

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie

Direktor: Prof. Dr. med. S. Endres

Medizinische Klinik und Poliklinik IV

Klinikum der Universität

Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

**Immuntherapie des hepatozellulären Karzinoms mit
5'-Triphosphat-modifizierter siRNA**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Igor Lazić

aus Belgrad

2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. M. Schnurr

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Andreas Eigler
Prof. Dr. Florian Löhe

Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter: Dr. Stephanie Schievenbusch, Dr. Lars König,
Dr. Peter Düwell , Prof. Dr. Stefan Endres

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 03.05.2018

Anmerkung zur Zelllinie Hepa1-6 P2

Aufgrund des variablen Anwachsens der murinen Hepatomzelllinie Hepa1-6 in C57BL/6 Mäusen nach subkutaner Injektion wurde ein erfolgreich etablierter subkutaner Tumor explantiert, vereinzelt und erneut *in vitro* kultiviert. Diese Passagierung wurde ein zweites Mal wiederholt und die Zelllinie Hepa1-6 P2 benannt. In den *In-vitro*-Versuchen zeigte sich, dass sich diese Zelllinie bezüglich der Aktivierbarkeit mit RIG-I-Liganden analog zu den ursprünglichen Hepa1-6 Zellen verhält.

Aktuelle Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe stellen jedoch in Frage, ob Hepa1-6 P2 Zellen hepatischer Abstammung sind. Das Genexpressionsprofil von Hepa1-6 P2 unterscheidet sich in wesentlichen Punkten von der ursprünglichen Zelllinie (Fehlen von Albumin- und AFP-Expression). Die exakte Zuordnung des Expressionsprofils ist noch nicht abgeschlossen. Die Ergebnisse der *In-vivo*-Versuche im Rahmen der vorliegenden Arbeit, die mit Hepa1-6 P2 Zellen erfolgten, müssen unter diesem Aspekt betrachtet werden.

Meiner Familie in Dankbarkeit

1	Einleitung	1
1.1	Hepatozelluläres Karzinom: Epidemiologie	1
1.2	Hepatozelluläres Karzinom: Therapie & Prävention	2
1.3	Immuntherapie des hepatozellulären Karzinoms	4
1.4	Genexpressionshemmung in der Tumorthherapie	12
1.5	Dualer Therapieansatz durch 5'-Triphosphat-modifizierte siRNA.....	16
1.6	Zielsetzung der Arbeit	18
2	Material & Methoden	19
2.1	Material	19
2.2	Methoden	26
2.3	<i>In-vivo</i> -Tumormodell.....	33
2.4	Statistische Analysen	37
3	Ergebnisse	38
3.1	RIG-I-Aktivierung durch ppp-RNA in Hepatomazellen.....	38
3.2	Einfluss von RIG-I Aktivierung auf die Vitalität der Hepatomazellen ..	41
3.3	Genexpressionshemmung von c-MET mittels RNAi	42
3.4	Einfluss der RNAi auf die Vitalität der Hepatomazellen.....	44
3.5	Evaluation einer bifunktionellen ppp-siRNA gegen c-MET	44
3.6	Tumorimmuntherapie mit ppp-c-MET im HCC-Mausmodell.....	48
4	Diskussion	53
4.1	Immuntherapie mit bifunktionseller siRNA gegen c-MET im HCC	53
4.2	Funktionalität von RIG-I in Hepatomazellen	54
4.3	Genexpressionshemmung von c-MET in Hepatomazellen.....	56
4.4	Therapeutische Wirkung der ppp-c-MET.....	57
4.5	Zusammenfassende Bewertung und Ausblick	61
5	Zusammenfassung	65
6	Literaturverzeichnis	66
7	Verzeichnis der Abkürzungen	74
8	Verzeichnis der Abbildungen	76
9	Danksagung	77

1 Einleitung

1.1 Hepatozelluläres Karzinom: Epidemiologie

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist der häufigste primäre maligne Lebertumor. Es ist gekennzeichnet durch ein aggressives Wachstum, sowie eine schlechte Prognose (Venook et al. 2010). Weltweit ist es der sechsthäufigste Tumor, wobei Männer mit einem Verhältnis von 2,4:1 öfter betroffen sind als Frauen. Das HCC stellt die zweithäufigste tumorassoziierte Todesursache mit jährlich über eine halbe Millionen Todesfällen dar. Mortalität und Inzidenz stimmen nahezu überein (IACR-GLOBOCAN 2012, Parkin et al 2005). Die Neuerkrankungsrate zeigt dabei eine große geographische Variabilität. Interessanterweise treten 85 % der Erkrankungen in Entwicklungsländern auf. Dahingegen ist die Inzidenz in Deutschland, Kanada und Skandinavien mit weniger als 8 pro 100.000 Personen relativ gering (IACR-LOBOCAN 2012, Parkin et al. 2005, Gomaa et al. 2008).

Weltweit ist zu beobachten, dass das HCC meist auf der Grundlage einer Leberzirrhose entsteht. Erkrankungen, die eine Leberzirrhose begünstigen, stellen somit wesentliche Risikofaktoren für das HCC dar (Fattovich et al. 2004). Man geht davon aus, dass 50 bis 80 % der HCC-Patienten weltweit HBV infiziert sind. Das Hepatitis-C-Virus (HCV) ist ebenso ein Risikofaktor des HCC und ist mit 10 bis 25 % der Fälle assoziiert (Venook et al. 2010). Die viralen Hepatitiden stellen somit den größten – direkten und indirekten – Risikofaktor des HCC dar (Venook et al. 2010, Gomaa et al. 2008, Seeff et al. 2006).

In der westlichen Welt, wo virale Hepatitiden seltener vorkommen, sind weitere Risikofaktoren zu nennen (Simonetti et al. 1991). Insbesondere der exzessive chronische Alkoholabusus stellt hier eine wesentliche Ursache für die Entstehung des HCC dar. Als weitere bedeutende Risikofaktoren in der

westlichen Welt sind Adipositas und Diabetes mellitus zu nennen (Davila et al. 2005). Weitere mögliche Ursache der Hepatokarzinogenese ist das Pilzgift Aflatoxin des Genus *Aspergillus* (Gomaa et al. 2008). Auch bestimmte Stoffwechselerkrankungen können die Entstehung eines HCC begünstigen. Hierzu zählen der Alpha-1-Antitrypsinmangel (Zhou et al. 2000), die hepatische Porphyrrie (Andant et al. 2000) und insbesondere die Hämochromatose (Fargion et al. 1994).

Die Zahl der Neuerkrankten steigt mit zunehmenden Alter stetig (Parkin et al. 2005, Gomaa et al. 2008). In den letzten zwei Jahrzehnten konnte eine steigende Inzidenz in Australien, Zentraleuropa, Großbritannien und Nordamerika verzeichnet werden (Bosch et al. 2004). In den USA hat sich zwischen 1975 und 2005 die Zahl der HCC-Fälle verdreifacht. Die Prävalenz des HCC soll erwartungsgemäß ab 2015 bis 2020 steigen und dann ein Plateau erreichen. Während die bessere Prävention und Behandlung der viralen Hepatitiden deren Auswirkungen als Risikofaktoren verringern, werden voraussichtlich Adipositas und Diabetes mellitus eine stärkere Rolle spielen (Venook et al. 2010). Alleine in Deutschland werden jährlich über 8600 Fälle registriert (Robert-Koch-Institut 2015).

1.2 Hepatozelluläres Karzinom: Therapie & Prävention

Der Tumor ist rasch progredient, oft rezidivierend nach Therapie und die verschiedenen Therapiemöglichkeiten zeigen nur eine moderate Wirksamkeit. Patienten profitieren am meisten von radikalen Eingriffen, wie Lebertransplantation, Leberresektion, sowie perkutanen Interventionen (Bruix et al. 2002). Zurzeit finden die primäre Resektion, Lebertransplantation, Radiofrequenz-Thermoablation (RFA), die transarterielle Chemoembolisation (TACE) und der Multi-Kinase-Inhibitor Sorafenib klinische Anwendung.

Die Mehrzahl der HCC-Fälle werden im fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert, wodurch die Therapieoptionen deutlich eingeschränkt werden

(Bialecki et al. 2005, Llovet et al. 2003). Die primäre Resektion und die Lebertransplantation sind die einzigen Verfahren mit kurativer Aussicht bei einem Fünf-Jahresüberleben von über 70 %. Jedoch ist eine primäre Resektion aufgrund der durchschnittlich späten Diagnosestellung in vielen Fällen nicht mehr möglich. Die Lebertransplantation ist bei steigender Zahl potentieller Organempfänger in ihrer Verfügbarkeit limitiert (DSO 2015). Llovet et. al konnte in einer Phase III Studie zeigen, dass das Überleben von Patienten mit fortgeschrittenem HCC mittels Sorafenib-Therapie im Vergleich zur Placebo-Kontrolle von 8 auf 11 Monate verlängert werden konnte (Llovet et al. 2008). Der Nutzen einer Ziel-gerichteten Therapie ist also eher moderat. Zudem kommt die Therapie bei Patienten mit fortgeschrittener Leberzirrhose nicht mehr in Frage. Es besteht somit für die meisten Patienten keine zufriedenstellende Therapie für das fortgeschrittene HCC. Die engmaschige Beobachtung von Risikopatienten ist die wirksamste Strategie, um zumindest Patienten in einem frühen, prognostisch günstigeren Stadium zu diagnostizieren (Bruix et al. 2002).

Die Prävention und Behandlung der viralen Hepatitiden als wesentliche Risikofaktoren ist unterschiedlich erfolgreich. Die bis vor kurzem erfolgte Therapie des HCV durch pegylierte Interferone und Ribavirin zeigte nur eine geringe Effektivität bei hoher Toxizität. Neuere direkt wirksame Substanzen wurden in den letzten Jahren zugelassen und zeigen vielversprechende Ergebnisse. Jedoch ist zu erwähnen, dass die bisherige Erfahrung mit diesen Medikamenten, insbesondere bezüglich der Verhinderung des Auftretens von HCC, limitiert ist. Welchen Einfluss sie auf das HCC hat, muss zukünftig evaluiert werden (Gonzalez-Grande et al. 2016).

Die systematische Einführung von HBV-Impfungen zeigte dagegen bereits, dass die HCC-Inzidenz regional signifikant reduziert werden konnte. Jedoch treten die Mehrzahl der HCC-Fälle in Entwicklungsländern auf, in denen aus diversen Gründen eine flächendeckende Etablierung solcher Impfprogramme bisher nicht möglich war (Beasley 2009, Chang et al. 1997). Somit besteht trotz der zur Verfügung stehenden Therapieoptionen für das HCC nur ein moderater

Behandlungserfolg. Die Erforschung neuer Behandlungsmethoden ist dringend erforderlich.

1.3 Immuntherapie des hepatozellulären Karzinoms

Da die Leber im Rahmen ihrer Stoffwechsellastungen einem kontinuierlichen Immunstimulus ausgesetzt ist, besitzt sie bereits im physiologischen Zustand Mechanismen, um eine überschießende Immunantwort zu vermeiden. Chronische Infektionszustände verstärken dieses immunsuppressive Milieu, was letztlich zur Entstehung des HCC beiträgt (Protzer et al. 2012). Die genauen Ursachen der Immuntoleranz des HCC sind noch nicht geklärt. Deutlich ist jedoch, dass das HCC eine ausgeprägte Immunsuppression aufweist (Zhang et al. 2010, Ormandy et al. 2005). Aktuelle Studien legen nahe, dass immunmodulatorische Verfahren in der Therapie des HCC aussichtsreich sein könnten (Duffy et al. 2015, Hong et al. 2014, Gao et al. 2014, Sangro et al. 2013, Avella et al. 2012).

1.3.1 Stand der Forschung

Die Verwendung von rekombinantem, humanem Interferon- α (IFN- α) war einer der ersten immuntherapeutischen Ansätze zur Therapie des HCC. Dies ist auf die Erfahrungen in der Behandlung der viralen Hepatitiden zurückzuführen. Mehrere klinische Studien wurden durchgeführt und ergeben eine gemischte Datenlage, wobei für bestimmte HCC-Subpopulationen positive Ergebnisse gezeigt werden konnten (Chen et al. 2012, Llovet et al. 2000). Weitere immuntherapeutische Verfahren, wie zum Beispiel die Tumorimmunisierung oder der adoptive Zelltransfer, wurden im Rahmen verschiedener Studien zum HCC untersucht. Ein tumorspezifisches T-Zell-Epitop, welches in der Tumorimmunisierung des HCC eine Rolle spielt, stellt das α -Fetoprotein (AFP) dar (Bei et al. 2011). So konnte Grimm et al. im Mausmodell darlegen, dass

durch die Immunisierung der Mäuse gegen AFP eine T-Zell-vermittelte Immunantwort zur Tumorregression führt (Grimm et al. 2000). Zwar konnte Hong et al. zuletzt zeigen, dass durch die Optimierung des Epitops diese Immunantwort weiter verstärkt werden kann, jedoch bleibt die T-Zell-vermittelte Reaktion gegen den Tumor schwach (Hong et al. 2014). Eine weitere Verbesserung dieser adaptiven Immunantwort ist Gegenstand aktueller Untersuchungen.

Ein weiteres Verfahren, das zur Immuntherapie des HCC Anwendung findet, ist der adoptive Transfer von Immunzellen. Dabei werden zum Beispiel T-Zellen *ex vivo* so modifiziert, dass sie einen tumorspezifischen, chimären Antigenrezeptor (CAR) exprimieren. Dieses Verfahren zeigt in der Hämatonkologie vielversprechende Ergebnisse und wird bereits in klinischen Studien evaluiert (Maus et al. 2014). Eine chinesische Arbeitsgruppe konnte zuletzt in einem HCC-Mausmodell die Effektivität dieser Methode darstellen. Durch die Gabe von CAR T-Zellen, die gegen das HCC-spezifische Antigen GPC3 gerichtet sind, kam es zu einer erheblichen Reduktion des Tumolvolumens. Trotz der erhofften hohen Tumorspezifität blieb diese relativ gering, sodass die unerwünschten Wirkungen der Therapie eine Limitation dieser Anwendung bleiben (Gao et al. 2014).

Doch auch neuere Verfahren, wie die Blockade von Molekülen, die eine gegen den Tumor gerichtete Immunantwort inhibieren, sogenannte *immune checkpoint inhibitors*, werden in der Therapie des HCC getestet. Die europäische Arzneimittelzulassungsbehörde EMA hat bereits mehrere solcher Inhibitoren, wie zum Beispiel Ipilimumab, Pembrolizumab und Nivolumab, zur Therapie des Melanoms zugelassen. Nivolumab wurde zudem kürzlich auch zur Therapie des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms zugelassen.

Einige dieser Antikörper befinden sich auch zur Behandlung des HCC in klinischen Studien. Tremelimumab ist ein humaner, monoklonaler Antikörper, der die Wirkung von *cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4* (CTLA4)

abschwächt. Sangro et al. konnte in einer Phase II Studie nachweisen, dass die intravenösen Gabe von Tremelimumab bei Patienten mit fortgeschrittenem HCC bei HCV-Infektion und noch gut erhaltener Leberfunktion eine antivirale und antitumorale Wirkung induziert. Über 70 % der Patienten sprachen auf diese Therapie an. Inwiefern dieser Antikörper Einfluss auf Tumorprogression und Gesamtüberleben hat, bleibt Ziel aktueller Untersuchungen (Sangro et al. 2013).

Die bisherige Studienlage zur Immuntherapie des HCC legt nahe, dass die Kombination von immuntherapeutischen mit anderen Verfahren die antitumorale Wirkung potenzieren kann. So konnte zum Beispiel die Arbeitsgruppe um Avella et al. die Effektivität eines chemoimmuntherapeutischen Ansatzes präsentieren. Es konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass der Transfer von Tumorantigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen in Kombination mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Sunitinib zu einer Eradikation des Tumors sowie voller Remission über 12 Monate führte (Avella et al. 2012).

Auch die Kombination von Immuntherapie mit klinisch etablierten Behandlungsmethoden zeigt vielversprechende Ergebnisse. Es konnte bereits gezeigt werden, dass nach TACE und RFA eine tumorgerichtete Immunantwort induziert wird (Nobuoka et al. 2012). Duffy et al. evaluierte in einer Phase I/II Studie die Kombination von Tremelimumab mit TACE oder RFA bei Patienten mit fortgeschrittenem HCC. Dabei konnte eine Infiltration von Immunzellen ins Tumorgewebe dargestellt werden, sowie das klinische Ansprechen dieser Therapie mit einer Verzögerung der Tumorprogression (Duffy et al. 2015). Zusammenfassend lässt sich daher sagen, dass in zahlreichen Studien erfolgsversprechende Strategien präsentiert wurden, um die Immunsuppression des HCC zu überwinden und so zur Tumorkontrolle zu führen. Die Immuntherapie hält also aussichtsreiche Behandlungsmöglichkeiten in der Therapie des Leberkarzinoms bereit.

1.3.2 Immuntherapie mit Liganden von RIG-I *like* Helikasen

Es wurden bereits verschiedene immuntherapeutische Verfahren präsentiert. Eine weitere, wirkungsvolle Methode um das Immunsystem gegen den Tumor zu richten, ist es eine virale Infektion der Tumorzellen nachzuahmen. Das angeborene Immunsystem verfügt über Mechanismen, die pathogene RNA-Viren im Zytosol erkennen und eine antivirale Immunantwort, sowie Apoptose auslösen können. Verantwortlich für diesen Mechanismus sind ubiquitär exprimierte *Retinoic acid-inducible gene 1* (RIG-I) *like helicases* (RLH) (Schmidt et al. 2011). Aktiviert man gezielt diese zytosolischen Immunrezeptoren mit bestimmten RNA-Molekülen in Tumorzellen, wird eine IFN-gesteuerte Immunantwort induziert, die zur Tumorregression führen kann (van den Boorn et al. 2013).

1.3.2.1 Wirkungsweise der RIG-I-like-Helikasen

Neben RIG-I gehört *melanoma differentiation-associated gene 5* (MDA5) zu der Familie der RLH. RLH bestehen aus einer N-terminalen *caspase-recruitment domain* (CARD) gefolgt von einer *helicase domain* und einer C-terminalen *regulatory domain* (**Abbildung 1**). Die CARD-Domäne ist zuständig für die Signalweitergabe und die Beibehaltung eines inaktiven Zustandes während der Abwesenheit von RLH-Liganden. Die *helicase domain* und die *regulatory domain* sind zuständig für die Bindung der RNA, sowie der Bewegung entlang gebundener RNA (Schmidt et al. 2011). Das Protein *laboratory of genetics and physiology 2* (LGP2) gehört ebenso zur Familie der RLH, besitzt jedoch keine CARD-Domäne. Es ist somit nur indirekt an der Signalweitergabe beteiligt, indem es die Aktivität von RIG-I und MDA5 reguliert. Die genaue Wirkungsweise von LGP2 ist bisher nicht abschließend erforscht (Ahmad et al. 2015).

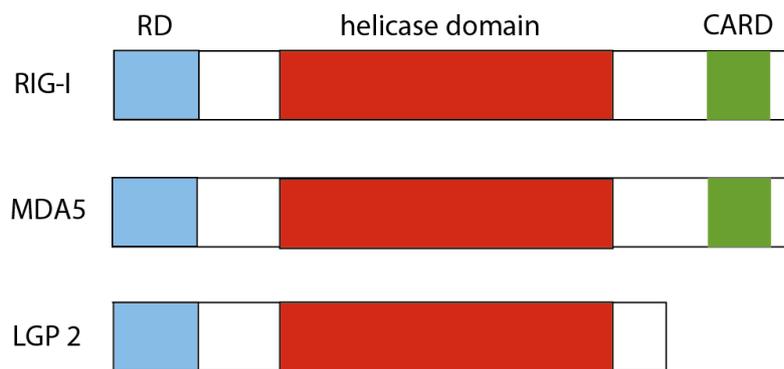


Abbildung 1: Aufbau von RLH-Rezeptoren. RNA-Virus-Infektionen werden über RLH erkannt, die aus den Rezeptoren RIG-I, MDA5 und LGP2 bestehen. Alle RLH besitzen eine *helicase domain* und eine *regulatory domain* (RD). Während RIG-I und MDA5 jeweils eine *caspase recruitment domain* (CARD) besitzen, fehlt diese bei LGP2. Abbildung modifiziert aus (Takeuchi 2012).

Eine doppelsträngige 5'-Triphosphat-modifizierte RNA mit einer Länge von etwa 20 Nukleotiden (ppp-RNA) konnte als RIG-I-Ligand identifiziert werden (Hornung et al. 2006). Ein entsprechender Ligand für MDA5 ist *polyinosinic polycytidylic acid* (poly(I:C)), eine lange synthetische doppelsträngige RNA (Schlee et al. 2009). Neuere Untersuchungen zeigen, dass ebenso eine doppelsträngige 5'-Diphosphat-modifizierte RNA zu einer suffizienten RIG-I-Aktivierung führen kann (Goubau et al. 2014). Wird der entsprechende Ligand erkannt, bindet RIG-I beziehungsweise MDA5 an das Adapterprotein *IFN- β promoter stimulator 1* (IPS-1) (auch bekannt als CARDIF, MAVS oder VISA), welches sich in der äußeren Mitochondrienmembran befindet (Kawai et al. 2005). Diese Interaktion führt zu einer Hochregulation von Transkriptionsfaktoren, wie *IFN regulatory factor 3* (IRF-3), *IFN regulatory factor 7* (IRF-7) und *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells* (NF- κ B) (**Abbildung 2**).

Dies resultiert weiterhin über den *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) Signalweg zur Expression von Typ I IFN, proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen, sowie weiterer IFN-stimulierter Gene (ISG) (Schmidt et al. 2011, Besch et al. 2009). Des Weiteren führt die Aktivierung der RLH über die

Hochregulation proapoptotischer Proteine zur Induktion des intrinsischen Apoptoseweges (Besch et al. 2009). Ferner konnte bereits gezeigt werden, dass die Aktivierung von RLH zur vermehrten Expression von MHC-I und CD95-Molekülen (auch bekannt als Fas) auf der Oberfläche von Tumorzellen führt. Somit werden Tumorzellen empfindlicher gegenüber zytotoxischen T-Zellen, die tumorspezifisch den Zelltod einleiten können. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass dendritische Zellen, die RLH-induzierten apoptotischen Tumorzellen ausgesetzt waren, ausreifen und in der Lage waren, tumorspezifische Antigene zu präsentieren. Somit konnte dargestellt werden, dass RLH-Liganden einen immunogenen Tumorzelltod auslösen können, was letztlich auch zu einer adaptiven Immunantwort führt (Düwell et al. 2014).

Darüber hinaus ergaben jüngste Studien Hinweise darauf, dass RIG-I und MDA5 eine direkte Wirkung auf die virale RNA haben, indem sie mit viralen Proteinen interferieren, wie zum Beispiel Replikationsmodulen oder Kapsiden. Jedoch sind weitere Studien notwendig, um diese Proteine genau zu identifizieren und ein weiteres Verständnis über diesen Mechanismus und dessen Regulation zu erlangen (Ahmad et al. 2015).

