

Bericht für Roland Ernst Stiftung für Gesundheitswesen über meinen Auslandsaufenthalt in Boston am Wyss Institute for Biologically Inspired Engineering an der Harvard Universität von Thomas Schlichthärle.

DNA Nanostrukturen für die Krebsimmuntherapie

Das Projekt im Labor

Das Roland Ernst Stipendium hat mir geholfen meine Masterarbeit am Wyss Institute for Biologically Inspired Engineering an der Harvard Universität durchzuführen. Das Projekt war angesiedelt in der Arbeitsgruppe von Prof. William Shih im Bereich der DNA Nanotechnologie. Professor Shih war maßgeblich daran beteiligt die DNA Origami Technologie für drei-dimensionale Nanostrukturen weiterzuentwickeln. Mit Hilfe einer langen einzelsträngigen DNA (M13 Phagen DNA mit ca. 7308 Basen) ist es möglich unter Zugabe ca. 200 Oligonukleotiden die 30-60 Nukleinsäuren lang sind, zwei- und drei-dimensionale Strukturen zu falten. Dafür werden die Bestandteile in einem Magnesium Puffer erst auf 80 Grad erhitzt, um sämtliche Sekundärstrukturen aufzulösen, und dann langsam auf Raumtemperatur über einen Zeitraum von 18 - 72 Stunden abgekühlt. Paul Rothemund publizierte im Jahr 2006 in Nature die Grundlagen für diese Methode [1]. Die ersten Nanostrukturen die nach dem Prinzip des DNA Origami gefaltet wurden, waren unter anderem Rechtecke, Smilies und Dreiecke. Prof. Shih hat dieses System in den drei-dimensionalen Bereich erweitert und publizierte Strukturen denen ein quadratisches Gitter zu Grunde liegt und die gebogen werden können [2]. Die Strukturen werden am Computer mit Hilfe von caDNAno programmiert [3]. Als ich zu Beginn meiner Masterarbeit ins Labor kam, wurde aktiv an einer sogenannten Bungalow Struktur gearbeitet. Abbildung 1 zeigt die Struktur, die einen offenen Zylinder mit ca. 60 nm Durchmesser, sowie ca. 25 nm Höhe darstellt.

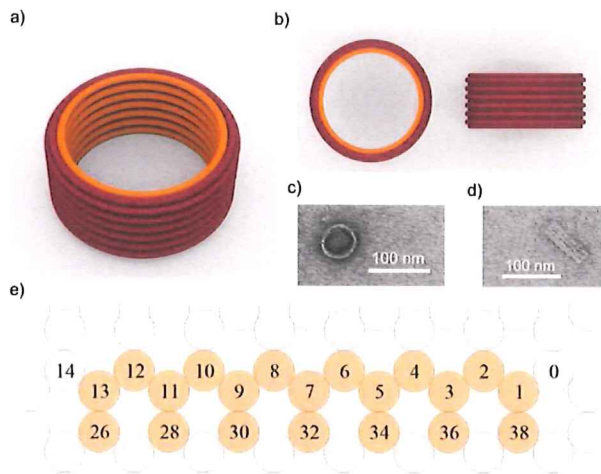


Abbildung 1: Bungalow Struktur. a) 3D Design der Bungalow Struktur. b) Ansicht von der Seite und von Oben. Die Bungalow Struktur besitzt einen Durchmesser von ca. 60 nm und ist ca. 25 nm hoch. c) Aufnahme mit dem Transmissions Elektronen Mikroskop (TEM) welche die Bungalow Struktur von oben zeigt. d) Seitenansicht der Bungalow Struktur mit dem TEM. e) Querschnitt durch die Struktur in caDNAo

Meine Aufgabe im Projekt war es für diese Struktur eine Halbkugel weiterzuentwickeln, welche den Zylinder an einem Ende abdichtet. Ebenfalls sollten diese Strukturen dann multimerisiert werden um eine Nano-Kapsel zu erhalten.

Insgesamt wurden zwei verschiedene Nano-Kapseln gebaut, eine mit vier Zylindern in der Mitte, sowie zwei Halbkugeln um die Enden abzudichten, sowie eine Struktur mit nur zwei Zylindern und zwei Halbkugeln. Abbildung 2 zeigt die Strukturen welche während der Masterarbeit gefaltet und charakterisiert wurden.

