

Aus der Klinik für Allgemeine Pädiatrie  
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

**DISSERTATION**

Entwicklung eines lentiviralen shRNA Screens zur Identifizierung  
potentieller therapeutischer Ziele in SH-EP Neuroblastomazellen

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Livius Penter  
aus Dresden

Datum der Promotion: 30. Mai 2015

## Zusammenfassung

Trotz intensiver Forschung an Radiochemotherapieschemata liegt die 5-Jahresüberlebensrate von Kindern mit Neuroblastom vom Hochrisikotyp noch immer bei nur 50%. Ein neuer, vielversprechender Ansatz ist die Kombination konventioneller Therapieprinzipien mit der spezifischen Inhibition zellulärer Signalwege, die für Tumorigenese verantwortlich sind. Imatinib ist ein Beispiel für dieses Konzept, das die 5-Jahresüberlebensrate von Patienten mit Chronisch Myeloischer Leukämie von 30% auf 89% verbesserte. Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines synthetischen RNA-Interferenzscreens basierend auf einer Neuroblastomzelllinie mit hoher Doxorubicinresistenz und die Durchführung einer Pilotstudie zur Identifizierung potentieller therapeutischer Ziele für die Behandlung des Neuroblastoms [1, 2, 3, 4].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein auf Durchflusszytometrie basierter Assay entwickelt, der mit SH-EP als Reporterzelllinie die Identifizierung von shRNA-mir-Expressionsvektoren erlaubt, die Neuroblastomzellproliferation verringern oder Doxorubicin induzierten Zelltod erhöhen. SH-EP Zellen wurden mit pGIPZ lentiviralen shRNA-mir Expressionsvektoren transduziert und anschließend drei Tage lang mit Puromycin selektioniert. Nach weiteren drei Tagen Wachstum +/- Doxorubicin wurden DNA-Gehalt und Zellviabilität mittels Durchflusszytometrie und dem Zellvitalitätstest MTT bestimmt. shRNA-mir-Expressionsvektoren gegen PLK1 und p53 wurden als Positivkontrollen etabliert, die Zellproliferation inhibieren und Zelltod verstärken, bzw. Doxorubicinresistenz erhöhen [5, 6, 7, 8].

Die Fähigkeit des Systems, therapeutische Ziele zu identifizieren, wurde mit 275 shRNA-mir-Expressionsvektoren gegen 69 Gene der Familie der F-box Proteine, Schlüsselregulatoren zellulärer Signalwege, exemplarisch nachgewiesen. Dieser Screen war in der Lage, drei Gene zu identifizieren, von denen bekannt ist, dass sie eine Rolle in der Pathogenese des Neuroblastoms spielen: Fbxo5/Emi1, Fbxw11/ $\beta$ -TrCP2 und Fbxo45. Der Assay wies eine hohe Trennschärfe auf, da der Unterschied zwischen dem Signal der Positivkontrollen und dem Median regelmäßig mehr als  $2\sigma$  betrug [9, 10, 11].

Aufgrund dieser erfolgreichen Pilotstudie scheint es nun sinnvoll, weitere Genfamilien, deren Mitglieder bekanntermaßen Schlüsselpositionen in wachstumsregulierenden Signalwegen besetzen, mit dem entwickelten System zu untersuchen. Die Herausforderung besteht darin, den Durchsatz des Systems dadurch zu erhöhen, Durchflusszytometrie mit einem ähnlich sensitiven, aber weniger zeitaufwändigen Read-out zu ersetzen, wie zum Beispiel automatisierter Mikroskopie oder einem Fluoreszenz basierten Reportersystem. Damit wird es möglich sein, die Fragestellung des Screens auszuweiten und die Suche nach neuen therapeutischen Zielen für Patienten mit Neuroblastom vom Hochrisikotyp zu beschleunigen.

**Schlagwörter:** Screen, RNA-Interferenz, targeted therapy, Neuroblastom, F-box Proteine

## Abstract

Even after extensive research on radiochemotherapy, the 5-year survival rate of children with high risk neuroblastoma still does not exceed 50%. A promising, new approach is the combination of conventional therapies with specific inhibition of cell signaling that promotes tumorigenesis. Imatinib set an impressive example for this concept by increasing the 5-year survival rate of chronic myeloid leukemia patients from 30% to 89%. In order to identify genes that could be inhibited to improve the therapeutic outcome of high risk neuroblastoma patients, we sought to establish an RNA-interference based synthetic lethal screen, using a highly doxorubicin resistant neuroblastoma cell line [1, 2, 3, 4].

We developed a flow cytometry-based assay, which enables the identification of shRNAmir expression vectors that reduce tumor cell proliferation or augment doxorubicin-induced cell death, employing SH-EP as neuroblastoma reporter cell line. SH-EP cells transduced with pGIPZ lentiviral shRNAmir expression vectors were selected with puromycin for three days. After subsequent growth in fresh medium +/-doxorubicin for three days, cell cycle distribution and cell viability were measured using flow cytometry and MTT assay. shRNAmir expression vectors targeting PLK1 and p53 were established as positive controls that markedly inhibit cell proliferation and increase cell death, or elevate doxorubicin resistance, respectively [5, 6, 7, 8].

The capacity of the system to identify potential therapeutic targets was assessed by knocking down the family of F-box proteins, key regulators of cellular signaling, using 275 shRNAmir expressions vectors targeting 69 genes. This screen recapitulated three genes known to play a role in neuroblastoma: Fbxo5/Emi1, Fbxw11/ $\beta$ -TrCP2 and Fbxo45. The employed positive controls, being more than two standard deviations from the mean, indicated the desirably high sensitivity of the assay [9, 10, 11].

This successful pilot study now rationalizes a knock down strategy of larger groups of genes related to tumorigenesis, such as phosphatases and kinases. One major challenge will be to increase the throughput of the system by replacing flow cytometry with an equally sensitive but less time-consuming read-out, like automated microscopy or a fluorescence based reporter assay. This will allow broadening the scope of the screen and accelerate the quest for new drugable targets to increase the chance of successfully treating high risk neuroblastoma patients.

**Keywords:** Screen, RNA-Interference, targeted therapy, Neuroblastoma, F-box proteins

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Funktionelle Genomik mit Hilfe von RNA-Interferenz . . . . .	2
1.1.1	Mechanismus der RNA-Interferenz . . . . .	3
1.1.2	RNA-Interferenztechniken in vitro . . . . .	4
1.1.3	Weiterentwicklung von shRNA: shRNA-mir . . . . .	5
1.1.4	Systematische Untersuchungen mit RNA-Interferenz . . . . .	5
1.1.5	Beispiele für RNAi-Screens . . . . .	6
1.2	Neuroblastom . . . . .	7
1.2.1	Prognose und Behandlung . . . . .	7
1.2.2	Bemühungen um neue Therapieansätze . . . . .	8
1.2.3	Grenzen der Therapie am Beispiel Doxorubicin . . . . .	8
1.3	RNAi-Screen zur Identifizierung neuer Therapieziele . . . . .	10
1.3.1	Mögliche neue Therapieziele: F-box Proteine . . . . .	11
1.4	Zielstellung . . . . .	12
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>14</b>
2.1	Geräte . . . . .	14
2.2	Verbrauchsmaterialien . . . . .	15
2.3	shRNA-Expressionsvektoren und Plasmide . . . . .	15
2.4	Antibiotika und Chemotherapeutika . . . . .	15
2.5	Antikörper . . . . .	15
2.6	Zelllinien . . . . .	16
2.7	Lösungen . . . . .	17
2.7.1	Zellkultur . . . . .	17
2.7.2	Analysen . . . . .	17
2.7.3	Transfektion und Transduktion . . . . .	17
2.7.4	Western Blot . . . . .	18
2.8	Ansätze . . . . .	18
2.8.1	Zellkulturmedien . . . . .	18
2.8.2	Zellvitalitätstest mit MTT . . . . .	19
2.8.3	SchnellFACS-Puffer . . . . .	19

2.8.4	Transfektion . . . . .	19
2.8.5	Western Blot . . . . .	20
2.9	Methoden . . . . .	21
2.9.1	Zellkultur . . . . .	21
2.9.2	Ausplattieren der Zellen mit definierter Zelldichte . . . . .	21
2.9.3	Zellvitalitätstest mit MTT . . . . .	22
2.9.4	Bestimmung DNA-Gehalt per Durchflusszytometrie . . . . .	22
2.9.5	Datenauswertung des Screens . . . . .	23
2.9.6	Virusproduktion mit HEK293T Zellen . . . . .	23
2.9.7	Transduktion . . . . .	24
2.9.8	Western Blot . . . . .	24
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>26</b>
3.1	Etablierung des experimentellen Systems . . . . .	26
3.1.1	Auswahl der Reporterzelllinie . . . . .	27
3.1.2	Aktivität von shRNA-mir in SH-EP Zellen . . . . .	28
3.1.3	Assay des Screens . . . . .	37
3.1.4	Interne Kontrollen . . . . .	41
3.1.5	Repräsentation der F-box Proteine durch die Bibliothek . . . . .	42
3.2	Screen der F-box Proteine . . . . .	43
3.2.1	Vergleichbarkeit der Proben . . . . .	43
3.2.2	Auswertung der internen Kontrollen . . . . .	45
3.2.3	Änderungen des Proliferationsverhaltens . . . . .	46
3.2.4	Zunahme der Doxorubicinresistenz . . . . .	49
3.2.5	Zunahme der Doxorubicinsensitivität . . . . .	50
3.2.6	Screenvalidierung . . . . .	53
3.2.7	Transduktion unter optimierten Bedingungen . . . . .	56
3.2.8	Spezifität des Phänotyps der shRNA-mir gegen Fbxo45 . . . . .	59
3.2.9	Inhibition von Fbxo45 in Fi301 Zellen . . . . .	60
3.3	Weiterentwicklung des experimentellen Systems . . . . .	61
3.3.1	Zelldichteabhängigkeit der Doxorubicinsensitivität . . . . .	61
3.3.2	Alternative für Doxorubicin: all-trans-Retinsäure . . . . .	63
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>65</b>
4.1	Experimentelles System . . . . .	65
4.1.1	shRNA-Bibliothek . . . . .	66
4.1.2	Reporterzelllinie . . . . .	67
4.1.3	Analyse des Phänotyps . . . . .	67
4.1.4	Interne Kontrollen . . . . .	68
4.1.5	Trennschärfe . . . . .	70

4.1.6	Falsch positive Ergebnisse des Primärscreens . . . . .	71
4.2	Ergebnisse des Screens der F-box Proteine . . . . .	71
4.2.1	Zellproliferation unter Inhibition von F-box Proteinen . . . . .	72
4.2.2	Doxorubicinresistenz unter Inhibition von F-box Proteinen . . . . .	73
4.2.3	Doxorubicinsensitivität unter Inhibition von F-box Proteinen . . . . .	75
4.2.4	Ausblick Phosphatasen und Kinasen . . . . .	78
4.3	Weiterentwicklung des experimentellen Systems . . . . .	78
4.3.1	Assay . . . . .	78
4.3.2	shRNA-Bibliothek . . . . .	79
4.3.3	Reporterzelllinie . . . . .	80
4.3.4	Alternative all-trans-Retinsäure . . . . .	80
4.3.5	Read-out . . . . .	81
4.4	Funktionelle Genomik in der Zukunft . . . . .	82
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>86</b>
	<b>Selbständigkeitserklärung</b>	<b>93</b>
	<b>Lebenslauf</b>	<b>94</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>95</b>

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Vergleich Prozessierung miRNA - shRNA-mir . . . . .	3
1.2	Dosislimitierung von Doxorubicin . . . . .	9
1.3	Synergismus aus zellulärem Stress und Signalinhibition . . . . .	10
1.4	Struktur und Funktion von F-box Proteinen . . . . .	12
3.1	Vergleich der Doxorubicinsensitivität verschiedener Zelllinien . . . . .	28
3.2	Vergleich der Transduzierbarkeit von HEK293T und SH-EP Zellen . . . . .	30
3.3	Aktivität verschiedener shRNA-mirs gegen PLK1 in HEK293T Zellen . . . . .	32
3.4	Vergleich von shRNA-mirs gegen PLK1 in SH-EP und HEK293T Zellen . . . . .	33
3.5	Aktivität von shRNA-Expressionsvektoren gegen p53 in HEK293T Zellen . . . . .	35
3.6	Steigerung der Doxorubicinresistenz von SH-EP Zellen durch p53-Inhibition . . . . .	36
3.7	Ablaufschema des Screens . . . . .	39
3.8	Wachstumskurve SH-EP Zellen unter Doxorubicinexposition 10nM - 1000nM . . . . .	40
3.9	Eignung von shRNA-mir-Expressionsvektoren gegen PLK1 als Positivkontrolle. . . . .	41
3.10	Übersicht zur Repräsentation der F-box Proteine durch die Bibliothek . . . . .	43
3.11	Auswertung Screen: Menge lebendiger Zellen der unbehandelten Proben . . . . .	44
3.12	Auswertung Screen: Interne Positivkontrollen . . . . .	46
3.13	Auswertung Screen: Änderungen der Zellproliferation . . . . .	47
3.14	Auswertung Screen: Zunahme polyploider Zellen . . . . .	48
3.15	Induktion von Polyploidie durch Inhibition von Fbxo5/Emi1 und PLK1 . . . . .	49
3.16	Auswertung Screen: Zunahme Doxorubicinresistenz . . . . .	50
3.17	Auswertung Screen: Zunahme Doxorubicinsensitivität . . . . .	51
3.18	Auswertung Screen: Sensitivierung . . . . .	52
3.19	Auswertung Validierung: shRNA-mir-Expressionsvektoren gegen Fbxo5/Emi1 . . . . .	54
3.20	Auswertung Validierung: Verminderung der Zellviabilität . . . . .	55
3.21	Auswertung Validierung: Zunahme der Doxorubicinsensitivität . . . . .	56
3.22	Bestimmung des optimalen Volumens an Virusüberstand . . . . .	57
3.23	Kandidatengene in verschiedenen Tumorzelllinien . . . . .	58
3.24	Spezifität des Phänotyps der shRNA-mir gegen Fbxo45 . . . . .	59
3.25	Unveränderte Doxorubicinsensitivität bei Inhibition von Fbxo45 in Fi301 Zellen . . . . .	61
3.26	Zelldichteabhängigkeit der Doxorubicinsensitivität von SH-EP Zellen . . . . .	62

3.27 Dosis-Wirkungs-Kurve von all-trans-Retinsäure in SH-EP Zellen . . . . .	64
4.1 Schema zur Weiterentwicklung des experimentellen Systems . . . . .	79



# Tabellenverzeichnis

1.1	Prognose und Therapie Neuroblastom . . . . .	7
2.1	Übersicht Zellkultur . . . . .	21
2.2	Übersicht Transduktionsbedingungen . . . . .	24
3.1	Auflösungsvermögen Zellviabilitätstest (MTT) . . . . .	38
4.1	Validierung Screen: Übersicht F-box Proteine . . . . .	75
4.2	Erwartete Kandidaten Screen F-box Proteine . . . . .	76

# Kapitel 1

## Einleitung

In Deutschland ist etwa ein Viertel aller Todesfälle auf Krebs zurückzuführen. Jährlich gibt es circa 500.000 Neuerkrankungen. Mit steigender Lebenserwartung werden diese Zahlen in den nächsten Jahrzehnten noch zunehmen. Krebsforschung wird somit auch in der Zukunft einer der wichtigsten Bereiche medizinischer Forschung sein.<sup>1</sup> Bisher ist die Krebsforschung in der Lage gewesen, die Prognose einiger Krebserkrankungen deutlich zu verbessern. Aufgrund der unselektiven Wirkungsweise grundlegender Therapieansätze, wie Chemotherapeutika und Bestrahlung, liegt die 5-Jahres-Überlebensrate von Krebspatienten dennoch weiterhin nur bei circa 60%.<sup>1</sup> Ein grundsätzliches Problem in der Entwicklung neuer Therapieansätze besteht in der Unkenntnis der genauen molekulargenetischen Pathogenese vieler Krebserkrankungen. Ohne diese Kenntnisse ist es schwer, einen gezielten Ansatzpunkt für spezifischere Krebstherapien zu finden. Ein wesentlicher Schwerpunkt der Krebsforschung ist daher seit Jahrzehnten die Aufklärung molekulargenetischer Prozesse und ihrer Pathologien.

Schon in den 1980er Jahren war bekannt, dass Krebs Resultat von somatischen Mutationen ist. Ein bedeutender Fortschritt für die Krebsforschung war die Sequenzierung des menschlichen Genoms, die nicht nur wesentlich zum Verständnis seiner Struktur und Funktionalität beigetragen hat, sondern auch die gezielte Suche nach für Krebsentstehung ursächlichen Mutationen zuließ. Die Entdeckung von Protoonkogenen, wie zum Beispiel des BRAF Gens, das in 50% aller Melanome mutiert ist, konnte auch unmittelbar als Ansatzpunkt neuer Pharmakotherapien genutzt werden [12]. Die sich anschließende Entwicklung von Microarrays ermöglichte es, Expressionsprofile zu erstellen und Gewebeproben hinsichtlich hunderter möglicher Mutationen von Genen gleichzeitig zu analysieren. Damit war die Hoffnung verbunden, neben der Entdeckung weiterer krebsrelevanter Expressionsänderungen mehr über die biologische Bedeutung und Interaktion von in Tumorzellen aktiven Signalwegen zu lernen. Darauf aufbauend sollten verbesserte pharmakologische Therapieansätze entwickelt werden. Mit Hilfe von Genexpressionsanalysen wurden nicht nur viele Krebs relevante Gene identifiziert, sondern Tumoren können auch besser als mit herkömmlichen histologischen Klassi-

---

<sup>1</sup>Krebs in Deutschland 2007/2008. Häufigkeiten und Trends. 8. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2012

fizierungen in Untergruppen eingeteilt werden, die eine Voraussage über die Erfolgsaussichten einer Therapie erlauben [12]. Für das Osteosarkom, bei dem histologische Klassifizierungen von geringem prognostischen Wert sind, konnten beispielsweise Genexpressionssignaturen gefunden werden, die eine Voraussage des klinischen Verlaufs erlauben. Somit können Patienten identifiziert werden, die von einer adjuvanten Chemotherapie profitieren [13]. Diese für das Osteosarkom gefundenen Genexpressionssignaturen ermöglichen darüber hinaus auch die Risikostratifizierung von Patienten mit einigen anderen Tumorentitäten, wie gastrointestinalen Stromatumoren, Brustkrebs und Lymphomen.

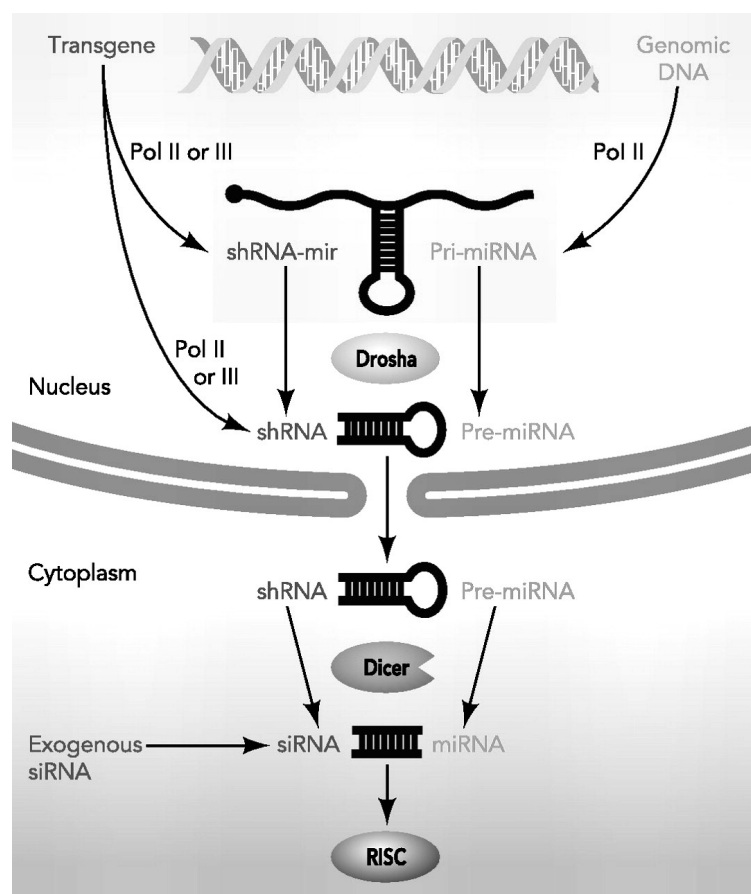
Diese bisherigen Bemühungen konnten die Langzeitüberlebensrate einzelner Patientengruppen deutlich erhöhen. Dennoch steht die Krebsforschung weiter vor dem Problem, dass trotz guter Vorhersagbarkeit des Therapieverlaufs der Therapieerfolg vieler Tumoren mit schlechter Prognose nicht entscheidend verbessert werden konnte. Aufbauend auf deskriptive Forschung mit der Analyse von Expressionsprofilen ist es in der Zukunft wichtig, bekannte Faktoren und Signalwege funktionell näher zu charakterisieren. Über die Aufklärung der Pathogenese von Krebserkrankungen ist es anschließend möglich, gezielt neue pharmakologische Prinzipien zu entwickeln. Ein eindrucksvolles Beispiel hierfür liefert Imatinib. Basierend auf dem Wissen, dass 95% aller Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie (CML) über das sogenannte Philadelphiachromosom verfügen, das zum Entstehen des für die CML ursächlichen Fusionsproteins BCR-ABL führt, wurde nach einem spezifischen Inhibitor für diese Tyrosinkinase gesucht. Durch Einsatz des BCR-ABL Inhibitors Imatinib konnte die 5-Jahresüberlebensrate von CML, die vorher abhängig von der Studie mit 30% bis 60% angegeben wurde, auf 89% gesteigert werden [2, 4].

## 1.1 Funktionelle Genomik mit Hilfe von RNA-Interferenz

Die Entdeckung der RNA-Interferenz (RNAi) hat der Forschung eine Technik zur Verfügung gestellt, mit der funktionelle Forschung sehr viel effektiver als mit früheren Zugängen durchgeführt werden kann. RNA-Interferenz ermöglicht es, die Expression von Genen auf RNA-Ebene einfach herunterzuregulieren und ihre Funktion auf diese Weise zu untersuchen. RNA-Interferenz ist im Vergleich zu Techniken wie dem Knockout von Genen nicht nur schneller und kostengünstiger, sie kann auch deutlich universeller eingesetzt werden. RNAi-Techniken wie siRNA oder shRNA sind in nahezu jedem gewählten Tier- oder Zellmodellssystem einsetzbar und erlauben die Kombination mit weiteren Optionen, wie induzierbarer Expression, beispielsweise gesteuert über Tetrazyklin, oder zusätzlicher Fluoreszenzmarkierung der siRNA-Moleküle. Ein weiterer Vorteil ist die im Vergleich zu Inhibitoren von Proteinfunktion höhere Spezifität, mit der RNA-Interferenz Genprodukte inhibiert.

### 1.1.1 Mechanismus der RNA-Interferenz

Es sind unterschiedliche RNA-Interferenzmechanismen bekannt. Neben der RNA-Interferenz durch exogene siRNA und endogene microRNA (miRNA), wird durch Histonmethylierung vermitteltes transcriptional gene silencing (TGS) unterschieden. Der molekulare Mechanismus von TGS ist im Gegensatz zu siRNA und miRNA bisher nicht gut untersucht [14]. In Nematoden, Insekten und Pflanzen dient RNA-Interferenz mittels siRNA als intrinsischer Abwehrmechanismus gegen Viren. Virale doppelsträngige RNA wird von DICER, einem RNase III Enzym, in kleine siRNA-Stücke geschnitten. Im weiteren Verlauf wird diese siRNA in den RNA-induced silencing complex (RISC) geladen und ist für die Erkennung von mRNA zuständig, die für virale Proteine kodiert, die somit degradiert werden kann [15].



**Abbildung 1.1** – Prozessierung von endogener miRNA im Vergleich zu shRNA-mir. Nach Transkription von pri-miRNA/shRNA-mir erfolgt die Prozessierung zu pre-miRNA/shRNA mittels Drosha, der Export in das Zytoplasma über Exportin-5, die DICER vermittelte Spaltung in miRNA/siRNA und die anschließende Inkorporation in den RISC-Komplex. Quelle: Physiology, Vol. 22, No. 3, 161-166, June 2007

RNA-Interferenz durch miRNA ist ein bedeutender Genregulationsmechanismus in eukaryotischen Zellen, der unter anderem die Entwicklung von Stammzellen durch Beeinflussung der Genexpression von Transkriptionsfaktoren mitsteuert [16]. MiRNA geht aus pri-miRNA hervor, die von RNA-Polymerase II transkribiert wird und zunächst durch Drosha,

einer RNase III Endonuklease, unter Vermittlung durch das RNA-Bindungsprotein Pasha, in 70 Nukleotide lange pre-miRNA geschnitten wird. pre-miRNA wird durch Exportin-5 in das Zytoplasma transportiert, wo DICER für die Prozessierung in fertige miRNA von 21 Nukleotiden Länge zuständig ist. Anschließend wird die miRNA analog zu siRNA in den RISC-Komplex geladen, der die miRNA als Vorlage für die Erkennung von mRNA verwendet [17].

Der RISC-Komplex ist der Punkt, an dem siRNA- und miRNA-Signalweg konvergieren. Essentieller Bestandteil des RISC-Komplex sind Argonautenproteine. Der wichtigste Vertreter dieser Gruppe ist Ago2. Von der doppelsträngigen siRNA bzw. miRNA wird der Antisensestrang in den RISC-Komplex geladen und dient als Vorlage zum Erkennen der Ziel-mRNA. In Abhängigkeit der Sequenzhomologie zwischen geladenem Antisensestrang und der entsprechenden mRNA arbeitet Ago2 auf unterschiedliche Weise. siRNA und miRNA in Pflanzen haben nahezu perfekte Übereinstimmung mit der Ziel-mRNA. Ago2 ist in diesem Fall in der Lage, mRNA direkt zu spalten. miRNA von Metazoa hat in der Regel eine unvollständige Sequenzhomologie, sodass eine miRNA bis zu mehrere hundert verschiedene Ziel-mRNAs besitzen kann, deren Translation Ago2 inhibiert (translational repression) [14, 18].

### 1.1.2 RNA-Interferenztechniken in vitro

RNA-Interferenz kann in vitro entweder über die direkte Applikation von siRNA in permeabilisierte Zellen oder über den Umweg einer mit Hilfe eines Vektors stabil in das Genom integrierten shRNA-Expressionskassette realisiert werden. Während in Zellen eingebrachte siRNA direkt in den RISC-Komplex inkorporiert werden kann, unterliegt das shRNA-Transkript vorher einer mit miRNA vergleichbaren Prozessierung. Der stabil in das Genom integrierte shRNA-Expressionsvektor erlaubt die langfristige Herunterregulierung eines Gens. Der Effekt von siRNA ist dagegen nur temporär, und lässt nach 4-5 Tagen aufgrund von sinkender siRNA-Konzentration wieder nach.

Der Einsatz von siRNA hat im Vergleich zu shRNA den Vorteil, eine stärkere Herunterregulierung eines Gens erreichen zu können, da mit extern zugefügter siRNA deutlich höhere Mengen an inhibitorisch aktiven Molekülen pro Zelle erreicht werden können als mit shRNA. Die Transkriptanzahl einer shRNA wird durch die Menge an in das Genom integrierter shRNA-Expressionskassetten, deren Transkriptionsrate und der sich daran anschließenden Prozessierung bis zum RISC-Komplex bestimmt. Die maximale Anzahl an in das Genom integrierter shRNA-Expressionskassetten ist dadurch begrenzt, dass sie ab einem Grenzwert eine zytotoxische Interferonantwort durch die infizierten Zellen auslösen. Die Transkriptionsrate der shRNA-Expressionskassette hängt ebenfalls von verschiedenen Faktoren, wie der Aktivität der zugehörigen RNA-Polymerase und des entsprechenden Promoters, ab. Im Rahmen der RNA-Prozessierung bis zum RISC-Komplex ist vor allem die Aktivität der

Faktoren Drosha, DICER, Exportin-5 und Ago2 für die Effektivität von RNA-Interferenz ausschlaggebend [14].

### 1.1.3 Weiterentwicklung von shRNA: shRNA-mir

Der Erfolg funktioneller Forschung mit RNA-Interferenz hängt entscheidend von der Effektivität der zugrundeliegenden RNA-Interferenztechnik ab. Je besser die Expression eines Gens herunterreguliert ist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass eine Änderung des Phänotyps resultiert, die für weiterführende Analysen genutzt werden kann.

Als die Technik der RNA-Interferenz mittels shRNA entwickelt wurde, waren die Prozesse, die zur Reifung einer pri-miRNA über Drosha und Pasha in pre-miRNA und weiter über Exportin-5 und DICER zur fertigen miRNA führen, noch nicht hinlänglich bekannt. Die damals verwandten shRNAs waren daher einfache von RNA-Polymerase III transkribierte RNAs mit Haarnadelstruktur, die nach dem Vorbild von pre-miRNA nur über eine Schnittstelle für DICER verfügten. 2005 führte die detaillierte Aufklärung der Prozessierung von endogener miRNA zur Entwicklung von shRNA-mir. shRNA-mir hat die Struktur von endogener miRNA zum Vorbild mit jeweils einer Schnittstelle für Drosha und DICER sowie einem 2-Nukleotidüberhang am 3'-Ende. Sie wird analog zu pri-miRNA von RNA-Polymerase II transkribiert und anschließend von Drosha geschnitten, was die Erkennung durch DICER deutlich verbessert und in mehr produzierter siRNA mündet. Für shRNA-mir ist beschrieben, dass sie im Vergleich zu normaler shRNA eine bis zu 12-mal stärkere Genherunterregulierung erreichen kann [19].

### 1.1.4 Systematische Untersuchungen mit RNA-Interferenz

Um die Technik der RNA-Interferenz genomweit einsetzen zu können, ist inzwischen eine Vielzahl von siRNA- und shRNA-Bibliotheken entstanden, mit denen das gesamte Genom oder ein Teil davon bezüglich einer biologischen Fragestellung untersucht werden kann. Eine der am bisher weitesten entwickelten genomweiten shRNA-Bibliotheken ist die auf shRNA-mir basierte pGIPZ-Bibliothek von Openbiosystems, die unter Mitarbeit von Gregory Hanon entstand, der auch an der Entwicklung von shRNA-mir beteiligt war [19]. shRNA-Expressionsvektoren der pGIPZ-Bibliothek koexprimieren tGFP, dessen mRNA mit dem shRNAmir-Transkript polycistronisch gekoppelt ist. Über die Intensität der GFP-Fluoreszenz von transduzierten Zellen kann eine Aussage darüber getroffen werden, wie hoch die Transkriptmenge der jeweiligen shRNA-mir ist. Teile dieser Bibliothek wurden für die Erstellung dieser Arbeit verwendet.

Grundsätzlich sind zwei Ansätze unterscheidbar, mit denen RNAi-Bibliotheken eingesetzt werden können. Bei parallel durchgeführten Screeninguntersuchungen werden alle untersuchten Gene in einer Reporterzelllinie voneinander isoliert herunterreguliert. In einem genau definierten Assay wird überprüft, ob die Herunterregulierung des jeweiligen Gens

mit einem veränderten Phänotyp der Zelllinie einhergeht. Die Stärke dieses Ansatzes ist es, dass siRNA oder shRNA mit einer maximal erreichbaren Anzahl an Transkripten pro Zelle eingesetzt werden kann, mit der ein guter Knockdown sowie eine ausgeprägte Änderung des Phänotyps der Reporterzellen erzielt wird. Die MOI, das Verhältnis aus infektiösen Partikeln und Zellen (multiplicity of infection), ist also sehr viel größer als 1.

Alternativ ist es möglich, einen Zellpool mit einer kompletten shRNA-Bibliothek zu infizieren und die Reporterzellen anschließend über einige Zeit einem geeigneten Selektionsdruck auszusetzen. Über die Analyse, welche Genherunterregulierung zu einer An- oder Abreicherung von Zellen führt, können so Informationen zur Bedeutung von Genen hinsichtlich der untersuchten Fragestellung erlangt werden. Die Durchführung eines Screens ist auf diese Weise deutlich einfacher, hat aber den großen Nachteil, dass bei einer MOI  $< 0,3$  pro Zelle nur ein Expressionsvektor der jeweiligen shRNA integriert werden kann. Die Auflösung eines solchen Screens ist deutlich geringer, da RNA-Interferenz mit nur einer integrierten shRNA-Expressionskassette weitaus weniger effektiv ist. Auch die aufwändige Identifizierung der unter Selektion angereicherten shRNAs mittels Sequenzierung stellt eine Herausforderung für zur Verfügung stehenden technischen und personellen Ressourcen dar [3].

### 1.1.5 Beispiele für RNAi-Screens

Es existieren inzwischen viele Beispiele für erfolgreich durchgeführte Screens mit RNA-Interferenz, sowohl im Bereich Krebsforschung, aber auch hinsichtlich anderer biologischer Fragestellungen.

Potentielle neue Therapieziele des Ovarialkarzinoms konnten beispielsweise mit Hilfe eines parallel durchgeführten shRNA Screens von Duan et al. 2008 gefunden werden. Die Grundlage war ein Assay, bei dem das Wachstum von SKOV-3<sub>TR</sub>-Zellen, einer Taxol resistenten Ovarialkarzinomzelllinie, jeweils nach Expression einer der gegen 132 Gene gerichteten shRNAs in An- und Abwesenheit einer sublethalen Dosis Taxol vermessen wurde. Der Screen konnte PRP-4 (pre-mRNA processing factor-4) als Faktor identifizieren, dessen Herunterregulierung durch insgesamt 3 der 5 eingesetzten shRNAs die Taxolsensitivität der Taxol resistenten Ovarialkarzinomzelllinie SKOV-3<sub>TR</sub> deutlich steigerte. Daneben wurden mit Survivin, MDR-1, THOC1, MDM2 und Krit1 weitere Faktoren entdeckt, deren Herunterregulierung die Taxolsensitivität von SKOV-3<sub>TR</sub>-Zellen erhöhte [20].

Ein weiteres Beispiel für einen erfolgreichen parallel durchgeführten Screen mit insgesamt 3000 shRNAs gegen menschliche Phosphatasen, Kinasen und F-box Proteine war die Suche nach Modulatoren zirkadianer Rhythmie von Maier et al. 2009. Die dabei eingesetzte Bibliothek war die pGIPZ-Bibliothek von Openbiosystems. Der Screen konnte unter anderem CK2 als für den korrekten Ablauf des zirkadianen Zyklus essentieller Faktor identifizieren [21].

Mit Hilfe einer gepoolten Bibliothek gegen menschliche Phosphatasen und Kinasen konnten Rato et al. 2010 essentielle Proteine für eine HIV-Infektion identifizieren: Jurkat T-Zellen

wurden mit einem Pool aus 2855 shRNAs transduziert und in drei Zyklen mit einem HI-Virus, der Hitze stabiles Antigen (HSA) koexprimiert, infiziert. Über die Selektion und Expansion von HSA-negativen Zellen konnten 14 verschiedene Proteine identifiziert werden, die für HIV-Replikation essentiell sind, und die in der Zukunft möglicherweise neue antivirale Strategien in der HIV-Therapie ermöglichen [22].

## 1.2 Neuroblastom

Das Neuroblastom ist eine Krebserkrankung, bei der viele Patienten mit bisher schlechter Therapieprognose von der Identifizierung neuer Therapieziele profitieren würden. Es stellt mit einem Anteil von 8% nach der akuten lymphoblastischen Leukämie den zweithäufigsten Tumor im Kindesalter in Deutschland dar.<sup>2</sup> Trotz Verbesserungen der Behandlungsmöglichkeiten des Neuroblastoms liegt die Langzeitüberlebensrate von Hochrisikopatienten immer noch bei nur 40-50% [1].

Das Neuroblastom leitet sich von Vorläuferzellen des sympathischen Nervensystems ab und zeigt daher in Abhängigkeit seiner Lokalisation, die von abdominalen bis hin zu zervikalen Manifestationen reichen kann, sehr unterschiedliche Symptome, angefangen von symptomlosen Raumforderungen bis hin zu massiven Beschwerden wie neurologischen Ausfällen (z.B. Horner-Syndrom oder Querschnittssymptomatik), Luftnot, Bauch- und Rückenschmerzen sowie Harn- und Darmproblemen [23].

### 1.2.1 Prognose und Behandlung

**Tabelle 1.1** – Prognose und Therapie Neuroblastom in Abhängigkeit des Stadiums. Nach Maris N Engl J Med 2010; 362:2202-2211 und International Neuroblastoma Staging System 2010

Variable	Risikogruppe			
	Niedrig	Intermediär	Hoch	Stadium 4S
Lokalisation	Lokalisierte Tumor	Lokalisierte Tumor mit regionalem Lymphknotenbefall, Knochen- und Knochenmarksmetastasen	Disseminierte Knochen- und Knochenmarksmetastasen	Lokalisierte Tumor mit Dissemination in Haut, Leber und Knochenmark
Therapie	Operation	Operation, Chemotherapie	Hochdosischemotherapie, Bestrahlung Primärtumor und Metastasen, Myeloablative Chemotherapie mit autologer, hämatopoietischer Stammzelltransplantation, Retinolsäure, anti-GD2 Immuntherapie	Symptomatische Therapie
Langzeitüberlebensrate[%]	>98	90-95	40-50	>90

Der klinische Verlauf des Neuroblastoms ist ungewöhnlich dichotom, was sich in einer zweigeteilten Therapiestrategie niederschlägt: Während Patienten in einem Niedrigrisiko-,

<sup>2</sup>Krebs in Deutschland 2007/2008. Häufigkeiten und Trends. 7. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2012



Intermediär- oder dem 4S-Stadium eine exzellente Langzeitüberlebensrate von mehr als 90% haben, beträgt die Langzeitüberlebensrate von Hochrisikopatienten mit Neuroblastom nur 40-50%. Molekularbiologisch ist bei Hochrisikopatienten oft eine segmentale Chromosomenaberration wie der MYCN-Amplifikation zu finden, die einen besonders wichtigen prognostischen Marker bei der Therapie des Neuroblastoms darstellt. Chromosomenaberrationen, bei denen ganze Chromosomen dupliziert werden, korrelieren häufig mit einer deutlich günstigeren Prognose [1].

Spiegelbildlich dazu kann das Neuroblastom bei Patienten mit Niedrigrisiko- und Intermediärstadium in der Regel mit einer Operation und anschließender Chemotherapie erfolgreich behandelt werden, während Hochrisikopatienten eine Hochdosisradiochemotherapie mit autologer, hämatopoietischer Stammzelltransplantation und Retinolsäure erhalten. Bemerkenswert ist das nur im Säuglingsalter vorkommende Tumorstadium 4S, das sich durch eine extrem hohe Spontanremission von 80% auszeichnet, die bei diesen Patienten lediglich eine symptomatische Therapie erfordert [24].

### 1.2.2 Bemühungen um neue Therapieansätze

Neuere Bemühungen in der Therapie von Hochrisikopatienten umfassen die Entwicklung von Immuntherapie mit monoklonalen GD2-Antikörpern gegen von Neuroblastomzellen exprimiertes GD2 oder radioaktiv markiertes Metaiodbenzylguanidin ( $^{131}\text{I}$ -MBG), das von Neuroblastomzellen selektiv aufgenommen werden soll. In einer Phase III Studie zum Einsatz von GD2-Antikörpern konnte die 2-Jahresrate an progressionsfreiem Überleben von ausgewählten Hochrisikopatienten mit Neuroblastom 2010 von 46% auf 66% erhöht werden [25]. Auch zum Einsatz von  $^{131}\text{I}$ -MBG existieren Studien. Eine Phase II Studie zum Einsatz von  $^{131}\text{I}$ -MBG nach Hochdosischemotherapie bei Hochrisikopatienten konnte 2007 eine Ansprechrate von 34% der untersuchten Patienten feststellen [26]. Demgegenüber konnte eine von der Deutschen Neuroblastomstudie 2006 veröffentlichte retrospektive Studie keine Verlängerung der Langzeitüberlebensrate von Hochrisikopatienten durch den Einsatz von  $^{131}\text{I}$ -MBG feststellen [27].

