



universität
wien

DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

„Click-Konjugation von siRNA an ein Designed Ankyrin
Repeat Protein zur zielgerichteten Aufnahme in
Tumorzellen“

verfasst von / submitted by

Sonja Streußnig

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of
Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2016 / Vienna, 2016

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

Univ.-Ass. Mag. Dr. Johannes Winkler, Privatdoz

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei Privatdoz. Dr. Johannes Winkler bedanken, der es mir ermöglicht hat, meine Diplomarbeit am Department für pharmazeutische Chemie zu absolvieren und mir stets mit gutem Rat zur Seite gestanden ist.

Außerdem möchte ich Mag. Cornelia Lorenzer ein großes Dankeschön für die Betreuung, die zeitintensive Unterstützung bei all meinen Versuchen und ihr immer vorhandenes offenes Ohr für jegliche Probleme aussprechen.

Weiters bedanke ich mich bei Mag. Anna-Maria Winkler, MSc Volker Baumann, Mag. Dr. Mehrdad Dirin und DI Theresa Schwarz für ihre Tipps und Hilfestellungen.

Abschließend möchte ich mich auch besonders bei meiner Familie und meiner Freundin bedanken, die mir durch ihre Unterstützung das Studium ermöglicht haben und in jeder Lebenslage an meiner Seite stehen.

Abstract

Post-transcriptional gene silencing through RNA interference (RNAi) by small interfering ribonucleic acids (siRNAs) enables gene-specific therapy. Some RNAi-based drugs have already been developed and are undergoing clinical testing. However, administering siRNAs is still a major problem. Especially limited transport to the target location and limited uptake into the target cells are barriers which have to be overcome and are therefore at the core of current research.

There are different strategies to overcome these problems, including structural optimization of the siRNA and the use of delivery systems like lipid particles, cationic polymers or nanoparticles. Another possibility is the use of oligonucleotide conjugates for receptor-specific targeting.

Using click chemistry, a conjugate of a siRNA oligonucleotide and a Designed Ankyrin Repeat Protein (DARPin) was produced. Dibenzocyclooctyne-N-hydroxysuccinimidyl ester (DBCO-NHS-ester) was used as a linker between the oligonucleotide and the DARPin. The DARPin N3-Ec1 binds specifically to the transmembrane glycoprotein Epithelial Cell Adhesion Molecule (EpCAM), which is overexpressed on tumor cells of various carcinomas.

The main focus of the work was the production of the DBCO-conjugate and its cell culture analysis. Procedures for efficient conjugation and purification of the final product were established. Specific binding of the conjugate to the target EpCAM and the uptake into target cells were tested using flow cytometry. The results demonstrate significantly better binding to EpCAM through the DBCO-conjugate than through the siRNA itself. Furthermore, successful cellular uptake into EpCAM-positive cells was shown.

Zusammenfassung

RNA-Interferenz (RNAi) ermöglicht es, die Expression von Genen posttranslational zu regulieren und somit genspezifische Therapien zu entwickeln. Small-interfering Ribonukleinsäure (siRNA) baut dabei die entsprechende komplementäre messenger Ribonukleinsäure (mRNA) ab, wodurch deren Genexpression inhibiert wird. Obwohl schon RNAi-basierte Medikamente entwickelt worden sind, stellt die Verabreichung der siRNA noch immer eine große Hürde dar. Vor allem der Transport zum Wirkort und die Aufnahme in die Zielzellen sind limitierende Faktoren und deshalb momentan Gegenstand vieler Forschungsprojekte.

Es gibt mehrere Ansätze diese Hürden zu lösen. Dazu zählen die Struktur der siRNA zu optimieren und spezielle Transportsysteme wie Lipidpartikel, kationische Polymere oder auch Nanopartikel-Systeme. Eine weitere Möglichkeit ist die Herstellung von Oligonukleotid-Konjugaten besonders für eine rezeptor-spezifische Aufnahme, womit ich mich auch im Zuge meiner Diplomarbeit näher beschäftigt habe.

Mittels Click-Chemie wurde ein Biokonjugat aus dem EpCAM-spezifischen DARPin N3-Ec1 und einem Oligonukleotid mithilfe eines bifunktionellen Dibenzocyclooctin-N-hydroxysuccinimidyl-Alkyllinkers (DBCO-NHS-Alkyllinkers) hergestellt. Das Designed Ankyrin Repeat Protein (DARPin) N3-Ec1 bindet spezifisch an das transmembranäre Glykoprotein Epithelial Cell Adhesion Molecule (EpCAM), welches in einigen Krebsarten überexprimiert ist.

Neben der Ermittlung und Optimierung der geeigneten Reaktionsbedingungen für die Herstellung des DBCO-Konjugates sowie der effizienten Aufreinigung des Endproduktes wurde mittels Durchflusszytometrie sowohl die Bindung des DBCO-Konjugates an sein Target EpCAM, als auch die Aufnahme in die Zielzellen untersucht. Die

Zellkulturversuche haben gezeigt, dass es durch die Struktur des DBCO-Konjugates zu einer deutlich stärkeren Bindung an EpCAM-positive Zellen kommt, als durch die entsprechende siRNA-Duplex allein. Außerdem konnte gezeigt werden, dass das DBCO-Konjugat in EpCAM-positive Zellen aufgenommen wird.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	I
Abstract	II
Zusammenfassung	III
Inhaltsverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 RNA-Interferenz (RNAi)	1
1.2 RNAi-basierte Therapie, ihre Hürden und mögliche Lösungsansätze	3
1.3 Oligonukleotid-Konjugate	6
1.4 Click-Chemie	7
1.5 Designed Ankyrin Repeat Proteins (DARPs)	8
1.6 Epithelial Cell Adhesion Molecule (EpCAM)	10
2 Ziel	12
3 Material und Methoden	13
3.1 Herstellung und Aufreinigung des Konjugates	13
3.1.1 Reaktion von Oligonukleotid mit Linker	13
3.1.2 Größenausschlusschromatographie	14
3.1.3 Umsetzung mit dem Protein N3-Ec1	15
3.1.4 Semipräparative Aufreinigung mittels Reversed Phase- High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) ..	15
3.2 Fluoreszenzmarkierung	16
3.3 Analytik des Konjugates	16
3.3.1 RP-HPLC	16
3.3.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	18
3.3.3 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Native PAGE) ..	19
3.3.4 Stabilitätsprüfung	20
3.4 Zellkulturversuche	21
3.4.1 Bindungsversuch mittels Durchflusszytometrie an EpCAM-positiven Zellen	21
3.4.2 Zellaufnahmeversuch mittels Durchflusszytometrie in EpCAM-positive Zellen	23

3.4.3	Luciferase Assay	26
4	Resultate	30
4.1	Herstellung und Aufreinigung des Konjugates	30
4.1.1	Reaktion von Oligonukleotid mit Linker	30
4.1.2	Größenausschlusschromatographie	32
4.1.3	Umsetzung mit dem Protein N3-Ec1	33
4.1.4	Semipräparative Aufreinigung mittels Reversed Phase- High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) ..	36
4.2	Fluoreszenzmarkierung	37
4.3	Stabilitätsprüfung	37
4.4	Zellkulturversuche.....	38
4.4.1	Bindungsversuch mittels Durchflusszytometrie an EpCAM-positive Zellen	38
4.4.2	Bindungsversuch mittels Durchflusszytometrie an EpCAM-negative Zellen	43
4.4.3	Zellaufnahmeversuch mittels Durchflusszytometrie in EpCAM-positive Zellen	47
4.4.4	Luciferase-Assay.....	51
5	Diskussion	53
5.1	Herstellung und Aufreinigung des Konjugates	53
5.2	Fluoreszenzmarkierung	54
5.3	Analytik des Konjugates	55
5.4	Zellkulturversuche.....	55
5.5	Konklusion	59
	Referenzen.....	61

Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CPPs	zellpenetrierende Peptide
CuAAC	Kupfer(I)-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition
DARPinS	Designed Ankyrin Repeat Proteins
DBCO	Dibenzocyclooctin
DBCO-NHS-Alkyllinker	Dibenzocyclooctin-N-hydroxysuccinimidyl-Alkyllinker
DBCO-NHS-Ester	Dibenzocyclooctin-N-hydroxysuccinimidyl-Ester
DMSO	Dimethylsulfoxid
dsRNA	Doppelsträngige Ribonukleinsäure
EpCAM	Epithelial Cell Adhesion Molecule
FBS	Fetales Kälberserum
LAR II	Luciferase Assay Reagenz II
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
Native PAGE	Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PA	Pachyonychia congenital
PAMAM-Dendrimere	Polyamidoamin-Dendrimere
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PEG	Polyethylenglykol
PEI	Polyethylenimin
PLB	Passiver Lysepuffer
PLGA	Polylactid-co-Glykolid
PPI-Dendrimere	Polypropylenimin-Dendrimere
RISC	RNA-Induced-Silencing-Complex
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RP-HPLC	Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography
RSV	Respiratory Syncytial Virus
SB-Puffer	Sodium-Borat-Puffer
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
siRNA	Small-interfering Ribonukleinsäure
SNALPs	stabile Nukleinsäure-Lipid-Partikel
SPAAC	Strain-promoted Azid-Alkin-Cycloaddition

TBE

TEMED

TRIS-HCl

TTRA

TRIS-Borat-EDTA

Tetramethylethyldiamin

TRIS(hydroxymethyl)aminomethan-Hydrochlorid

Transthyretin-Amyloidose

1 Einleitung

1.1 RNA-Interferenz (RNAi)

Andrew Z. Fire und Craig C. Mello haben im Oktober 2006 den Nobelpreis für die Entdeckung der RNA-Interferenz (RNAi) erhalten.¹ Im Nematoden *Caenorhabditis elegans* haben sie den RNAi-Mechanismus durch doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA) gezeigt. Sie entdeckten, dass das spezifische Gen-Silencing durch eine Mischung aus dsRNA viel effektiver war als durch Sense- bzw. Antisense-RNA allein.² Auch in Fliegen, Mäusen, Pflanzen und Pilzen konnte RNAi nachgewiesen werden³ und wenig später wurde der Mechanismus auch in Säugetierzelllinien beschrieben. Dies ermöglicht RNAi zu nutzen, um die Funktionen von diversen humanen Genen zu analysieren und auch um Gen-spezifische Therapien zu entwickeln.⁴

Abbildung 1.01 (siehe S. 2) zeigt den RNAi-Mechanismus. Das Enzym Dicer, eine Ribonuklease III, spaltet dsRNA in kleine RNA-Duplexe, die 20-30 Nukleotide lang sind. Diese Duplexe werden entwunden, wobei der „guide strand“ und der „passenger strand“ entstehen. Der „passenger strand“ wird abgebaut und der „guide strand“ wird in den RNA-Induced-Silencing-Complex (RISC), der ein Argonaut-Protein enthält, aufgenommen. Der Komplex aus RISC, „guide strand“ und Argonaut-Protein sucht seine einzelsträngige Ziel-Messenger-Ribonukleinsäure (Ziel-mRNA), die zum „guide strand“ komplementär ist, und baut diese ab.^{5,6,7}

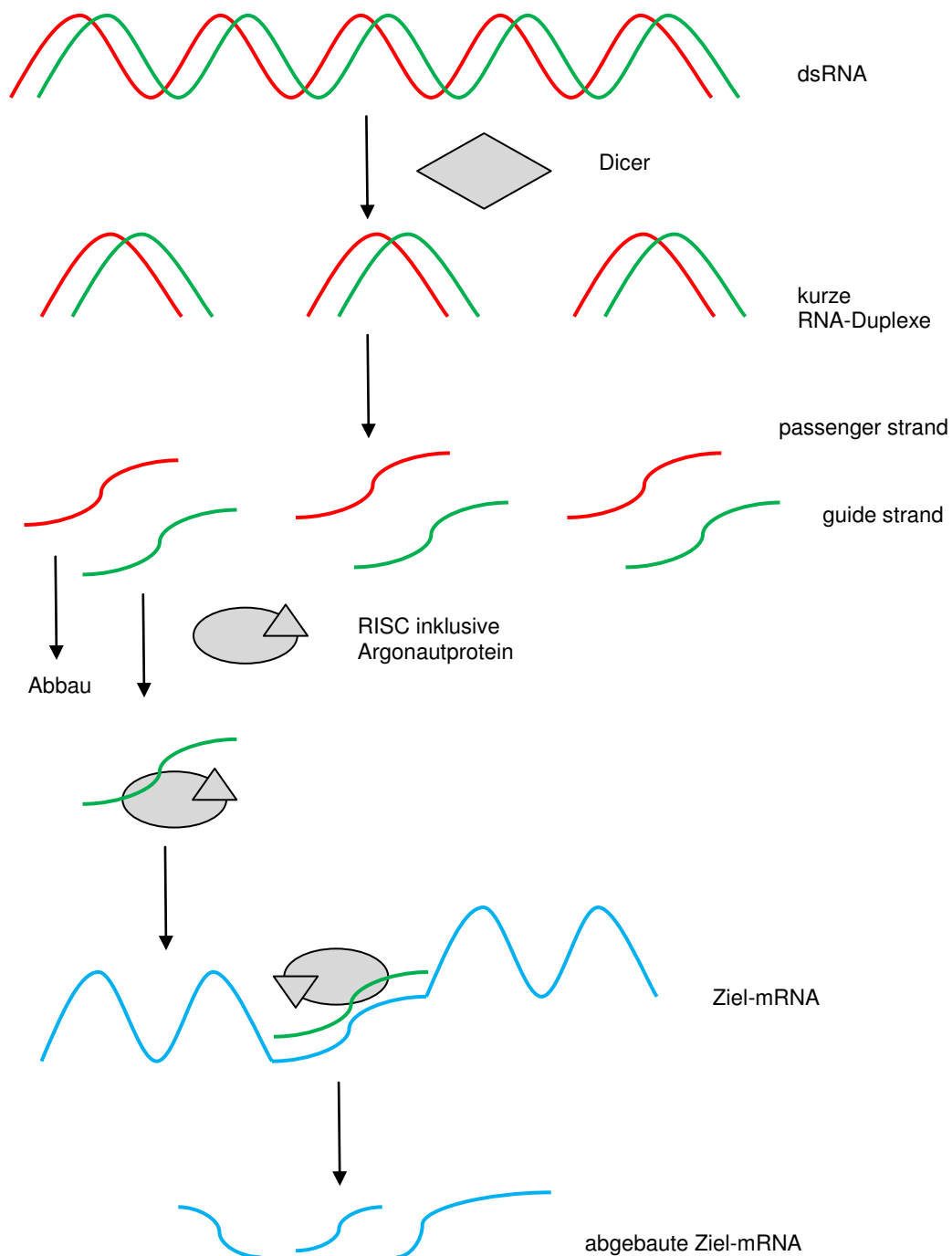


Abbildung 1.01: Schematische Darstellung des Mechanismus der RNA-Interferenz. DsRNA wird dabei mithilfe von dem Enzym Dicer in kurze RNA-Duplexe gespalten. Nachdem diese Duplexe entwunden worden sind, wird der „passenger strand“ abgebaut und der „guide strand“ formt gemeinsam mit RISC und Argonautprotein einen Komplex, der die komplementäre Ziel-mRNA abbaut.

1.2 RNAi-basierte Therapie, ihre Hürden und mögliche Lösungsansätze

Es gibt Hinweise, dass alle menschlichen Zellen kurze, nichtkodierende Ribonukleinsäuren (RNAs) enthalten und es möglich ist, die Expression von nahezu allen menschlichen Genen posttranslational zu regulieren.⁶ Dabei kann der Abbau von komplementärer mRNA durch small-interfering Ribonukleinsäure (siRNA) und damit die Inhibition der Genexpression ausgenutzt werden, um spezifisch Krankheiten zu behandeln.⁸ RNAi ist so spezifisch, weil die Identifikation der Ziel-mRNA auf der Watson-Crick-Basenpaarung beruht. Diese Spezifität versucht man auszunutzen, um gezielt mutierte Allele, die Krankheiten verursachen, wie zB aktivierte Onkogene, stillzulegen.⁹

Einige RNAi-basierte Medikamente wurden bereits entwickelt und befinden sich in der klinischen Prüfung. Dazu zählen zum Beispiel Medikamente zur Behandlung von diversen Tumoren, Hypercholesterinämie, chronisch myeloischer Leukämie (CML), Respiratory-Syncytial-Virus-Infektionen (RSV-Infektionen) und seltenen Erbkrankheiten wie Transthyretin-Amyloidose (TTRA) oder Pachyonychia congenita (PA).⁸

Eine Schwierigkeit stellt jedoch die geeignete Verabreichung der siRNA dar. Einerseits ist es möglich, die RNAi-basierten Therapeutika systemisch zu verabreichen. Dazu zählen intravenöse Injektionen bzw Injektionen direkt ins Zielgewebe, die intravitreale Gabe und auch lokale Verabreichungsmöglichkeiten wie Augentropfen oder Inhalation. Andererseits sind auch ex-vivo Methoden, wie die autologe Zelltherapie, bei der menschliche Zellen entnommen, mit siRNA modifiziert und wieder reimplantiert werden, möglich.⁸ Wichtig ist in jedem Fall, dass ein effektiver Transport der siRNA zu ihren Zielzellen gewährleistet wird.⁵ Dazu muss nach systemischer Verabreichung nicht nur dem schnellen Abbau durch Serumnukleasen entgegengewirkt werden, sondern auch das Durchdringen des vaskulären Endothels, der Transport durch den Extrazellulärraum zur

Zielzelle und der Durchtritt durch die Plasmamembran und die Membran des Endosoms der Zielzelle müssen bewerkstelligt werden.¹⁰ Bislang gelingt der effektive Transport von siRNA jedoch nur zur Leber^{10,11}, extrahepatische Ziele wie zum Beispiel Tumore, Muskeln, das Herz oder fibrotische Gewebe können nur unzureichend erreicht werden. Nackte, unmodifizierte siRNA weist Nachteile wie viele negative Ladungen und ein hohes Molekulargewicht auf und wird schnell von Serumnukleasen abgebaut und rasch renal eliminiert¹², was wiederum die Gabe von hohen Dosen bedingt. Durch die Entwicklung von speziellen Trägersystemen (Lipidpartikel, Liposomen, kationische Polymere oder Nanopartikel-Systeme) und Konjugaten lässt sich die Bioverfügbarkeit verbessern, aber es ergibt sich oft ein toxikologisches Problem.¹¹ Eine weitere Hürde stellt das Vermeiden von Off-Target-Effekten, wie das Gen-Silencing von anderen Genen als den Zielgenen und ungewollte Zytotoxizität, dar.⁵ Außerdem können große Mengen an siRNA die unspezifische Immunabwehr aktivieren.¹³

Damit die RNAi-basierte Therapie nicht nur in der Theorie, sondern auch in der pharmazeutischen Praxis erfolgreich ist, wird vor allem an der Verbesserung der pharmakokinetischen Eigenschaften der Wirkstoffe geforscht. Mögliche Lösungsansätze hierfür sind Strukturoptimierung, Entwicklung von geeigneten Transportsystemen und auch die Verknüpfung mit Liganden, die die pharmakologischen Eigenschaften verbessern oder es ermöglichen, gezielt an spezifische Rezeptoren zu binden.¹¹

Die Forschung zeigt, dass durch chemische Derivatisierung die Stabilität der Wirkstoffe gut verbessert werden kann, ihre Bioverfügbarkeit hingegen aber kaum positiv beeinflusst wird. Außerdem tolerieren die RNA-Effektormoleküle kaum strukturelle Modifikationen.¹¹

Durch spezielle Transportsysteme für siRNAs wie zum Beispiel Lipidpartikel, Liposomen, kationische Polymere oder Nanopartikel-Systeme kann man wiederum die Pharmakokinetik verbessern, jedoch muss die erfolgreiche klinische Applikation dieser Systeme erst gezeigt werden.¹¹

Durch stabile Nukleinsäure-Lipid-Partikel (SNALPs) bei denen die siRNA von einer Doppellipidschicht umhüllt wird, kann man beispielsweise die Bioverfügbarkeit der siRNA und die Transfektion erhöhen.¹³ Die Doppellipidschicht besteht aus kationischen und fusogenen Lipiden und ist mit Polyethylenglykol beschichtet. Es konnte gezeigt werden, dass mithilfe dieses Transportsystems die Replikation des Hepatitis B Virus in Mäusen mit einer vergleichsweise geringen Dosis an siRNA unterdrückt werden kann, was nicht nur den Vorteil einer Kostenersparnis hat, sondern auch die Toxizität der Therapie verringert. Möglich ist das, weil die Lipid-Komponente die siRNA vor dem Abbau durch Serumnukleasen schützt und die endosomale Aufnahme in die Zielzelle sowie die anschließende Freisetzung in das Zytoplasma erleichtert.¹⁴

