

# Die Rolle von ALFY in der ATRA induzierten Zellzytotoxizität und Autophagie bei SKBR3 Brustkrebszellen.

## 1 Zusammenfassung

All trans Retinsäure (ATRA) stellt eine vielversprechende Therapiemöglichkeit für Brustkrebs dar. Man hat jedoch auch entdeckt, dass ATRA die Autophagie induziert. Bei dieser findet eine Verdauung von Zellkomponenten statt. Die Bausteine der abgebauten Stoffe werden dabei recycelt, wodurch die Zelle Energie produzieren kann. Die Autophagie kann in der Krebstherapie eine Schutzfunktion gegen das ATRA darstellen, da die Zellen in schlechten Lebensbedingungen trotzdem Energie und Bausteine produzieren und überleben können. Um die Therapie mit ATRA zu verbessern, wäre es also sinnvoll, in Kombination mit ATRA die Autophagie zu inhibieren. ALFY, um welches es in dieser Studie geht, ist als Adapterprotein an der Autophagie beteiligt. Durch die Herunterregulation des ALFY Proteins in SKBR3 Brustkrebszellen, wollen wir schauen, welche Auswirkungen ALFY in Bezug auf die ATRA induzierte Zellzytotoxizität und somit der Autophagie hat. Die Herunterregulation wird mittels shRNA gemacht. Anschliessend werden die SKBR3 Zellen mit der ALFY-Herunterregulation mit ATRA inkubiert und der Zelltod mittels Westernblot (geschnittenes PARP, Caspase 3) und FACS (AnnexinV-PI) gemessen.

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die Herunterregulation des ALFY Proteins in SKBR3-Zellen keine Erhöhung der ATRA induzierten Zellzytotoxizität gezeigt hat. Es ist deshalb anzunehmen, dass ALFY, die ATRA induzierte Autophagie nicht massgeblich beeinflusst.

**Schlüsselwörter:** Brustkrebs, Autophagie, ATRA, ALFY

## 2 Einleitung

ATRA, welches normalerweise für die Therapie von Promyelozytenleukämie eingesetzt wird, stellt auch für Brustkrebs eine vielversprechende Therapiemöglichkeit dar. Das Problem ist jedoch, dass ATRA in klinischen Studien primäre Resistenzen und nur eine geringe Toxizität auf die Brustkrebszellen gezeigt hat. Grund dafür kann sein, dass ATRA die Autophagie induziert. Bei dieser findet eine Verdauung von Zellkomponenten statt, wobei die abgebauten Stoffe recycelt werden. Durch die recycelten Stoffe kann die Zelle Energie produzieren. So können die Krebszellen, die mit ATRA behandelt werden, durch den Energiegewinn trotzdem überleben. Es muss deshalb versucht werden, die ATRA Behandlung in der Brustkrebstherapie zu verbessern. Um dies zu erreichen, wäre es sinnvoll, in Kombination mit ATRA die Autophagie zu inhibieren.

ALFY, um welches es in dieser Studie geht, ist als Adapterprotein an der Autophagie beteiligt. Durch die Herunterregulation des ALFY-Proteins in den SKBR3 Brustkrebszellen wollen wir schauen, ob die Autophagie inhibiert und somit das Zellsterben unter ATRA-Therapie induziert wird.

## 3 Ziele und Fragestellung

Das Ziel dieser Diplomarbeit ist es, herauszufinden, welche Rolle das ALFY Protein in der ATRA induzierten Zellzytotoxizität und Autophagie in SKBR3 Brustkrebszellen hat. Wir wollen herausfinden, ob durch das Inhibieren des ALFY Proteins, der Zelltod unter ATRA erhöht wird. Dabei haben wir uns folgende Frage gestellt:

- Ist ALFY positiv oder negativ für die ATRA-induzierte Zellzytotoxizität von SKBR3 Brustkrebszellen?

## 4 Material, Methodik, Vorgehen

Die Herunterregulation des ALFY Proteins wird mittels shRNA (short hairpin Ribonukleinsäure) gemacht. Für das Einbringen der Plasmid-DNA (Desoxyribonukleinsäure) in den Zellkern der SKBR3 Zellen, welche die Information für die shRNA besitzt, werden Lentiviren verwendet. Der Virus integriert sich in das Genom. Die shRNA wird anschliessend in den Brustkrebszellen transkribiert und bindet dann durch Hybridisierung an die ALFY mRNA, was zu deren Degradation führt. Dies wird mit 4 verschiedenen shRNA's gemacht, wobei folgende shALFY-Zelllinien entstehen: shALFY\_796, shALFY\_1045, shALFY\_1696 und shALFY\_mix. Anschliessend wird mittels Westernblot geschaut, ob die Herunterregulation funktioniert hat. Zudem wird mittels Westernblot die Caspase 3 und das geschnittene PARP als Apoptosemarker gemessen.

