

Nicolas Alexander Geis
Dr. med.

Resistenz von Tumorzellen gegenüber Komplement: Zielgerichtete Expressionshemmung humaner membranständiger Komplementregulatoren (mCRP) mittels *siRNA*- und Immunliposomen- Technologie

Geboren am: 10.03.1980 in Wiesbaden
Staatsexamen am 26.10.2007 an der Ruprecht-Karls Universität Heidelberg

Promotionsfach: Immunologie
Doktorvater: Prof. Dr. med. vet. M Kirschfink

Eine zunehmend an Bedeutung gewinnende Therapieoption zur Behandlung maligner Tumore ist die Immuntherapie. Besonders die Applikation tumorspezifischer, monoklonaler Antikörper, die zielgerichtet an neoplastische Zellen binden und dort sowohl zelluläre als auch humorale Effektorfunktionen des Immunsystems aktivieren können, haben großes therapeutisches Potential. Trotz beachtlicher Fortschritte blieben die klinischen Möglichkeiten und Erfolge dieses Behandlungskonzeptes bisher limitiert. Zahlreiche „Escape-Mechanismen“ von Tumorzellen werden für die eingeschränkte Wirksamkeit von Immuntherapien verantwortlich gemacht. In diesem Zusammenhang sind besonders Resistenzmechanismen gegen Angriffe des Komplementsystems als wesentlichen Bestandteil des humoralen Immunsystems von entscheidender Bedeutung. Vor allem die (Über-)Expression sogenannter membranständiger Komplement-Regulatorproteine (mCRPs, CD46, CD55 und CD59) verhindert dabei eine effektive Komplementaktivierung gegen Tumorzellen. Von gesunden Körperzellen werden diese Regulatorproteine zum Schutz vor „zufälligen“ Angriffen des Komplementsystems synthetisiert. Im Verlauf einer neoplastischen Zelltransformation kommt es häufig, möglicherweise aufgrund eines entsprechenden Selektionsdrucks, zu einer Überexpression der Regulatorproteine.

In der Vergangenheit konnte vielfach gezeigt werden, dass die Neutralisierung der membranständigen Komplementregulatoren eine Sensibilisierung maligner Zellen gegenüber Angriffen des Komplementsystems bewirkt. Dadurch wird die Effizienz in der Klinik verwendeter monoklonaler Antikörper signifikant gesteigert. Bisher angewendete Methoden zur Inhibition der Regulatorprotein-Funktion umfassen sowohl eine enzymatische Entfernung, eine Antikörper-vermittelte Blockade als auch eine Zytokin- und *AS-ODN*-induzierte Expressionshemmung der Komplement-Regulatorproteine.

Ein geeignetes Mittel zur spezifischen Synthesehemmung von Zielproteinen bereits auf mRNA-Ebene stellt die sogenannte *RNA-Interferenz (RNAi)*, basierend auf *small interfering RNA*-Molekülen (*siRNA*), dar. Diese Methodik verkörpert die neueste Generation von Antisense-Verfahren und hat aufgrund von besserer Wirksamkeit und höherer Molekülstabilität die *DNA-Antisense-Technologie* in der Anwendung für eine sequenzspezifische, posttranskriptionale Gensuppression weitestgehend abgelöst.

Im Rahmen dieser Dissertation wurden potente, über einen vergleichsweise langen Zeitraum wirkende *siRNA*-Moleküle für die Synthesehemmung der membranständigen Komplement-Regulatorproteine CD46, CD55 und CD59 entwickelt und deren Anwendung für die Brustkarzinom-Zelllinie BT-474 optimiert. *SiRNA* anti-CD46(301) erreichte eine Reduktion der CD46-Expression um 73%, *siRNA* anti-CD55(255) inhibierte die CD55-Expression um 33%, und *siRNA* anti-CD59(1339) erreichte eine 77%ige Hemmung der CD59-Proteinexpression. In funktionellen Studien zeigten die nach *siRNA*-vermittelter

Expressionshemmung mCRP-defizienten Zielzellen sowohl eine gesteigerte Suszeptibilität gegenüber Komplement-vermittelter Zytolyse (bis zu 55% gesteigerte CDC) als auch eine vermehrte Opsonisierung durch Ablagerung von C3-Spaltprodukten auf ihrer Zelloberfläche (CD46: +67%, CD55: +39%).