Kationische, zellpenetrierende Peptide (CPPs) können durch elektrostatische Interaktionen nicht-kovalente Komplexe mit siRNA bilden. Diese Komplexe sind in Summe positiv geladen und damit nicht auf eine endosomale Aufnahme in die Zielzelle angewiesen, sondern passieren die Membran direkt. CPPs und siRNA können aber auch über Disulfidbrücken kovalent quervernetzt werden. Der Abbau der Disulfidbrücken in der Zelle führt dann zur Freisetzung der siRNA im Zytoplasma.¹²

Auch kationische Polymere sind effiziente Transfektionsreagenzien für siRNA. Sie formen gemeinsam mit der siRNA Polyplexe, deren Eigenschaften vom Verhältnis der positiven Ladungen der kationischen Polymere zur Anzahl der Phosphatgruppen der siRNA abhängen. Als Polymere nutzt man zum Beispiel Polyethylenimin (PEI) oder auch Polylactid-co-Glykolid (PLGA). Weitere Transportmöglichkeiten für siRNA stellen Polyamidoamin-Dendrimere (PAMAM-Dendrimere) und Polypropylenimin-Dendrimere (PPI-Dendrimere) dar. Auch Cyclodextrin-enthaltende kationische Polymer oder Dendrimere sind im Einsatz.¹²

Die biochemischen Eigenschaften und die Zellaufnahme lassen sich durch Konjugation optimieren. Konjugate erlauben außerdem Funktionalitäten

einzuführen, die es ermöglichen spezifische Gewebe oder Tumore anzugreifen.¹¹

1.3 Oligonukleotid-Konjugate

Oligonukleotid-Konjugate werden, wie schon erwähnt, vor allem hergestellt um die biochemischen Eigenschaften der siRNA zu verbessern und um ihre Aufnahme in das Zielgewebe zu erleichtern und somit die größten Hürden der siRNA-basierten Therapie zu umgehen. Aber auch Konjugate mit Liganden, die ein Rezeptor-spezifisches Targeting erlauben, sind momentan Gegenstand der Forschung.¹¹ Dazu ist es nötig, die siRNA mit einem Liganden, der an einen zell- bzw. gewebespezifischen Rezeptor bindet, zu verknüpfen, was schlussendlich dazu führt, dass das Konjugat aus siRNA und Ligand mittels Endozytose in die Zelle aufgenommen wird.¹⁵ Um hiermit auch in der Klinik erfolgreich zu sein, ist es wichtig, sicher zu stellen, dass sich die siRNA erst nach der Aufnahme in das Zielgewebe von ihrem Liganden trennt und nicht schon durch eine frühzeitige Freisetzung auf dem Weg dorthin verloren geht.¹⁶

Aus Abbildung 1.02 (siehe S. 7) ist ersichtlich, dass es mehrere Möglichkeiten gibt, Liganden an Oligonukleotide anzuknüpfen. Als Verknüpfungsstellen gelten vor allem die 3'- und 5'-Enden, aber auch die 2'-Hydroxy-Gruppen und die Nukleobasen.¹¹

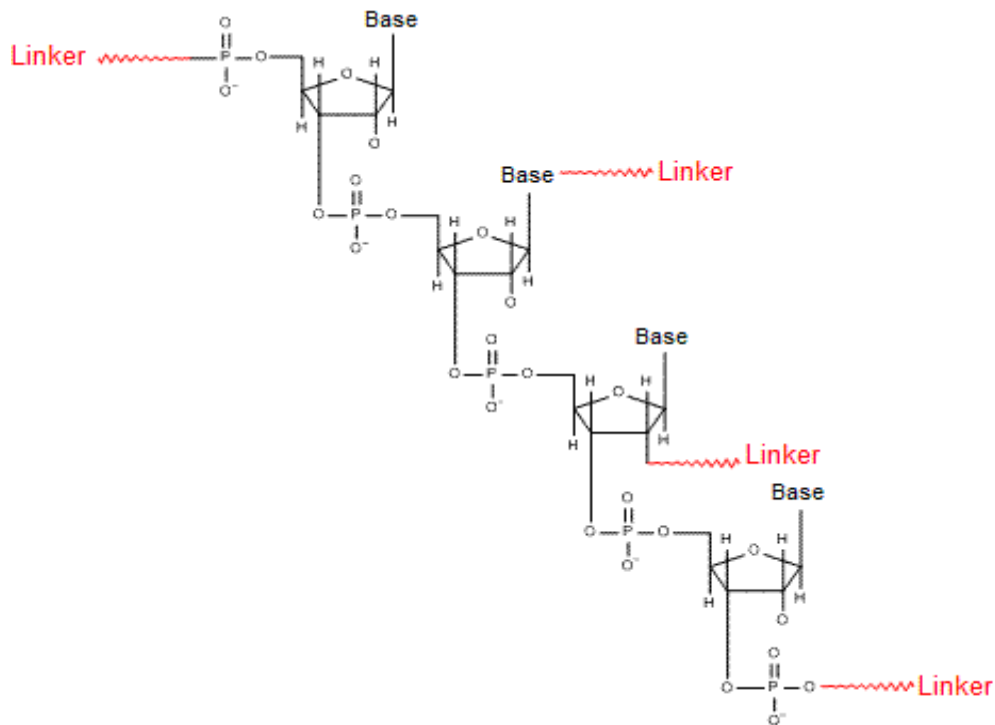


Abbildung 1.02: Oligonukleotid mit seinen potentiellen Verknüpfungsstellen für einen Linker.

1.4 Click-Chemie

Der Begriff Click-Chemie wurde von Sharpless und Kollegen eingeführt. Sie zählen darunter Reaktionen, die unter einfachen Reaktionsbedingungen bausteinförmig und stereospezifisch ablaufen, in großem Umfang hohe Ausbeuten liefern, keine oder harmlose bzw leicht zu entfernende Lösungsmittel erfordern, nur unbedenkliche Nebenprodukte liefern und deren Produkte sich leicht isolieren lassen.¹⁷

Als typischer Vertreter der Click-Chemie-Reaktionen gilt die Kupfer(I)-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC).¹⁸ Die Zytotoxizität von Kupfer, verbunden mit häufig auftretenden Schwierigkeiten, die entsprechenden Katalysatoren vor der Anwendung vollständig zu entfernen, hat es jedoch notwendig gemacht, kupferfreie Methoden der Click-Chemie zu entwickeln.^{18,19} Da Azide jedoch in Abwesenheit eines Metallkatalysators nur schwer mit Alkinen reagieren, gibt es mehrere Ansätze, die Reaktivität der

Alkine zu erhöhen, wovon einer die sogenannte Strain-promoted Azid-Alkin-Cycloaddition (SPAAC) darstellt¹⁸, die auch im Rahmen meiner Diplomarbeit Anwendung findet. Abbildung 1.03 (siehe S. 8) zeigt schematisch ein Konjugat, das ich mittels SPAAC hergestellt habe.

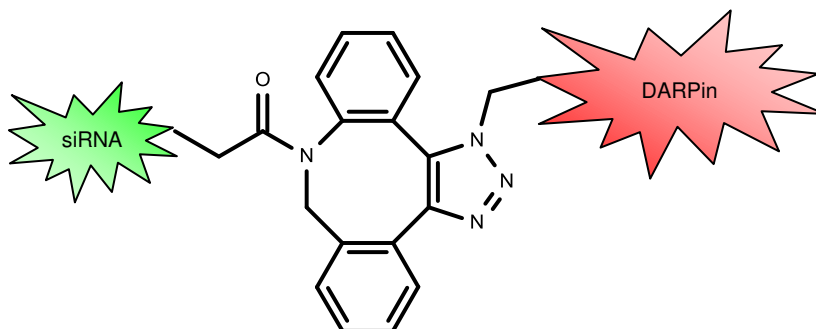


Abbildung 1.03: Schematische Darstellung eines Konjugates aus siRNA und DARPin, das mittels SPAAC hergestellt wurde. Als Linker fungiert dabei Dibenzocyclooctin (DBCO).

Es ist vorteilhaft, dass man Azide und Alkine leicht in Nukleinsäuren einführen kann, ohne ihre biophysikalischen Eigenschaften zu stark zu beeinflussen. Weitere Vorteile sind, dass sie nur miteinander und nicht mit anderen funktionellen Gruppen, die häufig in der Natur vorkommen, reagieren und dass das dabei entstehende Triazol sehr stabil und nicht toxisch ist.²⁰ All das macht es möglich, mittels Click-Chemie physiologisch verträgliche, maßgeschneiderte Makromoleküle und Biokonjugate herzustellen.¹⁸

1.5 Designed Ankyrin Repeat Proteins (DARPin)

Bei Designed Ankyrin Repeat Proteins (DARPin) handelt es sich um Bindungsmoleküle, die mit hoher Affinität und Spezifität an ihre Zielstrukturen binden können. Sie leiten sich von natürlichen Ankyrin-Repeat-Proteinen, deren Funktion das Vermitteln von Protein-Protein-Interaktionen ist^{21,22}, ab und bestehen strukturell gesehen aus einem Strukturmotiv, das sich mehrmals wiederholt und an den Enden ein N- bzw C-Cap besitzt.²³ Jedes

dieser, auch als „Repeat“ bezeichneten, Strukturmodule besteht üblicherweise aus 33 Aminosäureresten, die eine Beta-Schleife, gefolgt von zwei antiparallelen Alpha-Helices formen.^{22,24} N- und C-Cap verleihen dem DARPin eine hydrophile, leicht lösliche Oberfläche, die den hydrophoben Kern abschirmt und die Stabilität erhöht.^{22,25} Das Einführen eines Cystein-Restes ermöglicht diverse Modifikationen und Konjugationen.^{24,26} Indem am N-Terminus die Initiator-Aminosäure Methionin durch Azidohomoalanin ersetzt wird, ist es außerdem möglich, DARPins für die Click-Chemie zugänglich zu machen.²⁷

Gegenüber von monoklonalen Antikörpern, die man traditionell verwendet um eine spezifische Proteinbindung mit hoher Affinität zu erzielen, haben DARPins den Vorteil, dass sie robuste biophysikalische Eigenschaften besitzen und in Abhängigkeit von ihrer Länge, sehr stabil und trotzdem kleiner als monoklonale Antikörper sind. Auch ihre Produktion gestaltet sich relativ einfach, da sie mit guten Ausbeuten in E.coli zur Expression gebracht werden können.^{25,26,28}

Eingesetzt werden DARPins in der Forschung, Diagnostik und Therapie.^{21,25,26,28} Therapeutisch nutzen kann man sie potentiell auf mehrere Arten. Unmodifizierte DARPins können zB an einen Rezeptor oder Liganden binden und antagonistisch wirken. Durch Konjugation mit Polyethylenglykol (PEG) kann dabei die Serumhalbwertszeit modifiziert werden. Es ist aber auch möglich, Konjugate mit zytotoxischen Wirkstoffen, Peptiden oder auch mit anderen DARPins herzustellen.²³ Weiters ist es möglich, DARPins für Tumor-Targeting oder als Transportvehikel in der Tumorthherapie zu nutzen. Beispielsweise können mit ihrer Hilfe siRNAs zum jeweiligen Zielort transportiert werden und damit eventuell Hürden der RNAi-basierten Therapie, wie unbefriedigende organ- und zellspezifische Aufnahme der siRNA, gemeistert werden.²⁸ Das wurde gezeigt als ein EpCAM-spezifisches DARPin als Carrier für eine siRNA, die komplementär zur bcl-2 mRNA war, fungiert hat und die dadurch begünstigte Inhibition der Expression von bcl-2 die Apoptose von Tumorzellen begünstigt hat.²⁹

1.6 Epithelial Cell Adhesion Molecule (EpCAM)

Das Epithelial Cell Adhesion Molecule (EpCAM, CD326) ist ein 40 000 Da schweres, transmembranäres Glykoprotein, das vor allem in Tumorzellen, in geringem Ausmaß aber auch in normalen Epithelzellen, vorkommt.^{16,30,31} Zu seiner Überexpression kommt es vor allem auf Darm-, Magen-, Prostata- und Lungenkrebszellen³², Adenokarzinomen der Gebärmutter, Plattenepithelkarzinomen der Speiseröhre, gastrointestinalen Karzinoiden³¹ und auf Brustkrebszellen^{33,34}. Weiters kommt es auch bei Entzündungsprozessen zu einer Up-Regulation der EpCAM-Expression.³⁰

Es spielt eine Rolle bei der Zelladhäsion, Zellmigration, Proliferation und Differenzierung^{16,30} und gilt als attraktives tumor-assoziiertes Ziel^{25,29} und prognostischer Marker.^{30,33}

Folgend sind einige Beispiele angeführt, die unterschiedliche Strategien aufweisen, wie man sich EpCAM in der Tumordiagnose und –therapie zunutze machen kann:

Eine EpCAM-Überexpression korreliert mit anderen Parametern, die auf eine aggressive Form von Brustkrebs hinweisen, wie zum Beispiel „high-grade“ Tumore, große Tumore und das Vorhandensein von axilliären Metastasen und ist somit Indikator für eine schlechte Prognose bei nodal positivem Mammakarzinom.³³

Im Vergleich zu gesundem Brustgewebe kommt es in Brustkrebsgewebe zu einer 100-1000fachen EpCAM-Überexpression. Legt man die EpCAM-Genexpression mithilfe von siRNA still, resultierte das in vitro in einer 35-80%igen Reduktion der Zellproliferation in vier verschiedenen Brustkrebszelllinien.³⁴

Wie in 1.5 erwähnt, stellen DARPins die Basis für eine neue Generation von Protein-Therapeutika in der Tumorthherapie dar. Es ist gelungen, DARPins zu entwickeln, die spezifisch an EpCAM binden können. Durch Phagen- und Ribosomen-Display werden DARPins dazu aus kombinatorischen

Bibliotheken ausgewählt und bezüglich ihrer Bindung an EpCAM-positive Tumorzellen untersucht. Neben einigen anderen bindet auch das DARPin N3-Ec1, mit dem ich im Rahmen meiner Diplomarbeit gearbeitet habe, spezifisch an EpCAM. Durch Rezeptor-vermittelte Endozytose werden die EpCAM-spezifischen DARPins gemeinsam mit ihrer Transportfracht in die Tumorzellen aufgenommen. ²⁴

2 Ziel

Im Rahmen meiner Diplomarbeit sollte mittels Click-Chemie ein Biokonjugat aus dem DARPin N3-Ec1 und einem Oligonukleotid mithilfe eines bifunktionellen Dibenzocyclooctin-N-hydroxysuccinimidyl-Alkyllinkers (DBCO-NHS-Alkyllinkers) hergestellt werden. Um ein reines Produkt in einer möglichst hohen Ausbeute zu erhalten, sollten die optimalen Reaktionsbedingungen für die einzelnen Reaktionsschritte eruiert werden und diese mit geeigneten Methoden, wie Hochleistungsflüssigkeitschromatographie und Gelelektrophorese, überwacht werden. Weiters sollte die Stabilität des Konjugates in Zellmedium überprüft werden und mittels Durchflusszytometrie sollte sowohl die Bindung an das Target EpCAM, als auch die Zellaufnahme untersucht werden. Abschließend sollte mit einem Luciferase-Assay evaluiert werden, ob und in welchem Ausmaß das Konjugat zu einem Gen-Silencing-Effekt führt.

3 Material und Methoden

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma GlaxoSmithKline (Brentford, Großbritannien) synthetisiert und der Linker DBCO-NHS-Ester von Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Der Alexa Fluor® 568 Farbstoff, die Zellmedien DMEM GlutaMAX™ und Opti-MEM® sowie die Transfektionsreagenzien Lipofectamin® RNAiMAX und Lipofectamin® 2000 wurde von der Firma Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) bezogen. Die Zellkulturplatten stammten von Greiner Bio-One (Kremsmünster, Deutschland) und die Materialien für die Elektrophorese von Serva (Heidelberg, Deutschland). Alle anderen verwendeten Reagenzien und Lösungsmittel wurden ebenfalls von den oben genannten Firmen bezogen.

Im Laufe der Arbeit wurde ausschließlich mit RNase-freiem Wasser gearbeitet, um einen eventuellen Abbau der Oligonukleotide zu verhindern.

3.1 Herstellung und Aufreinigung des Konjugates

3.1.1 Reaktion von Oligonukleotid mit Linker

Eine 10 mM Stammlösung von Dibenzocyclooctin-N-hydroxysuccinimidyl-Ester (DBCO-NHS-Ester) in Dimethylsulfoxid (DMSO) wurde hergestellt, bei -20 °C im Kühlschrank aufbewahrt und für die Folgereaktionen verwendet.

5 nmol einer 1,17 mM 3'-Amino-Oligonukleotid-Lösung (4,27 µl) wurden, um das Reaktionsvolumen zu erhöhen, mit der 4,85-fachen Menge an RNase freiem Wasser (20,73 µl) versetzt. Die Lösung wurde mit 25 µl 100 mM phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) (pH 7,7) gepuffert, um die Reaktion bei einer finalen Konzentration von 50 mM ablaufen lassen zu können. Ein 5-facher Überschuss der zuvor hergestellten 10 mM Lösung von DBCO-NHS Ester in DMSO (25 nmol, 2,5 µl) wurde hinzugefügt und das

Reaktionsgemisch wurde bei 25 °C und 400 rpm am Thermo-Mixer inkubiert. Nach einer Stunde Reaktionszeit wurde die Reaktion beendet und mittels Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) wurde der Verlauf der Reaktion, wie in 3.3.1 beschrieben, kontrolliert.

Um bei kleinen Reaktionsansätzen das Reaktionsvolumen zu erhöhen, wurde das 3'-Amino-Oligonukleotid vor der Pufferzugabe mit der 4,85-fachen Menge an RNase freiem Wasser versetzt. Da sich die gewählten Reaktionsbedingungen als optimal erwiesen haben, wurde die Zugabe von RNase freiem Wasser auch für größere Reaktionsansätze (ausgehend von 50 nmol 3'-Amino-Oligonukleotid) beibehalten.

3.1.2 Größenausschlusschromatographie

Um den Überschuss an DBCO-NHS Ester und das durch die Reaktion entstandene NHS-Hydrolyseprodukt zu entfernen, wurde eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt. Die dabei vorherrschenden Bedingungen sind in Tabelle 3.01 (siehe S. 14) angeführt.

Tabelle 3.01: Bedingungen der Größenausschlusschromatographie

Parameter	Daten
Gerät	ÄKTA™ pure (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, Großbritannien)
Säule	Superdex 75 10/300 GL
Puffer	50 mM PBS, pH~7,2
Flussrate	0,5 ml/min
Absorptionswellenlängen	260 nm, 280 nm, 230 nm
Fraktionsgröße	0,5 ml

Von den gesammelten Fraktionen wurde die Absorption bei 260 nm mittels NanoDrop-Spektrophotometer ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) bestimmt. Aus dieser wurde mithilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes

und des Extinktionskoeffizienten, der mit der Nearest-Neighbour-Methode aus der Summe der Koeffizienten der einzelnen Nukleotide berechnet worden war, die Konzentration an enthaltenem Oligonukleotid berechnet und die Fraktionen, die Produkt enthalten haben, wurden vereinigt. Um zu kontrollieren, ob die Aufreinigung mittels Größenausschlusschromatographie erfolgreich war, wurde von den vereinigten Fraktionen eine RP-HPLC gemacht.

Gegebenenfalls wurden die vereinigten Fraktionen mithilfe eines Amicon Ultra 0,5 ml Zentrifugalfilters (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) konzentriert um einerseits das 3'-DBCO-Oligonukleotid für die Umsetzung mit dem Protein möglichst konzentriert vorliegen zu haben und um andererseits bei den einzelnen Reaktionsansätzen möglichst idente Bedingungen zu erzielen.