Der Westernblot dient dem Nachweis von Proteinen. Hierzu werden die Proteine zunächst nach ihrer Grösse aufgetrennt und anschliessend auf eine Membran übertragen, bevor die Proteine von Interesse mittels Primär- und Sekundäntikörper detektiert werden können.

Um den Zelltod noch von einer anderen Seite zu detektieren wird das FACS (Fluorescence-activated cell sorting) verwendet. Dabei wird das AnnexinV und das PI gemessen. Das AnnexinV färbt die apoptotischen Zellen an und erzeugt dabei ein grünes Fluoreszenzsignal. Das PI färbt die nekrotischen Zellen an und ergibt dabei ein rotes Fluoreszenzsignal. Lebendige Zellen sind hingegen Doppelnegativ und zeigen kein Fluoreszenzsignal. Die shALFY-Zellen werden dabei immer mit shCTRL-Zellen, welche keine Herunterregulation des ALFY-Proteins enthalten verglichen.

## 5 Resultate

Hier sind die Resultate der gemachten Westernblots dargestellt. In der Abbildung A ist die Detektion des ALFY-Proteins ersichtlich. Es ist zu sehen, dass das ALFY-Protein in jeder Zelllinie im Vergleich zu den Kontrollzellen (shCTRL) signifikant tiefer ist, was bedeutet, dass in allen 4 Zellreihen eine Herunterregulation des ALFY Proteins stattgefunden hat. In der Abbildung B sind die Resultate der Westernblots der Caspase 3 ersichtlich. Die Caspase 3 ist jeweils bei den shALFY\_1045 und den shALFY\_mix signifikant erhöht. Bei den shALFY\_796 und den shALFY\_1696 ist jedoch kein signifikanter Unterschied im Vergleich zu den shCTRL-Zellen zu sehen. In der Abbildung C ist der Nachweis des geschnittenen PARP's ersichtlich. Hier konnte in keiner Zellreihe ein signifikanter Unterschied im Vergleich zu den Kontrollzellen dargestellt werden.

