

***Small interfering RNA*-vermittelte Hemmung der
Apoptoseinhibitoren *BCL2*, *BCL-XL*, *XIAP* und *Survivin* in
Zellkultur- und Mausmodellen des humanen
Harnblasenkarzinoms**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt

der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften

der Technischen Universität Dresden

von

Diplomchemikerin Doreen Kunze

geboren am 07. Oktober 1981 in Bautzen

Eingereicht am 20. Mai 2011

Die Dissertation wurde in der Zeit von September 2005 bis Mai 2011 am Lehrstuhl für Allgemeine Biochemie der Technischen Universität Dresden in Kooperation mit der Klinik und Poliklinik für Urologie des Universitätsklinikums „Carl Gustav Carus“ der Technischen Universität Dresden angefertigt.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	ii
Abkürzungen	v
Gen- und Proteinbezeichnungen	vi
1 Einleitung	1
1.1 Apoptose – zielgerichteter, regulierter Zelltod	1
1.1.1 Definition, Morphologie und Signalwege	1
1.1.2 Die Rolle der BCL2-Proteinfamilie im intrinsischen Apoptosesignalweg	4
1.1.3 Die Rolle der <i>Inhibitor of Apoptosis Protein</i> -Familie beim regulierten Zelltod	5
1.2 Das Harnblasenkarzinom	7
1.2.1 Epidemiologie, Ätiologie und Klassifikation	7
1.2.2 Therapie und Prognose	8
1.2.3 Molekulare Ursachen der Entstehung und Progression.....	9
1.2.4 Harnblasenkarzinom und Apoptose	11
1.3 <i>Small interfering RNAs</i> – Nukleinsäurekonstrukte zur selektiven Hemmung tumorrelevanter Gene	12
2 Zielstellung	16
3 Material und Methoden	17
3.1 Material	17
3.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterial	17
3.1.2 Reagenzien und Kits.....	19
3.1.3 Medien, Puffer und Lösungen	20
3.2 Zelllinien und deren Behandlung	21
3.2.1 Humane Zelllinien und deren Kultivierung.....	21
3.2.2 Behandlung humaner Zelllinien mit siRNAs	22
3.2.2.1 Sequenzen der verwendeten siRNAs.....	22
3.2.2.2 Transfektion der siRNAs	23
3.2.2.3 Kombinationsbehandlung mit siRNAs und Chemotherapeutika	24
3.2.3 Transfektion mit <i>short hairpin</i> RNA-Vektoren.....	24

3.3	Zellbiologische Methoden	26
3.3.1	Zellviabilitätstest	26
3.3.2	Bestimmung der Zellzahl	26
3.3.3	Zellkoloniebildungstest	26
3.3.4	Durchflusszytometrische Quantifizierung der Apoptoserate	27
3.3.5	Durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse	27
3.4	Molekularbiologische und proteinbiochemische Methoden	28
3.4.1	Quantitative Polymerasekettenreaktion.....	28
3.4.1.1	Isolation von Total-RNA und cDNA-Synthese.....	28
3.4.1.2	Durchführung der quantitativen Polymerasekettenreaktion.....	29
3.4.2	<i>Microarray</i> -Analysen	31
3.4.2.1	RNA-Isolation und Qualitätskontrolle	31
3.4.2.2	Synthese, Reinigung und Fragmentierung biotinmarkierter cDNA	32
3.4.2.3	Hybridisieren, Waschen, Färben und Scannen der <i>Microarrays</i>	34
3.4.2.4	Datenauswertung	35
3.4.3	<i>Western Blot</i>	35
3.5	Untersuchungen am subkutanen EJ28-Xenotransplantatmodell.....	37
3.5.1	Auswahl eines geeigneten siRNA-Carriers	37
3.5.2	Etablierung der intravenösen Chemotherapie	38
3.5.3	Kombinierte Behandlung mit siRNA und Chemotherapie.....	39
4	Ergebnisse	40
4.1	Zielgenexpression in Harnblasenkarzinomzelllinien und nichtmalignen Fibroblasten	40
4.2	Effekte der siRNA-vermittelten Inhibition von <i>BCL2</i>, <i>BCL-XL</i>, <i>XIAP</i> und <i>Survivin</i> in Harnblasenkarzinomzelllinien.....	41
4.2.1	Optimierung der siRNA-Transfektion.....	41
4.2.2	Charakterisierung der Zielgenexpression und -proteinmenge.....	44
4.2.3	Effekte auf die Zellproliferation.....	45
4.2.4	Effekte auf Apoptoserate und Zellzyklus	48
4.2.5	Einfluss der siRNA-Behandlung auf eine nachgeschaltete Chemotherapie.....	50
4.2.6	Effekte der simultanen Inhibition von <i>BCL-XL</i> und <i>Survivin</i>	53
4.2.7	Analyse transkriptomweiter Genexpressionsänderungen in EJ28-Zellen.....	55
4.2.8	Zielgenexpression und Effekte der siRNA-Behandlung in Cisplatin-resistenten Harnblasenkarzinomzelllinien.....	60
4.3	Effekte der siRNA-Behandlung in nichtmalignen Fibroblasten.....	61

4.4	Effekte einer langfristigen Inhibition von <i>BCL2</i>, <i>BCL-XL</i> und <i>XIAP</i> in EJ28-Zellen	62
4.5	Studien im subkutanen EJ28-Xenotransplantatmodell.....	66
4.5.1	Auswahl eines geeigneten siRNA-Carriers	66
4.5.2	Optimierung der intravenösen Chemotherapiebehandlung.....	66
4.5.3	Effekte einer kombinierten siRNA- und Chemotherapiebehandlung	68
5	Diskussion	69
5.1	Eignung von <i>BCL2</i>, <i>BCL-XL</i>, <i>XIAP</i> und <i>Survivin</i> als Antitumortargets.....	69
5.2	Auswahl geeigneter siRNAs und Optimierung der Transfektionsbedingungen	71
5.3	siRNA-vermittelte Reduktion der Zielgenexpression in Einzel- und Kombinationsbehandlungen in humanen Harnblasenkarzinomzellen	73
5.4	Zelluläre Effekte der Inhibition von <i>BCL2</i>, <i>BCL-XL</i>, <i>XIAP</i> und <i>Survivin</i> in humanen Harnblasenkarzinomzelllinien	74
5.4.1	<i>Survivin</i>	74
5.4.2	<i>XIAP</i>	76
5.4.3	<i>BCL2</i>	78
5.4.4	<i>BCL-XL</i>	79
5.4.5	Simultane Inhibition verschiedener Apoptoseinhibitoren	80
5.4.5.1	Simultane Inhibition von <i>BCL2</i> , <i>BCL-XL</i> , <i>XIAP</i> und <i>Survivin</i>	80
5.4.5.2	Simultane Inhibition von <i>BCL-XL</i> und <i>Survivin</i>	81
5.4.5.3	Weitere Studien zur simultane Inhibition von Apoptoseinhibitoren.....	82
5.5	Transkriptomweite Genexpressionsänderungen nach siRNA-vermittelter Inhibition verschiedener Apoptoseinhibitoren	84
5.6	Etablierung einer kombinierten siRNA- und Chemotherapiebehandlung im subkutanen EJ28-Xenotransplantatmodell.....	87
5.7	Molekulare und zelluläre Effekte der Hemmung von <i>BCL2</i>, <i>BCL-XL</i>, <i>XIAP</i> und <i>Survivin</i> in nichtmalignen Fibroblasten.....	90
5.8	siRNAs als Antitumortherapeutika	91
6	Zusammenfassung.....	95
7	Literaturverzeichnis.....	96
	Danksagung	107
	Erklärung.....	108

Abkürzungen

3'-UTR	3' <i>untranslated region</i> (3'-untranslatierter Bereich)	HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure
Abb.	Abbildung	HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
A.d.	<i>aqua destillata</i> (destilliertes Wasser)	HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
ASO	<i>antisense</i> -Oligonukleotid(e)	IAP	<i>Inhibitor of Apoptosis Protein</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> (Zell- und Stammsammlung)	LC	<i>LightCycler</i>
ATP	Adenosintriphosphat	LNA	<i>locked nucleic acid</i>
BCa	<i>bladder cancer</i> (Harnblasenkarzinom)	MMC	Mitomycin C
BCG	<i>Bacillus Calmette-Guérin</i>	mRNA	<i>messenger RNA</i>
BH	<i>BCL2 homology</i>	MTP	Mikrotiterplatte
BIR	<i>baculovirus IAP repeat</i>	n.b.	nicht bestimmt
BIRC	<i>BIR-containing</i>	NF-κB	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells</i> (Transkriptionsfaktor)
bp	Basenpaar(e)	NOD	<i>non-obese diabetic</i> (nicht fettleibig, diabetisch)
CARD	Caspase-Rekrutierungsdomäne	ns-si	<i>non-silencing</i> siRNA (Kontrolle)
CDDP	<i>cis</i> -Diamindichlorplatin (Cisplatin)	nt	Nukleotid(e)
cDNA	<i>complementary DNA</i>	OD	optische Dichte
CIS	<i>Carcinoma in situ</i>	PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
cRNA	<i>complementary RNA</i>	PBS-T	PBS-Tween 20-Lösung
CT	Chemotherapeutikum, Chemotherapie	PCR	Polymerasekettenreaktion
dATP	Desoxyadenosintriphosphat	PEI	Polyethylenimin
DISC	<i>Death-Inducing Signaling Complex</i>	PI	Propidiumiodid
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>	PVDF	Polyvinylidenfluorid
DMSO	Dimethylsulfoxid	qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion
DNA	Desoxyribonukleinsäure	rev	<i>reverse</i>
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate	RING	<i>really interesting new gene</i>
DOTAP	N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium-methylsulfat	RISC	<i>RNA Induced Silencing Complex</i>
dUTP	Desoxyuridintriphosphat	RNA	Ribonukleinsäure
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>	RNAi	RNA-Interferenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	Rt	Raumtemperatur
FACS	<i>Fluorescence-Activated Cell Sorter</i> (Durchflusszytometer)	SCID	<i>severe combined immunodeficiency</i> (schwere kombinierte Immundefizienz)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat	shRNA	<i>short hairpin RNA(s)</i>
FL	Fluorescein	siRNA	<i>small interfering RNA(s)</i>
for	<i>forward</i>	Tab.	Tabelle
g	Normalfallbeschleunigung	tBID	<i>truncated BID</i>
GEM	2',2'-Difluordesoxycytidin (Gemcitabin)		

TF	Transfektion	VF	Verdünnungsfaktor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	WST-1	4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzendisulfonat
TUR-B	transurethrale Resektion eines Harnblasenkarzinoms	WT	<i>whole transcript</i>
UC	Urothelkarzinom	w/w	<i>weight / weight</i> (Gewichtsverhältnis)

Gen- und Proteinbezeichnungen

AGO2	<i>argonaute 2</i>	FADD	<i>Fas (TNFRSF6)-associated via death domain</i>
APAF1	<i>apoptotic peptidase activating factor 1</i>	FAS	<i>Fas (TNF receptor superfamily, member 6)</i>
AURKB	<i>aurora kinase B</i>	FASLG	<i>Fas ligand</i>
BAD	<i>BCL2-associated agonist of cell death</i>	FGFR3	<i>fibroblast growth factor receptor 3</i>
BAK	<i>BCL2-antagonist/killer</i>	FLIP	<i>FLICE-inhibitory protein</i>
BAX	<i>BCL2-associated X protein</i>	GFP	<i>green fluorescent protein</i>
BCL2	<i>B-cell CLL/lymphoma 2</i>	HAVCR1	<i>hepatitis A virus cellular receptor 1</i>
BCL2A1	<i>BCL2-related protein A1</i>	HIST1H2BK	<i>histone cluster 1, H2bk</i>
BCL2L10	<i>BCL2-like 10</i>	HRAS	<i>v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
BCL2L12	<i>BCL2-like 12</i>	HRK	<i>harakiri, BCL2 interacting protein (contains only BH3 domain)</i>
BCL2L13	<i>BCL2-like 13</i>	hTERT	<i>humane telomerase reverse transcriptase</i>
BCL2L14	<i>BCL2-like 14</i>	HTRA2	<i>HtrA serine peptidase 2</i>
BCL2L15	<i>BCL2-like 15</i>	IFIT1	<i>interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1</i>
BCL-XL	<i>BCL2L1, BCL2 like 1</i>	IL6	<i>interleukin 6 (interferon, beta 2)</i>
BCL-W	<i>BCL2L2, BCL2 like 2</i>	IL8	<i>interleukin 8</i>
BID	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>	ILP2	<i>IAP-like protein 2</i>
BIK	<i>BCL2-interacting killer</i>	INCENP	<i>inner centromere protein antigens 135/155kDa</i>
BIM	<i>BCL2L11, BCL2-like 11</i>	KRAS	<i>v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
BMF	<i>Bcl2 modifying factor</i>	LIVIN	<i>BIRC7, baculoviral IAP repeat containing 7</i>
BOK	<i>BCL2-related ovarian killer</i>	MCL1	<i>myeloid cell leukemia sequence 1</i>
BOREALIN	<i>CDCA8, cell division cycle associated 8</i>	MDA5	<i>IFIH1, interferon induced with helicase C domain 1</i>
BRUCE	<i>baculovirus inhibitor of apoptosis repeat containing ubiquitin-conjugating enzyme</i>	MDM2	<i>Mdm2 p53 binding protein homolog (mouse)</i>
CDKN2A	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits CDK4)</i>	MLLT11	<i>myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 11</i>
cIAP1	<i>cellular inhibitor of apoptosis 1</i>		
cIAP2	<i>cellular inhibitor of apoptosis 2</i>		
DIABLO	<i>direct IAP binding protein with low pI</i>		
DICER1	<i>dicer 1, ribonuclease type III</i>		
EPHB4	<i>EPH receptor B4</i>		
ERBB2	<i>v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian)</i>		
EREG	<i>epiregulin</i>		

NAIP	<i>NLR family, apoptosis inhibitory protein</i>	TBP	<i>TATA-box binding protein</i>
NOXA	<i>PMAIP1, phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1</i>	TFB1M	<i>transcription factor B1, mitochondrial</i>
PAPSS2	<i>3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase 2</i>	TLR3	<i>toll-like receptor 3</i>
PKN3	<i>protein kinase N3</i>	TLR6	<i>toll-like receptor 6</i>
PLK1	<i>polo-like kinase 1</i>	TLR7	<i>toll-like receptor 7</i>
PKR	<i>EIF2AK2, eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2</i>	TLR8	<i>toll-like receptor 8</i>
PUMA	<i>p53 up-regulated modulator of apoptosis</i>	TNC	<i>tenascin C</i>
RB1	<i>retinoblastoma 1</i>	TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
RIG-1	<i>DDX58, DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58</i>	TNF-R1	<i>tumor necrosis factor receptor type 1</i>
RIPK1	<i>receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 1</i>	TNFRSF21	<i>tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21</i>
RRM2	<i>ribonucleotide reductase M2</i>	TNFRSF25	<i>tumor necrosis factor receptor superfamily, member 25</i>
SEMA3A	<i>sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3A</i>	TP53	<i>tumor protein p53</i>
STC1	<i>stanniocalcin 1</i>	TRADD	<i>TNFR1-associated death domain protein</i>
Survivin	<i>BIRC5, baculoviral IAP repeat-containing 5</i>	TRAIL	<i>TNF-related apoptosis inducing ligand</i>
		TRAIL-R1	<i>TNF-related apoptosis inducing ligand receptor 1</i>
		TRAIL-R2	<i>TNF-related apoptosis inducing ligand receptor 2</i>
		TSC1	<i>tuberous sclerosis 1</i>
		VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
		XIAP	<i>X-linked inhibitor of apoptosis</i>

Zur Übersichtlichkeit werden die Gene (kursive Schreibweise) und Proteine (normale Schreibweise) im Text nur mit ihren Symbolen bezeichnet.

1 Einleitung

Die Existenz von über 100 verschiedenen Tumorentitäten sowie der mehrstufige Prozess der progressiven Transformation gesunder humaner Zellen in maligne Krebszellen belegen die Komplexität von Tumorerkrankungen. Trotz der enormen Vielfalt an Tumoren existieren zellphysiologische Merkmale, die alle Krebszellen kennzeichnen. Dazu gehören u.a. die Unabhängigkeit von externen Wachstumssignalen, die Insensitivität gegenüber antiproliferativen Signalen, die unbegrenzte Teilungsfähigkeit, die dauerhafte Angiogenese, die Befähigung zur Invasion und Metastasierung sowie die Fähigkeit, den natürlichen Mechanismus zum Schutz vor infizierten oder geschädigten Zellen, die Apoptose, zu umgehen [Hanahan & Weinberg, 2011].

1.1 Apoptose – zielgerichteter, regulierter Zelltod

1.1.1 Definition, Morphologie und Signalwege

Die Apoptose, eine Form des programmierten Zelltodes, ist ein essenzieller biologischer Prozess, der durch gezielte Entfernung überflüssiger Zellen in der Embryonalentwicklung und Organogenese eine wichtige Rolle spielt. Durch die entzündungsfreie Eliminierung geschädigter Zellen schützt Apoptose zudem vor unkontrollierter Zellproliferation und ist ausschlaggebend für die Erhaltung der Homöostase adulter, ausgereifter Gewebe [Daniel, 2008]. Der evolutionär konservierte, energieabhängige Prozess der Apoptose kann durch physiologische, aber auch durch eine Vielzahl zytotoxischer Stimuli induziert werden, z.B. durch DNA-Schädigung oder Stresseinwirkung infolge Wachstumsfaktormangels, Hypoxie bzw. der Akkumulation missgefalteter Proteine. Fehler in der Apoptoseregulation sind mit der Entstehung zahlreicher Krankheiten assoziiert. So ist die Überaktivierung der Apoptose mit Herzerkrankungen und neurodegenerativen Krankheiten, wie z.B. Morbus Alzheimer, verbunden [Whelan *et al.*, 2010; Lukiw & Bazan, 2010]. Im Gegenzug stellt die verminderte Apoptosefähigkeit, welche die Weitergabe dysfunktioneller Tumorsuppressorgene und aktivierter Onkogene ermöglicht, einen Schlüsselfaktor in der Tumorgenese, der Rezidivierung und der Tumorprogression dar [Gerl & Vaux, 2005]. Ein funktionsuntüchtiger Apoptosesignalweg ist ebenso eine Ursache für die Entstehung von Therapieresistenzen, z.B. gegen Chemo- oder Radiotherapien [Johnstone *et al.*, 2002; Shangary & Johnson, 2003].

Morphologisch ist die Apoptose gekennzeichnet durch eine Kondensation des Chromatins, eine Fragmentierung der DNA, ein Schrumpfen der Zelle, das Vorhandensein einer im Anfangsstadium intakten Zellmembran sowie einer Ausstülpung von Zellmembranbläschen infolge der Zerstörung des Zytoskeletts (*blebbing*) im späteren Stadium. Die apoptotischen Zellen sowie die abgeschnürten membranumschlossenen Partikel (apoptotische Körperchen) werden rasch, ohne Entzündungsreaktionen und Gewebeschädigung, von Phagozyten durch Phagozytose entfernt [Burz *et al.*, 2009].

Effektormoleküle der Apoptose sind spezifische Proteasen, die Cystein im aktiven Zentrum tragen und im Substratprotein Peptidbindungen vor einem Aspartat spalten – die Caspasen. Diese werden als Zymogene, die so genannten Pro-Caspasen, synthetisiert [Shi, 2004]. Pro-Caspasen bestehen aus einer großen (p20) und einer kleinen (p10) Untereinheit sowie einer Prodomäne, die regulatorische Elemente wie eine Caspase-Rekrutierungsdomäne (CARD) enthalten kann. Infolge eines apoptotischen Stimulus werden die Pro-Caspasen zu den aktiven heterotetrameren Caspasen, bestehend aus je zwei p10- und p20-Untereinheiten, prozessiert [Daniel, 2008]. Für den regulierten Zelltod sind vor allem die Caspasen-2, -8, -9 und -10 (Initiator-Caspasen) sowie die Caspasen-3, -6 und -7 (Effektor-Caspasen) von Bedeutung [Taylor *et al.*, 2008]. Initiator-Caspasen werden über Signalkomplexe, wie z.B. das Apoptosom, aktiviert und spalten im Rahmen der Caspase-Kaskade die Effektor-Pro-Caspasen. Die aktiven Effektor-Caspasen spalten infolgedessen Proteine, die für die Zellfunktionen und -stabilität von Bedeutung sind.

Die Initiation der Apoptose kann über zwei verschiedene Signalwege erfolgen (Abb. 1.1). Der intrinsische Apoptosesignalweg wird über intrazelluläre Signale, z.B. Stresssignale nach DNA-Schädigung oder Hypoxie, eingeleitet und über spezifische, organellenvermittelte Signalwege hauptsächlich in den Mitochondrien, aber auch im endoplasmatischen Retikulum ausgeführt. Infolge einer Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran werden proapoptotische Faktoren wie Cytochrom C und der *Inhibitor of Apoptosis Protein* (IAP)-Antagonist DIABLO aus dem Intermembranraum freigesetzt. Cytochrom C bindet APAF1 und führt zu einer Konformationsänderung des Proteins, welche die Bindung von ATP/dATP ermöglicht. Nach einer zweiten energieabhängigen APAF1-Konformationsänderung und einer Stabilisierung des APAF1-Cytochrom-C-Komplexes lagern sich sieben dieser Komplexe zu einem Heptamer zusammen. Über die CARD-Domänen wird Pro-Caspase-9 zum Komplex rekrutiert, das Apoptosom entsteht. Caspase-9 wird aktiviert und vermittelt die Aktivierung der Effektor-Caspasen-3, -6 und -7 [Burz *et al.*, 2009; Daniel, 2008]. Bei ATP-Mangel in den Zellen ist die Aktivierung von Caspasen in diesem Signalweg nicht möglich. Es resultiert Caspase-unabhängige Apoptose, welche durch ein Anschwellen der Zelle und den schnellen Verlust der Zellmembranintegrität gekennzeichnet ist [Daniel, 2008].

Der extrinsische Zelltodsignalweg dient der Erkennung apoptotischer Signale aus der Zellumgebung und wird durch Bindung von Zelltodliganden (z.B. TRAIL, FASLG) an die extrazelluläre Domäne der transmembranen Todesrezeptoren (z.B. TRAIL-R1, FAS) aktiviert (Abb. 1.1). Infolgedessen kommt es zur Trimerisierung der Todesrezeptoren, zur Bindung von Adapterproteinen (z.B. FADD) an die intrazelluläre, als Todesdomäne bezeichnete Aminosäuresequenz und zur Bildung des *Death-Inducing Signaling Complex* (DISC). Während das Adapterprotein FADD direkt an die Todesdomäne der TRAIL- und FAS-Rezeptoren bindet, ist für die Bindung an den TNF-R1-Rezeptor noch zusätzlich das Adapterprotein TRADD erforderlich. Nach Rekrutierung von Pro-Caspase-8 oder -10 zum DISC erfolgt deren proteolytische Spaltung. Dieser Prozess kann durch FLIP inhibiert werden [Irmeler *et al.*, 1997]. Die aktivierten Caspasen-8 bzw. -10 vermitteln anschließend die Aktivierung der Effektor-Caspasen-3 und -7 [Burz *et al.*, 2009; Kroemer *et al.*, 2007].

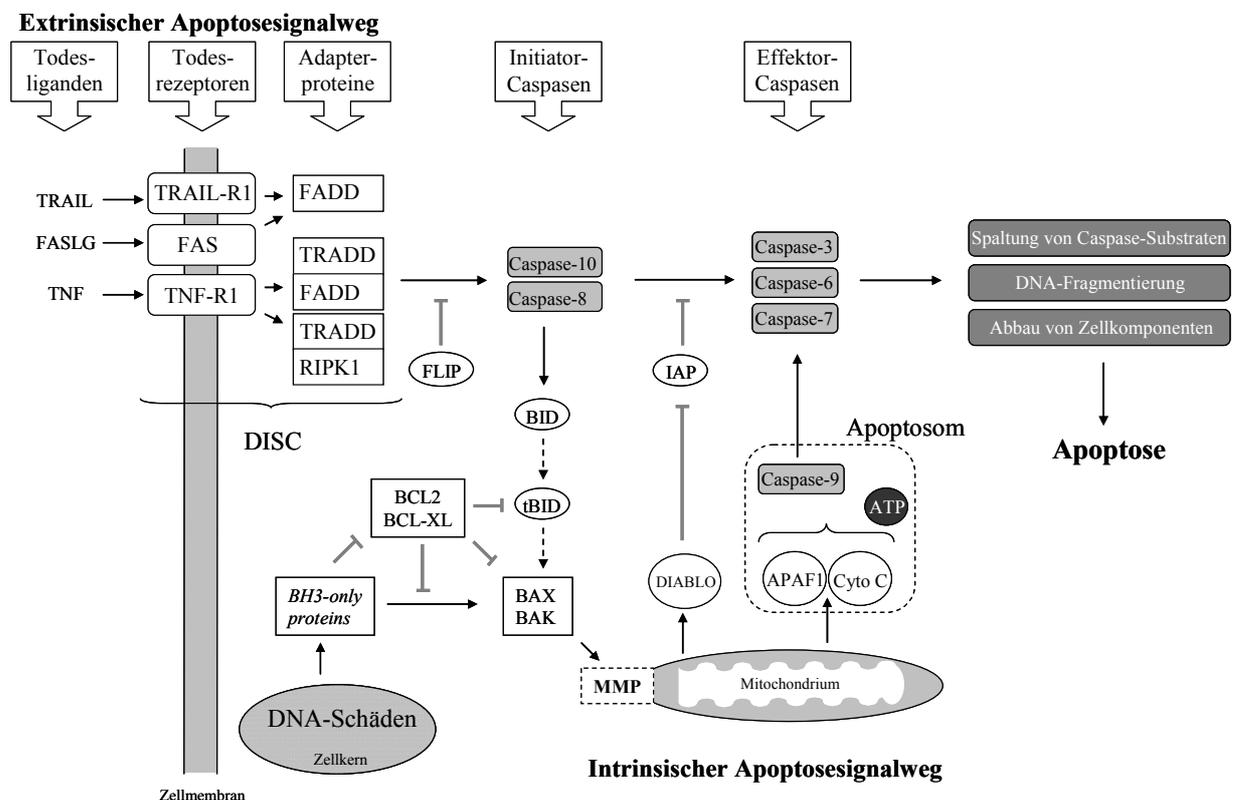


Abb. 1.1: Vereinfachte Darstellung der Apoptosesignalwege. Der intrinsische Signalweg wird durch Stresssignale, z.B. nach DNA-Schädigung, induziert. Infolge der Oligomerisierung von BAX und/oder BAK und der damit verbundenen Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran (MMP) werden proapoptische Faktoren wie Cytochrom C (Cyto C) und der *Inhibitor of Apoptosis Protein* (IAP)-Antagonist DIABLO aus dem Intermembranraum freigesetzt. Die Initiator-Caspase-9 wird energieabhängig im Apoptosom aktiviert. Die Stimulation des extrinsischen Signalweges erfolgt durch Bindung von Zelltodliganden an die extrazelluläre Domäne der transmembranen Todesrezeptoren. Durch Trimerisierung der Rezeptoren und Anlagerung der Adapterproteine wird der *Death-Inducing Signaling Complex* (DISC) gebildet und Caspase-8 bzw. -10 aktiviert. Beide Signalwege führen nach Aktivierung der Effektor-Caspasen zur DNA-Fragmentierung sowie zum Abbau von Zellkomponenten und münden in der Phagozytose der apoptotischen Zelle. Mitglieder der IAP-Familie können die Aktivierung der Caspasen hemmen. BID wirkt als Vermittler zwischen beiden Apoptosesignalwegen. Nach Caspase-8-vermittelter Spaltung transloziert das Spaltprodukt *truncated* BID (tBID) in die Mitochondrien und fördert dort die Freisetzung der proapoptischen Faktoren.

Beide Zelltodsignalwege führen abschließend zur Caspase-vermittelten Spaltung zellulärer Proteine, welche die Inaktivierung von Zellteilung und Reparaturmechanismen (z.B. DNA-Reparatur), den Abbau molekularer Strukturen (z.B. Kernmembran, Zytoskelett), die Störung von Zell-Zell-Kontakten sowie die Markierung der Zelle für die Phagozytose bedingen [Daniel, 2008]. Eine Verbindung zwischen beiden Apoptosesignalwegen stellt die Caspase-8-vermittelte Spaltung von zytosolischem BID dar. Das Spaltprodukt *truncated* BID (tBID) transloziert in die Mitochondrienmembran, fördert deren Permeabilisierung und infolgedessen die Freisetzung proapoptotischer Faktoren [Korsmeyer *et al.*, 2000].

Der programmierte Zelltod ist ein komplexer, streng regulierter Prozess. Zwei Proteinfamilien, die entscheidende Funktionen bei der Apoptoseregulation innehaben, sind die BCL2-Familie und die IAP-Familie.

1.1.2 Die Rolle der BCL2-Proteinfamilie im intrinsischen Apoptosesignalweg

Die BCL2-Proteinfamilie umfasst sowohl anti- als auch proapoptotisch wirkende Vertreter, die durch ein konserviertes Sequenzmotiv, die *BCL2 homology* (BH)-Domänen, gekennzeichnet sind (Tab. 1.1) [Aouacheria *et al.*, 2007]. Während die sechs antiapoptotischen Mitglieder jeweils vier BH-Domänen (BH1 bis BH4) besitzen, unterteilen sich die proapoptotischen Vertreter in *effector proteins* mit bis zu vier BH-Domänen sowie in *BH3-only proteins* mit nur einer BH3-Domäne.

Tab. 1.1: Ausgewählte anti- und proapoptotische Mitglieder der BCL2-Familie.

Antiapoptotisch		Proapoptotisch: <i>effector proteins</i>		Proapoptotisch: <i>BH3-only proteins</i>	
BCL2 ¹	BCL2L10 ¹	BAX ¹	BCL2L13 ¹	BAD	BMF
BCL-XL ^{1,2}	BCL2A1 ¹	BAK ¹	BCL2L14	BID	HRK ¹
BCL-W ¹		BOK ¹	BCL2L15	BIK ¹	NOXA
MCL1 ¹		BCL2L12		BIM ¹	PUMA

¹ enthalten Transmembrandomäne [Aouacheria *et al.*, 2007]; ² antiapoptotische Spleißvariante des *BCL2L1*-Gens

Viele Mitglieder der BCL2-Familie weisen zusätzlich eine Transmembrandomäne auf (Tab. 1.1) [Aouacheria *et al.*, 2007]. Einige davon, wie z.B. BCL2 und BAK, sind generell in der Mitochondrienmembran, aber auch in der Membran des endoplasmatischen Retikulums oder des Zellkerns lokalisiert [Cory *et al.*, 2003]. Andere Vertreter wie BAX und BID befinden sich im Zytosol gesunder Zellen und translozieren nach einem apoptotischen Stimulus in die äußere Mitochondrienmembran.

Die Mitglieder der BCL2-Familie regulieren die Integrität der äußeren Mitochondrienmembran und somit den intrinsischen Apoptosesignalweg. Das Verhältnis von pro- und antiapoptotischen Faktoren ist dabei entscheidend für den Ablauf des programmierten Zelltodes. Nach einem Apoptosestimulus oligomerisieren BAX und/oder BAK in der äußeren Mitochondrienmembran, fördern deren Permeabilisierung und somit die Freisetzung von Cytochrom C (Abb. 1.1) [Chipuk *et al.*, 2010]. Der exakte Mechanismus der BAX/BAK-Aktivierung ist noch nicht vollständig geklärt. Gesichert ist, dass nach einem Apoptosesignal die Aktivierung von *BH3-only proteins* erfolgt. Beispielsweise wird BID gespalten oder die *PUMA*-Transkription infolge von DNA-Schädigung durch den Tumorsuppressor p53 induziert [Nakano & Vousden, 2001]. Aktivierte *BH3-only proteins* können nun BAX und BAK direkt durch Bindung aktivieren (z.B. BID, BIM) oder aber antiapoptotische BCL2-Familienmitglieder wie BCL2 und BCL-XL, welche BAX und BAK binden und infolgedessen die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran verhindern, inaktivieren (z.B. BAD, BIK) [Letai *et al.*, 2002].

1.1.3 Die Rolle der *Inhibitor of Apoptosis Protein*-Familie beim regulierten Zelltod

Aufgrund seiner Fähigkeit, Apoptose in infizierten Zellen zu hemmen, wurde 1993 das erste IAP in Baculoviren identifiziert [Crook *et al.*, 1993]. Infolgedessen wurden die Mitglieder dieser Proteinfamilie als Apoptoseinhibitoren bezeichnet. Die humane IAP-Familie umfasst derzeit acht Mitglieder, die aufgrund ihrer aus etwa 70 Aminosäuren bestehenden und Protein-Protein-Wechselwirkungen vermittelnden Signaturdomäne *baculovirus IAP repeat* (BIR) auch als *BIR-containing* (BIRC) *proteins* bekannt sind (Tab. 1.2). Ursprünglich wurde angenommen, dass IAPs ihre antiapoptotische Wirkung über eine direkte Bindung und Inaktivierung von Caspasen entfalten [Deveraux & Reed, 1999]. *In vivo* konnte dies bislang jedoch nur für XIAP nachgewiesen werden [Chai *et al.*, 2001; Riedl *et al.*, 2001; Shiozaki *et al.*, 2003]. Zudem deuten Strukturanalysen darauf hin, dass eine direkte Caspase-Hemmung durch die anderen sieben IAPs nicht möglich ist [Eckelman *et al.*, 2006]. Der exakte Mechanismus der IAP-vermittelten Apoptoseregulation ist noch ungeklärt. Einige IAPs wie cIAP1 und cIAP2 besitzen eine *really interesting new gene* (RING)-Finger-Domäne, welche eine E3-Ubiquitin-Ligaseaktivität zeigt und die Ubiquitinierung und somit den proteasomalen Abbau aktiver Caspasen vermitteln kann (Tab. 1.2) [Dubrez-Daloz *et al.*, 2008]. Für Survivin wurde eine Komplexbildung mit XIAP beschrieben, wodurch XIAP stabilisiert und seine antiapoptotische Wirkung verstärkt wird [Dohi *et al.*, 2004].

Tab. 1.2: Humane Mitglieder der IAP-Familie und ihre Strukturdomänen.

Bezeichnungen	Strukturdomänen
NAIP, BIRC1	BIR1 ¹ -BIR2 ¹ -BIR3 ¹ -NACHT ² -LRR ³
cIAP1, BIRC2	BIR1-BIR2-BIR3-CARD ⁴ -RING ⁵
cIAP2, BIRC3	BIR1-BIR2-BIR3-CARD-RING
XIAP, BIRC4	BIR1-BIR2-BIR3-RING
Survivin, BIRC5	BIR1
BRUCE, APOLLON, BIRC6	BIR1-UBC ⁶
LIVIN, ML-IAP, BIRC7	BIR1-RING
ILP2, BIRC8	BIR1-RING

¹ vermittelt Protein-Protein-Wechselwirkungen; ² nukleotidbindende Domäne; ³ dient vermutlich der Liganden-erkennung; ⁴ vermittelt Protein-Protein-Interaktionen, Bindungspartner noch nicht identifiziert; ⁵ E3-Ubiquitinligase; ⁶ E2-Ubiquitin-konjugierende- und E3-Ubiquitinligase-Aktivität [Dubrez-Daloz *et al.*, 2008; Eckelman *et al.*, 2006]. Abkürzungen: BIR – *baculovirus IAP repeat*, CARD – Caspase-Rekrutierungsdomäne, LRR – *leucine rich repeat*, NACHT – *domain present in NAIP, CIITA, HET E and TP1*, RING – *really interesting new gene*, UBC – *ubiquitin-conjugating*

DIABLO und HTRA2, welche im intrinsischen Apoptosesignalweg neben Cytochrom C aus den Mitochondrien freigesetzt werden, wirken als IAP-Antagonisten (Abb. 1.1). Über ihr *IAP binding motif* binden sie an ausgewählte BIR-Domänen der IAPs und verdrängen die dort gebundene Caspase oder vermitteln den Abbau der IAPs [Yang & Du, 2004]. Interessanterweise kann Survivin sowohl die Freisetzung der IAP-Antagonisten inhibieren als auch DIABLO durch Bindung inaktivieren und infolgedessen indirekt die Wirkung anderer IAPs verstärken [Caldas *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2003]. Zudem besteht hier eine funktionelle Verbindung zwischen den beiden apoptoseregulierenden Proteinfamilien, da BCL2 und BCL-XL, die antiapoptotischen Mitglieder der BCL2-Familie, ebenfalls die Freisetzung der IAP-Antagonisten aus den Mitochondrien inhibieren [Sun *et al.*, 2002].

Neben ihrer Funktion im programmierten Zelltod spielen IAPs unter anderem wichtige Rollen in der intrazellulären Signalübertragung, der Zellteilung und der Angiogenese. Beispielsweise ist XIAP ein Aktivator des Transkriptionsfaktors NF-κB, welcher in die Regulation von Zellproliferation, Zelltod und Immunantwort involviert ist und auch die Transkription von IAPs und antiapoptotischen Mitgliedern der BCL2-Familie fördert [Kucharczak *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2007]. Unter physiologischen Bedingungen spielt Survivin u.a. eine große Rolle in der Embryonalentwicklung, der Reifung hämatopoetischer Zellen, der Spermato-genese sowie der Zellerneuerung in Leber und Pankreas; wird jedoch nicht in gesunden ausdifferenzierten Zellen gebildet [Caldas *et al.*, 2005; Li & Brattain, 2006]. *Survivin* wird zellzyklusabhängig, insbesondere während der Mitose, exprimiert [Li *et al.*, 1998]. Das Protein Survivin ist ein essenzieller Bestandteil des *chromosomal passenger complex* [Ruchaud *et al.*, 2007]. Aufgrund seiner Funktion als Mitoseregulator fördert Survivin zudem die Zellproliferation und Angiogenese [Margulis *et al.*, 2008].

1.2 Das Harnblasenkarzinom

1.2.1 Epidemiologie, Ätiologie und Klassifikation

In Deutschland stellt das Harnblasenkarzinom (BCa) mit ca. 19 360 geschätzten Neuerkrankungen im Jahr 2006 die vierthäufigste Tumorneuerkrankung und mit 3 549 Sterbefällen die zehnthäufigste Krebstodesursache bei Männern dar [Robert Koch Institut, 2010]. Weltweit traten im Jahr 2008 geschätzt 386 300 BCa-Neuerkrankungen und 150 200 BCa-Todesfälle auf [Jemal *et al.*, 2011]. Die häufigsten bösartigen Neubildungen der Harnblase sind Urothelkarzinome (früher: Transitionalzellkarzinome), ihr Anteil liegt bei über 90 %. Seltener sind Plattenepithel- oder Adenokarzinome [Pashos *et al.*, 2002].

Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 72-74 Jahren. Männer sind etwa dreimal häufiger betroffen als Frauen [Jacobs *et al.*, 2010]. Risikofaktoren, die zur BCa-Entstehung beitragen, sind neben Alter und Geschlecht vor allem der Tabakkonsum und eine Exposition gegenüber polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen oder aromatischen Aminen, die unter anderem in der Farb-, Gummi- und Lederindustrie eingesetzt werden [Jacobs *et al.*, 2010].

Die Klassifikation der Tumorausbreitung erfolgt im Rahmen feingeweblicher Untersuchungen nach dem TNM-System (T - Ausdehnung des Primärtumors, N - Lymphknotenbefall, M - Fernmetastasierung) [Sobin *et al.*, 2009]. Zusätzlich werden die Karzinome anhand des Grades der histologischen Entartung entweder als *low-grade* oder als *high-grade* entsprechend der Kriterien der Weltgesundheitsorganisation aus dem Jahr 2004 unterschieden [Seitz *et al.*, 2005]. Zum Diagnosezeitpunkt weisen ca. 70-80 % der Patienten ein nichtmuskelinvasives BCa auf, das entweder auf das Urothel beschränkt ist (*Carcinoma in situ* [CIS], Ta) oder bereits subepitheliales Gewebe (T1) infiltriert (Abb. 1.2) [Jacobs *et al.*, 2010]. In den verbleibenden Fällen werden bereits muskelinvasive oder metastasierte Tumoren (T2-T4) detektiert.

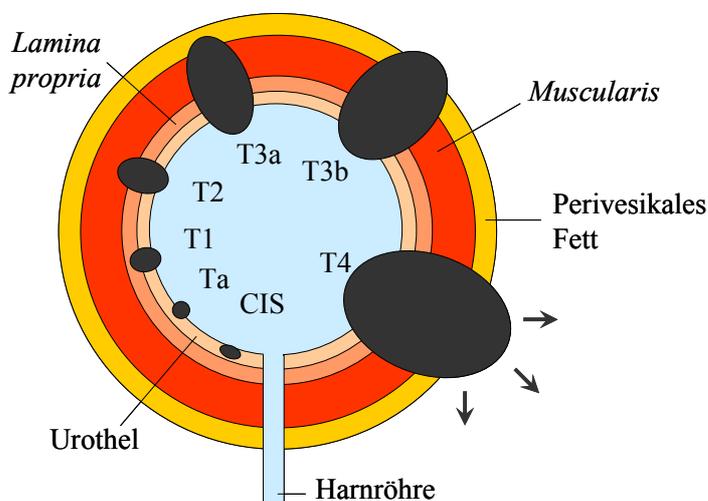


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Harnblase und Klassifikation der Tumorausbreitung beim Harnblasenkarzinom. CIS: *Carcinoma in situ*; Ta: nichtinvasives papilläres Karzinom; T1: Tumor infiltriert subepitheliales Bindegewebe; T2: Tumor infiltriert Muskulatur; T3: Tumor infiltriert perivesikales Gewebe (T3a: mikroskopisch; T3b: makroskopisch); T4: Tumor infiltriert benachbarte Organe (T4a: Prostata, Uterus, Vagina; T4b: Becken- oder Bauchwand).

1.2.2 Therapie und Prognose

Patienten mit nichtmuskelinvasivem BCa stellen bezüglich des Rezidiv- und Progressionsrisikos und damit auch hinsichtlich der zu wählenden Therapie eine sehr heterogene Gruppe dar. Anhand von Anzahl und Größe der Tumoren, des Tumorstadiums und -grades, der bisherigen Rezidivrate sowie dem Vorhandensein von CIS erfolgt eine Risikoabschätzung und eine Einordnung der Patienten in Gruppen mit geringem, mittlerem bzw. hohem Rezidiv- bzw. Progressionsrisiko. Entsprechend der Gruppeneinteilung variiert das Rezidivrisiko nach 5 Jahren zwischen 31 % und 78 %, das Progressionsrisiko zwischen 0,8 % und 45 % [Sylvester, 2011].

Nichtmuskelinvasive Urothelkarzinome werden mittels transurethraler Resektion (TUR-B) organerhaltend aus der Blasenwand entfernt. Zur Rezidiv- und Progressionsprophylaxe wird nach der TUR-B die intravesikale Instillation eines Chemotherapeutikums (CT) wie z.B. Mitomycin C (MMC) oder Doxorubicin empfohlen [Babjuk *et al.*, 2011]. Diese adjuvanten Chemotherapien können das Rezidivrisiko jedoch nur bedingt vermindern (entsprechend einer Metaanalyse sinkt das Rezidivrisiko von 48,4 % nach TUR-B auf 36,7 % nach TUR-B+CT) und haben keinen Einfluss auf die Tumorprogression [Sylvester *et al.*, 2004; Chiong & Esuvaranathan, 2010]. Eine bei Patienten mit hohem Progressionsrisiko, d.h. bei Patienten mit CIS (häufig Vorstufe invasiver BCa) oder *high-grade* Tumoren, durchgeführte langfristige intravesikale Immuntherapie mit *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) kann zwar die Rezidiv- und Progressionsrate senken, ist jedoch im Vergleich zur intravesikalen Chemotherapie mit stärkeren lokalen und systemischen Nebenwirkungen (bis hin zur Sepsis) verbunden [Jacobs *et al.*, 2010]. Zudem entwickeln ca. 20 % der Patienten eine BCG-Intoleranz, die zum Therapieabbruch führen kann [Witjes, 2006].

Bei Patienten ohne Ansprechen auf eine BCG-Therapie oder mit muskelinvasivem BCa der Stadien T2 bis T4a wird eine radikale Zystektomie durchgeführt [Novotny *et al.*, 2007; Stenzl *et al.*, 2011]. Dabei wird zum Zeitpunkt der Zystektomie bei 30-50 % der Patienten die tatsächliche Schwere der Erkrankung unterschätzt [Jacobs *et al.*, 2010]. Es entwickeln 20-30 % der Patienten mit T2-, 40-60 % der Patienten mit T3- und 70-90 % der Patienten mit T4-Tumoren Fernmetastasen oder Lokalrezidive und versterben an der Krankheit. Die 5-Jahresüberlebensraten liegen je nach Tumorstadium zwischen 27 % und 66 % [Jacobs *et al.*, 2010]. Daher empfiehlt sich vor der Zystektomie eine Cisplatin-basierte systemische Chemotherapie [Stenzl *et al.*, 2011].

Patienten mit metastasiertem BCa werden mit einer kombinierten, meist Cisplatin-basierenden Chemotherapie behandelt, z.B. Methotrexat/Vinblastin/Doxorubicin/Cisplatin (MVAC) oder Gemcitabin/Cisplatin. Trotz initialem Therapieansprechen rezidivieren die Mehrzahl der Tumoren, eine Heilung ist nahezu ausgeschlossen, in seltenen Fällen jedoch möglich [Agarwal

& Hussain, 2009; Froehner *et al.*, 2001]. Das mediane Überleben von Patienten mit metastasiertem BCa liegt bei lediglich 12-15 Monaten [Jacobs *et al.*, 2010].

Insgesamt ist die Prognose für BCa-Patienten, besonders im fortgeschrittenen Stadium, als schlecht zu bewerten. Das Urothelkarzinom stellt zwar im Vergleich zu anderen soliden Tumoren eine eher chemosensitive Erkrankung dar, jedoch ist, bedingt durch die Ausbildung von Resistenzmechanismen, das Ansprechen auf eine lokale oder systemische Chemotherapie begrenzt [Gasi3n & Cruz, 2006]. Daher stehen die Verbesserung der Wirksamkeit etablierter Chemotherapeutika sowie die Suche nach neuen, wirksameren Behandlungsstrategien im Fokus der experimentellen und klinischen BCa-Forschung [Fuessel *et al.*, 2006a].

1.2.3 Molekulare Ursachen der Entstehung und Progression

Es existieren zwei in ihrer Tumorbilogie und Prognose divergente Frühstadien des BCa: nichtmuskelinvasive, papilläre Ta-Tumoren mit hohem Rezidiv- aber geringem Progressionsrisiko und flache *high-grade* CIS-Läsionen mit hohem Progressionsrisiko, die infolgedessen häufig eine Vorstufe invasiver BCa darstellen [Castillo-Martin *et al.*, 2010; Wu 2005] (Abb. 1.3).

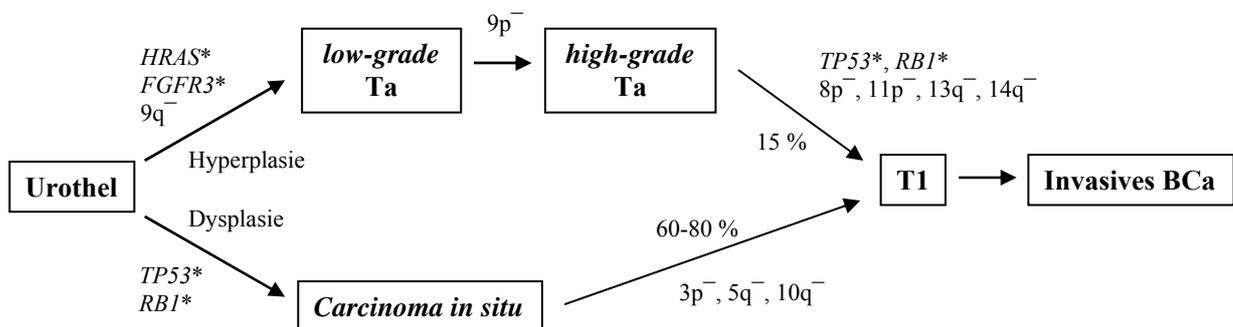


Abb. 1.3: Molekulare Wege der Harnblasenkarzinomentstehung. Die Pathogenese von Harnblasenkarzinomen kann über zwei verschiedene molekulargenetische Routen erfolgen. Zum einen können infolge aktivierender Mutationen im *HRAS*- oder *FGFR3*-Gen papilläre Ta-Tumoren mit hohem Rezidiv- und geringem Progressionspotenzial entstehen. Zum anderen bedingen funktionelle Defekte in den *TP53*- und *RBI*-Tumorsuppressorsignalwegen die Entstehung von *Carcinoma in situ* mit hohem Progressionsrisiko. Abkürzungen: p⁻ / q⁻ – Verluste im kurzen bzw. langen Arm des angegebenen Chromosoms; * kennzeichnen mutierte Gene

Papilläre, nichtinvasive Ta-Tumoren können aus gutartigen Urothelverdickungen, so genannten Hyperplasien, entstehen. Sie sind infolge von Mutationen im *FGFR3*- oder *HRAS*-Gen durch einen konstitutiv aktivierten Rezeptortyrosinkinase/RAS-(*rat sarcoma viral oncogene*)-Signalweg gekennzeichnet [Wu 2005]. Dieser Signalweg spielt eine zentrale Rolle in der Zellproliferation und ist durch Weiterleitung mitogener Signale von der Zelloberfläche in den Zellkern an der Erneuerung von Epithelzellen beteiligt [Gschwind *et al.*, 2004]. Aktivierende Mutationen der Rezeptortyrosinkinase *FGFR3* werden in 74 % der Ta-Tumoren,

jedoch nur in 16 % der muskelinvasiven BCa beschrieben [Billerey *et al.*, 2001]. Das Proto-Onkogen *HRAS* ist in ca. 54 % der Urothelkarzinome überexprimiert [Ye *et al.*, 1993]. Dies wird durch aktivierende *HRAS*-Mutationen, die in 10-40 % der BCa auftreten, hervorgerufen bzw. ist eine Folge der *FGFR3*-Induktion [Jebar *et al.*, 2005; Wu 2005]. Die Progression papillärer BCa zum invasiven Wachstum ist häufig mit Deletionen in den Chromosomenarmen 8p, 11p, 13q und 14q verbunden [Wu 2005].

CIS-Läsionen und muskelinvasive BCa sind durch inaktivierende Mutationen der Tumorsuppressorgene *TP53* und *RB1* gekennzeichnet [Castillo-Martin *et al.*, 2010]. Das Produkt des *TP53*-Gens, p53, ist ein Transkriptionsfaktor, der nach DNA-Schädigung in gesunden Zellen das Fortschreiten des Zellzyklus inhibiert um eine DNA-Reparatur zu ermöglichen bzw. bei stärkeren Beeinträchtigungen die Expression von Genen, deren Proteine apoptosefördernde Funktionen besitzen, vermittelt. *TP53*-Mutationen reduzieren die sequenzspezifische DNA-Bindung von p53 und beeinträchtigen dessen Funktion als Transkriptionsfaktor [Maslon & Hupp, 2010]. Intaktes p53 kann zudem von MDM2, welches in ca. 30 % der BCa verstärkt gebildet wird, sowohl durch direkte Bindung als auch durch Ubiquitinierung inhibiert werden [Haupt *et al.*, 1997; Wu 2005]. *RB1* ist ein negativer Regulator des Zellzyklus. Eine Verringerung des *RB1*-Proteinniveaus in muskelinvasiven BCa korreliert mit einem verkürzten Überleben dieser Patienten [Cordon-Cardo *et al.*, 1992]. Gleichzeitige Fehlfunktionen in den *TP53*- und *RB1*-Signalwegen treten in über 50 % der invasiven *high-grade* BCa auf [Wu 2005]. Diese Veränderungen beeinflussen die genomische Stabilität der BCa-Zellen und begünstigen die Akkumulation weiterer genetischer Aberrationen. Demzufolge wächst der Anteil chromosomaler Veränderungen mit zunehmendem Tumorstadium, was mit einer ungünstigeren Prognose assoziiert ist [Blaveri *et al.*, 2005].

Urothelkarzinome treten häufig multifokal, d.h. an mehreren Stellen in der Harnblase, auf [Wu 2005]. Dies kann durch sich unabhängig voneinander entwickelnde Tumorherde bedingt sein [Hartmann *et al.*, 2000] oder aber durch Streuung bzw. Migration von BCa-Zellen aus einem Tumorklon hervorgerufen werden [Simon *et al.*, 2001]. Ein generelles, frühzeitiges Ereignis in der BCa-Entstehung sind *loss of heterozygosity*-Ereignisse am Chromosom 9, auf dem mehrere Tumorsuppressorgene, wie z.B. *CDKN2A* und *TSC1*, lokalisiert sind [Wu 2005]. Ebenso tragen Fehlregulationen in den Apoptosesignalwegen entscheidend zur BCa-Entstehung und -Progression bei und sind zudem Ursachen für die Ausbildung von Therapieresistenzen [Duggan *et al.*, 2001].

