

Aus der Medizinischen Klinik und Polyklinik IV
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Martin Reincke

Ligandenvermittelter Gentransfer in Tumorzellen mittels synthetischer
Gentransfervektoren unter Anwendung einer Hitzeschockbehandlung

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München
vorgelegt von
Astrid Brüggemann
aus
München
2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Christine Spitzweg

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Lars Lindner

Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter: Univ.-Prof. Dr. Manfred Ogris
Dr. rer. nat. Joana Viola

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

Tag der mündlichen Prüfung: 28.11.2019

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| 1. Abkürzungsverzeichnis..... | 2 |
| 2. Einleitung..... | 3 |
| 2.1 Krebs in Deutschland..... | 3 |
| 2.2 Verwendete Therapiekonzepte in der Onkologie..... | 3 |
| 2.3 Hyperthermie..... | 4 |
| 2.4 Hsp70 als mögliche Ursache für die Wirkung der Hyperthermie..... | 5 |
| 2.4 Gentherapie..... | 6 |
| 2.5 Ziel dieser Arbeit..... | 7 |
| 3. Materialien und Methoden..... | 8 |
| 3.1 Materialien..... | 8 |
| 3.2 Methoden..... | 9 |
| 3.2.1 Zellkultur..... | 9 |
| 3.2.2 Mikroskop..... | 10 |
| 3.2.3 Zählen der Zellen..... | 10 |
| 3.2.4 Wasserbad..... | 10 |
| 3.2.5 Hitzeschock..... | 10 |
| 3.2.6 Durchflusszytometrische Analyse (FACS)..... | 11 |
| 3.2.7 DNA-Miniprep..... | 12 |
| 3.2.8 Transfektion..... | 12 |
| 3.2.9 Luciferase-Assay..... | 13 |
| 4. Ergebnisse..... | 14 |
| 4.1 Hitzeschock: Verschiedene Wasserbäder..... | 14 |
| 4.2 Sichtbare Auswirkung der Hitzeschockbehandlung..... | 16 |
| 4.2.1 CT-26..... | 16 |
| 4.2.2 ST007..... | 17 |
| 4.3 Durchflusszytometrische Analyse | 18 |
| 4.3.1 Vergleich verschiedener Mischtechniken | 18 |
| 4.3.2 CT26 | 19 |
| 4.3.3 ST007..... | 21 |
| 4.4 Transfektion..... | 22 |
| 4.4.1 CT26..... | 22 |
| 4.4.2 ST007..... | 23 |
| 5. Diskussion..... | 24 |
| 5.1 Hyperthermie in Kombination mit Gentherapie..... | 24 |
| 5.2 Hsp70 als Target..... | 24 |
| 5.4 Herausforderungen der Methodenwahl..... | 25 |
| 5.4.1 Zellkultur..... | 25 |
| 5.4.2 Mischmethoden..... | 26 |
| 5.4.3 Hyperthermiebehandlung..... | 26 |
| 6. Zusammenfassung..... | 27 |
| 7. Anhang..... | 29 |
| 7.1 Danksagung..... | 29 |
| 7.2 Eidesstattliche Versicherung | 30 |
| 7.3 Quellen..... | 31 |

1. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------|--|
| °C | Grad Celsius |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| Da | Dalton |
| DAPI | 4',6-Diamidino-2-phenylindol |
| DMEM | Dulbeccos modified Eagle-Medium |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| FACS | Fluorescent-activated cell scanning / Durchflusszytometrie |
| FCS | Fötales Kälberserum |
| h | Hours, Stunden |
| HBG | HEPES-buffered glucose / HEPES-gepufferte Glucose |
| HEPES | 4-(2-hydroxyethyl)-1-Piperazinethanesulfonsäure |
| Hsp70 | 70 kD Hitzeschockprotein |
| IgG1 | Immunoglobulin G1 |
| l | Liter |
| LAR | Luciferaseassay-Reagenz |
| LPEI | Lineares Polyethylenimin |
| mg | Milligramm |
| mHsp70 | Membranständiges Hsp70 |
| min | Minuten |
| ml | Milliliter |
| N/P ratio | Verhältnis von LPEI-Stickstoff zu DNA-Phosphat in Mol |
| FITC | Flouresceinisothiocyant |
| nm | Nanometer |
| PBS | Phosphate buffered saline / phosphatgepufferte Salzlösung |
| PEG | Polyethylenglycol |
| PFA | Paraformaldehyd |
| RLU | Relative light units / relative Lichteinheiten |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| rpm | Revolutions per minute / Umdrehungen pro Minute |
| RPMI medium | Roswell Park Memorial Institute-Medium |
| µg | Mikrogramm |
| µl | Mikroliter |

2. Einleitung

Der Anteil der Menschen in Deutschland, die an Krebs sterben, steigt. Umso wichtiger ist es, neue Therapiestrategien zu entwickeln, die gegen möglichst viele verschiedene Arten von Krebs wirksam sind.

2.1 Krebs in Deutschland

Im Jahr 1980 war in Deutschland bei 20,2% aller Todesfälle Krebs die Ursache, im Jahr 2014 war das bereits bei 25,8% der Fall, also etwa bei einem Viertel mehr. Über die Zeit davor lassen sich nur ungenaue Aussagen treffen, da erst seit den achtziger Jahren verlässliche Daten zur Verfügung stehen. Es ist jedoch anzunehmen, dass dieser Anstieg schon deutlich länger erfolgt, da er in direktem Verhältnis zur Lebenserwartung steht.

| Gestorbene: Deutschland, Jahre, Todesursachen | | |
|--|---------|---------|
| Todesursachenstatistik Deutschland Gestorbene (Anzahl) | | |
| Todesursachen | Jahr | |
| | 1980 | 2014 |
| Insgesamt | 952 356 | 868 356 |
| Bösartige Neubildungen (BN) | 192 719 | 223 758 |

Todesursachen:
Die ausgewählten Todesursachen ermöglichen einen zeitlichen Vergleich nach der Umstellung der ICD-Systematik (1980-1997 ICD9, ab 1998 ICD-10).
'Insgesamt' enthält die Angaben zu allen Gestorbenen eines Berichtsjahres.

© Statistisches Bundesamt, Wiesbaden 2016 | Stand: 13.08.2016 / 13:14:46

Die Zurückdrängung tödlich verlaufender Infektionskrankheiten, die bessere Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen und die daraus resultierende Rektangularisierung der Lebenserwartungskurve lassen außerdem vermuten, dass sich diese Entwicklung noch fortsetzen wird.

2.2 Verwendete Therapiekonzepte in der Onkologie

Die Behandlung einer Krebserkrankung besteht in der Regel aus einer Kombination verschiedener Methoden, die an die Tumorart, das Stadium und den Patienten angepasst wird. Die drei Hauptsäulen sind Chirurgie, Chemotherapie und Strahlenbehandlung. Hinzu kommen bei

bestimmten Tumorentitäten noch neuere Therapieformen wie Antikörpertherapie, antihormonelle Therapie, Zytokintherapie oder Stammzelltransplantation. Die Problematik ist jedoch meist, dass nur in frühen Tumorstadien und bei sonst eher gesunden Patientinnen die Tumore kurativ behandelt werden können. Um die Zahl dieser Patienten zu erhöhen, werden Früherkennungsprogramme durchgeführt. Für ältere, multimorbide Patienten oder auch bei fortgeschrittenen Tumorstadien werden zwar ähnliche Methoden verwendet, jedoch nicht mehr mit dem Ziel der Heilung, sondern mit dem Ziel der Verlängerung des Lebens unter Berücksichtigung der Lebensqualität. Dementsprechend kommen manche Therapien wegen ihrer Nebenwirkungen nicht mehr in Frage oder können nur noch in verminderter Intensität durchgeführt werden.

Insofern liegt bei der Entwicklung neuer Therapieformen der Fokus nicht mehr nur auf der Effektivität, sondern auch auf der Verträglichkeit für den Patienten.

2.3 Hyperthermie

Eine weitere, zunehmend angewandte Therapiemöglichkeit ist die Hyperthermie. Mittels Mikrowellen, eines Magnetfelds oder warmer Lösungen wird die Temperatur in und um den Tumor auf 40-45°C erhöht. Bei diesen Behandlungen zeigte sich, dass es eine Schwellentemperatur von ca. 42,5°C gibt. Oberhalb dieser Grenze wirkt die Wärme zytotoxisch, unterhalb im Wesentlichen sensibilisierend für einen weiteren Bestandteil der Therapie, z.B. Chemotherapie oder Bestrahlung. Auf diese Weise können beispielsweise Chemoresistenzen überwunden werden. Tumorarten, die mit Erfolg mit Hyperthermie behandelt wurden, sind beispielsweise pädiatrische Knochen-, Weichteil- und Keimzelltumore, Zervixkarzinome, Ovariakarzinome und oberflächliche Blasenkarzinome.¹

Eine seit kurzem routinemäßig in bestimmten Zentren angewandte Therapie ist die Behandlung mit HIPEC (hypertherme intraperitoneale Chemotherapie) zur Behandlung bestimmter Peritonealkarzinosen. Nach chirurgischer, möglichst vollständiger Entfernung der Tumormasse aus dem Bauchraum wird hierbei das Peritoneum mit erhitzter Chemotherapeutika-Lösung gespült.²

Auch in der Behandlung von Sarkomen konnte im Rahmen einer Phase III-Studie gezeigt werden, dass Chemotherapie in Kombination mit Hyperthermie zu besseren Ergebnissen führt als alleine. Hierbei erfolgte die Temperaturerhöhung mittels Mikrowellen.^{3,4}

Hyperthermiebehandlungen werden - vor allem im Vergleich zu anderen Krebstherapien - von den meisten Patienten gut vertragen. Mögliche Nebenwirkungen sind Schmerzen, insbesondere durch Miterwärmung von nicht tumorösem Gewebe, daraus resultierenden Ödemen und Verbrennungen.⁵ Die Resistenz des menschlichen Körpers gegenüber Erwärmung ist dadurch zu erklären, dass eine

Erhöhung der Körpertemperatur in vielen physiologischen Situationen ebenfalls auftritt, beispielsweise beim Sport. Dabei werden Temperaturen von bis zu 40°C erreicht.⁶

Als Ursachen für die Wirksamkeit einer Temperaturerhöhung in der Tumorbehandlung werden eine Hemmung der DNA-Reparatur im Tumor, die Hitzeempfindlichkeit hypoxischer oder S-Phase-Zellen und die verbesserte Reoxygenierung des Tumors durch Erhöhung der Perfusion gesehen.¹

