichtmikroskopische Aufnahmen nach 24 h (n=3 Huh7 und n=2 1205Lu: Unbehandelt, 10 µg/ml, 20µg/ml und 40 µg/ml; n=1 restliche Bedingungen).

Die in 1205Lu-Zellen beobachtete Toxizität nach Transfektion mit hohen VLP-Konzentrationen machte diese Zelllinie für die weitere Charakterisierung der VLP-Technologie ungeeignet und wurde für weitere Experimente ausgeschlossen. Eine Dosis von 20 µg/ml wurde als bestmöglicher Kompromiss zwischen Transfektionseffizienz und Toxizität für weitere Experimente verwendet.

3.1.4 Untersuchung der Beladungskapazität der VLPs

Es ist unklar, ob das stöchiometrische Verhältnis von DNA zu VP1-Protein während des VLP-Assembly einen signifikanten Einfluss auf die VLP-Transfektionseffizienz hat bzw. ab wann die Beladungsgrenze der VLP erreicht ist. Um dieser Frage nachzugehen, wurden eine konstante Menge an VP1-Protein mit eGFP-DNA im Gewichtsverhältnis 1:2500, 1:250, 1:100, 1:50 und 1:25 beladen. Anschließend erfolgte die Transfektion von Huh7 und SK-BR-3 mit 20 µg/ml eGFP-VLPs (Abbildung 7). Ab einem DNA:VP1-Verhältnis von 1:250 zeigte sich keine weitere Zunahme des Anteils eGFP-positiver Zellen. Dies wurde als Sättigung der VP1-Proteine mit DNA-Molekülen definiert.

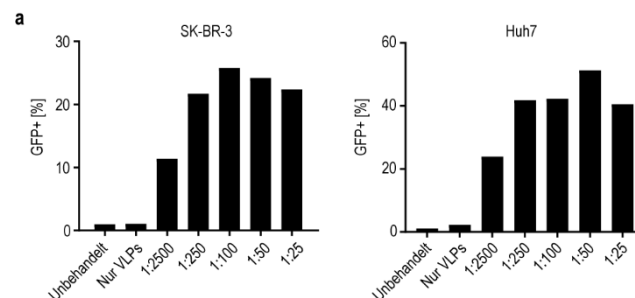


Abbildung 7: Einfluss des Verhältnisses von eGFP-DNA zu VP1-Protein während des VLP-Assembly auf die eGFP-Expression 72 h nach Transfektion. (a) Transfektion von 20 µg/ml eGFP-VLPs mit unterschiedlichen VP1 : DNA Verhältnissen und anschließender Durchflusszytometrie nach 72 h. Es zeigte sich in den Daten beider Zelllinien keine Zunahme der eGFP-positiven Zellen ab einem Verhältnis von 1:250 (n=1).

3.1.5 Aufnahme- und Expressionskinetik der VLP-Transfektion

Aus der Literatur ist die Kinetik der VLP-Aufnahme in die Zelle nicht bekannt. Um diese zu ermitteln, wurden Huh7 und SK-BR-3 mit 20 µg/ml eGFP-VLPs kultiviert. Das VLP-enhaltende Zellkulturmedium wurde nach 4 h, 6 h oder 24 h gewechselt. 72 h nach Transfektion wurde die eGFP-Expression mittels Durchflusszytometrie untersucht (Abbildung 8a). Bei einem Wechsel des Zellkulturmediums nach 24 h zeigte sich ein deutlich höherer Anteil eGFP-positiver Zellen. Dies deutet darauf hin, dass die Aufnahme kontinuierlich über eine längere Zeit erfolgt, anders als bei einer Lipofektion, bei der nach wenigen Stunden kein Anstieg der Transfektion mehr zu beobachten ist.

Um zu untersuchen, wann die maximale Expression der DNA nach Transfektion erreicht ist, wurde der Anteil an eGFP-positiven Zellen nach 48 h, 72 h und 96 h per Durchflusszytometer ermittelt. Dabei zeigte sich sowohl in Huh7 als auch in SK-BR-3 ein Maximum nach 72 h (Abbildung 8b).

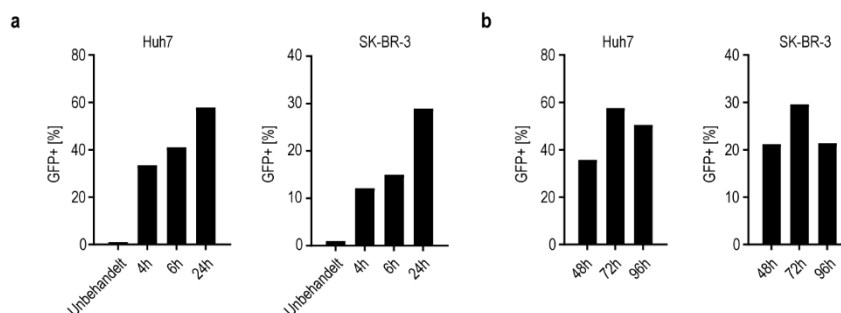


Abbildung 8: Einfluss der Transfektionsdauer auf die Transfektionseffizienz. (a) Das Zellkulturmedium wurde 4 h, 6 h oder 24 h nach der Transfektion mit 20 µg/ml eGFP-VLPs gewechselt. 72 h nach der Transfektion wurde der Prozentsatz eGFP-positiver Zellen durchflusszytometrisch ermittelt. **(b)** Der Prozentsatz eGFP-positiver Zellen wurde 48 h, 72 h und 96 h nach Transfektion mit 20 µg/ml eGFP-VLPs ermittelt (n=1).

Nach der erfolgreichen Charakterisierung der wichtigsten Parameter der VLP-Technologie sollten nun therapeutische Nukleinsäuren auf ihre Eignung im Kontext der VLP-vermittelten Transfektion untersucht werden.

3.2 VLPs als Transportvehikel für therapeutische Nukleinsäuren

Unsere Abteilung hat in den vergangenen Jahren erfolgreich die Anwendung von immunstimulatorischen ppp-RNAs als RIG-I-Liganden in der Tumorthherapie demonstrieren können (Ellermeier et al. 2013, Ruzicka et al. 2020). Im Folgenden sollte untersucht werden, ob sich VLPs für den Transport dieser ppp-RNAs in das Zytosol von Tumorzellen eignen. Eine zielgerichtete Applikation von ppp-RNA spezifisch in Tumorzellen könnte die therapeutische Wirksamkeit bei gleichzeitiger Reduktion von Nebenwirkungen erhöhen.

3.2.1 Herstellung von Triphosphat-RNAs

Zunächst war die Synthese einer geeigneten ppp-RNA notwendig. Eine kurze doppelsträngige *Hairpin*-ppp-RNA sollte als RIG-I-Ligand dienen. Eine Vielzahl von PRRs ist in der Lage unterschiedliche Formen einzel- und doppelsträngiger RNA zu erkennen. Um einen immunstimulatorischen Effekt mit Gewissheit einem definierten Rezeptor zuzuschreiben, ist ein möglichst reines RNA-Produkt notwendig. Insbesondere bei heterogenen RNA-Produkten würde durch die Ausbildung von Sekundärstrukturen zwischen einzelnen RNA-Molekülen das Risiko einer unspezifischen Aktivierung weiterer RNA-Sensoren bestehen.

Die Synthese der ppp-RNA erfolgte per T7 *in vitro*-Transkription (IVT) von einer geeigneten DNA-Matrize (Sequenz 1). Anschließend wurde das aufgereinigte RNA-Produkt per *Hochleistungsflüssigkeitschromatographie* (HPLC) und Absorptionmessung bei 260 nm qualitativ analysiert. Hier zeigte sich 0,5 min nach dem Absorptionsmaximum ein zweites schwächeres Absorptionssignal (Abbildung 9b). Da in einer chemisch synthetisierten ppp-RNA, welche als Qualitätskontrolle diente, dieses Signal nicht auftrat (Abbildung 9a), musste von einem Nebenprodukt der IVT ausgegangen werden. Aus der Literatur ist bekannt, dass bestimmte T7-Promoter-Sequenzen (wie der hier verwendete *class III phi 6.5*-Promoter) zu heterogenen Reaktionsprodukten mit Nukleoid-Substitutionen am 5'-Ende führen können (Pleiss et al. 1998). Um zu

untersuchen, ob die Reinheit der IVT durch die Verwendung einer veränderten Promotersequenz, des sogenannten *class II phi 2.5*-Promoters (Coleman et al. 2004), erhöht werden kann, wurde eine DNA-Matrize (Sequenz 2) mit entsprechender Promotersequenz verwendet. Tatsächlich zeigte sich bei Verwendung dieser DNA-Matrize in der HPLC-Analyse kein ungewünschtes Nebenprodukt (Abbildung 9d). Um auszuschließen, dass sequenzspezifische Besonderheiten der Transkriptionsvorlage für diesen Effekt verantwortlich waren, wurde auch die DNA-Matrize der Sequenz 2 mit einem *class III phi 6.5*-Promoter ausgestattet (Abbildung 9c). Es zeigte sich erneut ein Nebenprodukt der RNA-Synthese, so dass bestätigt werden konnte, dass das hohe Maß an Homogenität des Transkriptionsprodukts der Sequenz 2 von der Verwendung eines *class II phi 2.5*-Promoters abhängig ist.

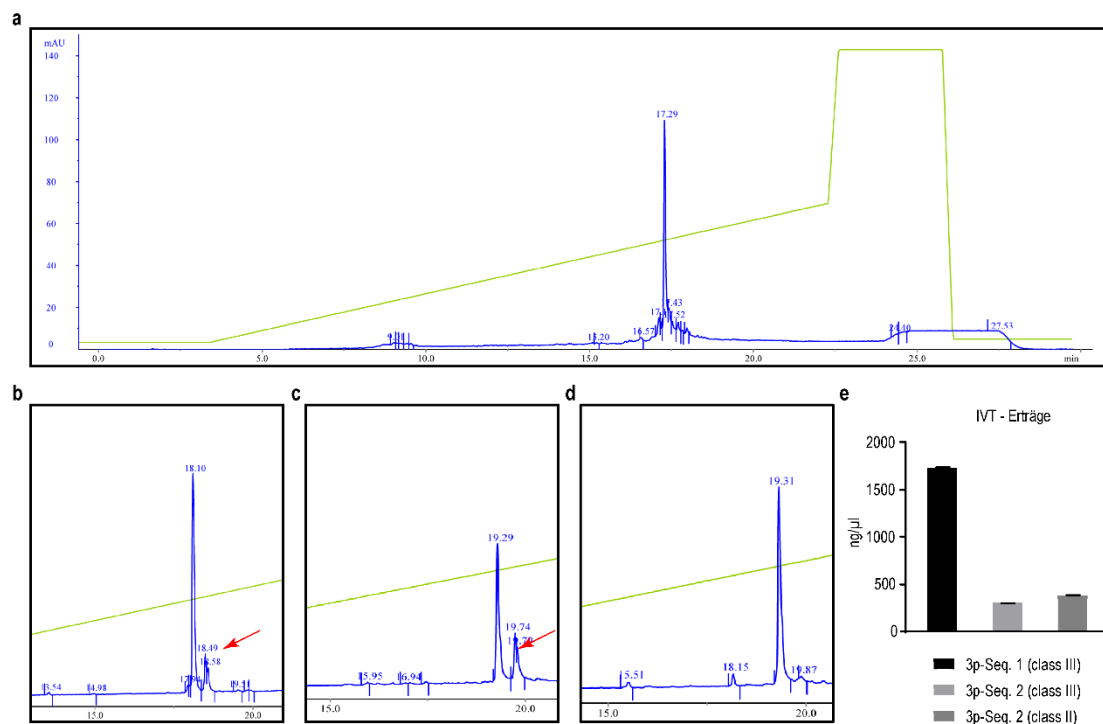


Abbildung 9: T7 in vitro-Transkriptionen verschiedener ppp-RNAs und anschließende Analyse mittels HPLC. (a) Eine chemisch synthetisierte doppelsträngige RNA diente als Kontrolle der Analyse. Durch einen kontinuierlichen Anstieg des Elutionspuffers (grüne Kurve) erfolgte die Auftrennung der RNA nach Elutionszeitpunkt (siehe Kapitel 2.3.2.3). Eine Absorptionsmessung bei 260 nm (blaue Kurve; *milli-absorbance unit* (mAU)) diente zum Nachweis der einzelnen RNA-Fraktionen. (b) Die Sequenz 1 wurde unter einem *class III phi 6.5*-Promoter transkribiert, anschließend wurde das Reaktionsprodukt mittels HPLC analysiert. Neben dem Hauptprodukt wurde ein Nebenprodukt (roter Pfeil) in der HPLC detektiert. (c) Die unter einem *class III phi 6.5*-Promoter transkribierte Sequenz 2 zeigte ebenfalls ein Nebenprodukt. (d) Die Transkription der Sequenz 2 mittels eines *class II phi 2.5*-Promoters zeigte hingegen kein signifikantes Nebenprodukt. (e) Jede Sequenz wurde in einem doppelten Transkriptionsansatz hergestellt und in 100 µl dH₂O eluiert und anschließend die RNA Konzentration gemessen. Gezeigt ist eine repräsentative Abbildung von zwei unabhängigen Experimenten.