1.2.4 Harnblasenkarzinom und Apoptose

Beim BCa sind zahlreiche Veränderungen in den Apoptosesignalwegen bekannt. Eine entscheidende Rolle spielt dabei das bereits erwähnte Tumorsuppressorgen *TP53*, welches in bis zu 61 % der BCa mutiert und mit einem invasiven Phänotyp verbunden ist [McKnight *et al.*, 2005]. Das Protein p53, welches aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit in Abwesenheit von Stresssignalen in gesunden Zellen nur in geringem Maß vorhanden ist, kann sowohl die Transkription von Genen, deren Proteine proapoptotische Funktionen besitzen, z.B. *BAX*, *PUMA*, *NOXA* sowie *APAF1* [Hickman *et al.*, 2002], induzieren als auch die Expression von Genen, deren Proteine antiapoptotisch wirken, z.B. *BCL2*, *BCL-XL* und *Survivin*, inhibieren [Haldar *et al.*, 1994; Hoffman *et al.*, 2002; Sugars *et al.*, 2001]. Bei BCa-Patienten sind *TP53*-Mutationen bzw. die dadurch häufig veränderte Proteinstabilität des mutierten p53, welche zu einer Akkumulation von p53 in den Tumorzellen führt, mit einem höheren Tumorstadium und -grad sowie mit einer ungünstigeren Prognose der betroffenen Patienten assoziiert [Karam *et al.*, 2007a; Sarkis *et al.*, 1993]. Eine postulierte erhöhte Chemosensitivität von *TP53*-mutierten BCa-Zellen konnte in einer multizentrischen klinischen Studie an Hochrisiko-Patienten mit organbegrenzten, muskelinvasiven BCa bisher nicht bestätigt werden [Stadler *et al.*, 2009].

Weiterhin sind beim BCa Veränderungen in den Genen der Todesrezeptoren, deren Proteine für die Erkennung extrazellulärer Apoptosesignale unerlässlich sind, bekannt. So werden auf dem Chromosom 8 in der Region der *TRAIL-R1*- und *TRAIL-R2*-Rezeptoren häufig *loss of heterozygosity*-Ereignisse beobachtet und in 28 % der BCa Mutationen des *FAS*-Rezeptors detektiert [Adams *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 1999]. Ein infolgedessen geringeres *FAS*-Proteinniveau in den BCa-Geweben ist mit einem höheren Tumorstadium und -grad sowie einer schlechteren Prognose assoziiert [Yamana *et al.*, 2005].

BCL2 und *BCL-XL*, die wichtigsten antiapoptotischen Mitglieder der *BCL2*-Familie, sowie die Vertreter der *IAP*-Familie tragen ebenfalls zum inkorrekten Ablauf der Apoptose beim BCa bei. In 28-100 % der BCa werden auf Transkriptebene oder immunhistochemisch *BCL2*-positive Tumorzellen detektiert, was häufig mit der Entstehung von Chemo- und Radiotherapieresistenzen und einer ungünstigeren Prognose verbunden ist [Cooke *et al.*, 2000; Gazzaniga *et al.*, 1998; Glick *et al.*, 1996; Hussain *et al.*, 2003; Liukkonen *et al.*, 1997; Ong *et al.*, 2001; Pollack *et al.*, 1997]. Ein in 81 % der invasiven BCa positiver *BCL-XL*-Proteinnachweis korreliert mit einem hohen Tumorgrad und -stadium [Korkolopoulou *et al.*, 2002]. Zudem ist beschrieben, dass die Überexpression von *BCL2* oder *BCL-XL* in verschiedenen BCa-Zelllinien eine Chemoresistenz hervorruft [Cho *et al.*, 2006; Lebedeva *et al.*, 2001; Miyake *et al.*, 1998]. Studien an Leukämiezellen zeigen, dass die Reduktion des

BCL2-Proteins durch Induktion von BCL-XL kompensiert werden kann, was für die Ausbildung von Therapieresistenzen von Bedeutung sein könnte [Han *et al.*, 1996].

XIAP-positive Zellen werden in 61 % aller nichtmuskelinvasiven BCa detektiert und sind mit einem erhöhten Rezidivrisiko verbunden [Li *et al.*, 2007]. Weiterhin bewirkt die stabile XIAP-Überexpression in T24-BCa-Zellen eine erhöhte Chemoresistenz [Bilim *et al.*, 2003]. Für *LIVIN* wurde gezeigt, dass nur die Isoform α in 23 % der nichtmuskelinvasiven BCa exprimiert wird, was mit einer verkürzten rezidivfreien Zeit assoziiert ist [Gazzaniga *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2009]. Weiterhin wird beschrieben, dass die Überexpression von *cIAP2* in BCa-Zelllinien zur Ausbildung einer Chemoresistenz führt [Jönsson *et al.*, 2003].

Zahlreiche Studien belegen eine außerordentliche Wertigkeit von *Survivin* beim BCa. So wird *Survivin* als geeigneter Marker für die BCa-Diagnose und -Prognose als auch für das Ansprechen auf intravesikale und systemische Therapien beschrieben [zusammengefasst in Margulis *et al.*, 2008]. Während gesundes Urothel keine Expression von *Survivin* aufweist, wird dieser Apoptoseinhibitor auf mRNA- und Proteinebene in 53-100 % der BCa gefunden, was oft mit einem hohen Tumorstadium und -grad sowie einer gesteigerten Rezidiv- und Progressionsrate korreliert [Karam *et al.*, 2007b; Schultz *et al.*, 2003; Shariat *et al.*, 2007; Weikert *et al.*, 2005]. Zudem ist ein hohes *Survivin*-Niveau im Gewebe oder Urin von BCa-Patienten mit einem schlechteren Ansprechen auf Radio- und Chemotherapien verbunden [Hausladen *et al.*, 2003; Weiss *et al.*, 2009].

Antiapoptotische Proteine wie BCL2, BCL-XL, XIAP und *Survivin* können also BCa-Zellen vor dem natürlichen Zelltod schützen und die Wirksamkeit antiproliferativer Therapien beeinträchtigen. Demzufolge könnte die Hemmung dieser Targets eine Reaktivierung der Apoptosesignalwege bewirken und infolgedessen das Tumorwachstum reduzieren sowie die Effektivität von neoadjuvanten oder adjuvanten Therapien erhöhen. Eine viel versprechende Methode zur spezifischen Geninhibition stellen synthetische Nukleinsäurekonstrukte, insbesondere die *small interfering RNAs* (siRNAs), dar.

1.3 *Small interfering RNAs* – Nukleinsäurekonstrukte zur selektiven Hemmung tumorrelevanter Gene

Die RNA-Interferenz (RNAi) ist ein Mechanismus der posttranskriptionellen Geninhibition, bei dem doppelsträngige RNA die Spaltung sequenzhomologer mRNAs vermittelt oder deren Translation reprimiert. Dieser evolutionär konservierte Prozess dient insbesondere dem Schutz des Genoms vor Invasion fremder Nukleinsäuren, wie z.B. RNA-Viren oder Transposons [Dallas & Vlassov, 2006]. Lange doppelsträngige RNA wird in der Zelle von der

Ribonuklease DICER1 in kurze, 21-23 Nukleotide umfassende siRNAs mit charakteristischen 2 nt-Einzelstrangüberhängen am 3'-Ende gespalten (Abb. 1.4) [Zhang *et al.*, 2004].

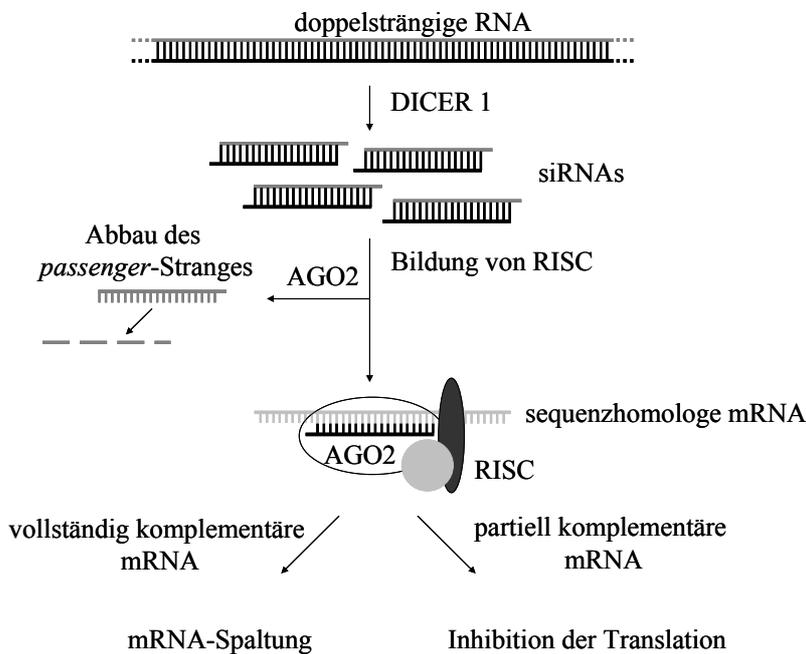


Abb. 1.4: Mechanismus der RNA-Interferenz. Lange doppelsträngige RNA-Moleküle werden in der Zelle von DICER in *small interfering RNAs* (siRNAs) gespalten. Diese werden im *RNA-Induced Silencing Complex* (RISC) von AGO2 entwunden. Der *guide*-Strang der siRNA vermittelt die Interaktion mit der Ziel-mRNA. Bei Komplementarität wird die Target-mRNA durch AGO2 gespalten, die mRNA-Fragmente werden von Exonukleasen abgebaut. Bei Fehlpaarungen zwischen siRNA-Strang und mRNA kann eine Inhibition der Translation resultieren.

Die siRNAs werden im *RNA-Induced Silencing Complex* (RISC) gebunden und durch AGO2 entwunden (Abb. 1.4). Der siRNA-*passenger*-Strang, auch *sense*-Strang genannt, wird abgebaut. Der *guide*-Strang (= *antisense*-Strang) bindet über Watson-Crick-Basenpaarung an komplementäre mRNA und vermittelt deren Spaltung durch AGO2 [Kim & Rossi, 2007]. Dabei wird die Ziel-mRNA an der Phosphodiesterbindung zwischen den Nukleotiden gespalten, welche, vom 5'-Ende gezählt, den siRNA-Nukleotiden 10 und 11 gegenüberliegen [Elbashir *et al.*, 2001a]. Durch Dissoziation der Target-mRNA-Segmente vom siRNA-Strang erfolgt die Regeneration des funktionstüchtigen RISC. Die mRNA-Fragmente werden anschließend von zellulären Exonukleasen abgebaut [Orban & Izaurralde, 2005]. Welcher der beiden siRNA-Stränge in RISC eingebaut wird, hängt von der thermodynamischen Stabilität der Duplex-Enden ab, wobei der Strang mit der schwächeren Basenpaarung am 5'-Ende favorisiert ist [Schwarz *et al.*, 2003]. Fehlpaarungen zwischen der Ziel-mRNA und dem siRNA-Strang können die endonukleolytische Spaltung supprimieren und eine Inhibition der Translation bewirken (Abb. 1.4) [Carthew & Sontheimer, 2009].

Synthetische siRNAs, deren Nukleotidabfolge spezifisch an ein gewähltes mRNA-Target angepasst ist, können in Zellen eingebracht werden und dort unter Ausnutzung der RNAi die sequenzspezifische Hemmung der Ziel-mRNA vermitteln [Elbashir *et al.*, 2001b]. Dieser Effekt hält in sich schnell teilenden Zellen ungefähr eine Woche an [Bartlett & Davis, 2006]. Eine längerfristige Targetinhibition kann durch Verwendung von *short hairpin RNA* (shRNA)-Vektoren erzielt werden. Diese in die Zielzellen eingebrachten DNA-Vektoren

exprimieren dauerhaft doppelsträngige, eine Haarnadelschleife enthaltende shRNAs, welche von EXPORTIN 5 ins Zytosol transportiert und dort von DICER1 zu funktionstüchtigen siRNAs prozessiert werden [Aagaard & Rossi, 2007].

Da der Einsatz von siRNAs eine schnelle und einfache Generierung von *loss-of-function*-Phänotypen erlaubt, liegen wichtige Anwendungsgebiete dieser Konstrukte in der Aufklärung der Genfunktion und der Entschlüsselung von Signalwegen [Kurreck, 2009]. Dabei ist es durch entsprechende Sequenzauswahl sogar möglich, selektiv bestimmte Isoformen zu inhibieren, um deren spezifische Funktion zu erforschen [Warnecke *et al.*, 2004]. Weiterhin sind siRNAs auch für therapeutische Anwendungen zur Inhibition krankheitsassoziierter Gene von großem Interesse. Zahlreiche präklinische und erste klinische Studien belegen die Zweckmäßigkeit dieses Ansatzes, u.a. in der Behandlung von Krebserkrankungen und viralen Infektionen [zusammengefasst in López-Fraga *et al.*, 2008 und Phalon *et al.*, 2010]. Zur Therapie der Augenerkrankung „Altersbedingte Makuladegeneration“ werden bereits klinische Phase II/III-Studien mit siRNAs, die gegen den Angiogenesefaktor *VEGF* oder dessen Rezeptoren gerichtet sind, durchgeführt [zusammengefasst in Kurreck, 2009]. Die Eignung von siRNAs zur Behandlung von Tumorerkrankungen wird in verschiedenen klinischen Phase I-Studien evaluiert (Tab. 1.3). Erste Ergebnisse zeigen, dass die nach operativer Entfernung von Glioblastomen in die entstandenen Kavitäten injizierte, gegen *TNC* gerichtete siRNA eine signifikante Verbesserung des Gesamtüberlebens der Patienten bewirkt [Rolle *et al.*, 2010]. *TNC* ist ein Glycoprotein der extrazellulären Matrix, welches in Hirntumoren verstärkt gebildet wird.

Tab. 1.3: Klinische Studien zur direkten Applikation von siRNAs bei Tumorerkrankungen.

Tumorentität	Produkt	Target	Applikation	Status
Glioblastoma multiforme	ATN-RNA ¹	<i>TNC</i>	postoperative Injektion in Kavität	Phase I
Solide Tumoren	CALAA-01 ²	<i>RRM2</i>	intravenös	Phase I
Fortgeschrittene solide Tumoren	Atu027 ³	<i>PKN3</i>	intravenös	Phase I
Adenokarzinom des Pankreas	siG12D ⁴	<i>KRASG12D</i> (Mutation des KRAS-Onkogenes)	intratumoral	Phase I

Quellen: Rolle *et al.*, 2010; US National Institutes of Health, 2010; Firma: ¹ Senetek PLC; ² Calando Pharmaceuticals; ³ Silence Therapeutics AG; ⁴ Silenseed Ltd.

Die Harnblase als Hohlorgan bietet die einzigartige Möglichkeit einer lokalen Wirkstoffapplikation durch intravesikale Instillation, bei der das Medikament lokal angereichert wird und systemische Nebenwirkungen vermieden werden. Klinische Studien mit siRNA-Therapeutika beim BCa sind derzeit nicht beschrieben. Ergebnisse von Zellkultur- und Tierexperimenten zeigen jedoch das Potenzial dieser molekularen Behandlungsansätze. Beispielsweise bewirkt die siRNA-vermittelte Hemmung der im BCa überexprimierten Rezeptor-

tyrosinkinase *EPHB4* eine Reduzierung der Zellviabilität sowie eine Apoptoseinduktion *in vitro* [Xia *et al.*, 2006]. Eine Inhibition von *hTERT*, der katalytischen Untereinheit der Telomerase, welche entscheidend zur Immortalisierung von Tumorzellen beiträgt, verstärkt in EJ28-BCa-Zellen das Ansprechen auf eine nachgeschaltete Chemotherapie mit MMC oder Cisplatin (CDDP) [Kraemer *et al.*, 2006]. Zudem bewirkt eine kombinierte Hemmung von *hTERT* und *Survivin* oder *hTERT* und dem Angiogenesefaktor *VEGF* in EJ28-Zellen eine signifikant stärkere Viabilitätsreduktion im Vergleich zu den entsprechenden Einzelbehandlungen [Kunze *et al.*, 2008]. *In vivo* wird eine Verringerung des Wachstums humaner BCa-Zellen im orthotopen Mausmodell nach intravesikaler Instillation einer liposomenverpackten siRNA gegen den Mitoseregulator *PLK1* beschrieben [Nogawa *et al.*, 2005]. Wichtig für einen effektiven, nebenwirkungsarmen Einsatz von siRNAs in der Tumorthherapie ist die Auswahl von Zielgenen, die in Tumorzellen im Vergleich zu gesundem Gewebe überexprimiert sind und deren Proteine eine essenzielle Funktion in der Tumorbiologie innehaben.

2 Zielstellung

Die Apoptose ist ein hochkonservierter, streng regulierter biologischer Prozess, welcher der Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase und der gezielten, entzündungsfreien Eliminierung geschädigter Zellen dient. Fehlregulationen in den Apoptosesignalwegen stellen ein zentrales Ereignis in der Tumorgenese dar und tragen außerdem zur Entstehung von Chemo- und Radiotherapieresistenzen bei. Eine wichtige Rolle in der Apoptoseregulation spielen die Mitglieder der BCL2- und der *Inhibitor of Apoptosis Protein* (IAP)-Familien, deren wichtigste antiapoptotische Vertreter *BCL2*, *BCL-XL*, *XIAP* und *Survivin* häufig in Tumoren, einschließlich des Harnblasenkarzinoms (BCa), überexprimiert sind.

In der vorliegenden Arbeit soll überprüft werden, ob die Hemmung der Apoptoseinhibitoren *BCL2*, *BCL-XL*, *XIAP* und *Survivin* mittels *small interfering RNAs* (siRNAs) zur Reduktion des BCa-Zellwachstums führt und damit eine Therapieoption zur BCa-Behandlung darstellen könnte. Zur Auswahl geeigneter Modellzelllinien für die Inhibition der vier Zielgene werden die Expressionsniveaus der Targets in verschiedenen BCa-Zelllinien sowie in nicht-malignen Fibroblastenzellen bestimmt. Anschließend erfolgt die Charakterisierung der molekularen und zellulären Effekte der siRNA-vermittelten Zielgenhemmung in ausgewählten BCa-Zelllinien sowie in den nichtmalignen Kontrollzellen. Da zur Tumorentstehung und -progression eine Vielzahl von genetischen Veränderungen beitragen, erscheint der Angriff eines einzelnen Zielgens unzureichend für eine effektive Tumorthherapie. Aufgrund dessen wird untersucht, ob durch simultane Reduktion der ausgewählten Apoptoseinhibitoren stärkere wachstumshemmende Effekte erzielt werden können. Ebenso wird überprüft, ob die Ausschaltung von *BCL2*, *BCL-XL*, *XIAP* und/oder *Survivin* BCa-Zellen gegenüber einer nachgeschalteten Behandlung mit den klinisch beim BCa eingesetzten Chemotherapeutika Mitomycin C oder Cisplatin sensitivieren kann. Zur Charakterisierung genomweiter Expressionsänderungen nach Hemmung der antiapoptotischen Faktoren erfolgen Oligonukleotid-*Microarray*-Analysen. Die zellulären Effekte einer langfristigen Inhibition der ausgewählten Zielgene werden unter Nutzung von *short hairpin RNA*-Vektoren bestimmt. Schließlich wird ein subkutanes BCa-Xenotransplantat-Mausmodell etabliert, an dem die aus den Zellkulturanalysen hervorgegangenen effektivsten siRNA- und/oder siRNA+Chemotherapie-Behandlungen *in vivo* charakterisiert werden können. Dafür erfolgt zunächst die Etablierung einer lokalen siRNA-Applikation sowie einer systemischen Chemotherapie *in vivo*.

Diese Arbeit soll klären, ob durch siRNA-vermittelte Inhibition von *BCL2*, *BCL-XL*, *XIAP* und/oder *Survivin* Apoptose in BCa-Zellen induziert werden kann und ob diese Behandlung die Effektivität konventioneller Chemotherapien erhöht.

3 Material und Methoden

Nach Vorstellung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien (Kapitel 3.1.1), Reagenzien und Kits (Kapitel 3.1.2) sowie Medien, Puffer und Lösungen (Kapitel 3.1.3) erfolgt die Einführung der verwendeten humanen Zelllinien (Kapitel 3.2.1) sowie der applizierten siRNAs (Kapitel 3.2.2.1). Basierend auf diesen Informationen wird anschließend die alleinige bzw. mit einer Chemotherapie kombinierte siRNA-Transfektion beschrieben (Kapitel 3.2.2.2 und 3.2.2.3). Um Langzeiteffekte der Inhibition bestimmter apoptoseregulierender Gene zu analysieren, wurden EJ28-BCa-Zellen stabil mit shRNA-Vektoren transfiziert (Kapitel 3.2.3). Zur Charakterisierung der aus den vorgenommenen Behandlungen resultierenden zellulären Effekte erfolgten WST-1-Zellviabilitätstests (Kapitel 3.3.1), Zellzählungen (Kapitel 3.3.2), Zellkoloniebildungstests (Kapitel 3.3.3) sowie durchflusszytometrische Bestimmungen von Apoptoseraten (Kapitel 3.3.4) und Zellzyklusverteilungen (Kapitel 3.3.5). Molekulare Effekte der Zellbehandlungen wurden auf mRNA-Ebene mittels quantitativer Polymerasekettenreaktion (Kapitel 3.4.1) und Oligonukleotid-*Microarrays* (Kapitel 3.4.2) sowie auf Proteinebene mittels *Western Blot* (Kapitel 3.4.3) untersucht. Um schließlich die antitumorale Wirkung der siRNAs *in vivo* zu verifizieren, erfolgten Untersuchungen am subkutanen EJ28-Xenotransplantatmodell (Kapitel 3.5).

3.1 Material

3.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

Produkt	Firma
Affymetrix Expression Console Software 1.1	Affymetrix (Santa Clara, USA)
Autoradiographiefilm BioMax MR; Autoradiographiekassetten	Eastman Kodak (Rochester, USA)
Bioanalyzer 2100; 2100 Expert Software (B.02.02); Chip Priming Station; IKA Vortex Mixer	Agilent (Böblingen)
Brutschrank BB6220	Heraeus (Hanau)
Combitips plus (0,5 ml; 5 ml; 10 ml)	Eppendorf (Hamburg)
Dampfsterilisator	H+P Labortechnik (Oberschleissheim)
Dri-Block DB 2A (Heizelement)	Techne (Cambridge, Großbritannien)
Einfriergerät NICOOL LM 10	Air Liquide (St. Georges, Frankreich)
Einmalspritzen (5 ml; 10 ml)	Braun (Melsungen)
Einwegpipetten (5 ml; 10 ml; 25 ml; 50 ml)	Corning (New York, USA)
Elektroblottermodul; Elektrophoresesystem TV100	VWR (Darmstadt)

Elektrophorese-Netzgerät EPS 3500	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
FACScan Durchflusszytometer inkl. CellQuest-Software, FACS-Röhrchen	Becton Dickinson (Heidelberg)
Filterpapier	Schleicher & Schuell BioScience (Dassel)
Filterspitzen SafeSeal-Tips professional (10 µl; 100 µl; 1000 µl)	Biozym (Hessisch Oldendorf)
Flockeneisbereiter	Wessamat Eismaschinenfabrik (Kaiserslautern)
GeneChip Human Gene 1.0 ST Array; Fluidics Station 450; Hybridization Oven 640; Scanner 3000 7G; GCOS 1.4	Affymetrix (Santa Clara, USA)
Gewebekulturgefäße (6-, 24- und 96-Well-Mikrotiterplatten, 25 cm ² -, 75 cm ² -, 175 cm ² -Zellkulturflaschen)	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Hybond-P PVDF Membrane	GE Healthcare (Freiburg)
Injektionsspritzen (1 ml)	Terumo Europe (Leuven, Belgien)
Kanülen (27 G)	Braun (Melsungen)
Kodak <i>ID Image Analysis Software</i> V3.6; Kodak X-OMAT 480 RA Processor (Röntgenfilmentwickler)	Eastman Kodak (Rochester, USA)
Kryoröhrchen (2 ml)	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Laminiergerät	Severin (Sundern)
LightCycler 1.5 inkl. Software 3.5; LightCycler-Kapillaren	Roche Applied Science (Mannheim)
Messschieber (digital)	Globaltronics (Hamburg)
Mikroskop Zeiss Axiovert 40 C	Carl Zeiss (Oberkochen)
Mikrotiterplatten-Spektrophotometer AR 8001	Anthos Labtec (Salzburg, Österreich)
Multistepper	Brand (Wertheim)
PCR Softtubes (0,5 ml)	Biozym (Hessisch Oldendorf)
Pipetboy (Pipettierhilfe)	Integra Biosciences (Fernwald)
Pipetten	Eppendorf (Hamburg)
Pipettenspitzen (10 µl; 100 µl; 1000 µl)	Nerbe (Winsen/Luhe)
Präzisionsküvetten (Quarzglas)	Hellma (Müllheim)
Präzisionswaage 510	Kern (Balingen)
Precise Protein Gels, 8-16 % (Gradienten-Polyacrylamid-Gel)	Thermo Fisher Scientific (Bonn)
QiaShredder	Qiagen (Hilden)
Reaktionsgefäße (0,5 ml; 1,5 ml; 2,0 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Rotator SB3	Roth (Karlsruhe)
Spektrometer Ultrospec 3000	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Spritzenfilter Fitopur S Plus 0,2 µM	Sarstedt (Nümbrecht)
Sterilbank Holten LaminAir S 2010 1.2	Heto-Holten (Allerød, Dänemark)
Thermocycler PTC-100	MJ Research (Watertown, USA)
Vortex-Schüttler Genie 2	Scientific Industries (Bohemia, USA)
winMDI 2.8 (Software für FACS-Auswertungen)	http://facs.scripps.edu/software.html
Zellzählgerät Coulter Z2 Particle Count & Size Analyser	Beckman-Coulter (Krefeld)
Zentrifuge 5415R; 5810R; MiniSpin	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifugenröhrchen (15 ml; 50 ml)	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Zetuvit E – sterile Saugkompressen	Hartmann (Heidenheim)

3.1.2 Reagenzien und Kits

Produkt	Firma
Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I	BD Biosciences (Heidelberg)
Aqua ad iniectabilia	Braun (Melsungen)
AteloGene Local Use	Koken (Tokyo, Japan)
Beschichtete LightCycler Standardkapillaren	Roboscreen (Leipzig)
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Bicin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Cell Proliferation Reagent WST-1	Roche Applied Science (Mannheim)
Cisplatin (CDDP)	Klinikapotheke (Dresden)
Coomassie Brilliant Blue G-250	Bio-Rad (München)
Coulter Isoton II Diluent	Beckman-Coulter (Krefeld)
CycleTEST PLUS DNA Reagent Kit	BD Biosciences (Heidelberg)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Desoxyribonukleotid (dNTP)-Mix (je 10 mM)	Fermentas (St. Leon-Rot)
Dithiothreitol	Roth (Karlsruhe)
DOTAP Liposomal Transfection Reagent	Roche Applied Science (Mannheim)
Dulbecco's Mod. Eagle Medium (DMEM) mit 4,5 g/l Glukose	Invitrogen (Karlsruhe)
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	PAA Laboratories (Pasching, Österreich)
ECL Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare (Freiburg)
Effectene Transfection Reagent	Qiagen (Hilden)
Ethanol (96 %)	Klinikapotheke (Dresden)
Ethanol (absolut)	J.T.Baker (Deventer, Holland)
Ethidiumbromid	Roth (Karlsruhe)
FastDigest Scal	Fermentas (St. Leon-Rot)
5x First-Strand Buffer	Invitrogen (Karlsruhe)
Fötale Kälberserum	Invitrogen (Karlsruhe)
Formaldehyd	Merck (Darmstadt)
Gemcitabin (GEM)	Klinikapotheke (Dresden)
GeneChip WT Sense Target Labeling and Control Reagents; GeneChip Hybridization, Wash and Stain Kit	Affymetrix (Santa Clara, USA)
Geneticin (G-418)	Invitrogen (Karlsruhe)
Gentamicin	Invitrogen (Karlsruhe)
Giemsa-Lösung	Merck (Darmstadt)
Glycerol	Merck (Darmstadt)
HEPES (Feststoff)	Roth (Karlsruhe)
HEPES-Puffer (1 M)	Invitrogen (Karlsruhe)
InviTrap Spin Cell RNA Mini Kit	Invitex (Berlin)
In vivo-jetPEI inkl. 10 %iger Glukose-Lösung	Peqlab (Erlangen)
Isofluran	Baxter Deutschland (Unterschleißheim)
Kohlendioxid (CO ₂)	Praxair (Düsseldorf)
LightCycler FastStart DNA Master Hybridization Probes; LightCycler TaqMan Master	Roche Applied Science (Mannheim)
Magermilchpulver	Heirler Cenovis (Radolfzell)
MEM Non Essential Amino Acids (100x)	Invitrogen (Karlsruhe)

Methanol	Merck (Darmstadt)
Mitomycin C (MMC)	Medac (Wedel)
Natriumchlorid (NaCl)	VWR (Darmstadt)
Natriumdodecylsulfat	Roth (Karlsruhe)
Nukleasefreies Wasser	Roth (Karlsruhe)
OptiMEM I (serumfreies Medium)	Invitrogen (Karlsruhe)
pd(N) ₆ Random Primers	Roche Applied Science (Mannheim)
Ponceau S Solution	Serva (Heidelberg)
Real-Time Reagent Mix BCL2/BCL-XL	AJ Roboscreen (Leipzig)
RNA 6000 Nano Kit	Agilent (Böblingen)
RNeasy Mini Kit; RNase-Free DNase Set	Qiagen (Hilden)
RPMI-1640 (Zellkulturmedium)	Invitrogen (Karlsruhe)
Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder	Fermentas (St. Leon-Rot)
Stickstoff (flüssig)	Air Liquide (St. Georges, Frankreich)
SuperScript II Reverse Transcriptase	Invitrogen (Karlsruhe)
SureSilencing shRNA Plasmids	SABiosciences (Frederick, USA)
Tris(hydroxyl-methyl)aminomethan (Tris)	Roth (Karlsruhe)
10x Trypsin-EDTA (0,5 % Trypsin, 0,2 % EDTA in PBS)	BIOCHROM AG (Berlin)
Tween 20	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Universal ProbeLibrary Probe #86	Roche Applied Science (Mannheim)
Wasser für Injektionszwecke	Serum Werk Bernburg (Bernburg)
XL1-Blue Electroporations-Competent Cells	Agilent (Böblingen)
Zyppy Plasmid Miniprep Kit	Zymo Research (Orange, USA)

3.1.3 Medien, Puffer und Lösungen

Lösung	Zusammensetzung	
Zellzucht		
Vollmedium DMEM	440 ml	DMEM (4,5 g/l Glucose)
	50 ml	Fötale Kälberserum
	5 ml	HEPES (1 M)
	5 ml	<i>MEM non-essential amino acids</i> (100x)
Vollmedium RPMI 1640	445 ml	RPMI-1640
	50 ml	Fötale Kälberserum
	5 ml	<i>MEM non-essential amino acids</i> (100x)
Trypsin-EDTA-Lsg.	100 ml	Trypsin-EDTA (10x)
	900 ml	A.d.
Western Blot		
Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese-Probenpuffer	200 µl	Glycerol
	100 µl	Natriumdodecylsulfat (20 %)
	125 µl	Tris (1 M; pH 6,8)
	525 µl	A.d.
	50 µl	β-Mercaptoethanol
	1 Spatelspitze	Bromphenolblau
10x Elektrophorese-Laufpuffer	121 g	Tris
	238 g	HEPES
	10 g	Natriumdodecylsulfat
	auf 1 l	mit A.d. auffüllen

Transferpuffer	6 g 8,16 g 200 ml auf 2 l	Tris Bicin Methanol mit A.d. auffüllen
0,1 % PBS-Tween 20	1 l 1 ml	PBS Tween 20
5 % Magermilchpulver-Puffer	5 g auf 100 ml	Magermilchpulver mit PBS-T auffüllen
0,5 % Magermilchpulver-Puffer	1 g auf 200 ml	Magermilchpulver mit PBS-T auffüllen
in vivo-Studien		
HEPES/NaCl-Puffer	1 ml 876,6 mg auf 100 ml	HEPES (1 M) NaCl mit A.d. auffüllen → pH-Wert auf 7,4 einstellen → durch 0,2 µm-Filter steril filtrieren

3.2 Zelllinien und deren Behandlung

3.2.1 Humane Zelllinien und deren Kultivierung

Die Kultivierung der adhärennten humanen Monolayerzelllinien erfolgte unter sterilen Bedingungen in 75 cm²-Zellkulturflaschen in einem Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂-Partialdruck in gesättigter Wasserdampf-atmosphäre. Nach mikroskopischer Begutachtung wurden die Zellen alle 2-3 Tage, nicht länger als bis zur 30. Passage, nach folgendem Schema behandelt: (1) Entfernen des verbrauchten Mediums, (2) zweimaliges Waschen der Zellen mit PBS, (3) Trypsin-EDTA-Behandlung (0,05 % Trypsin, 0,02 % EDTA) zum Ablösen der Zellen vom Kulturgefäß (5 min, 37 °C), (4) Verdünnen der Zellen in frischem Medium und (5) Überführen in neue Kulturflasche. Für die Zelllinien EJ28, J82 und Fibroblasten fand das Kulturmedium DMEM, für 5637-Zellen das Medium RPMI-1640 Verwendung (Tab. 3.1). Cisplatin-resistente Zelllinien EJ28^{CDDP} und J82^{CDDP} wurden nach dauerhafter Kultivierung der Zellen in CDDP-haltigem DMEM-Kulturmedium (EJ28: 2 µg/ml CDDP; J82: 0,25 µg/ml CDDP) erhalten.

Tab. 3.1: Verwendete humane Zelllinien.

Name	Ursprung und Eigenschaften	Bezugsquelle / Nummer der Zelllinie
EJ28	UC, invasiv, entdifferenziert, metastatisch, <i>TP53</i> -Mutation	Universität Frankfurt
J82	UC, invasiv, entdifferenziert, <i>TP53</i> -Mutation	ATCC / HTB-1
5637	UC, invasiv, mäßig differenziert, <i>TP53</i> -Mutation	ATCC / HTB-9
Fibroblasten	Nichtmaligne Fibroblastenzelllinie aus Vorhaut-Primärkultur	Kinderklinik, Technische Universität Dresden

Abkürzungen: ATCC – *American Type Culture Collection*, UC – Urothelkarzinom

Langfristig erfolgte die Lagerung der Zellen in flüssigem Stickstoff. Zur Kryokonservierung wurden die Zellen nach der Ernte in einem 50 ml-Röhrchen zentrifugiert (450 g, 5 min, 4 °C), mit Kulturmedium gewaschen, in Einfriermedium (Kulturmedium; 40 % Fötale Kälberserum; 10 % DMSO; 0,5 % Gentamicin) aufgenommen, in 2 ml-Kryoröhrchen überführt und halbautomatisch unter Verwendung des Einfriergerätes NICOOL LM 10 abgekühlt. Zum Ansatz einer Rekultur wurden die tiefgefrorenen Zellen schnell aufgetaut, in ein 50 ml-Röhrchen mit Kulturmedium überführt, zentrifugiert (450 g, 10 min, 4 °C), mit Kulturmedium gewaschen und in einer 75 cm²-Zellkulturflasche ausgesät.

Für die Durchführung von Experimenten erfolgte die Aussaat der Zellen in 6-, 24- und 96-Well-Mikrotiterplatten (MTP) oder 25 cm²-Zellkulturflaschen. Nach der Behandlung wurden bei allen Analysen die Zellen im Kulturüberstand und die mittels Trypsin-EDTA geernteten adhärennten Zellen zusammen untersucht.

3.2.2 Behandlung humaner Zelllinien mit siRNAs

3.2.2.1 Sequenzen der verwendeten siRNAs

Gegen jedes der vier Targets *BCL2*, *BCL-XL*, *XIAP* und *Survivin* wurden von der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) entsprechend des firmeneigenen siRNA-Designalgorithmus jeweils drei siRNAs entworfen und synthetisiert (Tab. 3.2). Für Zellkulturexperimente kamen entsalzte siRNAs, für *in vivo*-Anwendungen HPLC-gereinigte Konstrukte zum Einsatz. Die als Lyophilisate gelieferten siRNAs wurden steril in einem definierten Volumen A.d. gelöst und bei -80 °C gelagert. Als Kontrolle diente eine *non-silencing* siRNA (ns-si) ohne Homologie zu humanen mRNAs (Eurogentec).

Tab. 3.2: Sequenzen der verwendeten siRNA-Konstrukte. Angegeben sind die Targetsequenzen der verwendeten siRNA-Konstrukte sowie ihre Position im entsprechenden Transkript. Die Identifikationsnummern der mRNA-Sequenzen sind in Klammern notiert. Alle siRNAs wurden mit 3'-dTdT-Überhängen synthetisiert.

siRNA	Targetsequenz (5' → 3')	siRNA	Targetsequenz (5' → 3')
Gegen <i>BCL2</i> (NM_000633.2)		Gegen <i>XIAP</i> (NM_001167.2)	
B2-1	CGGUGGUGGAGGAGCUCUU Position: 888-907 nt	X-1	CGAGCAGGGUUUCUUUAUA Position: 273-291 nt
B2-2	GCAUGCGGCCUCUGUUUGA Position: 1107-1125 nt	X-2	CUGGGCAGGUUGUAGAUAU Position: 556-574 nt
B2-3	CGGAGGCUGGGAUGCCUUU Position: 1069-1087 nt	X-3	GGUGAAGGUGAUAAAGUAA Position: 1005-1023 nt
Gegen <i>BCL-XL</i> (NM_138578.1)		Gegen <i>Survivin</i> (NM_001168.2)	
BX-1	GGGACAGCAUAUCAGAGCU Position: 715-733 nt	S-1	GAAGCAGUUUGAAGAAUUA Position: 391-409 nt
BX-2	CAGCUGGAGUCAGUUUAGU Position: 432-450 nt	S-2	CCAACAAUAAGAAGAAAGA Position: 471-489 nt
BX-3	CAGCAUAUCAGAGCUUUGA Position: 719-737 nt	S-3	GGACCACCGCAUCUCUACA Position: 166-184 nt

3.2.2.2 Transfektion der siRNAs

Die Zellen wurden 1-3 Tage nach Aussaat bei 40-60 % Wachstumsdichte für 4 h unter Verwendung des kationischen Lipids DOTAP (N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniummethylsulfat) mit den entsprechenden siRNAs transfiziert. In Tab. 3.3 sind Transfektionsprotokolle beispielhaft für 40 nM siRNA-Gesamtkonzentration in verschiedenen Kulturgefäßen angegeben. In den Kombinationsbehandlungen wurde die siRNA-Gesamtkonzentration von 40 nM beibehalten. Dazu wurden in den Zweier-Kombinationen jeweils 20 nM, in den Vierer-Kombinationen je 10 nM und in der Achter-Kombination jeweils 5 nM pro siRNA zusammen in OptiMEM I inkubiert. Die Bezeichnung und Zusammensetzung der verwendeten siRNA-Kombinationen ist in Abb. 3.1 dargestellt. Unbehandelte Zellen wurden während des Zeitabschnitts der Transfektion in OptiMEM I (Gesamtvolumen entsprechend Tab. 3.3) inkubiert.

Tab. 3.3: Protokoll zur Herstellung der siRNA-Transfektionslösungen. Die siRNA-Gesamtkonzentration beträgt 40 nM (Stammkonzentration: 2 µM) bei einem siRNA:DOTAP-Verhältnis von 1:30 (w/w). Die angegebenen Volumina beziehen sich jeweils auf einen Ansatz (1 Well bzw. 1 Flasche).

	25 cm ² -Flasche	6-Well-MTP	24-Well-MTP	96-Well-MTP
siRNA-Ansatz	52,0 µl siRNA 248,0 µl OptiMEM I	20,0 µl siRNA 180,0 µl OptiMEM I	6,0 µl siRNA 44,0 µl OptiMEM I	2,0 µl siRNA 18,0 µl OptiMEM I
DOTAP-Ansatz	41,5 µl DOTAP 258,5 µl OptiMEM I	16,0 µl DOTAP 184,0 µl OptiMEM I	4,8 µl DOTAP 45,2 µl OptiMEM I	1,6 µl DOTAP 18,4 µl OptiMEM I
TF-Lösung	300 µl siRNA-Ansatz 300 µl DOTAP-Ansatz → 15 min Inkubation	200 µl siRNA-Ansatz 200 µl DOTAP-Ansatz → 15 min Inkubation	50 µl siRNA-Ansatz 50 µl DOTAP-Ansatz → 15 min Inkubation	20 µl siRNA-Ansatz 20 µl DOTAP-Ansatz → 15 min Inkubation
Vorlage	2000 µl OptiMEM I	600 µl OptiMEM I	200 µl OptiMEM I	60 µl OptiMEM I
Gesamt	2600 µl	1000 µl	300 µl	100 µl

Abkürzungen: MTP – Mikrotiterplatte, TF-Lösung – Transfektionslösung

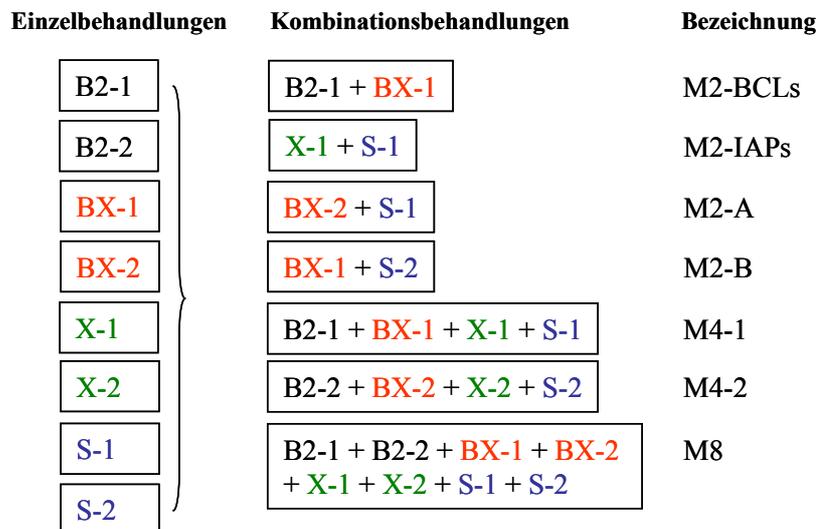


Abb. 3.1: Bezeichnung und Zusammensetzung der siRNA-Kombinationsbehandlungen. B2 – siRNA gegen *BCL2*, BX – siRNA gegen *BCL-XL*, X – siRNA gegen *XIAP*, S – siRNA gegen *Survivin*, Sequenzen der verwendeten siRNA-Konstrukte siehe Tab. 3.2.

3.2.2.3 Kombinationsbehandlung mit siRNAs und Chemotherapeutika

Um zu überprüfen, ob die Inhibition der Targetgene zu einer Sensitivierung von BCa-Zellen auf eine nachgeschaltete CT führt, wurden die Zellen nach Transfektion mit in Kulturmedium verdünnten Chemotherapeutika (EJ28: 2,1 µg/ml CDDP bzw. 0,9 µg/ml MMC; J82: 1,2 µg/ml CDDP bzw. 1,0 µg/ml MMC) inkubiert (Abb. 3.2). Die CT-Konzentrationen wurden dabei so an die entsprechende Zelllinie angepasst, dass durch eine CT-Monotherapie mäßige zytotoxische Effekte hervorgerufen werden, d.h. dass der Anteil apoptotischer Zellen 48 h nach alleiniger CT-Behandlung etwa 30 % beträgt. Proben, die in den folgenden Kapiteln mit „nur CT“ bezeichnet sind, wurden im Zeitabschnitt der Transfektion in OptiMEM I inkubiert.

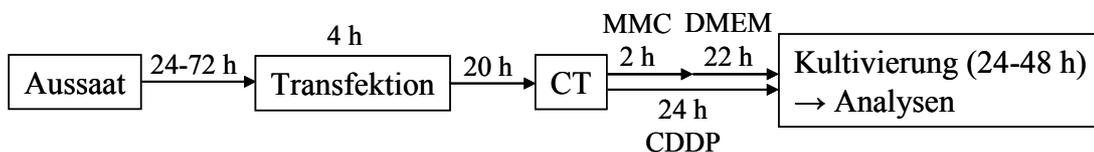


Abb. 3.2: Schema für eine kombinierte Behandlung mit siRNAs und Chemotherapie. Die Zellen wurden 20 h nach siRNA-Transfektion mit Cisplatin (CDDP) für 24 h oder Mitomycin C (MMC) für 2 h inkubiert. Nach Kultivierung für weitere 24-48 h erfolgte der WST-1-Test bzw. die Ernte der Zellen mit anschließender Zellzählung und Apoptosemessung. Abkürzungen: CT – Chemotherapie, DMEM – Vollmedium DMEM (siehe Kapitel 3.1.3)

3.2.3 Transfektion mit *short hairpin* RNA-Vektoren

Um Langzeiteffekte der Inhibition von *BCL2*, *BCL-XL* und *XIAP* zu charakterisieren, wurden EJ28-BCa-Zellen stabil mit shRNA-Vektoren transfiziert. Die dafür verwendeten genspezifischen *SureSilencing shRNA Plasmids*-Kits enthielten jeweils vier targetspezifische shRNA-Vektoren sowie einen Kontrollvektor, welche über eine Neomycin-Geneticin-Resistenz die Selektion stabil transfizierter Zellen ermöglichten. Entsprechend der Herstellerangaben erfolgte zunächst die Anfertigung von Vorratslösungen der Vektoren. Dafür wurden die Plasmide einzeln in *XLI-Blue Electroporations-Competent Cells* amplifiziert und unter Verwendung des *Zyppy Plasmid Miniprep Kits* gereinigt.

Zur Auswahl der jeweiligen, hinsichtlich der Target-mRNA-Expressionsreduzierung effizientesten shRNA-Sequenz aus den vier im Kit enthaltenen Sequenzen (Tab. 3.4) wurden EJ28-Zellen transient mit den Plasmiden (*supercoiled*) transfiziert. Dazu wurden je 40 000 Zellen in 24-Well-MTP ausgesät, nach 24 h Kultivierung einmal mit PBS gewaschen und mit 350 µl frischem Kulturmedium versetzt. Die Transfektion erfolgte mit dem *Effectene Transfection Reagent*-Kit: 0,2 µg DNA wurden mit *Buffer EC* auf 60 µl aufgefüllt, mit 1,6 µl *Enhancer* versetzt und 5 min bei Rt inkubiert. Nach Zugabe von 5 µl *Effectene* erfolgte eine

zehnminütige Inkubation bei Rt. Anschließend wurden 350 µl Kulturmedium hinzugefügt, zweimal auf- und abpipettiert und die Transfektionslösung tropfenweise zu den Zellen gegeben. Achtundvierzig Stunden später erfolgte die Zellernte und quantitative Bestimmung der Target-mRNA-Expressionsniveaus.

Tab. 3.4: Insert-Sequenzen der verwendeten shRNA-Vektoren.

BCL2	BCL-XL	XIAP
GAGGATTGTGGCCTTCTTTGA	TGACCACCTAGAGCCTTGGAT	CGAGCAGGGTTTCTTTATACT
TGCGGCCTCTGTTTGATTCT	AGACAAGGAGATGCAGGTATT	GCCACGCAGTCTACAAATTCT
GGGAGGATTGTGGCCTTCTTT	AGAGCCTTGGATCCAGGAGAA	CTGGTTGCAGATCTAGTGAAT
AGCATGCGGCCTCTGTTTGAT	GATGGCCACTTACCTGAATGA	AGGAACCCTGCCATGTATAGT

Mit den effizientesten shRNA-Vektoren (erste Zeile in Tab. 3.4) und dem Kontroll-shRNA-Vektor (GGAATCTCATTCGATGCATAC, ohne Sequenzhomologie zu humanen Genen) erfolgte die stabile Transfektion. Hierfür wurden die Plasmide mit dem *FastDigest*-Restriktionsenzym *ScaI* linearisiert: 1 µg DNA wurde mit 2 µl 10x *FastDigest buffer* sowie 1 µl Restriktionsenzym versetzt, mit A.d. auf 20 µl aufgefüllt, 5 min bei 37 °C und 10 min bei 65 °C inkubiert. In Vorbereitung der Transfektion erfolgten die Aussaat von 200 000 EJ28-Zellen in 6-Well-MTP, ein einmaliger Waschschrift mit PBS nach 24 h Kultivierung und ein Auffüllen mit 1600 µl frischem Kulturmedium. Zur Transfektion wurden 0,4 µg DNA mit *Buffer EC* auf 100 µl aufgefüllt, mit 3,2 µl *Enhancer* versetzt und 5 min bei Rt inkubiert. Nach Zugabe von 10 µl *Effectene* erfolgte eine zehnminütige Inkubation bei Rt. Anschließend wurden 600 µl Kulturmedium hinzugefügt, zweimal auf- und abpipettiert und die Transfektionslösung tropfenweise zu den Zellen gegeben. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet und 1:10 verdünnt in DMEM mit 600 µg/ml Geneticin ausgesät. Zur Selektion stabil transfizierter Klone erfolgte nach einer Woche Kultivierung die Aussaat von stark verdünnten Zellen (eine Zelle pro 400 µl Medium) in DMEM+Geneticin in 96-Well-MTP (200 µl pro Well). Die sich ausbildenden Kolonien wurden einzeln in immer größere Kulturgefäße überführt bis genügend Zellen für Expressionsmessungen und zur Kryokonservierung vorhanden waren. Für jedes Zielgen und den Kontroll-Vektor wurde jeweils ein Klon für weiterführende Analysen ausgewählt: EJ28-B2 (shRNA gegen *BCL2*), EJ28-BX (shRNA gegen *BCL-XL*), EJ28-X (shRNA gegen *XIAP*) und EJ28-K (Kontroll-shRNA).

3.3 Zellbiologische Methoden

3.3.1 Zellviabilitätstest

Mit Hilfe des Zellproliferationsreagenzes WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzendisulfonat) kann die Viabilität von Zellen quantitativ bestimmt werden. WST-1 wird durch mitochondriale Dehydrogenasen stoffwechselaktiver Zellen in ein photometrisch nachweisbares Formazan umgesetzt, welches Licht im Wellenlängenbereich 400-500 nm signifikant stärker absorbiert als WST-1. Die Menge des gebildeten Formazans ist dabei direkt proportional zur Zahl metabolisch aktiver Zellen. Die Verwendung des wasserlöslichen, ungiftigen WST-1 ermöglicht es, die Zellen nach einem Waschschrift weiter zu kultivieren und den Test zu einem späteren Zeitpunkt zu wiederholen.

In Vorbereitung des WST-1-Tests wurden die Zellen in 96-Well-MTP ausgesät (EJ28: 1700 Zellen/Well; J82 und Fibroblasten: 2000 Zellen/Well) und nach 72 h entsprechend der Ausführungen in Kapitel 3.2.2 behandelt. Zur Viabilitätsmessung wurden den 100 µl Kulturmedium pro Well je 10 µl WST-1 hinzugefügt und die Zellen in Abhängigkeit von der Wachstumsdichte 45 min bis 3 h inkubiert. Mit Hilfe des MTP-Spektrophotometers erfolgte im Anschluss die Messung der bei 450 nm und der Referenzwellenlänge 620 nm transmittierten Lichtintensitäten sowie die Subtraktion der daraus berechneten Absorptionswerte.

3.3.2 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 100 µl Zellsuspension mit 9,9 ml der elektrisch leitfähigen Flüssigkeit *Coulter Isoton II Diluent* verdünnt. Die Zählung erfolgte automatisch mit Hilfe des Zellzählgerätes *Coulter Z2 Particle Count & Size Analyser*. Das Gerät bestimmt Anzahl und Größenverteilung der Zellen in einer Probe nach dem Impedanzverfahren. Hierbei wird während der Messung über zwei Platinelektroden eine Spannung an die Kapillarstrecke angelegt. Der Durchtritt jeder Zelle durch die Kapillare erzeugt eine Widerstandsänderung. Die Anzahl der Signale entspricht dabei der Zellzahl, die Amplitude des Signals der Zellgröße.

3.3.3 Zellkoloniebildungstest

Um das Langzeitproliferationsverhalten zu charakterisieren, wurde die Fähigkeit der Koloniebildung aus Einzelzellen untersucht. Hierfür erfolgte die Aussaat stark verdünnter Zellen (zu je 100 Zellen/Well) als Dreifachbestimmung in 6-Well-MTP. Nach Kultivierung für 10-12 Tage wurden die Zellen mit PBS gewaschen, 20 min mit 4 %iger Formaldehydlösung fixiert, erneut

mit PBS gewaschen, 10 min mit frisch filtrierter Giemsa-Lösung (1:20 verdünnt in A.d.) angefärbt und zum Abschluss mehrmals mit A.d. gewaschen. Die manuelle Zählung der gefärbten Kolonien erfolgte nach Trocknung der Platten unter Verwendung eines Lichtmikroskops.