Die Idee zu Hyperthermiebehandlungen entstand aus Einzelfallberichten zu Tumorremissionen nach fieberhaften Infekten. Eine vor der Entwicklung der Chemotherapie verwendete Krebstherapie war daher die Fiebertherapie, bei der dem Patienten bakterielle Toxine injiziert wurden, bis eine Fieberreaktion auftrat. Der auf diesem Forschungsgebiet sehr aktive William B. Coley, der den Toxinen auch seinen Namen lieh, konnte auf diese Weise über Therapieerfolge bis hin zu vollständigen Remissionen berichten. Andere Ärzte berichteten dagegen von einer sehr unzureichenden Wirksamkeit. Zu dieser Diskrepanz hat vermutlich beigetragen, dass Coley selbst ca. 15 verschiedene und wohl auch verschieden wirksame Toxine verwendete, und auch die Injektionsorte und -Techniken nicht standardisiert waren.⁷ Im Jahr 1962 verweigerte die FDA, die amerikanische Zulassungsbehörde für Medikamente, die Anerkennung, sodass Coley's toxins nicht mehr angewendet wurden.⁸

2.4 Hsp70 als mögliche Ursache für die Wirkung der Hyperthermie

Eine weitere mögliche Ursache für die Wirksamkeit der Hyperthermiebehandlung ist die Expression des Hitzeschockproteins 70 auf der Oberfläche von Krebszellen. Seit etwa 20 Jahren ist bekannt, dass Zellen der unterschiedlichsten Krebsarten Hsp70 auf ihrer Oberfläche exprimieren.⁹ Dieses Protein wird physiologisch in fast allen Mammalia exprimiert und auch bei Pflanzen gibt es Äquivalente. Als Chaperon dient es gemeinsam mit Co-Chaperonen und weiteren Proteinen dazu, fehlgefaltete oder durch äußere Einflüsse denaturierte Proteine wieder in ihre native Form zurückzubringen. In gesunden Zellen kommt es nur intrazellulär vor.¹⁰ Dadurch, dass es somit ein Unterscheidungsmerkmal zwischen gesunden und Krebszellen liefert, ist es ein Ansatzpunkt für zielgerichtete Therapien. Hitzeschock oder andere zelluläre Stressfaktoren können sowohl die intrazelluläre, als auch bei Krebszellen die membranständige Expression erhöhen.¹¹ Zusätzlich zur Proteinreparatur scheint Hsp70 noch weitere Funktionen zu erfüllen. In vitro konnte gezeigt werden, dass es die Antigenpräsentation an T-Zellen unterstützt.^{12,13} Auf diese Weise könnte eine Erhöhung der Körpertemperatur das Immunsystem stärken und es dabei gezielt gegen den Krebs lenken.

2.4 Gentherapie

Eine weitere Therapiemöglichkeit, deren erste Vertreter in den letzten Jahren die Zulassung erreicht haben, ist die Gentherapie. Die erste Zulassung weltweit eines Gentherapeutikum erfolgte 2003 in China, wo Gendicine¹⁴ zur Therapie von bestimmten HNO-Tumoren zugelassen wurde, 2005 gefolgt von Oncorine¹⁵ für den selben Bereich. In der EU zur Krebstherapie zugelassen ist aktuell die Therapie mit Talimogen laherparepvec¹⁶ bei malignem Melanom, in den USA werden Tisagenlecleucel¹⁷ und Axicabtagen Ciloleucel¹⁸ bei bestimmten Lymphomen verwendet. Bei den genannten Therapien wird entweder ein viraler Vektor in den Patienten eingebracht, der die gewünschte genetische Veränderung überträgt und selbst tumorlytisch wirkt, oder bereits von einem viralen Vektor entsprechend veränderte Lymphozyten des Patienten diesem zurückgegeben.

Virale bzw. biologische Vektoren haben den Vorteil, dass bereits bestehende Systeme zum DNA/RNA-Transport in Zellen genutzt werden können. Nachteile hiervon sind, dass bereits durch den Vektor selbst schwer zu beherrschende Immunreaktionen auftreten können. Bei in das Genom integrierenden Viren treten potentiell durch unerwartete Erbgutveränderungen Zweitkarzinome im Verlauf auf, die Menge der transportierten Information ist begrenzt und die Wirkung des Vektors ist systemisch, sodass die Spezifität in die transportierte Information gelegt werden muss.

Daher wurden andere, nicht-virale Methoden entwickelt, um Erbinformation in die Zielzellen zu transportieren. Der Vorteil hierbei ist, dass die Vektoren präzise optimiert werden können, wodurch das Targeting verbessert werden kann. Außerdem sind die Vektoren einfacher in großen Mengen herzustellen und es treten keine unerwarteten Wirkungen von viralen Proteinen oder Wechselwirkungen mit Virus-Erbinformation auf. Die Herausforderungen sind das Umgehen der körpereigenen Abbauprozesse, der Transport der Erbinformation an einen Ort der Zelle, an dem Replikation und Expression erfolgt, bei gleichzeitig möglichst geringer allgemeiner Toxizität.¹⁹

Die aktuell erfolgsversprechendsten nicht-viralen Vektoren sind kationische Polymere und Lipide/Liposomen. Bei der Verwendung von Lipiden werden mit den zu transportierenden Nukleinsäuren und eventuell weiteren für die Transfektion notwendige Stoffen sogenannte Lipoplexe gebildet und die Nukleinsäure dadurch effizient und vor Nukleasen geschützt in die Zelle transportiert. Als kationisches Polymer dient oft lineares Polyethylenimin, welches zur Modifikation an weitere Substanzen gebunden werden kann und mit der Nukleinsäure (DNA oder RNA) Polyplexe formt. Hier können als Liganden direkt Proteine oder Peptide gekoppelt werden, die an bestimmte Merkmale auf der Zelloberfläche binden und somit die Transfektion auf Zellen mit diesem Merkmal konzentrieren.^{20,21}

2.5 Ziel dieser Arbeit

Eine Möglichkeit, die Methoden der Hitzeschocktherapie und der Gentherapie zu verknüpfen, ist es, die Krebszellen mit einem Gentransfervektor zu behandeln, der so adressiert ist, dass die DNA spezifisch von Krebszellen aufgenommen wird, die das Hsp70-Protein auf ihrer Oberfläche exprimieren.

In dieser Arbeit wurde als DNA-bindenden Teil des Vektors lineares Polyethylenimin (LPEI) verwendet, das, um seine Toxizität zu vermindern, an das Polymer Polyethylenglykol (PEG) gekoppelt war. An das distale Ende des Polyethylenglykols war das sogenannte FELS-Peptid gekoppelt, das an membranständiges Hsp70 (mHsp70) binden sollte. Dieses Konjugat war bereits im Labor vorhanden, in dieser Arbeit sollte nun seine Eignung für den HSP70-spezifischen Gentransfer geprüft werden. Dafür musste zunächst eine Möglichkeit der Hitzeschockbehandlung für die Zellen *in vitro* etabliert werden, um die Hsp70-Expression kontrolliert zu erhöhen. Dies wurde mittels Durchflusszytometrie überprüft. Danach wurde in Transfektionsexperimenten die Wirksamkeit des Konjugats getestet .

3. Materialien und Methoden

3.1 Materialien

| Bezeichnung | Firma |
|---|--|
| ATP (Adenosine-5 ^{''} -triphosphate) | Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland) |
| cmHsp70.1-FITC Antikörper | Erhalten von Prof. Dr. rer. nat. Gabriele Multhoff ⁶ |
| CT26, murine Kolonkarzinom-Zelllinie | ATCC CRL 2638; erhalten von Prof Gabriele Multhoff |
| Cyan TM ADP Durchflusszytometer | Dako (Hamburg, Deutschland) |
| DAPI | MP Biomedicals (Eschwege, Deutschland) |
| FACS-Puffer | PBS mit 10% FCS |
| FITC Mouse IgG1 Antikörper | BioLegend (Fell, Deutschland) |
| H2O | Millipore System |
| HBG | 20 mM HEPES pH 7.4, 5 % Glucose |
| HEPES | Biomol (Hamburg, Deutschland) |
| LAR | 1 mmol Glycyglycin pH 8, 0.1 mmol MgCl ₂ , 0.01 mmol EDTA pH 8, 50.8 mg DTT, 27.8 mg ATP, 0.5 ml Co-Enzym A (42.6mg/ml), H ₂ O auf 100 ml |
| LPEI | Synthetisiert von Wolfgang Rödl ¹⁷ |
| LPEI-Konjugate: LPEI-PEG, LPEI-PEG-Fels, LPEI-PEG-scFels | Synthetisiert von Silvia Katharina Laube ¹⁸ PEG-yliertes LPEI, zusätzlich gekoppelt an ein Peptid mit der Sequenz TKDNNLLGRFELSG, genannt FELS, das an mHsp70 bindet, zusätzlich gekoppelt an ein Kontrollpeptid mit identer Aminosäurezusammensetzung wie FELS, die aber in willkürlicher Reihenfolge angeordnet sind (scrambled) |
| Luciferin | Promega (Mannheim, Deutschland) |
| Luminometer Centro LB960 | Berthold Technologies GmbH & Co KG (Bad Wildbad, Deutschland) P |

| | |
|---|--|
| Lysepuffer | Promega (Mannheim, Deutschland) |
| Mikroskop | Zeiss Axiovert 200 |
| NaCl | Merck kGaA (Darmstadt, Deutschland) |
| PL-125-T2USB Temperatur-Messgerät | Voltcraft (Hirschau, Deutschland) |
| QIAprep Spin Miniprep Kit | Qiagen (Venlo, Niederlande) |
| S7-007, Lungenmelanom-Zelllinie vom Schwein | Erhalten von Prof. Wanke, LMU München ¹⁹ |
| Summit Software | Summit (Jamesville, NY, USA) |
| Trockenschrank, Modell 5000 | Fa. Memmert (Schwabach, Deutschland) |
| Wasserbad Julabo A3 | Julabo (Seelbach, Deutschland) |
| WinMDI 2.9 Software | Joe Trotter, The Scripps Institute, Flow Cytometry Core Facility |
| Zellkulturplatten | Nunc™ (Wiesbaden, Deutschland) TPP (Trasadingen, Schweiz) |

Alle weiteren Chemikalien kamen von Sigma Aldrich (München, Deutschland), alle weiteren Zellkulturmaterialien von der Biochrom AG (Berlin, Deutschland).

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

Die murine Kolonkarzinomlinie CT26 wurde in Zellkulturflaschen in Roswell Park Memorial Institute-Medium (RPMI-Medium) mit 10% fötalem Kälberserum (FCS), L-Glutamin und Antibiotika bei 37°C und 5%CO₂ in wasserdampfgesättigter Luft kultiviert. Nach zwei bis vier Tagen, wenn ungefähr 90% Konfluenz erreicht waren, wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend für eine Minute durch eine Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst. Um die Reaktion zu beenden, wurde das beschriebene Zellkulturmedium zugegeben. Nun wurden die Zellen entweder weiter in Zellkulturflaschen kultiviert oder in Mikrotiterplatten ausgesät.