Die höchsten IVT-Erträge konnten für die Sequenz 1 beobachtet werden, für die Sequenz 2 zeigten sich, unabhängig vom gewählten Promoter, nur geringfügige Unterschiede der IVT-Erträge. Die hier produzierten ppp-RNAs konnten nun in den folgenden Experimenten auf ihre Wirksamkeit in der VLP-vermittelten Transfektion untersucht werden.

3.2.2 Eignung von VLPs für den ppp-RNA-Transport

Kurze doppelsträngige ppp-RNAs sind in der Lage, RIG-I zu aktivieren. Wie bereits in der Einleitung ausgeführt, mündet die darauffolgende Aktivierung diverser intrazellulärer Signalwege in der dosisabhängigen Freisetzung von Zytokinen, wie Typ-I IFN und IP-10 (CXCL10), sowie in der Induktion von programmiertem Zelltod. In vorausgegangen wissenschaftlichen Arbeiten konnte der anti-tumorale Therapieeffekt der ppp-RNA in verschiedenen Tumorentitäten nachgewiesen werden (Poeck et al. 2008, Ellermeier et al. 2013 und Ruzicka et al. 2020). Während herkömmliche Verfahren des RNA-Transports auf unspezifischer Lipofektion beruhen, sollte im Folgenden geklärt werden, ob sich VLPs für den Transport von ppp-RNA eignen.

Zunächst wurde die Wirksamkeit der produzierten ppp-RNA untersucht. Hierzu erfolgte die Lipofektion von Huh7-Zellen mit 40 nM RNA. Als Kontrolle diente eine sequenzidentische OH-RNA (ohne ppp-Modifikation) und eine zytotoxische siRNA, welche durch *knockdown* essenzieller Gene in humanen Zellen zum Zelltod führt. Nach 48 h ließen sich im Überstand in den ppp-RNA-transfizierten Zellen große Mengen des *interferon gamma-induced protein* (IP-10) per ELISA nachweisen, was als *readout* für RIG-I-Aktivierung diente. Zudem zeigte sich sowohl in den ppp-RNA- als auch in den siRNA-transfizierten Zellen eine signifikante Reduktion der Zell-Viabilität. Nach diesem Nachweis der immunstimulatorischen Wirkung der ppp-RNA und der zytotoxischen Wirkung der siRNA konnten beide RNAs für ihre Eignung als VLP-Cargo untersucht werden

Als nächstes erfolgte die Verpackung der RNAs in VLPs und die anschließende Transfektion von Huh7-Zellen. Im IP-10 ELISA zeigten sich in keiner Gruppe eine

signifikante IP-10 Produktion 72 h nach Transfektion. Ebenso konnte keine verringerte Zell-Viabilität festgestellt werden. Parallel zur Transfektion mit RNA-VLPs erfolgte außerdem die Transfektion mit eGFP-DNA-VLPs und eine fluoreszenzmikroskopische Kontrolle der eGFP-Expression, um Probleme mit den VP1-Protein-Chargen auszuschließen. Abweichend von den Ergebnissen dieser Positivkontrolle und der Lipofektion-vermittelten Transfektion, zeigte sich weder für siRNA noch für ppp-RNA ein VLP-vermittelter therapeutischer Effekt.

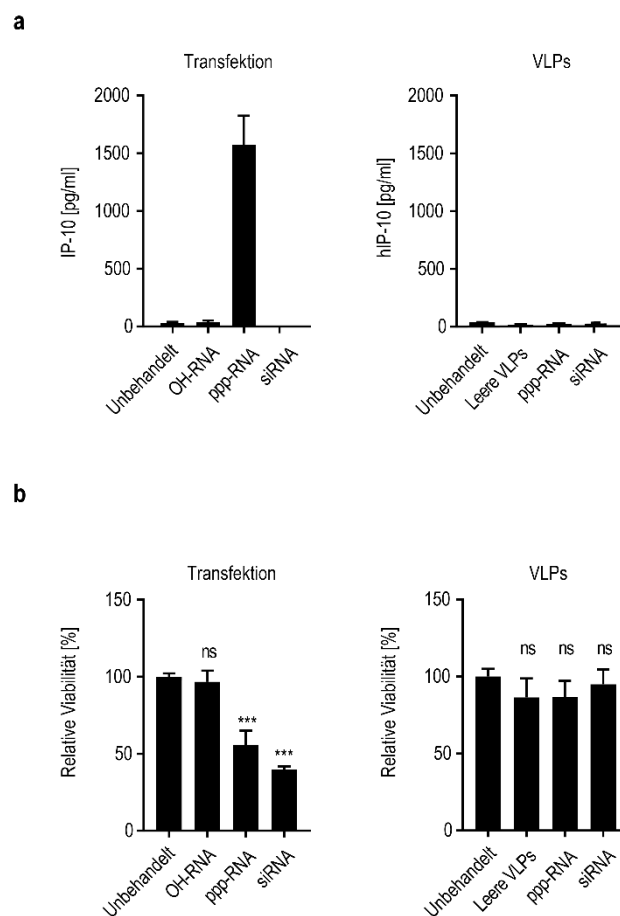


Abbildung 10: Transfektion von RNA mittels Lipofektion oder VLPs. (a) Messung der humanen IP-10-Konzentration im Überstand 48 h nach Lipofektion (a) oder 72 h nach VLP-Transfektion (b). Repräsentative Abbildung von zwei unabhängigen Experimenten. Gepoolte Zell-Viabilität nach Lipofektion (c) oder VLP-Transfektion (d) aus drei unabhängigen Experimenten.

Durch den fehlenden Nachweis eines therapeutischen Effektes der ppp-RNA-VLPs bzw. siRNA-VLPs konzentrierte sich der weitere Teil dieser Arbeit auf die Weiterentwicklung des DNA-basierten Ansatzes.

3.2.3 Tumorspezifische Promoter zur spezifischen Expressionskontrolle

Am Beispiel der bisher verwendeten Tumorzellen sollte eine Strategie zur zellspezifischen DNA-Expression demonstriert werden. Als Beispiel wurde hier der Promoter des humanen Alpha-Fetoproteins (hAFP) gewählt, einem im HCC überexprimierten Protein (Galle et al. 2019). Um zu überprüfen, ob durch Verwendung des hAFP-Promotors eine HCC-spezifische Expression des Transgens erreicht werden kann, wurden Huh7-, SK-BR-3- und 1205Lu-Zellen mit 250 ng einer für die *Lucia* Luciferase-kodierenden DNA-Kassette mit humanen AFP-Promoter (hAFP-Lucia) transfiziert. Nur in der HCC-Zelllinie-Huh7 konnte nach 48 h ein deutliches Lumineszenz-Signal nachgewiesen werden. In SK-BR-3 und 1205Lu zeigten sich keine Änderungen der Lumineszenz gegenüber einer Transfektionskontrolle. Als Transfektionskontrolle wurde eine eGFP-kodierende DNA-Kassette verwendet, welche unter der Kontrolle des ubiquitär aktiven CAG-Promoters steht (*pGEM-CAG-EGFP*). Fluoreszenzmikroskopisch zeigte sich in der Transfektionskontrolle in allen Zelllinien ein deutliches GFP-Signal (Daten nicht gezeigt).

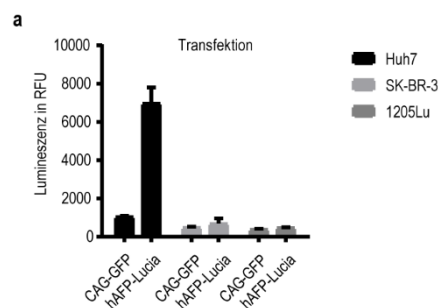


Abbildung 11: Nachweis der tumorspezifischen DNA-Expression unter Verwendung des humanen Alpha-Fetoprotein-Promoters. (a) Messung der Lumineszenz im Zellkultur-Überstand nach 48 h nach Transfektion im 48-Well Format mit jeweils 500 ng/ml Plasmid. Verwendet wurde eine für die Luciferase (*Lucia*) kodierende DNA-Kassette, welche eine Sekretion der Luciferase in das Zellkulturmedium vermittelt. Die Expression der Luciferase wird durch einen hAFP-Promoter vermittelt. Als Kontrolltransfektion wurde eine CAG-eGFP DNA-Kassette verwendet. Ein repräsentatives Experiment von zwei (wobei 1205Lu-Zellen durch HeLa-Zellen ersetzt wurden).

Es konnte gezeigt werden, dass der HCC-spezifische hAFP-Promoter nur in der hepatozellulären Tumorzelllinie Huh7 signifikant transkribiert wurde. Ein therapeutisches Gen würde also durch VLPs, die einen solchen Promoter in ihren DNA-Kassetten verwenden, mit einer höheren Spezifität im Tumorgewebe transkribiert werden. Der verwendete hAFP-Promoter ist in seiner Größe mit dem vorangegangenen CAG-Promoter vergleichbar, sodass nicht von einem Unterschied in der Verpackungseffizienz auszugehen ist.

Eine Fortführung dieser Experimente war bei fehlender Verfügbarkeit des VP1-Proteins nicht möglich.

3.3 Tumorspezifisches Retargeting der VLPs

Im ersten Teil dieser Arbeit konnte die Fähigkeit der VLPs demonstriert werden, eine Vielzahl von Zelllinien erfolgreich zu transfizieren. In diesem Teil der Arbeit sollte die Modifikation dieses natürlichen Tropismus untersucht werden, um eine tumorspezifische Aufnahme zu ermöglichen. Ein solches Retargeting der VLPs würde eine spezifischere Anwendung dieser als Therapeutikum ermöglichen.

3.3.1 Bakterielle Testexpression von modifizierten scFv

Zum Zweck des tumorspezifischen Retargetings sollten Antikörperfragmente (scFv) kovalent mittels eines chemischen Crosslinkers an die Außenseite der VLPs gekoppelt werden. Von der AG Gruber wurde ein gelungenes Retargeting der VLPs durch Bindung eines modifizierten anti-HER2-scFv an die Außenseite des VP1-Proteins beschrieben (WIPO PCT: WO2009036933A2). In Anlehnung an diese Strategie wurden fünf unterschiedliche tumorassoziierte Membranproteine ausgewählt, welche ein tumorspezifisches Retargeting für AML, HCC und Pankreaskarzinom ermöglichen könnten. *C-type lectin domain family 12 member A (CLEC12A)* und *Cluster of Differentiation 33 (CD33)* wurden für das Retargeting der AML ausgewählt, der

Asialoglycoprotein receptor (ASGPR) für das HCC, während das *Fibroblast activation protein alpha* (FAP) und Mesothelin als Zielstruktur für das Pankreaskarzinom ausgewählt wurden. Gegen diese Antigene gerichtete scFv-Sequenzen wurden in Patentschriften und Veröffentlichungen recherchiert.

C-terminal der scFv-Sequenzen wurde eine für die Aminosäuren Serin-Glycin-Cystein kodierende Nukleotidsequenz eingefügt. Die freie Thiolgruppe des Cysteins ermöglicht hierbei ein chemisches Cross-Linking mit den VLPs. Zwischen dieser SGC-Sequenz und dem scFv wurde für die Aufreinigung des scFv ein *Hexahistidin*-Tag (6x-His-Tag) inseriert. Die so modifizierten scFv wurden in einen bakteriellen periplasmatischen Expressionsvektor (pAK400) kloniert. Nachfolgend wurden zudem Konstrukte mit zusätzlichem *Myc*-Tag (MYC) zur verbesserten Nachweisbarkeit des scFv erstellt.