3.3.4 Durchflusszytometrische Quantifizierung der Apoptoserate

Während der Apoptose bleibt die Zellmembran initial erhalten, jedoch ändert sich ihre Lipidzusammensetzung. Ein wichtiges Ereignis ist dabei die Translokation des Phospholipids Phosphatidylserin von der zytoplasmatischen Innenseite der Plasmamembran auf die Außenseite. Annexin V, welches Phosphatidylserin mit hoher Affinität bindet, wird im *Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I* als Marker für diesen frühapoptotischen Prozess genutzt (FITC: Fluoresceinisothiocyanat). Zusätzlich erfolgt durch Aufnahme des Nukleinsäureinterkalators Propidiumiodid (PI) der Nachweis des Verlustes der Membranintegrität in der Spätphase des Zelltodes, was die quantitative Unterscheidung von viablen (Annexin V-FITC-negativ, PI-negativ), frühapoptotischen (Annexin V-FITC-positiv, PI-negativ), spätapoptotischen (Annexin V-FITC-positiv, PI-positiv) und nekrotischen (Annexin V-FITC-negativ, PI-positiv) Zellen ermöglicht. Nach Anregung der beiden Fluorophore am *Fluorescence Activated Cell Sorter* (FACS) mit monochromatischem Licht der Wellenlänge 488 nm wird die Fluoreszenzintensität des FITC-markierten Annexin V bei 525 nm und die des PI bei 600 nm detektiert.

Die Zellen wurden wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben behandelt und geerntet. Nach einem zweiten PBS-Waschschritt wurden von jeder Probe 1×10^5 Zellen in 100 μl *Annexin V Binding Buffer* resuspendiert, mit je 5 μl Annexin V-FITC und PI versetzt und für 15 min bei Rt im Dunkeln inkubiert. Nach Zugabe weiterer 400 μl *Annexin V Binding Buffer* wurden je 2×10^4 Zellen am FACScan im Institut für Pathologie (Technische Universität Dresden) gemessen. Die Auswertung, d.h. die Einteilung der Zellen in die oben genannten vier Gruppen, erfolgte mit Hilfe der Software winMDI 2.8 durch Quadrantenanalyse nach Darstellung der Fluoreszenzintensitäten von Annexin V-FITC *versus* PI im *density plot*. Die Summe der Anteile an früh- und spätapoptotischen Zellen ergibt dabei die Gesamtapoptoserate.

3.3.5 Durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse

Um Aussagen über den relativen Anteil der Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen zu erhalten, erfolgte die durchflusszytometrische Bestimmung des DNA-Gehalts PI-gefärbter Zellkerne. Dafür wurden mindestens 1×10^5 Zellen in 1 ml *Buffer Solution* resuspendiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert. Anschließend erfolgten unter Verwendung des

CycleTest plus DNA Reagent Kits die Auflösung der Zellmembranen, die Entfernung des Zytoskeletts und der Kernproteine, der RNA-Abbau, die Stabilisierung des Chromatins und die Färbung der DNA der isolierten Kerne. Die Messung von 2×10^4 Zellkernen am FACScan im Institut für Pathologie (Technische Universität Dresden) ergab jeweils ein Fluoreszenzhistogramm, aus dem unter Nutzung der Software winMDI 2.8 der prozentuale Anteil von Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen ermittelt wurde.

3.4 Molekularbiologische und proteinbiochemische Methoden

3.4.1 Quantitative Polymerasekettenreaktion

3.4.1.1 Isolation von Total-RNA und cDNA-Synthese

Zur Bestimmung der mRNA-Niveaus mittels quantitativer Polymerasekettenreaktion (qPCR) wurde die Total-RNA aus den Zellen isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die Isolation der Total-RNA erfolgte dabei nach Herstellerangaben mit dem *InviTrap Spin Cell RNA Mini Kit*. Das Prinzip der RNA-Isolation beruht auf der Bindung von Nukleinsäuren an die Silikatmatrix der Säulen, anschließenden Waschschritten zur Entfernung von Proteinen sowie der nachfolgenden Elution der Total-RNA mit einer Lösung geringer Ionenstärke.

In Vorbereitung der RNA-Präparation erfolgte die Zellbehandlung wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben. Nach der Ernte wurden bis zu 5×10^6 Zellen in 350 μ l Lysepuffer, welcher frisch mit 3,5 μ l 1 M Dithiothreitol versetzt wurde, aufgenommen und bei -80°C gelagert. Bei Rt erfolgte die Aufarbeitung des Lysats über Aufbringen auf die Membran eines DNA-bindenden Filters, zweiminütige Inkubation und einminütiges Zentrifugieren bei 13 400 g. Die DNA-Säule wurde verworfen. Das Eluat wurde mit 350 μ l 70 %igem Ethanol versetzt, auf einen RNA-bindenden Filter gegeben, 1 min inkubiert und 1 min bei 9300 g zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen, die RNA-Säule einmal mit 600 μ l Waschpuffer R1 (vor der ersten Verwendung mit einer Volumeneinheit absolutem Ethanol versetzt) und zweimal mit je 700 μ l Waschpuffer R2 (vor der ersten Verwendung mit vier Volumeneinheiten absolutem Ethanol versetzt) durch Zentrifugieren (30 s, 9300 g) gewaschen. Anschließend wurde der Filter trocken zentrifugiert (5 min, 13 400 g). Die RNA-Elution erfolgte mit 40-60 μ l A.d. nach zweiminütiger Inkubation auf der Membran (1 min, 9300 g). Die RNA wurde bei -80°C gelagert. Zur Konzentrations- und Reinheitsbestimmung erfolgte die Messung der optischen Dichten der Proben bei 260 nm (OD_{260}), 280 nm (OD_{280}) und der Referenzwellenlänge 320 nm (OD_{320}). Aus der Gleichung $c_{RNA} = (OD_{260} - OD_{320}) \cdot \epsilon_{RNA} \cdot VF$ ergibt sich mit dem

Konzentrationsfaktor $\varepsilon_{RNA} = 40 \mu\text{g/ml}$ und dem Verdünnungsfaktor VF die RNA-Konzentration c_{RNA} . Der Quotient der optischen Dichten OD_{260}/OD_{280} bestimmt die Reinheit der Probe und sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

Für die cDNA-Synthese wurden 500 ng Total-RNA in 10 μl A.d. mit 1 μl pd(N)₆-Primern (200 ng/ μl) sowie 1 μl dNTPs (je 10 mM) versetzt, 5 min bei 65 °C und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 4 μl *First Strand Buffer* (5x) sowie 2 μl Dithiothreitol (100 mM) hinzugefügt und 2 min bei 42 °C inkubiert. Zuletzt erfolgte die Zugabe von 1 μl *SuperScript II Reverse Transkriptase* (200 Units/ μl). Der Reaktionsansatz wurde folgendem Temperaturprogramm unterworfen: 10 min 25 °C, 50 min 42 °C und 15 min 70 °C. Die Proben wurden für die Amplifizierung mittels qPCR 1 : 5 in A.d. verdünnt und bei 4 °C gelagert.

3.4.1.2 Durchführung der quantitativen Polymerasekettenreaktion

Die Bestimmung der mRNA-Mengen erfolgte unter Nutzung des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers mittels *real-time*-qPCR. Für die Expressionsmessung von *BCL2* und *BCL-XL* wurde der jeweilige *Real-Time Reagent Mix*-Kit (enthält Sonde und beide Primer) und der Kit *LightCycler FastStart DNA Master Hybridization Probes* verwendet. Die Quantifizierung der *Survivin*-mRNA erfolgte unter Nutzung der Hydrolysesonde *Universal ProbeLibrary Probes #86* und des *LightCycler TaqMan Master*. Die Expressionsniveaus von *XIAP* und dem Referenzgen *TBP* wurden mittels Hybridisierungssonden und dem *LightCycler FastStart DNA Master Hybridization Probes*-Kit quantifiziert. In Tab. 3.5 sind, soweit bekannt, die Sequenzen der verwendeten Primer und Sonden angegeben.

Tab. 3.5: Primer und Sonden für die quantitative Polymerasekettenreaktion. Die HPLC-gereinigten Primer und Sonden wurden von der Firma TibMolBiol (Berlin) synthetisiert. Die Hybridisierungssonden sind mit den Fluoreszenzfarbstoffen Fluorescein (FL) und LightCycler Red 640 (LC) markiert.

Primer- und Sondennamen	Sequenz (5'→3') und Markierungen
Survivin FOR ¹	GAA CTG GCC CTT CTT GGA G
Survivin REV ¹	AAG TCT GGC TCG TTC TCA GTG
TBP FOR ²	GAA TAT AAT CCC AAG CGG TTT G
TBP REV ²	ACT TCA CAT CAC AGC TCC CC
TBP FL ²	TTT CCC AGA ACT GAA AAT CAG TGC C - FL
TBP LC ²	LC - TGG TTC GTG GCT CTC TTA TCC TCA TG - PH
XIAP FOR ³	GTG ATA AAG TAA AGT GCT TTC ACT GT
XIAP REV ³	GTA GTT CTT ACC AGA CAC TCC TCA A
XIAP FL	GTG AAG ACC CTT GGG AAC AAC AT - FL
XIAP LC	LC - CTA AAT GGT ATC CAG GGT GCA AAT ATC TG - PH

¹ Roche Applied Science; ² Linja *et al.*, 2001; ³ McManus *et al.*, 2004; Abkürzungen: FL – Fluorescein, FOR – forward, LC – LightCycler Red 640, PH – 3'-Phosphatgruppe, REV – reverse

Unter Kühlung wurden je 18 µl des qPCR-Ansatzes (Tab. 3.6) sowie 2 µl cDNA (vgl. Kapitel 3.4.1.1) bzw. A.d. (Negativkontrolle) in Glaskapillaren pipettiert. Die Kapillaren wurden 1 min bei 180 g zentrifugiert und anschließend im LightCycler dem entsprechenden Temperaturprogramm (Tab. 3.6) unterworfen. Die Bestimmung der Expression aller Gene erfolgte in zwei unabhängigen qPCR-Analysen (mittlere Abweichung < 30 %). Als Standards dienten Glaskapillaren, die mit 50 - 1x10⁵ *BCL2*-PCR-Produkten bzw. 10 - 1x10⁶ *BCL-XL*-, *Survivin*-, *XIAP*- oder *TBP*-PCR-Produkten beschichtet waren. Die Auswertung erfolgte mit der LightCycler Software Version 3.5 nach der *Second Derivative Maximum*-Methode. Die relativen Zielgenexpressionsniveaus wurden durch Verhältnisbildung aus der Zielgentranskriptmenge und dem entsprechenden *TBP*-Transkriptwert berechnet.

Tab. 3.6: Pipettierschemata und Temperaturprogramme für die quantitativen Polymerasekettenreaktionen. Den angegebenen Ansätzen wurden vor der Quantifizierung noch je 2 µl cDNA bzw. in der Negativkontrolle 2 µl destilliertes Wasser (A.d.) zugefügt.

<i>BCL2</i>-qPCR-Ansatz (1 Reaktion)	PCR-Protokoll	Temperatur	Zeit
13,10 µl A.d. 2,00 µl <i>Reagent Mix</i> (10x) 2,40 µl MgCl ₂ (25 mM) 0,20 µl Primer FOR (50 µM) 0,20 µl Primer REV (50 µM) 0,10 µl Sonde (50 µM) Fragmentgröße: unbekannt	Initiale Denaturierung	95 °C	10 min
	Amplifizierung: 45 Zyklen		
	1. Denaturierung	95 °C	5 s
	2. Annealing/Elongation	59 °C	20 s
	Kühlen	40 °C	60 s
<i>BCL-XL</i>-qPCR-Ansatz (1 Reaktion)	PCR-Protokoll	Temperatur	Zeit
13,16 µl A.d. 2,00 µl <i>Reagent Mix</i> (10x) 2,40 µl MgCl ₂ (25 mM) 0,16 µl Primer FOR (50 µM) 0,16 µl Primer REV (50 µM) 0,12 µl Sonde (50 µM) Fragmentgröße: unbekannt	Initiale Denaturierung	95 °C	10 min
	Amplifizierung: 45 Zyklen		
	1. Denaturierung	95 °C	5 s
	2. Annealing/Elongation	61 °C	20 s
	Kühlen	40 °C	60 s
<i>Survivin</i>-qPCR-Ansatz (1 Reaktion)	PCR-Protokoll	Temperatur	Zeit
13,30 µl A.d. 4,00 µl <i>Reagent Mix</i> (10x) 0,25 µl Primer FOR (20 µM) 0,25 µl Primer REV (20 µM) 0,20 µl Sonde (10 µM) Fragmentgröße: 93 bp	Initiale Denaturierung	95 °C	10 min
	Amplifizierung: 45 Zyklen		
	1. Denaturierung	95 °C	10 s
	2. Annealing/Elongation	60 °C	20 s
	Kühlen	40 °C	60 s
<i>TBP</i>-qPCR-Ansatz (1 Reaktion)	PCR-Protokoll	Temperatur	Zeit
12,40 µl A.d. 2,00 µl <i>Reagent Mix</i> (10x) 2,40 µl MgCl ₂ (25 mM) 0,30 µl Primer FOR (20 µM) 0,30 µl Primer REV (20 µM) 0,20 µl Sonde FL (20 µM) 0,40 µl Sonde LC (20 µM) Fragmentgröße: 226 bp	Initiale Denaturierung	95 °C	10 min
	Amplifizierung: 45 Zyklen		
	1. Denaturierung	95 °C	10 s
	2. Annealing	61 °C	15 s
	3. Elongation	72 °C	10 s
	Kühlen	40 °C	60 s

XIAP-qPCR-Ansatz (1 Reaktion)	PCR-Protokoll	Temperatur	Zeit
12,20 µl A.d. 2,00 µl <i>Reagent Mix</i> (10x) 2,40 µl MgCl ₂ (25 mM) 0,50 µl Primer FOR (20 µM) 0,50 µl Primer REV (20 µM) 0,20 µl Sonde FL (20 µM) 0,20 µl Sonde LC (20 µM) Fragmentgröße: 184 bp	Initiale Denaturierung Amplifizierung: 45 Zyklen 1. Denaturierung 2. Annealing 3. Elongation Kühlen	95 °C 95 °C 54 °C 72 °C 40 °C	10 min 10 s 10 s 8 s 60 s

Abkürzungen: A.d. – *aqua destillata* (destilliertes Wasser), bp – Basenpaare, FL – Fluorescein, FOR – *forward*, LC – LightCycler Red 640, MgCl₂ – Magnesiumchlorid, (q)PCR – (quantitative) Polymerasekettenreaktion, REV – *revers*

3.4.2 Microarray-Analysen

Mit den verwendeten *GeneChip Human Gene 1.0 ST Arrays* kann simultan die Expression von 28 869 humanen Genen quantitativ auf Transkriptebene erfasst werden. Die Detektion der Genexpression erfolgt dabei anhand von 764 855 auf einem Glasträger immobilisierten *perfect match*-Oligonukleotidsonden (25 nt), die über die gesamte Länge der zu untersuchenden Transkripte verteilt sind (*whole transcript*-[WT]-Abdeckung). Die mRNA der Proben (RNA-Isolation: Kapitel 3.4.2.1) wird in Form biotinmarkierter cDNA (Biotinylierung: Kapitel 3.4.2.2) auf die *Array*-Oberfläche aufgebracht. Bei der Färbung der *Microarrays* wird die Biotinmarkierung in ein Fluoreszenzsignal überführt und detektiert (Kapitel 3.4.2.3). Infolge der spezifischen Hybridisierung der Transkriptsequenzen an die komplementären Sonden kann aus der Position des Fluoreszenzsignals die Identität der Transkripte und aus der Signalstärke deren Expressionshöhe ermittelt werden [McLachlan *et al.*, 2004]. Im Rahmen der Auswertung (Kapitel 3.4.2.4) erfolgt die Zusammenfassung der Signale aller Sonden eines Transkripts zu einem Expressionswert. Für die Hintergrundabschätzung sind auf den *Arrays* ca. 17 000 Hintergrundsonden enthalten.

3.4.2.1 RNA-Isolation und Qualitätskontrolle

EJ28-Zellen wurden wie unter Kapitel 3.2.2 beschrieben in 6-Well-MTP einzeln mit den siRNAs B2-1, B2-2, BX-1, BX-2, X-1, X-2, S-1 oder S-2 bzw. mit den siRNA-Kombinationen M4-1, M4-2 sowie M-8 oder nur mit OptiMEM I behandelt und 48 h nach Transfektion geerntet. Die RNA-Isolation erfolgte bei Rt mit dem *RNeasy Mini Kit*. Hierfür wurden 3×10^6 Zellen in 350 µl *Buffer RLT*, dem frisch 3,5 µl β-Mercaptoethanol zugegeben wurden, lysiert. Zum Homogenisieren wurde das Lysat auf eine *QIAshredder*-Säule gegeben und zentrifugiert (2 min, 16 000 g). Im Anschluss wurde das Lysat mit 350 µl 70 %igem Ethanol versetzt, auf einen RNA-bindenden Filter gegeben und 30 s bei 8000 g zentrifugiert.

Der Durchfluss wurde verworfen und die Membran mit 350 μl *Buffer RWI* gewaschen (30 s, 8000 g). Für den anschließenden DNA-Verdau erfolgte das Lösen von 1500 Units DNase in 550 μl nukleasefreiem Wasser. Von dieser Stammlösung wurden je 10 μl zusammen mit 70 μl *RDD Buffer* auf die Membran des RNA-bindenden Filters gegeben und 15 min inkubiert. Danach wurde die Säule je einmal mit 350 μl *Buffer RWI* (30 s, 8 000 g), 500 μl *Buffer RPE* (vor der ersten Nutzung mit 4 Volumeneinheiten absolutem Ethanol versetzt; 30 s, 8000 g) und 500 μl *Buffer RPE* gewaschen (2 min, 8000 g). Die Elution der RNA erfolgte mit 30 μl A.d. nach einminütiger Inkubation auf der Membran (1 min, 8000 g). Bis zur Aufarbeitung wurde die RNA bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Die Bestimmung von Konzentration und Integrität der RNA erfolgte bei Rt mit dem *RNA 6000 Nano Kit* am *Bioanalyzer 2100*. Zunächst wurden 550 μl des Gels durch einen Filter zentrifugiert (10 min, 1500 g) und danach 65 μl des Gels mit 1 μl Farbstoff versetzt, gemischt und zentrifugiert (10 min, 16 000 g). An der Basisplatte der *Priming Station* wurde Position „C“ und an der Spritzenhalterung die oberste Position eingestellt. Es wurden 9 μl Gel-Farbstoff-Mix in die Kavität „G“ des RNA-Nanochips gegeben, die *Priming Station* geschlossen, die Spritze nach unten gedrückt und der Druck 30 s aufrecht erhalten. Im Anschluss erfolgte die Befüllung der beiden Kavitäten „G“ mit jeweils 9 μl Gel-Farbstoff-Mix sowie aller weiteren Kavitäten mit je 5 μl *RNA 6000 Nano Marker*. In die Kavität für den RNA-Leiter wurde zusätzlich 1 μl RNA-Nanomarker (zuvor 2 min bei $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ denaturiert) und in die Analyse-Kavitäten jeweils 1 μl Probe pipettiert. Nach dem Mischen des Chips mittels Vortexer (1 min, 2400 min^{-1}) erfolgten die Messung und Datenauswertung am *Bioanalyzer* unter Nutzung der *2100 Expert Software* (B.02.02).

3.4.2.2 Synthese, Reinigung und Fragmentierung biotinmarkierter cDNA

Die Präparation der biotinmarkierten cDNAs erfolgte nach Herstellerangaben entsprechend des *100 ng Total RNA Labeling Protocols*. Zur Amplifikation wurde hierbei vor der Biotinylierung unter Nutzung des *GeneChip WT Sense Target Labeling and Control Reagents*-Kits die Total-RNA in cDNA, anschließend in cRNA und danach wieder in cDNA umgeschrieben.

Zunächst wurden von jeder Probe 100 ng Total-RNA (vgl. Kapitel 3.4.2.1) mit 2 μl einer Lösung aus poly(A)-RNA-Kontrolle (1 : 50 000 verdünnt) und T7-(N)₆-Primern (250 ng/ μl) versetzt, mit nukleasefreiem Wasser auf 5 μl aufgefüllt, 5 min bei $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 3 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Im Anschluss erfolgte das zur Amplifikation der RNA notwendige Umschreiben in nichtmarkierte cDNA entsprechend des Protokolls in Tab. 3.7.

Tab. 3.7: Pipettierschemata und Temperaturprogramme für die cDNA-Synthese (1. Zyklus).

Erststrang-cDNA-Synthese	Zweitstrang-cDNA-Synthese
5,0 µl Total-RNA/T7-(N) ₆ -Primer/poly(A)-RNA-Kontrolle	4,8 µl nukleasefreies Wasser
2,0 µl 1 st Strand Buffer (5x)	4,0 µl MgCl ₂ (17,5 mM)
1,0 µl Dithiothreitol (0,1 M)	0,4 µl dNTPs (je 10 mM)
0,5 µl dNTPs (je 10 mM)	0,6 µl DNA-Polymerase I
0,5 µl RNase-Inhibitor	0,2 µl RNase H
1,0 µl <i>SuperScript II Reverse Transcriptase</i>	→ zum Erststrang-cDNA-Syntheseansatz geben
Temperaturprogramm:	Temperaturprogramm:
25 °C 10 min	16 °C 120 min
42 °C 60 min	75 °C 10 min
70 °C 10 min	4 °C 3 min
4 °C 3 min	

In der folgenden *in vitro*-Transkription erfolgte das Umschreiben der cDNA in cRNA. Dafür wurden 5 µl *10x IVT Buffer*, 20 µl *IVT NTP Mix* und 5 µl *IVT Enzyme Mix* gemischt, zum Zweitstrang-cDNA-Syntheseansatz gegeben und die Reaktionslösung 16 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Reinigung der cRNA bei Rt. Hierfür wurde das Reaktionsgemisch mit 50 µl nukleasefreiem Wasser sowie 350 µl *cRNA Binding Buffer* versetzt, 3 s mittels Vortexer gemischt, mit 250 µl absolutem Ethanol versetzt, auf eine *IVT cRNA Cleanup Spin Column* gegeben und zentrifugiert (30 s, 8000 g). Der Durchfluss wurde verworfen. Die Säule wurde einmal mit 500 µl *cRNA Wash Buffer* und einmal mit 500 µl 80 %igem Ethanol gewaschen (30 s, 8000 g). Anschließendes Zentrifugieren der geöffneten Reaktionsgefäße für 5 min bei 16 000 g führte zur Entfernung von Ethanolresten von der Säule. Die Elution der cRNA erfolgte mit 15 µl nukleasefreiem Wasser nach fünfminütiger Inkubation auf der Membran (1 min, 16 000 g). Das Eluat wurde erneut auf die Säule gegeben und nach fünfminütiger Inkubation zentrifugiert (1 min, 16 000 g). Die Bestimmung der cRNA-Konzentration erfolgte photometrisch.

Im nächsten Schritt wurde die cRNA in einzelsträngige cDNA umgeschrieben (Tab. 3.8) und die cDNA hydrolisiert: Zugabe von 1 µl RNase H und Inkubation für 45 min bei 37 °C, 5 min bei 95 °C und 2 min bei 4 °C. Zur Reinigung der einzelsträngigen cDNA wurde das Reaktionsgemisch mit 80 µl nukleasefreiem Wasser sowie 370 µl *cDNA Binding Buffer* versetzt, 3 s mittels Vortexer gemischt, auf eine *cDNA Spin Column* gegeben und zentrifugiert (1 min, 8 000 g). Der Durchfluss wurde verworfen. Die Säule wurde einmal mit 750 µl *cDNA Wash Buffer* gewaschen (1 min, 8 000 g). Nach Zentrifugieren der geöffneten Reaktionsgefäße (5 min, 16 000 g) wurden zur Elution der cDNA zweimal nacheinander 15 µl *cDNA Elution Buffer* auf die Membran gegeben, 1 min inkubiert und zentrifugiert (1 min, 16 000 g). Die Bestimmung der cDNA-Konzentration erfolgte photometrisch. Anschließend wurde die einzelsträngige cDNA fragmentiert und biotinyliert (Tab. 3.9).

Tab. 3.8: Pipettierschemata und Temperaturprogramme für die cDNA-Synthese (2. Zyklus).

cRNA-Präparation	Erststrang-cDNA-Synthese
x µl cRNA (10 µg) 1,5 µl <i>Random Primers</i> (3 µg/µl) mit nukleasefreiem Wasser auf 8 µl auffüllen	4,00 µl <i>1st Strand Buffer</i> (5x) 2,00 µl Dithiothreitol (0,1 M) 1,25 µl dNTP+dUTP (je 10 mM) 4,75 µl <i>SuperScript II Reverse Transcriptase</i> → zur cRNA geben
Temperaturprogramm: 70 °C 5 min 25 °C 5 min 4 °C 3 min	Temperaturprogramm: 25 °C 10 min 42 °C 90 min 70 °C 10 min 4 °C 3 min

Tab. 3.9: Pipettierschemata und Temperaturprogramme für die Fragmentierung und Biotinylierung einzelsträngiger cDNA.

cDNA-Fragmentierung	Biotinylierung
x µl einzelsträngige cDNA (5,5 µg) mit nukleasefreiem Wasser auf 31,2 µl auffüllen 10,0 µl nukleasefreies Wasser 4,8 µl <i>cDNA Fragmentation Buffer</i> (10x) 1,0 µl <i>uracil-DNA glycosylase</i> (10 Units/µl) 1,0 µl <i>apurinic/aprimidinic endonuclease I</i> (1 000 Units/µl) → zur cDNA geben	45,0 µl fragmentierte cDNA 12,0 µl <i>TdT Buffer</i> (5x) 2,0 µl <i>terminal deoxynucleotidyl transferase</i> 1,0 µl <i>DNA Labeling Reagent</i> (5 mM)
Temperaturprogramm: 37 °C 60 min 93 °C 2 min 4 °C 3 min	Temperaturprogramm: 37 °C 60 min 70 °C 10 min 4 °C 3 min

3.4.2.3 Hybridisieren, Waschen, Färben und Scannen der *Microarrays*

Unter Nutzung der biotinylierten cDNA wurde der Hybridisierungsmix entsprechend des in Tab. 3.10 angegebenen Pipettierschemas hergestellt, 5 min bei 99 °C sowie 5 min bei 45 °C inkubiert und zentrifugiert (1 min, 16 000 g). Im Anschluss erfolgten die Befüllung des auf Rt erwärmten *GeneChip Human Gene 1.0 ST Arrays* mit 80 µl des Hybridisierungsmixes und eine 17-stündige Inkubation im Hybridisierungsöfen (45 °C, 60 min⁻¹). Nach dem Entfernen des Hybridisierungsmixes wurden die *Arrays* mit je 100 µl Waschpuffer A befüllt. Das Waschen und Färben der *Arrays* erfolgte an der *GeneChip Fluidics Station 450* unter Nutzung des *GeneChip Hybridization, Wash and Stain Kits*. Die *Microarrays* sowie die Reaktionsgefäße mit den im Kit enthaltenen Färbelösungen und dem *Array Holding Buffer* wurden in die Station eingesetzt und der Wasch- und Färbeprozess nach dem Protokoll „FS450_0007“ durchgeführt (Tab. 3.10). Anschließend erfolgte das Scannen der *Arrays* mittels *GeneChip Scanner 3000 7G* unter Verwendung der Grundeinstellungen der Software GCOS.

Tab. 3.10: Pipettierschema zur Herstellung des Hybridisierungsmixes sowie Wasch- und Färbeprotokoll.

Hybridisierungsmix	Wasch- und Färbeprotokoll FS450_0007
27,0 µl biotinylierte cDNA	- Waschpuffer A (10 Zyklen, 30 °C)
1,7 µl <i>Control Oligonucleotide B2</i> (3 nM)	- Waschpuffer B (6 Zyklen, 50 °C)
5,0 µl <i>Eukaryotic Hybridization Controls</i> (20x) ¹	- Färbelösung 1 (5 min, 35 °C)
50,0 µl <i>Hybridization Mix</i> (2x)	- Waschpuffer A (10 Zyklen, 30 °C)
7,0 µl DMSO	- Färbelösung 2 (5 min, 35 °C)
9,3 µl nukleasefreies Wasser	- Färbelösung 1 (5 min, 35 °C)
	- Waschpuffer A (15 Zyklen, 35 °C)
	- Füllen mit <i>Array Holding Buffer</i>

¹ vor der Verwendung 5 min bei 65 °C inkubiert

3.4.2.4 Datenauswertung

Qualitätskontrolle und Primärauswertung erfolgten mit der *Affymetrix Expression Console Software*. Zuerst wurde dabei sichergestellt, dass die Hybridisierungs- und Poly(A)-Kontrollen die erwarteten Signale liefern [Affymetrix, 2004]. Anschließend wurden die Daten basierend auf dem *Robust Multichip Analysis* (RMA)-Algorithmus (beinhaltet Hintergrundkorrektur und Quantilnormalisierung) korrigiert und die logarithmierten Expressionswerte als *.txt-Datei exportiert.

Die weitere Datenauswertung erfolgte mit Microsoft Excel. Zur Charakterisierung der Gene, deren Expression sich durch die Behandlung mit targetspezifischen siRNAs verändert hat, wurden die n-fachen Änderungen der Expressionsniveaus aller 28 869 Gene nach Behandlung mit der/den jeweiligen targetspezifischen siRNA(s) bezogen auf die Behandlung mit dem ns-si-Konstrukt berechnet. Als Schwellwert für eine relevante Verringerung bzw. Erhöhung des Expressionsniveaus wurde eine n-fache Änderung von 1,7 festgelegt. Im Anschluss erfolgten die Identifizierung der Transkripte, die in einem Experiment jeweils von beiden gegen dasselbe Target gerichteten siRNAs moduliert wurden (Bsp. BX-1 und BX-2) sowie die Bestimmung der Gene, deren mRNA-Niveaus sich in beiden unabhängigen Experimenten durch Behandlung mit einem siRNA-Konstrukt veränderten. Weiterhin erfolgte die Charakterisierung der Transkripte, welche in beiden Experimenten durch die Kombinationsbehandlungen M4-1, M4-2 und M8 beeinflusst wurden.

3.4.3 Western Blot

In Vorbereitung der Proteinquantifizierung erfolgte die Transfektion der Zellen wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben. Von den Proben wurden Pellets à 5×10^4 Zellen in je 20 µl Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese-Probenpuffer lysiert, die Proteine 5 min bei 95 °C denaturiert, auf ein 8-16 %iges Polyacrylamid-Gradientengel aufgetragen und für 50 min bei

150 V aufgetrennt. Als Größenstandard diente der *Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder*. Die Übertragung der Proteine auf die Hybond-P-Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (zuvor für 10 s mit Methanol aktiviert und in Transferpuffer äquilibriert) erfolgte mit dem *Tank-Blot*-System (90 min, 40 V). Zur Überprüfung der Blot-Effizienz wurde die Membran mit *Ponceau S Solution* (5 min) und das Gel mit Coomassie Brilliantblaulösung (20 min) gefärbt. Zum Blocken der unspezifischen Bindungsstellen wurde die Membran 90 min in 5 %igem Magermilchpulver-Puffer geschwenkt und anschließend dreimal je 10 min mit 0,5 %igem Magermilchpulver-Puffer gewaschen. Die Inkubation der in 0,5 %igem Magermilchpulver-Puffer verdünnten primären Antikörper (Tab. 3.11) erfolgte eingeschweißt in einer Plastiktüte für 2 h bei Rt. Die Antikörper gegen BCL2, β -Aktin und XIAP wurden zusammen inkubiert. Für den Nachweis aller anderen Proteine wurde die Membran geteilt. Nach dreimaligem Waschen der Membran mit 0,5 %igem Magermilchpulver-Puffer (für je 10 min) erfolgte die einstündige Inkubation der entsprechenden Sekundärintikörper (BCL2, BCL-XL, β -Aktin und XIAP: *Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP*; Survivin: *Polyclonal Swine Anti-Rabbit Immunoglobulins/HRP*; Tab. 3.11). Abschließend wurde einmal 15 min und zweimal je 5 min in 0,1 % PBS-Tween 20 sowie zweimal in PBS gewaschen. Die Detektion der Proteinbanden erfolgte mit dem *Enhanced Chemiluminescence (ECL)*-Kit nach einminütiger Inkubation in einer Mischung aus je 3 ml *Detection Reagent 1* und *2* auf Röntgenfilmen. Die densitometrische Quantifizierung der Proteinbanden erfolgte mit der *Kodak 1D Image Analysis Software*. Die für ein bestimmtes Protein erhaltenen Werte wurden auf den Wert des Referenzproteins β -Aktin der Probe normiert.

Tab. 3.11: Antikörper für Western Blot.

Bezeichnung	Klon	Wirt	Verdünnung
<i>Bcl-xL Monoclonal Antibody</i> ¹	2H12	Maus	1 : 100
<i>Monoclonal Anti-β-Actin</i> ²	AC-74	Maus	1 : 20000
<i>Monoclonal Mouse Anti-Human BCL2 Oncoprotein</i> ³	124	Maus	1 : 150
<i>Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP</i> ³	-	Kaninchen	1 : 1000
<i>Polyclonal Swine Anti-Rabbit Immunoglobulins/HRP</i> ³	-	Schwein	1 : 1000
<i>Purified Mouse Anti-XIAP</i> ⁴	28	Maus	1 : 250
<i>Survivin Antibody</i> ⁵	-	Kaninchen	1 : 1000

¹ QED Bioscience Inc. (San Diego, USA), ² Sigma-Aldrich (Steinheim), ³ DAKO (Glostrup, Dänemark), ⁴ BD Biosciences (Heidelberg), ⁵ Novus Biologicals (Littleton, USA); Abkürzung: HRP – *horseradish peroxidase* (Meerrettichperoxidase)

3.5 Untersuchungen am subkutanen EJ28-Xenotransplantatmodell

Um die antitumorale Wirkung der siRNAs im BCa-Xenotransplantatmodell zu testen, wurden in Kooperation mit dem Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie (Leipzig) tierexperimentelle Studien nach den gültigen Tierschutzrichtlinien durchgeführt. Eine entsprechende Genehmigung durch die Landesdirektion Leipzig (TVV 10/09) lag vor. Die Zucht und Haltung der NOD/SCID-Mäuse erfolgte unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen im Medizinisch-Experimentellen Zentrum der Medizinischen Fakultät Leipzig. Als humanes BCa-Modell wurde die Zelllinie EJ28 verwendet. Während der Behandlungs- und Beobachtungszeiträume wurden die Tiere alle zwei Tage hinsichtlich Gesamtaspekt und Überleben sowie zweimal wöchentlich bezüglich Gewicht und Tumorgröße untersucht, wobei die Bestimmung der Tumorausdehnung mittels Messschieber erfolgte. Dabei wurden jeweils Längs- und Breitendurchmesser der Tumoren gemessen und daraus der Mittelwert d berechnet. Unter Annahme kugelförmiger Tumoren ergibt sich das Tumolvolumen V entsprechend $V = \frac{1}{6} \pi d^3$.

Für alle Untersuchungen und Behandlungen wurden die Tiere mit Isofluran (2,5 Volumenprozent) narkotisiert. Nach Beendigung der Versuchsreihen bzw. beim Auftreten erheblicher Belastungen erfolgte die Euthanasie der Mäuse in CO₂-Atmosphäre. Zum Abschluss der Experimente wurden die Tumoren entnommen und deren Gewicht bestimmt.

3.5.1 Auswahl eines geeigneten siRNA-Carriers

Zur Verbesserung der siRNA-Aufnahme in die subkutanen EJ28-Xenotransplantattumoren wurde die Eignung von Atelocollagen (*AteloGene Local Use-Kit*) und *in vivo*-jetPEI als siRNA-Carrier überprüft. Für einen direkten Nachweis von siRNA-Aufnahme und -Wirksamkeit *in vivo* wurde, aufgrund seiner antiproliferativen Wirkung *in vitro*, das gegen *Survivin* gerichtete Konstrukt S-1 (2,75 nmol [36,45 µg] pro Injektion) für dieses Experiment ausgewählt (Kapitel 4.2.3 und 4.2.4).

Zu Beginn der Versuchsreihe wurden je 2×10^6 EJ28-Zellen in einem Volumen von 200 µl PBS subkutan in die Nackenfalte von 24 NOD/SCID-Mäusen injiziert. Nach 11 Tagen erfolgte die Einteilung der Mäuse in zwei Gruppen à 9 Tiere (für die siRNA+Carrier-Behandlung) und eine Gruppe à 6 Tiere (für die HEPES/NaCl-Puffer-Kontrollgruppe), wobei auf vergleichbare mittlere Tumolvolumina in allen drei Gruppen geachtet wurde. Die peritumorale Injektion von je 100 µl Lösung erfolgte an den Tagen 14, 21 und 28 nach Tumorzellinokulation.

Herstellung der siRNA-*in vivo*-jetPEI-Injektionslösung:

Für jeden Injektionstag wurden bei Raumtemperatur 300 µl der 110 µM siRNA-Lösung mit 300 µl 10 %iger Glukoselösung versetzt, mittels Vortexer gemischt und zentrifugiert (10 s, 2000 g). In einem separaten Reaktionsgefäß wurden 52,5 µl *in vivo*-jetPEI mit 247,5 µl 10 %iger Glukoselösung und 300 µl nukleasefreiem Wasser vermischt, mittels Vortexer gemischt und zentrifugiert (10 s, 2000 g). Anschließend wurde die *in vivo*-jetPEI-Lösung zur siRNA-Lösung gegeben, erneut mittels Vortexer gemischt und zentrifugiert (10 s, 2000 g). Nach mindestens 15 min Inkubation erfolgte die Injektion von jeweils 100 µl Lösung (= 2,75 nmol siRNA) pro Maus.

Herstellung der siRNA-Atelocollagen-Injektionslösung:

Alle Lösungen und Reaktionsgefäße waren eisgekühlt, um ein Gelieren des Atelocollagens zu verhindern. Zunächst wurden 600 µl Atelocollagen aus der gelieferten Spritze in ein 2,0 ml-Reaktionsgefäß überführt. In einem zweiten Reaktionsgefäß wurden 300 µl der 110 µM siRNA-Lösung mit 60 µl des *10x siRNA Buffer* sowie 240 µl nukleasefreiem Wasser gemischt. Anschließend wurde die siRNA-Lösung auf die Atelocollagen-Lösung pipettiert und das Reaktionsgefäß für 20 min bei 4 °C im Rotator bewegt (4 min⁻¹). Abschließend wurde die Injektionslösung bei 4 °C zentrifugiert (1 min, 9300 g) und bis zur Applikation von je 100 µl (= 2,75 nmol siRNA) pro Maus auf Eis gelagert.

3.5.2 Etablierung der intravenösen Chemotherapie

Um *in vivo* die Wirkung einer kombinierten siRNA+CT-Behandlung untersuchen zu können, wurde die intravenöse Chemotherapie hinsichtlich des Therapeutikums und der CT-Konzentration optimiert. Die antitumorale Wirkung der applizierten CT sollte moderat sein (ca. 30 % Tumorwachstumshemmung), um eine mögliche siRNA-vermittelte Verstärkung der CT-Effekte nachweisen zu können.

Zur Auswahl eines geeigneten Chemotherapeutikums erfolgte im ersten Experiment die Analyse der Wirksamkeit von MMC und Gemcitabin (GEM) im subkutanen EJ28-Xenotransplantatmodell. Dafür wurden je 5×10^6 EJ28-Zellen in einem Volumen von 200 µl PBS subkutan in die Nackenfalte von 30 NOD/SCID-Mäusen injiziert. Nach 11 Tagen erfolgte die Einteilung der Mäuse in drei Gruppen à 10 Tiere, wobei auf vergleichbare mittlere Tumorumfänge in allen Gruppen geachtet wurde. An den Tagen 15, 22 und 29 nach Tumorzellinokulation erfolgte die Injektion von 3 mg/kg MMC oder 60 mg/kg GEM in den beiden Behandlungsarmen bzw. von PBS im Kontrollarm (jeweils 200 µl).

Zur Bestimmung der optimalen CT-Konzentration wurden in einem zweiten Experiment je 2×10^6 EJ28-Zellen in einem Volumen von 200 μl PBS subkutan in die Nackenfalte von 30 NOD/SCID-Mäusen injiziert. Nach Einteilung der Mäuse in drei Gruppen erfolgte an den Tagen 15, 22 und 29 nach Tumorsetzung die Injektion von 0,75 oder 1,5 mg/kg MMC in den beiden Behandlungsarmen bzw. von PBS im Kontrollarm (jeweils 200 μl).

3.5.3 Kombinierte Behandlung mit siRNA und Chemotherapie

Folgend wurde die Wirkung einer kombinierten siRNA+Chemotherapie-Behandlung *in vivo* analysiert. Die Durchführung dieser Untersuchungen erfolgte in zwei Teilexperimenten mit je 10 NOD/SCID-Mäusen pro Behandlungsarm. Entsprechend der *in vitro* erzielten Ergebnisse (Kapitel 4.2) wurden im ersten Experiment die beiden siRNA-Einzelbehandlungen BX-1 und S-2 (je 3 nmol pro Injektion und Maus) und im zweiten Experiment die siRNA-Kombinationen „BX-1 + S-2“ (2 x 1,5 nmol) sowie „B2-2 + BX-1 + X-2 + S-2“ (4 x 0,75 nmol) zusammen mit MMC appliziert. Als Kontrollen dienten jeweils die Gruppen „HEPES/NaCl-Puffer + MMC“ und „ns-si + MMC“.

Für jedes Teilexperiment wurden den 40 Mäusen je 2×10^6 EJ28-Zellen in einem Volumen von 200 μl PBS subkutan in die Nackenfalte injiziert. Nach 11 Tagen erfolgte die Einteilung der Mäuse in die vier Untersuchungsgruppen, wobei auf vergleichbare mittlere Tumorumfänge in allen vier Gruppen geachtet wurde. Die siRNA- bzw. Pufferlösungen (je 100 μl) wurden an den Tagen 14, 21 und 28 peritumoral, das Chemotherapeutikum (je 2 mg/kg MMC) an den Tagen 15, 22 und 29 intravenös appliziert. Als Carrier für die siRNAs diente *in vivo*-jetPEI, welches entsprechend der Ergebnisse des in Kapitel 3.5.1 beschriebenen Experimentes ausgewählt wurde.

Herstellung der siRNA-*in vivo*-jetPEI-Injektionslösung:

Für jeden Injektionstag wurden bei Raumtemperatur 500 μl der 120 μM siRNA-Lösung mit 500 μl 10 %iger Glukoselösung versetzt, mittels Vortexer gemischt und zentrifugiert (10 s, 2000 g). In einem separaten Reaktionsgefäß wurden 96 μl *in vivo*-jetPEI mit 404 μl 10 %iger Glukoselösung und 500 μl nukleasefreiem Wasser vermischt, mittels Vortexer gemischt und zentrifugiert (10 s, 2000 g). Anschließend wurde die *in vivo*-jetPEI-Lösung zur siRNA-Lösung gegeben, erneut mittels Vortexer gemischt und zentrifugiert (10 s, 2000 g). Nach mindestens 15 min Inkubation erfolgte die Injektion von jeweils 100 μl Lösung (= 3 nmol siRNA) pro Maus.

4 Ergebnisse

4.1 Zielgenexpression in Harnblasenkarzinomzelllinien und nichtmalignen Fibroblasten

Um deren Eignung als Modellzelllinien für die Hemmung von *BCL2*, *BCL-XL*, *XIAP* und *Survivin* zu überprüfen, wurden zunächst die Transkriptlevel dieser vier Apoptoseinhibitoren in den BCa-Zelllinien EJ28, J82 und 5637 sowie in nichtmalignen Fibroblastenzellen mittels qPCR (vgl. Kapitel 3.4.1) bestimmt. Alle untersuchten BCa-Zelllinien exprimieren die ausgewählten Zielgene, wobei die *BCL2*-, *BCL-XL*- und *Survivin*-Transkripte in den Tumorzelllinien in höherem Maße als in den gesunden Kontrollzellen gebildet werden (Tab. 4.1). Bezüglich der auf das Referenzgen *TBP* normierten relativen mRNA-Niveaus ist *BCL-XL* durch den größten Wert charakterisiert, gefolgt von *Survivin* und *XIAP* (Tab. 4.1). *BCL2* wird dagegen in deutlich geringerem Maße exprimiert. Werden die BCa-Zelllinien untereinander verglichen, so sind für EJ28 und J82 jeweils die höchsten Zielgentranskriptniveaus zu verzeichnen (Tab. 4.1). Daher wurden diese BCa-Zelllinien für die Analysen zur Inhibition von *BCL2*, *BCL-XL*, *XIAP* und *Survivin* ausgewählt.

Tab. 4.1: Relative Target-mRNA-Niveaus in Harnblasenkarzinomzelllinien und Fibroblasten. Die Targettranskriptzahlen wurden mittels qPCR ermittelt und auf das Referenzgen *TBP* normiert. Die relativen Target-mRNA-Niveaus ergeben sich jeweils als Quotient der aus Doppelbestimmungen berechneten Mittelwerte der Transkriptzahlen von Ziel- und Referenzgen. Die entsprechenden Vertrauensbereiche wurden mittels Fehlerfortpflanzungsgesetz aus den Schwankungen der jeweiligen Einzelmessungen bestimmt.

Zelllinie	<i>BCL2/TBP</i>	<i>BCL-XL/TBP</i>	<i>XIAP/TBP</i>	<i>Survivin/TBP</i>
EJ28	0,283 ± 0,007	27,8 ± 0,7	3,25 ± 0,09	4,35 ± 0,14
J82	0,084 ± 0,002	24,0 ± 1,0	2,00 ± 0,03	2,77 ± 0,08
5637	0,058 ± 0,004	7,0 ± 0,1	1,92 ± 0,03	1,10 ± 0,05
Fibroblasten	0,020 ± 0,003	6,4 ± 1,2	1,91 ± 0,30	0,62 ± 0,10

Die stärksten Expressionserhöhungen bezogen auf die nichtmalignen Fibroblasten weisen EJ28- und J82-Zellen auf (Abb. 4.1). Für *BCL2*, *BCL-XL* und *Survivin* konnte in den beiden BCa-Zelllinien eine deutliche Überexpression im Vergleich zu den Fibroblasten festgestellt werden. Das *XIAP*-Transkript wird dagegen in beiden Tumorzelllinien auf einem ähnlichen Niveau wie in den untersuchten Fibroblasten gebildet.

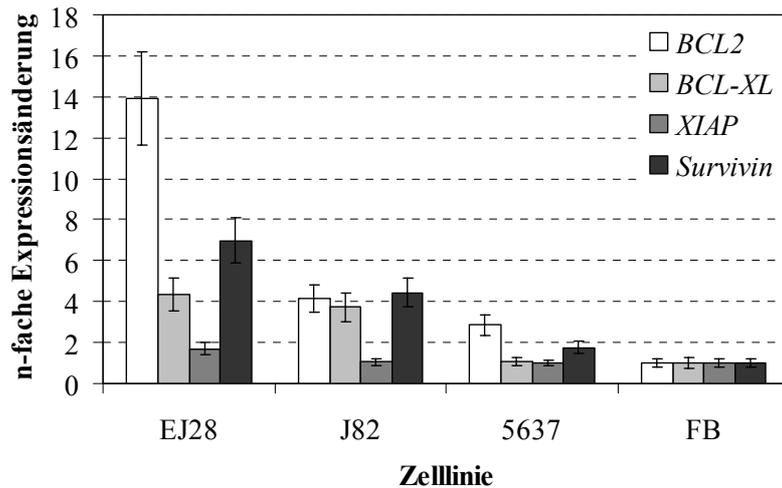


Abb. 4.1: Relative mRNA-Niveaus der Zielgene *BCL2*, *BCL-XL*, *XIAP* und *Survivin* in humanen Harnblasenkarzinomzelllinien bezogen auf nichtmaligne Fibroblasten. Die Targettranskriptzahlen wurden als Doppelbestimmung mittels qPCR ermittelt und auf das Referenzgen *TBP* normiert. Hier dargestellt sind die n-fachen Änderungen der relativen Target-mRNA-Niveaus bezogen auf nichtmaligne Fibroblasten zusammen mit den entsprechenden Konfidenzintervallen.

4.2 Effekte der siRNA-vermittelten Inhibition von *BCL2*, *BCL-XL*, *XIAP* und *Survivin* in Harnblasenkarzinomzelllinien

Um die Effekte einer siRNA-vermittelten Reduktion der vier Apoptoseinhibitoren *BCL2*, *BCL-XL*, *XIAP* und *Survivin* hinreichend diskutieren zu können, wurden zunächst Parameter der siRNA-Transfektion optimiert (Kapitel 4.2.1). Basierend auf diesen Resultaten erfolgten nach verschiedenen siRNA-Behandlungen die Bestimmungen von Expression und Proteinmenge der vier Zielgene (Kapitel 4.2.2) sowie die Charakterisierung zellulärer Effekte, wie Proliferation (Kapitel 4.2.3), Apoptoserate und Zellzyklusverteilung (Kapitel 4.2.4). Im Anschluss wurde der Einfluss verschiedener siRNA-Vorbehandlungen auf die Wirksamkeit von Chemotherapeutika analysiert (Kapitel 4.2.5). Motiviert durch die bereits erzielten Ergebnisse erfolgte die Untersuchung der Effekte einer simultanen Inhibition von *BCL-XL* und *Survivin* (Kapitel 4.2.6). Transkriptomweite Genexpressionsänderungen in BCa-Zellen wurden mittels *Microarray*-Analysen charakterisiert (Kapitel 4.2.7). Der Abschnitt schließt mit der Analyse der siRNA-Wirkung in chemotherapieresistenten BCa-Zellen (Kapitel 4.2.8).

4.2.1 Optimierung der siRNA-Transfektion

Unter Verwendung der siRNAs B2-1, BX-1, X-1 und S-1 wurden zunächst an der BCa-Zelllinie EJ28 die Transfektionsbedingungen zum einen hinsichtlich der siRNA-Konzentration und zum anderen bezüglich des Transfektionsablaufs in den siRNA-Kombinationsbehandlungen optimiert. Zusätzlich erfolgten Untersuchungen zum zeitlichen Verlauf der siRNA-vermittelten Targetexpressionsreduktion.

Für jedes der vier Zielgene wurden von den jeweils drei getesteten siRNAs (vgl. Tab. 3.2) für die weiteren Untersuchungen die beiden Konstrukte ausgewählt, die in EJ28-Zellen die stärkste Reduktion der entsprechenden Target-mRNA-Niveaus hervorriefen (Daten nicht gezeigt). Bezogen auf die in Tab. 3.2 eingeführte Nomenklatur sind das die siRNAs mit den Endungen -1 und -2, also z.B. für *BCL2* die Konstrukte B2-1 und B2-2.

Die konzentrationsabhängigen Verläufe der jeweiligen relativen Targettranskriptzahlen 24 h nach Behandlung mit B2-1, BX-1, X-1 oder S-1 bezogen auf die ns-si-Kontrolle sind in Abb. 4.2 dargestellt. Im Ergebnis wird für die Einzelbehandlungen, d.h. für die Inhibition eines einzelnen der vier Zielgene, bei einer siRNA-Konzentration von 40 nM die stärkste Targettranskriptreduktion um 69 % (für X-1) bis 84 % (für S-1) erzielt. Demzufolge wurde für die Kombinationsbehandlungen zur simultanen Inhibition von *BCL2*, *BCL-XL*, *XIAP* und *Survivin* eine siRNA-Konzentration von 10 nM pro Target gewählt, so dass sich ebenfalls eine siRNA-Gesamtkonzentration von 40 nM in den Kombinationen M4 und M8 ergab: 4 x 10 nM siRNA in M4-1 (B2-1 + BX-1 + X-1 + S-1) und M4-2 (B2-2 + BX-2 + X-2 + S-2) sowie 8 x 5 nM siRNA in M8 (B2-1 + B2-2 + BX-1 + BX-2 + X-1 + X-2 + S-1 + S-2).

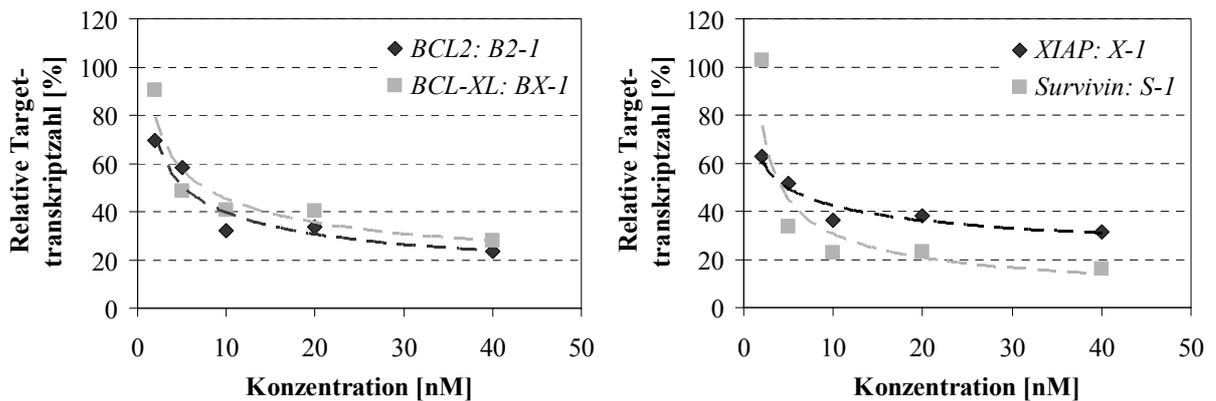


Abb. 4.2: Konzentrationsabhängige Bestimmung der relativen Target-mRNA-Niveaus nach siRNA-vermittelter Inhibition eines bestimmten Zielgens. Relative Transkriptzahlen der Targets *BCL2*, *BCL-XL*, *XIAP* und *Survivin* 24 h nach Transfektion von EJ28-Zellen mit entsprechenden targetspezifischen siRNAs verschiedener Konzentrationen. Die Transkriptzahlen wurden auf *TBP* normiert und sind relativ zur ns-si-Kontrolle (100 %) dargestellt.