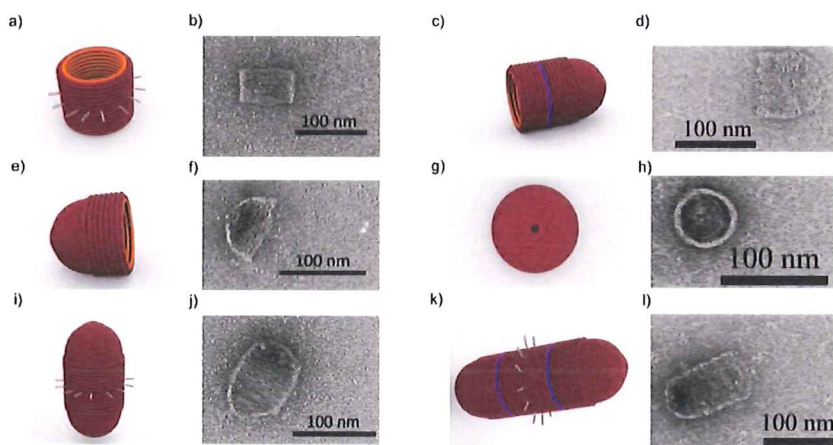


Abbildung 2: Strukturen der Nano-Kapsel. a & b) Cartoon Model der Zylinder Dimere sowie TEM Bild. c & d) Trimer aufgebaut aus zwei Zylindern sowie der Halbkugel. e & f) Dimer aufgebaut aus einem Zylinder und der Halbkugel. g & h) Ansicht von oben des Trimers von c & d. i & j) Tetramer Nano-Kapsel aufgebaut aus zwei Zylindern und zwei Halbkugeln zur Abdichtung der Enden. k & l) Hexamer Nano-Kapsel aufgebaut aus vier Zylindern und jeweils einer Halbkugel an den Enden.

Die Dimerisierung der mittleren Zylinder wurde mithilfe sogenannter iMotif Sequenzen erprobt. Das iMotif ist eine DNA Sequenz welche aus repetitiven Cytosine Bausteinen (4 je 3 Basen lang) sowie dazwischen liegenden Loops (3 Basen) aufgebaut ist. Die Cytosine bilden in niedrigem pH Wasserstoffbrücken miteinander aus und stapeln sich aufeinander. Die pH Sensitivität kann über die Loop Sequenzen (Adenin vs. Thymin) optimiert werden. Im Labor entschieden wir uns für eine Sequenz die bei pH 5.5 die Sekundärstruktur ausbildet. pH 5.5 liegt in Zellen zum Beispiel in Endolysosomalen Kompartimenten vor, wodurch sich die Struktur öffnet und es zur kontrollierten Freisetzung von Medikamente kommt, welche vorher im Inneren der Nano-Kapsel geschützt waren.

Der Vorteil der Struktur ist ebenfalls, dass das äußere mit Antikörpern oder Peptiden funktionalisiert werden kann um die Nano-Kapsel gezielt an eine Zelle zu bringen. Im Inneren ist genügend Platz für weitere Peptide, Oligonukleotide, Proteine oder small molecules, die erst in der Zielzelle ihre Wirkung entfalten sollen.

Das Projekt wird im Labor weitergeführt und die Nano-Kapsel soll ihre Anwendung in der Krebsimmuntherapie finden, dafür wird das Äußere mit einem Dec-205 Antikörper Fragment funktionalisiert um die Nano-Kapsel gezielt zu dendritischen Zellen zu bringen. Im Inneren befindet sich ein CpG-DNA Oligonukleotid, welches Toll-like Rezeptor 9 aktiviert und somit die dendritische Zelle aktiviert. Ebenso findet ein krebsspezifisches Peptid Platz. Desweiteren sollen zellwandpenetrierende Proteine implementiert werden um so gezielt das endolysosomale Kompartiment zu überwinden und eine intrazelluläre cytoplasmatische Freisetzung zu erreichen.