Es erfolgte nun die rekombinante Expression der scFv in BL21-*E. coli*-Bakterien. Eine Inkubation der Zellen in einem periplasmatischen Extraktionspuffer führte durch Membran-Destabilisierung und osmotischen Schocks zur Freisetzung der scFv aus dem Periplasma. Anschließend erfolgte die Inkubation der periplasmatischen Proteinfraction mit Nickel-Nitrilotriessigsäure-Agarose (Ni-NTA). Die hohe Bindungsaffinität des negativ geladenen 6x-His-Tag zu Nickel-Ionen bedingt eine spezifische Bindung der scFv an Ni-NTA-*Beads*. Ein Waschschrift mit 10 mM Imidazol löste unspezifisch gebundene BL21-Proteine von den Ni-NTA-*Beads*. Das verbleibende scFv-Proteingemisch wurde durch einen Waschschrift mit 500 mM Imidazol von der Ni-NTA gelöst. Für alle fünf scFv-Expressionen konnte in dieser Elutionsfraction die Anreicherung eines spezifischen Proteins nachgewiesen werden (Abbildung 12). Dieses zeigte sich nicht in entsprechenden Negativkontrollen (Daten nicht gezeigt) und hatte zudem eine scFv-charakteristische molekulare Größe.

Da für den anti-ASGPR- und den anti-Mesothelin-scFv die stärkste Proteinexpression nachgewiesen werden konnte, wurden diese beiden Konstrukte für die weitere Aufreinigung und funktionelle Analyse herangezogen.

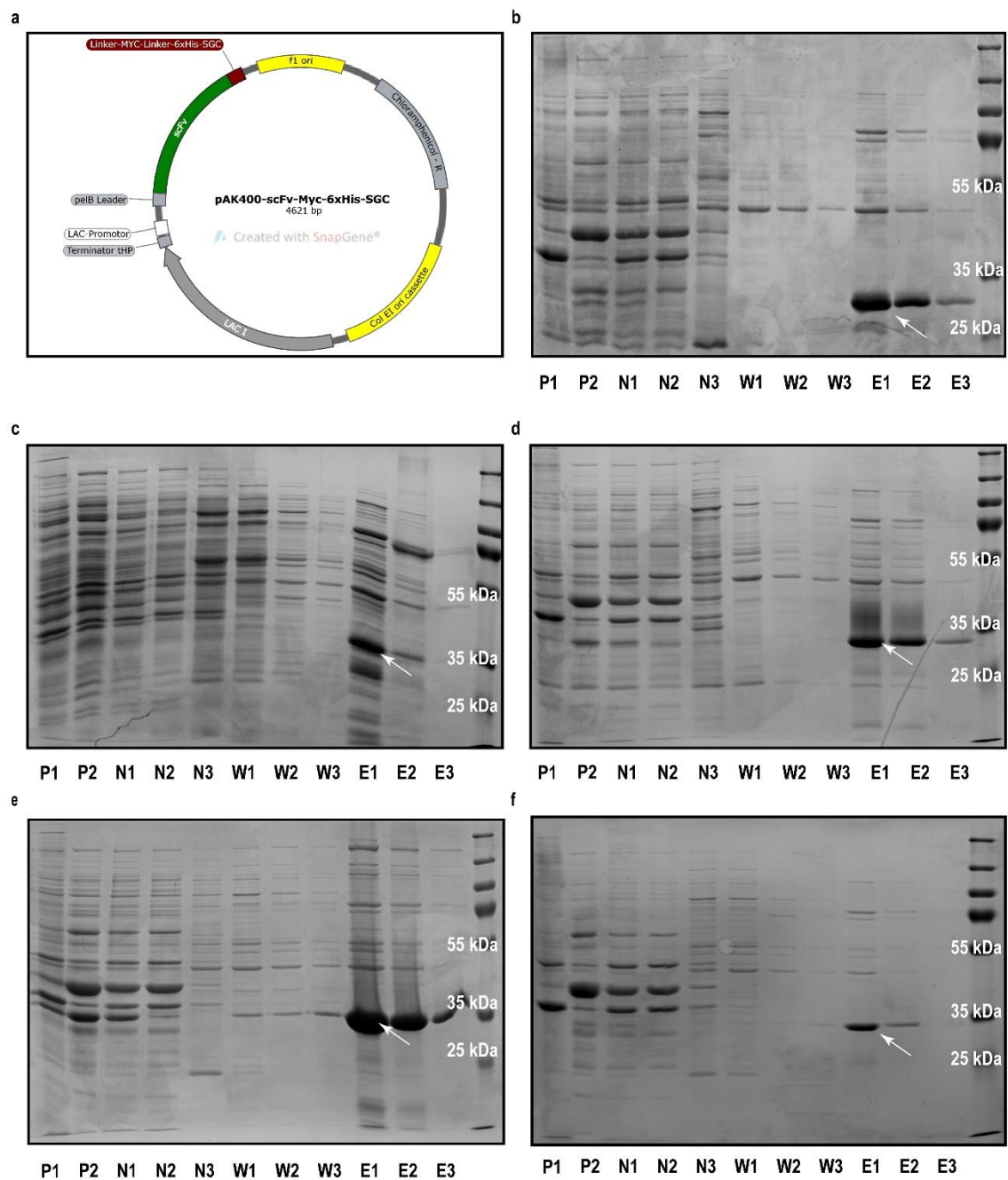


Abbildung 12: Bakterielle Expression und Anreicherung von C-terminal modifizierten scFv. Abbildung (a) zeigt das modifizierte pAK400-Plasmid. Bakterielle periplasmatische Expression und Anreicherung von C-terminalen modifizierten (b) anti-ASGPR-scFv, (c) anti-CLEC12A-scFv, (d) anti-FAP-scFv (e) anti-Mesothelin-scFv und eines (f) anti-CD33-scFv. Zwei periplasmatischen Extraktionsfraktionen (P1 und P2) wurden mit Ni-NTA-Beads bei 4°C für 60 min inkubiert. Vor (N1) und nach (N2) der Ni-NTA-Inkubation wurden Proben gewonnen und der Überstand (N3) nach fünfminütiger Zentrifugation bei 800 x g verworfen. Es erfolgten fünf Waschschrte (W1-W3) mit 500 µl PBS (10 mM Imidazol) und fünf Elutionsschritte (E1-E3) mit 500 µl PBS (500 mM Imidazol). 30 µl jeder Fraktion wurden auf ein 12% SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Die Proteine wurden durch eine Coomassie-Färbung sichtbar gemacht.

3.3.2 Aufreinigung des anti-ASGPR-scFv

Zunächst mussten geeignete Aufreinigungsbedingungen für den anti-ASGPR-scFv ermittelt werden (Abbildung 13). Hierzu erfolgte die Aufreinigung per Affinitätschromatographie, in dem die 6x-His-Tag-enthaltenden scFv an eine Ni-NTA-Säule gebunden wurden. In einem iterativen Prozess (siehe Material und Methoden) wurden für die Aufreinigung der scFv eine Imidazol-Konzentration von 30 mM ermittelt, welche eine Entfernung sämtlicher BL21-Proteine ermöglichte ohne zur Ablösung der scFv von der Ni-NTA zu führen. Die Wasch- und Expressionsfraktionen wurden anschließend mittels SDS-PAGE analysiert. Hier zeigte sich eine einzelne Proteinbande zwischen 25 kD und 35 kD, welche der molekularen Größe eines scFv entsprach. Gleichzeitig zeigten sich bei 30 mM Imidazol nur geringe scFv Verluste in den Waschfraktionen.

Der hier aufgereinigte anti-ASGPR wurde erstmalig nach Insertion eines C-terminalen Cysteins aufgereinigt. Geringfügige Veränderungen der Aminosäuresequenz eines rekombinanten Proteins können zu drastischen Einschränkungen seiner Funktionalität führen (Kang et al. 2020). Nach der Expression und Aufreinigung des modifizierten anti-ASGPR-scFv musste die Affinität dieses rekombinanten Proteins gegenüber dem ASGPR-Antigen bestätigt werden.

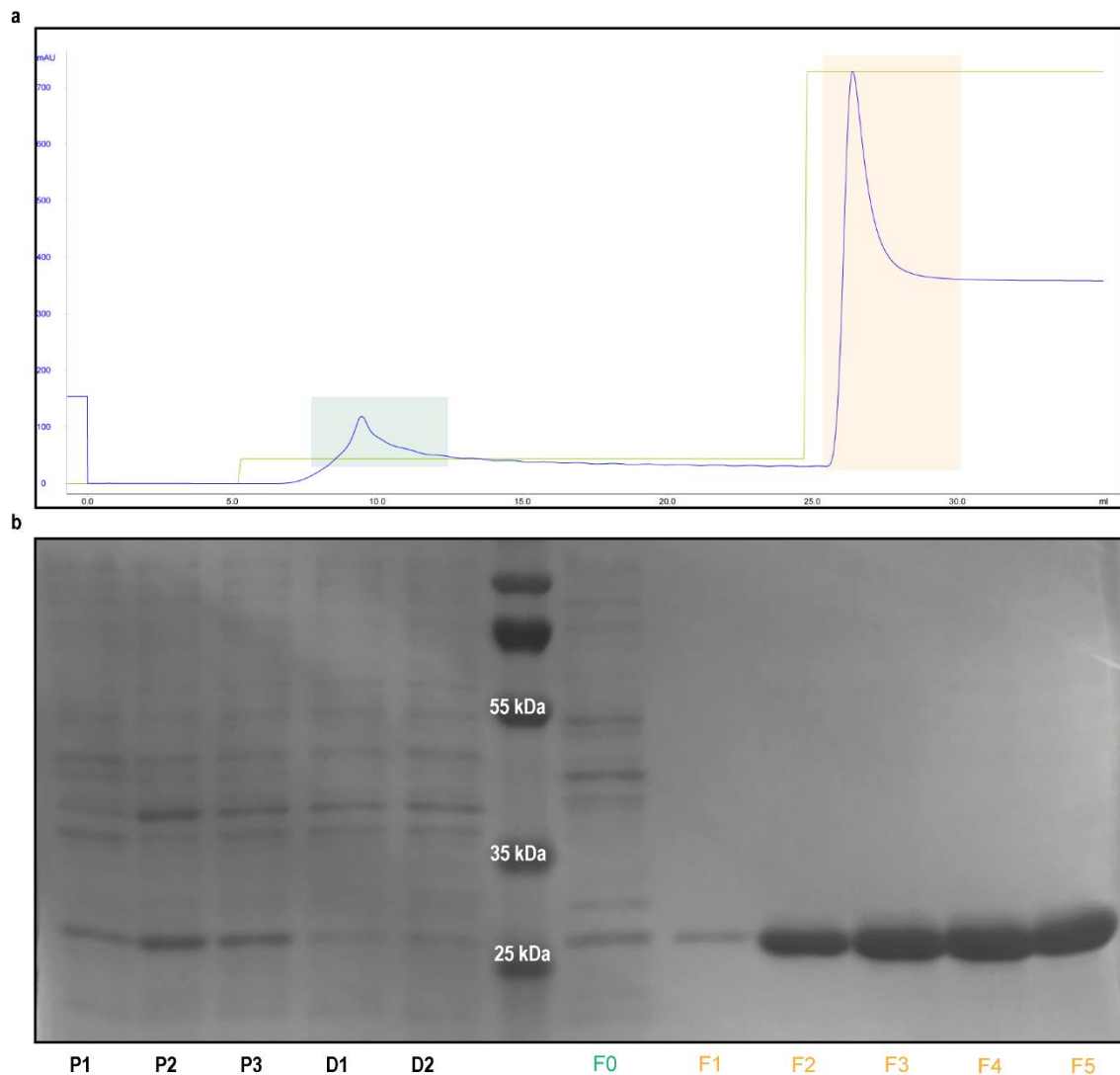


Abbildung 13: Affinitätschromatographie eines C-terminal modifizierten anti-ASGPR-scFv. **(a)** Aufreinigung der periplasmatischen Fraktionen einer bakteriellen anti-ASGPR-scFv-Expression mittels Ni-NTA-Säule und HPLC (1 ml/min). In einem zweistufigen Prozess erfolgte die Erhöhung der Imidazol-Konzentration (grüne Kurve) und eine Proteindetektion per Absorptionsmessung bei 280 nm (blaue Kurve). **(b)** Aufgetragen auf ein 12% SDS-Polyacrylamid-Gel wurden 10 µl der periplasmatischen Extraktionsfraktionen (P1-P2), der gepoolten Extraktionsfraktionen nach Dialyse mit dem HPLC-Puffer A (P3), nach Durchfluss durch die Ni-NTA-Säule (D1-D2), der Waschfraktion zum Zeitpunkt der höchsten Proteindetektion (F0, grünes Quadrat) und der Elutionsfraktionen (F1-F5, orangenes Quadrat). Die Proteine wurden durch eine Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Eine geeignete Imidazol-Waschkonzentration (30 mM) wurde in vier iterativen Aufreinigungsexperimenten bestimmt.