1.3.2.2 Tumorummuntherapie mit RLH-Liganden

Tumorzellen sind sensibel für die RLH-gesteuerte Induktion der Apoptose, wohingegen gesundes Gewebe fähig ist, sich durch die Expression antiapoptotischer Proteine wie Bcl-xL vor der Aktivierung des intrinsischen Apoptoseweges zu schützen (Besch et al. 2009).

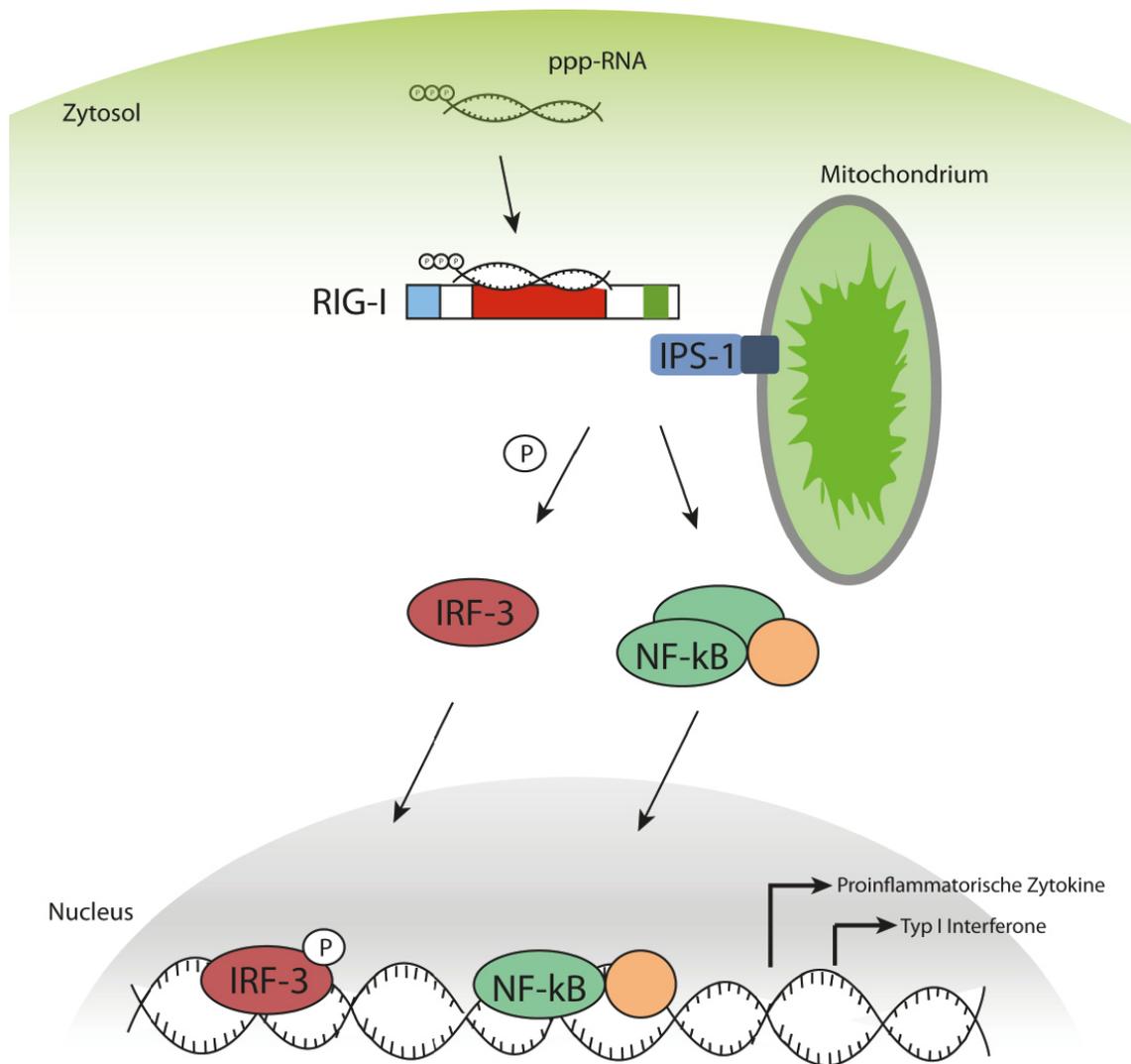


Abbildung 2: RIG-I und MDA5 Signalkaskade. Die ubiquitär exprimierten RNA-Helikasen erkennen virale RNA von sich replizierenden Viren innerhalb des Zytosols. RIG-I und MDA5 besitzen jeweils eine *caspase recruitment domain* (CARD), die nach Erkennung viraler Bestandteile mit Proteinen der äußeren Mitochondrienmembran, genannt IPS-1 (oder auch MAVS, VISA, Cardif), interagieren. In Folge werden intrazelluläre Signalwege initiiert, die zu einer Aktivierung von NF- κ B und zu einer Phosphorylierung und Dimerisierung von IRF-3 führen. Dies führt es zu einer Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Typ I IFN.

Ferner wurde bereits beschrieben, dass mittels RLH das immunsuppressive Milieu eines Tumors umgewandelt werden kann. Durch die Aktivierung von RLH, der Freisetzung von tumorspezifischen Antigenen und deren Präsentation entsteht ein Milieu, das eine tumorgerichtete Immunantwort stimuliert und die Infiltration von T-Zellen und weiteren Effektorzellen anregt. Daraus ergibt sich eine Möglichkeit der Tumorimmuntherapie, die bereits in präklinischen Studien in verschiedenen Tumormodellen für das Melanom, Ovarial- und

Pankreaskarzinom erfolgreich evaluiert wurde (Besch et al. 2009, Kubler et al. 2011, Ellermeier et al. 2013, Duewell et al. 2015). So konnte unsere Arbeitsgruppe im murinen Pankreastumormodell durch die Aktivierung von RLH eine deutliche Tumorregression als auch tumorantigen-spezifische T-Zellen im Tumorgewebe nachweisen. Zudem zeigten sich im Pankreastumormodell, dass erfolgreich therapierte Mäuse resistent gegenüber einer zweiten Tumorinduktion waren (Duewell et al. 2014).

Inwiefern das HCC vulnerabel für solch einen immuntherapeutischen Ansatz ist, ist Gegenstand der derzeitigen Forschung und Ziel dieser Arbeit. Aktuelle Studien legen nahe, dass RIG-I auch im HCC eine therapeutische Zielstruktur sein kann (Hou et al. 2014, Liu et al. 2015). Es konnte bereits einen Zusammenhang zwischen der Expression von RIG-I und der Prognose bestimmter HCC-Patienten dargestellt werden. RIG-I ist in Unterformen des HCC herunter reguliert. Eine geringe Expression von RIG-I korrelierte dabei mit einem geringen Gesamtüberleben (Liu et al. 2015).

Ferner wurde bereits beschrieben, dass RLH durch IFN stimuliert werden. Im Sinne einer positiven Rückkopplung führt die Entstehung von IFN über die RLH-Kaskade zur Hochregulation von RLH, ISG und zur Expression weiterer Typ I IFN (Kang et al. 2004). Dies konnte auch im HCC-Modell bestätigt werden. Eine IFN-Therapie des HCC konnte durch die Aktivierung von RIG-I verstärkt werden. Insbesondere korrelierte die Hochregulation von RIG-I in den Hepatomazellen mit verringerter Fähigkeit zur Invasion und Migration (Hou et al. 2014). Dies legt nahe, dass die RIG-I-Expression und Aktivierung selbst einen antitumoralen Effekt auf das HCC haben kann. Wie genau dabei RIG-I Einfluss auf die Karzinogenese des HCC nimmt und ob der Effekt von im Tumor vorhandenen RIG-I-Liganden abhängt, ist nicht abschließend geklärt (Hou et al. 2014, Liu et al. 2015).

1.4 Genexpressionshemmung mittels RNA-Interferenz in der Tumorthherapie

Kurze nicht-kodierende RNA-Moleküle (20-30 bp) nehmen physiologisch an der Regulation der Genexpression teil, indem sie mit RNA interferieren. So kann in eukaryotischen Zellen der zelluläre Stoffwechsel beeinflusst werden und fremde RNA abgewehrt werden (Jinek et al. 2009). Gelangt doppelsträngige RNA in das Zytosol, so kann diese von der Ribonuklease *Dicer* zu sog. *small interfering RNA* (siRNA) prozessiert werden (Bernstein et al. 2001). Diese siRNA bindet an Proteine der *Argonaute* Familie und bildet somit den *RNA-induced silencing complex* (RISC). Mithilfe dieses Komplexes kann die spezifische Sequenz der siRNA einer komplementären *messenger-RNA* (mRNA) zugeführt werden, was letztlich zum Abbau der mRNA beziehungsweise zur Unterdrückung der Translation kodierter Proteine führt (Hutvagner et al. 2008).

Bisherige Studien zeigen, dass die Blockierung prokanzerogener Signalkaskaden durch RNA-Interferenz (RNAi) erfolgreich zu einer zeitweiligen Hemmung des Tumorwachstums führen kann (Ozcan et al. 2015). RNAi-basierende Therapeutika für das HCC wurden in Studien intensiv untersucht (Xu et al. 2011). Die wesentlichen Zielstrukturen der RNAi im HCC befinden sich in onkogenen Signalwegen und Genen, die eine Rolle bei der Angiogenese und Metastasierung des Tumors spielen oder Genen, die durch das HBV oder HCV exprimiert werden (Xu et al. 2011).

1.4.1 Die Tyrosinrezeptorkinase c-MET

Hepatocyte growth factor (HGF), auch *scatter factor* oder Hepatopoetin A, ist ein multifunktionaler Wachstumsfaktor, dessen entsprechender transmembraner Rezeptor die Tyrosinkinase c-MET ist. Dieser Rezeptor findet

sich hauptsächlich auf Zellen epithelialer Herkunft, wie zum Beispiel der Leber, der Niere, der Prostata, des Pankreas, des Muskels sowie des Knochenmarks (Whittaker et al. 2010). Er wird aber auch auf Endothelzellen, Neuronen, hämatopoetischen Zellen und Melanozyten gefunden (Peruzzi et al. 2006). Der c-MET-Rezeptor ist ein Heterodimer, der nach Aktivierung durch HGF dimerisiert und verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden wie MAPK, NF- κ B, Phosphoinositid-3-Kinasen/AKT (PI3K/AKT) und *signal transducers and activators of transcription* (STAT) aktiviert (Garajova et al. 2015). Diese führen zu Proliferation, Regeneration, Migration, Angiogenese und dem Fortbestand der Zelle.

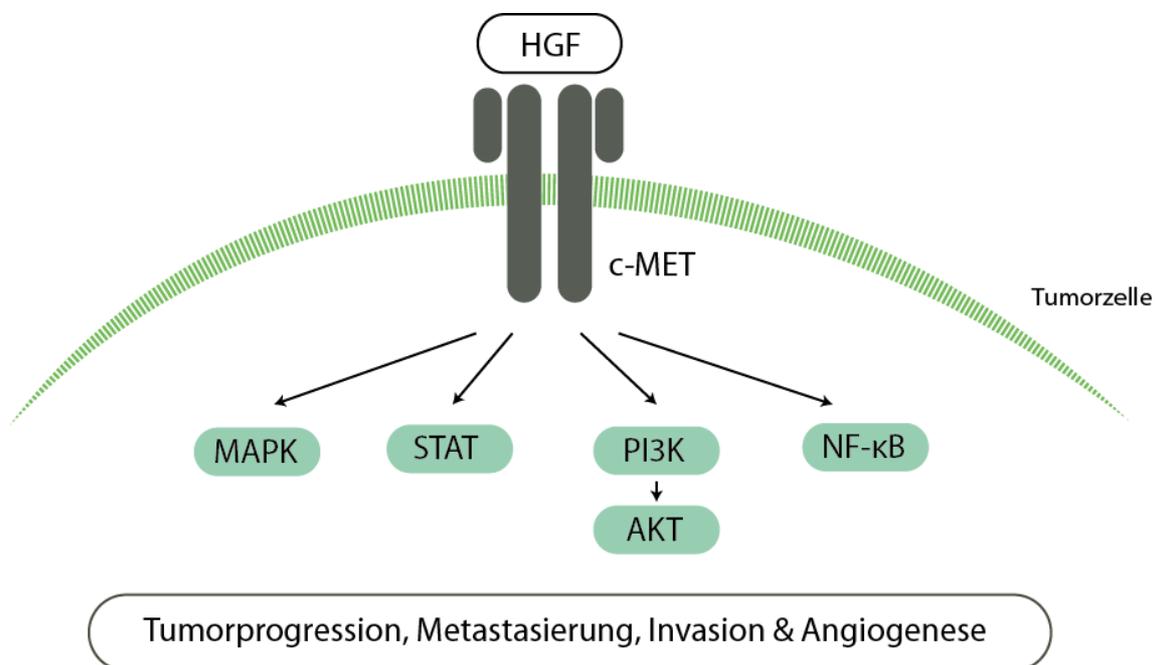


Abbildung 3: c-MET-Signalkaskade in einer Tumorzelle. Eine Mutation der Tyrosinrezeptorkinase c-MET führt zur konstitutiven Dimerisierung und fortlaufender Aktivierung der c-MET-Signalkaskade auch in Abwesenheit des Liganden *Hepatocyte growth factor* (HGF). Dies führt über verschiedene Kaskaden (MAPK, STAT, PI3K/AKT, NF- κ B) zur Tumorprogression, Metastasierung, Invasion und Angiogenese.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine c-MET-Defizienz (*Knockout* des Rezeptors c-MET) zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber Leberschäden führt und darüber hinaus die Leberregeneration verzögert (Nakamura et al. 2011). Andere Signalkaskaden, die zum Beispiel durch *epithelial-growth-factor-receptor*, *insulin-like-growth-factor-1-receptor*, *RAF-kinase* oder *vascular-*

endothelial-growth-factor aktiviert werden, modulieren die c-MET-Signalkaskade, sodass diese als Teil eines heterogenen Signalnetzwerkes gesehen werden kann (**Abbildung 3**) (Blumenschein et al. 2012).

Der genaue Mechanismus der Aktivierung und Interaktion der einzelnen Bestandteile ist bisher nicht endgültig geklärt (Venepalli et al. 2013). Lorenzato et al. konnte des Weiteren nachweisen, dass c-MET-Mutationen weniger in primären Tumoren auftreten als in Metastasen. Dies kann als Indiz gedeutet werden, dass diese Mutation ein Zeichen der fortgeschrittenen Tumordifferenzierung ist (Lorenzato et al. 2002).

Humane HCC weisen in bis zu 48 % eine c-MET-Überexpression auf, wobei bezüglich genauer Zahlen Diskrepanz in der Literatur besteht. Unterschiedliche Testmethoden, kleine Patientengruppen und die verschiedene Ätiologie des HCC führen möglicherweise zu heterogenen Angaben (Ueki et al. 1997, Giordano et al. 2014). Das Vorliegen einer c-MET-Mutation führt dazu, dass der Rezeptor konstitutiv dimerisiert und es auch ohne Agonisten zu einer fortlaufenden Aktivierung der c-MET-Signalkaskade kommt. Die Folge dessen ist Tumorprogression, Metastasierung, Invasion, Angiogenese und erhöhte Zellmotilität (Venepalli et al. 2013). Ferner konnte Karagonlar et al. *in vitro* eine Korrelation zwischen einer Sorafenib-Resistenz und einer erhöhten Aktivität der c-MET-Signalkaskade nachweisen. Die Unterbrechung des c-MET-Signalweges führte zum erneuten Ansprechen auf die Sorafenib-Therapie (Firtina Karagonlar et al. 2016). Es lässt sich zusammenfassen, dass proonkogene Veränderungen in der HGF/c-MET-Signalkaskade in einer Vielzahl solider Tumoren vorgefunden werden und dass diese Alterationen zu einem schlechteren klinischen Bild und geringerem therapeutischen Ansprechen führen (Garajova et al. 2015).

1.4.2 Unterbindung der c-MET-Signalkaskade als Therapie des HCC

Verschiedene Substanzen, die die c-MET-Signalkaskade im Tumor unterbrechen, sind derzeit Gegenstand experimenteller, präklinischer und klinischer Forschung. Diese bestehen aus monoklonalen Antikörper gegen HGF oder c-MET, Tyrosin-Kinase-Inhibitoren, die selektiv auf c-MET wirken und Tyrosin-Kinase-Inhibitoren, die mehrere Zielstrukturen erfassen (Garajova et al. 2015, Goyal et al. 2013).

Drei spezifische c-MET-Tyrosin-Kinase-Inhibitoren wurden in klinischen Phase II-Studien an Patienten mit fortgeschrittenem HCC evaluiert und haben sich als verträglich und sicher gezeigt: Foretinib, Cabozantinib und Tivantinib (Yau TC 2012, Verslype et al. 2012, Santoro et al. 2013). Ein weiterer c-MET-Tyrosin-Kinase-Inhibitor, INC280, befindet sich in einer klinischen Studie bei HCC-Patienten mit dysreguliertem c-MET-Signalweg (NIH 2015). Von den genannten Tyrosin-Kinase-Inhibitoren besitzt man die meiste Erfahrung mit Tivantinib (Goyal et al. 2013).

Santoro et al. konnte in einer präklinischen Studie darlegen, dass die Gabe von Tivantinib bei Patienten mit fortgeschrittenem HCC und einer c-MET-Überexpression zu einer Verbesserung des Gesamtüberlebens und Verlängerung bis zur Tumorprogression führt (Santoro et al. 2013). Dies demonstriert, dass die Unterbindung der c-MET-Signalkaskade eine wesentliche Rolle in der Therapie des HCC spielen kann. Derzeit wird eine klinische Phase III-Studie zur therapeutischen Wirkung von Tivantinib durchgeführt (Abbadessa 2016).

1.5 Dualer Therapieansatz durch 5'-Triphosphat-modifizierte siRNA

Im Laufe der Zeit werden Tumoren oft durch zufällige Mutationen resistent gegenüber Therapieansätzen, die sich auf eine einzige Zielstruktur konzentrieren. Es wurde bereits verdeutlicht, wie die Kombination verschiedener Immuntherapien am HCC zu einer Verstärkung des antitumoralen Effektes führen kann. Hier soll nun ein weiterer kombinierter Therapieansatz vorgestellt werden.

RNAi stellt wie oben beschrieben in der Therapie des HCC eine Möglichkeit dar, um durch spezifische Genexpressionshemmung tumorfördernder Gene die Tumorprogression aufzuhalten. Durch die Triphosphat-Modifikation am 5' Ende solch einer siRNA (ppp-RNA) kann diese zugleich als RIG-I-Ligand dienen und somit RNAi und die RIG-I-vermittelte Aktivierung des Immunsystems verbinden. Die Bifunktionalität einer solchen ppp-siRNA wurde bereits *in vitro* und *in vivo* in verschiedenen Zelllinien und Tumormodellen erfolgreich demonstriert (Ellermeier et al. 2013, Meng et al. 2014, Poeck et al. 2008).

Im murinen Pankreaskarzinommodell konnten diese kombinierten Effekte *in vivo* bestätigt werden. Mäuse, die mit einer ppp-siRNA behandelt wurden, die sowohl gegen TGF- β gerichtet ist als auch RIG-I aktiviert, zeigten im Vergleich zu den jeweiligen Einzeltherapien ein prolongiertes Gesamtüberleben (Ellermeier et al. 2013). Eine andere Strategie, die erfolgreich im Melanom-Modell getestet wurde, war einer Bcl2-spezifische, triphosphatmodifizierte siRNA. Poeck et al. konnte durch die Kombination beider Effekte eine stärkere Tumorregression darstellen als durch die Expressionshemmung des antiapoptotischen Bcl2 oder der RIG-I-Aktivierung alleine (Poeck et al. 2008).

In dieser Arbeit soll eine gegen c-MET gerichtete ppp-siRNA evaluiert werden (ppp-c-MET). Das Einbringen dieser ppp-c-MET in HCC-Zellen soll einerseits

über die 5'-Triphosphatmodifikation den RIG-I-Signalweg aktivieren und andererseits die Translation von c-MET unterdrücken (**Abbildung 4**). Darzustellen in welcher Art und Weise die Verbindung dieser beiden Funktionen in einer ppp-siRNA antitumorale Effekte beim HCC induzieren kann, ist Ziel dieser Arbeit.