Die Schweinemelanomzelllinie S7-007 wurde ebenfalls in Zellkulturflaschen, aber in Dulbeccos modified Eagle-Medium (DMEM) mit 1% Glucose, 10% FCS, L-Glutamin und Antibiotika bei 37°C und 5%CO₂ in wasserdampfgesättigter Luft kultiviert. Da porcine Zellen potentiell endogene Retroviren enthalten können, wurde unter S2-Bedingungen gearbeitet. Nach 4 bis 7 Tagen, bei einer Konfluenz von ungefähr 80%, wurden die Zellen mit PBS gewaschen und zwei Minuten lang mit Trypsin/EDTA-Lösung behandelt, bis sie sich vom Untergrund lösten. Zum Beenden der Reaktion wurde das beschriebene Zellkulturmedium zugegeben und die Zellen weiter kultiviert oder ausgesät.²²

3.2.2 Mikroskop

Um die Zellen zu beurteilen, zu beobachten oder zu zählen wurden sie regelmäßig mit dem Mikroskop betrachtet und auch zu Dokumentationszwecken fotografiert.

3.2.3 Zählen der Zellen

Die Zellen wurden mit Hilfe einer Zählkammer nach Neubauer gezählt. Die Zählkammer wurde mit etwa 20µl der bei sehr hoher Zellkonzentration eventuell verdünnten und zuvor vorsichtig aufgeschüttelten Zellsuspension beschickt. Unter dem Mikroskop wurden sechs Gruppenquadrate ausgezählt, die ermittelte Zellzahl durch 6 geteilt und anschließend mit dem Kammerfaktor 5000 multipliziert, um die Zahl der Zellen pro Milliliter zu erhalten.

3.2.4 Wasserbad

Um die Tauglichkeit eines Wasserbades für die Verabreichung eines subletalen Hitzeschocks festzustellen, wurde das betreffende Wasserbad gesäubert, neu befüllt und auf eine Temperatur zwischen 40 und 50°C eingestellt. Nach einer Einlaufzeit von mehreren Stunden bis zu einer Nacht wurde über mindestens zwei Stunden im Minutenabstand mit dem Temperatur-Messgerät die Wassertemperatur aufgezeichnet, um das Ausmaß von Temperaturschwankungen festzustellen.

3.2.5 Hitzeschock

Die Zellen wurden wie oben beschrieben gewonnen und je nach weiterer Verwendung in 6-well-plates (CT26: 100 000 Zellen/well, S7-007: 300 000 Zellen/well) oder 96-well-plates (CT26: 5000 Zellen/well, S7-007: 9000 Zellen/well) ausgesät. Nachdem die Zellen etwa 36 Stunden angewachsen waren, wurden die Mikrotiterplatten mit Parafilm luftdicht verschlossen. Die Kontrollen wurden wieder in den Brutschrank gestellt, die behandelten Platten zusätzlich in eine wasserdichte Plastiktüte (Gefrierbeutel) verpackt und mit Hilfe eines Ständers und eines Gewichts so im Wasserbad positioniert, dass sie von allen Seiten mit Wasser umspült waren. Während der Hitzeschockbehandlung wurde regelmäßig die Wassertemperatur mit einem Thermometer mit einer Auflösung von 0,1°C geprüft und gegebenenfalls nachreguliert. Zieltemperatur war dabei 42°C. Nach zwei Stunden wurden die Platten aus dem Wasserbad bzw. Brutschrank genommen und der Parafilm sowie gegebenenfalls der Beutel entfernt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, um den Einfluss des Mediums, in dem möglicherweise durch die Hitzebehandlung veränderte Bestandteile vorhanden waren, zu minimieren. Anschließend wurden die Zellen mit frischem Medium versorgt und weitere 16 Stunden bei 37°C im Brutschrank bebrütet.

3.2.6 Durchflusszytometrische Analyse (FACS)

Die Zellen wurden wie oben beschrieben gewonnen und in 6-well-plates ausgesät, CT26-Zellen mit einer Dichte von 100 000 Zellen/well, S7-007-Zellen mit einer Dichte von 300 000 Zellen/well. Jede Analyse wurde in Triplikaten durchgeführt, zu jeder Probe gab es zwei Kontrollen mit Zellen aus demselben well, die jeweils entweder gar nicht gefärbt oder mit garantiert nicht-bindenden Antikörpern behandelt wurden. 16 Stunden nach der Hitzebehandlung, beziehungsweise 24 Stunden nach dem Aussähen wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit einer Trypsin/EDTA-Lösung von den Platten abgelöst. Da Trypsin die Zelloberfläche angreift, erfolgte die Trypsinierung so kurz wie möglich, bei CT26-Zellen maximal eine Minute, bei S7-007-Zellen maximal zwei Minuten, um das mHsp70 nicht zu beschädigen. Anschließend wurde die Reaktion durch die Zugabe von FACS-Puffer beendet. Die so erhaltenen Zellen wurden gezählt, jeweils 100 000 Zellen in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und fünf Minuten bei 1000 rcf zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und je nach Ziel der Analyse Anti-Hsp70-Antikörper in der indizierten Menge und Verdünnung oder 5µl Kontrollantikörperlösung dazugegeben. Gegebenenfalls wurde auf die Antikörperzugabe verzichtet. Anschließend wurden die Zellen mittels Ratschenaufgeschüttelt. Das ist ein Vorgang, bei dem das Reaktionsgefäß über ein Gitter gezogen wird (vergleichbar zur Tonerzeugung auf einer sog. ‚Sambagurke‘). Danach erfolgte eine Inkubation auf Eis für 30 Minuten. Um überschüssige Antikörper zu entfernen und die Zellen zu waschen, wurde dann etwa ein Milliliter FACS-Puffer dazugegeben und nochmals geratscht. Danach wurden die Zellen wieder fünf Minuten bei 1000rcf zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, durch einen Milliliter frischen FACS-Puffer ersetzt und die Röhrchen nochmals geratscht.

Zu den CT26-Zellen wurde dann direkt vor der Analyse 1µl 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) zugegeben und mit dem Vortex-Mischer gemischt, um tote Zellen kenntlich zu machen. S7-007-Zellen durften nicht lebend aus dem S2-Labor gelangen und mussten daher fixiert werden. Um auch hier die toten Zellen von den lebenden unterscheiden zu können, wurden die S7-007-Zellen nach der Antikörperfärbung nochmals 10 Minuten mit 1µl DAPI auf Eis inkubiert, gewaschen wie zuvor beschrieben und anschließend in einem Milliliter zweiprozentiger PFA-Lösung bei Raumtemperatur 15 Minuten fixiert. Um die Fixierungslösung zu entfernen, wurden die Zellen danach nochmals fünf Minuten bei 1000rcf zentrifugiert, mit einem Milliliter PBS resuspendiert und nochmals geratscht.

Beim Umfüllen in FACS-Röhrchen direkt vor der Messung wurden beide Zellreihen durch ein Sieb (cell strainer, Maschenweite 300µm) filtriert, um grobe Agglutinationen zu entfernen.

Die FITC-Fluoreszenz wurde bei 488nm angeregt und zwischen 530 und 540nm detektiert, DAPI-Fluoreszenz wurde bei 360nm angeregt und zwischen 440 und 450 nm detektiert.

3.2.7 DNA-Miniprep

Um Plasmid-DNA für die Transfektion (s.u.) zu erhalten, wurden mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit mehrere DNA-Minipreps durchgeführt. Das beiliegende Protokoll wurde dabei leicht abgewandelt: Die Übernacht-Bakterienkultur wurde acht anstelle von drei Minuten bei 4500rpm anstatt 8000rpm zentrifugiert, die Lyse der Bakterien dauerte nur maximal drei anstatt maximal fünf Minuten, um den Waschpuffer zu entfernen wurde zweimal anstatt einmal zentrifugiert und es wurden nur 30µl anstelle von 50µl Elutionspuffer verwendet.

3.2.8 Transfektion

Zur Transfektion wurden die Zellen in 96-well-plates ausgesät. CT26-Zellen wurden mit einer Zelldichte von 5000 Zellen/well gesät, S7-007-Zellen mit einer höheren Dichte von 9000 Zellen/well, da sie langsamer wachsen. Nach mindestens 24 Stunden im Brutschrank bzw. 16 Stunden nach der Hitzeschockbehandlung wurden die Zellen transfiziert.

Die für die Transfektion mit LPEI-Konjugaten als Vektor nötigen Polyplexe wurden durch Vermischung der Plasmid-DNA mit den Konjugaten in einem N/P-Verhältnis von sechs erzeugt. N/P bezieht sich auf die molaren Konzentrationen des im LPEI enthaltenen Stickstoffs (engl. Nitrogen) und das in der DNA enthaltene Phosphat.

Für CT26-Zellen wurden nach Vortests 200ng DNA/well verwendet, für S7-007-Zellen jeweils 400ng DNA/well.

Hierzu wurden DNA bzw. LPEI-Konjugate mit HBG (20 mM HEPES pH 7.4, 5 % Glucose) in einem Volumen von jeweils 10µl pro transfiziertem well verdünnt und die beiden Verdünnungen durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren miteinander vermischt. Anschließend wurde die Mischung zwanzig Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurde das verbrauchte Zellkulturmedium aus den wells entfernt und durch 80µl frisches Medium ersetzt. Danach wurden jeweils 20µl der Polyplex-Lösung in jedes well gegeben und die Zellen wieder bei 37°C und 100% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach weiteren vier Stunden wurde das Medium erneut gewechselt, da LPEI toxisch ist und nicht zu lange auf die Zellen einwirken darf. Vor der Auswertung wurden die Zellen weitere 24 Stunden im Brutschrank inkubiert.

3.2.9 Luciferase-Assay

Einen Tag nach der Transfektion (s.o.) wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, um das Medium vollständig zu entfernen und dann mit 10-fach verdünntem Lysepuffer, 100µl pro well, lysiert. Um alle Zellen zu zerstören, wurden die Platten zweimal bei -20°C eingefroren und wieder aufgetaut und anschließend der Boden der wells mit der Pipettenspitze abgekratzt. Da der

Lysepuffer auch die Luciferase angreift, wurde darauf geachtet, die lysierten Zellen nicht länger als 20 Minuten bei Raumtemperatur zu halten.

Zur Analyse wurden 30 μ l/well der lysierten Zellen in weiße 96-well-plates überführt und mit 100 μ l Luciferase-Assay-Reagenz (LAR)/well zuzüglich einem Milliliter zum Spülen und 250 μ l Luciferin pro 5ml LAR auf einem Centro LB960 Microplate Luminometer bei Raumtemperatur vermessen.