Das Zeitverhalten der Zielgentranskriptniveaus nach siRNA-Einzelbehandlung ist in Abb. 4.3 dargestellt. Die siRNA-vermittelte Abnahme der relativen Targettranskriptzahlen wird bereits 4 h nach Transfektion beobachtet und hält auch 96 h nach Behandlung noch an. Die zeitliche Änderung der mRNA-Niveaus ist jedoch für die einzelnen Targets verschieden. Während die relative Transkriptzahl für *Survivin* nur moderat von 17 % nach 4 h auf 29 % nach 96 h steigt, ist für *BCL2* ein stärkerer Anstieg von 25 % nach 4 h auf 62 % nach 96 h zu verzeichnen.

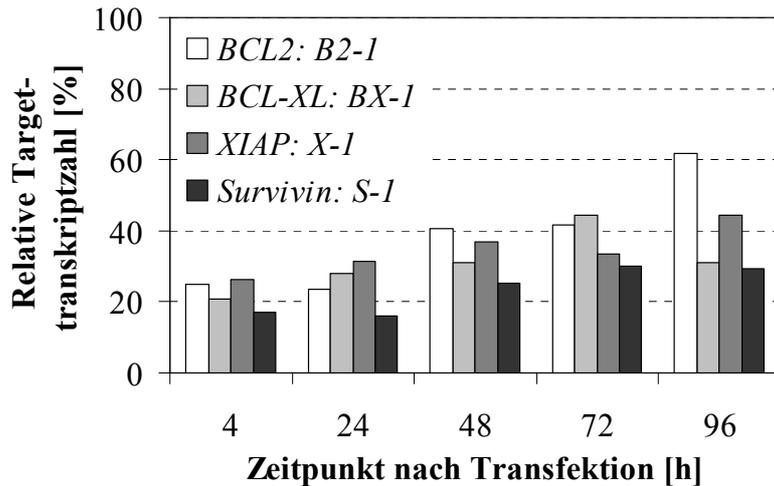


Abb. 4.3: Zeitabhängige Bestimmung der relativen Target-mRNA-Niveaus nach siRNA-vermittelter Inhibition eines bestimmten Zielgens. Relative Transkriptzahlen der Targets *BCL2*, *BCL-XL*, *XIAP* und *Survivin* nach Transfektion von EJ28-Zellen mit 40 nM der entsprechenden targetspezifischen siRNA. Die Transkriptzahlen wurden auf *TBP* normiert und sind relativ zur ns-si-Kontrolle (100 %) dargestellt.

Um den optimalen Ablauf einer Kombinationsbehandlung zur gleichzeitigen Inhibition aller vier Zielgene zu bestimmen, wurde die simultane Transfektion von siRNAs gegen alle Targets (M4-1) mit einer sequenziellen Behandlung [4 h Transfektion mit siRNAs gegen *BCL2*+*BCL-XL* (M2-BCLs: B2-1 + BX-1) gefolgt von 4 h Transfektion mit siRNAs gegen *XIAP*+*Survivin* (M2-IAPs: X-1 + S-1)] verglichen. Im Ergebnis ist die simultane Behandlung der sequenziellen vorzuziehen, da im ersten Fall eine deutlich stärkere Reduktion der Target-mRNA-Mengen, insbesondere für *Survivin* und *XIAP*, zu verzeichnen ist. Dennoch fällt die Abnahme der Transkriptniveaus für ein bestimmtes Zielgen, insbesondere für *BCL2* und *BCL-XL*, nicht so stark aus, wie nach dem Einsatz der entsprechenden Zweierkombination M2-BCLs (Abb. 4.4).

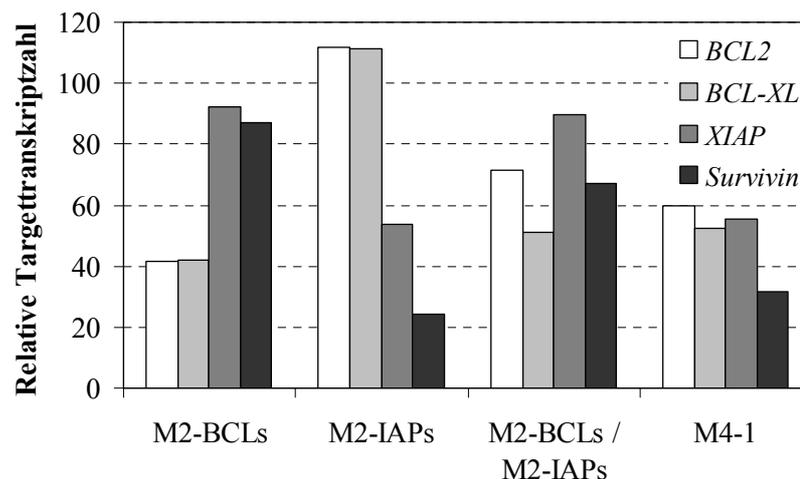


Abb. 4.4: Relative Target-mRNA-Niveaus nach simultaner bzw. sequenzieller siRNA-Transfektion in Kombinationsbehandlung zur gleichzeitigen Inhibition aller vier Zielgene. Relative Transkriptzahlen der Targets *BCL2*, *BCL-XL*, *XIAP* und *Survivin* 48 h nach Transfektion von EJ28-Zellen mit je 10 nM siRNA pro Target. Die Behandlung erfolgte mit siRNA-Zweierkombinationen gegen *BCL2*+*BCL-XL* (M2-BCLs: B2-1 + BX-1) oder *XIAP*+*Survivin* (M2-IAPs: X-1 + S-1) bzw. gestaffelt mit M2-BCLs (4 h) gefolgt von M2-IAPs (4 h) sowie simultan mit der siRNA-Viererkombination M4-1. Die Transkriptzahlen wurden auf *TBP* normiert und sind relativ zur ns-si-Kontrolle (100 %) dargestellt.

4.2.2 Charakterisierung der Zielgenexpression und -proteinmenge

Zunächst wurde die targetspezifische Wirksamkeit der siRNA-Einzelbehandlungen im Vergleich zum Kontrollkonstrukt ns-si in EJ28- und J82-Zellen untersucht. Die relativen Zielgen-mRNA-Niveaus 48 h nach Transfektion mit siRNA-Konstrukten einer Gesamtkonzentration von 40 nM sind in Abb. 4.5 dargestellt. Alle untersuchten siRNAs bewirken auf mRNA-Ebene eine Reduktion der entsprechenden Targetexpression. Für *BCL2*, *BCL-XL* und *Survivin* wird in beiden Zelllinien eine jeweils vergleichbare Hemmung der Transkriptzahlen um bis zu 85 % (für S-2 in J82) bezogen auf die Kontrolle nachgewiesen. *XIAP* wird in EJ28-Zellen um 61-63 %, in J82-Zellen um 31-44 % reduziert (Abb. 4.5).

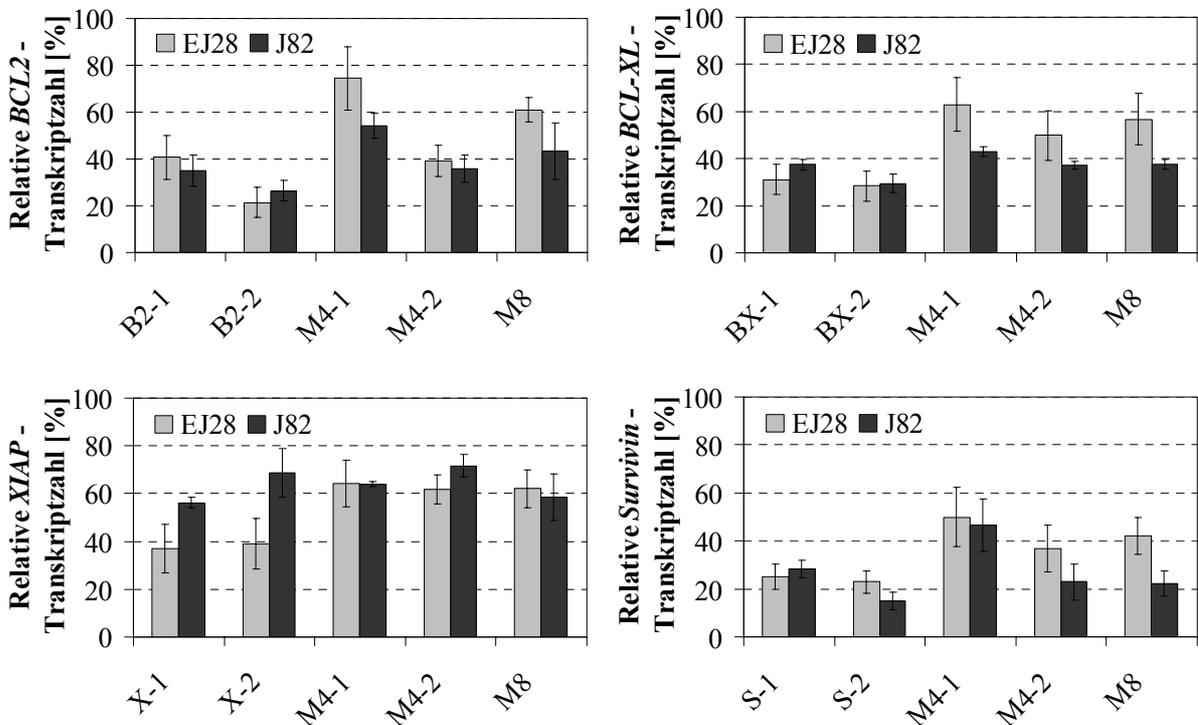


Abb. 4.5: Relative Target-mRNA-Niveaus nach siRNA-Einzel- und -Kombinationsbehandlungen in EJ28- und J82-Zellen. Relative Transkriptzahlen der Targets *BCL2*, *BCL-XL*, *XIAP* und *Survivin* 48 h nach Transfektion mit siRNAs einer Gesamtkonzentration von 40 nM. Die Transkriptzahlen wurden auf *TBP* normiert und sind relativ zur ns-si-Kontrolle (100 %) zusammen mit den aus Doppel- bis Vierfachbestimmungen berechneten mittleren Abweichungen dargestellt.

In den Kombinationsbehandlungen zur simultanen Inhibition von *BCL2*, *BCL-XL*, *XIAP* und *Survivin* durch ein (M4-1, M4-2) bzw. zwei (M8) siRNA-Konstrukt(e) pro Zielgen werden die Transkriptniveaus aller Targets reduziert (Abb. 4.5). Für *BCL2*, *BCL-XL* und *Survivin* werden die größten Hemmraten beobachtet, und zwar um bis zu 63 % in EJ28- bzw. um bis zu 78 % in J82-Zellen. Das *XIAP*-Transkript wird dagegen nur um 28-42 % gesenkt.

Western Blot-Analysen und deren quantitative Auswertung, wie sie beispielhaft in Abb. 4.6 und 4.7 dargestellt sind, zeigen sowohl für die siRNA-Einzel- als auch für die siRNA-Kombinationsbehandlungen eine starke Reduzierung der Proteinniveaus der entsprechenden Targets in EJ28-Zellen. Die Abnahme der Proteinmenge in den transfizierten BCa-Zellen ist dabei in der Regel größer als die entsprechende Reduktion auf mRNA-Ebene (vgl. Abb. 4.5 und 4.7). Insbesondere werden auf Proteinebene für alle vier Targets in den Einzelbehandlungen Hemmraten um 86 % bis 97 % erzielt (Abb. 4.7). Für die Kombinationsbehandlungen liegt die Targetproteinreduzierung zwischen 47 % und 90 %. Äquivalente Ergebnisse werden nach entsprechenden siRNA-Behandlungen der Zelllinie J82 erzielt (Daten nicht gezeigt).

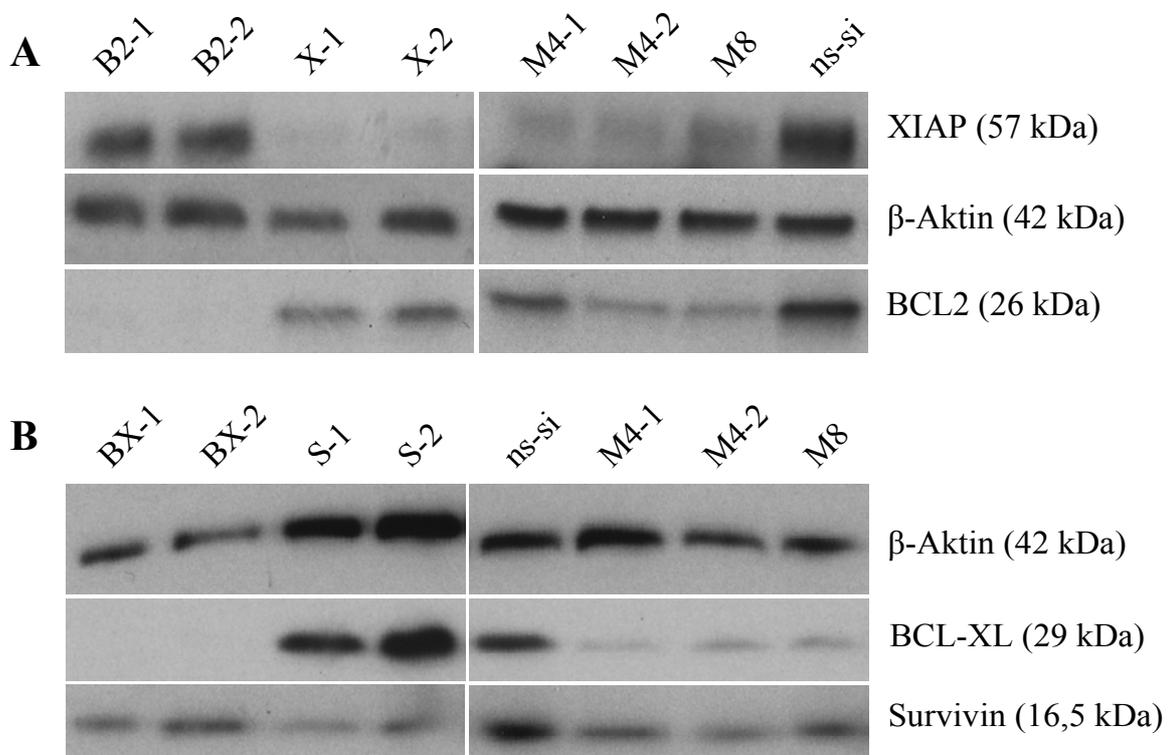


Abb. 4.6: Proteinniveaus der Targets nach siRNA-Einzel- und -Kombinationsbehandlungen in EJ28-Zellen. Repräsentative Ergebnisse von *Western Blot*-Analysen zum Proteinnachweis von BCL2 und XIAP (A) sowie BCL-XL und Survivin (B) 48 h nach Transfektion mit siRNAs einer Gesamtkonzentration von 40 nM. Als Referenzprotein diente β -Aktin.

4.2.3 Effekte auf die Zellproliferation

Um die Auswirkungen der siRNA-vermittelten Inhibition von *BCL2*, *BCL-XL*, *XIAP* und *Survivin* auf das Wachstumsverhalten der EJ28- und J82-BCa-Zelllinien zu analysieren, wurden nach der Transfektion WST-1-Zellviabilitätstests, Zellzahlbestimmungen sowie Zellkoloniebildungstests (vgl. Kapitel 3.3.1 – 3.3.3) durchgeführt.

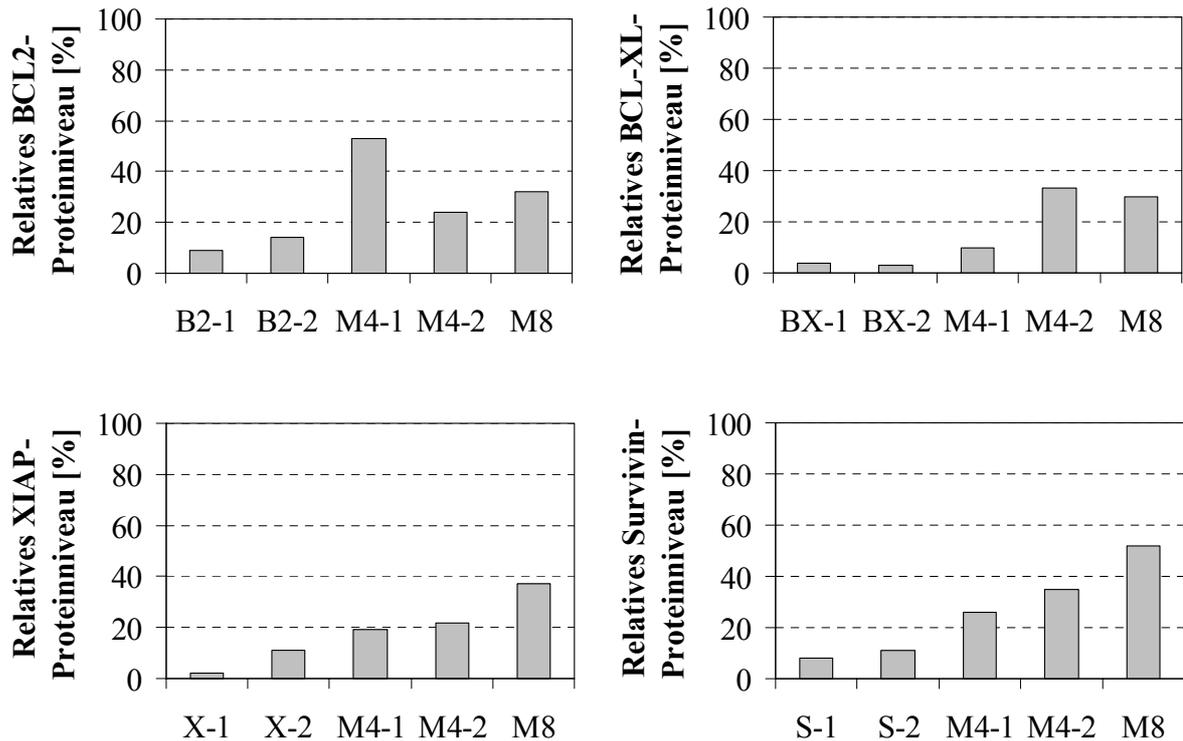


Abb. 4.7: Relative Proteinniveaus von BCL2, BCL-XL, XIAP und Survivin nach siRNA-Einzel- und -Kombinationsbehandlungen in EJ28-Zellen. Relative Proteinniveaus der Targets 48 h nach Transfektion mit siRNAs einer Gesamtkonzentration von 40 nM. Die densitometrisch bestimmten Werte für die Targetproteine wurden auf das Referenzprotein β -Aktin normiert und sind relativ zur ns-si-Kontrolle (100 %) dargestellt.

Die Ergebnisse der Zellviabilitätsbestimmungen sind in Abb. 4.8 dargestellt. Während die Hemmung von *BCL2* und *XIAP* die Viabilität der EJ28-Zellen nicht beeinflusst, führt die *BCL-XL*-Inhibition zu einer marginalen, nicht signifikanten Viabilitätsreduktion. Eine signifikante Verminderung der Zellviabilität von EJ28-Zellen um 29 % wird hingegen durch Transfektion mit den gegen *Survivin* gerichteten siRNAs erzielt. Die Kombinationsbehandlungen reduzieren die Viabilität der EJ28-Zellen sogar um bis zu 40 %. Die Viabilität von J82-Zellen wird – außer durch B2-2 – durch alle targetspezifischen siRNA-Behandlungen reduziert, am stärksten durch die simultane Inhibition aller vier Zielgene um 36 % (für M-8) bis 45 % (für M4-1, Abb. 4.8).

Die Änderung der Zellzahl, einem weiteren Maß der Zellproliferation, wird in Abb. 4.9 gezeigt. Es ist zu erkennen, dass durch Transfektion von EJ28- und J82-Zellen mit den gegen *Survivin* gerichteten siRNAs S-1 und S-2 sowie durch die kombinierte Ausschaltung aller vier Zielgene in beiden BCa-Zelllinien eine Zellzahlabnahme um bis zu 52 % bezogen auf die ns-si-Kontrolle erzielt werden kann (Abb. 4.9).

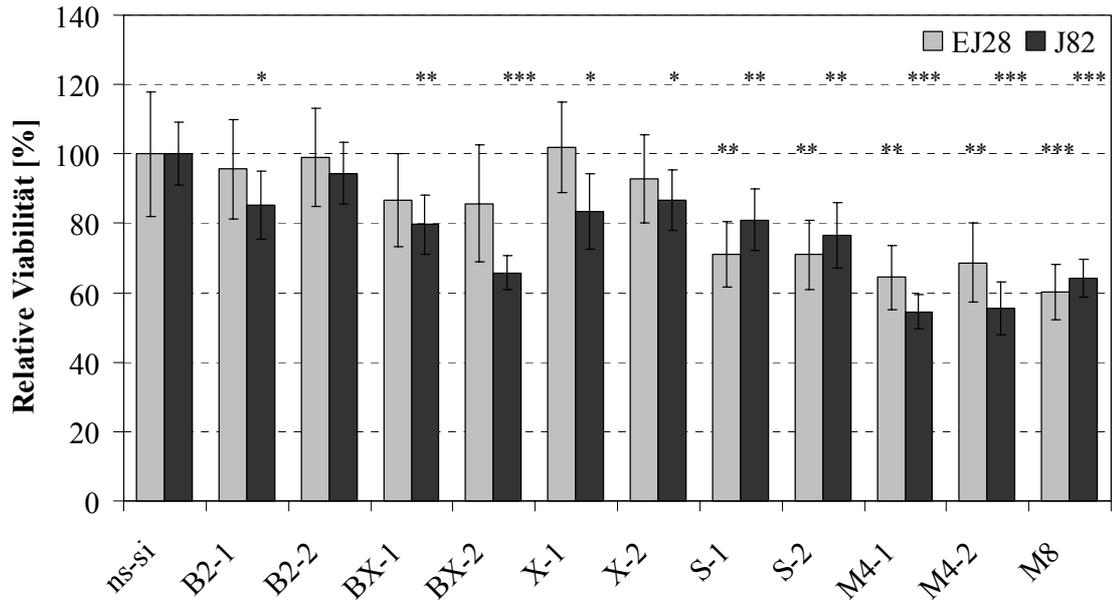


Abb. 4.8: Effekte der siRNA-Einzel- und -Kombinationsbehandlungen auf die Viabilität von EJ28- und J82-Zellen. Relative Viabilität 96 h nach Transfektion mit siRNAs einer Gesamtkonzentration von 40 nM. Dargestellt sind die Mittelwerte von Vierfachbestimmungen relativ zur ns-si-Kontrolle (100 %) zusammen mit den 95 %-Konfidenzintervallen. Signifikante Unterschiede der targetspezifischen siRNA-Behandlung gegenüber der Kontrolle wurden mit Hilfe des Student'schen t-Tests bestimmt (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

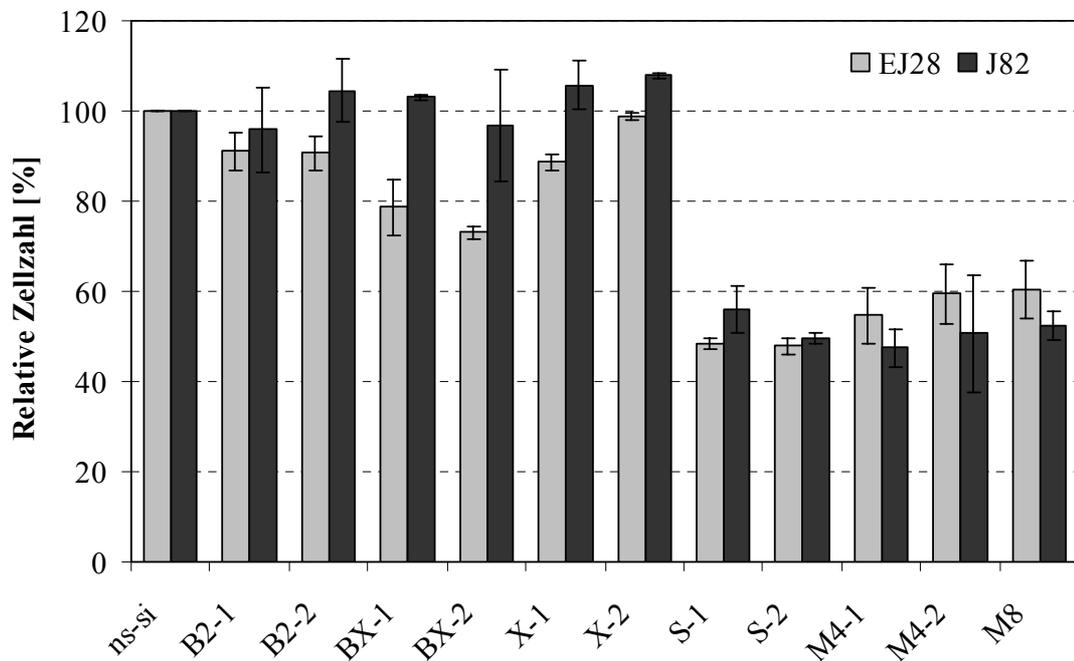


Abb. 4.9: Effekte der siRNA-Einzel- und -Kombinationsbehandlungen auf die Zellzahl von EJ28- und J82-Zellen. Relative Zellzahl 48 h nach Transfektion mit siRNAs einer Gesamtkonzentration von 40 nM. Die Werte sind relativ zur ns-si-Kontrolle (100 %) zusammen mit den aus Doppel- bis Vierfachbestimmungen berechneten mittleren Abweichungen dargestellt.

Die Inhibition von *Survivin* reduziert zudem in EJ28-Zellen die Koloniebildung, ein Maß für die Langzeitproliferationsfähigkeit der Zellen, um 86 % (für S-1) bzw. 80 % (für S-2, Abb. 4.10). Während alle weiteren siRNA-Monotherapien die Langzeitproliferationsfähigkeit dieser BCa-Zellen nicht beschränken, verringert die kombinierte Hemmung aller vier Apoptoseinhibitoren die relative Koloniezahl um maximal 43 % (für M4-2).

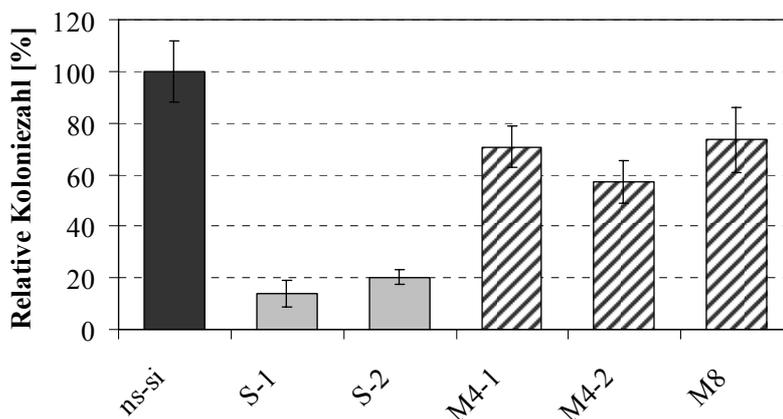


Abb. 4.10: Relative Koloniezahl von EJ28-Zellen nach siRNA-Einzel- und -Kombinationsbehandlungen. Der Zellkoloniebildungstest wurde 48 h nach Transfektion mit siRNAs einer Gesamtkonzentration von 40 nM als Dreifachansatz ausgesät. Dargestellt sind die Mittelwerte relativ zur ns-si-Kontrolle (100 %) zusammen mit den 95 %-Konfidenzintervallen.

4.2.4 Effekte auf Apoptoserate und Zellzyklus

Um festzustellen, ob die BCa-Wachstumshemmung infolge der einzelnen bzw. simultanen Inhibition der Zielgene auf eine Apoptoseinduktion zurückzuführen ist und ob Alterationen im Zellzyklus hervorgerufen werden, erfolgten die Bestimmungen von Apoptoseraten (vgl. Kapitel 3.3.4) sowie Zellzyklusverteilungen (vgl. Kapitel 3.3.5).

Entsprechend der in Abb. 4.11 A dargestellten Apoptoseraten ist zu erkennen, dass die siRNA-vermittelte Hemmung von *Survivin* sowie die simultane Inhibition aller vier Zielgene eine 1,9 bis 2,5fach erhöhte Apoptoserate in EJ28-Zellen hervorruft. Beispielsweise steigert sich die Gesamtapoptoserate von 10 % in der Kontrollbehandlung auf 25 % nach Behandlung mit der siRNA S-1. In J82-Zellen führt die Transfektion mit siRNAs gegen ein bzw. mehrere Targets nur zu einer marginalen Erhöhung der Apoptoserate um durchschnittlich das 1,4fache (Abb. 4.11 B).

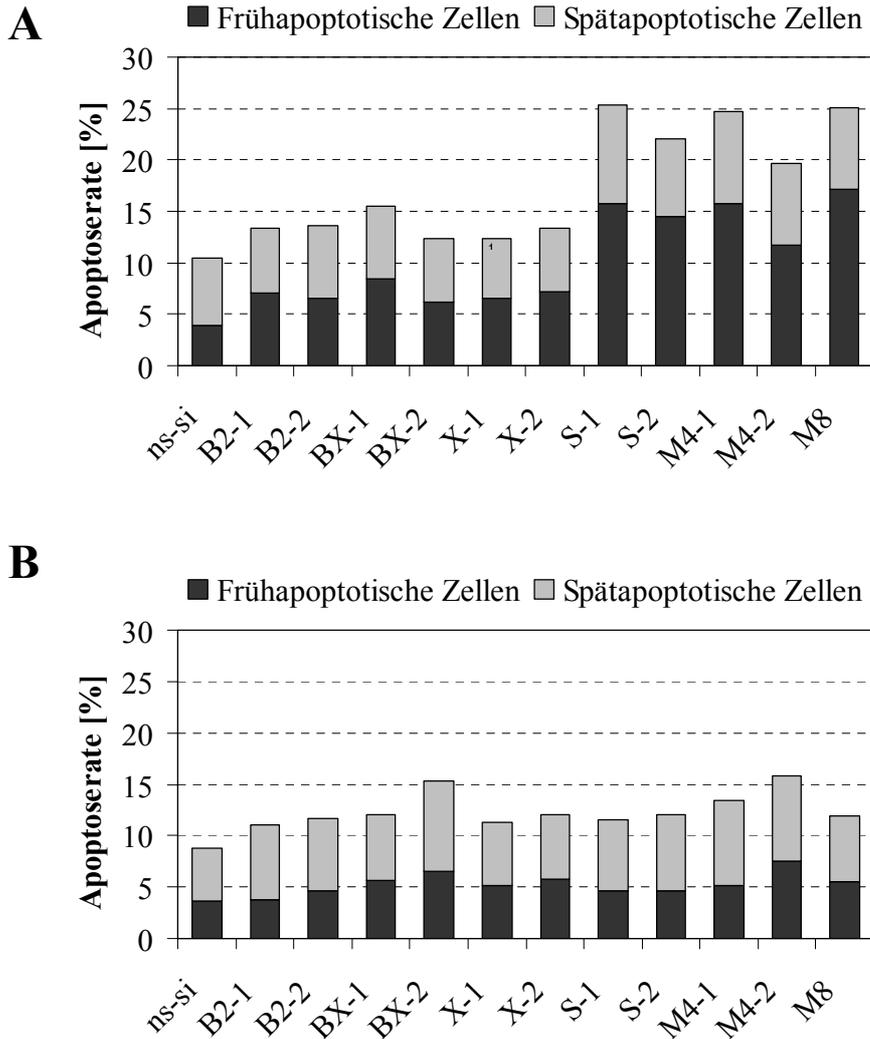


Abb. 4.11: Apoptoseraten in EJ28- (A) und J82-Zellen (B) nach siRNA-Einzel- und -Kombinationsbehandlungen. Dargestellt sind die Apoptoseraten einer repräsentativen Messreihe, unterteilt in frühe (Annexin V-FITC+, PI-) und späte (Annexin V-FITC+, PI+) Apoptosephase, 48 h nach Transfektion mit siRNAs einer Gesamtkonzentration von 40 nM.

Deutliche Veränderungen in der Zellzyklusverteilung, d.h. ein G2-/M-Arrest, die Entstehung polyploider Zellen sowie die Reduktion des Anteils von Zellen in der G0-/G1-Phase, treten nach Inhibition von *Survivin* auf (Abb. 4.12). Beispielsweise steigt der Anteil polyploider Zellen in den EJ28-Proben von 1 % für die ns-si-Kontrolle auf 10-13 % und in J82-Proben von 2 % auf bis zu 11 % an. Die Anzahl an Zellen in der G2/M-Phase erhöht sich relativ zur ns-si-Kontrolle um 15-61 %. In geringerem Maße werden für beide Zelllinien diese Effekte auch in den Kombinationsbehandlungen beobachtet. Hier verdoppelt sich die Anzahl polyploider Zellen im Vergleich zur Kontrolle, die Anzahl an Zellen in der G2/M-Phase steigt relativ zur ns-si-Kontrolle um maximal 24 %. Die Einzelinhibition von *BCL2*, *BCL-XL* oder *XIAP* bewirkt in den untersuchten BCa-Zellen keine nennenswerten Zellzyklusalterationen (Daten nicht gezeigt).

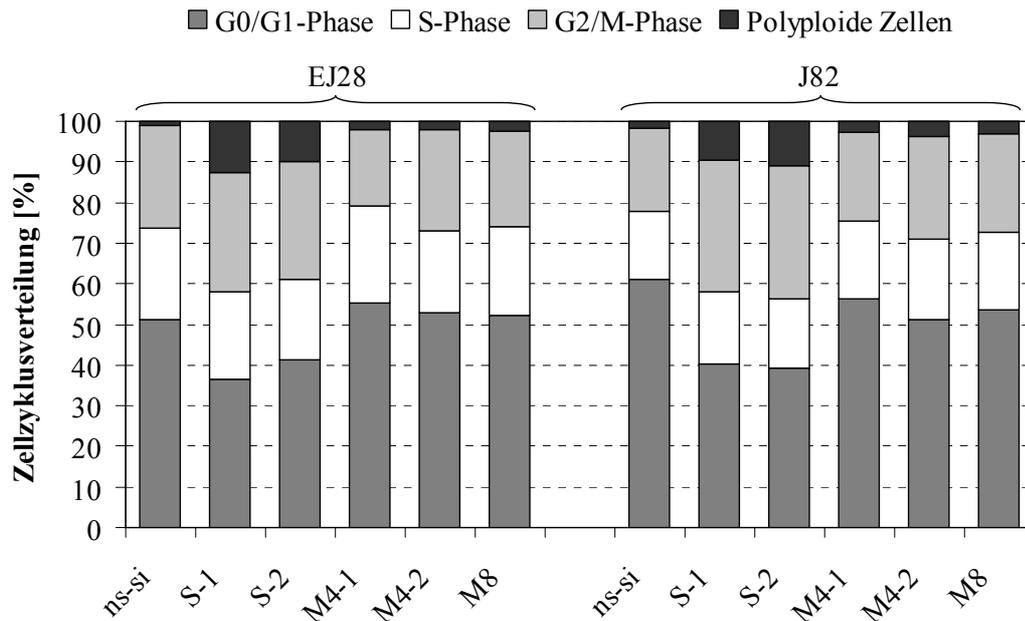


Abb. 4.12: Zellzyklusverteilungen in EJ28- und J82-Zellen nach siRNA-Einzel- und -Kombinationsbehandlungen. Dargestellt sind die Zellzyklusverteilungen aus einer repräsentativen Messreihe 48 h nach Transfektion mit siRNAs einer Gesamtkonzentration von 40 nM.

4.2.5 Einfluss der siRNA-Behandlung auf eine nachgeschaltete Chemotherapie

Zur Klärung der Fragestellung, ob die Hemmung der vier Apoptoseinhibitoren die Wirksamkeit von Chemotherapeutika *in vitro* erhöhen kann, wurden BCa-Zellen, die eine mit einer siRNA-Vorbehandlung kombinierte CT erhalten haben (vgl. Kapitel 3.2.2.3), hinsichtlich Wachstumsverhalten (z.B. Zellviabilität und Zellzahl [vgl. Kapitel 3.3.1 und 3.3.2]) sowie Apoptoseinduktion (vgl. Kapitel 3.3.4) charakterisiert.

Entsprechend der jeweils letzten Säulengruppe in den Abb. 4.13 und 4.14 führt bereits die alleinige Behandlung mit Chemotherapeutika zu einer deutlichen Reduktion der Zellviabilität (mit CDDP bei EJ28-Zellen um 74 % und bei J82-Zellen um 59 %). Die Vorbehandlung der BCa-Zellen mit dem ns-si-Kontrollkonstrukt beeinflusst die Wirksamkeit der Chemotherapeutika nicht und ruft eine vergleichbare Zellviabilitätsinhibition wie die alleinige CT hervor (mit CDDP bei EJ28-Zellen um 71 % und bei J82-Zellen um 61 %).

Zur Bewertung eines spezifischen Verstärkungseffekts wurden die siRNA+CT-Behandlungen mit der jeweiligen ns-si+CT-Kontrolle verglichen. Während die Inhibition von *BCL2* oder *XIAP* bei beiden Zelllinien keinen Einfluss auf die Effektivität der nachgeschalteten CT hat (Daten nicht gezeigt), rufen Vorbehandlungen mit siRNAs gegen *BCL-XL*, *Survivin* oder *BCL2+BCL-XL+XIAP+Survivin* in 26 von 28 Proben eine signifikant stärkere Reduktion der

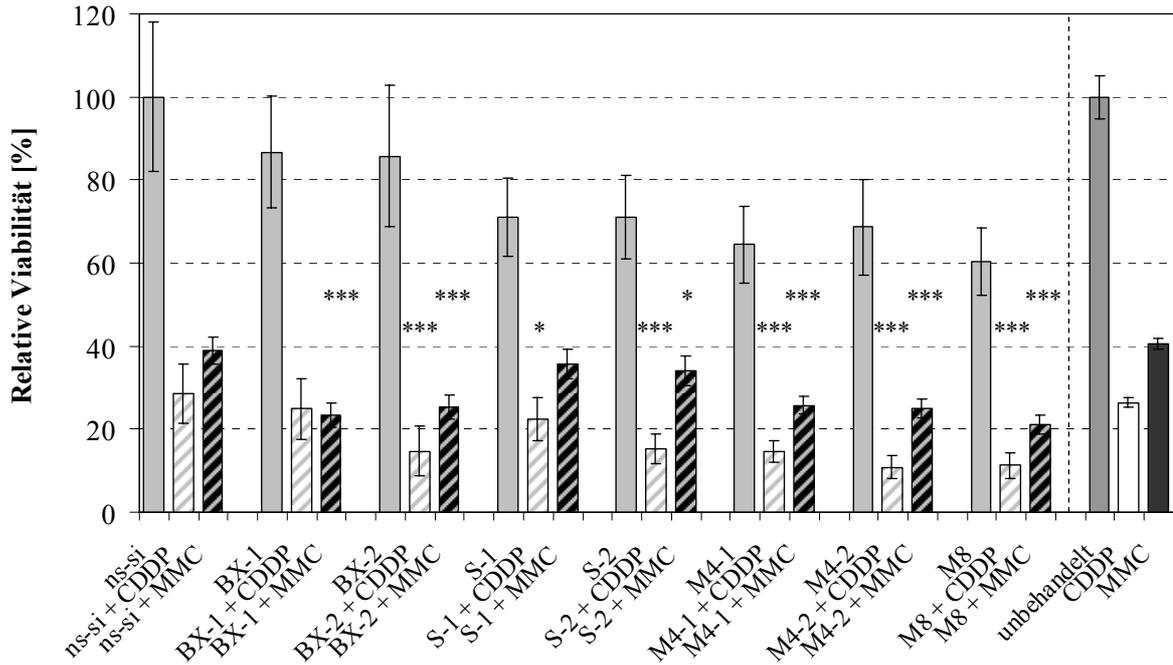


Abb. 4.13: Viabilität von EJ28-Zellen nach kombinierter siRNA+Chemotherapie-Behandlung 96 h nach Transfektion. Die Zellen wurden mit siRNAs einer Gesamtkonzentration von 40 nM vorbehandelt und 20 h nach Transfektion mit 2,1 µg/ml Cisplatin (CDDP) bzw. 0,9 µg/ml Mitomycin C (MMC) inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte von Vierfachbestimmungen relativ zur ns-si-Kontrolle bzw. für CDDP- und MMC-Einzelbehandlungen relativ zu unbehandelten Zellen (100 %) zusammen mit den 95 %-Konfidenzintervallen. Signifikante Unterschiede der siRNA+CT-Behandlung gegenüber der Kontrolle ns-si+CT wurden mit Hilfe des Student'schen t-Tests bestimmt (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Abkürzungen: CT – Chemotherapie

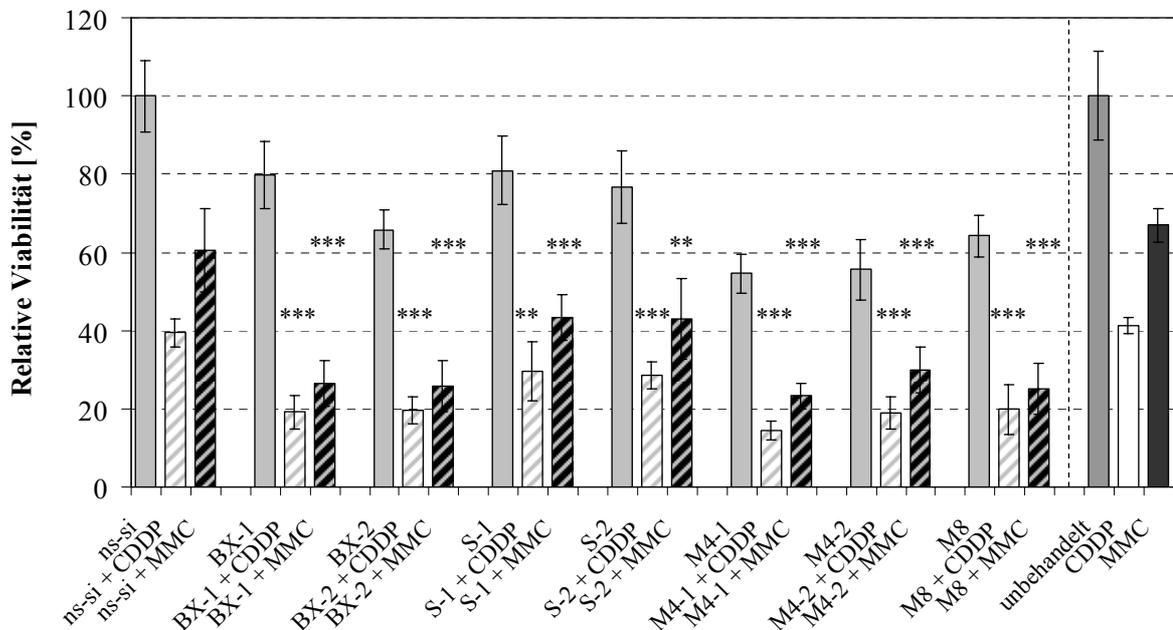


Abb. 4.14: Viabilität von J82-Zellen nach kombinierter siRNA+Chemotherapie-Behandlung 96 h nach Transfektion. Die Zellen wurden mit siRNAs einer Gesamtkonzentration von 40 nM vorbehandelt und 20 h nach Transfektion mit 1,2 µg/ml Cisplatin (CDDP) bzw. 1,0 µg/ml Mitomycin C (MMC) inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte von Vierfachbestimmungen relativ zur ns-si-Kontrolle bzw. für CDDP- und MMC-Einzelbehandlungen relativ zu unbehandelten Zellen (100 %) zusammen mit den 95 %-Konfidenzintervallen. Signifikante Unterschiede der siRNA+CT-Behandlung gegenüber der Kontrolle ns-si+CT wurden mit Hilfe des Student'schen t-Tests bestimmt (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Abkürzungen: CT – Chemotherapie

BCa-Zellviabilität hervor als die jeweilige ns-si+CT-Kontrolle (Abb. 4.13, 4.14). Beispielsweise kann in EJ28-Zellen die Viabilität durch BX-1 bzw. BX-2 in Kombination mit MMC (um 77 % bzw. 75 % jeweils bezogen auf die ns-si-Kontrolle) signifikant stärker als durch die ns-si+MMC-Behandlung (um 61 %) gehemmt werden. In J82-Zellen unterscheidet sich die Viabilitätsreduktion durch S-1 bzw. S-2 in Kombination mit CDDP (um 70 % bzw. 72 %) signifikant vom Effekt der ns-si+CDDP-Kontrolle (um 61 %). Die Kombinationsbehandlungen M4-1, M4-2 und M8 bewirken für beide Chemotherapeutika in EJ28- und J82-BCa-Zellen in der Mehrheit der Proben eine stärkere Reduktion der Zellviabilität als die untersuchten Monotarget-siRNA+Chemotherapie-Behandlungen (Viabilitätsabnahme um bis zu 89 % für M4-2+CDDP und M8+CDDP in EJ28-Zellen; Abb. 4.13, 4.14).

Die weiterführende Charakterisierung der zellulären Effekte der Kombinationsbehandlungen aus targetspezifischen siRNAs plus CT erfolgte 48 und 72 h nach siRNA-Behandlung. Bereits 48 h nach Transfektion ist die Zahl der EJ28-Zellen durch die siRNA+CDDP-Behandlungen um bis zu 58 % (für BX-1) bezogen auf die ns-si+CDDP-Kontrolle reduziert (Abb. 4.15 A). Im Vergleich dazu hatte die alleinige siRNA-Behandlung mit BX-1 nur eine Zellzahlabnahme um 21 % relativ zur ns-si-Kontrolle ergeben (vgl. Abb. 4.9). Vierundzwanzig Stunden später wird bei kombinierter siRNA+CDDP-Behandlung eine weitere Reduktion der Zellzahl festgestellt, insgesamt um bis zu 75 % (für M8, Abb. 4.15 A). Für MMC werden die gleichen Tendenzen beobachtet (Abb. 4.15 B): eine deutliche Reduktion der Zellzahl in Kombination mit gegen *BCL-XL*, *Survivin* und *BCL2+BCL-XL+XIAP+Survivin* gerichteten siRNAs. Für die eingesetzte MMC-Konzentration sind die erzielten Effekte im Allgemeinen etwas schwächer im Vergleich zu CDDP.

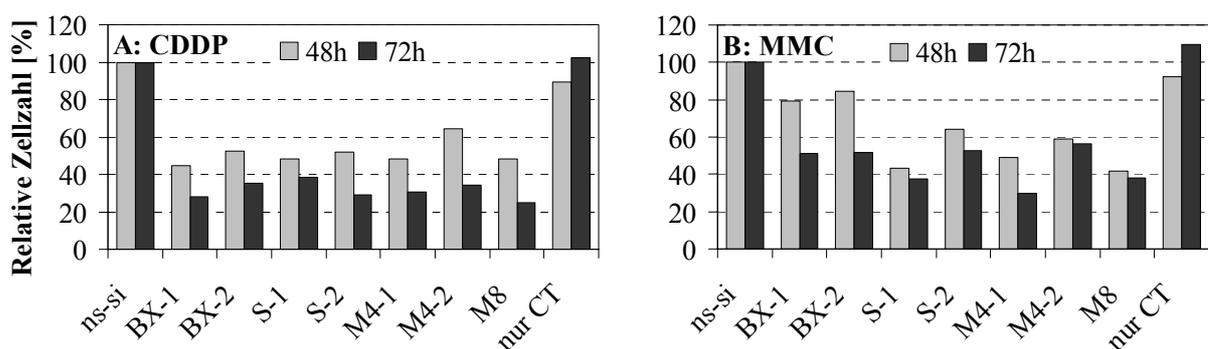


Abb. 4.15: Wachstumsinhibitorische Effekte nach kombinierter siRNA+Chemotherapie-Behandlung in EJ28-Zellen. Die Zellen wurden mit siRNAs einer Gesamtkonzentration von 40 nM vorbehandelt und 20 h nach Transfektion mit A) 2,1 µg/ml Cisplatin für 24 h bzw. mit B) 0,9 µg/ml Mitomycin C für 2 h inkubiert. Die Werte sind relativ zur ns-si+CT-Kontrolle (100 %) dargestellt. Abkürzungen: CT – Chemotherapie

Die Gesamtapoptoserate steigt 72 h nach siRNA-Transfektion in EJ28-Zellen von 36 % (ns-si+CDDP) bzw. 25 % (ns-si+MMC) auf bis zu 73 % (M4-2+CDDP) bzw. 68 % (M4-1+MMC, Abb. 4.16). Der Anteil nekrotischer Zellen verbleibt auf dem Niveau der Kontrollen. Vergleichbare Ergebnisse wurden mit der BCa-Zelllinie J82 erzielt (Daten nicht gezeigt).

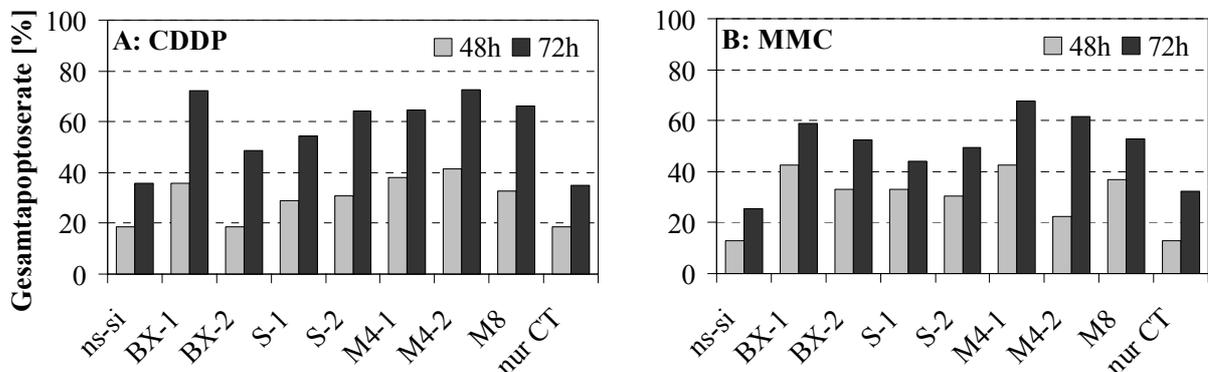


Abb. 4.16: Apoptoserate nach kombinierter siRNA+Chemotherapie-Behandlung in EJ28-Zellen. Die Zellen wurden mit siRNAs einer Gesamtkonzentration von 40 nM vorbehandelt und 20 h nach Transfektion mit A) 2,1 µg/ml Cisplatin (CDDP) für 24 h bzw. mit B) 0,9 µg/ml Mitomycin C (MMC) für 2 h inkubiert. Abkürzungen: CT – Chemotherapie

4.2.6 Effekte der simultanen Inhibition von *BCL-XL* und *Survivin*

Die Inhibition von *Survivin* in den untersuchten BCa-Zelllinien stellt die effektivste Therapieoption der analysierten siRNA-Einzelbehandlungen dar (vgl. Kapitel 4.2.3 und 4.2.4). Gleichzeitig verstärkt speziell die Hemmung von *BCL-XL* die antiproliferativen Effekte einer nachgeschalteten Chemotherapie (vgl. Kapitel 4.2.5). Aus diesen Gründen wurden zusätzliche Untersuchungen zur Wirkung einer kombinierten Inhibition von *BCL-XL* und *Survivin* im Vergleich zu den bereits etablierten siRNA-Einzel- und -Kombinationsbehandlungen durchgeführt. Da in den M4-Kombinationen bereits die siRNAs BX-1 und S-1 (in M4-1) sowie BX-2 und S-2 (in M4-2) zusammen enthalten sind, wurden für die folgenden Analysen die Kombinationen BX-2 + S-1 (M2-A) und BX-1 + S-2 (M2-B) – je 20 nM pro siRNA – gewählt. Insbesondere erfolgten nach Bestimmungen der relativen Target-mRNA- und -Proteinniveaus Charakterisierungen zum Wachstums- und Apoptoseverhalten von BCa-Zellen, die eine alleinige siRNA-Behandlung sowie eine kombinierte siRNA+CT-Behandlung erhalten haben.

Quantitative PCR-Analysen zeigen, dass durch die siRNA-Kombinationsbehandlungen M2-A und M2-B die *BCL-XL*- bzw. *Survivin*-mRNA-Niveaus um maximal 64 % bzw. 81 % reduziert werden können (Abb. 4.17 A). Im Vergleich dazu erzielten die entsprechenden targetspezifischen Einzelbehandlungen mit BX-1/BX-2 bzw. S-1/S-2 nur geringfügig größere maximale Änderungen der relativen Targettranskriptzahlen um 72 % bzw. 85 % (vgl. Abb.

4.5). *Western Blot*-Analysen (Abb. 4.17 B) belegen eine durch den Einsatz der Konstrukt-kombinationen M2-A und M2-B verringerte BCL-XL- und Survivin-Proteinmenge in EJ28-BCa-Zellen.