Diese beiden Beispiele machen deutlich, dass immernoch kein wesentlicher Durchbruch in der Therapie des Neuroblastoms von Hochrisikopatienten erzielt wurde und auch in der Zukunft weitere Bemühungen in dieser Richtung notwendig sind.

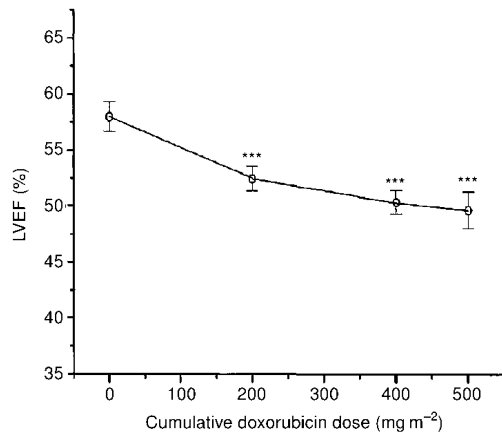
### 1.2.3 Grenzen der Therapie am Beispiel Doxorubicin

Die wesentliche Limitierung beim Einsatz von Hochdosischemotherapie ist die Tatsache, dass neben Krebszellen auch andere Zellen des Patienten geschädigt werden, und es sehr schnell zu tiefgreifenden Schäden am blutbildenden System kommt. Aus diesem Grund wurde Hochdosischemotherapie erst durchführbar als es mit Hilfe autologer, hämatopoietischer Stammzelltransplantationen möglich war, die anschließende Regenerationszeit des hämatopoietischen

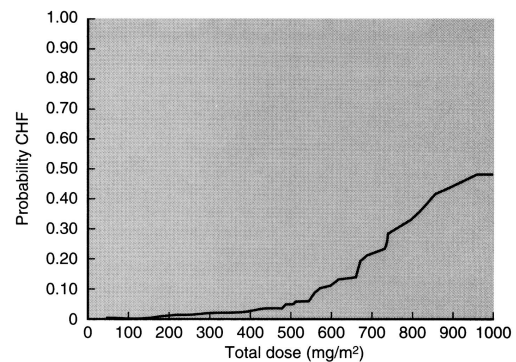
Systems stark zu verkürzen.

Das Anthrazyklin Doxorubicin ist ein prominentes Beispiel für ein effektives Chemotherapeutikum, dessen Einsatz bei der Therapie des Neuroblastoms durch unerwünschte Arzneimittelwirkungen begrenzt ist. Doxorubicin vermittelt Zytotoxizität durch Induktion von DNA-Schäden. Es werden hierfür unterschiedliche Wirkmechanismen diskutiert, wie eine Inhibition von Topoisomerase II, Alkylierung oder Interkalation mit DNA, die Inhibition von DNA-Replikation durch Entstehung von DNA Crosslinks oder die Entstehung von freien Sauerstoffradikalen [28].

Vor allem die kardiotoxische Wirkung von Doxorubicin kann lebensbedrohlich sein und erfordert eine strenge Überwachung der eingesetzten Menge. Abbildung 1.2(a) zeigt die Abnahme der linksventrikulären Ejektionsfraktion mit zunehmender kumulativer therapeutischer Doxorubicindosis. Konsistent mit dieser Beobachtung ist das Ergebnis einer Studie zur Kardiotoxizität von Doxorubicin, nach der das Risiko einer kongestiven Herzinsuffizienz mit zunehmender Doxorubicin steigt (Abbildung 1.2(b)).



(a) Doxorubicin induzierte Reduktion der Ejektionsfraktion



(b) Wahrscheinlichkeit Doxorubicin induzierter Herzinsuffizienz

**Abbildung 1.2** – Dosislimitierung von Doxorubicin. Die Gesamtdosis einer Therapie mit Doxorubicin ist durch Kardiotoxizität limitiert. (a) Mit steigender kumulativer Doxorubicindosis kommt es zur Abnahme der Ejektionsfraktion. (b) Parallel nimmt die Wahrscheinlichkeit einer Herzinsuffizienz zu. Quellen: T Nousiainen et al.; *British Journal of Cancer* (2002) 86, 1697–1700. Genzou Takemura et al.; *Progress in Cardiovascular Diseases* Volume 49, Issue 5, 2007, 330-352.

Für die Vermittlung dieser Kardiotoxizität werden unterschiedliche Mechanismen, wie die Entstehung von Sauerstoffradikalen, Apoptoseinduktion, Expressionsänderung von Kardiomyozyten spezifischen Genen und veränderte Signalwege diskutiert. Trotz intensiver Bemühungen ist es bisher nicht gelungen, Doxorubicin assoziierte schädliche Effekte auf das Herz erfolgreich zu vermeiden. Ein neuer Ansatz besteht in der parallelen Gabe von hämatopoietischen Faktoren wie Erythropoietin, Granulozytenkolonie stimulierender Faktor (G-CSF) und Thrombopoietin [29].

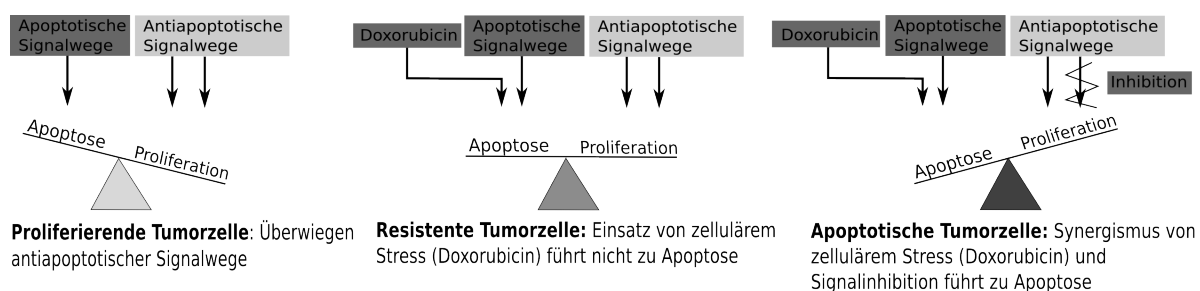
Die Problematik von unerwünschten Arzneimittelwirkungen wird durch die Fähigkeit von Tumoren, eine Resistenz gegen unterschiedliche Pharmaka auszubilden, im Verlauf einer

Chemotherapie meist noch verstärkt. Eine erhöhte Resistenz von Tumorzellen erfordert den Einsatz von höheren Mengen an Chemotherapeutika, was wiederum unerwünschte Arzneimittelwirkungen aggraviert. Auch beim Einsatz von Doxorubicin wird regelmäßig die Ausbildung von Resistenzen beobachtet, die die Effektivität einer Doxorubicinbehandlung innerhalb der zulässigen Therapiedosis stark vermindern. Für die Entstehung von Therapieresistenzen scheinen unterschiedliche Mechanismen verantwortlich zu sein. Es lassen sich häufig eine verminderte Aufnahme bzw. eine erhöhte Ausfuhr von Doxorubicin bei resistenten Zellen finden. Weiterhin sind bei resistenten Zelllinien veränderte Signalwege im Zusammenhang mit Apoptose beschrieben [30].

### 1.3 RNAi-Screen zur Identifizierung neuer Therapieziele

Für den therapeutischen Einsatz von Chemotherapeutika wie Doxorubicin ist es wünschenswert, die Sensitivität von Tumorzellen gegenüber diesen Chemotherapeutika zu erhöhen. Auf diese Weise wäre es möglich, mit bereits geringeren Mengen an Doxorubicin in Tumorzellen Apoptose auszulösen. Somit könnte der beschriebenen Kardiotoxizität als auch der Entstehung von Therapieresistenzen begegnet werden. Eine Möglichkeit ist die Kombination von Chemotherapeutika und der Modulation von Signalwegen, die das Überleben von Tumorzellen fördern.

Abbildung 1.3 verdeutlicht diesen Ansatz: In einer proliferierenden Tumorzelle überwiegen antiapoptotische Signalwege. Während der alleinige Einsatz von durch beispielsweise Doxorubicin induzierten zellulären Stress eine resistente Tumorzelle nicht in Apoptose zu treiben vermag, kann der Synergismus aus Doxorubicin und der gezielten Inhibition eines zusätzlichen Signalwegs Apoptose in der Zelle auslösen.



**Abbildung 1.3** – Prinzip des Synergismus von zellulärem Stress und Signalinhibition. In Tumorzellen überwiegen antiapoptotische Signalwege. Therapeutisch verabreicherter, zellulärer Stress ist in therapieresistenten Tumorzellen nicht in der Lage, das Verhältnis der Stärke pro- und antiapoptotischer Signalwege umzukehren und Apoptose auszulösen. Die Kombination von zellulärem Stress und der zusätzlichen Inhibition antiapoptotischer Signalwege kann zum Übergewicht proapoptotischer Signalwege und der Überwindung von Therapieresistenzen führen.

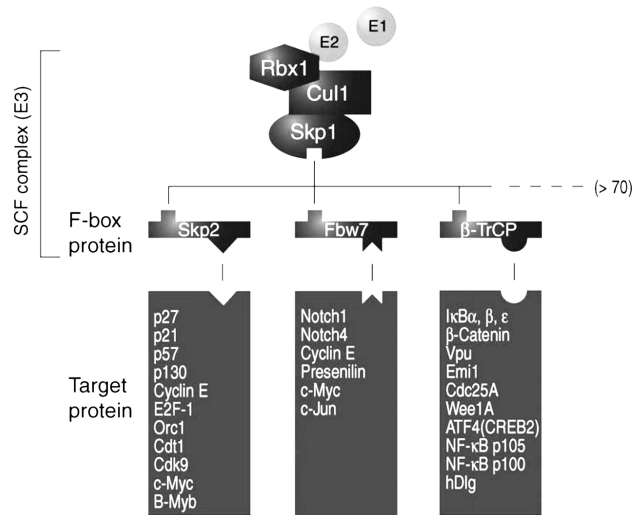
### 1.3.1 Mögliche neue Therapieziele: F-box Proteine

Ein sehr geeigneter Zugang für die Identifizierung neuer Therapieziele des Neuroblastoms, deren Inhibition die Aktivität von Überlebenssignalwegen der Tumorzellen vermindert, wäre ein genomweiter, synthetischer Screen, in dem die Herunterregulierung von Genen mit der Applikation von zellulärem Stress kombiniert wird. Die Durchführung eines genomweiten Screens ist ein sehr komplexes und teures Projekt. Es ist daher strategisch sinnvoll, sich einem genomweiten Screen in Stufen zu nähern. Indem man einen Teilscreen einer bedeutenden, eng umrissenen Gruppe von Genen an den Anfang stellt, kann man ein experimentelles System aufbauen, das geeignet ist, einen kompletten Screen durchzuführen. Basierend auf diesen Erfahrungen können anschließend weitere Genfamilien abgearbeitet werden oder auch ein vollständiger Screen nachgezogen werden.

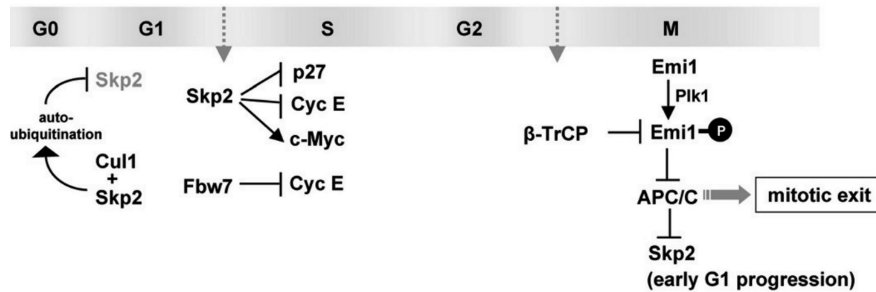
Es stellt sich daher die Frage, welche eng umrissene Gruppe von Genen relevant für die Modulation der Chemoresistenz von Neuroblastomzellen ist, und so Kandidat für einen ersten Teilscreen wäre. Für eine schnelle Modulation von zellulären Signalwegen, zum Beispiel als Antwort auf therapeutisch vermittelten zellulären Stress, ist neben reversiblen Proteinmodifikationen, wie Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen, irreversibler Proteinabbau verantwortlich. Proteininstabilität, also die Kontrolle über Erhalt oder Abbau von Proteinen, wird in der Zelle über die Familie der F-box Proteine realisiert, die damit eine entscheidende Rolle in der Modulation von vielen zellulären Signalwegen spielen.

F-box Proteine sind Teil des SCF-Ubiquitinligase-Komplex, dessen aus drei Komponenten bestehende Struktur in Abbildung 1.4(a) zu sehen ist: Skp1, ein Cullin und Rbx1/Roc1/Hrt1 bilden ein Gerüst, an dem ein F-box Protein und die Ubiquitinligase gebunden sind. Das F-box Protein vermittelt dabei die Bindung des Komplex mit dem Substrat, das nach Polyubiquitinierung im Proteasom abgebaut wird [31]. Über diesen zentralen Regulationsmechanismus nehmen F-box Proteine auf eine große Anzahl an Signalwegen und Zellfunktionen Einfluss. Abbildung 1.4(b) zeigt, wie die F-box Proteine Skp2, Fbxw7,  $\beta$ -TrCP und Emi1 beispielsweise als wesentliche Regulatoren den Zellzyklus kontrollieren. Dies prädestiniert sie sowohl als Faktoren, die an der Pathogenese von Krebserkrankungen teilhaben, aber auch als potentielle Therapieziele. Beispiele finden sich auch beim Neuroblastom: Während Skp2-Überexpression bei Neuroblastompatienten mit schlechter Therapieprognose korreliert, konnte gezeigt werden, dass eine gestörte Fbxw7 vermittelte Degradation von Myc-N an der Entstehung des Neuroblastoms beteiligt ist [32, 33].

Die Gruppe der F-box Proteine umfasst 69 bekannte Proteine, von denen nur 27 zum Teil charakterisiert sind [34]. Da die Funktion des Großteils der F-box Proteine bisher nicht eingehend charakterisiert wurde, sie aber auf Grund ihrer Rolle als Regulatoren von Proteininstabilität in viele wichtige Signalwege eingreifen, erscheint es sehr wahrscheinlich, dass neue Therapieziele für das Neuroblastom unter den bisher nicht näher beschriebenen F-box Proteinen gefunden werden können.



(a) Struktur des SCF-Ubiquitinligase-Komplexes



(b) Zellzykluskontrolle durch F-box Proteine

**Abbildung 1.4** – Struktur und Funktion von F-box Proteinen. (a) F-box Proteine sind als Teil des SCF-Ubiquitinligase-Komplexes über die Strukturproteine Skp1, Cul1 und Rbx1 mit der Ubiquitinligase verbunden und vermitteln die Erkennung des Zielsubstrats. F-box Protein vermittelte Ubiquitinierung dient als Signal zur Inaktivierung von zellulären Proteinen durch proteosomale Degradation. (b) Die Modulation der Aktivität von zellulären Regulatoren ermöglicht die Kontrolle von Prozessen wie dem Ablauf des Zellzyklus durch F-box Proteine. Quellen: Nakayama, K. *Semin Cell Dev Biol* 16, 323-33 (2005). Ho, M.S. et al. *Cell Mol Life Sci* 65, 1977-2000 (2008).

## 1.4 Zielstellung

Für die Verbesserung der Prognose von Hochrisikopatienten mit Neuroblastom ist es notwendig, die Effektivität bestehender Therapieoptionen zu verbessern oder alternative Therapieoptionen zu entwickeln. Ein vielversprechender Ansatz ist der synergische Einsatz herkömmlicher Chemotherapeutika in Kombination mit der Inhibition von Signalwegen, die das Überleben der Tumorzellen fördern. Auf diese Weise kann die Effektivität bestehender Chemotherapeutika gesteigert und unerwünschte Arzneimittelwirkungen reduziert werden. Doxorubicin ist ein Vertreter von bei Neuroblastompatienten häufig verwendeter Pharmaka, dessen Einsatz durch unerwünschte, kardiotoxische Arzneimittelwirkungen limitiert ist. Die kombinierte Therapie mit Doxorubicin und einem Inhibitor eines Signalweges, der das Überleben

der Neuroblastomzellen fördert, wäre daher eine Möglichkeit, die Therapie von Hochrisikopatienten mit Neuroblastom zu verbessern.

Ein genomweiter, synthetischer RNAi-Screen ist in der Lage, neue Therapieziele zu identifizieren, deren Inhibition zu einer Steigerung der Sensitivität von Neuroblastomzellen gegenüber Doxorubicin führt. Er stellt daher einen naheliegenden Schritt in der Verbesserung bestehender Therapieoptionen für das Neuroblastom dar. Die Durchführung eines RNAi-Screens ist ein komplexes Projekt, das umfangreiche Vorbereitung erfordert. Am Anfang steht die Etablierung eines experimentellen Systems, was die Auswahl einer geeigneten Reporterzelllinie und der dazu kompatiblen shRNA Bibliothek sowie die Entwicklung eines geeigneten Assays, der dem Screen eine hohe Sensitivität und Reproduzierbarkeit verleiht, umfasst. Daran anschließend ist es notwendig, das entwickelte System mit Hilfe eines Screens einer überschaubaren Gruppe von Genen zu charakterisieren, um Optimierungsmöglichkeiten zu identifizieren. Für eine Pilotstudie ist die Familie der F-box Proteine geeignet, eine kompakte, in ihrer Gesamtheit wenig charakterisierte Gruppe von Proteinen, die auf Grund ihrer Funktion als Regulatoren von Proteinstabilität eine zentrale Rolle in der Kontrolle zahlreicher zellulärer Funktionen spielen. Nach erfolgter Optimierung ist es dann möglich, einen genomweiten Screen durchzuführen.

Die Zielstellung der Doktorarbeit war daher die Etablierung eines experimentellen Systems zur Durchführung eines synthetischen RNAi-Screens, mit dem neue Therapieziele für das Neuroblastom gefunden werden können, deren Inhibition die Sensitivität von Neuroblastomzellen gegenüber Doxorubicin moduliert, oder das Proliferationsverhalten der Tumorzellen verändert. Im Anschluss sollte das etablierte System zur Durchführung eines Screens der F-box Proteine genutzt werden, um die Eignung des experimentellen Systems bewerten, und Optimierungsmöglichkeiten aufdecken zu können.

# Kapitel 2

## Material und Methoden

### 2.1 Geräte

- Sicherheitswerkbank Holten LaminAir 2448 (Heraeus Instruments)
- Pipetten Pipetman 1, 2, 10, 20, 100, 200 und 1000 $\mu$ l (Gilson)
- Mehrkanalpipetten 5-100 $\mu$ l und 30-300 $\mu$ l (Biohit)
- Handdispenser Multipette Xstream und Multipette Plus (Eppendorf)
- Pipettierhilfe Pipetus (Hirschmann Laborgeräte)
- Zählkammer Neubauer (Marienfeld-Superior)
- Wasserbad UB-12 (Techne)
- Inkubator Heraeus BB15 (Thermo Electron Corporation)
- Lichtmikroskop CK2 (Olympus)
- Lichtmikroskop Axiovert S100 (Zeiss)
- BD FACSCanto II (BD Biosciences)
- Western Blot Gelsystem (Bio-Rad)
- Western Blot Photokassette Hypercassette RPN 1643 24x30cm (Amersham)
- Western Blot Photomaschine Cawomat 2000 IR (Cawo)
- ELISA 96-Well Reader (FLUOstar OPTIMA)
- Mikrozentrifuge IEC (MicroMax)
- Großzentrifuge CS-6R Centrifuge (Beckmann)
- Photometer BioPhotometer (Eppendorf)

## 2.2 Verbrauchsmaterialien

- Zellkulturflaschen 25, 75 und 150cm<sup>2</sup> (TPP)
- Zellkulturschalen 10cm (TPP)
- Zellkulturtestplatten 6-, 12-, 24- und 96-Well (TPP)
- Whatman-Filterpapier GB005 Gel Blotting Paper (Whatman)
- PVDF Western Blotting Membrane (Roche)
- Röntgenfilm CL-Xposure Film Clear Blu X-Ray Film 18x24cm (Thermo Scientific)

## 2.3 shRNA-Expressionsvektoren und Plasmide

- pLentiLox3.7 p53 shRNA-Expressionsvektor (zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Ralph Wäsch, Universitätsklinikum Freiburg [35])
- TP53-1, TP53-2, TP53-3 p53 shRNA-Expressionsvektoren (zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Achim Kramer, Charité Berlin)
- PLK1 shRNA-Expressionsvektoren (Prof. Kramer, Charité Berlin)
- Subbibliothek F-box Proteine Openbiosystems (Prof. Kramer, Charité Berlin)
- Verpackungsplasmid psPAX, kodierend für die viralen Proteine gag und pol (zur Verfügung gestellt von Prof. Didier Trono, École Polytechnique Fédérale de Lausanne)
- Hüllplasmid pMD2.G, kodierend für Glycoprotein G des Vesikulären Stomatitis Virus (Prof. Trono, EPFL Lausanne)

## 2.4 Antibiotika und Chemotherapeutika

- Doxorubicin (Sigma). Lagerung bei  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- all-trans-Retinsäure (Sigma). Lagerung bei  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- Puromycin (Sigma). Lagerung bei  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## 2.5 Antikörper

- p53-Primärantikörper p53 (DO-1): SC-126 (Santa Cruz)
- Sekundärantikörper Goat Anti-Mouse IgG-HRP: SC-2055 (Santa Cruz)



## 2.6 Zelllinien

- SH-EP (zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Christof Dame, Charité Berlin)

Eine Neuroblastomzelllinie vom stromalen Typ mit Expression von Fibronektin und Vimentin, ohne Expression von Neurofilamenten oder GFAP. SH-EP ist eine Tochterzelllinie von SK-N-SH, welche aus einer Knochenmarksmetastase eines 4-jährigen Mädchens mit Neuroblastom im Stadium IV isoliert wurde, und besitzt die gleichen zytogenetischen Eigenschaften: 1pdel negativ, t(1p) negativ, N-Myc-Amplifikation negativ, Chromosom 17 Wildtyp [36, 37]

- SK-N-AS (zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Christof Dame, Charité Berlin)

Eine Neuroblastomzelllinie isoliert aus einer Knochenmarksmetastase eines 8-jährigen Mädchens mit Neuroblastom im Stadium IV. Zytogenetische Eigenschaften: 1pdel positiv, t(1p) negativ, N-Myc-Amplifikation positiv, Chromosom 17 Wildtyp [37]

- HEK293T (zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Achim Kramer, Charité Berlin)

Sehr gut kultivierbare, adhärent wachsende, hypotriploide Epithelzellen. Sie sind Tochterzellen von HEK293 Zellen, welche ursprünglich von menschlichen, embryonalen Nierenzellen eines in den Niederlanden abgetriebenen Foetus abstammen. HEK293 Zellen wurden mit Teilen des menschlichen Adenovirus 5 transformiert und besitzen Eigenschaften transformierter Krebszellen. HEK293T Zellen exprimieren zusätzlich das SV40 large T-Antigen, das es erlaubt, die Zellen für die Reproduktion verschiedener Viren einzusetzen [38].

- U373 (ATCC)

Eine adhärent wachsende Zelllinie, die ursprünglich aus einem menschlichen Glioblastom isoliert wurde. Sie stellt ein Modellsystem für Forschung mit CMV dar. Karyotyp: 46n [39, 40]

- U2OS (ATCC)

Adhärent wachsende Epithelzellen, die einem mittelgradig differenzierten Osteosarkom der Tibia eines 15-jährigen Mädchens entstammen. Zytogenetik: p53 Wildtyp, Rb Wildtyp, p16 negativ (Referenz: ATCC #HTB-96)

- Fi301 (zur Verfügung gestellt vom Institut für Virologie, Charité Berlin)

Primäre menschliche, embryonale Lungenfibroblasten [41]

## 2.7 Lösungen

### 2.7.1 Zellkultur

- RPMI RPMI1640 (Gibco)
- DMEM (Gibco)
- EMEM (Lonza)
- FCS (Lonza)
- Penicillin-Streptomycin (Gibco) mit  $10000 \frac{U}{ml}$  Penicillin und  $10 \frac{mg}{ml}$  Streptomycin
- GlutaMAX 100x (Gibco)
- Gentamycin  $50 \frac{mg}{ml}$  (Lonza)
- Mix nicht essentieller Aminosäuren 100x (Biochrome)
- Natriumpyruvat 100mM (Biochrome)
- L-Alanyl L-Glutamin 200mM (Biochrome)
- Natriumbicarbonat 7,5% (w/v) (Biochrome)
- Trypsin-EDTA 0,05% 1x (Gibco)

### 2.7.2 Analysen

- MTT-Reagenz Produktnummer M2128-1G (Sigma)
- Isopropanol (Roth)
- HCl (EMSURE)
- Igepal (Sigma)
- Propidiumiodid (Sigma)
- RNase-A (Sigma)

### 2.7.3 Transfektion und Transduktion

- Opti-MEM (Gibco)
- Lipofectamin 2000 (Invitrogen)
- Polybrene (Sigma)

### 2.7.4 Western Blot

- Tris HCl (Roth)
- SDS Natriumlaurylsulfat (Roth)
- 10% Glycerol (Merck)
- Acrylamid 30% Rothiphorese Gel 30 (Roth)
- APS Ammoniumpersulfat (Serva)
- H<sub>2</sub>O (Braun)
- TEMED N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (Sigma)
- $\beta$ -Mercaptoethanol (Sigma)
- Bromphenolblau (Sigma)
- D<sub>C</sub> Protein Assay (Bio-Rad)
- Glycin (Roth)
- Borsäure (Roth)
- EDTA Ethylendiamintetraessigsäure (Roth)
- Methanol (Roth)
- Magermilchpulver (Roth)
- ECL-Reagenz Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific)
- Natriumazid (Roth)

## 2.8 Ansätze

### 2.8.1 Zellkulturmedien

- RPMI mit 10% FCS und 1% Penicillin-Streptomycin
- DMEM mit 10% FCS, 1% Penicillin-Streptomycin und 1% GlutaMAX
- EMEM mit 0,1% Gentamycin, 10% FCS, 1% Mix nicht essentieller Aminosäuren, 1% Natriumpyruvat, 1% L-Alanyl L-Glutamin, 2% Natriumbicarbonat

## 2.8.2 Zellvitalitätstest mit MTT

### MTT-Reagenz

Lösung des MTT-Reagenzs in PBS mit Zielkonzentration von  $5 \frac{mg}{ml}$ . Lagerung in 2ml Aliquots (Eppendorf-Reaktionsgefäße) bei  $-20^\circ C$ .

### MTT-Solvent

Isopropanol mit 4mM HCl und 0,1% Igepal. Lagerung bei Raumtemperatur.

## 2.8.3 SchnellFACS-Puffer

Der SchnellFACS-Puffer enthielt RNase-A und wurde daher nur für den unmittelbaren Verbrauch angesetzt. Lagerung bei  $4^\circ C$ .

### Ansatz 3x für 10ml

- 7,15ml PBS
- 0,15ml Igepal
- 1,20ml Propidiumiodid  $1 \frac{mg}{ml}$
- 1,50ml RNase-A  $10 \frac{mg}{ml}$

## 2.8.4 Transfektion

Ansatz B musste jeweils 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert werden, bevor er mit Ansatz A zusammengebracht werden konnte.

### Transfektion im 96-Well

#### Ansatz A

- $0,1\mu g$  Verpackungsplasmid psPAX
- $0,06\mu g$  Hüllplasmid pMD2.G
- $0,14\mu g$  Vektorplasmid
- $26\mu l$  Opti-MEM

#### Ansatz B

- $0,52\mu l$  Lipofectamin 2000
- $26\mu l$  Opti-MEM

### Transfektion in $75cm^2$ Zellkulturflasche

#### Ansatz A

- $12,3\mu g$  Verpackungsplasmid psPAX
- $7,3\mu g$  Hüllplasmid pMD2.G
- $17,6\mu g$  Vektorplasmid
- $3,15ml$  Opti-MEM

#### Ansatz B

- $62,3\mu l$  Lipofectamin 2000
- $3,15ml$  Opti-MEM

### 2.8.5 Western Blot

Die Zusammensetzung der Ansätze richtete sich nach dem Protokoll von Current Protocols in Molecular Biology [42].

#### Laemmli Puffer

- 50mM Tris ph 6,8
- 2% SDS
- 10% Glycerol

#### Trenngel

- 4ml Acrylamid 30%
- 2,5ml SDS + Tris HCL ph 8,8
- 0,1ml APS
- 3,5ml H<sub>2</sub>O
- 8 $\mu$ l TEMED

#### Sammelgel

- 0,75ml Acrylamid 30%
- 1,25ml SDS + Tris HCL ph 6,8
- 0,05ml APS
- 3ml H<sub>2</sub>O
- 8 $\mu$ l TEMED

#### 10x Laufpuffer

- 30g Tris HCl
- 144g Glycin
- 1000ml H<sub>2</sub>O

#### 10x Elektrophoresepuffer

- 216g Tris HCl
- 110g Borsäure
- 75ml 0,5M EDTA
- 5l H<sub>2</sub>O

#### Transferpuffer

- H<sub>2</sub>O 69%

- Methanol 20%
- 10x Elektrophoresepuffer 10%
- 10% SDS 1%

### Antikörper

- p53-Antikörper in PBS mit 5% Magermilchpulver und 0,1% Natriumazid (Konzentration Antikörper 1:200)
- Sekundärantikörper in PBS mit 5% Magermilchpulver und 0,1% Natriumazid (Konzentration Antikörper 1:5000)

## 2.9 Methoden

### 2.9.1 Zellkultur

Zur Stammhaltung wurden die eingesetzten Zelllinien in 150cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen mit 25ml Medium bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Abhängig von der eingesetzten Zelllinie kamen verschiedene Zellkulturmedien zum Einsatz. Je nach Zelllinie wurden die Zellen nach einem unterschiedlichen zeitlichen Muster umgesetzt. Tabelle 2.2 gibt eine Übersicht.

**Tabelle 2.1** – Eingesetzte Zellkulturmedien und Kultivierungsmuster

Zelllinie	Zellkulturmedium	Umsetzung
SH-EP	RPMI	3x pro Woche im Verhältnis 1:3
HEK293T	DMEM	3x pro Woche im Verhältnis 1:5
U373	DMEM	2x pro Woche im Verhältnis 1:4
U2OS	DMEM	2x pro Woche im Verhältnis 1:4
Fi301	EMEM	2x pro Woche im Verhältnis 1:4

Zum Umsetzen der Zellen wurden die Zellen zunächst mit PBS gespült und dann 5 Minuten mit 3ml Trypsin bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in insgesamt 10ml Medium aufgenommen und in neue 150cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen mit vorgelegtem Medium gegeben.

### 2.9.2 Ausplattieren der Zellen mit definierter Zelldichte

Um Zellen in einer definierten Zelldichte ausplattieren zu können, wurden sie zunächst analog zur Stammhaltung (Kapitel 2.9.1) mit Hilfe von PBS und Trypsin in 20ml Medium aufgenommen. Mit einer Neubauerzählkammer wurde anschließend die Anzahl der Zellen im Medium bestimmt, sodass die Zellen dann verdünnt und in einer genau festgelegten Zelldichte ausplattiert werden konnten.

Da es bei einem Screen auf möglichst geringe durch Zellkultur verursachte Variabilität ankommt, sollten Zellen besonders homogen ausplattiert werden. Bei einer 96-Wellplatte kommt es vor allem an den äußeren Spuren oft zu Randeffekten, die dazu führen, dass Zellen an den Rändern der Wells aggregieren, und sich nicht homogen absetzen. Dieser Effekt kann mit einer unterschiedlich schnellen Änderung der Temperatur in den äußeren und inneren Bereichen einer 96-Wellplatte erklärt werden. Lundholt et al. haben 2003 zur Verminderung dieses Problems vorgeschlagen, die frisch mit Zellen beschickten 96-Wellplatten circa eine Stunde lang bei Raumtemperatur stehen zu lassen, bevor sie in den Inkubator gestellt werden [43]. Zellen, die in 96-Wellplatten ausplattiert wurden, wurden vor Beginn der Inkubation bei 37 °C daher erst eine Stunde bei Raumtemperatur belassen.

### 2.9.3 Zellvitalitätstest mit MTT

Zur Bestimmung der Zellviabilität in einem 96-Well wurde ein auf MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) basierender Zellvitalitätstest nach einem Protokoll aus dem Wallert and Provost Labor eingesetzt.<sup>1</sup> Im Zuge der Inkubation mit gelbem, wasserlöslichen MTT kommt es zur Umsetzung in blau-violettes, wasserunlösliches Formazan. Über das Maß der Absorptionsänderung kann die Zellmenge quantifiziert werden [7].

Vor der Durchführung des Zellvitalitätstests wurde der Überstand der Zellen durch 100  $\mu$ l frisches Medium ersetzt, um apoptotische Zelltrümmer zu entfernen. Anschließend wurden 20  $\mu$ l MTT-Reagenz hinzugegeben und die Zellen 3,5h bei 37 °C inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurde der Überstand verworfen und durch 120  $\mu$ l MTT-Solvent ersetzt. Der MTT-Solvent löst die Zellen und homogenisiert das entstandene Formazan im Well. Nach 5 Minuten konnte die Absorption mittels ELISA 96-Well Reader mit einem Anregungsfilter von 584nm vermessen werden. MTT-Solvent absorbiert selber einen Teil des angeregten Lichts, sodass ein Leerwert aus der mittleren Absorption mehrerer 96-Wells mit 120  $\mu$ l MTT-Solvent ohne Zellen von den Messwerten abgezogen werden muss.

### 2.9.4 Bestimmung DNA-Gehalt per Durchflusszytometrie

Mit Hilfe von mit Propidiumiodid gefärbten Zellen kann durchflusszytometrisch ein DNA-Profil einer Zellpopulation erstellt werden. Die Färbung basiert auf der stöchiometrischen Bindung von fluorogenem Propidiumiodid an DNA. Der DNA-Gehalt einer Zellpopulation kann so durchflusszytometrisch ermittelt werden [8]. Während mitotische Zellen einen vermehrten DNA-Gehalt aufweisen, ist der DNA-Gehalt von apoptotischen Zellen aufgrund von DNA-Abbau verringert.

Standardprotokolle zur Färbung von Zellen mit Propidiumiodid sehen vor, die Zellen vorher in Ethanol zu fixieren. Dies war für die Durchführung des Screens nicht praktika-

---

<sup>1</sup>Proliferation Assay - MTT Protocol, Wallert and Provost Lab

bel. Alternativ können die Zellen mit einem SchnellFACS-Puffer inkubiert werden, der die drei notwendigen Schritte für eine DNA-Färbung mit Propidiumiodid kombiniert: Permeabilisierung der Zellen, Verdau von RNA und Färbung der DNA mit Propidiumiodid.

Zur Durchführung der DNA-Färbung im 96-Well wurden die Zellen zunächst abgelöst. Der Überstand der Zellen wurde abgenommen und aufbewahrt. Nach einer Inkubation mit 50 $\mu$ l Trypsin für 10 Minuten bei 37°C wurde der Überstand wieder auf die Zellen gegeben. Anschließend erfolgte die Inkubation mit zusätzlichen 100 $\mu$ l SchnellFACS-Puffer bei Raumtemperatur für 15 Minuten. Die Zellsuspension konnte dann direkt im Durchflusszytometer gemessen werden. Um Veränderungen der Messwerte zu verhindern, mussten die Proben bis zur Messung auf Eis gestellt werden.

### 2.9.5 Datenauswertung des Screens

Die Auswertung der durchflusszytometrischen Rohdaten des Screens erfolgte mit Hilfe der Software BD FACSDiva von Biosciences. Die Analyse der Zellzyklusverteilung der Proben erfolgte automatisiert über die Funktion „batch analysis“ von FACSDiva mit fest gesetzten gates in der Darstellung des DNA-Gehalts mittels PerCP-Cy5.5 nach Ausschluss von Zelldebris in der Darstellung von forward und side scatter. Diese Daten konnten direkt in Microsoft Excel importiert werden.

Zellviabilitätsdaten des MTT-Tests wurden vom ELISA 96-Well Reader bereits für das Hintergrundsignal des MTT-Solvents korrigiert und im Dateiformat von Microsoft Excel bereitgestellt.

Die Auswertung der Datensätze wurde mit Hilfe von Microsoft Excel realisiert. Unter Ausschluss der internen Kontrollen wurden der Median sowie die Standardabweichung aller Proben über die Funktionen MEDIAN und STABW ermittelt. Anschließend wurde der Unterschied zwischen Messwert und Median für jeden Parameter jeder einzelnen Probe mit der Formel  $Abstand [\sigma] = \frac{Messwert - Median}{Standardabweichung}$  berechnet.

### 2.9.6 Virusproduktion mit HEK293T Zellen

Virusüberstand wurde im Screen standardmäßig in 96-Wells produziert. Für Virustitrationen und andere Versuche im größeren Maßstab erfolgte die Virusproduktion in 75cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen. Angaben zu den jeweiligen Zelldichten und Medienvolumina sind unten aufgeführt.

24h vor Transfektion wurden die HEK293T Zellen in einer Dichte ausplattiert, bei der sie zum Zeitpunkt der Transfektion circa 60% Konfluenz erreichten (genaue Angaben siehe unten). Die Transfektion erfolgte durch Zugabe des oben angegebenen Transfektionsansatz, nachdem dieser 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert worden war. Nach 16h Inkubation mit dem Transfektionsansatz wurde der Überstand der HEK293T Zellen durch frisches EMEM ersetzt, da sich in Vorversuchen gezeigt hatte, dass die Virusproduktion in EMEM



zu höheren Virustitern führt als mit DMEM (Daten nicht gezeigt). Nach weiteren 36h konnte der Überstand der HEK293T Zellen für eine Transduktion gewonnen werden.

### 96-Well

- Ausplattierung von  $3 * 10^4$  HEK293T Zellen in 100 $\mu$ l DMEM pro 96-Well
- Medienwechsel mit 200 $\mu$ l EMEM

### 75cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche

- Ausplattierung von 10% einer konfluenten 150cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche HEK293T Zellen in 10ml DMEM pro 75cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche
- Medienwechsel mit 10ml EMEM

## 2.9.7 Transduktion

Für die Transduktion von Reporterzellen im Screen und im Rahmen anderer Versuche wurden die Zellen jeweils 8h vor Transduktion mit Polybrene als Transduktionshilfe in einer Zielkonzentration von  $8 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$  nach Zugabe des Virusüberstandes ausplattiert. Die Zeit von 8h wurde gewählt, um den Zellen genügend Zeit zu geben, sich abzusetzen, ohne dass sich die eingesetzte Zellmenge durch Proliferation wesentlich ändern konnte. Angaben zu den jeweiligen Zelldichten und Medienvolumina sind unten aufgeführt. Die Menge des Virusüberstands bezieht sich auf die Standardbedingungen im Screen. Für Versuche, bei denen die eingesetzte Virusmenge variiert wurde, wie zum Beispiel bei Virustitrationen oder Transduktionen mit definierter Virusmenge, wurde diese entsprechend angepasst.

**Tabelle 2.2** – Übersicht über die Transduktionsbedingungen in Abhängigkeit des gewählten Maßstabs

Maßstab	Zellmenge	Virusüberstand [ml]	Fläche [cm <sup>2</sup> ]
96-Well	$10^4$ in 0,08ml Medium	0,02	0,3
12-Well	$10^5$ in 0,8ml Medium	0,2	3
6-Well	$3 * 10^5$ in 2,4ml Medium	0,6	9

Nach 16h erfolgte ein Medienwechsel mit frischem Medium, dem Puromycin in einer Konzentration von  $8 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$  zugesetzt war.

## 2.9.8 Western Blot

Der Western Blot wurde nach dem Protokoll von Current Protocols in Molecular Biology [42] durchgeführt.

### **Vorbereiten der Proben**

Nach Gewinnung und Waschen des Zellmaterials mit PBS wurden die Proben im dreifachen Volumen Laemmlipuffer resuspendiert. An die 20-minütige Inkubation auf Eis schloss sich die Sonizierung der Proben an, bei der die Pellets vollständig aufgelöst wurden. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 4°C erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration photometrisch mit Hilfe des  $D_C$  Protein Assays nach dem Protokoll von Bio-Rad. Alle Proben wurden unter Zugabe von Laemmlipuffer auf die gleiche Proteinkonzentration eingestellt. Anschließend erfolgte die Zugabe von jeweils  $\frac{1}{5}$  Volumen  $\beta$ -Mercaptoethanol/Bromphenolblau und eine weitere Inkubation bei 95°C für 5 Minuten.