4. Ergebnisse

4.1 Hitzeschock: Verschiedene Wasserbäder

Zuerst wurde der Trockenschrank nach der oben beschriebenen Methode getestet. Nach Auswertung der Daten ergab sich folgende Kurve:

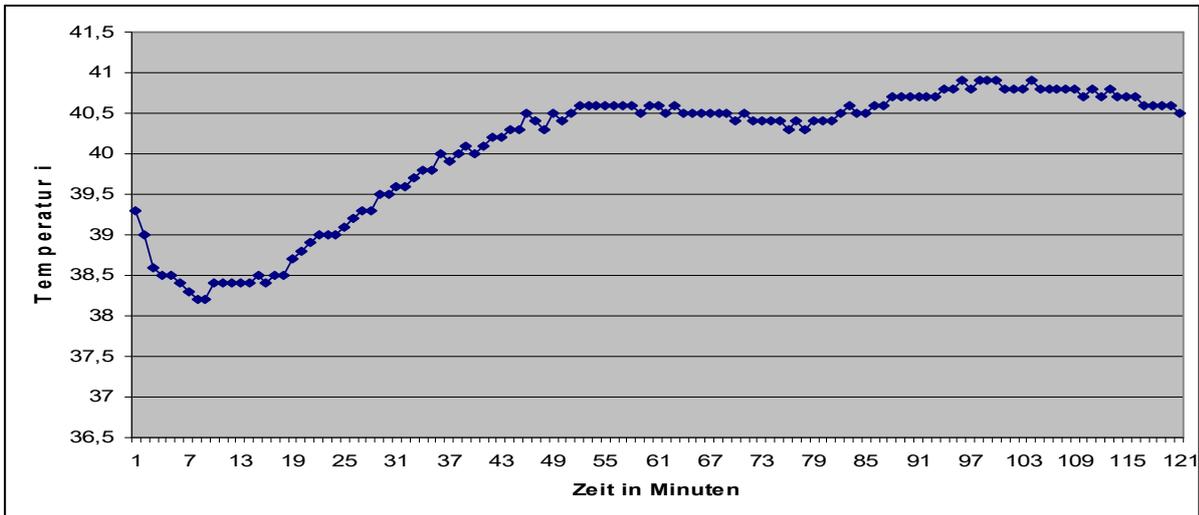


Abbildung 1: Temperaturkurve des Trockenschranks

Die Messung der Temperatur im Julabo A3-Wasserbad erbrachte folgendes Ergebnis:

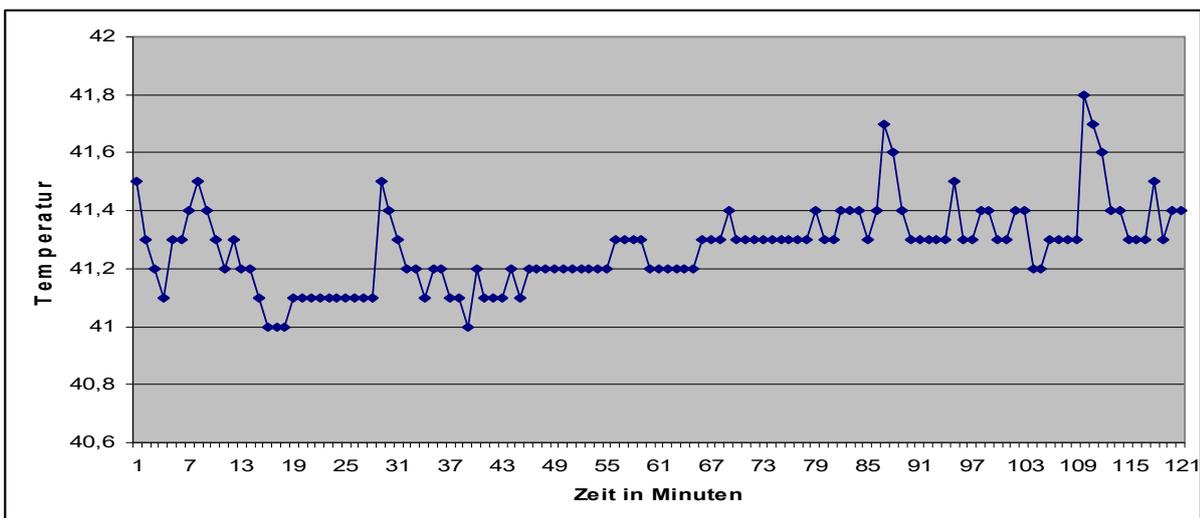


Abbildung 2: Temperaturkurve des Julabo A3 Wassebades (seitlich styroporverpackt, oben offen)

Um einen reproduzierbaren, subletalen Hitzeschock verabreichen zu können, musste das Wasserbad die Temperatur mit möglichst wenig Schwankungen über mindestens zwei Stunden halten können. Außerdem war eine möglichst genaue Temperatureinstellung, eine Möglichkeit, die Temperatur nachzuregeln und eine einfache Kontrollmöglichkeit notwendig.

Im Trockenschrank verlief die Temperaturkurve in langsamen Wellen, die jeweils ungefähr eine Stunde dauerten. Die maximale Temperaturdifferenz war dabei 2,7°C. Das im Trockenschrank stehende Wasserbad war von außen ohne Öffnen der Tür nicht mehr zugänglich.

Im Wasserbad von Julabo wurde die Temperatur in ca. fünfminütigen Abständen nachreguliert, die maximale Temperaturschwankungsbreite während des zweistündigen Messzeitraums betrug 0,8°C. Es war von oben offen zugänglich und hatte durch eine kontinuierliche Strömung eine gleichmäßige Temperaturverteilung.

Aus diesem Grund wurde das Wasserbad von Julabo ausgewählt, welches zusätzlich von unten und von der Seite mit Styropor isoliert war. Es wies von den zur Verfügung stehenden Wasserbädern die geringsten Temperaturschwankungen auf, die Temperatur konnte über zwei Regler sehr genau eingestellt und bei Bedarf nachreguliert werden und es war von oben zur Temperaturkontrolle zugänglich.

4.2 Sichtbare Auswirkung der Hitzeschockbehandlung

Auswirkungen des subletalen Hitzeschocks waren nur unmittelbar nach der Hitzebehandlung mikroskopisch sichtbar. Direkt nach dem Hitzeschock schienen die Zellen in die ersten Stadien der Apoptose einzugehen. Sie kugelten sich ab, zogen ihre Ausläufer ein und verloren an Adhäsion. Nach den 12 bis 16 Stunden Inkubationszeit, die dem Hitzeschock folgten, hatten sich die Zellen bereits erholt und waren zu ihrem ursprünglichen Aussehen zurückgekehrt (Abb 3, 4).

4.2.1 CT-26

Die CT26-Zellen waren vor Beginn des Hitzeschocks zu 90% konfluent, klein und spindelförmig. Direkt nach der Hitzebehandlung wirkten sie teilweise abgerundet, aber noch anhaftend. Dieser leichte Verlust der Adhäsion ist ein erstes Anzeichen für ein präapoptotisches Stadium. 16 Stunden nach der Behandlung waren die Zellen jedoch größtenteils wieder zurückgekehrt in ihre spindelförmige Form, die Zelldichte war nicht sichtbar verändert.

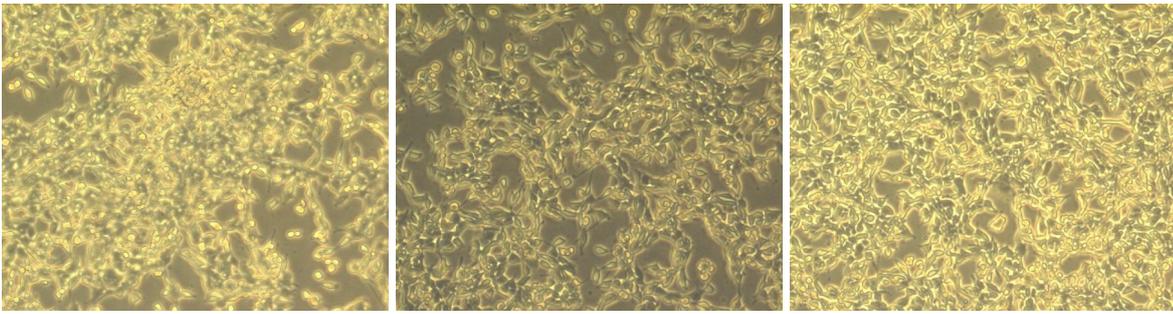


Abbildung 3a: CT26-Zellen vor dem Hitzeschock, 23.5, Passage 9

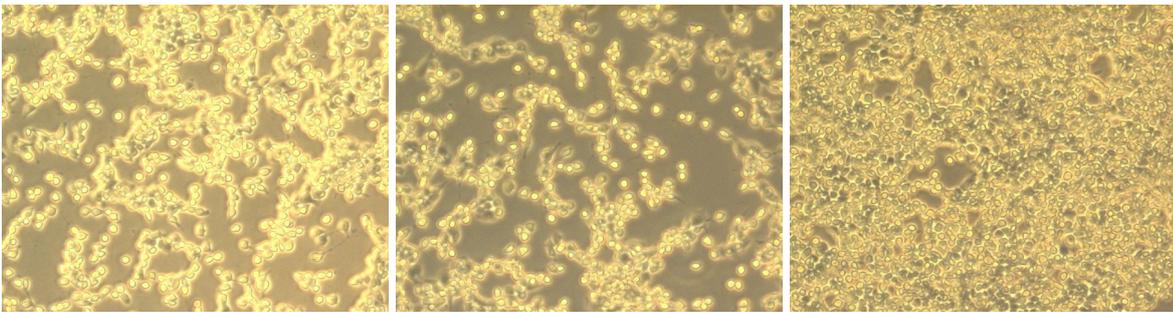


Abbildung 3b: CT26-Zellen direkt nach dem Hitzeschock (nach Mediumwechsel), 23.5, Passage 9

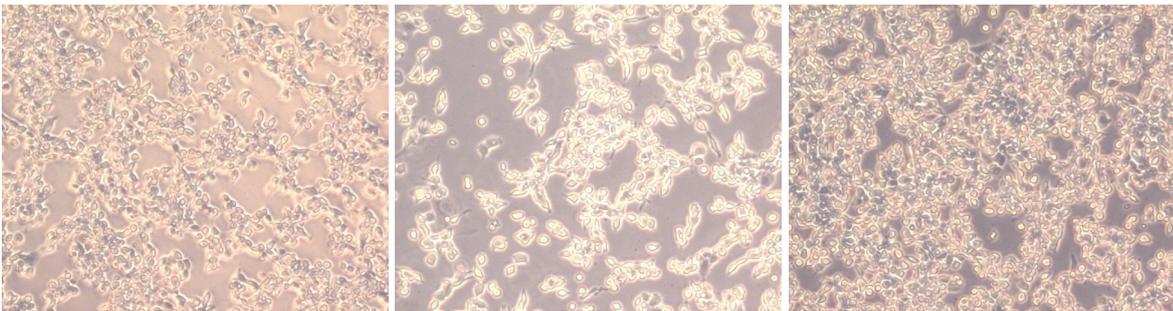


Abbildung 3c: CT26-Zellen ca 16h nach dem Hitzeschock, 24.5.12, Passage 9

4.2.2 ST007

Die ST007-Zellen waren vor Beginn der Hitzeschocks groß und flach, spindelförmig und besaßen teilweise sogar mehrere Ausläufer. Teilweise waren sie granuliert und nicht mehr anhaftend. Nach der Hitzebehandlung wirkten sie leicht abgerundet, die Zahl der Ausläufer war gesunken. Insgesamt war ihre Form immer noch spindelförmig. Nach weiteren 16 Stunden waren die Zellen größtenteils wieder zu ihrer vorherigen Form zurückgekehrt und waren wieder sehr flach. Wenige granuliert und nicht mehr anhaftende Zellen waren sichtbar. Die Zelldichte war nicht auffallend verringert.