3.1.3 Umsetzung mit dem Protein N3-Ec1

3 nmol der 29,61 μ M 3'-DBCO-Oligonukleotid-Lösung (101,32 μ l) wurden mit einem 2-fachen Überschuss an 611 μ M N3-Ec1 (6 nmol, 9,82 μ l) versetzt und mit 9,82 μ l 100 mM PBS (pH 7,1-7,4) auf eine Endkonzentration von 50 mM gepuffert. Das Reaktionsgemisch wurde bei 25 °C und 400 rpm am Thermo-Mixer inkubiert. Nach drei Stunden Reaktionszeit wurde die Reaktion beendet und zur Verlaufskontrolle wurden eine RP-HPLC und ein Proteingel durchgeführt. Bei größeren Reaktionsansätzen wurde analog vorgegangen.

3.1.4 Semipräparative Aufreinigung mittels Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC)

Mithilfe der RP-HPLC wurde das DBCO-Konjugat semipräparativ aufgereinigt. Dazu wurde das DBCO-Konjugat auf die Säule aufgetragen und die Fraktionen, die das DBCO-Konjugat enthalten haben, wurden in 1,5 ml Eppendorfgefäßen aufgefangen und mittels Speed Vac (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland) eingeeengt. Die dabei herrschenden RP-HPLC-Bedingungen waren ident mit

denen zur Analyse des Konjugates (siehe Tabelle 3.02, S. 17). Danach wurden die Fraktionen in je 50 µl 10 mM PBS (pH 7,1-7,4) gelöst, vereinigt und mittels NanoDrop-Spektrophotometer wurde die finale Konzentration des aufgereinigten DBCO-Konjugats ermittelt.

Um zu zeigen, dass die semipräparative Aufreinigung mittels RP-HPLC funktioniert hat, sprich überschüssiges Protein abgetrennt wurde, wurden ein Proteingel und eine RP-HPLC vom aufgereinigten DBCO-Konjugat angefertigt.

3.2 Fluoreszenzmarkierung

Für die Zellkulturversuche, die zur Untersuchung der Bindung und Aufnahme des DBCO-Konjugats gedient haben, mussten sowohl das DBCO-Konjugat, als auch die Kontroll-siRNA fluoreszenzmarkiert werden. Verwendet wurde dazu ein mit Alexa Fluor® 568 fluoreszenzmarkierter Antisense-Strang, der zum DBCO-Konjugat und der Kontroll-siRNA komplementär war. Zur Duplexbildung mit dem fluoreszenzmarkierten Antisense-Strang wurden das DBCO-Konjugat bzw die Kontroll-siRNA im Laminar Air Flow mit dem fluoreszenzmarkierten Antisense-Strang in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß versetzt, gevortext, zentrifugiert und zuerst 8 Minuten bei Raumtemperatur und anschließend 2 Minuten auf Eis inkubiert. Während des ganzen Vorgangs wurde auf Lichtschutz geachtet.

Um die Duplexbildung zu dokumentieren, wurde ein natives Gel angefertigt.

3.3 Analytik des Konjugates

3.3.1 RP-HPLC

Mithilfe der RP-HPLC wurde einerseits der Verlauf der Herstellung des DBCO-Konjugates kontrolliert (Hat das 3'-Amino-Oligonukleotid mit dem

DBCO-NHS Ester reagiert? Wurden durch die Größenausschlusschromatographie der Überschuss an DBCO-NHS-Ester und das durch die Reaktion entstandene Hydrolyseprodukt entfernt? Wie ist die Umsetzung mit dem Protein verlaufen?) und andererseits wurde mittels RP-HPLC die semipräparative Aufreinigung des DBCO-Konjugates durchgeführt und die Reinheit kontrolliert.

Verwendet wurde das Gerät Shimadzu Prominence mit dem dazugehörigen Programm LC Solution (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). Als stationäre Phase hat eine Clarity 5u Oligo RP18 Säule (Phenomenex, Torrance, USA) gedient, als mobile Phase A wurde eine 50 mM Triethylammoniumacetat-Lösung und als mobile Phase B Acetonitril verwendet. Detektiert wurde mit dem UV-Detektor des Gerätes bei einer Wellenlänge von 260 nm. Um die Proben zu analysieren, wurden zwei verschiedene Methoden der Gradientenelution angewendet, die beide Tabelle 3.02 (siehe S. 17) zu entnehmen sind. Die beiden Methoden unterschieden sich erst ab Minute 62,01, was sich nur auf die Reinigungsphase der Säule, nicht aber auf die Analysen auswirkt, da alle Produkte bereits vorher eluieren.

Tabelle 3.02: Methoden der Gradientenelution zur Analyse und semipräparativen Aufreinigung mittels RP-HPLC

Methode A			Methode B		
Zeit [min]	Mobile Phase A [%]	Mobile Phase B [%]	Zeit [min]	Mobile Phase A [%]	Mobile Phase B [%]
0,00	92	8	0,00	92	8
60,00	54	44	60,00	54	44
60,01	35	65	60,01	35	65
62,00	35	65	65,00	35	65
62,01	92	8	65,01	92	8
67,00	92	8	70,00	92	8

3.3.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Durch die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde überprüft, ob das 3'-DBCO-Oligonukleotid mit dem Protein reagiert hat und ob durch die semipräparative RP-HPLC das überschüssige Protein vollständig abgetrennt wurde und das DBCO-Konjugat rein vorlag.

Ein 12 %iges SDS-Polyacrylamidgel wurde angefertigt, indem die zuvor bereitete Gellösung für das Trenngel, möglichst blasenfrei, in eine Elektrophoreseapparatur (Bio-Rad, Hercules, USA) gegossen wurde. Für die Trenngellösung wurden 1,72 ml Wasser, 1,25 ml 1,5 M TRIS(hydroxymethyl)aminomethan-Hydrochlorid (TRIS-HCl) (pH 8,8) und 2,00 ml Acrylamid/Bisacrylamid (30 %/0,8% w/v) in einem Becherglas vermischt und unmittelbar vor dem Gießen zur Polymerisation mit 25,00 µl Ammoniumpersulfat (APS) (10 % w/v) und 3,30 µl Tetramethylethyldiamin (TEMED) versetzt. Anschließend wurde das Trenngel mit 1000 µl Isopropanol überschichtet und 1 Stunde polymerisieren gelassen. Nach der Polymerisation wurde Isopropanol mithilfe von Filterpapier vollständig entfernt, das zuvor bereitete Sammelgel gegossen und ein 0,75 mm breiter Probenkamm eingesetzt, der die 10 Taschen des Gels erzeugt hat. Für die Sammelgellösung wurden 1,23 ml Wasser, 0,5 ml 0,5 M TRIS-HCl (pH 6,8) und 0,27 ml Acrylamid/Bisacrylamid (30 %/0,8% w/v) in einem Becherglas vermischt und unmittelbar vor dem Gießen zur Polymerisation mit 10 µl APS und 2 µl TEMED versetzt. Nach der Polymerisation, die über Nacht stattgefunden hat, wurde der Probenkamm entfernt.

Von jeder Probe wurden, bezogen auf das Protein, 5 µg mit soviel Lämmli-Puffer versetzt, um pro Probe ein Gesamtvolumen von 20 µl zu erhalten. Die Proben wurden 2-3 Minuten auf 95 °C erhitzt, um die Proteine zu denaturieren, und in die Taschen des Gels aufgetragen. Außerdem wurden 3 µl des Molekulargewichts-Standards Page Ruler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) auf das Gel aufgetragen.

Für die Elektrophorese wurde das Gel circa 60 Minuten bei 150 V laufen gelassen. Als Puffer wurde innen 1x Kathoden-Puffer und außen 1x Anoden-Puffer verwendet. 1x Kathoden-Puffer und 1x Anoden-Puffer wurden hergestellt, indem 10x Kathoden-Puffer (30,20 g TRIS, 10,00 g SDS, 144,42 g Glycin ad 1000 ml ddH₂O) und 10x Anodenpuffer (30,20 g TRIS, 10,00 g SDS ad 1000 ml ddH₂O) mit doppelt destilliertem Wasser 1:10 verdünnt wurden.

Nach der Elektrophorese wurde das Sammelgel entfernt, die Proteine mittels Comassie-Färbung sichtbar gemacht und das Bandenmuster analysiert. Zur Dokumentation wurde das Gel mit dem GS-710 Calibrated Imaging Densitometer (Bio-Rad, Hercules, USA) eingescannt.

3.3.3 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Native PAGE)

Im Zuge dieser Arbeit wurde durch die native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (native PAGE) kontrolliert, ob es zur Duplexbildung zwischen dem DBCO-Konjugat und dem fluoreszenzmarkierten Antisense-Strang bzw zwischen der Kontroll-siRNA und dem fluoreszenzmarkierten Antisense-Strang gekommen ist.

Für das native 10 %ige Polyacrylamidgel wurden 1,875 ml 40 %ige Acrylamid-Stammlösung, 0,75 ml 10x TRIS-Borat-EDTA (TBE), 4,70 ml Wasser, 10 µl TEMED und 100 µl APS in einem Becherglas gemischt, in die dafür vorgesehene Apparatur gegossen und um die Taschen zu formen wurde ein Probenkamm eingesetzt.

Je 20 pmol der zu hybridisierenden Einzelstränge wurden in einem Eppendorfgefäß vereinigt, ein paar Minuten reagieren gelassen und mit Ladepuffer, bestehend aus 80 % Glycerol und Wasser, auf ein Gesamtvolumen von 15 µl aufgefüllt und mit 5 µl 1:100 verdünntem DNA Loading Dye versetzt.

Nach einem dreißigminütigen Vorlauf des vollständig polymerisierten Geles bei 100 V wurden die zuvor bereiteten Proben auf das Gel aufgetragen. Als Standard wurde in die Außentaschen 5 µl 6x DNA Loading Dye aufgetragen und das Gel bei 100 V laufen gelassen, bis Bromphenolblau 2/3 der Gelstrecke erreicht hatte. Sowohl der Vorlauf, als auch die elektrophoretische Auftrennung wurden auf Eis durchgeführt, um eine Dissoziation der Stränge zu verhindern.

Mit dem Ettan DIGE Imager (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, Großbritannien) und der dazugehörigen Software wurde die Fluoreszenz der markierten Stränge mit der Channel-Filter-Einstellung Cy3, welche mit dem Alexa 568 Farbstoff kompatibel ist, angeregt und durch Variation der Belichtungszeiten eine geeignete Aufnahme des Gels zur Dokumentation gemacht.

3.3.4 Stabilitätsprüfung

Mithilfe der Stabilitätsprüfung wurde überprüft, ob und in welchem Zeitraum das DBCO-Konjugat in einem Ansatz mit Zellmedium, bestehend aus DMEM GlutaMAX™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) und 10% fetalem Kälberserum (FBS), durch Nukleasen abgebaut wird. Die Bedingungen der Probenvorbereitung wurden dazu so gewählt, dass sie mit den Bedingungen, die bei den Zellkulturversuchen herrschen, möglichst ident waren. Dazu wurden Stock-Lösungen im Laminar Air Flow bereitete, indem das DBCO-Konjugat bzw die Kontroll-siRNA zur Hybridisierung mit dem entsprechenden Antisense-Strang versetzt und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Zu den bereiteten Stock-Lösungen wurde anschließend vorgewärmtes Medium hinzugefügt. Es wurden für jede Probe fünf Ansätze zu je 30 pmol DBCO-Konjugat bzw zu je 36 pmol Kontroll-siRNA bereitete und 0, 1, 3, 24 und 48 Stunden bei 37° C und 550 rpm am Schüttler inkubiert. Außerdem wurde ein Ansatz mit 30 pmol DBCO-Konjugat anstatt mit Medium mit Wasser versetzt und nicht inkubiert. Als die individuelle Inkubationszeit

für jeden Ansatz vergangen war, wurde dieser für zwei Minuten auf 60° C erhitzt und mit je 4 µl (Ansätze mit DBCO-Konjugat) bzw mit je 2,4 µl (Ansätze mit Kontroll-siRNA) 6x Orange DNA Loading Dye versetzt. Danach wurden die Ansätze eingefroren und als die Inkubationszeit für jeden Ansatz vergangen war, wurde eine Gelelektrophorese mit einem 2 %igen Agarosegel durchgeführt.

Da bei der Gelelektrophorese Ethidiumbromid, welches als mutagen eingestuft wird, zur Anwendung gekommen ist, wurde in weiterer Folge unter dem Abzug und mit Nitrilhandschuhen gearbeitet. Das Gel wurde bereit, indem 0,8 g Agarose in einem Erlenmayerkolben mit 40 ml 1x TBE versetzt wurden und die Suspension zum vollständigen Lösen kurz in der Mikrowelle erhitzt wurde. Nach dem Abkühlen wurden 4 µl einer gebrauchsfertigen Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml in Wasser) zur Lösung hinzugefügt und das Gel wurde in seine Form gegossen. Für die Taschenbildung wurde ein Kamm eingesetzt. Nach circa 1 Stunde war das Gel erstarrt und die aufgetauten Proben konnten aufgetragen werden. Als Standard wurden in die Außentaschen je 5 µl gene ruler 50bp (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) aufgetragen und als Puffer wurde 1x Sodium-Borat-Puffer (SB-Puffer) verwendet. Das Gel wurde bei 70 V circa bis zur Hälfte der Gelstrecke laufen gelassen und mittels ChemiDoc XRS (Bio-Rad, Hercules, USA) wurde das Gel unter UV-Anregung eingescannt. Eine Abschwächung der Bandenintensität bedeutet einen Abbau durch Serumnukleasen.

3.4 Zellkulturversuche

3.4.1 Bindungsversuch mittels Durchflusszytometrie an EpCAM-positiven Zellen

Die Bindung des DBCO-Konjugates an EpCAM positive MDA-MB-468 Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht. Mittels Penta His Tag Antikörper wurde dabei die Bindung des Proteins gezeigt und mittels

fluoreszenzmarkiertem Antisense-Strang die Bindung des gesamten Konjugates. Als Kontrolle fungierten dabei das Protein N3-Ec1 und das 3'-Amino-Oligonukleotid. Als Negativkontrolle wurde der Versuch auch an EpCAM negativen HeLa-Zellen analog durchgeführt.

Vorbereitung der Zellen

Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, trypsinisiert, mit frischem Medium versetzt und gezählt. Das Medium wurde entfernt, die Zellen wurden mit circa 3 ml PBS nochmals gewaschen, bei 4° C und 1000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert und der Überschuss an PBS wurde entfernt. Um eine Zellzahl von 1 200 000 / ml zu erhalten, wurden die Zellen in der entsprechenden Menge an frisch zubereitetem FACS-Puffer, bestehend aus 1 % FBS in PBS, resuspendiert.

Vorbereitung der Duplexe für die Proben, die mit Penta His Tag Antikörper behandelt wurden

In der Laminar Air Flow Werkbank wurde eine Stock-Lösung aus DBCO-Konjugat und komplementärem Antisense-Strang hergestellt. Zur Duplexbildung wurden die Oligonukleotide dazu in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß vereinigt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Unter denselben Bedingungen wurde außerdem zu Kontrollzwecken eine Stock-Lösung aus dem Protein N3-Ec1 und dem Antisense-Strang hergestellt.

Vorbereitung der Duplexe für die Proben, die mit fluoreszenzmarkiertem Antisense-Strang versetzt wurden

Wie in Punkt 3.2 beschrieben, wurden das DBCO-Konjugat und die Kontroll-siRNA mit dem Alexa Fluor® 568 fluoreszenzmarkierten Antisense-Strang hybridisiert. Auch in diesem Fall wurden Stock-Lösungen bereitet.

Vorbereitung der mit Penta-His-Tag-Antikörper-behandelten Proben

Für jede Probe wurden 150 µl (entsprechen 180 000 Zellen) der zuvor bereiteten Zellsuspension in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß mit der entsprechenden Menge an Stock-Lösung versetzt und 1 Stunde auf Eis inkubiert. Danach wurden die Proben mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen und bei 4° C und 1000 rpm 5 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, der Waschschrift ein weiteres Mal wiederholt und die Zellen in 200 µl eiskaltem FACS-Puffer resuspendiert. Zu jeder Probe wurden 2 µl Penta-His-Tag-Antikörper (Qiagen, Hilden, Deutschland) pipettiert und die Proben wurden erneut 1 Stunde auf Eis inkubiert. Wie oben beschrieben wurden die Proben noch zweimal gewaschen, die Zellen in 500 µl eiskaltem FACS-Puffer resuspendiert, in FACS-Röhrchen überführt und bis zur Messung auf Eis gelagert.

Vorbereitung der fluoreszenzmarkierten Proben

Auch für diese Proben wurden je 150 µl (entsprechen 180 000 Zellen) Zellsuspension in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß mit der entsprechenden Menge an Stock-Lösung versetzt und 1 Stunde auf Eis inkubiert. Nachdem die Zellen zweimal, wie oben beschrieben, gewaschen wurden, wurden sie in 500 µl eiskaltem FACS-Puffer resuspendiert, in FACS-Röhrchen überführt und bis zur Messung auf Eis gelagert.

Für die Vermessung der Proben wurde, wie auch bei allen anderen Durchflusszytometrie-Versuchen, das Gerät BD FACScalibur™ (BD Biosciences, New Jersey, USA) verwendet und die Auswertung der Proben wurde mit der dazugehörigen Software durchgeführt.

3.4.2 Zellaufnahmeversuch mittels Durchflusszytometrie in EpCAM-positive Zellen

Auch die Zellaufnahme in EpCAM positive MDA-MB-468 Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht. Mithilfe eines fluoreszenzmarkierten

Antisense-Stranges wurde die Aufnahme des DBCO-Konjugates gezeigt. Als Kontrolle dienten dabei das 3'-Amino-Oligonukleotid und unbehandelte Zellen.

Außerdem wurde im Zuge dieses Versuches überprüft, ob die Zugabe des Transfektionsreagenzes Lipofectamin RNAimax die Aufnahme der siRNA-Duplexe in die Zellen beeinflusst.

Vorbereitung und Aussäen der Zellen

Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, trypsinisiert, mit frischem Medium versetzt und gezählt. Durch Verdünnen wurde eine Zellsuspension mit einem Zellgehalt von 500 000 Zellen/ml hergestellt, von welcher je 200 µl in die Wells einer 48-Well-Platte ausgesät wurden. Dabei wurde besonders darauf geachtet, dass die Zellsuspension durch Auf- und Abpipettieren in den Wells gut resuspendiert wurde. Der Rand der Platte wurde nur mit Medium, nicht aber mit Zellen versetzt, da es an diesen Positionen der Platte möglich ist, dass der Inhalt im Inkubator geringfügig verdampft, was die Versuchsergebnisse verfälschen könnte. Mithilfe eines Lichtmikroskops wurde überprüft, ob die Zellen gleichmäßig verteilt waren und danach wurden die Zellen 24 Stunden bei 37° C inkubiert.

Transfektion

Es wurden, wie in Punkt 3.2 beschrieben, Stock-Lösungen vom mit Alexa Fluor® 568 fluoreszenzmarkierten DBCO-Konjugat und der Kontroll-siRNA hergestellt.

In den Wells der am Vortag vorbereiteten Platte wurde das Medium abgenommen und die Zellen wurden mit je 100 µl PBS gewaschen. Nachdem frisches Medium in den Wells vorgelegt worden war, wurde die Stock-Lösung hinzugefügt und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren wurde eine gute Durchmischung gewährleistet. Dabei wurde so vorgegangen, dass schlussendlich in jedem Well ein Gesamtvolumen von

200 µl mit der entsprechenden Konzentration an Probe enthalten war. Die Zellen wurden erneut 24 Stunden bei 37° C inkubiert.

Für die Proben mit Lipofectamin wurde ebenfalls eine Stock-Lösung aus Alexa Fluor® 568 fluoreszenzmarkiertem Antisense-Strang und Kontroll-siRNA hergestellt. Dazu wurde die Duplexbildung, wie in Punkt 3.2 beschrieben, durchgeführt und die Probe mit 15 µl Opti-MEM® versetzt. Lipofectamin RNAimax wurde ebenfalls mit 15 µl Opti-MEM® versetzt, beides vereinigt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von Medium wurde eine Verdünnungsreihe erstellt, um anschließend zu den, wie oben beschrieben, vorbereiteten Zellen 200 µl Probe pipettieren zu können. Alle Proben haben pro pmol siRNA-Duplex 0,3 µl Transfektionsreagenz enthalten.