### **Auftrennung der Proben mittels Gelelektrophorese**

Vor Auftrennung der Proben wurde ein Polyacrylamidgel, bestehend aus Trenn- und Sammelgel, entsprechend der in Kapitel 2.8.5 angegebenen Ansätze gegossen. Nach Auftragung von Proben und Größenmarkern im Sammelgel wurden die Proben mittels Gelelektrophorese in 1xLaufpuffer bei 30mA Stromstärke aufgetrennt. Die Auftrennung erfolgte für circa eine Stunde bis alle Proteinbanden des Größenmarkers vollständig voneinander zu unterscheiden waren.

### **Übertragen der Proben auf PVDF-Membran**

Nach Auftrennung der Proteine im elektrischen Feld wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran im Semi-Dry-Verfahren übertragen. Die PVDF-Membran wurde vorher in Methanol eingeweicht. Die Übertragung erfolgte in einem elektrischen Feld der Stärke  $1 \frac{mA}{cm^2}$ , wobei in Transferpuffer eingeweichtes Whatman-Filterpapier als Leiter des elektrischen Feldes zum Einsatz kam.

### **Detektion spezifischer Proteinbanden**

An die Übertragung der Proteine auf die PVDF-Membran schloss sich eine einstündige Inkubation der Membran mit PBS und 10% Magermilchpulver bei 4°C zum Absättigen aller freien Bindungsstellen an. Anschließend erfolgte die Inkubation der Membran mit dem Primärantikörper bei 4°C über Nacht. Nach dreimaligen Waschen in PBS wurde die Membran zwei Stunden mit dem Sekundärantikörper bei 4°C inkubiert. Zum Schluss erfolgte ein erneutes dreimaliges Waschen der Membran mit PBS und anschließend die Detektion spezifischer Proteinbanden mittels Pierce ECL Detektionsreagenz auf Röntgenfilm.

# Kapitel 3

## Ergebnisse

Das Ziel des ersten Teils der Arbeit war die Etablierung eines experimentellen Systems für einen shRNA Screen, mit dem es möglich ist, Gene zu finden, deren Inhibition die Doxorubicinsensitivität von Neuroblastomzellen moduliert, oder ihr Proliferationsverhalten verändert. In einem zweiten Schritt sollte das System mit der Durchführung eines Screens der F-box Proteine getestet werden. Auf diese Weise sollten Aussagen über die Qualität dieses Systems gewonnen und mögliche Optimierungsmöglichkeiten identifiziert werden, um eine spätere Weiterentwicklung des Systems für einen größer angelegten Screen zu ermöglichen.

### 3.1 Etablierung des experimentellen Systems

Bei der Durchführung eines Screens ist die Etablierung des experimentellen Systems der Schritt, der über die Erfolgsaussichten des Screens maßgeblich entscheidet. Je präziser die experimentellen Bedingungen des Screens definiert und je stärker sie auf die Fragestellung hin optimiert sind, desto höher ist das Auflösungsvermögen des Screens. Die Etablierungsarbeiten für einen Screen umfassten in diesem Fall die Auswahl einer technisch geeigneten und bezüglich der Fragestellung repräsentativen Zelllinie, die Auswahl einer shRNA-Bibliothek mit hoher Inhibitionseffektivität in der ausgewählten Zelllinie und die Entwicklung eines Assays, der in der Lage ist, für die untersuchte Fragestellung relevante Faktoren mit hoher Sensitivität zu identifizieren.

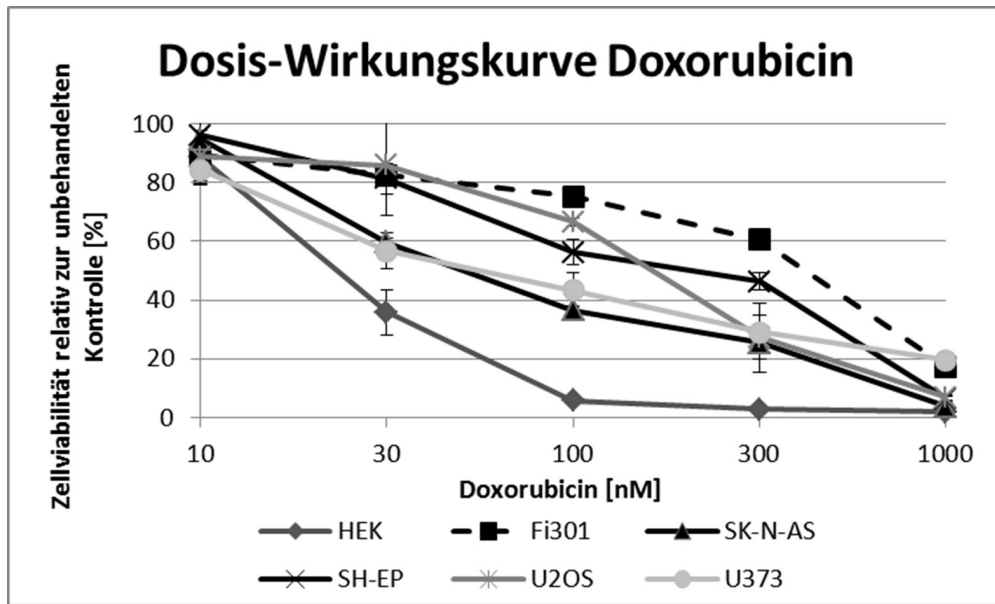
Da ein Screen einen sehr umfangreichen Datensatz zu unterschiedlichen Messzeitpunkten generiert, müssen interne Kontrollen etabliert werden, mit denen die Vergleichbarkeit der Daten kontrolliert werden kann. Außerdem ist es notwendig, die Qualität der Bibliothek abzuschätzen, die sich darüber definiert, welcher Anteil der shRNAs in der Bibliothek Genexpression effektiv inhibiert, und wie groß die Anzahl der shRNAs pro Zielgen ist. Das Wissen um die Qualität der Bibliothek ist entscheidend für die anschließende Interpretation der Ergebnisse des Screens [3].

### 3.1.1 Auswahl der Reporterzelllinie

Am Anfang der Etablierungsarbeiten stand die Auswahl einer für die Fragestellung relevanten und technisch geeigneten Reporterzelllinie. Da es um die Suche nach Genen ging, deren Inhibition die Doxorubicinsensitivität von Neuroblastomzellen erhöht, musste zunächst eine für das Neuroblastom repräsentative Modellzelllinie gefunden werden, die über eine hohe Doxorubicinresistenz verfügt. Je höher die Doxorubicinresistenz der eingesetzten Zelllinie ist, desto besser kann eine potentielle Erhöhung der Doxorubicinsensitivität vermessen werden, und desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass ein Screen in der Lage ist, Gene zu identifizieren, deren Inhibition eine Erhöhung der Doxorubicinsensitivität induziert. Idealerweise sind die experimentellen Bedingungen im Laufe der Datenerhebung eines Screens immer gleich. Ein wichtiger technischer Aspekt einer Reporterzelllinie ist daher robuste Handhabbarkeit, die eine zuverlässige Kultivierung der Zellen mit hoher Voraussagbarkeit über den Zeitraum des Screens erlaubt, und den Einfluss der veränderlichen Eigenschaften der Zelllinie auf die experimentellen Bedingungen minimiert.

Für die Auswahl einer geeigneten Reporterzelllinie mit hoher Doxorubicinsensitivität standen mit SK-N-AS und SH-EP Zellen zwei Neuroblastomzelllinien zur Verfügung, die sich durch eine robuste Handhabbarkeit auszeichnen, und die auch bereits erfolgreich als Reporterzelllinien verschiedener Screens eingesetzt wurden [44, 33]. Um die Zelllinie mit der höheren Doxorubicinresistenz auszuwählen, wurde zunächst die Doxorubicinsensitivität von SK-N-AS und SH-EP Zellen mit Hilfe einer Dosis-Wirkungs-Untersuchung verglichen. Gleichzeitig wurde die Doxorubicinsensitivität vier anderer Zelllinien als Referenz ermittelt, um die Doxorubicinsensitivität der beiden Neuroblastomzelllinien nicht nur untereinander vergleichen, sondern auch um das generelle Niveau ihrer Doxorubicinsensitivität einordnen zu können. Bei den Vergleichszelllinien handelte es sich um HEK293T (menschliche embryonale Nierenzellen), U373 (Glioblastom) und U2OS (Osteosarkom) sowie um nicht transformierte, primäre Lungenfibroblasten (Fi301). Die Vermessung der Doxorubicinsensitivität der sechs Zelllinien ergab, dass SH-EP Zellen im Vergleich zu SK-N-AS Zellen und anderen transformierten Zelllinien eine sehr hohe, mit der von Fi301 Zellen vergleichbaren, Doxorubicinresistenz aufweisen. Sie qualifizierten sich daher als Kandidat für die Reporterzelllinie des Screens.

Das Ergebnis der Untersuchungen zur Doxorubicinresistenz der Zelllinien ist in Abbildung 3.1 dargestellt. Sie zeigt die mittels MTT-Test ermittelte Viabilität behandelter Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen nach drei Tagen Zellwachstum unter Exposition mit steigenden Konzentrationen Doxorubicin. Die zytotoxische Wirkung von Doxorubicin manifestierte sich abhängig von der untersuchten Zelllinie bei einer Konzentration zwischen 10nM und 1000nM. Während eine Konzentration von 10nM Doxorubicin praktisch keinen Einfluss auf die Proliferation der untersuchten Zelllinien hatte, führte eine Konzentration von 1000nM bei allen untersuchten Zelllinien zu ausgeprägten zytotoxischen Effekten. Die Zell-



**Abbildung 3.1** – SH-EP Zellen verfügen über eine hohe Doxorubicinresistenz. Die Doxorubicinsensitivität von SK-N-AS, SH-EP (beides Neuroblastom), HEK293T (Nierenzellkarzinom), U373 (Glioblastom) und U2OS Zellen (Osteosarkom) sowie von primären Lungenfibroblasten (Fi301) wurde mit einer Dosis-Wirkungs-Kurve verglichen. Die Doxorubicinsensitivität ist als Verhältnis aus Zellviabilität unter Doxorubicinexposition und der Zellviabilität einer unbehandelten Kontrolle dargestellt. Die Zellviabilität wurde nach dreitägigem Wachstum unter Doxorubicinexposition zwischen 10nM und 1000nM mittels Zellvitalitätstest (MTT) ermittelt.

viabilität fiel dabei im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle auf unter 20%. Mikroskopisch waren bei dieser Konzentration bei allen Zelllinien deutliche zytopathische Effekte zu sehen (Daten nicht gezeigt).

Die sensitivste bzw. die resistenteste Zelllinie waren HEK293T und Fi301. Die Doxorubicinkonzentration, bei der die Viabilität von HEK293T Zellen gegenüber unbehandelter Kontrollzellen nach drei Tagen auf 50% reduziert war, lag unter 30nM. Demgegenüber war die Viabilität von Fi301 Zellen erst bei Konzentrationen >300nM auf 50% des Kontrollwerts verringert. Die Doxorubicinsensitivität der anderen Zelllinien lag zwischen der von HEK293T und Fi301 Zellen. Für die untersuchten Neuroblastomzelllinien SH-EP und SK-N-AS lagen die Konzentrationen, die zu einer Reduktion der Zellviabilität auf 50% führten, bei etwa 300nM und 30nM. SH-EP Zellen waren somit nicht nur die transformierte Zelllinie mit der höchsten Doxorubicinresistenz in der Untersuchung, sondern auch um ein vielfaches resistentere als SK-N-AS Zellen. Die Konzentration von 300nM Doxorubicin wurde später auch im Screen eingesetzt (siehe zytostatische Konzentration in Abbildung 3.8).

### 3.1.2 Aktivität von shRNA-mir in SH-EP Zellen

Ein weiteres wichtiges Kriterium für die Auswahl der Reporterzelllinie eines shRNA-Screens ist die Inhibitionseffektivität, mit der shRNA-Expressionsvektoren aus der zur Verfügung

stehenden shRNA-Bibliothek Genexpression in der Reporterzelllinie verringern können. Je effektiver Genexpression inhibiert werden kann, desto ausgeprägter fällt eine resultierende Änderung des Phänotyps der Reporterzelllinie aus. Je stärker eine Phänotypänderung ist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass sie messbar wird und das entsprechende Gen als für die Fragestellung relevanter Faktor identifiziert werden kann. Als nächstes schloss sich daher die Frage an, wie effektiv Genexpression in SH-EP Zellen durch die zur Verfügung stehenden shRNA-mir-Expressionsvektoren der pGIPZ-Bibliothek inhibiert werden kann.

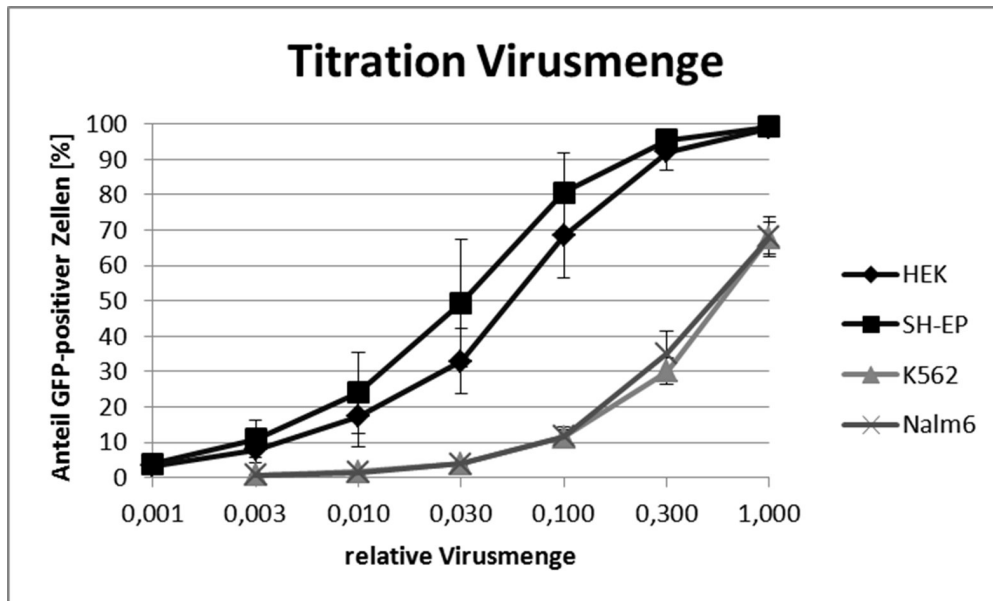
Die Effektivität von RNA-Interferenz mit pGIPZ shRNA-mir-Expressionsvektoren ist in HEK293T Zellen besonders hoch [19]. Daher bot es sich an, die Aktivität von pGIPZ shRNA-mir-Expressionsvektoren in SH-EP und HEK293T Zellen zu vergleichen, um entscheiden zu können, ob SH-EP als Reporterzelllinie für einen Screen mit der pGIPZ-Bibliothek geeignet ist. Der Vergleich von pGIPZ shRNA-mir-Expressionsvektoren in SH-EP und HEK293T Zellen sollte in zwei Stufen durchgeführt werden: Da hohe Transduzierbarkeit von Zellen Voraussetzung für effektive RNA-Interferenz ist, sollten SH-EP und HEK293T Zellen zunächst bezüglich ihrer Transduzierbarkeit mit pGIPZ shRNA-mir-Expressionsvektoren verglichen werden, um zu überprüfen, wie gut SH-EP Zellen transduziert werden können. Um entscheiden zu können, ob die in SH-EP Zellen transduzierten shRNA-mir-Expressionsvektoren auch tatsächlich über eine hohe Aktivität verfügen und Genexpression wirksam inhibiert werden kann, sollte die Inhibitionsaktivität von pGIPZ shRNA-mir-Expressionsvektoren in HEK293T und SH-EP Zellen in einem zweiten Schritt dann direkt verglichen werden.

### Vergleich der Transduzierbarkeit von SH-EP und HEK293T Zellen

Um die Transduzierbarkeit von HEK293T und SH-EP Zellen miteinander vergleichen und gegenüber anderen Zelllinien einordnen zu können, wurde die Transduktionseffizienz von den adhärent wachsenden Zelllinien HEK293T und SH-EP, sowie von den beiden hämatopoietischen Zelllinien K562 (Chronisch myeloische Leukämie) und Nalm6 (Akute lymphoblastische Leukämie) in Abhängigkeit von absteigenden Mengen Virus bestimmt. Da mit pGIPZ-shRNA-Expressionsvektoren transduzierte Zellen GFP koexprimieren, entspricht die Transduktionseffizienz dem Verhältnis aus GFP exprimierenden Zellen und der Gesamtzellzahl.

Abbildung 3.2 zeigt die Virustitration, bei der SH-EP, HEK293T sowie Nalm6 und K562 Zellen mit absteigenden Virusmengen transduziert wurden.<sup>1</sup> Sowohl HEK293T als auch SH-EP Zellen ließen sich mit maximal eingesetzter Virusmenge zu nahezu 100% transduzieren. Mit abnehmender Virusmenge nahm auch die Transduktionseffizienz beider Zelllinien erwartungsgemäß ab. Insgesamt war die Transduktionseffizienz beider Zelllinien vergleichbar. SH-EP Zellen ließen sich dabei sogar geringfügig besser transduzieren als HEK293T Zellen. Bei 10% der maximal eingesetzten Virusmenge lag die Transduktionseffizienz von SH-EP

<sup>1</sup>Die Daten der hämatopoietischen Zellen stammen von Dipl.-Biol. Steffi Prieskorn



**Abbildung 3.2** – Vergleichbarkeit der Transduzierbarkeit von HEK293T und SH-EP Zellen. HEK293T und SH-EP Zellen zeigten im Vergleich zu hämatopoietischen Suspensionskulturzellen K562 und Nalm6 eine vergleichbar hohe Transduzierbarkeit. Im Rahmen einer Verdünnungsreihe wurde der Anteil transduzierter Zellen in Abhängigkeit der eingesetzten Virusmenge bestimmt. Transduzierte Zellen konnten mit Hilfe von Durchflusszytometrie über das durch den transduzierten shRNA-mir-Expressionsvektor koexprimierte GFP von untransduzierten Zellen unterschieden werden.

Zellen beispielsweise bei 80%, während sie bei HEK293T Zellen bei 70% lag. Die hohe Transduktionseffizienz von HEK293T und SH-EP Zellen zeigte sich beim Vergleich mit der maximal erreichbaren Transduktionseffizienz der beiden hämatopoietischen Zelllinien, die nur bei 60% lag. Während die adhärent wachsenden Zellen bei einem Zehntel der maximal eingesetzten Virusmenge noch zu über 70% transduziert waren, lag die Transduktionseffizienz der hämatopoietischen Zellen hier bei lediglich 10%.

Die Transduzierbarkeit von SH-EP Zellen, die noch über der von HEK293T Zellen lag, konnte somit als sehr gut bewertet werden, was die Entscheidung, SH-EP als Reporterzelllinie einzusetzen, weiter unterstützte.

### Aktivität von shRNA-mir gegen PLK1 in SH-EP und HEK293T Zellen

Der nächste Schritt bestand darin zu zeigen, dass pGIPZ shRNA-mir-Expressionsvektoren, die in HEK293T Zellen funktionell aktiv sind, auch in SH-EP Zellen über eine ähnliche Aktivität verfügen. Für den Nachweis der Funktionalität der Expressionsvektoren in SH-EP Zellen gab es zwei Möglichkeiten. Einmal konnte der Nachweis auf Genexpressions- oder Proteinebene über eine ähnlich starke Reduktion der mRNA eines Gens bzw. eines Proteins in beiden Zelllinien geführt werden. Die Alternative eines funktionellen Vergleichs bestand darin, shRNA-mir-Konstrukte der pGIPZ-Bibliothek zu identifizieren, die in HEK293T

Zellen eine messbare Änderung des Phänotyps induzieren, und zu überprüfen, ob auch mit SH-EP Zellen eine vergleichbare Änderung des Phänotyps messbar ist. Da in dem Screen funktionell relevante Gene identifiziert werden sollten, bestand der Vorteil dieses Ansatzes darin, nicht nur die Verringerung einer Genexpression quantitativ zu vergleichen, sondern sogar eine Aussage darüber treffen zu können, wie stark sich die Änderungen des Phänotyps in SH-EP Zellen im Vergleich zu HEK293T Zellen auswirken.

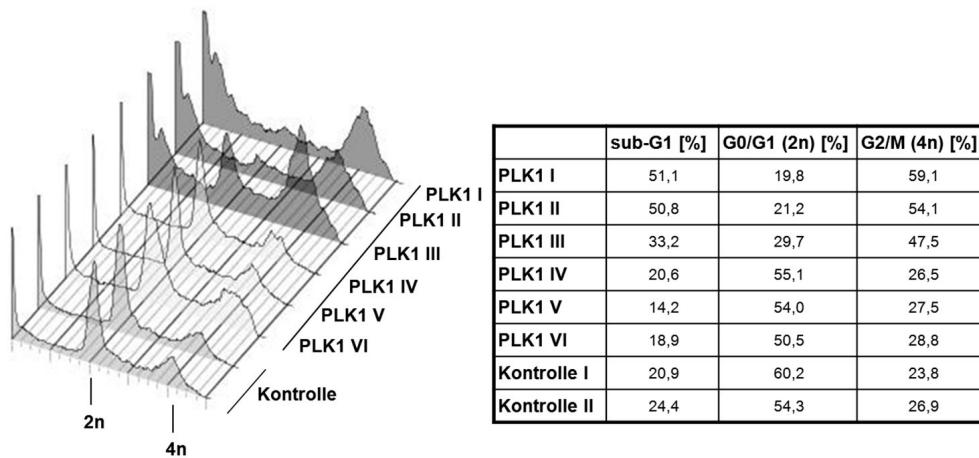
Für den Vergleich der Phänotypänderungen zwischen HEK293T und SH-EP Zellen wurde nach einem Faktor gesucht, dessen Inhibition zu deutlichen, leicht messbaren Effekten führt. PLK1 ist ein Protein, dessen Inhibition mit Ablaufstörungen der Mitose eine ausgeprägte Phänotypänderung induziert. PLK1 phosphoryliert und aktiviert eine Vielzahl von Faktoren wie zum Beispiel CDC25, die unter anderem in den Aufbau des Spindelapparats, die Trennung von Chromosomen und Cytokinese involviert sind [5]. Depletion von PLK1 manifestiert sich in einem M-Phase-Arrest und erhöhter Apoptoseneigung, die mit Durchflusszytometrie als Zunahme der apoptotischen sub-G1 Fraktion sowie von Zellen mit verdoppeltem, diploiden DNA-Gehalt ( $4n$ ) im Zellzyklusprofil leicht darstellbar sind [45].

Um die Aktivität von shRNA-Expressionsvektoren gegen PLK1 in HEK293T und SH-EP Zellen vergleichen zu können, mussten zunächst shRNA-mirs aus der pGIPZ-Bibliothek gefunden werden, die PLK1 mit hoher Effektivität inhibieren können. Es standen hierfür sechs verschiedene Bibliothekskonstrukte gegen PLK1 zur Verfügung, von denen die funktionell aktiven Expressionsvektoren durch Vergleich ihrer Aktivität in HEK293T Zellen identifiziert werden sollten. Der Vergleich der Aktivität der verschiedenen shRNA-mir-Expressionsvektoren gegen PLK1 ergab gleichzeitig einen Hinweis darüber, wie hoch der Anteil funktionell aktiver shRNA-mir-Expressionsvektoren in der Bibliothek ist.

Mit Hilfe von HEK293T Zellen konnten aus den 6 zur Verfügung stehenden shRNA-mir-Expressionsvektoren zwei Vertreter mit hoher funktioneller Aktivität identifiziert werden. Die HEK293T Zellen wurden hierzu mit den 6 shRNA-mirs gegen PLK1 sowie zwei Negativkontrollen transduziert und ihr DNA-Gehalt nach 3 Tagen Wachstum durchflusszytometrisch bestimmt. In Abbildung 3.3 ist der DNA-Gehalt der Zellen in Form von Zellzyklusprofilen mit einer Aufschlüsselung der G1-, G2- und sub-G1 Fraktionen (Apoptose) dargestellt. Zellen, die sich in der G1- und G2-Phase bzw. in Apoptose befinden, stellen sich im Zellzyklusprofil mit einem einfachen oder verdoppelten, diploiden DNA-Gehalt von  $2n$  und  $4n$  bzw. einem reduzierten DNA-Gehalt kleiner als  $2n$  dar. Bei 2 der 6 untersuchten shRNA-mir-Expressionsvektoren gegen PLK1, neben einem dritten mit geringer Änderung des Phänotyps, war der Anteil an Zellen in der G2-Phase und in der sub-G1 Fraktion gegenüber der Negativkontrolle jeweils um den Faktor 2 erhöht. Diese deutliche Änderung des Zellzyklusprofils durch die beiden shRNA-mirs spricht dafür, dass sie PLK1 effektiv inhibieren konnten, und auf diese Weise den charakteristischen M-Phase-Arrest durch PLK1-Inhibition induzierten. Diese beiden aktiven shRNA-mir-Expressionsvektoren gegen PLK1 qualifizierten sich daher für den Vergleich der Inhibitionsaktivität in HEK293T und SH-EP Zellen.



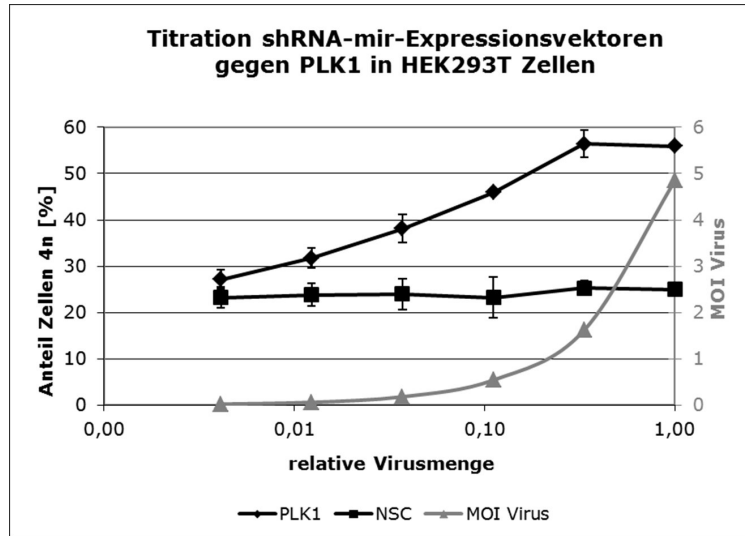
### Vergleich verschiedener pGIPZ shRNA-mir-Expressionsvektoren gegen PLK-1 in HEK293T Zellen



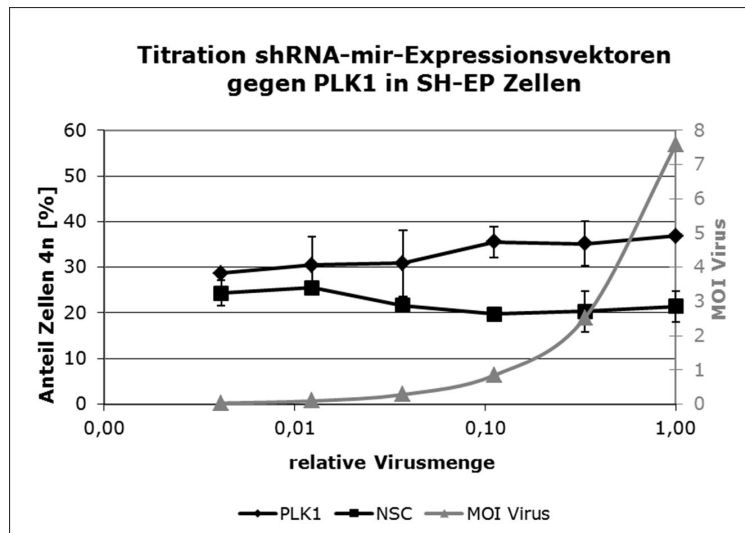
**Abbildung 3.3** – Vergleich der Aktivität verschiedener shRNA-mir-Expressionsvektoren gegen PLK1 in HEK293T Zellen. Die Identifizierung von shRNA-mir-Expressionsvektoren mit hoher Aktivität in HEK293T Zellen erfolgte durch Vergleich der Stärke des durch PLK1-Inhibition induzierten M-Phase-Arrests und daraus folgender erhöhter Apoptoseneigung, die sich als Zunahme der Zellen in der G2/M-Fraktion (4n) und in der sub-G1 Fraktion darstellen. Die DNA-Verteilung aller Proben wurde drei Tage nach Transduktion durchflusszytometrisch bestimmt. Die Verteilung der G0/G1- und G2/M-Fraktion ist auf alle nicht-apoptotischen Zellen, die sub-G1 Fraktion auf alle gemessenen Zellen bezogen.

Die beiden funktionell hoch aktiven shRNA-mir-Expressionsvektoren gegen PLK1 konnten anschließend für den Vergleich ihrer Aktivität in SH-EP und HEK293T Zellen eingesetzt werden. Da es für einen Screens entscheidend ist, dass Phänotypänderungen der Reporterzelllinie sicher vermessen werden können, sollte geklärt werden, ob die shRNA-mir-Expressionsvektoren auch in SH-EP Zellen einen gut messbaren M-Phase-Arrest induzieren. Inhibition von PLK1 ist abhängig vom untersuchten Zelltyp unterschiedlich stark limitierend, sodass die Reaktion verschiedener Zelllinien selbst auf nahezu komplette Inhibition von PLK1 unterschiedlich ausfällt [45]. Der Effekt der shRNA-mir-Expressionsvektoren gegen PLK1 sollte aus diesem Grund in HEK293T und SH-EP Zellen in Abhängigkeit der eingesetzten Virusmenge verglichen werden. Diese kann mit Hilfe der MOI (multiplicity of infection), dem Verhältnis aus infektiösen Partikeln und Zellen beschrieben werden. Wenn der durch PLK1-Inhibition hervorgerufene M-Phase-Arrest in beiden Zelllinien ab einer ähnlich hohen MOI maximal ist, so kann davon ausgegangen werden, dass die zugrundeliegende Aktivität der eingesetzten shRNA-mir-Expressionsvektoren vergleichbar ist.

Mit Hilfe einer Titration, in der die beiden shRNA-mir-Expressionsvektoren gegen PLK1 in HEK293T und SH-EP Zellen mit absteigenden Mengen eingesetzt wurden, konnte gezeigt werden, dass die Änderung des Phänotyps tatsächlich in beiden Zelllinien ab einer  $MOI \approx$



(a) Virustitration von shRNA-mir-Expressionsvektoren gegen PLK1 in HEK293T Zellen



(b) Virustitration von shRNA-mir-Expressionsvektoren gegen PLK1 in SH-EP Zellen

**Abbildung 3.4** – shRNA-mir-Expressionsvektoren gegen PLK1 zeigen in SH-EP und HEK293T Zellen eine vergleichbare Inhibitionsaktivität. Transduktion mit shRNA-mir-Expressionsvektoren gegen PLK1 führt zur Zunahme von Zellen mit 4n DNA-Gehalt, dem durchflusszytometrischen Korrelat des durch PLK1-Inhibition induzierten M-Phase-Arrests. Die maximale Zunahme wurde in beiden Zelllinien bei einer  $MOI \approx 1$  erreicht. Die Zellzyklusverteilung in Abhängigkeit der eingesetzten Virusmenge des shRNA-mir-Expressionsvektors gegen PLK1 wurde per Verdünnungsreihe drei Tage nach Transduktion durchflusszytometrisch vermessen. Die eingesetzte MOI (multiplicity of infection) ergab sich aus dem Anteil an transduzierten Zellen, die über ihre GFP-Expression identifiziert wurden.

1 maximal ist. Die Inhibitionsaktivität von shRNA-mir-Expressionsvektoren gegen PLK1 war in SH-EP Zellen daher vergleichbar mit der als hoch bekannten Inhibitionsaktivität von shRNA-mir-Expressionsvektoren in HEK293T Zellen. Die Eignung von SH-EP als Reporterzelllinie konnte somit bestätigt werden.

Abbildung 3.4 zeigt die Virustitrationen mit den beiden shRNA-mir-Expressionsvektoren gegen PLK1 sowie zwei Negativkontrollen jeweils als Mittelwerte in HEK293T und SH-EP Zellen. Die Anzahl der Zellen mit 4n DNA-Gehalt sowie die erreichte MOI ist in Abhängigkeit der eingesetzten Virusmenge dargestellt. Die MOI ergab sich aus der Berechnung der für eine Transduktionseffizienz von 60% benötigten Virusmenge, die einer MOI=1 entspricht.<sup>2</sup> Die Transduktionseffizienz ergab sich wiederum aus dem Verhältnis aus GFP-positiven Zellen und der Gesamtzellzahl analog zu Kapitel 3.1.2.

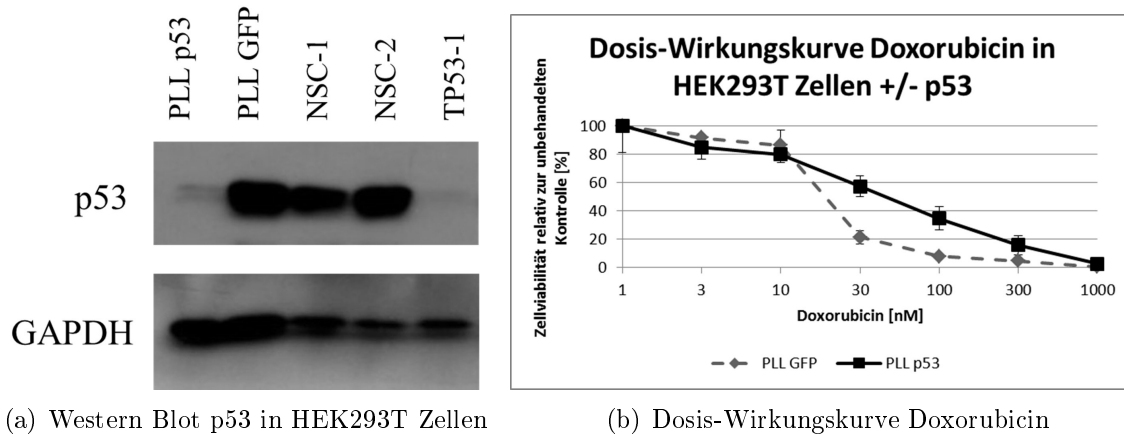
Bei beiden Zelllinien war eine Zunahme der Menge an Zellen mit 4n DNA-Gehalt bei steigender MOI feststellbar, die jeweils bei einer MOI  $\approx 1$  ihr Maximum erreichte und auf eine vergleichbare Aktivität der shRNAs in SH-EP Zellen hindeutet. Erwartungsgemäß unterschied sich die absolute, maximale Zunahme an Zellen mit 4n DNA-Gehalt bei beiden Zelllinien deutlich. Während die Zunahme in HEK293T Zellen bei 30% lag, war die Anzahl an Zellen mit 4n DNA-Gehalt in SH-EP Zellen nur um circa 10% gesteigert. Der Effekt der shRNAs gegen PLK1 war in den SH-EP Zellen dennoch klar zu vermessen.

### Aktivität von shRNA gegen p53 in SH-EP und HEK293T Zellen

Obwohl die Aktivität der shRNA-mir-Expressionsvektoren gegen PLK1 in SH-EP und HEK293T Zellen vergleichbar war, war es aufgrund der unterschiedlichen Bedeutung von PLK1 in beiden Zelllinien wünschenswert, die Aktivität der Bibliotheks-shRNA-mir in SH-EP Zellen mit einem weiteren Beispiel funktionell zu untersuchen. Einer der Hauptspieler in der Modulation von Doxorubicinresistenz ist p53. Die Inhibition von p53 führt zu einer Erhöhung der Doxorubicinresistenz, die mit Hilfe eines Zellviabilitätstests (MTT) gut gemessen werden kann [6]. Abbildung 3.5(b) zeigt eine mit MTT aufgenommene Dosis-Wirkungskurve, in der die Doxorubicinresistenz von HEK293T Zellen durch Inhibition von p53 deutlich steigt ist. pGIPZ shRNA-mir-Expressionsvektoren gegen p53 sollte daher zum Einsatz kommen, um die Aktivität von Bibliotheksstrukturen in SH-EP Zellen zu untersuchen.

Analog zur Suche nach shRNA-mir gegen PLK1 musste zunächst eine shRNA-mir gegen p53 aus der pGIPZ-Bibliothek identifiziert werden, die über eine hohe Aktivität in HEK293T Zellen verfügt. Es standen drei pGIPZ shRNA-mir-Expressionsvektoren gegen p53 zur Auswahl. Untersuchungen in HEK293T Zellen ergaben, dass mit TP53-1 nur eine dieser shRNA-mirs gegen p53 funktionell aktiv ist. Um eine Aussage über die Stärke dieser ausgewählten pGIPZ shRNA-mir gegen p53 treffen zu können, stand zum Vergleich eine weitere, publizierte pLentiLox3.7 shRNA zur Verfügung, die p53 sehr effektiv inhibiert, und die die Doxorubicinresistenz von HEK293T Zellen deutlich steigert (Abbildung 3.5(b)) [41, 35]. Im Gegensatz zu dem RNA-Polymerase II transkribierten pGIPZ-Vektor mit CMV-Promoter, auf dem shRNA-mir basiert, handelt es sich bei pLentiLox3.7 um einen RNA-Polymerase III transkribierten shRNA-Vektor mit U6-Promoter. Mit Hilfe eines Western Blots konn-

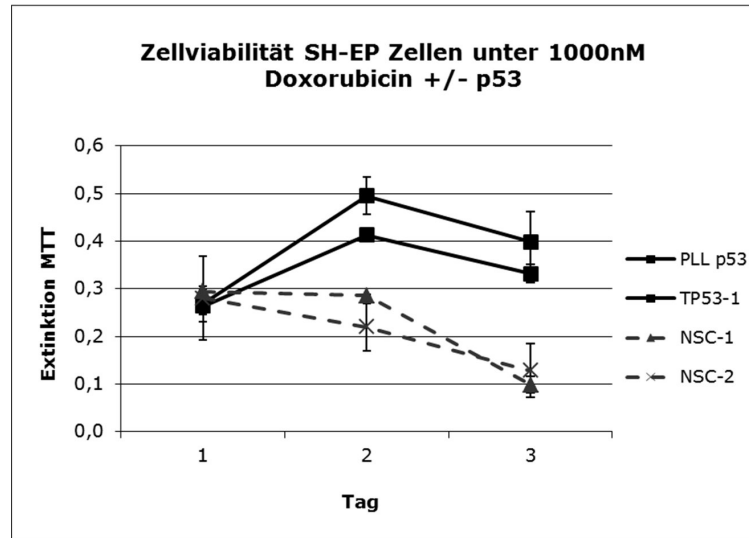
<sup>2</sup>Stephenson, Frank H.: Calculations for Molecular Biology and Biotechnology, 2nd edition, Elsevier, 2010, S. 83ff



**Abbildung 3.5** – Aktivität von shRNA-Expressionsvektoren gegen p53 in HEK293T Zellen. (a) Zwei shRNA-Expressionsvektoren gegen p53, PLL p53 (RNA-Polymerase III transkribierte shRNA basiert auf pLentiLox3.7-Vektor mit U6-Promoter) und TP53-1 (RNA-Polymerase II transkribierte shRNA-mir basiert auf pGIPZ-Vektor mit CMV-Promoter) verfügen über eine ähnliche Inhibitionseffektivität gegenüber p53 im Western Blot. Einsatz von PLL GFP (pLentiLox3.7 shRNA gegen GFP) sowie NSC-1 und NSC-2 (pGIPZ scrambled shRNA-mir) als Negativkontrolle. GAPDH diente als Ladekontrolle. (b) PLL p53 erhöht die Doxorubicinresistenz von HEK293T Zellen in der Dosis-Wirkungskurve durch Inhibition von p53.

te gezeigt werden, dass sowohl PLL p53 als auch TP53-1 sehr gut in der Lage sind, p53 in HEK293T Zellen herunterzuregulieren, sodass die shRNA-mir TP53-1 für weitere Versuche eingesetzt werden konnte. Abbildung 3.5(a) zeigt den Western Blot, in dem die Stärke der p53-Inhibition durch die pLentiLox3.7 shRNA (PLL p53) und die pGIPZ shRNA-mir (TP53-1) in HEK293T Zellen miteinander verglichen wurde. Als Negativkontrollen dienten eine pLentiLox3.7 shRNA gegen GFP (PLL GFP) und unspezifische pGIPZ shRNA-mirs (NSC-1 und NSC-2).