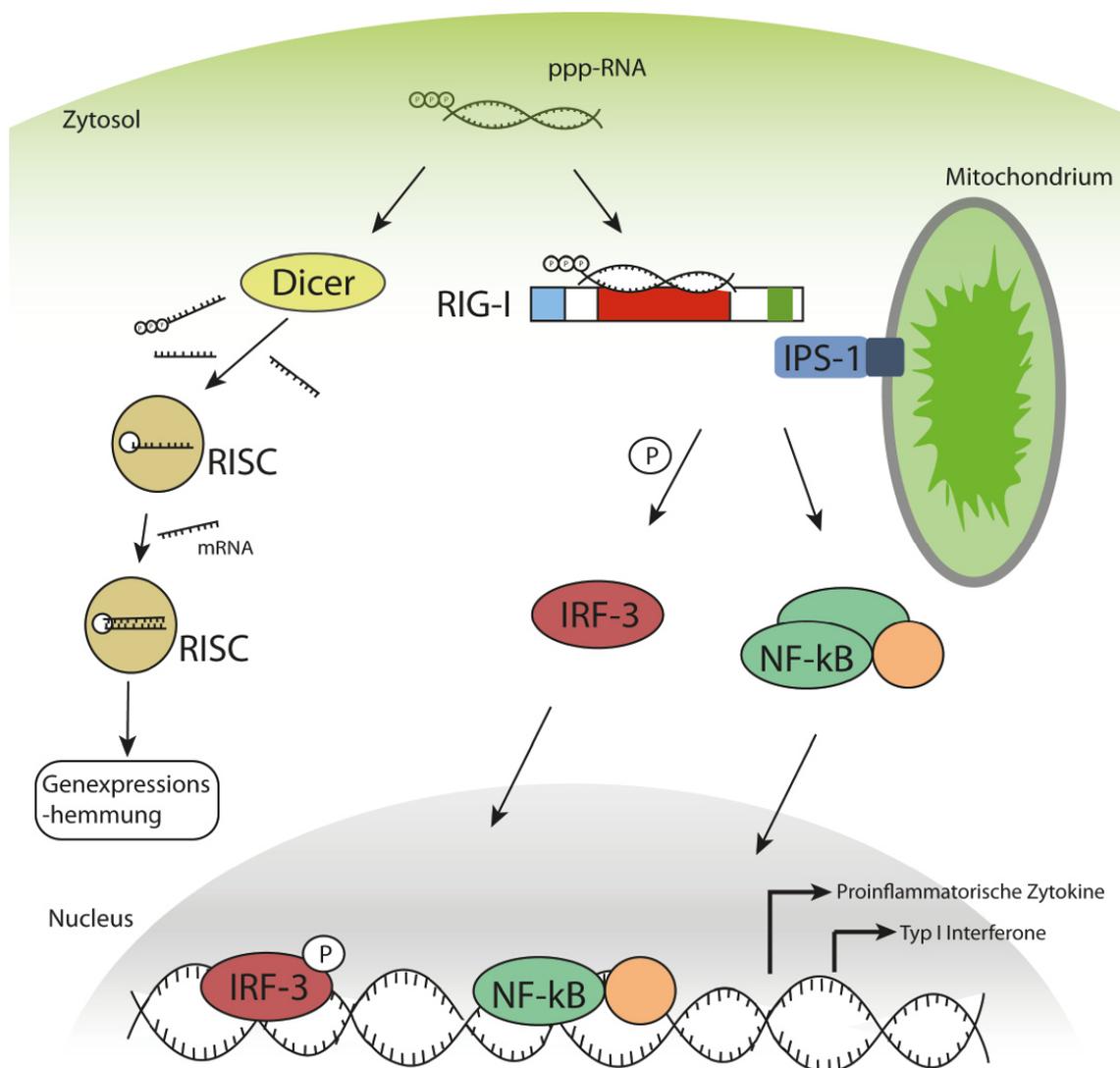


Abbildung 4: 5'-Triphosphat-modifizierte siRNA und zelluläre Wirkungsweise. Es werden zwei mögliche Prozessierungen einer bifunktionellen ppp-siRNA illustriert. Rechts ist dargestellt, wie durch die 5'-Triphosphatmodifikation die ppp-siRNA von RIG-I erkannt wird und folglich intrazelluläre Signalwege initiiert werden, die via NF- κ B und Phosphorylierung von IRF-3 zu einer Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Typ I IFN führen. Links in der Abbildung ist dargestellt, wie die siRNA von Dicer prozessiert wird und mithilfe von RISC eine Degradierung der komplementären mRNA letztlich zur Genexpressionshemmung führt.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit soll die Wirkungsweise einer selbstgenerierten bifunktionellen ppp-siRNA gegen c-MET (ppp-c-MET) in der Behandlung des HCC *in vitro*, sowie *in vivo* im murinen, orthotopen Leberkarzinommodell evaluiert werden. Dabei soll Folgendes untersucht werden:

- Funktionalität von RIG-I in murinen HCC-Zelllinien
- Einfluss von RIG-I-Liganden auf die Vitalität der HCC-Zellen
- Genexpressionshemmung von c-MET mittels RNAi
- Generierung einer bifunktionellen ppp-siRNA gegen c-MET (ppp-c-MET)
- Evaluierung der ppp-c-MET *in vitro* und *in vivo* im HCC-Mausmodell

2 Material & Methoden

2.1 Material

2.1.1 Technische Ausstattung

BD FACS Canto II	BD Biosciences, USA
Blotting System	Bio-Rad, Deutschland
CO ₂ -Inkubator für Zellkultur (BD 6220)	Heraeus, Deutschland
Eismaschine	Ziegra, Deutschland
ELISA reader (Mithras LB940)	Berthold Technologies, Deutschland
FACSCanto II	BD Bioscience, Deutschland
Gel-Elektrophorese-System	peqLab, Deutschland
Inverses Lichtmikroskop	Zeiss, Deutschland
Kühlgeräte(4°C, -20°C)	Bosch, Deutschland Liebherr, Deutschland
Laminar Flow für Zellkultur	Heraeus, Deutschland
LightCycler® 480 Real-Time PCR System	Roche, Deutschland
Mikroskop Axiovert25 and Axiovert200M	Zeiss, Deutschland
Mikroskop TCS SP5 II	Leica, Deutschland
Mithras LB940 Plattenlesegerät	Berthold Technologies, Deutschland
Multifuge 3L-R	Heraeus, Deutschland
NanoDrop® 2000c	ThermoScientific, Deutschland
Neubauer-Zählkammer Optik	Labor Frischknecht, Deutschland
Nitrozellulosemembran	GE Healthcare, UK
Amersham TM -Hybond TM -ECL	
Photometer: Ultrospec 3000 pro	Pharmacia Biotech, USA
Rotator RM5	Karl Hecht AG, Deutschland
Schüttler	NeoLab, Deutschland
Tiefkühlschränke (-80°C)	Thermo Scientific, USA
Thermocycler T3	Biometra, Deutschland
Thermomixer	Eppendorf, Deutschland
Vortex VF2	Janke & Kunkel, Deutschland

Vortex Genie 2	Bender & Hobein AG, CH
Waage (LP 6209)	Sartorius, Deutschland
Waage (SBC 21)	Scaltec Instruments, Deutschland
Wasserbad	Köttermann, Deutschland
Wasser-Deionisierungsmaschine SG	Reinstwasser-Systeme, Deutschland
Western Blot Analyzer LAS4000 mini	GE Healthcare, Deutschland
Zentrifuge 5424	Eppendorf, Deutschland
Zellkultur Lamina Flow	Thermo Scientific, Deutschland
Zentrifuge (Multifuge 3L-R)	Thermo Scientific, Deutschland
Zentrifuge (5424 and 5415R)	Eppendorf, Deutschland
Skalpel (No.22)	Feather, Japan
Nahtfaden (Prolene 5-0)	Ethicon, USA

2.1.2 Chemikalien, Reagenzien und Puffer

Aqua ad injectabilia	Braun Melsungen AG, Deutschland
Ammoniumacetat	Life Technologies, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma Aldrich, Deutschland
Chloroform	Roth, Deutschland
Kollagenfolie	Resorba, Deutschland
DAPI Nuclear Counterstain	ThermoScientific, USA
Dimethylsulfoxide (DMSO)	Sigma Aldrich, Deutschland
DC Protein Assay (Bradford)	Bio-Rad, Deutschland
Dorbene	Pfizer, USA
<i>Phosphate-buffered saline</i> (PBS) (1x)	Lonza, Belgien
Elisa Substrat Reagent A/B	BD Pharmingen, USA
Erylyse	
Ethanol	Merck KGaA, Deutschland
Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Deutschland
FACSFlow, FACSSafe	Becton Dickinson, Deutschland
Flumazenil	Inresa, Deutschland
Interferon- γ (IFN- γ)	Immunotools, Deutschland
Interferon- β (IFN β)	Immunotools, Deutschland
<i>In vivo</i> -JetPEI TM	Polyplus transfection, USA

Isofluran (Forene®)	Abbott, Schweiz
Isopropanol (70 Vol %)	Apotheke Innenstadt, LMU München
KAPA PROBE FAST Universal qPCR Master Mix	peqlab, Deutschland
Katalase	Sigma-Aldrich, Deutschland
Lipofectamine™RNAiMAX	Invitrogen, Deutschland
Methanol	Merck, Deutschland
Milchpulver	Roth, Deutschland
Midazolam	Ratiopharm, Deutschland
Nalaxon	Inresa, Deutschland
Natriumazetat	Sigma-Aldrich, Deutschland
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific, USA
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol	Sigma-Aldrich, Deutschland
Primer Probe Mix (10x)	Roche, Deutschland
Propidium-Iodid	PharMingen, USA
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄ , 2N)	Apotheke Innenstadt, LMU München
Temgesic (Buprenorphin)	RB Pharmaceuticals, UK
TMB Substrate Reagent Set	Becton Dickinson, Deutschland
Trypan-Blau	Sigma Aldrich, Deutschland
Trypsin-EDTA (10x)	PAA, Österreich
Turbo-DNAse	life-technologies, Deutschland
Tween® 20	Roth, Karlsruhe, Deutschland
2-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH, Deutschland
VECTASHIELD® Mounting Medium	Vector Laboratories, USA
Zelllysispuffer (10x)	Cell Signaling Technology, USA

2.1.2.1 PufferWestern Blot-Puffer*Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan* (TRIS)*Sodium dodecyl sulfate* (SDS)Separations-Puffer (4x, pH 8.8)

1.5 M Tris

14 mM SDS

in 1 l ultrareinem Wasser

Lauf-Puffer (10x)

248 mM Tris

1.92 M Glycin

35 mM SDS

in 1l ultrareinem Wasser

Transfer-Puffer (20x)

198 mM Tris

2 M Glycin

in 1 l ultrareinem Wasser

Transfer-Puffer (1x)

20 x Stock

10 % MeOH

in 1 l ultrareinem Wasser

Puffer zum Blocken

5 % BSA in TBST

Waschpuffer (TBST)

165,9 mM Tris-HCl

44,5 mM Tris

1,5 M NaCl

0,5 % Tween 20

FACS-Puffer

2 mM EDTA

2 % FBS

0,1 % NaN₃ in PBS**2.1.3 Zellkulturmaterialien und –medien**

β-Mercaptoethanol

Roth, Deutschland

Bepanthen®-Salbe

Bayer Vital GmbH, Deutschland

Bovines Serum-Albumin (BSA)

Gibco BRL, GB

Dulbecco's modified Eagle's medium
(DMEM), high glucose

Lonza, Belgien

Dulbecco's PBS (1x)	Lonza, Belgien
Eppendorfggefäße /Safe-Lock Tubes	Eppendorf, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	Life Technologies, Deutschland
GENTA-FOIL resorb®	RESORBA Medical GmbH, Deutschland
Laborhandschuhe	Sempermed, Österreich
L-Glutamin (200 mM)	PAA, Österreich
Minimum-essential-medium- non-essential amino acids (MEM-NEAA)	Life Technologies, Deutschland
Natriumpyruvat	Biochrome, Deutschland
PCR-Tubes	Biozym, Deutschland
Penicilline/Streptomycin (100 x)	PAA, Österreich
Pipettenspitzen	Sarsted, Deutschland Eppendorf, Deutschland Gilson, USA
Polystyrene roundbottom Tubes	Dickinson, CA, USA
Opti-MEM®	Life Technologies, Deutschland
Zellkulturflaschen 175 cm ³ / 75 cm ³	Greiner, Deutschland
Zellkulturplatten: 96- / 12- / 24- / 48- Well-Flachboden	Becton Dickinson, CA, USA
96-Well-Rundboden	Greiner, Deutschland
96-Well-ELISA-Platten	Costar, USA

Weitere Plastikmaterialien für die Zellkultur wurden von den Firmen Becton Dickinson (Le Pont de Claix, F), BibbySterilin (Stone, Staffordshire, GB), Falcon (Heidelberg, D) und Greiner (Frickenhausen, D) bezogen.

2.1.4 Nukleinsäuren

2.1.4.1 Ribonukleinsäuren

siRNA	Sequenz (5' zu 3')	Unternehmen
OH-c-MET	GUG CUG UGA AAU CCU UAA ACU CHA GUU UAA GGA UUU CAC AHC AC (44)	Eurofins MWG Operon, Deutschland
OH-RNA	GCG CUA UCC AGC UUA CGU A (dTdT) (19)	Eurofins MWG Operon, Deutschland

2.1.4.2 Desoxyribonukleinsäuren

DNA-Template	Sequenz (5' zu 3')	Unternehmen
ppp-c-MET	GTC CTG TGA AAT CCT TAA ACT CGA GTT TAA GGA TTT CAC AGC ACT ATA GTG AGT CGT A (58)	Eurofins MWG Operon, Deutschland
ppp-RNA	TAC GTA AGC TGG ATA GCG CTA TAG TGA GTC G (31)	Eurofins MWG Operon, Deutschland

DNA-Templates zur *In-vitro*-Transkription der Triphosphat-modifizierten RNAs.

2.1.4.3 Primer zur qRT-PCR

Gen	Spezies	Sequenz ('5 nach 3')
β-Actin	murin	F: CTA AGG CCA ACCC GTG AAA AG
		R: ACC AGA GGC ATA CAG GGA CA
c-MET	murin	F: GCT CTG GAG GAC AAG ACC AC
		R: TTC TGC TAC ACC GTC AGC TTT
RIG-I	murin	F: CAC AGT GTC AAT GCC TCC AA
		R: TTG CTG ACC CAG AAG ATG G
MDA5	murin	F: CAC CTG CAA TTC CAA AAT CTT A
		R: CTA TTA ACC GTG TTC AAA ACA TGA A
INF-β	murin	F: ACT GCC TTT GCC ATC CAA
		R: CCC AGT GCT GGA GAA ATT GT

Die Primer sind für beide Stränge angegeben (F=forward, R=reverse).

2.1.5 Kits

Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad, Deutschland
CellTiter-Blue® Cell Viability Assay	Promega, Deutschland
CXCL10 ELISA Kit, murin	R&D Systems, UK
Cell Trace™ CFSE Cell Proliferation Kit	Life Technologies, Deutschland
HiScribe™ T7 <i>In-Vitro</i> -Transcription Kit	New England Biolabs GmbH
<i>In Situ</i> Cell Death Detection Kit	Roche Diagnostics, Deutschland
LC 480 Probes Master qRT-PCR Kit	Roche Diagnostics, Deutschland
peqGOLD Total RNA Kit	peqlab, Deutschland
Protoscript First Strand DNA Synthesis Kit	New England Biolabs, Deutschland
RevertAid™ First strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Scientific, USA

2.1.6 Antikörper

2.1.6.1 Primäre und sekundäre Antikörper für das Western Blotting

Spezifität	Spezies	Molekulargewicht	Unternehmen
β-Actin	Kaninchen	45 kDa	Cell Signaling
Anti-rabbit IgG-HRP	Ziege	-	Santa Cruz
c-MET	Kaninchen	145 kDa (β-Subunit)	Santa Cruz
p-IRF-3	Kaninchen	45-55 kDa	Cell Signaling

2.1.6.2 Antikörper und Reagenzien zur Durchflusszytometrie

Spezifität	Fluorochrom	Spezies/Isotyp	Klon	Konzentration	Unternehmen
Annexin V	FITC	rekombinant Huhn	-	1:33	Immunotools
MHC-I	APC	mouse/IgG _{2a}	AF6-88.5	1:200	BioLegend
Propidium Iodid		-	-	-	PharMingen
CD95	FITC	Hamster IgG ₂	Jo2	1:200	BDPharmingen

APC: Allophycocyanine; FITC: Fluorescein-5-isocyanate; PE: Phycoerythrin; PerCP: Peridinin-chlorophyll-protein complex.

2.1.7 Software

Adobe Photoshop CS4	Adobe Systems, USA
Adobe Illustrator CS4	Adobe Systems, USA
EndNote X4	Thomson Reuters, USA
FACSDiva	BD Bioscience, Deutschland
FlowJo 7.6.5	ree Star, USA
Graphpad Prism 5.0	Graphpad Software, USA
GSA Image Analyser	GSA Gesellschaft für Softwareentwicklung und Analytik mbH, Deutschland
LAS AF V2.2.1	Leica, Deutschland
Lightcycler 480 SW 1.5	Roche, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden & Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien wachsen als Einzelschicht und sind adhärent. Sie wurden in 175 ml beziehungsweise 75 ml Kulturflaschen gehalten und in Vollmedium (DMEM High Glucose Medium mit 10 % FCS, 1 %, 100 U/l Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin und 1 % 2 mM L-Glutamin) kultiviert. Mittels Trypsin-EDTA wurden die Zellen abgelöst und in einer Neubauer Zählkammer nach einer Trypan-Blau-Ausschlussfärbung gezählt.

2.2.1.1 Hepa1-6 Tumorzellen

Diese murine Tumorzelllinie ist ein Derivat des BW7756 Hepatoms, das in einer C57L Maus entstanden ist. Es wurde beschrieben, dass die Zellen bestimmte leberspezifische Substrate sezernieren können (zum Beispiel Albumin, Alpha1-Antitrypsin, Alphafetoprotein, Amylase). Die Verdopplungszeit beträgt ungefähr 30 Stunden. Diese Zelllinie wurde vom Leibniz-Institut, der Deutschen

Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, in Braunschweig erworben.

2.2.1.2 Hepa1-6 P2 Tumorzellen

Aufgrund des variablen Anwachsens der Hepatomzelllinie Hepa1-6 in C57BL/6 Mäusen nach subkutaner Injektion wurde ein erfolgreich etablierter subkutaner Tumor explantiert, vereinzelt und erneut *in vitro* kultiviert. Diese *In-vivo*-Passagierung wurde ein zweites Mal wiederholt und die Zelllinie Hepa1-6 P2 benannt. In den *in vitro* Versuchen zeigte sich, dass sich diese Zelllinie bezüglich der Aktivierbarkeit mit RIG-I Liganden analog zu den ursprünglichen Hepa1-6 Zellen verhält. Aktuelle Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe stellen jedoch in Frage, ob Hepa1-6 P2 Zellen hepatischer Abstammung sind. Das Genexpressionsprofil von Hepa1-6 P2 unterscheidet sich in wesentlichen Punkten von der ursprünglichen Zelllinie (Fehlen von Albumin- und AFP-Expression). Die exakte Zuordnung des Expressionsprofils ist noch nicht abgeschlossen. Die Ergebnisse der *in vivo* Versuche im Rahmen der vorliegenden Arbeit, die mit Hepa1-6 P2 Zellen erfolgten, müssen unter diesem Aspekt betrachtet werden (siehe Anmerkung auf S. III).

2.2.1.3 Aussaat der Tumorzellen

Für die Transfektion beziehungsweise Stimulation der entsprechenden Zellen wurden diese auf verschieden großen Kulturplatten ausgesät. 12 bis 24 Stunden wurde gewartet, sodass die Zellen die Möglichkeit hatten adhärent zu werden. Bei einer Konfluenz von 30 bis 50 % wurden die Zellen transfiziert. Die entsprechenden Zellzahlen der einzelnen Tumorzelllinien pro Well sind der folgenden Tabelle zu entnehmen.

Hepa 1-6 (P2)	Zellzahl
6-well	200.000
12-well	100.000
24-well	20.000 bis 30.000
96-well	2.500

2.2.1.4 Transfektion der Tumorzellen

Mit Hilfe des Transfektionsreagenzes Lipofectamine®RNAiMAX (Lipofectamine) wurde die entsprechende RNA transfiziert. Durch Kreuztitration ergab sich ein Verhältnis von 2,5 µl Lipofectamine pro 500 ng RNA als empfehlenswert. Die Transfektion erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers (Invitrogen, Deutschland).

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 RNA Isolation

Die RNA Isolation aus den Zelllinien wurde mittels des *peqGOLD Total RNA Isolation kit* (PEQLAB, Deutschland) gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Letztlich wurde die an einer Isolationssäule gebundene RNA mit 50 µl RNase-freiem Wasser eluiert und die Konzentration photometrisch mithilfe eines Spektrophotometers (Nano Drop®) bestimmt.

2.2.2.2 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese wurde mithilfe des *RevertAID™ First strand cDNA Synthesis kit* (ThermoScientific, USA) entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die für den Umschrieb verwendeten Reagenzien sind der folgenden Tabelle zu entnehmen.

Reagenzien	(Konzentration)	Menge
RNA		2000 ng
oligo(dT) ₁₈ Primer	(0,5 µg/µl)	1 µl
dNTP Mix	(10 mM je Nukleotid)	2 µl
RNase Inhibitor	(20 U/µl)	1 µl
Reverse Transkriptase	(200 U/µl)	1 µl
Reaktionspuffer	(5x)	4 µl
H ₂ O		11 µl

2.2.2.3 Quantitative Real-time-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)

Nach Transfektion des jeweiligen siRNA und Lipofectamine-Gemisches wurde mithilfe der genannten Kits RNA isoliert und cDNA synthetisiert. Mit dem *LC 480 Probes Master qRT-PCR Kit*, sowie entsprechenden Sonden der Firma Roche wurde an einem *Light Cycler® 480 Instrument* (Roche, Deutschland) eine qRT-PCR durchgeführt. Die verwendeten Reagenzien, sowie die Geräteeinstellungen des qPCR-Cyclers sind in den folgenden Tabellen gelistet. Als Detektionsformat wurde „*Mono Color Hydrolysis Probes*“ gewählt. Die Analyse erfolgte mittels der *LightCycler® 480 Software Version 1.5*.

Reagenzien	(Konzentration)	Menge
KAPA PROBE FAST qPCR Master Mix	(2x)	5 µl
Primer Forward	(10 µM)	0,2 µl
Primer Reverse	(10 µM)	0,2 µl
Sonde	(10 µM)	0,1 µl
H ₂ O		2,5 µl
cDNA	(50 ng/µl)	2 µl

Programmbezeichnung	Zyklen	Temperatur [°C]
Inkubation	1	95
Amplifikation	45	60
Kühlung	1	49

Die Primer wurden anhand der *Universal Probes Library* (Roche, Deutschland) ausgewählt und von MWG (MWG Eurofins, Deutschland) synthetisiert. Die relative Expression wurde mittels der $\Delta\Delta Ct$ Methode, normalisiert auf die β -Actin Expression, bestimmt.

2.2.2.4 In-vitro-Transkription

Die 5'-Triphosphatmodifikation der siRNA wurde mittels einer *In-vitro*-Transkription (IVT) mithilfe des *HiScribe™ T7 In-vitro-Transcription Kit* (New England Biolabs GmbH, Deutschland) erstellt. Die Synthese erfolgte gemäß

den Angaben des Herstellers für kurze Templates (50 bis 300 Nukleotide). Die exakten Mengen und Reaktionszeiten werden im Folgenden ausführlich angegeben. Die DNA-Vorlagen wurden nach entsprechenden Leitlinien entworfen und von *Eurofins MWG Operon* synthetisiert. Die verwendeten Sequenzen sind unter 2.1.4.2 aufgeführt. Die Konzentration der RNA wurde photometrisch mithilfe des Nano Drop[®] erfasst. Die erfolgreiche Triphosphatmodifikation wurde abschließend anhand der CXCL10 Sekretion und MHC-I Expression nach Transfektion der entsprechenden ppp-RNA in Tumorzellen auf ihre Funktionalität getestet.

Reagenzien	Menge
DNA Hybridisierungspuffer	10 µl
T7 Promoter Primer	2 µl
Das DNA-Template wurde bis zur äquivalenten Menge des T7 Promoter Primer hinzugegeben.	

Reagenzien	(Konzentration)	Menge
Exo-minus Klenow DNA-Polymerase	(10 U/µl)	2 µl
dNTP Mix	(2,5 mM)	2 µl
Klenow Fill-in Puffer	(10x)	2 µl
Zuzüglich des DNA-Templates mit T7 Promoter Primer.		

Reagenzien	(Konzentration)	Menge
H ₂ O		8 µl
T7 Reaktionspuffer	(10x)	4 µl
HMW Mix	(20x)	2 µl
Ribonukleotidlösung	(20x)	2 µl
RNA-Polymerase		4 µl
Zuzüglich des doppelsträngigen DNA-Templates.		

2.2.3 Methoden funktioneller Analysen

2.2.3.1 Enzym-linked-Immunosorbent-Assay (ELISA)

Zur Quantifizierung des löslichen Proteins CXCL10 im Tumorüberstand oder im Tumorlysat wurde das murine CXCL10 ELISA Kit (R&D Systems, UK) laut Herstellerangaben verwendet. Die Proteinkonzentration wurde photometrisch mithilfe des Spektrophotometers Nano Drop[®] bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt. Die untere Nachweisgrenze lag laut Herstellerangaben bei 2,2 pg/ml für murines CXCL10.

2.2.3.2 Proteingewinnung, SDS-PAGE und Western Blot

Mithilfe von Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot wurden Proteine aus Tumorlysaten nach üblichem Standard der Größe nach aufgetrennt und auf eine Membran transferriert. So konnte die Expression verschiedener Proteine der RLH-Signalkaskade, sowie des Zielgens c-MET, auf Proteinebene dargestellt werden. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels des BCA-Assays (Bio-Rad, Deutschland). Die Detektion der Proteine auf der Nitrozellulosemembran erfolgte mittels des ECL Chemilumineszenzsubstrates in einem Western Blot Analyzer LAS4000 mini (GE Healthcare, Deutschland).