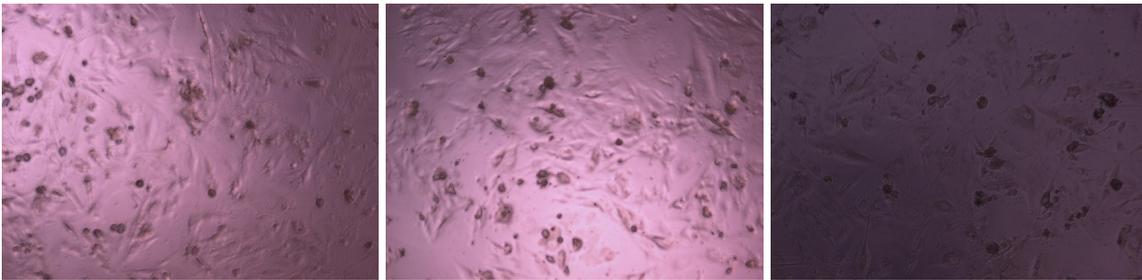


Abbildung 4a: ST007-Zellen unmittelbar vor dem Hitzeschock, 26.10.12, Passage 9

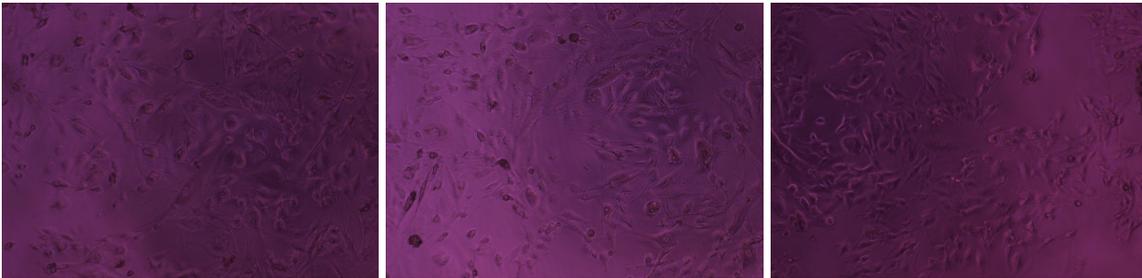


Abbildung 4b: ST007-Zellen direkt nach Hitzeschock und Mediumwechsel, 26.10.12, Passage 9



Abbildung 4c: ST007-Zellen ca 16h nach dem Hitzeschock, 27.10.12, Passage 9

4.3 Durchflusszytometrische Analyse

4.3.1 Vergleich verschiedener Mischtechniken

Im Zuge der FACS-Vortests mit CT26-Zellen wurden unterschiedliche Methoden evaluiert, um eine möglichst homogene Zellsuspension intakter Zellen zu erhalten. Übliche Methoden dazu sind Mischen mittels Vortex-Mischer und Ratschen, ein Vorgang, bei dem das Reaktionsgefäß mit der Zellsuspension über ein Gitter gezogen wird, ähnlich wie bei dem Musikinstrument Sambagurke.

Da sich in der Fachliteratur keine eindeutigen Vor- oder Nachteile finden ließen, wurden hier beide Methoden miteinander verglichen.

Dazu wurden mit obengenanntem FACS-Protokoll vorbereitete, ansonsten aber unbehandelte CT26-Zellen wahlweise entweder nur mittels Vortex-Mischer aufgeschüttelt oder nur geratscht, mit

Ausnahme des letzten Misch-Schrittes nach Zugabe von DAPI, der in einem anderen Raum stattfand und bei dem immer ein Vortex-Mischer verwendet wurde. Die Zellen wurden anschließend durchflußzytometrisch vermessen (Abb 5).

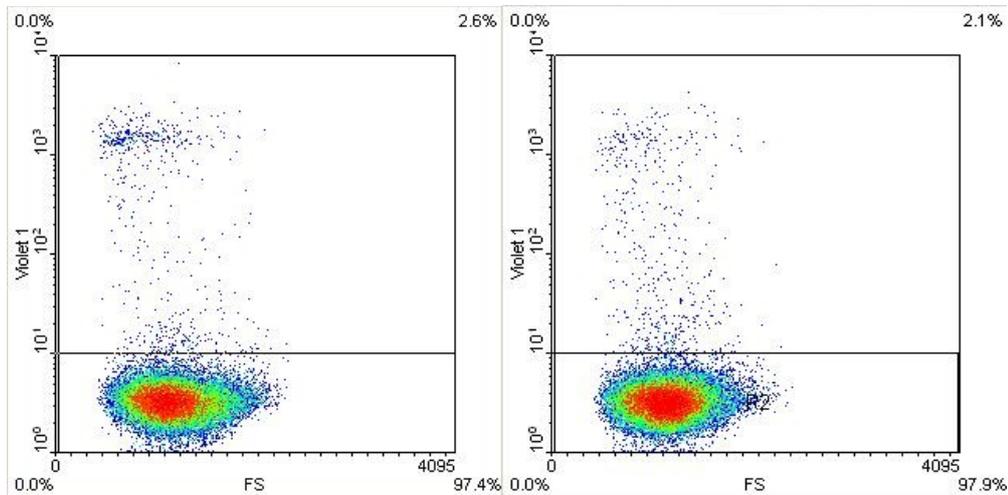


Abbildung 5a: Durchflußzytometrische Analyse unbehandelter CT26-Zellen

Links: Geratschte Zellen, Rechts: Mit dem Vortex-Mischer gemischte Zellen

Im Diagramm wird der Forward Scatter gegen die violette Fluoreszenz-Intensität dargestellt. Der Quadrant wurde so gewählt, dass der Prozentsatz der toten Zellen oben rechts abgelesen werden kann. Es wurden nur intakte Zellen (nach gating in FSC vs SSC) für die Analyse ausgewählt.

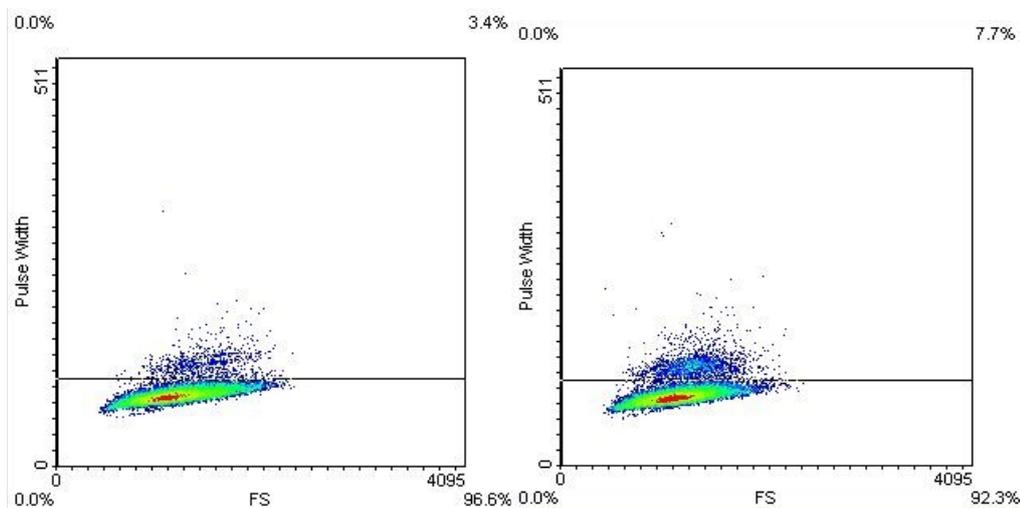


Abbildung 5b: Durchflußzytometrische Analyse unbehandelter CT26-Zellen

Links: Geratschte Zellen, Rechts: Mit Vortex-Mischer gemischte Zellen

Im Diagramm wird der Forward Scatter gegen die Pulsweite dargestellt. Der Quadrant wurde so gewählt, dass der Prozentsatz der zusammenhaftenden Zellen, sog. Dubletten, oben rechts abgelesen werden kann. Es wurden nur intakte und lebende Zellen für die Analyse ausgewählt.

Entgegen der verbreiteten Annahme, dass Ratschen schonender sei, zeigte sich hier, dass der Prozentsatz der toten Zellen, die nicht in die FACS-Analyse einbezogen werden konnten, beim Ratschen genauso hoch oder sogar höher war als beim Mischen mit dem Vortex-Mischer.

Der deutlichste Unterschied ergab sich bei der Auswertung der Pulsweite. Über diesen Parameter ist es möglich, zusammenhaftende Zellen zu erkennen. Beim Mischen mit dem Vortex-Mischer war der Anteil der Dubletten fast doppelt so hoch wie beim Ratschen, dies war wiederholt reproduzierbar. Ein niedriger Dublettenanteil war wichtig, da sich mit dem verwendeten Auswertprogramm die Dubletten nur schlecht herausfiltern lassen.

Basierend auf diesen Daten wurde die Methode des Ratschens für weitere FACS-Analysen gewählt.

4.3.2 CT26

Die Messungen am Durchflusszytometer wurden mit dem Ziel durchgeführt, unbehandelte und hitzebehandelte Zellen in Bezug auf die Expression des Hsp70.1-Hitzeschockproteins auf der Zelloberfläche zu vergleichen. Die CT26-Zellen dienten dabei als Vergleichszellen für die eventuell später auch im Rahmen von Tierversuchen zu verwendenden ST-007 Zellen.

Da die erwartete Veränderung nicht sehr groß war, wurden die einzelnen Versuchsgruppen mit jeweils vier Replikaten (n=4) durchgeführt.