DMEM+ 10%FBS	DMEM+ 10%FBS	DMEM+ 10%FBS	DMEM+ 10%FBS	DMEM+ 10%FBS	DMEM+ 10%FBS	DMEM+ 10%FBS	DMEM+ 10%FBS
DMEM+ 10%FBS	DBCO- Konjugat 1333 nM	DBCO- Konjugat 666,67 nM	DBCO- Konjugat 333,33 nM	DBCO- Konjugat 167 nM	DBCO- Konjugat 67 nM	DBCO- Konjugat 33 nM	DMEM+ 10%FBS
DMEM+ 10%FBS	Kontroll- siRNA 1333 nM	Kontroll- siRNA 666,67 nM	Kontroll- siRNA 333,33 nM	Kontroll- siRNA 167 nM	Kontroll- siRNA 67 nM	Kontroll- siRNA 33 nM	DMEM+ 10%FBS
DMEM+ 10%FBS	Kontroll- siRNA + LF 50 nM	Kontroll- siRNA + LF 20 nM	Kontroll- siRNA + LF 10 nM	Kontroll- siRNA + LF 2 nM	Un- behandelte Zellen	Un- behandelte Zellen	DMEM+ 10%FBS
DMEM+ 10%FBS	Un- behandelte Zellen	Un- behandelte Zellen	Un- behandelte Zellen	Un- behandelte Zellen	Un- behandelte Zellen	Un- behandelte Zellen	DMEM+ 10%FBS
DMEM+ 10%FBS	DMEM+ 10%FBS	DMEM+ 10%FBS	DMEM+ 10%FBS	DMEM+ 10%FBS	DMEM+ 10%FBS	DMEM+ 10%FBS	DMEM+ 10%FBS

Abbildung 3.01: Beispielhafter Plattenplan des Zellaufnahmeversuches

Fluoreszenzmikroskopie

Um abzuschätzen, ob die Transfektion geglückt war und die Oligonukleotide in die Zellen aufgenommen worden waren, wurden Aufnahmen mit einem Fluoreszenzmikroskop gemacht. Dazu wurde das Medium abgenommen, die Zellen zweimal mit je 500 µl PBS gewaschen und Aufnahmen mit dem

Fluoreszenzmikroskop EVOS™ FL (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) gemacht. Durch einen Overlay von normalbelichteten Bildern und Bildern, die durch die für den Fluoreszenzfarbstoff spezifische Wellenlänge angeregt worden waren, konnte visualisiert werden, wo sich die fluoreszenzmarkierten Proben befunden haben.

Durchflusszytometrie

Nach dem Abnehmen von PBS wurden die Zellen mit 500 µl FACS-Puffer gewaschen und jedes Well wurde mit 45 µl 1 x Trypsin versetzt und inkubiert, um die Zellen von der Platte abzulösen. Nachdem mittels Lichtmikroskop kontrolliert worden war, ob sich alle Zellen vollständig abgelöst hatten, wurden die Zellen in 500 µl FACS-Puffer resuspendiert, in FACS-Röhrchen überführt und mit dem Gerät BD FACScalibur™ (BD Biosciences, New Jersey, USA) wurden die Proben vermessen und mit der dazugehörigen Software ausgewertet.

3.4.3 Luciferase Assay

Mit dem Luciferase-Assay wurde untersucht, ob das DBCO-Konjugat die Expression der Luciferase-Reportergene Firefly- und Renilla-Luciferase herunter reguliert. Dazu wurden in EpCAM-positive MDA-MB-468 Zellen die Plasmide p-EGFP-Luc und pCMV-GLuc eingebracht und anschließend wurden die Zellen mit DBCO-Konjugat und Kontroll-siRNA transfiziert. Um die Transfektion durch Destabilisierung der Endosomen zu verbessern wurde dem Medium Chloroquin zugesetzt. Der Dual Luciferase® Reporter 1000 Assay (Promega, Fitchburg, USA) wurde laut Herstellerprotokoll durchgeführt und die Messungen wurden mittels Tecan Infinite® 200Pro (Tecan, Männedorf, Schweiz) und der dazugehörigen Software i-control™ gemacht.

Zellaussaat

Es wurde eine Zellsuspension aus EpCAM-positiven MDA-MB-468 Zellen und dem Medium DMEM GlutaMAX™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham,

USA) inklusive 10 % FBS so verdünnt, dass durch das Pipettieren von je 90 µl Zellsuspension in jedes Well einer 96-Well-Platte circa 20 000 Zellen/Well enthalten waren. Anschließend wurde die Platte 24 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Einbringen der Plasmid-DNA (pDNA)

Von den Plasmiden pEGFP-Luc und pCMV-GLuc wurden, ausgehend von Stammlösungen, je 70 µl mit einer Konzentration von 100 ng/µl durch Verdünnen mit Opti-MEM® bereit. Je 60 µl davon wurden zusammenpipettiert und mit 30 µl Opti-MEM® verdünnt. 36 µl Lipofectamin 2000 wurden mit 114 µl Opti-MEM® versetzt und 20 Minuten inkubiert. Für das Einbringen in die Zellen wurden die 150 µl pDNA-Lösung und die 150 µl Lipofectamin 2000-Lösung vermischt und pro Well wurden 2,5 µl davon zu den Zellen vom Vortag gegeben. Somit hat jedes Well, wie laut Hersteller empfohlen, 0,3 µl Lipofectamin 2000, enthalten. Die Platte wurde erneut für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Herstellung des Chloroquin-haltigen Mediums

Zu einem Teil der Wells wurde Chloroquin zugesetzt, um die Effizienz der Transfektion zu erhöhen. Dazu wurde eine 6,25 mM Chloroquin-Lösung hergestellt, steril filtriert und mit Medium 1:100 verdünnt um später in jedes dafür vorgesehene Well 80 µl des mit Chloroquin-versetzten Mediums zu pipettieren.

Herstellung der Transfektionslösungen für die Proben in Chloroquin-freiem Medium

Eine 10 µM siRNA-Stocklösung wurde bereit, mit Lipofectamin RNAimax versetzt und mit Opti-MEM® verdünnt. Die nötige Menge an Opti-MEM® wurde dazu so aufgeteilt, dass sowohl die siRNA, als auch das Transfektionsreagenz zuerst mit Opti-MEM® verdünnt, inkubiert und anschließend beides vereinigt wurde. Pro Probe wurden auch hier, wie vom Hersteller empfohlen, 0,3 µl Lipofectamin RNAimax zugesetzt. Aus dieser

Stock-Lösung wurden durch weiteres Verdünnen mit Opti-MEM® die gewünschten Verdünnungen bereitet, um die laut Plattenplan vorgesehenen Stoffmengen in die Wells überführen zu können.

Herstellung der Transfektionslösungen für die Proben in Chloroquin-haltigem Medium

Die Konjugate wurden mit dem entsprechenden Antisense-Strang hybridisiert und durch Zugabe von Opti-MEM® wurden die benötigten Verdünnungsreihen hergestellt.

Auch die verwendete siRNA-Duplex wurde mit Opti-MEM® entsprechend verdünnt.

Transfektion

Das alte Medium wurde aus den Wells der Platte entfernt und die Zellen jedes Wells wurden mit 100 µl PBS gewaschen. Dann wurden in jedes Well 80 µl Medium, mit oder ohne Chloroquin, hinzugefügt. Um eine gute Durchmischung zu gewährleisten wurden durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren zu jedem Well 20 µl der Probe gegeben.

Die Platte wurde anschließend für 48 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Luciferase-Assay für pCMV-GLuc

Das Medium der 96-Well-Platte wurde in eine neue, transparente 96-Well-Platte transferiert, 50 µl Stop&Glo Reagenz wurden hinzugefügt und die Lumineszenz wurde bestimmt.

Luciferase-Assay für pEGFP-Luc

Die Zellen wurden mit 100 µl PBS gewaschen. Nach dem vollständigen Entfernen der Flüssigkeit wurde durch Zugabe von 30 µl 1x passivem Lysepuffer (PLB) die Zelllyse eingeleitet. Die Platte wurde für circa 30 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt.

Im Tecan-Scanner wurden vollautomatisch 50 µl Luciferase Assay Reagenz II (LAR II) pro Well hinzugefügt und die Lumineszenz sofort gemessen.

4 Resultate

4.1 Herstellung und Aufreinigung des Konjugates

4.1.1 Reaktion von Oligonukleotid mit Linker

Als erster Reaktionsschritt bei der Herstellung des DBCO-Konjugates wurde das 3'-Amino-Oligonukleotid mit DBCO-NHS-Ester umgesetzt, wobei sich eine Amidbindung zwischen dem Linker und dem Oligonukleotid ausgebildet hat und ein Hydrolyseprodukt abgespalten wurde (siehe Abbildung 4.01, S. 31). Nach einer Reaktionszeit von 1 Stunde wurde der Verlauf der Reaktion mittels RP-HPLC kontrolliert. Der Vergleich der HPLC-Chromatogramme des Oligonukleotides vor und nach der Umsetzung mit DBCO-NHS Ester zeigt, dass binnen 1 Stunde 100 % des 3'-Amino-Oligonukleotides zum 3'-DBCO-Oligonukleotid reagieren (siehe Abbildung 4.02, S. 31).

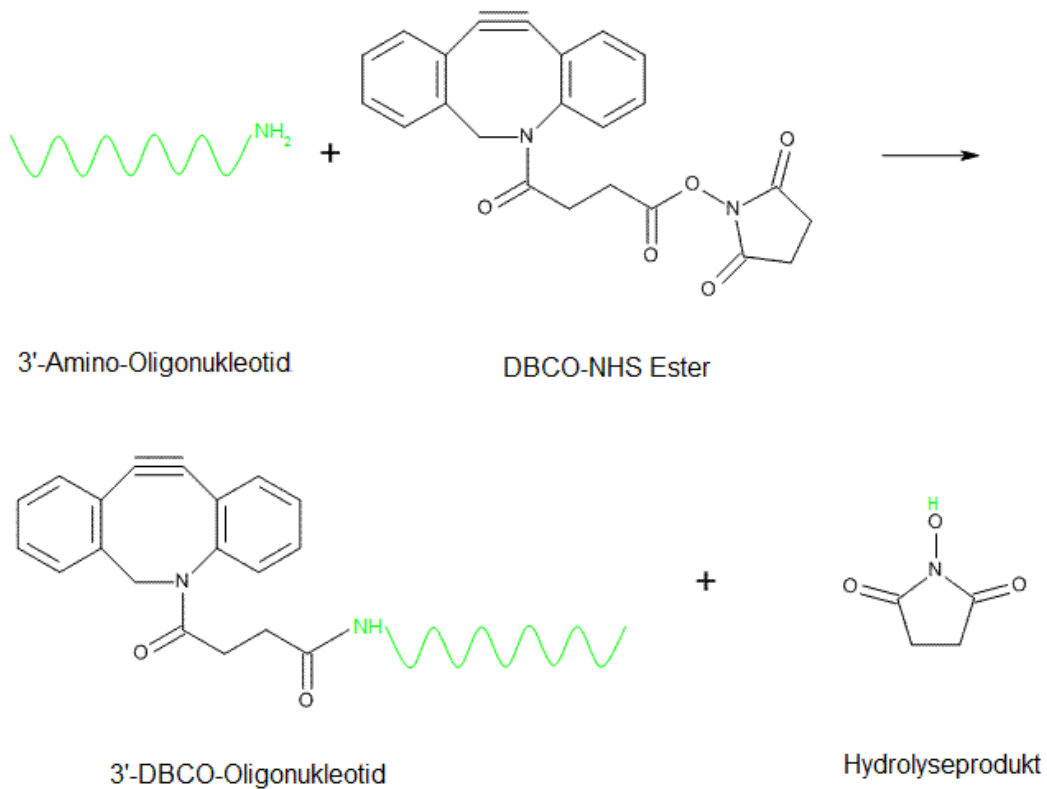


Abbildung 4.01: Reaktion zwischen 3'-Amino-Oligonukleotid und dem Linker DBCO-NHS-Ester. Unter Abspaltung eines Hydrolyseproduktes bildet sich eine Amidbindung zwischen dem Linker und dem Oligonukleotid aus.

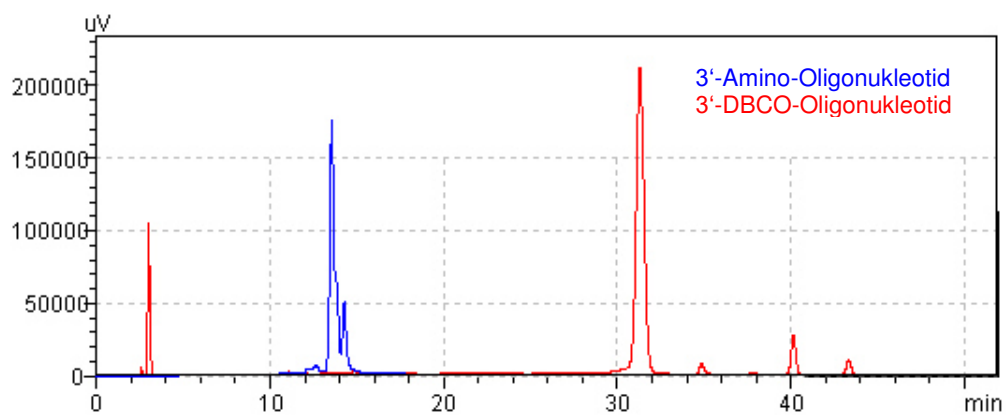


Abbildung 4.02: Vergleich der RP-HPLC Chromatogramme des 3'-Amino-Oligonukleotides und des 3'-DBCO-Oligonukleotides nach 1 Stunde Reaktionszeit. Eingesetzt wurden jeweils 0,5 nmol der Oligonukleotide. Das 3'-Amino-Oligonukleotid weist eine Retentionszeit von 14 Minuten auf und das 3'-DBCO-Oligonukleotid eluiert nach 31 Minuten. Es ist deutlich zu erkennen, dass das 3'-Amino-Oligonukleotid vollständig zum 3'-DBCO-Oligonukleotid reagiert hat.

4.1.2 Größenausschlusschromatographie

Mithilfe der Größenausschlusschromatographie wurden der Überschuss an DBCO-NHS Ester und durch die Reaktion entstandenes Hydrolyseprodukt entfernt. Nach circa 14 ml eluiert das 3'-DBCO-Oligonukleotid (siehe Abbildung 4.03, S. 32) und kann, wie durch die RP-HPLC bestätigt, durch das Auffangen der einzelnen Fraktionen gut von den unerwünschten Begleitsubstanzen abgetrennt werden (siehe Abbildung 4.04, S. 33).

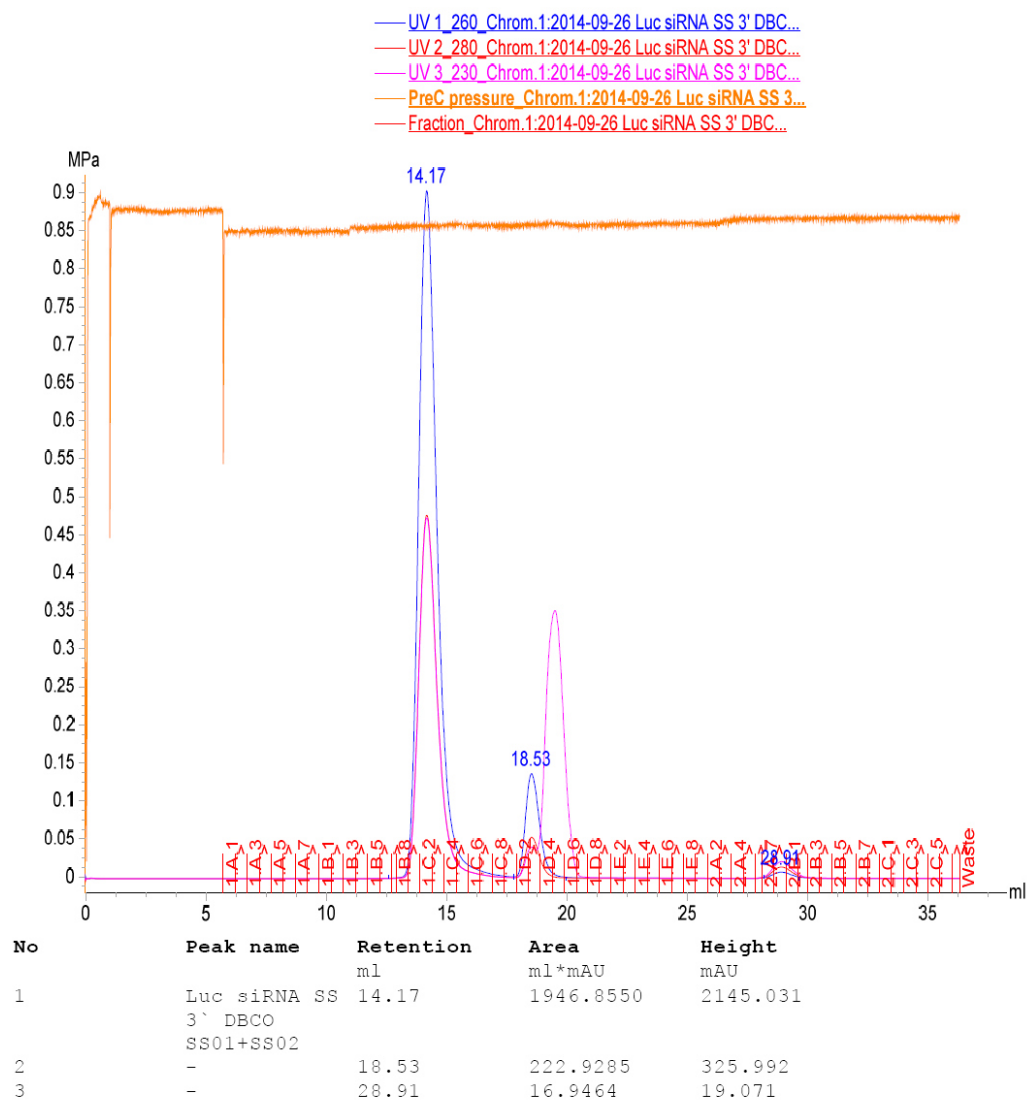


Abbildung 4.03: Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie. Die Fraktionen der Peaks wurden gesammelt, vereinigt und zur Identifikation wurde eine RP-HPLC durchgeführt, die gezeigt hat, dass das 3'-DBCO-Oligonukleotid bei 14 ml eluiert.

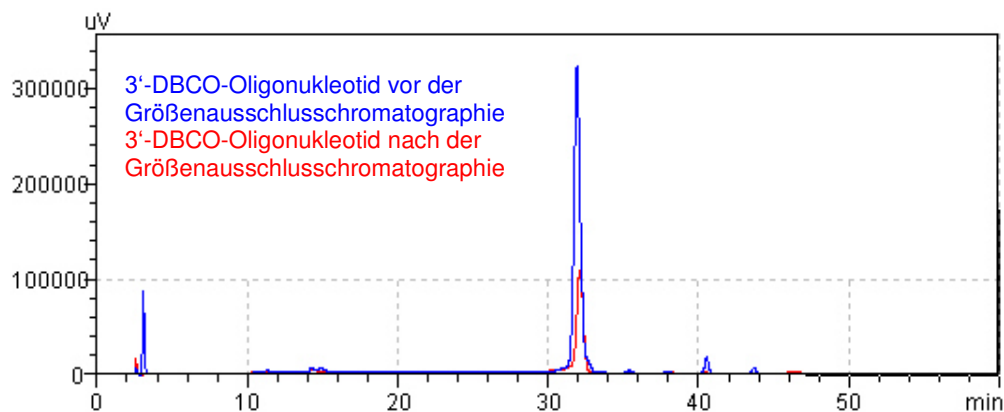


Abbildung 4.04: Chromatogramm des 3'-DBCO-Oligonukleotides vor der Größenausschlusschromatographie verglichen mit dem Chromatogramm des 3'-DBCO-Oligonukleotides nach der Größenausschlusschromatographie (vereinigte Fraktionen des Peaks, der nach 14 ml eluiert). Eingesetzt wurden jeweils 0,5 nmol Oligonukleotid.