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden Möglichkeiten für einen zielgerichteten Transport von *siRNAs* im allgemeinen und der mCRP-spezifischen *siRNAs* im speziellen in relevante Tumorzellen geprüft. In vielen Fällen – vor allem zur Behandlung von metastasierten Tumoren – ist es erforderlich, die Expression der Zielgene in spezifischen, eventuell sogar verschiedenen Geweben zu inhibieren. Eine ungezielte, auch in gesunden Körperzellen ausgelöste Expressionshemmung der Komplementregulatoren durch die entwickelten mCRP-spezifischen *siRNAs* wäre fatal.

Besondere Aufmerksamkeit wurde dabei der Verwendung von Immunoliposomen gewidmet, deren wichtigstes Anwendungsgebiet bisher die gezielte Akkumulation von Chemotherapeutika in maligne entarteten Geweben ist. Diese Vehikel ahmen im Prinzip den Transportmechanismus eines viralen Vektors nach. In der wässrigen Innenphase eines Liposoms lassen sich therapeutische Wirkstoffe einschließen. An die Außenseite dieses kugelförmigen Vehikels können monoklonale Antikörper für ein Zell-spezifisches „*Targeting*“ kovalent verankert werden.

Im Rahmen dieser Dissertation ist es gelungen, die entwickelten mCRP-spezifischen *siRNA*-Moleküle in Immunoliposomen zu inkorporieren. Als „*Targeting*“-Ligand für das liposomale Konjugat wurde dabei der rekombinante, humanisierte monoklonale Antikörper Trastuzumab (Herceptin®, RhuMAB HER2) verwendet, der spezifisch an den häufig von Mammakarzinomen überexprimierten Wachstumsfaktor-Rezeptor HER2 (Humaner Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor 2, p185HER2, ErbB2) bindet. Im Hinblick auf spätere *in vivo*-Applikationen wurden die Immunoliposomen durch Kopplung von hydrophilen Polyethylenglycol (PEG)-Polymeren an ihre Oberfläche „sterisch stabilisiert“. Die in dieser Form als „PEGylierte Immunoliposomen“ (PILs) oder „Stealth Immunoliposomes“ bezeichneten Vehikel werden schlechter von Effektorzellen des retikuloendothelialen Systems (RES) erkannt und haben entsprechend längere Plasmahalbwertszeiten.

Mit Hilfe dieser Vehikel konnten die mCRP-spezifischen *siRNA*-Moleküle zielgerichtet in HER2-überexprimierende BT-474 Brustkarzinomzellen eingeschleust werden. Um auch unter Verwendung der liposomalen Konjugate eine signifikante Expressionshemmung der Komplementregulatoren erreichen zu können, werden im Rahmen dieser Arbeit weitere Verbesserungsvorschläge sowohl zur Optimierung der Einschussrate von *siRNAs* in Liposomen als auch zur Maximierung der zytoplasmatischen Freisetzung dieser Antisense-Moleküle aus Endolysosomen nach Aufnahme der Vehikel über Rezeptor-vermittelte Endozytose gemacht.

Schlussfolgernd können die entwickelten mCRP-spezifischen *siRNA*-Moleküle die Expression der Komplement-Regulatorproteine effektiv hemmen und dadurch eine Sensibilisierung von Zielzellen gegenüber Angriffen des Komplementsystems bewirken. Aufgrund der klinischen Anwendbarkeit von *siRNAs* und vielversprechender Fortschritte in der Entwicklung von Vehikeln zum zielgerichteten Einbringen der Antisense-Moleküle ausschließlich in relevante Tumorzellen („*Targeting*“), könnten die mCRP-spezifischen *siRNAs* schon bald als adjuvantes Ko-Therapeutikum zur Verbesserung der Effektivität Antikörper-basierter Tumor-Immuntherapien in der Klinik verwendet werden.