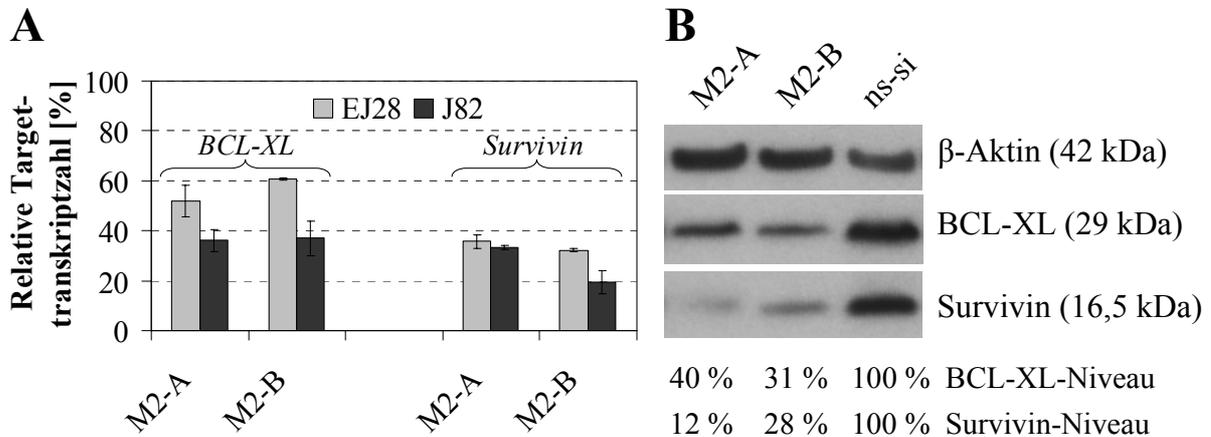


Abb. 4.17: Relative *BCL-XL*- und *Survivin*-mRNA- und -Proteinniveaus in EJ28- und J82-Zellen. Relative Transkriptzahlen (A) und repräsentative Ergebnisse von *Western Blot*-Analysen der Zelllinie EJ28 (B) 48 h nach Transfektion mit siRNAs einer Gesamtkonzentration von 40 nM. Die Transkriptzahlen wurden auf *TBP* normiert und sind relativ zur ns-si-Kontrolle (100 %) zusammen mit den aus Doppelbestimmungen berechneten mittleren Abweichungen dargestellt. Als Referenzprotein bei den *Western Blot*-Analysen diente β-Aktin.

Bezüglich der Zellzahl (Daten nicht grafisch dargestellt) ist durch die simultane Inhibition von *BCL-XL* und *Survivin* eine Reduktion auf das Niveau der *Survivin*-Einzelausschaltungen sowie der kombinierten Ausschaltung aller vier Gene zu verzeichnen. Dabei wird für EJ28 eine Zellzahlminderung um $(46 \pm 5) \%$ (M2-A) bzw. $(48 \pm 11) \%$ (M2-B) und für J82 um $(38 \pm 8) \%$ bzw. $(54 \pm 3) \%$ beobachtet (vgl. Abb. 4.9). Bezüglich der Viabilität von EJ28-Zellen kommt es infolge der *BCL-XL*+*Survivin*-Hemmung zu einer Abnahme um bis zu 48 % (M2-B) (Abb. 4.19 C), die somit stärker ist als für die getesteten siRNA-Einzel- und -Kombinationsbehandlungen (vgl. Abb. 4.8: max. 40 % Viabilitätsreduktion durch M-8).

Mit einer Verringerung der EJ28-Koloniebildungsfähigkeit um $(38 \pm 9) \%$ (M2-A) und $(65 \pm 6) \%$ (M2-B) resultiert die Langzeitproliferationsänderung in den M2-Behandlungen zwischen den Effekten der *Survivin*-Einzelhemmung und denen der kombinierten Ausschaltung aller vier Zielgene (vgl. Abb. 4.10). Entsprechend Abb. 4.18 A liegt die Apoptoseinduktion in den *BCL-XL*+*Survivin*-Kombinationsbehandlungen mit 28-31 % in EJ28 etwas über und mit 14-16 % in J82 auf dem Niveau der M4- und M8-Kombinationen (vgl. Abb. 4.11). Der Anteil polyploider Zellen in den M2-Behandlungen liegt mit 5-8 % unter dem Level der *Survivin*-Einzelinhibition, aber über dem der kombinierten Ausschaltung aller vier Apoptoseinhibitoren (vgl. Abb. 4.18 B mit Abb. 4.12).

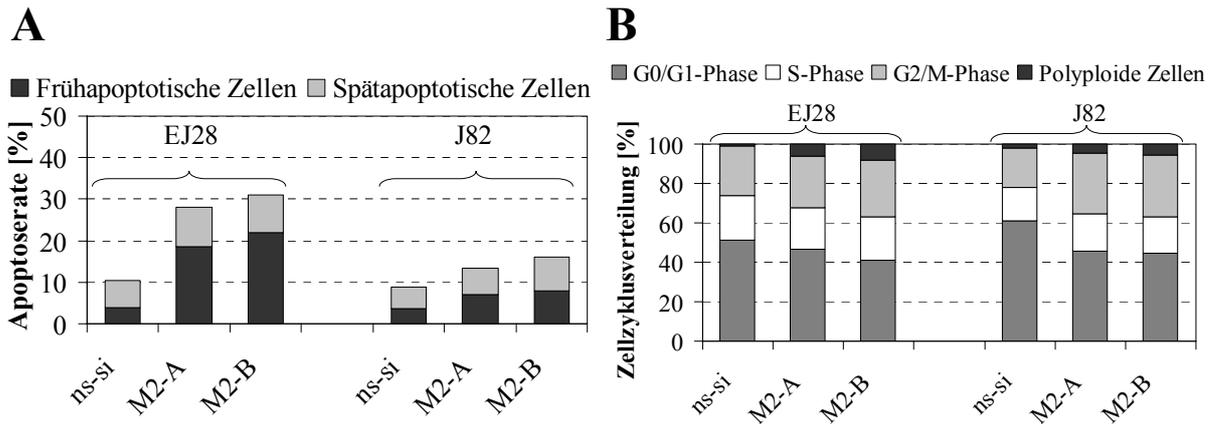


Abb. 4.18: Apoptoseraten und Zellzyklusverteilungen nach kombinierter *BCL-XL*- und *Survivin*-Inhibition in EJ28- und J82-Zellen. Dargestellt sind die Apoptoseraten einer repräsentativen Messreihe unterteilt in frühe (Annexin V-FITC+, PI-) und späte (Annexin V-FITC+, PI+) Apoptosephase (A) sowie die Zellzyklusverteilungen 48 h nach Transfektion mit siRNAs einer Gesamtkonzentration von 40 nM (B).

Die stärkste chemosensitivierende Wirkung auf EJ28-Zellen wird durch gleichzeitige Ausschaltung von *BCL-XL* und *Survivin* erzielt. Entsprechend Abb. 4.19 A nimmt für EJ28-Zellen die Gesamtapoptoserate 72 h nach Transfektion von 36 % bzw. 25 % in den ns-si+CT-Kontrollen bis auf 94 % bzw. 84 % in den M2-B+CT-Behandlungen zu. Infolge dieser deutlichen Apoptoseinduktion werden auch Zellzahl und Viabilität stärker reduziert als in den zuvor untersuchten siRNA-Einzel- und -Kombinationsbehandlungen. Während durch die simultane Inhibition von *BCL-XL* und *Survivin* in Kombination mit CT die Zellzahl um bis zu 86 % (M2-B+CDDP) gesenkt wird (Abb. 4.19 B), lag die maximale Reduktion zuvor bei 75 % (M8+CDDP) (vgl. Abb. 4.15). Die Viabilitätsabnahme verstärkte sich von 89 % (M8+CDDP, Abb. 4.13) auf bis zu 94 % (M2-B+CDDP, Abb. 4.19 C).

4.2.7 Analyse transkriptomweiter Genexpressionsänderungen in EJ28-Zellen

Transkriptomweite Genexpressionsänderungen infolge der einzelnen und kombinierten Hemmung der Apoptoseinhibitoren *BCL2*, *BCL-XL*, *XIAP* und *Survivin* wurden unter Nutzung der *Microarray*-Technologie in zwei unabhängigen Experimenten 48 h nach Transfektion in EJ28-Zellen untersucht (vgl. Kapitel 3.4.2). Um spezifische Einflüsse zu erkennen und damit von Effekten abzutrennen, die von der Transfektion an sich herrühren, erfolgten zunächst paarweise Vergleiche der Genexpressionsdaten nach Behandlung mit targetspezifischen siRNAs und der ns-si-Kontrolle (B2-1 vs. ns-si, etc.). Demzufolge verändern die Einzelbehandlungen mit den zielgenspezifischen siRNAs die Expression von 52 - 645 der 28 869 auf dem *Array* enthaltenen humanen Transkripte um einen Faktor $\geq 1,7$ (Abb. 4.20). Jedoch ist die

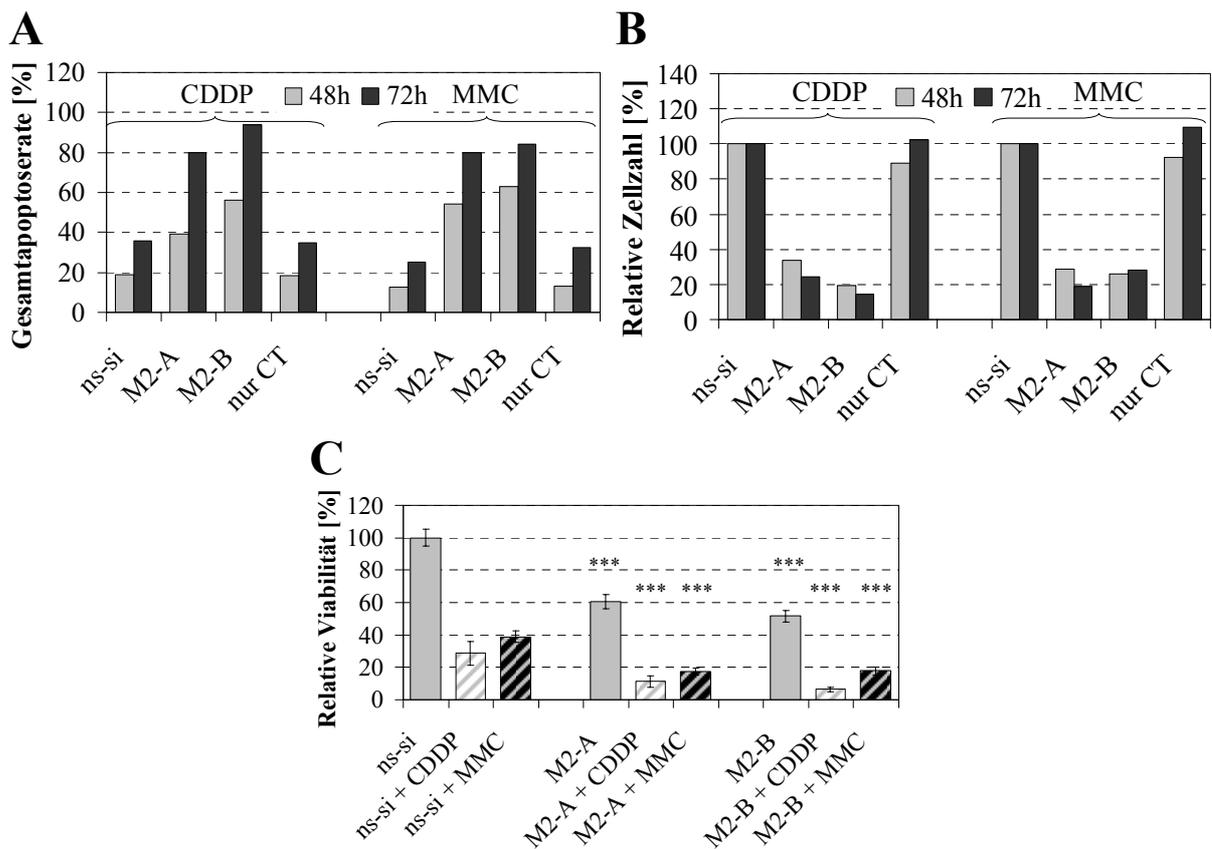


Abb. 4.19: Zelluläre Effekte der simultanen Inhibition von *BCL-XL* und *Survivin* in Kombination mit Chemotherapie auf EJ28-Zellen. Die Zellen wurden mit siRNAs einer Gesamtkonzentration von 40 nM vorbehandelt und 20 h nach Transfektion mit 2,1 µg/ml Cisplatin (CDDP) für 24 h bzw. 0,9 µg/ml Mitomycin C (MMC) für 2 h inkubiert. Dargestellt sind Gesamtapoptoserate (A), Zellzahl relativ zur ns-si+CT-Kontrolle (B), und Zellviabilität relativ zur ns-si-Kontrolle (C, Mittelwerte von Vierfachbestimmungen zusammen mit 95 %-Konfidenzintervallen; signifikante Unterschiede der siRNA+CT-Behandlung gegenüber der Kontrolle ns-si+CT wurden mit Hilfe des Student'schen t-Tests bestimmt [$* p < 0,05$, $** p < 0,01$, $*** p < 0,001$]). Abkürzungen: CT – Chemotherapie

Anzahl der Transkripte, die von beiden gegen dasselbe Target gerichteten siRNAs reguliert werden (9 - 143) sowie die Zahl derer, die in beiden unabhängigen Experimenten durch ein siRNA-Konstrukt beeinflusst werden (3 - 41), deutlich geringer. In beiden Experimenten und von beiden gegen dasselbe Target gerichteten siRNAs werden je nach Zielgen ein bis sechs Transkripte moduliert, deren Funktion sowie n-fache Expressionsänderung infolge der siRNA-Transfektion in Tab. 4.2 angegeben sind.

Analog zu der mittels qPCR detektierten deutlichen Reduktion der mRNA-Niveaus von *BCL-XL* und *Survivin* infolge der Behandlung mit den jeweiligen targetspezifischen siRNA-Konstrukten (vgl. Abb. 4.5) zeigt sich auch in den *Microarray*-Analysen eine starke Abnahme dieser Transkriptlevel (Tab. 4.2). Wie bereits für die Einzelbehandlungen erkennbar (Tab. 4.2), sind in den drei Kombinationsbehandlungen M4-1, M4-2 und M8 in beiden Experimenten die Gene *HIST1H2BK* und *STC1* hochreguliert (Abb. 4.21).

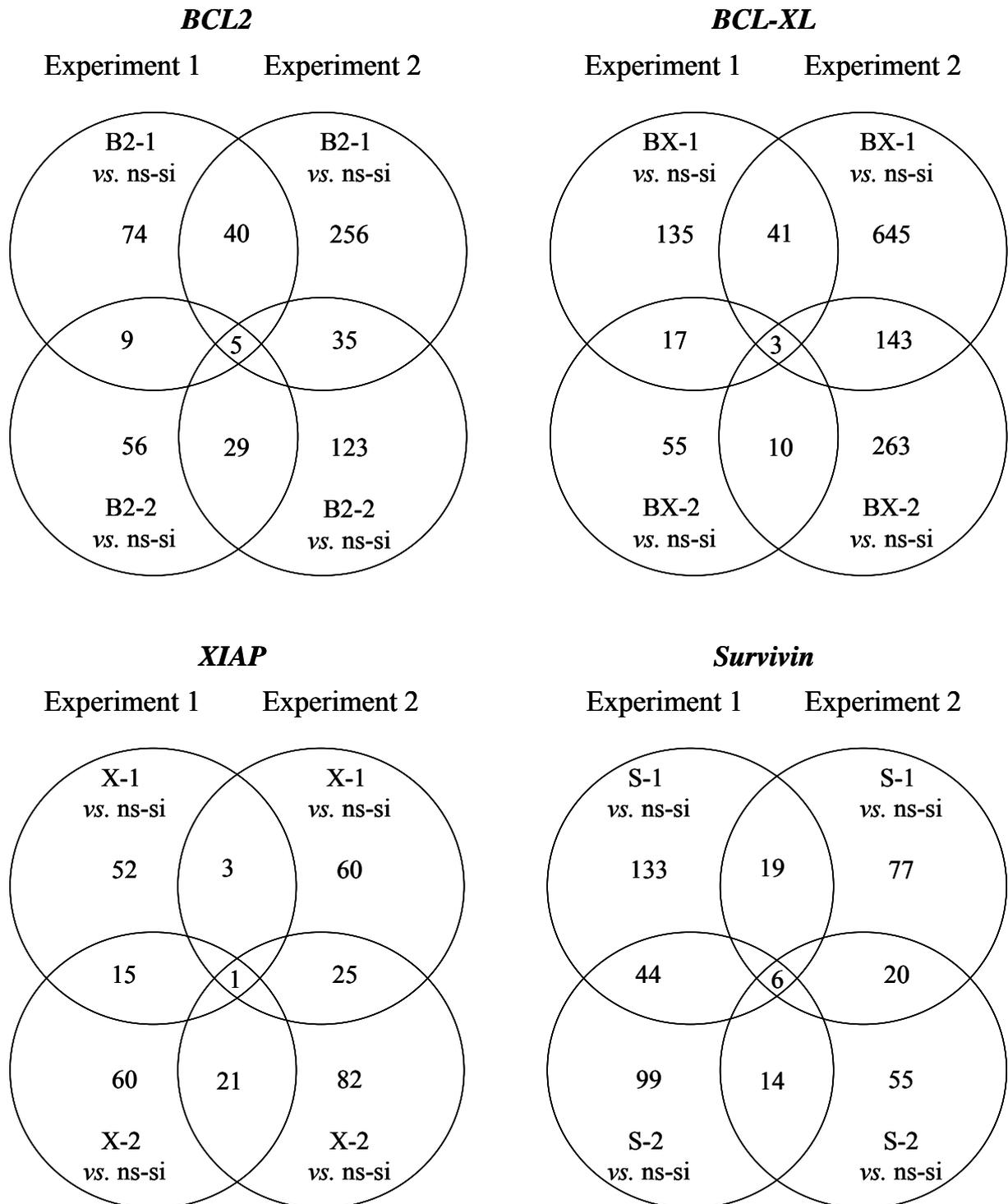


Abb. 4.20: Venn-Diagramme zur Darstellung der Anzahl differenziell exprimierter Gene nach siRNA-Einzelbehandlung in EJ28-Zellen. Ergebnis der *Microarray*-Analysen 48 h nach Transfektion mit siRNAs einer Konzentration von 40 nM.

Tab. 4.2: Expressionsänderung der Gene, die in EJ28-Zellen von zwei gegen dasselbe Target gerichteten siRNAs in zwei unabhängigen Experimenten im Vergleich zur ns-si-Kontrolle um einen Faktor $\geq 1,7$ verändert wurden. Ergebnis der *Microarray*-Analysen 48 h nach Transfektion mit siRNAs einer Konzentration von 40 nM. Positive Werte symbolisieren eine Hoch-, negative eine Herunterregulation des Gens.

Gensymbol	n-fache Expressionsänderung				Funktion
	E1	E2	E1	E2	
BCL2	B2-1	B2-2	B2-1	B2-1	
<i>HIST1H2BK</i>	+ 2,4	+ 2,5	+ 2,2	+ 2,3	Bestandteil der Nukleosomen ¹
<i>MLLT11</i>	+ 1,8	+2,2	+ 2,1	+ 3,0	Unbekannt
<i>PAPSS2</i>	- 1,7	- 2,1	- 2,3	- 2,6	3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat-(PAPS)-Synthese
<i>SEMA3A</i>	+ 1,8	+ 2,0	+ 2,1	+ 2,3	Regulation des Axonwachstum, Angiogeneseinhibitor
<i>STC1</i>	+ 2,5	+ 2,8	+ 1,7	+ 2,4	Calcium- und Phosphat-Homöostase
BCL-XL	BX-1	BX-2	BX-1	BX-1	
<i>BCL-XL</i>	- 2,7	- 3,8	- 2,4	- 3,5	Apoptoseregulation
<i>HIST1H2BK</i>	+ 3,4	+ 3,6	+ 3,0	+ 2,6	Bestandteil der Nukleosomen ¹
<i>MLLT11</i>	+ 1,7	+ 1,8	+ 1,7	+ 1,8	Unbekannt
XIAP	X-1	X-2	X-1	X-1	
<i>HIST1H2BK</i>	+ 1,8	+ 1,8	+ 3,8	+ 4,6	Bestandteil der Nukleosomen ¹
Survivin	S-1	S-2	S-1	S-1	
<i>HIST1H2BK</i>	+ 2,5	+ 2,4	+ 2,6	+ 2,6	Bestandteil der Nukleosomen ¹
<i>IL6</i>	+ 2,1	+ 2,5	+ 1,9	+ 2,3	Regulation der Immunreaktion
<i>SEMA3A</i>	+ 1,8	+ 2,0	+ 1,7	+ 1,7	Regulation des Axonwachstum, Angiogeneseinhibitor
<i>STC1</i>	+ 2,1	+ 1,8	+ 2,0	+ 2,1	Calcium- und Phosphat-Homöostase
<i>Survivin</i>	- 2,2	- 2,4	- 2,0	- 3,4	Apoptose- und Mitoseregulation
<i>TFB1M</i>	+ 1,7	+ 1,7	+ 2,0	+ 1,8	Dimethyltransferase, mitochondrialer Transkriptionsfaktor

¹ Regulation von Transkription, DNA-Reparatur, etc.; Abkürzungen: E1, E2 – Experiment 1 bzw. 2

Insbesondere das Konstrukt B2-1 induziert *IL6*, *IL8* sowie *TLR6*, drei Gene, die mit der Antwort einer Zelle auf Stress assoziiert sind (Tab. 4.3). Auch in den Kombinationsbehandlungen M4-1 und M8, in welchen die siRNA B2-1 enthalten ist, konnte eine Aktivierung dieser Gene festgestellt werden.

Die *Microarray*-Analysen zeigen, dass die Inhibition eines einzelnen Zielgens (z.B. *Survivin*) 48 h nach Transfektion keine Expressionsänderungen der anderen drei Apoptoseinhibitoren (im Beispiel: *BCL2*, *BCL-XL*, *XIAP*) bewirkt. Weiterhin konnte sowohl in den siRNA-Einzel- als auch in den Kombinationsbehandlungen keine transkriptionelle Beeinflussung weiterer Mitglieder der *IAP*- (*NAIP*, *cIAP1*, *cIAP2*, *BRUCE*, *LIVIN*, *ILP2*) bzw. *BCL2*- (u.a. *BCL2L2*, *BCL2A1*, *BAX*, *BAD*, *BID*, *BOK*, *MCL1*, *BIK*) -Familien festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

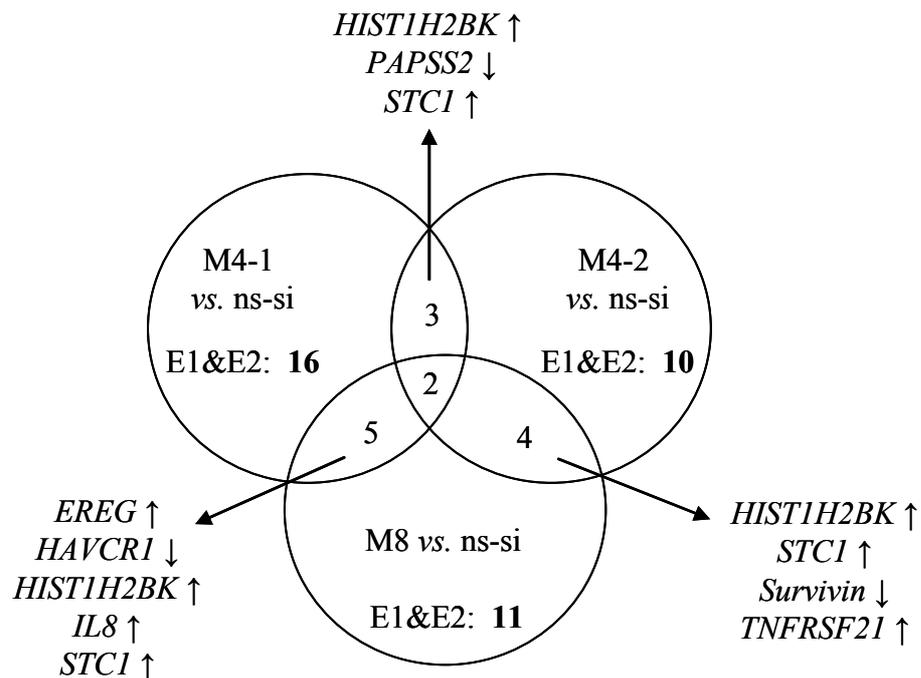


Abb. 4.21: Venn-Diagramm zur Darstellung der Anzahl differenziell exprimierter Gene nach siRNA-Kombinationsbehandlung in EJ28-Zellen. Ergebnis der *Microarray*-Analysen 48 h nach Transfektion mit siRNAs einer Gesamtkonzentration von 40 nM. Abkürzungen: E1 – Experiment 1; E2 – Experiment 2

Tab. 4.3: Expression der stressassoziierten Gene *IL6*, *IL8* und *TLR6* in EJ28-Zellen 48 h nach Transfektion mit siRNAs einer Gesamtkonzentration von 40 nM. Angegeben sind die n-fachen Expressionsänderungen infolge der siRNA-Einzel- oder -Kombinationsbehandlungen im Vergleich zur ns-si-Kontrolle. Veränderungen um einen Faktor $\geq 1,7$ sind fettgedruckt. Positive Werte symbolisieren eine Hoch-, negative eine Herunterregulation des Gens.

Behandlung	n-fache Expressionsänderung					
	<i>IL6</i>		<i>IL8</i>		<i>TLR6</i>	
	E1	E2	E1	E2	E1	E2
B2-1	+ 2,2	+ 2,7	+ 2,2	+ 2,2	+ 1,9	+ 1,7
B2-2	- 1,4	- 1,2	+ 1,2	+ 1,1	+ 1,5	+ 1,4
BX-1	+ 1,4	+ 1,2	+ 1,6	+ 1,3	+ 1,4	- 1,1
BX-2	- 1,3	1,0	+ 1,2	- 1,1	+ 1,3	- 1,3
X-1	1,0	- 1,2	+ 1,1	1,0	+ 1,3	- 1,1
X-2	+ 1,2	+ 1,3	+ 1,1	1,0	+ 1,3	- 1,1
S-1	+ 2,1	+ 2,5	+ 1,2	+ 1,4	+ 1,7	1,0
S-2	+ 1,9	+ 2,3	+ 1,2	+ 1,8	+ 1,6	1,0
M4-1	+ 1,6	+ 2,6	+ 1,8	+ 1,9	+ 1,7	+ 1,2
M4-2	+ 1,2	+ 1,2	+ 1,3	+ 1,5	+ 1,5	1,0
M8	+ 1,4	+ 1,7	+ 1,8	+ 2,0	+ 1,4	1,0

Abkürzungen: E1, E2 – Experiment 1 bzw. 2

4.2.8 Zielgenexpression und Effekte der siRNA-Behandlung in Cisplatin-resistenten Harnblasenkarzinomzelllinien

Da die Ausbildung von Chemotherapieresistenzen mit einer erhöhten Expression von apoptoseinhibierenden Genen verbunden sein kann, wurden CDDP-resistente BCa-Zelllinien hinsichtlich der Expression von *BCL2*, *BCL-XL*, *XIAP* und *Survivin* charakterisiert. Die nach langfristiger Kultur in CDDP-haltigem Medium erhaltenen Zelllinien EJ28^{CDDP} und J82^{CDDP} (vgl. Kapitel 3.2.1) wiesen jedoch keine signifikanten Änderungen der mRNA-Niveaus der vier Zielgene verglichen mit den Stammzelllinien auf (Daten nicht gezeigt). Beide Zelllinien waren auch weiterhin einer Therapie mit siRNAs gegen *BCL2*, *BCL-XL*, *XIAP* und *Survivin* zugänglich. So wurde die Viabilität der Zellen durch die siRNA-Behandlung um bis zu 43 % (M2-B) reduziert (Abb. 4.22). Entsprechende Analysen an nicht-CDDP-resistenten EJ28-Zellen ergaben vergleichbare Viabilitätsabnahmen um bis zu 48 % (M2-B, vgl. Abb. 4.19 C).

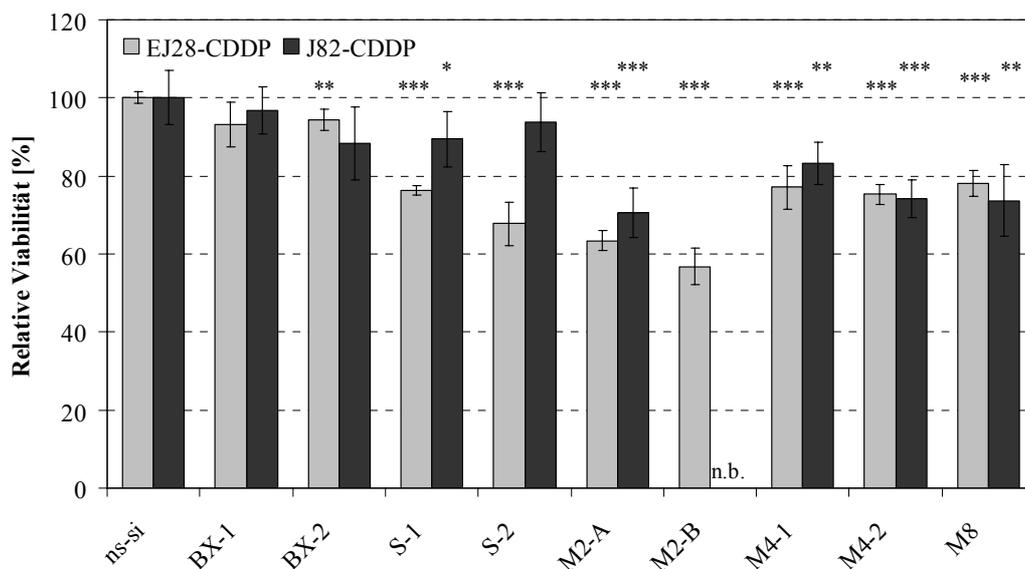


Abb. 4.22: Relative Viabilität von Cisplatin-resistenten EJ28- und J82-Zellen 96 h nach siRNA-Transfektion. Die Zellen wurden mit siRNAs einer Gesamtkonzentration von 40 nM behandelt. Dargestellt sind die Mittelwerte von Vierfachbestimmungen relativ zur ns-si-Kontrolle (100 %) zusammen mit den 95 %-Konfidenzintervallen. Signifikante Unterschiede der targetspezifischen siRNA-Behandlung gegenüber der Kontrolle wurden mit Hilfe des Student'schen t-Tests bestimmt (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Abkürzungen: n.b. – nicht bestimmt

4.3 Effekte der siRNA-Behandlung in nichtmalignen Fibroblasten

Für eine weiterführende Charakterisierung der siRNA-Wirksamkeit im Tiermodell sowie für eine potenzielle klinische Anwendung ist es unabdingbar, die siRNA-vermittelten Effekte auf nichtmaligne Zellen zu untersuchen. Da gesunde Urothelzellen nicht als Zelllinie verfügbar waren, wurde hierfür auf eine Primärkultur humaner Vorhaut-Fibroblasten zurückgegriffen.

Einhergehend mit der Expression der Zielgene *BCL2*, *BCL-XL*, *XIAP* und *Survivin* in den verwendeten Fibroblasten, welche außer für *XIAP* deutlich geringer war als in den BCa-Zelllinien (vgl. Abb. 4.1), bewirkt die Transfektion mit den targetspezifischen siRNAs eine Reduktion der entsprechenden mRNA-Niveaus (Abb. 4.23). Der Grad der relativen Expressionshemmung ist dabei mit dem in den untersuchten BCa-Zelllinien vergleichbar (vgl. Abb. 4.5).

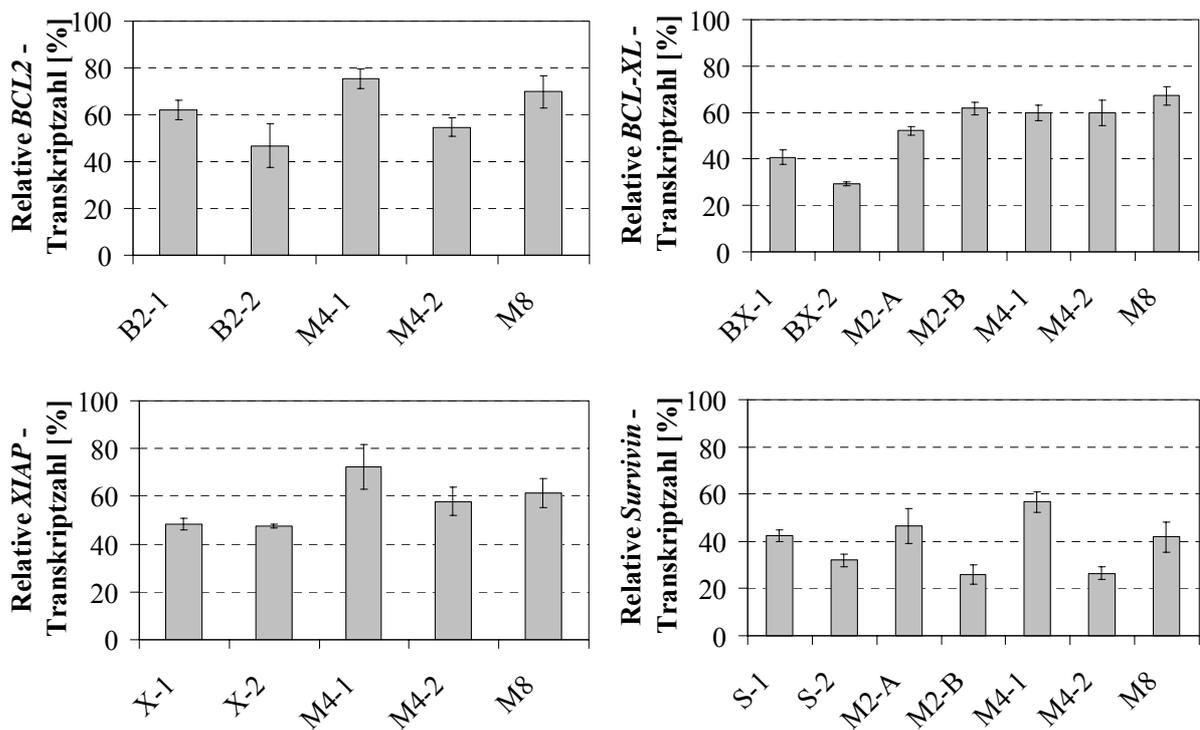


Abb. 4.23: Relative Target-mRNA-Niveaus in nichtmalignen Fibroblasten. Relative Transkriptzahlen der Targets *BCL2*, *BCL-XL*, *XIAP* und *Survivin* 48 h nach Transfektion mit siRNAs einer Gesamtkonzentration von 40 nM. Die Transkriptzahlen wurden auf *TBP* normiert und sind relativ zur ns-si-Kontrolle (100 %) zusammen mit den aus Doppelbestimmungen berechneten mittleren Abweichungen dargestellt.

Wie aus den Abbildungen 4.24 und 4.25 abgeleitet werden kann, hat die siRNA-vermittelte Reduktion von *BCL2*, *BCL-XL* bzw. *XIAP* keinen Einfluss auf das Wachstum der Fibroblasten. Hingegen bewirkt die Inhibition von *Survivin* in den Einzel- und Kombinationsbehandlungen ähnliche antiproliferative Effekte wie in den untersuchten BCa-Zelllinien. So resultiert in den Fibroblasten eine um bis zu 30 % verringerte Viabilität, eine um durchschnittlich

lich 30 % reduzierte Zellzahl und eine Apoptoseinduktion um das 1,2 bis 1,8fache (Abb. 4.24, 4.25 A, B). Der Anteil an Zellen in der G2/M-Phase steigt um bis zu 39 % (von 15 % in der Kontrolle auf 21 % in S-2-behandelten Zellen), der Anteil polyploider Fibroblastenzellen von 1 % in der ns-si-Kontrolle auf maximal 3 % nach Behandlung mit S-2 (Abb. 4.25 C).

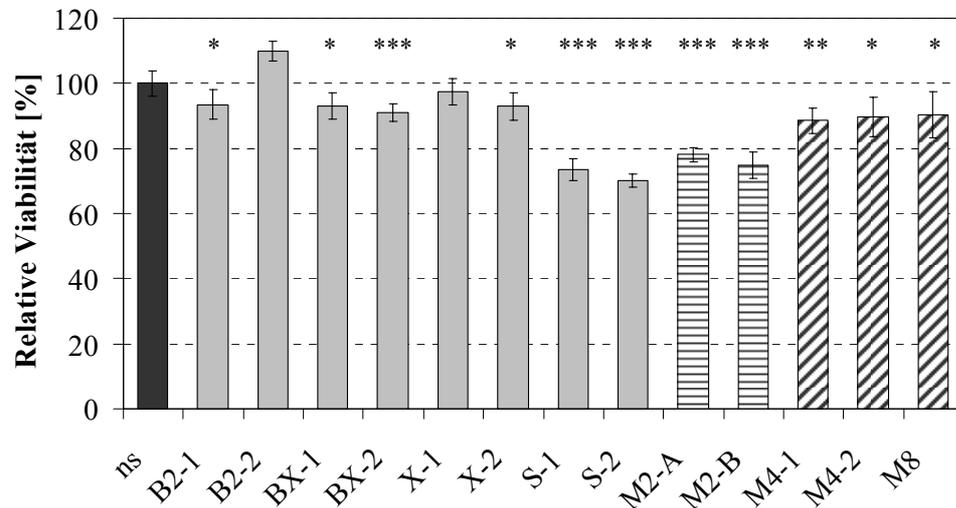


Abb. 4.24: Effekte der siRNA-Einzel- und -Kombinationsbehandlungen auf die Viabilität von nicht-malignen Fibroblasten. Relative Viabilität 96 h nach Transfektion mit siRNAs einer Gesamtkonzentration von 40 nM. Dargestellt sind Mittelwerte von Vierfachbestimmungen relativ zur ns-si-Kontrolle zusammen mit den 95 %-Konfidenzintervallen. Signifikante Unterschiede der targetspezifischen siRNA-Behandlung gegenüber der Kontrolle wurden mit Hilfe des Student'schen t-Tests bestimmt (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

4.4 Effekte einer langfristigen Inhibition von *BCL2*, *BCL-XL* und *XIAP* in EJ28-Zellen

Eine geeignete Möglichkeit, die Effekte einer langfristigen Zielgeninhibition zu analysieren, ist die Nutzung von Vektoren, welche eine dauerhafte U1-Promotor-vermittelte Transkription von targetspezifischen shRNAs ermöglichen. Diese werden in der Zelle von DICER1 zu siRNAs prozessiert und wirken anschließend über den Mechanismus der RNAi.

Zunächst wurde aus den jeweils vier pro *SureSilencing shRNA Plasmids*-Kit enthaltenen genspezifischen shRNAs über eine transiente Transfektion die hinsichtlich der Target-Expressionsreduzierung effizienteste shRNA-Sequenz ausgewählt. Die daraus resultierenden drei shRNAs (je eine gegen *BCL2*, *BCL-XL* und *XIAP*) sowie eine Kontroll-shRNA ohne Homologie zu humanen Genen wurden anschließend stabil in EJ28-Zellen transfiziert (vgl. Kapitel 3.2.3). Anschließend erfolgte die Charakterisierung der mRNA-Niveaus der Targets in den stabil transfizierten Zellen direkt nach der Selektion der Zellklone sowie nach Kultivierung über neun Passagen.

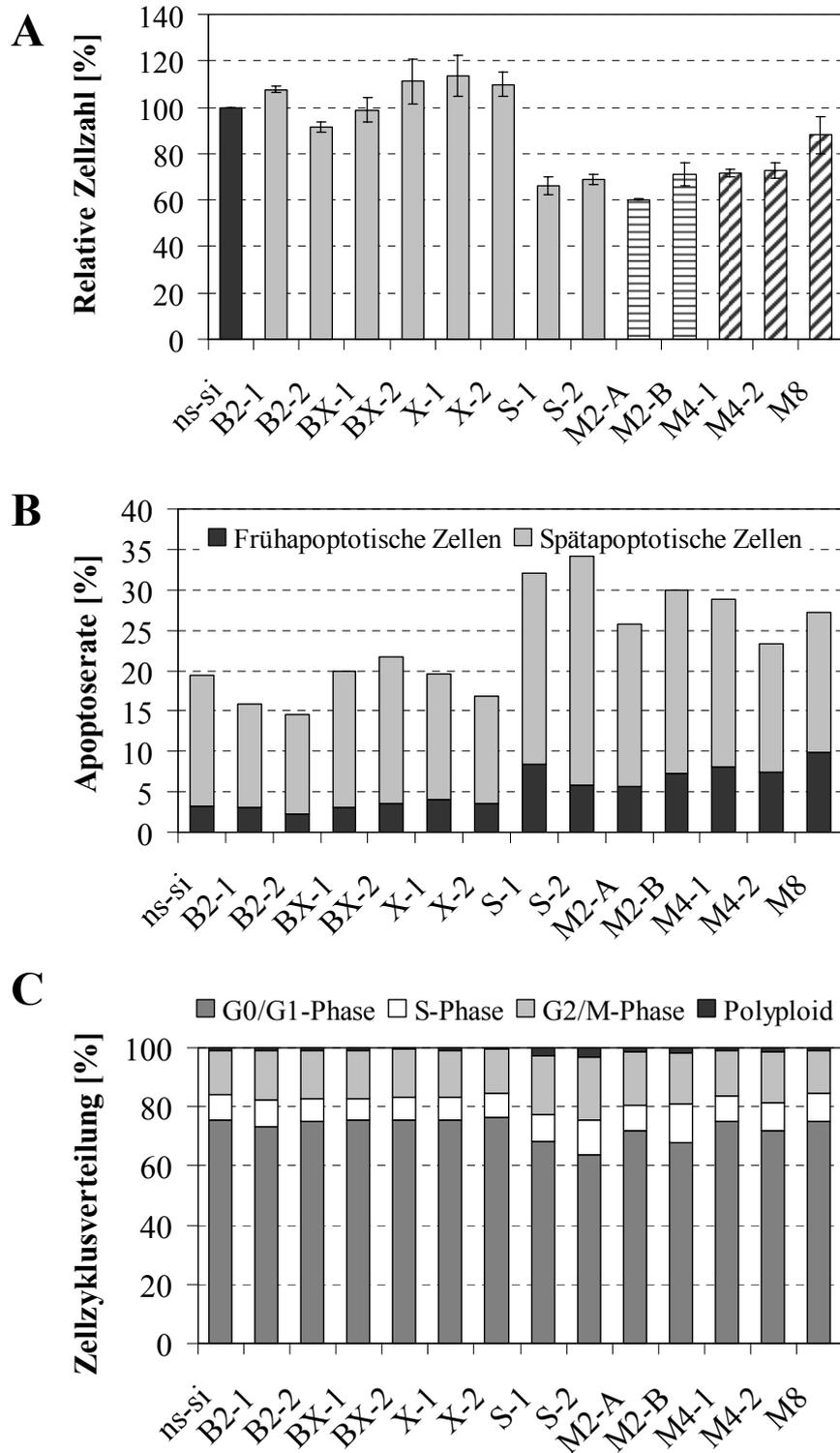


Abb. 4.25: Zelluläre Effekte der einzelnen und kombinierten siRNA-vermittelten Inhibition von *BCL2*, *BCL-XL*, *XIAP* und *Survivin* in nichtmalignen Fibroblastenzellen. Die Analysen erfolgten 48 h nach Transfektion mit siRNAs einer Gesamtkonzentration von 40 nM. (A) Zellzahl relativ zur ns-si-Kontrolle (100 %) mit mittlerer Abweichung (Doppelbestimmung), (B) Apoptoserate, unterteilt in frühe (Annexin V-FITC+, PI-) und späte (Annexin V-FITC+, PI+) Apoptosephase, (C) Zellzyklusverteilung.

Wie Tab. 4.4 zeigt, wurden die Expressionsniveaus der drei Zielgene, bezogen auf die EJ28-K-Kontrollzelllinie (stabil mit Kontroll-shRNA-Vektor transfiziert), langfristig um 43-52 % reduziert. EJ28-K-Zellen wiesen dabei vergleichbare Targettranskriptniveaus wie die Ausgangszelllinie EJ28 auf. Die dauerhafte Inhibition eines Zielgens (z.B. *BCL2*) beeinflusste die Expression von *Survivin* und den anderen beiden Targets (im Beispiel *BCL-XL* und *XIAP*) nicht (Daten nicht gezeigt).

Tab. 4.4 Relative Targetexpression nach shRNA-vermittelter Inhibition von *BCL2*, *BCL-XL* und *XIAP* in EJ28-Zellen. Die Targettranskriptzahlen wurden direkt nach der Selektion der stabil transfizierten Klone sowie nach Kultivierung über 9 Passagen als Doppelbestimmung mittels qPCR gemessen. Die Werte sind auf das Referenzgen *TBP* normiert und relativ zur Kontrollzelllinie EJ28-K (100 %) dargestellt.

Relatives <i>BCL2</i> - Transkriptniveau in EJ28-B2		Relatives <i>BCL-XL</i> - Transkriptniveau in EJ28-BX		Relatives <i>XIAP</i> - Transkriptniveau in EJ28-X	
Direkt	Nach 9 Passagen	Direkt	Nach 9 Passagen	Direkt	Nach 9 Passagen
48 %	48 %	62 %	57 %	39 %	51 %

Das Proliferationsverhalten der generierten Zelllinien variiert stark. Charakterisierungen der Wachstumsdichte zu verschiedenen Zeitpunkten nach Aussaat einer einheitlichen Zellzahl ergaben ein vergleichbares Verhalten für EJ28-BX und EJ28-K, welches jedoch stärker als das der Ausgangszelllinie EJ28 war (Abb. 4.26). Der EJ28-B2-Zellklon proliferierte in ähnlichem Maße wie die ursprünglichen EJ28-Zellen, während die Proliferationsfähigkeit des EJ28-X-Zellklons deutlich erhöht war. Durchflusszytometrische Messungen (vgl. Kapitel 3.3.4 und 3.3.5) ergaben, dass die Zellzyklusverteilung in allen Proben vergleichbar und die Apoptoserate nur in den EJ28-BX-Zellen verändert ist. In diesem Zellklon wurde eine um das 3,3fache verstärkte Apoptoseinduktion, d.h. eine Erhöhung der Gesamtapoptoserate von 13 % in EJ28-K auf 43 % in EJ28-BX (Abb. 4.27) beobachtet. Zusätzlich trat eine nekrotische EJ28-BX-Zellfraktion auf (21 % der Zellen).

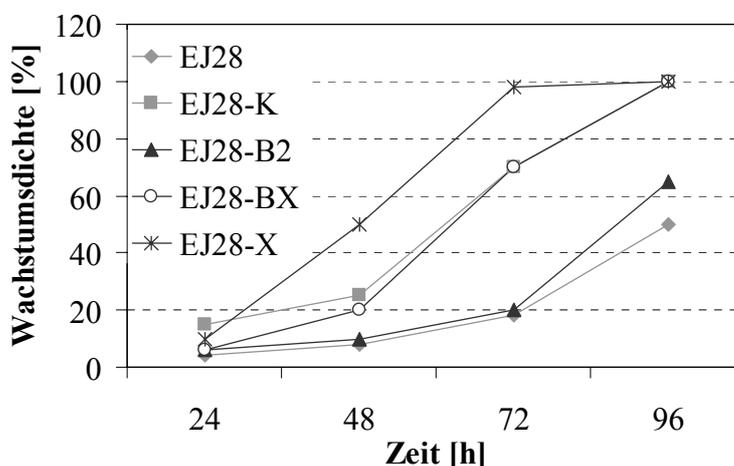


Abb. 4.26: Wachstumsverhalten von EJ28-Zellen und EJ28-Zellklonen nach stabiler Integration von shRNAs gegen *BCL2* (EJ28-B2), *BCL-XL* (EJ28-BX) und *XIAP* (EJ28-X) bzw. eines Kontroll-shRNA-Vektors (EJ28-K). Schätzungen der Wachstumsdichte zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Aussaat von jeweils 1700 Zellen/Well in 96-Well-Mikrotiterplatten.

Eine Behandlung der Zellklone mit Chemotherapie zeigte, dass, analog zur Inhibition mit den siRNAs, die Ausschaltung von *BCL2* und *XIAP* keinen Einfluss auf die Wirksamkeit von CDDP und MMC hat (Daten nicht gezeigt). Hingegen führte die stabile Inhibition von *BCL-XL* zu einer deutlichen Chemosensitivierung. So waren 72 h nach CT-Behandlung 90 % (EJ28-BX + CDDP) bzw. 93 % (EJ28-BX + MMC) der Zellen apoptotisch, verglichen mit 71 % bzw. 40 % in der EJ28-K-Kontrolle (Abb. 4.27).

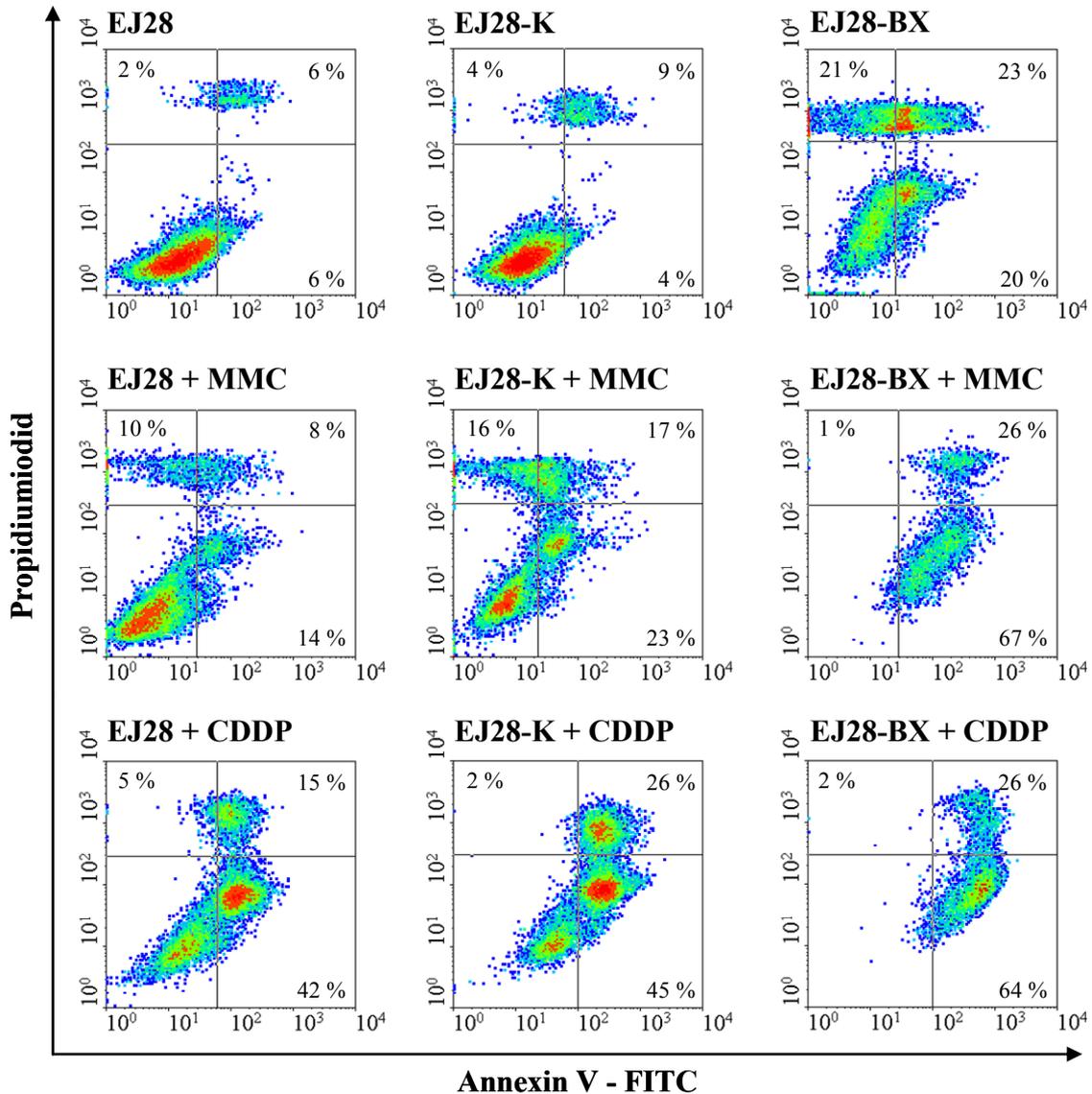


Abb. 4.27: Apoptoseraten von EJ28-Zellen und -Zellklonen ohne sowie mit Chemotherapiebehandlung. EJ28-, EJ28-K- (stabil mit Kontroll-shRNA-Vektor transfiziert) und EJ28-BX-Zellen (stabil mit einem gegen *BCL-XL* gerichteten shRNA-Vektor transfiziert) wurden mit 2,1 µg/ml Cisplatin (CDDP, für 24 h) bzw. 0,9 µg/ml Mitomycin C (MMC, für 2 h) behandelt und 72 h nach Behandlungsbeginn geerntet. Nach Zugabe von Annexin V-FITC und Propidiumiodid (PI) erfolgte die FACS-Messung von je 2×10^4 Zellen. Die Annexin V-FITC/PI-Plots zeigen die Verteilung der Fluoreszenzsignale und ermöglichen die Unterscheidung von frühapoptotischen (unterer rechter Quadrant: Annexin V-FITC+, PI-), spätapoptotischen (oberer rechter Quadrant: Annexin V-FITC+, PI+), nekrotischen (oberer linker Quadrant: Annexin V-FITC-, PI+) und viablen Zellen (unterer linker Quadrant: Annexin V-FITC-, PI-).