Die beiden in HEK293T Zellen aktiven shRNA-Expressionsvektoren gegen p53 wurden in SH-EP Zellen eingesetzt, um zu überprüfen, ob sie in der Lage sein würden, p53 genauso effektiv zu inhibieren und ebenfalls eine messbare Erhöhung der Doxorubicinresistenz zu induzieren. Mit Hilfe einer Wachstumskurve, in der die Zellviabilität von SH-EP Zellen über drei Tage unter einer zytotoxischen Doxorubicinkonzentration (1000nM) vermessen wurde, konnte gezeigt werden, dass die Inhibition von p53 mit den beiden shRNA-Expressionsvektoren in SH-EP Zellen erwartungsgemäß zu einer ausgeprägten Erhöhung der Doxorubicinresistenz führt. Es konnte somit nachgewiesen werden, dass die shRNA PLL p53 und die shRNA-mir TP53-1 in SH-EP Zellen eine vergleichbare Aktivität zeigen. Abbildung 3.6 zeigt die Zellviabilität von SH-EP Zellen im Verlauf der drei Tage, die mit Hilfe eines Zellvitalitätstests (MTT) vermessen wurde. Die SH-EP Zellen waren mit einem der beiden shRNA-Expressionsvektoren gegen p53 oder mit einer Negativkontrolle transduziert. Während die Zellviabilität in allen Proben nach 24h noch nahezu gleich war, lag sie bei den Zellen, in denen p53 inhibiert war, an Tag 2 und 3 deutlich höher als in den Negativkon-



**Abbildung 3.6** – Steigerung der Doxorubicinresistenz von SH-EP Zellen durch Inhibition von p53. Die Zunahme der Doxorubicinresistenz durch Inhibition von p53 zeigte sich durch höhere Zellviabilität bei den Proben mit inhibiertem p53 (PLL p53 und TP53-1) im Vergleich zu den Proben mit Wildtyp p53 (NSC-1 und NSC-2). Die Zellviabilität wurde über drei Tage unter Doxorubicinexposition mittels Zellvitalitätstest (MTT) verfolgt.

trollen.

Aus den Vergleichen zur Aktivität von pGIPZ shRNA-mir-Expressionsvektoren gegen PLK1 in HEK293T und SH-EP Zellen und dem Nachweis der Erhöhung der Doxorubicinresistenz durch die beiden shRNAs gegen p53 in SH-EP Zellen konnte somit geschlussfolgert werden, dass die Effektivität von RNA-Interferenz mit pGIPZ shRNA-mir-Expressionsvektoren in SH-EP Zellen mit der hohen Effektivität von RNA-Interferenz in HEK293T Zellen vergleichbar ist. SH-EP Zellen erfüllen somit die Bedingungen, die an die Reporterzelllinie für den Screen gestellt worden waren: Es handelt sich um eine technisch gut handhabbare Zelllinie mit hoher Doxorubicinresistenz, in der die shRNA-mir der pGIPZ-Bibliothek eine hohe Aktivität zeigt. SH-EP wurde daher als Reporterzelllinie für den Screen ausgewählt.

### Anteil funktionell aktiver pGIPZ shRNA-mir-Expressionsvektoren

Die Suche nach funktionell aktiven pGIPZ shRNA-mir-Expressionsvektoren gegen PLK1 und p53 gab Hinweise darauf, dass nur ein Teil der Bibliotheks-shRNA-mirs funktionell aktiv ist. Es waren nur 2 von 6 shRNA-mirs gegen PLK1 und 1 von 3 shRNA-mirs gegen p53 funktionell hoch aktiv. Dies entspricht dem Ergebnis von Untersuchungen zur Inhibitionseffektivität von shRNA-mir, auf dem die in der Arbeit verwendete shRNA-Bibliothek basiert. 13 von 36 untersuchte shRNA-mirs zeigten bei Silva et al. 2005 eine Reduktion der Zielgenexpression um  $\geq 80\%$  [19]. Bei Versuchen zur Inhibitionsaktivität einer anderen shRNA-Bibliothek waren bei Bassik et al. 2009 nur 6 von 33 shRNAs funktionell aktiv [46]. Hauptgrund für den niedrigen Anteil funktionell aktiver shRNA-Expressionsvektoren

in automatisiert generierten shRNA-Bibliotheken ist die schwierige Vorhersagbarkeit des Abschnitts der shRNA-Sequenz, der für die Erkennung der Ziel-mRNA zuständig ist, und so ihre Inhibitionsaktivität bestimmt [46].

### 3.1.3 Assay des Screens

Neben der Auswahl der geeigneten Reporterzelllinie ist die Entwicklung eines Assays mit hohem Auflösungsvermögen und Signal-Rausch-Abstand entscheidend für den Erfolg des Screens. Im Screen sollten Faktoren identifiziert werden, deren Inhibition entweder zu einer Steigerung oder, wie bei Inhibition von p53, zu einer Abnahme der Doxorubicinsensitivität führt. Daneben sollte der Assay auch imstande sein, Änderungen des Proliferationsverhaltens, die wie die Inhibition von PLK1 einen Ansatz in der Krebstherapie darstellen können, und fehlerhafte Transduktionen der Reporterzellen identifizieren zu können.

#### Wahl des Read-outs

Auflösungsvermögen und Signal-Rausch-Abstand des Assays werden von der Sensitivität des ausgewählten Read-outs bestimmt. Technischer Aufwand und Kosten eines Read-outs steigen oftmals mit zunehmender Sensitivität, sodass bei der Wahl des Read-outs ein Kompromiss zwischen Praktikabilität und angemessener Sensitivität gefunden werden musste.

Es kam zunächst ein Zellvitalitätstests wie MTT als kostengünstiger und einfach zu handhabender Read-out infrage. MTT basiert auf einem automatisiert auslesbaren Farbumschlag, der durch den Umsatz eines Reportersubstrats durch NAD(P)H-abhängige, zelluläre Oxidoreduktasen hervorgerufen wird, und liefert ein zur Menge vitaler Zellen in der getesteten Probe proportionales Signal [7]. MTT eignet sich für das Aufnehmen von Wachstumskurven und zur Vermessung deutlicher Veränderungen der Zellproliferation, wie zum Beispiel die Wachstumshemmung durch Inhibition von PLK1. Es war jedoch davon auszugehen, dass die Sensitivität von MTT für einen Großteil der zu erwartenden Effekte nicht ausreichen würde. Es sind F-box Proteine bekannt, deren Inhibition die Apoptoseeigung von Zellen steigert. Diese Änderungen sind allerdings oft zu klein, um sie mit einem Zellvitalitätstest sicher auflösen zu können. Peschiaroli et al. 2009 beschrieben beispielsweise eine Steigerung der Apoptoserate unter Doxorubicinexposition von BT-20 Mammakarzinomzellen, in denen Fbxo45 durch siRNA inhibiert wurde, von 15% auf 25% [11].

Tabelle 3.1 illustriert die Schwierigkeit, subtilen Änderungen mit Hilfe eines auf MTT basierenden Assays aufzulösen, anhand eines Rechenbeispiels. Ein klar negatives Signal wie der wachstumsverlangsamende Effekt unter PLK1-Inhibition im Vergleich mit einer unbehandelten Kontrollprobe ist mit Hilfe von MTT klar auflösbar ( $\frac{1,60}{0,35} = 4,6$ ). Demgegenüber ist ein geringes, negatives Signal, wie der Unterschied der Zellviabilität einer Probe, in der Fbxo45 inhibiert ist und einer Kontrollprobe, jeweils unter Doxorubicinexposition, leicht von nicht zu vermeidenden Störfaktoren überlagert und nicht mehr auflösbar ( $\frac{0,2}{0,15} = 1,33$ ). Unter-

**Tabelle 3.1** – Rechenbeispiel zum Auflösungsvermögen eines Assays basierend auf einem Zellviabilitätstest (MTT). Dramatische negative Signale wie die Inhibition von PLK1 können mit dem MTT-Test aufgelöst werden. Subtilere negative Signale werden leicht durch Störfaktoren wie unterschiedliche DNA-Mengen, die zu unterschiedlichen Virustitern und Ausgangszellmengen führen, überlagert. Positive Signale wie bei der Inhibition von p53, die zu einer höheren Zellviabilität gegenüber der Negativkontrolle führt, können ebenfalls gut aufgelöst werden.

Messwerte MTT-Test

Probe	Wachstumsfaktor	Tag 0	Tag 1	Tag 2	Tag 3
kein Doxorubicin	2,0x	0,20	0,40	0,80	<b>1,60</b>
kein Doxorubicin + Inhibition PLK1	1,2x	0,20	0,24	0,29	<b>0,35</b>
Doxorubicin zytostatisch	1,0x	0,20	0,20	0,20	<b>0,20</b>
Doxorubicin zytostatisch + Inhibition Fbxo45	0,9x	0,20	0,18	0,16	<b>0,15</b>
Doxorubicin zytotoxisch	0,5x	0,20	0,10	0,05	<b>0,02</b>
Doxorubicin zytotoxisch + Inhibition p53	1,2x	0,20	0,24	0,29	<b>0,35</b>

schiede in den DNA-Mengen der shRNA-Bibliothek führen beispielsweise zu unterschiedlich hohen Virustitern, sodass die Ausgangszellmengen nach Selektion erfolgreich transduzierter Zellen mit Puromycin nicht gleich sind. Positive Signale, wie die Zunahme der Zellviabilität unter Doxorubicinexposition einer Probe, in der im Gegensatz zur Kontrolle p53 inhibiert ist, lassen sich mit Hilfe eines Zellvitalitätstests wiederum sehr gut auflösen ( $\frac{0,35}{0,02} = 17,5$ ).

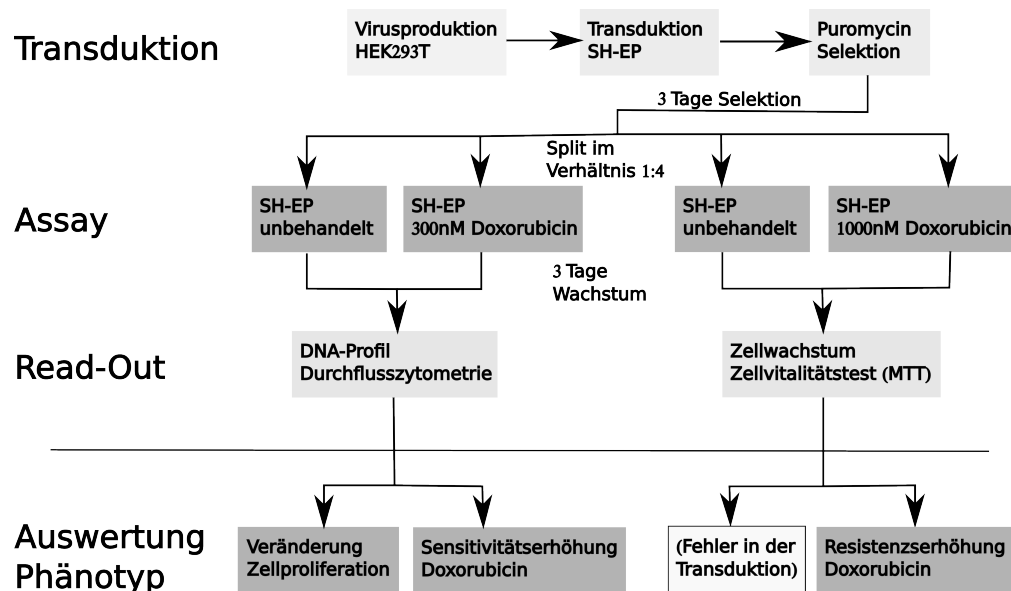
MTT sollte daher für die Suche nach Faktoren, deren Inhibition die Doxorubicinresistenz steigert, als Read-out eingesetzt werden. Hierfür war vorgesehen, die Zellen mit einer gerade zytotoxischen Doxorubicinkonzentration zu exponieren, unter der sie zu nahezu 100% in Apoptose gehen und ein minimales MTT-Signal liefern, sodass sich eine Resistenzzunahme der Zellen in einem erhöhten Signal mit gutem Signal-Rausch-Abstand manifestiert. Auch für die Identifizierung von Fehlern bei der Transduktion sollte MTT eingesetzt werden, da sie zu einer reduzierten Anzahl an Puromycin resistenten Zellen in der Probe führt, die im Screen durch ein stark reduziertes MTT-Signal auffällt.

Für die Suche von Proben mit erhöhter Apoptoserate unter Doxorubicinexposition sind durchflusszytometrisch erstellte DNA-Profile deutlich besser geeignet als MTT. Aus diesem Grund sollte Durchflusszytometrie als zusätzlicher Read-out eingesetzt werden. Auf diese Weise kann die Apoptoserate der Proben direkt bestimmt werden, sodass ein gut messbares, positives Signal vorliegt. Zusätzlich liefern DNA-Profile weitere Informationen zur Probe, wie zum Beispiel das Proliferationsverhalten, das über die Verteilung von Zellen in G1-, S- und G2-Fraktion charakterisiert ist. Unter den F-box Proteinen sind Faktoren wie Fbxo5/Emi1 bekannt, die den Ablauf des Zellzyklus modulieren. Inhibition von Fbxo5/Emi1 führt zu Endoreplikation, die sich in einem polyploiden DNA-Gehalt niederschlägt, die im DNA-Profil

klar zu erkennen ist [10].

Dem guten Auflösungsvermögen von DNA-Profilen steht ein hoher Zeitaufwand und eine schlechte Automatisierbarkeit gegenüber. Dieser Punkt wurde bewusst als Optimierungsschritt für die Zukunft in Kauf genommen. Das Ziel der Arbeit war die Etablierung eines Systems, mit dem ein späterer, weitaus größer angelegter Screen durchgeführt werden kann. Mit der Durchführung eines Testscreens der überschaubaren Familie der F-box Proteine, der über einen Read-out mit maximal erreichbarer Sensitivität verfügt, konnte die Eignung der anderen beteiligten Komponenten des Systems, wie der eingesetzten Zelllinie, dem Assay und der shRNA-Bibliothek bewertet werden, ohne durch einen Read-out mit zu geringer Auflösungskraft limitiert zu sein.

### Ablaufschema des Screens



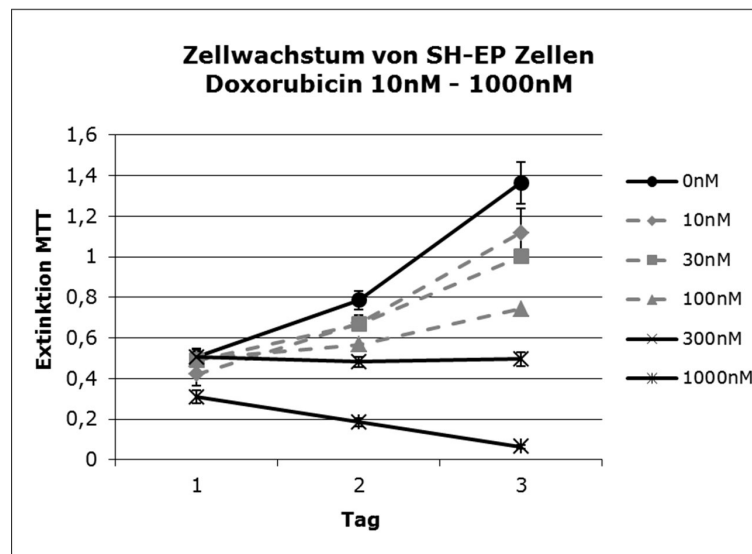
**Abbildung 3.7** – Schema zum Ablauf des Screens. Nach Produktion des Virusüberstands in HEK293T Zellen wurde die Reporterzelllinie SH-EP transduziert und drei Tage mit Puromycin kultiviert. Anschließend wurden die Reporterzellen im Verhältnis von 1:4 umgesetzt. Zwei Teile blieben unbehandelt, zwei Teile wurden mit einer zytostatischen (300nM) bzw. zytotoxischen (1000nM) Doxorubicinkonzentration behandelt. Nach drei Tagen Wachstum wurde eine unbehandelte und die Probe mit der zytostatischen Doxorubicinkonzentration mit Durchflusszytometrie sowie eine unbehandelte und die Probe mit der zytotoxischen Doxorubicinkonzentration mittels Zellvitalitätstest (MTT) analysiert. Anschließend erfolgte die Auswertung der Daten.

Das Ablaufschema in Abbildung 3.7 gibt eine Übersicht zum Ablauf des Assays und fasst zusammen, welcher Read-out für welche Fragestellung zum Einsatz kommen sollte. Zu Beginn des Assays sollten sich die Reporterzellen in einer Wachstumsphase befinden, um Bedingungen zu gewährleisten, unter denen Änderungen des Zellwachstums und der Doxorubicinsensitivität optimal registriert werden können. Zwischen Transduktion der Reporterzellen und Beginn des Assays mussten drei Tage liegen, um sicherzustellen, dass die mRNA der jeweili-



gen Zielgene und die entsprechenden Proteine herunterreguliert sein würden. Zu Beginn des Assays wurden die bis dahin konfluenten Reporterzellen daher im Verhältnis 1:4 gesplittet. Jede der vier resultierenden Zellpopulationen wurde für einen Teil des Screens eingesetzt.

Für den Assay stellte sich die Frage, in welcher Art die Reporterzellen mit Doxorubicin exponiert werden sollten, um eine Erhöhung der Doxorubicinsensitivität möglichst gut messbar zu machen. In vielen Untersuchungen zu Doxorubicinsensitivität werden Zellen einem kurzen, zytotoxischen Impuls Doxorubicin ausgesetzt. Dies hat den Nachteil, dass eine moderate Steigerung der Doxorubicinsensitivität, wie sie zum Beispiel bei der Inhibition von Fbxo45 auftritt, durch einen schnellen, massiven Anstieg der Apoptoserate quantitativ überlagert wird und nicht mehr auflösbar ist. Es wurde daher entschieden, die Reporterzellen über eine längere Zeit mit einer sublethalen Doxorubicinkonzentration zu behandeln. Dieser Modus hat den Vorteil, dass moderate Effekte stärker hervortreten und besser detektierbar werden. Er modelliert auch die klinische Anwendung von Doxorubicin besser, das über den mehrmonatigen Zeitraum einer Therapie mehrfach verabreicht wird.<sup>3</sup> Es sollte dafür eine zytostatische Doxorubicinkonzentration zum Einsatz kommen. Eine Steigerung der normalen Doxorubicinsensitivität führt dabei zu einer deutlichen Erhöhung der Apoptoseneigung der Zellen, die mit Durchflusszytometrie gut darstellbar ist.



**Abbildung 3.8** – Wachstumskurve SH-EP Zellen unter Doxorubicinexposition. Die zytostatische und zytotoxische Doxorubicinkonzentration von 300nM und 1000nM von SH-EP Zellen ergaben sich aus der Wachstumskurve, die über drei Tage unter Exposition mit Doxorubicinkonzentrationen zwischen 10nM und 1000nM aufgenommen wurde. Die Zellviabilität wurden per Zellvitalitätstest (MTT) vermessen.

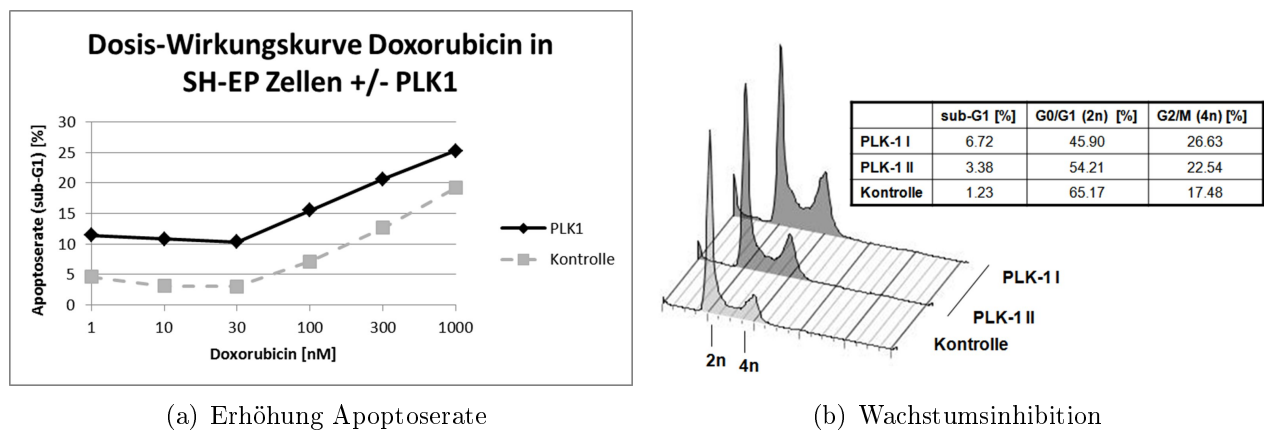
Für die im Assay eingesetzten zytostatischen und zytotoxischen Doxorubicinkonzentrationen wurden Werte von 300nM und 1000nM mit Hilfe einer Wachstumskurve bestimmt, die in Abbildung 3.8 dargestellt ist. Das Wachstum der Zellen wurde unter Exposition mit un-

<sup>3</sup>NB2004 Trial Protocol for Risk Adapted Treatment of Children with Neuroblastoma

verschiedlich starken Konzentrationen Doxorubicin über drei Tage vermessen. Unbehandelte SH-EP Zellen proliferierten ungehindert. Doxorubicin in geringen Dosen bis 100nM führte zu verlangsamer Proliferation und wirkte bei 300nM zytostatisch. Eine Konzentration von 1000nM war für SH-EP Zellen über drei Tage nahezu vollständig zytotoxisch. Aus der Wachstumskurve ging weiterhin hervor, dass eine Expositionsdauer von drei Tagen ausreichend ist, um die verschiedenen Effekte von Doxorubicin auf das Wachstumsverhalten von SH-EP Zellen diskriminierbar zu machen. Für den Screen wurde entschieden, die Reporterzellen nach drei Tagen Assay mit Hilfe von Durchflusszytometrie oder Zellproliferationsassay zu analysieren, und dem mit der Zeit steigenden Risiko, dass die Ergebnisse des Assays durch eine unerwünschte Gegenselektion beeinflusst werden, auszuweichen.

### 3.1.4 Interne Kontrollen

Für die Durchführung eines parallel basierten Screens, der auf mehrere experimentelle Runden aufgeteilt werden muss, ist die Gewährleistung stets vergleichbarer experimenteller Bedingungen eine Herausforderung. Interne Kontrolle, die eine Aussage über die Vergleichbarkeit der Ergebnisse aus verschiedenen Runden des Screens liefern, sind essentiell für die Auswertung des Screens. Eine weitere Schwierigkeit leitete sich aus der Zelldichte abhängigen Doxorubicinsensitivität ab, die mit steigender Zelldichte abnimmt [47]. Für die Bewertbarkeit der Daten war es daher wichtig, über Positivkontrollen zu verfügen, die eine Aussage darüber zulassen, wie stark sich eine reale Erhöhung der Doxorubicinsensitivität im Assay darstellt.



**Abbildung 3.9** – Eignung von shRNA-mir-Expressionsvektoren gegen PLK1 als Positivkontrollen. (a) Die Dosis-Wirkungs-Kurve von Doxorubicin ist bei PLK1-Inhibition parallel verschoben und zeigt eine allgemeine Erhöhung der Apoptoserate durch eine generelle Steigerung der Aktivität proapoptotischer Signalwege. Die Apoptoserate der Proben in Abhängigkeit der eingesetzten Doxorubicinkonzentration wurde nach drei Tagen Doxorubicinexposition mittels Durchflusszytometrie bestimmt. (b) PLK1-Inhibition führt über einen M-Phase-Arrest zu einer deutlichen Wachstumsinhibition, die sich durchflusszytometrisch als Zunahme der Zellen mit 4n DNA-Gehalt manifestiert.

Für den Screen war es sinnvoll, neben Negativkontrollen interne Kontrollen für die Er-

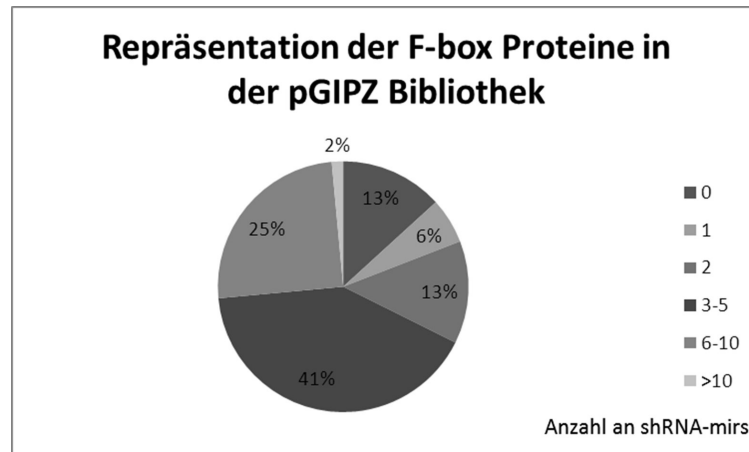
höhung und Verringerung der Doxorubicinsensitivität sowie für Änderungen des Proliferationsverhaltens ohne Doxorubicinexposition zu verwenden. Die bereits in SH-EP Zellen auf Funktion überprüften shRNAs gegen p53 und PLK1 sollten im Screen als interne Kontrollen zum Einsatz kommen. Inhibition von p53 führt zu einer Zunahme der Doxorubicinresistenz von SH-EP Zellen, die bereits in Abbildung 3.6 gezeigt wurde. shRNA gegen p53 eignete sich daher als Positivkontrolle für eine erhöhte Doxorubicinresistenz der SH-EP Zellen. Inhibition von PLK1 schränkt die Proliferation von Zellen massiv ein und steigert die Apoptoserate. Abbildung 3.9(a) zeigt eine Dosis-Wirkungs-Kurve von Doxorubicin mit und ohne PLK1-Inhibition. Dargestellt ist jeweils die Menge an apoptotischen Zellen. Es ist deutlich zu sehen, dass PLK1-Inhibition bereits ohne Doxorubicinexposition zur Erhöhung der Fraktion der apoptotischen Zellen führt. Mit steigender Menge an Doxorubicinexposition steigen die Fraktionen an apoptotischen Zellen in SH-EP Zellen mit und ohne PLK1-Inhibition nahezu parallel an. Abbildung 3.9(b) zeigt den Effekt einer PLK1-Inhibition ohne weiteren zellulären Stress auf das DNA-Profil der Zellen. Die Fraktion an Zellen mit 4n DNA-Gehalt sind deutlich erhöht, was das Korrelat für die Wachstumsinhibition darstellt. Analog zu Abbildung 3.9(a) ist die Zahl an apoptotischen Zellen erhöht. shRNA-mir-Expressionsvektoren gegen PLK1 konnten somit als Positivkontrolle für eine erhöhte Apoptoserate unter Doxorubicinexposition und für Zellzyklusprofiländerungen ohne Doxorubicineinfluss eingesetzt werden.

### 3.1.5 Repräsentation der F-box Proteine durch die Bibliothek

Die Erfolgsaussichten eines Screens werden maßgeblich durch die Qualität der eingesetzten shRNA-Bibliothek bestimmt, die sich über die Anzahl an shRNAs pro repräsentiertem Gen und über die zu erwartende Inhibitionseffektivität dieser shRNAs definiert. Eine Auswahl von shRNAs gegen Vertreter der Familie der F-box Proteine stand bereits vor Beginn der Etablierungsarbeiten zur Verfügung. Sie stammte aus der pGIPZ-Bibliothek von Openbiosystems, welche sich bereits beim Einsatz in einem großangelegten Screen bewährt hatte [21]. Die Qualität dieser Subbibliothek wurde überprüft, um einschätzen zu können, welche Ergebnisse von dem Testscreen der F-box Proteine erwartet werden durften, und um einordnen zu können, worauf mögliche Defizite zurückzuführen wären.

Aus der Identifizierung von shRNA-mir-Expressionsvektoren der Bibliothek mit hoher Aktivität gegen PLK1 und p53 (siehe Kapitel 3.1.2) war bereits bekannt, dass nur ein Teil der pGIPZ-shRNAs funktionell aktiv waren, was sich auch mit Untersuchungen anderer Arbeiten deckt [19, 46]. Für einen Screen mit realistischen Erfolgsaussichten sollten für jedes Zielgen daher mehr als 5 shRNAs existieren, um es mit hoher Wahrscheinlichkeit durch zwei unabhängige shRNAs mit hoher Aktivität repräsentieren zu können. Abbildung 3.10 gibt eine Übersicht zur Repräsentation der Familie der 69 F-box Proteine durch die zur Verfügung stehenden 275 shRNAs.

10 (13%) F-box Proteine waren nicht in der Bibliothek repräsentiert. 13 (19%) F-box



**Abbildung 3.10** – Übersicht zur Repräsentation der F-box Proteine durch pGIPZ shRNA-mir-Expressionsvektoren aus der zur Verfügung stehenden Bibliothek.

Proteine waren nur durch ein oder zwei shRNAs und weitere 28 (42%) nur durch drei bis fünf shRNAs repräsentiert. Die Repräsentation der F-box Proteine durch die zur Verfügung stehende Bibliothek war daher als zum Teil unzureichend zu bewerten. Bei F-box Proteinen, die nur durch ein oder zwei shRNAs vertreten waren, war die Möglichkeit anzunehmen, dass keine der verfügbaren shRNAs über ausreichend Aktivität verfügen würde, um das jeweilige Zielprotein für die Induktion eines im Screen messbaren Effekts hinreichend stark zu inhibieren.

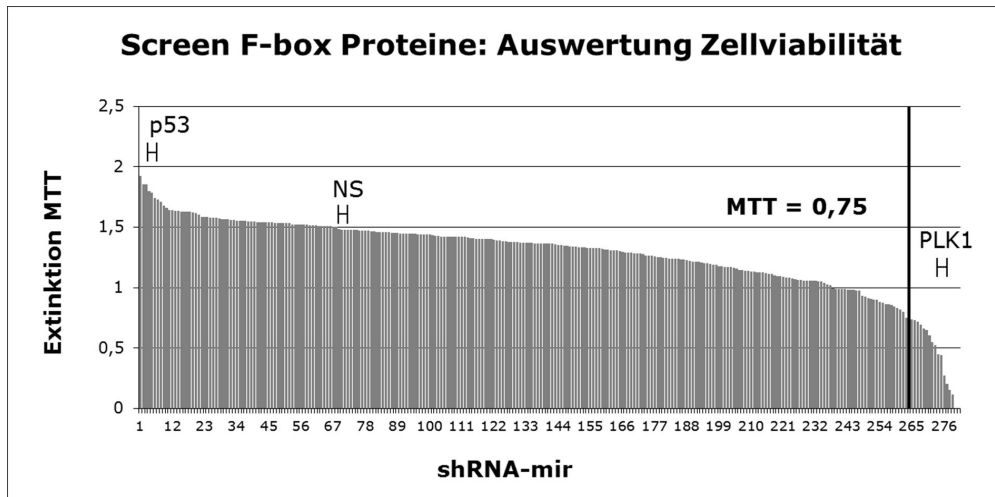
Aus diesem Grund war davon auszugehen, dass ein Teil der potentiellen Zielgene des Screens entweder nicht erfassbar sein würden, oder ihre Inhibition zu nur schwach ausgeprägten Effekten führen würde.

## 3.2 Screen der F-box Proteine

Nach der Etablierung des experimentellen Systems wurde ein Screen der F-box Proteine durchgeführt, um die Eignung des Systems aus eingesetzter Reporterzelllinie, shRNA-Bibliothek und dem gewählten Assay für einen weiteren, größeren Screen zu untersuchen.

### 3.2.1 Vergleichbarkeit der Proben

Bei der Durchführung eines Screens ist es essentiell, dass die Zellmengen aller Proben möglichst geringe Schwankungen aufweisen, da Zelldichte ein wesentlicher Einflussfaktor auf Proliferationsverhalten und Doxorubicinsensitivität einer Zellpopulation ist [47]. Der Großteil der Proben wies mit der Negativkontrolle (NS) vergleichbare Zellviabilität auf, sodass hier von einer Vergleichbarkeit ausgegangen wurde. Abbildung 3.11 zeigt die Zellviabilität aller unbehandelten Proben, die nach drei Tagen Wachstum mit Hilfe eines Zellvitalitätstests (MTT) bestimmt wurden. Die MTT-Werte der meisten Proben waren im Bereich zwischen



**Abbildung 3.11** – Auswertung Screen: Schwankungen der Zellviabilität der unbehandelten Proben wiesen auf falschpositive Ergebnisse in den anschließenden Auswertungen des Screens hin. Hauptursache war die heterogene Qualität der Ausgangs-DNA, die zu unterschiedlich hohen Virustitern führte. Bei den Positivkontrollen, shRNA-mir gegen PLK1 und p53, war die Menge lebendiger Zellen erwartungsgemäß erniedrigt bzw. erhöht. Proben, bei denen der MTT-Wert kleiner als 0,75 war, waren mit Wachstumsinhibition analog zu shRNA-mir gegen PLK1 oder mit niedrigem Virustiter zu erklären und sollten in der Validierung erneut überprüft werden. Die Zellviabilität wurde drei Tage nach Transduktion und Selektion mit Puromycin mittels einem Zellvitalitätstest (MTT) bestimmt.

1,0 und 1,5 verteilt. Die Streuung der Zellmengen ist auf Schwankungen der Qualität und Quantität der Ausgangs-DNA der shRNA-Bibliothek zurückzuführen, die nicht kontrolliert werden konnten, und über verschieden hohe Virustiter zu unterschiedlichen Ausgangszellmengen führten. Während die beiden shRNA-mirs gegen p53 in Abbildung 3.11 zu einer geringfügig höheren Proliferation führten, die mit dem Wegfall des p53-vermittelten Kontrollpunktes zwischen G1- und S-Phase zu erklären ist, war die Proliferation durch shRNA-mirs gegen PLK1 erwartungsgemäß stark reduziert [48, 5].

Neben Proben mit shRNA-mir-Expressionsvektoren gegen PLK1 fanden sich weitere Proben, bei denen die Zellmenge ebenfalls stark reduziert war. Bei diesen Proben bestand die Möglichkeit, dass entweder shRNA-mir-Expressionsvektoren transduziert wurden, die wie shRNA-mir gegen PLK1 eine Wachstumsinhibition vermitteln, oder aber ein niedriger Virustiter zu fehlender Puromycinresistenz der Zellen führte, die in der anschließenden Selektion mittels Puromycin in den Zelltod gingen. Nach Abschluss der Puromycinselektion wurde die GFP-Fluoreszenz aller Proben vermessen, da davon auszugehen war, dass fehlerhafte Transduktion mit niedriger GFP-Fluoreszenz einhergeht, und der proliferationsinhibitorische Effekt eines shRNA-mir-Expressionsvektors erst nach Ansteigen der GFP-Fluoreszenz manifest wird. Gegenüber den MTT-Werten unterlag die GFP-Fluoreszenz allerdings einer extremen Streuung, sodass daraus keine Aussage bezüglich der Ursache der verminderten Zellmenge getroffen werden konnte. Gründe für die starke Streuung der GFP-Fluoreszenz können

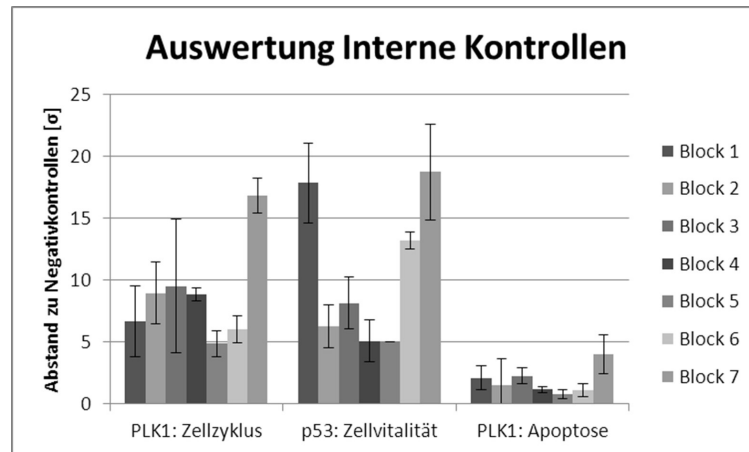
in der Abhängigkeit der GFP-Expression vom Virustiter aber auch von der Verteilung und der Morphologie der Zellen im 96-Well liegen (shRNA-mir gegen PLK1 führt über wenige, große Zellen mit 4n DNA-Gehalt zu hoher GFP-Fluoreszenz im Well). Ein Aussortieren von GFP-negativen Zellen in der FACS-Auswertung war aufgrund des DNA-Färbeprotokolls, das zum Austritt von GFP aus den permeabilisierten Zellen führt, ebenfalls nicht möglich. Da zwischen Transduktionsfehlern und einem inhibitorischen Effekt des entsprechenden shRNA-mir-Expressionsvektors nicht unterschieden werden konnte, wurden alle Proben mit einem MTT-Wert  $< 0,75$  in eine Validierung des Primärscreens einbezogen. Einige dieser Proben erscheinen nicht in Abbildung 3.17, da bei ihnen die Erstellung eines Zellzyklusprofils wegen geringer Zellzahlen unmöglich war. Aufgrund der inversen Korrelation von Zellproliferation und Apoptoserate unter Doxorubicinexposition gab es eine Überlappung von Proben, die sowohl über reduzierte Zellviabilität als auch wegen gesteigerter Apoptoserate für eine Validierung ausgewählt wurden.

Aufgrund der unterschiedlichen Zellmengen war davon auszugehen, dass die Auswertung des Screens zu falschpositiven Ergebnissen führen würde. Um die Anzahl falschpositiver Ergebnisse zu verringern, ist es für die Auswertung eines Screens allgemein anerkannter Standard, ein Gen als Kandidat für eine Validierung zu klassifizieren, wenn zwei unterschiedliche shRNA-Expressionsvektoren gegen das gleiche Gen jeweils eine Änderung des Phänotyps um mindestens zwei Standardabweichungen vom Median hervorrufen [3]. Diese Forderung sollte auch in der Auswertung des Testscreens angewandt werden.

### 3.2.2 Auswertung der internen Kontrollen

Wie in Kapitel 3.1.4 beschrieben, wurden zwei shRNA-Expressionsvektoren gegen PLK1 als interne Positivkontrolle für Veränderungen des Proliferationsverhaltens und Erhöhung der Apoptoserate sowie zwei shRNA-Expressionsvektoren gegen p53 als Positivkontrolle für eine Erhöhung der Doxorubicinresistenz der Reporterzelllinie eingesetzt. Mit den internen Kontrollen war es somit möglich abzuschätzen, in welchem Bereich Änderungen des Phänotyps der Reporterzelllinie zu erwarten waren. Der Primärscreen wurde aus Gründen der Handhabbarkeit in insgesamt 7 aufeinander folgenden Blöcken durchgeführt. Die internen Kontrollen ermöglichten zudem einen Überblick, inwieweit die Daten dieser 7 Teilblöcke des Screens vergleichbar waren.

Die Auswertung der internen Kontrollen in Abbildung 3.12 zeigte vergleichbare Bedingungen für die Datenerhebung in den 7 Blöcken des Screens. Dargestellt ist jeweils der Abstand zwischen dem Signal der Positiv- und der Negativkontrollen. Für die Suche nach Änderungen des Proliferationsverhaltens und einer Erhöhung der Doxorubicinresistenz ergab sich ein Abstand von mehr als  $5\sigma$ , sodass hier sehr gute Bedingungen für die Identifizierung einer Phänotypänderung vorlagen. Demgegenüber lag die Positivkontrolle für die Erhöhung der Apoptoserate (shRNA-mir gegen PLK1) in der Regel nur  $1,5\sigma$  von den Negativkontrollen entfernt.