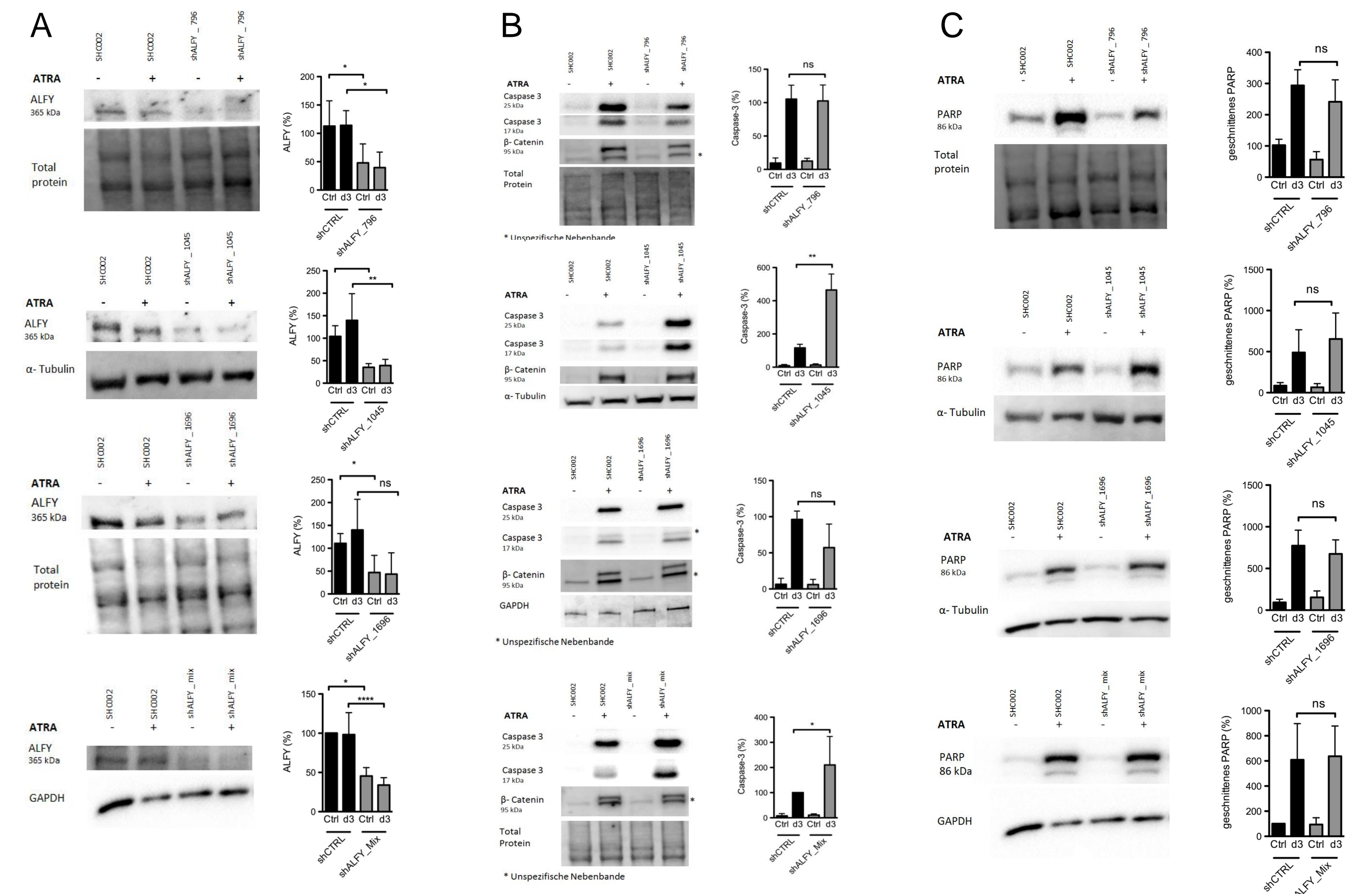


Abb. 1 (A-C) Darstellung der Resultate der Westernblots

Die shALFY-Zellen und die shCTRL-Zellen wurden jeweils für 3 Tage mit ATRA behandelt. Links in der Spalte ist jeweils der gemachte Westernblot ersichtlich und rechts die Quantifizierung der erhaltenen Banden. Ein \* bedeutet, dass das Resultat signifikant ausfiel und ein ns bedeutet, dass das Resultat nicht signifikant war.

In der Abbildung 2 sind die Resultate des FACS dargestellt. Wiederum hat sich bei allen vier Zellkolonien kein signifikanter Unterschied im Zelltod im Vergleich zu den shCTRL Zellen gezeigt.

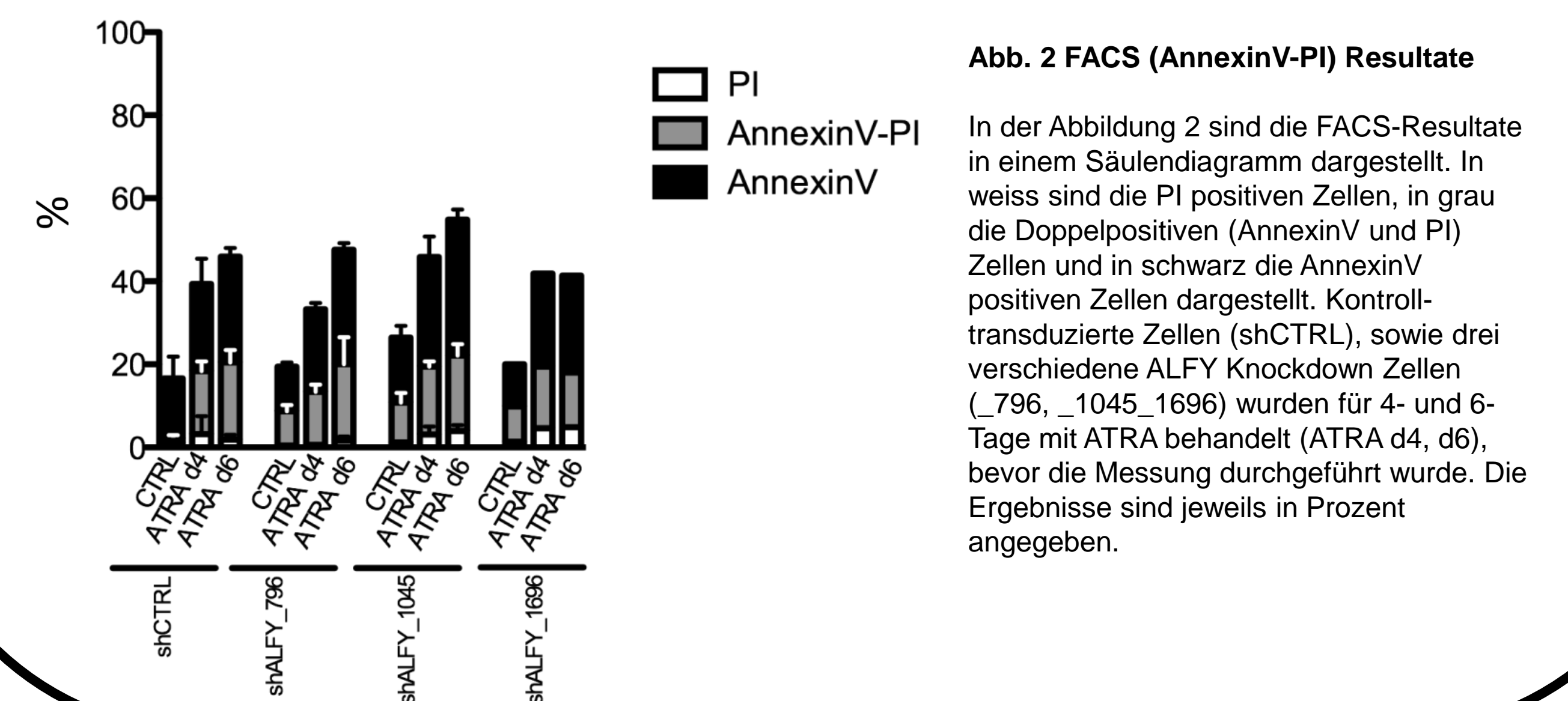


Abb. 2 FACS (AnnexinV-PI) Resultate

In der Abbildung 2 sind die FACS-Resultate in einem Säulendiagramm dargestellt. In weiss sind die PI positiven Zellen, in grau die Doppelpositiven (AnnexinV und PI) Zellen und in schwarz die AnnexinV positiven Zellen dargestellt. Kontrolltransduzierte Zellen (shCTRL), sowie drei verschiedene ALFY Knockdown Zellen (\_796, \_1045, \_1696) wurden für 4- und 6-Tage mit ATRA behandelt (ATRA d4, d6), bevor die Messung durchgeführt wurde. Die Ergebnisse sind jeweils in Prozent angegeben.

## 6 Diskussion

In vorliegender Studie konnte gezeigt werden, dass in allen shALFY-Zellen eine signifikante Herunterregulation des ALFY Proteins statt fand (Abb. 1, A). Mittels Westernblot wurde bei den shALFY-Zellen unter ATRA-Therapie und unter Kontrollbedingungen die Caspasen 3 und das geschnittene PARP als Apoptosemarker gemessen. Dabei hat sich nicht bei allen Zelllinien ein einheitliches Ergebnis gezeigt. Es konnte also kein erhöhter Zelltod unter ATRA-Therapie bei den shALFY-Zellen detektiert werden. Das selbe wurde bei der Messung des AnnexinV und PI mittels FACS festgestellt. Es konnte wiederum kein signifikanter Unterschied zwischen den shALFY-Zellen und den shCTRL-Zellen in Bezug auf den Zelltod festgestellt werden. Zusammenfassend kann man sagen, dass ALFY keinen Einfluss auf die ATRA induzierte Zellzytotoxizität gezeigt hat. Es ist zwar bekannt, dass ALFY als Adapterprotein an der Autophagie beteiligt ist, es konnte jedoch nicht gezeigt werden, ob ALFY auch an der ATRA-induzierten Autophagie beteiligt ist. In vorliegender Studie wurde die Autophagie selber aus Zeitgründen nicht gemessen. Hätte ALFY jedoch einen direkten Einfluss auf die ATRA induzierte Autophagie, würde man vermutlich bei Abwesenheit des ALFY Proteins einen Einfluss auf die ATRA-induzierte Zellzytotoxizität sehen.

### Quellen:

- Antwerpes, F., Hönscher, C., Offierowski, N., [Stand 08.12.2015] Autophagie, (<http://flexikon.doccheck.com/de/Autophagie>)
- Bohne, F., [Stand 10.12.2015] Autophagie und Krebs – Das „Sich-Selbst-Fressen“ scheint essentiell für das Wachstum von Krebszellen [http://scienceblogs.de/science\\_meets\\_society/2012/02/21/autophagie-und-krebs-das-sichselbstfressen-scheint-essentiell-fur-das-wachstum-von-krebszellen/](http://scienceblogs.de/science_meets_society/2012/02/21/autophagie-und-krebs-das-sichselbstfressen-scheint-essentiell-fur-das-wachstum-von-krebszellen/)
- Herr, I. und Apel, A. (2008) Manipulation der Autophagie als neue Strategie in der Tumortherapie? | Deutsche Zeitschrift für Klinische Forschung | DZKF 12
- Kohlmann, H., [Stand 31.03.2016] Apoptosedetektion mittels Annexin V, [http://www.med4you.at/laborbefunde/techniken/durchflusszytometrie/lbef\\_annexin.htm](http://www.med4you.at/laborbefunde/techniken/durchflusszytometrie/lbef_annexin.htm)
- Mizushima, N. (2007) Autophagy: process and function | GENES & DEVELOPMENT 21
- Abb. 1: Trüb, S., (2016), Darstellung der Resultate der Westernblots, Bern, eigene Abbildung
- Abb. 2: Trüb, S. (2016), Abb. 2 FACS (AnnexinV-PI) Resultate, Bern, eigene Abbildung
- Hintergrundbild: <http://www.medmix.at/effektivere-op-bei-brustkrebs> [Stand 30.08.2016]