4.5 Studien im subkutanen EJ28-Xenotransplantatmodell

Um die erfolgreichen Experimente an BCa-Zellkulturen (vgl. Kapitel 4.2) mit *in vivo*-Analysen zu überprüfen, wurden Untersuchungen im subkutanen EJ28-Xenotransplantatmodell durchgeführt. Vor der eigentlichen Analyse der Effekte einer kombinierten siRNA+Chemotherapie-Behandlung im Tiermodell (Kapitel 4.5.3) erfolgte zunächst die Optimierung der jeweiligen Einzelbehandlungen. Literaturangaben [Urban-Klein *et al.*, 2005] und eigene Vorarbeiten zur peritumoralen Applikation unkomplexierter siRNAs im Rahmen dieser Arbeit (Daten nicht gezeigt) belegen, dass die Aufnahme „nackter“ siRNA-Konstrukte in subkutane Tumor-Xenotransplantate gering ist. Daher wurde die Eignung von Atelocollagen und *in vivo*-jetPEI als siRNA-Carrier überprüft (Kapitel 4.5.1). Weiterhin erfolgten Untersuchungen zur Wirksamkeit zweier intravenös applizierter Chemotherapeutika am EJ28-Xenotransplantatmodell und die Optimierung der MMC-Behandlung hinsichtlich der zu injizierenden Konzentration (Kapitel 4.5.2).

4.5.1 Auswahl eines geeigneten siRNA-Carriers

Die Applikation der gegen *Survivin* gerichteten siRNA S-1 zusammen mit dem Carrier *in vivo*-jetPEI bewirkte eine deutliche Reduktion des Tumorendvolumens um 43 % bezogen auf die Puffer-Kontrollgruppe (Abb. 4.28). Ebenso verringerte sich das Tumorendgewicht von (1320 ± 390) mg in der Puffergruppe auf (930 ± 300) mg in der *in vivo*-jetPEI-Gruppe. Im Gegensatz dazu hatte die siRNA+Atelocollagen-Behandlung keinen Einfluss auf das Tumorstadium (Abb. 4.28). Das Allgemeinbefinden der Tiere wurde durch die Behandlungen nicht beeinflusst. Entsprechend dieser Ergebnisse erfolgte die Auswahl von *in vivo*-jetPEI als siRNA-Carrier für die weiteren Studien.

4.5.2 Optimierung der intravenösen Chemotherapiebehandlung

Basierend auf Literaturangaben [Pirollo *et al.*, 2008; Xin *et al.*, 2005] wurde zunächst die Wirkung einer dreimaligen intravenösen Gabe von GEM (60 mg/kg) und MMC (3 mg/kg) auf das Wachstum subkutaner EJ28-Xenotransplantate untersucht (Abb. 4.29 A). Während die gewählte Konzentration an GEM nur eine minimale Wachstumshemmung bewirkte, führte die

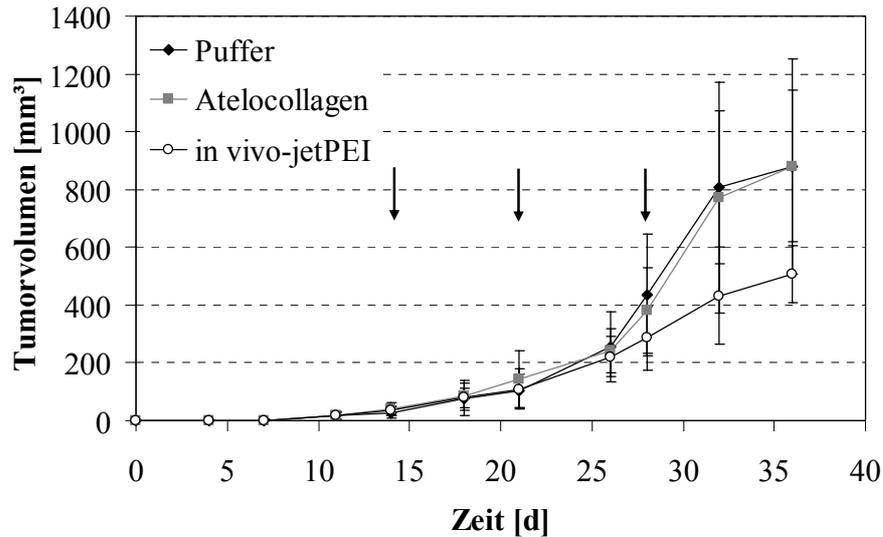


Abb. 4.28: Änderung des Tumorzvolumens nach peritumoraler Applikation der gegen *Survivin* gerichteten siRNA S-1 in Kombination mit Atelocollagen bzw. *in vivo-jetPEI*. An den Tagen 14, 21 und 28 (Pfeile) nach Inokulation von 2×10^6 EJ28-Zellen in NOD/SCID-Mäuse erfolgte die Injektion von je 100 μ l siRNA-(2,75 nmol) oder HEPES/NaCl-Pufferlösung. Dargestellt sind die Mittelwerte der mittels Messschieber bestimmten Tumorzvolumina für die einzelnen Gruppen zusammen mit den 95 %-Konfidenzintervallen.

Behandlung mit 3 mg/kg MMC zu einer Reduktion des Tumorendvolumens um 87 %. Das Allgemeinbefinden der Versuchstiere wurde nicht beeinträchtigt. Zur Auswahl einer MMC-Dosis, welche das Tumorzvolumen in moderaterem Maße beeinflusst und damit den Nachweis einer putativen siRNA-vermittelten Steigerung der CT-Wirkung ermöglicht, wurde eine zweite Studie mit 0,75 bzw. 1,5 mg/kg MMC durchgeführt. Beide CT-Konzentrationen bewirkten eine vergleichbare Reduktion des Tumorendvolumens um ca. 36 % (Abb. 4.29 B). Das Tumorendgewicht wurde von (980 ± 330) mg (PBS-Puffer) auf (800 ± 300) mg (0,75 mg/kg MMC) bzw. (800 ± 260) mg (1,5 mg/kg MMC) reduziert.

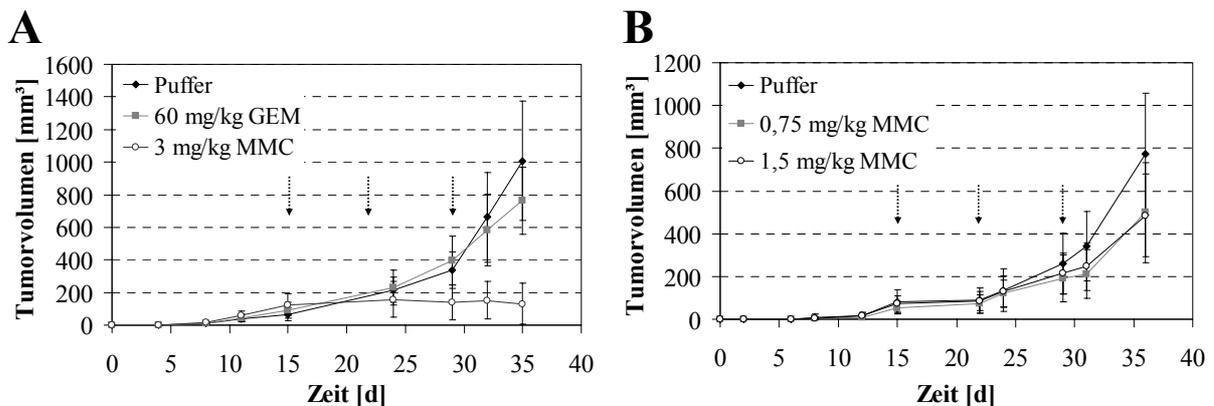


Abb. 4.29: Änderung des Tumorzvolumens nach intravenöser Chemotherapie im subkutanen EJ28-Xenotransplantatmodell. Die tumortragenden NOD/SCID-Mäuse wurden an den Tagen 15, 22 und 29 (Pfeile) nach Inokulation von 5×10^6 (A) bzw. 2×10^6 EJ28-Zellen (B) mit den genannten Konzentrationen Gemcitabin (GEM), Mitomycin C (MMC) bzw. Puffer (phosphatgepufferte Salzlösung) im Kontrollarm behandelt. Dargestellt sind die Mittelwerte der mittels Messschieber bestimmten Tumorzvolumina für die einzelnen Gruppen zusammen mit den 95 %-Konfidenzintervallen.

4.5.3 Effekte einer kombinierten siRNA- und Chemotherapiebehandlung

Um die Effekte einer kombinierten siRNA+Chemotherapie-Behandlung zu analysieren, wurden aufgrund ihrer chemosensitivierenden Wirkung *in vitro* (vgl. Kapitel 4.2.5 und 4.2.6) die siRNAs BX-1, S-2 sowie die Kombinationen M2-B und „BX-1 + S-2 (= M2-B) + B2-2 + X-2“ ausgewählt. Entsprechend Abb. 4.30 führt die kombinierte Applikation von BX-1 und MMC zu einem verlangsamten Tumorwachstum im Vergleich zur Puffer- bzw. ns-si-Kontrollgruppe. Insbesondere bewirkte die Inhibition von *BCL-XL* in Kombination mit dem Chemotherapeutikum am Tag 35 nach Inokulation der EJ28-Zellen in die NOD/SCID-Mäuse eine Reduktion des Tumorendvolumens um 48 % verglichen mit der ns-si+MMC-Kontrolle (Abb. 4.30). In die Auswertung konnten dabei 9 Tiere in der Puffer-Gruppe, 6 Mäuse in der ns-si+MMC-Gruppe und 8 Tiere in der BX-1+MMC-Gruppe einbezogen werden. Infolge erheblicher Belastungen der Versuchstiere, bedingt durch das Auftreten von Nekrosen am Schwanz infolge der Chemotherapiebehandlung, war eine vorzeitige Euthanasie der Hälfte der Tiere unabdingbar und daher nur eine teilweise Auswertung dieses Experimentes möglich. Basierend auf den vorliegenden Ergebnissen der signifikanten Reduktion des Tumolvolumens durch eine gegen *Survivin* gerichtete siRNA (Abb. 4.28) sowie durch eine kombinierte BX-1+MMC-Therapie (Abb. 4.30) wird die simultane Behandlung von BCa-Zellen mit siRNAs gegen die Apoptoseinhibitoren *Survivin* und *BCL-XL* zusammen mit Chemotherapeutika als besonders erfolgversprechend eingeschätzt.

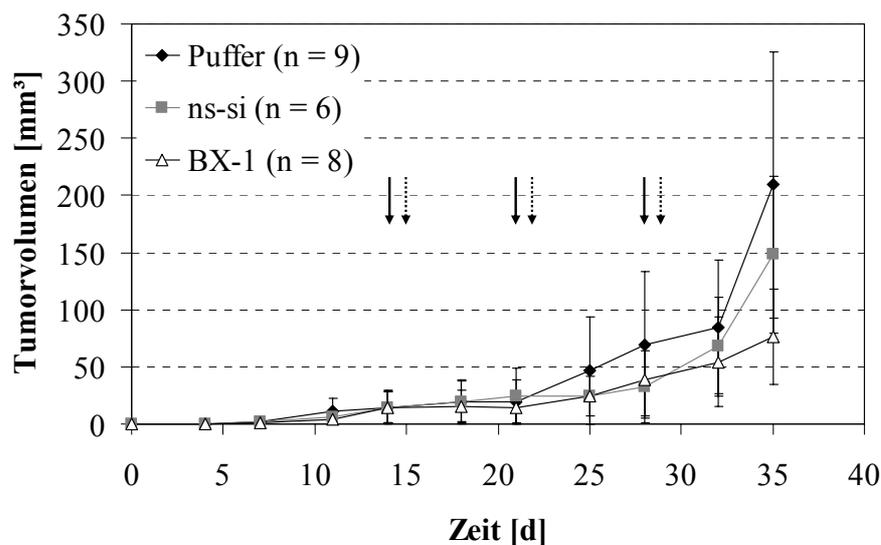


Abb. 4.30: Änderung des Tumolvolumens nach peritumorale Applikation der gegen *BCL-XL* gerichteten siRNA BX-1 in Kombination mit Mitomycin C. An den Tagen 14, 21 und 28 (—▶) nach Inokulation von 2×10^6 EJ28-Zellen in NOD/SCID-Mäuse erfolgte die Injektion von je 100 μ l siRNA- (je 3 nmol, Carrier: *in vivo*-jetPEI) oder HEPES/NaCl-Pufferlösung. Je 2 mg/kg Mitomycin C wurden an den Tagen 15, 22 und 29 (.....▶) intravenös appliziert. Dargestellt sind die Mittelwerte der mittels Messschieber bestimmten Tumolvolumina für die einzelnen Gruppen zusammen mit den 95 %-Konfidenzintervallen. Abkürzung: n – Anzahl der Tiere

5 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu überprüfen, ob die siRNA-vermittelte Reduktion der Apoptoseinhibitoren *BCL2*, *BCL-XL*, *XIAP* und *Survivin* eine geeignete Therapieoption zur Behandlung des Harnblasenkarzinoms darstellen könnte. Dafür erfolgte zunächst die Quantifizierung der mRNA-Niveaus dieser Zielgene in drei BCa-Zelllinien sowie in nichtmalignen Fibroblastenzellen. Anschließend wurden die molekularen und zellulären Effekte einer siRNA-vermittelten Hemmung dieser vier Apoptoseinhibitoren in den BCa-Zelllinien EJ28 und J82 sowie in den Fibroblastenzellen analysiert. Um eine möglichst starke antiproliferative Wirkung zu erzielen, erfolgten – neben der Einzelinhibition der Zielgene – Experimente zur simultanen Reduktion verschiedener Apoptoseinhibitoren. Da die Ausschaltung tumorassoziierter Faktoren zu einer Chemosensitivierung von Tumorzellen führen kann, wurde untersucht, ob die siRNA-induzierte Inhibition der vier ausgewählten Zielgene in BCa-Zellen die Wirksamkeit einer nachgeschalteten Chemotherapie mit MMC oder CDDP beeinflusst. Zur Charakterisierung genomweiter Expressionsänderungen nach siRNA-Transfektion erfolgten Oligonukleotid-*Microarray*-Analysen. Unter Verwendung von shRNA-Vektoren wurden die zellulären Effekte nach langfristiger Reduktion von *BCL2*, *BCL-XL* und *XIAP* in EJ28-BCa-Zellen analysiert. Zudem erfolgten nach Etablierung der peritumoralen siRNA-Applikation und der intravenösen Chemotherapiebehandlung im subkutanen EJ28-Xenotransplantatmodell erste Untersuchungen zur siRNA-vermittelten Inhibition von *BCL-XL* und *Survivin* in Kombination mit MMC *in vivo*.

5.1 Eignung von *BCL2*, *BCL-XL*, *XIAP* und *Survivin* als Antitumortargets

Die Fehlregulation des natürlichen Zelltodes, der Apoptose, ist ein Schlüsselfaktor der Tumorgenese [Hanahan & Weinberg, 2011]. Von besonderer Bedeutung sind dabei die Mitglieder der BCL2- und IAP-Familien, welche wichtige Funktionen in der Regulation der Apoptose-signalwege innehaben [Tan *et al.*, 2009]. *BCL2*, *BCL-XL*, *XIAP* und *Survivin*, die vier wichtigsten apoptoseinhibierenden Vertreter dieser beiden Familien, sind häufig in Tumoren überexprimiert, was zudem eine Ursache für die Ausbildung von Resistenzen gegen Chemo- und Radiotherapien zu sein scheint [Hunter *et al.*, 2007; Shangary & Johnson, 2003]. Daher stellen

diese Zielgene interessante Kandidaten für eine molekularbasierte Tumorthherapie dar. Die Inhibition von *BCL2*, *XIAP* oder *Survivin* durch *antisense*-Oligonukleotide (Kapitel 5.4.5.3) wird bereits an verschiedenen Tumorentitäten in zahlreichen klinischen Studien untersucht [zusammengefasst in Kunze *et al.*, 2010].

BCL2 und *BCL-XL* regulieren den intrinsischen Apoptosesignalweg. Sie beeinflussen die Integrität der äußeren Mitochondrienmembran und blockieren die Freisetzung von Cytochrom C [Aouacheria *et al.*, 2007]. Die (Über)-Expression von *BCL2* und *BCL-XL* in BCa-Geweben ist mit einer ungünstigeren Prognose und der Entstehung von Chemo- und Radiotherapieresistenzen verbunden [Gazzaniga *et al.*, 2003; Hussain *et al.*, 2003; Korkolopoulou *et al.*, 2002; Pollack *et al.*, 1997]. *XIAP* ist als direkter Caspase-Inhibitor das potenteste Mitglied der IAP-Familie. BCa-Patienten mit positivem *XIAP*-Nachweis tragen ein deutlich erhöhtes Rezidiv- und Progressionsrisiko [Li *et al.*, 2007]. Der Apoptoseinhibitor und Mitoseregulator *Survivin* stellt in Tumoren das vierthäufigste hochregulierte Transkript dar und wird auch in 53-100 % der BCa detektiert, was mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium und hohem Tumorgrad sowie einer schlechteren Prognose verbunden ist [Karam *et al.*, 2007b; Weikert *et al.*, 2005; Velculescu *et al.*, 1999]. Aufgrund ihrer (Über)-Expression in BCa-Geweben und ihres in der Literatur diskutierten Einflusses bei der Ausbildung von Therapieresistenzen wurden *BCL2*, *BCL-XL*, *XIAP* und *Survivin* als potenziell geeignete Zielgene für eine experimentelle Studie zur siRNA-vermittelten BCa-Therapie ausgewählt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte zunächst die Charakterisierung der mRNA-Niveaus der vier Zielgene *BCL2*, *BCL-XL*, *XIAP* und *Survivin* in den drei humanen BCa-Zelllinien EJ28, J82 und 5637 sowie in gesunden humanen Vorhaut-Fibroblasten (vgl. Kapitel 4.1), da eine nichtmaligne Urothelzelllinie für den Vergleich nicht zur Verfügung stand. Mit den Experimenten wurde gezeigt, dass *BCL2* und *Survivin* in allen drei BCa-Zelllinien sowie *BCL-XL* in EJ28- und J82-Zellen im Vergleich zu nichtmalignen Fibroblasten überexprimiert sind. Das *XIAP*-Transkript wird in den untersuchten gesunden und malignen Zellen auf ähnlichem Niveau gebildet.

Während für *BCL2* und *BCL-XL* ein positiver Proteinnachweis in den BCa-Zelllinien HT1197, RT112, T24 und UM-UC-3 beschrieben ist [Gabriel *et al.*, 2008], existieren bislang keine Angaben zu den mRNA- oder Proteinniveaus dieser beiden Apoptoseinhibitoren in den Zelllinien EJ28, J82 und 5637. Yang *et al.* (2010a) belegen eine simultane mRNA-Expression der IAPs *LIVIN*, *Survivin* und *XIAP* in EJ-, T24- und BIU-87-BCa-Zellen sowie eine deutlich höhere Proteinmenge dieser drei Targets in T24-Zellen im Vergleich zu gesunden SV-HUC-1-Ureterzellen. Eine Quantifizierung der mRNA-Expression sowie eine Analyse der ZielgenmRNA-Mengen in der nichtmalignen SV-HUC-1-Zelllinie wurden jedoch nicht vorgestellt [Yang *et al.*, 2010a]. Analog zu den nahezu identischen *XIAP*-Transkriptlevels in EJ28-, J82- und 5637-BCa-Zellen sowie in nichtmalignen Fibroblastenzellen beschreiben Bilim *et al.*

(2003) ein vergleichbares XIAP-Proteinniveau in den BCa-Zelllinien HT1376, RT4, SCaBER und T24. Eine Normalzelllinie wurde in dieser Studie nicht betrachtet, jedoch wurde in den äußeren Zellschichten von gesundem Urothelgewebe ein mäßiges XIAP-Level detektiert [Bilim *et al.*, 2003]. Weiterhin zeigen Sensintaffar *et al.* (2010) ein nahezu identisches XIAP-Proteinniveau in 10 Tumorzelllinien unterschiedlichen Ursprungs inklusive der BCa-Zelllinie T24 (weitere Tumorentitäten: Melanom, Kolon-, Mamma-, Pankreas- und Prostatakarzinom). Bezüglich *Survivin* beschreiben Fuessel *et al.* (2004) ein im Vergleich zu nichtmalignen Vorhaut-Fibroblasten deutlich erhöhtes mRNA-Niveau in acht BCa-Zelllinien, einschließlich EJ28, J82 und 5637. Aufgrund der hohen Targetexpressionsniveaus (vgl. Tab. 4.1) erfolgten die weiteren Analysen im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit den Zelllinien EJ28 und J82.

Obwohl für *XIAP* keine Überexpression im Vergleich zu den nichtmalignen Fibroblasten gefunden wurde, könnte *XIAP* infolge einer Chemotherapiebehandlung in den BCa-Zellen induziert werden, wie es von Li *et al.* (2006) in Pankreaskarzinomzellen beschrieben wurde. Entsprechend führt die stabile Überexpression von *XIAP* in T24-BCa-Zellen zu einer Chemo-resistenz [Bilim *et al.*, 2003]. Da zur Behandlung des BCa routinemäßig Chemotherapeutika eingesetzt werden (vgl. Kapitel 1.2.2) und deren Effektivität im Therapieverlauf häufig durch auftretende Resistenzen limitiert wird [Fuessel *et al.*, 2006a], könnte die Inhibition von *XIAP* langfristig von Bedeutung sein. Daher wurde dieses Zielgen in die weiteren Analysen einbezogen.

5.2 Auswahl geeigneter siRNAs und Optimierung der Transfektionsbedingungen

In der medizinischen Forschung und insbesondere in der Tumorthherapie stellen siRNAs hochinteressante Wirkstoffkandidaten zur selektiven posttranskriptionellen Inhibition ausgewählter Zielgene dar. Um eine optimale Targetreduktion zu erzielen und um putative Nebenwirkungen durch Einsatz möglichst geringer siRNA-Mengen zu vermeiden, ist die Nutzung hochwirksamer siRNA-Sequenzen unerlässlich. Grundvoraussetzung für eine effiziente Geninhibition ist bereits die Auswahl einzelsträngiger und damit zugänglicher Bereiche in der Target-mRNA [Ameres *et al.*, 2007]. Weitere Kriterien für den Entwurf effektiver und spezifischer siRNAs sind u.a. die Einzigartigkeit der Targetsequenz im humanen Transkriptom und die Auswahl asymmetrischer siRNAs, bei denen durch eine geringere thermodynamische Stabilität am 5'-Ende des siRNA-*guide*-Stranges der Einbau dieses Stranges in RISC favorisiert wird [Walton *et al.*, 2010].

Komplexe siRNA-Designalgorithmen erlauben heutzutage eine sehr zuverlässige Vorhersage wirksamer Konstrukte. So wurden die in der vorliegenden Arbeit verwendeten siRNAs

nach dem Designalgorithmus der Fa. Eurogentec entwickelt. Gegen jedes der Targets *BCL2*, *BCL-XL*, *XIAP* und *Survivin* wurden aus den jeweils drei synthetisierten Konstrukten die zwei siRNAs ausgewählt, die in EJ28-Zellen die stärkste Reduktion der entsprechenden Zielgen-mRNA-Niveaus hervorrufen (vgl. Kapitel 4.2.1), wobei jeweils alle drei getesteten Konstrukte zu einer Targetinhibition führen (Daten nicht gezeigt). Experimentell erfolgte anschließend beispielhaft mit den siRNAs B2-1, BX-1, X-1 und S-1 in EJ28-BCa-Zellen die Bestimmung der Targethemmung in Abhängigkeit von der Konstruktkonzentration (vgl. Abb. 4.2). Bereits bei einer Konzentration von 10 nM siRNA wird 24 h nach der Behandlung eine deutliche Reduktion der Zielgen-mRNA-Niveaus um 59 bis 77 % erzielt. Eine Vervierfachung der eingesetzten siRNA-Menge erhöht die Inhibitionsrate nur geringfügig auf 69 bis 84 %. Für eine bestmögliche Vergleichbarkeit der Ansätze sollten sowohl in den siRNA-Einzel- als auch in den siRNA-Kombinationsbehandlungen einheitliche Konstruktgesamtkonzentrationen und Transfektionsmittelmengen verwendet werden. Infolgedessen wurde eine siRNA-Gesamtkonzentration von 40 nM ausgewählt, weshalb in den Kombinationsbehandlungen 5 nM (M8), 10 nM (M4-1, M4-2) bzw. 20 nM (M2-A, M2-B) pro Konstrukt eingesetzt wurden. Auf diese Weise konnte in allen Behandlungen – unter Wahrung gleichbleibender Nebeneffekte durch konstante Mengen an Transfektionsmittel – eine deutliche Targetinhibition gewährleistet werden.

Mit der gewählten siRNA-Konzentration von 40 nM in den Einzelbehandlungen werden auf mRNA-Ebene für EJ28-Zellen ähnliche Hemmraten erzielt wie mit den in eigenen Vorarbeiten in einer Konzentration von 200 nM eingesetzten, gegen *BCL2*, *BCL-XL* oder *XIAP* gerichteten siRNAs: Während mit B2-1, BX-1 bzw. X-1 die Targetexpression 96 h nach Transfektion um 38, 69 bzw. 56 % gesenkt werden konnte (vgl. Abb. 4.3), führte die Verwendung von 200 nM der zuvor getesteten Konstrukte zum gleichen Zeitpunkt zu einer Reduktion um 41, 63 bzw. 54 % [Kunze *et al.*, 2008b]. Ning *et al.* (2004) zeigen, dass die Behandlung von EJ28- und J82-Zellen mit 250 nM einer gegen *Survivin* gerichteten siRNA 48 h nach Transfektion eine Verminderung der relativen *Survivin*-Transkriptzahl um ca. 70 bzw. 50 % bewirkt. In der vorliegenden Arbeit liegt die *Survivin*-mRNA-Reduktion bei Einsatz von 40 nM siRNA zum selben Zeitpunkt bei durchschnittlich 76 bzw. 79 % (vgl. Abb. 4.5). Diese Vergleiche zeigen, dass die hier verwendeten siRNA-Sequenzen bereits in geringen Konzentrationen eine effektive, lang anhaltende Targetinhibition hervorrufen.

Untersuchungen zur Optimierung des Transfektionsablaufs für die gleichzeitige Inhibition aller vier Zielgene ergaben, dass die simultane Transfektion der siRNAs einer sequenziellen Behandlung [4 h Transfektion mit siRNAs gegen *BCL2+BCL-XL* gefolgt von 4 h Transfektion mit siRNAs gegen *XIAP+Survivin*] vorzuziehen ist (vgl. Abb. 4.4). Ursache für die reduzierte Wirksamkeit von X-1 und S-1 in der sequenziellen Behandlung könnte eine Sättigung von

RISC durch die siRNAs der ersten Transfektion sein, welche die Effektivität der Konstrukte der zweiten Behandlung limitiert.

Zur Charakterisierung der konstruktsspezifischen Wirkung unter Ausschluss transfektionsbedingter Effekte wurden in dieser Arbeit alle Ergebnisse im Vergleich zur Behandlung mit dem Kontrollkonstrukt ns-si, welches keine Homologie zu humanen mRNAs aufweist, betrachtet. Die in allen Experimenten mitgeführten nicht transfizierten, unbehandelten Zellen waren hinsichtlich der molekularen und zellulären Parameter mit den jeweiligen ns-si-Kontrollzellen vergleichbar (Daten nicht gezeigt).

5.3 siRNA-vermittelte Reduktion der Zielgenexpression in Einzel- und Kombinationsbehandlungen in humanen Harnblasenkarzinomzellen

Die in dieser Arbeit verwendeten siRNAs reduzieren, einzeln und in Kombination, die mRNA- und Proteinniveaus der entsprechenden Zielgene (vgl. Kapitel 4.2.2). Bedingt durch den Einsatz verschiedener siRNA-Konzentrationen ist dabei die Targetinhibition in den Einzelbehandlungen (40 nM siRNA pro Zielgen) stärker als in den M4- und M8-Kombinationen (10 nM siRNA pro Zielgen). Es sei erwähnt, dass eine simultane Transfektion verschiedener siRNAs das Risiko eines Wettbewerbes zwischen den Konstrukten um den Einbau in RISC birgt, wodurch einzelne siRNAs in ihrer Wirksamkeit limitiert werden können [Castanotto *et al.*, 2007]. Dieser Effekt wurde mit den hier verwendeten siRNAs nicht beobachtet. Die im Vergleich zu den siRNA-Einzelbehandlungen geringere Targettranskriptreduktion in den M4- und M8-Behandlungen scheint hauptsächlich durch den Konzentrationseffekt bedingt zu sein.

Auffällig ist, dass insbesondere die Inhibition von *XIAP* auf Proteinebene stärker ist als die entsprechenden Effekte auf Transkriptebene (vgl. Abb. 4.5 und 4.7). Dies könnte dadurch bedingt sein, dass die siRNAs X-1 und X-2 trotz vollständiger Komplementarität zur Ziel-mRNA eher eine Inhibition der Translation als eine Spaltung der Target-mRNA bewirken. Interessanterweise wird in der Literatur zur siRNA-vermittelten Hemmung von *XIAP* in humanen Tumorzellkulturen, im Gegensatz zu den anderen Zielgenen, hauptsächlich eine Proteinreduktion beschrieben, wohingegen das Transkriptniveau unerwähnt bleibt [Griffith *et al.*, 2011; Ohnishi *et al.*, 2008; Sensintaffar *et al.*, 2010; Yamaguchi *et al.*, 2005]. Nur Zhang *et al.* (2007) zeigen – jedoch nicht quantitativ – eine Reduzierung der *XIAP*-Expression und -Proteinmenge 24 bis 72 h nach Transfektion von 25 nM einer gegen *XIAP* gerichteten siRNA in Ösophaguskarzinomzellen. Anhand publizierter Daten ist somit eine Beurteilung der *XIAP*-siRNA-Effekte auf das Target-mRNA-Niveau nicht eindeutig möglich.

5.4 Zelluläre Effekte der Inhibition von *BCL2*, *BCL-XL*, *XIAP* und *Survivin* in humanen Harnblasenkarzinomzelllinien

Eine siRNA-vermittelte Inhibition von *BCL2*, *BCL-XL*, *XIAP* oder *Survivin* bewirkt in verschiedenen *in vitro*- und *in vivo*-Modellen unmittelbare antiproliferative Effekte auf Tumorzellen unterschiedlichen Ursprungs [Hao *et al.*, 2007; Miao *et al.*, 2007; Mu *et al.*, 2009; Yano *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2009]. Ebenso kann die Reduktion dieser Zielgene in Tumorzellen zu einer Chemosensitivierung führen [George *et al.*, 2009; Mu *et al.*, 2009; Yonesaka *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2009]. In den folgenden Abschnitten werden daher die zellulären Effekte der Inhibition von *BCL2*, *BCL-XL*, *XIAP* und *Survivin* in BCa-Zelllinien detailliert betrachtet.

5.4.1 *Survivin*

In den hier untersuchten BCa-Zelllinien EJ28 und J82 zeigte von den siRNA-Einzelbehandlungen insbesondere die *Survivin*-Inhibition eine ausgeprägte wachstumshemmende Wirkung (vgl. Kapitel 4.2.3 und 4.2.4). So ruft die *Survivin*-Reduktion eine Verringerung der Zellzahl um durchschnittlich 50 % und eine Reduzierung des Kurz- bzw. Langzeitproliferationsvermögens um durchschnittlich 25 % bzw. 83 % hervor. Ursachen hierfür sind eine um das 2,3fache erhöhte Apoptoserate in EJ28-Zellen sowie ein Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase (+ 60 % im Vergleich zur ns-si-Behandlung in J82-Zellen, + 15 % in EJ28-Zellen) verbunden mit der Entstehung polyploider Zellen. *Survivin* spielt, neben seiner Funktion als Apoptoseinhibitor, auch eine entscheidende Rolle in der Mitose- und Zytokineseregulierung. INCENP, BOREALIN, AURKB und *Survivin* bilden zusammen den *chromosomal passenger complex*, welcher die Chromosomenseparation während der Mitose sowie die Zytokinese reguliert [Jeyaprasath *et al.*, 2007]. Zudem ist *Survivin* in die Stabilisierung der Mitosespindel involviert [Giodini *et al.*, 2002]. Infolgedessen bewirkt die *Survivin*-Hemmung neben der Apoptoseinduktion auch eine Arretierung im Zellzyklus und aufgrund wiederholter, unvollständig ablaufender Zellkernteilungen eine Polyploidie, d.h. eine Vermehrung des Chromosomensatzes (mitotische Katastrophe).

Alternatives Spleißen des *Survivin*-Transkripts führt zur Bildung mehrerer Spleißvarianten, von denen Wildtyp-*Survivin*, welches von vier Exons kodiert wird, im BCa die dominierende Variante ist [Atlasi *et al.*, 2009; Wuttig *et al.*, 2007]. Die medianen Transkriptniveaus der Spleißvarianten *Survivin*- Δ Ex3 (Verlust des Exons 3, Leserasterverschiebung in Exon 4) und

Survivin-2B (Insertion eines kryptischen Exons 2B) liegen in BCa-Geweben bei unter 7 % des Wildtyp-*Survivin*-Niveaus. Infolgedessen beruht die stärkste antiproliferative Wirkung in BCa-Zelllinien auf einer Reduktion von Wildtyp-*Survivin*, während die Inhibition der anderen Spleißvarianten von untergeordneter Bedeutung ist [Wuttig *et al.*, 2007]. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten siRNAs S-1, S-2 und S-3 sind alle drei komplementär zur mRNA von Wildtyp-*Survivin* und *Survivin-2B*, die Konstrukte S-2 und S-3 zusätzlich zum *Survivin-ΔEx3*-Transkript. Mittels qPCR und *Western Blot* wurde die siRNA-vermittelte Reduktion der dominanten Isoform, Wildtyp-*Survivin*, nachgewiesen (vgl. Abb. 4.5 und 4.6). Eine Quantifizierung der anderen Spleißvarianten erfolgte nicht. Obwohl das Konstrukt S-2 zusätzlich *Survivin-ΔEx3* inhibieren kann, sind die zellulären Effekte einer Transfektion von S-1 oder S-2 nahezu identisch (vgl. Kapitel 4.2.3 und 4.2.4), was die geringere Bedeutung dieser Isoform im BCa bestätigt.

Übereinstimmend mit den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen zeigen Ku *et al.* (2010) und Takizawa *et al.* (2007) eine Apoptoseinduktion und einen G2/M-Arrest infolge einer siRNA-vermittelten *Survivin*-Inhibition in T24-BCa-Zellen. In der gleichen Zelllinie wird nach *Survivin*-siRNA-Behandlung eine Inhibition des Kurz- und Langzeitproliferationsvermögens beschrieben [Yang *et al.*, 2010a]. Ebenso schildern Ning *et al.* (2004) nach Transfektion von 250 nM einer gegen *Survivin* gerichteten siRNA eine Viabilitätsreduktion und Apoptoseinduktion in EJ28- und 5637-BCa-Zellen sowie einen G2/M-Arrest plus die Bildung polyploider Zellen in den Zelllinien EJ28, J82 und 5637. Analog zu den mit S-1 und S-2 erzielten Ergebnissen (vgl. Abb. 4.11 und 4.12) wurde in J82-Zellen nach *Survivin*-Inhibition keine erhöhte Apoptoserate, dafür aber ein im Vergleich zur EJ28 deutlich größerer Anteil an Zellen in der G2/M-Phase gefunden [Ning *et al.*, 2004]. In Abhängigkeit vom *TP53*-Status wird ein unterschiedliches Ansprechen von Sarkomzellen auf eine *Survivin*-Reduktion beschrieben. Während in Wildtyp-*TP53*-Zellen infolge der siRNA-Behandlung Apoptose induziert wird, ist dies in einer Sarkomzelllinie mit mutiertem *TP53* nicht der Fall [Kappler *et al.*, 2005]. Da jedoch sowohl EJ28- als auch J82-Zellen *TP53*-Mutationen aufweisen (vgl. Tab. 3.1), müssen weitere Faktoren existieren, die das Ansprechen der Zellen auf eine Anti-*Survivin*-Therapie beeinflussen.

Aufgrund der nach transients *Survivin*-Inhibition deutlichen Arretierung der Tumorzellen in der G2/M-Phase und der sich ausbildenden Polyploidie, welche längerfristig zum Zelltod führt und somit das Langzeitproliferationsvermögen der Zellen enorm vermindert (vgl. Abb. 4.10), wurde auf eine stabile *Survivin*-Ausschaltung mittels shRNA-Vektoren verzichtet.

Eine langfristige Kultivierung der BCa-Zelllinien in CDDP-haltigem Medium veränderte das *Survivin*-Transkriptniveau nicht (vgl. Kapitel 4.2.8). Entsprechend der in Kapitel 4.2.5 vorgestellten Untersuchungen führt jedoch die Behandlung der beiden BCa-Zelllinien EJ28 und J82 mit S-1 oder S-2 zu einer Sensitivierung der Tumorzellen auf eine nachgeschaltete

Chemotherapie. Infolge einer deutlichen Apoptoseinduktion (Gesamtapoptoserate 64 % nach Behandlung mit „S-2 + CDDP“ in EJ28-Zellen im Vergleich zu 36 % nach Kontrollbehandlung „ns-si + CDDP“) werden eine stark reduzierte Zellviabilität sowie eine signifikante Abnahme der Zellzahl gemessen (vgl. Kapitel 4.2.5). Dieses Resultat steht im Einklang mit der von Fuessel *et al.* (2006b) in EJ28- und 5637-Zellen beschriebenen erhöhten Chemotherapie-wirksamkeit nach *Survivin*-Inhibition.

5.4.2 XIAP

In den BCa-Zelllinien EJ28 und J82 konnte nach transientscher *XIAP*-Inhibition keine Beeinflussung des Tumorzellwachstums festgestellt werden (vgl. Kapitel 4.2.3 und 4.2.4). Auch eine stabile Hemmung des Zielgens mittels shRNA zeigte keine antitumoralen Effekte (vgl. Kapitel 4.4). Vielmehr scheint die langfristige *XIAP*-Reduktion die Proliferation der EJ28-Zellen zu fördern (vgl. Abb. 4.26). Die Sequenz der verwendeten shRNA entspricht dabei der des siRNA-Konstrukts X-1 und ist von den vier getesteten shRNA-Sequenzen die hinsichtlich der Targethemmung effizienteste (vgl. Kapitel 3.2.3). Die Eignung dieses mRNA-Abschnitts als Targetbereich wird durch die beiden voneinander unabhängigen Ansätze (1) Auswahl effektiver siRNAs nach dem Designalgorithmus der Fa. Eurogentec und (2) Identifizierung der wirksamsten shRNA aus vier nach einem experimentell verifizierten shRNA-Designalgorithmus (SABiosciences) entwickelten Konstrukten bekräftigt. Zusätzlich wurde gezeigt, dass eine *XIAP*-Depletion das Ansprechen der untersuchten Tumorzelllinien auf die Chemotherapeutika CDDP und MMC nicht verändert (vgl. Kapitel 4.2.5 und 4.4). Zudem war das mRNA-Niveau von *XIAP* in den CDDP-resistenten EJ28- und J82-Zellen verglichen mit den Stammzelllinien unverändert (vgl. Kapitel 4.2.8).

In vorangegangenen Arbeiten bewirkte die *XIAP*-Reduzierung nach Transfektion mit 200 nM siRNA zwar eine Abnahme der EJ28-Zellzahl, jedoch konnten, vergleichbar mit den hier erzielten Ergebnissen, keine Änderungen von Apoptoserate und Zellzyklusverteilung festgestellt werden. Ebenso wurde die Wirksamkeit nachgeschalteter Chemotherapien durch die *XIAP*-Inhibition nicht beeinflusst [Kunze *et al.*, 2008b]. Sensintaffar *et al.* (2010) zeigen für T24-BCa-Zellen, dass die siRNA-vermittelte Reduktion von *XIAP* nach 48 h – jedoch nicht nach 24, 72 und 96 h – eine geringe Reduktion der Zellviabilität um 13 % bewirkt. Ähnlich sind die Effekte nach *XIAP*-Depletion in den neun weiteren untersuchten Melanom-, Kolon-, Mamma-, Pankreas- bzw. Prostatakarzinomzelllinien. Nur in drei dieser Zelllinien tritt zu einem der vier analysierten Zeitpunkte eine Absenkung der Zellviabilität um maximal 20 % auf [Sensintaffar *et al.*, 2010]. Hingegen beschreiben Yang *et al.* (2010a) ebenfalls in T24-BCa-Zellen nach Reduktion von *XIAP* einen Rückgang der Zellviabilität und Kolonie-

bildungsfähigkeit um ca. 30 % sowie eine Erhöhung der Apoptoserate um ca. 5 %. Dabei ist die Stärke der zellulären Effekte der *XIAP*-Inhibition nahezu identisch mit denen nach siRNA-vermittelter *Survivin*- oder *LIVIN*-Hemmung in der gleichen Zelllinie [Yang *et al.*, 2010a]. Da die Abnahme des *XIAP*-Proteinniveaus trotz (1) unterschiedlicher siRNA-Sequenzen, (2) variierender Konstruktkonzentrationen und (3) verschiedener Transfektionsbedingungen in der vorliegenden Arbeit und in den Publikationen von Sensintaffar *et al.* (2010) und Yang *et al.* (2010a) vergleichbar um 80 % liegt, können die Unterschiede bei den zellulären Effekten nicht auf eine verschieden starke Targetinhibition zurückzuführen sein. Möglich wäre, dass die von Yang *et al.* (2010a) verwendete Kombination aus zwei siRNAs neben *XIAP* weitere Gene inhibiert und dadurch eine antiproliferative Wirkung hervorgerufen wird.

In der Mehrzahl der Studien zur RNAi-vermittelten *XIAP*-Reduktion in humanen Tumorzellkulturmodellen bewirkt die Inhibition dieses Zielgens keine direkten Effekte auf das Tumorstadium, sondern vielmehr eine Sensitivierung gegenüber exogenen Apoptosestimuli wie Strahlentherapie oder Behandlung mit rekombinantem TRAIL [Connolly *et al.*, 2009; Giagkousiklidis *et al.*, 2007; Ohnishi *et al.*, 2008; Yamaguchi *et al.*, 2005]. Die Beeinflussung der Wirksamkeit von Chemotherapeutika durch *XIAP*-Depletion scheint abhängig vom Wirkmechanismus des Therapeutikums zu sein. Entsprechend McManus *et al.* (2004) verstärkt die shRNA-vermittelte Targetreduktion die Wirksamkeit von Docetaxel und Paclitaxel, zweier Zytostatika aus der Gruppe der Taxane, deren Wirkung auf einer Stabilisierung der Mikrotubuli und infolgedessen einer Blockierung der Mitose basiert. Hingegen wird durch *XIAP*-Hemmung die Effektivität von Carboplatin und Doxorubicin, beides Interkalantien, welche die DNA-Replikation und die Transkription behindern, nicht beeinträchtigt [McManus *et al.*, 2004]. Da die hier verwendeten Chemotherapeutika CDDP und MMC ihre zytostatische Wirkung ebenfalls über DNA-Interkalation entfalten, könnte dies eine Ursache für die nicht beobachtete chemosensitivierende Wirkung nach *XIAP*-Reduktion sein. Um diese Theorie zu überprüfen, sollte untersucht werden, welchen Einfluss die *XIAP*-Hemmung in BCa-Zellen auf Zytostatika wie Docetaxel und Paclitaxel, welche jedoch klinisch beim BCa nicht von Bedeutung sind [Babjuk *et al.*, 2011; Stenzl *et al.*, 2011], hat.

Eine Ursache für die nicht beobachteten antitumoralen Effekte der *XIAP*-Inhibition *in vitro* könnte darin begründet liegen, dass diese Experimente an Monolayerzellkulturen durchgeführt wurden. Im Vergleich dazu zeigen Gallardo-Pérez *et al.* (2009), dass das *XIAP*-Proteinniveau in Sphäroiden aus HeLa-Zellen (Zervixkarzinom) infolge NF- κ B-Aktivierung deutlich gegenüber dem Wert der Monolayerkultur ansteigt. Da in Monolayerkulturen alle Zellen kontinuierlich mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt werden, könnte es sein, dass für ihre Proliferation *XIAP* von geringerer Bedeutung ist als in soliden Tumoren.

5.4.3 *BCL2*

Wie für *XIAP* zeigte auch die durch 40 nM siRNA induzierte *BCL2*-Reduktion sowohl einzeln als auch in Kombination mit Chemotherapie keine antitumorale Wirkung auf die EJ28- und J82-BCa-Zellen (vgl. Kapitel 4.2.3 - 4.2.5 und 4.4). Unter Verwendung von 200 nM eines anderen gegen *BCL2* gerichteten siRNA-Konstrukts konnte eine Erniedrigung der EJ28-Zellzahl um 42 %, eine Erhöhung der Apoptoserate um 9 % sowie eine Sensitivierung der Zellen auf eine nachgeschaltete MMC-, nicht aber CDDP-Behandlung, erzielt werden [Kunze *et al.*, 2008b]. Die Reduzierung der *BCL2*-mRNA-Menge 96 h nach Transfektion war dabei vergleichbar mit der nach B2-1-Behandlung und lag bei ca. 40 % (vgl. Abb. 4.3 und Kunze *et al.*, 2008b). Diese trotz ähnlicher Targetexpressionssenkung unterschiedlichen zellulären Auswirkungen könnten darin begründet sein, dass die von Kunze *et al.* (2008b) verwendete siRNA, möglicherweise auch durch die 5fach höhere Konzentration, targetunabhängige Nebeneffekte induziert, die Ursache für die antiproliferative Wirkung sind.

Die *BCL2*-Expression in den CDDP-resistenten EJ28- und J82-BCa-Zelllinien war vergleichbar mit dem Targetexpressionsniveau in den Stammzelllinien (vgl. Kapitel 4.2.8). Im Gegensatz dazu zeigen Cho *et al.* (2006) ein im Vergleich zur parentalen BCa-Zelllinie T24 deutlich erhöhtes *BCL2*-Niveau in einer CDDP-resistenten T24-Sublinie. Infolge RNAi-vermittelter *BCL2*-Inhibition wird die CDDP-Resistenz in dieser Subzelllinie aufgehoben und Apoptose induziert [Cho *et al.*, 2006].

Die durch siRNA-vermittelte *BCL2*-Inhibition hervorgerufenen Effekte in anderen Tumorentitäten variieren. Während in PC-3- und LNCaP-Prostatakarzinomzellen eine gegen *BCL2* gerichtete siRNA trotz starker Targetinhibition keine Phänotypveränderungen hervorruft [Anderson *et al.*, 2006], wird in Magenkarzinomzellen eine deutliche Beeinträchtigung des Tumorwachstums beobachtet [Hao *et al.*, 2007]. Entsprechend George *et al.* (2009) werden Glioblastomzellen durch *BCL2*-Reduktion gegenüber Paclitaxel sensitiviert. Von drei Zelllinien pädiatrischer Lebertumoren wird nur eine infolge siRNA-vermittelter *BCL2*-Hemmung gegenüber einer Chemotherapie mit CDDP, Doxorubicin, Paclitaxel oder Etoposid sensitiviert [Warmann *et al.*, 2008].

Da der Beitrag eines Apoptoseinhibitors zur Tumorgenese zwischen den Zelltypen variieren kann, ist es möglich, dass die posttranskriptionelle Inhibition von *BCL2* in verschiedenen Tumorentitäten unterschiedliche Resultate hervorruft. Zudem ist bekannt, dass die Reduktion von *BCL2* in Tumorzellen durch eine Induktion von *BCL-XL* kompensiert werden kann [Han *et al.*, 1996]. Dadurch könnte in einigen Zellarten die antiproliferative Wirkung der *BCL2*-Hemmung ausgeglichen werden. In den hier untersuchten BCa-Zelllinien bewirkt die *BCL2*-Depletion jedoch keine Expressionserhöhung von *BCL-XL* (vgl. Kapitel 4.2.7). Trotz der deutlich erhöhten Expression von *BCL2* in EJ28- und J82-Zellen im Vergleich zu nicht-

malignen Fibroblasten liegt das mRNA-Niveau dieses Zielgens in den BCa-Zelllinien bei < 1 % des *BCL-XL*-Niveaus (vgl. Kapitel 4.1). Daher könnte *BCL2* in diesen BCa-Zellen von untergeordneter Bedeutung sein. Ebenso besteht die Möglichkeit, dass vergleichbar zu *XIAP* die *BCL2*-Expression infolge der Zellkulturbedingungen gering ist. Entsprechend Yang *et al.* (2009) ist das Proteinniveau dieses Zielgens, nicht aber das von *BCL-XL*, in Sphäroiden aus Bronchialkarzinomzellen gegenüber dem der Monolayerzellkultur deutlich erhöht (mRNA-Niveau nicht vorgestellt).

5.4.4 *BCL-XL*

Die siRNA-vermittelte Einzelinhibition von *BCL-XL* zeigte in den BCa-Zelllinien EJ28 und J82 eine geringfügige antitumorale Wirkung. Beispielsweise wird die Viabilität von EJ28-Zellen um ca. 14 % reduziert (vgl. Abb. 4.8). Während diese transiente Targetreduktion nur eine minimale Apoptoseinduktion (+ maximal 5 % in EJ28, vgl. Abb. 4.11 A) hervorruft, wächst der Anteil apoptotischer EJ28-Zellen nach shRNA-vermittelter *BCL-XL*-Reduktion von 13 % in der Kontrolle auf 43 % (vgl. Abb. 4.27). Da Apoptose ein energieabhängiger Mechanismus ist, z.B. wird für die Bildung des Apoptosoms ATP benötigt (vgl. Abb. 1.1), geht Apoptose *in vitro* nach längerer Zeit infolge ATP-Mangels in Nekrose über [Silva 2010]. Aus diesem Grund tritt in den EJ28-BX-Zellen neben der apoptotischen auch eine nekrotische Zellfraktion auf (vgl. Abb. 4.27). Obwohl das *BCL-XL*-mRNA-Niveau der BCa-Zellen durch langfristige Kultur in CDDP-haltigem Medium nicht beeinträchtigt wird (vgl. Kapitel 4.2.8), führt sowohl die transiente als auch die stabile *BCL-XL*-Inhibition zu einer deutlichen Chemosensitivierung (vgl. Kapitel 4.2.5 und 4.4). So steigt z.B. die Gesamtapoptoserate 72 h nach Transfektion von 25 % in der Kontrollbehandlung auf 59 % in der „BX-1 + MMC“-Probe an, die Zellzahl sinkt um 49 % (vgl. Abb. 4.15 B und 4.16 B). In den EJ28-BX-Zellen sind nach Behandlung mit CDDP bzw. MMC 90 % bzw. 93 % apoptotische Zellen nachweisbar und damit 19 % bzw. 53 % mehr als in den Kontrollen (vgl. Abb. 4.27).

Die Transfektion mit 200 nM einer anderen gegen *BCL-XL* gerichteten siRNA bewirkt in EJ28-Zellen ebenfalls eine Erhöhung der Apoptoserate um 10 % sowie eine Chemosensitivierung [Kunze *et al.*, 2008b]. Weitere Studien zur siRNA-vermittelten *BCL-XL*-Hemmung in BCa-Zelllinien sind in der Literatur nicht beschrieben. Dafür werden sowohl in Ovarial- und Kolon- als auch in Prostatakarzinomzellen direkte wachstumsinhibitorische Effekte sowie eine Sensitivierung gegenüber TRAIL- bzw. CDDP-Behandlung infolge siRNA-induzierter *BCL-XL*-Depletion nachgewiesen [Mu *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2005]. Ebenso ruft eine stabile *BCL-XL*-Inhibition in Magen-, Ösophagus- und Nasopharynxkarzinomzellen eine Apoptoseinduktion und in Hepg2-Zellen (hepatozelluläres Karzinom) zusätzlich eine Chemosensiti-

vierung hervor, wobei in den drei erstgenannten Tumorentitäten die shRNA-Behandlung nicht mit einer Chemotherapie kombiniert wurde [Lei *et al.*, 2005; Lei *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2005; Xie *et al.*, 2006]. Insgesamt scheint *BCL-XL* bei verschiedenen Tumorerkrankungen, inklusive des BCa, eine wichtige Rolle bei der Inhibition des natürlichen Zelltodes zu spielen und stellt daher generell ein attraktives Target für eine zielgerichtete Antitumorthherapie dar.

Zusammengefasst kann festgestellt werden, dass von den untersuchten Einzeltarget-behandlungen die siRNA-vermittelte *Survivin*-Inhibition in den BCa-Zelllinien EJ28 und J82 eine direkte Wachstumshemmung hervorruft. Zudem sensitiviert die RNAi-induzierte *BCL-XL*-Reduktion diese Tumorzellen auf eine nachgeschaltete Chemotherapie mit MMC oder CDDP. Die Apoptoseinhibitoren *BCL2* und *XIAP* scheinen in den EJ28- und J82-Monolayerkulturen von untergeordneter Bedeutung zu sein.