Zur Kontrolle der Bindungsaffinität des anti-ASGPR-scFv wurden die ASGPR-exprimierende HCC-Zelllinie HepG2 und Hep3B verwendet. Es erfolgte die Inkubation einer HepG2-Zellsuspension mit anti-ASGPR-scFv und eine anschließende Markierung zellulär gebundener scFv mittels eines anti-6x-His-Antikörpers. In der anschließenden Durchflusszytometrie zeigte der

scFv keine Affinität gegenüber den ASGPR-exprimierenden Zellen (Abbildung 14c).

Die spontane Ausbildung intermolekularer Disulfidbrücken zwischen einzelnen scFv-Molekülen ist nach der Insertion eines Cysteins am C-Terminus des scFv vorbeschrieben (Albrecht et al. 2004). Eine solche intermolekulare Disulfidbrücke könnte den Antikörper-gestützten Nachweis eines C-terminalen 6x-His-Tag per Durchflusszytometrie behindern. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, erfolgte die Größenauffrennung per SDS-PAGE sowohl unter nicht-reduzierenden Bedingungen als auch in der Anwesenheit des Reduktionsmittels β -Mercaptoethanol. Während sich in Anwesenheit von β -Mercaptoethanol ein spezifisches Proteinsignal zwischen 25 und 35 kDa zeigte, überwog in der Abwesenheit von β -Mercaptoethanol ein zweites Proteinsignal geringfügig über der 55 kDa-Markierung (Abbildung 14a). Diese Signale entsprachen der errechneten molekularen Größe eines anti-ASGPR scFv-Monomer (26,8 kDa) und eines anti-ASGPR scFv-Dimere (53,6 kDa). Geringfügige Unterschiede zwischen dem theoretisch errechneten molekularen Gewicht mit den Ergebnissen der SDS-PAGE wurden in der Literatur wiederholt vorbeschrieben (Guan et al. 2015). Durch seine größere Molekülgröße sind intramolekulare Disulfidbrücken Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin (TCEP) schlechter zugänglich als β -Mercaptoethanol. Zur schonenden Reduktion des scFv-Dimeres erfolgte nun die Titration einer geeigneten TCEP-Menge und eine anschließende erneute durchflusszytometrische Analyse des scFv-Monomers. Es konnte ebenfalls keine spezifische Bindung des scFv an ASGPR-positive Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 14c).

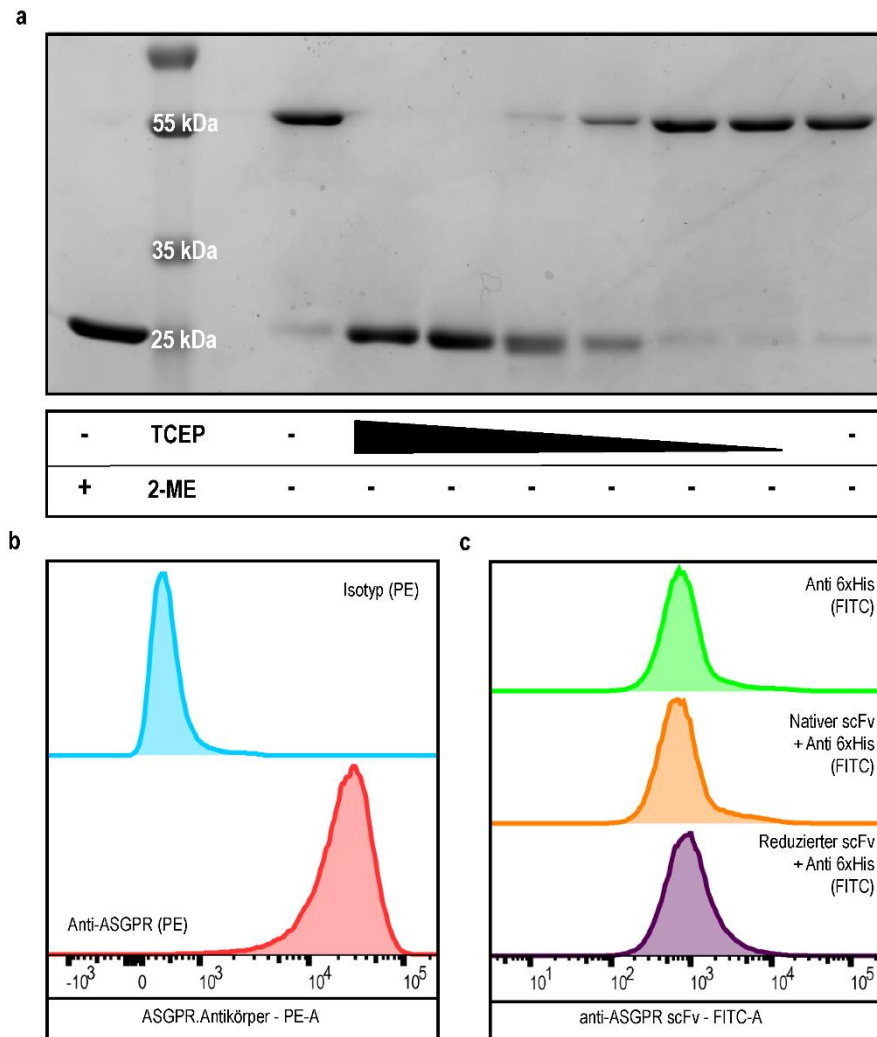


Abbildung 14: Biochemische Untersuchung des C-terminal modifizierten anti-ASGPR-scFv. (a) 1 μg des anti-ASGPR-scFv wurden mit und ohne β -Mercaptoethanol (2-ME) auf eine 12% SDS-PAGE aufgetragen. TCEP diente der Reduktion der scFv-Dimere in Monomere unter Bewahrung intramolekularer scFv-Disulfidbrücken. TCEP-Konzentration von Links nach Rechts: 100 mM, 10 mM, 1 mM, 100 μM , 10 μM , 1 μM . **(b)** Links: Färbung einer ASGPR positiven Zelllinie (HepG2). Rechts: Untersuchung der Affinität von 100 mg/l des nativen und reduzierten (1 mM TCEP) anti-ASGPR-scFv für die HCC-Zelllinie-HepG2 mittels eines FITC-markierten anti-6x-His-Antikörpers. Ein repräsentatives Experiment von zwei (wobei HepG2 durch Hep3B ersetzt wurde).

Da es nicht möglich ist, die funktionelle Expression eines *de novo* exprimierten Proteins sicher vorherzusagen, schien ein Versuch-und-Irrtum-Vorgehen für unsere scFv-Expression unvermeidlich. Nachdem der modifizierte anti-ASGPR scFv nicht funktionell exprimiert werden konnte, sollte nun der anti-Mesothelin scFv aufgereinigt und charakterisiert werden.

3.3.3 Aufreinigung und Charakterisierung des anti-Mesothelin-scFv

Der anti-Mesothelin-scFv konnte erfolgreich im Milligramm-Maßstab in BL21-*E. coli*-Bakterien exprimiert und anschließend wie oben beschrieben über Affinitätschromatographie aufgereinigt werden (Abbildung 15a). Die Qualitätskontrolle mittels einer SDS-PAGE zeigte eine hohe Reinheit des Produktes (Abbildung 15b).

Zur Untersuchung der Affinität des scFv für Mesothelin wurde die Mesothelin-exprimierende humane Pankreaskarzinom-Zelllinie SUIT-2-MSLN verwendet. Mesothelin-negative Panc1-Zellen dienten als Negativkontrolle (Daten nicht gezeigt). Die spezifische Bindung des anti-Mesothelin-scFv an SUIT-2-MSLN wurde durch Anfärbung mit einem Fluorochrom-markierten anti-6x-His-Tag-Antikörper nachgewiesen (Abbildung 15c). Anschließend erfolgte eine Titration der scFv-Konzentration mit konzentrationsabhängiger Zunahme der Fluorochrom-Signalstärke. Hier zeigte sich eine hyperbolische Saturationskurve der scFv-Bindung an die Mesothelin-exprimierenden Zellen (Abbildung 15d). Es erfolgte die Bestimmung der Dissoziationskonstante K_D nach dem in Kapitel 2.4.3.4 beschriebenen Vorgehen. Der errechnete K_D -Wert von 23,48 nM bewies die hochspezifische Bindung des scFv an die Mesothelin-exprimierende Zelllinie SUIT-2-MSLN.

Der funktionelle scFv wurde dem mir nachfolgenden Doktoranden unserer Arbeitsgruppe zum Retargeting der VLPs übergeben. Die dort gewonnen Daten sind nicht mehr Teil dieser Arbeit.

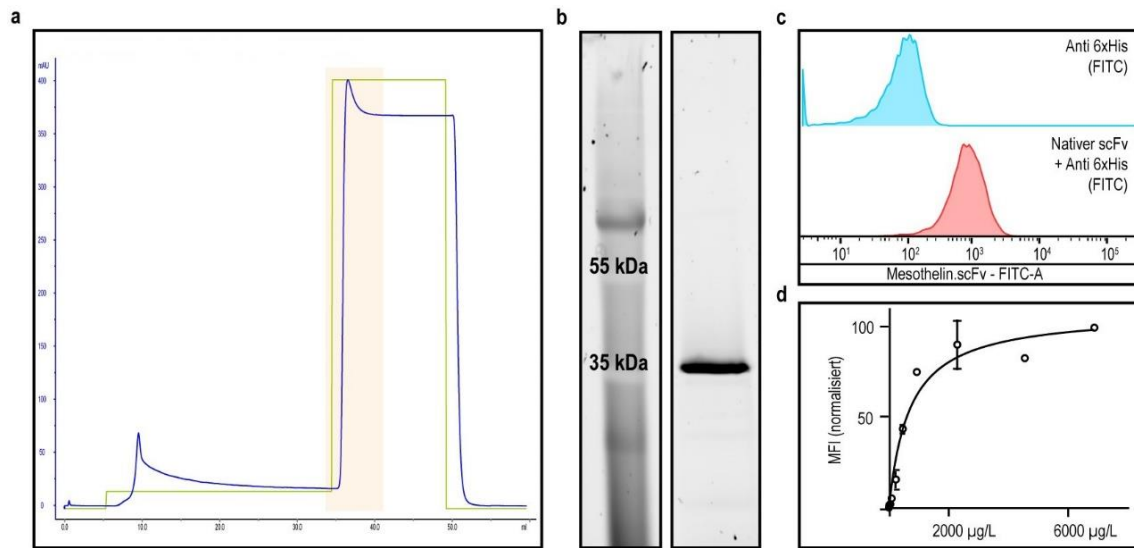


Abbildung 15: Bakterielle Aufreinigung eines C-terminal modifizierten anti-Mesothelin-scFv und Affinitätstestung mittels Durchflusszytometrie. (a) Aufreinigung der periplasmatischen Fraktionen einer bakteriellen anti-Mesothelin-scFv-Expression mittels Ni-NTA-Säule und HPLC (1 ml/min). In einem zweistufigen Prozess erfolgte die Erhöhung der Imidazol-Konzentration (grüne Kurve) und eine Proteindetektion per Absorptionmessung bei 280 nm (blaue Kurve). **(b)** Aufgetragen auf eine SDS-PAGE wurden 10 µl der in der in **(a)** farbig (orange) hinterlegten Elutionsfraktion. **(c)** Untersuchung der Affinität von 100 mg/l des nativen anti-Mesothelin-scFv für SUIT-2-MSLN mittels eines FITC-markierten anti-6x-His-Antikörpers. Eine Negativkontrolle mit nicht Mesothelin-exprimierenden Panc1-Zellen wurde durchgeführt (Daten nicht gezeigt). **(d)** Normalisierte Titrationskurve des durchflusszytometrischen Nachweises von anti-Mesothelin-scFv auf Panc-1 in nativer Form. Gezeigt sind gepoolte Daten aus zwei unabhängigen Experimenten zur Bestimmung der Dissoziationskonstante K_D (siehe Kapitel 2.4.3.4).

