

Johanna Rupp

Dr. med.

Zur therapeutischen Rolle von Chondroitinsulfat-Proteoglykan 4 in Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region

Fach: Hals-Nasen-Ohrenheilkunde
Doktormutter: Prof. Dr. rer. nat. Christel Herold-Mende

Krebserkrankungen stellen weltweit die zweithäufigste Todesursache dar, wobei Kopf-Hals-Tumore eine wesentliche Gruppe ausmachen. Der Großteil der Kopf-Hals-Tumore geht vom auskleidenden Plattenepithel aus und wird daher auch als Plattenepithelkarzinom der Kopf-Hals-Region zusammengefasst. Die 5-Jahres-Überlebensrate der Patienten mit Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region hat sich in den letzten Jahrzehnten trotz der Fortschritte der modernen Medizin nur mäßig verbessert. Kombinationstherapien mit neuen, onkologischen Arzneimitteln, insb. aus dem Bereich der *targeted therapy*, wecken die Hoffnung einer Verbesserung dieser Prognose. Doch bisher zugelassene Medikamente der *targeted therapy* blieben hinter den Erwartungen zurück, sodass die medizinische Forschung nach weiteren Zielstrukturen in Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region sucht, die zur Entwicklung von *targeted therapies* herangezogen werden können. Ein vielversprechender Kandidat hierfür ist das Chondroitinsulfat-Proteoglykan 4, welches in der vorliegenden Arbeit hinsichtlich seiner möglichen therapeutischen Rolle in Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region untersucht wurde. Das Ziel bestand in der Identifikation einer potentiell vorteilhaften Kombinationstherapie, bestehend aus einer anti-Chondroitinsulfat-Proteoglykan 4-gerichteten *targeted therapy* und einer medikamentösen (Chemo-)Therapie.

Zunächst wurde ein stabiler *Knockdown* von Chondroitinsulfat-Proteoglykan 4 in zwei humanen Tumorzelllinien von Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region etabliert. Hierzu wurde die Ribonukleinsäuren-Interferenz mit einem *short interfering* Ribonukleinsäuren-System verwendet, die mittels Lentiviren in die Zielzellen transduziert wurde. Die transduzierten Zellen wurden durch Grenzverdünnung und Picken isoliert und separat expandiert. Sobald eine ausreichende Zellzahl erreicht war, wurde die *messenger* Ribonukleinsäure von Chondroitinsulfat-Proteoglykan 4 mittels quantitativer Reverser Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion bestimmt und die Zellklone mit dem höchsten *Knockdown* ausgewählt: HNO210 KD-2 #2 mit einem medianen *Knockdown* auf 20,6 % und HNO210 KD-4 #9 ebenso mit einem medianen *Knockdown* auf 20,6 %, sowie HNO223 KD-2 #5 mit einem medianen *Knockdown* auf 17,0 % und HNO223 KD-2 #11 mit einem medianen *Knockdown* auf 19,0 %. Der *Knockdown* von Chondroitinsulfat-Proteoglykan 4 wurde mittels Mehrfach-Immunfluoreszenz validiert. Die ausgewählten Zellklone wurden in funktionellen Zellanalysen für das Medikamentenscreening

eingesetzt. Doch in keinem Versuch wurde die für ein Medikamentenscreening benötigte gleichmäßige Proliferation bei gleichzeitig geringer Varianz über alle Wells einer Zellkulturplatte hinweg erreicht. Das Medikamentenscreening war mit diesen Zellen daher nicht möglich.

Als Alternative wurde ein transienter, induzierbarer *Knockdown* von Chondroitinsulfat-Proteoglykan 4 mit einem *short hairpin* Ribonukleinsäure-System etabliert. Dieses wurde mittels Lipofektion in die Zellen transfiziert. Die Transfektion gelang nur in einer der beiden humanen Tumorzelllinien. Auf eine Isolation einzelner Zellklone wurde zugunsten einer Expansion als polyklonale *Knockdown*-Tumorzelllinien verzichtet. Der *Knockdown* wurde mittels Fluoreszenz-aktivierter Zell-Sortierung bestimmt. Auch hier konnte ein zufriedenstellender *Knockdown* von Chondroitinsulfat-Proteoglykan 4 erreicht werden: Zellkultur KD-980 mit einem *Knockdown* auf 23,7 % und die Zellkultur KD-977 mit einem *Knockdown* auf 17,5 %. Diese Zellen zeigten ein ausreichendes Proliferationsverhalten und konnten so im Medikamentenscreening eingesetzt werden.

Das Medikamentenscreening erfolgte mit funktioneller Zellanalyse der Proliferation mit dem *CellTiter-Glo® 3D Cell Viability Assay*. Im Vergleich von induzierten und nicht induzierten Zellen konnten acht Medikamente identifiziert werden, für die bei *Knockdown* von Chondroitinsulfat-Proteoglykan 4 eine Sensibilisierung bestand. Davon erfüllten sieben Medikamente auch die pharmakologischen Dosis-Anforderungen. Die vielversprechendsten vier Medikamente wurden für eine weitere Validierung ausgewählt: Melphalan, Abirateron, Lapatinib und Ceritinib.

Zu den mit der vorliegenden Arbeit identifizierten Medikamenten und deren Einsatz bei Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region finden sich sowohl passende als auch widersprüchliche Aussagen sowie viele offene Fragen in der aktuellen wissenschaftlichen Literatur. Aufgrund der Schwierigkeiten bei der Etablierung eines *Knockdowns* in den humanen HNSCC-Tumorzelllinien mittels Ribonukleinsäuren-Interferenz stellt sich die Frage, inwieweit der erreichte *Knockdown* von Chondroitinsulfat-Proteoglykan 4 selbst, die verwendeten Ribonukleinsäuren-Interferenz-Systeme oder die grundsätzliche Idee sowie Methodik der Isolation einzelner Zellklone hierfür verantwortlich sein kann.

Basierend auf den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit bestehen die höchsten synergistischen Therapieerfolge bei einer *targeted therapy* von Chondroitinsulfat-Proteoglykan 4, simuliert durch einen *Knockdown*, und Therapie mit diesen vier Medikamenten: Melphalan, Abirateron, Lapatinib und Ceritinib. Diese Ergebnisse müssen zunächst reproduziert und validiert werden. Eine Reproduktion empfiehlt sich mit gewissen methodischen Veränderungen, wie dem Verzicht auf Isolationsmethoden, und Ergänzungen, wie der Bestimmung des *Knockdowns* im Screening.