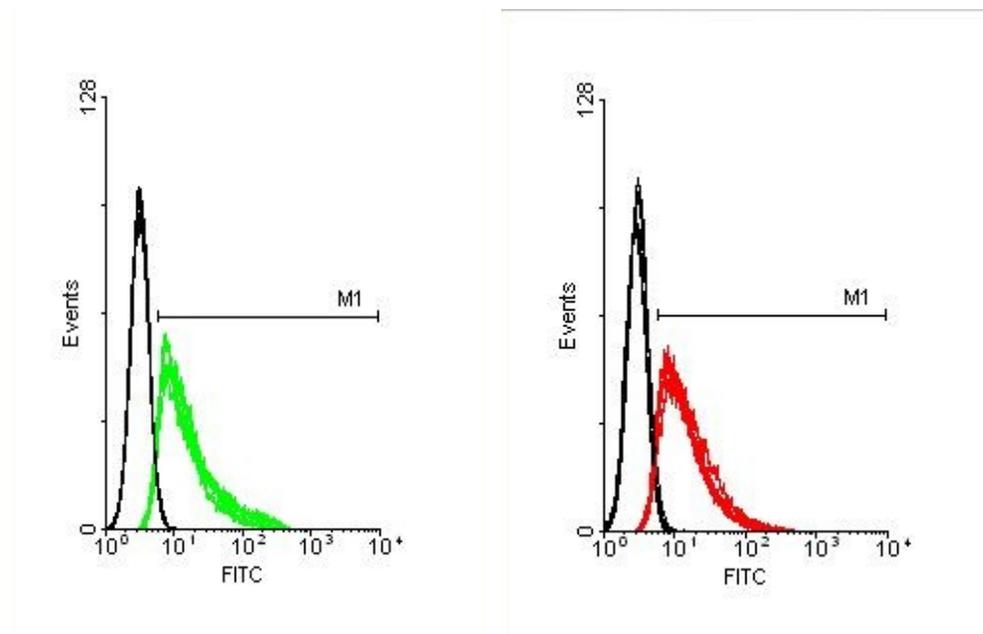


Abbildung 6: Durchflusszytometrische Analyse von mit dem FITC-markierten Hsp70.1-Antikörper gefärbten CT26-Zellen

Links: unbehandelte Kontrollzellen, Rechts: Hitzeschockbehandelte Zellen

Marker M1: Upper limit : 4095, Lower limit: 794

Im Diagramm wird die Fluoreszenzintensität auf dem FITC-Kanal dargestellt, die der Antikörperbindung entspricht. Die schwarzen Kurven stellen die Kontrollantikörperbindung dar. Es wurden nur intakte, lebende Zellen für die Analyse ausgewählt (Gating in FFC/SSC und DAPI/FSC).

Der Marker wurde so gesetzt, dass der kleinere x-Wert dem Wert entspricht, an dem der verlängerte, lineare Anteil des rechten Schenkels der Kurve der Kontrollantikörperbindung die Abszisse schneidet. Die so eingeschlossenen Zellen werden als positiv gewertet.

Die Auswertung ergab, dass die unbehandelten Kontrollzellen im Durchschnitt zu 92% Hsp70.1-positiv waren, die hitzebehandelten Zellen zu 91%. Die Differenz liegt im Rahmen der Standardabweichung.

Bei der durchflusszytometrischen Vermessung der antikörpermarkierten CT26-Zellen ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den hitzebehandelten und den Kontrollzellen. Beide waren hochpositiv. Da dies bei Untersuchungen in anderen Labors nicht der Fall gewesen war, und Hsp70 als Hitzeschockprotein bei vielen Arten von Zellstress verstärkt exprimiert wird, lag der Verdacht nahe, dass auch die unbehandelten Kontrollzellen einem unbekanntem Stressor ausgesetzt waren. Trotz mehrfacher Wiederholung des Versuchs konnte dieser jedoch nicht identifiziert werden, der Anteil Hsp70-exprimierender Zellen zeigte sich gleichbleibend hoch.

4.3.3 ST007

Die porcine Melanomzelllinie war vor dieser Arbeit noch nie auf die Expression des Hsp70.1-Hitzeschockproteins auf der Zelloberfläche untersucht worden. Da es sich bei Hsp70.1 um ein hochkonservierte Proteinsequenz handelt, sollte der Antikörper Kreuzreaktivität zwischen humanem, murinem und porcinem Hsp70.1 zeigen, sodass der selbe Antikörper zur Färbung verwendet werden kann.

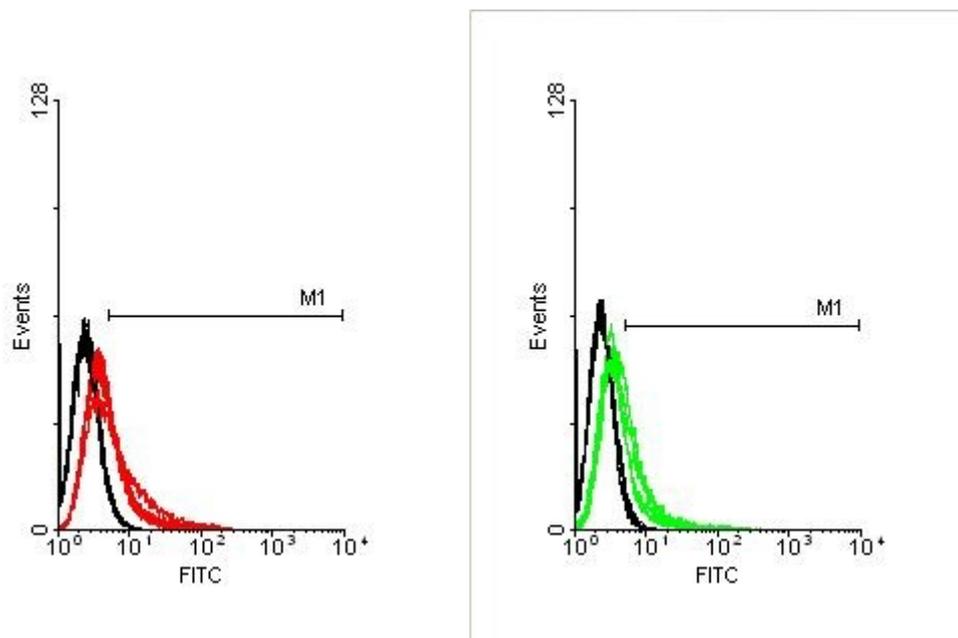


Abbildung 7: Durchflusszytometrische Analyse von mit dem FITC-markierten Hsp70.1-Antikörper gefärbten ST007-Zellen

Links: unbehandelte Kontrollzellen, Rechts: Hitzeschockbehandelte Zellen

Marker: Upper: 4090, Lower: 747

Im Diagramm wird die Fluoreszenzintensität auf dem FITC-Kanal dargestellt, die der Antikörperbindung entspricht. Die schwarzen Kurven stellen die Kontrollantikörperbindung dar. Es wurden nur intakte und lebende Zellen für die Analyse ausgewählt.

Der Marker wurde so gesetzt, dass der kleinere x-Wert dem Wert entspricht, an dem der verlängerte, lineare Anteil des rechten Schenkels der Kurve der Kontrollantikörperbindung die Abszisse schneidet. Die so eingeschlossenen Zellen werden als positiv gewertet.

Die statistische Auswertung ergab, dass die Kontrollzellen zu 28% Hsp70.1-positiv waren, die hitzebehandelten Zellen zu 36%. Die Standardabweichung liegt bei 5 bzw. 6%.

Somit liegt der Unterschied zwischen behandelten und nicht-behandelten Zellen knapp oberhalb der Standardabweichung.

Die Auswertung der durchflusszytometrischen Untersuchung der ST007-Zellen ergab somit einen kleinen Anstieg der Hsp70-Expression auf der Zelloberfläche nach Hitzeschockbehandlung.

4.4 Transfektion

4.4.1 CT26

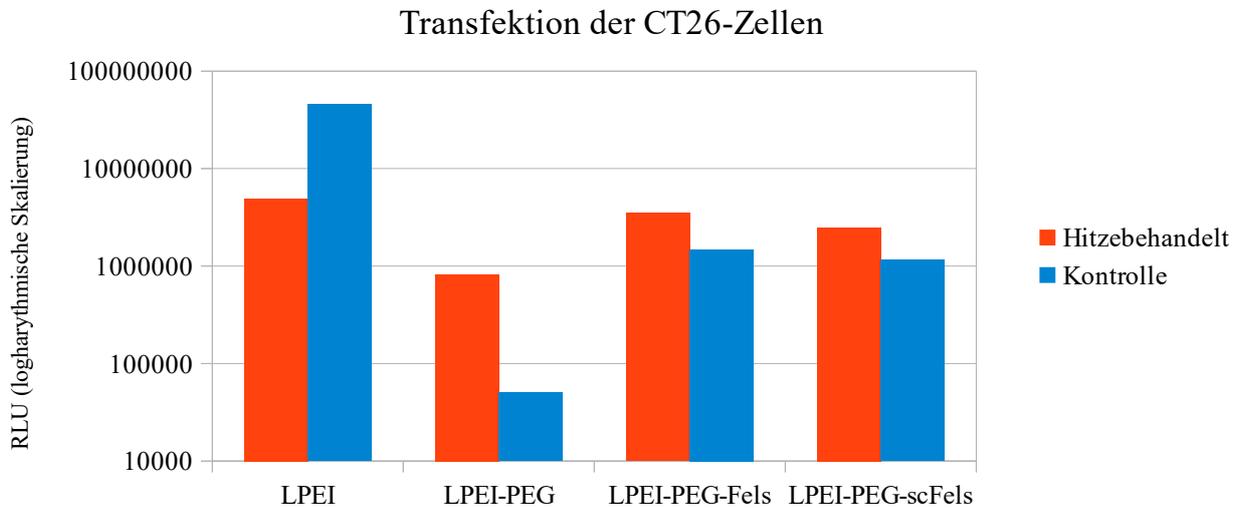


Abbildung 8: Ergebnis der Transfektion von CT26-Zellen, ausgesät am 24.1.12

Es wird die mittels Luciferase-Assay gemessene Transfektionseffizienz der verschiedenen Vektoren (LPEI, LPEI-PEG, LPEI-PEG-Fels, LPEI-PEG-scFels) bei hitzebehandelten und nicht-hitzebehandelten Zellen dargestellt.

CT-26 murine Kolonkarzinomzellen wurden sowohl nach Hitzebehandlung als auch ohne Hyperthermie mit unterschiedlichen Polyplexen transfiziert. Die unbehandelten Zellen ließen sich am besten mit LPEI als Vektor transfizieren, etwa gleich gut mit dem Peptid-gekoppelten PEGylierten LPEI (Fels und scFels) und am schlechtesten mit PEGylierten LPEI ohne Ligand.

Im Vergleich dazu war die Transfektion von hitzebehandelten Zellen mit LPEI wesentlich weniger effizient. Die Transfektionseffizienz mit LPEI-PEG-Fels war ähnlich wie mit LPEI alleine, gefolgt vom Kontroll-Protein-gekoppelten PEGylierten LPEI. Am wenigsten effizient war das PEGylierte LPEI ohne Peptid.