4 Diskussion

4.1 Die Transfektion von Nukleinsäuren mittels VLPs

Die zellspezifische Transfektion stellt nach wie vor eines der größten Probleme gentherapeutischer Medikamente dar. In der vorliegenden Arbeit konnte zunächst gezeigt werden, dass ein Transport von DNA und RNA durch Verpackung in JC-Virus-basierten VLPs in adhärenente und nicht-adhärenente Tumorzellen möglich ist. In der anschließenden Charakterisierung der VLPs wurden zentrale Fragen der Transfektionseffizienz, Transfektionskinetik und Toxizität geklärt.

Ein zelltypabhängiger Unterschied der Transfektionseffizienz könnte mit dem natürlichen Tropismus des JC-Virus erklärt werden. Eine spezifische Pentasaccharidsequenz ist zur Anheftung an die Zellmembran notwendig, wohingegen die Anwesenheit der 5-HT₂-Rezeptorfamilie entscheidend für die effiziente Endozytose des JC-Virus ist (Neu et al. 2010, Assetta et al. 2013). Lichtmikroskopische Untersuchungen zeigten eine dosisabhängige Toxizität der VLPs in zwei von drei verwendeten Zelllinien. Der Mechanismus der Zelltodinduktion ist ungeklärt und in der Literatur bislang nicht beschrieben. Es ist allerdings anzumerken, dass die hier verwendete VLP-Konzentration um ein Vielfaches über der bisher *in vivo* verwendeten VLP-Konzentration liegt (Hoffmann et al. 2016, Hoffmann et al. 2018). Hoffmann et al. verwendeten VLP-Gesamt Mengen von 40 µg bis 150 µg pro Versuchstier, während hier bis zu 40 µg im 48-Multiwell-Format verwendet wurden. Da durch Hoffmann et al. *in vivo* und in Primärzellen keine Toxizität gezeigt wurde, können Tumorzell-spezifische Besonderheiten als Erklärung nicht ausgeschlossen werden. Bei der mikroskopisch beobachteten Bildung von intrazellulären Vesikeln könnten es sich morphologisch um VLP-enthaltende Endosomen oder Lysosomen handeln. Abweichend von der für das JC-Virus beschriebenen Transfektionskinetik zeigte sich zudem eine langsamere Transfektionsgeschwindigkeit der VLPs (Pho et al. 2000). Zukünftige Arbeiten mit Antikörper-basierter Anfärbung von Nukleus, Endosom, Lysosom und

VP1-Protein zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Transfektion und anschließender konfokaler Mikroskopie könnten Auskunft über den Ursprung dieser Vesikel sowie den intrazellulären Transport der VLPs geben.

Von besonderem Interesse erscheint die Erkenntnis, dass nur ein geringer Teil der eingesetzten DNA tatsächlich in VLPs verpackt wird. Hierzu könnte unter anderem folgende theoretische Überlegung eine Erklärung bieten: Das ringförmige JC-Virus-Genom ist etwa 5100 Basenpaare lang, im ungünstigsten Fall sollten also in einem *virus-like particle* nur eine einzelne eGFP-DNA-Kassette einer Länge von 1901 Basenpaaren verpackt werden. Das molekulare Gewicht dieser eGFP-DNA-Kassette entspricht 1.175 kDa. Die molekulare Masse eines einzelnen VP1-Proteins kann mit ungefähr 40 kDa angenommen werden. Da 360 VP1-Proteine ein Virus-Kapsid bilden, entspricht dies einem molekularen Gewicht von 14.400 kDa. Falls nur eine einzelne DNA-Kassette pro VLP verpackt wird, entspricht dies folglich einer theoretischen VLP-Kapazität von DNA-Kassette zu VP1-Proteinen von ungefähr 1:12,25. Die experimentell beobachtete effektive VLP-Kapazität liegt jedoch bei 1:250 (Abbildung 7). Hieraus lässt sich ableiten, dass höchstens jeder 20te VLP mit einer DNA-Kassette beladen ist. Für weitere Arbeiten sollte bedacht werden, dass eine Optimierung der Reaktionsbedingungen unter welchen sich die VP1-Proteine zu einem VLP zusammenlagern (Ding et al. 2010) oder eine anschließende Aufreinigung der beladenen VLPs die effektive VLP-Kapazität um den Faktor 20 steigern könnte.

Darüber hinaus wurde die Eignung der VLPs für den Transport immunstimulatorischer ppp-RNAs überprüft. Zunächst wurden diese kurzen RNA-Oligonukleotide, welche über eine 5'-Triphosphat-Gruppe verfügten, mittels *in vitro*-Transkription hergestellt und aufgereinigt. Hierbei gelang es die Reinheit des Transkriptionsprodukts durch Verwendung eines T7 *class II phi 2.5*-Promoters weiter zu verbessern (Abbildung 9). Jedoch zeigte sich, dass VLPs sich nicht für den Transport von ppp-RNA-Molekülen eignen (Abbildung 10).

Das Fehlen einer RIG-I-Aktivierung durch ppp-RNA-VLPs könnte mit der VLP-Biologie erklärt werden. Das JC-Virus transportiert sein Erbgut nach Infektion einer Zelle über das endoplasmatische Retikulum in den Nukleus. Man kann davon ausgehen, dass eine gesunde Zelle Mechanismen entwickelt hat, RNA-Transkriptionsprodukte mit einer 5' Triphosphat-Gruppe nicht in das Zytosol gelangen zu lassen, da dies den viralen RNA-Sensor RIG-I aktivieren würde. Im Nukleus freigesetzte ppp-RNA kann also nicht frei in das Zytosol diffundieren, sondern ist auf den Transport durch Transportproteine wie Exportin-5 angewiesen (Wu et al. 2018). Experimentelle Studien zur zellulären Transkription von RIG-I-Agonisten bzw. ppp-RNA bestätigen, dass nukleäre ppp-RNA nicht zur Aktivierung des RIG-I-Signalwegs in der Lage ist (Luke et al. 2011). Die Wechselwirkung zwischen ppp-RNA und dem VP1-Protein wurde bisher noch nicht untersucht. Es erscheint ebenfalls möglich, dass die stark negative Triphosphat-Gruppe der ppp-RNA die Bildung funktioneller VLPs verhindert oder zu stark mit der positiv-geladenen Innenseite der VLP interagiert, was eine Erkennung durch RIG-I verhindert.

Neben immunstimulatorischer RNA konnte auch ein effektiver Transport einer zytotoxischen siRNA ausgeschlossen werden. Das Fehlen eines siRNA-Effekts ist schwieriger zu erklären, da dieser bereits in der Literatur für Primärzellen beschrieben wurde (Hoffmann et al. 2016, Hoffmann et al. 2018). Hierbei sind mehrere Erklärungen denkbar, welche zum Teil auch auf das Fehlen eines ppp-RNA Effekts übertragbar sind. Die einfachste Erklärung ist, dass die Menge an transfizierter siRNA nicht ausreicht, um einen zytotoxisch messbaren Effekt in der verwendeten Zelllinie auszulösen. Tumorzellspezifische Besonderheiten des Exportin-5-Transportwegs könnten hier ebenfalls eine Rolle spielen (Wu et al. 2018). Die Wahl einer spezifischen siRNA zum *knockdown* eines mittels RT-qPCR quantifizierbaren mRNA-Produkts wäre hier eine sensitivere Nachweismethode eines siRNA-Effekts. In Hinblick auf die ursprüngliche Fragestellung dieser Arbeit nach therapeutischer Verwendbarkeit scheinen solch schwache siRNA-Effekte jedoch nicht relevant.

Die VLP-Technologie ermöglicht jedoch den effizienten Transport von DNA-Kassetten in eine Vielzahl von Tumorzelllinien. Abhängig vom

transportierten Gen ist es vorstellbar, indirekt immunstimulatorische Effekte durch ppp-RNA nachzuahmen oder sogar zu übertreffen. Für diesen Zweck besonders geeignet scheinen konstitutiv aktive MAVS-Mutanten (Gupta et al. 2016), IRF7/IRF3-Fusionsproteine (Ramirez-Carvajal et al. 2016) und vor allem *RNA-dependent RNA polymerases* (RdRPs) (Painter et al. 2015), welche einen potenten Vakzinierungseffekt innerhalb einer Tumorzelle auslösen könnten, ähnlich wie für ppp-RNA-transfizierte Tumorzellen beschrieben (Bek et al. 2019).

Zur Demonstration der Spezifität einer solchen Therapie konnte mithilfe des Alpha-Fetoprotein-Promoters (hAFP) eine tumorzellspezifische Expression eines Reportergens gezeigt werden (Abbildung 11). Nur in der HCC-Zelllinie-Huh7 konnte eine relevante Expression der Reporter-DNA nachgewiesen werden. Der hier verwendete hAFP-Promoter inklusive eines 5'-SV40-Enhancer-Elements ist mit 515 Basenpaaren kleiner als der bisher verwendete ubiquitäre CAG-Promoter mit 892 Basenpaaren. Eine Verpackung in VLPs sollte also sichergestellt sein. Weitere tumorspezifische Promoter sind in der Literatur beschrieben und könnten das Repertoire an spezifisch therapierbaren Tumoren erweitern (Chen et al. 2018).

Die VLP-Technologie wurde im Deutschen Primatenzentrum in Göttingen entwickelt. Wir bezogen das VP1-Protein von der AG Gruber. Hierzu wurde das *major capsid protein VP1* (VP1) rekombinant in Insektenzellen hergestellt und aufgereinigt. Die rekombinante Expression neuer VP1-Proteine erfolgte in unregelmäßigen Abständen. Jede VP1-Charge wurde nach ihrer Ankunft in München durch die Transfektion von eGFP-DNA in Huh7-Zellen getestet. Hierbei mussten mehrere Chargen auf Grund von Dysfunktionalität verworfen werden, in welchen sich bei makroskopischer Betrachtung denaturiertes VP1-Protein zeigte. Für weiterführende Arbeiten ist eine Sicherstellung eines regelmäßigen Nachschubs an VP1-Protein und eines geeigneten Transportwegs unabdingbar. Diese Engpässe in der VP1-Protein-Produktion limitierten die Anzahl der möglichen Experimente und Wiederholungsmöglichkeiten, sodass sich der zweite Teil dieser Arbeit auf die Expression modifizierter scFv-Moleküle zum späteren Retargeting konzentrierte.

4.2 Modifikation des VLP-Tropismus

Wie in der Einleitung erläutert, wurde durch die AG Gruber eine Hypothese zum Retargeting der VLPs mittels Antikörperfragmenten aufgestellt. Durch ein chemisches Cross-Linking eines scFv an die Außenseite des VP1-Protein sollte es möglich sein, den natürlichen Tropismus des VP1 zu inhibieren und gleichzeitig ein Retargeting gegen die Antigene der Antikörperfragmente zu ermöglichen. Hierzu wurden zunächst verschiedene potenzielle Membranproteine identifiziert, welche ein tumorspezifisches Targeting ermöglichen könnten. Für zukünftige Arbeiten sollte das Targeting einer großen Bandbreite unterschiedlicher Tumormodelle ermöglicht werden. CD33, CLEC12A, ASGPR, Mesothelin und FAP gehörten zu den identifizierten Zielproteinen. Bei CD33 und CLEC12A handelt es sich um TAAs, welche in der Literatur als vielversprechende Zielstruktur für das Targeting akuter myeloischer Leukämien beschrieben wurden (Willier et al. 2021). Durchflusszytometrische Untersuchungen zeigten zudem, dass beide Membranproteine von den in dieser Arbeit verwendeten AML-PDX-Zelllinien exprimiert werden (Daten nicht gezeigt). ASGPR stellt hingegen ein leberspezifisches Target des Hepatozellulären Karzinoms und der hier verwendeten HCC-Zelllinie-Huh7 dar (Oh et al. 2016). Mesothelin und FAP sind in der Literatur als Targets des Pankreaskarzinoms (Lv et al. 2019) und seines Tumorstromas (Lindner et al. 2019) vorgeschlagen worden.