2.2.3.3 Durchflusszytometrie

Mithilfe der Durchflusszytometrie wurde die Expression von Oberflächenproteinen, wie zum Beispiel MHC-I auf Tumorzellen, analysiert. Hierzu wurden die zu untersuchenden Zellen im Falle von adhärenenten *in vitro* Kulturen zuerst mit Trypsin-EDTA abgelöst und mit PBS gewaschen. Die so erhaltenen Einzelzellsuspensionen wurden anschließend mit den entsprechenden, fluoreszenzgelabelten Antikörpern laut Herstellerangabe inkubiert. Die jeweiligen Antikörper sind unter 2.1.6.2 gelistet. Es wurde das Durchflusszytometer BD FACS Canto II (BD Biosciences, USA) mit der

entsprechenden Software BD FACSDiva verwendet. Die Auswertungen wurden über die Software FlowJo Version 7.6.5 vorgenommen.

2.2.3.4 Annexin V-Propidiumjodid Assay

Es wurden mittels Durchflusszytometrie viable Zellen, früh-apoptotische Zellen und nekrotische Zellen differenziert. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen wurden die Tumorzellen auf entsprechenden Wellplatten ausgesät und 24 Stunden später mit den verschiedenen siRNA transfiziert. Nach weiteren 48 Stunden wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA abgelöst und mit PBS gewaschen. Zur Detektion von früh-apoptotischen Zellen wurden die Einzelzellsuspensionen mit FITC-konjugiertem Annexin V Antikörpern (Immunotools, Deutschland) nach Herstellerangabe inkubiert. Zur Differenzierung der nekrotischen Zellen wurden die Zellsuspensionen mit Propidium-Iodid (BD PharMingen, USA) inkubiert. Die jeweiligen Antikörper und Reagenzien sind unter 2.1.6.2 gelistet. Letztlich wurden die Zellen am Durchflusszytometer BD FACS Canto II (BD Biosciences, USA) analysiert. Die Proben wurden als Duplikate angesetzt und neben unbehandelten Zellen wurde ebenfalls eine Kontrolle, die keine Zellen enthält, mitgeführt.

2.2.3.5 Analyse der CD95-Expression

Es wurde die Expression von CD95 auf Tumorzellen nach Transfektion einer Triphosphat-modifizierten siRNA durchflusszytometrisch gemessen. Dafür wurden die Tumorzellen ausgesät und 24 Stunden später mit verschiedenen siRNA transfiziert. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA abgelöst und mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit einem FITC-konjugiertem, CD95-spezifischen Antikörper (BD PharMingen, USA) laut Herstellerangaben inkubiert. Der Antikörper ist unter 2.1.6.2 gelistet. Letztlich wurden die Zellen am Durchflusszytometer BD FACS Canto II (BD Biosciences, USA) analysiert. Die Proben wurden als Duplikate angesetzt und neben unbehandelten Zellen wurde ebenfalls eine Kontrolle, die keine Zellen enthält, mitgeführt.

2.2.3.6 CellTiter-Blue® Cell Viability Assay

Um die Vitalität der Tumorzellen unter unterschiedlichen Bedingungen zu bestimmen, wurde der *CellTiter-Blue® Cell Viability Assay* (Promega, Deutschland) verwendet. Die zu analysierenden Tumorzellen wurden nach Transfektion mit verschiedenen siRNA in einer 96-Wellplatte 48 Stunden inkubiert und anschließend der *CellTiter-Blue® Cell Viability Assay* laut Herstellerangabe umgesetzt. Die Fluoreszenz wurde vier Stunden nach Zugabe der *CellTiter-Blue®* Reagenz bei einer Wellenlänge von 560 / 590 nm ausgelesen. Die Proben wurden als Duplikate angesetzt und neben unbehandelten Zellen wurde ebenfalls eine Kontrolle, die keine Zellen enthält, mitgeführt.

2.3 In-vivo-Tumormodell

2.3.1 Versuchstiere und Haltung

Sechs Wochen alte, weibliche Mäuse vom Stamm C57BL/6 wurden von Janvier (St. Berthevin Cedex, Frankreich) bezogen. Maximal sechs bis acht Mäuse wurden artgerecht in einem Käfig gehalten. Die Versuchstiere wurden vor Versuchsbeginn mindestens eine Woche in der Tierhaltung akklimatisiert. Die Durchführung der Tierversuche wurde von der Regierung von Oberbayern genehmigt (AZ: 55.2-1-54-2532-52-13). Die Versuche wurden gemäß den Bestimmungen des Tierschutzgesetzes durchgeführt.

2.3.2 Injektion der Tumorzellen

Für operative Eingriffe wurden die Mäuse mit 100 µl eines Narkosemix intraperitoneal (i. p.) gespritzt. Das Austrocknen der Augen wurde mittels Bepanthen®-Salbe (Bayer Vital GmbH, Deutschland) verhindert. Nach Überprüfung der richtigen Narkosetiefe wurden Haut und Peritoneum im Längsschnitt eröffnet und der linke Leberlappen hervorgebracht. Zur Injektion

von Tumorzellen der Zelllinie Hepa1-6 P2 wurden diese mit Trypsin-EDTA abgelöst, dreifach mit PBS gewaschen und zu einer Einzelzelllösung prozessiert. Es wurden 5×10^5 Zellen in einem Volumen von 30 μ l PBS orthotop in den linken Leberlappen langsam injiziert, sodass sich subkapsulär ein lokal begrenzter Tumor abzeichnete. Um diesen einzelnen Fokus in der Leber zu erhalten und den Rückfluss von Tumorzellen in den Peritonealraum zu verhindern, wurde die Einstichstelle mit einer resorbierbaren Kollagenfolie (GENTA-FOIL resorb®, RESORBA Medical GmbH) versiegelt.

Nach erfolgter Injektion wurden die Organe repositioniert und das Peritoneum sowie Haut mit Prolene-Faden (Prolene 5-0, Ethicon, USA) wieder verschlossen. Zur abschließenden Antagonisierung der Narkose wurden 100 μ l des entsprechenden Antidots i.p., sowie 100 μ l subkutan (s.c.) injiziert. Die Mäuse wurden bis zum Aufwachen unter einer Rotlichtlampe vor Unterkühlung geschützt und in den folgenden Stunden und Tagen engmaschig überwacht.

Medikament	Konzentration	Menge	Wirkung
Narkosemix			
Midazolam	5 mg/ml	10 mg	Benzodiazepin, Sedation
Temgesic (Buprenorphin)	0,3 mg/ml	0,3 mg	Opioid, Analgesie
Dorbene (Medetomidin)	1 mg/ml	0,2 mg	α_2 adrenerger Agonist, Sedation, Analgesie

Medikament	Konzentration	Menge	Wirkung
Antidot			
Flumazenil	0.1 mg/ml	0.5 mg	Benzodiazepin Rezeptor Antagonist
Naloxon	0.4 mg/ml	1.2 mg	Opioid Antagonist
Antisedan (Atipamezol)	5 mg/ml	2.5 mg	α_2 adrenerger Antagonist

2.3.3 Injektion der siRNA

Die Injektion der entsprechenden siRNA erfolgte über eine Schwanzvene. Jeder Maus wurde pro Injektion eine Menge von 50 µg beziehungsweise 25 µg siRNA komplexiert mit der Transfektionsreagenz *in vivo* jetPEI™ (Peqlab, Deutschland) laut Herstellerangabe injiziert. Die Zusammensetzung ist folgender Tabelle zu entnehmen.

pro 100 µl RNA Ansatz	Pro 100 µl jetPEI™ Ansatz
50 µl Glucose 10 %	50 µl Glucose 10 %
50µg siRNA	8 µl jetPEI™
ad 100 µl H ₂ O steril	ad 42 µl H ₂ O steril

2.3.4 Ablauf der Tierversuche

In allen Versuchen konnten sich die Versuchstiere mindestens eine Woche in der Tierhaltung akklimatisieren. Tag 0 wurde als der Tag der Tumorinjektion deklariert. Nach sieben Tagen wurde das Anwachsen des Tumors kontrolliert. Bei einer durchschnittlichen Tumorgöße von 25 mm³ wurde mit den Versuchen begonnen. Die Tiere wurden in die verschiedenen Behandlungsgruppen randomisiert, sodass die durchschnittliche Tumorgöße in den einzelnen Gruppen übereinstimmte. Als Abbruchkriterien wurden definiert: eine Tumorgöße von mehr 150 mm², Ulcera, ein Gewichtsverlust über 20 %, das Auftreten von Aszites, auffälliges Sozialverhalten, Beeinträchtigung der Mobilität oder verringerte Nahrungs- beziehungsweise Flüssigkeitsaufnahme. Sofern ein Abbruchkriterium auftrat, wurde das Versuchstier unter Isofluranarkose durch zervikale Dislokation getötet.

Die erste Therapie wurde am siebten Tag intravenös über die Schwanzvene injiziert. Eine etwaige zweite Therapie folgte am zehnten Tag. 24 Stunden nach der letzten therapeutischen Injektion wurde der Versuch durch zervikale Dislokation abgebrochen. Die Tumoren wurden explantiert, vermessen und zur weiteren Analyse aufgearbeitet. Die Tumorgöße *in situ* wurde mit einer Schiebelehre und mittels der Formel Tumurlänge in mm mal Tumorbreite in mm

vermessen. Das Volumen des Tumors wurde mit der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Tumolvolumen in mm}^3 = \frac{4}{3} \times \pi \times \text{Tumurlänge} \times \text{Tumorbreite} \times \text{Tumorphöhe in mm.}$$

2.3.5 Histologische Aufarbeitung der Tumoren

Nach operativer Entfernung des Tumors wurde dieser für 24 Stunden in Formalin fixiert. Die Tumoren wurden anschließend nach laborüblicher Entwässerung und Entfettung mittels Xylol und einer Alkoholreihe in einem Paraffinblock eingebettet. Nach Aushärtung des Paraffins wurden mit einem Mikrotom 3-5 µm dünne Serienschnitte angefertigt. Diese wurden bei Raumtemperatur aufbewahrt. Zur Färbung wurde das *In Situ Cell Death Detection Kit* (Roche Diagnostics, Deutschland) laut Herstellerangabe verwendet. Zur Zellkerndarstellung wurden die Schnitte mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid) inkubiert. Die gefärbten Schnitte wurden letztlich mit VECTASHIELD®-Mounting Medium (Vector Laboratories, USA) abgedeckt und mit dem Fluoreszenzmikroskop TCS SP5 II (Leica, Deutschland) untersucht. Fluorescein wurde bei einer Wellenlänge im Bereich von 450 bis 500 nm angeregt und bei einer Wellenlänge von 515 bis 565 nm detektiert. DAPI wurde bei einer Wellenlänge von 340 nm angeregt und bei einer Wellenlänge von 488 nm detektiert.

Zur Analyse der Schnitte wurden diese digital im Format 1024 x 1024 Pixel gespeichert und mithilfe der Bildanalysesoftware *GSA Image Analyser* (GSA Gesellschaft für Softwareentwicklung und Analytik mbH, Deutschland) ausgewertet. Es wurde ein Raster mit der Feldgröße 100 x 100 Pixel über die Schnitte gelegt und manuell ausgezählt. Dabei wurde ein Feld nur als apoptotisch gewertet, sofern mehr als die Hälfte der gezählten Zellen innerhalb der Fläche in der entsprechenden Färbung aufleuchteten.

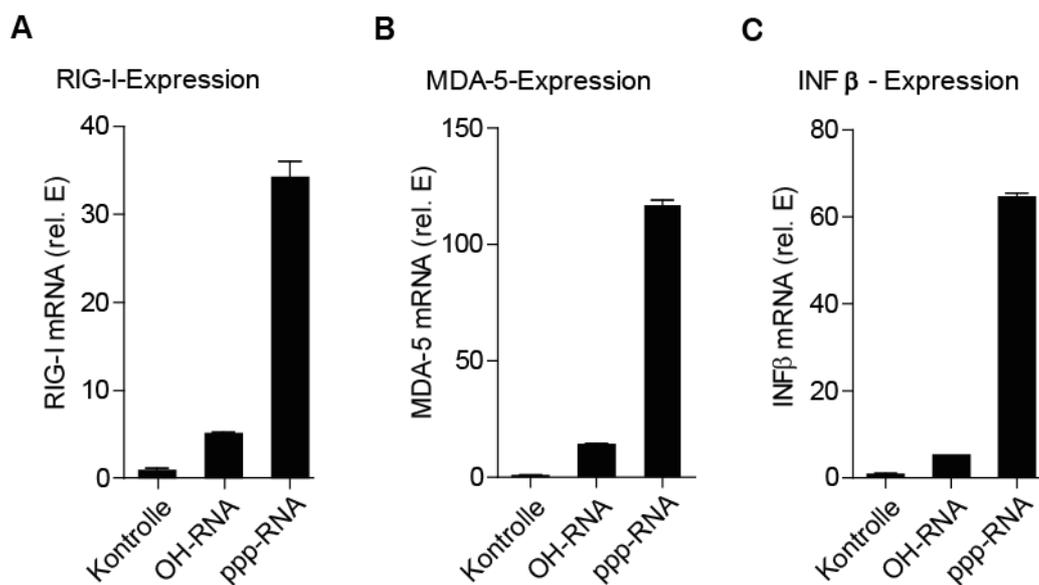
2.4 Statistische Analysen

Die präsentierten Daten zeigen Mittelwerte \pm S.D (*in vitro*). Der S.E.M. wurde bei den *in vivo*-Abbruchversuchen zur Darstellung der Tumorgröße dargestellt. Eine Überprüfung auf Normalverteilung wurde durchgeführt. Als parametrischer Test wurde der Student-t-Test verwendet. Als nicht-parametrischer Test wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Die statistischen Analysen wurden mittels der Software GraphPad Prism 5 ausgeführt. Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als signifikant erachtet.

3 Ergebnisse

3.1 RIG-I-Aktivierung durch ppp-RNA in Hepatomazellen

Zunächst wurde untersucht, ob die murine Hepatomazelllinie Hepa1-6 eine funktionsfähige RIG-I-Signalkaskade besitzt. Die Expression der zytosolischen Helikasen RIG-I und MDA5 in den Hepa1-6 Zellen wurde nach Gabe der ppp-RNA mittels qRT-PCR analysiert. Es zeigte sich nach Transfektion der ppp-RNA eine deutliche Hochregulation der RIG-I mRNA-Expression, wohingegen die Transfektion einer unspezifischen Kontroll-RNA (OH-RNA) zu keiner Hochregulation führte (**Abbildung 5A**). Ebenso war eine Hochregulation der MDA5 mRNA-Expression nach Stimulation mit der ppp-RNA zu beobachten. Dies deutet auf eine Signalschleife hin, in der die Aktivierung von RIG-I zu einer Produktion von Typ I IFN führt, die wiederum die Expression von RLH induziert (**Abbildung 5B**) (Kang et al. 2004). Repräsentativ für die Typ I IFN Produktion zeigte sich nach ppp-RNA Transfektion eine Hochregulation von IFN- β (**Abbildung 5C**).



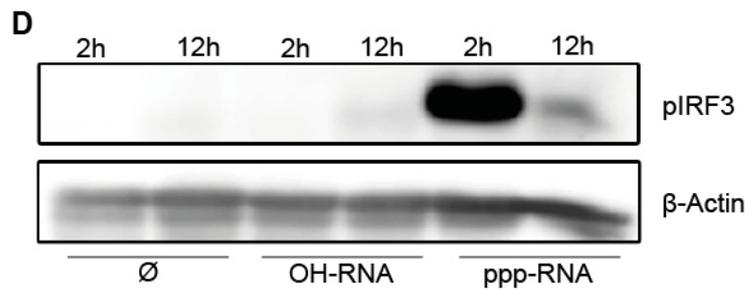


Abbildung 5: RLH-Signalkaskade in Hepa1-6 Zellen nach ppp-RNA Transfektion. A-C: Transkriptionsanalyse mittels qRT-PCR. Hepa1-6 Zellen wurden mit jeweils 500 ng/ml OH-RNA beziehungsweise ppp-RNA transfiziert, nach 18 Stunden die mRNA isoliert und mittels qRT-PCR analysiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. **A:** RIG-I mRNA Expression. **B:** MDA5 mRNA Expression. **C:** INF- β mRNA Expression. Gezeigt sind repräsentative Daten aus drei unabhängigen Versuchen (n=6). Die relative Expression wurde mittels $\Delta\Delta$ Cp Methode berechnet. Als Referenzgen wurde β -Actin herangezogen. **D:** Phosphorylierung von IRF-3 (pIRF3). Hepa1-6 Zellen wurden mit jeweils 1500 ng/ml OH-RNA beziehungsweise ppp-RNA transfiziert und zu verschiedenen Zeitpunkten lysiert. Die Expression von pIRF3 wurde mittels Western Blot analysiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen.

Ferner wurde die Phosphorylierung des Downstream-Elementes IRF-3 (pIRF-3) in der RIG-I-Signalkaskade mittels Western Blot in den Hepa1-6 Zellen nach ppp-RNA Transfektion nachgewiesen. Weder bei den unbehandelten noch bei den Kontroll-RNA behandelten Zellen ließ sich pIRF-3 nachweisen. Nach Stimulation mit ppp-RNA war bereits nach zwei Stunden eine deutliche Phosphorylierung von IRF-3 zu erkennen, welche nach 12 Stunden wieder abnahm (**Abbildung 5D**).

Als nächstes wurden die funktionellen Auswirkungen der RIG-I-Aktivierung in Hepa1-6 Zellen untersucht. Hierzu wurde im Überstand der Tumorzellen nach Transfektion der ppp-RNA das IFN-induzierbare Chemokin CXCL10 mittels ELISA gemessen. Die Transfektion einer Kontroll-RNA hatte keine Auswirkung auf die Konzentration von CXCL10, wohingegen bei ppp-RNA behandelten Tumorzellen eine deutliche Sekretion von CXCL10 festgestellt werden konnte (**Abbildung 6**). Dies lässt auf eine intakte IFN-Synthese der Tumorzellen schließen.

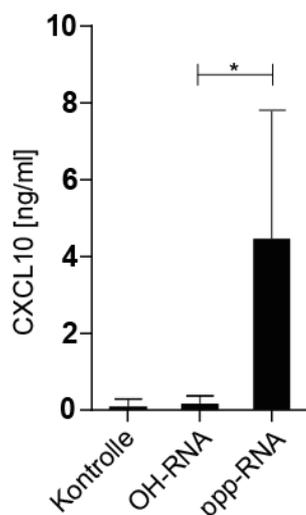


Abbildung 6: CXCL10-Konzentrationen im Überstand von Hepa1-6 Zellen. Zellen wurden mit jeweils 500 ng/ml OH-RNA beziehungsweise ppp-RNA transfiziert. Nach 48 Stunden Inkubation wurde der Überstand abgenommen und mittels ELISA die CXCL10 Konzentration bestimmt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Versuchen (n=6); *p = 0,048.

Es wurde beschrieben, dass die Aktivierung von RIG-I in Tumorzellen zu einer Hochregulation des Todesrezeptors Fas (CD95) führt (Meng et al. 2014). Die Bindung des Fas-Liganden an CD95 führt zur Induktion des extrinsischen Apoptoseweges. Um diesen Effekt der ppp-RNA zu erfassen, wurde die CD95 Expression bei Hepa1-6 Zellen durchflusszytometrisch untersucht. Dabei zeigte sich eine dosisabhängige Induktion der CD95 Expression nach Stimulation mit ppp-RNA. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle exprimierten bis zu 64 % der ppp-RNA behandelten Tumorzellen CD95 auf ihrer Oberfläche (**Abbildung 7A**).

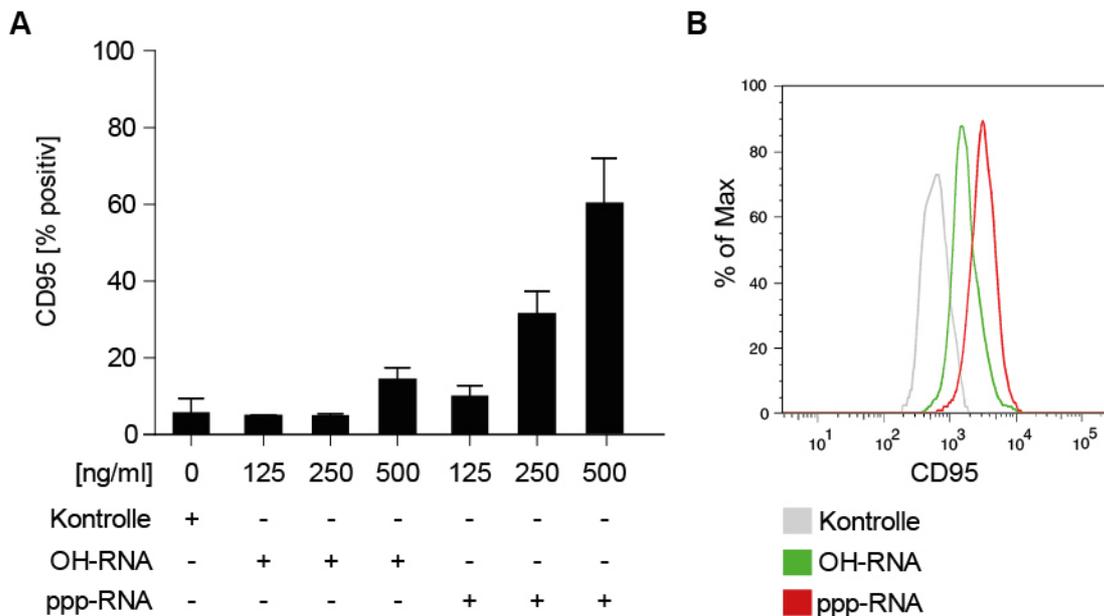


Abbildung 7: CD95-Expression auf Hepa1-6 Zellen nach ppp-RNA Stimulation. Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen OH-RNA beziehungsweise ppp-RNA transfiziert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit einem FITC-konjugierten Antikörper gegen CD95 gefärbt und mittels FACS analysiert. **A:** Fluoreszenzintensität CD95-positiver Hepa1-6 Zellen, die mit OH-RNA beziehungsweise ppp-RNA transfiziert wurden. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus 2 Versuchen ($n=3$). **B:** Histogramm von Hepa1-6 Zellen, die mit 500 ng/ml OH-RNA beziehungsweise ppp-RNA transfiziert wurden.

3.2 Einfluss von RIG-I-Aktivierung auf die Vitalität der Hepatomazellen

Im Folgenden wurde untersucht, wie sich die RIG-I Aktivierung mit ppp-RNA auf die Vitalität der Hepatomazellen auswirkt. Zunächst wurden Hepa1-6 Zellen mit ppp-RNA transfiziert und die Tumorzellzahl mittels *CellTiter-Blue® Cell Viability Assay* untersucht. Dabei zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle (100 % Vitalität) eine deutliche Reduktion der Zellzahl nach Behandlung mit ppp-RNA (**Abbildung 8A:** 87 % bei OH-RNA versus 58 % bei ppp-RNA).

Ferner konnte eine Zelltodauslösung der Hepa1-6 Zellen durch eine durchflusszytometrische Analyse mittels Annexin V-Färbung bestätigt werden. In diesem Assay konnte nach ppp-RNA Behandlung in ca. 30 % der Zellen die Induktion von Apoptose nachgewiesen werden (**Abbildung 8B**). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass Hepa1-6 Zellen sensitiv bezüglich ppp-RNA-induzierter Apoptose sind.