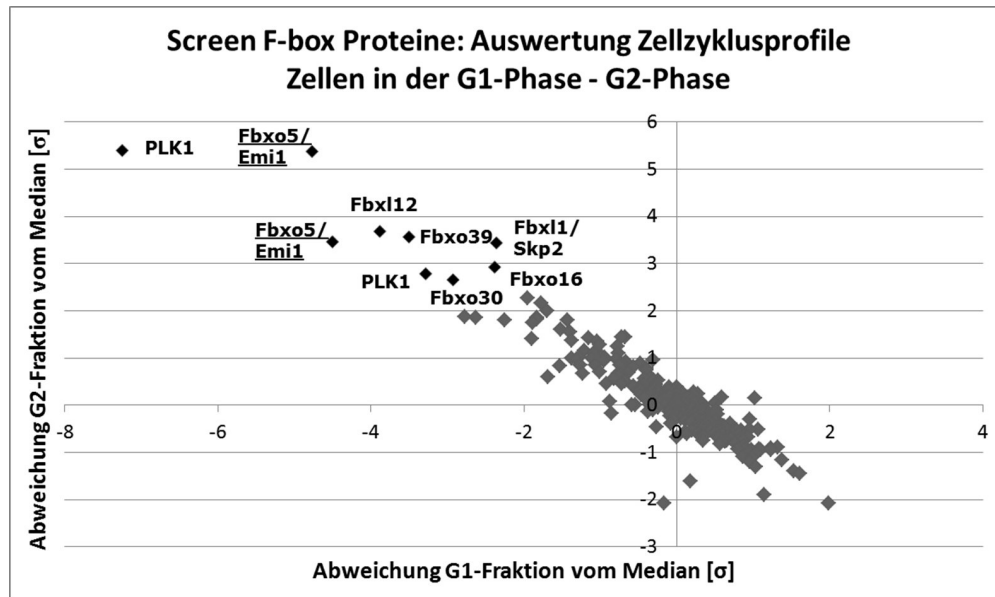
**Abbildung 3.12** – Auswertung Screen: Abstand der internen Positivkontrollen von den Negativkontrollen für die Suche nach Änderungen des Zellzyklusprofils (PLK1), der Doxorubicinresistenz (p53) und der Doxorubicinsensitivität (PLK1) in den 7 Teilblöcken des Screens. Die Kontrollen zeigen vergleichbare Screeningbedingungen in den 7 Blöcken. Für die Analyse der Zellzyklusprofile und der Zellvitalität ergibt sich ein exzellenter Abstand  $\geq 5\sigma$  zwischen Positiv- und Negativkontrollen. Die Positivkontrollen für eine Erhöhung der Doxorubicinsensitivität lagen nur  $> 1\sigma$  von den Negativkontrollen entfernt.

Aufgrund dieser suboptimalen Bedingungen war zu erwarten, dass das Auflösungsvermögen in diesem Teil des Screens schlechter war als in den anderen. Es wurde daher entschieden für diesen Teil des Screens die Schwelle für eine Validierung von shRNA-Expressionsvektoren abzusenken. Anstatt zweier unterschiedlicher shRNA-Expressionsvektoren gegen das gleiche Gen mit einer jeweiligen Änderung des Phänotyps von mindestens zwei Standardabweichungen wurden zwei shRNA-Expressionsvektoren mit einer Änderung des Phänotyps um  $0,5\sigma$  gefordert.

### 3.2.3 Änderungen des Proliferationsverhaltens

Zur Suche nach F-box Proteinen, deren Inhibition zu Änderungen der Zellproliferation führt, wurden die Reporterzellen nach drei Tagen Wachstum ohne Doxorubicinexposition durchflusszytometrisch analysiert. Die Zellzyklusprofile der Proben wurden bezüglich des Verhältnis aus Zellen in der G2- und G1-Phase als Maß für den Ablauf von Zellproliferation und bezüglich des Anteils von Zellen mit polyploidem DNA-Gehalt untersucht, um mögliche Störungen im Ablauf der Mitose identifizieren zu können. Bei Mitoseablaufstörungen ist eine veränderte Apoptoserate zu erwarten [49]. Diese wurde hier nicht dargestellt, da davon auszugehen ist, dass sich Mitoseablaufstörungen zunächst in Änderungen des Verhältnis aus G1-, S- und G2-Phase manifestieren, bevor sie sich in der Apoptoserate niederschlagen.

Insgesamt lagen 10 auffällige Proben außerhalb der doppelten Standardabweichung, von denen jeweils acht shRNA-mir-Expressionsvektoren gegen ein einzelnes, und zwei gegen Fbxo5/Emi1 gerichtet waren. Nach der Forderung von zwei unabhängigen shRNA-Expres-



**Abbildung 3.13** – Auswertung Screen: Änderungen der Zellproliferation. Zur Suche nach F-box Proteinen, deren Inhibition zu Änderungen der Zellproliferation führt, wurde die Menge an Zellen in der G2-Phase in Abhängigkeit von der Menge an Zellen in der G1-Phase in Standardabweichungen vom Median ermittelt. shRNA-mir-Expressionsvektoren gegen PLK1 als Positivkontrollen lagen außerhalb der doppelten Standardabweichung. Fbxo5/Emi1 qualifizierte sich als Ergebnis mit zwei shRNA-mir-Expressionsvektoren, die außerhalb der doppelten Standardabweichung lagen. Die DNA-Verteilung der Proben wurde nach dreitägigem Wachstum ohne Doxorubicinexposition durchflusszytometrisch analysiert.

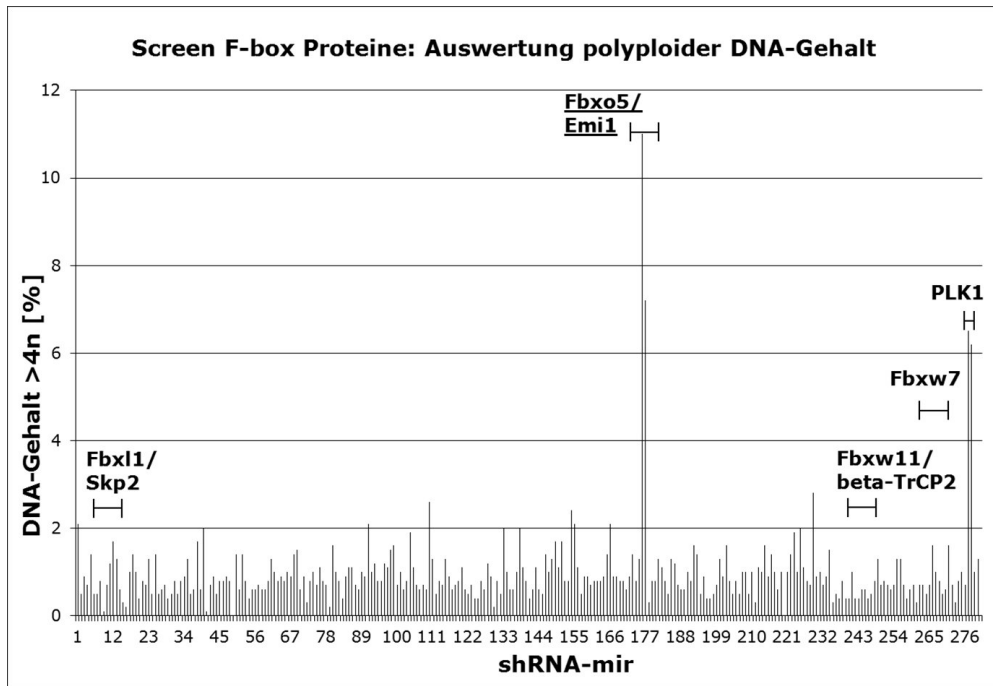
sionsvektoren gegen das gleiche Gen qualifizierte sich Fbxo5/Emi1 somit als Ergebnis in diesem Teil des Screens. Dieser Befund deckt sich mit anderen Arbeiten, aus denen bekannt ist, dass Inhibition von Fbxo5/Emi1 zu Ablaufstörungen der Mitose mit deutlich verändertem DNA-Profil führt [10].

Das Verhältnis aus Zellen in der G2- und G1-Phase der Proben ist in Abbildung 3.13 in Vielfachen der Standardabweichung vom Median dargestellt. Zwischen der Menge an Zellen in der G2- und G1-Phase existiert eine zu erwartende, antiproportionale Beziehung. Je größer die Menge an Zellen in der G2-Phase ist, desto niedriger ist die Menge an Zellen in der G1-Phase. Das ist erklärbar, da sich eine normal proliferierende Zelle entweder in der G1-, in der mengenmäßig meist untergeordneten S- oder in der G2-Phase befindet.

265 der 275 untersuchten Proben sowie die Negativkontrollen lagen innerhalb der doppelten Standardabweichung vom Median, und wurden als unauffällig eingeordnet. Demgegenüber lagen die beiden Positivkontrollen mit shRNA gegen PLK1 mit 3 bzw. 7 Standardabweichungen deutlich vom Median entfernt. Der Screen verfügte somit über eine hohe Trennschärfe zwischen unauffälligen shRNA-Expressionsvektoren und solchen, die eine Veränderung des Zellzyklusprofils induzierten.

Die Auswertung der Proben hinsichtlich Zellen mit polyploidem DNA-Gehalt in Abbildung 3.14 führte zum gleichen Ergebnis. Bei 273 der 275 untersuchten Proben und den Neg-



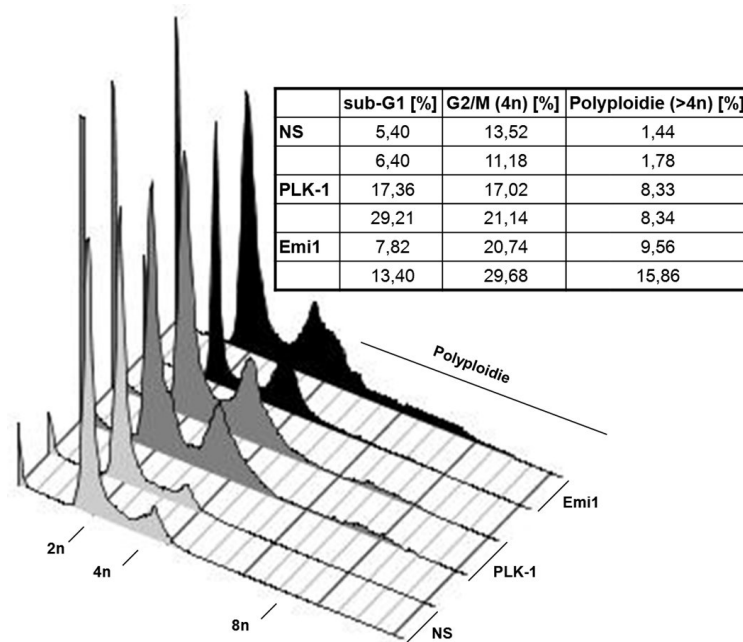


**Abbildung 3.14** – Auswertung Screen: Zunahme polyploider Zellen. Zur Suche nach F-box Proteinen, deren Inhibition zur Zunahme polyploider Zellen führt, wurde der DNA-Gehalt der Proben bezüglich Polyploidie ausgewertet. Der Anteil polyploider Zellen war bei der Positivkontrolle, shRNA-mir gegen PLK1, gegenüber Kontrollproben um das dreifache erhöht. Fbxo5/Emi1 qualifizierte sich als Ergebnis mit zwei Proben, deren Anteil an polyploiden Zellen um das drei- bzw. fünffache gesteigert war. Die DNA-Verteilung der Proben wurde nach dreitägigem Wachstum ohne Doxorubicinexposition durchflusszytometrisch analysiert.

ativkontrollen lag der Anteil an Zellen mit polyploidem DNA-Gehalt unter 3%. Dieser Wert ist bei SH-EP Zellen unter normalen Umständen zu erwarten. Fbxo5/Emi1 wurde als Gen, dessen Inhibition zu Proliferationsstörungen führt, bestätigt. Die gleichen beiden shRNA-mir-Expressionsvektoren, die in der Auswertung der Zellzyklusprofile nach dem Verhältnis aus Zellen in der G2- und G1-Phase auffällig waren, steigerten den Anteil an Zellen mit polyploidem DNA-Gehalt auf 7% bzw. sogar 11%. Bei den Proben der Positivkontrollen, den beiden shRNA-mir-Expressionsvektoren gegen PLK1, war der Anteil an Zellen mit polyploidem DNA-Gehalt auf über 6% deutlich erhöht. Der Assay war somit auch in dieser Auswertung in der Lage, auffällige von unauffälligen shRNAs zu unterscheiden.

Unter den F-box Proteinen existieren mit Fbxl1/Skp2, Fbxw7, und Fbxw1/ $\beta$ -TrCP neben Fbxo5/Emi1 weitere Vertreter, die für die Kontrolle über den korrekten Ablauf des Zellzyklus eine herausragende Rolle spielen. Die Inhibition von Fbxl1/Skp2 kann zur Induktion von Polyploidie führen[50]. In Abbildung 3.14 sind die Proben, in denen shRNA gegen Fbxl1/Skp2, Fbxw7, und Fbxw11/ $\beta$ -TrCP2 (Funktionsanalogon zu Fbxw1/ $\beta$ -TrCP) eingesetzt wurde, markiert. Bei keiner der Proben war eine signifikante Steigerung von Polyploidie zu beobachten.

Abbildung 3.15 stellt die Änderungen des Zellzyklusprofils durch Inhibition von

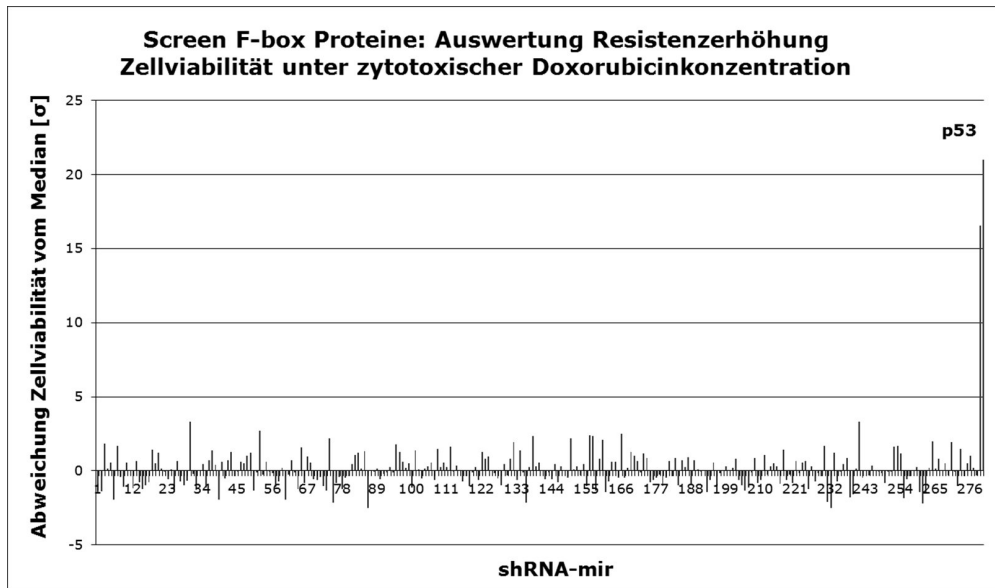


**Abbildung 3.15** – Induktion von Polyploidie durch Inhibition von Fbxo5/Emi1 und PLK1. shRNA-mir-Expressionsvektoren gegen Fbxo5/Emi1 und PLK1 führen zu Mitoseablaufstörungen durch Inhibition von Fbxo5/Emi1 bzw. PLK1. Im Vergleich zur Negativkontrolle (NS) arretieren Zellen vermehrt mit 4n DNA-Gehalt. Entsprechend ist die Apoptoserate verstärkt, was mit in einer erhöhten sub-G1 Fraktion im Zellzyklusprofil korreliert. Darstellung der Zellzyklusprofile von Zellen, die mit shRNA-mir-Expressionsvektoren gegen Fbxo5/Emi1 und PLK1 sowie Negativkontrollen transduziert waren, nach drei Tagen Wachstum.

Fbxo5/Emi1 im Vergleich zum durch PLK1-Inhibition induzierten Phänotyp dar. Sowohl die Inhibition von Fbxo5/Emi1 als auch von PLK1 führen zu einer Zunahme von Zellen mit 4n DNA-Gehalt. Während PLK1-Inhibition ebenso zu einer diskreten Zunahme von Zellen mit 8n DNA-Gehalt führt, zeigen Zellen, in denen Fbxo5/Emi1 inhibiert ist, eine stetige Zunahme des DNA-Gehalts auf Werte zwischen 4n und 8n. Sowohl Inhibition von Fbxo5/Emi1 als auch von PLK1 führen außerdem zu verstärktem Zelltod, der sich in einer erhöhten Zellfraktion im sub-G1 Bereich äußert.

### 3.2.4 Zunahme der Doxorubicinresistenz

Zur Suche von Faktoren, deren Inhibition zur Erhöhung der Doxorubicinresistenz führt, wurde die Zellviabilität der Reporterzellen nach drei Tagen Exposition mit einer zytotoxischen Doxorubicinkonzentration mittels eines Zellvitalitätstest (MTT) vermessen. Bei keiner der 275 Proben war eine ausgeprägte Steigerung der Doxorubicinresistenz zu beobachten. Die Auswertung des Assays ist in Abbildung 3.16 dargestellt. Sie zeigt die Mengen lebendiger Zellen aller untersuchten Proben unter Exposition mit einer zytotoxischen Doxorubicinresistenz in Standardabweichungen vom Median. Die internen Kontrollen mit zwei shRNA-Expressionsvektoren gegen p53 zeigten wie erwartet eine deutlich erhöhte Doxorubicinresistenz.

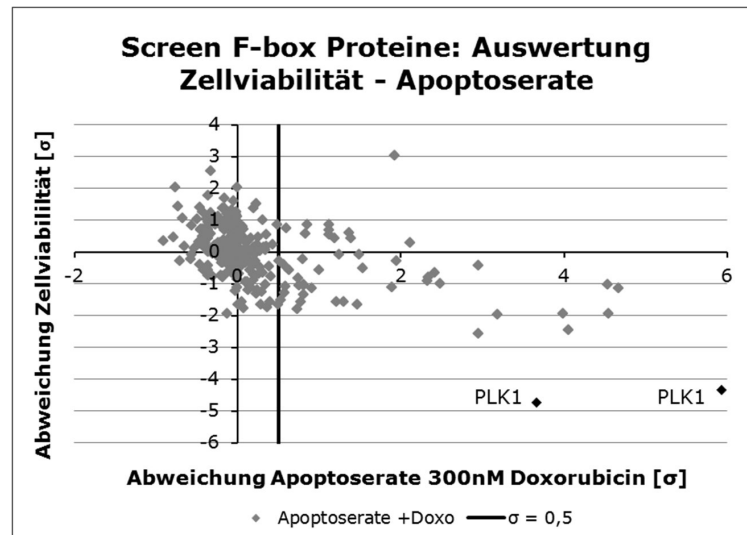


**Abbildung 3.16** – Auswertung Screen: Zunahme Doxorubicinresistenz. Kein shRNA-mir-Expressionsvektor gegen ein F-box Protein konnte einen signifikanten Anstieg der Doxorubicinresistenz hervorrufen. Bei der Positivkontrolle, shRNA-Expressionsvektoren gegen p53, lag die Zellviabilität  $> 15\sigma$  über dem Median. Das System war somit in der Lage, Steigerungen der Doxorubicinresistenz zu vermessen. Die Zellviabilität der Proben wurde nach drei Tagen Exposition mit einer zytotoxischen Doxorubicinkonzentration mittels eines Zellvitalitätstests (MTT) bestimmt. Darstellung in Standardabweichungen vom Median.

tenz. Die Zellviabilität lag 16 bzw. sogar 21 Standardabweichungen über dem Median und zeigte an, dass der Screen Zunahmen der Resistenz registrieren konnte. Das Gesamtniveau der Menge lebendiger Zellen bewegte sich bei allen 275 untersuchten Proben innerhalb von zwei Standardabweichungen um den Median herum. Angesichts des deutlichen Signals der Positivkontrollen kann dies als normale Variabilität des experimentellen Systems angesehen werden.

### 3.2.5 Zunahme der Doxorubicinsensitivität

Das Hauptaugenmerk des Screens war die Suche nach Faktoren, deren Inhibition zur Erhöhung der Doxorubicinsensitivität führt. Die Proben, die drei Tage lang unter einer zytostatischen Doxorubicinkonzentration gewachsen waren, wurden dazu durchflusszytometrisch analysiert, um ihre Rate an Zelltod bewerten zu können. Abbildung 3.17 zeigt die Apoptoserate dieser Zellen im Vergleich zur mittels MTT erhobenen Zellviabilität von Zellen, die ohne Doxorubicinexposition gewachsen waren, jeweils in Standardabweichungen vom Median. Proben der Positivkontrollen mit den beiden shRNA-mir-Expressionsvektoren gegen PLK1 wiesen erwartungsgemäß eine um mehr als  $2\sigma$  erhöhte Apoptoserate bei einer um mehr als  $4\sigma$  reduzierten Zellviabilität auf und zeigten an, dass der Assay in der Lage war, eine Erhöhung der Apoptoserate zu registrieren.

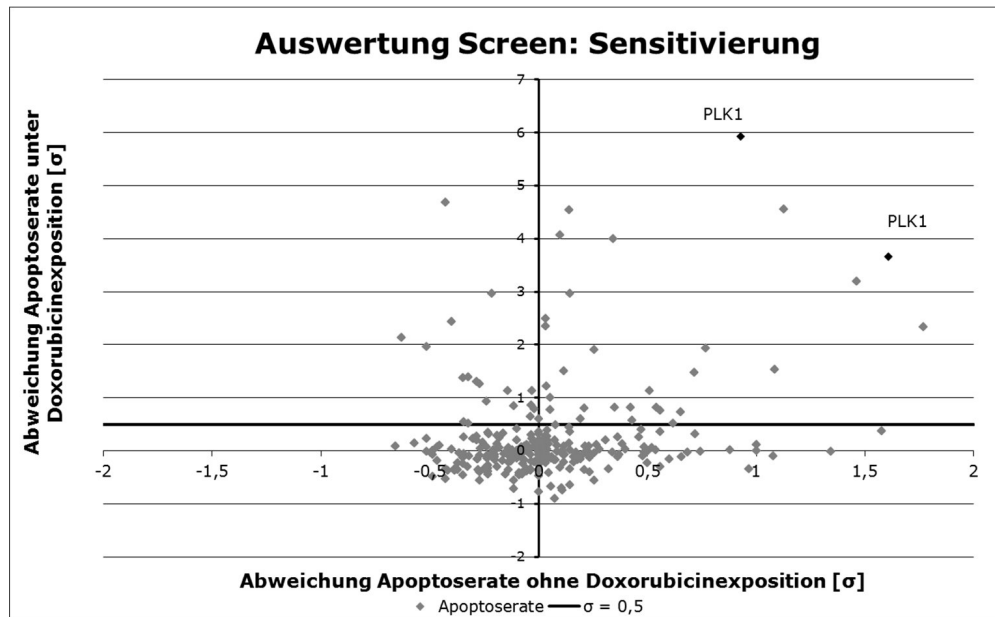


**Abbildung 3.17** – Auswertung Screen: Zunahme Doxorubicansensitivität. Gene, bei denen die Apoptoserate durch zwei shRNA-mir-Expressionsvektoren um mehr als  $0,5\sigma$  erhöht war, wurden für eine Validierung ausgewählt. Die Apoptoserate der Positivkontrollen, shRNA-mir gegen PLK1, war um  $2\sigma$  gegenüber dem Median erhöht und zeigte die Fähigkeit des Systems an, Erhöhungen der Apoptoserate zu identifizieren. Die Zellen wurde nach dreitägigem Wachstum unter zytostatischer Doxorubicinkonzentration durchflusszytometrisch analysiert. Darstellung einzelner Proben in Standardabweichungen vom Median in Gegenüberstellung mit der Zellviabilität ohne Doxorubicinexposition, die mittels Zellvitalitätstests (MTT) bestimmt wurde.

Die Anwendung der Forderung von zwei unabhängigen shRNA-Expressionsvektoren gegen das gleiche Gen mit einer Abweichung des Phänotyps von mehr als zwei Standardeinheiten für potentielle Kandidaten hätte an dieser Stelle zu keinem Ergebnis geführt. Die Auswertung der internen Positivkontrollen (Kapitel 3.2.2) hatte bereits nahegelegt, diese Bedingungen abzumildern. Aus zwei weiteren Gründen wurde entschieden, die Schwelle für potentielle Kandidaten auf eine halbe Standardabweichung herabzusetzen. F-box Proteine sind Modulatoren von zellulären Signalwegen, von denen bisher kein Vertreter bekannt ist, der Apoptose direkt kontrolliert [31]. Es ist daher zu erwarten, dass sich die Inhibition eines F-box Proteins tendentiell weniger stark auf die Apoptoseneigung einer Zelle auswirkt als die Inhibition eines direkt an der Apoptose beteiligten Proteins wie p53 oder bim. Aus den Etablierungsarbeiten war außerdem bekannt, dass die zu erwartende Inhibitionseffektivität vieler Bibliotheks-shRNA-mir-Expressionsvektoren unvollständig und daraus folgende Phänotypänderungen nur schwach sein würden (siehe Kapitel 3.1.2). Die Apoptoserate war bei 45 Proben um mehr als eine halbe Standardabweichung gegenüber dem Median erhöht. Davon wurden diejenigen Proben für eine weiterführende Validierung ausgewählt, bei denen zwei shRNA-mir-Expressionsvektoren gegen das gleiche Gen zu einer Steigerung der Apoptoserate um mehr als eine halbe Standardabweichung führte.

## Qualität der Daten

Eine weitergehende Analyse der Daten bestätigte Hinweise auf suboptimale experimentelle Bedingungen für die Suche nach shRNA-mir-Expressionsvektoren, die eine Erhöhung der Doxorubicinsensitivität induzieren. Diese hatten sich bereits aus der stark gestreuten Zellviabilität der unbehandelten Proben, die nicht mit Hilfe ermittelter GFP-Fluoreszenz korrigiert werden konnte (Abbildung 3.11), und der Auswertung der internen Positivkontrollen ergeben (Abbildung 3.12).



**Abbildung 3.18** – Auswertung Screen: Sensitivierung der Proben. Die Darstellung der Apoptoserate der Proben unter Doxorubicinexposition in Abhängigkeit der Apoptoserate ohne Doxorubicinexposition überprüft die Sensitivierung der Proben durch den jeweiligen shRNA-mir-Expressionsvektor. Die Apoptoserate der Positivkontrolle für eine Doxorubicinsensitivierung, shRNA-mir gegen PLK1, war mit und ohne Doxorubicinexposition um mehr als  $2\sigma$  erhöht. Die starke Streuung der restlichen Proben deutet auf experimentelle Bedingungen mit niedriger Trennschärfe innerhalb des Primärscreens hin. Die Apoptoserate der Proben ist in Standardabweichungen vom Median dargestellt, die nach dreitägigem Wachstum durchflusszytometrisch bestimmt wurde.

Proben, bei denen die Apoptoserate in Abbildung 3.17 erhöht war, wiesen gleichzeitig eine tendentiell verringerte Zellviabilität ohne Doxorubicinexposition auf. Diese inverse Korrelation aus Zellviabilität und Apoptoserate entspricht dem Phänotyp, der durch die Positivkontrolle, shRNA-Expressionsvektoren gegen PLK1, hervorgerufen wird. Eine Analyse zur Sensitivierung der Zellen gegenüber Doxorubicin durch den jeweiligen shRNA-mir-Expressionsvektor im Screen deutet darauf hin, dass vor allem die Zelldichteabhängigkeit der Doxorubicinsensitivität von SH-EP Zellen für diese erhöhten Apoptoseraten verantwortlich war. Als Ausdruck der Sensitivierung gegenüber Doxorubicin ist die Apoptoserate aller Proben unter Doxorubicinexposition in Abhängigkeit der Apoptoserate ohne Doxoru-

bicinexposition in Abbildung 3.18 gegenübergestellt. Proben, bei denen keine Sensitivierung vorlag, weichen weniger als  $0,5\sigma$  vom Median ab. Die interne Kontrolle für die Erhöhung der Apoptoserate, shRNA-mir-Expressionsvektoren gegen PLK1, zeigte konsistent zu den Daten aus Kapitel 3.1.4 mit und ohne Doxorubicinexposition eine deutliche Erhöhung der Apoptoserate, was auf eine generelle Steigerung der Aktivität proapoptotischer Signalwege durch Inhibition von PLK1 zurückzuführen ist. Unter den Proben, die sich für die Validierung qualifiziert hatten, verhielten sich einige Proben wie die Positivkontrolle. Bei anderen Proben zeigte sich die Apoptose steigernde Wirkung des jeweiligen shRNA-mir-Expressionsvektors nur unter Doxorubicinexposition.

Insgesamt war die Streuung aller Proben in dieser Analyse sehr groß, wobei sich keine klare Untergruppe von Proben abgrenzen ließ. Es musste daher davon ausgegangen werden, dass die Daten unter den experimentellen Bedingungen nicht mit optimaler Trennschärfe erhoben werden konnten. Aufgrund dieses Zusammenhangs und der niedrigen Schwelle für die Validierung war anzunehmen, dass Teile der für die Validierung ausgewählten shRNA-mir-Expressionsvektoren falschpositiv waren. Dieser Nachteil wurde bewusst akzeptiert, um die Möglichkeit zu wahren, tatsächliche Ergebnisse des Screens, die aus den oben dargestellten Gründen nur zu moderaten Effekten führen konnten, identifizieren zu können.

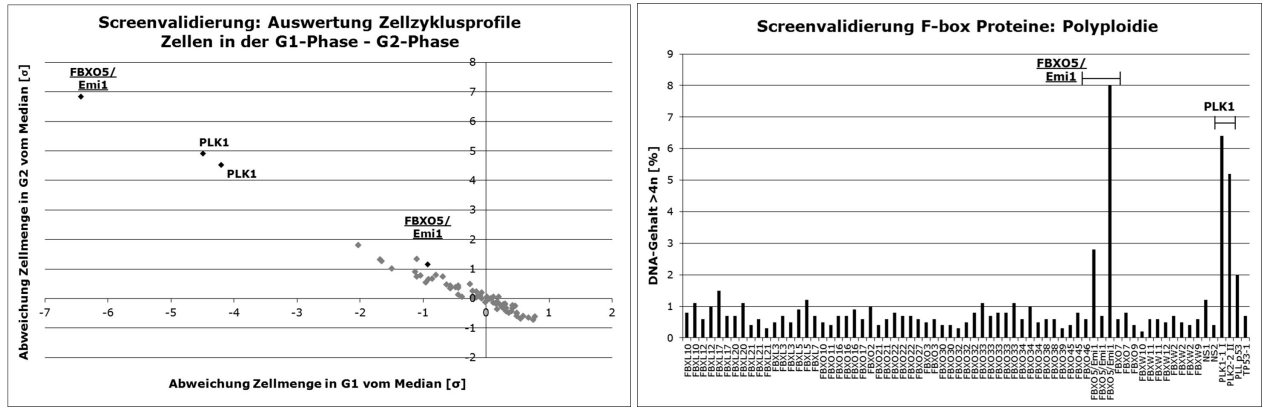
### 3.2.6 Screenvalidierung

Die im Screen erhaltenen Ergebnisse sollten zum Ausschluss falschpositiver Ergebnisse validiert werden. Auf diese Weise konnte außerdem bewertet werden, welcher der Anteil der im Primärscreen auffälligen Proben durch Fehler in der Datenerhebung und den niedrigen Schwellenwert für die Validierung bedingt waren. Um mögliche Störgrößen, wie schlechte Qualität der für die Virusproduktion eingesetzten DNA, ausschließen zu können, wurde die DNA noch einmal neu präpariert.<sup>4</sup> Anschließend erfolgte die Validierung in Form einer Wiederholung des Screens mit den im Primärscreen ausgewählten shRNA-mir-Expressionsvektoren.

#### **Fbxo5/Emi1**

Die Änderungen der Zellzyklusverteilung durch shRNA-mir-Expressionsvektoren gegen Fbxo5/Emi1 konnten reproduziert werden und sind in Abbildung 3.19 analog zur Auswertung der Zellzyklusprofile in Kapitel 3.2.3 dargestellt. Die Effekte der beiden shRNA-mir-Expressionsvektoren gegen Fbxo5/Emi1 fielen im Vergleich zum Primärscreen zum Teil schwächer aus, wobei die vorher aktivere shRNA-mir in der Validierung den schwächeren Phänotyp zeigte. Während eine der beiden shRNA-mirs gegen Fbxo5/Emi1 mit einer deutlichen Zunahme an Zellen in der G2-Phase und mit polyploidem DNA-Gehalt wieder eine ausgeprägte Änderung des Phänotyps induzierte, war der Anteil polyploider Zellen durch den anderen

<sup>4</sup>Die Präparation der DNA wurde von Dr. Matthias Truss und Dip-Biol. Steffi Prieskorn durchgeführt



(a) Zellen in der G2-Phase in Abhängigkeit von Zellen in der G1-Phase (b) Anteil an Zellen mit polyploidem DNA-Gehalt

**Abbildung 3.19** – Auswertung Validierung: shRNA-mir-Expressionsvektoren gegen Fbxo5/Emi1. (a) Deutliche Zunahme der Zellen in der G2-Phase durch einen shRNA-mir-Expressionsvektor gegen Fbxo5/Emi1. (b) Zwei shRNA-mir-Expressionsvektoren gegen Fbxo5/Emi1 führen zur Zunahme von Zellen mit polyploidem DNA-Gehalt. Die Proben wurden nach dreitägigem Wachstum ohne Doxorubicinexposition durchflusszytometrisch analysiert.

shRNA-mir-Expressionsvektor ebenfalls gesteigert. Die Zunahme an Zellen in der G2-Phase lag jedoch mit einer Standardabweichung über dem Median innerhalb der zu erwartenden, natürlichen Variabilität des experimentellen Systems.

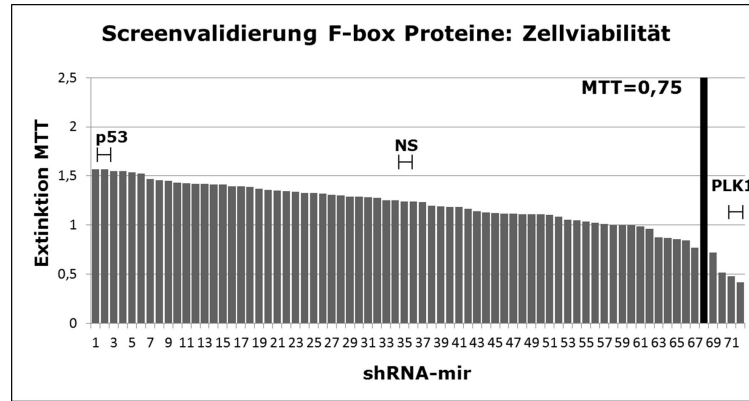
Diese Auswertung unterstreicht die Wichtigkeit einer Repräsentation der untersuchten Gene durch möglichst vielen shRNA-Expressionsvektoren. Schwierig zu kontrollierende Faktoren wie Transduktionseffizienz und Zellkultur führen zu deutlichen Schwankungen in der Ausprägung der untersuchten Phänotypen.

### Verminderung der Zellviabilität

Kein shRNA-mir-Expressionsvektor, der die Zellviabilität im Screen deutlich vermindert hatte, war in der Validierung (Abbildung 3.20) erneut auffällig. Die verminderte Zellviabilität im Screen wurde daher auf niedrige Virustiter und daraus folgend mangelnde Puromycinresistenz zurückgeführt. Neben den shRNA-mir-Expressionsvektoren gegen PLK1, die erwartungsgemäß eine deutliche Verminderung der Zellproliferation herbeiführten, reduzierte lediglich zwei weitere shRNA-mir-Expressionsvektoren das Zellwachstum der Proben in der Validierung auf einen MTT-Wert kleiner 0,75. Sie waren im Screen unauffällig gewesen, sodass von einem zufälligen Fehler ausgegangen wurde.

### Zunahme der Doxorubicinsensitivität

Mit Hilfe der Validierung des Primärscreens sollten F-box Proteine für weiterführende Untersuchungen ausgewählt werden, deren shRNA-mir-Expressionsvektoren die Doxorubicinsensitivität von SH-EP Zellen steigern. Um die Anzahl weiter zu untersuchender shRNA-mir-Expressionsvektoren auf eine handhabbare Größe zu begrenzen, wurden diejenigen aus-

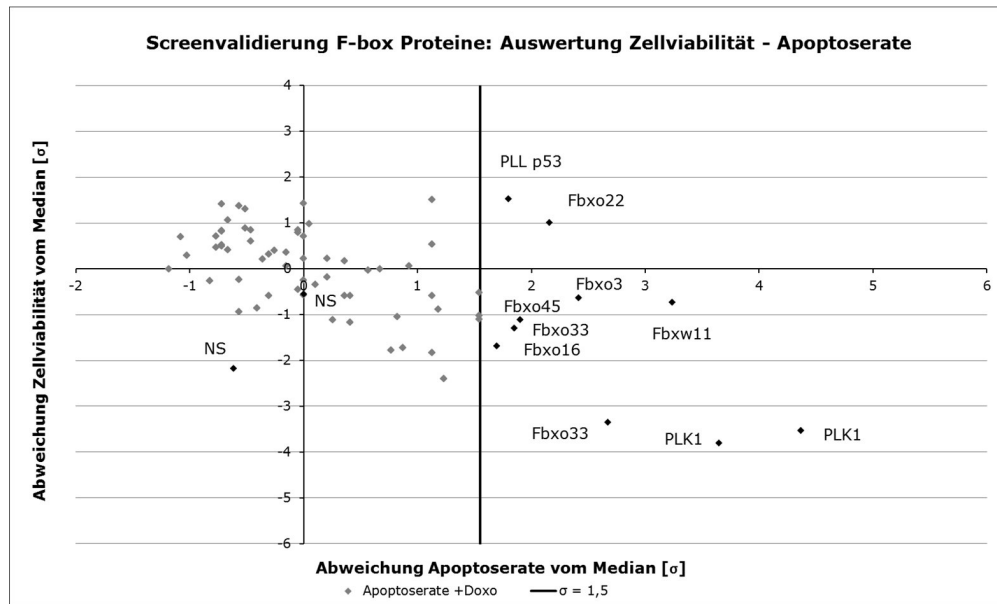


**Abbildung 3.20** – Auswertung Validierung: Verminderung der Zellviabilität. Keiner der shRNA-mir-Expressionsvektoren, die die Zellviabilität im Primärscreen stark reduziert hatten, war in der Validierung erneut auffällig. Die Proben der Positivkontrollen, shRNA-Expressionsvektoren gegen PLK1 und p53, wiesen erwartungsgemäß eine Erniedrigung oder Erhöhung der Zellviabilität auf. Die Zellviabilität ohne Doxorubicinexposition wurde nach drei Tagen Wachstum mit einem Zellvitalitätstest (MTT) bestimmt.

gewählt, die die Apoptoserate um  $1,5\sigma$  steigerten (Schwelle im Primärscreen:  $0,5\sigma$ ). Sieben shRNA-mirs entsprachen diesem Kriterium. Lediglich Fbxo33 war mit zwei shRNA-mirs gegen das gleiche Gen vertreten, sodass Fbxo33 nach der Ausgangsforderung zweier unabhängiger shRNA-mirs gegen das gleiche Gen an diesem Punkt das einzige Kandidatengen des Screens gewesen wäre. Mit Fbxw11/ $\beta$ -TrCP2 und Fbxo45 waren dennoch zwei Gene unter den übrigen sechs auffälligen shRNA-mir-Expressionsvektoren der Validierung, die als potentielle Ergebnisse des Screens erwartet worden waren [34]. Dies sprach dafür, dass ein Großteil der Kandidaten des Primärscreens als falschpositive Ergebnisse herausgefiltert wurde. Dieser Befund ist auf die in Kapitel 3.2.5 diskutierten Einflussfaktoren der Datenqualität des Primärscreens und der niedrigen Schwelle von  $0,5\sigma$  für eine Validierung zurückzuführen.