Die Sequenz des anti-CD33-scFv wurde von der AG Hopfner zur Verfügung gestellt. Gegen CLEC12A (Wiersma et al. 2015), Mesothelin (WIPO PCT: WO2015051199A2), FAP (WIPO PCT: WO2012020006) und ASGPR (Zhao et al. 2011) gerichtete scFv-Sequenzen wurden in Patentschriften und Veröffentlichungen recherchiert. Um ein späteres Cross-Linking zu ermöglichen, wurde C-terminal der scFv-Sequenz eine für die Aminosäuren Serin-Glycin-Cystein kodierende Nukleotidsequenz eingefügt. In bakteriellen Testexpressionen konnte die relative Expressionsstärke der modifizierten scFv abgeschätzt werden (Abbildung 12). Der anti-ASGPR-scFv zeigte das stärkste Expressionsprofil, weshalb dieser erfolgreich im Litermaßstab exprimiert und aufgereinigt wurde (Abbildung 13). Es sollte sich jedoch zeigen, dass dieser als

dysfunktionaler Dimer exprimiert wurde (Abbildung 14). Ein vollständiger Verlust der Affinität eines scFv zu seinem Antigen, nach Insertion eines C-terminalen Cysteins, ist in der Literatur bereits beschrieben worden (Albrecht et al. 2006). Dass eine C-terminale Cystein-Insertion jedoch nicht zwangsläufig zur Funktionslosigkeit eines scFv führt, wurde ebenfalls beschrieben (Albrecht et al. 2004). Aus diesem Grund erfolgte eine Expression und Aufreinigung des anti-Mesothelin-scFv unter identischen Bedingungen (Abbildung 15). In der anschließenden funktionellen Testung konnte eine spezifische Bindung des scFv an Mesothelin-exprimierende Zellen nachgewiesen werden. Eine Titrationskurve und eine nichtlineare Regressionsanalyse dieser zeigte eine Dissoziationskonstante K_D im niedrigen nanomolaren Bereich. Für nicht modifizierte anti-Mesothelin-scFv sind in Patentschriften K_D -Werte ebenfalls im niedrigen nanomolaren Bereich beschrieben (WIPO PCT: WO2000073346A1).

Da zu diesem Zeitpunkt keine ausreichende Menge an VP1-Protein zur Verfügung stand, wurde der funktionelle anti-Mesothelin-scFv an den mir nachfolgenden Doktoranden zur weiteren Evaluation des scFv-VLP-Ansatzes zu einem späteren Zeitpunkt übergeben. Die hier gewonnenen Daten sind nicht Teil dieser Arbeit. Neueste Forschungsergebnisse konnten jedoch das von uns angestrebte Retargeting der JC-Virus VLPs mittels chemischen Cross-Linking erfolgreich demonstrieren (Lai et al. 2021). Ergänzend hierzu konnte die AG Gruber jüngst ein Retargeting-System basierend auf scFv entwickeln und patentieren, welches kein chemisches Cross-Linking benötigt (WIPO PCT: WO2018141849A1). Die in dieser Arbeit etablierten scFv stellen folglich für zukünftige Retargeting-Versuche ein nützliches Werkzeug dar.

Als zentrales Hindernis für diese Arbeit stellte sich die unstetige Verfügbarkeit von VP1-Proteinen heraus, welche die Anzahl der möglichen Experimente limitierte. Eine Optimierung der VP1-Protein-Verfügbarkeit wäre für weitere experimentelle Arbeiten wünschenswert.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die auf dem VP1-Kapsidprotein des JC-Virus basierenden *virus-like particles* (VLPs) des Deutschen Primatenzentrums auf ihre Eignung für das tumorspezifische Targeting therapeutischer Nukleinsäuren untersucht. Mittels Reporter-Systemen konnte der VLP-vermittelte Transport von RNA und DNA in multiple Tumorzelllinien nachgewiesen werden. Es erfolgte die Ermittlung der Dosis-Wirkungs-Beziehung und Transfektionskinetik in verschiedenen Tumorzelllinien. Erstmals konnte eine dosisabhängige Toxizität der VLPs beobachtet werden. Die zugrundeliegenden zellbiologischen Vorgänge sind zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht geklärt. Durch experimentelle und theoretische Überlegungen konnte gezeigt werden, dass nur ein Bruchteil der VLPs mit DNA beladen werden konnten und eine Effizienzsteigerung der VLP-Technologie zukünftig möglich sein könnte. Die hier demonstrierte tumorspezifische DNA-Expression unter Kontrolle des humanen AFP-Promoters könnte die Spezifität der VLP-Technologie weiter erhöhen. Gezeigt wurde in dieser Arbeit zudem, dass sich VLPs nicht für den Transport immunstimulatorischer ppp-RNAs eignen. Als Nebenerkenntnis konnte die Reinheit der ppp-RNA-Synthese per *in vitro*-Transkription durch die Verwendung eines *class II phi 2.5-T7*-Promoters deutlich verbessert werden. Dies könnte weitere Arbeiten auf dem Gebiet der immunstimulatorischen RNA erleichtern. Das durch Gruber et al. beschriebene Retargeting der VLPs mittels Antikörperfragmenten (scFv) stellt eine vielversprechende Möglichkeit für einen spezifischen Nukleinsäuren-Transport dar. Fünf scFv-Sequenzen, gerichtet gegen die tumorassoziierte Membranproteine ASGRP, CD33, CLEC12, FAP und Mesothelin, wurden C-terminal modifiziert, um eine kovalente Kopplung an das VP1-Protein zu ermöglichen. Geeignete Expressions- und Aufreinigungsbedingungen für diese modifizierten scFv-Moleküle wurden etabliert und ein funktioneller anti-Mesothelin-scFv rekombinant hergestellt.

Literaturverzeichnis

- Adams D, Gonzalez-Duarte A, O'Riordan WD, Yang CC, Ueda M, Kristen AV, Tournev I, Schmidt HH, Coelho T, Berk JL, Lin KP, Vita G, Attarian S, Plante-Bordeneuve V, Mezei MM, Campistol JM, Buades J, Brannagan TH, 3rd, Kim BJ, Oh J, Parman Y, Sekijima Y, Hawkins PN, Solomon SD, Polydefkis M, Dyck PJ, Gandhi PJ, Goyal S, Chen J et al. Patisiran, an RNAi therapeutic, for hereditary transthyretin amyloidosis. *N Engl J Med* 2018; 379:11-21
- Albrecht H, Burke PA, Natarajan A, Xiong CY, Kalicinsky M, DeNardo GL, DeNardo SJ. Production of soluble scFvs with C-terminal-free thiol for site-specific conjugation or stable dimeric scFvs on demand. *Bioconjug Chem* 2004; 15:16-26.
- Albrecht H, Denardo GL, Denardo SJ. Monospecific bivalent scFv-SH: effects of linker length and location of an engineered cysteine on production, antigen binding activity and free SH accessibility. *J Immunol Methods*. 2006; 310(1-2):100-16.
- Andtbacka RHI, Collichio F, Harrington KJ, Middleton MR, Downey G, Öhrling K, Kaufman HL. Final analyses of OPTiM: a randomized phase III trial of talimogene laherparepvec versus granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in unresectable stage III-IV melanoma. *J Immunother Cancer* 2019; 7:145
- Assetta B, Maginnis MS, Gracia Ahufinger I, Haley SA, Gee GV, Nelson CD, O'Hara BA, Allen Ramdial SA, Atwood WJ. 5-HT2 receptors facilitate JC polyomavirus entry. *J Virol* 2013; 87:13490-8
- Balwani M, Sardh E, Ventura P, Peiró PA, Rees DC, Stölzel U, Bissell DM, Bonkovsky HL, Windyga J, Anderson KE, Parker C, Silver SM, Keel SB, Wang J-D, Stein PE, Harper P, Vassiliou D, Wang B, Phillips J, Ivanova A, Langendonk JG, Kauppinen R, Minder E, Horie Y, Penz C, Chen J, Liu S, Ko JJ, Sweetser MT et al. Phase 3 trial of RNAi therapeutic givosiran for acute intermittent porphyria. *N Engl J Med* 2020; 382:2289-301
- Bek S, Stritzke F, Wintges A, Nedelko T, Bohmer DFR, Fischer JC, Haas T, Poeck H, Heidegger S. Targeting intrinsic RIG-I signaling turns melanoma cells into type I interferon-releasing cellular antitumor vaccines. *Oncoimmunology* 2019; 8:e1570779
- Belgnaoui SM, Paz S, Hiscott J. Orchestrating the interferon antiviral response through the mitochondrial antiviral signaling (MAVS) adapter. *Curr Opin Immunol* 2011; 23:564-72
- Boehmer DFR, Formisano S, de Oliveira Mann CC, Mueller SA, Kluge M, Metzger P, Rohlf M, Horth C, Kocheise L, Lichtenthaler SF, Hopfner KP, Endres S, Rothenfusser S, Friedel CC, DUEWELL P, Schnurr M, Koenig LM. OAS1/RNase L executes RIG-I ligand-dependent tumor cell apoptosis. *Sci Immunol* 2021; 6:eabe2550
- Brunet JF, Denizot F, Luciani MF, Roux-Dosseto M, Suzan M, Mattei MG, Golstein P. A new member of the immunoglobulin superfamily - CTLA-4. *Nature* 1987; 328:267-70
- Bruns P. Die Heilwirkung des Erysipels auf Geschwülste. *Beitr Klin Chir* 1887; 3:443-66
- Burnet M. Cancer; a biological approach. I. The processes of control. *Br Med J* 1957; 1:779-86
- Bus T, Traeger A, Schubert US. The great escape: how cationic polyplexes overcome the endosomal barrier. *J Mater Chem B*. 2018; 6:6904-6918
- Camus M, Tosolini M, Mlecnik B, Pages F, Kirilovsky A, Berger A, Costes A, Bindea G, Charoentong P, Bruneval P, Trajanoski Z, Fridman WH, Galon J. Coordination of intratumoral immune reaction and human colorectal cancer recurrence. *Cancer Res* 2009; 69:2685-93

- Chen C, Yue D, Lei L, Wang H, Lu J, Zhou Y, Liu S, Ding T, Guo M, Xu L. Promoter-operating targeted expression of gene therapy in cancer: current stage and prospect. *Mol Ther Nucleic Acids* 2018; 11:508-14
- Chen LS, Wang M, Ou WC, Fung CY, Chen PL, Chang CF, Huang WS, Wang JY, Lin PY, Chang D. Efficient gene transfer using the human JC virus-like particle that inhibits human colon adenocarcinoma growth in a nude mouse model. *Gene Ther* 2010; 17:1033-41
- Chen P-L, Wang M, Ou W-C, Lii C-K, Chen L-S, Chang D. Disulfide bonds stabilize JC virus capsid-like structure by protecting calcium ions from chelation. *FEBS Letters* 2001; 500:109-13
- Chong ZX, Yeap SK, Ho WY. Transfection types, methods and strategies: a technical review. *Peer J* 2021; 9:e11165
- Chou MI, Hsieh YF, Wang M, Chang JT, Chang D, Zouali M, Tsay GJ. In vitro and in vivo targeted delivery of IL-10 interfering RNA by JC virus-like particles. *J Biomed Sci* 2010; 17:51
- Coleman TM, Wang G, Huang F. Superior 5' homogeneity of RNA from ATP-initiated transcription under the T7 phi 2.5 promoter. *Nucleic Acids Res* 2004; 32:e14
- Coley WB. Contribution to the knowledge of sarcoma. *Ann Surg* 1891; 14:199-220
- Ding Y, Chuan YP, He L, Middelberg AP. Modeling the competition between aggregation and self-assembly during virus-like particle processing. *Biotechnol Bioeng* 2010; 107:550-60
- Dong H, Zhu G, Tamada K, Chen L. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med* 1999; 5:1365-9
- Duewelling P, Steger A, Lohr H, Bourhis H, Hoelz H, Kirchleitner SV, Stieg MR, Grassmann S, Kobold S, Siveke JT, Endres S, Schnurr M. RIG-I-like helicases induce immunogenic cell death of pancreatic cancer cells and sensitize tumors toward killing by CD8(+) T cells. *Cell Death Differ* 2014; 21:1825-37
- Ehrlich P. Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung. *Beiträge zur experimentellen Pathologie und Chemotherapie* 1909:117-64
- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001; 411:494-8
- Ellermeier J, Wei J, Duewelling P, Hoves S, Stieg MR, Adunka T, Noerenberg D, Anders HJ, Mayr D, Poeck H, Hartmann G, Endres S, Schnurr M. Therapeutic efficacy of bifunctional siRNA combining TGF-beta1 silencing with RIG-I activation in pancreatic cancer. *Cancer Res* 2013; 73:1709-20
- Fang CY, Tsai YD, Lin MC, Wang M, Chen PL, Chao CN, Huang YL, Chang D, Shen CH. Inhibition of human bladder cancer growth by a suicide gene delivered by JC polyomavirus virus-like particles in a mouse model. *J Urol* 2015; 193:2100-6
- Frisque RJ, Bream GL, Cannella MT. Human polyomavirus JC virus genome. *J Virol* 1984; 51:458-69.
- Galle PR, Foerster F, Kudo M, Chan SL, Llovet JM, Qin S, Schelman WR, Chintharlapalli S, Abada PB, Sherman M, Zhu AX. Biology and significance of alpha-fetoprotein in hepatocellular carcinoma. *Liver Int* 2019; 39:2214-29
- Galon J, Bruni D. Approaches to treat immune hot, altered and cold tumours with combination immunotherapies. *Nat Rev Drug Discov* 2019; 18:197-218
- Gleiter S, Lillie H Cell-type specific targeting and gene expression using a variant of Polyoma VP1 virus-like particles. *Biol Chem* 2003; 384(2):247-55