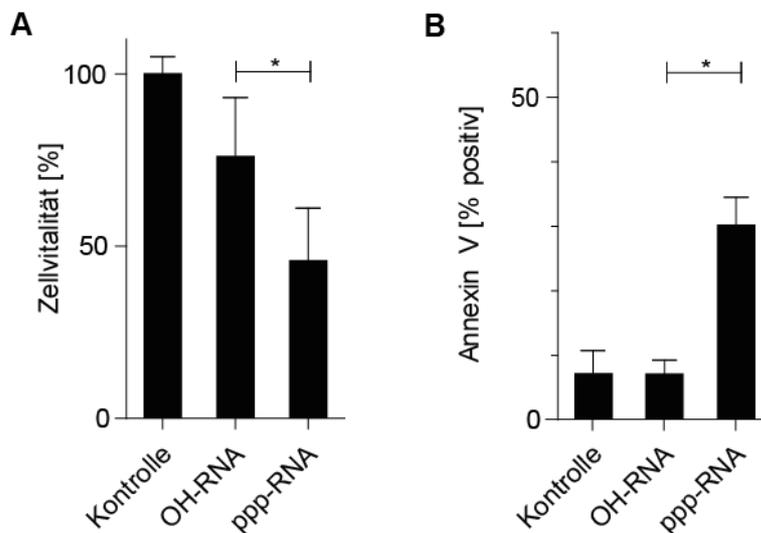


Abbildung 8: Zellvitalität der Hepa1-6 Zellen nach ppp-RNA-Transfektion. Zellen wurden mit OH-RNA oder ppp-RNA transfiziert und 48 Stunden später analysiert. Als Kontrolle dienen unbehandelte Zellen. **A:** *CellTiter-Blue® Cell Viability Assay*. Transfektion der respektiven RNA mit einer Konzentration von 1000 ng/ml. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Versuchen (n=6); *p = 0,087. **B:** Durchflusszytometrischer Apoptose Assay mittels Annexin V Färbung. Transfektion der respektiven RNA mit einer Konzentration von 500 ng/ml. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Versuchen (n=5).

3.3 Genexpressionshemmung von c-MET mittels RNAi

Im Folgenden wurde untersucht, inwiefern eine siRNA gegen c-MET (OH-c-MET), eine Tyrosinkinase, die den Hepatozyten-Wachstumsfaktor (HGF) bindet, in einer Genexpressionshemmung von c-MET in Hepatomzellen resultiert. Hierzu wurden Hepa1-6 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen der siRNA transfiziert und die c-MET-Expression auf mRNA Ebene mittels

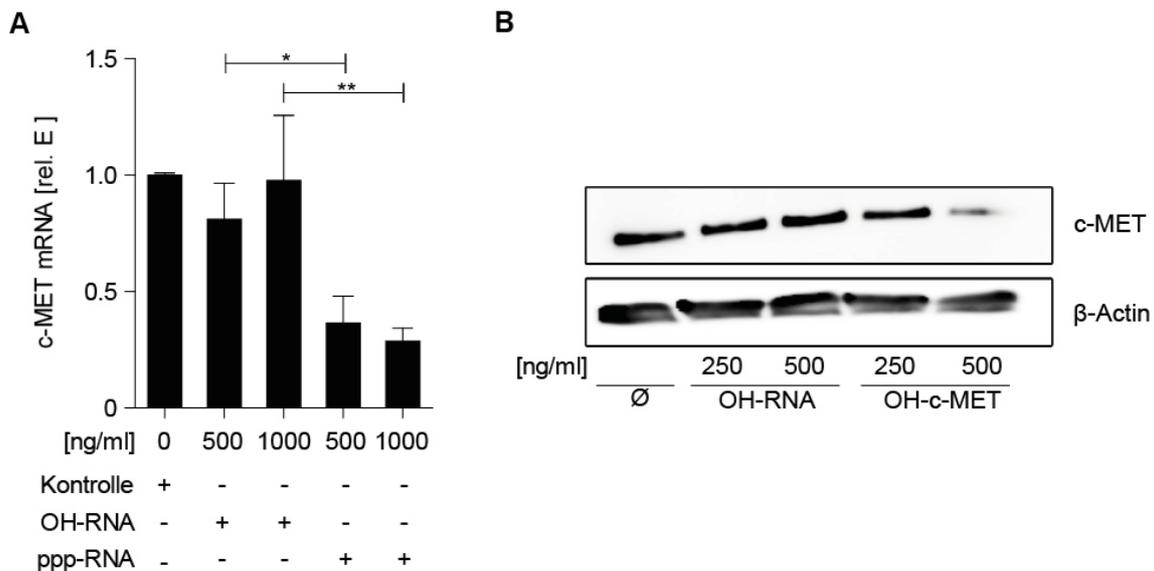


Abbildung 9: Genexpressionshemmung von c-MET mittels siRNA in Hepa1-6 Zellen. A: Relative Expression von c-MET mRNA. Hepa1-6 Zellen wurden mit 500 beziehungsweise 1000 ng/ml Kontroll-RNA (OH-RNA) beziehungsweise siRNA (OH-c-MET) transfiziert und 24 Stunden später die c-MET-Expression mittels qRT-PCR analysiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Die Expression wurde mittels $\Delta\Delta$ Cp Methode berechnet. Als Referenzgen wurde β -Actin herangezogen. Es werden Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Versuchen gezeigt (n=6); *p = 0,001; **p = 0,002. **B:** c-MET-Proteinexpression. Hepa1-6 Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen OH-RNA beziehungsweise OH-c-MET transfiziert und 48 Stunden später die c-MET Expression mittels Western Blot analysiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen.

qRT-PCR analysiert. Wie **Abbildung 9A** zeigt, resultierte eine Dosis von 500 beziehungsweise 1000 ng/ml in einer Reduktion der c-MET mRNA um 54 % beziehungsweise 69 %. Als nächstes wurde die Genexpressionshemmung auf Proteinebene mittels Western-Blot analysiert. Bei einer Konzentration von 1 μ g/ml der siRNA wurde eine deutliche Reduktion der c-MET-Proteinexpression detektiert (**Abbildung 9B**). Diese Ergebnisse zeigen, dass die gewählte siRNA-Sequenz effektiv die c-MET Genexpression hemmen kann.

3.4 Einfluss der c-MET-Inhibition auf die Vitalität der Hepatomazellen

Um funktionelle Effekte der c-MET-Genexpressionshemmung zu untersuchen, wurde die Vitalität von Hepa1-6 Zellen nach Transfektion mit siRNA gegen c-MET mittels des *CellTiter-Blue® Cell Viability Assay* untersucht. Es zeigte sich dabei eine dosisabhängige Reduktion der Zellvitalität. Die Vitalität der Hepa1-6 Zellen war bei einer siRNA-Konzentration von 250 beziehungsweise 1000 ng/ml um 21 % beziehungsweise 46 % reduziert (**Abbildung 10**). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass eine c-MET-Inhibition eine effektive Strategie zur Behandlung des HCC sein kann.

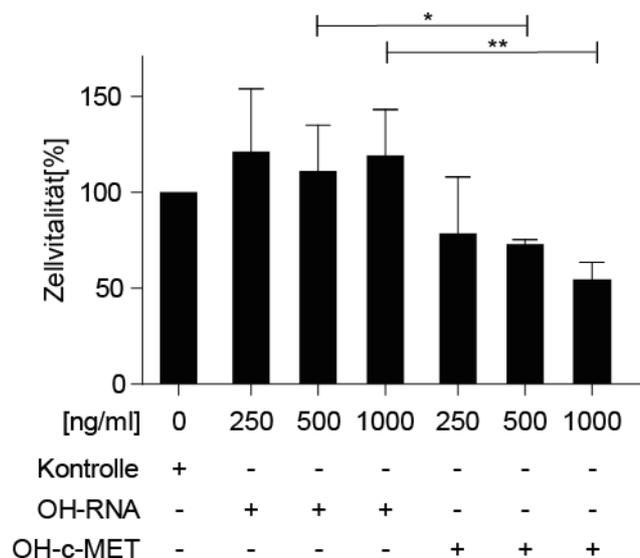


Abbildung 10: Einfluss der c-MET Genexpressionshemmung auf die Zellvitalität von Hepa1-6 Zellen. Hepa1-6 Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen (250, 500, beziehungsweise 1000 ng/ml) einer Kontroll-RNA (OH-RNA) beziehungsweise siRNA (OH-c-MET) transfiziert und nach 48 Stunden die Vitalität mittels *CellTiter-Blue® Cell Viability Assay* analysiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Es werden Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Versuchen gezeigt (n=6); *p = 0,005; **p < 0,0001.

3.5 Evaluation einer bifunktionellen ppp-siRNA gegen c-MET

Die im Rahmen dieser Arbeit generierte 5'-Triphosphat-modifizierte siRNA gegen c-MET (ppp-c-MET) soll zwei Funktionen in einem Molekül vereinen: (1) die

Genexpressionshemmung von c-MET und (2) die Aktivierung von RIG-I. Zunächst war es das Ziel, diese bifunktionelle ppp-siRNA funktionell zu evaluieren.

3.5.1 c-MET Genexpressionshemmung durch ppp-c-MET

Zunächst wurde untersucht ob die 5'-Triphosphatmodifikation der c-MET siRNA-Sequenz die Effizienz der Genexpressionshemmung beeinflusst. Hepa1-6 Zellen wurden mit OH-c-MET oder ppp-c-MET transfiziert und die c-MET mRNA-Expression mittels qRT-PCR gemessen. Dabei zeigte sich, dass die ppp-c-MET zu einer ähnlichen Effizienz der Genexpressionshemmung führt wie die unmodifizierte siRNA (**Abbildung 11**).

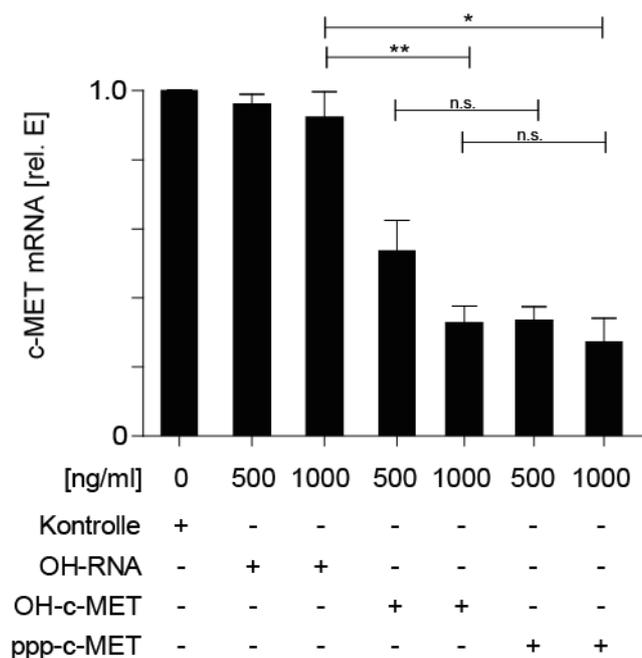


Abbildung 11: Effektivität der c-MET Genexpressionshemmung durch ppp-modifizierte und unmodifizierte siRNA. Hepa1-6 Zellen wurden mit 500 beziehungsweise 1000 ng/ml OH-RNA, OH-c-MET beziehungsweise ppp-c-MET transfiziert und nach 24 Stunden mittels qRT-PCR die relative c-MET mRNA Konzentration analysiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Es werden Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Versuchen gezeigt (n=6); *p = 0,0001; **p < 0,001, n.s. = nicht signifikant.

3.5.2 RIG-I-Aktivierung durch ppp-c-MET

Als nächstes wurde die RIG-I-aktivierende Wirkung der ppp-c-MET evaluiert. Zunächst wurde die Sekretion von CXCL10 von Hepa1-6 Zellen, die mit OH-RNA, ppp-RNA, OH-c-MET beziehungsweise ppp-c-MET transfiziert wurden, untersucht. Dabei konnte bei Tumorzellen, die mit unmodifizierter RNA (OH-RNA, OH-c-MET) transfiziert wurden, kein CXCL10 nachgewiesen werden. Sowohl die ppp-RNA ohne siRNA-Komponente, als auch ppp-c-MET induzierten ähnliche Mengen an CXCL10 (**Abbildung 12A**).

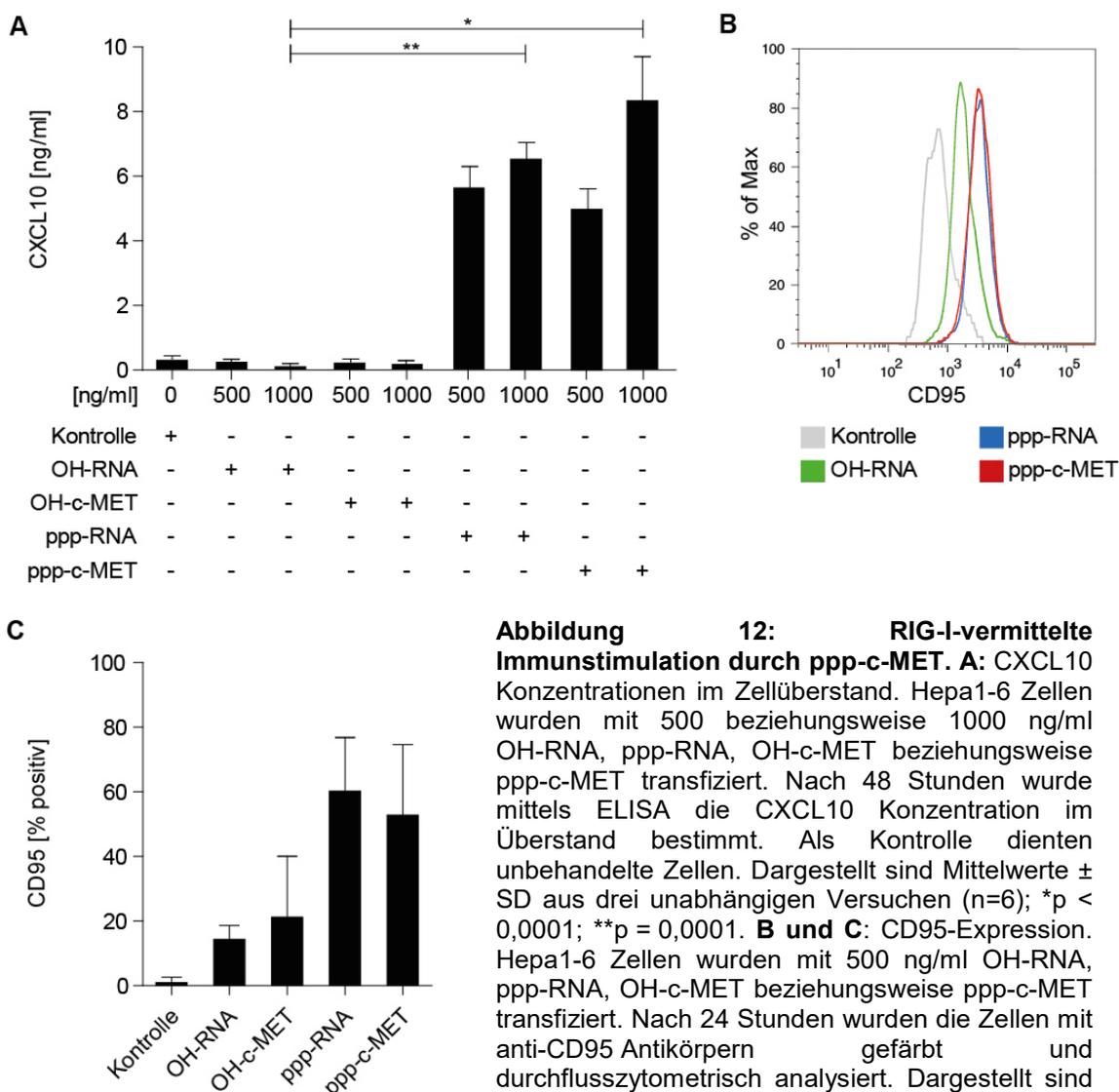


Abbildung 12: RIG-I-vermittelte Immunstimulation durch ppp-c-MET. **A:** CXCL10 Konzentrationen im Zellüberstand. Hepa1-6 Zellen wurden mit 500 beziehungsweise 1000 ng/ml OH-RNA, ppp-RNA, OH-c-MET beziehungsweise ppp-c-MET transfiziert. Nach 48 Stunden wurde mittels ELISA die CXCL10 Konzentration im Überstand bestimmt. Als Kontrolle dienen unbehandelte Zellen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Versuchen (n=6); *p < 0,0001; **p = 0,0001. **B und C:** CD95-Expression. Hepa1-6 Zellen wurden mit 500 ng/ml OH-RNA, ppp-RNA, OH-c-MET beziehungsweise ppp-c-MET transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit anti-CD95 Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind repräsentative Histogramme, beziehungsweise Mittelwerte \pm SD aus 2 Versuchen (n=3).

Zudem wurde die CD95 Expression bei Hepa1-6 Zellen durchflusszytometrisch untersucht. Sowohl ppp-RNA als auch ppp-c-MET führten in ähnlichem Maße zu einer Hochregulation der CD95-Expression (**Abbildung 12B**). Die Transfektion der unmodifizierten siRNA hatte diesbezüglich nur einen geringen Einfluss. Diese Ergebnisse lassen die Annahme zu, dass die bifunktionelle siRNA, ppp-c-MET, zu einer gleichwertigen RIG-I-Aktivierung führt, wie eine ppp-RNA ohne siRNA-Komponente.

3.5.3 Einfluss von ppp-c-MET auf die Vitalität der Hepatomazellen

Es konnte bereits dargestellt werden, dass die RIG-I-Aktivierung mit ppp-RNA als auch die c-MET-Genexpressionshemmung zu Zelltod von Hepa1-6 Zellen führt. Es stellte sich die Frage, ob durch Kombination beider Therapieprinzipien durch die bifunktionelle ppp-c-MET ein additiver Effekt bezüglich Vitalität erzielt werden kann. Hierzu wurden Hepa1-6 Zellen mit OH-RNA, ppp-RNA, OH-c-MET beziehungsweise ppp-c-MET transfiziert und die Vitalität mittels des *CellTiter-Blue® Assays* analysiert. Es zeigte sich durchschnittlich eine Reduktion der Vitalität um 42 % bei ppp-RNA, um 43 % bei OH-c-MET und um 52 % bei ppp-c-MET (**Abbildung 13A**). Diese Unterschiede bei der ppp-c-MET waren jedoch im Vergleich zu den einzelnen Strategien nicht signifikant.

Diese Ergebnisse wurden mit einer zweiten Methode, einer Annexin V-Färbung, durchflusszytometrisch überprüft. Zunächst zeigte sich, dass alle drei therapeutische Ansätze Apoptose induzieren, wobei eine effektive Apoptoseinduktion durch die ppp-c-MET zu erkennen war. Jedoch fand sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen beziehungsweise der kombinierten Therapiestrategie (**Abbildung 13B**).

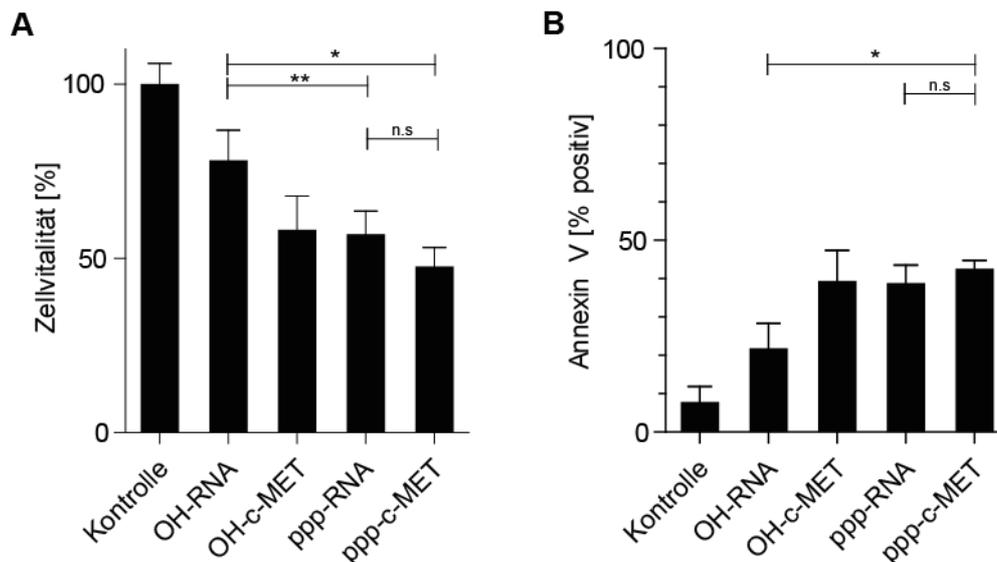


Abbildung 13: Einfluss von ppp-c-Met auf die Zellvitalität und Apoptoseinduktion von Hepa1-6 Zellen. **A:** Zellen wurden mit 1000 ng/ml OH-RNA, ppp-RNA, OH-c-MET beziehungsweise ppp-c-MET transfiziert und nach 48 Stunden anhand mittels *CellTiter-Blue® Cell Viability Assay* analysiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Versuchen (n=6); *p = 0,004; **p = 0,027; n.s. = nicht signifikant. **B:** Zellen wurden mit 500 ng/ml OH-RNA, ppp-RNA, OH-c-MET beziehungsweise ppp-c-MET transfiziert und 48 Stunden später nach Annexin V-Färbung durchflusszytometrisch analysiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Versuchen (n=4), *p = 0,029; n.s. = nicht signifikant.

3.6 Tumorimmuntherapie mit ppp-c-MET im HCC-Mausmodell

Um die therapeutische Effizienz der ppp-c-MET *in vivo* zu untersuchen, wurden C57BL/6-Mäusen subkapsulär in den linken Leberlappen Hepa1-6 (P2) Zellen injiziert. Nach sieben Tagen erfolgte einmalig eine intravenöse Injektion von Kontroll-RNA (OH-RNA), einer siRNA gegen c-MET (OH-c-MET), einer ppp-RNA beziehungsweise der bifunktionellen ppp-c-MET. 24 Stunden nach der Injektion erfolgte der Versuchsabbruch zur *ex vivo* Analyse der Tumore (**Abbildung 14**). Zunächst stellte sich die Tumorgöße nach Injektion von OH-c-MET, ppp-RNA, sowie ppp-c-MET im Vergleich zur OH-RNA deutlich reduziert dar. Die Reduktion des Tumolvolumens war nach Behandlung mit ppp-c-MET am ausgeprägtesten, wobei der Unterschied im Vergleich zu einer unmodifizierten ppp-RNA nicht signifikant war.