In der Arbeitsgruppe von Prof. William Shih habe ich mich sehr wohl gefühlt. Die Gruppe hat ca. 12 Mitarbeiter und ist in zwei unterschiedliche Subgruppen aufgeteilt, "DNA Origami Technologie" sowie "Biomedizinische Anwendungen der DNA Nanotechnologie". Jede Woche gibt es Subgruppenmeetings in denen die einzelnen Resultate der vergangenen Woche besprochen werden und das weitere Vorgehen diskutiert wird. Daneben gibt es jede Woche ein Gruppenmeeting in dem jeder ca. alle drei Monate seine aktuellen Projekte und Resultate vorstellen darf. Einmal im Monat findet noch ein Journal Club statt, in welchem neue und interessante Publikationen aus dem Feld besprochen werden. Was mir sehr gut gefallen hat war, dass Prof. Shih selbst noch DNA Nanostrukturen plant und programmiert. Dadurch ist er noch sehr nah an der täglichen Forschung und kann sehr gutes experimentelles Feedback geben.

Leben in Boston

Neben dem wissenschaftlichen Teil möchte ich den zukünftigen Stipendiaten auch etwas über das Leben in Boston erzählen. Boston liegt an der Ostküste der Vereinigten Staaten von Amerika, hat ca. 600.000 Einwohner und ist 6-7 Flugstunden von München oder Frankfurt (Lufthansa Direktflüge), sowie 4 Busstunden von New York und 5 Autostunden von Montreal entfernt. Eine Reise nach Quebec um Montreal und Quebec Stadt anzuschauen lohnt sich mit einem Mietwagen auf jeden Fall. Desweiteren gibt es einen US Airways Shuttle nach Washington, in die Hauptstadt der USA. Sehr sehenswert sind dort die zahlreichen kostenlosen Museen (National Air and Space Museum, Library of Congress) oder der Zoo. Ebenso ist Philadelphia eine Reise wert, mit der Liberty Bell, sowie dem sehr gut erhaltenen Gebäude in dem die Unabhängigkeitserklärung unterschrieben wurde.

Von Boston aus lassen sich auch super die White Mountains in New Hampshire (Mt. Washington, Franconia Notch, Cannon Mountain) mit sehr viel Natur und schönen Wanderrouten erkunden. Maine und der Acadia National Park sind auch gut über ein Wochenende mit dem Auto zu erreichen. Im Süden von Massachusetts liegt Cape Cod, eine Halbinsel mit wunderschönen Stränden, die in ca. 1 1/2 h mit dem Auto erreicht werden kann. Von Boston aus gibt es ebenfalls eine schnelle Fähre, die direkt nach Provincetown fährt, dort lassen sich sehr gut Seelöwen beobachten (Vorsicht vor den Haien).

Boston selbst bietet auch zahlreiche Freizeitaktivitäten, so lädt die Boston Symphony oder das Ballett in Chinatown ein um den Abend kulturell zu verbringen. Einen Besuch wert sind auf jeden Fall das Harvard Museum of Natural History mit in Sachsen gefertigten sehr realistischen Glasblumen (Eintritt frei für Harvard Angestellte + 1 Gast), dem Science Museum sowie dem Museum of Fine Arts. Um das Stadtzentrum zu erkunden bietet sich der Freedom Trail an, dieser führt als rote Linie durch die Stadt und weist den Weg vom Boston Common, dem zentralen Park in Zentrum von Boston über zahlreiche historische Gebäude, Quincy Market, durch das North End (italienisch angehaucht -> sehr gute Italiener) bishin zur USS Constitution, dem ältesten noch seetüchtigen Schiff der Welt auf dem es eine interessante kostenlose Besichtigungstour gibt. Auf dem Freedom Trail werden zahlreiche interessante Informationen über die amerikanische Unabhängigkeit kommuniziert. Im North End gibt es auch sehr leckere Konditoren (Mike's Pastry, Modern Pastry) die unbedingt ausprobiert werden sollten.

Im Hafen von Boston gibt es ein großes Aquarium sowie eine Bootstour zu den Harbour Islands (sehr empfehlenswert ist Georges Island, auf der es ein altes Fort zu erkunden gibt) oder auch eine Whale Watching Tour.

Im Sommer ist das Wetter in Boston sehr warm mit sehr hoher Luftfeuchtigkeit, die Winter können sehr kalt werden und durchaus von November bis April anhalten. Plötzliche Wintereinbrüche sind nicht so selten und es kann durchaus vorkommen, dass es über Nacht plötzlich einen Meter Schnee hat. Boston ist darauf jedoch sehr gut vorbereitet und die Straßen sind am nächsten Tag dann meist wieder relativ gut freigeräumt.