4.1.3 Umsetzung mit dem Protein N3-Ec1

In weiterer Folge wurde das durch Größenausschlusschromatographie aufgereinigte 3'-DBCO-Oligonukleotid mit dem Protein N3-Ec1 umgesetzt. Mittels Click-Chemie reagiert dabei das azid-aktivierte Protein mit dem Cyclooctinring des 3'-DBCO-Oligonukleotides zu der entsprechenden Triazolverbindung (siehe Abbildung 4.05, S. 34). Nach 3 Stunden Reaktionszeit wurden zur Verlaufskontrolle eine RP-HPLC und ein Proteingel gemacht. Binnen 3 Stunden reagiert die gesamte Menge an 3'-DBCO-Oligonukleotid mit dem Protein (siehe Abbildung 4.06, S. 35) und es bildet sich das DBCO-Konjugat (siehe Abbildung 4.07, S. 35).

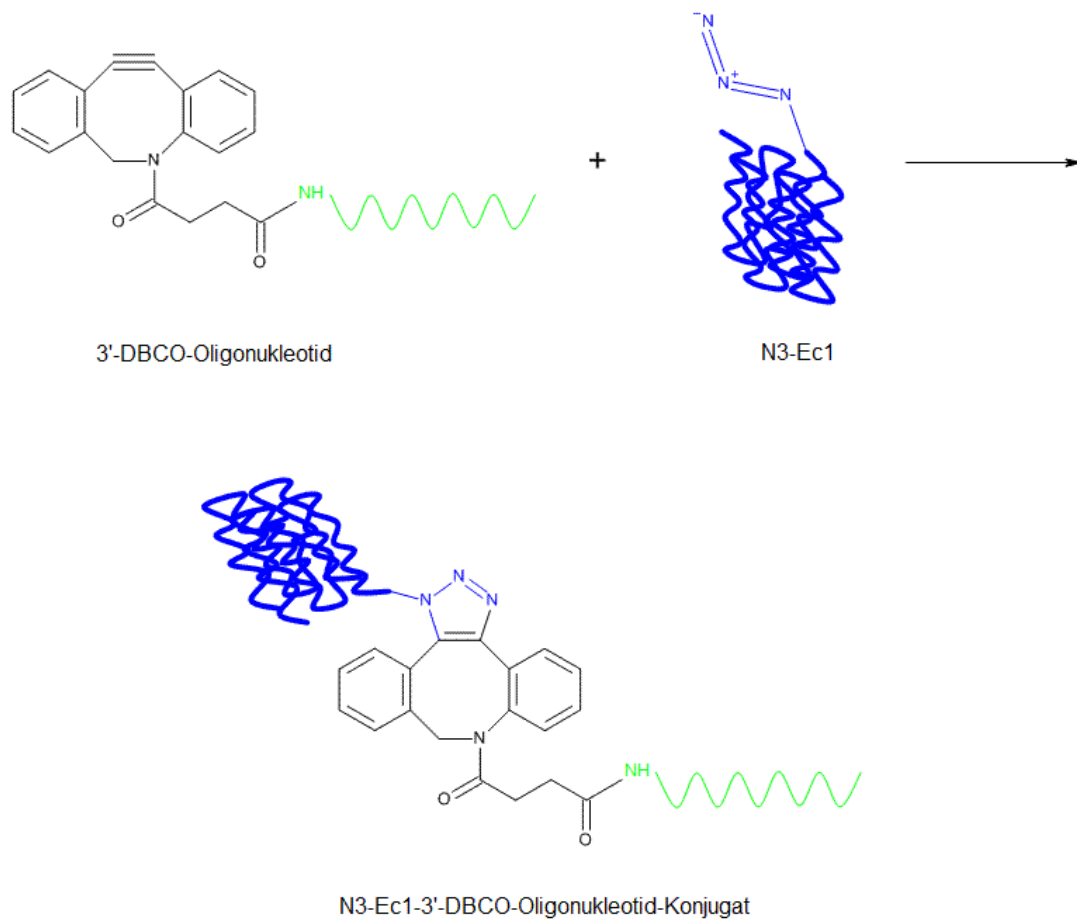


Abbildung 4.05: Reaktion zwischen 3'-DBCO-Oligonukleotid und dem Protein N3-Ec1. Das azid-aktivierte Protein reagiert mit dem Cyclooctinring des 3'-DBCO-Oligonukleotides zu der entsprechenden Triazolverbindung. Aufgrund der ungünstigen Ringspannung läuft die Reaktion spontan und ohne Metallkatalysator ab. Diese Form der Click-Chemie wird auch als SPAAC bezeichnet.

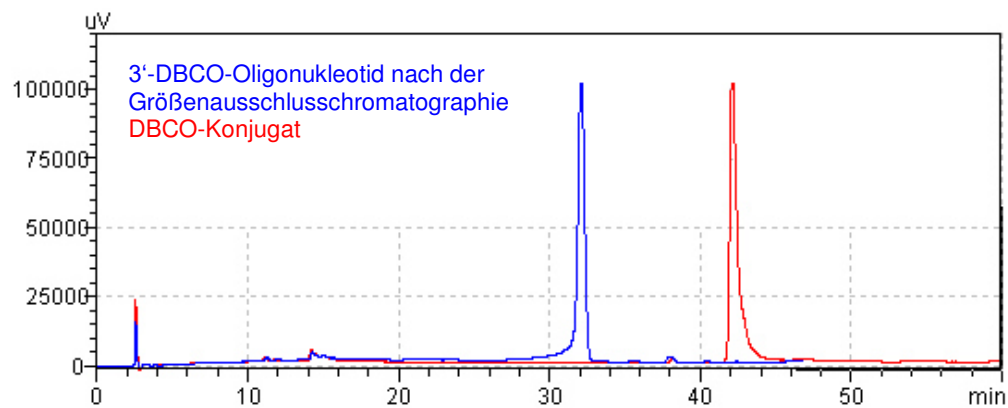


Abbildung 4.06: Chromatogramm des 3'-DBCO-Oligonukleotides nach der Größenausschlusschromatographie verglichen mit dem Chromatogramm des DBCO-Konjugates. Das DBCO-Konjugat eluiert nach circa 42 min und weist keinen Peak bei Minute 32 auf, was bedeutet, dass das 3'-DBCO-Oligonukleotid vollständig reagiert hat. Eingesetzt wurden je 0,5 nmol Oligonukleotid.

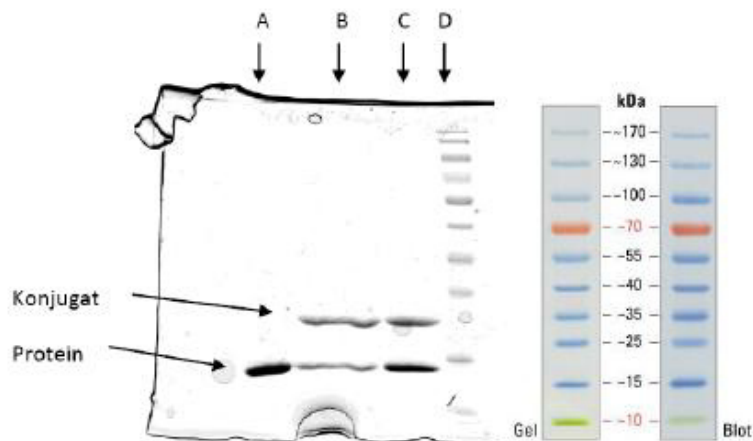


Abbildung 4.07: SDS-Polyacrylamidgel (12 %) des DBCO-Konjugates vor der semipräparativen Aufreinigung samt verwendetem Standard Page Ruler™ Prestained Protein Ladder. A: N3-Ec1 (5 µg), B: DBCO-Konjugat vor der semipräparativen Aufreinigung (bezogen auf 5 µg Protein), C: DBCO-Konjugat vor der semipräparativen Aufreinigung (bezogen auf 5 µg Protein), D: Page Ruler™ Prestained Protein Ladder (3 µl). Probe A zeigt die Bande des Proteins auf einer Höhe von circa 15 kDa. Diese Bande findet sich auch in den Proben B und C wieder, was sich daraus erklärt, dass bei der Reaktion von 3'-DBCO-Oligonukleotid und N3-Ec1 ein Überschuss an Protein zugesetzt wurde. Zusätzlich weisen Probe B und C aber auch je eine Bande bei circa 20 kDa auf, die von dem gebildeten DBCO-Konjugat stammt.

4.1.4 Semipräparative Aufreinigung mittels Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC)

Wie in 3.1.4 beschrieben, wurde das DBCO-Konjugat abschließend mittels RP-HPLC semipräparativ aufgereinigt, um überschüssiges Protein zu entfernen. Auch dieser Reaktionsschritt wurde mittels Proteingel und RP-HPLC überwacht. Nach der Aufreinigung liegt das DBCO-Konjugat rein vor (siehe Abbildung 4.08, S. 36).

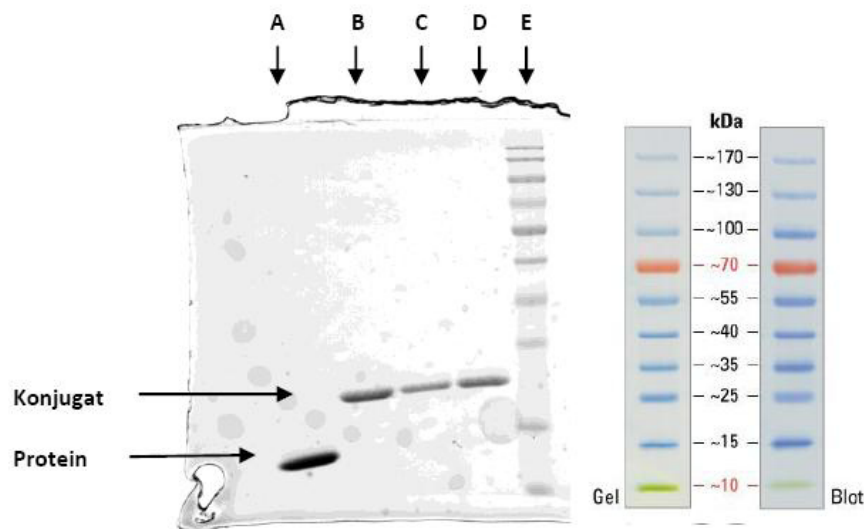


Abbildung 4.08: SDS-Polyacrylamidgel (12 %) des DBCO-Konjugates nach der semipräparativen Aufreinigung samt verwendetem Standard Page Ruler™ Prestained Protein Ladder. A: N3-Ec1 (5 µg), B: Fraktion 1 des DBCO-Konjugates nach der semipräparativen Aufreinigung (bezogen auf 5 µg Protein), C: Fraktion 2 des DBCO-Konjugates nach der semipräparativen Aufreinigung (bezogen auf 5 µg Protein), D: Fraktion 3 des DBCO-Konjugates nach der semipräparativen Aufreinigung (bezogen auf 5 µg Protein), E: Page Ruler™ Prestained Protein Ladder (3 µl). Probe A weist bei circa 15 kDa wieder die Bande des Proteins auf und die Proben B, C und D bei circa 20 kDa die Bande des DBCO-Konjugates. Im Gegensatz zu Abbildung 4.07 weisen die Probe jedoch keine zweite Bande auf der Höhe von 15 kDa auf, was bedeutet, dass das Protein durch die semipräparative Aufreinigung erfolgreich abgetrennt worden ist.

4.2 Fluoreszenzmarkierung

Durch die in 3.2 beschriebene Vorgehensweise kommt es sowohl zwischen dem DBCO-Konjugat und dem Alexa Fluor® 568 fluoreszenzmarkierten Antisense-Strang, als auch zwischen der Kontroll-siRNA und dem Alexa Fluor® 568 fluoreszenzmarkierten Antisense-Strang zur Duplexbildung (siehe Abbildung 4.09, S. 37), was wiederum für die folgenden Zellkulturversuche Voraussetzung ist.

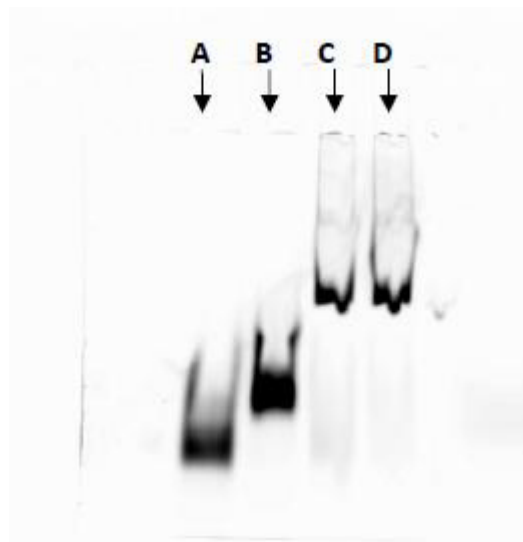


Abbildung 4.09: Natives Polyacrylamidgel (10 %) zum Nachweis der Duplexbildung. A: Alexa Fluor® 568 fluoreszenzmarkierter Antisense-Strang (20 pmol), B: Duplex Alexa Fluor® 568 fluoreszenzmarkierter Antisense-Strang und 3'-Amino-Oligonukleotid (20 pmol), C: Duplex Alexa Fluor® 568 fluoreszenzmarkierter Antisense-Strang und DBCO-Konjugat (20 pmol), D: Duplex Alexa Fluor® 568 fluoreszenzmarkierter Antisense-Strang und DBCO-Konjugat (20 pmol). Der deutliche Shift zwischen Probe A und B bzw zwischen Probe B und C/D weist auf eine erfolgreiche Duplexbildung sowohl zwischen fluoreszenzmarkiertem Antisense-Strang und 3'-Amino-Oligonukleotid als auch zwischen fluoreszenzmarkiertem Antisense-Strang und DBCO-Konjugat hin.

4.3 Stabilitätsprüfung

Ein 2 %iges Agarosegel wurde angefertigt um die Stabilität des DBCO-Konjugates zu überprüfen (siehe Abbildung 4.10, S. 38). Es ist zu erkennen,

dass es innerhalb von 48 Stunden nicht zum Abbau durch Serumnukleasen kommt, da die Bandenintensität zwischen den einzelnen Proben mit unterschiedlicher Inkubationsdauer nicht schwächer wird. Wie in 3.3.4 beschrieben wurden die Versuchsbedingungen dabei so gewählt, dass sie den Bedingungen, die bei den Zellkulturversuchen herrschen, möglichst ähnlich sind.

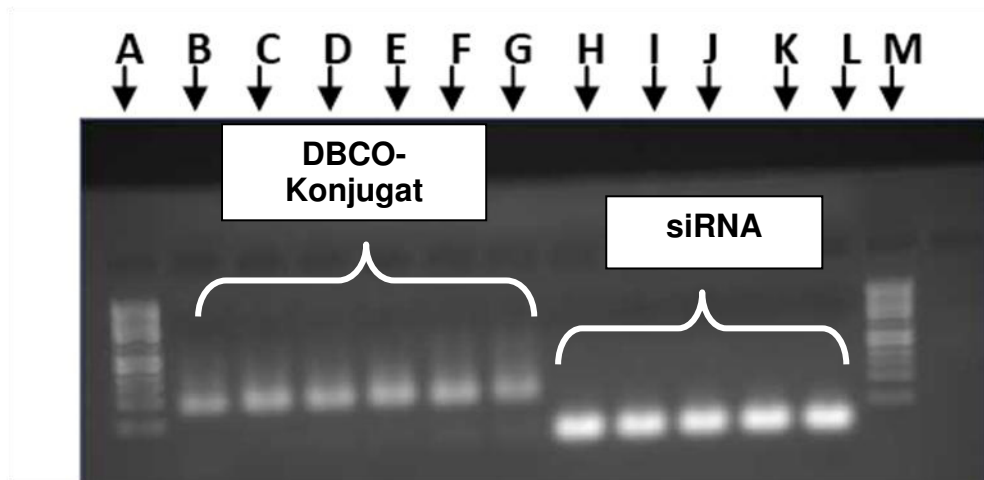


Abbildung 4.10: 2 %iges Agarosegel des DBCO-Konjugates, das zur Stabilitätskontrolle angefertigt wurde. A: GeneRuler 50 bp DNA Ladder (5 μ l), B: DBCO-Konjugat (30 pmol) + Wasser nach 0 h, C: DBCO-Konjugat (30 pmol) + Medium nach 0 h, D: DBCO-Konjugat (30 pmol) + Medium nach 1 h, E: DBCO-Konjugat (30 pmol) + Medium nach 3 h, F: DBCO-Konjugat (30 pmol) + Medium nach 24 h, G: DBCO-Konjugat (30 pmol) + Medium nach 48 h, H: Luciferase siRNA Antisense-Strang (36 pmol) + Medium nach 0 h, I: Luciferase siRNA Antisense-Strang (36 pmol) + Medium nach 1 h, J: Luciferase siRNA Antisense-Strang (36 pmol) + Medium nach 3 h, K: Luciferase siRNA Antisense-Strang (36 pmol) + Medium nach 24 h, L: Luciferase siRNA Antisense-Strang (36 pmol) + Medium nach 48 h, M: GeneRuler 50 bp DNA Ladder (5 μ l). Da die Bandenintensität weder bei den Proben mit siRNA, noch bei den Proben mit DBCO-Konjugat abnimmt, ist davon auszugehen, dass es in beiden Fällen innerhalb von 48 h zu keiner Abbaureaktion kommt.

4.4 Zellkulturversuche

4.4.1 Bindungsversuch mittels Durchflusszytometrie an EpCAM-positive Zellen

Mittels Durchflusszytometrie wurde die Bindung des DBCO-Konjugates an EpCAM positive MDA-MB-468 Zellen untersucht.

Mithilfe der mit Penta His Tag Antikörper behandelten Proben konnte nachgewiesen werden, dass das DBCO-Konjugat in allen getesteten Konzentrationen an EpCAM-positiven Zellen bindet. Außerdem ist ersichtlich, dass diese Bindung deutlich schwächer ist, als die des Proteins allein (siehe Abbildung 4.11, S. 39).

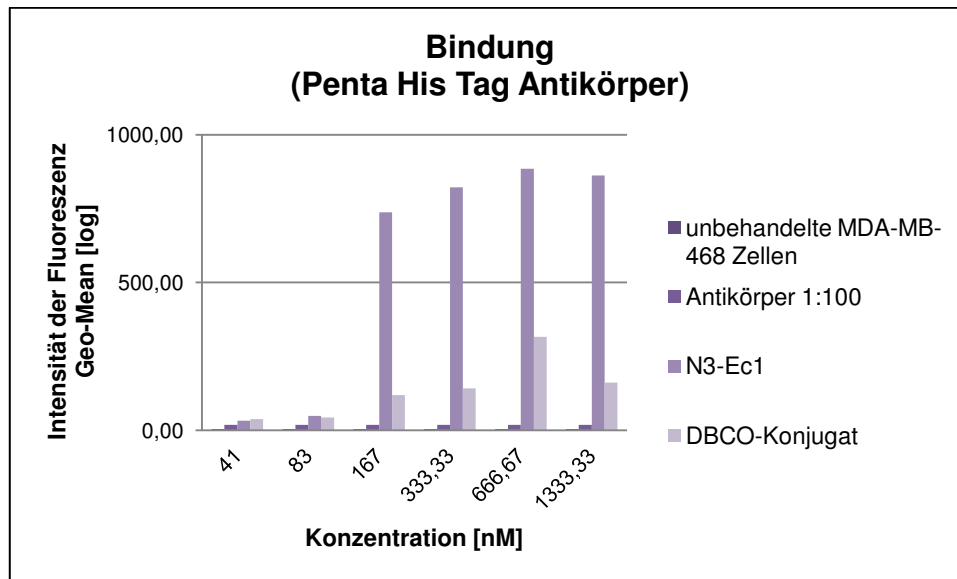


Abbildung 4.11: Übersicht der Ergebnisse der Durchflusszytometrie basierend auf dem Penta His Tag Antikörper. Es ist deutlich zu erkennen, dass das DBCO-Konjugat in allen getesteten Konzentrationen an die EpCAM positiven MDA-MB-468 Zellen bindet, jedoch deutlich schwächer, als die entsprechende Konzentration von N3-Ec1 allein.

Eine detaillierte Betrachtung der Ergebnisse der Probe mit einer Konzentration von 666,67 nM zeigt, dass der Antikörper an sich eine leichte Verschiebung aufweist, die auf eine unspezifische Bindung des Antikörpers an die Zellen hindeutet. Die Verschiebung, die durch das DBCO-Konjugat und das Protein zu Stande kommt, ist aber deutlich größer, weshalb trotz der unspezifischen Bindung des Antikörpers auf eine erfolgreiche Bindung von DBCO-Konjugat und Protein geschlossen werden kann (siehe Abbildung 4.12, S. 40 und Abbildung 4.13, S. 40).