In Abbildung 3.21 ist die Apoptoserate der Proben der Validierung unter Exposition mit einer zytostatischen Doxorubicinkonzentration der Zellviabilität ohne Doxorubicinexposition gegenübergestellt. Analog zu den Daten im Primärscreen (Abbildung 3.17) war erneut eine antiproportionale Beziehung beider Größen als Ausdruck Zelldichte abhängiger Doxorubicinsensitivität feststellbar. Wie erwartet stellte sich die Mehrheit der Ergebnisse des Primärscreens als falschpositiv heraus. Bei diesen Proben und den beiden Negativkontrollen (NS) war die Apoptoserate gegenüber der medianen Apoptoserate in der Validierung um weniger als  $0,5\sigma$  erhöht. Die Apoptoserate der Positivkontrollen mit shRNA-mir-Expressionsvektoren gegen PLK1 war um  $> 2\sigma$  gegenüber dem Median gesteigert. Eine der beiden shRNA-Expressionsvektoren gegen p53 rief neben erhöhter Zellproliferation ebenso eine erhöhte Apoptoserate hervor. Beides ist mit dem Wegfall des p53-vermittelten Kontrollpunktes zwischen G1- und S-Phase zu erklären, der dazu führt, dass Zellen sowohl schneller proliferieren als auch Doxorubicin vermittelte DNA-Schäden nicht reparieren, und somit ein





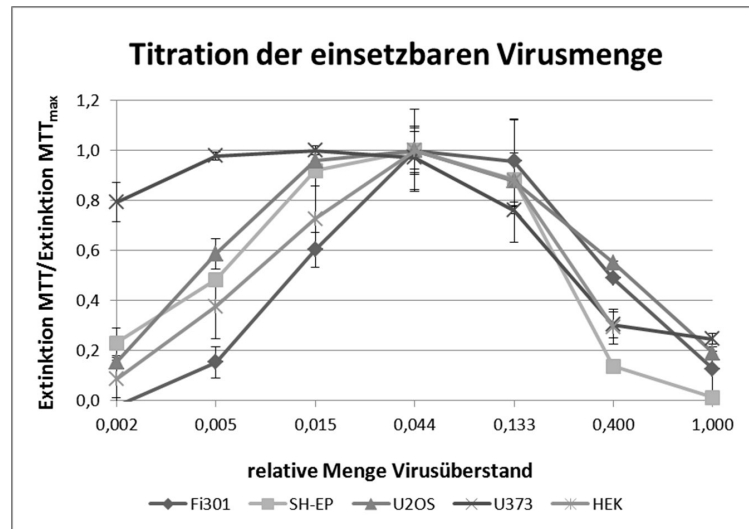
**Abbildung 3.21** – Auswertung Validierung: Zunahme der Doxorubicinsensitivität. Aus den shRNA-mir-Expressionsvektoren in der Validierung wurden diejenigen für weiterführende Untersuchungen ausgewählt, die die Apoptoserate um  $1,5\sigma$  steigerten. Die Apoptoserate der Positivkontrolle, shRNA-mir gegen PLK1, war um  $> 2\sigma$  gegenüber dem Median erhöht. Die Apoptoserate der Proben wurde nach dreitägigem Wachstum unter zytostatischer Doxorubicinkonzentration durchflusszytometrisch bestimmt und ist der Zellviabilität der Proben ohne Doxorubicinexposition gegenübergestellt (Messung mittels Zellvitalitätstests MTT).

erhöhtes Risiko haben, in Apoptose zu gehen. Dies steht nicht im Widerspruch zur erhöhten Zellviabilität unter Doxorubicinexposition von Zellen, in denen p53 inhibiert ist (siehe Abbildung 3.5(b) und 3.6) [48].

### 3.2.7 Transduktion unter optimierten Bedingungen

In der Validierung war die Phänotypänderung durch die beiden shRNA-mir-Expressionsvektoren gegen Fbxo5/Emi1 schwächer als im Primärscreen. Es war daher anzunehmen, dass nicht alle shRNA-Expressionsvektoren in der Validierung unter optimalen Bedingungen transduziert waren. Gleichzeitig war es möglich, dass die Steigerung der Doxorubicinsensitivität durch die shRNA-mir-Expressionsvektoren in anderen Reporterzelllinien deutlicher ausfallen würde. Es sollte daher überprüft werden, ob sich der Effekt der shRNA-mir-Expressionsvektoren gegen sechs F-box Proteine, die in der Validierung zu einer Erhöhung der Doxorubicinsensitivität um mehr als  $1,5\sigma$  geführt hatte, noch steigerbar wäre. Dazu sollte der Assay mit diesen shRNA-mir-Expressionsvektoren unter optimierten Transduktionsbedingungen in verschiedenen Reporterzelllinien wiederholt werden. Für eine möglichst große Bandbreite an Tumorentitäten wurden neben SH-EP Zellen die bereits in Kapitel 3.1.1 eingesetzten Zelllinien HEK293T (menschliche embryonale Nierenzellen), U2OS (Osteosarkom) und U373 (Glioblastom) ausgewählt. Primäre Lungenfibroblasten (Fi301) sollten im An-

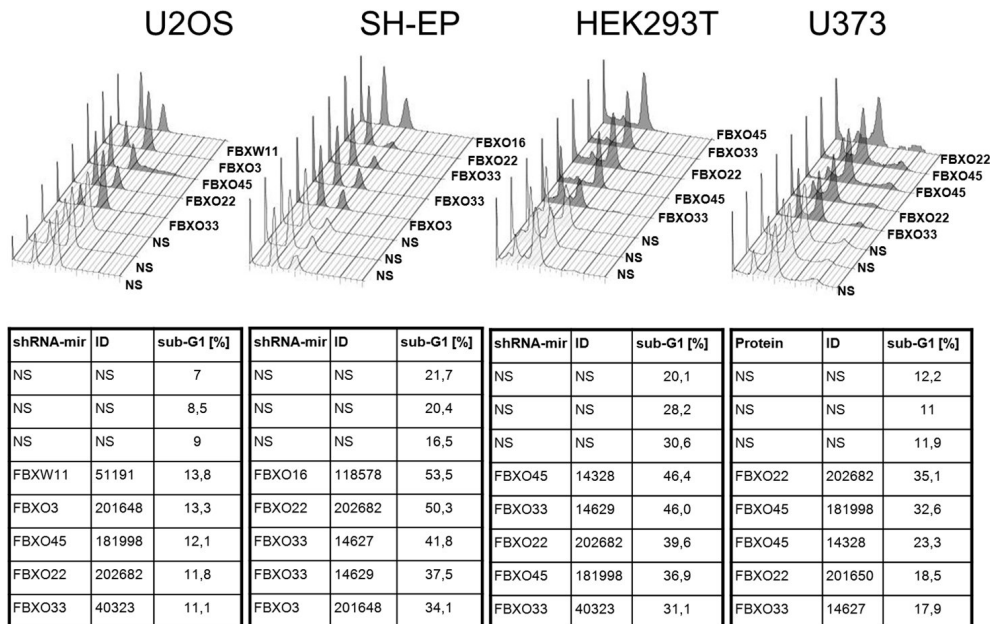
schluss als Modell für eine untransformierte Zelllinie dienen, um eine mögliche Tumorspezifität der Erhöhung der Doxorubicinsensitivität durch die shRNA-mir-Expressionsvektoren identifizieren zu können.



**Abbildung 3.22** – Bestimmung des optimalen Volumens an Virusüberstand mit maximalem Verhältnis aus hoher Viruslast und geringer virusvermittelter Zytotoxizität. Die Zellen wurden in einer Verdünnungsreihe mit absteigenden Mengen Virus des shRNA-mir-Expressionsvektors der Negativkontrollen des Screens transduziert. Nach drei Tagen Wachstum unter Puromycinselektionierung erfolgte die Bestimmung der Zellviabilität mit Hilfe eines Zellvitalitätstests (MTT). Dargestellt ist die Zellviabilität im Verhältnis zur maximal erreichbaren Zellviabilität ohne Puromycinselektion in Abhängigkeit der eingesetzten Virusmenge.

Zunächst wurde ein Virusstock für die optimierte Transduktion der in der Validierung auffälligen shRNA-mir-Expressionsvektoren sowie der internen Kontrollen angelegt. Für diesen wurde das optimale Volumen an Virusüberstand mit Hilfe einer Virustitration bestimmt. Bei dem 0,044-fachen Volumen des maximal eingesetzten Volumens war das Verhältnis aus eingesetzter Virusmenge und Virus vermittelter Zytotoxizität in den fünf Zelllinien maximal. Die MOI kann hier über die Zellviabilität nur abgeschätzt werden, und lag in der Größenordnung zwischen 5 und 10, was sich aus der Virusmenge ergibt, bei der das Verhältnis aus Zellviabilität mit und ohne Puromycinselektion bei 0,6 lag (in Analogie zu den Berechnungen in Kapitel 3.1.2). Im Gegensatz zum Screen wurde der Virusstock nicht aus 96-Wellplatten, sondern aus 75cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen gewonnen, sodass dieses Ergebnis nicht auf die Bedingungen des Screens übertragbar sind. Abbildung 3.22 zeigt die Titration, in der die Zellviabilität der mit absteigenden Volumen an Virusüberstand transduzierten Proben nach dreitägiger Selektion mit Puromycin mittels Zellvitalitätstests (MTT) vermessen wurden. Bei Virusüberständen über der optimalen Menge waren im Lichtmikroskop stark zytotoxische Effekte sichtbar und der MTT-Wert ergab stark reduzierte Zellviabilität, was mit der Induktion einer Interferonantwort der Zellen erklärbar ist [51]. Volumina an Virusüberstand unterhalb der optimalen Virusmenge führten aufgrund geringerer Mengen an Zellen mit Puromycinresistenz ebenfalls

zu reduzierter Zellviabilität. Die Permissivität für eine Virusinfektion lag bei U373 Zellen, einer Modellzelllinie für HCMV-Infektionen, unter den untersuchten Zelllinien am höchsten [40].

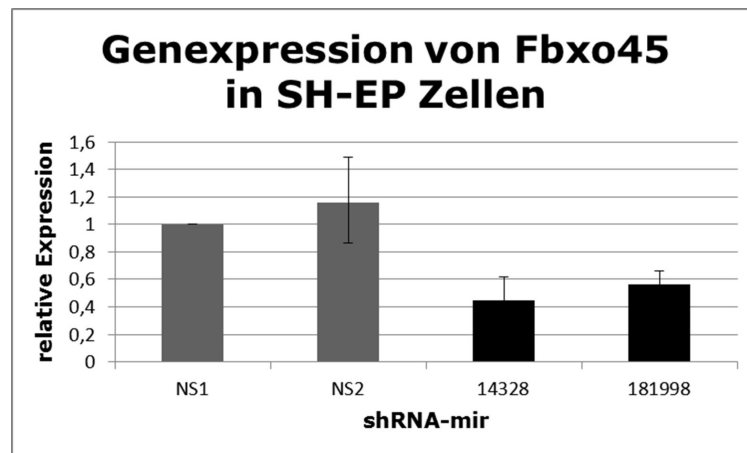


**Abbildung 3.23** – Kandidatengene in verschiedenen Tumorzelllinien. Dargestellt ist die Auswertung der jeweils fünf aktivsten shRNA-mir-Expressionsvektoren sowie der Negativkontrollen. Unter Einsatz der optimalen Virusmenge wurden die shRNA-mir-Expressionsvektoren gegen die Kandidatengene in U2OS, SH-EP, HEK293T und U373 Zellen transduziert. Nach drei Tagen Wachstum unter einer zytostatischen Doxorubicinkonzentration wurden die Proben durchflusszytometrisch analysiert.

Die vier Tumorzelllinien wurden mit den shRNA-mir-Expressionsvektoren gegen sechs F-box Proteine mit der ermittelten, optimalen Virusmenge transduziert. Analog zum Screen wurden die Proben nach dreitägiger Exposition mit einer zytostatischen Doxorubicinkonzentration durchflusszytometrisch analysiert. Die Doxorubicinkonzentration der jeweiligen Zelllinie wurde aus Daten der Versuche von Abbildung 3.1 bestimmt (U373 30nM, U2OS 100nM, SK-N-AS 30nM und SH-EP 300nM). Die Auswertung der Negativkontrollen und der jeweils 5 aktivsten shRNA-mir-Expressionsvektoren ist in Abbildung 3.23 gezeigt. Diese waren unter den optimierten Bedingungen in der Lage, die Doxorubicinsensitivität der Zellen stark zu steigern. Die Ausprägung der Steigerung bei SH-EP Zellen lag zum Teil über dem Niveau im Screen. Das Verhalten der shRNA-mir-Expressionsvektoren war in den verschiedenen Zelllinien jedoch nicht vergleichbar. Während beispielsweise die shRNA-mir gegen Fbxw11/ $\beta$ -TrCP2 mit der ID 51191 in U2OS die stärkste Erhöhung der Doxorubicinsensitivität induzierte, war diese shRNA-mir in den anderen Zelllinien nicht unter den 5 aktivsten. Die shRNA-mirs gegen Fbxo33 waren in allen vier Zelllinien unter den aktivsten shRNAs vertreten. Abhängig von der Zelllinie induzierte jedoch jeweils eine andere shRNA-mir den stärksten Phänotyp.

### 3.2.8 Spezifität des Phänotyps der shRNA-mir gegen Fbxo45

Nach dem die Ergebnisse des Screens in verschiedenen Zelllinien reproduziert werden konnten, musste die spezifische Inhibition der Zielgene durch die jeweiligen shRNA-mir-Expressionsvektoren gezeigt werden, um zielgenunabhängige Effekte wie virusvermittelte Zytotoxizität ausschließen zu können. Dies kann durch Nachweis der Reduktion der mRNA- oder Proteinmengen des Zielgens mittels Western Blot oder PCR erfolgen. Die Kombination aus spezifischer Inhibition des Zielgens und gleichzeitiger Zytotoxizität des shRNA-Expressionsvektors kann dabei nicht ausgeschlossen werden. Dieses Szenario kann über Einsatz einer siRNA mit einer anderen Sequenz gegen das Zielgen überprüft werden, die den gleichen Effekt hervorruft. Der Goldstandard zum vollständigen Ausschluss zielgenunabhängiger Zytotoxizität besteht in einer Komplementierung, bei der das inhibierte Protein unter Mutation der shRNA-Bindungsstelle rekombinant exprimiert wird, um den spezifischen, inhibitorischen Effekt des shRNA-Expressionsvektors aufzuheben.



**Abbildung 3.24** – Spezifität des Phänotyps der shRNA-mir gegen Fbxo45. Die Spezifität des Phänotyps des shRNA-mir-Expressionsvektors gegen Fbxo45 wurde per PCR überprüft. Die mRNA-Mengen von Fbxo45 waren in den Proben mit shRNA gegen Fbxo45 (14328 und 181998) gegenüber den Negativkontrollen (NS1 und NS2) deutlich reduziert.

Da eine Vermessung der mRNA-Mengen per PCR die unaufwändigste Methode ist, sollte die Spezifität der Kandidaten-shRNAs zunächst per PCR untersucht werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnten nicht alle shRNA-mir-Expressionsvektoren auf ihre Spezifität überprüft werden. Bei den shRNA-mir-Expressionsvektoren gegen Fbxo45 handelte es sich um ein erwartetes Ergebnis des Screens, deren Spezifität daher exemplarisch überprüft werden sollte. Abbildung 3.24 zeigt, dass die shRNA-mir-Expressionsvektoren gegen Fbxo45 die Menge an mRNA von Fbxo45 tatsächlich um 50 bzw. 60% reduzieren.<sup>5</sup> Diese moderate Reduktion der Ziel-mRNA konnte an diesem Punkt jedoch nicht klären, ob die Steigerung der Doxorubicinsensitivität durch Inhibition von Fbxo45 tatsächlich spezifisch war, oder ob

<sup>5</sup>Die Daten wurden von Dipl.-Biol. Steffi Prieskorn erstellt.

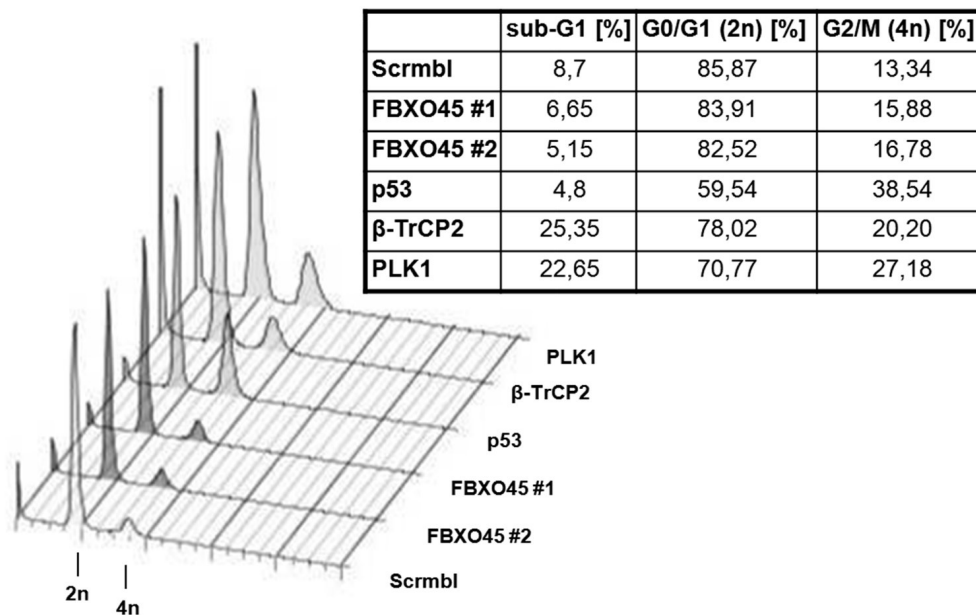
es sich um eine Zytotoxizität der shRNA-mir-Expressionsvektoren handelte. Für einen abschließenden Nachweis der Spezifität wäre an dieser Stelle der Einsatz von siRNA gegen Fbxo45 oder eine Komplementierung von Fbxo45 notwendig.

### 3.2.9 Inhibition von Fbxo45 in Fi301 Zellen

Bei der Suche nach Faktoren, deren Inhibition einen Therapievorteil im Einsatz von Doxorubicin erzielt, ist eine preferentielle Sensitivierung von Tumorzellen wünschenswert. Auf diese Weise kann die Effektivität von Doxorubicin gegenüber Tumorzellen gesteigert werden, ohne dabei unerwünschte Arzneimittelwirkungen wie Doxorubicin induzierte Kardiotoxizität zu erhöhen. Nachdem der Screen Fbxo45 als Gen identifiziert hatte, dessen Inhibition die Doxorubinsensitivität verschiedener Tumorzelllinien steigert und die Reduktion der Fbxo45-mRNA durch die shRNA-mir-Expressionsvektoren gegen Fbxo45 gezeigt werden konnte, sollte der Effekt der shRNA-mir gegen Fbxo45 in einer untransformierten Zelllinie untersucht werden. Da der therapeutische Einsatz von Doxorubicin vor allem durch Kardiotoxizität begrenzt ist, wären Kardiomyozyten das optimale Zellmodell für diese Fragestellung. Da keine entsprechende Zelllinie zur Verfügung stand, wurde zunächst auf primäre Lungenfibroblasten (Fi301) zurückgegriffen. Auf diese Weise konnte abgeschätzt werden, inwieweit sich weitere Untersuchungen in Kardiomyozyten lohnen würden.

Im Gegensatz zu shRNA-mir gegen PLK1 konnte shRNA-mir gegen Fbxo45 die Apoptoserate von Fi301 Zellen gegenüber der Negativkontrolle nicht steigern. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Steigerung der Doxorubinsensitivität durch Inhibition von Fbxo45 tumorspezifisch ist. Fi301 Zellen wurden dazu mit shRNA-mir-Expressionsvektoren gegen Fbxo45 sowie p53, PLK1, Fbxw11/ $\beta$ -TrCP2 und Negativkontrollen transduziert und anschließend nach drei Tagen Doxorubicinexposition durchflusszytometrisch analysiert (Abbildung 3.25). Mit den shRNA-Expressionsvektoren gegen p53 und PLK1 als Positivkontrollen konnte gezeigt werden, dass shRNA-mir-Expressionsvektoren in Fi301 Zellen aktiv sind, so dass der negative Befund nicht auf ineffektive RNA-Interferenz zurückzuführen ist. shRNA-mir-Expressionsvektoren gegen PLK1 steigerten die Apoptoserate der Fi301 Zellen von 8% in der Negativkontrolle (Scrambl) auf 22%. Der shRNA-Expressionsvektor gegen p53 führte zu einer Verringerung der Zellfraktion in G1 und einer Erhöhung der Zellfraktion in G2. Dies entsprach dem durch Inhibition von p53 vermittelten G1-Arrest unter Doxorubicinexposition [48]. Auch shRNA-mir gegen Fbxw11/ $\beta$ -TrCP2 steigerte die Apoptoserate der Fi301 Zellen gegenüber der Negativkontrolle von 8% auf 25%, und konnte somit einen Befund des Screens in einer weiteren Zelllinie reproduzieren.

Der nächste Schritt wäre der Nachweis der Inhibition von Fbxo45 durch die Vermessung der mRNA- oder Proteinmengen von Fbxo45 in Fi301 Zellen, die mit shRNA-mir-Expressionsvektoren gegen Fbxo45 transduziert wurden. Die Vermessung der mRNA-Reduktion von Fbxo45 in SH-EP Zellen hatte gezeigt, dass die inhibitorische Aktivität der



**Abbildung 3.25** – Unveränderte Doxorubicinsensitivität bei Inhibition von Fbxo45 in Fi301 Zellen. Primäre Lungenfibroblasten (Fi301) wurden mit shRNA-mir-Expressionsvektoren gegen Fbxo45, p53, PLK1, Fbxw11/ $\beta$ -TrCP2 und Negativkontrollen (Scrambl) transduziert. Inhibition von PLK1 und Fbxw11/ $\beta$ -TrCP2 führte zu einer Erhöhung der Apoptoserate gegenüber der Negativkontrolle und zeigte die Aktivität von shRNA-mir in Fi301 Zellen. Inhibition von p53 induzierte eine deutliche Zunahme der Zellen in der G2-Phase. shRNA-mir gegen Fbxo45 erhöhten die Apoptoserate von Fi301 Zellen nicht. Die Apoptoserate der Proben wurde nach drei Tagen Wachstum unter zytostatischer Doxorubicinexposition durchflusszytometrisch bestimmt.

eingesetzten shRNA-mir gegen Fbxo45 nicht sehr ausgeprägt ist. Es wäre sinnvoll, das Experiment mit einem shRNA-mir-Expressionsvektor oder siRNA zu wiederholen, die eine stärkere Inhibition vermitteln. Weitere Versuche könnten anschließend in Kardiomyozyten folgen.

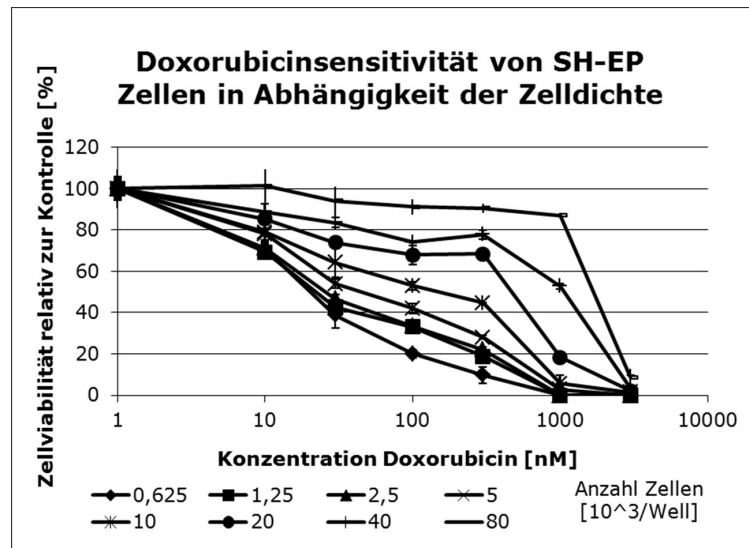
### 3.3 Weiterentwicklung des experimentellen Systems

Die Durchführung des Testscreens der F-box Proteine hatte die prinzipielle Funktionalität des entwickelten experimentellen Systems gezeigt. Die Tatsache, dass mit Fbxo5/Emi1, Fbxw11/ $\beta$ -TrCP2 und Fbxo45 erwartete Gene gefunden werden konnten, bestätigte die Funktionsfähigkeit des Systems. Nichtsdestotrotz wurden bereits während der Durchführung des Testscreens verschiedene Limitierungen des Systems augenscheinlich.

#### 3.3.1 Zelldichteabhängigkeit der Doxorubicinsensitivität

Es ist beschrieben, dass die Wirkung von Doxorubicin von der eingesetzten Zelldichte abhängig ist [47]. Bei der Durchführung des Screens und in der Validierung war jeweils ein deutlicher Zusammenhang zwischen eingesetzter Zelldichte und resultierender Apoptoserate zu beobachten. Da Exposition mit einer genau definierten Doxorubicinkonzentration ein essen-

tieller Punkt im Screen war, sollte untersucht werden, wie groß der Einfluss der Zelldichte auf die Wirkung von Doxorubicin in SH-EP Zellen ausfällt. Auf diese Weise konnte abgeschätzt werden, wie stark die Zelldichteabhängigkeit Ergebnisse im Screen beeinflusst.



**Abbildung 3.26** – Zelldichteabhängigkeit der Doxorubicinsensitivität von SH-EP Zellen. Die Doxorubicinsensitivität nimmt mit zunehmender Zelldichte ab. SH-EP Zellen wurden in verschiedenen Ausgangszelldichten zwischen  $0,625 \times 10^3$  und  $80 \times 10^3$  Zellen pro Well ausplattiert. Zellviabilität wurde nach drei Tagen Wachstum unter Doxorubicinexposition zwischen 1nM und 3000nM mit Hilfe eines Zellvitalitätstests (MTT) bestimmt. Dargestellt ist die Zellviabilität relativ zur unbehandelten Kontrolle.

Abbildung 3.26 zeigt die Doxorubicinsensitivität von SH-EP Zellen in Abhängigkeit der eingesetzten Zelldichte. Dargestellt ist jeweils die Zellviabilität relativ zur unbehandelten Kontrolle nach drei Tagen Wachstum unter Doxorubicinexposition bei verschiedenen Ausgangszellzahlen. Die Doxorubicinsensitivität der SH-EP Zellen nimmt mit ansteigender Zelldichte stark ab. Während die mittlere letale Dosis von Doxorubicin bei einer Ausgangszelldichte von weniger als 1.000 Zellen pro Well bei 20nM lag, war sie bei einer 100-mal höheren Ausgangszelldichte von 80.000 Zellen pro Well auf 2000nM 100-fach erhöht.

Aus diesen Daten konnte geschlussfolgert werden, dass die Doxorubicinsensitivität von SH-EP Zellen in erheblichem Maße von der eingesetzten Zelldichte abhängig ist. Es war anzunehmen, dass ein Teil der im Screen vermessenen, erhöhten Apoptoseraten auf verminderte Zelldichten zurückzuführen war. Die Proben im Screen waren jeweils parallel prozessiert worden, um vergleichbare Bedingungen zu ermöglichen. Gründe für die dennoch vorliegende Variabilität der Zelldichten waren möglicherweise die heterogene Qualität der Bibliotheks-DNA, die zu unterschiedlich vielen Puromycin resistenten Zellen führte, oder Positionseffekte in den 96-Wellplatten.

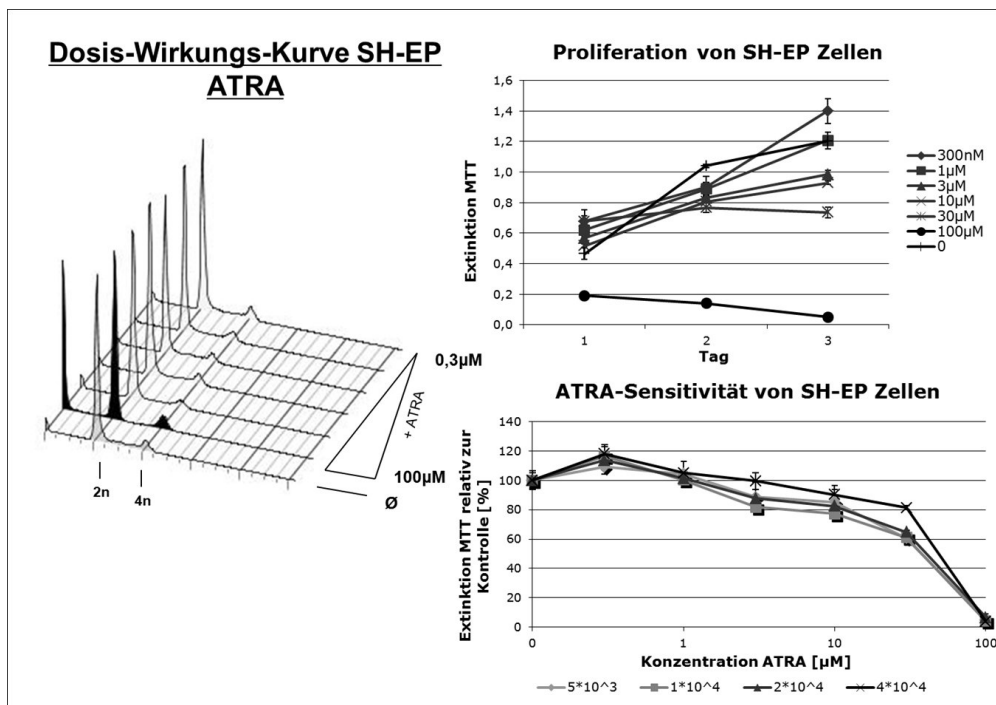
### 3.3.2 Alternative für Doxorubicin: all-trans-Retinsäure

Eine weitere Limitierung des Screens war der Einsatz von Durchflusszytometrie als Read-out. Das zeitaufwändige, sequentielle Vermessen einzelner Proben widerspricht grundsätzlich dem Ansatz eines Screens im Hochdurchsatzmaßstab. Für die Weiterentwicklung des eingesetzten Systems wäre ein schnellerer Read-out mit höherer Automatisierbarkeit von Vorteil. Neben Doxorubicin ist all-trans-Retinsäure (ATRA) eine bedeutende Substanz in der Therapie des Neuroblastoms, dessen Wirkmechanismus bis jetzt nicht gut verstanden ist [52]. Die Identifizierung von Faktoren, die die Wirkung von ATRA auf Neuroblastomzellen modulieren, wäre wie die Identifizierung von Modulatoren der Doxorubicinsensitivität hilfreich für die Entwicklung neuer Therapeutika für Neuroblastompatienten.

Die Wirkung von Doxorubicin steigt über einen breiten Konzentrationsbereich kontinuierlich an. ATRA hat demgegenüber den Vorteil, dass seine zytotoxische Wirkung auf Neuroblastomzellen in einem sehr engen therapeutischen Bereich oberhalb einer gut definierbaren Konzentration sprunghaft ansteigt [52]. Diese Eigenschaft kann in einem Screen ausgenutzt werden, bei dem Reporterzellen mit einer ATRA-Konzentration exponiert werden, die gerade unterhalb dieser zytotoxischen Schwelle liegt. Der kombinierte Einsatz von ATRA und shRNA-Expressionsvektoren gegen Faktoren, deren Inhibition zur Sensibilisierung der Reporterzellen gegenüber ATRA führt, würde unter diesen Bedingungen zu einer ausgeprägten Erhöhung der Zytotoxizität führen. Dieser Effekt würde sich in einer gegenüber der Negativkontrolle stark verminderten Zellzahl niederschlagen, die mit einem Zellvitalitätstest registrierbar wäre. Die dichotome Wirkung von ATRA unter und überhalb der zytotoxischen Schwelle in Verbindung mit einem gut automatisierbaren Zellvitalitätstest wäre daher eine gute Voraussetzung für die Durchführung eines Screens im Hochdurchsatz.

Die beschriebene Zelldichte unabhängige, dichotome Wirkungsweise von ATRA konnte in SH-EP Zellen gezeigt werden und bestätigte die Eignung von ATRA als potentiell zu untersuchendes Pharmakon für einen Screen, der über die Familie der F-box Proteine hinausgeht. Abbildung 3.27 zeigt die Dosis-Wirkungsbeziehung von ATRA-Exposition in SH-EP Zellen im Bereich zwischen  $0,3\mu\text{M}$  und  $100\mu\text{M}$ . ATRA-Konzentrationen bis  $30\mu\text{M}$  steigern die Apoptoserate von SH-EP Zellen gegenüber der Negativkontrolle kaum. Eine Zunahme der Konzentration auf  $100\mu\text{M}$  (schwarz) führte demgegenüber zu einem sprunghaften Anstieg der Apoptoserate. Dieser Befund korreliert mit dem Zellwachstum von SH-EP Zellen unter ATRA-Exposition. Während ATRA-Konzentrationen bis  $30\mu\text{M}$  lediglich proliferationsverlangsamend wirken, ist die Zellviabilität unter Exposition mit  $100\mu\text{M}$  ATRA schon nach 24h stark vermindert. Eine Dosis-Wirkungs-Kurve von ATRA nach drei Tagen Wachstum mit unterschiedlichen Ausgangszelldichten zeigt, dass die Wirkung praktisch nicht Zelldichte abhängig ist. Bei Ausgangszelldichten zwischen 5.000 und 40.000 Zellen war die schlagartige Zunahme der Zytotoxizität von ATRA zwischen  $30\mu\text{M}$  und  $100\mu\text{M}$  unverändert.





**Abbildung 3.27** – Dosis-Wirkungs-Kurve von all-trans-Retinsäure in SH-EP Zellen. Die Zytotoxizität von ATRA steigt oberhalb einer Konzentration von  $30\mu\text{M}$  sprunghaft an. Die Wirkung von ATRA auf die Proliferation von SH-EP Zellen ist dabei unabhängig von der eingesetzten Zelldichte. Die Zellviabilität von SH-EP Zelle in in verschiedenen Ausgangszelldichten wurde nach drei Tagen Wachstum unter ATRA-Exposition zwischen  $300\text{nM}$  und  $100\mu\text{M}$  mit Hilfe eines Zellvitalitätstests (MTT) bestimmt.

# Kapitel 4

## Diskussion

Trotz intensiver Bemühungen um eine Verbesserung der Prognose von Patienten mit Neuroblastom ist vor allem das Überleben von Hochrisikopatienten heutzutage immer noch nicht zufriedenstellend [1]. Zur Verbesserung der Langzeitüberlebensrate dieser Patienten ist es notwendig, die molekularen Mechanismen des Neuroblastoms besser aufzuklären und neue Therapieansätze auf zellulärer Ebene zu identifizieren. Funktionelle Forschung mit RNA-Interferenz bietet die Möglichkeit, eine Vielzahl von Genen in kurzer Zeit gezielt auf ihre Bedeutung hinsichtlich einer Eignung als Therapieziel zu untersuchen.

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, ein RNA-Interferenz basiertes, experimentelles System zu entwickeln, mit dem es möglich ist, potentielle therapeutische Ziele in einer Neuroblastomzelllinie zu identifizieren. Das entwickelte System wurde im Rahmen einer Pilotstudie mit einem Screen der Familie der F-box Proteine, einer bisher nicht umfassend charakterisierten Gruppe von Genen, die zentrale Aufgaben in der Zellregulation ausüben, getestet. Dabei konnten sowohl für das Neuroblastom als relevant geltende Gene als auch neue potentielle therapeutische Ziele in dieser Genfamilie identifiziert werden. Mit Hilfe dieses Screens war es möglich, die Güte des Systems zu bewerten, und Möglichkeiten für eine Weiterentwicklung abzuleiten.

Im Folgenden soll zunächst das entwickelte experimentelle System betrachtet werden, bevor auf die Ergebnisse des Screens und daraus hervorgehende Optimierungsmöglichkeiten der Komponenten des Systems eingegangen wird. Am Schluss erfolgt eine Diskussion über Perspektiven funktioneller Forschung in der Zukunft.

### 4.1 Experimentelles System

Bei der Entwicklung eines experimentellen Systems für einen Screen umfassen die über die Erfolgsaussichten entscheidenden Optimierungsschritte die Auswahl der zugrundeliegende Bibliothek und der Reporterzelllinie, sowie die Entwicklung eines hochauflösenden Assays und die Etablierung von internen Kontrollen [53].

### 4.1.1 shRNA-Bibliothek

Eines der wichtigsten Kriterien für die Auswahl der shRNA-Bibliothek für einen Screen ist eine möglichst hohe Effektivität, mit der die shRNA-Expressionsvektoren Gene inhibieren können. Je effektiver Gene inhibiert werden, desto deutlicher stellen sich Veränderungen des Phänotyps dar, die somit mit höherer Wahrscheinlichkeit im Screen registriert werden. Ein weiteres Kriterium ist das Vorliegen von erfolgreich durchgeführten Screens mit der infrage kommenden Bibliothek, die nicht nur bestätigen, dass die Bibliothek für einen Screen geeignet ist, sondern auch erlauben, die eigenen Ergebnisse mit anderen Arbeiten zu vergleichen.

Die Entscheidung für die shRNA-mir-Bibliothek von Openbiosystems war nicht Gegenstand der eigenen Arbeit, da sie bereits vor Beginn zur Verfügung stand. Sie kann als geeignete Bibliothek bewertet werden. Die Bibliothek basiert auf dem shRNA-mir-Expressionsvektor, einer Weiterentwicklung der ersten shRNA-Expressionsvektoren, der eine deutlich höhere RNA-Interferenzeffektivität zeigt [19]. Eigene Untersuchungen zur Inhibition von PLK1 und p53 bestätigten, dass circa ein Drittel der shRNA-mir-Expressionsvektoren der Bibliothek über eine sehr hohe Inhibitionseffektivität verfügen. Außerdem wurde sie bereits erfolgreich für zwei groß angelegte Hochdurchsatzscreens eingesetzt, die die Eignung der Bibliothek für die Durchführung eines Screens zeigen.

Schlabach et al. verglichen 2008 in einem genomweiten Screen den Einfluss der Inhibition verschiedener Gene auf Zellproliferation in vier unterschiedlichen Zelllinien. Sie konnten dabei Gene identifizieren, deren Inhibition in einzelnen, mehreren oder sogar in allen vier untersuchten Zelllinien wachstumsbegrenzend waren. Dabei fanden sie auch F-box Proteine, wie zum Beispiel Fbxo5/Emi1 [54]. Maier et al. 2009 verwendeten die Bibliothek zur Suche von Modulatoren der zirkadianen Rhythmie bei Säugern, bei der CK-2 als Hauptmodulator identifiziert werden konnte. Im Zusammenhang mit diesem Screen wurden auch die F-box Proteine Fbxl3 und Fbxw11/ $\beta$ -TrCP2 als Modulatoren zirkadianer Rhythmie entdeckt [21].

Dennoch war bereits während der Etablierungsarbeiten bekannt, dass die für den Screen zur Verfügung stehende Subbibliothek der Familie der F-box Proteine keine ausreichend hohe Repräsentation dieser Gene bereitstellt. Während 10 von 69 F-box Proteinen unrepräsentiert blieben, waren 13 mit ein oder zwei ungenügend und 28 weitere F-box Proteine mit jeweils drei bis fünf shRNA-mirs mittelmäßig repräsentiert. Angesichts der Erwartung, dass nur circa ein Drittel der shRNA-mir-Expressionsvektoren der Bibliothek über eine hohe Aktivität verfügen, war klar, dass die Bibliothek nicht für einen vollständigen Screen der Familie der F-box Proteine geeignet sein würde. Aufgrund der Tatsache, dass die Bibliothek im Rahmen von zwei Screens bereits F-box Proteine als relevante Faktoren einer Fragestellung identifizieren konnte, konnte davon ausgegangen werden, dass die Qualität Bibliothek für die Durchführung einer Pilotstudie, mit der zunächst die grundsätzliche Eignung des experimentellen Systems überprüft werden sollte, aber ausreicht.

### 4.1.2 Reporterzelllinie

An die Reporterzelllinie des experimentellen Systems wurde eine Reihe von Anforderungen gestellt. Analog zur Auswahl der shRNA-Bibliothek war es wünschenswert, eine Zelllinie zu verwenden, die sich bereits in anderen Arbeiten bewährt hatte, um über Vergleichsmöglichkeiten für die eigenen Ergebnisse zu verfügen. Weiterhin sollte die Zelllinie über eine hohe Doxorubicinresistenz verfügen, da sich eine Erhöhung der Doxorubicinsensitivität umso besser vermessen lässt, je höher die Ausgangsresistenz ist. Eine dritte Forderung war eine sehr gute Transduzierbarkeit sowie eine hohe Inhibitionsaktivität der shRNA-Expressionsvektoren der eingesetzten Bibliothek in der Reporterzelllinie als Voraussetzung für ausgeprägte und gut messbare Änderungen des Phänotyps.