5.4.5 Simultane Inhibition verschiedener Apoptoseinhibitoren

5.4.5.1 Simultane Inhibition von *BCL2*, *BCL-XL*, *XIAP* und *Survivin*

Die Beurteilung der gleichzeitigen Hemmung aller vier Apoptoseinhibitoren erfolgte durch Behandlung mit drei verschiedenen siRNA-Kombinationen. Zum einen wurden vier siRNAs, je 10 nM eines Konstruktes pro Target, miteinander gemischt (M4-1 bzw. M4-2), zum anderen wurden diese acht siRNAs (je 5 nM) zusammen eingesetzt (M8, vgl. Abb. 3.1). Die Verwendung von jeweils zwei siRNAs pro Zielgen, welche hinsichtlich der Targetreduktion ähnlich effektiv sind und der daraus folgende Einsatz dieser Konstrukte in jeweils halber Konzentration kann bei gleichbleibender Zielgenbeeinflussung eine Abnahme von siRNA-sequenzspezifischen Nebenwirkungen ermöglichen [Jackson & Linsley, 2010]. Hierbei sei erwähnt, dass in dieser Arbeit die größten Unterschiede in der targetspezifischen Expressionsreduktion für die beiden gegen *BCL2* gerichteten Konstrukte B2-1 und B2-2 festgestellt wurden, und zwar mit einer Differenz von 9 bzw. 19 % für J82- bzw. EJ28-Zellen (vgl. Abb. 4.5).

Insgesamt sind die zellulären Auswirkungen nach M4-1-, M4-2- oder M8-Behandlung in EJ28- und J82-BCa-Zellen gleichartig. Die Effekte einer kombinierten Hemmung von *BCL2*, *BCL-XL*, *XIAP* und *Survivin* auf die BCa-Zellviabilität und -zahl sind in ihrer Stärke mit denen nach *Survivin*-Einzelinhibition vergleichbar. Beispielsweise sinkt die Viabilität von EJ28-Zellen in den Kombinationsbehandlungen durchschnittlich um 36 % und die Zellzahl um \approx 42 % (vgl. Abb. 4.8 und 4.9). Ebenso liegt in EJ28-Zellen die Gesamtapoptoserate für die Kombinationen mit ca. 23 % auf dem Niveau der S-1- und S-2-Behandlungen (vgl. Abb. 4.11). Hingegen ist der Einfluss auf den Zellzyklus und das Langzeitproliferationsvermögen in den Kombinationsbehandlungen schwächer als in den *Survivin*-Einzelbehandlungen (vgl.

Abb. 4.10 und 4.12). So liegt beispielsweise, bezogen auf die ns-si-Kontrolle, die relative Erhöhung des Anteils an J82-Zellen in der G2/M-Phase bei durchschnittlich 17 % in den M4- und M8-Proben, während sie in den S-1- und S-2-Proben ca. 60 % beträgt (vgl. Abb. 4.12). Da von den vier Zielgenen nur *Survivin* sowohl in die Apoptosemodulation als auch in die Mitoseregulation involviert ist, sollten die schwächeren Zellzyklusveränderungen eine Folge der geringeren *Survivin*-Expressionsreduktion darstellen, welche in den Kombinationsbehandlungen bei durchschnittlich 57 %, in den Einzelbehandlungen dagegen bei 76 % liegt (Abb. 4.5). Dass die weiteren zellulären Effekte wie Zellzahl- und -viabilitätsabnahme in den Kombinationsbehandlungen trotz konzentrationsbedingt schwächerer *Survivin*-Inhibition eine annähernd gleiche Stärke wie für die S1- und S2-Behandlungen aufweisen, könnte auf eine synergistische Wirkung infolge simultaner Reduzierung mehrerer Apoptoseinhibitoren zurückzuführen sein. Auch die Chemosensitivierung infolge *BCL2+BCL-XL+XIAP+Survivin*-Depletion ist für die Kombinationsbehandlungen teilweise stärker als nach der effektivsten siRNA-Einzelbehandlung, der *BCL-XL*-Hemmung (vgl. Kapitel 4.2.5). Somit ist anzunehmen, dass die antiproliferativen und chemosensitivierenden Effekte der M4- und M8-Behandlungen insbesondere eine Folge der simultanen *Survivin*- und *BCL-XL*-Inhibition sind.

5.4.5.2 Simultane Inhibition von *BCL-XL* und *Survivin*

Da von den siRNA-Einzelbehandlungen die *Survivin*-Reduktion aufgrund ihrer direkten antitumoralen Wirksamkeit sowie die *BCL-XL*-Hemmung hinsichtlich der Verstärkung der Chemotherapiewirkung besonders interessant sind (vgl. Kapitel 5.4.1 und 5.4.4) und die Apoptoseinhibitoren *BCL2* und *XIAP* in den untersuchten BCa-Zellen von untergeordneter Bedeutung zu sein scheinen (vgl. Kapitel 5.4.2 und 5.4.3) und da anhand der M4- und M8-Kombinationsbehandlungen gezeigt werden konnte, dass der simultane Einsatz der ausgewählten siRNAs nicht die Wirksamkeit der einzelnen Konstrukte beeinflusst, wurde überprüft, welchen Effekt eine kombinierte Reduktion von *BCL-XL* und *Survivin* auf das Wachstumsverhalten der EJ28- und J82-Zellen hat. Durch den simultanen Einsatz von je 20 nM einer gegen *BCL-XL* und einer gegen *Survivin* gerichteten siRNA wird die *Survivin*-Expression stärker als in den M4- und M8-Behandlungen reduziert, das *BCL-XL*-mRNA-Niveau ist in diesen Proben vergleichbar (vgl. Abb. 4.5 und 4.17 A). Die Transfektion von M2-A bzw. M2-B erzielt in den BCa-Zelllinien eine ausgeprägtere antitumorale Wirkung als die Behandlung mit M4-1, M4-2 oder M8 (vgl. Kapitel 4.2.6). Die relative Viabilitätsreduktion ist in den *BCL-XL+Survivin*-Kombinationen stärker als in den untersuchten Einzel- und Vierer-Kombinationsbehandlungen (Abb. 5.1).

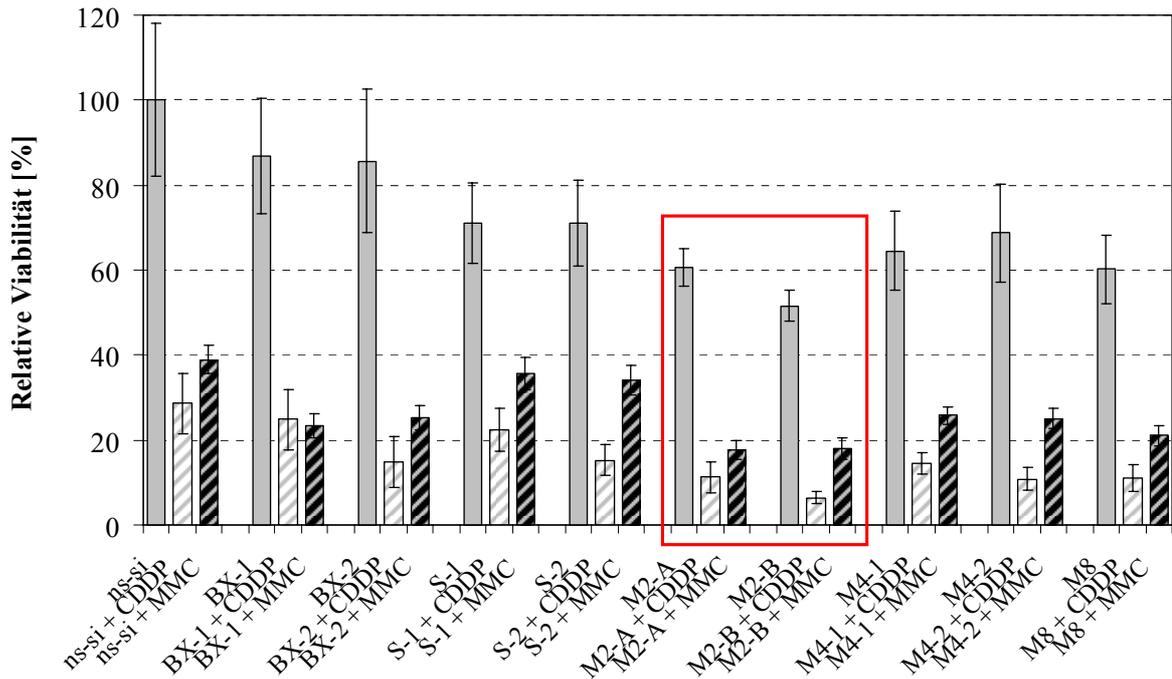


Abb. 5.1: Viabilität von EJ28-Zellen nach siRNA-Einzel- und -Kombinationsbehandlungen 96 h nach Transfektion. Die Zellen wurden mit siRNAs einer Gesamtkonzentration von 40 nM vorbehandelt und 20 h nach Transfektion mit 2,1 µg/ml Cisplatin (CDDP) bzw. 0,9 µg/ml Mitomycin C (MMC) inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte von Vierfachbestimmungen relativ zur ns-si-Kontrolle (100 %) zusammen mit den 95 %-Konfidenzintervallen.

Zudem sind nicht nur die Verminderung des Langzeitproliferationsvermögens und die Zellzyklusarretierung in den M2-A- und M2-B-Proben größer als nach simultaner Hemmung aller vier Apoptoseinhibitoren, vor allem führten diese Zweier-Kombinationsbehandlungen zu einer deutlich stärkeren Chemosensitivierung. Beispielsweise liegt die Gesamtapoptoserate in EJ28-Zellen 72 h nach Transfektion bei bis zu 94 % (M2-B+CDDP), während sie in den M4-/M8-Behandlungen nur maximal 73 % beträgt (M4-2+CDDP, vgl. Abb. 4.16 und 4.19 A). Infolgedessen verstärken sich auch die Viabilitätsabnahme (vgl. Abb. 5.1) und die Zellzahlreduktion, z.B. von max. 70 % in M4-1+MMC auf bis zu 81 % in M2-A+MMC (vgl. Abb. 4.15 und 4.19 B). Somit stellt die simultane Hemmung der Apoptoseinhibitoren *Survivin* und *BCL-XL*, je einem Mitglied der BCL2- und IAP-Familien, in Kombination mit Chemotherapie eine äußerst viel versprechende BCa-Therapieoption dar, deren Wirksamkeit im Tiermodell verifiziert werden sollte (Kapitel 5.7).

5.4.5.3 Weitere Studien zur simultane Inhibition von Apoptoseinhibitoren

Die ersten Publikationen zur simultanen Hemmung verschiedener Apoptoseinhibitoren basieren auf der Verwendung eines bispezifischen *antisense*-Oligonukleotids (ASO), welches voll-

ständig komplementär zum *BCL2*-Transkript ist und drei Fehlpaarungen zur *BCL-XL*-mRNA aufweist [Zangemeister-Wittke *et al.*, 2000]. ASOs sind kurze, 15 bis 20 Nukleotide umfassende, einzelsträngige DNA-Moleküle, deren Sequenz – analog dem siRNA-*guide*-Strang – komplementär zum Zielgenstrang gewählt wird. Nach Aufnahme dieser Konstrukte in die Zellen können ASOs u.a. über Watson-Crick-Basenpaarung an die Target-mRNA binden und die Proteinbiosynthese durch RNase H-vermittelte mRNA-Spaltung oder durch sterische Blockade des Ribosoms inhibieren [Kurreck 2003]. Aufgrund des in verschiedenen Tumorentitäten beobachteten Wechsels zwischen *BCL2*- und *BCL-XL*-Expression erscheint eine simultane Inhibition dieser Apoptoseinhibitoren äußerst sinnvoll [Arriola *et al.*, 1999; Han *et al.*, 1996]. Das bispezifische *BCL2+BCL-XL*-ASO „4625“ bewirkt in Tumorzelllinien unterschiedlichen Ursprungs (u.a. Melanom, Bronchial-, Mamma- und Prostatakarzinom) eine Expressionsminderung von *BCL2* und *BCL-XL* sowie infolge einer Induktion von Apoptose eine deutliche Reduktion der Zellproliferation [Gautschi *et al.*, 2001; Olie *et al.*, 2002; Yamanaka *et al.*, 2006; Zangemeister-Wittke *et al.*, 2000]. Zudem werden Mamma- und Prostatakarzinomzellen durch Behandlung mit 4625 gegenüber nachgeschalteten Chemotherapien sensitiviert [Simões-Wüst *et al.*, 2002; Yamanaka *et al.*, 2006]. Auch *in vivo* ruft das ASO 4625 eine deutliche Verringerung des Wachstums von Xenotransplantattumoren aus Mamma- bzw. Kolorektalkarzinomzellen hervor [Gautschi *et al.*, 2001]. In PC-3-Prostatakarzinomzellen wurde gezeigt, dass dieses bispezifische ASO neben der Reduktion der *BCL2*- und *BCL-XL*-Expression auch eine Herunterregulierung des Transkript- und Proteinniveaus von *MCL1*, eines weiteren antiapoptotischen Mitglieds der BCL2-Familie, induziert, während die Expression der proapoptotischen Gene *BAX*, *BAD* und *BAK* unverändert bleibt [Yamanaka *et al.*, 2005]. Zudem werden durch Freisetzung des IAP-Antagonisten DIABLO aus den Mitochondrien die Proteinniveaus der IAPs cIAP1, cIAP2, XIAP und Survivin vermindert sowie die Caspasen-3, -7 und -9 aktiviert [Yamanaka *et al.*, 2005].

Unter Verwendung von shRNA-Vektoren zeigen Lei *et al.* (2007), dass durch die kombinierte Reduktion von *BCL2* und *BCL-XL* Hepg2-Zellen (hepatozelluläres Karzinom) stärker gegenüber einer Chemotherapie sensitiviert werden als durch die Ausschaltung eines einzelnen dieser Zielgene. Ebenso bewirkt eine gleichzeitige Hemmung von zwei der drei Apoptoseinhibitoren *BCL2*, *BCL-XL* und *XIAP* in Chondrosarkomzellen eine Verstärkung der Radiosensitivität dieser Zellen [Kim *et al.*, 2007]. In EJ28-BCa-Zellen hingegen sind die antiproliferativen Effekte einer simultanen siRNA-vermittelten *BCL2*- und *BCL-XL*-Inhibition mit denen der Einzelbehandlungen vergleichbar [Kunze *et al.*, 2008b]. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, induziert auch die langfristige *BCL2*-Depletion in EJ28-Zellen die *BCL-XL*-Expression nicht (vgl. Kapitel 4.4). Weitere Studien zur kombinierten Hemmung dieser Zielgene in BCa-Zellen liegen nicht vor. Aus den eigenen Ergebnissen folgt daher, dass in BCa-Zelllinien, im Gegensatz zu anderen Tumorentitäten, die antitumorale Wirksamkeit der

BCL-XL-Reduktion durch eine simultane Inhibition von *BCL2* und *BCL-XL* nicht verstärkt werden kann.

Unter Verwendung von siRNAs wurden weitere Studien zur gleichzeitigen Ausschaltung mehrerer Apoptoseinhibitoren an Zellkulturmodellen verschiedener Tumorentitäten durchgeführt. So beschreiben Rückert *et al.* (2010) in Pankreaskarzinomzellen eine im Vergleich zu den jeweiligen Einzelbehandlungen stärkere Apoptoseinduktion nach gleichzeitiger Reduktion von *BCL2*, *XIAP* und *Survivin*. Ebenfalls zeigen Gill *et al.* (2009) in der Prostatakarzinomzelllinie PC-3 nach kombinierter *cIAP1*-, *cIAP2*- und *XIAP*-Hemmung eine größere Abnahme der Zellproliferation und eine stärkere Sensitivierung der Zellen auf eine Behandlung mit rekombinantem TRAIL. Yang *et al.* (2010a) belegen in T24-BCa-Zellen infolge einer deutlichen Apoptoseinduktion (ca. 30 %) nach kombinierter Inhibition der drei IAPs *LIVIN*, *XIAP* und *Survivin* eine stärkere Viabilitätsinhibition und Chemosensitivierung als in den entsprechenden Monotargetbehandlungen.

Die Resultate der veröffentlichten Studien sowie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen, dass die simultane Reduktion mehrerer Apoptoseinhibitoren in Tumorzellen deutlich stärkere antiproliferative Effekte hervorrufen kann als die Inhibition eines einzelnen antiapoptotischen Gens. In den untersuchten EJ28- und J82-BCa-Zellen tragen insbesondere *BCL-XL* und *Survivin* zum Wachstum und zum Chemotherapieansprechen der Zellen bei, so dass die kombinierte Hemmung dieser beiden Apoptoseinhibitoren *in vitro* im Vergleich zu den Einzelbehandlungen eine deutlich erhöhte antitumorale Wirksamkeit aufweist. Ob *BCL2* und *XIAP* in BCa-Zellen generell von untergeordneter Bedeutung sind oder ob die Kultur der Zellen als Monolayer mit konstanter Sauerstoff- und Nährstoffversorgung diese beiden Apoptoseinhibitoren für die Tumorzellen entbehrlich macht, sollte anhand von BCa-Zellsphäroiden analysiert werden. Zudem sollte in Folgearbeiten überprüft werden, welche Rolle weitere antiapoptotische Gene, wie z.B. *cIAP1*, *cIAP2*, *LIVIN* oder *MCL1*, in BCa-Zellen spielen und ob eine zusätzliche Ausschaltung dieser Faktoren eine Verbesserung des Therapieansatzes bewirken kann.

5.5 Transkriptomweite Genexpressionsänderungen nach siRNA-vermittelter Inhibition verschiedener Apoptoseinhibitoren

Zur Bestimmung transkriptomweiter Genexpressionsänderungen in EJ28-BCa-Zellen nach siRNA-vermittelter Inhibition von *BCL2*, *BCL-XL*, *XIAP* und *Survivin* – einzeln sowie in den M4- und M8-Kombinationen – wurden Oligonukleotid-*Microarray*-Analysen durchgeführt.

Diese Untersuchungen, bei denen parallel die Expression von 28 869 humanen Genen in einer RNA-Probe bestimmt wird, sollten klären, ob durch Hemmung eines oder mehrerer Zielgene andere apoptoseassoziierte Gene in ihrer Expression verändert werden. Ebenso sollte analysiert werden, welche weiteren targetabhängigen und -unabhängigen Änderungen durch die verwendeten siRNAs hervorgerufen werden. Um siRNA-spezifische Einflüsse zu erkennen und diese von möglichen transfektionsbedingten Effekten abzutrennen, wurden alle Expressionsdaten nach siRNA-Einzel- oder -Kombinationsbehandlungen auf die ns-si-Kontrolle bezogen.

Bei den siRNA-Einzelbehandlungen zeigte sich, dass in den beiden unabhängigen Experimenten und von beiden gegen dasselbe Zielgen gerichteten Konstrukten nur 1 - 6 Gene gleichzeitig in ihrer Expression um mindestens das 1,7fache verändert wurden (vgl. Abb. 4.20, Tab. 4.2). Für *BCL-XL* und *Survivin* konnten dabei die mittels qPCR ermittelten starken Target-mRNA-Reduktionen nach Behandlung mit den entsprechenden siRNAs in den *Microarray*-Analysen bestätigt werden (vgl. Abb. 4.5, Tab. 4.2). Da B2-1, X-1 und X-2 im Vergleich zu den anderen targetspezifischen siRNAs auf mRNA-Ebene – im Gegensatz zur Proteinebene – schwächere Expressionsänderungen hervorrufen (vgl. Abb. 4.5) und *Microarray*-Analysen eine geringere Sensitivität als die zuvor verwendeten qPCR-Messungen aufweisen [Park & Stegall, 2007], konnten für *BCL2* und *XIAP* in den *Microarray*-Untersuchungen keine den Schwellenwert übersteigenden Expressionsänderungen detektiert werden. Die Inhibition eines einzelnen Zielgens (z.B. *BCL-XL*) ruft zum analysierten Zeitpunkt, 48 h nach Transfektion, keine Veränderungen der Transkriptniveaus der anderen drei Targets (im Beispiel: *BCL2*, *XIAP* und *Survivin*) hervor. Zudem werden keine weiteren apoptoseassoziierten Gene auf mRNA-Ebene hoch- oder herunterreguliert (vgl. Kapitel 4.2.7).

Analog zu der in dieser Arbeit beobachteten geringen Anzahl differenziell exprimierter Gene nach siRNA-Transfektion (vgl. Abb. 4.20) zeigen Anderson *et al.* (2006), dass das Expressionsmuster nach siRNA-vermittelter *BCL2*-Hemmung, trotz deutlicher Targetreduktion, in PC-3-Prostatakarzinomzellen nahezu vergleichbar mit dem der Kontroll-siRNA ist. Ebenso bewirkt in Kolonkarzinomzellen selbst eine langfristige, shRNA-induzierte *XIAP*-Reduktion keine Expressionsänderungen anderer apoptoseregulierender Gene [Connolly *et al.*, 2009; Dai *et al.*, 2009]. Unter Nutzung eines speziellen Apoptose-*Microarrays* wird in T24-BCa-Zellen, im Gegensatz zu den hier an EJ28-BCa-Zellen erzielten Ergebnissen, 72 h nach siRNA-vermittelter *Survivin*-Inhibition eine Expressionsminderung von 14 apoptoseassoziierten Genen gemessen [Takizawa *et al.*, 2007]. Interessanterweise zählen dazu jedoch überwiegend apoptosefördernde Faktoren wie die Todesrezeptoren *TNF-R1* und *TNFRSF25*, zwei Caspasen sowie proapoptotische Mitglieder der BCL2-Familie: *BAK*, *BIM*, *BCL2L12* und *BCL2L13* [Takizawa *et al.*, 2007].

In den Kombinationsbehandlungen M4-1, M4-2 und M8 sind in beiden unabhängigen Experimenten 10 - 16 Gene differenziell exprimiert, von denen zwei, *HIST1H2BK* und *STC1*, in allen drei Behandlungen moduliert werden (vgl. Abb. 4.21). Auffällig ist, dass durch alle targetspezifischen siRNAs *HIST1H2BK*, ein Bestandteil der Nukleosomen, induziert wird (vgl. Tab. 4.2, Abb. 4.21). Ein Vergleich zwischen unbehandelten und ns-si-behandelten Zellen zeigt, dass *HIST1H2BK* in den ns-si-behandelten EJ28-Zellen 1,9fach herunterreguliert ist (Daten nicht gezeigt). Dies legt den Schluss nahe, dass die Expression von *HIST1H2BK* nicht infolge der Behandlung mit targetspezifischen siRNAs induziert wird, sondern vielmehr durch das Kontrollkonstrukt ns-si herunterreguliert wird. Da die Sequenz des Kontrollkonstruktes von der Fa. Eurogentec nicht veröffentlicht ist, kann nicht überprüft werden, ob ns-si teilweise komplementär zum *HIST1H2BK*-Transkript ist.

Infolge der *BCL2*- und *Survivin*-Einzelinhibition sowie in den Kombinationsbehandlungen wird *STC1* induziert (vgl. Tab. 4.2, Abb. 4.21). *STC1* ist ein Glykoprotein, welches in die Calcium- und Phosphat-Homöostase involviert ist. Zudem scheint *STC1* in die Apoptoseregulation einzugreifen. Allerdings variieren diesbezüglich die bislang veröffentlichten Ergebnisse. So wirkt *STC1* in Kolonkarzinomzellen proapoptotisch [Law *et al.*, 2008]. Ebenso wird in Knorpelzellen nach Inkubation mit rekombinantem *STC1* Apoptose induziert [Wu *et al.*, 2006]. In Ovarialkarzinomzellen hingegen führt die Überexpression von *STC1* zu einer Induktion der antiapoptotischen Proteine *BCL2* und *BCL-XL* [Liu *et al.*, 2010]. In Anbetracht der putativen Beteiligung von *STC1* bei der Apoptoseregulation sollte die Rolle dieses Genes in BCa-Zellen weiter untersucht werden. Das Semaphorin *SEMA3A* wird ebenfalls nach *BCL2*- und *Survivin*-Depletion hochreguliert (vgl. Tab. 4.2). Neben seiner Rolle in der Steuerung des Axonwachstums ist *SEMA3A* ein Angiogeneseinhibitor und beeinträchtigt das Tumorwachstum [Maione *et al.*, 2009; Schmidt & Strittmatter, 2007]. Aufgrund dessen sollte die Funktion von *SEMA3A*, insbesondere in Zusammenhang mit der *Survivin*-Inhibition, in weiterführenden Studien analysiert werden.

Die Behandlung der EJ28-Zellen mit der siRNA B2-1 führte zur Hochregulation der drei durch Stress induzierbaren Gene *IL6*, *IL8* und *TLR6* (vgl. Tab. 4.3). Ebenso induzierten die Konstrukte S-1 und S-2 das Zytokin *IL6*. Viele weitere mit einer Stressreaktion der Zelle in Verbindung stehende Gene wurden nicht beeinflusst, so dass der biologische Prozess der Stressantwort innerhalb der differenziell exprimierten Gene nicht überrepräsentiert war (Daten nicht gezeigt). Obwohl zunächst angenommen wurde, dass nur mehr als 30 Nukleotide umfassende doppelsträngige RNAs in der Zelle eine Interferonantwort auslösen können, zeigten weiterführende Studien, dass auch siRNAs dazu in der Lage sind [Elbashir *et al.*, 2001b; Sledz *et al.*, 2003]. Eine wichtige Rolle spielen dabei insbesondere die RNA-sensitiven Immunrezeptoren *TLR3*, *TLR7* und *TLR8*, die doppelsträngige RNA-bindende Proteinkinase *PKR* sowie die Helikasen *RIG-1* und *MDA5* [Kurreck, 2009]. Da sich die Expressionsmuster dieser

„siRNA-Sensoren“ zwischen Immunzellen und Nichtimmunzellen wesentlich unterscheiden [Schlee *et al.*, 2006], ist es zwingend notwendig zu überprüfen, ob die in dieser Arbeit verwendeten siRNAs *in vivo*, in immunkompetenten Versuchstieren, eine Immunaktivierung hervorrufen. Dies könnte durch Messung von Zytokinen im Blut der Versuchstiere sowie durch Quantifizierung des *IFIT1*-mRNA-Niveaus in Organen wie Leber und Niere, welche den Abbau und die Ausscheidung von Medikamenten zur Aufgabe haben, erfolgen [Jackson & Linsley, 2010]. Durch Vermeidung immunstimulatorischer Sequenzmotive innerhalb der siRNA wäre es möglich, unerwünschte Effekte auf das Immunsystem zu vermeiden [Kurreck, 2009], wobei diese bei der Behandlung von Tumorerkrankungen auch förderlich sein können [Schlee *et al.*, 2006].

5.6 Etablierung einer kombinierten siRNA- und Chemotherapiebehandlung im subkutanen EJ28-Xenotransplantatmodell

Unter Verwendung eines subkutanen EJ28-BCa-Xenotransplantatmodells in der Maus sollten die *in vitro* beobachteten deutlichen antiproliferativen Effekte nach siRNA-vermittelter Hemmung ausgewählter Apoptoseinhibitoren in Kombination mit Chemotherapie (vgl. Abb. 4.13 und 4.19 C) *in vivo* überprüft werden. Dafür war es zunächst notwendig, die siRNA- und Chemotherapieapplikation für das verwendete Tiermodell zu etablieren.

Aufgrund des hohen Molekulargewichtes (ca. 13 kDa) und der negativen Ladung des Phosphatrückgrats können siRNAs die Zellmembran in der Regel nicht eigenständig passieren [Whitehead *et al.*, 2009]. Während es *in vitro* unter Verwendung von Transfektionsmitteln, wie z.B. dem kationischen Lipid DOTAP (vgl. Kapitel 3.2.2.2), vergleichsweise einfach ist, siRNA-Moleküle effizient in die Zielzellen einzubringen, stellt dies *in vivo* zurzeit die größte Herausforderung dar, da die in der Zellkultur verwendeten Transfektionsmittel in Tier und Mensch oft toxische Nebenwirkungen induzieren [Kurreck 2009; Tiemann & Rossi, 2009]. *In vivo* werden lokale, wie z.B. die intranasale Therapeutikagabe bei Lungenerkrankungen, und systemische Applikationsformen, wie z.B. die intravenöse Injektion bei metastasierten Tumoren, voneinander unterschieden. Lokale Applikationen vereinen mehrere Vorteile. Beispielsweise sind zum Erreichen hoher lokaler Wirkstoffkonzentrationen geringere Therapeutikamengen erforderlich. Zusätzlich ist das Risiko, systemische Nebenwirkungen zu induzieren, deutlich niedriger [Shim & Kwon, 2010]. Da im Falle des BCa die klinische Anwendung der siRNA-Therapeutika zur Rezidiv- und Progressionsprophylaxe nach der Tumoresektion lokal durch intravesikale Instillation in die Harnblase erfolgen könnte, wurde in der vorliegenden

Arbeit eine lokale siRNA-Gabe etabliert (vgl. Kapitel 3.5.1). Weil in der putativen klinischen Anwendung nicht solide Karzinome, sondern vereinzelte, nach der BCa-Resektion verbliebene Tumorzellen das zu therapierende Ziel wären, erfolgte dabei eine peritumorale Wirkstoffapplikation.

Eigene Vorarbeiten zur peritumoralen Applikation einer unkomplexierten, gegen *Survivin* gerichteten siRNA im subkutanen BCa-Xenotransplantatmodell (Daten nicht gezeigt) bestätigten die bereits von Urban-Klein *et al.* (2005) für eine systemische, intraperitoneale siRNA-Gabe publizierten Ergebnisse: unkomplexierte, so genannte „nackte“ siRNAs werden häufig nicht in ausreichendem Maße in subkutane Tumor-Xenotransplantate aufgenommen. Eine Möglichkeit zur Verbesserung der siRNA-Aufnahme stellt die Komplexierung der siRNAs mit synthetischen kationischen Polymeren, z.B. Polyethylenimin (PEI), oder kationischen Polypeptiden, wie z.B. dem aus Kälberhaut extrahierten Kollagen des Typs I „Atelocollagen“, dar. So zeigen Urban-Klein *et al.* (2005) eine deutliche Wachstumsreduktion von subkutanen Ovarialkarzinomen nach intraperitonealer Injektion einer mit dem linearen PEI „*in vivo*-jetPEI“ komplexierten, gegen *ERBB2* gerichteten siRNA. Hingegen beeinflusst dieselbe, jedoch unkomplexiert applizierte siRNA die Tumorzellproliferation nicht [Urban-Klein *et al.*, 2005]. Ebenso führt sowohl die lokale als auch die systemische Applikation eines mit Atelocollagen komplexierten, gegen *BCL-XL* gerichteten siRNA-Konstrukts, im Gegensatz zur nackten siRNA, zur Verminderung des Wachstums subkutaner PC-3-Prostatakarzinom-Xenotransplantate [Mu *et al.*, 2009]. Basierend auf diesen viel versprechenden Resultaten erfolgte die Analyse von *in vivo*-jetPEI und Atelocollagen als siRNA-Carrier im subkutanen EJ28-Xenotransplantatmodell. Um die siRNA-Aufnahme und -Wirksamkeit dabei direkt nachweisen zu können, wurde für diese Untersuchungen die gegen *Survivin* gerichtete siRNA S-1, welche *in vitro* eine deutliche Reduktion der Tumorzellproliferation bewirkte (vgl. Kapitel 4.2.3), ausgewählt. Während die dreimalige peritumorale Applikation der mit Atelocollagen komplexierten siRNA S-1 das Tumorstadium nicht beeinflusste, induzierte diese siRNA in Kombination mit dem Carrier *in vivo*-jetPEI eine deutliche Reduktion des Tumorendvolumens und Tumorendgewichtes um 43 % bzw. 30 % (vgl. Kapitel 4.5.1). Infolgedessen wurde *in vivo*-jetPEI als siRNA-Carrier für die weiteren Analysen ausgewählt.

Bedingt durch die Erkenntnis, dass EJ28-BCa-Zellen trotz vorhandener Sensitivität *in vitro* (vgl. Abb. 4.13) *in vivo* nicht auf eine systemische CDDP-Behandlung ansprechen (Daten dieser Vorarbeiten nicht gezeigt), wurde die Wirksamkeit von intravenös injiziertem MMC und GEM im subkutanen EJ28-Xenotransplantatmodell überprüft. Die eingesetzten Konzentrationen von 60 mg/kg GEM bzw. 3 mg/kg MMC wurden basierend auf Literaturangaben ausgewählt [Pirollo *et al.*, 2008; Xin *et al.*, 2005]. Während GEM nur eine minimale Reduktion des Tumorstadiums bewirkte, verminderte die MMC-Behandlung das Tumorendvolumen um 87 % (vgl. Abb. 4.29). Da diese enorme Wachstumsinhibition den Nachweis einer durch eine

siRNA-Vorbehandlung verbesserten Chemotherapiewirksamkeit unmöglich macht, wurde ein zweites Experiment zur Optimierung der MMC-Konzentration durchgeführt. Die dabei verwendeten Mengen von 0,75 bzw. 1,5 mg/kg MMC pro Injektion induzierten eine vergleichbare Abnahme des Tumolvolumens um jeweils ca. 36 % (vgl. Abb. 4.29 B). Zur Erzielung einer geringfügig stärkeren Tumorwachstumshemmung wurde für die weiteren Studien eine MMC-Konzentration von 2 mg/kg festgelegt.

Basierend auf ihrer chemosensitivierenden Wirkung *in vitro* (vgl. Abb. 5.1) wurden die siRNAs BX-1, S-2 sowie die Kombinationsbehandlung M2-B für die Studien am subkutanen EJ28-Xenotransplantat-Mausmodell ausgewählt. Da die zellulären Effekte der Behandlungen M4-1 und M4-2 vergleichbar waren (vgl. Kapitel 4.2.3) und die Mischung M2-B in BCa-Zellen stärkere antiproliferative Effekte erzielte als M2-A (vgl. Kapitel 4.2.6), wurde zur simultanen Hemmung der vier Apoptoseinhibitoren *BCL2*, *BCL-XL*, *XIAP* und *Survivin in vivo* die Kombination „BX-1 + S-2 (= M2-B) + B2-2 + X-2“ eingesetzt. Im Gegensatz zu den zuvor durchgeführten Experimenten zur Etablierung der systemischen Chemotherapie, bei denen das Allgemeinbefinden der Versuchstiere durch die Behandlungen nicht beeinträchtigt wurde, traten im Experiment zur kombinierten siRNA+Chemotherapeutika-Applikation infolge der intravenösen MMC-Injektion Nekrosen am Schwanz der Mäuse auf. Aufgrund dieser erheblichen Belastungen war eine vorzeitige Euthanasie einzelner Versuchstiere unabdingbar. Die Auswertung der Daten für die verbleibenden Tiere dieses Experimentes bestätigt jedoch die *in vitro* nach *BCL-XL*-Inhibition beobachtete Verstärkung der Chemotherapiewirkung. So ist das Tumolvolumen durch BX-1+MMC-Behandlung gegenüber der Kontrollgruppe ns-si+MMC am Tag 35 um 48 % reduziert (vgl. Abb. 4.30).

Aufbauend auf der deutlichen antitumoralen Wirkung der *Survivin*-Inhibition (vgl. Abb. 4.28) und der starken Reduktion des Tumolvolumens nach BX-1+MMC-Behandlung (vgl. Abb. 4.30) sollte der Versuch zur siRNA-vermittelten Hemmung beider Apoptoseinhibitoren in Kombination mit Chemotherapie wiederholt werden. Insbesondere wird, aufgrund der *in vitro* beobachteten maximalen BCa-Wachstumshemmung nach simultaner Inhibition von *BCL-XL* und *Survivin* (vgl. Kapitel 4.2.6), die kombinierte Reduktion dieser Zielgene zusammen mit einer systemischen MMC-Behandlung als besonders viel versprechend eingeschätzt.

Publikationen, welche die simultane Hemmung verschiedener Apoptoseinhibitoren *in vivo* beschreiben, sind dem Autor nicht bekannt. Jedoch konnten durch Einzelinhibition der aussichtsreichen Kandidaten *BCL-XL* und *Survivin* in verschiedenen Tumor-Mausmodellen bereits viel versprechende Ergebnisse erzielt werden. Wie bereits erwähnt, inhibiert eine mittels Atelocollagen lokal oder systemisch applizierte, gegen *BCL-XL* gerichtete siRNA signifikant das Wachstum subkutaner Prostatakarzinome. Zusätzlich bewirkt diese siRNA eine deutliche Sensitivierung der PC-3-Tumorzellen gegenüber CDDP [Mu *et al.*, 2009]. Ebenso wird die

Proliferation subkutaner Kolonkarzinom-Xenotransplantate durch Behandlung mit einem *BCL-XL*-inhibierenden shRNA-Vektor vermindert [Zhu *et al.*, 2007]. Die RNAi-vermittelte Inhibition von *Survivin* führt in verschiedenen Tumorentitäten (hepatozelluläres Karzinom, kolorektales Karzinom und BCa) zu einer Wachstumsreduktion und kann eine Sensitivierung der Tumorzellen gegenüber Radio- und Chemotherapien induzieren [Hou *et al.*, 2006; Shen *et al.*, 2009; Song *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2010b]. Basierend auf diesen Publikationen und den eigenen Ergebnissen stellt die siRNA-vermittelte Hemmung der Apoptoseinhibitoren *BCL-XL* bzw. *Survivin* in Kombination mit konventionellen Chemotherapien eine aussichtsreiche Tumorthera­pieoption dar, deren Effektivität jedoch vor einer klinischen Phase I-Studie zunächst in weiteren *in vivo*-Studien bestätigt werden sollte. Insbesondere ist die simultane Inhibition von *BCL-XL* und *Survivin* in Kombination mit Chemotherapie im BCa-Xenotransplantatmodell zu evaluieren. Ebenso wäre zu prüfen, ob durch den Einschluss weiterer die BCa-Proliferation fördernder Targets, wie z.B. des Angiogenesefaktors *VEGF* [Donmez *et al.*, 2009; Roskoski, 2007] oder der an der Immortalisierung beteiligten Telomerase-Untereinheit *hTERT* [Artandi & DePinho, 2010; Ito *et al.*, 1998], eine Verstärkung der Therapiewirkung erzielt werden kann. So führte die simultane Inhibition von *BCL-XL*, *hTERT* und *VEGF* durch einen shRNA-Vektor bereits in *in vitro*- und *in vivo*-Studien an Plattenepithel-Karzinomzellen des Kehlkopfs zu deutlichen antitumoralen Effekten und einer stärkeren Apoptoseinduktion im Vergleich zu den entsprechenden Einzelbehandlungen [Wang *et al.*, 2008].

5.7 Molekulare und zelluläre Effekte der Hemmung von *BCL2*, *BCL-XL*, *XIAP* und *Survivin* in nichtmalignen Fibroblasten

Die als nichtmaligne Kontrollzelllinie ausgewählten humanen Vorhaut-Fibroblastenzellen exprimieren drei der vier Apoptoseinhibitoren (*BCL2*, *BCL-XL* und *Survivin*) auf einem deutlich geringeren Niveau als die BCa-Zelllinien EJ28 und J82 (vgl. Tab. 4.1). *XIAP* wird in den Fibroblasten auf einem ähnlichen Level wie in den untersuchten Tumorzellen gebildet. Die Behandlung der Fibroblastenzellen mit den targetspezifischen siRNAs induziert eine Verminderung der relativen Zielgen-mRNA-Niveaus, deren Grad mit dem der relativen Expressionsreduktion in den BCa-Zellen vergleichbar ist. Beispielsweise wird das *BCL-XL*-Transkript durch BX-2 in den Fibroblasten um 67 % und in den BCa-Zellen um ca. 71 % gesenkt (vgl. Abb. 4.23 und 4.5). Da die absoluten Expressionshöhen von *BCL2*, *BCL-XL* und *Survivin* in

der Kontrollzelllinie aber deutlich niedriger als in den BCa-Zellen sind (vgl. Tab. 4.1), ist die Expressionsminderung dieser Zielgene insgesamt geringer als in den Tumorzellen.

Die siRNA-vermittelte Hemmung von *BCL2*, *BCL-XL* und *XIAP* verändert das Wachstumsverhalten der Fibroblasten nicht (vgl. Kapitel 4.3). Jedoch induziert die *Survivin*-Inhibition infolge einer Apoptoseinduktion und eines Zellzyklusarrestes in der G2/M-Phase eine Verminderung der Zellproliferation. Eine kombinierte siRNA+Chemotherapie-Behandlung konnte in den Fibroblasten nicht analysiert werden, da diese nichtmalignen Zellen äußerst chemosensitiv sind. Trotz vieler veröffentlichter Studien zur siRNA- oder shRNA-vermittelten Reduktion der vier Zielgene in Tumorzellkulturen unterschiedlichen Ursprungs beschreiben nur wenige Publikationen, welche Effekte eine RNAi-induzierte Targetdepletion in einer nichtmalignen Zelllinie hervorruft. So wird die Viabilität der untersuchten Fibroblasten durch eine Behandlung mit einer gegen *BCL-XL* gerichteten shRNA bzw. mit einer gegen *Survivin* gerichteten siRNA nicht beeinflusst [Ning *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2007]. Eine Ursache für das unterschiedliche Ansprechen von Fibroblastenzellkulturen auf eine *Survivin*-Inhibition kann darin begründet liegen, dass diese Zellen beim Übergang von der Primärkultur in eine Zelllinie unterschiedliche genetische Veränderungen angehäuft haben und daher die *Survivin*-Expression in diesen verschiedenen Zelllinien variiert.

Survivin, welches in nahezu jedem humanen Tumor gebildet wird, ist in den meisten Normalgeweben nicht bzw. nur in sehr geringem Maße vorhanden [Caldas *et al.*, 2005]. Entsprechend wird *Survivin* auch nicht in gesundem Harnblasengewebe detektiert [Ku *et al.*, 2004; Moussa *et al.*, 2006; Shariat *et al.*, 2007; Weikert *et al.*, 2005]. Infolgedessen sollten, speziell bei einer lokalen, intravesikalen Anwendung von *Survivin*-inhibierenden Therapeutika beim Menschen, sowohl die systemischen Nebenwirkungen als auch die lokalen Nebeneffekte auf das gesunde Urothel gering sein. Dafür spricht auch, dass die siRNA-vermittelte *Survivin*-Inhibition *in vivo* keine Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens der Tiere bewirkte (vgl. Kapitel 4.5.1). Ebenso induziert eine gegen *Survivin* gerichtete siRNA nach systemischer Applikation im Tumormausmodell keine signifikanten Toxizitäten, wie z.B. Leber- oder Nierenschäden [Kunze *et al.*, 2008a].

5.8 siRNAs als Antitumorthapeutika

Theoretisch kann, bei entsprechendem Design der Konstrukte, jedes beliebige Gen durch siRNAs inhibiert werden [Whitehead *et al.*, 2009]. Als Targets für eine siRNA-vermittelte Antitumorthherapie, welche die unkontrollierte Proliferation der Tumorzellen hemmen soll, kommen insbesondere Gene in Frage, deren Expression in Tumoren im Vergleich zum Normalgewebe deutlich erhöht ist und deren Proteine eine essenzielle Rolle in der Karzino-

genese innehaben. Zu derartigen Targets zählen u.a. Gene, deren Proteine die Angiogenese, die Apoptose, die Immortalisierung oder die Metastasierung beeinflussen [Pai *et al.*, 2006]. Zudem kann die siRNA-vermittelte Geninhibition dazu beitragen, Tumorzellen gegenüber konventionellen Chemo- oder Radiotherapien zu sensitivieren [Kurreck, 2009]. Da nicht die Fehlregulation eines einzelnen Gens sondern die Anhäufung multipler genetischer Veränderungen zur Tumorentstehung und -progression führt und die Ausschaltung eines einzelnen Faktors die Abhängigkeit der Tumorzellen von anderen Signalwegen erhöhen kann, wird eine effektive und lang anhaltende Tumorthherapie voraussichtlich nur durch kombinierte Inhibition mehrerer tumorassoziierter Faktoren möglich sein [Hanahan & Weinberg, 2011].

Erste klinische Phase I-Studien (vgl. Tab. 1.3) sowie zahlreiche *in vitro*- und *in vivo*-Studien belegen das Potenzial RNAi-basierter Therapieansätze in der Tumorbehandlung [zusammengefasst in Pai *et al.*, 2006 und Phalon *et al.*, 2010]. Bevor siRNAs jedoch standardmäßig als Therapeutika in Betracht gezogen werden können, müssen zwei Kernpunkte geklärt werden: (1) die Frage nach der Spezifität der Konstrukte und (2) die effiziente Verbringung der siRNAs in die Zielzellen [Kurreck, 2009]. Wie bereits in Kapitel 5.5 erwähnt, können siRNAs das Immunsystem aktivieren. Zudem ist es möglich, dass diese Konstrukte targetunabhängige Veränderungen, so genannte *off-target*-Effekte, induzieren. Durch partielle Komplementarität der siRNA zu einer Nicht-Ziel-RNA – hierbei ist die Übereinstimmung von 11 aufeinanderfolgenden Nukleotiden ausreichend – können auch vom Target verschiedene Gene inhibiert werden [Jackson *et al.*, 2003]. Dabei ist es möglich, dass diese *off-target*-Effekte phänotypische Veränderungen, wie z.B. eine Beeinträchtigung der Zellviabilität, hervorrufen [Fedorov *et al.*, 2006]. Ebenso können Gene durch eine vollständige Homologie zwischen dem 3'-untranslatierten Bereich (3'-UTR) und der siRNA-*seed-region* (Positionen 2-7 oder 2-8 des siRNA-*guide*-Stranges) in ihrer Expression beeinflusst werden [Birmingham *et al.*, 2006]. Eine Analyse zum Auftreten aller 4096 möglichen Hexamersequenzen im 3'-UTR des humanen Transkriptoms zeigt, dass einige dieser Sequenzen selten, andere hingegen deutlich zahlreicher vorkommen und dass siRNAs, deren *seed region* komplementär zu den häufigeren Hexamersequenzen ist, wesentlich stärkere *off-target*-Effekte induzieren [Anderson *et al.*, 2008].

Aufgrund der möglichen immunstimulatorischen Aktivität von siRNAs gilt es auch zu überprüfen, inwieweit die in tierexperimentellen Studien erzielten siRNA-induzierten antiproliferativen Effekte eine Folge der Targethemmung sind. So nutzen zahlreiche Studien als Kontrollkonstrukt eine gegen *GFP* gerichtete siRNA, welche im Gegensatz zu den verwendeten targetspezifischen siRNAs nur eine geringe immunstimulatorische Wirkung zeigt [Robbins *et al.*, 2008]. Daher besteht die Möglichkeit, dass die therapeutische Wirksamkeit der targetspezifischen siRNAs nicht eine Folge der Zielgeninhibition ist, sondern die Aktivierung des Immunsystems zur Ursache hat [Robbins *et al.*, 2008]. Kleinman *et al.* (2008) belegen, dass,

analog zu den in klinischen Studien an Patienten mit altersbedingter Makuladegeneration evaluierten und gegen *VEGF* oder dessen Rezeptoren gerichteten siRNAs, im Mausmodell zur choroidalen Neovaskularisation auch zahlreiche unspezifische kleine doppelsträngige RNA-Moleküle eine antiangiogene Wirkung zeigen. Die Reduktion der Neovaskularisation ist dabei eine Folge der TLR3-Aktivierung [Kleinman *et al.*, 2008].

Es ist anzunehmen, dass siRNAs nie vollständig spezifisch sein werden. Jedoch ist es möglich, durch Einsatz geringer siRNA-Konzentrationen sowie durch ein intelligentes Design der Konstrukte Nebenwirkungen wie Immunstimulation oder *off-target*-Effekte zu reduzieren. So können häufig auftretende *seed-region*-Sequenzen oder immunstimulatorische Motive innerhalb der siRNA vermieden werden [Kurreck, 2009]. Ebenso können chemische Modifikationen, wie z.B. *locked nucleic acid* (LNA)-Modifikationen im *passenger*-Strang oder eine 2'-*O*-Methyl-Substitution an der Ribose des zweiten Nukleotids des siRNA-*guide*-Stranges, zur Minimierung der Nebenwirkungen beitragen [Elmén *et al.*, 2005; Jackson *et al.*, 2006]. Dabei ist zu beachten, dass durch die chemischen Modifikationen in der siRNA die Targethemmung nicht beeinträchtigt wird. Die targetunabhängigen Wirkungen der siRNAs müssen jedoch nicht zwangsläufig unerwünscht sein. Ähnlich wie bei der Therapie der choroidalen Neovaskularisation könnten die immunstimulatorischen, antiangiogenen Effekte bestimmter siRNAs auch in der Tumorbehandlung Vorteile bringen. So könnte beispielsweise die Neubildung von Blutgefäßen und damit die Nährstoffversorgung der Tumoren reduziert werden. Dennoch ist es unerlässlich, durch zweckmäßige Kontrollen, z.B. durch die Verwendung geeigneter Kontrollkonstrukte mit zu den Target-siRNAs vergleichbaren immunstimulatorischen Eigenschaften sowie durch Einsatz verschiedener gegen ein Zielgen gerichteter siRNA-Konstrukte, die siRNA-induzierten phänotypischen Veränderungen zu überprüfen und den siRNA-Wirkmechanismus zu charakterisieren.

Eine zentrale Herausforderung bei der Nutzung intrazellulär wirkender siRNAs zur Geninhibition *in vivo* stellt, aufgrund ihrer Größe und negativen Ladung, die Verbringung der Konstrukte in die Zielzellen dar (vgl. Kapitel 5.6). Obwohl nackte siRNAs *in vivo* nach lokaler Applikation von einigen Zellen spontan aufgenommen werden, z.B. nach intranasaler Verbringung in die Lunge [Bitko *et al.*, 2005], wird für die effektive Transfektion vieler Gewebe ein Carrier benötigt [Whitehead *et al.*, 2009]. Insbesondere bei der systemischen siRNA-Applikation sind zahlreiche Hindernisse zu überwinden. So müssen intravenös injizierte siRNAs unter Vermeidung der Aufnahme durch Phagozyten, der Degradation durch endogene Nukleasen sowie der Ausscheidung durch die Nieren (1) aus den Blutgefäßen in die extrazelluläre Matrix transportiert werden, (2) zu den Zielzellen diffundieren, (3) von diesen durch Endozytose aufgenommen und (4) aus den Endosomen freigesetzt werden [Whitehead *et al.*, 2009].

Eine Verlängerung der Halbwertszeit von siRNAs im Serum kann beispielsweise durch LNA-Modifikationen im Konstrukt erzielt werden [Elmén *et al.*, 2005]. Zur Verbesserung der Aufnahme werden siRNAs häufig mit neutralen oder kationischen Lipiden in Lipoplexen oder Liposomen komplexiert, welche zur Erhöhung der siRNA-Serumstabilität und zur Reduktion toxischer Nebenwirkungen zusätzlich mit Polyethylenglykol modifiziert werden können [Guo *et al.*, 2010; Kurreck, 2009]. Weitere viel versprechende siRNA-Carrier stellen insbesondere synthetische kationische Polymere (z.B. Polyethylenimine) und kationische Polypeptide (z.B. Atelocollagen) dar [Kurreck, 2009; Mu *et al.*, 2009]. Auch die Bindung von siRNAs an lipophile Moleküle, wie z.B. Cholesterol, kann die zelluläre Aufnahme z.B. in Leber und Jejunum verbessern [Soutschek *et al.*, 2004]. Die beste Möglichkeit zum Erreichen hoher siRNA-Konzentrationen in den Targetzellen und zur Reduktion putativer Nebenwirkungen in anderen Geweben stellt eine zelltypspezifische siRNA-Verbringung dar. Dabei können siRNAs beispielsweise an Aptamere oder Antikörper gebunden werden, welche ein Protein an der Oberfläche der Zielzellen erkennen [Chu *et al.*, 2006; Pirollo *et al.*, 2007]. Dies setzt jedoch voraus, dass ein Oberflächenprotein existiert, welches von den Targetzellen spezifisch bzw. in deutlich höherem Maße als von den Nicht-Zielzellen gebildet wird.

Den ersten Nachweis sowohl für die siRNA-Verbringung als auch für die Induktion der RNAi in Tumorzellen nach systemischer Applikation einer gegen *RRM2* gerichteten siRNA im Menschen liefern Davis *et al.* (2010). In dieser klinischen Studie mit drei Melanompatienten wurden die siRNAs in Nanopartikel aus Cyclodextrin-basiertem Polymer und Adamantan-gekoppeltem Polyethylenglykol verpackt. Für einen zielgerichteten Transport waren die Nanopartikel zudem mit dem Protein Transferrin, welches an den in Tumorzellen verstärkt gebildeten Transferrinrezeptor bindet, beladen. In den nach intravenöser siRNA-Injektion entnommenen Tumorbiopsien konnten intrazelluläre Nanopartikel nachgewiesen werden, deren Menge mit der applizierten Dosis korreliert. Zudem konnte sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene eine Reduktion der Expression des Zielgens *RRM2* detektiert werden [Davis *et al.*, 2010]. Diese viel versprechende Studie zeigt, dass bei einer systemischen siRNA-Applikation im Menschen eine Aufnahme wirksamer siRNA-Konstrukte in die Zielzellen erreicht werden kann. Gelingt es, die Kernpunkte der RNAi, d.h. die siRNA-Spezifität und -Aufnahme zu optimieren, könnten siRNAs geeignete Werkzeuge für eine spezifische Tumorthherapie darstellen.