- Goldmann C, Petry H, Frye S, Ast O, Ebitsch S, Jentsch KD, Kaup FJ, Weber F, Trebst C, Nisslein T, Hunsmann G, Weber T, Luke W. Molecular cloning and expression of major structural protein VP1 of the human polyomavirus JC virus: formation of virus-like particles useful for immunological and therapeutic studies. *J Virol* 1999; 73:4465-9
- Goswami R, Subramanian G, Silayeva L, Newkirk I, Doctor D, Chawla K, Chattopadhyay S, Chandra D, Chilukuri N, Betapudi V. Gene therapy leaves a vicious cycle. *Front Oncol* 2019; 9:297
- Guan Y, Zhu Q, Huang D, Zhao S, Jan Lo L, Peng J. An equation to estimate the difference between theoretically predicted and SDS PAGE-displayed molecular weights for an acidic peptide. *Sci Rep* 2015; 5:13370
- Guevara ML, Persano F, Persano S. Advances in lipid nanoparticles for mRNA-based cancer immunotherapy. *Front Chem* 2020; 8:589959
- Gupta S, Termini JM, Issac B, Guirado E, Stone GW. Constitutively active MAVS Inhibits HIV-1 replication via type I interferon secretion and Induction of HIV-1 restriction factors. *PLoS One* 2016; 11:e0148929
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144:646-74
- Helal NA, Osami A, Helmy A, McDonald T, Shaaban LA, Nounou MI. Non-viral gene delivery systems: hurdles for bench-to-bedside transformation. *Pharmazie* 2017; 72:627-93
- Hiscott J, Pitha P, Genin P, Nguyen H, Heylbroeck C, Mamane Y, Algarte M, Lin R. Triggering the Interferon Response: the role of IRF-3 transcription factor. *J Interferon Cytokine Res* 1999; 19:1-13
- Hitoshi N, Ken-ichi Y, Jun-ichi M. Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* 1991; 108:193-9
- Hoffmann DB, Boker KO, Schneider S, Eckermann-Felkl E, Schuder A, Komrakova M, Sehmisch S, Gruber J. In vivo siRNA delivery using JC virus-like particles decreases the expression of RANKL in rats. *Mol Ther Nucleic Acids* 2016; 5:e298
- Hoffmann DB, Gruber J, Boker KO, Deppe D, Sehmisch S, Schilling AF, Lemus-Diaz N, Komrakova M, Schneider S. Effects of RANKL knockdown by virus-like particle-mediated RNAi in a rat model of osteoporosis. *Mol Ther Nucleic Acids* 2018; 12:443-52
- Hornung V, Ellegast J, Kim S, Brzozka K, Jung A, Kato H, Poeck H, Akira S, Conzelmann KK, Schlee M, Endres S, Hartmann G. 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* 2006; 314:994-7
- Iurescia S, Fioretti D, Rinaldi M. Targeting cytosolic nucleic acid-sensing Pathways for Cancer Immunotherapies. *Front Immunol* 2018; 9:711
- Ivashkiv LB, Donlin LT. Regulation of type I interferon responses. *Nat Rev Immunol* 2014; 14:36-49
- Janeway CA, Jr. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1989; 54 Pt 1:1-13
- Kalbasi A, Ribas A. Tumour-intrinsic resistance to immune checkpoint blockade. *Nat Rev Immunol* 2020; 20:25-39
- Kang TH, Seong BL. Solubility, stability, and avidity of recombinant antibody fragments expressed in microorganisms. *Front Microbiol* 2020; 11:1927
- Kaur D, Patiyal S, Sharma N, Usmani SS, Raghava GPS. PRRDB 2.0: a comprehensive database of pattern-recognition receptors and their ligands. *Database (Oxford)* 2019; 2019

- Kawai T, Takahashi K, Sato S, Coban C, Kumar H, Kato H, Ishii KJ, Takeuchi O, Akira S. IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat Immunol* 2005; 6:981-8
- Kaygisiz K, Synatschke CV. Materials promoting viral gene delivery. *Biomater Sci* 2020; 8:6113-56
- Kranz LM, Diken M, Haas H, Kreiter S, Loquai C, Reuter KC, Meng M, Fritz D, Vascotto F, Hefesha H, Grunwitz C, Vormehr M, Husemann Y, Selmi A, Kuhn AN, Buck J, Derhovanessian E, Rae R, Attig S, Diekmann J, Jabulowsky RA, Heesch S, Hassel J, Langguth P, Grabbe S, Huber C, Tureci O, Sahin U. Systemic RNA delivery to dendritic cells exploits antiviral defence for cancer immunotherapy. *Nature* 2016; 534:396-401
- Lai WH, Fang CY, Chou MC, Lin MC, Shen CH, Chao CN, Jou YC, Chang D, Wang M. Peptide-guided JC polyomavirus-like particles specifically target bladder cancer cells for gene therapy. *Sci Rep* 2021; 11:11889
- Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Rutkowski P, Lao CD, Cowey CL, Schadendorf D, Wagstaff J, Dummer R, Ferrucci PF, Smylie M, Hogg D, Hill A, Marquez-Rodas I, Haanen J, Guidoboni M, Maio M, Schoffski P, Carlino MS, Lebbe C, McArthur G, Ascierto PA, Daniels GA, Long GV, Bastholt L, Rizzo JI, Balogh A, Moshyk A, Hodi FS, Wolchok JD. Five-Year Survival with combined nivolumab and ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med* 2019; 381:1535-46
- Le DT, Muller KM. In vitro assembly of virus-like particles and their Applications. *Life (Basel)* 2021; 11:334
- Li PP, Naknanishi A, Tran MA, Ishizu K, Kawano M, Phillips M, Handa H, Liddington RC, Kasamatsu H. Importance of Vp1 calcium-binding residues in assembly, cell entry, and nuclear entry of simian virus 40. *J Virol* 2003; 77:7527-38
- Luke JM, Simon GG, Soderholm J, Errett JS, August JT, Gale M, Jr., Hodgson CP, Williams JA. Coexpressed RIG-I agonist enhances humoral immune response to influenza virus DNA vaccine. *J Virol* 2011; 85:1370-83
- Lv J, Li P. Mesothelin as a biomarker for targeted therapy. *Biomark Res* 2019; 7:18 Lindner T, Loktev A, Giesel F, Kratochwil C, Altmann A, Haberkorn U. Targeting of activated fibroblasts for imaging and therapy. *EJNMMI Radiopharm Chem* 2019; 4:16
- Maginnis MS, Nelson CD, Atwood WJ. JC polyomavirus attachment, entry, and trafficking: unlocking the keys to a fatal infection. *J Neurovirol.* 2015; 21:601-13
- Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 1994; 12:991-1045
- Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, Rives S, Boyer M, Bittencourt H, Bader P, Verneris MR, Stefanski HE, Myers GD, Qayed M, De Moerloose B, Hiramatsu H, Schlis K, Davis KL, Martin PL, Nemecek ER, Yanik GA, Peters C, Baruchel A, Boissel N, Mechinaud F, Balduzzi A, Krueger J, June CH, Levine BL, Wood P, Taran T, Leung M, Mueller KT et al. Tisagenlecleucel in children and young adults with B-cell lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2018; 378:439-48
- Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 2008; 454:428-35
- Nelson CD, Derdowski A, Maginnis MS, O'Hara BA, Atwood WJ. The VP1 subunit of JC polyomavirus recapitulates early events in viral trafficking and is a novel tool to study polyomavirus entry. *Virology* 2012; 428:30-40
- Neu U, Maginnis MS, Palma AS, Stroh LJ, Nelson CD, Feizi T, Atwood WJ, Stehle T. Structure-function analysis of the human JC polyomavirus establishes the LSTc pentasaccharide as a functional receptor motif. *Cell Host Microbe* 2010; 8:309-19

- Norkiene M, Stonyte J, Ziogiene D, Mazeike E, Sasnauskas K, Gedvilaite A. Production of recombinant VP1-derived virus-like particles from novel human polyomaviruses in yeast. *BMC Biotechnol* 2015; 15:68
- Oh HR, Jo HY, Park JS, Kim DE, Cho JY, Kim PH, Kim KS. Galactosylated liposomes for targeted co-delivery of doxorubicin/vimentin siRNA to hepatocellular carcinoma. *Nanomaterials (Basel)* 2016; 6:141
- Pagès F, Mlecnik B, Marliot F, Bindea G, Ou F-S, Bifulco C, Lugli A, Zlobec I, Rau TT, Berger MD, Nagtegaal ID, Vink-Börger E, Hartmann A, Geppert C, Kolwelter J, Merkel S, Grützmann R, Van den Eynde M, Jouret-Mourin A, Kartheuser A, Léonard D, Remue C, Wang JY, Bavi P, Roehrl MHA, Ohashi PS, Nguyen LT, Han S, MacGregor HL et al. International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study. *Lancet* 2018; 391:2128-39
- Painter MM, Morrison JH, Zoecklein LJ, Rinkoski TA, Watzlawik JO, Papke LM, Warrington AE, Bieber AJ, Matchett WE, Turkowski KL, Poeschla EM, Rodriguez M. Antiviral protection via RdRP-mediated stable activation of innate immunity. *PLoS Pathog* 2015; 11:e1005311
- Paz SPC, Branco L, Pereira MAC, Spessotto C, Fragoso YD. Systematic review of the published data on the worldwide prevalence of john cunningham virus in patients with multiple sclerosis and neuromyelitis optica. *Epidemiol Health* 2018; 40:e2018001
- Pho MT, Ashok A, Atwood WJ. JC virus enters human glial cells by clathrin-dependent receptor-mediated endocytosis. *J Virol* 2000; 74:2288-92
- Pleiss JA, Derrick ML, Uhlenbeck OC. T7 RNA polymerase produces 5' end heterogeneity during in vitro transcription from certain templates. *RNA* 1998; 4:1313-7
- Poock H, Besch R, Maihoefer C, Renn M, Tormo D, Morskaya SS, Kirschnek S, Gaffal E, Landsberg J, Hellmuth J, Schmidt A, Anz D, Bscheider M, Schwerd T, Berking C, Bourquin C, Kalinke U, Kremmer E, Kato H, Akira S, Meyers R, Hacker G, Neuenhahn M, Busch D, Ruland J, Rothenfusser S, Prinz M, Hornung V, Endres S, Tuting T, Hartmann G. 5'-Triphosphate-siRNA: turning gene silencing and rig-I activation against melanoma. *Nat Med* 2008; 14:1256-63
- Quante AS, Ming C, Rottmann M, Engel J, Boeck S, Heinemann V, Westphalen CB, Strauch K. Projections of cancer incidence and cancer-related deaths in germany by 2020 and 2030. *Cancer Med* 2016; 5:2649-56
- Ramirez-Carvajal L, Diaz-San Segundo F, Ramirez-Medina E, Rodriguez LL, de Los Santos T. Constitutively active IRF7/IRF3 fusion protein completely protects swine against foot-and-mouth Disease. *J Virol* 2016; 90:8809-21
- Ray U, Cinque P, Gerevini S, Longo V, Lazzarin A, Schippling S, Martin R, Buck CB, Pastrana DV. JC polyomavirus mutants escape antibody-mediated neutralization. *Sci Transl Med.* 2015; 7:306ra151.
- Roberts TC, Langer R, Wood MJA. Advances in oligonucleotide drug delivery. *Nat Rev Drug Discov* 2020; 19:673-94
- Rusinova I, Forster S, Yu S, Kannan A, Masse M, Cumming H, Chapman R, Hertzog PJ. Interferome v2.0: an updated database of annotated interferon-regulated genes. *Nucleic Acids Res* 2013; 41:D1040-6
- Ruzicka M, Koenig LM, Formisano S, Boehmer DFR, Vick B, Heuer EM, Meini H, Kocheise L, Zeitlhofer M, Ahlfeld J, Kobold S, Endres S, Subklewe M, Duewell P, Schnurr M, Jeremias I, Lichtenegger FS, Rothenfusser S. RIG-I-based immunotherapy enhances survival in preclinical AML models and sensitizes AML cells to checkpoint blockade. *Leukemia* 2020; 34:1017-26