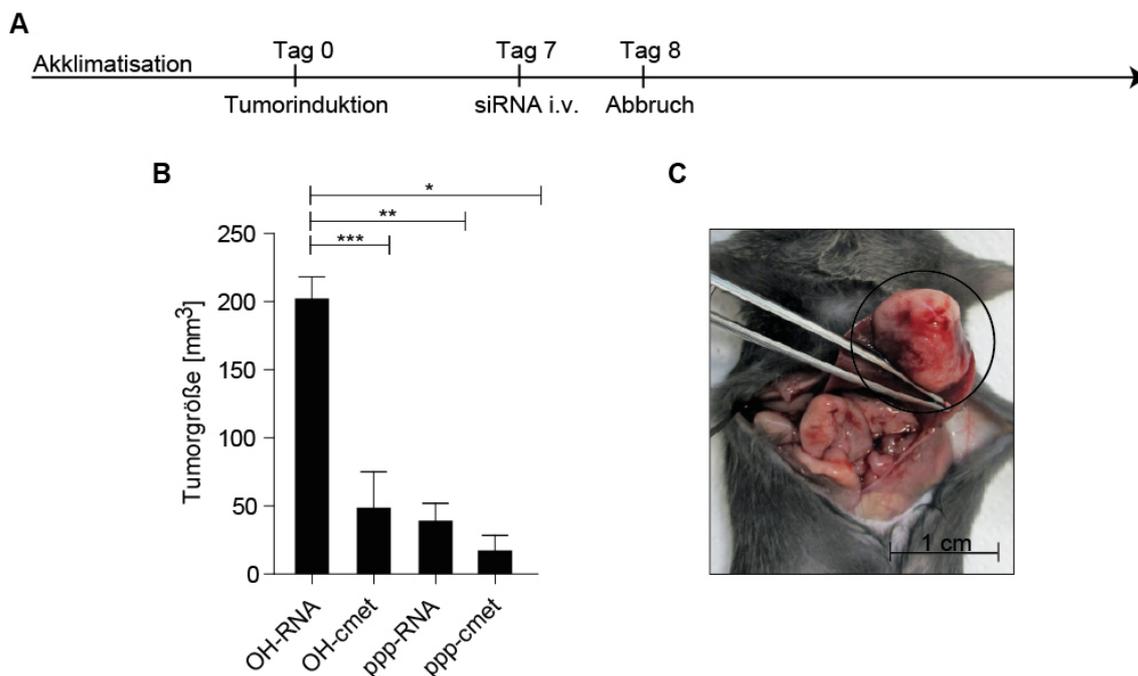


Abbildung 14: Abbruchversuch nach Therapie von C57BL/6 Mäusen mit orthotopen Hepa1-6 Tumoren mit immunaktiver RNA. Hepa1-6 (P2) Zellen wurden den Versuchstieren orthotop in den linken Leberlappen injiziert. Nach 7 Tagen wurde 50 µg einer OH-RNA, ppp-RNA, OH-c-MET beziehungsweise ppp-c-MET intravenös über die Schwanzvene appliziert. 24 Stunden nach Behandlung erfolgte der Abbruch des Versuchs. Tumore wurden explantiert, vermessen und aufgearbeitet. **A:** Therapieschema: **B:** Volumen der Tumoren 24 Stunden nach der Therapie mit immunaktiver RNA. Dargestellt sind Mittelwerte des Tumolvolumens ± SEM (n=4); *p < 0,001; **p < 0,001; ***p = 0,001; n.s. = nicht signifikant. **C:** Darstellung des subkapsulären Tumors im linken Leberlappen vor der Explantation.

In einem weiteren Versuch wurde eine zweite therapeutische Injektion zehn Tage nach Tumorinduktion hinzugefügt. Wieder erfolgte 24 Stunden nach der letzten Therapie der Versuchsabbruch zur Untersuchung des Tumorgewebes. Auch hier konnte gezeigt werden, dass das Tumolvolumen nach Injektion von OH-c-MET, ppp-RNA, sowie ppp-c-MET im Vergleich zur OH-RNA reduziert war. Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Therapiearmen fanden sich jedoch erneut nicht.

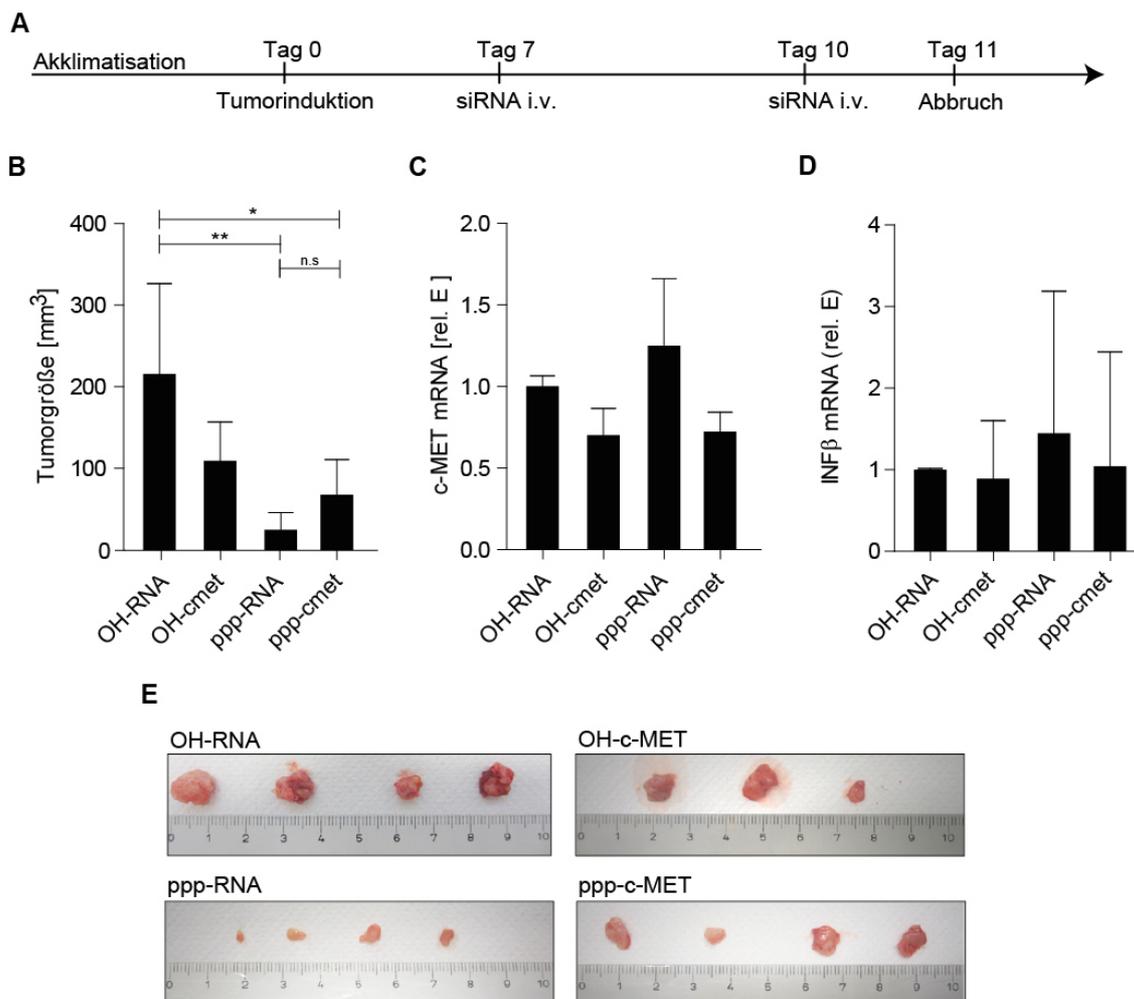


Abbildung 15: Abbruchversuch nach zweimaliger Therapie von C57BL/6 Mäusen mit orthotopen Lebertumoren mit immunaktiver RNA. Hepa1-6 (P2) Zellen wurden den Versuchstieren orthotop in den linken Leberlappen injiziert. Nach sieben und zehn Tagen wurden 50 µg OH-RNA, ppp-RNA, OH-c-MET beziehungsweise ppp-c-MET intravenös über die Schwanzvene injiziert. Nach weiteren 24 Stunden erfolgte der Abbruch des Versuchs. Die Tumoren wurden explantiert, vermessen und aufgearbeitet. **A:** Therapieschema. **B:** Volumen der Tumoren nach Therapie. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von je 4 Mäusen; * $p = 0,047$; ** $p = 0,015$; n.s. = nicht signifikant. **C und D:** Relative c-MET ($n=6$) und INF- β mRNA Expression ($n=8$) im Tumorgewebe gemessen mittels qRT-PCR. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SD der Tumoren je Versuchsgruppe. **E:** Explantierte orthotope Tumore 24 Stunden nach der zweiten Therapie.

Die Behandlung mit ppp-c-MET führte tendenziell zu einer effektiveren Tumorsuppression als mit OH-c-MET, jedoch zeigte sich für die unmodifizierte ppp-RNA im diesem Versuch die stärkste Wachstumshemmung (**Abbildung 15A, B und D**). Weitergehende Untersuchungen der Tumore mittels qRT-PCR zeigten keine eindeutigen Unterschiede bezüglich der relativen mRNA Expression von INF- β beziehungsweise c-MET zwischen den

Behandlungsgruppen (**Abbildung 15C**). Somit konnte zu dem gewählten Zeitpunkt kein eindeutiger Beleg für die direkte Wirkung der immunkativen RNA im Tumorgewebe erbracht werden.

3.6.1 Apoptoseinduktion im Tumorgewebe nach Therapie mit ppp-c-MET im HCC-Mausmodell

Mäuse mit orthotop induzierten Hepa1-6 Tumoren wurden einmalig mit OH-c-MET, ppp-RNA oder ppp-c-MET behandelt und 24 Stunden später explantiert für immunhistologische Analysen mittels TUNEL-Färbung, um den Nachweis von Zelltodinduktion in den Tumoren zu erbringen. Zunächst wurde deutlich, dass weder im Tumorgewebe unbehandelter Tiere noch durch die Behandlung mittels OH-RNA Apoptose nachzuweisen war.

Dagegen zeigen die Versuchstiere, die mit OH-c-MET, ppp-RNA beziehungsweise ppp-c-MET therapiert wurden, multifokal apoptotische Zellgruppierungen im Tumor (**Abbildung 16**). Durch Quantifizierung der Färbungen ließ sich nachweisen, dass die Therapie mit OH-c-MET in 13 %, mit ppp-RNA in 37 % und mit ppp-c-MET in 46 % der intratumoralen Zellen Apoptose induziert. Signifikante Unterschiede zwischen der Gabe von ppp-RNA und ppp-c-MET konnten nicht dargestellt werden.

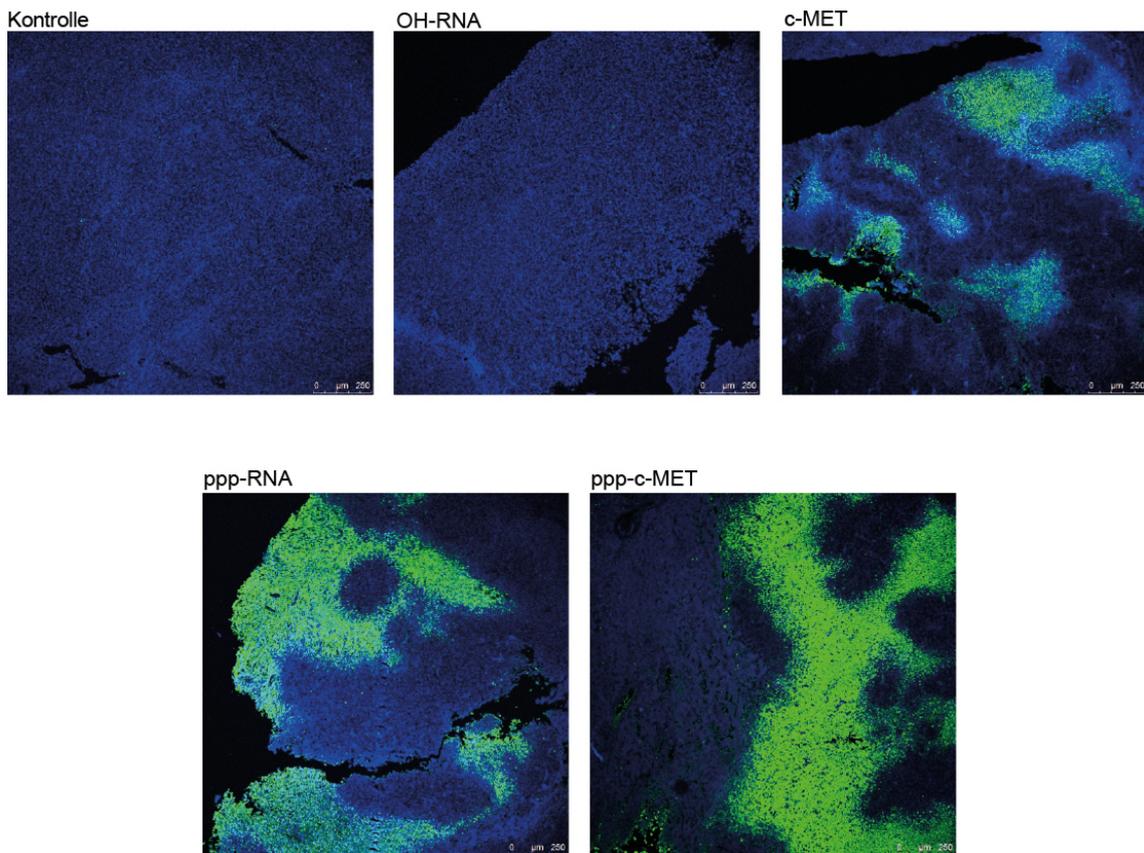


Abbildung 16: Konfokal-mikroskopische Aufnahmen orthotoper Lebertumore nach Therapie mit immunaktiver RNA. Hepa1-6 (P2) Zellen wurden den Versuchstieren orthotop in den linken Leberlappen injiziert. Nach 7 Tagen wurden 50 µg OH-RNA, ppp-RNA, OH-c-MET beziehungsweise ppp-c-MET intravenös über die Schwanzvene injiziert. Als Kontrolle wurde das entsprechende Volumen PBS gespritzt. 24 Stunden nach Behandlung erfolgte der Abbruch des Versuchs. Die Tumoren wurden explantiert, in Paraffin eingebettet und histologisch aufgearbeitet. Dargestellt sind repräsentative Tumorschnitte in einer DAPI-Färbung (■), sowie einer TUNEL-Färbung (■) mittels *in Situ Cell Death Detection* Kit (Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland) zur Detektion von Zelltod.

4 Diskussion

4.1 Immuntherapie mit bifunktioneller siRNA gegen c-MET im HCC-Modell

Die Behandlung von Tumoren mit bifunktioneller ppp-siRNA stellt einen innovativen Ansatz in der Tumorthherapie dar. Die Bifunktionalität einer solchen siRNA beruht zum einen auf der Genexpressionshemmung durch RNAi - in dieser Arbeit der Tyrosinkinase c-MET - , zum anderen auf der Induktion einer Typ I IFN-vermittelten Immunantwort durch die Aktivierung von RIG-I (Hornung et al. 2006). Dieses Wirkprinzip wurde bereits in verschiedenen Tumormodellen experimentell angewandt, um eine antitumorale Wirkung zu generieren (Meng et al. 2014, Poeck et al. 2008, Schnurr et al. 2013).

So konnte im orthotopen Pankreaskarzinommodell in C57BL/6 Mäusen nach systemischer Therapie mit einer gegen TGF- β gerichteten ppp-siRNA die Induktion von Apoptose im Tumor demonstriert werden. Ebenso konnte eine vermehrte Expression von immunstimulierenden Zytokinen, wie Typ I IFN, sowie die verminderte Expression von TGF- β in der Tumorumgebung gezeigt werden (Ellermeier et al. 2013). In einer anderen Arbeit wurde mit demselben dualen Wirkprinzip eine RNAi-vermittelte Hemmung der Glutaminase in Tumorzellen sowie eine RIG-I-Aktivierung induziert, was zu einem ausgeprägten Tumorzelltod führte (Meng et al. 2014).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, inwiefern eine solche bifunktionelle ppp-siRNA auch in der Therapie des HCC wirksam sein kann. Dafür wurde die Hepatomazelllinie Hepa1-6 bezüglich einer funktionellen RLH-Signalkaskade, sowie die Genexpressionshemmung durch eine spezifische c-MET siRNA untersucht. Zudem wurden die bifunktionelle

ppp-siRNA und ihre einzelnen Komponenten miteinander verglichen. Anschließend wurde die antitumorale Wirksamkeit im orthotopen Hepa1-6 Tiermodell *in vivo* evaluiert.

4.2 Funktionalität von RIG-I in Hepatomazellen

Zunächst konnte dargestellt werden, dass die untersuchte Zelllinie Hepa1-6 eine funktionelle RIG-I Signalkaskade besitzt. Die Transfektion einer ppp-RNA führte zu einer erhöhten Expression von RIG-I, was indirekt auf einen positiven Feedback-Loop durch die Induktion von Typ I IFN hinweist. Die Funktionalität konnte direkt über die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors IRF-3, sowie die Hochregulierung von IFN- β nachgewiesen werden. Weiterhin äußerte sich die RIG-I-Aktivierung in der Sekretion des Chemokins CXCL10 und einer vermehrten Expression von CD95 auf den Tumorzellen. Zudem konnte eine deutliche Reduktion der Vitalität der Tumorzellen durch RIG-I Aktivierung gezeigt werden, wobei die durchflusszytometrische Analyse auf Apoptose hinweist. Somit finden sich die typischen Eigenschaften einer RIG-I Aktivierung, wie sie bereits für andere Tumorentitäten nachgewiesen worden sind (Duell et al. 2014, Ellermeier et al. 2013, Meng et al. 2014, Poeck et al. 2008).

Im orthotopen murinen HCC-Modell konnte interessanterweise bereits nach ein bis zwei Behandlungen mit ppp-RNA eine deutliche Reduktion des Tumolvolumens erzielt werden. Dieser Effekt war deutlich ausgeprägter, als für andere Tumorentitäten beschrieben. Um eine vergleichbare Aussage bezüglich dieser potenten antitumoralen Wirkung im Mausmodell zu treffen, müssen Überlebensversuche erfolgen (Ellermeier et al. 2013). Untersuchungen des Tumorgewebes zeigten nur einen statistisch nicht signifikanten Trend für erhöhte IFN- β -mRNA Level. Dies könnte möglicherweise an der Kinetik der IFN-Induktion im Tumorgewebe liegen.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit publizierten Daten. Es wurde bereits anhand von Melanomzellen, Pankreaskarzinom- und Ovarialkarzinomzellen demonstriert, dass die Aktivierung von RLH über deren Liganden zur Apoptose in den Tumorzellen führt (Besch et al. 2009, Kubler et al. 2011, DUEWELL et al. 2015)

DUEWELL et al. konnte darüber hinaus nach RLH-basierter Therapie im Pankreaskarzinommodell Tumorantigen-spezifische T-Zellen nachweisen. Die Therapie war in der Lage, einen immunogenen Zelltod zu induzieren und somit eine Verbindung zwischen angeborener und adaptiver Immunität zu vermitteln. Die RLH-Aktivierung führte abhängig von der Dosis der RNA entweder direkt zur Induktion der Tumorzellapoptose oder indirekt über die Hochregulierung von CD95 zur erhöhten Sensibilität der Tumorzellen gegenüber den zytotoxischen T-Zellen. Wir konnten in der Hepatomazelllinie ebenso zeigen, dass die RIG-I Aktivierung zur Hochregulation von CD95 führt. Eine adaptive Immunantwort im HCC-Modell wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Es müssten weitere Versuche durchgeführt werden, um tumorreaktive T-Zellen und eine Kreuzpräsentation von Tumorantigenen nachzuweisen. Hier könnte das von Hepa 1-6 Zellen exprimierte Antigen AFP dienen, wogegen T-Zellantworten beschrieben wurden.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch die Verwendung des RIG-I Liganden ppp-RNA ein antitumoraler Effekt im HCC-Modell ausgelöst wird, der sich *in vitro* und *in vivo* in einer deutlichen Tumorkontrolle und der Induktion von Apoptose ausdrückte. Diese Liganden-abhängige Aktivierung von RIG-I, sowie die Effekte auf die Tumurvitalität wurden bereits in anderen Modellerkrankungen gezeigt und konnte hier im HCC bestätigt werden (Besch et al. 2009, Ellermann et al. 2013, DUEWELL et al. 2015, Meng et al. 2014).

4.3 Genexpressionshemmung von c-MET in Hepatomazellen

Die mutierte Tyrosinrezeptorkinase c-MET ist konstitutiv dimerisiert, was zur kontinuierlichen Aktivierung einer proonkogenen Signalkaskade führt. Dies resultiert in Tumorprogression, Metastasierung, Invasion, Angiogenese und erhöhte Zellmotilität (Venepalli et al. 2013). Es konnte bereits demonstriert werden, dass die Unterbrechung der c-MET Signalkaskade diese onkogenen Effekte aufhalten kann. Eine Möglichkeit diesen Signalweg zu unterbrechen, stellen Tyrosinrezeptorkinase-Inhibitoren dar, wie z. B. Cabozantinib oder Tivantinib. Deren Effektivität und Verträglichkeit wird bereits in klinischen Studien zum HCC evaluiert (Santoro et al. 2013, Xiang et al. 2014). Eine andere Möglichkeit den c-MET-Signalweg zu unterbinden, der in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde, ist die Genexpressionshemmung mittels RNAi. In zahlreichen Studien konnte bereits veranschaulicht werden, dass die therapeutische Anwendung von siRNA gegen c-MET die Proliferation von Tumorzellen *in vitro* und *in vivo* deutlich verringern kann (de Fougères et al. 2007, Guo et al. 2013). Im Rahmen dieser Arbeit zeigte sich, dass die Sequenz, die für die OH-c-MET, sowie für die modifizierte ppp-c-MET gewählt wurde, zu einer signifikanten Reduktion der c-MET-Expression führt.

Im HCC-Mausmodell konnte zunächst nach Behandlung mit OH-c-MET eine verminderte Tumorprogression gezeigt werden. Histologisch fanden sich in den Tumoren Areale mit vermehrtem Zelltod. Eine Hemmung der c-MET-Expression im Tumorgewebe konnte jedoch mittels qRT-PCR nicht eindeutig bestätigt werden. Möglicherweise war die Fallzahl der im Rahmen dieser Arbeit analysierten Tumore zu niedrig beziehungsweise der Zeitpunkt des Versuchsabbruchs ungünstig gewählt. Allerdings kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass der Therapieeffekt über sog. „off-target“ Mechanismen vermittelt wurde. Diesbezüglich ist die Aktivierung von TLR durch die RNA, insbesondere TLR7, zu diskutieren. Ellermeier et al. konnten zunächst mittels einer siRNA gegen TGF- β eine mäßige CXCL10 Synthese in Mäusen

mit Pankreaskarzinom generieren. Diese Immunantwort verschwand jedoch in TLR7-defizienten Mäusen, sodass von „off-target“-Effekten einer konventionellen siRNA ausgegangen werden musste (Ellermeier et al. 2013).

Um solch einen Mechanismus in Rahmen dieser Arbeit ausschließen zu können, müssten Versuche in MyD88- beziehungsweise TLR7-defizienten Tieren durchgeführt werden, die jedoch nicht zur Verfügung standen. Allerdings zeigten sich keine Therapie-Effekte bei einer Kontroll-RNA (OH-RNA), was gegen einen reinen TLR-Effekt bezüglich der Tumorkontrolle spricht.