Parks die es sich lohnt zu erkunden sind auf jeden Fall der vorher bereits erwähnte Boston Common, das Arnold Arboretum, Castle Island Park und der Forest Hills Cemetery, desweiteren können während der Sommermonate auf dem Charles River Kanus und Kajaks gemietet und die Skyline von Boston und Cambridge (MIT!) vom Wasser aus genossen werden. Am 4. Juli, dem amerikanischen Unabhängigkeitstag gibt es dort ein großes Feuerwerk am Abend auf dem Fluss und um die Mittagszeit lohnt sich ein Trip zum Castle Island Park. Dort gibt es einen Kanonen Salut an und von der USS Constitution die dafür extra mit einer Bootsparade vorsegelt.

Ein Besuch von zahlreichen Sportveranstaltungen, die an der Universität stattfinden lohnt sich auf jeden Fall auch, dort kann wunderbar die amerikanische College Sport Kultur bestaunt werden, die in den USA wesentlich ausgeprägter ist als in Deutschland (z.B. Eishockey, Lacrosse, American Football). Ein Besuch im Fenway Park, dem Heimatstadion der Red Sox, des Baseball Teams in Boston, und dem ältesten Baseballstadion der USA das noch benutzt wird ist auch empfehlenswert.

Vielleicht noch ein paar Worte zur Wohnungsfindung und zu den Finanzen. Im Vergleich zu Dresden ist Boston relativ teuer was ein WG Zimmer betrifft. Hier sollte zwischen 500 - 800 Euro gerechnet werden. Ich persönlich habe in Brookline (Coolidge Corner) bei einer Familie im Dachgeschoss gewohnt, hatte ca. 18 m², mein eigenes Bad aber keine Küche und habe 950 US Dollar bezahlt (ca. 730 Euro). Allerdings war ich sehr zufrieden damit, die Longwood Medical Area, in der ich gearbeitet habe, war ca. 25 Gehminuten entfernt und die Gegend war sehr sicher. Obwohl Boston und Cambridge generell sehr sicher sind, ich hatte zum Beispiel keine Probleme nachts um 12 oder 1 heimzulaufen, sollte man ein bisschen auf die Gegend achten. Ich zähle im folgenden Gegenden auf, in die problemlos gezogen werden kann und die auch sehr sicher sind: Brookline, Fenway, Backbay, Cambridge, Downtown Boston (North End), Alston, Brighton, Jamaica Plain. Gegenden von denen ich eher abrate, in denen ich auch nicht nachts alleine nach Hause laufen wollen würde sind Mission Hill, Roxbury, Dorchester, Chelsea.

Lebensmittel lassen sich sehr gut im Trader Joes (z.B. Coolidge Corner oder Cambridge Memorial Drive) einkaufen und sind je nach Produkt etwas teurer als in Deutschland. In den USA findet man eher selten Eiskaffees mit Eisbechern wie man es in Deutschland gewohnt ist, dafür gibt es sehr viele Geschäfte die Frozen Yoghurt mit frischen Früchten anbieten. Eine erfrischende Alternative während

der warmen Sommermonate und sehr lecker. Für ein Mittagessen im Food Court oder der Universitätsmensa kann zwischen 7-10 Dollar pro Tag gerechnet werden.

Ein Auslandsaufenthalt ist auf jeden Fall immer sehr zu empfehlen und Boston im speziellen ist ein sehr inspirierender Ort mit zahlreichen Colleges und Universitäten (MIT, Harvard, TUFTS, Northeastern, Boston University). Ein großer Vorteil ist durch die hohe Dichte an Forschungslaboren auch, dass es für so gut wie jedes Forschungsgebiet Experten gibt und eine sehr gute Atmosphäre für Kollaborationen vorherrscht.

1. Rothemund, P.W., *Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns*. Nature, 2006. **440**(7082): p. 297-302.
2. Dietz, H., S.M. Douglas, and W.M. Shih, *Folding DNA into twisted and curved nanoscale shapes*. Science, 2009. **325**(5941): p. 725-30.
3. Douglas, S.M., et al., *Rapid prototyping of 3D DNA-origami shapes with caDNAno*. Nucleic Acids Res, 2009. **37**(15): p. 5001-6.

Thomas Schürch

18.09.2014