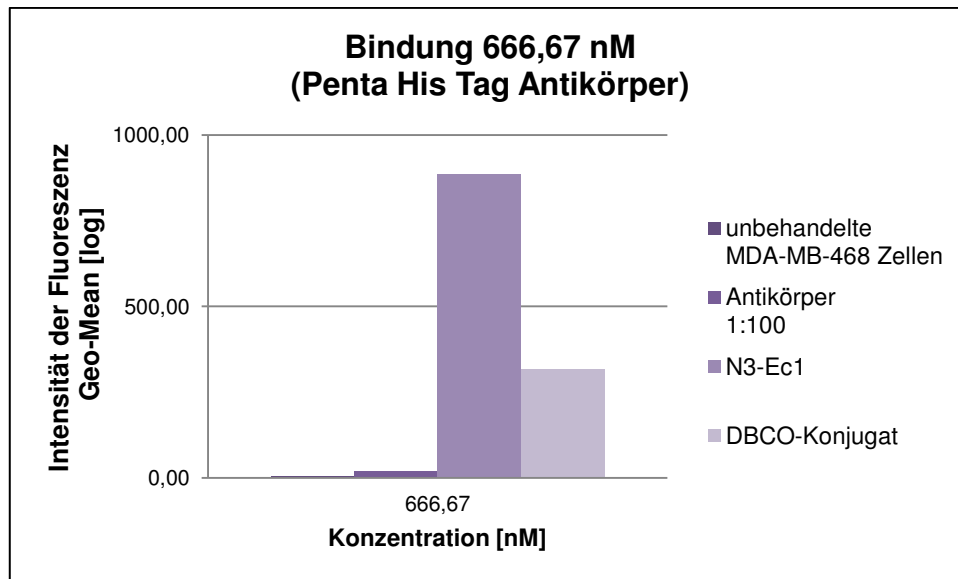


Abbildung 4.12: Ergebnisse des Bindungsversuches, basierend auf dem Penta His Tag Antikörper, mit der Konzentration 666,67 nM.

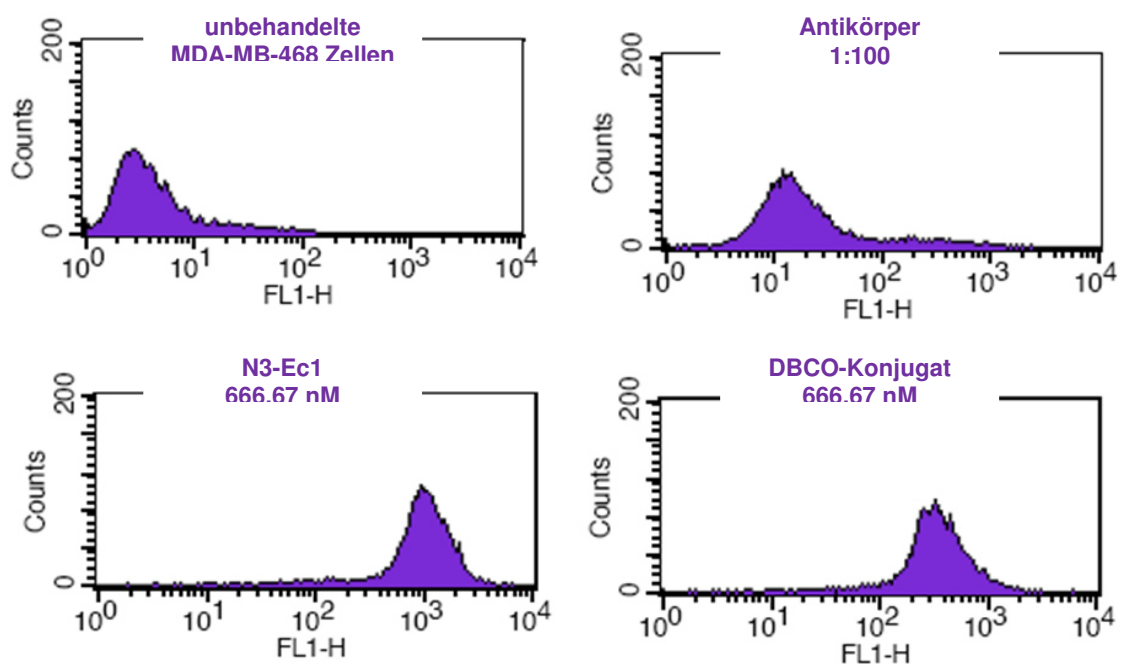


Abbildung 4.13: Durchflusszytometrie-Ergebnisse der Probe mit dem Penta His Tag Antikörper in der Konzentration von 666,67 nM. Der Antikörper allein weist eine leichte Verschiebung auf, er führt also zu einer unspezifischen Bindung. Die deutlich größere Verschiebung, die sowohl bei dem Protein allein, als auch bei dem DBCO-Konjugat zu sehen ist, zeigt, dass es zu einer erfolgreichen Bindung kommt.

Außerdem wurde mithilfe der Proben mit fluoreszenzmarkiertem Antisense-Strang gezeigt, dass nicht nur die Proteinkomponente, sondern das gesamte Konjugat an die Zellen bindet (siehe Abbildung 4.14, S. 41).

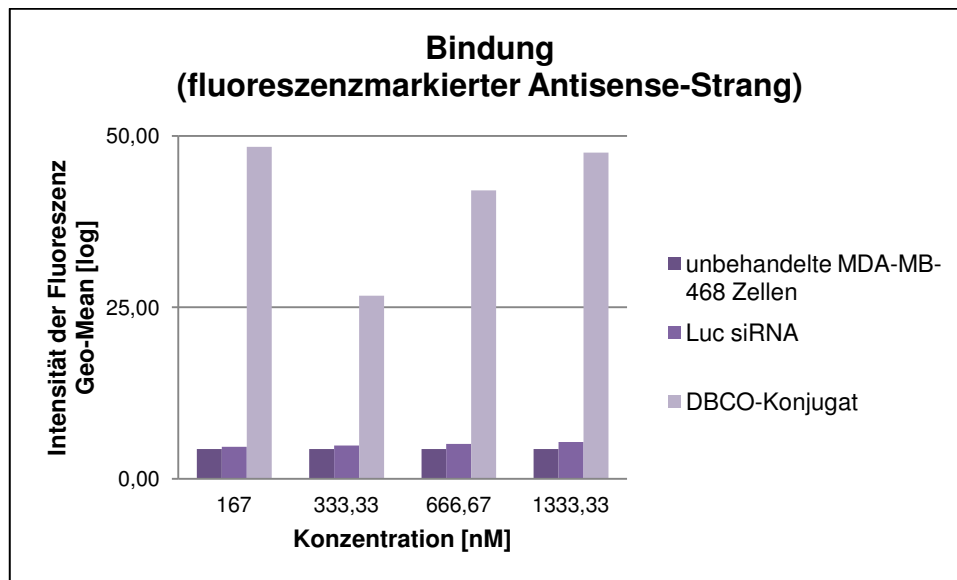


Abbildung 4.14: Übersicht der Ergebnisse der Durchflusszytometrie basierend auf dem fluoreszenzmarkierten Antisense-Strang. In allen getesteten Konzentrationen bindet das DBCO-Konjugat an die Zellen, die Luc siRNA Duplexe hingegen kaum.

Eine detaillierte Betrachtung der Ergebnisse der Probe mit 666,67 nM zeigt deutlich eine Verschiebung des Peaks durch das DBCO-Konjugat und im Vergleich dazu die siRNA, die keine Verschiebung aufweist (siehe Abbildung 4.15, S. 42 und Abbildung 4.16, S. 43).

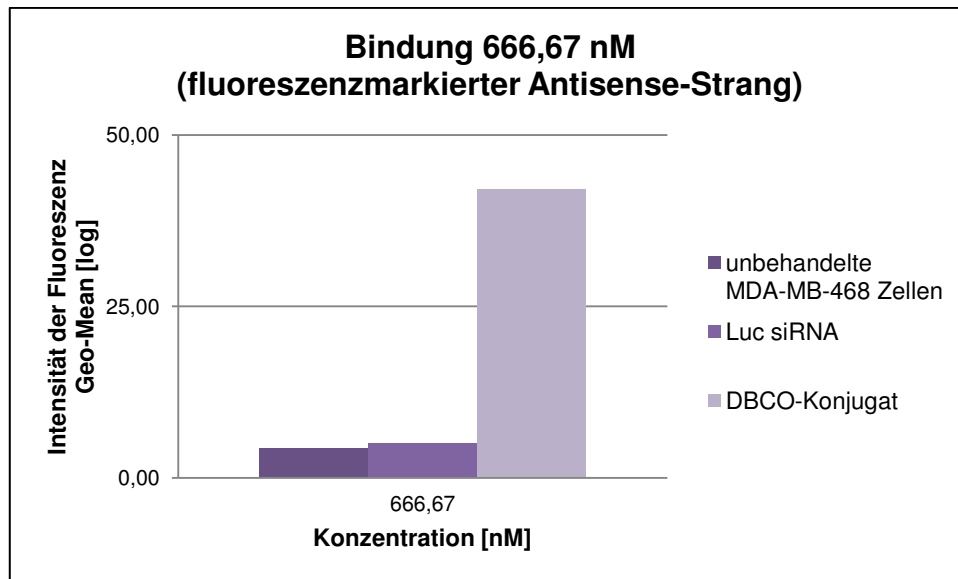


Abbildung 4.15: Ergebnisse des Bindungsversuches, basierend auf dem fluoreszenzmarkierten Antisense-Strang, mit der Konzentration 666,67 nM.

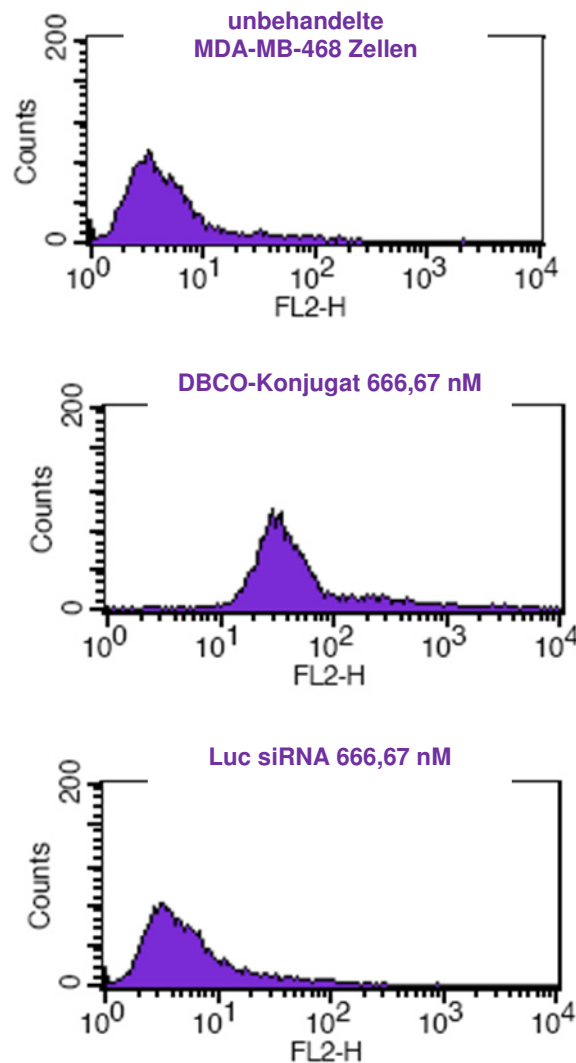


Abbildung 4.16: Durchflusszytometrie-Ergebnisse der Probe mit dem fluoreszenzmarkierten Antisense-Strang in der Konzentration von 666,67 nM. Das DBCO-Konjugat zeigt eine deutliche Verschiebung im Vergleich zu den unbehandelten Zellen und der Luc siRNA und beweist somit, dass das Konjugat bindet.

4.4.2 Bindungsversuch mittels Durchflusszytometrie an EpCAM-negative Zellen

Um zu zeigen, dass die Bindung spezifisch an EpCAM positive Zellen stattfindet, wurde auch die Bindung an EpCAM negative HeLa-Zellen mittels Durchflusszytometrie untersucht.

Der Antikörper bindet auch an die EpCAM-negativen Zellen unspezifisch. Das Signal der Proben mit Protein und Konjugat ist ident mit dem Hintergrundsignal, das durch den sekundären Antikörper verursacht wird (siehe Abbildung 4.17, S. 44 und Abbildung 4.18, S. 45).

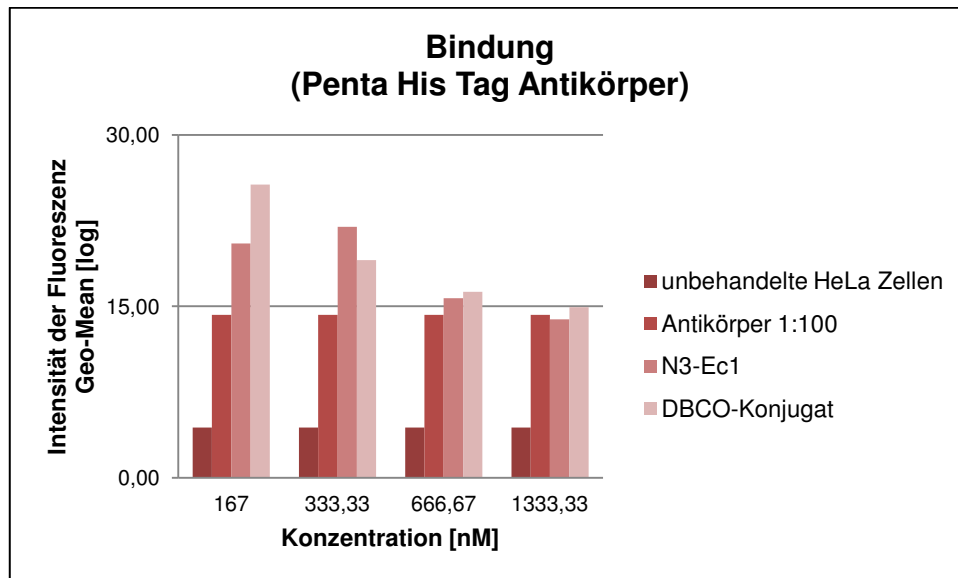


Abbildung 4.17: Übersicht der Ergebnisse der Durchflusszytometrie basierend auf dem Penta His Tag Antikörper. Der Antikörper führt auch an den HeLa-Zellen zu einer unspezifischen Bindung. Das Signal der Proben mit dem Protein und Konjugat ist ident mit dem Hintergrundsignal, das durch den sekundären Antikörper verursacht wird.

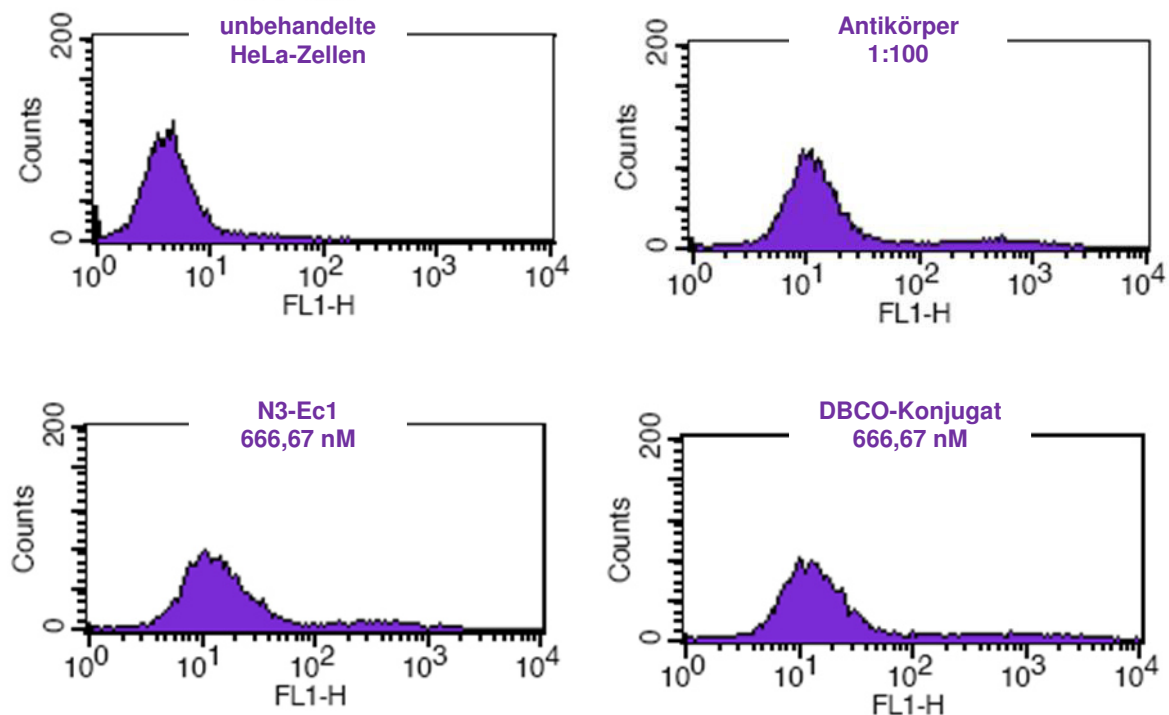


Abbildung 4.18: Durchflusszytometrie-Ergebnisse der Probe mit dem Penta His Tag Antikörper in der Konzentration von 666,67 nM. Auch in diesem Fall ist eine leichte Verschiebung bei der Antikörper-Probe zu sehen, was, wie bei den MDA-MB-468 Zellen, auf eine unspezifische Bindung hinweist. Im Gegensatz zu den EpCAM-positiven Zellen zeigen jedoch sowohl die Probe mit dem Protein N3-Ec1 allein, als auch die Probe mit dem DBCO-Konjugat ein Signal, das mit dem Hintergrundsignal, das durch den sekundären Antikörper verursacht wird, ident ist.

Weder die fluoreszenzmarkierte siRNA-Duplex, noch das DBCO-Konjugat binden nennenswert an die HeLa-Zellen (siehe Abbildung 4.19, S. 46 und Abbildung 4.20, S. 47). Diese Daten belegen, dass die receptorspezifische Bindung des DARPins durch die siRNA Konjugation nicht beeinflusst wird.

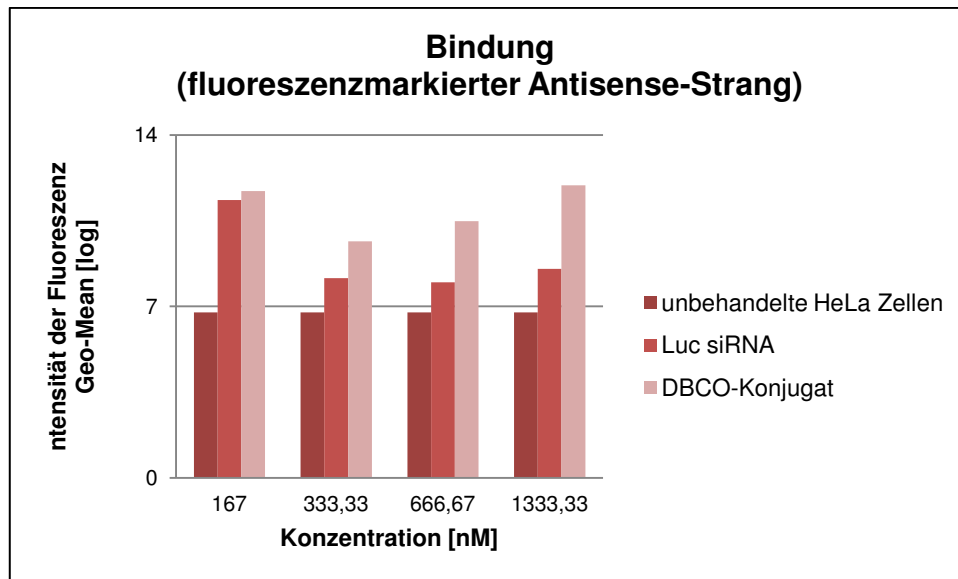


Abbildung 4.19: Übersicht der Ergebnisse der Durchflusszytometrie basierend auf dem fluoreszenzmarkierten Antisense-Strang. In allen getesteten Konzentrationen bindet sowohl der fluoreszenzmarkierte siRNA-Duplex, als auch das DBCO-Konjugat nur geringfügig an die HeLa-Zellen.

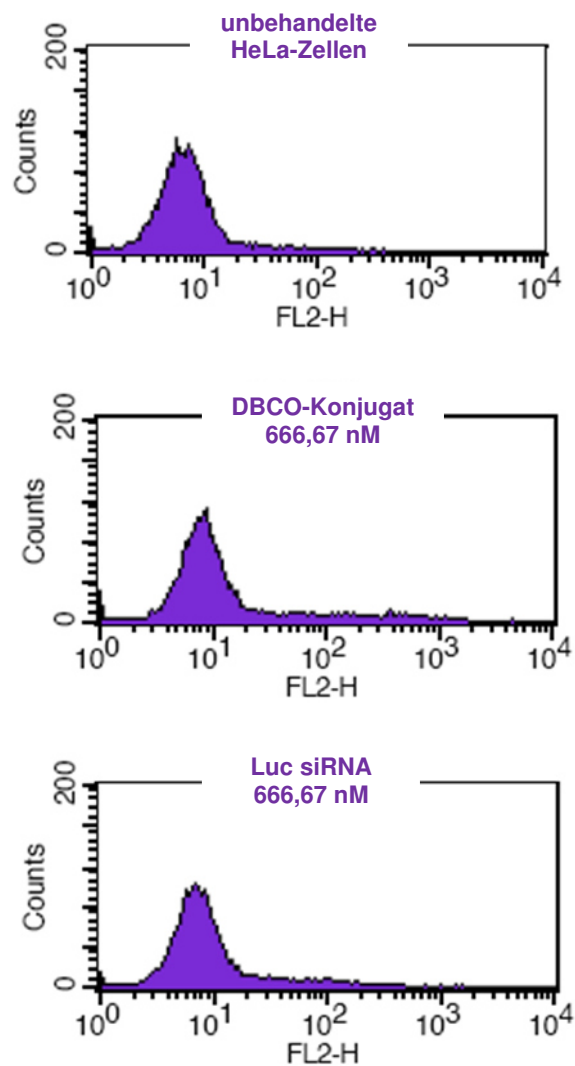


Abbildung 4.20: Durchflusszytometrie-Ergebnisse der Probe mit dem fluoreszenzmarkierten Antisense-Strang in der Konzentration von 666,67 nM. Weder das DBCO-Konjugat, noch die fluoreszenzmarkierte siRNA-Duplex zeigen im Vergleich zu den EpCAM-negativen Zellen eine Verschiebung an, es kommt also zu keiner Bindung an diese Zellen.

4.4.3 Zellaufnahmeversuch mittels Durchflusszytometrie in EpCAM-positive Zellen

Nachdem nachgewiesen worden war, dass das DBCO-Konjugat an EpCAM positive Zellen bindet, wurde außerdem untersucht, ob es auch in die Zellen

aufgenommen wird. Zu diesem Zweck wurde ebenfalls eine Durchflusszytometrie-Analyse nach 24 Stunden Inkubation bei 37° C durchgeführt.

Es hat sich gezeigt, dass das DBCO-Konjugat in allen getesteten Konzentrationen signifikant besser in EpCAM-positive Zellen aufgenommen wird als die entsprechende siRNA-Duplex allein (Abbildung 4.21, S. 48).

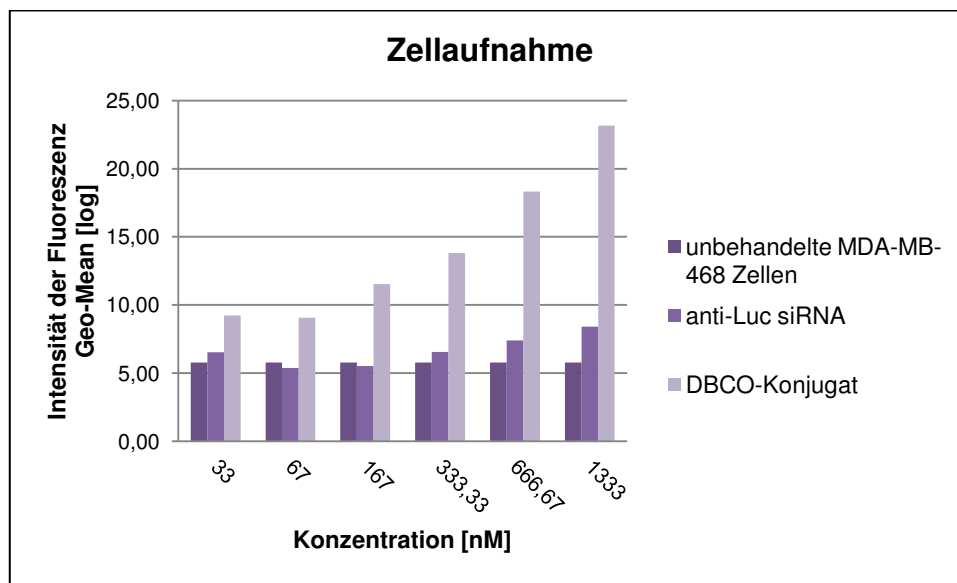


Abbildung 4.21: Übersicht der Ergebnisse des Zellaufnahmeversuches in MDA-MB-468 Zellen. Sie zeigt, dass das DBCO-Konjugat besser in die Zellen aufgenommen wird als die fluoreszenzmarkierte siRNA-Duplex allein. Außerdem ist ersichtlich, dass die Aufnahme konzentrationsabhängig ist – je höher die Konzentration, desto besser die Aufnahme.

Die detaillierte Betrachtung der Probe mit einer Konzentration von 666,67 nM zeigt deutlich die Verschiebung durch das DBCO-Konjugat und damit die Aufnahme in die Zellen (siehe Abbildung 4.22, S. 49).

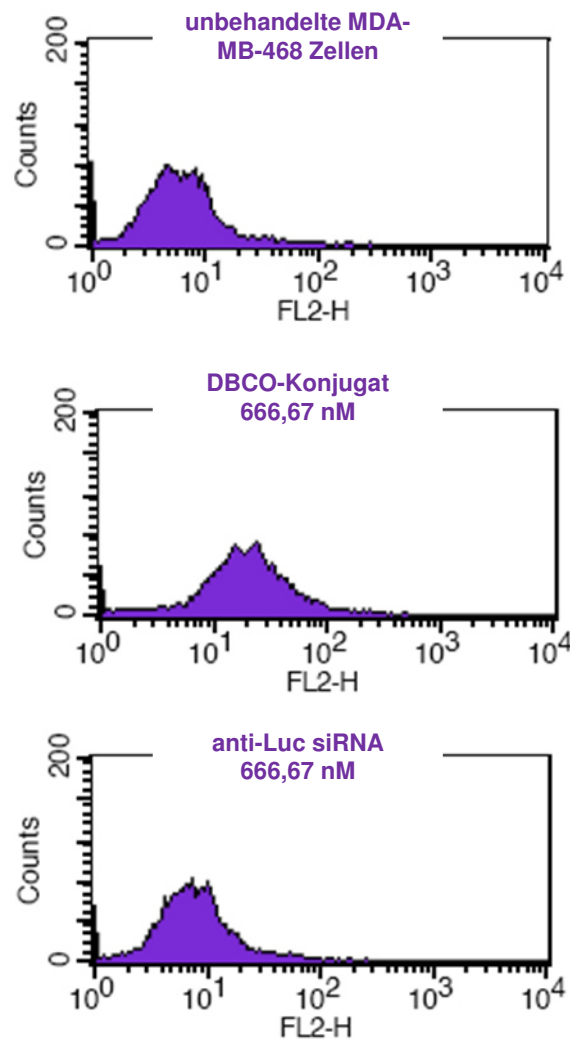


Abbildung 4.22: Durchflusszytometrie-Ergebnisse des Zellaufnahmeversuches in EpCAM-positive Zellen in der Konzentration von 666,67 nM. Das DBCO-Konjugat ist im Vergleich zu den unbehandelten MDA-MB-468 Zellen und der fluoreszenzmarkierten siRNA-Duplex verschoben und beweist somit die Aufnahme des Konjugates in die Zellen.

Die Auswertung der Aufnahmen mit dem Fluoreszenzmikroskop bestätigt die Erkenntnis, dass das DBCO-Konjugat in die Zellen aufgenommen wird. Eine quantitative Auswertung bezüglich der Zellaufnahme ermöglichen die Aufnahmen jedoch nicht (siehe Abbildung 4.23, S.50)

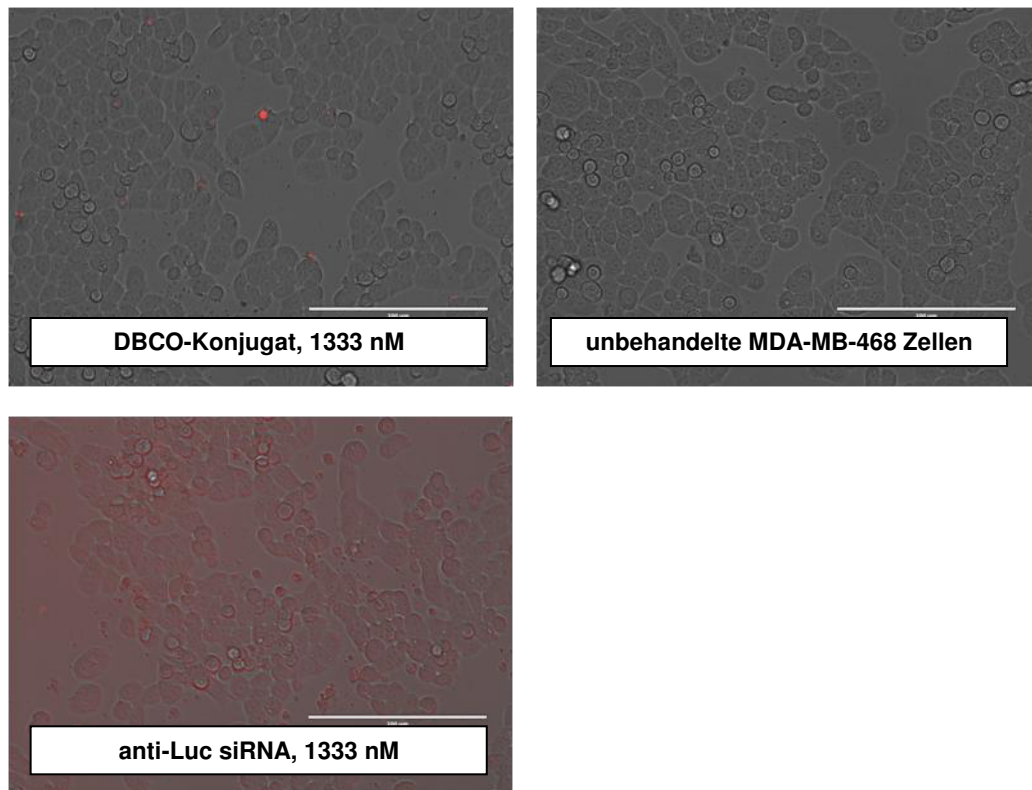


Abbildung 4.23: Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen im Zuge des Zellaufnahmeversuches. Verglichen mit den unbehandelten Zellen wurde das DBCO-Konjugat in die Zellen aufgenommen. Da aber auch die siRNA eine gewisse Fluoreszenz zeigt, ist es schwierig, anhand dieser Aufnahmen eindeutige Aussagen zu treffen.

Weiters konnte gezeigt werden, dass die Zugabe des Transfektionsreagenzes Lipofectamin RNAimax die Aufnahme von siRNA in Zellen konzentrationsabhängig erhöht. Je mehr Lipofectamin zugesetzt wird, desto besser wird die siRNA aufgenommen (siehe Abbildung 4.24, S. 51).

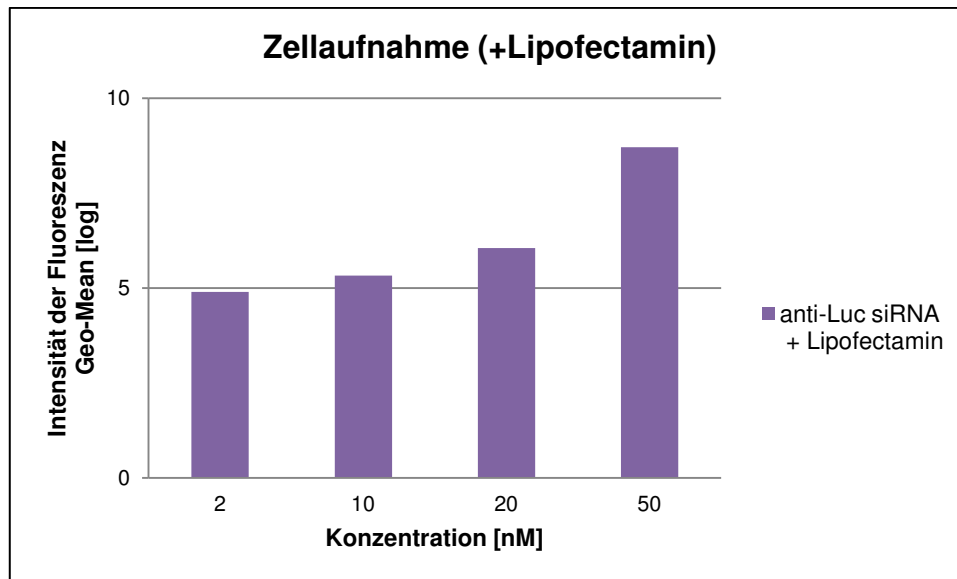


Abbildung 4.24: Aufnahme des fluoreszenzmarkierten Antisense-Stranges in EpCAM positive MDA-MB-468 Zellen in Abhängigkeit von dem Transfektionsreagenz Lipofectamin. Durch die Zugabe von Lipofectamin erhöht sich die Zellaufnahme konzentrationsabhängig.

4.4.4 Luciferase-Assay

Mit dem Luciferase-Assay wurde untersucht, ob das DBCO-Konjugat die Fähigkeit besitzt, die Genexpression von Luciferase-Reportergenen herunterzuregulieren.

Abbildung 4.25 (siehe S. 52) zeigt eine Übersicht der Ergebnisse des Luciferase-Assays. Das Konjugat weist nur in den Konzentrationen von 100 nM und 50 nM eine geringere Lumineszenz als die unbehandelten Zellen auf und zeigt damit eine Herunterregulierung der Genexpression. In den beiden Fällen ist die Herunterregulierung stärker, als durch die siRNA allein. In allen anderen getesteten Konzentrationen konnte kein Gen-Silencing-Effekt beobachtet werden.

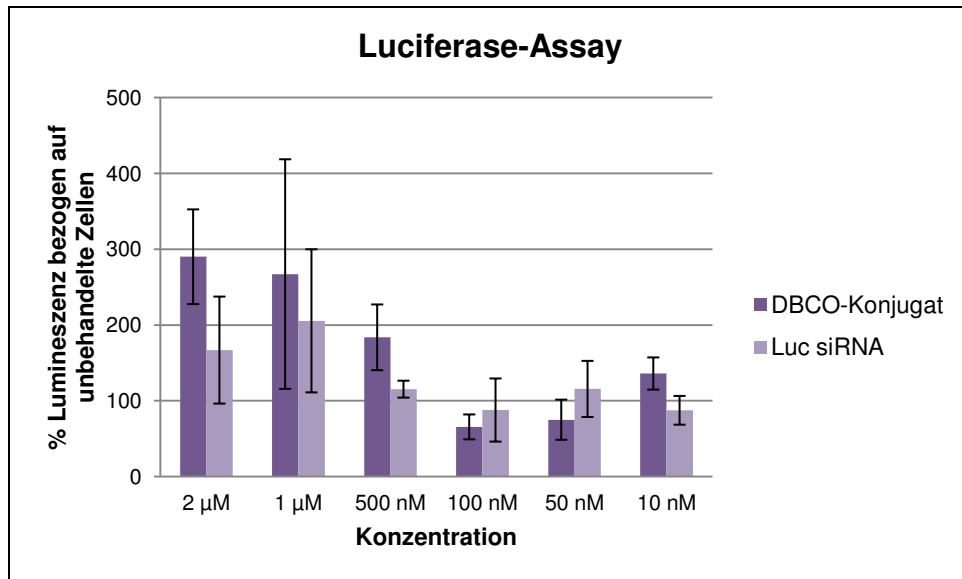


Abbildung 4.25: Graphische Darstellung der Ergebnisse des Luciferase-Assays.

5 Diskussion

5.1 Herstellung und Aufreinigung des Konjugates

Der erste Schritt der Herstellung des DBCO-Konjugates, die Umsetzung des 3'-Amino-Oligonukleotides mit DBCO-NHS Ester, hat sich als unkompliziert erwiesen und liefert, unter den in Punkt 3.1.1 angeführten Reaktionsbedingungen, verlässlich eine Ausbeute von praktisch 100 %. Bei den entsprechenden Vorversuchen mit einem Reaktionsansatz von 5 nmol 3'-Amino-Oligonukleotid wurde dieses, um das Reaktionsvolumen zu erhöhen, vor der Pufferzugabe mit der 4,85-fachen Menge an RNase-freiem Wasser versetzt. Da sich die Reaktionsbedingungen als optimal erwiesen haben, wurde die Zugabe von RNase-freiem Wasser auch in den folgenden, größeren Reaktionsansätzen von 50 nmol 3'-Amino-Oligonukleotid beibehalten.

Vor der weiteren Umsetzung mit dem Protein N3-Ec1 war es nötig, einerseits den Überschuss an DBCO-NHS-Ester und andererseits das durch die Reaktion entstandene Hydrolyseprodukt zu entfernen. Beides gelingt mittels Größenausschlusschromatographie. Das 3'-DBCO-Oligonukleotid eluiert nach circa 14 ml, kann in Eppendorf-Gefäßen aufgefangen werden und anschließend mittels Amicon-Filter konzentriert werden, um es für die Umsetzung mit dem Protein möglichst konzentriert vorliegen zu haben.

Im nächsten Schritt wurde das 3'-Amino-Oligonukleotid mit N3-Ec1 umgesetzt. Auch in diesem Schritt konnte man verlässlich eine Ausbeute von 100 % erzielen, wenn man das 3'-DBCO-Oligonukleotid mit dem 2-fachen Überschuss an Protein versetzt, mit PBS (pH 7,1-7,4) auf eine Endkonzentration von 50 mM puffert und die Reaktion nach 3 h bei 25 °C und 400 rpm am Thermo-Mixer beendet. Der Versuch, den Protein-Überschuss auf die 1,5-fache Menge zu verringern, hat in einer geringeren Ausbeute resultiert und ist deshalb nicht zu empfehlen. Auch einen 2-fachen

Überschuss an 3'-Amino-Oligonukleotid zu verwenden ist nicht zielführend, da hier erstens auch bei einer Reaktionszeit von 24 Stunden nur eine Ausbeute von 30 % erzielt wurde und man zweitens das überschüssige Oligonukleotid wieder rückgewinnen oder den Verlust in Kauf nehmen müsste.

Abschließend konnte das DBCO-Konjugat semipräparativ aufgereinigt werden. Dazu wurde es auf die Säule einer RP-HPLC aufgetragen, die Fraktionen, die das DBCO-Konjugat enthalten haben, wurden aufgefangen, mittels Speed Vac eingeeengt und durch erneutes Lösen in PBS (pH 7,1-7,4) auf die finale Konzentration gebracht.

Zur Verlaufskontrolle der einzelnen Reaktionsschritte bei der Herstellung des DBCO-Konjugates eignet sich die RP-HPLC. Durch SDS-PAGE kann außerdem überprüft werden, ob das 3'-DBCO-Oligonukleotid mit dem Protein reagiert hat und ob die semipräparative Aufreinigung erfolgreich war.

5.2 Fluoreszenzmarkierung

Um die Zellbindung und -aufnahme des DBCO-Konjugates mittels Durchflusszytometrie zu untersuchen, war es nötig, das DBCO-Konjugat mit einer Fluoreszenzmarkierung zu versehen. Dazu wurde es mit einem komplementären Alexa Fluor® 568 fluoreszenzmarkiertem Antisense-Strang hybridisiert, indem beide Stränge zusammen in einem Eppendorfgefäß gevortext, zentrifugiert und anschließend 8 Minuten bei Raumtemperatur und 2 Minuten auf Eis inkubiert wurden. Da diese Methode zu einer erfolgreichen Duplexbildung führt, konnte mit einem nativen Gel nachgewiesen werden (siehe Abbildung 4.09, S. 37). Mit der Kontroll-siRNA wurde analog verfahren.