4.4 Therapeutische Wirkung der ppp-c-MET

Im Rahmen dieser Arbeit wurde evaluiert, inwiefern durch eine von uns generierte bifunktionelle ppp-c-MET die RIG-I Aktivierung und die RNAi-vermittelte Geneexpressionshemmung von c-MET in einem RNA-Molekül vereint werden kann. Dabei sollte zunächst gezeigt werden, dass die ppp-Modifizierung der ppp-siRNA nicht zu Einschränkungen der einzelnen Funktionen führt.

Es zeigte sich, dass die ppp-c-MET, ebenso wie eine ppp-RNA ohne siRNA-Funktion in der Lage ist, über RIG-I eine typische antivirale Immunantwort zu generieren. Nach Transfektion der ppp-siRNA konnte eine ähnlich ausgeprägte Sekretion von CXCL10, sowie Hochregulierung von CD95 induziert werden. Des Weiteren konnte veranschaulicht werden, dass die ppp-c-MET zu einer signifikanten Hemmung der c-MET-Expression *in vitro* führt. Dabei veränderte die Triphosphatmodifikation die Effizienz der Expressionshemmung nicht, womit die Expressionshemmung durch die unmodifizierte und die ppp-modifizierte siRNA als gleichwertig betrachtet werden kann.

Diese Ergebnisse belegen, dass die von uns generierte ppp-c-MET sowohl als RIG-I-Ligand dienen als auch die Expression von c-MET hemmen kann. Es stellte sich jedoch die Frage, inwiefern sich die ppp-c-MET auf die Vitalität beziehungsweise Tumorprogression der Tumorzellen auswirkt und ob die Kombination der beiden Funktionen in einer gesteigerten Tumorabwehr resultiert. Um diese Fragen zu beantworten, wurde die Wirkungen der verschiedenen therapeutischen RNA auf die Vitalität der Tumorzellen *in vitro* und *in vivo* evaluiert. Zunächst konnte gezeigt werden, dass OH-c-MET, ppp-RNA und ppp-c-MET einen deutlichen Einfluss auf die Vitalität der Hepatomazellen haben. Ebenso konnte die Apoptoseinduktion durch alle drei RNA gezeigt werden. Die ppp-c-MET zeigte im Vergleich zu OH-c-MET und ppp-RNA tendenziell eine stärkere Inhibition der Tumorzellvitalität, allerdings war dieser Unterschied statistisch nicht signifikant. Dies ist möglicherweise auf den ausgesprochen starken Effekt der ppp-RNA auf die Tumorzellvitalität zurückzuführen. Diesbezüglich könnten Versuche, in denen die beiden Komponenten – c-MET-Inhibition und RIG-I-Aktivierung – separat untersucht werden und gegeneinander titriert werden Klarheit schaffen.

Auch *in vivo* konnte nach systemischer Behandlung mit OH-c-MET, ppp-RNA und ppp-c-MET eine Wachstumsverzögerung der Tumore gezeigt werden. Bereits eine einzige intravenöse Injektion der siRNAs führte zu einer 90 %-igen Tumorregression im Vergleich zur Kontrolle. Die ppp-RNAs schienen in diesem Zusammenhang zu einer effektiveren Inhibition des Wachstums zu führen als die OH-c-MET. Zudem zeigte sich nach einer intravenösen Injektion der siRNAs erneut zumindest eine Tendenz, dass die ppp-c-MET einen stärkere tumorsuppressive Wirkung als die ppp-RNA besitzt (eine statistische Signifikanz wurde jedoch nicht erreicht). Dieser Trend fand sich auch in den immunhistochemischen TUNEL-Färbungen der Tumore, in denen sich Areale mit massiv ausgeprägtem Zelltod fanden.

Die Therapieeffizienz von bifunktionellen ppp-siRNAs, welche die Expression eines Onkogens hemmt und RIG-I aktiviert, wurde für verschiedene

Tumormodelle erfolgreich dargestellt. Dabei zeigte sich durchweg eine potentere Tumorsuppression durch bifunktionelle ppp-siRNA als durch die alleinige Genexpressionshemmung oder RIG-I-Aktivierung. Interessanterweise zeigen diese Studien, dass die Kombination dieser beiden Funktionen zu einem synergistischen antitumoralen Effekt führen kann (Meng et al. 2014, Schnurr et al. 2013). In der Erstbeschreibung der bifunktionellen ppp-siRNA Strategie konnten Poeck et al. mittels einer Bcl-2-spezifischen ppp-siRNA eine effektivere Tumorkontrolle generieren, als durch die Expressionshemmung des antiapoptischen Bcl-2 oder der RIG-I-Aktivierung alleine (Poeck et al. 2008).

Dieser additive Effekt konnte im Rahmen dieser Arbeit allerdings mit der gewählten Strategie nicht erzielt werden. Es zeigte sich im HCC-Modell nach einer zweiten Injektion der therapeutischen RNA, dass die unmodifizierte ppp-RNA möglicherweise sogar eine stärkere Wachstumsverzögerung als die ppp-c-MET verursachte. Eine Erklärung könnte sein, dass in diesem Modell der überwiegende therapeutische Nutzen durch die RIG-I-Aktivierung (ppp-RNA-Komponente) vermittelt wurde und die ppp-RNA ohne RNAi-Komponente ein besserer RIG-I Ligand ist. Dies könnte unter anderem darauf zurückzuführen sein, dass die sterische Anordnung des RIG-I-Liganden in Verbindung mit der RLH einen entscheidenden Einfluss auf die RIG-I-Aktivierung haben kann. Wang et al. demonstrierte, dass Veränderungen der räumlichen Struktur der *regulatory domain* der RIG-I und des RIG-I-Liganden zu einem deutlichen Verlust der immunstimulatorischen Wirkung führt (Wang et al. 2010). Es stellt sich folglich die Frage, ob und inwiefern die RNA-Sequenz, die zur RNAi gewählt wurde, die RIG-I-Aktivierung beeinflusst.

Grundsätzlich ist zu klären, inwiefern c-MET als Zielstruktur einer ppp-RNA einen additiven oder gar synergistischen Effekt zulässt. Die Zusammenhänge zwischen der c-MET- und RIG-I-Signalwege sind nicht abschließend erforscht. Ein *Bcl-2-knockdown* lenkt direkt das Gleichgewicht von pro- und antiapoptischen Proteinen Richtung Apoptose und unterstützt damit den RIG-I-Signalweg (Poeck et al. 2008). Jia et al. konnte demonstrieren, dass HGF in

humanen Mesangiumzellen eine antiapoptotische Wirkung hat, indem eine Expressionszunahme von Bcl-2, sowie eine Expressionsabnahme von p53 und Bax nachgewiesen wurde (Jia et al. 2014). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass ein *gene silencing* von HGF zu einer Verschiebung von pro- und antiapoptischen Proteinen zu Gunsten des Zelltodes führte (Guo et al. 2016). Es ergeben sich also Hinweise, dass die Unterbrechung der HGF / c-MET-Signalkaskade indirekt eine proapoptotische Wirkung hat. Jedoch ist zu bedenken, dass eine Expressionshemmung von HGF – wie oben angeführt – nicht gleichzusetzen ist mit einer Expressionshemmung von c-MET. Es müssen also weitere Untersuchungen erfolgen, um zu evaluieren, inwiefern c-MET die richtige Zielstruktur in der Signalkaskade ist und ob eine proapoptotische Wirkung durch Hemmung des c-MET-Signalweges im HCC-Modell darstellbar ist.

Zudem ist nicht klar, in welcher Konzentration die ppp-c-MET, die letztlich das Zytosol der Tumorzellen erreicht, tatsächlich zur Aktivierung von RIG-I zu Verfügung steht beziehungsweise wie viel der ppp-c-MET zur Genexpressionshemmung führt. Zur Regulation der Ribonuklease *dicer* und den Proteinen der *Argonaute*-Familie, die die bifunktionelle ppp-c-MET im Zytosol spalten und den komplementären mRNA Strang zuführen, ist nur wenig bekannt. Somit ist die Relation dieser Anteile nur abzuschätzen. Eine Limitation dieser Arbeit ist, dass nicht abzulesen ist, welcher Teil der Apoptose der ppp-c-MET-behandelten Zellen durch die Genexpressionshemmung entsteht und welcher Teil durch die RIG-I-Aktivierung. In dieser Arbeit zeigte sich, dass bei gleichen Konzentrationen von OH-c-MET und ppp-RNA die Tumorsuppression durch die ppp-Modifikation durchgehend stärker ausfällt. Demzufolge fällt der *knockdown* der bifunktionellen ppp-c-MET vermutlich nicht so sehr ins Gewicht, wodurch ein additiver Effekt schwer darzustellen ist. Diesbezüglich muss auch berücksichtigt werden, dass die *In-vivo*-Genexpressionshemmung von c-MET nicht in ausreichendem Masse erfolgte. In der Tat konnte eine Reduktion der c-MET mRNA Expression in den behandelten Tumoren nicht nachgewiesen werden. Das Tumor-Targeting der

RNA im HCC stellt somit möglicherweise ein Problem dar, welches durch eine systemische RNA-Applikation nicht ausreichend adressiert wird.

Weiterhin zu bedenken sind mögliche Qualitätsunterschiede bei der Generierung der ppp-c-MET und der ppp-RNA. Die Generierung der ppp-Modifikation erfolgte mittels *In-vitro*-Transkription. Regelmäßig wurden mittels Annexin V-Assay und CXCL10 ELISA Qualitätskontrollen durchgeführt, um sicherzustellen, dass die ppp-Modifikation erfolgreich und die RIG-I-Liganden funktionell aktiv waren. Zu bedenken ist, dass die großen Mengen, die für *In-vivo*-Untersuchungen benötigt wurden, nur in wiederholter Erzeugung von kleinen Batches erreicht werden konnten. Gerade die Synthese der ppp-c-MET gestaltete sich in diesem Sinne als schwierig. Nach Zusammenführung dieser einzelnen Batches konnten sich durchaus minimale Qualitätsunterschiede summieren, die zuvor durch die Kontrollen nicht erfasst wurden. Retrospektive Untersuchungen mit Titrations der entsprechenden RNAs konnten dies bestätigen. Demzufolge kann nicht verlässlich gesagt werden, dass die verwendete ppp-RNA und ppp-c-MET im Hinblick auf ihre RIG-I-Aktivierung gleichwertig sind. Um dieses Problem zu lösen, wäre eine standardisierte synthetische Herstellung und Aktivitätsbeurteilung der ppp-c-MET und ppp-RNA wünschenswert. Weiterführende Studien in diese Richtung sind erforderlich und Gegenstand aktueller Untersuchungen der Arbeitsgruppe.

4.5 Zusammenfassende Bewertung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die murine Hepatomazelllinie Hepa1-6 eine funktionelle RIG-I-Signalkaskade besitzt, die durch synthetische Liganden, sogenannte ppp-RNAs, aktiviert werden kann. Des Weiteren ließ sich demonstrieren, dass durch Transfektion einer c-MET-spezifischen siRNA beziehungsweise einer bifunktionellen ppp-siRNA gegen c-

MET (ppp-c-MET), die Expression der Tyrosinkinase c-MET in den Tumorzellen effektiv gehemmt werden kann. Darüber hinaus vermittelte ppp-c-MET gleichzeitig eine RIG-I-Aktivierung. Somit konnte die Bifunktionalität der in dieser Arbeit generierten ppp-siRNA gezeigt werden. Die Transfektion von Tumorzellen mit ppp-c-MET resultierte in einer Typ I IFN-Antwort, Hochregulierung von MHC-I und CD95 (Fas) auf den Tumorzellen sowie Apoptose. Der additive Effekt der c-MET Inhibition bezüglich der Tumorsuppression war jedoch in Relation zum RIG-I-vermittelten Tumorzelltod nur gering ausgeprägt. Andere c-MET-abhängige Prozesse, wie Angiogenese, wurden in dieser Arbeit nicht untersucht.

In vivo zeigte die bifunktionelle ppp-siRNA keinen Vorteil gegenüber einer unmodifizierten ppp-RNA in Bezug auf Inhibition des Tumorwachstums. Dies ist unter anderem darauf zurückzuführen, dass durch RIG-I Aktivierung alleine ein ausgeprägter antitumoraler Effekt induziert wurde. Ein additiver Effekt war aus diesem Grund schwer darstellbar. Ferner stellte sich in nachfolgenden Experimenten heraus, dass die Funktionalität der ppp-c-MET im Vergleich zur Kontroll ppp-RNA bezüglich der Effektivität der RIG-I-Aktivierung nicht gleichwertig war. Aus diesem Grund sind weiterführende Experimente erforderlich, um festzustellen, ob die Kombination aus RIG-I Aktivierung und c-MET Inhibition einen additiven antitumoralen Effekt vermitteln kann.

Die antitumoralen Effekte, die hier mittels einer bifunktionellen siRNA im HCC-Modell sowie in anderen Tumormodellen bereits dargestellt werden konnten, eröffnen neue Möglichkeiten der Tumorthherapie. Dies erfolgt einerseits durch die Expressionshemmung tumorfördernder Genprodukte und andererseits durch die Veränderung des immunsuppressiven Milieus des Tumors (Duell et al. 2015, Meng et al. 2014, Poock et al. 2008). Es konnte gezeigt werden, dass durch die Hemmung von Genen, die bei Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika eine Rolle spielen, die Effektivität der Chemotherapie verbessert werden konnte (Sethi et al. 2012). Resistenzen gegenüber dem Multikinaseinhibitor Sorafenib, der beim HCC klinisch Anwendung findet,

konnten durch die Inhibition von Signalkaskaden, wie zum Beispiel der RAF-Kinase-Kaskade, überkommen werden (Galmiche et al. 2014). Es wäre denkbar, dass c-MET, das ein Onkogen in einem Netzwerk von Wachstumssignalkaskaden ist, auf ähnliche Weise Tumorzellen für eine solche Therapie sensibilisiert (Zhai et al. 2013). Dementsprechend wurde bereits demonstriert, dass die Gabe des c-MET-Inhibitors Golvatinib zu einer Sensibilisierung von Tumorzellen für den VEGFR-Inhibitor Lenvatinib führte. Die Gabe beider Medikamente resultierte in einer synergistischen Hemmung des Tumorwachstums (Nakagawa et al. 2014). So könnte auch die Therapie mit ppp-c-MET das HCC für weitere immunologische beziehungsweise chemotherapeutische Ansätze sensibilisieren.

Doch auch die Aktivierung von RIG-I führt zu Veränderungen am Tumor, die neue Therapieziele ermöglichen. Duewell et al. konnten im murinen Pankreaskarzinommodell durch die Aktivierung von MDA5 mittels poly(I:C) neben einer deutlichen Tumorregression aktivierte, Tumorantigen-spezifische CD8⁺ T-Zellen im Tumorgewebe, sowie im peripheren Blut, nachweisen. Ein nachhaltiges T-Zellgedächtnis konnte demonstriert werden, da überlebende Mäuse, die erfolgreich therapiert worden waren, resistent gegenüber einer erneuten Tumorinduktion waren (Duewell et al. 2015). Die durch RLH-basierte Therapie überwundene Immunsuppression und Induktion eines immunogenen Zelltods der Tumorzellen fungiert also wie eine intrinsische Impfung gegen den Tumor und stellt damit eine Verbindung zwischen angeborener und adaptiver Immunität dar (van den Boorn et al. 2013, Duewell et al. 2015). Ebenso ist denkbar, dass auch im HCC-Modell eine adaptive Immunantwort nach Behandlung mit ppp-c-MET induziert wird. Eine Hochregulation von CD95 und die Sekretion von CXCL10 konnte bereits im Rahmen dieser Arbeit demonstriert werden. Ziel weiterer Untersuchungen kann sein, Tumorantigen-spezifische T-Zellen im HCC sowie deren Bedeutung in der Tumorkontrolle nachzuweisen. Die ppp-c-MET ist ein vielversprechendes Molekül, um die Immunsuppression des Tumors über die Aktivierung des angeborenen und adaptiven Immunsystems zu durchbrechen. Erst kürzlich wurde beschrieben, dass auch traditionelle Chemotherapeutika in ähnlicher Art und Weise das

Immunsystem modulieren und durch immunologische Effekte wirken (Galluzzi et al. 2015). So kann die Sensibilisierung des Tumorgewebes für Effektorzellen des Immunsystems und auch die Genexpressionshemmung von Onkogenen zur erhöhten Vulnerabilität eines Tumors gegenüber weiteren Chemotherapien beziehungsweise Immuntherapien führen.

Ferner ist es von Interesse, welchen Einfluss die Darreichungsform der ppp-siRNA auf den antitumoralen Effekt hat. Die Effizienz der siRNAs könnte durch intraperitoneale beziehungsweise intravenöse Applikation beeinflusst werden, da Studien belegen, dass eine intraperitoneale Injektion durchaus eine Alternative bietet (Wong et al. 2011). Weiterhin kann eine Applikation der siRNA über die Portalvene beziehungsweise Leberarterie erfolgen, um eine möglichst hohe Konzentration im Tumorgewebe zu erlangen und systemische Nebenwirkungen zu minimieren. Auch eine direkte intratumorale Applikation mittels CT- oder Sonographie-gesteuerter Feinnadelpunktion ist denkbar. Überdies wurde bereits gezeigt, dass durch die Modifizierung von DNA-Nanopartikeln, die spezifisch an Oberflächenmoleküle der Tumorzellen binden, eine hohe Anreicherung von siRNA im Tumorgewebe erreicht werden kann (Lee et al. 2012). Bestimmte Oberflächenmoleküle, wie zum Beispiel der EGF-Rezeptor oder der Transferrinrezeptor, werden von Tumorzellen überexprimiert. Generiert man DNA-Nanopartikel, die so modifiziert sind, dass sie an diese Rezeptoren binden, könnten diese als spezifische Zielstruktur für die Einbringung der ppp-siRNA in den Tumor dienen.

5 Zusammenfassung

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist durch ein aggressives Wachstum sowie eine schlechte Prognose gekennzeichnet. Die Wirksamkeit der derzeit verfügbaren Therapien ist – auch aufgrund der häufig erst späten Diagnosestellung – unbefriedigend. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die zytosolische Helikase RIG-I, sowie die Tyrosinrezeptorkinase c-MET als neue Zielstrukturen für die Immuntherapie des HCC evaluiert. Eine für diese Zwecke generierte bifunktionelle ppp-siRNA ist in der Lage, einerseits als RIG-I-Ligand zu dienen und andererseits über RNAi die c-MET-Expression zu hemmen.

Die Behandlung einer murinen Hepatomazelllinie mit dieser bifunktionellen siRNA führte einerseits RIG-I-vermittelt zur einer Typ-I-IFN getragenen Immunantwort und Tumorzellapoptose, sowie andererseits zur Expressionshemmung von c-MET. Die Effizienz der ppp-anti-c-MET-siRNA bezüglich Zelltodinduktion war *in vitro* gegenüber der ppp-RNA tendenziell höher, jedoch fanden sich *in vivo* keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Tumorkontrolle. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass die ppp-RNA *in vivo* eine unerwartet starke therapeutische Effektivität aufwies. RIG-I-Liganden scheinen daher vielversprechend für die Immuntherapie des HCC. Allerdings ist ein direkter Vergleich der ppp-anti-c-MET-siRNA mit der Kontroll-ppp-RNA aufgrund Synthese-bedingter Unterschiede in der RIG-I-Aktivierung erschwert, wie sich anhand neuerer in unserer Arbeitsgruppe durchgeführter Versuche zeigte. Daher ist zunächst keine abschließende Bewertung möglich, inwiefern ein additiver Effekt durch c-MET-Inhibition erzielt werden kann.

In dieser Arbeit ist es gelungen, RIG-I als therapeutische Zielstruktur im HCC zu identifizieren. Zudem erfolgte der Nachweis, dass sich beide Funktionen, RIG-I-Aktivierung und c-MET-Inhibition, in einem bifunktionellen RNA-Molekül kombinieren lassen. Dieses *Proof-of-principle* stellt die Basis dar, das therapeutische Prinzip für die Immuntherapie des HCC weiter zu erforschen.

6 Literaturverzeichnis

- Abbadessa G. (2016). A Phase 3, Randomized, double-Blind Study of Tivantinib (ARQ 197) in Subjects With MET Diagnostic-High Inoperable Hepatocellular Carcinoma Treated With One Prior Systemic Therapy, NCT01755767, unter: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01755767> [Stand 11/2016]
- Ahmad S, Hur S. Helicases in Antiviral Immunity: Dual properties as sensors and effectors. *Trends in Biochemical Sciences* 2015;40:576-85.
- Andant C, Puy H, Bogard C, Faivre J, Soule JC, Nordmann Y, Deybach JC. Hepatocellular carcinoma in patients with acute hepatic porphyria: frequency of occurrence and related factors. *Journal of Hepatology* 2000;32:933-9.
- Avella DM, Li G, Schell TD, Liu D, Zhang SS, Lou X, Berg A, Kimchi ET, Tagaram HR, Yang Q, Shereef S, Garcia LS, Kester M, Isom HC, Rountree CB, Staveley-O'Carroll KF. Regression of established hepatocellular carcinoma is induced by chemoimmunotherapy in an orthotopic murine model. *Hepatology* 2012;55:141-52.
- Beasley RP. Rocks along the road to the control of HBV and HCC. *Annals of Epidemiology* 2009;19:231-4.
- Bei R, Mizejewski GJ. Alpha fetoprotein is more than a hepatocellular cancer biomarker: from spontaneous immune response in cancer patients to the development of an AFP-based cancer vaccine. *Current Molecular Medicine* 2011;11:564-81.
- Besch R, Poeck H, Hohenauer T, Senft D, Hacker G, Berking C, Hornung V, Endres S, Ruzicka T, Rothenfusser S, Hartmann G. Proapoptotic signaling induced by RIG-I and MDA-5 results in type I interferon-independent apoptosis in human melanoma cells. *The Journal of Clinical Investigation* 2009;119:2399-411.
- Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 2001;409:363-6.
- Bialecki ES, Di Bisceglie AM. Diagnosis of hepatocellular carcinoma. *HPB: the official Journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association* 2005;7:26-34.
- Blumenschein GR, Jr., Mills GB, Gonzalez-Angulo AM. Targeting the hepatocyte growth factor-cMET axis in cancer therapy. *Journal of the American Society of Clinical Oncology* 2012;30:3287-96.
- Bosch FX, Ribes J, Diaz M, Cleries R. Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. *Gastroenterology* 2004;127:S5-S16.
- Bruix J, Llovet JM. Prognostic prediction and treatment strategy in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2002;35:519-24.
- Chang MH, Chen CJ, Lai MS, Hsu HM, Wu TC, Kong MS, Liang DC, Shau WY, Chen DS. Universal hepatitis B vaccination in Taiwan and the incidence of

- hepatocellular carcinoma in children. Taiwan Childhood Hepatoma Study Group. *The New England Journal of Medicine* 1997;336:1855-9.
- Chen LT, Chen MF, Li LA, Lee PH, Jeng LB, Lin DY, Wu CC, Mok KT, Chen CL, Lee WC, Chau GY, Chen YS, Lui WY, Hsiao CF, Whang-Peng J, Chen PJ, Disease Committee of Adjuvant Therapy for Postoperative Hepatocellular Carcinoma TCOGNHRIZT. Long-term results of a randomized, observation-controlled, phase III trial of adjuvant interferon Alfa-2b in hepatocellular carcinoma after curative resection. *Annals of Surgery* 2012;255:8-17.
- Davila JA, Morgan RO, Shaib Y, McGlynn KA, El-Serag HB. Diabetes increases the risk of hepatocellular carcinoma in the United States: a population based case control study. *Gut* 2005;54:533-9.
- Deutsche Stiftung Organtransplantation (2015). Jahresbericht 2015 Organspende und Transplantation in Deutschland, unter: http://www.dso.de/uploads/tx_dsod/DSO_JB_2015_Web_2.pdf [Stand: 11/2016]
- de Fougerolles A, Vornlocher HP, Maraganore J, Lieberman J. Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery* 2007;6:443-53.
- 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 and Differentiation* 2014.
- Duffy AG, Makarova-Rusher OV, Kerkar SP, Kleiner DE, Fioravanti S, Walker M, Carey S, Figg WD, Steinberg SM, Anderson V, Abi-Jaoudeh N, Levi E, Wood BJ, Greten TF. A pilot study of tremelimumab - a monoclonal antibody against CTLA-4 - in combination with either trans catheter arterial chemoembolization (TACE) or radiofrequency ablation (RFA) in patients with hepatocellular carcinoma (HCC). *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)* 2015;33:4081-.
- Duewelling P, Beller E, Kirchleitner SV, Adunka T, Bourhis H, Siveke J, Mayr D, Kobold S, Endres S, Schnurr M. Targeted activation of melanoma differentiation-associated protein 5 (MDA5) for immunotherapy of pancreatic carcinoma. *Oncoimmunology* 2015;4:e1029698.
- 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 Research* 2013;73:1709-20.
- EMA. European Medicines Agency (2016). European Public Assessment Report: Opdivo, (EMA/277668/2016), unter: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/003985/WC500189768.pdf [Stand: 11/2016]. 2016.
- EMA. European Medicines Agency (2016). European Public Assessment Report: Yervoy, (EMA/430055/2011), unter: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-

[_Summary_for_the_public/human/002213/WC500109303.pdf](#) [Stand: 11/2016]. 2016.