4.4.2 ST007

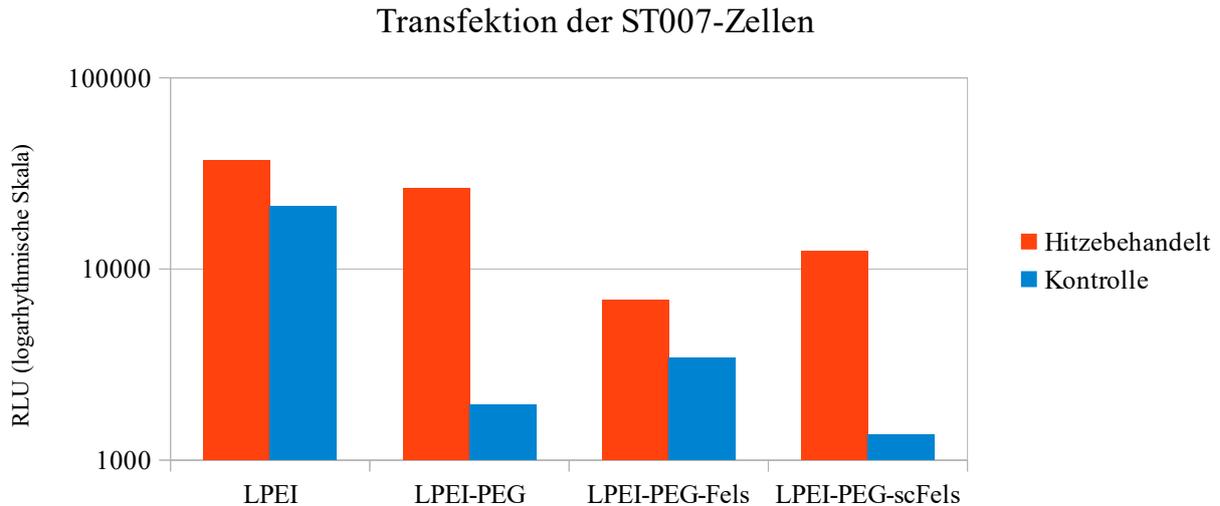


Abbildung 9: Ergebnis der Transfektion von ST007-Zellen (Passage 9)

Es wird die mittels Luciferase-Assay gemessene Transfektionseffizienz der verschiedenen Vektoren (LPEI, LPEI-PEG, LPEI-PEG-Fels, LPEI-PEG-scFels) bei hitzebehandelten und nicht-hitzebehandelten Zellen dargestellt.

Nicht hyperthermierte ST007 Zellen zeigten die höchsten Expressionswerte mit LPEI, gefolgt von LPEI-PEG-Fels, LPEI-PEG und LPEI-PEGscFels. Allgemein zeigten die hitzeschockbehandelten Zellen unabhängig vom verwendeten Vektor eine bessere Transfektionseffizienz. Dies war besonders ausgeprägt bei der Verwendung von PEG-gekoppeltem LPEI. Die Werte mit scFels-PEG-LPEI waren höher als die mit FELS-gekoppelten LPEI erreichten. Auffällig dabei waren die hohen Standardabweichungen. Die einzelnen hitzebehandelten Proben unterschieden sich sehr stark, während die Standardabweichung bei nicht hyperthermierten Zellen niedriger war.

5. Diskussion

5.1 Hyperthermie in Kombination mit Genterapie

Hyperthermie wird bereits in Kombination mit anderen, schon etablierten Therapieformen, wie der Chemo- und Strahlentherapie, verwendet. Daher ist es naheliegend, auch die Kombination mit einem neuen Behandlungsansatz wie der Genterapie zu erforschen. In mehreren Arbeitsgruppen konnte gezeigt werden, dass eine subletale Hitzebehandlung die Transfektionsrate wesentlich erhöhen kann.²³⁻²⁵ Dies gilt sowohl für virale, als auch für nicht-virale Vektoren. Die Ursache hierfür ist unklar, vermutet wird eine höhere Permeabilität der Zellwände nach Hitzeschock.

Auch in dieser Arbeit konnte festgestellt werden, dass die Transfektionsraten der hitzebehandelten im Vergleich zu den nicht-behandelten Zellen unabhängig vom verwendeten Gentransfervektor höher waren. Eine Ausnahme bildeten lediglich die hitzebehandelten und mit LPEI transfizierten CT-26-Zellen, in welchen eine geringere Transfektionseffizienz gemessen wurde. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass durch die kombinierte Toxizität von Hitzeschockbehandlung und LPEI-Transfektion die Gesamtzellzahl geringer war, welche in diesem Ansatz nicht gemessen wurde.

Es konnte jedoch außerdem gezeigt werden, dass die Transfektionsrate auch bei der Verwendung des Vektors LPEI-PEG durch Hyperthermie gesteigert werden kann.

Die lokale Hyperthermie könnte damit eine weitere Möglichkeit zur Verbesserung der tumorspezifischen Wirkung von Genterapien bieten. Werden Gentransfervektoren systemisch verabreicht, kann potentiell deren lokale Wirkung durch selektive Temperaturerhöhung im Tumor erhöht werden. Zugleich hat diese Kombination der Behandlungsmethoden das Potential, ein weiteres Problem der Genterapie vor allem mit nicht-viralen Vektoren zu lösen, nämlich die bislang häufig zu niedrige Transfektionsrate, die teilweise nur mit dem Preis einer erhöhten Toxizität verbessert werden konnte.

5.2 Hsp70 als Target

An der Zelloberfläche exprimiertes Hsp70 ist, wie bereits in der Einleitung beschrieben, eine geeignete Zielstruktur für den selektiven Angriff auf Krebszellen. Dies wurde in Tierversuchen mit dem auch in dieser Arbeit verwendeten anti HSP70 Antikörper, der in dieser Arbeit in gekoppelter Form zum Färben für die FACS-Analyse verwendet wurde gezeigt.²⁶ Dabei konnten nach Binden des Antikörpers an Hsp70-überexprimierende Tumorzellen eine antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC, antibody dependent cellular cytotoxicity) beobachtet werden. Bereits in einer

Phase II-Studie werden NK-Zellen, die mittels Hsp70 Peptid aktiviert werden, zur Behandlung von Hsp70 überexprimierenden Tumoren eingesetzt.²⁷ Die Koppelung von Gold-Nanopartikeln an den verwendeten cmHsp70.1-Antikörper wurde ebenfalls bereits durchgeführt, um diese mittels Computertomographie zu detektieren.²⁸

Die Verwendung von mHsp70 Peptid als Ligand für die Übertragung von Nanopartikeln zur Gentherapie war in dieser Arbeit nicht erfolgreich, die Transfizierbarkeit durch den Peptid-adressierten Vektor war nicht reproduzierbar verbessert im Vergleich zur Adressierung mittels Kontrollpeptid. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die mHsp70-Bindung des Peptids, das für die Adressierung verwendet wurde, in der Koppelung an den Vektor nicht mehr ausreichend war. Dennoch konnte ein Synergismus der Gentherapie und der Hitzebehandlung gezeigt werden.

5.4 Herausforderungen der Methodenwahl

Eine weitere Herausforderung dieser Arbeit bestand in der Etablierung der verwendeten Methoden und der Erstellung von Protokollen, die reproduzierbare Resultate erbrachten.

5.4.1 Zellkultur

Die Zelllinie CT-26 wurde bereits zuvor in Hitzeschockversuchen verwendet, und dabei 61 % mHsp70.1-positiven Zellen bereits ohne Hitzeschock gemessen²⁶. In der hier vorliegenden Arbeit wurde jedoch wiederholt ein weit höherer Anteil (>90%) gemessen. Als Ursache wurde zunächst ein unbekannter Stressor vermutet und die Versuche daher mit besonders sorgfältig kultivierten Zellen wiederholt. Das Ergebnis änderte sich dadurch jedoch nicht. Eine andere Erklärung für den hohen Anteil mHsp70-positiver Zellen ist, dass Zellen in Kultur mutieren können und z.B. Hsp70 positive Klone expandieren. Um dies zu vermeiden, wurde mit möglichst frühen Passagen gearbeitet, ganz ausschließen lässt sich eine Mutation hierdurch jedoch nicht. Aus anderen Arbeiten ist bekannt, dass sowohl die intrazelluläre als auch die membranständige Hsp70-Expression in verschiedenen Zelllinien sehr unterschiedlich sein, und sich auch innerhalb einer Zelllinie, beispielsweise abhängig von der Kultivierungsdauer, verändern kann.¹⁰

Obwohl sich der Anteil der mHsp70-positiven Zellen durch einen Hitzeschock nicht weiter erhöhen ließ, wurden die Transfektionsexperimente mit und ohne Hitzeschock durchgeführt.

5.4.2 Mischmethoden

Bei der Überprüfung der einzelnen Schritte des FACS-Protokolls bei der Etablierung der Methoden fiel auf, dass im Labor unterschiedliche Arbeitsschritte, abzentrifugierte Zellen zu resuspendieren, verwendet wurden, i.e. die Benutzung eines Vortex-Mischers oder sogenanntes Ratschen. In den

oben beschriebenen durchflusszytometrischen Versuchen stellte sich heraus, dass die beiden Mischmethoden im resultierenden Anteil an toten Zellen und im Anteil an zusammenhaftenden Zellen, sog. Dubletten, unterschieden. Durch das Ratschen kamen etwas mehr Zellen zu Schaden, dafür ließen sie sich besser separieren. Dies ist insofern von Bedeutung, als eine hohe Anzahl an Dubletten das Ergebnis einer FACS-Analyse verfälschen kann. Größere Konglomerate zusammenhaftender Zellen können sogar eine Gefahr für die Funktionsfähigkeit des Gerätes sein. Daher sollte alles, was ihre Zahl senken kann, in zukünftige Protokolle aufgenommen werden.

5.4.3 Hyperthermiebehandlung

Nicht nur unter Laborbedingungen stellt die präzise Erwärmung eines Tumors bzw. von Tumorzellen eine Herausforderung dar. Aktuell laufende, klinische Studien halten sich dafür an die Qualitätssicherungsstandards der ESHO (European Society for Hyperthermic Oncology). Zur Etablierung eines Behandlungsprotokolls im Labor musste eine Möglichkeit geschaffen werden, mit vertretbarem Aufwand bereits in einer Mikrotiterplatte adhärente Zellen ohne den zusätzlichen Zellstress des Ablösens mit einem kontrollierten, reproduzierbaren und nicht letalen Hitzeschock zu behandeln. Zur Wärmeapplikation wurde hierbei, orientiert an der HIPEC und der Organperfusion, ein Wasserbad ausgewählt, da hier ebenfalls die Temperaturübertragung über eine Flüssigkeit erfolgt. Dabei wurde während des Prozesses die Mikrotiterplatte komplett untergetaucht und fixiert, um den Einfluss der Umgebungstemperatur des Labors und von Schwenkbewegungen der Platte zu vermindern. Das Ziel der Verabreichung eines subletalen Hitzeschocks war erreicht, als die Zellen reproduzierbar unmittelbar nach dem Hitzeschock unter dem Mikroskop sichtbare Folgen aufwiesen, sich die Zelldichte aber nach einer Erholungsperiode nicht merklich vermindert hatte.

6. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war, die Funktionsfähigkeit der auf mHsp70 zielenden Konjugate bei der Transfektion von Krebszellen zu prüfen. Dazu sollte ein Protokoll für eine Hitzeschockbehandlung der Zellen entwickelt und die dadurch veränderte Hsp70-Expression auf der Zelloberfläche mit durchflusszytometrischen Methoden gemessen werden. Anschließend sollten mit den hitzebehandelten Zellen Transfektionsexperimente durchgeführt werden.

Bei der CT26-Zelllinie konnte im Gegensatz zu Versuchen in anderen Laboren nach Hitzeschock kein Anstieg der Hsp70-Expression auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden, wobei die Vergleichswerte der nicht-hitzebehandelten Kontrollzellen mit über 90% mHsp70-positiven Zellen sehr hoch waren.

Die Ergebnisse der Transfektionen der CT26-Zellen zeigten zwar im Vergleich zum Goldstandard der Transfektion mit LPEI eine niedrigere Reporterexpression, waren im Vergleich zum PEG-gekoppelten LPEI jedoch deutlich verbessert. Beim Vergleich der gekoppelten Peptide erreichte das FELS Peptid, das zur Bindung an mHsp70 designed wurde, etwas höhere Werte auch als das Kontrollpeptid, das aus denselben Aminosäuren in randomisierter Reihenfolge bestand. Der Unterschied war allerdings gering. Die mit Hitzeschock behandelten Zellen erreichten bei der Analyse im Luminometer höhere Werte als die behandelten Zellen, mit Ausnahme der LPEI-transfizierten Zellen.

Bei der bisher kaum untersuchten Schweinemelanomzelllinie ST007, die nativ zu etwa einem Viertel mHsp70-positiv ist, war nach dem Hitzeschock ein leichter, aber nicht signifikanter Anstieg des Anteils an mHsp70-positiven Zellen zu beobachten. Die Transfizierbarkeit war insgesamt schlechter als bei den CT26-Zellen. Das FELS-Peptid bewirkte eine geringere Transfektionsrate als das Kontrollpeptid.

Durch die Hitzeschockbehandlung wurde die Aufnahme der Plasmid-DNA in die Zellen jedoch generell verbessert, unabhängig vom verwendeten Vektor.

Es konnten Protokolle zur Verabreichung eines subletalen Hitzeschocks im Labor sowie zur anschließenden FACS-Analyse entwickelt werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Hyperthermie eine wirkungsvolle und vielversprechende adjuvante Methode, die sowohl in Kombination mit herkömmlichen Therapien, wie Chemotherapie oder Radiotherapie eingesetzt werden kann, aber auch, wie in dieser Arbeit gezeigt, in Kombination mit neuen Therapien wie der Genterapie. Mittels des oben beschriebenen Protokolls kann eine Hyperthermiebehandlung im Labor gut nachgestellt werden, sodass die genaue

Wirkungsweise weiter erforscht werden kann. Weitere Untersuchungen, ggf. mit anders gekoppelten Vektoren, sind notwendig.

7. Anhang

7.1 Danksagung

Ich danke Frau Prof. Dr. med. Christine Spitzweg dafür, dass sie diese Arbeit ermöglicht hat.

Prof. Dr. Manfred Ogris danke ich für die Betreuung und für die Freiräume, die er mir gelassen hat.

Dr. rer. nat. Joana Viola möchte ich danken für die unschätzbare Hilfe, Einarbeitung in die Zellkultur und die Beantwortung sehr vieler Fragen, die ich als Laborneuling hatte.

Alle, die im Labor gearbeitet haben, während ich dort war, waren immer offen für Fragen. Ohne ihre Hilfe wäre ich niemals so weit gekommen.

Vielen Dank an Silvia Laube, die die meiner Arbeit vorangehende Diplomarbeit geschrieben hat.

Prof. Dr. rer. nat. Gabriele Multhoff danke ich sehr für die Zurverfügungstellung der mHsp70-Antikörper und für hilfreiche Tipps im Zusammenhang mit Wasserbädern.

PD Dr. rer. nat. Mathias Gehrmann danke ich für die Einführung in sein FACS-Protokoll und dafür, dass er mir das Ratschen gezeigt hat.

Diese Arbeit hat mich auch persönlich weitergebracht. Was ich im Labor und beim Schreiben gelernt habe, hat mir viele Türen geöffnet, die ich sonst niemals gefunden hätte. Dafür bin ich von Herzen dankbar.

7.2 Eidesstattliche Versicherung

Brüggemann, Astrid

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Ligandenvermittelter Gentransfer in Tumorzellen mittels synthetischer Gentransfervektoren unter Anwendung einer Hitzeschockbehandlung

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, 05.12.2019

Ort, Datum

Astrid Brüggemann

Unterschrift Doktorandin

7.3 Quellen

1. Lindner, L. H. & Issels, R. D. Stellenwert der Hyperthermie im Rahmen der medikamentösen Tumortherapie. *Onkol.* **16**, 1063–1071 (2010).
2. van Driel, W. J. *et al.* Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy in Ovarian Cancer. *N. Engl. J. Med.* **378**, 230–240 (2018).
3. Issels, R. D. *et al.* Effect of Neoadjuvant Chemotherapy Plus Regional Hyperthermia on Long-term Outcomes Among Patients With Localized High-Risk Soft Tissue Sarcoma: The EORTC 62961-ESHO 95 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol.* **4**, 483–492 (2018).
4. Issels, R. D. *et al.* Neo-adjuvant chemotherapy alone or with regional hyperthermia for localised high-risk soft-tissue sarcoma: a randomised phase 3 multicentre study. *Lancet Oncol.* **11**, 561–570 (2010).
5. Bruggmoser, G. *et al.* Guideline for the clinical application, documentation and analysis of clinical studies for regional deep hyperthermia. *Strahlenther. Onkol.* **188**, 198–211 (2012).
6. Simon, H. B. Hyperthermia. *N. Engl. J. Med.* **329**, 483–487 (1993).
7. Nauts, H. C., Swift, W. E. & Coley, B. L. The Treatment of Malignant Tumors by Bacterial Toxins as Developed by the Late William B. Coley, M.D., Reviewed in the Light of Modern Research. *Cancer Res.* **6**, 205–216 (1946).
8. McCarthy, E. F. The toxins of William B. Coley and the treatment of bone and soft-tissue sarcomas. *Iowa Orthop J* **26**, 154–8 (2006).
9. Multhoff, G. *et al.* A stress-inducible 72-kDa heat-shock protein (HSP72) is expressed on the surface of human tumor cells, but not on normal cells. *Int J Cancer* **61**, 272–9 (1995).
10. Macario, A. J. L. & de Macario, E. C. Sick Chaperones, Cellular Stress, and Disease. *N. Engl. J. Med.* **353**, 1489–1501 (2005).
11. Multhoff, G. Heat shock protein 72 (HSP72), a hyperthermia-inducible immunogenic determinant on leukemic K562 and Ewing's sarcoma cells. *Int J Hyperth.* **13**, 39–48 (1997).
12. Bendz, H. *et al.* Human heat shock protein 70 enhances tumor antigen presentation through complex formation and intracellular antigen delivery without innate immune signaling. *J Biol Chem* **282**, 31688–702 (2007).

13. Multhoff, G. & Hightower, L. E. Cell surface expression of heat shock proteins and the immune response. *Cell Stress Chaperones* **1**, 167–76 (1996).
14. Peng, Z. Current Status of Gendicine in China: Recombinant Human Ad-p53 Agent for Treatment of Cancers. *Hum. Gene Ther.* **16**, 1016–1027 (2005).
15. Liang, M. Oncorine, the World First Oncolytic Virus Medicine and its Update in China. *Curr. Cancer Drug Targets* **18**, 171–176 (2018).
16. Andtbacka, R. H. I. *et al.* Talimogene Laherparepvec Improves Durable Response Rate in Patients With Advanced Melanoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **33**, 2780–2788 (2015).
17. Liu, Y., Chen, X., Han, W. & Zhang, Y. Tisagenlecleucel, an approved anti-CD19 chimeric antigen receptor T-cell therapy for the treatment of leukemia. *Drugs Today Barc. Spain* **53**, 597–608 (2017).
18. Jain, M. D., Bachmeier, C. A., Phuoc, V. H. & Chavez, J. C. Axicabtagene ciloleucel (KTE-C19), an anti-CD19 CAR T therapy for the treatment of relapsed/refractory aggressive B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Ther. Clin. Risk Manag.* **14**, 1007–1017 (2018).
19. Yin, H. *et al.* Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nat. Rev. Genet.* **15**, 541–555 (2014).
20. Schaffert, D. & Ogris, M. Nucleic acid carrier systems based on polyethylenimine conjugates for the treatment of metastatic tumors. *Curr. Med. Chem.* **20**, 3456–3470 (2013).
21. Rödl, W., Schaffert, D., Wagner, E. & Ogris, M. Synthesis of polyethylenimine-based nanocarriers for systemic tumor targeting of nucleic acids. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **948**, 105–120 (2013).
22. Laube, S. K. Targeting membrane heat shock protein 70 by non-viral vectors for gene delivery into tumor cells. (2011).
23. Chi, M.-S. *et al.* Comparing the Effectiveness of Combined External Beam Radiation and Hyperthermia Versus External Beam Radiation Alone in Treating Patients With Painful Bony Metastases: A Phase 3 Prospective, Randomized, Controlled Trial. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **100**, 78–87 (2018).

24. Lin, M. *et al.* The therapeutic effect of PEI-Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe₂O₄ nanoparticles/pEgr1-HSV-TK/GCV associated with radiation and magnet-induced heating on hepatoma. *Nanoscale* **5**, 991–1000 (2013).
25. Yamaguchi, M., Ito, A., Okamoto, N., Kawabe, Y. & Kamihira, M. Heat-inducible transgene expression system incorporating a positive feedback loop of transcriptional amplification for hyperthermia-induced gene therapy. *J. Biosci. Bioeng.* **114**, 460–465 (10).
26. Stangl, S. *et al.* Targeting membrane heat-shock protein 70 (Hsp70) on tumors by cmHsp70.1 antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 733–738 (2011).
27. Specht, H. M. *et al.* Heat Shock Protein 70 (Hsp70) Peptide Activated Natural Killer (NK) Cells for the Treatment of Patients with Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) after Radiochemotherapy (RCTx) – From Preclinical Studies to a Clinical Phase II Trial. *Front. Immunol.* **6**, 162 (2015).
28. Gehrman, M. K. *et al.* Imaging of Hsp70-positive tumors with cmHsp70.1 antibody-conjugated gold nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine* **10**, 5687–5700 (2015).