5.3 Analytik des Konjugates

Zur genauen Analyse des DBCO-Konjugates haben sich sowohl die RP-HPLC als auch diverse Gelelektrophoreseverfahren als geeignet erwiesen.

Mittels RP-HPLC konnten nicht nur der Verlauf der Herstellung des Konjugates genau überwacht und abschließend dessen Reinheit überprüft werden, sondern auch die semipräparative Aufreinigung durchgeführt werden, wobei überschüssiges Protein vom DBCO-Konjugat abgetrennt wurde

Die SDS-Page diente, wie die RP-HPLC, der Verlaufskontrolle bei der Konjugatherstellung und der abschließenden Reinheitsüberprüfung. Durch die native PAGE wurde die erfolgreiche Duplexbildung zwischen dem DBCO-Konjugat und dem fluoreszenzmarkierten Antisense-Strang bzw zwischen der Kontroll-siRNA und dem fluoreszenzmarkierten Antisense-Strang gezeigt und mithilfe des 2 %igen Agarosegels wurde veranschaulicht, dass das DBCO-Konjugat innerhalb von 48 Stunden in einem Ansatz mit Zellmedium nicht durch Serumnukleasen abgebaut wird.

5.4 Zellkulturversuche

Die Durchflusszytometrie wurde im Rahmen meiner Diplomarbeit verwendet, um zu untersuchen, ob das DBCO-Konjugat an Zellen bindet und darüberhinaus auch in diese aufgenommen wird.

Der Bindungsversuch mit dem Penta His Tag Antikörper hat gezeigt, dass das DBCO-Konjugat, wie zu erwarten, eindeutig an EpCAM-positive Zellen bindet, jedoch deutlich schwächer als das Protein allein. Das geringere Signal ist vermutlich nicht auf eine schwächere Bindung der Proteindomäne an EpCAM-Rezeptoren zurückzuführen, sondern auf eine sterische Hinderung der Bindung des sekundären Antikörpers an den His-Tag des DARPin. Die Konjugation der siRNA fand nämlich direkt an der N-

terminalen Aminosäure und somit in unmittelbarer Nähe zum His-Tag statt. Außerdem ging aus diesem Versuch heraus, dass auch der Antikörper an sich geringfügig an die Zellen bindet. Eine gewisse unspezifische Bindung des sekundären Antikörpers tritt bei solchen Analysen immer auf, weshalb die entsprechende Kontrolle wesentlich zur Beurteilung der Ergebnisse ist. Da es durch das DBCO-Konjugat und das Protein aber zu einer deutlich größeren Verschiebung und damit stärkeren Bindung kommt, kann dies vernachlässigt werden.

Der Versuch basierend auf dem fluoreszenzmarkierten Antisense-Strang hat ergeben, dass die Bindung wirklich durch die Struktur des DBCO-Konjugates bedingt ist und dass das entsprechende 3'-Amino-Oligonukleotid allein kaum an die Zellen bindet.

Um die Bindungsspezifität des DBCO-Konjugates zu zeigen, wurde der Bindungsversuch einerseits mit EpCAM-positiven MDA-MB-468 Zellen und andererseits mit EpCAM negativen HeLa-Zellen, an die das Konjugat nicht binden sollte, durchgeführt. Vergleicht man die Ergebnisse, sieht man, dass das DBCO-Konjugat spezifisch an die EpCAM-positiven Zellen bindet (siehe Abbildung 5.01, S. 57).

Auch wenn aus den hier präsentierten Daten nicht direkt auf eine EpCAM-Rezeptorbindung des Konjugates geschlossen werden kann, lässt die bekannte Charakterisierung der hochspezifischen Bindung von Ec1 an EpCAM keine Zweifel, dass das Konjugat tatsächlich an EpCAM-Rezeptoren bindet.

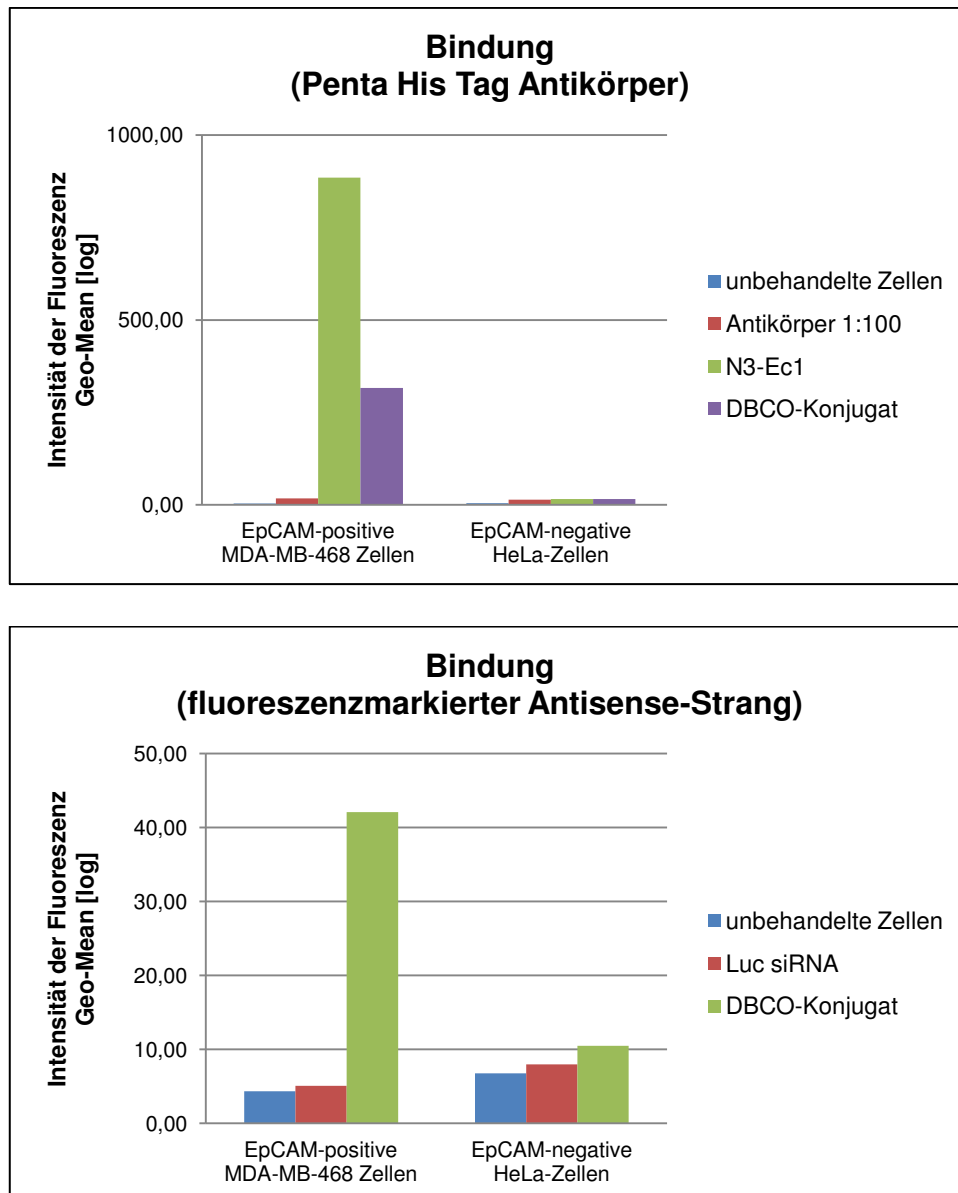


Abbildung 5.01: Vergleich der Ergebnisse des Bindungsversuches von EpCAM-positiven und EpCAM-negativen Zellen. Es ist deutlich zu sehen, dass das DBCO-Konjugat an die EpCAM-positiven MDA-MB-468 Zellen mit höherer Intensität bindet als an die EpCAM-negativen HeLa-Zellen. Es kann außerdem gezeigt werden, dass es durch die Struktur des DBCO-Konjugates zu einer deutlich höheren Bindung kommt als durch die siRNA-Duplex allein.

Verglichen mit einem über eine Maleimid-Bindung verknüpften und einem über eine Disulfid-Bindung verknüpften DARPin-Oligonukleotid-Konjugat (unpublizierte Daten) weist das DBCO-Konjugat eine höhere

Bindungsintensität an EpCAM-positive Zellen auf (siehe Abbildung 5.02, S. 58).

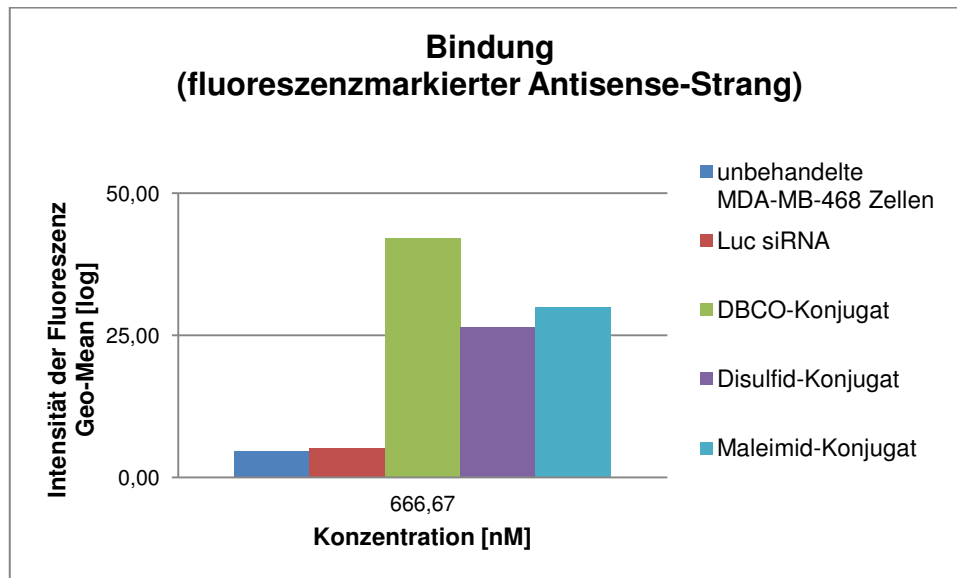


Abbildung 5.02: Vergleich der Ergebnisse des Bindungsversuches des DBCO-Konjugates mit denen anderer DARPin-Oligonukleotid-Konjugate. Sowohl das DBCO-Konjugat, als auch das Disulfid- und Maleimid-Konjugat weisen eine Bindung an EpCAM-positive Zellen auf. Im Fall des DBCO-Konjugates ist die Bindungsintensität am höchsten.

Das DBCO-Konjugat bindet jedoch nicht nur erfolgreich an EpCAM-positive Zellen, es wird darüber hinaus auch in diese aufgenommen, wie die Ergebnisse des Zellaufnahmeversuches zeigen.

Die Methode der Fluoreszenzmikroskopie hat sich nur als bedingt geeignet erwiesen. Sie erlaubt im Zuge der Verlaufskontrolle eine gute und schnelle Abschätzung, ob es zur Zellaufnahme gekommen ist, eine weitere Quantifizierung ist jedoch nicht möglich. Durch intensivere Waschvorgänge vor den Aufnahmen oder durch eine Optimierung der verwendeten Einstellungen am Fluoreszenzmikroskop könnte hier jedoch noch eine Verbesserung erzielt werden.

Weiters zeigen die Ergebnisse der Durchflusszytometrie, dass die Zellaufnahme durch die Zugabe von Lipofectamin als Transfektionsreagenz erhöht werden kann.

Mit dem Luciferase-Assay sollte die Herunterregulierung der Genexpression der Reportergene Firefly- und Renilla-Luciferase gezeigt werden. Die Ergebnisse des Tests waren jedoch nicht eindeutig. In zwei von sechs getesteten Konzentrationen ist es zu einem Gen-Silencing-Effekt durch das DBCO-Konjugat gekommen. Dieser Effekt war stärker, als durch die Kontroll-siRNA allein. In höheren Konzentrationen kam es aus ungeklärter Ursache zu einer Überexpression der Luciferase. Die Daten weisen auf einen geringen, teilweise konzentrationsabhängigen Gen-Silencing-Effekt hin. Die schwächeren Effekte können durch unzureichenden Endosomal-Escape oder durch eine ungenügende Abspaltung der siRNA vom Protein nach erfolgter Zellaufnahme ausgelöst werden. Für eine genauere Aussage müssen aber weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

5.5 Konklusion

Konjugate aus dem DARPin N3-Ec1 und einem Oligonukleotid lassen sich mithilfe des bifunktionellen DBCO-NHS-Alkyllinkers und den Methoden der Click-Chemie schnell und einfach herstellen und aufreinigen. Dabei wird verlässlich eine hohe Ausbeute erzielt und auch der Verlauf der einzelnen Reaktionsschritte lässt sich mittels RP-HPLC und Gelelektrophorese gut überwachen. Die Stabilitätsprüfung hat gezeigt, dass das DBCO-Konjugat in Zellmedium auch über einen längeren Zeitraum stabil ist und keinem Abbau durch Serumnukleasen unterliegt.

Die Zellkulturversuche basierend auf der Durchflusszytometrie haben gezeigt, dass es durch die Struktur des DBCO-Konjugates zu einer deutlich stärkeren Bindung an EpCAM-positive Zellen kommt, als durch die entsprechende siRNA-Duplex allein. Neben der erfolgreichen Bindung

konnte außerdem gezeigt werden, dass das DBCO-Konjugat in EpCAM-positive Zellen aufgenommen wird.

Ob es durch das Konjugat zu einem Gen-Silencing-Effekt kommt und ob dieser Effekt dem Gen-Silencing-Effekt durch siRNA allein überlegen ist, konnte nicht gezeigt werden, da die Ergebnisse des Luciferase-Assays nicht eindeutig waren. Es ist daher notwendig, diesbezüglich weitere Untersuchungen durchzuführen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Idee, den Einsatz von siRNA-basierter Therapie mittels DARPin-Oligonukleotid-Konjugaten zu erleichtern, vielversprechend ist und es eines Tages vielleicht möglich sein wird, Krankheiten auf diesem Weg zu therapieren.

Referenzen

- 1 Press Release (02.10.2006): The 2006 Nobel Prize in Physiology or Medicine.<http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2006/press.html> (27.12.2015).
- 2 Fire A, Xu S, Montgomery MK et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 391(6669), 806-811 (1998)
- 3 Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP. RNAi: Double-Stranded RNA Directs the ATP-Dependent Cleavage of mRNA at 21 to 23 Nucleotide Intervals. *Cell* 101(1), 25-33 (2000)
- 4 Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*. 411(6836), 494-498 (2001)
- 5 Wang Z, Rao DD, Senzer N, Nemunaitis J. RNA Interference and Cancer Therapy. *Pharm. Res.* 28(12), 2983-2995 (2011)
- 6 Siomi H, Siomi MC. On the road to reading the RNA-interference code. *Nature*. 457(7228), 396-404 (2009)
- 7 Meister G, Tuschl T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*. 431(7006), 343-349 (2004)
- 8 Burnett JC, Rossi JJ, Tiemann K. Current Progress of siRNA/shRNA Therapeutics in Clinical Trials. *Biotechnol. J.* 6(9), 1130-1146 (2011)
- 9 Hannon GJ. RNA interference. *Nature* 418(6894), 244-51 (2002)
- 10 Ming X, Laing B. Bioconjugates for targeted delivery of therapeutic oligonucleotides. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 87, 81-89 (2015)
- 11 Winkler J. Oligonucleotide conjugates for therapeutic applications. *Ther. Deliv.* 4(7), 791-809 (2013).
- 12 Wang J, Lu Z, Wientjes MG, Au JL. Delivery of siRNA Therapeutics: Barriers and Carriers. *AAPS J.* 12(4), 492-503 (2010)
- 13 Xu CF, Wang J. Delivery systems for siRNA drug development in cancer therapy. *Asian J. Pharm. Sci.* 10(1), 1-12 (2015)

- 14 Rossi JJ. RNAi therapeutics: SNALPing siRNAs in vivo. *Gene Ther.* 13(7), 583-584 (2006)
- 15 Willibald J, Harder J, Sparrer K et al. Click-Modified Anandamide siRNA Enables Delivery and Gene Silencing in Neuronal and Immune Cells. *J. Am. Chem. Soc.* 134, 12330-12333 (2012)
- 16 Simon M, Stefan N, Plückthun A, Zangemeister-Wittke U. Epithelial cell adhesion molecule-targeted drug delivery for cancer therapy. *Exper Opin. Drug Deliv.* 10(4), 451-468 (2013)
- 17 Kolb HC, Finn MG, Sharpless KB. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 40(11), 2004-2021 (2001)
- 18 Becer CR, Hoogenboom R, Schubert US. Click Chemistry beyond Metal-Catalyzed Cycloaddition. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 48(27), 4900-4908 (2009)
- 19 Jewett JC, Bertozzi CR. Cu-free click cycloaddition reactions in chemical biology. *Chem. Soc. Rev.* 39(4), 1272-1279 (2010)
- 20 El-Sagheer AH, Brown T. Click chemistry with DNA. *Chem. Soc. Rev.* 39, 1388-1405 (2010)
- 21 Li J, Mahajan A, Tsai MD. Ankyrin Repeat: A Unique Motif Mediating Protein-Protein Interactions. *Biochemistry* 45(51), 15168-15178 (2006)
- 22 Kohl A, Binz HK, Forrer P et al. Designed to be stable: Crystal structure of a consensus ankyrin repeat protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100(4), 1700-1705 (2003)
- 23 Stumpp MT, Binz HK, Amstutz P. DARPins: A new generation of protein therapeutics. *Drug Discov. Today* 13(15/16), 659-701 (2008)
- 24 Stefan N, Martin-Killias P, Wyss-Stoeckle S et al. DARPins Recognizing the Tumor-Associated Antigen EpCAM Selected by Phage and Ribosome Display and Engineered for Multivalency. *J. Mol. Biol.* 413(4), 826-843 (2011)
- 25 Tamaskovic R, Simon M, Stefan N et al. Designed ankyrin repeat proteins (DARPins): From research to therapy. *Methods Enzymol.* 503, 101-134 (2012)
- 26 Boersma YL, Plückthun A. DARPins and other repeat protein scaffolds: advances in engineering and applications. *Curr. Opin. Biotechnol.*

- 22(6), 849-857 (2011)
- 27 Simon M, Zangemeister-Wittke U, Plückthun A. Facile Double-Functionalization of Designed Ankyrin Repeat Proteins using Click and Thiol Chemistries. *Bioconjug. Chem.* 23(2), 279-286 (2012)
- 28 Plückthun A. Designed Ankyrin Repeat Proteins (DARPs): Binding Proteins for Research, Diagnostics, and Therapy. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 55, 489-511 (2015)
- 29 Winkler J, Martin-Killias P, Plückthun A, Zangemeister-Wittke U. EpCAM-targeted delivery of nanocomplexed siRNA to tumor cells with designed ankyrin repeat proteins. *Mol. Cancer Ther.* 8(9), 2674-2683 (2009)
- 30 Trzpis M, McLaughlin PMJ, de Leij LMFH, Harmsen MC. Epithelial Cell Adhesion Molecule: More than a Carcinoma Marker and Adhesion Molecule. *Am. J. Pathol.* 171(2), 386-395 (2007)
- 31 Went P, Dirnhofer S, Schöpf D et al. Expression and Prognostic Significance of EpCAM. *J. Cancer Mol.* 3(6), 169-174 (2008)
- 32 Went P, Vasei M, Bubendorf L et al. Frequent high-level expression of the immunotherapeutic target Ep-CAM in colon, stomach, prostate and lung cancers. *Br. J. Cancer.* 94(1), 128-135 (2006)
- 33 Spizzo G, Went P, Dirnhofer S et al. High Ep-CAM expression is associated with poor prognosis in node-positive breast cancer. *Breast cancer Res. Treat.* 86(3), 207-213 (2004)
- 34 Osta WA, Chen Y, Mikhitarian K et al. EpCAM is overexpressed in breast cancer and is a potential target for breast cancer gene therapy. *Cancer Res.* 64(16), 5818-5824 (2004)