EMA. European Medicines Agency (2016). European Public Assessment Report: Keytruda, (EMA/480071/2016), unter:

http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/003820/WC500190993.pdf [Stand: 11/2016]. 2016.

Fargion S, Fracanzani AL, Piperno A, Braga M, D'Alba R, Ronchi G, Fiorelli G. Prognostic factors for hepatocellular carcinoma in genetic hemochromatosis. *Hepatology* 1994;20:1426-31.

Fattovich G, Stroffolini T, Zagni I, Donato F. Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. *Gastroenterology* 2004;127:S35-50.

Firtina Karagonlar Z, Koc D, Iscan E, Erdal E, Atabey N. Elevated HGF expression as an Autocrine c-Met Activation Mechanism in Acquired Resistance to Sorafenib in HCC Cells. *Cancer Science* 2016.

Galluzzi L, Buque A, Kepp O, Zitvogel L, Kroemer G. Immunological Effects of Conventional Chemotherapy and Targeted Anticancer Agents. *Cancer Cell* 2015;28:690-714.

Galmiche A, Chauffert B, Barbare JC. New biological perspectives for the improvement of the efficacy of sorafenib in hepatocellular carcinoma. *Cancer Letters* 2014;346:159-62.

Gao H, Li K, Tu H, Pan X, Jiang H, Shi B, Kong J, Wang H, Yang S, Gu J, Li Z. Development of T cells redirected to glypican-3 for the treatment of hepatocellular carcinoma. *Clinical Cancer Research* 2014;20:6418-28.

Garajova I, Giovannetti E, Biasco G, Peters GJ. c-Met as a target for Personalized Therapy. *Translational Oncogenomics* 2015;7:13-31.

Giordano S, Columbano A. Met as a therapeutic target in HCC: facts and hopes. *Journal of Hepatology* 2014;60:442-52.

Gomaa AI, Khan SA, Toledano MB, Waked I, Taylor-Robinson SD. Hepatocellular carcinoma: epidemiology, risk factors and pathogenesis. *World Journal of Gastroenterology* 2008;14:4300-8.

Gonzalez-Grande R, Jimenez-Perez M, Gonzalez Arjona C, Mostazo Torres J. New approaches in the treatment of hepatitis C. *World Journal of Gastroenterology* 2016;22:1421-32.

Goubau D, Schlee M, Deddouche S, Pruijssers AJ, Zillinger T, Goldeck M, Schuberth C, Van der Veen AG, Fujimura T, Rehwinkel J, Iskarpatyoti JA, Barchet W, Ludwig J, Dermody TS, Hartmann G, Reis e Sousa C. Antiviral immunity via RIG-I-mediated recognition of RNA bearing 5'-diphosphates. *Nature* 2014;514:372-5.

Goyal L, Muzumdar MD, Zhu AX. Targeting the HGF/c-MET pathway in hepatocellular carcinoma. *Journal of the American Association for Cancer Research* 2013;19:2310-8.

Grimm CF, Ortmann D, Mohr L, Michalak S, Krohne TU, Meckel S, Eisele S, Encke J, Blum HE, Geissler M. Mouse alpha-fetoprotein-specific DNA-based immunotherapy of hepatocellular carcinoma leads to tumor regression in mice. *Gastroenterology* 2000;119:1104-12.

Guo W, Chen W, Yu W, Huang W, Deng W. Small interfering RNA-based molecular therapy of cancers. *Chinese Journal of Cancer* 2013;32:488-93.

Guo JR, Li W, Wu Y, Wu LQ, Li X, Guo YF, Zheng XH, Lian XL, Huang HF, Chen YZ. Hepatocyte growth factor promotes proliferation, invasion, and metastasis of myeloid leukemia cells through PI3K-AKT and MAPK/ERK signaling pathway. *American Journal of Translational Research* 2016;8:3630-44.

Hong Y, Peng Y, Guo ZS, Guevara-Patino J, Pang J, Butterfield LH, Mivechi NF, Munn DH, Bartlett DL, He Y. Epitope-optimized alpha-fetoprotein genetic vaccines prevent carcinogen-induced murine autochthonous hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2014;59:1448-58.

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.

Hou J, Zhou Y, Zheng Y, et al. Hepatic RIG-I predicts survival and interferon-alpha therapeutic response in hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell* 2014;25:49-63.

Hutvagner G, Simard MJ. Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2008;9:22-32.

International Agency for Research on Cancer (2012). Liver Cancer Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012, unter: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx?cancer=liver [11/2016]

Jia Q, Ha X, Yang Z, Hui L, Yang X. Hepatocyte growth factor protects human mesangial cells against apoptosis induced by lead damage. *Biological Trace Element Research* 2014;162:80-6.

Jinek M, Doudna JA. A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. *Nature* 2009;457:405-12.

Kang DC, Gopalkrishnan RV, Lin L, Randolph A, Valerie K, Pestka S, Fisher PB. Expression analysis and genomic characterization of human melanoma differentiation associated gene-5, mda-5: a novel type I interferon-responsive apoptosis-inducing gene. *Oncogene* 2004;23:1789-800.

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. *Nature Immunology* 2005;6:981-8.

Krebs in Deutschland 2011/2012. 10. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2015

Kubler K, tho Pesch C, Gehrke N, Riemann S, Dassler J, Coch C, Landsberg J, Wimmenauer V, Polcher M, Rudlowski C, Tuting T, Kuhn W, Hartmann G, Barchet W. Immunogenic cell death of human ovarian cancer cells induced by

cytosolic poly(I:C) leads to myeloid cell maturation and activates NK cells. *European Journal of Immunology* 2011;41:3028-39.

Lee H, Lytton-Jean AK, Chen Y, Love KT, Park AI, Karagiannis ED, Sehgal A, Querbes W, Zurenko CS, Jayaraman M, Peng CG, Charisse K, Borodovsky A, Manoharan M, Donahoe JS, Truelove J, Nahrendorf M, Langer R, Anderson DG. Molecularly self-assembled nucleic acid nanoparticles for targeted in vivo siRNA delivery. *Nature Nanotechnology* 2012;7:389-93.

Liu Z, Dou C, Jia Y, Li Q, Zheng X, Yao Y, Liu Q, Song T. RIG-I suppresses the migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells by regulating MMP9. *International Journal of Oncology* 2015;46:1710-20.

Llovet JM, Sala M, Castells L, Suarez Y, Vilana R, Bianchi L, Ayuso C, Vargas V, Rodes J, Bruix J. Randomized controlled trial of interferon treatment for advanced hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2000;31:54-8.

Llovet JM, Bruix J. Systematic review of randomized trials for unresectable hepatocellular carcinoma: Chemoembolization improves survival. *Hepatology* 2003;37:429-42.

Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, de Oliveira AC, Santoro A, Raoul JL, Forner A, Schwartz M, Porta C, Zeuzem S, Bolondi L, Greten TF, Galle PR, Seitz JF, Borbath I, Haussinger D, Giannaris T, Shan M, Moscovici M, Voliotis D, Bruix J, Group SIS. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *The New England Journal of Medicine* 2008;359:378-90.

Lorenzato A, Olivero M, Patane S, Rosso E, Oliaro A, Comoglio PM, Di Renzo MF. Novel somatic mutations of the MET oncogene in human carcinoma metastases activating cell motility and invasion. *Cancer Research* 2002;62:7025-30.

Maus MV, Grupp SA, Porter DL, June CH. Antibody-modified T cells: CARs take the front seat for hematologic malignancies. *Blood* 2014;123:2625-35.

Melero I, Prieto J. A clinical trial of CTLA-4 blockade with tremelimumab in patients with hepatocellular carcinoma and chronic hepatitis C. *Journal of Hepatology* 2013;59:81-8.

Meng G, Xia M, Xu C, Yuan D, Schnurr M, Wei J. Multifunctional antitumor molecule 5'-triphosphate siRNA combining glutaminase silencing and RIG-I activation. *International Journal of Cancer* 2014;134:1958-71.

Nakagawa T, Matsushima T, Kawano S, Nakazawa Y, Kato Y, Adachi Y, Abe T, Semba T, Yokoi A, Matsui J, Tsuruoka A, Funahashi Y. Lenvatinib in combination with golvatinib overcomes hepatocyte growth factor pathway-induced resistance to vascular endothelial growth factor receptor inhibitor. *Cancer Science* 2014;105:723-30.

Nakamura T, Sakai K, Nakamura T, Matsumoto K. Hepatocyte growth factor twenty years on: Much more than a growth factor. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2011;26 Suppl 1:188-202.

National Institute of Health. ClinicalTrials.gov (2016). A Phase II, Open Label, Single Arm, Multicenter Study of INC280 Administered Orally in Adults With Advanced Hepatocellular Carcinoma; Database-Identifier: NCT01737827, unter:

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study?term=inc280+hcc&rank=1>[Stand: 11/2016]

Nobuoka D, Motomura Y, Shirakawa H, Yoshikawa T, Kuronuma T, Takahashi M, Nakachi K, Ishii H, Furuse J, Gotohda N, Takahashi S, Nakagohri T, Konishi M, Kinoshita T, Komori H, Baba H, Fujiwara T, Nakatsura T. Radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma induces glypican-3 peptide-specific cytotoxic T lymphocytes. *International Journal of Oncology* 2012;40:63-70.

Ormandy LA, Hillemann T, Wedemeyer H, Manns MP, Greten TF, Korangy F. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Research* 2005;65:2457-64.

Ozcan G, Ozpolat B, Coleman RL, Sood AK, Lopez-Berestein G. Preclinical and clinical development of siRNA-based therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2015;87:108-19.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA: a Cancer Journal for Clinicians* 2005;55:74-108.

Peruzzi B, Bottaro DP. Targeting the c-Met signaling pathway in cancer. *Journal of the American Association for Cancer Research* 2006;12:3657-60.

Poeck H, Besch R, Maihoefer C, et al. 5'-Triphosphate-siRNA: turning gene silencing and Rig-I activation against melanoma. *Nature Medicine* 2008;14:1256-63.

Protzer U, Maini MK, Knolle PA. Living in the liver: hepatic infections. *Nature Reviews Immunology* 2012;12:201-13.

Sangro B, Gomez-Martin C, de la Mata M, Inarrairaegui M, Garralda E, Barrera P, Riezu-Boj JI, Larrea E, Alfaro C, Sarobe P, Lasarte JJ, Perez-Gracia JL, Santoro A, Rimassa L, Borbath I, Daniele B, Salvagni S, Van Laethem JL, Van Vlierberghe H, Trojan J, Kolligs FT, Weiss A, Miles S, Gasbarrini A, Lencioni M, Cicalese L, Sherman M, Gridelli C, Buggisch P, Gerken G, Schmid RM, Boni C, Personeni N, Hassoun Z, Abbadessa G, Schwartz B, Von Roemeling R, Lamar ME, Chen Y, Porta C. Tivantinib for second-line treatment of advanced hepatocellular carcinoma: a randomised, placebo-controlled phase 2 study. *The Lancet Oncology* 2013;14:55-63.

Schlee M, Roth A, Hornung V, Hagmann CA, Wimmenauer V, Barchet W, Coch C, Janke M, Mihailovic A, Wardle G, Juranek S, Kato H, Kawai T, Poeck H, Fitzgerald KA, Takeuchi O, Akira S, Tuschl T, Latz E, Ludwig J, Hartmann G. Recognition of 5' triphosphate by RIG-I helicase requires short blunt double-stranded RNA as contained in panhandle of negative-strand virus. *Immunity* 2009;31:25-34.

Schmidt A, Endres S, Rothenfusser S. Pattern recognition of viral nucleic acids by RIG-I-like helicases. *Journal of Molecular Medicine* 2011;89:5-12.

Schnurr M, DUEWELL P. Breaking tumor-induced immunosuppression with 5'-triphosphate siRNA silencing TGFbeta and activating RIG-I. *Oncoimmunology* 2013;2:e24170.

Seeff LB, Hoofnagle JH. Epidemiology of hepatocellular carcinoma in areas of low hepatitis B and hepatitis C endemicity. *Oncogene* 2006;25:3771-7.

Sethi G, Pathak HB, Zhang H, Zhou Y, Einarson MB, Vathipadiekal V, Gunewardena S, Birrer MJ, Godwin AK. An RNA interference lethality screen of the human druggable genome to identify molecular vulnerabilities in epithelial ovarian cancer. *PLoS One* 2012;7:e47086.

Simonetti RG, Camma C, Fiorello F, Politi F, D'Amico G, Pagliaro L. Hepatocellular carcinoma. A worldwide problem and the major risk factors. *Digestive Diseases and Sciences* 1991;36:962-72.

Takeuchi, S. *Nucleic Acid Sensors and Antiviral Immunity*: LandesBioscience; 2012.

Ueki T, Fujimoto J, Suzuki T, Yamamoto H, Okamoto E. Expression of hepatocyte growth factor and its receptor c-met proto-oncogene in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1997;25:862-6.

van den Boorn JG, Hartmann G. Turning tumors into vaccines: co-opting the innate immune system. *Immunity* 2013;39:27-37.

Venepalli NK, Goff L. Targeting the HGF-cMET Axis in Hepatocellular Carcinoma. *International Journal of Hepatology* 2013;2013:341636.

Venook AP, Papandreou C, Furuse J, de Guevara LL. The incidence and epidemiology of hepatocellular carcinoma: a global and regional perspective. *The Oncologist* 2010;15 Suppl 4:5-13.

Verslype C, Cohn A, Kelley R. Activity of cabozantinib (XL184) in hepatocellular carcinoma: results from a phase II randomized discontinuation trial. *Journal of Clinical Oncology* 2012;30:4007.

Wang Y, Ludwig J, Schuberth C, Goldeck M, Schlee M, Li H, Juranek S, Sheng G, Micura R, Tuschl T, Hartmann G, Patel DJ. Structural and functional insights into 5'-ppp RNA pattern recognition by the innate immune receptor RIG-I. *Nature Structural & Molecular Biology* 2010;17:781-7.

Whittaker S, Marais R, Zhu AX. The role of signaling pathways in the development and treatment of hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2010;29:4989-5005.

Wong KP, Sha W, Zhang X, Huang SC. Effects of administration route, dietary condition, and blood glucose level on kinetics and uptake of ¹⁸F-FDG in mice. *Journal of Nuclear Medicine* 2011;52:800-7.

Xiang Q, Chen W, Ren M, Wang J, Zhang H, Deng DY, Zhang L, Shang C, Chen Y. Cabozantinib suppresses tumor growth and metastasis in hepatocellular carcinoma by a dual blockade of VEGFR2 and MET. *Journal of the American Association for Cancer Research* 2014;20:2959-70.

Xu C, Lee SA, Chen X. RNA interference as therapeutics for hepatocellular carcinoma. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery* 2011;6:106-15.

Yau TC WS, Yee Chao, Chia-Jui Yen, Ronnie Tung-Ping Poon. A phase I/II study of foretinib, an oral multikinase inhibitor targeting MET, RON, AXL, TIE-2, and VEGFR in advanced hepatocellular carcinoma (HCC). *Journal of Clinical Oncology* 2012;30:4108.

Zhang HH, Mei MH, Fei R, Liu F, Wang JH, Liao WJ, Qin LL, Wei L, Chen HS. Regulatory T cells in chronic hepatitis B patients affect the

immunopathogenesis of hepatocellular carcinoma by suppressing the anti-tumour immune responses. *Journal of Viral Hepatitis* 2010;17 Suppl 1:34-43.

Zhai B, Sun XY. Mechanisms of resistance to sorafenib and the corresponding strategies in hepatocellular carcinoma. *World Journal of Hepatology* 2013;5:345-52.

Zhou H, Ortiz-Pallardo ME, Ko Y, Fischer HP. Is heterozygous alpha-1-antitrypsin deficiency type PIZ a risk factor for primary liver carcinoma? *Cancer* 2000;88:2668-76.

7 Verzeichnis der Abkürzungen

BSA	Bovines Serumalbumin
CAR	Chimärer Antigenrezeptor
CARD	<i>Caspase recruitment domain</i>
CD95	APO-1 / FAS-Rezeptor
c-MET	Cellular-met
CTLA4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated pProtein 4</i>
DC	Dendritischen Zellen
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxide
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
ELISA	<i>Enzym-linked immunosorbent aAssay</i>
FCS	Fetales Kälberserum
FRET	Förster-Resonanzenergietransfers
FSC	Vorwärtsstreulicht
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
HBsAg	HBV-Oberflächenantigen
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis-C-Virus
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i>
i.p.	Intraperitoneal
IFN β	Interferon β
IFN γ	Interferon γ
IPS-1	<i>IFN-β promoter stimulator 1</i>
IRF-3	<i>IFN regulatory factor 3</i>
ISG	Interferon-stimulierende Gene

IVT	<i>In-vitro</i> -Transkription
LGP2	<i>Laboratory of Genetics and Physiology 2</i>
Lipofectamine	Lipofectamine®RNAiMAX
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MDA5	<i>Melanoma differentiation-associated gene 5</i>
MEM-NEAA	Minimum essential medium non essential amino acids
mRNA	<i>Messenger-RNA</i>
NASH	Nicht-alkoholische Steatohepatitis
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
OH-c-MET	siRNA mit C-MET-Sequenz
OH-RNA	Unspezifische siRNA
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
pIRF-3	IRF-3 (phosphoryliert)
poly:IC	<i>Polyinosinic-polycytidylic acid</i>
ppp-c-MET	Doppelsträngige 5' Triphosphat-RNA mit c-MET Sequenz
ppp-RNA	Doppelsträngige 5' Triphosphat-RNA
qRT-PCR	Quantitative <i>Real-time</i> -Polymerasekettenreaktion
RFA	Radiofrequenz-Thermoablation
RIG-I	<i>Retinoic acid-inducible gene 1</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RLH	<i>RIG-I-like helicases</i>
s.c.	Subkutan
siRNA	<i>Short interfering RNA</i>
SSC	Seitwärtsstreulicht
TACE	Transarterielle Chemoembolisation
TLR	Toll-like-Rezeptor

8 Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1: Aufbau von RLH-Rezeptoren	8
Abbildung 2: RIG-I und MDA5 Signalkaskade.....	10
Abbildung 3: c-MET-Signalkaskade in einer Tumorzelle	13
Abbildung 4: 5'-Triphosphat-modifizierte siRNA und zelluläre Wirkungsweise. 17	
Abbildung 5: RLH-Signalkaskade in Hepa1-6 Zellen nach ppp-RNA Transfektion.....	39
Abbildung 6: CXCL10-Konzentrationen im Überstand von Hepa1-6 Zellen	40
Abbildung 7: CD95-Expression auf Hepa1-6 Zellen nach ppp-RNA Stimulation	41
Abbildung 8: Zellvitalität der Hepa1-6 Zellen nach ppp-RNA-Transfektion.....	42
Abbildung 9: Genexpressionshemmung von c-MET mittels siRNA in Hepa1-6 Zellen.	43
Abbildung 10: Einfluss der c-MET Genexpressionshemmung auf die Zellvitalität von Hepa1-6 Zellen.	44
Abbildung 11: Effektivität der c-MET Genexpressionshemmung durch ppp-modifizierte und unmodifizierte siRNA.	45
Abbildung 12: RIG-I-vermittelte Immunstimulation durch ppp-c-MET.....	46
Abbildung 13: Einfluss von ppp-c-Met auf die Zellvitalität und Apoptoseinduktion von Hepa1-6 Zellen.	48
Abbildung 14: Abbruchversuch nach Therapie von C57BL/6 Mäusen mit orthotopen Hepa1-6 Tumoren mit immunaktiver RNA.....	49
Abbildung 15: Abbruchversuch nach zweimaliger Therapie von C57BL/6 Mäusen mit orthotopen Lebertumoren mit immunaktiver RNA.....	50
Abbildung 16: Konfokal-mikroskopische Aufnahmen orthotoper Lebertumore nach Therapie mit immunaktiver RNA.....	52

9 Danksagung

Zunächst möchte ich mich herzlichst bei meinem Doktorvater Prof. Max Schnurr für die Überlassung dieses interessanten Themas, die immerwährende Unterstützung und die freundschaftliche Zusammenarbeit bedanken. Des Weiteren gilt ein besonderer Dank Dr. Peter Düwell, Dr. Stephanie Schievenbusch, Dr. Lars König und Dr. Tina Adunka für die langjährige Betreuung und Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten. Ich möchte auch meinen Mitdoktoranden, vor allem Laura Posselt, für die tatkräftige Unterstützung danken. Ich habe die Zeit in der AG Schnurr sehr genossen und bin dankbar für die kollegiale Zusammenarbeit und den Spaß, den wir im und um das Labor hatten.

Weiterhin möchte ich mich bei Prof. Stefan Endres für die Aufnahme in die Abteilung für Klinische Pharmakologie bedanken. Ohne die wissenschaftliche und materielle Förderung im Rahmen des DFG Graduiertenkollegs 1202 „Oligonukleotide in Zellbiologie und Therapie“ wäre mir eine experimentelle Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen.

Ich danke ebenso meiner Familie und meinen Freunden für ihre emotionale Unterstützung und ihr Vertrauen.

Eidesstattliche Versicherung

Lazic, Igor

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Immuntherapie des hepatozellulären Karzinoms mit 5'-Triphosphat-modifizierter siRNA

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.

München, 13.04.2017

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand