universität wien

# DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„siRNA-basierte Evaluierung von Heat Shock Proteinen als Ziele in der Tumortherapie“

verfasst von

Kathrin Laczkovits

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2015

| | |
|---|---|
| Studienkennzahl lt. Studienblatt: | A 449 |
| Studienrichtung lt. Studienblatt: | Diplomstudium Pharmazie |
| Betreut von: | Univ.-Prof. Dr. Ernst Urban |

# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich recht herzlich bei Univ.-Prof. Dr. Ernst Urban bedanken, der mir die Absolvierung meiner Diplomarbeit am Department für medizinische Chemie möglich gemacht hat.

Ein großes Dankeschön richtet sich auch an Dr. Johannes Winkler für die freundliche Unterstützung und hilfreichen Ratschläge rund um die Bearbeitung meines Diplomarbeitsthemas.

Bedanken möchte ich mich auch bei Volker Baumann M.Sc. für das Engagement und die tolle Betreuung während meiner gesamten Diplomarbeit.

Zuletzt möchte ich noch meine Familie, insbesondere meine Eltern dankend erwähnen, die mir dieses Studium ermöglicht haben und mir immer unterstützend zur Seite standen.

Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.

## Inhaltsverzeichnis

Danksagung.....1

Zusammenfassung.....4

Abstract.....6

1. Einleitung.....8
1.1. Heat Shock Proteine.....8
1.2. microRNAs .....17
1.3. siRNAs und RNA-Interferenz.....19
1.4. RNA-basierte Therapeutika bei Krebs.....21

2. Ziel.....23

3. Material und Methoden.....24
3.1. Zellkultur.....24
3.2. Zelllinienvermehrung.....24
3.3. Reverse Transfektion.....25
3.4.1. Proliferationstest mit EZ4U-Substrat.....25
3.4.2. Proliferationstest mit PrestoBlue Reagenz.....26
3.5. Propidiumjodid-Färbung und FACS-Analyse.....27

4. Resultate.....28
4.1. Proliferationstest.....28
4.2. Zellzyklusanalysen mit Durchflusszytometrie.....39

5. Diskussion.....49
5.1. Effekt von Heat-Shock-Protein-Silencing auf Tumorwachstum.....49

6. Abkürzungen.....54

7. Quellenangaben.....57

Lebenslauf.....62

# Zusammenfassung

Unter RNA-Interferenz versteht man einen sequenzspezifischen, post-transkriptionellen Gen-Silencing-Mechanismus, welcher durch dsRNA vermittelt wird. Speziell in letzter Zeit gibt es zunehmendes Interesse an der Nutzung dieser Gen-Silencing-Aktivität, um neue Medikamente für die Behandlung verschiedener Krankheiten zu entwickeln. Krebs gilt dabei als eines der Hauptziele, da Onkogene, mutierte Tumorsuppressorgene und mehrere andere Gene, welche zur Tumorprogression beitragen, potentiell wichtige Ziele für das Gen-Silencing durch RNAi sind. SiRNA-basierte Medikamente haben deutliche Vorteile gegenüber herkömmlichen kleinen Molekülen oder Protein-basierten Medikamenten, darunter zum Beispiel hohe Spezifität, bessere Wirksamkeit und geringere Toxizität. Einen weiteren großen Vorteil der RNAi-Therapeutika bei Krebs stellt das gleichzeitige Erreichen mehrerer Gene dar. Allerdings gibt es einige technische Hürden zu überwinden, welche sich im Fokus der aktuellen Forschung und Entwicklung befinden.

Da Heat Shock Proteine in Krebszellen häufig überexprimiert sind und dadurch zur Stabilisierung onkogener Proteine führen sowie das Überleben der Tumorzellen, die Proliferation, die Gefäßneubildung und die Metastasierung fördern, wurde in dieser Diplomarbeit untersucht, ob und welche Heat Shock Proteine günstige therapeutische Ziele von Tumortherapeutika sind.

Ausgewählte synthetische siRNAs von Heat Shock Proteinen (HSP27, HSP60, HSP90, CDC37, GRP58, GRP78) wurden in MDA-MB-468- sowie in A549-Zellen transfiziert. Anhand von Proliferationstest wurden die verschiedenen Effekte der einzelnen siRNAs auf das Wachstum der Krebszellen gezeigt. Die stärkste proliferationshemmende Wirkung hatte demnach die siRNA gegen CDC37 sowohl in den MDA-MB-468- als auch in den A549-Zellen. Durch spezielle Kombinationen mit bestimmten anderen siRNAs bzw. auch miRNAs ließen sich die wachstumshemmenden Effekte mancher siRNA-Einzelbehandlungen leicht steigern. Darunter war die Kombination von der siRNA gegen GRP58 und Lin28b sowie die Mischung von miR-29b und HSP27. Bei anderen, besonders mit der siRNA gegen HSP60 wurde jedoch eine deutliche Reduktion der proliferationshemmenden Wirkung festgestellt.

Der Einfluss der Einzel- sowie Kombinationsbehandlung mit verschiedenen siRNAs auf die einzelnen Zellzyklusphasen der MDA-MB-468 bzw. A549-Zellen wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie untersucht. Dabei erwies sich in den MDA-MB-468-Zellen die Einzelbehandlung mit den siRNAs gegen GRP78 bzw. HSP90 sowie die siRNA-Kombinationsbehandlung gegen GRP78 und HSP90 mit einer deutlichen Verschiebung der G0/G1-Phase zur G2/M-Phase am effektivsten. In den A549-Zellen konnte der deutlichste Effekt nach Survivin-Knockdown mit einer starken Abnahme des Zellanteils in der G0/G1-Phase festgestellt werden, wogegen der apoptotische Zellanteil erhöht war.
Generell konnte gezeigt werden, dass sich das Tumorwachstum nicht durch jede Heat Shock Protein-siRNA oder spezielle Kombinationen im gleichen Ausmaß hemmen lässt, wodurch die Bedeutung einer Definition effektiver Zielgen-Kombinationen in der Tumortherapie in Abhängigkeit der einzelnen Krebsarten verdeutlicht wird.

## Abstract

RNA interference is defined as a sequence-specific, post-transcriptional gene silencing mechanism mediated by dsRNA. Especially in the last years there has been increasing interest to use this gene-silencing-activity in order to develop new drugs for the therapy of various diseases. Cancer is regarded as one of the major targets, as oncogenes, mutated tumor suppressor genes and several other genes that contribute to tumor progression, are potentially important targets for gene silencing by RNAi. SiRNA-based drugs have many advantages in contrast to conventional small molecules or protein-based drugs, including high specificity, better efficacy and less toxicity. The simultaneous knockdown of several genes is another great advantage of RNAi therapeutics in cancer. However, there are some technical barriers to overcome, which are the focus of current research and development.

As heat shock proteins are often overexpressed in cancer cells and thus stabilize oncogenic proteins, promote tumor cell survival, proliferation, angiogenesis and metastasis, in this thesis the main focus was on the investigation of heat shock proteins as favourable targets of anticancer-therapeutics.

Selected synthetic siRNAs targeted at heat shock proteins (HSP27, HSP60, HSP90, CDC37, GRP58, GRP78) were transfected into MDA-MB-468- and A549 cells. Based on proliferation assays the different growth-inhibiting effects of these siRNAs were analyzed. In both celllines siRNA against CDC37 had the most obvious proliferation-inhibiting effect. Using special combinations with other siRNAs or miRNAs the growth-inhibitoring effects of some siRNA-single treatments could be slightly increased. Among them was the siRNA against GRP58 and Lin28b as well as the combination of miR-29b and HSP27. In other combinations however, especially with the siRNA against HSP60, a significant reduction in the anti-proliferative effect was observed.

The influence of single and combination treatment with various siRNAs on the individual cell cycle phases of MDA-MB-468 and A549 cells was analyzed by flow cytometry. In the MDA-MB-468 cells it turned out that the single treatment of the siRNA against GRP78 and HSP90 and the siRNA-combination treatment against GRP78 and HSP90 was most effective with a significant shift of the G0/G1-phase to the G2/M-phase. In A549 cells the

most obvious effect was after survivin-knockdown with a strong decrease of the cell content in the G0/G1-phase, whereas the apoptotic cell percentage was increased.

Generally it has been shown that tumor growth is not inhibited by any heat shock protein-siRNA or specific combinations to the same extent, which clarifies the importance to define effective target gene-combinations in tumor therapy in dependence of the various forms of cancer.

# 1. Einleitung

## 1.1. Heat Shock Proteine

Heat Shock Proteine (HSPs) wurden im Jahre 1962 als eine Reihe von hochkonservierten Proteinen entdeckt. Sie kommen sowohl in Eukaryonten als auch in Prokaryonten vor.[1] Eine erhöhte Expression ist die Antwort auf eine Vielzahl von physiologischen Einflüssen wie auch Umwelteinflüssen, zum Beispiel erhöhter Temperatur, Vorhandensein von Schwermetallen oder oxidativem Stress.[1,2] Es wurde gezeigt, dass die meisten HSPs starke zellschützende Wirkungen haben und sich wie ein molekulares Chaperon für andere zelluläre Proteine verhalten. Durch akuten oder chronischen Stress kann es infolge von Protein-Fehlfaltung, Proteinaggregation oder Störung der regulatorischen Komplexe zur unerwünschten Aktivierung von Signalwegen kommen. Durch ihre Funktion als molekulare Chaperone bringen HSPs die Protein-Homöostase wieder ins Gleichgewicht. Sie unterstützen die korrekte Faltung der synthetisierten Polypeptidkette wie auch fehlgefalteter Proteine und verhindern deren Aggregation.[1] HSPs sind auch dafür bekannt, das Überleben der Zellen durch Hemmung des programmierten Zelltodes (Apoptose) zu erhöhen.[3] In Abhängigkeit von ihrer intrazellulären oder extrazellulären Lage haben HSPs unterschiedliche Funktionen. Intrazelluläre HSPs haben eine Schutzfunktion und ermöglichen den Zellen somit unter ansonsten letalen Bedingungen zu überleben. Weiters wurde gezeigt, dass einige HSPs direkt mit verschiedenen Komponenten des streng regulierten programmierten Zelltodes interagieren. Im Gegensatz dazu können extrazelluläre oder membrangebundene HSPs immunologische Funktionen vermitteln. Sie können eine Immunantwort auslösen, hervorgerufen entweder durch das erworbene oder das angeborene Immunsystem.[1]

Säugetier-HSPs wurden in fünf Familien nach ihrer Molekülgröße eingeteilt: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 und die kleinen HSPs, wobei die Zahl ungefähr dem Molekulargewicht entspricht. Während HSP90 in großer Menge in den Zellen exprimiert wird, ist die Expression von HSP70 und HSP27 stark von unterschiedlichen Einflüssen, wie Hitze, oxidativem Stress oder der Behandlung mit Zytostatika abhängig.[1]

In Tumorzellen kommt es häufig zur Überexpression von HSPs, was zur Stabilisierung von onkogenen Proteinen führen kann. HSPs fördern die Unabhängigkeit von Wachstumsfaktoren, das Überleben der Tumorzellen, die Proliferation, die Gefäßneubildung und die Metastasierung. Weiters scheint es, dass Tumorzellen eine höhere Abhängigkeit von HSPs als normale Zellen zeigen und deshalb auch empfindlicher auf Inhibierung der HSPs reagieren.[2]

Charakteristisch für viele Malignome ist der erhöhte Bedarf an molekularen Chaperonen und damit die erhöhten Werte von HSPs. Diese Abhängigkeit von molekularen Chaperonen scheint ein guter Angriffspunkt im Kampf gegen Krebs zu sein und hat zur Entwicklung von Medikamenten zum Abbau molekularer Chaperone und des Krebs-Proteoms geführt, wodurch es zum Verlust der Lebensfähigkeit der Tumorzellen kommt.[3] Die Mechanismen, denen die erhöhte Expression von molekularen Chaperonen der HSP70- und HSP60-Familien in Krebs zugrunde liegen, sind noch unklar, aber es wird angenommen, dass die Fehlregulation des Transkriptionsfaktors HSF1 eine Rolle spielt.[3]

In normalen, nicht gestressten Zellen werden **HSP70**[4] und **HSP27**[5] gar nicht oder in sehr geringen Mengen exprimiert. Sobald diese HSPs jedoch exprimiert sind, beeinflussen sie nicht nur die Aggregation, den Transport und die Faltung anderer Proteine, sondern greifen auch direkt in den apoptotischen Signalweg ein. HSPs können an mehreren Punkten im apoptotischen Signalweg wirken, um zu gewährleisten, dass Stress-induzierte Schäden nicht unerwünscht den Zelltod auslösen. Im Gegensatz zu normalen, nicht transformierten Zellen, ist das Grundniveau von HSP70 und/oder HSP27 in Tumorzellen ungewöhnlich hoch.[4,5] Tierversuchsmodelle haben gezeigt, dass beide Proteine das kanzerogene Potenzial der Krebszellen erhöhen. Der Beitrag dieser HSPs zur Tumorgenese kann ihrer Funktion als molekularer Chaperone zugeschrieben werden, die den Krebszellen die Möglichkeit bietet, Proteinaktivitäten zu stabilisieren, insbesondere die Komponenten der Zellzyklusmaschinerie, Kinasen und andere Proteine, die das Tumorzellwachstum beeinflussen.[1]

| | |
|---|---|
| Wachstumsfaktoren | Her2, ERbeta |
| Kinasen | IKKbeta, DAXX, PKCdelta, RhoA, Akt, P38, MK2, Phk, p90Rsk, PTEN, PRKD1, PPM1A, TRAF6 |
| Cysteinproteasen | Caspase-3 |
| Membransignalproteine | CD10, TLR3 |

*Tabelle 1: Diverse Proteine, die durch HSP27 stabilisiert werden.*[6]

Das kanzerogene Potential von HSP70 und HSP27 kann auch mit ihren anti-apoptotischen Eigenschaften in Verbindung gebracht werden.[1]

**HSP60** ist ein weiteres Chaperon aus der Familie der Heat Shock Proteine. In Eukaryoten kommt es in der Regel in den Mitochondrien vor, wobei in den letzten Jahren gezeigt werden konnte, dass es auch im Zytosol, an der Zelloberfläche, im extrazellulären Raum und im peripheren Blut zu finden ist. In Wechselwirkung mit HSP10 spielt HSP60 eine wichtige Rolle bei der Faltung neu gebildeter Polypeptide. Zusätzlich begünstigt HSP60 das Überleben von bestimmten Arten von Tumorzellen.[7] Weiters ist bekannt, dass HSP60 die Caspase-Aktivierung steigern kann bzw. anti-apoptotische Mechanismen stimuliert. HSP60 kann also gegenteilige Effekte im Hinblick auf das Tumorzellüberleben haben. Diese Erkenntnisse machen HSP60 zu einem interessanten Angriffspunkt für die Anti-Tumor-Therapie.[7]

**HSP90** ist das am umfangreichsten getestete Target in der Krebstherapie. Mit seinem hohen Molekulargewicht von ungefähr 90kDA ist es besonders wichtig für die Stabilität und Funktion von vielen onkogenen Proteinen, die für die Tumorentwicklung verantwortlich sind.[2] Es wurden mehr als hundert Zielproteine für HSP90 identifiziert.[8] Dazu zählen zum Beispiel Kinasen wie Src und Raf, Signal-Transduktions-Proteine, Transkriptionsfaktoren wie p53, Zellzyklus-regulierende Proteine, antiapoptotische Proteine und die Telomerase.[2]

| | |
|---|---|
| Tyrosin-Kinase-Rezeptoren | Her2, EGFR, c-KIT, MAP2K1, FLT3, VEGFR, IGF1R, EPHA2 |
| Signal-Transduktions-Proteine | N-Ras, Raf1, Akt, IKK, Src |
| Transkriptionsfaktoren | HIF1a, p53, ERalpha, Androgenrezeptor |
| Zellzyklus-regulierende Proteine | CDK4, CDK6, PLK1, WEE1, Cyclin D |
| Antiapoptotische Proteine | APAF1, Survivin, RIPK1, BCL2 |

*Tabelle 2: Diverse Proteine, die durch HSP90 stabilisiert werden.*[2,9]

Die Aktivierung und Stabilisierung dieser Zielproteine macht HSP90 zu einem interessanten Target für die Behandlung von Krebs und anderen Erkrankungen, bei denen HSP90-Zielproteine involviert sind.[8]

Es konnten fünf verschiedene Isoformen von HSP90 identifiziert werden, welche sich in Struktur, Position in der Zelle und Substratspezifität unterscheiden.[2] Im Zytoplasma von Wirbeltieren existieren zwei verschiedene Isoformen von HSP90: eine induzierbare Form (Hsp90α) und eine konstitutiv exprimierte Form (HSP90ß). Alle HSP90-Proteine haben eine gemeinsame Domain-Organisation und sind in der Lage durch Konformationsänderungen ATP zu hydrolysieren. Jede Untereinheit des HSP90-Dimers besteht aus einer N-Domäne, einer M-Domäne und einer C-terminalen Domäne. Die N-Domäne enthält die Nukleotid-Bindungsstelle und wird durch eine lange Linkersequenz mit der M-Domäne verbunden. Der C-Terminus ist die Dimerisierungseite von HSP90. Das Chaperon selbst ist eine sehr langsam wirkende ATPase, welche beim Menschen nur 0,05 Einheiten ATP/min hydrolysiert. Die ATP-Bindung führt zur Umlagerung der drei Domänen von einer offenen V-förmigen Konformation zu einer geschlossenen Konformation. Ein kurzes Segment der N-Domäne und der ATP Deckel klappen über die ATP-Bindungstasche, um das katalytische Zentrum zu bilden. Die ATPase-Aktivität von HSP90 und die Bindung an die Zielproteine werden durch Co-Chaperone maßgeblich unterstützt.[8]

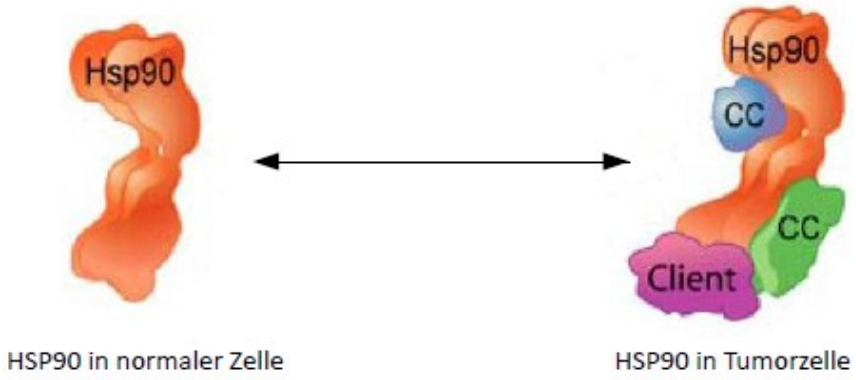



*Abbildung 1: HSP90 zeigt in normalen Zellen wenig ATPase-Aktivität, hingegen in Tumorzellen, in denen HSP90 überexprimiert ist, komplexiert es Co-Chaperone (CC) und hat erhöhte ATPase-Aktivität.*[10]

Diese Co-Faktoren können in Tetratricopeptid-enthaltende Co-Chaperone wie Sti1 und Protein-Phosphatase 5 (PPH-5) und in nicht-Tetratricopeptid-enthaltende Co-Chaperone wie p23, Aha1 und CDC37 gruppiert werden.[8]

**CDC37** ist ein Kinase-spezifisches Co-Chaperon, welches für stabile HSP90-Kinase-Komplexe erforderlich ist. Zusätzlich hemmt CDC37 die ATPase-Aktivität von HSP90. Weiters ist bekannt, dass der N-terminalen Teil von CDC37 für die Kinase-Bindung und die mittlere Domäne für die Wechselwirkung mit HSP90 verantwortlich ist, während der C-terminale Teil unbekannte Funktion hat.
Derzeit werden verschiedene Mechanismen für die hemmende Funktion von CDC37 auf HSP90 diskutiert. Einerseits wird angenommen, dass sich CDC37 zwischen den beiden Untereinheiten von HSP90 positioniert und so das Schließen der N-terminalen Domänen verhindert, was zu Störungen des ATP Umsatzes führt. Andererseits gibt es Hinweise, dass CDC37 an der äußeren Oberfläche von HSP90 zu finden ist.[8]

Die **Glukose-regulierten Proteine** (GRPs) sind stress-induzierte Chaperone, die vor allem im endoplasmatischen Retikulum oder den Mitochondrien vorkommen. Jüngste Fortschritte zeigen, dass GRPs Funktionen besitzen, die denen der verwandten Hitzeschockproteine ähnlich sind. Sie können aktiv zu anderen zellulären Standorten

transportiert werden und neue Funktionen, welche die Signalisierung, Proliferation, Invasion, Apoptose, Entzündungen und Immunität steuern, übernehmen. Weiters konnte anhand von Mausmodellen ihre spezifische Rolle in der Tumorentstehung, Metastasierung und Angiogenese identifiziert werden.[11]

**GRP58** ist ein auf Stress reagierendes Protein aus der Familie der Protein-Disulfid-Isomerasen. Im endoplasmatischen Retikulum ist es für die korrekte Faltung von Glykoproteinen und deren Qualitätskontrolle verantwortlich. Weitere bekannte Funktionen sind die Mitwirkung am Haupthistokompatibilitätskomplex-Klasse I (MHC) und die Regulation der Genexpression. GRP58 ist auch an der Bildung von Komplexen mit anderen Proteinen und sogar DNA beteiligt.[12] Weiters scheint es, dass GRP58 für die embryonale Entwicklung entscheidend ist und mit einigen Erkrankungen wie zum Beispiel Krebs und Alzheimer in Verbindung steht.[13]

Die Glukose-regulierten Proteine **GRP78** (auch bekannt als BiP oder HSPA5)[14], **GRP94** (GP96, HSP90B1)[15], **GRP170** (ORP150, HYOU1)[16] und **GRP75** (Mortalin, HSPA9) sind stress-induzierte molekulare Chaperone. Anders als die meisten der HSPs, welche vor allem im Cytosol und dem Zellkern zu finden sind, kommen diese GRPs im endoplasmatischen Retikulum (ER) oder den Mitochondrien vor. In ihrer Rolle als Chaperon, erleichtern diese GRPs die Proteinfaltung wie auch den Transport von fehlgefalteten Proteinen, welche dann abgebaut werden. Gekoppelt an ihre $Ca^{2+}$-Bindungsfunktionen erhalten sie die Integrität und Homöostase des ER und der Mitochondrien unter physiologischen wie auch pathologischen Bedingungen. In verschiedenen Krebszelllinien ist die Überexpression von GRPs weit verbreitet und steht in Zusammenhang mit aggressivem Wachstum und invasiven Eigenschaften.[11,14,15,16]
GRP78 zum Beispiel reguliert das Gleichgewicht zwischen Überleben der Krebszelle und Apoptose durch Erhaltung der Proteinfaltungskapazität im ER einerseits und Aufrechterhaltung der Stresssensoren und ER-assoziierten pro-apoptotischen Maschinerie andererseits.[11]

GRP170 kann Antigene präsentieren, um eine Immunantwort hervorzurufen, was nahe legt, dass GRP170 als Teil eines neuen Impfstoffs zur Steigerung der Antitumor-Immunantwort fungieren könnte.[11]

Die Entdeckung, dass das Zelloberflächen-GRP78 vorzugsweise in Krebszellen und gestressten Endothelzellen exprimiert wird, hat zur Entwicklung von therapeutischen Mitteln geführt, welche gezielt am Zelloberflächen-GRP78 angreifen. Im Mausmodell hat sich gezeigt, dass diese Mittel bei minimaler Toxizität Apoptose induzieren und die Tumorentstehung unterdrücken können.[11]

Durch die Verwendung von Krebszelllinien, Xenotransplantaten und Knockout-Mausmodellen wurde die wichtige Rolle dieser GRPs in Krebs bekannt.[11]

Vielversprechende Therapeutika, die speziell gegen die GRPs gerichtet sind, befinden sich in der Entwicklung. Dazu zählen zum Beispiel konjugierte Peptide, Proteintoxine, Antikörper, kleine Moleküle und microRNAs.[11]

Vor allem aber HSP90 erwies sich als potentiell geeignetes Ziel zur Behandlung von Krebs. Seitdem bewiesen wurde, dass Geldanamycin Antitumor-Effekte durch die Inhibition von HSP90 besitzt, wurde auf diesem Gebiet viel unternommen, um vielversprechende HSP90-Inhibitoren zu identifizieren bzw. zu synthetisieren.[10,17]

HSP90 scheint aus mehreren Gründen ein geeignetes Ziel zu sein:

- Es ist an der Reifung und Stabilisierung einer Vielzahl von onkogenen Proteinen beteiligt, die eine entscheidende Rolle in der Onkogenese und malignen Progression spielen, wodurch die Krebszellen in gewisser Weise von der korrekten HSP90-Funktion abhängig sind.[17]

- Schlechte Bedingungen wie Hypoxie, niedriger pH-Wert und nicht ausreichende Nährstoffversorgung der Tumorzellen können zur Destabilisierung der Proteine führen, sodass diese noch stärker abhängig von der HSP90-Aktivität sind. Diese große Abhängigkeit der Krebszellen von HSP90 liegt an der Tatsache, dass HSP90 in den Tumorzellen 4-6% des Gesamtproteins ausmacht, wogegen es in normalen Zellen nur 1-2% sind.[17]

- Eine andere Erklärung für die Tumorselektivität von HSP90-Inhibitoren ist der Beobachtung zuzuschreiben, dass HSP90 in den Krebszellen hauptsächlich als multi-Chaperon-Komplex mit einer hohen Affinität für ATP vorhanden ist, während es in normalen Zellen überwiegend in unkomplexierter oder latenter Form vorkommt. Tanespimycin (17-AAG) beispielsweise zeigt zu HSP90, welches aus Tumorzellen isoliert wurde, eine ca. 100-fach höhere Bindungsaffinität als zu HSP90 aus normalen Zellen.[17]

- Weiters konnte beobachtet werden, dass sich eine Vielzahl von HSP90-Inhibitoren, wie zum Beispiel Tanespimycin, Alvespimycin, Retaspimycin, verschiedene Resorcinol-Derivate sowie Purin-Analoga tumorspezifisch anreichern. Somit ist diese Selektivität nicht den strukturellen oder physikalisch-chemischen Eigenschaften einer bestimmten Gruppe von Verbindungen zuzuschreiben, sondern den Eigenschaften von HSP90 selbst.[17]

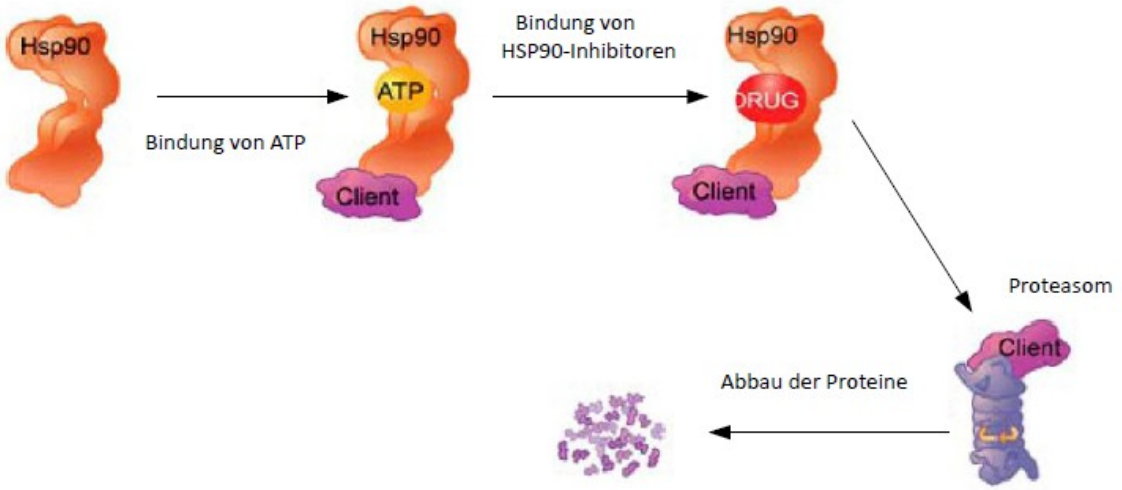



*Abbildung 2:* ***Der Mechanismus von HSP90-Inhibitoren:*** *Während HSP90 in normalen Zellen wenig ATPase-Aktivität und Bindungsaffinität zu HSP90-Inhibitoren zeigt, ist HSP90 in Tumorzellen überexprimiert, hat erhöhte ATPase-Aktivität und damit auch verstärkte Affinität zu HSP90-Inhibitoren. Diese binden kompetitiv an die ATP-Bindungsstelle und stören dadurch die Funktion von HSP90 (darunter die korrekte Proteinfaltung), was zum Abbau der Proteine im Proteasom führt.*[10]

**Retaspimycin** Hydrochlorid beispielsweise (auch bekannt als IPI-504) ist ein Geldanamycin-Analogon, welches sich in pre-klinischen Modellen als potenter HSP90-Inhibitor bei nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (NSCLC), Gastrointestinalkarzinom und HER2-positivem Brustkrebs erwiesen hat. Es bindet mit einer hohen Affinität an HSP90, die Bindung von ATP an HSP90 ist dadurch verhindert und somit in weiterer Folge auch die korrekte Faltung des Proteins.[2] In Untersuchungen an Gliom-Zellen zeigte sich, dass IPI-504 Apoptose induziert, die Motilität beeinflusst, die Bildung von epidermalen Wachstumsfaktoren und mitogen-aktivierten Proteinkinasen signifikant verringert, sowie die Sekretion von vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren hemmt. Weiters konnte an immunsupprimierten Mäusen eine leichte Minderung des Tumorwachstums beobachtet werden. Aus derzeitiger Sicht hat IPI-504 großes Potential als aktive Therapie in Gliomen eingesetzt zu werden, jedoch sind noch weitere Forschungsergebnisse in Kombinationstherapien erforderlich.[18]

Auch **Ganetespib** (STA-9090), ein Resorcinol-Derivat, ist ein durchaus potenter HSP90-Inhibitor, welcher ebenfalls an der ATP-bindenden Domäne von HSP90 angreift. Schon in niedrigen nanomolaren Konzentrationen führt es *in vitro* zur Abtötung einer Vielzahl von menschlichen Krebszelllinien und auch in Tumor-Maus-Modellen konnte eine starke Antitumor-Aktivität beobachtet werden.[19] In Phase-I-Studien an Patienten mit Rektalkarzinomen, chronischer myeloider Leukämie sowie akuter lymphoblastischer Leukämie konnte eine gute Verträglichkeit in Hinblick auf die Leber-, Herz- und renale Toxizität sowie gute Antitumor-Aktivität festgestellt werden. Weiters wurde eine randomisierte Phase-IIb/III-Studie durchgeführt, in der das Standard-Präparat Docetaxel mit der Kombination Docetaxel plus Ganetespib in Patienten mit KRAS-mutiertem NSCLC verglichen wurde. Hierbei konnte eine verbesserte objektive Ansprechrate sowie eine erhöhte Überlebensrate beobachtet werden, was mit der Durchführung einer Phase-III-Studie an einer größeren Zahl an Patienten mit NSCLC bestätigt werden soll.[2] Auch bei metastasierendem Melanom, welches als eine der aggressivsten Formen von Hautkrebs anzusehen ist, gilt Ganetespib als potentes Therapeutikum. Durch die Beeinflussung der Expression von Wachstumsfaktoren und das Eingreifen in Signalwege, den Zellzyklus und Apoptose zeigt sich die antiproliferative Aktivität von Ganetespib auf

eine Vielzahl von kutanen Melanom-Zelllinien, welche letztlich zu einem Zellzyklusarrest sowie Apoptose der Melanomzellen führt.[19]

## 1.2. microRNAs

MicroRNAs (miRNAs) sind kleine endogene nicht-codierende RNAs, die die post-transkriptionelle Genexpression regulieren.[20] Mit einer Länge von 19-25 Nukleotiden (nt) sind sie ein klassisches Beispiel für kurze nicht-codierende RNAs. Durch Hemmung oder Blockierung der Translation der Ziel-mRNA regulieren miRNAs mehr als 30% des Genoms von Säugetieren.[21]

1993 konnte durch Untersuchungen an Caenorhabditis elegans gezeigt werden, dass das Gen lin-4 nicht für ein Protein codiert, sondern für zwei kleine RNA-Moleküle. Eines der beiden war mit einer Länge von 61 nt reichlich vorhanden, während das andere mit einer Länge von 21 nt nicht translatiert wurde. Nachfolgende Untersuchungen zeigten, dass das 21 nt-Transkript komplementär an die 3'-nicht übersetzte Region (3'-UTR) von lin-14 bindet und so die Expression von lin-14 vermindert. Im Jahre 2000 wurde in Caenorhabditis elegans eine weitere 22 nt nicht-kodierende RNA, let-7, identifiziert. Überraschenderweise wurde hier auch festgestellt, dass sie komplementär zu einem Abschnitt der 3'-UTR von lin-41 ist.[20]

miRNAs werden durch RNA-Polymerase II transkribiert. Die ersten Zwischentranskripte sind Haarnadel (Hairpin)-Moleküle, welche auch pri-miRNA genannt werden. Anders als bei mRNAs beginnt die miRNA-Reifung im Zellkern und endet im Zytoplasma. Drosha, ein RNase Typ III Enzym mit endonukleolytischer Aktivität erkennt die Haarnadel-Struktur der pri-miRNA und spaltet sie. Dadurch entsteht eine pre-miRNA mit einer Länge von ca. 60-70 nt. Im Zytoplasma wird die pre-miRNA durch das Enzym DICER zur dimeren miRNA. Während der Strang mit niedriger freier Energie am 5'-Ende in den RISC (RNA-induced silencing complex) eingebaut wird, wird der andere Strang abgebaut. Die an die RISC-Struktur gebundene miRNA wird zur komplementären Sequenz der Ziel-mRNA geführt. Wenn die Kopplung abgeschlossen (100% Sequenz-Komplementarität zwischen

der miRNA und mRNA) ist, wird die mRNA abgebaut. Ist die Sequenz jedoch nur teilweise komplementär, kommt es zur Hemmung der mRNA-Translation.

Alternativ dazu können miRNAs auch aus in Introns vorliegenden Sequenzen transkribiert werden.[20]

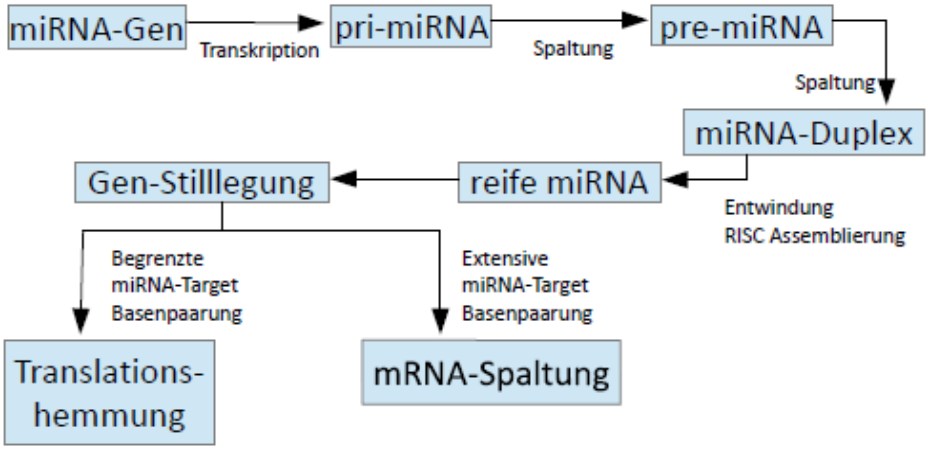



*Abbildung 3:* ***miRNA-Reifung:*** *Durch Transkription wird aus dem miRNA-Gen die pri-miRNA (primary microRNA).Nach Spaltungsprozessen wird daraus die pre-miRNA (precursor microRNA). Im Zytoplasma wird diese pre-miRNA gespalten und der miRNA-Duplex, welcher die reife miRNA enthält, wird gebildet. Der Duplex entwindet sich, sodass die reife miRNA in den RISC aufgenommen werden kann. Die Basenpaarung zwischen der miRNA und der Ziel-mRNA führt zur Genstilllegung, entweder durch mRNA-Spaltung oder durch Translationshemmung in Abhängigkeit von der Komplementarität zwischen miRNA und der Ziel-mRNA.*[22]

Bisher hat sich gezeigt, dass miRNAs die Expression von mindestens einem Drittel aller menschlichen Gene reguliert, und damit eine wichtige Rolle in verschiedenen biologischen Prozessen, einschließlich der Regulierung des Zellzyklus, Apoptose, Zelldifferenzierung und embryonalen Entwicklung spielen. Die Deregulierung der miRNA-Expression wird häufig mit menschlichen Krebsarten assoziiert. Dabei kommt es meist zur Aktivierung von Onkogenen oder Inaktivierung von Tumor-Suppressor-Genen. Weiters wurde gezeigt, dass miRNAs auch eine wichtige Rolle bei der Myogenese und Kardiogenese spielen.[20]

## 1.3. siRNAs und RNA-Interferenz

Auch die small interfering RNA (siRNA) zählt zu den nicht codierenden RNAs. Mit einer Länge von 21-23 nt spielt sie eine wichtige Rolle in der RNA-Interferenz.[23] Nicht nur die Größe ist jener der miRNAs ähnlich, es gibt auch Gemeinsamkeiten in der Biogenese und der Funktion. Sowohl miRNAs als auch siRNAs haben doppelsträngige Vorläuferformen.[24] Während miRNAs von Transkripten produziert werden, die Haarnadelstrukturen bilden, entstehen siRNAs aus langen doppelsträngigen RNA-Vorstufen (dsRNA).

Auch die eigene Expressionshemmung ist ein wesentlicher Unterschied zwischen miRNAs und siRNAs. Fast alle siRNAs, egal ob endogene siRNAs oder Virus-siRNAs, können ihren eigenen Ursprungsort lahmlegen, was zu einem kontinuierlichen Kampf um ihre eigene Produktion führt.[24] Manche haben auch die Fähigkeit andere Orte im Genom stillzulegen. Weiters bedeutet dies, dass sie sehr anpassungsfähig sind und ihre Sequenzkonservierung gegen den Selektionsdruck behaupten können. Im Gegensatz dazu können die meisten miRNAs ihren eigenen Entstehungsort nicht hemmen, jedoch andere Gene stilllegen. Dies ist wahrscheinlich der Bildung von miRNA Vorläufer-RNAs im Kern und dem Ausschluss von gereifter, effektiver miRNA aus dem Kern zuzuschreiben.[24]

Unter RNA-Interferenz (RNAi) versteht man einen sequenzspezifischen, post-transkriptionellen Gen-Silencing-Mechanismus in Tieren und Pflanzen, welcher durch dsRNA vermittelt wird.[25]

Gen-Silencing durch dsRNA wurde erstmals in den frühen 1990er Jahren in Pflanzen beobachtet. Das Phänomen RNAi wurde jedoch erst 1998 durch Fire et al. beschrieben, die herausfanden, dass die Injektion von dsRNA in Caenorhabditis elegans zur Inaktivierung der komplementären mRNA-Sequenz führt. Da die eingeführten dsRNA Moleküle die Funktion des Zielgens blockieren, wurde das Verfahren "RNA-Interferenz" bezeichnet. Es wurde auch beobachtet, dass mehrere hundert Basen lange dsRNAs nicht nur für erhebliches Gen-Silencing in Caenorhabditis elegans verantwortlich waren,

sondern auch stärker und aktiver als die entsprechenden einzelsträngigen Antisense-Moleküle waren.[25]

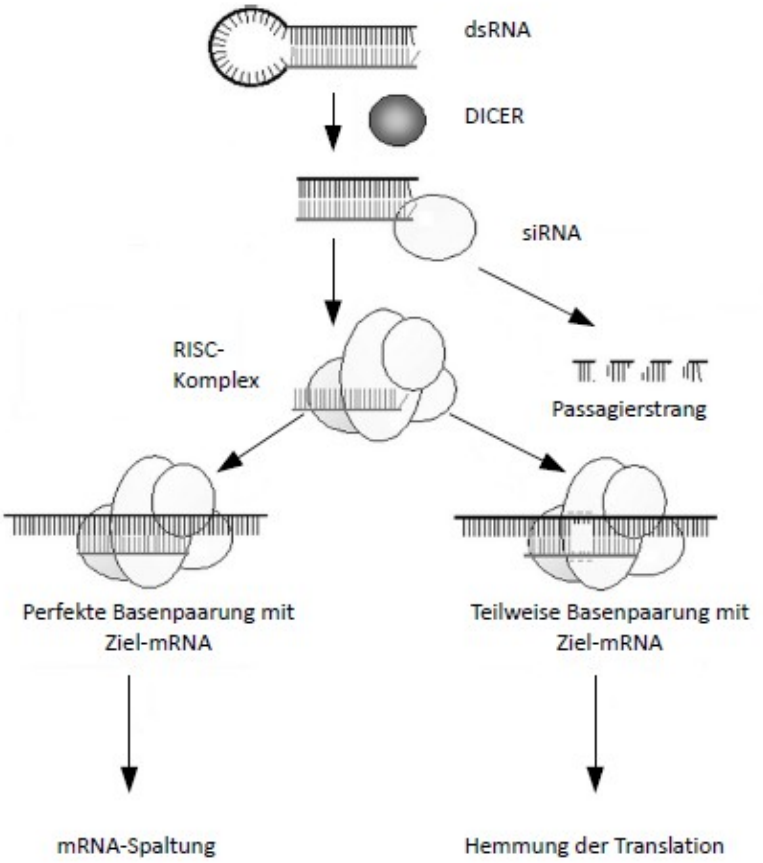



*Abbildung 4:* ***Der Mechanismus der RNAi:*** *Die dsRNA wird von dem Enzym Dicer in die 21-23 nt lange[23] siRNA gespalten. Während der Strang mit schwächerer 5'-Basenpaarung in den RISC eingebaut wird, wird der andere Strang abgebaut. Je nach Sequenzkomplementarität kommt es entweder zur mRNA-Spaltung oder Translationshemmung.[26]*

Das lange Fragment der dsRNA wird durch das Enzym DICER in Duplexe mit 19 gepaarten nt und 2 nt langen Überhängen an den beiden 3'-Enden gespalten. Diese Duplexe, bekannt als siRNA, bilden zusammen mit den Argonautenproteinen einen großen Proteinkomplex, den RISC. Innerhalb des RISC entwindet sich die siRNA und der Leitstrang leitet den RISC an die Ziel-mRNA, während der andere Strang entfernt und durch Nukleasen abgebaut wird. Die zum Leitstrang komplementäre mRNA wird in den RISC aufgenommen. Ago2 spaltet die Phosphodiesterbindung auf der mRNA und setzt

die gespaltenen Fragmente frei, die schließlich abgebaut werden und im Gen-Silencing resultieren. Der mit siRNA beladene RISC kann für mehrere Durchgänge des Gen-Silencing Prozesses recycelt werden, was die siRNA für therapeutische Eingriffe äußerst attraktiv macht.[25]

Als Alternative dazu kann der RISC die Funktion einer zum Leitstrang der siRNA komplementären mRNA als Informationsüberträger auch ohne Spaltung blockieren.[27]
Mithilfe von miRNAs kann das Gen-Silencing auf zwei posttranskriptionelle Arten durchgeführt werden. Einerseits die mRNA-Spaltung, andererseits die translationale Hemmung. Ausschlaggebend welcher Mechanismus angewendet wird ist die Komplementarität zwischen mRNA und miRNA. Zur Spaltung kommt es, wenn es nahezu vollständige Sequenzkomplementarität gibt. Ist die Sequenz jedoch nur teilweise komplementär, kommt es zur translationalen Hemmung der mRNA.[20,28] Kommt es zur Spaltung durch miRNA, bleibt diese nach der Spaltung unversehrt und kann weitere mRNAs zerstören.[28]

## 1.4. RNA-basierte Therapeutika bei Krebs

In letzter Zeit gibt es zunehmendes Interesse an der Nutzung der Gen-Silencing-Aktivität von dsRNA um neue Medikamente für die Behandlung von verschiedenen Krankheiten, wie Krebs, neurologischen Erkrankungen, altersbedingter Makula-Degeneration und viralen Infektionen zu entwickeln. SiRNA-basierte Medikamente haben deutliche Vorteile gegenüber herkömmlichen kleinen Molekülen oder Protein-basierten Medikamenten, darunter zum Beispiel hohe Spezifität, bessere Wirksamkeit und geringere Toxizität. Allerdings gibt es einige technische Hürden zu überwinden, bevor siRNA-basierte Medikamente zur Anwendung kommen. Das Erreichen der Zielgewebe, die Aufnahme in die Zielzellen und die Stabilität im Serum stellen große Herausforderungen dar und sind die Schwerpunkte der aktuellen Forschung und Entwicklung.[25]

Trotz einer Reihe von Hürden, haben bereits einige RNA oder RNA-basierte Therapeutika die klinische Prüfung erreicht. Herausforderungen beim Erreichen der Zielgewebe, in der Spezifität, Stabilität und Immunaktivierung von RNA-Therapeutika haben zu Verbesserungen von synthetischen und natürlichen Nukleinsäure-Trägersystemen und der Entwicklung von chemisch modifizierten Oligonukleotiden geführt.[29]

RNA ist *in vivo* instabil aufgrund der Fülle von Ribonukleasen im Serum und in den Zellen. Durch chemische Modifikationen können die gewünschten Eigenschaften verbessert werden, ohne dabei die Aktivität zu beeinflussen. Diese können unter anderem die Affinität zum Zielort erhöhen, den Abbau durch Nukleasen verringern und die pharmakokinetischen Eigenschaften sowie die RNAi-Silencing Effizienz verbessern.[29] Jedoch erfüllt bislang keine Derivatisierung alle diese Anforderungen.

Krebs ist eines der Hauptziele der RNAi-basierten Therapie, da Onkogene, mutierte Tumorsuppressorgene und mehrere andere Gene, welche zur Tumorprogression beitragen, potentiell wichtige Ziele für das Gen-Silencing durch RNAi sind. Aufgrund des genauen Wirkungsmechanismus, der hohen Spezifität und Wirksamkeit des RNAi-vermittelten Gen-Silencing können Nebenwirkungen reduziert werden, welche häufig mit Chemotherapeutika assoziiert sind. Einen großen Vorteil der RNAi-Therapeutika bei Krebs stellt die Möglichkeit des gleichzeitigen Erreichens mehrerer Gene dar, was auf unterschiedliche zelluläre Signalwege, die an der Tumorprogression beteiligt sind, zurückzuführen ist. Die gleichzeitige Hemmung von mehreren Genen durch einen siRNA-Cocktail ist möglicherweise ein effektiverer und wirksamerer Weg zur Behandlung von Krebs und könnte auch die Wahrscheinlichkeit von mehrfachen Arzneimittelresistenzen minimieren, welche in der Regel bei der Krebstherapie mit kleinen Molekülen auftreten.[25]

# 2. Ziel

Das primäre Ziel meiner Diplomarbeit war die Untersuchung der Effekte der siRNA-basierten Hemmung verschiedener Heat Shock Proteine, und damit deren Eignung als therapeutische Ziele. Der Einfluss von einigen Co-Faktoren sollte ebenfalls bestimmt werden. Durch gleichzeitige Hemmung mehrerer HSPs bzw. Co-Faktoren sollten neue Informationen über das Zusammenspiel dieser Proteinfamilie gewonnen werden.

Im ersten Schritt sollten synthetische siRNAs von Heat Shock Proteinen ausgewählt werden, um sie anschließend in Tumorzellen zu transfizieren. Im nächsten Schritt sollte anhand von Proliferationstests gezeigt werden, welche Effekte die verschiedenen siRNAs auf das Wachstum der Krebszellen haben. Effektive Heat-Shock-siRNAs sollten des weiteren mit anderen siRNAs und auch miRNAs kombiniert werden, um eventuelle additive und im besten Fall auch synergistische Antitumor-Effekte zu zeigen. Dies sollte für eine Auswahl verschiedener Tumorzelllinien so durchgeführt werden, um die unterschiedliche Wirkung der siRNAs auf diese aufzeigen zu können.

Zur genaueren Charakterisierung der funktionellen Effekte sollten Zellzyklus-Analysen durchgeführt werden, um den Einfluss effektiver Sequenzen auf die behandelten Krebszellen analysieren zu können. Dazu sollte eine Analyse mit Hilfe der Durchflusszytometrie etabliert und verwendet werden.

# 3. Material und Methoden

## 3.1. Zellkultur

Im Zuge meiner Diplomarbeit wurden mehrere Zelllinien aus humanem Lungenkarzinom, Brustkarzinom, Gebärmuterhalskarzinom und Kolonkarzinom verwendet. Die Kultivierung war für alle verwendeten Zelllinien dieselbe: A549 Zellen, MCF-7 Zellen, MDA-MB-468 Zellen, SW480 Zellen und HeLa Zellen wurden in DMEM + Glutamax™ (Dulbeco's Modified Eagle Medium, Gibco™, Großbritannien) mit 10%igem Zusatz von fetalem Kälberserum (Gibco™) bei 37°C mit 5% Kohlenstoffdioxid befeuchteter Luft kultiviert. Auf den Einsatz von Antibiotika wurde dabei gänzlich verzichtet.

## 3.2. Zelllinienvermehrung

Zum Splitten wurden nahezu konfluente Zellen verwendet. Zunächst wurde das Medium mit Hilfe einer Pipette entfernt. Mit vorgewärmtem, sterilem 1x DPBS (Dulbeco's Phosphate Buffered Saline, Gibco™, Großbritannien) wurden die Zellen gewaschen. Zur Ablösung von der Gefäßwand, wurden die Zellen mit Trypsin (Gibco™) behandelt und anschließend für fünf Minuten bei 37 °C inkubiert. Danach wurde frisches, steriles Medium beigefügt. Durch das im vorgewärmten Medium enthaltene FCS (fetale Kälberserum) wurde die Trypsinaktivität sofort inhibiert. Nach guter Durchmischung der Zellsuspension wurde ein Aliquot in eine neue 25 $cm^2$ große Zellkulturflasche (Greiner Bio-One, Deutschland) mit frischem vorgewärmtem Medium gegeben. Je nach Konfluenz wurden die Zellen alle 24 h, 48 h bzw. 72 h gesplittet.

## 3.3. Reverse Transfektion

Zunächst wurde Lipofectamin RNAiMax (Gibco™) mit Optimem Medium (Gibco™) verdünnt – 0,15 µl Lipofectamin in 15 µl Optimem für jedes zu behandelnde Well. In sterilen 1,5 ml Eppendorfgefäßen wurde Optimem Medium (Gibco™) vorgelegt, anschließend wurden siRNAs bzw. miRNAs in verschiedenen Kombinationen und das verdünnte Lipofectamin RNAiMAX (Gibco™) hinzugefügt. Die Konzentration der miRNA/siRNA Kombinationen für die Zellbehandlung lag bei 2,5 nM. Die Eppendorfgefäße wurden nun geschüttelt, kurz zentrifugiert und anschließend für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurde eine Zellsuspension mit gewünschter Zellzahl pro ml in DMEM durch Trypsinisierung, Zählen in einer Neubauer-Kammer und anschließendem Verdünnen bereitet. Nach Ablauf der 20 minütigen Inkubationszeit wurden 30 µl des siRNA/miRNA-Lipofectamin-Gemisches in jedes Well einer 96-Well Platte (Greiner bio-one) pipettiert. Danach wurden 170 µl der frisch bereiteten Zellsuspension hinzugefügt. Je nach verwendeter Zelllinie enthielt dann jedes Well zwischen 2500 (HeLa) und 6500 (MDA-MB-468) Zellen. Um die Zellen homogen in den Wells zu verteilen wurde die Platte kurz im Tecan plate reader M200Pro (Tecan, Grödig, Austria) geschüttelt.

## 3.4. Proliferationstest

### *3.4.1. Proliferationstest mit EZ4U-Substrat*

Dieser Proliferationstest wurde üblicherweise nach 72-stündiger Inkubation der revers-transfizierten Zellen in den 96-Well Platten durchgeführt. Benötigt wurden 11 ml vorgewärmtes (37 °C) Medium pro 96-Well Platte und EZ4U, das nicht radioaktive Zellproliferationsbestimmungs-Set (Biomedica, Österreich).

Zu Beginn wurde das EZ4U Substrat in einer Glasphiole bereitet, in welcher das Trockensubstrat mit 2,5 ml Aktivatorflüssigkeit versetzt wurde. Durch Schütteln konnte

das Substrat vollständig gelöst werden. Pro 96-Well Platte wurden 1,25 ml des gelösten EZ4U Substrats mit dem vorgewärmtem Medium gemischt. Nach Entfernen des alten Mediums von der 96-Well-Platte, wurden nun in jedes Well 200 µl von der Substrat-Medium-Lösung pipettiert. Als Negativ-Kontrolle wurden 3 freie Wells ebenfalls mit der Mischung befüllt. Anschließend wurde die Platte in den Tecan Scanner eingelegt. Zur Analyse wurde die i-Control Software angewendet. Nun wurden alle 30 Minuten Messungen durchgeführt, bis die maximale Absorption einen Wert zwischen 1,8 – 2,0 erreicht hat. Zwischen den Messungen befanden sich die Platten im Inkubator bei 37 °C.

### *3.4.2. Proliferationstest mit PrestoBlue Reagenz*

Dieser Proliferationstest wurde ebenfalls für gewöhnlich nach 72-stündiger Inkubation der revers-transfizierten Zellen in den 96-Well Platten durchgeführt. Für A549 Zellen wurde die Proliferation anhand dieses Tests analysiert, weil sich herausstellte, dass die Zellen auf das PrestoBlue sensitiver reagierten als auf das EZ4U Substrat. Hierbei wurden pro 96-Well Platte 2,9 ml vorgewärmtes (37 °C) Medium und 325 µl PrestoBlue Reagenz (PrestoBlue™ Cell Viability Reagent, Invitrogen, USA) benötigt.

Die Mischung des vorgewärmten Mediums mit dem PrestoBlue Reagenz erfolgte in der Laminar-Flow Werkbank unter sterilen Bedingungen. Wie beim Proliferationstest mit dem EZ4U Substrat wurde auch hier zunächst das alte Medium von der 96-Well Platte abgenommen. Danach wurde jedes Well mit 50 µl der Mischung gefüllt und 3 Wells als Negativ-Kontrolle wurden wieder gefüllt. Im Tecan Reader wurde mit Hilfe der i-Control Software analysiert. Anders als bei der Messung mit EZ4U wurde hier nicht die Absorption der Zellen, sondern die Fluoreszenz gemessen und zwar jeweils nach 60 Minuten und nach 90 Minuten. Nach 90 Minuten wurde meist ein Wert zwischen 20 000 und 25 000 erreicht und die Messung konnte beendet werden. Zwischen den Messungen wurden die Platten wieder im Inkubator bei 37 °C platziert.

## 3.5. Propidiumjodid-Färbung und FACS-Analyse (Fluorescence Activated Cell Sorting)

Für dieses Experiment wurden revers transfizierte Zellen nach 72 stündiger Inkubationszeit verwendet. Zunächst wurde das Medium, das 10 % FCS enthält, abgenommen und in sterile 1,5 ml Eppendorfgefäße übergeführt. Daraufhin wurde jedes Well zwei Mal mit je 100 µl DMEM-FCS gewaschen, um die Reste des Presto Blue bzw. EZ4U zu entfernen. Das Medium des zweiten Waschschrittes blieb ca. eine Stunde auf den Zellen damit sich diese erholen. Danach wurden die Zellen mit 40 µl Trypsin behandelt, um eine Einzelzellsuspension zu erhalten. Gestoppt wurde die Trysinisierung durch Zugabe von 150 µl des alten, zuvor in den 1,5 ml Eppendorfgefäßen gesammelten Mediums, in welchem die Zellen 72 Stunden inkubiert wurden. Das Medium wurde in einer V-Boden Platte gesammelt und auf Eis gestellt. Die Zellsuspension wurde in die dazugehörigen Wells der V-Boden Platte übergeführt, welche auf Eis stand. Nun wurde die Platte für 5 Minuten bei 500 g zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abpipettiert, um das Zellpellet nicht zu verlieren. Anschließend wurde dieses in 40 µl 1xDPBS mit 5 mM EDTA resuspendiert. Durch Hinzufügen von 200 µl 96 % Ethanol wurden die Zellen fixiert und konnten so bei -20 °C gelagert werden. Im nächsten Schritt wurden die in der V-Boden Platte Ethanol-fixierten Zellen bei 500 g und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert und daraufhin der Überstand abpipettiert. Danach wurden 200 µl 1xDPBS mit 5 mM EDTA und 1 % FBS zugegeben, um die Zellen durch Auf- und Abpipettieren zu resuspendieren. Anschließend wurde wieder bei 500 g und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Nun wurden 200 µl 1xDPBS mit 5 mM EDTA und 1 % FBS sowie 10 µg/ml Propidiumjodid hinzugefügt. Wieder wurden die Zellen durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Zuletzt wurden die V-Boden Platten mit den jeweiligen Zellsuspensionen für 10 Minuten auf Eis platziert und anschließend mit dem Durchflusszytometer MACSQuant Analyzer (Miltenyi Biotec, Germany) gemessen.

# 4. Resultate

Für die Durchführung der Experimente wurden aus einem Pool von synthetisierten und auf Gen-Knockdown untersuchten siRNAs bzw. miRNAs die für eine Proliferationshemmung ausgesuchter Krebszelllinien scheinbar effektivsten ausgewählt. Da Heat Shock Proteine in Tumorzellen häufig überexprimiert sind, wurde der Fokus auf eben diese siRNAs gelegt.

## 4.1. Proliferationstest

Nach erfolgter Transfektion wurden Proliferationstests durchgeführt, um die Effekte der einzelnen siRNAs bzw. miRNAs oder auch Kombinationen von beiden auf das Tumorwachstum zu untersuchen. Verschiedene Tumorzelllinien wurden dafür verwendet. Anfangs wurden einzelne siRNAs bzw. miRNAs in die Zellen transfiziert. Die anschließende Inkubation für 72 h bei 37 °C garantierte die Genausschaltung durch siRNAs und den Austausch der miRNAs. Je nach verwendeter Tumorzelllinie wurden unterschiedliche Proliferationstests durchgeführt.

Für MDA-MB-468, SW480 sowie HeLa-Zellen wurde die Proliferation aufgrund der unterschiedlichen Absorption gemessen. Als Indikator für die Zellvitalität wurden Tetrazoliumsalze verwendet. Lebende Zellen besitzen die Fähigkeit farblose oder schwach gefärbte Tetrazoliumsalze in intensiv gefärbte Formazanderivate umzuwandeln. Diese Reduktionsreaktion erfordert jedoch intakte Mitochondrien, welche innerhalb weniger Minuten nach dem Absterben der Zelle inaktiviert werden. Aus diesem Grund kann man bei diesem Test ausgezeichnet zwischen lebenden und toten Zellen unterscheiden.

Zur Analyse der Proliferation von A549-Zellen wurde ein anderer Test herangezogen. Hier wurde als Indikator für die Lebensfähigkeit der Zellen eine Resazurin-basierte Lösung verwendet. Resazurin ist blau und nicht-fluoreszierend. Durch den Kontakt mit

lebenden Zellen kommt es zur Reduktion dieser Verbindung zu Resorufin, wodurch sich die Farbe von blau zu rot ändert und starke Fluoreszenz zu beobachten ist. Die Fluoreszenz, welche wiederum mit dem Tecan Reader Infinite F 200 Pro gemessen wurde, ist proportional zu der Anzahl der lebenden Zellen und wurde daher zur quantitativen Analyse herangezogen.
Mit Hilfe dieser beiden Proliferationstests konnten die Effekte der einzelnen siRNAs und miRNAs in unterschiedlichen Tumorzellen gut analysiert werden. Aufbauend darauf wurden dann einige siRNAs und miRNAs für Kombinationen ausgewählt, um die gemessenen Effekte zu steigern, wobei das Hauptaugenmerk auf die Kombination von verschiedenen Heat Shock Proteinen gerichtet wurde.

Um die Signifikanz in den Unterschieden zwischen unbehandelten und behandelten Zellen zu bestimmen, kam der Student t-Test zur Anwendung. Alle erhaltenen Ergebnisse wurden auf eine Negativ-Kontrolle bezogen, um unspezifische Einflüsse, welche zum Beispiel auf das Transfektionsreagenz zurückzuführen sind, auszugleichen. Auch Unterschiede in der Proliferation können durch diese Kontrolle ausgeglichen werden.

Zunächst wurden die MDA-MB-468-Zellen mit den siRNAs gegen einige Heat Shock Proteine behandelt und für 72 Stunden inkubiert. Die anschließende Messung der Absorption und die darauffolgende Auswertung ergab eine untereinander recht unterschiedliche relative Proliferationshemmung der einzelnen siRNAs.

Nachfolgend sind die verwendeten siRNAs der Heat Shock Proteine und ihre wesentlichen Funktionen als Chaperone in den Zellen aufgelistet.

- CDC37: wichtige Aufgabe in Signaltransduktion der Zellen
- GRP58: vermittelt im Komplex mit Lektinen die Faltung neu synthetisierter Glykoproteine
- GRP78: wichtige Aufgabe in Faltung und Aggregation von Proteinen im ER

- HSP27: involviert in Stressresistenz und Aktin-Organisation, bei Stressinduktion Translokation von Zellplasma in Zellkern
- HSP60: wichtig für Faltung und Aggregation von Proteinen in den Mitochondrien
- HSP90: hilft Proteinen über ATPase-Aktivität bei korrekter Faltung; durch Co-Chaperon unterstützt.

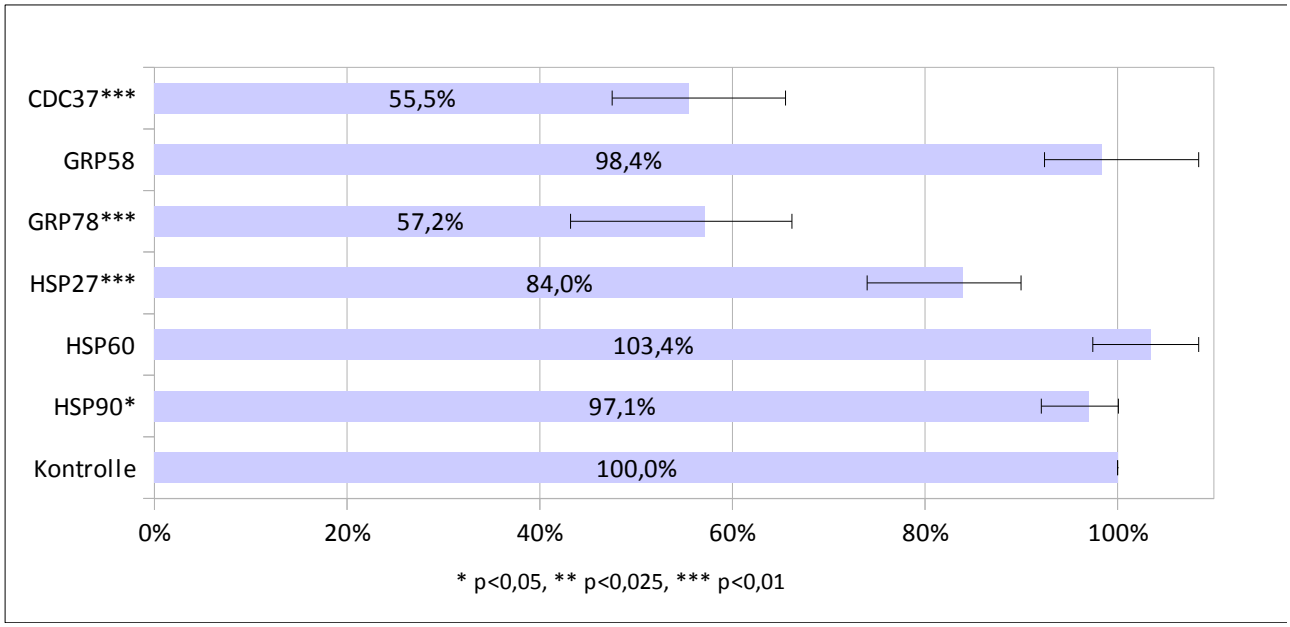



*Abbildung 5: Proliferation der einzelnen Heat Shock Protein-siRNAs von MDA-MB-468-Zellen bezogen auf eine unbehandelte Negativ-Kontrolle. Die Standardabweichungen sind als Fehlerindikatoren angegeben.*

Die Behandlung mit der siRNA gegen CDC37 erzielte mit einer Proliferationshemmung von 44 % im Vergleich zu den unbehandelten Zellen die größten Effekte. Die Hemmung von GRP78 zeigte mit einer Verminderung des Wachstums von 43 % ein ganz ähnliches Ergebnis. Die anderen Heat Shock Protein-siRNAs lieferten mit Minuswerten zwischen 16 % und 2 % schwächere Effekte. Bei der Behandlung mit der siRNA gegen HSP60 kam es sogar zu einer Proliferationssteigerung um 3 %.

Um diese Effekte der Wachstumshemmung weiter auszubauen bzw. zu verbessern, wurden weitere Experimente durchgeführt. Die oben angeführten siRNAs wurden mit anderen siRNAs und auch miRNAs kombiniert, in die MDA-MB-468-Zellen transfiziert und wieder für 72 Stunden inkubiert. Nach Messung der Absorption und genauer

Auswertung zeigten sich unterschiedlichste Ergebnisse. Einige davon wurden ausgewählt und in den nachfolgenden Abbildungen dargestellt.

Die in den ausgewählten Kombinationen verwendeten siRNAs bzw. miRNAs und ihre wichtigsten Aufgaben sind in folgender Aufzählung beschrieben.[9,30]

- EpCAM: fungiert als Calcium-unabhängiges Zell-Adhäsionsmolekül
- miR-29b-2: involviert in Regulierung der post-transkriptionellen Genexpression; beeinflusst Stabilität und Translation von mRNAs z.B. von MCL-1; erhöhte miR-29b-2-Expression führt in malignen Zellen zur Downregulierung von MCL-1
- BCL2: Membranprotein außerhalb der Mitochondrien; blockiert Apoptose von Zellen, wie zum Beispiel Lymphozyten

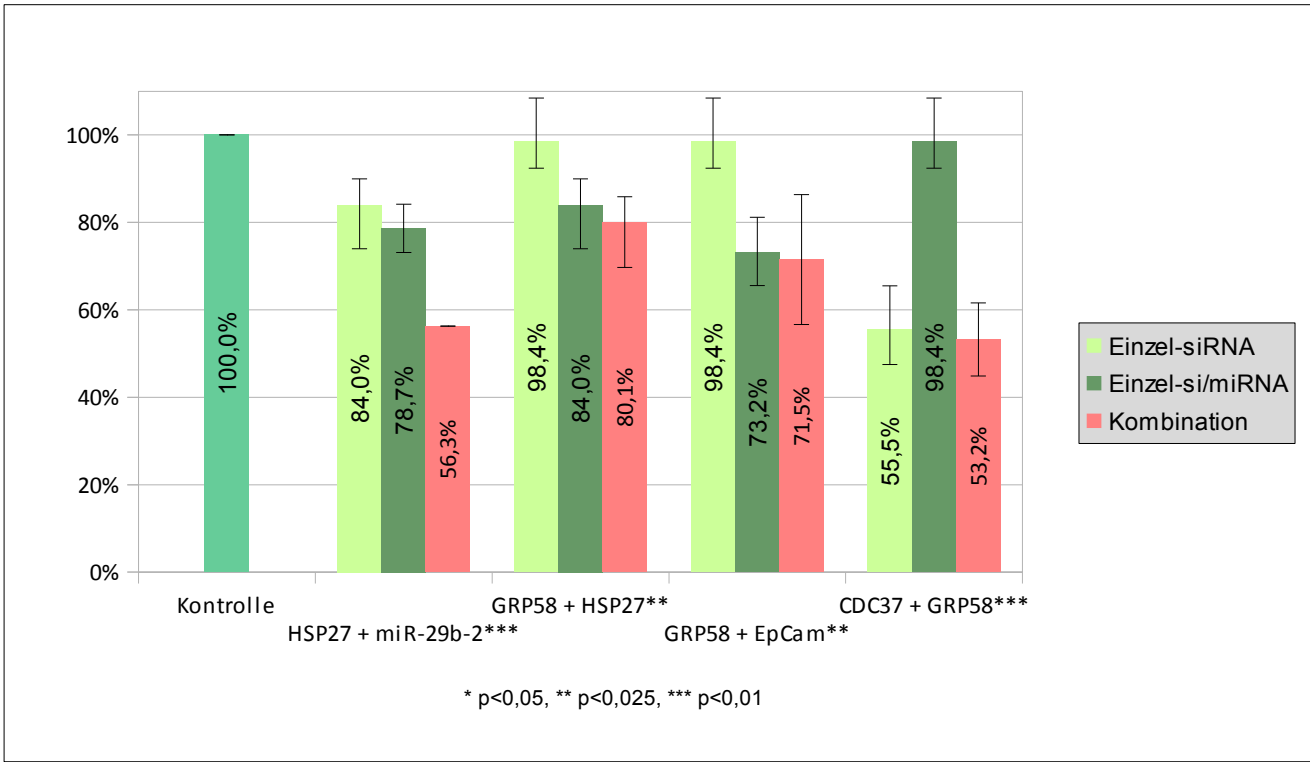



*Abbildung 6: Proliferation der Kombinationen einzelner Heat Shock Protein-siRNAs mit anderen siRNAs/miRNAs bezogen auf eine unbehandelte Negativ-Kontrolle in MDA-MB-468-Zellen. Die Standardabweichungen sind als Fehlerindikatoren angegeben.*

An den in Abbildung 6 angeführten siRNA-Kombinationen konnten additive und sogar teils leicht synergistische Effekte verzeichnet werden. Durch die gemeinsame Transfektion der siRNAs gegen CDC37 und GRP58 addierten sich die Effekte der Einzel-siRNAs. Weiters zeigte sich bei dem Silencing von GRP58 und EpCAM eine Addition der proliferationshemmenden Wirkung im Vergleich zu den siRNA-Einzelbehandlungen. So ergab sich eine Wachstumsminderung von 29 %. Durch Kombinierung der siRNAs gegen GRP58 und HSP27 sowie HSP27 und miR-29b-2 konnten sogar leicht synergistische Effekte beobachtet werden. Die Minderung des Zellwachstums lag bei den siRNA-Kombinationsbehandlungen gegen GRP58 und HSP27 bei 20 %, bei HSP27 und miR-29b-2 sogar bei 44 %. Am wirkungsvollsten stellte sich die siRNA-Kombination gegen CDC37 und GRP58 heraus mit einer Wachstumshemmung von fast 47 %, wobei der proliferationshemmende Effekt der siRNA-Einzelbehandlung gegen CDC37 allein schon 44 % betrug.

Durch die spezielle Kombination der Heat Shock Protein-siRNAs untereinander bzw. mit anderen siRNAs und miRNAs konnten nicht nur additive und leicht synergistische Effekte gezeigt werden. Bei einigen Kombinationen konnte im Vergleich zu den siRNA-Einzelbehandlungen eine verminderte proliferationshemmende Wirkung beobachtet werden.

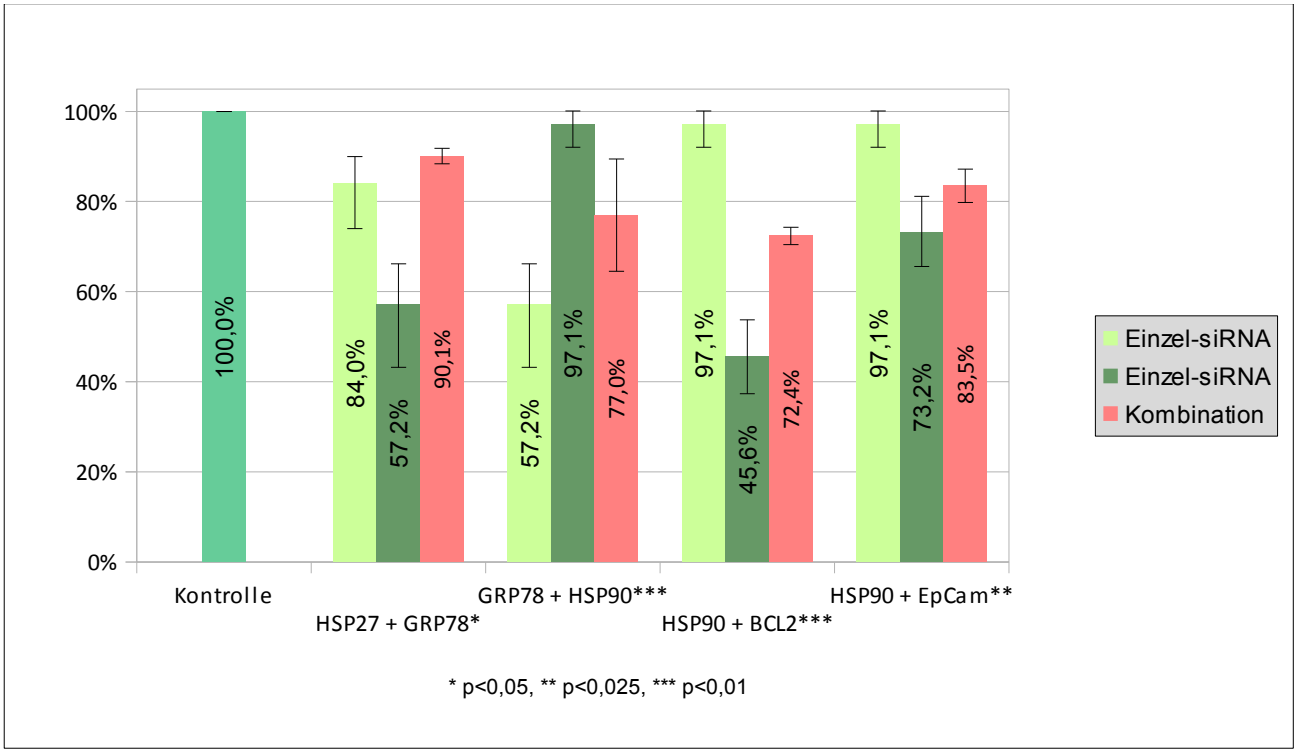



*Abbildung 7: Proliferation der Kombinationen einzelner Heat Shock Protein-siRNAs mit anderen siRNAs bezogen auf eine unbehandelte Negativ-Kontrolle in MDA-MB-468-Zellen. Die Standardabweichungen sind als Fehlerindikatoren angegeben.*

Die Auswertung der durchgeführten Proliferationstests ergab für einige Kombinationen eine teils drastische Minderung der wachstumshemmenden Wirkung im Vergleich zu den siRNA-Einzelbehandlungen. Vor allem die gemeinsame Transfektion verschiedener siRNAs mit der siRNA gegen HSP90 führte zu einer wesentlichen Abnahme der proliferationshemmenden Effekte. Durch die gleichzeitige Hemmung von EpCAM und HSP90 konnte eine Reduktion der Proliferation von nur noch 17 % beobachtet werden, wobei die siRNA-Einzelbehandlung gegen EpCAM eine Wachstumshemmung von 27 % zeigte. Auch die proliferationshemmenden Effekte der siRNAs gegen GRP78 und HSP90 sowie BCL2 und HSP90 minimierten sich stark. Die Einzelbehandlung mit der siRNA gegen GRP78 ergab eine Wachstumsverminderung von 43 %, in Kombination mit der HSP90-siRNA waren es nur noch 23 %. Ähnliches zeigte sich bei den siRNAs gegen BCL2 und HSP90. Während das Silencing von BCL2 eine Reduktion des Wachstums von 52 %

ergab, waren es in Kombination mit der HSP90-siRNA nur noch 28 %. Die stärkste Abschwächung der proliferationshemmenden Wirkung konnte bei der gleichzeitigen Hemmung von GRP78 und HSP27 beobachtet werden. Hier lag der wachstumshemmende Effekt bei lediglich 10 %, während die Auswertung des Proliferationstests mit der GRP78-siRNA-Einzelbehandlung ein Minus von 43 % zeigte.

Nicht nur MDA-MB-468-Zellen wurden mit siRNAs einzeln oder in Kombination mit anderen behandelt, auch an A549-Zellen wurden zahlreiche Experimente durchgeführt. Zunächst wurden wieder die einzelnen siRNAs der Heat Shock Proteine in die Zellen transfiziert. Nach 72-stündiger Inkubationszeit wurden Proliferationstests durchgeführt, welche anschließend ausgewertet wurden.

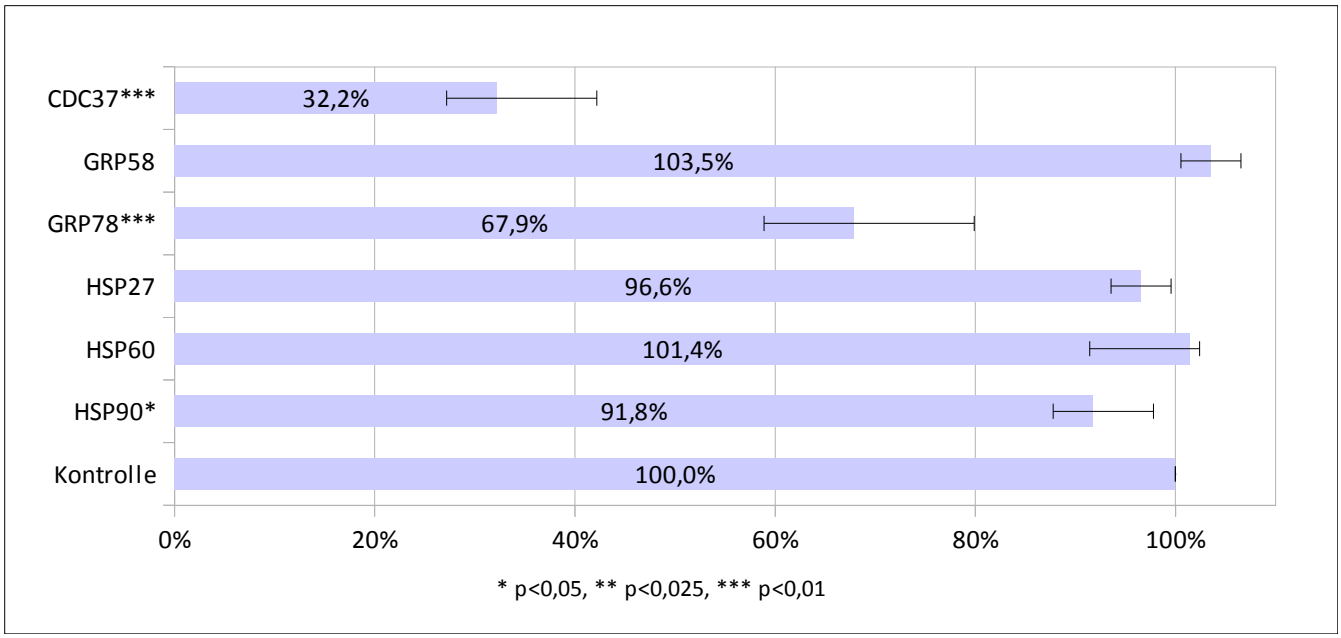



*Abbildung 8: Proliferation der einzelnen Heat Shock Protein-siRNAs von A549-Zellen bezogen auf eine unbehandelte Negativ-Kontrolle. Die Standardabweichungen sind als Fehlerindikatoren angegeben.*

Wie schon bei den MDA-MB-468-Zellen zeigte sich wieder beim Gen-Silencing von CDC37 der stärkste wachstumshemmende Effekt mit einem Wert von 68 %. Bei der siRNA-Behandlung gegen GRP78 konnte eine Proliferationshemmung von 32 % beobachtet werden. Schwächere Effekte gab es bei den siRNAs gegen HSP27 und HSP90.

Hier lag das Wachstum im Vergleich zu den unbehandelten Zellen immer noch bei über 90 %. Bei der Hemmung von GRP58 bzw. HSP60 kam es sogar zu einer Proliferationssteigerung um 4 % bzw. 1 %.

Die nachfolgende Abbildung zeigt einen Vergleich der Proliferationen der beiden Krebszelllinien MDA-MB-468 und A549 durch Behandlung mit den Heat Shock-siRNAs.

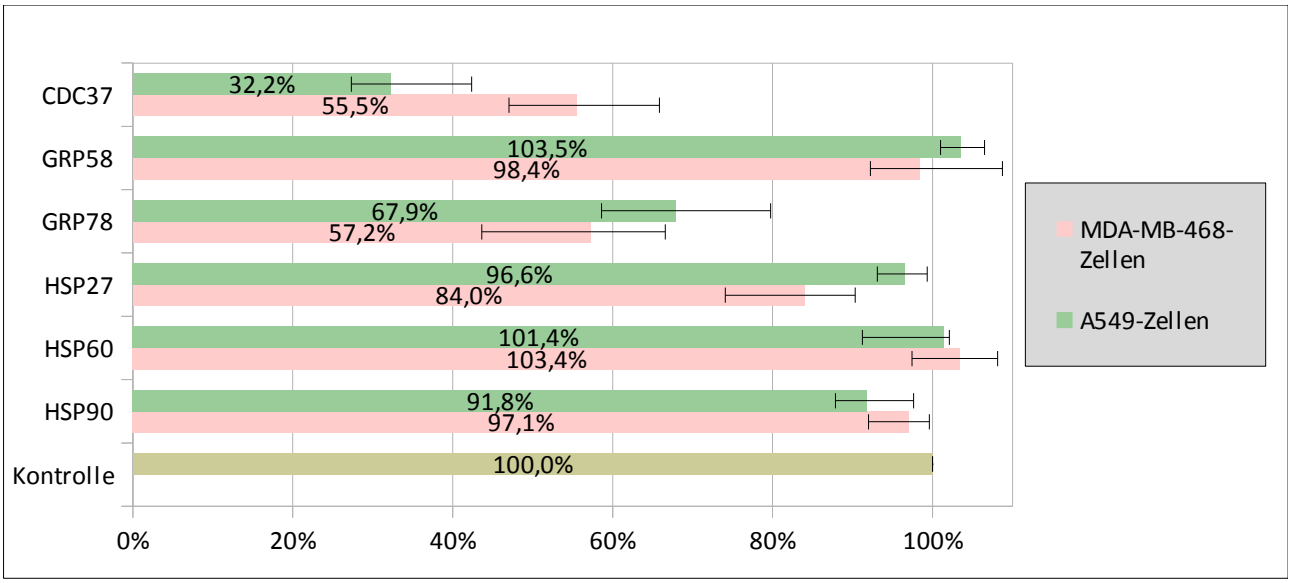



*Abbildung 9: Proliferation der einzelnen Heat Shock Protein-siRNAs von MDA-MB-468-Zellen sowie A549-Zellen bezogen auf eine unbehandelte Negativ-Kontrolle. Die Standardabweichungen sind als Fehlerindikatoren angegeben.*

Deutliche Abweichungen der wachstumshemmenden Effekte zwischen den beiden Zelllinien gab es bei den siRNAs gegen CDC37, GRP78 und HSP27, wobei hier der größte Unterschied mit mehr als 20 % bei der Behandlung mit der CDC37-siRNA zu beobachten war. Schwache Wachstumsunterschiede mit Werten um 5% oder weniger konnten beim Silencing von GRP58, HSP60 und HSP90 verzeichnet werden.

Um eine mögliche Steigerung der wachstumshemmenden Effekte im Vergleich zu den siRNA-Einzelbehandlungen untersuchen zu können, wurden auch an den A549-Zellen wieder mehrere Zweier-Kombinationen getestet.

Nachfolgend sind die zur Kombination verwendeten siRNAs und ihre wichtigsten Funktionen aufgelistet.[9,31]

- Lin28b: bindet und inhibiert let-7 miRNAs; dadurch Expressionserhöhung von Onkogenen (z.B. MYCN, welches das Wachstum und die Zellteilung von Neuroblastomzellen fördert), die durch let-7 reguliert werden
- MDM2: fördert Tumorbildung durch Hemmung von Tumorsuppressor-Proteinen, wie p53; eigene Expression wird durch p53 reguliert
- Survivin: auch „Überlebens-Protein“ genannt; apoptosehemmend; hoch exprimiert während Embryonalentwicklung und in Tumorgewebe

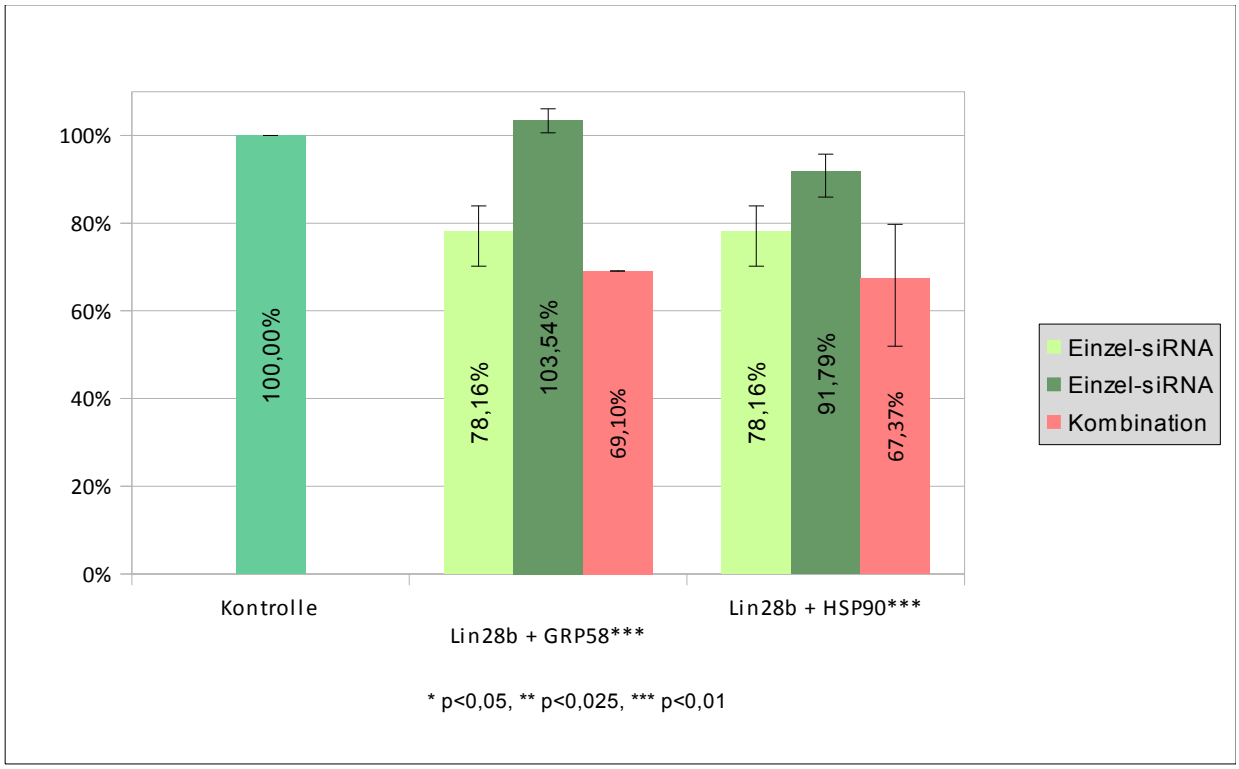



*Abbildung 10: Proliferation zweier Kombinationen einzelner Heat Shock Protein-siRNAs mit anderen siRNAs bezogen auf eine unbehandelte Negativ-Kontrolle in A549-Zellen. Die Standardabweichungen sind als Fehlerindikatoren angegeben.*

Durch die gleichzeitige Hemmung von LIN28b und GRP58 sowie Lin28b und HSP90 konnten im Vergleich zu den siRNA-Einzelbehandlungen leicht synergistische Effekte festgestellt werden. Die alleinige Transfektion der Lin28b-siRNA bewirkt eine

Proliferationshemmung von 22 %, in Kombination mit der siRNA gegen GRP58 konnte der wachstumshemmende Effekt auf 31 % signifikant ($p<0,01$) gesteigert werden, obwohl die GRP58-siRNA selbst keine Verringerung der Proliferationsrate bewirkt. Ganz ähnlich war es bei der gleichzeitigen Hemmung von LIN28b und HSP90. Hier konnte durch die siRNA-Kombination eine Proliferationshemmung von 33 % erreicht werden.

Wie schon bei MDA-MB-468-Zellen konnte auch bei den A549-Zellen durch bestimmte Kombinationen eine deutliche Reduktion der Proliferationshemmung gegenüber den siRNA-Einzelbehandlungen beobachtet werden.

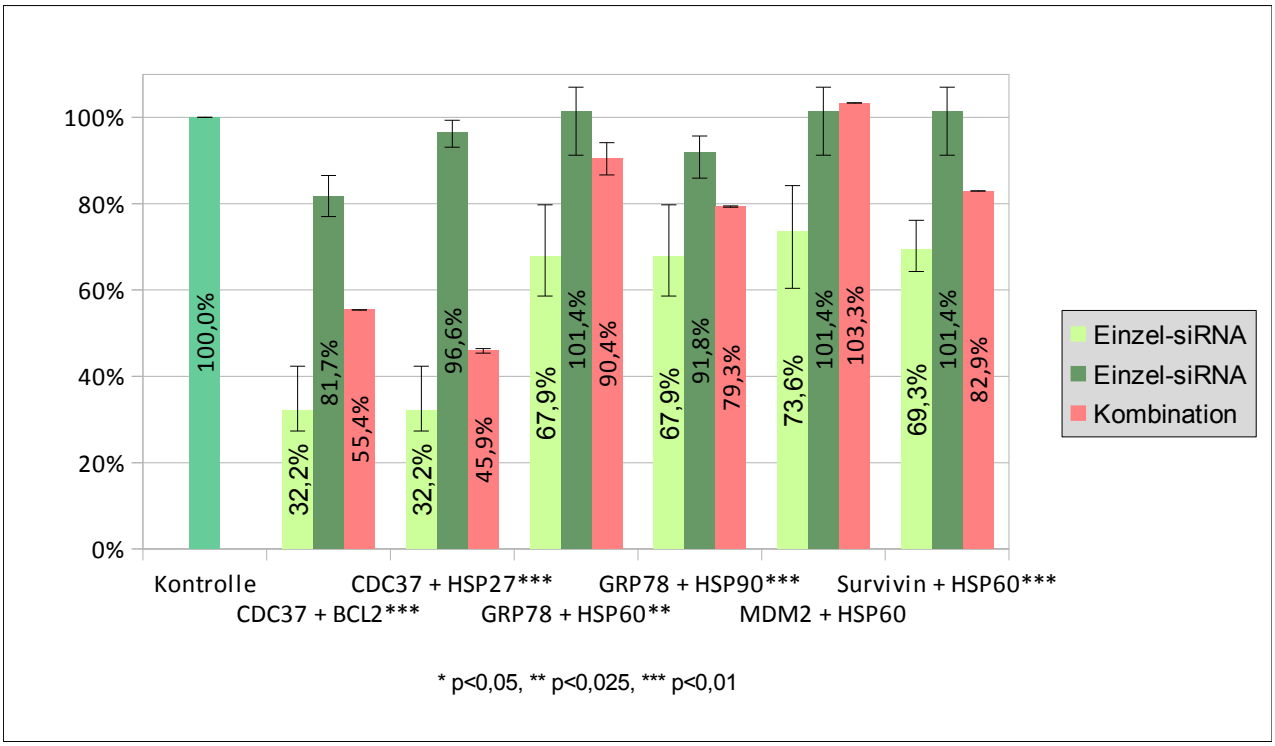



*Abbildung 11: Proliferation der Kombinationen einzelner Heat Shock Protein-siRNAs mit anderen siRNAs bezogen auf eine unbehandelte Negativ-Kontrolle in A549-Zellen. Die Standardabweichungen sind als Fehlerindikatoren angegeben.*

Die Behandlung der Zellen mit der siRNA gegen CDC37 alleine führt zu einer Wachstumshemmung von 68 %. Dieser starke Effekt wurde durch die Kombination mit den siRNAs gegen BCL2 oder HSP27 deutlich reduziert. Durch die gleichzeitige Hemmung von CDC37 und BCL2 betrug die Wachstumshemmung nur noch 45 %, bei CDC37 und

HSP27 waren es 54 %. Weiters konnte bei der Kombination der siRNAs gegen GRP78 und HSP60 sowie GRP78 und HSP90 eine deutliche Verminderung der Einzeleffekte verzeichnet werden. Die siRNA gegen GRP78 alleine bewirkt eine Proliferationshemmung von 32 %, wogegen die Kombination mit der siRNA gegen HSP60 das Wachstum der Zellen um nur 10 % senken konnte. Durch die Behandlung mit den siRNAs gegen GRP78 und HSP90 lag der proliferationshemmende Effekt bei nur noch 21 %. Auch die Kombination der siRNAs gegen Survivin und HSP60 zeigte eine Verminderung der Effekte. Während die siRNA-Einzelbehandlung gegen Survivin eine Hemmung des Wachstums von 31 % ergab, waren es in Kombination mit der siRNA gegen HSP60 nur noch 17 %. Zur völligen Aufhebung der wachstumshemmenden Wirkung kam es bei der gleichzeitigen Hemmung von MDM2 und HSP60, obwohl beide in Einzelanwendung deutlichen Einfluss auf die Proliferation hatten. Die siRNA gegen MDM2 alleine bewirkt eine Verminderung des Wachstums um 26 %.

## 4.2. Zellzyklusanalysen mit Durchflusszytometrie

Nach der Färbung mit Propidiumjodid wurde mit einigen siRNA-behandelten Zellen eine Zellzyklusanalyse durchgeführt. Wie schon bei den Proliferationstests wurde auch hier das Hauptaugenmerk wieder auf die Heat Shock Proteine gerichtet. Es wurde der Einfluss der verschiedenen siRNAs bzw. Kombinationen davon auf die einzelnen Zellzyklusphasen von MDA-MB468-Zellen und A549-Zellen analysiert und in den folgenden Tabellen dargestellt.

| Apoptotische Zellen (3 biologische Replikate) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Kombination** | **Konzentration** | **%** | **STD in %** | **Differenz** | **Signifikanz** |
| Unbehandelte Zellen | 7,65 nM | 9,10 | 3,66 | 0,00 | n.s. |
| GRP78 | 7,65 nM | 8,10 | 3,22 | -1,00 | n.s. |
| HSP27 | 7,65 nM | 6,50 | 1,86 | -2,60 | n.s. |
| HSP90 | 7,65 nM | 8,50 | 1,68 | -0,60 | n.s. |
| GRP78 + HSP27 | 7,65 nM | 8,06 | 0,97 | -1,03 | n.s. |
| GRP78 + HSP90 | 7,65 nM | 9,65 | 2,64 | 0,56 | n.s. |
| HSP90 + BCL2 | 7,65 nM | 6,91 | 1,54 | -2,19 | n.s. |

*Tabelle 3: Prozentueller Anteil der apoptotischen Zellen nach der Behandlung der MDA-MB468-Zellen mit einzelnen Heat Shock Protein-siRNAs bzw. Kombinationen.*

Die meisten apoptotischen Zellen mit einem Wert von ca. 10 % konnte man bei der Behandlung der Zellen mit der siRNA gegen GRP78 in Kombination mit der siRNA gegen HSP90 beobachten. Den geringsten Anteil an apoptotischen Zellen erreichte das Silencing von HSP27. Hier waren es 6,5 %. Die restlichen Behandlungen mit siRNAs bzw. Kombinationen zweier siRNAs erzielten Werte um 8 %. Alle Ergebnisse zeigten jedoch im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (9,1 % apoptotische Zellen) keine signifikanten Unterschiede.

| G0/G1 Phase, diploider Chromosomensatz (3 biologische Replikate) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Kombination** | **Konzentration** | **%** | **STD in %** | **Differenz** | **Signifikanz** |
| Unbehandelte Zellen | 7,65 nM | 41,95 | 1,87 | 0,00 | n.s. |
| GRP78 | 7,65 nM | 24,53 | 13,18 | -17,42 | * p<0,05 |
| HSP27 | 7,65 nM | 42,26 | 8,09 | 0,30 | n.s. |
| HSP90 | 7,65 nM | 16,68 | 8,61 | -25,27 | *** p<0,01 |
| GRP78 + HSP27 | 7,65 nM | 34,55 | 7,91 | -7,40 | n.s. |
| GRP78 + HSP90 | 7,65 nM | 21,15 | 14,53 | -20,80 | * p<0,05 |
| HSP90 + BCL2 | 7,65 nM | 43,72 | 7,15 | 1,76 | n.s. |

*Tabelle 4: Prozentueller Anteil der MDA-MB468-Zellen, welche nach der Behandlung mit einzelnen Heat Shock Protein-siRNAs bzw. Kombinationen in der G0/G1 Phase zu finden sind.*

Der größte Anteil an Zellen in der G0/G1 Phase wird durch die Kombinationsbehandlung mit den siRNAs gegen HSP90 und BCL2 mit einem Wert von fast 44 % erreicht, jedoch ist dies nicht signifikant in Bezug auf die unbehandelten Zellen. Sehr signifikant (p<0,01) ist der Unterschied mit ca. 25 % zwischen den mit HSP90-siRNA-behandelten (~ 17 %) und den unbehandelten Zellen (~ 42 %), hier ist jedoch die Standardabweichung mit fast 9 % ziemlich hoch. Generell konnten recht hohe Standardabweichungen festgestellt werden.

| S Phase (3 biologische Replikate) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Kombination** | **Konzentration** | **%** | **STD in %** | **Differenz** | **Signifikanz** |
| Unbehandelte Zellen | 7,65 nM | 28,20 | 7,19 | 0,00 | n.s. |
| GRP78 | 7,65 nM | 26,97 | 3,77 | -1,24 | n.s. |
| HSP27 | 7,65 nM | 23,54 | 2,30 | -4,66 | n.s. |
| HSP90 | 7,65 nM | 28,11 | 4,71 | -0,10 | n.s. |
| GRP78 + HSP27 | 7,65 nM | 32,66 | 4,83 | 4,46 | n.s. |
| GRP78 + HSP90 | 7,65 nM | 23,67 | 5,41 | -4,54 | n.s. |
| HSP90 + BCL2 | 7,65 nM | 27,50 | 3,92 | -0,71 | n.s. |

*Tabelle 5: Prozentueller Anteil der MDA-MB468-Zellen, welche nach der Behandlung mit einzelnen Heat Shock Protein-siRNAs bzw. Kombinationen in der S-Phase zu finden sind.*

Der Anteil an unbehandelten Zellen in der Synthese-Phase beträgt ca. 28 %. Im Bezug darauf zeigen sich durch die Behandlung mit siRNAs bzw. siRNA-Kombinationen keine signifikanten Unterschiede. Die Differenzen zwischen behandelten und unbehandelten Zellen liegen zwischen -0,10 und 4,46 %.

| **G2/M Phase, doppelt diploider Chromosomensatz (3 biologische Replikate)** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Kombination** | **Konzentration** | **%** | **STD in %** | **Differenz** | **Signifikanz** |
| Unbehandelte Zellen | 7,65 nM | 21,28 | 2,49 | 0,00 | n.s. |
| GRP78 | 7,65 nM | 32,85 | 6,54 | 11,56 | ** p<0,025 |
| HSP27 | 7,65 nM | 22,65 | 5,32 | 1,37 | n.s. |
| HSP90 | 7,65 nM | 37,25 | 5,60 | 15,96 | *** p<0,01 |
| GRP78 + HSP27 | 7,65 nM | 22,59 | 2,73 | 1,31 | n.s. |
| GRP78 + HSP90 | 7,65 nM | 33,03 | 7,78 | 11,75 | ** p<0,025 |
| HSP90 + BCL2 | 7,65 nM | 21,02 | 4,43 | -0,26 | n.s. |

*Tabelle 6: Prozentueller Anteil der MDA-MB468-Zellen, welche nach der Behandlung mit einzelnen Heat Shock Protein-siRNAs bzw. Kombinationen in der G2/M-Phase zu finden sind.*

Bei den Zellen in der G2- bzw. Mitose-Phase lassen sich je nach Behandlung recht unterschiedliche Ergebnisse analysieren. Mit Ausnahme des gleichzeitigen Silencing von HSP90 und BCL2 zeigt sich bei allen Behandlungen eine Erhöhung des Zellanteils in der G2- bzw. M-Phase, was auf eine Hemmwirkung deutet. Während es bei der Behandlung mit der siRNA gegen HSP27 sowie GRP78 und HSP27 nur zu einem leicht erhöhten Anteil um ungefähr 1 % in Bezug auf die unbehandelten Zellen kommt, kann man bei den Zellen, welche mit den siRNAs gegen GRP78, HSP90 und einer Kombination aus beiden behandelt wurden, eine signifikante Erhöhung ($p<0,025$ bzw. $p<0,01$) feststellen.

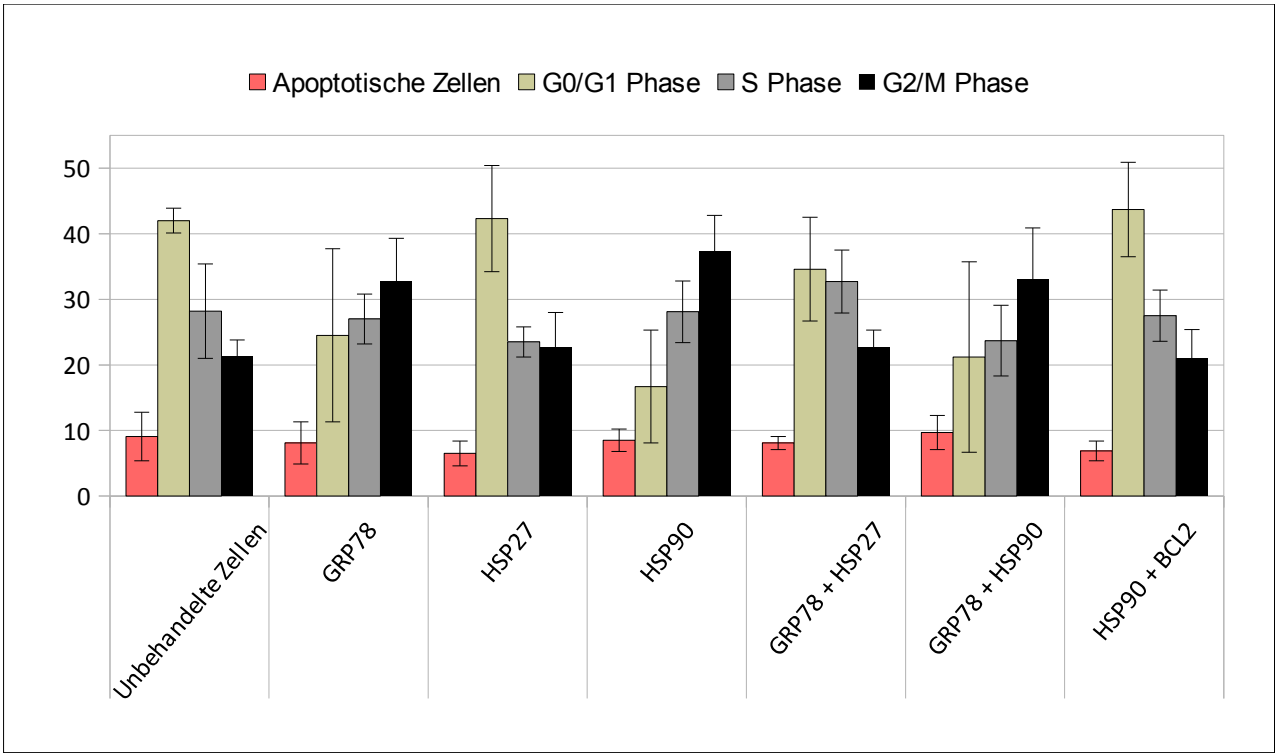



*Abbildung 12: Prozentuelle Darstellung der Zellzyklusphasen der unbehandelten sowie behandelten MDA-MB468-Zellen.*

Wie aus Abbildung 12 gut hervorgeht, zeigen sich bei der Zellzyklusanalyse der mit GRP78-, HSP90- und GRP78 + HSP90-siRNA-behandelten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen die meisten Effekte. Hierbei ist eine deutliche Verschiebung der G0/G1-Phase zur G2/M-Phase zu beobachten. Der Einfluss der Behandlungen auf den Anteil der apoptotischen Zellen sowie der Zellen in der Synthese-Phase war nur sehr gering und damit verglichen mit den unbehandelten Zellen nicht signifikant.

Auch für A549-Zellen wurden Zellzyklusanalysen durchgeführt, wie in folgenden Tabellen dargestellt wird.

| Apoptotische Zellen (3 biologische Replikate) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Kombination** | **Konzentration** | **%** | **STD in %** | **Differenz** | **Signifikanz** |
| Unbehandelte Zellen | 7,65 nM | 8,21 | 0,72 | 0,00 | n.s. |
| HSP60 | 7,65 nM | 10,02 | 1,69 | 1,81 | n.s. |
| GRP78 | 7,65 nM | 11,25 | 1,13 | 3,04 | n.s. |
| GRP78 + HSP60 | 7,65 nM | 9,19 | 1,35 | 0,98 | n.s. |
| HSP90 | 7,65 nM | 12,19 | 3,57 | 3,98 | n.s. |
| HSP90 + GRP78 | 7,65 nM | 11,29 | 0,81 | 3,07 | n.s. |
| BCL2 | 7,65 nM | 12,76 | 2,63 | 4,55 | * p<0,05 |
| BCL2 + HSP90 | 7,65 nM | 17,59 | 1,57 | 9,37 | *** p<0,01 |
| Survivin | 7,65 nM | 18,03 | 5,54 | 9,82 | *** p<0,01 |
| Survivin + HSP60 | 7,65 nM | 19,06 | 1,79 | 10,85 | *** p<0,01 |
| MDM2 + HSP60 | 7,65 nM | 13,70 | 3,29 | 5,48 | ** p<0,025 |
| MDM2 | 7,65 nM | 16,22 | 4,00 | 8,00 | ** p<0,025 |

*Tabelle 7: Prozentueller Anteil der apoptotischen Zellen nach der Behandlung der A549-Zellen mit einzelnen Heat Shock Protein-siRNAs bzw. Kombinationen.*

Durch die Behandlung der A549-Zellen mit bestimmten siRNAs lassen sich deutliche Effekte verglichen mit den unbehandelten Zellen verzeichnen. So zeigt sich zum Beispiel bei der gleichzeitigen Behandlung mit der siRNA gegen Survivin und HSP60 die stärkste Erhöhung des apoptotischen Anteils um mehr als 10 %, wobei die siRNA gegen HSP60 alleine nur einen geringen Effekt hat. Der Einfluss der siRNAs gegen Survivin, MDM2 und BCL2 kombiniert mit HSP90 führt ebenfalls zu einer deutlichen Zunahme der apoptotischen Zellen.

| G0/G1 Phase, diploider Chromosomensatz (3 biologische Replikate) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Kombination** | **Konzentration** | **%** | **STD in %** | **Differenz** | **Signifikanz** |
| Unbehandelte Zellen | 7,65 nM | 48,46 | 1,54 | 0,00 | n.s. |
| HSP60 | 7,65 nM | 49,28 | 1,44 | 0,81 | n.s. |
| GRP78 | 7,65 nM | 57,39 | 0,44 | 8,93 | *** p<0,01 |
| GRP78 + HSP60 | 7,65 nM | 51,19 | 0,79 | 2,72 | * p<0,05 |
| HSP90 | 7,65 nM | 50,61 | 0,41 | 2,15 | * p<0,05 |
| HSP90 + GRP78 | 7,65 nM | 49,97 | 1,10 | 1,51 | n.s. |
| BCL2 | 7,65 nM | 51,34 | 2,45 | 2,87 | * p<0,05 |
| BCL2 + HSP90 | 7,65 nM | 51,62 | 0,69 | 3,16 | ** p<0,025 |
| Survivin | 7,65 nM | 41,37 | 3,28 | -7,09 | ** p<0,025 |
| Survivin + HSP60 | 7,65 nM | 40,44 | 2,63 | -8,02 | *** p<0,01 |
| MDM2 + HSP60 | 7,65 nM | 51,64 | 1,63 | 3,18 | * p<0,05 |
| MDM2 | 7,65 nM | 54,82 | 0,91 | 6,35 | *** p<0,01 |

*Tabelle 8: Prozentueller Anteil der A549-Zellen, welche nach der Behandlung mit einzelnen Heat Shock Protein-siRNAs bzw. Kombinationen in der G0/G1 Phase zu finden sind.*

Wie schon bei den MDA-MB468-Zellen beobachtet werden konnte, befindet sich auch der Großteil der A549-Zellen in der G0/G1-Phase. Mit über 57 % und damit um fast 9 % mehr als die unbehandelten Zellen erzielt das Silencing von GRP78 den größten Effekt. Zu einer signifikanten Erhöhung ($p<0,01$) der prozentuellen Anteile kommt es auch durch die Einzelbehandlung mit der siRNA gegen MDM2. Aufgrund des Einflusses der Survivin-siRNA befinden sich im Vergleich zu den unbehandelten Zellen deutlich weniger in der G0/G1-Phase. Durch Kombination mit der siRNA gegen HSP60 lässt sich dieser Effekt um ca. einen Prozent steigern.

| S Phase (3 biologische Replikate) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Kombination** | **Konzentration** | **%** | **STD in %** | **Differenz** | **Signifikanz** |
| Unbehandelte Zellen | 7,65 nM | 30,33 | 1,45 | 0,00 | n.s. |
| HSP60 | 7,65 nM | 28,67 | 1,36 | -1,67 | n.s. |
| GRP78 | 7,65 nM | 24,21 | 1,07 | -6,12 | *** p<0,01 |
| GRP78 + HSP60 | 7,65 nM | 28,59 | 1,30 | -1,75 | n.s. |
| HSP90 | 7,65 nM | 27,14 | 2,27 | -3,20 | n.s. |
| HSP90 + GRP78 | 7,65 nM | 28,35 | 1,54 | -1,98 | n.s. |
| BCL2 | 7,65 nM | 28,77 | 3,92 | -1,56 | n.s. |
| BCL2 + HSP90 | 7,65 nM | 23,47 | 1,20 | -6,87 | *** p<0,01 |
| Survivin | 7,65 nM | 26,43 | 4,20 | -3,90 | n.s. |
| Survivin + HSP60 | 7,65 nM | 25,46 | 2,26 | -4,88 | ** p<0,025 |
| MDM2 + HSP60 | 7,65 nM | 25,84 | 2,98 | -4,49 | * p<0,05 |
| MDM2 | 7,65 nM | 22,81 | 3,24 | -7,52 | ** p<0,025 |

*Tabelle 9: Prozentueller Anteil der A549-Zellen, welche nach der Behandlung mit einzelnen Heat Shock Protein-siRNAs bzw. Kombinationen in der S-Phase zu finden sind.*

Ungefähr ein Drittel der unbehandelten Zellen befindet sich in der Synthese-Phase. Durch das Silencing von MDM2 sind es mit nicht ganz 23 % deutlich weniger Zellen in dieser Phase des Zellzyklus. Die Kombination der siRNAs gegen MDM2 und HSP60 führt zu einer Abschwächung dieses Effektes. Zu einer signifikanten Erhöhung ($p<0,01$) des Zellanteils in der Synthese-Phase kommt es bei der Kombinationsbehandlung mit den siRNAs gegen BCL2 und HSP90 um fast 7 %, während die Einzelbehandlungen nur geringe, nicht signifikante Effekte zeigen. Weiters bringt die Behandlung mit der siRNA gegen GRP78 eine starke Erhöhung ($p<0,01$) um knapp über 6 % verglichen mit den unbehandelten Zellen, welche durch Kombination mit anderen siRNAs nicht gesteigert werden konnte sondern im Gegenteil abgeschwächt wurde.

| G2/M Phase (3 biologische Replikate) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Kombination** | **Konzentration** | **%** | **STD in %** | **Differenz** | **Signifikanz** |
| Unbehandelte Zellen | 7,65 nM | 11,63 | 0,76 | 0,00 | n.s. |
| HSP60 | 7,65 nM | 10,62 | 1,49 | -1,01 | n.s. |
| GRP78 | 7,65 nM | 6,60 | 0,67 | -5,03 | *** p<0,01 |
| GRP78 + HSP60 | 7,65 nM | 10,08 | 0,74 | -1,55 | * p<0,05 |
| HSP90 | 7,65 nM | 8,96 | 1,60 | -2,67 | * p<0,05 |
| HSP90 + GRP78 | 7,65 nM | 9,88 | 0,45 | -1,75 | ** p<0,025 |
| BCL2 | 7,65 nM | 6,67 | 0,69 | -4,96 | *** p<0,01 |
| BCL2 + HSP90 | 7,65 nM | 6,54 | 0,52 | -5,09 | *** p<0,01 |
| Survivin | 7,65 nM | 12,28 | 3,39 | 0,65 | n.s. |
| Survivin + HSP60 | 7,65 nM | 12,90 | 1,75 | 1,27 | n.s. |
| MDM2 + HSP60 | 7,65 nM | 8,05 | 1,97 | -3,58 | ** p<0,025 |
| MDM2 | 7,65 nM | 5,83 | 1,58 | -5,80 | *** p<0,01 |

*Tabelle 10: Prozentueller Anteil der A549-Zellen, welche nach der Behandlung mit einzelnen Heat Shock Protein-siRNAs bzw. Kombinationen in der G2/M-Phase zu finden sind.*

Im Bezug auf die unbehandelten Zellen ist der Anteil der mit siRNA-behandelten Zellen in der G2 bzw. Mitose-Phase leicht erniedrigt. Einzige Ausnahme bildet das Silencing von Survivin bzw. die gleichzeitige Genstilllegung von Survivin und HSP60. Hier kommt es zu einer leichten, jedoch nicht signifikanten Erhöhung. Die stärksten Effekte sind bei der Behandlung mit den siRNAs gegen MDM2, GRP78, BCL2 und BCL2 kombiniert mit HSP90 zu beobachten. Mit Werten von ungefähr 5 – 6 % führen diese Behandlungen zu einer signifikanten Erhöhung ($p<0,01$) verglichen mit den unbehandelten Zellen.

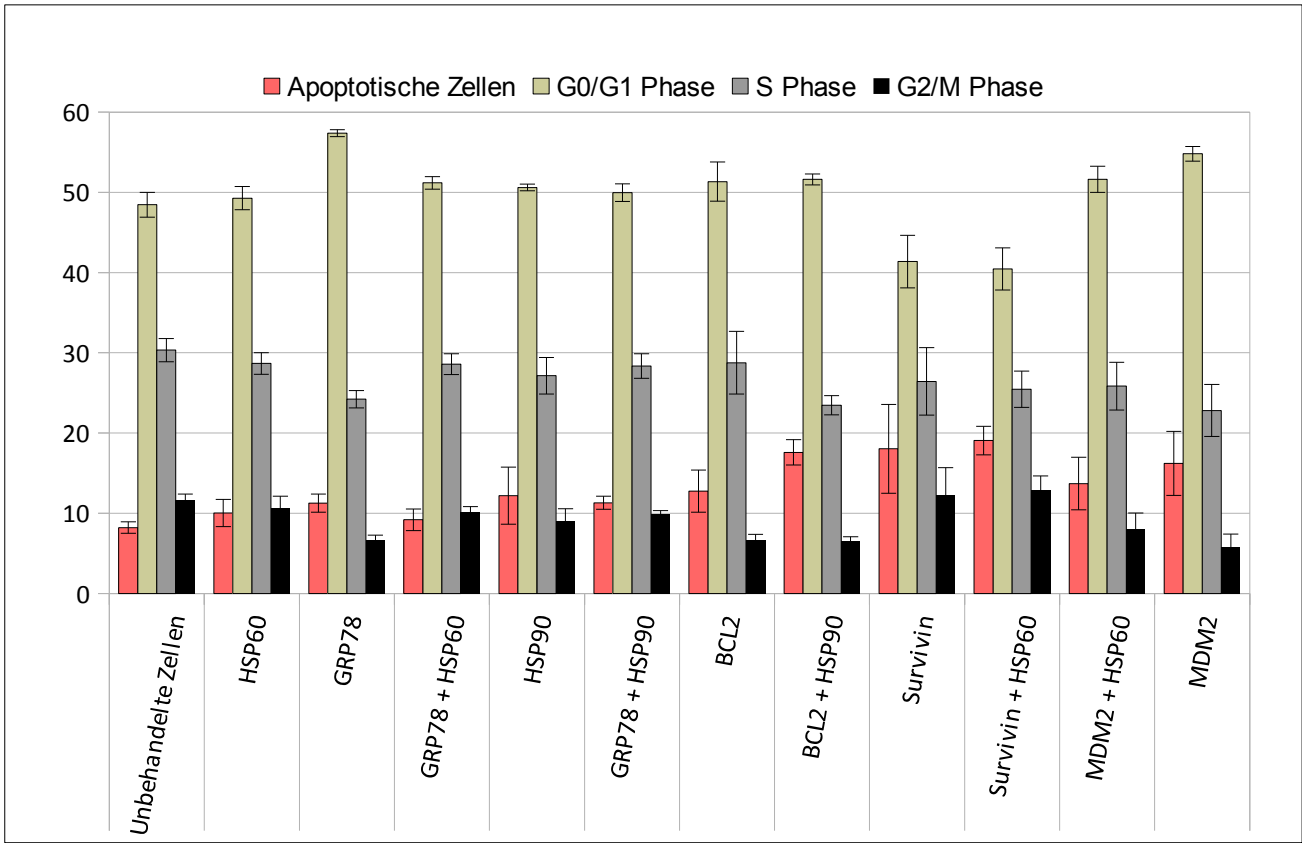



*Abbildung 13: Prozentuelle Darstellung der Zellzyklusphasen der unbehandelten sowie behandelten A549-Zellen.*

Anhand der dargestellten Zellzyklusphasen in Abbildung 13 lassen sich deutliche Effekte der verschiedenen siRNAs und Kombinationen dieser erkennen. Durch die Behandlung der Zellen mit den siRNAs gegen Survivin bzw. Survivin und HSP60 kommt es zu einer deutlichen Verminderung des Zellanteils in der G0/G1-Phase, wobei es mehr apoptotische Zellen bezogen auf die unbehandelten Zellen gibt. Besonders durch das Silencing von GRP78 und MDM2 lässt sich ebenfalls ein starker Effekt auf die in der G0/G1-Phase befindlichen Zellen zeigen. Hierbei kommt es zu einer signifikanten Erhöhung ($p<0,01$) des Zellanteils in dieser Phase des Zellzyklus. Es scheint eine Verschiebung der Synthese-Phase zur G0/G1-Phase zu geben. Auch der Einfluss auf die Zellen in der G2/M-Phase wird anhand der Abbildung 13 gut erkennbar. Deutlich weniger Zellen im Vergleich zu den nicht behandelten Zellen gibt es in dieser Phase durch den Einfluss der siRNAs gegen GRP78, BCL2, BCL2 kombiniert mit HSP90, MDM2

und MDM2 kombiniert mit HSP60. Im Gegensatz dazu ist der Anteil an apoptotischen Zellen durch die Behandlung mit diesen siRNAs erhöht.

# 5. Diskussion

## 5.1. Effekt von Heat-Shock-Protein-Silencing auf Tumorwachstum

Um ihre onkogenen Eigenschaften wirksam werden zu lassen, bedürfen viele Krebszellen der Stabilisierung ihrer onkogenen Proteine durch verschiedene HSPs. Dazu gehören unter anderem Her2, ERalpha, ERbeta, IKKbeta, DAXX, Akt, TRAF6, Caspase-3, CD10, EGFR, c-KIT, VEGFR, Scr, p53, CDK4, CDK6, Survivin, BCL2 und viele weitere.[2,6] Können sie durch zum Beispiel Heat-Shock-Protein-Silencing nicht stabilisiert werden, kommt es zur Wachstumshemmung bzw. zum Untergang der Krebszelle. Da Heat Shock Proteine speziell in Tumorzellen häufig überexprimiert sind und das Überleben der Tumorzellen, die Proliferation, die Gefäßneubildung sowie die Metastasierung fördern[2], stand die Untersuchung der Wirkung einzelner Heat Shock Protein-siRNAs auf die Krebszellen im Vordergrund.

Mit Hilfe von Proliferationstests sollte der wachstumshemmende Effekt verschiedener siRNAs und deren Kombination mit anderen siRNAs bzw. miRNAs gezeigt werden. Nach der Transfektion in MDA-MB-468- und A549-Zellen und anschließender 72-stündiger Inkubationszeit konnten die jeweiligen Effekte gemessen werden.

Die stärkste proliferationshemmende Wirkung hatte die siRNA gegen CDC37 sowohl in den MDA-MB-468-Zellen als auch in den A549-Zellen. Dieser deutliche Effekt auf die Proliferation ist auf die Stabilisierung von HSP90-Kinase-Komplexen und Hemmung der HSP90-ATPase-Aktivität durch CDC37 zurückzuführen. In MDA-MB-468-Zellen konnte die Wirkung der CDC37-siRNA durch die Kombination mit der siRNA gegen GRP58 sogar noch leicht gesteigert werden.

Grundsätzlich waren die Effekte der meisten Heat Shock Protein-siRNAs in beiden Tumorzelllinien ähnlich, wobei die Proliferation durch Hemmung von GRP78 und HSP27 in den MDA-MB-468-Zellen deutlich stärker gesenkt werden konnte. Anders sah es bei CDC37 aus, hier konnte das Wachstum in den MDA-MB-468-Zellen um 44 % gehemmt werden mit einem Unterschied von über 20 Prozentpunkten im Vergleich zu den A549-Zellen, wo die Proliferationsreduktion bei 68 % lag.

Diese Unterschiede zwischen den getesteten Zelllinien könnten in einer divergierenden Expressionsrate der jeweiligen Gene in den Lungenkarzinom- bzw. Brustkrebszellen begründet sein.

Die Effekte einer gleichzeitigen Hemmung mehrerer Heat-Shock-Proteine bzw. Onkogene wurde untersucht, um Wechselwirkungen aufzudecken und eine stärkere Wachstumshemmung zu erreichen. Dabei wurden in mehreren Fällen sowohl erhöhte als auch reduzierte proliferationshemmende Wirkungen gefunden.

Die siRNA gegen GRP78 zum Beispiel schien mit einer Wachstumshemmung der Krebszellen von über 30 % bzw. 40 % vielversprechend, konnte jedoch in Kombination mit anderen siRNAs keine erhöhten Effekte zeigen. Im Gegensatz dazu konnten bei einigen Kombinationen jedoch auch additive bzw. leicht synergistische Effekte beobachtet werden. Vor allem die gemeinsame Transfektion mit der siRNA gegen Lin28b in A549-Zellen zeigt eine Steigerung der Einzeleffekte von GRP58- und HSP90-siRNAs. Lin28b ist dafür bekannt durch die Blockierung der let-7-miRNA-Biogenese und darauffolgender Derepression der let-7-Zielgene eine wichtige Rolle in der Tumorentwicklung und Metastasierung zu spielen.[32] In der Literatur ist bislang kein direkter Zusammenhang zwischen Lin28b und den beiden Heat Shock Proteinen beschrieben. In MDA-MB-468-Zellen erreichte die gleichzeitige siRNA-Behandlung mit HSP27 und miR-29b-2 leicht synergistische Effekte. Hier führte die Kombination zu einer Wachstumshemmung von 44 %, während die miRNA gegen miR-29b-2 alleine die Proliferation um 21 % und die HSP27-siRNA alleine um nur 16 % senken konnte. Auch für diese siRNA/miRNA-Kombination ist noch kein Zusammenhang bekannt.

Auffällig ist, dass die HSP60-siRNA in A549-Zellen in Kombination mit mehreren anderen siRNAs zu einer starken Reduktion der proliferationshemmenden Wirkung im Vergleich zu den entsprechenden siRNA-Einzelbehandlungen führt. Bei der gleichzeitigen Genstilllegung von HSP60 und GRP78 sowie MDM2 oder Survivin minimieren sich die Effekte um bis zu fast 30 %. In den A549-Zellen scheint die Genausschaltung von HSP60 die phänotypischen Auswirkungen des Silencing dieser Tumorzielgene deutlich abzuschwächen. Die Reduktion von HSP60 ergab keinen Einfluss auf das Wachstum der Tumorzellen, weder bei A549 (Lungenkarzinom) noch bei MDA-MB-468 (Brustkrebs). In

der Literatur ist zwar ein vorwiegend anti-apoptotischer, pro-metastasierender und proliferationsbegünstiger Effekt von HSP60 beschrieben, eine Abhängigkeit vom speziellen Tumortyp ist aber ebenso bekannt[14]. In klinischen Untersuchungen wurde unter anderem eine negative Korrelation von hoher HSP60-Expression mit der Überlebensrate von Patienten mit Magen- und Ovarialkarzinomen gefunden.[33,34] Auf der anderen Seite ergaben biochemische Experimente, dass HSP60 während der Apoptose im Zytosol akkumuliert ist und abhängig von der Interaktion mit Caspase-3 sowohl pro- als auch anti-apoptotische Wirkungen begünstigen kann. Ein Knockdown von HSP60 ergab eine Verzögerung der durch Chemotherapie (BMD188) ausgelöste Apoptose von humanen Prostatakarzinom- und Fibroblastenzellen.[35] In diesem Modell wurde eine Translokation von mitochondrialem HSP60 in Zytosol nachgewiesen. Hingegen wurde in anderen Modellen, bei denen die HSP60-Akkumulation im Zytosol nicht aus mitochondrialer Ausschüttung hervorgerufen wird, eine Verstärkung der Apoptose durch HSP60 Knockdown mit siRNA gefunden. Zusammen mit der Assoziation von HSP60 mit Membranen des Golgi-Apparats und Exosomen ergibt sich ein sehr komplexes Schema von HSP60-Funktionen, die je nach spezifischem zellulärem Status, aber auch abhängig vom Zelltyp, gegensätzlich sein können. Die Experimente im Rahmen der Diplomarbeit ergaben, dass die apoptose-schützende Wirkung in A549-Zellen offenbar im Vordergrund steht.