- Sasnauskas K, Bulavaite A, Hale A, Jin L, Knowles WA, Gedvilaite A, Dargeviciute A, Bartkeviciute D, Zvirbliene A, Staniulis J, Brown DW, Ulrich R. Generation of recombinant virus-like particles of human and non-human polyomaviruses in yeast *saccharomyces cerevisiae*. *Intervirology* 2002; 45:308-17
- Schmidt U, Rudolph R, Bohm G. Mechanism of assembly of recombinant murine polyomavirus-like particles. *J Virol* 2000; 74:1658-62
- Seth RB, Sun L, Ea CK, Chen ZJ. Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell* 2005; 122:669-82
- Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, Schreiber RD. IFNgamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 2001; 410:1107-11
- Shim G, Kim D, Le QV, Park GT, Kwon T, Oh YK. Nonviral delivery systems for cancer gene therapy: strategies and challenges. *Curr Gene Ther* 2018; 18:3-20
- Song Y, Zhou K, Jin C, Qian Z, Hou M, Fan L, Li F, Ding K, Zhou H, Li X, Chen B, Sun X, Song X, Jiang M, Zhang Q, Liu L, Yu G, Hu Y, Zhao Z, Liu L, Xue H, Luo J, He B, Jin X, Wang M, Li B, Xia Y, Zhu J. A phase II study of the anti-programmed cell death-1 (PD-1) antibody penpulimab in patients with relapsed or refractory classic hodgkin lymphoma (cHL). *J Immunother of Cancer* 2020; 8:A840-A
- Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. The cancer genome. *Nature* 2009; 458:719-24
- Stutman O. Tumor development after 3-methylcholanthrene in immunologically deficient athymic-nude mice. *Science* 1974; 183:534-6
- Sun SC. The non-canonical NF-kappaB pathway in immunity and inflammation. *Nat Rev Immunol* 2017; 17:545-58
- Sun X, Li W, Zhang X, Qi M, Zhang Z, Zhang XE, Cui Z. In vivo targeting and Imaging of atherosclerosis using multifunctional virus-like particles of simian virus 40. *Nano Lett* 2016; 16:6164-71
- Thomas L, Lawrence H. Cellular and humoral aspects of the hypersensitive states. *New York: Hoeber-Harper* 1959:529-32
- Thorsson V, Gibbs DL, Brown SD, Wolf D, Bortone DS, Ou Yang TH, Porta-Pardo E, Gao GF, Plaisier CL, Eddy JA, Ziv E, Culhane AC, Paull EO, Sivakumar IKA, Gentles AJ, Malhotra R, Farshidfar F, Colaprico A, Parker JS, Mose LE, Vo NS, Liu J, Liu Y, Rader J, Dhankani V, Reynolds SM, Bowlby R, Califano A, Cherniack AD, Anastassiou D et al. The immune landscape of cancer. *Immunity* 2018; 48:812-30 e14
- van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, Knuth A, Boon T. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 1991; 254:1643-7
- Vick B, Rothenberg M, Sandhofer N, Carlet M, Finkenzeller C, Krupka C, Grunert M, Trumpp A, Corbacioglu S, Ebinger M, Andre MC, Hiddemann W, Schneider S, Subklewe M, Metzeler KH, Spiekermann K, Jeremias I. An advanced preclinical mouse model for acute myeloid leukemia using patients' cells of various genetic subgroups and in vivo bioluminescence imaging. *PLoS One* 2015; 10:e0120925
- Wahane A, Waghmode A, Kapphahn A, Dhuri K, Gupta A, Bahal R. Role of lipid-based and polymer-based non-viral vectors in nucleic acid delivery for next-generation gene therapy. *Molecules* 2020; 25

- Wang M, Tsou TH, Chen LS, Ou WC, Chen PL, Chang CF, Fung CY, Chang D. Inhibition of simian virus 40 large tumor antigen expression in human fetal glial cells by an antisense oligodeoxynucleotide delivered by the JC virus-like particle. *Hum Gene Ther* 2004; 15:1077-90.
- Wiersma VR, de Bruyn M, Shi C, Gooden MJ, Wouters MC, Samplonius DF, Hendriks D, Nijman HW, Wei Y, Zhou J, Helfrich W, Bremer E. C-type lectin-like molecule-1 (CLL1)-targeted TRAIL augments the tumoricidal activity of granulocytes and potentiates therapeutic antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *MAbs* 2015; 7:321-30
- Willier S, Rothämel P, Hastreiter M, Wilhelm J, Stenger D, Blaeschke F, Rohlf M, Kaeuferle T, Schmid I, Albert MH, Binder V, Subklewe M, Klein C, Feuchtinger T. CLEC12A and CD33 coexpression as a preferential target for pediatric AML combinatorial immunotherapy. *Blood* 2021; 137:1037-49
- Willmsky G, Blankenstein T. Sporadic immunogenic tumours avoid destruction by inducing T-cell tolerance. *Nature* 2005; 437:141-6
- Wilson RC, Doudna JA. Molecular mechanisms of RNA interference. *Annu Rev Biophys* 2013; 42:217-39
- Wu K, He J, Pu W, Peng Y. The role of exportin-5 in microRNA biogenesis and cancer. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 2018; 16:120-6
- Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Akira S, Fujita T. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* 2004; 5:730-7
- Zhao X, Yu Z, Dai W, Yao Z, Zhou W, Zhou W, Zhou J, Yang Y, Zhu Y, Chen S, Cao L. Construction and characterization of an anti-asialoglycoprotein receptor single-chain variable-fragment-targeted melittin. *Biotechnol Appl Biochem* 2011; 58:405-11
- Zou J, Chang M, Nie P, Secombes CJ. Origin and evolution of the RIG-I like RNA helicase gene family. *BMC Evol Biol* 2009; 9:85

Verzeichnis der Abkürzungen

ASGPR	<i>Asialoglycoprotein receptor</i>
CAG	<i>CMV early enhancer/chicken beta actin</i>
CLEC12A	<i>C-type lectin domain family 12 member A</i>
CV	<i>Column volume</i>
dsRNA	Doppelsträngige RNA
DTT	1,4-Dithiothreit
eGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether) -N,N,N',N'-tetraessigsäure
FAP	<i>Fibroblast activation protein alpha</i>
h	Stunde
hAFP-Promoter	Promoter des humanen <i>Alpha-fetoprotein</i>
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
IP-10	<i>Interferon gamma-induced protein, CXCL10</i>
IRF3	<i>Interferon regulatory factor 3</i>
ISGs	<i>Interferon-stimulated genes</i>
MAVS	<i>Mitochondrial antiviral-signaling protein</i>
MDA5	<i>Melanoma differentiation antigen 5</i>
min	Minute
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure-Agarose
OH-RNA	RNA mit 5'-Hydroxygruppe-Gruppe
PDX-AML	<i>Patient-derived xenograft AML</i>
ppp-RNA	RNA mit 5'-Triphosphat-Gruppe
PRRs	<i>Pattern recognition receptors</i>
RFU	<i>Relative fluorescence unit</i>
RLR	<i>RIG-I-like receptors</i>
RIG-I	<i>Retinoic acid inducible gene 1</i>
scFv	<i>Single-chain variable fragment</i>
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
TAA	<i>Tumor-associated antigen</i>
TCEP	Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin
VP1	<i>Major capsid protein VP1</i>
VLP	<i>Virus-like particle</i>

Lebenslauf

Beruflicher Werdegang und Studium

Seit 2020	Arzt in Weiterbildung, I. Medizinische Klinik und Poliklinik, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
2013 - 2020	Hochschulstudium der Humanmedizin, Ludwig-Maximilians-Universität München Gesamtnote: „sehr gut“ (1,33)

Promotionsförderung und Stipendien

2016 - 2020	Stipendiat der Studienstiftung des deutschen Volkes
2016 - 2018	Assoziiertes Mitglied des Doktorandenkollegs <i>i-Target: Immunotargeting of cancer</i> , Elitenetzwerk Bayern
2015 - 2017	Promotionsstudiengang „Molekulare Medizin“, Förderprogramm für Forschung und Lehre (FöFoLe) der Medizinischen Fakultät der LMU

Publikationen

Boehmer DFR, Formisano S, de Oliveira Mann CC, Mueller SA, Kluge M, Metzger P, Rohlf s M, Horth C, **Kocheise L**, Lichtenthaler SF, Hopfner KP, Endres S, Rothenfusser S, Friedel CC, D uewell P, Schnurr M, Koenig LM.
OAS1/RNase L executes RIG-I ligand-dependent tumor cell apoptosis.
Science Immunology 2021; 6:eabe2550
JIF²⁰²⁰ 17.7

Ruzicka M, Koenig LM, Formisano S, Boehmer DFR, Vick B, Heuer EM, Meinl H, **Kocheise L**, Zeitlhofer M, Ahlfeld J, Kobold S, Endres S, Subklewe M, D uewell P, Schnurr M, Jeremias I, Lichtenegger FS, Rothenfusser S.
RIG-I-based immunotherapy enhances survival in preclinical AML models and sensitizes AML cells to checkpoint blockade.
Leukemia 2020; 34:1017-26
JIF²⁰²⁰ 11.5

Danksagung

Zunächst gilt mein Dank meinem Doktorvater Prof. Max Schnurr, sowie den Arbeitsgruppenleitern Prof. Simon Rothenfußer und Dr. Lars König für die Überlassung dieses interessanten Themas, ihre fortlaufende wissenschaftliche Unterstützung und die freundschaftliche Zusammenarbeit.

Ein besonderer Dank gilt unserem Institutsleiter Prof. Stefan Endres für die kollegiale und gute Atmosphäre, die er in der Abteilung für Klinische Pharmakologie etablierte und die seinesgleichen sucht. Die einzigartige Kombination aus freundschaftlichem Beisammensein und fokussiertem wissenschaftlichen Arbeiten wird mir noch lange positiv in Erinnerung bleiben.

Mein größter Dank geht allerdings an meine vielen Kolleginnen und Kollegen, von denen ich über Jahre unzählige Dinge lernen durfte. Ihrer Hilfsbereitschaft und ihren aufgeweckten Ideen verdanke ich einen Großteil meiner wissenschaftlichen Fähigkeiten. Ohne sie wäre meine Zeit im Labor nicht die gewesen, die sie wurde. Ich bin dankbar für die engen Freundschaften, die ich während meiner Zeit in der Abteilung für Klinische Pharmakologie schloss.

Meinen Kooperationspartnern Dr. Stefan Schneider (AG Gruber) und Dr. Nadja Fenn (AG Hopfner) bin ich für ihre Hilfestellung bei konkreten wissenschaftlichen Problemen dankbar.

Mein Dank gilt zudem dem Förderprogramm für Forschung und Lehre (FöFoLe) der Medizinischen Fakultät, dem Doktorandenkolleg *i-Target: Immunotargeting of cancer* des Elitenetzwerks Bayern und der Studienstiftung des deutschen Volkes für ihre ideelle und finanzielle Förderung während meiner Dissertation.

Ein persönlicher Dank gilt meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, für all ihre Unterstützung während meines Studiums und meiner Promotion.

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation

**Tumorzellspezifisches Targeting von
therapeutischen Nukleinsäuren mittels *virus-like particles*
zur Immuntherapie von Tumoren**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Lorenz Kocheise
Unterschrift Doktorand

München, 25. Oktober 2021