Die Etablierungsarbeiten der eigenen Arbeit führten unter diesen Kriterien zur Auswahl der Neuroblastomzelllinie SH-EP als Reporterzelllinie. Es handelt sich dabei um eine vielfach verwendete Zelllinie, die unter anderem bereits in einer Arbeit zur Steigerung der Doxorubicinsensitivität und als Reporterzelllinie eines Neuroblastomscreens eingesetzt wurde [33, 55]. Die hohe Doxorubicinresistenz von SH-EP Zellen zeigte sich beim Vergleich mit verschiedenen anderen Tumorzelllinien, die deutlich über der Doxorubicinresistenz von SK-N-AS (Neuroblastom), HEK293T (menschliche embryonale Nierenzellen), U373 (Glioblastom) und U2OS Zellen (Osteosarkom) lag. Bei der anschließenden Bestimmung der zytostatischen Doxorubicinkonzentration von SH-EP Zellen wurde eine Konzentration von 300nM ermittelt. Dieser Wert war mit der in einer Arbeit von Fulda et al. 1999 verwendeten Konzentration von 183nM vergleichbar [55]. Die gute Transduzierbarkeit von SH-EP Zellen zeigte sich beim Vergleich der Transduzierbarkeit von SH-EP mit HEK293T Zellen, einer Zelllinie mit hoher Transduzierbarkeit [19]. SH-EP Zellen war dabei sogar geringfügig besser transduzierbar als HEK293T Zellen. Kontroll-shRNA-Expressionsvektoren gegen PLK1 und p53, deren hohe Aktivität vorher in HEK293T Zellen ausgetestet worden war, konnten auch in SH-EP Zellen einen deutlichen Effekt induzieren. Insgesamt konnte SH-EP daher als vom technischen Standpunkt aus gesehen optimale Zelllinie eingestuft werden.

### 4.1.3 Analyse des Phänotyps

Bei der Auswahl der optimalen Analysemethode der Änderung des Phänotyps der Reporterzelllinie wurde ein Kompromiss aus hohem Auflösungsvermögen sowie schneller und kostengünstiger Durchführbarkeit angestrebt.

#### **Doxorubicinsensitivität und Proliferationsverhalten**

Für die Suche nach Faktoren, die die Doxorubicinsensitivität der Reporterzelllinie steigern oder das Proliferationsverhalten verändern, wurde Durchflusszytometrie als Read-out eingesetzt. Auf diese Weise war es möglich, das Verhalten der Reporterzelllinie mit hohem Auflösungsvermögen zu vermessen, sodass gleichzeitig Aussagen über Apoptoseneigung, Zell-

proliferation oder auch Effekte wie Endoreplikation getroffen werden konnten, die bei der Inhibition von F-box Proteinen zu erwarten sind [8].

Durchflusszytometrie wurde bereits in verschiedenen Screens eingesetzt. Beispiele für auf Durchflusszytometrie basierende Screens sind die Identifizierung von Fbxo5/Emi1 als Regulator von Mitose durch Machida et al. 2007, die Entdeckung von Flt3 als negativer Regulator von IL-10 in T-Zellen, eines der wichtigsten antientzündlichen Zytokine, und die Aufklärung der Transkriptionsregulation von MHC-II durch Paul et al. 2011 [10, 56, 57]. Ein entscheidender Nachteil von Durchflusszytometrie ist der große Zeitaufwand. Paul et al. 2011 konnten auf automatisierte Durchflusszytometer zurückgreifen, die den Hauptteil der Arbeit durchführten. Auf diese Weise war es ohne Probleme möglich, tausende von Proben durchflusszytometrisch zu analysieren. Da diese Möglichkeiten für die Erstellung dieser Doktorarbeit nicht vorhanden waren, wurden nicht alle Teile des Screens mit Durchflusszytometrie durchgeführt.

### **Steigerung der Doxorubicinresistenz**

Die Suche nach Faktoren, deren Inhibition zur Erhöhung der Doxorubicinresistenz führt, wurde mittels negativer Selektion durchgeführt, in dem die Reporterzellen einer zytotoxischen Doxorubicinkonzentration ausgesetzt wurden. Die Etablierungsarbeiten der KontrollshRNA gegen p53 in Kapitel 3.1.2 hatten gezeigt, dass SH-EP Zellen, deren Doxorubicinresistenz durch Transduktion mit einem resistenzvermittelnden shRNA-Expressionsvektor zunimmt, unter diesen Bedingungen wieder minimal proliferieren. Diese Zellproliferation kann mit Hilfe eines Zellvitalitätstests gut aufgelöst werden. Aus diesem Grund kam der MTT-Zellvitalitätstest als Read-out für diesen Teil des Screens zum Einsatz.

Diese Art der negativen Selektion zur Suche nach Resistenz vermittelnden Faktoren ist in abgewandelter Form bereits in einer Reihe anderer Screens zum Einsatz gekommen, wobei oftmals gepoolte shRNA-Bibliotheken eingesetzt werden. Nach negativer Selektion der Reporterzellpopulation mit einem Stressor können shRNA-Expressionsvektoren, die sich unter Einwirkung des Selektionsdrucks innerhalb der Reporterzellpopulation anreichern, mittels PCR nachgewiesen werden und so Resistenz vermittelnde Faktoren identifiziert werden. Beispiele sind der Screen von Rato et al. 2010, in dem nach Faktoren gesucht wurde, deren Inhibition eine HIV-Infektion verlangsamt, oder der Screen von Nagaoka-Yasuda et al. 2007, in dem sich Retinolsaturase als Mediator von Resistenz gegenüber oxidativem Stress darstellte [22, 58].

#### **4.1.4 Interne Kontrollen**

Für den Screen war es notwendig, interne Kontrollen zu etablieren, die eine Aussage darüber erlauben, inwieweit der Screen in der Lage ist, zwischen shRNA-Expressionsvektoren, die einen Effekt auslösen, und solchen ohne Effekt zu unterscheiden. Für die Suche nach Modu-

latores von Doxorubicinsensitivität wurden daher interne Kontrollen eingesetzt, die sowohl einen positiven als auch einen negativen Einfluss auf die Doxorubicinsensitivität haben. Im Rahmen der Suche nach Faktoren mit Einfluss auf das Proliferationsverhalten kam ebenfalls eine interne Kontrolle für Wachstumsinhibition zum Einsatz. Mit shRNA-Expressionsvektoren gegen p53 und PLK1 wurden zwei tumorbiologisch bedeutsame Faktoren als interne Kontrollen ausgewählt. Während Inhibition von p53 Doxorubicinresistenz erhöht, steigert Inhibition von PLK1 die Doxorubicinsensitivität und induziert auch Wachstumsinhibition.

Die klare Steigerung von Doxorubicinresistenz durch Inhibition von p53 ist auch aus anderen Arbeiten bekannt [6]. Die shRNA gegen p53 war aber nicht nur aus technischen Gründen als interne Kontrolle für einen Screen geeignet, sondern spiegelt auch die biologische Relevanz dieses Proteins wider. Die Bedeutung von p53-Mutationen für Tumorigenese sind seit Jahrzehnten bekannt. Auch heute noch hat p53-Forschung große Bedeutung, da dieses Protein weitere Prozesse wie Differenzierung und embryonale Entwicklung steuert [59]. Speziell beim Neuroblastom ist p53 ein therapeutisch wichtiges Protein. Neuroblastompatienten mit Wildtyp p53 entwickeln häufige Resistenzen über eine Mutation oder den Verlust von p53 in den Tumorzellen im Verlauf der Therapie [60].

Die Inhibition von PLK1 führt zu einer generellen Erhöhung der Apoptoserate, die bereits ohne Einfluss zellulärer Stressoren zu beobachten ist. Da PLK1 als Proteinmodifikator in viele verschiedene zelluläre Signalwege eingreift, verschiebt PLK1-Inhibition das Verhältnis aus pro- und antiapoptotischen Signalwegen in Richtung Apoptose. Die basale Wahrscheinlichkeit, Apoptose auszulösen, die sich in Zellkultur trotz Abwesenheit zellulärer Stressoren in einem gewissen Prozentsatz apoptotischer Zellen äußert, wird somit erhöht. In Kapitel 3.1.4 wurde mit Hilfe einer Dosis-Wirkungs-Kurve gezeigt, dass PLK1-Inhibition über die Erhöhung der Apoptoserate zu einer Parallelverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve von Doxorubicin führt. Dieses Verhalten lässt sich auch bei anderen Proteinen finden, die die Doxorubicinsensitivität von Zellen modulieren. So beschrieben Peschiaroli et al. 2009 die Steigerung der Doxorubicinsensitivität von BT-20 Brustkrebszellen durch Inhibition von Fbxo45. Dabei sahen sie bereits bei unbehandelten Zellen eine Steigerung der Apoptoserate durch Inhibition von Fbxo45 [11].

Auch aus therapeutischer Sicht ist shRNA gegen PLK1 eine gut geeignete Positivkontrolle für einen Screen mit Neuroblastomzellen. Untersuchungen mit Xenograftmodellen haben gezeigt, dass bereits nanomolare Konzentrationen des PLK1-Inhibitors BI 2536 zum Zelltod von Neuroblastomzellen führen, während erst mikromolare Mengen BI 2536 für neuronale Stammzellen zytotoxisch sind. Dies verspricht eine gute therapeutische Breite des PLK1-Inhibitors [61]. Inzwischen wird die Einsatzbarkeit von BI 2536 für den Einsatz in der Therapie von verschiedenen soliden Tumoren im Rahmen einer klinischen Studie getestet.<sup>1</sup>

Die beiden internen Kontrollen p53 und PLK1 waren somit zwei gut geeignete Faktoren,

---

<sup>1</sup>BI 2536 in Treating Patients With Recurrent or Metastatic Solid Tumors, NCT00526149, National Cancer Institute (NCI)

um therapeutisch relevante Mechanismen, wie die Resistenzzunahme von Neuroblastomzellen im Verlauf der Therapie oder die Zunahme der Doxorubicinsensitivität durch einen Inhibitor nachzustellen. Im Verlauf der Etablierungsarbeiten in Kapitel 3.1.2 konnten shRNA-Expressionsvektoren gegen diese beiden Faktoren ausgewählt werden, über eine hohe Inhibitionsaktivität verfügen, was die theoretisch gut geeigneten internen Kontrollen auch praktisch umsetzbar machte.

#### 4.1.5 Trennschärfe

Mit Hilfe der internen Kontrollen konnte im Rahmen der Auswertung des Screens gezeigt werden, dass das experimentelle System über eine hohe Trennschärfe verfügt, da die internen Kontrollen bei der Auswertung aller Teile des Screens an den Extrema der Datensätze lagen. Auf diese Weise war es dem System möglich, unauffällige Proben und solche, die einen Effekt zeigen, sicher zu diskriminieren.

In der Auswertung der Zellzyklusprofile ohne Doxorubicinexposition in Kapitel 3.2.3 wurde über die Bestimmung des Verhältnis von G2- zu G1-Fraktion nach Änderungen des Proliferationsverhaltens gesucht. Die Anzahl an Zellen in G2 war bei beiden Positivkontrollen mit shRNA-mir-Expressionsvektoren gegen PLK1 mehr als  $3\sigma$  gegenüber dem Median erhöht. Auch in der Auswertung der Zellfraktionen mit polyploiden DNA-Gehalt hoben sich die Proben mit shRNA-mir-Expressionsvektoren gegen PLK1 deutlich ab. Die Zellfraktion mit polyploidem DNA-Gehalt war bei ihnen gegenüber der Negativkontrolle um mehr als das dreifache gesteigert. Das Verhalten der shRNA-mir-Expressionsvektoren gegen PLK1 zeigte, dass der Screen in der Lage war, shRNA-mir-Expressionsvektoren sicher zu identifizieren, die eine Änderung des Proliferationsverhaltens hervorriefen.

Auch bei der Suche nach F-box Proteinen, deren Inhibition zur Erhöhung der Doxorubicinresistenz führt, bestätigte das Verhalten der Positivkontrollen mit shRNA-Expressionsvektoren gegen p53 in Kapitel 3.2.4 die Fähigkeit des Screens, zwischen shRNA-mir-Expressionsvektoren mit und ohne Auswirkung auf die Doxorubicinresistenz zu unterscheiden. Die Zellviabilität der beiden Positivkontrollen mit shRNA-Expressionsvektoren gegen p53 war gegenüber der Negativkontrolle in beeindruckender Weise um  $15\sigma$  gesteigert.

Die Suche nach F-box Proteinen, deren Inhibition zur Steigerung der Doxorubicinsensitivität führt, zeigte in Kapitel 3.2.5 ebenfalls die Eignung des Systems, shRNA-mir-Expressionsvektoren mit positivem Einfluss auf die Doxorubicinsensitivität darzustellen. Während die shRNA-mir-Expressionsvektoren der Negativkontrolle keinen Einfluss auf die Doxorubicinsensitivität zeigten, war die Apoptoserate der Positivkontrollen gegenüber dem Median bis zu  $6\sigma$  erhöht. Der Screen war somit auch in diesem Teil des Assays in der Lage, auffällige shRNA-mir-Expressionsvektoren zu erkennen.

Das beschriebene Verhalten der internen Kontrollen war wie in Kapitel 3.2.2 dargestellt, in ähnlicher Weise in allen 7 Blöcken der Datenerhebung des Primärscreens reproduzierbar.

Dies zeigt die Robustheit des experimentellen Systems, shRNA-mir-Expressionsvektoren zu identifizieren, die einen Effekt auf das Proliferationsverhalten oder die Doxorubicinsensitivität ausüben. Insgesamt konnte die Trennschärfe der Analysemethoden als gut eingeschätzt werden. Daraus konnte gefolgert werden, dass F-box Proteine, die im Rahmen des Screens wider Erwarten unauffällig blieben, nicht auf Unzulänglichkeiten des experimentellen Systems zurückzuführen waren.

#### 4.1.6 Falsch positive Ergebnisse des Primärscreens

Trotz der guten Trennschärfe des Systems zeigte sich in der Validierung, dass ein Großteil der Ergebnisse aus der ersten Runde des Screens falschpositive Ergebnisse waren. Hauptgrund für die große Anzahl an falschpositiven Ergebnissen war die besonders niedrig angelegte Schwelle für eine Validierung von Proben von einer halben Standardabweichung. Auf diese Weise sollten falschnegative Ergebnisse vermieden werden, da diese im Gegensatz zu falschpositiven Ergebnissen nicht in einer Validierung identifiziert werden können. Die Schwelle wurde bewusst niedrig angesetzt, da F-box Proteinen durch die eingesetzte shRNA-mir-Bibliothek nur ungenügend repräsentiert waren. Weiterhin waren aufgrund der nur partiellen Inhibition durch shRNA-mir-Expressionsvektoren der Bibliothek lediglich geringe Auswirkungen auf die Apoptoserate zu erwarten, die nicht mit der biologischen Bedeutung dieser Gene korreliert. Im Zusammenhang mit dieser niedrigen Schwelle führte die Zelldichteabhängigkeit der Doxorubicinwirkung zu der hohen Zahl an falschpositiven Ergebnissen im Bereich knapp oberhalb der halben Standardabweichung. Die Unterschiede in der Zelldichte waren vor allem auf unterschiedliche Titer der eingesetzten Virusüberstände zurückzuführen. Aus diesem Grund war es unvermeidbar, dass die Puromycinselektion der Reporterzelllinie zu unterschiedlichen Zelldichten führte. Auf Optimierungsmöglichkeiten zu diesem Punkt wird in Kapitel 4.3.2 weiter eingegangen.

## 4.2 Ergebnisse des Screens der F-box Proteine

Die Funktionsfähigkeit des nach verschiedenen Gesichtspunkten optimierten, experimentellen Systems wurde mit einem Screen der F-box Proteine untersucht, einer kompakten Gruppe von 69 Genen, die Proteinstabilität modulieren und von denen einige Vertreter eine zentrale Rolle in der Regulation von Zellzyklus und Zelltod spielen. Der Großteil der Familie ist dagegen bisher kaum charakterisiert und scheint Tumorigenese wenig zu beeinflussen [34]. Der Screen ergab eine Reihe der erwarteten F-box Proteine, deren Bedeutung für Doxorubicinsensitivität und Proliferationsverhalten bekannt ist, sowie einige bisher nicht näher charakterisierte F-box Proteine.



### 4.2.1 Zellproliferation unter Inhibition von F-box Proteinen

Bei der Auswertung der Daten zur Zellproliferation, die mit Hilfe von Durchflusszytometrie gewonnen wurden, ergab sich das deutlichste Ergebnis des Screens. Zwei shRNA-mir-Expressionsvektoren gegen Fbxo5/Emi1 erhöhten in der ersten Runde des Screens die Fraktion an Zellen in der G2-Phase gegenüber dem Median um mehr als  $4\sigma$ . In der Validierung des Screens waren diese shRNA-mir-Expressionsvektoren erneut auffällig und bestätigten Fbxo5/Emi1 als Ergebnis des Screens. Daneben konnten keine weiteren F-box Proteine gefunden werden, deren Inhibition zu deutlichen Veränderung der Zellproliferation führt.

Dieser Befund war konsistent mit dem Ergebnis von zwei weiteren Screens, mit denen der Einfluss der Inhibition von F-box Proteinen auf Zellproliferation untersucht wurde. Machida et al. führten 2007 einen Screen der F-box Proteine durch, in dem sie mit Hilfe von siRNA nach F-box Proteinen suchten, die Einfluss auf die Zellzyklusregulation ausüben [10]. Auch bei diesem Screen wurde nur Fbxo5/Emi1 als Ergebnis publiziert. Es fehlen jedoch Angaben, ob in dem Screen tatsächlich nur siRNA gegen Fbxo5/Emi1 auffällig war, oder ob weitere F-box Proteine als mögliche Regulatoren des Zellzyklus identifiziert werden konnten.

Schlabach et al. verglichen 2008 in einem genomweiten Screen den Einfluss der Inhibition verschiedener Faktoren auf Zellproliferation in vier verschiedenen Zelllinien [54]. Die dabei eingesetzte shRNA-mir-Bibliothek enthielt auch die im Rahmen dieser Doktorarbeit verwendeten shRNA-mir-Expressionsvektoren gegen F-box Proteine. In einer der vier Zelllinien, einer menschlichen Mammaepithelzelllinie, hatten insgesamt 28 shRNA-mir-Expressionsvektoren gegen F-box Proteine einen Effekt auf die Zellproliferation. Unter den fünf shRNA-mirs gegen F-box Proteine mit den stärksten Effekten auf diese Zelllinie fand sich die gleiche shRNA-mir gegen Fbxo5/Emi1, die im Screen dieser Doktorarbeit auffällig war.

Die Kongruenz der Ergebnisse aus der Literatur und dem Screen bestätigt die Fähigkeit des eingesetzten experimentellen Systems, erwartete Faktoren zu finden und Ergebnisse vergleichbarer Screens zu reproduzieren. Dennoch stellt sich die Frage, warum entgegen der Erwartungen an einen Screen der F-box Proteine nicht weitere Faktoren mit einem Einfluss auf Zellproliferation gefunden werden konnten. Fbxl1/Skp2, Fbxw7 und Fbxw1/ $\beta$ -TrCP bzw. das Funktionsanalogon Fbxw11/ $\beta$ -TrCP2 sind F-box Proteine, von denen bekannt ist, dass sie direkt an Zellzyklusregulation beteiligt sind. Inhibition von Fbxl1/Skp2 führt zum Beispiel zu Polyploidie in Hepatozyten [50]. Dies ist bemerkenswert, da ein shRNA-mir-Expressionsvektor gegen Fbxw11/ $\beta$ -TrCP2 erwartungsgemäß nicht nur in der Reporterzelllinie des Screens sondern in Kapitel 3.2.9 auch in primären Lungenfibroblasten zu einer Erhöhung der Apoptoserate führte.

Für die Tatsache, dass neben Fbxo5/Emi1 keine weiteren F-box Proteine als relevante Modulatoren der Zellproliferation identifiziert werden konnten, lassen sich verschiedene Gründe finden. Neben Unzulänglichkeiten der eingesetzten Bibliothek sind redundante Funktionen von F-box Proteinen ein wesentlicher Punkt. Die Inhibition eines F-box Proteins

kann oft durch ein anderes F-box Protein kompensiert werden, ohne dass der Zelle daraus Funktionsverluste erwachsen. Erst die Inhibition von mehreren F-box Proteinen kann diese Änderungen forcieren. Gluschnaider et al. beschrieben 2010 beispielsweise eine deutliche Wachstumsverlangsamung einer Prostatazelllinie, die erst durch gleichzeitige Inhibition von Fbxw1/ $\beta$ -TrCP und Fbxw11/ $\beta$ -TrCP2 erreicht werden konnte [62].

Je nach betrachteter Zelllinie können die angesprochenen Redundanzen unterschiedlich ausfallen, sodass es denkbar ist, dass andere F-box Proteine mit einer anderen Reporterzelllinie als Modulatoren der Zellproliferation auffällig geworden wären. Der Screen von Schlabach et al. 2008, in dem der Einfluss der Inhibition verschiedener Faktoren auf Zellproliferation in vier verschiedenen Zelllinien untersucht wurde, bestätigt diese Vermutung. Es zeigte sich sehr deutlich, dass neben prominenten Faktoren wie PLK1 oder CDC16, die in allen vier Zelllinien für eine normale Zellproliferation essentiell waren, viele Faktoren nur in einer Auswahl der untersuchten Zelllinien wachstumslimitierend waren. Weiterhin zeigte der Vergleich zwischen den Zelllinien die unterschiedliche Bedeutung von Faktoren in Abhängigkeit der betrachteten Zelllinie. Während ein ubiquitär benötigter Faktor wie PLK1 in zwei der vier Zelllinien unter den 5 wichtigsten Faktoren für Zellproliferation lag, war die Bedeutung von PLK1 in den beiden anderen Zelllinien gegenüber anderen Faktoren deutlich nachrangig. Insgesamt scheint auch die singuläre Inhibition von F-box Proteinen in Abhängigkeit der betrachteten Zelllinie eine sehr unterschiedliche Bedeutung für Zellproliferation zu haben. Neben der erwähnten Mammaepithelzelllinie mit 28 auffälligen shRNA-Expressionsvektoren gegen F-box Proteine zeigten in einer der vier Zelllinien kein shRNA-Expressionsvektor und in den beiden anderen Zelllinien jeweils nur zwei shRNA-Expressionsvektoren gegen unterschiedliche F-box Proteine Effekte hinsichtlich der Zellproliferation.

#### 4.2.2 Doxorubicinresistenz unter Inhibition von F-box Proteinen

Obwohl die als interne Kontrolle verwendeten shRNA-Expressionsvektoren gegen p53 in der Lage waren, die Doxorubicinresistenz der Reporterzellen deutlich zu steigern, ergab die Auswertung des Screens kein F-box Protein, dessen Inhibition zu einer Erhöhung der Doxorubicinresistenz führt. Dieser negative Befund ist mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht auf das experimentelle System zurückzuführen, da die Zellviabilität der Proben mit shRNA-Expressionsvektoren gegen p53 bis zu  $15\sigma$  gegenüber der Negativkontrolle erhöht war. Der Assay war somit grundsätzlich in der Lage, Steigerungen der Resistenz zu vermessen.

Zur Einordnung dieses Ergebnis existieren nur wenig publizierte Daten. Auch wenn vor dem Screen nicht klar war, ob es F-box Proteine geben würde, deren Inhibition eine Steigerung der Doxorubicinresistenz herbeiführt, überrascht das Ergebnis dennoch nicht. Resistenz gegenüber Doxorubicin scheint in großem Maße über MDR-1 vermittelt zu werden. Watts et al. führten 2001 mit Hilfe von cDNA-Microassays Untersuchungen zu molekularen Mechanismen von Doxorubicinresistenz durch, indem sie doxorubicinsensitive Myelomzellen

in einem Medium mit zunächst niedriger und später hoher Doxorubicinkonzentration kultivierten und Veränderungen der Genexpression nachvollzogen [63]. MDR-1 war das bei diesen Analysen am auffälligsten hochregulierte Protein. Dieser in-vitro Befund konnte durch Oue et al. 2009 auch in-vivo bei verschiedenen pädiatrischen Tumoren wie dem Neuroblastom gefunden werden. Nach Ablauf einer Standardchemotherapie war die Expression von MDR1 bei einem Großteil des untersuchten Patientenkollektivs hochreguliert [64]. Obwohl SH-EP Zellen über eine hohe Doxorubicinresistenz verfügen, scheint MDR1 dafür nicht der ausschlaggebende Faktor zu sein. Porro et al. konnten 2010 sowohl zeigen, dass SH-EP Zellen MDR1 nur gering exprimieren, sowie dass die Induktion von MDR1 über eine MycN-Überexpression in SH-EP Zellen zu einer Erhöhung ihrer Doxorubicinresistenz führt [65].

Ein weiterer Induktor von MDR-1 ist YB-1, dessen Stabilität durch Fbxo33 negativ reguliert wird [66]. Eine Hypothese zu Beginn des Screens war daher die Erhöhung der Doxorubicinresistenz durch Inhibition von Fbxo33 und der daraus folgenden Disinhibition von YB-1. Konträr zu dieser Erwartung steigerte shRNA gegen Fbxo33 vielmehr die Doxorubicinsensitivität im Screen. Eine Mögliche Erklärung sind weitere, bisher nicht näher untersuchte Substrate von Fbxo33, die für diesen Effekt verantwortlich sind.

Bei der Bewertung des negativen Ergebnis muss in Betracht gezogen werden, dass der Screen primär für die Suche nach Faktoren zur Steigerung der Doxorubicinsensitivität optimiert war. Dementsprechend kam eine Zelllinie zum Einsatz, die von sich aus bereits eine hohe Doxorubicinresistenz mitbrachte. Es ist daher unklar, inwieweit die Doxorubicinresistenz über Modulation von MDR-1 in dieser Zelllinie noch steigerbar war. Die Tatsache, dass shRNA gegen p53 eine sehr deutlichen Steigerung der Doxorubicinresistenz induzieren kann, ist damit zu erklären, dass p53 ein direkter Regulator der Apoptose ist. Die Inhibition von p53 hat daher zwangsläufig dramatische Auswirkungen auf die Doxorubicinresistenz, wie es von der Entwicklungen von Therapieresistenzen durch Verlust von Wildtyp p53 bekannt ist [60].

Es stellt sich die Frage, ob mögliche Steigerungen der Doxorubicinresistenz durch Inhibition von F-box Proteinen zu klein waren, um sie mit einem Proliferationsassay darstellen zu können. Zur Beantwortung dieser Frage können die Durchflusszytometriedaten zur Suche nach F-box Proteinen, deren Inhibition zur Erhöhung der Doxorubicinsensitivität führt, zum Vergleich herangezogen werden. Bei diesem Teil des Assays wurde die Apoptoserate der Reporterzelllinie unter Exposition mit einer zytostatischen Doxorubicinkonzentration erhoben. Diese Daten weisen ein deutlich höheres Auflösungsvermögen als die Zellproliferationsdaten auf. Im Fall einer Steigerung der Doxorubicinresistenz wäre eine deutlich verringerte Apoptoserate wahrscheinlich gewesen. Es finden sich jedoch unter diesen Daten keine Proben, bei denen die Apoptoserate gegenüber der Negativkontrolle um mehr als  $1\sigma$  vermindert war. Es ist daher davon auszugehen, dass mit der eingesetzten Kombination aus Reporterzelllinie und verfügbarer shRNA-Bibliothek tatsächlich keine Steigerungen der Doxorubicinresistenz

zu beobachten waren und der negative Befund nicht auf Unzulänglichkeiten des eingesetzten experimentellen Systems zurückzuführen ist. Ein möglicher Grund könnte die lückenhafte Repräsentation der F-box Proteine durch die eingesetzte Bibliothek sein, sodass einige Vertreter im Screen nicht erfasst werden konnten. Weiterhin ist es denkbar, dass F-box Proteine in Bezug auf Doxorubicinresistenz im Vergleich zu Faktoren wie p53 und MDR-1 eine untergeordnete Rolle spielen.

### 4.2.3 Doxorubicinsensitivität unter Inhibition von F-box Proteinen

Tabelle 4.1 gibt eine Übersicht über die 6 F-box Proteine, die sich im Rahmen der Validierung als Ergebnisse des Screens bestätigten.

**Tabelle 4.1** – Validierung des Screens: Übersicht über F-box Proteine, deren Inhibition zur Erhöhung der Doxorubicinsensitivität führt

	<b>F-box Protein</b>	<b>(Potentieller) Mechanismus</b>
Erwartet	Fbxw11/ $\beta$ -TrCP2	Steigerung Apoptoserate durch Inhibition der Fbxw11/ $\beta$ -TrCP2 vermittelten Degradation von $\text{I}\kappa\text{B}$ [9].
	Fbxo3	Steigerung Apoptoserate durch Disinhibition von p53. Inhibition von Fbxo3 vermittelter Degradation der p53-Aktivatoren HIPK2 und p300 [67].
	Fbxo45	Steigerung Apoptoserate durch Disinhibition von p73. Inhibition von Fbxo45 vermittelter Degradation von p73 [11].
Unerwartet	Fbxo16	Funktion unbekannt
	Fbxo22	Effektorprotein von p53. Inhibition von Fbxo22 potentiell Chemoresistenz steigernd [68].
	Fbxo33	Kontrolle Stabilität des p53-Inhibitors YB-1. Inhibition von Fbxo33 potentiell Chemoresistenz steigernd [66].

Die F-box Proteine Fbxw11/ $\beta$ -TrCP2, Fbxo3 und Fbxo45 waren drei Proteine, die auch vor dem Screen als potentielle Kandidaten bekannt waren. Daneben wurden mit Fbxo22 und Fbxo33 zwei F-box Proteine gefunden, von denen man vom heutigen Stand der Forschung gesehen erwartet hätte, dass ihre Inhibition eine Zunahme der Doxorubicinresistenz herbeiführt [68, 66]. Die Charakterisierung dieser beiden F-box Proteinen ist jedoch noch nicht ausreichend, um ihre Bedeutung auf Doxorubicinsensitivität abschließend beurteilen zu können. Lutz et al. charakterisierten von Fbxo33 nur eines von mehreren Zielsubstraten. Somit verbleiben andere potentielle Zielsubstrate, wie Karyopherin beta 3 (KPNB3), Heat shock protein 1 beta (HSPCB), Heat shock protein 9B (HSPA9B) und DEAD box polypeptide 3 (DDX3X), die sie nicht näher untersuchten [66]. Von Fbxo22 ist bisher bekannt, dass es den

Abbau der Histondemethylase KDM4 vermittelt [69]. Es fehlen jedoch weitere Untersuchungen dazu, welche Auswirkungen die Inhibition von Fbxo22 auf Genexpression besitzt. Die Überlegung, dass Inhibition von Fbxo22 zu einer Steigerung der Doxorubicinresistenz führen kann, resultiert aus der Tatsache, dass Fbxo22 ein Effektorprotein von p53 ist [68].

Bei der Bewertung der Ergebnisse des Screens ist es schwer abzuschätzen, welche weiteren F-box Proteine potentielle Ergebnisse eines Screens zu Modulatoren der Doxorubicinsensitivität gewesen wären. Neben dem Screen von Machida et al. über F-box Proteine, die einen Einfluss auf Zellproliferation haben, existieren keine systematischen Untersuchungen zu F-box Proteinen [10]. Aus empirischen Studien zu verschiedenen F-box Proteinen waren 2009 27 von den 69 bekannten F-box Proteinen teilweise charakterisiert [34]. Zu vielen dieser F-box Proteine fehlt jedoch weiterhin eine genaue Aufstellung aller Zielsubstrate, sodass gesicherte Vorhersagen zum Verhalten der Zelle bei Verlust ihrer Funktion nicht immer möglich sind.

**Tabelle 4.2** – Erwartete Ergebnisse des Screens der F-box Proteine: Eine Übersicht zu F-box Proteinen, die aufgrund der über sie bekannten Daten als Kandidaten des Screens infrage kamen unter Angabe der Anzahl an verfügbaren shRNA-mir-Expressionsvektoren in der eingesetzten Bibliothek. Hervorgehoben sind F-box Proteine, die im Screen auffällig waren.

<b>F-box Protein</b>	<b>Zielsubstrate</b>	<b>Anzahl shRNA-mirs</b>
Fbxw1/ $\beta$ -TrCP	I $\kappa$ B	0
<b>Fbxw11/<math>\beta</math>-TrCP2</b>	I $\kappa$ B	5
Fbxw8	Cyclin D1	4
Fbxo4	Cyclin D1	4
Fbxo31	Cyclin D1	0
Fbxo18	(DNA-Schäden)	3
Fbxl1/Skp2	c-Myc, p27, ...	6
<b>Fbxo3</b>	Hipk2, p300	9
<b>Fbxo45</b>	p73	2

Tabelle 4.2 fasst aus den bekannten Daten zu F-box Proteinen diejenigen zusammen, die aufgrund ihrer Zielsubstrate als Modulatoren der Doxorubicinsensitivität und somit als Ergebnisse des Screen erwartet werden konnten [34]. shRNA-mir-Expressionsvektoren gegen F-box Proteine, die im Screen auffällig waren, sind hervorgehoben. Zwei der F-box Proteine in dieser Liste, Fbxw1/ $\beta$ -TrCP und Fbxo31, waren nicht durch die Bibliothek repräsentiert und konnten durch den Screen nicht gefunden werden. Bei Fbxw1/ $\beta$ -TrCP und Fbxw11/ $\beta$ -TrCP2 handelt es sich um Funktionsanaloga. shRNA-mir-Expressionsvektoren gegen Fbxw11/ $\beta$ -TrCP2 waren im Screen auffällig.

Unter der Liste der potentiellen Kandidaten finden sich neben dem in der Bibliothek fehlenden Fbxo31 zwei weitere F-box Proteine, deren Zielsubstrat Cyclin D1 ist. Diese F-box Proteine induzieren einen G1-Arrest über die Degradation von Cyclin D1. Santra et al. beschrieben 2009 explizit eine Erhöhung der Apoptoserate von  $\gamma$ -bestrahlten Melanozyten, bei denen Fbxo31 inhibiert war. Fbxo31 wäre daher ein sehr wahrscheinlicher Kandidat des

Screens gewesen. Im Gegensatz zu Fbxo31 konnten Santra et al. jedoch keine Hochregulation von Fbxo4 oder Fbxw8 bei DNA-Schädigung feststellen. Sie schlossen aus diesem Befund bereits, dass Fbxo31 von den drei F-box Proteinen, die Cyclin D1-Stabilität kontrollieren, das für DNA-Schädigungen relevanteste F-box Protein ist [70]. Dieser Zusammenhang kann erklären, warum shRNA-mir-Expressionsvektoren gegen Fbxo4 und Fbxw8 im Screen nicht auffällig waren.

Fbxo18 ist ein F-box Protein, das im Zusammenhang mit der Reparatur von DNA-Schäden als F-box DNA Helikase Fbh1 bekannt ist [71]. Eine Modulation von Doxorubicinsensitivität war daher möglich, bestätigte sich jedoch nicht im Screen. Auch shRNA-mir-Expressionsvektoren gegen Fbxl1/Skp2 blieb in dem Screen unauffällig. Da es durch 6 shRNA-mirs repräsentiert war, ist es unwahrscheinlich, dass dieses Ergebnis auf die shRNA-Bibliothek zurückzuführen ist.

Das Ergebnis spiegelt wider, dass nur einige wenige F-box Proteine, trotz ihrer zentralen Funktion als Regulatoren von Proteinstabilität, Doxorubicinsensitivität modulieren zu scheinen. Möglicherweise existieren genügend redundante Signalwege in der Zelle, um den Verlust der meisten F-box Proteine ausgleichen zu können. Hinweise dafür finden sich bei Xia et al. 2007 und Westmoreland et al. 2009, die unabhängig voneinander Modulatoren der Doxorubicinsensitivität mittels eines Screens in *S. cerevisiae* suchten. Dabei fanden sie vor allem Orthologe von menschlichen Genen, die unmittelbar in die Reparatur von DNA-Schäden involviert sind [72, 73]. Dies ist konsistent mit dem Wirkmechanismus von Doxorubicin, der auf der Induktion von DNA-Schäden basiert. Es fanden sich jedoch keine Orthologe von menschlichen F-box Proteinen unter den Faktoren, die für die Modulation von Doxorubicinsensitivität verantwortlich waren.

Auch bei der Modulation der Sensitivität anderer Chemotherapeutika scheinen die meisten F-box Proteine von untergeordneter Wichtigkeit zu sein: In einem Screen, in dem nach Modulatoren von Paclitaxelsensitivität in einer Lungenkarzinomzelllinie gesucht wurde, fanden Whitehurst et al. 2007 mit Fbxo18 nur ein einziges F-box Protein, dessen Inhibition die Sensitivität von Paclitaxel steigert [74]. In dem Screen wurden jeweils vier siRNAs gegen das gleiche Gen parallel transfiziert. Die Spezifität des siRNA-Gemischs gegen Fbxo18 wurde von Whitehurst et al. nicht validiert, sodass es möglich ist, dass dieser Befund auf einem zielgenunabhängigen Effekt basiert. Der Wirkmechanismus von Paclitaxel wird im Gegensatz zu Doxorubicin nicht über direkte DNA-Schäden vermittelt, sondern Paclitaxel verhindert den Abbau von Mikrotubuli. Behandelte Zellen werden in der Mitose blockiert, und gehen entweder in Apoptose oder verlassen die Mitose ohne erfolgte Zellteilung. Analog zu diesem Wirkmechanismus wurden viele Faktoren als Modulatoren der Paclitaxelsensitivität gefunden, die im Zusammenhang mit Mikrotubulusaufbau und -abbau stehen.

Nichtsdestotrotz wurden drei erwartete F-box Proteine gefunden. Von dem shRNA-mir-Expressionsvektor gegen Fbxo45 konnte nachgewiesen werden, dass er die mRNA-Mengen von Fbxo45 um bis zu 60% reduziert. Zusätzlich existieren Hinweise, dass Inhibition von

Fbxo45 möglicherweise in untransformierten primären Lungenfibroblasten nicht zu einer Steigerung der Doxorubicinsensitivität führt. Dies lässt den Schluss zu, dass das eingesetzte System und die gewählte Strategie des Screens im Rahmen der Möglichkeiten erfolgreich war. Es scheint daher sinnvoll, die Bemühungen zur Suche von Faktoren, deren Inhibition zur Steigerung von Doxorubicinsensitivität führt, auf weitere Gengruppen auszuweiten.

#### 4.2.4 Ausblick Phosphatasen und Kinasen

Bereits 2005 wurde der bedeutende Einfluss von Phosphatasen und Kinasen auf Chemoresistenz von HeLA-Zellen mit Hilfe eines siRNA-Screens gezeigt. 73 der 650 bekannten Kinasen und 72 der 222 bekannten Phosphatasen waren an der Modulation von Chemoresistenz in der untersuchten Zelllinie beteiligt [75]. Ein Screen, der die Inhibition von Kinasen und Phosphatasen mit zellulärem Stress, zum Beispiel ausgelöst durch Doxorubicin, kombiniert, ist daher ein sinnvoller Schritt hin zur Identifizierung von neuen Therapiezielen des Neuroblastoms. 2011 wurde mit einem Screen menschlicher Kinasen von Cole et al. der Einfluss ihrer Herunterregulierung auf die Proliferation von Neuroblastomzellen untersucht. Dabei wurde CHK-1 als Therapieziel des Neuroblastoms identifiziert [44]. Auch wenn CHK-1 schon vorher als potentiell Therapieziel für Tumoren bekannt war, bestätigt dieser Screen die Bedeutung von Phosphatasen und Kinasen im Neuroblastom [76].

### 4.3 Weiterentwicklung des experimentellen Systems

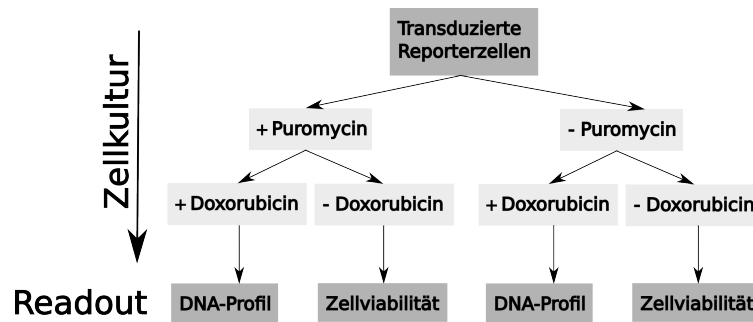
Der Screen der F-box Proteine hat gezeigt, dass das Ziel der Doktorarbeit, die Entwicklung eines experimentellen Systems zur Identifizierung potentieller therapeutischer Ziele in SH-EP Neuroblastomzellen, erreicht wurde. Vor allem aufgrund des bei einigen shRNA-mirs auftretenden, niedrigen Virustiters ergab der Screen der F-box Proteine falschpositive Ergebnisse im Zellviabilitätstest und in der durchflusszytometrischen Vermessung der Doxorubicinsensitivität. Letzteres ist auf die durch fehlende Puromycinresistenz bedingte, reduzierte Zelldichte zurückzuführen, die mit einer erhöhten Doxorubicinsensitivität einhergeht (siehe Kapitel 3.3.1).

#### 4.3.1 Assay

Auf den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Vorarbeiten aufbauend wurde ein optimiertes Protokoll entwickelt, mit dem es möglich ist, falsch positive Ergebnisse, die auf niedrige Virustiter zurückgehen, zu identifizieren. Das Protokoll hat seine Zuverlässigkeit in einem Phosphatasescreen bereits unter Beweis gestellt.<sup>2</sup>

Abbildung 4.1 illustriert das dahinterstehende Konzept. Die Reporterzellen werden zunächst mit den Puromycinresistenz vermittelnden shRNA-Expressionsvektoren transduziert.

<sup>2</sup>Die Versuche wurden von Dipl.-Biol. Steffi Prieskorn durchgeführt.



**Abbildung 4.1** – Schema zur Weiterentwicklung des experimentellen Systems: Reporterzellen werden in An- und Abwesenheit von Puromycin kultiviert. Im zweiten Teil des Screens erfolgt die Analyse der Zellen mit Durchflusszytometrie nach Wachstum unter Doxorubicin sowie ein Zellviabilitätstest nach Wachstum ohne Doxorubicin. Eine niedrigere Zellviabilität von Zellen nach Puromycinkultur im Vergleich zu Kultur ohne Puromycin weist auf einen niedrigen Virustiter hin.

Anschließend erfolgt die Kultur in An- und Abwesenheit von Puromycin. Im zweiten Teil des Screens werden die Zellen dann nach Wachstum unter Doxorubicinexposition mittels Durchflusszytometrie und nach Wachstum ohne zusätzlichem Stress mittels Zellviabilitätstest analysiert. Wenn die Zellviabilität der Zellen nach Kultur in Puromycin deutlich geringer ist als nach Kultur ohne Puromycin, deutet dies auf einen niedrigen Virustiter und fehlende Puromycinresistenz hin. In diesem Fall ist diese Probe von der Auswertung des Screens auszuschließen.

### 4.3.2 shRNA-Bibliothek

Eine Verbesserung der shRNA-Bibliothek wäre ein weiterer, möglicher Optimierungsschritt für das System. Der Screen im Rahmen dieser Arbeit bestätigte die prinzipielle Einsatzbarkeit der Bibliothek, in dem mit Fbxo5/Emi1 eines der prominentesten F-box Proteine identifiziert wurde. Nichtsdestotrotz zeigt die Aufstellung der Ergebnisse, dass mit Fbxw1/ $\beta$ -TrCP und Fbxo31 zwei wahrscheinliche Ergebnisse nicht gefunden werden konnten, und es daher möglich ist, dass weitere F-box Proteine aufgrund ihrer ungenügenden Repräsentation nicht identifiziert werden konnten. Es wäre daher wünschenswert, dass die shRNA-Bibliothek jedes Gen mit einer hohen Anzahl an unterschiedlichen shRNAs abdeckt. Zusätzlich ist es notwendig, dass die Bibliothek nur über validierte shRNAs verfügt, die keine zielgenunabhängigen Effekte induzieren und deren Inhibition des jeweiligen Zielgens auf mRNA-Ebene per PCR nachgewiesen ist. Während heutzutage verfügbare shRNA-Bibliotheken über Inhibitionseffizienzen verfügen, die abhängig von dem jeweiligen shRNA-Expressionsvektor zwischen 0% und über 90% sehr stark streuen, müsste jeder shRNA-Expressionsvektor der Bibliothek generell über eine Inhibitionseffizienz von mehr als 90% verfügen, um die Trennschärfe



eines Screens maximieren zu können.<sup>3,4</sup> Mit diesen Bedingungen wäre sichergestellt, dass negative Befunde nicht aufgrund von Lücken in der shRNA-Bibliothek entstehen.

### 4.3.3 Reporterzelllinie

Die technische Eignung von SH-EP als Reporterzelllinie mit hoher Doxorubicinresistenz und guter Transduzierbarkeit bestätigte sich auch im Screen. Dennoch haben SH-EP Zellen den Nachteil, nicht über eine für das Neuroblastom oft sehr charakteristische MycN-Amplifikation zu verfügen. Otto et al. 2009 setzten SH-EP Zellen für ihren Neuroblastomscreen sogar als Negativkontrolle für die Spezifität von Ergebnissen bezüglich MycN-Amplifikation ein [33]. Die Tatsache, dass mit SH-EP Zellen keine Ergebnisse gefunden werden können, die im direkten Zusammenhang mit einer MycN-Amplifikation stehen, kann jedoch auch als Vorteil ausgelegt werden. Die Ergebnisse, die mit SH-EP Zellen als Reporterzelllinie gefunden werden, haben mit höherer Wahrscheinlichkeit eine über die MycN-Amplifikation hinausgehende Relevanz für Tumorerkrankungen und somit allgemeinere Gültigkeit. Die Alternative, eine MycN-amplifizierte Zelllinie einzusetzen, hätte daher möglicherweise den Nachteil, allgemein gültige Therapieziele nicht darstellen zu können. Als Option für die Fortsetzungen der Screeningbemühungen für das Neuroblastom wäre es denkbar, eine zweite MycN-amplifizierte Reporterzelllinie hinzuzunehmen. Auf diese Weise könnte die MycN-Spezifität der Ergebnisse zugeordnet werden.

### 4.3.4 Alternative all-trans-Retinsäure

Anthrazykline gehören zu den effektivsten Chemotherapeutika in der Krebstherapie. Eine Aufklärung der Modulatoren ihrer Wirkung ist daher ein relevantes Thema für einen Screen. Daher ist es unglücklich, dass ein Screen mit Doxorubicin durch die Zelldichte abhängige Wirkung von Doxorubicin limitiert ist. Es wurde bereits angesprochen, dass das Ausweichen auf einen anderen Stressor wie zum Beispiel all-trans-Retinsäure (ATRA) eine prinzipielle Möglichkeit ist, das durch die Zelldichteabhängigkeit Doxorubicins verursachte Rauschen des Screens zu vermindern. Wenn man bedenkt, dass die Ergebnisse von Screens zu Modulatoren der Doxorubicin- bzw. Paclitaxelsensitivität von Xia et al. 2007 und Westmoreland et al. 2009 bzw. Whitehurst et al. 2007 jeweils eine deutliche Anreicherung von Genen aufwiesen, die direkt mit der Wirkungsweise des untersuchten Chemotherapeutikums im Zusammenhang standen, ist es wahrscheinlich, dass ein breit angelegter Screen mit ATRA bzw. Doxorubicin zu teilweise unterschiedlichen Ergebnissen kommen würde [72, 73, 74]. Ein Ausweichen auf einen anderen Stressor würde daher zwar die technische Durchführbarkeit des Screens

---

<sup>3</sup>A Validated Library of Lentiviral shRNAmir Targeting Cancer Genes; Open Biosystems, Inc. Huntsville, Alabama

<sup>4</sup>MISSION™ TRC shRNA library Validation; Gregory A. Wemhoff, Functional Genomics Group, Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis

erhöhen, aber gleichzeitig verhindern, dass Doxorubicin spezifische Modulatoren gefunden werden können.

### 4.3.5 Read-out

Um Aussagekraft eines weiteren Screens zu erhöhen, wäre eine deutliche Erhöhung der shRNAs pro Gen oder alternativ die Durchführung des Screens in Triplikaten oder besser sogar Sextuplikaten wünschenswert. Beide Möglichkeiten würden es erlauben, Einflussfaktoren wie der Zelldichte entgegenzuwirken, und so das Rauschen und die Anzahl an falschpositiven Ergebnissen minimieren zu können. Beide hätten jedoch zur Bedingung, dass ein zeitlich wenig aufwendiger Read-out eingesetzt wird. Durchflusszytometrie ist für einen breit angelegten Screen mit tausenden Proben ohne Vollautomatisierung nur bedingt geeignet. Bei der Entwicklung des Assays wurde bereits angesprochen, dass der optimale Read-out ein schnelles, automatisierbar auslesbares System wäre, das nur bei Ablauf von Apoptose ein spezifisches Signal liefert. Dieses System wäre einem Read-out, der Zellvitalität misst, überlegen. Ein Zellvitalitätsassay ist auf einen Vergleich mit Kontrollzellen angewiesen, wobei entschieden werden muss, welche Verringerung der Zellvitalität als auffällig klassifiziert wird.

Kommerzielle Apoptosesensoren, bei denen ein Substrat durch bei Apoptose aktivierte Caspasen umgesetzt wird und die ein automatisiert auslesbares Signal liefern, wären eine gute Option. Sie lassen sich jedoch aufgrund der immensen Kosten pro Reaktion nur schwer für einen Screen einsetzen, bei dem zehntausende Messungen erforderlich sind. Ein Beispiel für die generelle Realisierbarkeit dieses Ansatzes bietet der Screen von Duan et al. 2010, in dem basierend auf einem kommerziellen Apoptosesensor nach Kinasen gesucht wurde, deren Inhibition zu Apoptose in Osteosarcomzellen führt [77]. Dieser Screen war in der Lage, PLK1 als potentiell Ziel für die Therapie des Osteosarcoms zu identifizieren. Wenn man bedenkt, dass Spänkuch et al. schon 2002 die Eignung von PLK1 als potentiell Ziel in der Krebstherapie beschrieben, ist das Verhältnis aus Aufwand und Nutzen des Ergebnis von Duan et al. jedoch fragwürdig, da allein die Kosten für das Substrat des Apoptosesensors nicht unerheblich gewesen sein dürften.

Eine Alternative für kommerzielle Apoptosesensoren mit Substratumsatz wäre ein intrazellulärer Apoptosesensor, der bei Ablauf der Apoptose ein Signal, wie zum Beispiel Lumineszenz oder Fluoreszenz auslöst, das dann ebenfalls automatisiert ausgelesen werden kann und mit dem die Menge an apoptotischen Zellen einer Zellpopulation quantifiziert werden kann. Es existieren bereits Beispiele für solche Reporterkonstrukte. Laxman et al. beschrieben 2002 ein Reportermolekül mit einer Schnittstelle für Caspase-3, das nach Umsetzung durch Caspase-3 über Luciferaseaktivität verfügt. Auf diese Weise kann Apoptose spezifisch über Luciferaseaktivität nachgewiesen werden. Laxman et al. verwendeten dieses System, um die Caspaseaktivierung von Gliomzellen, die dieses Reportermolekül stabil exprimierten, in Mäusen unter Exposition mit TRAIL (Tumornekrosefaktor-verwandter

Apoptose-induzierender Ligand) in Echtzeit nachzuverfolgen [78]. Ein auf diesem Prinzip basierendes Reporterkonstrukt für Apoptose, mit dem die eingesetzte Reporterzelllinie zuvor stabil transduziert wird, würde es erlauben, die Automatisierbarkeit des Screens deutlich zu erhöhen und gleichzeitig eine Verringerung des Rauschens des Assays über eine Durchführung in Sextuplikaten ermöglichen.

Eine noch bessere Möglichkeit bestünde im Einsatz von automatisierter Mikroskopie als Read-out. Die Bewertung morphologischer Veränderungen der Reporterzelllinie eines Screens ermöglicht es, wesentlich differenziertere Informationen über das Verhalten der Zellen zu erhalten als es beispielsweise mit der eindimensionalen Erhebung der Apoptoserate der Fall ist. Die Daten des Screens können im Nachhinein auch auf andere Parameter hin überprüft werden. Insgesamt ist der Informationsgehalt und die Flexibilität von Mikroskopie jedem anderen Read-out deutlich überlegen. Mikroskopie hat im Gegenzug den Nachteil, dass die Etablierung eines Screens mit automatisierter Mikroskopie sehr komplex ist. Allein die Anschaffung eines Mikroskops, das automatisiert Bilder im Hochdurchsatz verlässlich anfertigt kann, ist sehr kostenintensiv. Weiterhin ist das automatisierte Erstellen von Bildern ansich eine nicht-triviale Aufgabenstellung. Vor allem die exakte Justierung der Fokusebene für das Anfertigen der Bilder stellt eine große Herausforderung dar, da das Mikroskop in der Lage sein muss, selbstständig die optimale Fokusebene einzustellen. Auch die Auswertung von mit automatisierter Mikroskopie angefertigten Bildern ist eine anspruchsvolle Aufgabe, die die Zusammenarbeit mit Bioinformatikern erfordert. Die Verarbeitung großer Mengen an Bildern kann nur mit Hilfe einer Software umgesetzt werden, für die vorher genau festgelegt werden muss, wie die Morphologie der Zellen bewertet werden soll, und welche Änderungen dabei als auffällig eingeordnet werden sollen. Während heutzutage bereits gute Mikroskope für die automatisierte Erstellung von Bildern im Hochdurchsatz existieren, ist vor allem die Auswertesoftware für diese Daten noch in der Entwicklung [79].

## 4.4 Funktionelle Genomik in der Zukunft

Die Auswertung des Screens der F-box Proteine im Rahmen dieser Doktorarbeit hat gezeigt, dass das entwickelte experimentelle System grundsätzlich Faktoren identifizieren kann, die im Zusammenhang mit der Wirkung von Doxorubicin stehen. Weiterhin wurden technische Limitierungen deutlich, für die verschiedene Optimierungsmöglichkeiten bestehen. Weitergehende Screeningbemühungen können auf diese Weise sicherlich angegangen werden, die dann auch zu Ergebnissen führen werden, die vergleichbar sind mit bisher veröffentlichten Screens.

In den vergangenen Jahren wurde eine große Zahl an Screens zu unterschiedlichen Fragestellungen im Bereich der Tumorforschung, aber auch bezüglich anderer biologischer Themen erfolgreich durchgeführt. Dennoch stellt sich die Frage, ob der bisher gewählte Ansatz der Screens auch in der Zukunft weiter fortgesetzt werden sollte. Trotz des Erfolgs von groß angelegten Screens muss kritisch angemerkt werden, dass sich die Ergebnisse bisher oft nur

auf schon lange bekannte Faktoren begrenzten. Hierfür lassen sich viele Beispiele anführen, wie zum Beispiel PLK1 als Ergebnis des Osteosarcomscreens von Duan et al. 2010, das bereits vor 2003 bekannte CK-2 als Ergebnis des Screens von Maier et al. 2009 zur Regulierung der zirkadianen Rhythmie oder auch CHK-1 als Ergebnis eines Screens zu Therapiezielen des Neuroblastoms von Cole et al. 2011 [77, 21, 80, 44, 76]. Die Leistung dieser Screens soll damit nicht infrage gestellt werden. Auch wenn aus diesen Screens keine neuen therapeutischen Konsequenzen erwachsen, zeigen sie jedoch, dass das Prinzip von Screens mit RNA-Interferenz funktioniert.

Nachdem heutzutage klar geworden ist, dass ein gut geplanter Screen zuverlässige Ergebnisse liefern kann, stellt sich vielmehr nun die Frage, wonach gesucht werden sollte. Es ist unwahrscheinlich, dass für jede Krebserkrankung ein essentielles Protein existiert, das als Ansatzpunkt für eine vollständig kurative Therapie dienen kann. Vielmehr ist die Entstehung einer Krebserkrankung ein komplexer Prozess, an dem viele Faktoren beteiligt sind. Der Screen der F-box Proteine hat verdeutlicht, dass neben Faktoren, deren Inhibition zu dramatischen Effekten führt, auch viele Faktoren existieren, die jeweils für einen moderaten Beitrag zur Zellregulation verantwortlich sind. Die meisten Screens setzen für potentielle Kandidaten eine Schwelle, die dazu führt, dass der Screen zu einer handhabbaren Zahl von Ergebnissen führt. Auf diese Weise wird jedoch für Faktoren mit großer Bedeutung selektiert, und ein Teil der beteiligten Faktoren bereits von vornherein ausgeschlossen. Eine weitere Schwierigkeit besteht in Redundanzen von Signalwegen, die dazu führen, dass die Inhibition eines Faktors durch einen anderen Faktor kompensiert werden kann, sodass die resultierende geringfügige Veränderung des Phänotyps nicht mit der Bedeutung des Faktors selber korreliert.

Es scheint daher sinnvoll, in der Zukunft nicht mehr nur nach einzelnen Faktoren zu suchen, sondern der Tatsache Rechnung zu tragen, dass Krebsentstehung ein komplexer Prozess ist, der insgesamt besser verstanden werden muss, um daraus Konsequenzen für Therapiemöglichkeiten zu ziehen. Für die Fortsetzung von Screens wäre es daher sinnvoll, nach Beziehungen zwischen den gefundenen Faktoren zu suchen, und das Netzwerk aufzuklären, innerhalb dessen die einzelnen Faktoren zusammen Krebs hervorrufen. Ein Screen sollte also nicht mehr Möglichkeit aufgefasst werden, einen einzigen Faktor zu isolieren, sondern eine Fragestellung systematisch aufzuklären.

Ein Beispiel für diese Art der Annäherung an eine komplexe Frage bietet der Screen von Paul et al. 2011 [56]. In diesem Screen ging es unter anderem um die Aufklärung der Transkriptionsregulation von MHC-II. Zunächst wurde in einem primären Screen nach Faktoren gesucht, die die Antigenpräsentation über MHC-II allgemein beeinflussen. Es wurden insgesamt 276 Kandidaten identifiziert. In einem sekundären Screen wurde unter den gefundenen 276 Kandidaten nach Proteinen gesucht, die speziell die Transkription von MHC-II beeinflussen. Insgesamt konnten 9 Faktoren gefunden werden. Jeder dieser 9 Faktoren wurde anschließend einzeln inhibiert, und dabei die Expression der anderen 8 Faktoren ver-

messen. Aus diesen Daten konnte ein Netzwerk erstellt werden, das die unterschiedlichen Abhängigkeiten dieser Faktoren untereinander und den Mechanismus, mit dem sie MHC-II Transkription kontrollieren, darstellt. Paul et al. integrierten für die Systematisierung ihrer Kandidaten des Primärscreens auch Daten einer Expressionsdatenbank. Heutzutage sind inzwischen große Datenmengen zur Genexpression praktisch aller Gene in den verschiedensten Gewebetypen verfügbar. Die Kombination eigener Daten mit diesen extern verfügbaren Daten erlaubt es, eigene Befunde schneller einzuordnen oder sogar besser zu verstehen. Auch dies ist ein Prinzip, auf das in Screens der Zukunft stärker eingegangen werden muss.

Ein anderer Aspekt der funktionellen Genomik, der in der Zukunft adressiert werden muss, sind die Bedingungen, unter denen Versuche stattfinden, und wie nahe sie den physiologischen Bedingungen im Patienten kommen. Bei der Auswahl der Reporterzelllinie im Rahmen dieser Doktorarbeit, aber sicherlich auch bei den meisten anderen Screens, stand bzw. steht zunächst die Frage im Raum, wie stabil die Eigenschaften dieser Zelllinie in der Zellkultur sind. Nur eine Reporterzelllinie mit guter Kultivierbarkeit kommt für einen Screen infrage. Es stellt sich die Frage, welchen Einfluss die künstlichen Bedingungen der Zellkultur auf die Ergebnisse von Screens haben. Nicht nur die Selektion einer besonders gut wachsenden Reporterzelllinie, sondern auch die Abwesenheit anderer Zelltypen, wie zum Beispiel Stromazellen oder Immunzellen, schaffen Bedingungen, unter denen nach krebsrelevanten Faktoren gesucht werden, die als eher unphysiologisch zu bewerten sind.

Eine Möglichkeit diese Bedingungen zu verbessern wären zum Beispiel in-vivo Versuche. Es ist denkbar, eine vollständige shRNA-Bibliothek so in eine Zelllinie zu transduzieren, dass jede Zelle mit einem shRNA-Expressionsvektor transduziert wird. Mit dieser Zelllinie könnte dann in einer Maus ein Tumor induziert werden. Nach einiger Zeit würden die Zellen aus dem Tumor präpariert werden, und anschließend könnte zum Beispiel per PCR bestimmt werden, welche shRNA-Expressionsvektoren der Bibliothek im Tumor angereichert bzw. abgereichert wurden. Diese Art des Screens würde deutlich physiologischere Bedingungen erreichen als heutige in-vitro Versuche. Richtungsweisend sind hierbei die Arbeiten von Zender et al. 2008 und von Bric et al. 2009 [81, 82]. Zender et al. konnten mit Hilfe eines in-vivo Screens Tumorsuppressorgene identifizieren, deren Verlust die Entstehung von Leberzellkarzinomen begünstigt. Sie transduzierten gepoolte shRNA-Expressionsvektoren gegen Gene, die in Leberzellkarzinomen deletiert sind, in Leberprogenitorzellen, die in ein entsprechendes Mausmodell gegeben wurden. Aus den in den Mäusen entstehenden Lebertumoren konnten shRNA-Expressionsvektoren identifiziert werden, die besonders stark angereichert waren. Weitergehende Untersuchungen bestätigten, dass die Inhibition der jeweiligen Zielgene die Entstehung von Leberzellkarzinomen begünstigt. Bric et al. wandten das gleiche Prinzip auf Tumorsuppressorgene an, die eine Rolle in der Entstehung von Lymphomen spielen.

Bric et al. haben in ihrer Arbeit bereits darauf verwiesen, dass bisherige in-vivo Screens durch die Inhibitionseffektivität der eingesetzten shRNAs-Expressionsvektoren, der Anzahl an untersuchten Genen und eingesetzten Tieren sowie der Fokussierung auf eine Tumorentität

deutliche Limitierungen aufweisen. Für weitere Fortschritte in der Erforschung von Krebserkrankungen wird der Übergang von in-vitro zu in-vivo funktioneller Genomik dennoch sicherlich in absehbarer Zeit unabdingbar werden.

# Literaturverzeichnis

- [1] GM Brodeur. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer*, 3(3):203–16, 2003.
- [2] B. J. Druker, F. Guilhot, S. G. O'Brien, et al. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*, 355(23):2408–17, 2006.
- [3] J Moffat and DM Sabatini. Building mammalian signalling pathways with rna screens. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(3):177–87, 2006.
- [4] R. T. Silver, S. H. Woolf, R. Hehlmann, et al. An evidence-based analysis of the effect of busulfan, hydroxyurea, interferon, and allogeneic bone marrow transplantation in treating the chronic phase of chronic myeloid leukemia: developed for the american society of hematology. *Blood*, 94(5):1517–36, 1999.
- [5] F. A. Barr, H. H. Sillj, and E. A. Nigg. Polo-like kinases and the orchestration of cell division. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5(6):429–40, 2004.
- [6] Torsten R. Dunkern, Inga Wedemeyer, Manuela Baumgärtner, Gerhard Fritz, and Bernd Kaina. Resistance of p53 knockout cells to doxorubicin is related to reduced formation of dna strand breaks rather than impaired apoptotic signaling. *DNA Repair*, 2(1):49–60, 2003.
- [7] T. Mosmann. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65(1-2):55–63, 1983.
- [8] C. Riccardi and I. Nicoletti. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat Protoc*, 1(3):1458–61, 2006.
- [9] S. Y. Fuchs, V. S. Spiegelman, and K. G. Kumar. The many faces of beta-trcp e3 ubiquitin ligases: reflections in the magic mirror of cancer. *Oncogene*, 23(11):2028–36, 2004.
- [10] Y. J. Machida and A. Dutta. The apc/c inhibitor, emi1, is essential for prevention of rereplication. *Genes Dev*, 21(2):184–94, 2007.

- [11] A. Peschiaroli, F. Scialpi, F. Bernassola, M. Pagano, and G. Melino. The f-box protein fbxo45 promotes the proteasome-dependent degradation of p73. *Oncogene*, 28(35):3157–66, 2009.
- [12] E. S. Lander. Initial impact of the sequencing of the human genome. *Nature*, 470(7333):187–97, 2011.
- [13] F. Chibon, P. Lagarde, S. Salas, et al. Validated prediction of clinical outcome in sarcomas and multiple types of cancer on the basis of a gene expression signature related to genome complexity. *Nat Med*, 16(7):781–7, 2010.
- [14] D. H. Kim and J. J. Rossi. Strategies for silencing human disease using rna interference. *Nat Rev Genet*, 8(3):173–84, 2007.
- [15] Y. Stram and L. Kuzntzova. Inhibition of viruses by rna interference. *Virus Genes*, 32(3):299–306, 2006.
- [16] J. C. Carrington and V. Ambros. Role of micrnas in plant and animal development. *Science*, 301(5631):336–8, 2003.
- [17] A. Saumet and C. H. Lecellier. Anti-viral rna silencing: do we look like plants? *Retrovirology*, 3:3, 2006.
- [18] A. J. Pratt and I. J. MacRae. The rna-induced silencing complex: a versatile gene-silencing machine. *J Biol Chem*, 284(27):17897–901, 2009.
- [19] J. M. Silva, M. Z. Li, K. Chang, et al. Second-generation shrna libraries covering the mouse and human genomes. *Nat Genet*, 37(11):1281–8, 2005.
- [20] Z Duan, EJ Weinstein, D Ji, et al. Lentiviral short hairpin rna screen of genes associated with multidrug resistance identifies prp-4 as a new regulator of chemoresistance in human ovarian cancer. *Mol Cancer Ther*, 7(8):2377–85, 2008.
- [21] B Maier, S Wendt, JT Vanselow, et al. A large-scale functional rnai screen reveals a role for ck2 in the mammalian circadian clock. *Genes Dev*, 23(6):708–18, 2009.
- [22] Sylvie Rato, Sara Maia, Paula M. Brito, et al. Novel hiv-1 knockdown targets identified by an enriched kinases/phosphatases shrna library using a long-term iterative screen in jurkat t-cells. *PLoS ONE*, 5(2):e9276, 2010.
- [23] JL Weinstein, HM Katzenstein, and SL Cohn. Advances in the diagnosis and treatment of neuroblastoma. *Oncologist*, 8(3):278–92, 2003.
- [24] JM Maris. Recent advances in neuroblastoma. *N Engl J Med*, 362(23):2202–11, 2010.



- [25] A. L. Yu, A. L. Gilman, M. F. Ozkaynak, et al. Anti-gd2 antibody with gm-csf, interleukin-2, and isotretinoin for neuroblastoma. *N Engl J Med*, 363(14):1324–34, 2010.
- [26] K. K. Matthay, G. Yanik, J. Messina, et al. Phase ii study on the effect of disease sites, age, and prior therapy on response to iodine-131-metaiodobenzylguanidine therapy in refractory neuroblastoma. *J Clin Oncol*, 25(9):1054–60, 2007.
- [27] M. Schmidt, T. Simon, B. Hero, et al. Is there a benefit of 131 i-mibg therapy in the treatment of children with stage 4 neuroblastoma? a retrospective evaluation of the german neuroblastoma trial nb97 and implications for the german neuroblastoma trial nb2004. *Nuklearmedizin*, 45(4):145–51; quiz N39–40, 2006.
- [28] DA Gewirtz. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the anti-tumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol*, 57(7):727–41, 1999.
- [29] G Takemura and H Fujiwara. Doxorubicin-induced cardiomyopathy from the cardiotoxic mechanisms to management. *Prog Cardiovasc Dis*, 49(5):330–52, 2007.
- [30] R Supino, M Mariani, G Capranico, A Colombo, and G Parmiani. Doxorubicin cellular pharmacokinetics and dna breakage in a multi-drug resistant b16 melanoma cell line. *Br J Cancer*, 57(2):142–6, 1988.
- [31] ET Kipreos and M Pagano. The f-box protein family. *Genome Biol*, 1(5):REVIEWS3002, 2000.
- [32] F Westermann, KO Henrich, JS Wei, et al. High *skp2* expression characterizes high-risk neuroblastomas independent of *mycn* status. *Clin Cancer Res*, 13(16):4695–703, 2007.
- [33] T Otto, S Horn, M Brockmann, et al. Stabilization of n-myc is a critical function of aurora a in human neuroblastoma. *Cancer Cell*, 15(1):67–78, 2009.
- [34] J. R. Skaar, V. D’Angiolella, J. K. Pagan, and M. Pagano. Snapshot: F box proteins ii. *Cell*, 137(7):1358, 1358.e1, 2009.
- [35] D. Engelbert, D. Schnerch, A. Baumgarten, and R. Wäsch. The ubiquitin ligase *apc(cdh1)* is required to maintain genome integrity in primary human cells. *Oncogene*, 27(7):907–17, 2008.
- [36] V. Ciccarone, B. A. Spengler, M. B. Meyers, J. L. Biedler, and R. A. Ross. Phenotypic diversification in human neuroblastoma cells: expression of distinct neural crest lineages. *Cancer Res*, 49(1):219–25, 1989.
- [37] C. J. Thiele. Neuroblastoma. *J. Human Cell Culture*, 1:21–53, 1998.

- [38] F. L. Graham, J. Smiley, W. C. Russell, and R. Nairn. Characteristics of a human cell line transformed by dna from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*, 36(1):59–74, 1977.
- [39] J. Ponten and E. H. Macintyre. Long term culture of normal and neoplastic human glia. *Acta Pathol Microbiol Scand*, 74(4):465–86, 1968.
- [40] M. Boeckh, C. A. Gleaves, R. Bindra, and J. D. Meyers. Comparison of mrc-5 and u-373mg astrocytoma cells for detection of cytomegalovirus in shell vial centrifugation cultures. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 10(7):569–72, 1991.
- [41] L. Wiebusch and C. Hagemeier. p53- and p21-dependent premature apc/c-cdh1 activation in g2 is part of the long-term response to genotoxic stress. *Oncogene*, 29(24):3477–89, 2010.
- [42] S. Gallagher, S. E. Winston, S. A. Fuller, and J. G. Hurrell. Immunoblotting and immunodetection. *Curr Protoc Cell Biol*, Chapter 6:Unit6.2, 2011.
- [43] B. K. Lundholt, K. M. Scudder, and L. Pagliaro. A simple technique for reducing edge effect in cell-based assays. *J Biomol Screen*, 8(5):566–70, 2003.
- [44] K. A. Cole, J. Huggins, M. Laquaglia, et al. Rnai screen of the protein kinome identifies checkpoint kinase 1 (chk1) as a therapeutic target in neuroblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(8):3336–41, 2011.
- [45] B. Spänkuch-Schmitt, J. Bereiter-Hahn, M. Kaufmann, and K. Strebhardt. Effect of rna silencing of polo-like kinase-1 (plk1) on apoptosis and spindle formation in human cancer cells. *J Natl Cancer Inst*, 94(24):1863–77, 2002.
- [46] M. C. Bassik, R. J. Lebbink, L. S. Churchman, et al. Rapid creation and quantitative monitoring of high coverage shrna libraries. *Nat Methods*, 6(6):443–5, 2009.
- [47] Y Takemura, H Kobayashi, H Miyachi, et al. The influence of tumor cell density on cellular accumulation of doxorubicin or cisplatin in vitro. *Cancer Chemother Pharmacol*, 27(6):417–22, 1991.
- [48] E. Yonish-Rouach. The p53 tumour suppressor gene: a mediator of a g1 growth arrest and of apoptosis. *Experientia*, 52(10-11):1001–7, 1996.
- [49] J. D. Orth, A. Loewer, G. Lahav, and T. J. Mitchison. Prolonged mitotic arrest triggers partial activation of apoptosis, resulting in dna damage and p53 induction. *Mol Biol Cell*, 23(4):567–76, 2012. ISSN 1939-4586.
- [50] K Nakayama, H Nagahama, YA Minamishima, et al. Targeted disruption of skp2 results in accumulation of cyclin e and p27(kip1), polyploidy and centrosome overduplication. *EMBO J*, 19(9):2069–81, 2000.

- [51] AJ Bridge, S Pebernard, A Ducraux, AL Nicoulaz, and R Iggo. Induction of an interferon response by rnaï vectors in mammalian cells. *Nat Genet*, 34(3):263–4, 2003.
- [52] G. J. Veal, J. Errington, C. P. Redfern, A. D. Pearson, and A. V. Boddy. Influence of isomerisation on the growth inhibitory effects and cellular activity of 13-cis and all-trans retinoic acid in neuroblastoma cells. *Biochem Pharmacol*, 63(2):207–15, 2002.
- [53] Christophe J. Echeverri and Norbert Perrimon. High-throughput rnaï screening in cultured cells: a user’s guide. *Nat Rev Genet*, 7(5):373–384, 2006.
- [54] M. R. Schlabach, J. Luo, N. L. Solimini, et al. Cancer proliferation gene discovery through functional genomics. *Science*, 319(5863):620–4, 2008.
- [55] S Fulda, W Lutz, M Schwab, and KM Debatin. Mycn sensitizes neuroblastoma cells for drug-induced apoptosis. *Oncogene*, 18(7):1479–86, 1999.
- [56] P. Paul, T. van den Hoorn, M. L. Jongsma, et al. A genome-wide multidimensional rnaï screen reveals pathways controlling mhc class ii antigen presentation. *Cell*, 145(2):268–83, 2011.
- [57] A. L. Astier, G. Beriou, T. M. Eisenhaure, et al. Rna interference screen in primary human t cells reveals flt3 as a modulator of il-10 levels. *J Immunol*, 184(2):685–93, 2010.
- [58] R. Nagaoka-Yasuda, N. Matsuo, B. Perkins, K. Limbaeck-Stokin, and M. Mayford. An rnaï-based genetic screen for oxidative stress resistance reveals retinol saturase as a mediator of stress resistance. *Free Radic Biol Med*, 43(5):781–8, 2007.
- [59] T. Stiewe. The p53 family in differentiation and tumorigenesis. *Nat Rev Cancer*, 7(3):165–8, 2007.
- [60] N. Keshelava, J. J. Zuo, P. Chen, et al. Loss of p53 function confers high-level multidrug resistance in neuroblastoma cell lines. *Cancer Res*, 61(16):6185–93, 2001.
- [61] N. Grinshtein, A. Datti, M. Fujitani, et al. Small molecule kinase inhibitor screen identifies polo-like kinase 1 as a target for neuroblastoma tumor-initiating cells. *Cancer Res*, 71(4):1385–95, 2011.
- [62] U. Gluschnaider, G. Hidas, G. Cojocar, et al. beta-trcp inhibition reduces prostate cancer cell growth via upregulation of the aryl hydrocarbon receptor. *PLoS One*, 5(2):e9060, 2010.
- [63] G. S. Watts, B. W. Futscher, R. Isett, et al. cDNA microarray analysis of multidrug resistance: doxorubicin selection produces multiple defects in apoptosis signaling pathways. *J Pharmacol Exp Ther*, 299(2):434–41, 2001.

- [64] T. Oue, A. Yoneda, S. Uehara, H. Yamanaka, and M. Fukuzawa. Increased expression of multidrug resistance-associated genes after chemotherapy in pediatric solid malignancies. *J Pediatr Surg*, 44(2):377–80, 2009.
- [65] A. Porro, M. Haber, D. Diolaiti, et al. Direct and coordinate regulation of atp-binding cassette transporter genes by myc factors generates specific transcription signatures that significantly affect the chemoresistance phenotype of cancer cells. *J Biol Chem*, 285(25):19532–43, 2010.
- [66] M. Lutz, F. Wempe, I. Bahr, D. Zopf, and H. von Melchner. Proteasomal degradation of the multifunctional regulator yb-1 is mediated by an f-box protein induced during programmed cell death. *FEBS Lett*, 580(16):3921–30, 2006.
- [67] Y. Shima, T. Shima, T. Chiba, et al. Pml activates transcription by protecting hipk2 and p300 from scffbx3-mediated degradation. *Mol Cell Biol*, 28(23):7126–38, 2008.
- [68] L. Vrba, D. J. Junk, P. Novak, and B. W. Futscher. p53 induces distinct epigenetic states at its direct target promoters. *BMC Genomics*, 9:486, 2008.
- [69] M. K. Tan, H. J. Lim, and J. W. Harper. Scf(fbxo22) regulates histone h3 lysine 9 and 36 methylation levels by targeting histone demethylase kdm4a for ubiquitin-mediated proteasomal degradation. *Mol Cell Biol*, 31(18):3687–99, 2011.
- [70] MK Santra, N Wajapeyee, and MR Green. F-box protein fbxo31 mediates cyclin d1 degradation to induce g1 arrest after dna damage. *Nature*, 459(7247):722–5, 2009.
- [71] K. Fugger, M. Mistrik, J. R. Danielsen, et al. Human fbh1 helicase contributes to genome maintenance via pro- and anti-recombinase activities. *J Cell Biol*, 186(5):655–63, 2009.
- [72] L. Xia, L. Jaafar, A. Cashikar, and H. Flores-Rozas. Identification of genes required for protection from doxorubicin by a genome-wide screen in *saccharomyces cerevisiae*. *Cancer Res*, 67(23):11411–8, 2007.
- [73] T. J. Westmoreland, S. M. Wickramasekara, A. Y. Guo, et al. Comparative genome-wide screening identifies a conserved doxorubicin repair network that is diploid specific in *saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One*, 4(6):e5830, 2009.
- [74] Angelique W. Whitehurst, Brian O. Bodemann, Jessica Cardenas, et al. Synthetic lethal screen identification of chemosensitizer loci in cancer cells. *Nature*, 446(7137):815–819, 2007.
- [75] JP MacKeigan, LO Murphy, and J Blenis. Sensitized rnai screen of human kinases and phosphatases identifies new regulators of apoptosis and chemoresistance. *Nat Cell Biol*, 7(6):591–600, 2005.

- [76] Z. F. Tao and N. H. Lin. Chk1 inhibitors for novel cancer treatment. *Anticancer Agents Med Chem*, 6(4):377–88, 2006.
- [77] Z Duan, D Ji, EJ Weinstein, et al. Lentiviral shrna screen of human kinases identifies plk1 as a potential therapeutic target for osteosarcoma. *Cancer Lett*, 293(2):220–9, 2010.
- [78] B. Laxman, D. E. Hall, M. S. Bhojani, et al. Noninvasive real-time imaging of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(26):16551–5, 2002.
- [79] V. Starkuviene and R. Pepperkok. The potential of high-content high-throughput microscopy in drug discovery. *Br J Pharmacol*, 152(1):62–71, 2007.
- [80] B. Akten, E. Jauch, G. K. Genova, et al. A role for ck2 in the drosophila circadian oscillator. *Nat Neurosci*, 6(3):251–7, 2003.
- [81] L. Zender, W. Xue, J. Zuber, et al. An oncogenomics-based in vivo rna screen identifies tumor suppressors in liver cancer. *Cell*, 135(5):852–64, 2008.
- [82] A. Bric, C. Miething, C. U. Bialucha, et al. Functional identification of tumor-suppressor genes through an in vivo rna interference screen in a mouse lymphoma model. *Cancer Cell*, 16(4):324–35, 2009.

# Selbständigkeitserklärung

## Eidesstattliche Versicherung

Ich, Livius Penter, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Entwicklung eines lentiviralen shRNA Screens zur Identifizierung potentieller therapeutischer Ziele in SH-EP Neuroblastomazellen“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE - [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet. Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

Berlin, den 30. Juni 2013

---

# Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

# Danksagung

Bei der Arbeit an dieser Dissertation wurde ich von vielen verschiedenen Seiten unterstützt, wofür ich mich hier bedanken möchte.

Für die Überlassung des Themas dieser Dissertation und die Unterstützung, die ich darüber hinaus durch ihn in meinem Studium erfuhr, danke ich Professor Christian Hagemeyer sehr herzlich.

Ich möchte Dr. Matthias Truß danken, der mir als Betreuer dieser Arbeit nicht nur die ersten Schritte in experimenteller Forschung wies, sondern auch unzählige Stunden darauf verwandte, mit mir an dem Fortschritt des Projekts zu arbeiten und mich dabei bis zum Abschluss der Promotion unterstützte.

Aus dem Labor für pädiatrische Molekularbiologie möchte ich besonders Dr. Lüder Wiebusch dafür danken, dass er mir immer gerne mit Rat zu Seite stand. Auch allen anderen Mitarbeitern des Labors danke ich für größere oder kleinere Hilfestellungen bei meiner Arbeit.

Meinen Eltern danke ich dafür, dass sie mir die Möglichkeit, mein Studium zwei Semester lang für die Arbeit an der medizinischen Doktorarbeit zu unterbrechen, mit der gleichen Selbstverständlichkeit einräumten, wie sie mir auch alle anderen Abschnitte meiner Ausbildung möglich machten.