Survivin ist ein gut untersuchtes Target in der Onkologie mit anti-apoptotischer und pro-Überlebenswirkung. Durch pro-apoptotische Signale wird Survivin aus Mitochondrien freigesetzt, inhibiert die Caspasen 3 und 9, und unterdrückt damit den Zelltod.[36] Weil Survivin durch die Chaperone HSP90 und HSP60 stabilisiert wird, wurde eine verstärkte Wirkung durch gleichzeitigen Knockdown von HSP60 und Survivin erwartet. In A549-Zellen ergab sich aber eine Abschwächung der durch Survivin-Reduktion ausgelösten Verminderung der Proliferation durch HSP60-Knockdown. In den Zellzyklus-Analysen konnte dagegen kein solcher abschwächender Effekt, aber auch keine Verstärkung durch HSP60-Reduktion gefunden werden. Eventuell kommen diese unerwarteten Resultate durch einen Caspase-3 aktivierenden Effekt von HSP60 in diesem Zellmodell zustande.

Nach Auswertung der Proliferationstests konnte auch in den MDA-MB-468-Zellen ein deutlicher Rückgang der wachstumshemmenden Wirkung durch bestimmte Kombinationen festgestellt werden. Am stärksten war dies bei den siRNAs gegen GRP78 sowie HSP27 zu beobachten.

Auch mit der Durchführung und Analyse von FACS-Versuchen wurde der Einfluss der Einzel- sowie Kombinationsbehandlung mit verschiedenen siRNAs auf die einzelnen Zellzyklusphasen der MDA-MB-468 bzw. A549-Zellen untersucht.
Bei der Datenauswertung des FACS-Versuches an MDA-MB-468-Zellen zeigte sich, dass die Einzelbehandlung mit den siRNAs gegen GRP78 und HSP90 sowie die siRNA-Kombinationsbehandlung gegen GRP78 und HSP90 die stärksten Effekte lieferten. Es konnte eine deutliche Verschiebung der G0/G1-Phase zur G2/M-Phase beobachtet werden, welche auf eine Wachstumshemmung hindeutet und bei der Behandlung mit HSP90-siRNA am stärksten ausfiel. Im Gegensatz dazu waren die Effekte der HSP90-siRNA, die sich anhand der Proliferationtests zeigten mit einer Wachstumshemmung von nur rund 3 % sehr gering und konnten somit durch die FACS-Analyse nicht untermauert werden. Besonders auffällig waren hier jedoch die doch recht hohen Standardabweichungen von teilweise über 13 %, was aus meiner Sicht zu einer Wiederholung des Versuches führen sollte, um diese gezeigten Effekte nochmals zu bestätigen. Die Behandlung mit der siRNA gegen GRP78 lieferte schon bei den Proliferationtests mit einer deutlich signifikanten Wachstumshemmung einen großen Effekt, der sich zwar durch die Kombination mit der HSP90-siRNA nicht steigern ließ aber nun mithilfe der Zellzyklusanalyse bestätigt werden konnte.
Die Zellzyklusanalyse an behandelten A549-Zellen brachte recht unterschiedliche Ergebnisse. So konnte durch das Silencing von Survivin bzw. Survivin und HSP60 eine deutliche Abnahme des Zellanteils in der G0/G1-Phase festgestellt werden, wogegen der apoptotische Zellanteil erhöht war. Dies untermauert das bei den Proliferationstests erhaltene Ergebnis einer starken Wachstumshemmung von fast 31 %. Wie schon bei den Proliferationstests konnte auch bei der Zellzyklusanalyse keine signifikante Steigerung des Einzel-Effekts durch Kombination dieser beiden siRNAs gezeigt werden.

Deutliche Einflüsse auf die G2/M-Phase konnten durch die Behandlung mit den siRNAs gegen GRP78, BCL2, BCL2 kombiniert mit HSP90, MDM2 und MDM2 kombiniert mit HSP60 erreicht werden. Hier befanden sich weniger Zellen in dieser Phase des Zellzyklus wobei es einen erhöhten Anteil an apoptotischen Zellen gab. Verglichen mit den Resultaten der Proliferationstests konnten diese Ergebnisse mit einer Ausnahme bestätigt werden. Durch die Kombination der siRNAs gegen MDM2 und HSP60 lässt sich ein apoptotischer Zellanteil von fast 14 % analysieren, während bei den Proliferationstests sogar eine leichte Wachstumssteigerung festgestellt werden konnte.

Der Vergleich des Angriffes an den wichtigsten Vertretern der Heat-Shock-Proteine ergab deutlich unterschiedliche Effekte auf das Zellwachtum. Interessanterweise ist die Hemmung von HSP90, das als vielversprechendstes HSP-Target in der Onkologie gilt, kaum wirksam in den beiden getesteten Zelllinien. Gleiches gilt für HSP60, das sogar zu einem protektiven Effekt gegenüber anderen, wachstumshemmenden Interventionen führt. Auf der anderen Seite sind GRP78 und der HSP-Co-Faktor CDC37 die wirksamsten Targets für siRNA in diesen Zelllinien. Einzelne Kombinationen von siRNAs, zum Beispiel gegen Lin28b und GRP58 in A549-Zellen sowie die gleichzeitige Transfektion einer siRNA und einer miRNA, wie HSP27-siRNA und miR-29b, resultierten in einer erhöhten anti-Tumorwirkung und können als Ausgangspunkt für weitere therapeutische Ansätze verwendet werden.

Die Interaktionen verschiedener Signalwege spielen eine Rolle in der Wirkung der einzelnen Heat Shock Proteine. Der gleichzeitige Knockdown mehrerer Gene ergab teilweise stärkere, teilweise aber auch abgeschwächte Effekte. Diese Heterogenität unterstreicht die Komplexizität des Netzwerks der molekularen Chaperone sowie der Definition effektiver Zielgene in der Tumorbehandlung und die Vorteile eines Angriffs an mehreren Genen.

# 6. Abkürzungen

A549 – Humane Lungenkarzinom-Zelllinie

AGO2 – Argonautenprotein 2

Akt – Proteinkinase B

APAF1 – Apoptotische Protease-aktivierender Faktor 1

BCL2 – B-Zell Lymphom 2

CDC37 – Zellteilungszyklus 37

CDK4 – Cyclin-abhängige Kinase 4

CDK6 – Cyclin-abhängige Kinase 6

CD10 – Transmembrane Metalloendopeptidase

c-KIT – Tyrosinkinase KIT

DAXX – Tod assoziiertes Protein 6

DMEM – Dulbecco's Modfied Eagle Medium

DNA - Desoxyribonukleinsäure

dsRNA – Doppelsträngige RNA

EpCAM – Epitheliales Zelladhäsionsmolekül

EPHA2 – Ephrin Typ-A Rezeptor 2

ER – Endoplasmatisches Retikulum

ERbeta – Estrogenrezeptor beta

EGFR – Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor

FACS - Fluorescence Activated Cell Sorting

FLT3 – Fms-like Tyrosinkinase 3

Gen-Silencing - Gen-Stilllegung

GRP – Glukose-reguliertes Protein

HeLa – Humane Zervixkarzinom-Zelllinie (Patientin: *He*nrietta *La*cks)

Her2 – Humaner Epithelialer Wachstumsfaktor-Rezeptor 2

HIF1a – Hypoxie-induzierbarer Faktor 1 alpha

HSP – Heat Shock Protein

HSP27, HSP60, HSP70, HSP90 – Heat Shock Proteine mit unterschiedlicher Molekülgröße

IGF1R – Insulin-like Wachstumsfaktor 1

IKKbeta – Inhibitor der nuklearen kappa-B Kinase Subuntereinheit beta

IPI-504 – Retaspimycin (Geldanamycin-Analogon)

MAP2K1 – Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase 1

MCF-7 – Humane Brustkrebs-Zelllinie (Michigan Cancer Foundation 7)

MDA MB468 – Humane Brustkrebs-Zelllinie

MDM2 – mouse double minute 2

miRNA – microRNA

MK2 – Mitogen-aktivierte Proteinkinase-aktivierte Proteinkinase 2

mRNA – messenger RNA (Boten RNA)

NAIF1 – Nukleärer Apoptose-induzierender Faktor 1

N-Ras - Neuroblastom-Ras

NSCLC – Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom

n.s. - nicht signifikant

nt – Nukleotide

PBS – Phosphat gepufferte Salze

Phk – Phosphorylase Kinase

PKCalpha – Proteinkinase C alpha

PLK1 – Polo-like Kinase 1

PPM1A – Proteinphosphatase 1A

PRKD1 – Serin/Threonin-Proteinkinase D1

PTEN – Phosphatase und TENsin homolog

P38 – P38 mitogen-aktivierte Proteinkinase

p90RSK – p90 ribosomale s6 Kinase, MAPK-aktivierte Proteinkinase 1

RAF1 – Serin/Threonin-Proteinkinase 1

RhoA – Ras homolog gene family member A

RIPK1 – Rezeptor-aktivierende Serin/Threonin-Kinase 1

RISC - RNA-induced silencing complex (RNA-induzierter Stilllegungs-Komplex)

RNA - Ribonukleinsäure

RNAi – RNA-Interferenz

siRNA – short interfering RNA

Src – Tyrosinkinase

STA-9090 – Ganetespib (Resorcinol-Derivat)

SW480 – Humane Kolonkarzinom-Zelllinie

TLR3 – Toll-like Rezeptor 3

TRAF6 – Tumornekrosefaktorrezeptor-assoziierter Faktor 6

VEGFR – Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor

WEE1 – WEE-like Proteinkinase 1

17-AAG – Tanespimycin (Geldanamycin-Analogon)

17-DMAG – Alvespimycin (Geldanamycin-Analogon)

# 7. Quellenangaben


**1** Schmitt, E., et al. "Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy." *Journal of leukocyte biology* 81.1 (2007): 15-27.

**2** Garcia-Carbonero, Rocio, Amancio Carnero, and Luis Paz-Ares. "Inhibition of HSP90 molecular chaperones: moving into the clinic." *The lancet oncology* 14.9 (2013): e358- e369.

**3** Calderwood, Stuart K. "Molecular cochaperones: tumor growth and cancer treatment." *Scientifica* 2013 (2013).

**4** Murphy, Maureen E. "The HSP70 family and cancer." *Carcinogenesis* 34.6 (2013): 1181-1188.

**5** Vidyasagar, Aparna, Nancy A. Wilson, and Arjang Djamali. "Heat shock protein 27 (HSP27): biomarker of disease and therapeutic target." *Fibrogenesis Tissue Repair* 5.7 (2012).

**6** Arrigo, André-Patrick, and Benjamin Gibert. "HspB1, HspB5 and HspB4 in Human Cancers: Potent Oncogenic Role of Some of Their Client Proteins." *Cancers* 6.1 (2014): 333-365.

**7** Cappello, Francesco, et al. "Hsp60 expression, new locations, functions and perspectives for cancer diagnosis and therapy." *Cancer Biol Ther* 7.6 (2008): 801-809.

**8** Eckl, Julia M., et al. "Cdc37 (cell division cycle 37) restricts Hsp90 (heat shock protein 90) motility by interaction with N-terminal and middle domain binding sites." *Journal of Biological Chemistry* 288.22 (2013): 16032-16042.

**9** NCBI. Gene [online]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene

**10** Kamal, Adeela, and Francis J. Burrows. "Hsp90 inhibitors as selective anticancer drugs." *Discovery medicine* 4.23 (2009): 277-280.

**11** Lee, Amy S. "Glucose-regulated proteins in cancer: molecular mechanisms and therapeutic potential." *Nature Reviews Cancer* 14.4 (2014): 263-276.

**12** Turano, Carlo, et al. "ERp57/GRP58: a protein with multiple functions." *Cellular & molecular biology letters* 16.4 (2011): 539-563.

**13** Coe, Helen, and Marek Michalak. "ERp57, a multifunctional endoplasmic reticulum resident oxidoreductase." *The international journal of biochemistry & cell biology* 42.6 (2010): 796-799.

**14** Li, Jianze, and Amy S. Lee. "Stress induction of GRP78/BiP and its role in cancer." *Current molecular medicine* 6.1 (2006): 45-54.

**15** Marzec, Michal, Davide Eletto, and Yair Argon. "GRP94: An HSP90-like protein specialized for protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum."*Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 1823.3 (2012): 774-787.

**16** Wang, Hongxia, et al. "The endoplasmic reticulum chaperone GRP170: from immunobiology to cancer therapeutic." *Name: Frontiers in Oncology* 4 (2014): 377.

**17** Li, Yanyan, et al. "New developments in Hsp90 inhibitors as anti-cancer therapeutics: mechanisms, clinical perspective and more potential."*Drug Resistance Updates* 12.1 (2009): 17-27.

**18** Di, Kaijun, et al. "Profiling Hsp90 differential expression and the molecular effects of the Hsp90 inhibitor IPI-504 in high-grade glioma models." *Journal of neuro-oncology* 120.3 (2014): 473-481.

**19** Wu, Xinqi, Melina E. Marmarelis, and F. Stephen Hodi. "Activity of the heat shock protein 90 inhibitor ganetespib in melanoma." *PloS one* 8.2 (2013): e56134.

**20** Dogini, Danyella Barbosa, et al. "The new world of RNAs." *Genetics and molecular biology* 37.1 (2014): 285-293.

**21** Setoyama, Tetsuro, et al. "Non-coding RNAs for medical practice in oncology."*The Keio journal of medicine* 60.4 (2011): 106-113.

**22** L. MacFarlane and Paul R. Murphy “MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer”, Current Genomics, 2010, no. 11, pp 537-561

**23** Doench, John G., Christian P. Petersen, and Phillip A. Sharp. "siRNAs can function as miRNAs." *Genes & development* 17.4 (2003): 438-442.

**24** Carthew, Richard W., and Erik J. Sontheimer. "Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs." *Cell* 136.4 (2009): 642-655.

**25** Bora, Roop Singh, et al. "RNA interference therapeutics for cancer: Challenges and opportunities (Review)." *Molecular medicine reports* 6.1 (2012): 9-15.

**26** Lehner, Ben, Andrew G. Fraser, and Christopher M. Sanderson. "How to use RNA interference." *Briefings in functional genomics & proteomics* 3.1 (2004): 68-83.

**27** Siomi, Haruhiko, and Mikiko C. Siomi. "On the road to reading the RNA-interference code." *Nature* 457.7228 (2009): 396-404.

**28** Bartel, David P. "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function."*cell* 116.2 (2004): 281-297.

**29** Burnett, John C., and John J. Rossi. "RNA-based therapeutics: current progress and future prospects." *Chemistry & biology* 19.1 (2012): 60-71.

**30** Mott, Justin L., et al. "mir-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis." Oncogene 26.42 (2007): 6133-6140.

**31** Molenaar, Jan J., et al. "LIN28B induces neuroblastoma and enhances MYCN levels via let-7 suppression." *Nature genetics*44.11 (2012): 1199-1206.

**32** Zhou, Jianbiao, Siok-Bian Ng, and Wee-Joo Chng. "LIN28/LIN28B: an emerging oncogenic driver in cancer stem cells." *The international journal of biochemistry & cell biology* 45.5 (2013): 973-978.

**33** Li, Xiao-shan, et al. "Heat Shock Protein 60 Overexpression Is Associated with the Progression and Prognosis in Gastric Cancer." *PloS one* 9.9 (2014): e107507.

**34** Hjerpe, Elisabet, et al. "HSP60 predicts survival in advanced serous ovarian cancer." *International Journal of Gynecological Cancer* 23.3 (2013): 448-455.

**35** Chandra, Dhyan, Grace Choy, and Dean G. Tang. "Cytosolic Accumulation of HSP60 during Apoptosis with or without Apparent Mitochondrial Release EVIDENCE THAT ITS PRO-APOPTOTIC OR PRO-SURVIVAL FUNCTIONS INVOLVE DIFFERENTIAL INTERACTIONS WITH CASPASE-3." *Journal of Biological Chemistry* 282.43 (2007): 31289-31301.

**36** Kelly, Ronan J., et al. "Impacting tumor cell-fate by targeting the inhibitor of apoptosis protein survivin." *Mol Cancer* 10.35 (2011): 10-1186.

# Lebenslauf

**Persönliche Angaben**

Name: Kathrin Laczkovits

Geburtstag: 15.08.1990

Geburtsort: Wiener Neustadt

Staatsangehörigkeit: Österreich

**Ausbildung**

| | |
|---|---|
| 09/2000 – 06/2008 | Bundesrealgymnasium Zehnergasse (Wirtschaftskundlicher Zweig), Wiener Neustadt, Österreich |
| 10/2008 – 01/2015 | Universität Wien, Fakultät für Pharmazie, Österreich |

**Berufserfahrung**

| | |
|---|---|
| 08/2007 | Ferialpraktikum, Alte Kronenapotheke, Wiener Neustadt |
| 09/2008 – 04/2012 | geringfügig Angestellte, Firma Ing. Fuhrmann, Wien |
| 10/2012 – 12/2014 | geringfügig Angestellte, Auge Gottes Apotheke, Wien |

**Fremdsprachenkenntnisse**

Deutsch: Muttersprache

Englisch: Sehr gut