6 Zusammenfassung

Das Harnblasenkarzinom (BCa) stellt in Deutschland die zehnthäufigste krebbedingte Todesursache bei Männern dar. Nichtmuskelinvasive BCa werden organerhaltend aus der Blasenwand reseziert und zur Rezidiv- und Progressionsprophylaxe mittels intravesikaler Chemo- oder Immuntherapien behandelt. Trotz dieser adjuvanten Therapien, die mit starken Nebenwirkungen verbunden sein können, ist nur eine bedingte Minimierung des Rezidivrisikos möglich. Besonders im fortgeschrittenen Stadium weisen Harnblasenkarzinome eine schlechte Prognose auf. Obwohl das BCa eine chemosensitive Erkrankung darstellt, wird das Ansprechen auf lokale oder systemische Chemotherapien durch auftretende Resistenzmechanismen limitiert. Daher stehen sowohl die Verbesserung konventioneller Chemotherapien als auch die Suche nach neuartigen Behandlungsstrategien im Fokus der experimentellen BCa-Forschung.

Die Apoptose, eine Form des programmierten Zelltodes, ist ein essenzieller biologischer Prozess, welcher der Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase dient und in Tumoren häufig fehlreguliert ist. Eine Ursache dafür ist die verstärkte Expression von Apoptoseinhibitoren wie *BCL2*, *BCL-XL*, *XIAP* und *Survivin*, welche zudem mit dem Auftreten von Chemotherapie-resistenzen assoziiert sein kann. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass insbesondere die siRNA-vermittelte Hemmung von *BCL-XL* und *Survivin* in den BCa-Zelllinien EJ28 und J82 antiproliferative Effekte hervorruft und diese Tumorzellen gegenüber einer nachgeschalteten Chemotherapie mit Mitomycin C oder Cisplatin sensitiviert. Hingegen bewirkte sowohl die transiente als auch die stabile RNAi-induzierte Hemmung von *BCL2* und *XIAP* in den untersuchten BCa-Monolayerzellkulturen, möglicherweise infolge kontinuierlicher Versorgung der Tumorzellen mit Sauerstoff und Nährstoffen, keine Reduktion des Tumorwachstums.

Eine gegenüber den Einzelbehandlungen deutliche Verstärkung der antitumoralen und insbesondere der chemosensitivierenden Effekte in den BCa-Zelllinien wurde durch simultane Hemmung von *BCL-XL* und *Survivin* erzielt. Beispielsweise stieg der Anteil apoptotischer Zellen von 64 % nach *Survivin*-siRNA+Cisplatin-Behandlung auf 94 % nach gleichzeitiger *BCL-XL*+*Survivin*-Inhibition in Kombination mit Cisplatin. Folglich stellt die simultane Inhibition von *BCL-XL* und *Survivin* in Kombination mit Chemotherapeutika eine äußerst viel versprechende BCa-Therapieoption dar. Tierexperimentelle Studien belegen die wachstumshemmende Wirkung der *Survivin*-Reduktion und der kombinierten *BCL-XL*-siRNA+Chemotherapie-Behandlung, so wurde das Tumorendvolumen im Vergleich zur Kontrollbehandlung um 43 % bzw. um 48 % reduziert.

7 Literaturverzeichnis

- Aagaard L, Rossi JJ: RNAi therapeutics: principles, prospects and challenges. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007; 59: 75-86.
- Adams J, Cuthbert-Heavens D, Bass S, Knowles MA: Infrequent mutation of TRAIL receptor 2 (TRAIL-R2/DR5) in transitional cell carcinoma of the bladder with 8p21 loss of heterozygosity. *Cancer Lett.* 2005; 220: 137-44.
- Affymetrix. GeneChip expression analysis - data analysis fundamentals, 2004.
- Agarwal N, Hussain M: Management of bladder cancer: current and emerging strategies. *Drugs.* 2009; 69: 1173-87.
- Ameres SL, Martinez J, Schroeder R: Molecular basis for target RNA recognition and cleavage by human RISC. *Cell.* 2007; 130: 101-12.
- Anderson EM, Miller P, Ilsley D, Marshall W, Khvorova A, Stein CA, Benimetskaya L: Gene profiling study of G3139- and Bcl-2-targeting siRNAs identifies a unique G3139 molecular signature. *Cancer Gene Ther.* 2006; 13: 406-14.
- Anderson EM, Birmingham A, Baskerville S, Reynolds A, Maksimova E, Leake D, Fedorov Y, Karpilow J, Khvorova A: Experimental validation of the importance of seed complement frequency to siRNA specificity. *RNA.* 2008; 14: 853-61.
- Aouacheria A, Cibiel A, Guillemain Y, Gillet G, Lalle P: Modulating mitochondria-mediated apoptotic cell death through targeting of Bcl-2 family proteins. *Recent Pat DNA Gene Seq.* 2007; 1: 43-61.
- Arriola EL, Rodriguez-Lopez AM, Hickman JA, Chresta CM: Bcl-2 overexpression results in reciprocal downregulation of Bcl-X(L) and sensitizes human testicular germ cell tumours to chemotherapy-induced apoptosis. *Oncogene.* 1999; 18: 1457-64.
- Artandi SE, DePinho RA: Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis.* 2010; 31: 9-18.
- Atlasi Y, Mowla SJ, Ziaee SA: Differential expression of survivin and its splice variants, survivin-DeltaEx3 and survivin-2B, in bladder cancer. *Cancer Detect Prev.* 2009; 32: 308-13.
- Babjuk M, Oosterlinck W, Sylvester R, Kaasinen E, Böhle A, Palou J, Rouprêt M: Guidelines on non-muscle invasive bladder cancer (TaT1 and CIS). 2011. <http://www.uroweb.org>; Stand 16.05.2011.
- Bartlett DW, Davis ME: Insights into the kinetics of siRNA-mediated gene silencing from live-cell and live-animal bioluminescent imaging. *Nucleic Acids Res.* 2006; 34: 322-33.
- Bilim V, Kasahara T, Hara N, Takahashi K, Tomita Y: Role of XIAP in the malignant phenotype of transitional cell cancer (TCC) and therapeutic activity of XIAP antisense oligonucleotides against multidrug-resistant TCC in vitro. *Int J Cancer.* 2003; 103: 29-37.
- Billerey C, Chopin D, Aubriot-Lorton MH, Ricol D, Gil Diez de Medina S, Van Rhijn B, Bralet MP, Lefrere-Belda MA, Lahaye JB, Abbou CC, Bonaventure J, Zafrani ES, van der Kwast T, Thiery JP, Radvanyi F: Frequent FGFR3 mutations in papillary non-invasive bladder (pTa) tumors. *Am J Pathol.* 2001; 158: 1955-9.
- Birmingham A, Anderson EM, Reynolds A, Ilsley-Tyree D, Leake D, Fedorov Y, Baskerville S, Maksimova E, Robinson K, Karpilow J, Marshall WS, Khvorova A: 3' UTR seed matches, but not overall identity, are associated with RNAi off-targets. *Nat Methods.* 2006; 3: 199-204.
- Bitko V, Musiyenko A, Shulyayeva O, Barik S: Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA. *Nat Med.* 2005; 11: 50-5.
- Blaveri E, Brewer JL, Roydasgupta R, Fridlyand J, DeVries S, Koppie T, Pejavar S, Mehta K, Carroll P, Simko JP, Waldman FM: Bladder cancer stage and outcome by array-based comparative genomic hybridization. *Clin Cancer Res.* 2005; 11: 7012-22.
- Burz C, Berindan-Neagoe I, Balacescu O, Irimie A: Apoptosis in cancer: key molecular signaling pathways and therapy targets. *Acta Oncol.* 2009; 48: 811-21.

- Caldas H, Jiang Y, Holloway MP, Fangusaro J, Mahotka C, Conway EM, Altura RA: Survivin splice variants regulate the balance between proliferation and cell death. *Oncogene*. 2005; 24: 1994-2007.
- Carthew RW, Sontheimer EJ: Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*. 2009; 136: 642-55.
- Castanotto D, Sakurai K, Lingeman R, Li H, Shively L, Aagaard L, Soifer H, Gatignol A, Riggs A, Rossi JJ: Combinatorial delivery of small interfering RNAs reduces RNAi efficacy by selective incorporation into RISC. *Nucleic Acids Res*. 2007; 35: 5154-64.
- Castillo-Martin M, Domingo-Domenech J, Karni-Schmidt O, Matos T, Cordon-Cardo C: Molecular pathways of urothelial development and bladder tumorigenesis. *Urol Oncol*. 2010; 28: 401-8.
- Chai J, Shiozaki E, Srinivasula SM, Wu Q, Datta P, Alnemri ES, Shi Y: Structural basis of caspase-7 inhibition by XIAP. *Cell*. 2001; 104: 769-80.
- Chiong E, Esuvaranathan K: New therapies for non-muscle-invasive bladder cancer. *World J Urol*. 2010; 28: 71-8.
- Chipuk JE, Moldoveanu T, Llambi F, Parsons MJ, Green DR: The BCL-2 family reunion. *Mol Cell*. 2010; 37: 299-310.
- Cho HJ, Kim JK, Kim KD, Yoon HK, Cho MY, Park YP, Jeon JH, Lee ES, Byun SS, Lim HM, Song EY, Lim JS, Yoon DY, Lee HG, Choe YK: Upregulation of Bcl-2 is associated with cisplatin-resistance via inhibition of Bax translocation in human bladder cancer cells. *Cancer Lett*. 2006; 237: 56-66.
- Chu TC, Twu KY, Ellington AD, Levy M: Aptamer mediated siRNA delivery. *Nucleic Acids Res*. 2006; 34: e73.
- Connolly K, Mitter R, Muir M, Jodrell D, Guichard S: Stable XIAP knockdown clones of HCT116 colon cancer cells are more sensitive to TRAIL, taxanes and irradiation in vitro. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2009; 64: 307-16.
- Cooke PW, James ND, Ganesan R, Burton A, Young LS, Wallace DM: Bcl-2 expression identifies patients with advanced bladder cancer treated by radiotherapy who benefit from neoadjuvant chemotherapy. *BJU Int*. 2000; 85: 829-35.
- Cordon-Cardo C, Wartinger D, Petrylak D, Dalbagni G, Fair WR, Fuks Z, Reuter VE: Altered expression of the retinoblastoma gene product: prognostic indicator in bladder cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1992; 84: 1251-6.
- Cory S, Huang DC, Adams JM: The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene*. 2003; 22: 8590-607.
- Crook NE, Clem RJ, Miller LK: An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J Virol*. 1993; 67: 2168-74.
- Dai Y, Qiao L, Chan KW, Yang M, Ye J, Zhang R, Ma J, Zou B, Lam CS, Wang J, Pang R, Tan VP, Lan HY, Wong BC: Adenovirus-mediated down-regulation of X-linked inhibitor of apoptosis protein inhibits colon cancer. *Mol Cancer Ther*. 2009; 8: 2762-70.
- Dallas A, Vlassov AV: RNAi: a novel antisense technology and its therapeutic potential. *Med Sci Monit*. 2006; 12: RA67-74.
- Daniel P: Molekulare Grundlagen der Apoptose. 2008; In: Ganten D, Ruckpaul K, Grundlagen der Molekularen Medizin, 3. Auflage. Springer Medizin Verlag, Heidelberg.
- Davis ME, Zuckerman JE, Choi CH, Seligson D, Tolcher A, Alabi CA, Yen Y, Heidel JD, Ribas A: Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles. *Nature*. 2010; 464: 1067-70.
- Deveraux QL, Reed JC: IAP family proteins—suppressors of apoptosis. *Genes Dev*. 1999; 13: 239-52.
- Dohi T, Okada K, Xia F, Wilford CE, Samuel T, Welsh K, Marusawa H, Zou H, Armstrong R, Matsuzawa S, Salvesen GS, Reed JC, Altieri DC: An IAP-IAP complex inhibits apoptosis. *J Biol Chem*. 2004; 279: 34087-90.
- Donmez G, Sullu Y, Baris S, Yildiz L, Aydin O, Karagoz F, Kandemir B: Vascular endothelial growth factor (VEGF), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), and thrombospondin-1 (TSP-1) expression in urothelial carcinomas. *Pathol Res Pract*. 2009; 205: 854-7.
- Dubrez-Daloz L, Dupoux A, Cartier J: IAPs: more than just inhibitors of apoptosis proteins. *Cell Cycle*. 2008; 7: 1036-46.

- Duggan BJ, Kelly JD, Keane PF, Johnston SR: Molecular targets for the therapeutic manipulation of apoptosis in bladder cancer. *J Urol.* 2001; 165: 946-54.
- Eckelman BP, Salvesen GS, Scott FL: Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family. *EMBO Rep.* 2006; 7: 988-94.
- Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T: RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* 2001a; 15: 188-200.
- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T: Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature.* 2001b; 411: 494-8.
- Elmén J, Thonberg H, Ljungberg K, Frieden M, Westergaard M, Xu Y, Wahren B, Liang Z, Ørum H, Koch T, Wahlestedt C: Locked nucleic acid (LNA) mediated improvements in siRNA stability and functionality. *Nucleic Acids Res.* 2005; 33: 439-47.
- Fedorov Y, Anderson EM, Birmingham A, Reynolds A, Karpilow J, Robinson K, Leake D, Marshall WS, Khvorova A: Off-target effects by siRNA can induce toxic phenotype. *RNA.* 2006; 12: 1188-96.
- Froehner M, Gaertner HJ, Manseck A, Wirth MP: Durable complete remission of metastatic sarcomatoid carcinoma of the bladder with cisplatin and gemcitabine in an 80-year-old man. *Urology.* 2001; 58: 799i-iii.
- Fuessel S, Kueppers B, Ning S, Kotzsch M, Kraemer K, Schmidt U, Meye A, Wirth MP: Systematic in vitro evaluation of survivin directed antisense oligodeoxynucleotides in bladder cancer cells. *J Urol.* 2004; 171: 2471-6.
- Fuessel S, Kunze D, Kraemer K, Schwenzer B, Meye A, Wirth MP: Chemosensitization of human bladder cancer cells by pre-treatment with nucleic acid inhibitors: antiproliferative effects and specificity. 2006a; In: Bonavida B, Chemo-immunosensitization of resistant tumor cells to apoptosis. Transworld Research Network, Kerala, Indien.
- Fuessel S, Herrmann J, Ning S, Kotzsch M, Kraemer K, Schmidt U, Hakenberg OW, Wirth MP, Meye A: Chemosensitization of bladder cancer cells by survivin-directed antisense oligodeoxynucleotides and siRNA. *Cancer Lett.* 2006b; 232: 243-54.
- Gabriel U, Bolenz C, Becker A, Schaaf A, Steidler A, Trojan L, Weiss C, Michel MS: Evaluation of cytotoxic effects induced by bcl-2 and bcl-xL antisense-oligodeoxynucleotides in normal urothelium and transitional cell carcinoma. *Oncol Rep.* 2008; 20: 1419-23.
- Gallardo-Pérez JC, Espinosa M, Ceballos-Cancino G, Daniel A, Rodríguez-Enríquez S, Aviles A, Moreno-Sánchez R, Melendez-Zajgla J, Maldonado V: NF-kappa B is required for the development of tumor spheroids. *J Cell Biochem.* 2009; 108: 169-80.
- Gasión JP, Cruz JF: Improving efficacy of intravesical chemotherapy. *Eur Urol.* 2006; 50: 225-34.
- Gautschi O, Tschopp S, Olie RA, Leech SH, Simões-Wüst AP, Ziegler A, Baumann B, Odermatt B, Hall J, Stahel RA, Zangemeister-Wittke U: Activity of a novel bcl-2/bcl-xL-bispecific antisense oligonucleotide against tumors of diverse histologic origins. *J Natl Cancer Inst.* 2001; 93: 463-71.
- Gazzaniga P, Gradilone A, Silvestri I, Gandini O, Giuliani L, Vincenzoni A, Gallucci M, Frati L, Agliano AM: Variable levels of bcl-2, bcl-x and bax mRNA in bladder cancer progression. *Oncol Rep.* 1998; 5: 901-4.
- Gazzaniga P, Gradilone A, Giuliani L, Gandini O, Silvestri I, Nofroni I, Saccani G, Frati L, Aglianò AM: Expression and prognostic significance of LIVIN, SURVIVIN and other apoptosis-related genes in the progression of superficial bladder cancer. *Ann Oncol.* 2003; 14: 85-90.
- Gerl R, Vaux DL: Apoptosis in the development and treatment of cancer. *Carcinogenesis.* 2005; 26: 263-70.
- George J, Banik NL, Ray SK: Bcl-2 siRNA augments taxol mediated apoptotic death in human glioblastoma U138MG and U251MG cells. *Neurochem Res.* 2009; 34: 66-78.
- Giagkousiklidis S, Vellanki SH, Debatin KM, Fulda S: Sensitization of pancreatic carcinoma cells for gamma-irradiation-induced apoptosis by XIAP inhibition. *Oncogene.* 2007; 26: 7006-16.
- Gill C, Dowling C, O'Neill AJ, Watson RW: Effects of cIAP-1, cIAP-2 and XIAP triple knockdown on prostate cancer cell susceptibility to apoptosis, cell survival and proliferation. *Mol Cancer.* 2009; 8: 39-50.
- Giodini A, Kallio MJ, Wall NR, Gorbsky GJ, Tognin S, Marchisio PC, Symons M, Altieri DC: Regulation of microtubule stability and mitotic progression by survivin. *Cancer Res.* 2002; 62: 2462-7.
- Glick SH, Howell LP, White RW: Relationship of p53 and bcl-2 to prognosis in muscle-invasive transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol.* 1996; 155: 1754-7.

- Griffith TS, Kucaba TA, O'Donnell MA, Burns J, Benetatos C, McKinlay MA, Condon S, Chunduru S: Sensitization of human bladder tumor cells to TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis with a small molecule IAP antagonist. *Apoptosis*. 2011; 16: 13-26.
- Gschwind A, Fischer OM, Ullrich A: The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2004; 4: 361-70.
- Guo P, Coban O, Snead NM, Trebley J, Hoepflich S, Guo S, Shu Y: Engineering RNA for targeted siRNA delivery and medical application. *Adv Drug Deliv Rev*. 2010; 62: 650-66.
- Haldar S, Negrini M, Monne M, Sabbioni S, Croce CM: Down-regulation of bcl-2 by p53 in breast cancer cells. *Cancer Res*. 1994; 54: 2095-7.
- Han Z, Chatterjee D, Early J, Pantazis P, Hendrickson EA, Wyche JH: Isolation and characterization of an apoptosis-resistant variant of human leukemia HL-60 cells that has switched expression from Bcl-2 to Bcl-xL. *Cancer Res*. 1996; 56: 1621-8.
- Hanahan D, Weinberg RA: Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011; 144: 646-74.
- Hao JH, Gu QL, Liu BY, Li JF, Chen XH, Ji YB, Zhu ZG, Lin YZ: Inhibition of the proliferation of human gastric cancer cells SGC-7901 in vitro and in vivo using Bcl-2 siRNA. *Chin Med J (Engl)*. 2007; 120: 2105-11.
- Hartmann A, Rösner U, Schlake G, Dietmaier W, Zaak D, Hofstaedter F, Knuechel R: Clonality and genetic divergence in multifocal low-grade superficial urothelial carcinoma as determined by chromosome 9 and p53 deletion analysis. *Lab Invest*. 2000; 80: 709-18.
- Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M: Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*. 1997; 387: 296-9.
- Hausladen DA, Wheeler MA, Altieri DC, Colberg JW, Weiss RM: Effect of intravesical treatment of transitional cell carcinoma with bacillus Calmette-Guerin and mitomycin C on urinary survivin levels and outcome. *J Urol*. 2003; 170: 230-4.
- Hickman ES, Moroni MC, Helin K: The role of p53 and pRB in apoptosis and cancer. *Curr Opin Genet Dev*. 2002; 12: 60-6.
- Hoffman WH, Biade S, Zilfou JT, Chen J, Murphy M: Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53. *J Biol Chem*. 2002; 277: 3247-57.
- Hou JQ, He J, Wang XL, Wen DG, Chen ZX: Effect of small interfering RNA targeting survivin gene on biological behaviour of bladder cancer. *Chin Med J (Engl)*. 2006; 119: 1734-9.
- Hunter AM, LaCasse EC, Korneluk RG: The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets. *Apoptosis*. 2007; 12: 1543-68.
- Hussain SA, Ganesan R, Hiller L, Cooke PW, Murray P, Young LS, James ND: BCL2 expression predicts survival in patients receiving synchronous chemoradiotherapy in advanced transitional cell carcinoma of the bladder. *Oncol Rep*. 2003; 10: 571-6.
- Irmeler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, Bodmer JL, Schröter M, Burns K, Mattmann C, Rimoldi D, French LE, Tschopp J: Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature*. 1997; 388: 190-5.
- Ito H, Kyo S, Kanaya T, Takakura M, Inoue M, Namiki M: Expression of human telomerase subunits and correlation with telomerase activity in urothelial cancer. *Clin Cancer Res*. 1998; 4: 1603-8.
- Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, Kobayashi SV, Burchard J, Mao M, Li B, Cavet G, Linsley PS: Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol*. 2003; 21: 635-7.
- Jackson AL, Burchard J, Leake D, Reynolds A, Schelter J, Guo J, Johnson JM, Lim L, Karpilow J, Nichols K, Marshall W, Khvorova A, Linsley PS: Position-specific chemical modification of siRNAs reduces "off-target" transcript silencing. *RNA*. 2006; 12: 1197-205.
- Jackson AL, Linsley PS: Recognizing and avoiding siRNA off-target effects for target identification and therapeutic application. *Nat Rev Drug Discov*. 2010; 9: 57-67.
- Jacobs BL, Lee CT, Montie JE: Bladder cancer in 2010: how far have we come? *CA Cancer J Clin*. 2010; 60: 244-72.
- Jebar AH, Hurst CD, Tomlinson DC, Johnston C, Taylor CF, Knowles MA: FGFR3 and Ras gene mutations are mutually exclusive genetic events in urothelial cell carcinoma. *Oncogene*. 2005; 24: 5218-25.

- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D: Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011; 61: 69-90.
- Jeyaprakash AA, Klein UR, Lindner D, Ebert J, Nigg EA, Conti E: Structure of a Survivin-Borealin-INCENP core complex reveals how chromosomal passengers travel together. *Cell.* 2007; 131: 271-85.
- Johnstone RW, Ruefli AA, Lowe SW: Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell.* 2002; 108:153-64.
- Jönsson G, Paulie S, Grandien A: cIAP-2 block apoptotic events in bladder cancer cells. *Anticancer Res.* 2003; 23: 3311-6.
- Kappler M, Taubert H, Bartel F, Blümke K, Panian M, Schmidt H, Dunst J, Bache M: Radiosensitization, after a combined treatment of survivin siRNA and irradiation, is correlated with the activation of caspases 3 and 7 in a wt-p53 sarcoma cell line, but not in a mt-p53 sarcoma cell line. *Oncol Rep.* 2005; 13: 167-72.
- Karam JA, Lotan Y, Karakiewicz PI, Ashfaq R, Sagalowsky AI, Roehrborn CG, Shariat SF: Use of combined apoptosis biomarkers for prediction of bladder cancer recurrence and mortality after radical cystectomy. *Lancet Oncol.* 2007a; 8: 128-36.
- Karam JA, Lotan Y, Ashfaq R, Sagalowsky AI, Shariat SF: Survivin expression in patients with non-muscle-invasive urothelial cell carcinoma of the bladder. *Urology.* 2007b; 70: 482-6.
- Kim DW, Seo SW, Cho SK, Chang SS, Lee HW, Lee SE, Block JA, Hei TK, Lee FY: Targeting of cell survival genes using small interfering RNAs (siRNAs) enhances radiosensitivity of Grade II chondrosarcoma cells. *J Orthop Res.* 2007; 25: 820-8.
- Kim DH, Rossi JJ: Strategies for silencing human disease using RNA interference. *Nat Rev Genet.* 2007; 8: 173-84.
- Kleinman ME, Yamada K, Takeda A, Chandrasekaran V, Nozaki M, Baffi JZ, Albuquerque RJ, Yamasaki S, Itaya M, Pan Y, Appukuttan B, Gibbs D, Yang Z, Karikó K, Ambati BK, Wilgus TA, DiPietro LA, Sakurai E, Zhang K, Smith JR, Taylor EW, Ambati J: Sequence- and target-independent angiogenesis suppression by siRNA via TLR3. *Nature.* 2008; 452: 591-7.
- Korkolopoulou P, Lazaris ACh, Konstantinidou AE, Kavantzias N, Patsouris E, Christodoulou P, Thomas-Tsagli E, Davaris P: Differential expression of bcl-2 family proteins in bladder carcinomas. Relationship with apoptotic rate and survival. *Eur Urol.* 2002; 41: 274-83.
- Korsmeyer SJ, Wei MC, Saito M, Weiler S, Oh KJ, Schlesinger PH: Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death Differ.* 2000; 7: 1166-73.
- Kraemer K, Schmidt U, Fuessel S, Herr A, Wirth MP, Meye A: Microarray analyses in bladder cancer cells: inhibition of hTERT expression down-regulates EGFR. *Int J Cancer.* 2006; 119: 1276-84.
- Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C: Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev.* 2007; 87: 99-163.
- Ku JH, Kwak C, Lee HS, Park HK, Lee E, Lee SE: Expression of survivin, a novel inhibitor of apoptosis, in superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol.* 2004; 171: 631-5.
- Ku JH, Seo SY, Kwak C, Kim HH: Cytotoxicity and apoptosis by survivin small interfering RNA in bladder cancer cells. *BJU Int.* 2010; 106: 1812-6.
- Kucharczak J, Simmons MJ, Fan Y, Gélinas C: To be, or not to be: NF-kappaB is the answer-role of Rel/NF-kappaB in the regulation of apoptosis. *Oncogene.* 2003; 22: 8961-82.
- Kunze D, Wuttig D, Kausch I, Blietz C, Blumhoff L, Burmeister Y, Kraemer K, Fuessel S, Toma M, Schwenzer B, Meye A, Grimm MO, Hakenberg OW, Jocham D, Wirth MP: Antisense-mediated inhibition of survivin, hTERT and VEGF in bladder cancer cells in vitro and in vivo. *Int J Oncol.* 2008a; 32: 1049-56.
- Kunze D, Wuttig D, Fuessel S, Kraemer K, Kotzsch M, Meye A, Grimm MO, Hakenberg OW, Wirth MP: Multitarget siRNA inhibition of antiapoptotic genes (XIAP, BCL2, BCL-X(L)) in bladder cancer cells. *Anticancer Res.* 2008b; 28: 2259-63.
- Kunze D, Kraemer K, Fuessel S: Antisense Oligonucleotides: Insights from Preclinical Studies and Clinical Trials. 2010; In: Erdmann VA, Barciszewski J, RNA Technologies and Their Applications, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

- Kurreck J: Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. *Eur J Biochem.* 2003; 270: 1628-44.
- Kurreck J: RNA interference: from basic research to therapeutic applications. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2009; 48: 1378-98.
- Law AY, Lai KP, Lui WC, Wan HT, Wong CK: Histone deacetylase inhibitor-induced cellular apoptosis involves stanniocalcin-1 activation. *Exp Cell Res.* 2008; 314: 2975-84.
- Lebedeva I, Raffo A, Rando R, Ojwang J, Cossum P, Stein CA: Chemosensitization of bladder carcinoma cells by bcl-xL antisense oligonucleotides. *J Urol.* 2001; 166: 461-9.
- Lee SH, Shin MS, Park WS, Kim SY, Dong SM, Pi JH, Lee HK, Kim HS, Jang JJ, Kim CS, Kim SH, Lee JY, Yoo NJ: Alterations of Fas (APO-1/CD95) gene in transitional cell carcinomas of urinary bladder. *Cancer Res.* 1999; 59: 3068-72.
- Lei XY, Zhong M, Feng LF, Yan CY, Zhu BY, Tang SS, Liao DF: Silencing of Bcl-XL expression in human MGC-803 gastric cancer cells by siRNA. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2005; 37: 555-60.
- Lei XY, Zhong M, Feng LF, Zhu BY, Tang SS, Liao DF: Bcl-XL small interfering RNA enhances sensitivity of Hepg2 hepatocellular carcinoma cells to 5-fluorouracil and hydroxycamptothecin. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2006; 38: 704-10.
- Lei XY, Zhong M, Feng LF, Zhu BY, Tang SS, Liao DF: siRNA-mediated Bcl-2 and Bcl-xl gene silencing sensitizes human hepatoblastoma cells to chemotherapeutic drugs. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2007; 34: 450-6.
- Letai A, Bassik MC, Walensky LD, Sorcinelli MD, Weiler S, Korsmeyer SJ: Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell.* 2002; 2: 183-92.
- Li F, Ambrosini G, Chu EY, Plescia J, Tognin S, Marchisio PC, Altieri DC: Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature.* 1998; 396: 580-4.
- Li Y, Jian Z, Xia K, Li X, Lv X, Pei H, Chen Z, Li J: XIAP is related to the chemoresistance and inhibited its expression by RNA interference sensitizes pancreatic carcinoma cells to chemotherapeutics. *Pancreas.* 2006; 32: 288-96.
- Li F, Brattain MG: Role of the Survivin gene in pathophysiology. *Am J Pathol.* 2006; 169: 1-11.
- Li M, Song T, Yin ZF, Na YQ: XIAP as a prognostic marker of early recurrence of nonmuscular invasive bladder cancer. *Chin Med J (Engl).* 2007; 120: 469-73.
- Linja MJ, Savinainen KJ, Saramaki OR, Tammela TL, Vessella RL, Visakorpi T: Amplification and overexpression of androgen receptor gene in hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res.* 2001; 61: 3550-5.
- Liu F, He CW, Zhang YF, Zhou KY: RNA interference by expression of short hairpin RNAs suppresses bcl-xL gene expression in nasopharyngeal carcinoma cells. *Acta Pharmacol Sin.* 2005; 26: 228-34.
- Liu HB, Kong CZ, Zeng Y, Liu XK, Bi JB, Jiang YJ, Han S: Livin may serve as a marker for prognosis of bladder cancer relapse and a target of bladder cancer treatment. *Urol Oncol.* 2009; 27: 277-83.
- Liu G, Yang G, Chang B, Mercado-Urbe I, Huang M, Zheng J, Bast RC, Lin SH, Liu J: Stanniocalcin 1 and ovarian tumorigenesis. *J Natl Cancer Inst.* 2010; 102: 812-27.
- Liukkonen TJ, Lipponen PK, Helle M, Jauhiainen KE: Immunoreactivity of bcl-2, p53 and EGFr is associated with tumor stage, grade and cell proliferation in superficial bladder cancer. Finnbladder III Group. *Urol Res.* 1997; 25: 1-7.
- López-Fraga M, Wright N, Jiménez A: RNA interference-based therapeutics: new strategies to fight infectious disease. *Infect Disord Drug Targets.* 2008; 8: 262-73.
- Lu M, Lin SC, Huang Y, Kang YJ, Rich R, Lo YC, Myszkowski D, Han J, Wu H: XIAP induces NF-kappaB activation via the BIR1/TAB1 interaction and BIR1 dimerization. *Mol Cell.* 2007; 26: 689-702.
- Lukiw WJ, Bazan NG: Inflammatory, apoptotic, and survival gene signaling in Alzheimer's disease. A review on the bioactivity of neuroprotectin D1 and apoptosis. *Mol Neurobiol.* 2010; 42: 10-6.
- Maione F, Molla F, Meda C, Latini R, Zentilin L, Giacca M, Seano G, Serini G, Bussolino F, Giraud E: Semaphorin 3A is an endogenous angiogenesis inhibitor that blocks tumor growth and normalizes tumor vasculature in transgenic mouse models. *J Clin Invest.* 2009; 119: 3356-72.

- Margulis V, Lotan Y, Shariat SF: Survivin: a promising biomarker for detection and prognosis of bladder cancer. *World J Urol.* 2008; 26: 59-65.
- Maslon MM, Hupp TR: Drug discovery and mutant p53. *Trends Cell Biol.* 2010; 20: 542-55.
- McKnight JJ, Gray SB, O'Kane HF, Johnston SR, Williamson KE: Apoptosis and chemotherapy for bladder cancer. *J Urol.* 2005; 173: 683-90.
- McLachlan GF, Do K-A, Ambroise C: Analyzing microarray gene expression data. 2004; John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, USA.
- McManus DC, Lefebvre CA, Cherton-Horvat G, St-Jean M, Kandimalla ER, Agrawal S, Morris SJ, Durkin JP, Lacasse EC: Loss of XIAP protein expression by RNAi and antisense approaches sensitizes cancer cells to functionally diverse chemotherapeutics. *Oncogene.* 2004; 23: 8105-17.
- Miao GY, Lu QM, Zhang XL: Downregulation of survivin by RNAi inhibits growth of human gastric carcinoma cells. *World J Gastroenterol.* 2007; 13: 1170-4.
- Miyake H, Hanada N, Nakamura H, Kagawa S, Fujiwara T, Hara I, Eto H, Gohji K, Arakawa S, Kamidono S, Saya H: Overexpression of Bcl-2 in bladder cancer cells inhibits apoptosis induced by cisplatin and adenoviral-mediated p53 gene transfer. *Oncogene.* 1998; 16: 933-43.
- Moussa O, Abol-Enein H, Bissada NK, Keane T, Ghoneim MA, Watson DK: Evaluation of survivin reverse transcriptase-polymerase chain reaction for noninvasive detection of bladder cancer. *J Urol.* 2006; 175: 2312-6.
- Mu P, Nagahara S, Makita N, Tarumi Y, Kadomatsu K, Takei Y: Systemic delivery of siRNA specific to tumor mediated by atelocollagen: combined therapy using siRNA targeting Bcl-xL and cisplatin against prostate cancer. *Int J Cancer.* 2009; 125: 2978-90.
- Nakano K, Vousden KH: PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell.* 2001; 7: 683-94.
- Ning S, Fuessel S, Kotsch M, Kraemer K, Kappler M, Schmidt U, Taubert H, Wirth MP, Meye A: siRNA-mediated down-regulation of survivin inhibits bladder cancer cell growth. *Int J Oncol.* 2004; 25: 1065-71.
- Nogawa M, Yuasa T, Kimura S, Tanaka M, Kuroda J, Sato K, Yokota A, Segawa H, Toda Y, Kageyama S, Yoshiki T, Okada Y, Maekawa T: Intravesical administration of small interfering RNA targeting PLK-1 successfully prevents the growth of bladder cancer. *J Clin Invest.* 2005; 115: 978-85.
- Novotny V, Hakenberg OW, Wiessner D, Heberling U, Litz RJ, Oehlschlaeger S, Wirth MP: Perioperative complications of radical cystectomy in a contemporary series. *Eur Urol.* 2007; 51: 397-401.
- Ohnishi K, Nagata Y, Takahashi A, Taniguchi S, Ohnishi T: Effective enhancement of X-ray-induced apoptosis in human cancer cells with mutated p53 by siRNA targeting XIAP. *Oncol Rep.* 2008; 20: 57-61.
- Olie RA, Hafner C, Küttel R, Sigrist B, Willers J, Dummer R, Hall J, Stahel RA, Zangemeister-Wittke U: Bcl-2 and bcl-xL antisense oligonucleotides induce apoptosis in melanoma cells of different clinical stages. *J Invest Dermatol.* 2002; 118: 505-12.
- Ong F, Moonen LM, Gallee MP, ten Bosch C, Zerp SF, Hart AA, Bartelink H, Verheij M: Prognostic factors in transitional cell cancer of the bladder: an emerging role for Bcl-2 and p53. *Radiother Oncol.* 2001; 61: 169-75.
- Orban TI, Izaurralde E: Decay of mRNAs targeted by RISC requires XRN1, the Ski complex, and the exosome. *RNA.* 2005; 11: 459-69.
- Pai SI, Lin YY, Macaes B, Meneshian A, Hung CF, Wu TC: Prospects of RNA interference therapy for cancer. *Gene Ther.* 2006; 13: 464-77.
- Park WD, Stegall MD: A meta-analysis of kidney microarray datasets: investigation of cytokine gene detection and correlation with rt-PCR and detection thresholds. *BMC Genomics.* 2007; 8: 88-96.
- Pashos CL, Botteman MF, Laskin BL, Redaelli A: Bladder cancer: epidemiology, diagnosis, and management. *Cancer Pract.* 2002; 10: 311-22.
- Phalon C, Rao DD, Nemunaitis J: Potential use of RNA interference in cancer therapy. *Expert Rev Mol Med.* 2010; 12: e26.
- Pirollo KF, Rait A, Zhou Q, Hwang SH, Dagata JA, Zon G, Hogrefe RI, Palchik G, Chang EH: Materializing the potential of small interfering RNA via a tumor-targeting nanodelivery system. *Cancer Res.* 2007; 67: 2938-43.
- Pirollo KF, Rait A, Zhou Q, Zhang XQ, Zhou J, Kim CS, Benedict WF, Chang EH: Tumor-targeting nanocomplex delivery of novel tumor suppressor RB94 chemosensitizes bladder carcinoma cells in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res.* 2008; 14: 2190-8.

- Pollack A, Wu CS, Czerniak B, Zagars GK, Benedict WF, McDonnell TJ: Abnormal bcl-2 and pRb expression are independent correlates of radiation response in muscle-invasive bladder cancer. *Clin Cancer Res.* 1997; 3: 1823-9.
- Riedl SJ, Renatus M, Schwarzenbacher R, Zhou Q, Sun C, Fesik SW, Liddington RC, Salvesen GS: Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP. *Cell.* 2001; 104: 791-800.
- Robert Koch-Institut (Hrsg.): Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends. 2010; Berlin.
- Robbins M, Judge A, Ambegia E, Choi C, Yaworski E, Palmer L, McClintock K, MacLachlan I: Misinterpreting the therapeutic effects of small interfering RNA caused by immune stimulation. *Hum Gene Ther.* 2008; 19: 991-9.
- Rolle K, Nowak S, Wyszko E, Nowak M, Zukiel R, Piestrzeniewicz R, Gawronska I, Barciszewska MZ, Barciszewski J: Promising human brain tumors therapy with interference RNA intervention (iRNAi). *Cancer Biol Ther.* 2010; 9: 396-406.
- Roskoski R Jr: Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2007; 62: 179-213.
- Ruchaud S, Carmena M, Earnshaw WC: The chromosomal passenger complex: one for all and all for one. *Cell.* 2007; 131: 230-1.
- Rückert F, Sann N, Lehner AK, Saeger HD, Grützmann R, Pilarsky C: Simultaneous gene silencing of Bcl-2, XIAP and Survivin re-sensitizes pancreatic cancer cells towards apoptosis. *BMC Cancer.* 2010; 10: 379.
- Sarkis AS, Dalbagni G, Cordon-Cardo C, Zhang ZF, Sheinfeld J, Fair WR, Herr HW, Reuter VE: Nuclear overexpression of p53 protein in transitional cell bladder carcinoma: a marker for disease progression. *J Natl Cancer Inst.* 1993; 85: 53-9.
- Schlee M, Hornung V, Hartmann G: siRNA and isRNA: two edges of one sword. *Mol Ther.* 2006; 14: 463-70.
- Schmidt EF, Strittmatter SM: The CRMP family of proteins and their role in Sema3A signaling. *Adv Exp Med Biol.* 2007; 600: 1-11.
- Schultz IJ, Kiemeny LA, Witjes JA, Schalken JA, Willems JL, Swinkels DW, de Kok JB: Survivin mRNA expression is elevated in malignant urothelial cell carcinomas and predicts time to recurrence. *Anticancer Res.* 2003; 23: 3327-31.
- Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD: Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell.* 2003; 115: 199-208.
- Seitz M, Zaak D, Knüchel-Clarke R, Stief C: Urinary bladder tumours. The new 2004 WHO classification. *Urologe A.* 2005; 44: 1073-86.
- Sensintaffar J, Scott FL, Peach R, Hager JH: XIAP is not required for human tumor cell survival in the absence of an exogenous death signal. *BMC Cancer.* 2010; 10: 11-23.
- Shangary S, Johnson DE: Recent advances in the development of anticancer agents targeting cell death inhibitors in the Bcl-2 protein family. *Leukemia.* 2003; 17: 1470-81.
- Shariat SF, Ashfaq R, Karakiewicz PI, Saeedi O, Sagalowsky AI, Lotan Y: Survivin expression is associated with bladder cancer presence, stage, progression, and mortality. *Cancer.* 2007; 109: 1106-13.
- Shen W, Wang CY, Wang XH, Fu ZX: Oncolytic adenovirus mediated Survivin knockdown by RNA interference suppresses human colorectal carcinoma growth in vitro and in vivo. *J Exp Clin Cancer Res.* 2009; 28: 81-91.
- Shi Y: Caspase activation: revisiting the induced proximity model. *Cell.* 2004; 117: 855-8.
- Shim MS, Kwon YJ: Efficient and targeted delivery of siRNA in vivo. *FEBS J.* 2010; 277: 4814-27.
- Shiozaki EN, Chai J, Rigotti DJ, Riedl SJ, Li P, Srinivasula SM, Alnemri ES, Fairman R, Shi Y: Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9. *Mol Cell.* 2003; 11: 519-27.
- Silva MT: Secondary necrosis: the natural outcome of the complete apoptotic program. *FEBS Lett.* 2010; 584: 4491-9.
- Simões-Wüst AP, Schürpf T, Hall J, Stahel RA, Zangemeister-Wittke U: Bcl-2/bcl-xL bispecific antisense treatment sensitizes breast carcinoma cells to doxorubicin, paclitaxel and cyclophosphamide. *Breast Cancer Res Treat.* 2002; 76: 157-66.

- Simon R, Eltze E, Schäfer KL, Bürger H, Semjonow A, Hertle L, Dockhorn-Dworniczak B, Terpe HJ, Böcker W: Cytogenetic analysis of multifocal bladder cancer supports a monoclonal origin and intraepithelial spread of tumor cells. *Cancer Res.* 2001; 61: 355-62.
- Sledz CA, Holko M, de Veer MJ, Silverman RH, Williams BR: Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol.* 2003; 5: 834-9.
- Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C: TNM classification of malignant tumours, seventh edition. 2009; John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, USA.
- Song Z, Yao X, Wu M: Direct interaction between survivin and Smac/DIABLO is essential for the anti-apoptotic activity of survivin during taxol-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 2003; 278: 23130-40.
- Song X, Wang JB, Yin DL, Yang HY, Liu LX, Jiang HC: Down-regulation of lung resistance related protein by RNA interference targeting survivin induces the reversal of chemoresistances in hepatocellular carcinoma. *Chin Med J (Engl).* 2009; 122: 2636-42.
- Soutschek J, Akinc A, Bramlage B, Charisse K, Constien R, Donoghue M, Elbashir S, Geick A, Hadwiger P, Harborth J, John M, Kesavan V, Lavine G, Pandey RK, Racie T, Rajeev KG, Röhl I, Toudjarska I, Wang G, Wuschko S, Bumcrot D, Kotliansky V, Limmer S, Manoharan M, Vornlocher HP: Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature.* 2004; 432: 173-8.
- Stadler WM, Lerner SP, Groshen S, Stein JP, Skinner DG, Raghavan D, Steinberg GD, Wood D, Klotz LH, Hall MC, Cote R: Randomized trial of p53 targeted adjuvant therapy for patients (pts) with organ- confined node-negative urothelial bladder cancer (UBC). *J Clin Oncol.* 2009; 27: abstr 5017.
- Stenzl A, Witjes JA, Cowan NC, De Santis M, Kuczyk M, Lebreit T, Merseburger AS, Ribal MJ, Sherif A: Guidelines on bladder cancer muscle-invasive and metastatic. 2011. <http://www.uroweb.org>; Stand 16.05.2011.
- Sugars KL, Budhram-Mahadeo V, Packham G, Latchman DS: A minimal Bcl-x promoter is activated by Brn-3a and repressed by p53. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29: 4530-40.
- Sun XM, Bratton SB, Butterworth M, MacFarlane M, Cohen GM: Bcl-2 and Bcl-xL inhibit CD95-mediated apoptosis by preventing mitochondrial release of Smac/DIABLO and subsequent inactivation of X-linked inhibitor-of-apoptosis protein. *J Biol Chem.* 2002; 277: 11345-51.
- Sylvester RJ, Oosterlinck W, van der Meijden AP: A single immediate postoperative instillation of chemotherapy decreases the risk of recurrence in patients with stage Ta T1 bladder cancer: a meta-analysis of published results of randomized clinical trials. *J Urol.* 2004; 171: 2186-9.
- Sylvester RJ: Bacillus Calmette-Guérin treatment of non-muscle invasive bladder cancer. *Int J Urol.* 2011; 18: 113-20.
- Takizawa BT, Uchio EM, Cohen JJ, Wheeler MA, Weiss RM: Downregulation of survivin is associated with reductions in TNF receptors' mRNA and protein and alterations in nuclear factor kappa B signaling in urothelial cancer cells. *Cancer Invest.* 2007; 25: 678-84.
- Tan ML, Ooi JP, Ismail N, Moad AI, Muhammad TS: Programmed cell death pathways and current antitumor targets. *Pharm Res.* 2009; 26: 1547-60.
- Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ: Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008; 9: 231-41.
- Tiemann K, Rossi JJ: RNAi-based therapeutics-current status, challenges and prospects. *EMBO Mol Med.* 2009; 1: 142-51.
- Urban-Klein B, Werth S, Abuharbeid S, Czubayko F, Aigner A: RNAi-mediated gene-targeting through systemic application of polyethylenimine (PEI)-complexed siRNA in vivo. *Gene Ther.* 2005; 12: 461-6.
- US National Institutes of Health. <http://www.clinicaltrials.gov>; Stand 16.05.2011.
- Velculescu VE, Madden SL, Zhang L, Lash AE, Yu J, Rago C, Lal A, Wang CJ, Beaudry GA, Ciriello KM, Cook BP, Dufault MR, Ferguson AT, Gao Y, He TC, Hermeking H, Hiraldo SK, Hwang PM, Lopez MA, Luderer HF, Mathews B, Petroziello JM, Polyak K, Zawel L, Zhang W, Zhang X, Zhou W, Haluska FG, Jen J, Sukumar S, Landes GM, Riggins GJ, Vogelstein B, Kinzler KW: Analysis of human transcriptomes. *Nat Genet.* 1999; 23: 387-8.
- Walton SP, Wu M, Gredell JA, Chan C: Designing highly active siRNAs for therapeutic applications. *FEBS J.* 2010; 277: 4806-13.

- Wang Y, Tao ZZ, Chen SM, Xiao BK, Zhou XH, Liu JP: Application of combination of short hairpin RNA segments for silencing VEGF, TERT and Bcl-xl expression in laryngeal squamous carcinoma. *Cancer Biol Ther.* 2008; 7: 896-901.
- Warmann SW, Frank H, Heitmann H, Ruck P, Herberts T, Seitz G, Fuchs J: Bcl-2 gene silencing in pediatric epithelial liver tumors. *J Surg Res.* 2008; 144: 43-8.
- Warnecke C, Zaborowska Z, Kurreck J, Erdmann VA, Frei U, Wiesener M, Eckardt KU: Differentiating the functional role of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha (EPAS-1) by the use of RNA interference: erythropoietin is a HIF-2alpha target gene in Hep3B and Kelly cells. *FASEB J.* 2004; 18: 1462-4.
- Weikert S, Christoph F, Schrader M, Krause H, Miller K, Müller M: Quantitative analysis of survivin mRNA expression in urine and tumor tissue of bladder cancer patients and its potential relevance for disease detection and prognosis. *Int J Cancer.* 2005; 116: 100-4.
- Weiss C, von Römer F, Capalbo G, Ott OJ, Wittlinger M, Krause SF, Sauer R, Rödel C, Rödel F: Survivin expression as a predictive marker for local control in patients with high-risk T1 bladder cancer treated with transurethral resection and radiochemotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2009; 74: 1455-60.
- Whelan RS, Kaplinskiy V, Kitsis RN: Cell death in the pathogenesis of heart disease: mechanisms and significance. *Annu Rev Physiol.* 2010; 72: 19-44.
- Whitehead KA, Langer R, Anderson DG: Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. *Nat Rev Drug Discov.* 2009; 8: 129-38.
- Witjes JA: Management of BCG failures in superficial bladder cancer: a review. *Eur Urol.* 2006; 49: 790-7.
- Wu XR: Urothelial tumorigenesis: a tale of divergent pathways. *Nat Rev Cancer.* 2005; 5: 713-25.
- Wu S, Yoshiko Y, De Luca F: Stanniocalcin 1 acts as a paracrine regulator of growth plate chondrogenesis. *J Biol Chem.* 2006; 281: 5120-7.
- Wuttig D, Kunze D, Fuessel S, Toma M, Stade J, Kotsch M, Kappler M, Taubert H, Schwenzer B, Baretton G, Hakenberg OW, Meye A, Wirth MP: Are overexpressed alternative survivin transcripts in human bladder cancer suitable targets for siRNA-mediated in vitro inhibition? *Int J Oncol.* 2007; 30: 1317-24.
- Xia G, Kumar SR, Stein JP, Singh J, Krasnoperov V, Zhu S, Hassanieh L, Smith DL, Buscarini M, Broek D, Quinn DI, Weaver FA, Gill PS: EphB4 receptor tyrosine kinase is expressed in bladder cancer and provides signals for cell survival. *Oncogene.* 2006; 25: 769-80.
- Xie YE, Tang EJ, Zhang DR, Ren BX: Down-regulation of Bcl-XL by RNA interference suppresses cell growth and induces apoptosis in human esophageal cancer cells. *World J Gastroenterol.* 2006; 12: 7472-7.
- Xin Y, Lyness G, Chen D, Song S, Wientjes MG, Au JL: Low dose suramin as a chemosensitizer of bladder cancer to mitomycin C. *J Urol.* 2005; 174: 322-7.
- Yamaguchi Y, Shiraki K, Fuke H, Inoue T, Miyashita K, Yamanaka Y, Saitou Y, Sugimoto K, Nakano T: Targeting of X-linked inhibitor of apoptosis protein or survivin by short interfering RNAs sensitize hepatoma cells to TNF-related apoptosis-inducing ligand- and chemotherapeutic agent-induced cell death. *Oncol Rep.* 2005; 14: 1311-6.
- Yamana K, Bilim V, Hara N, Kasahara T, Itoi T, Maruyama R, Nishiyama T, Takahashi K, Tomita Y: Prognostic impact of FAS/CD95/APO-1 in urothelial cancers: decreased expression of Fas is associated with disease progression. *Br J Cancer.* 2005; 93: 544-51.
- Yamanaka K, Rocchi P, Miyake H, Fazli L, Vessella B, Zangemeister-Wittke U, Gleave ME: A novel antisense oligonucleotide inhibiting several antiapoptotic Bcl-2 family members induces apoptosis and enhances chemosensitivity in androgen-independent human prostate cancer PC3 cells. *Mol Cancer Ther.* 2005; 4: 1689-98.
- Yamanaka K, Rocchi P, Miyake H, Fazli L, So A, Zangemeister-Wittke U, Gleave ME: Induction of apoptosis and enhancement of chemosensitivity in human prostate cancer LNCaP cells using bispecific antisense oligonucleotide targeting Bcl-2 and Bcl-xL genes. *BJU Int.* 2006; 97: 1300-8.
- Yang QH, Du C: Smac/DIABLO selectively reduces the levels of c-IAP1 and c-IAP2 but not that of XIAP and livin in HeLa cells. *J Biol Chem.* 2004; 279: 16963-70.
- Yang TM, Barbone D, Fennell DA, Broaddus VC: Bcl-2 family proteins contribute to apoptotic resistance in lung cancer multicellular spheroids. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2009; 41: 14-23.

- Yang D, Song X, Zhang J, Ye L, Wang S, Che X, Wang J, Zhang Z, Wang L, Shi W: Therapeutic potential of siRNA-mediated combined knockdown of the IAP genes (Livin, XIAP, and Survivin) on human bladder cancer T24 cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2010a; 42: 137-44.
- Yang W, Sun T, Cao J, Liu F: Survivin downregulation by siRNA/cationic liposome complex radiosensitises human hepatoma cells in vitro and in vivo. *Int J Radiat Biol*. 2010b; 86: 445-57.
- Yano J, Hirabayashi K, Nakagawa S, Yamaguchi T, Nogawa M, Kashimori I, Naito H, Kitagawa H, Ishiyama K, Ohgi T, Irimura T: Antitumor activity of small interfering RNA/cationic liposome complex in mouse models of cancer. *Clin Cancer Res*. 2004; 10: 7721-6.
- Ye DW, Zheng JF, Qian SX, Ma YJ: Correlation between the expression of oncogenes ras and c-erbB-2 and the biological behavior of bladder tumors. *Urol Res*. 1993; 21: 39-43.
- Yonesaka K, Tamura K, Kurata T, Satoh T, Ikeda M, Fukuoka M, Nakagawa K: Small interfering RNA targeting survivin sensitizes lung cancer cell with mutant p53 to adriamycin. *Int J Cancer*. 2006; 118: 812-20.
- Zangemeister-Wittke U, Leech SH, Olie RA, Simões-Wüst AP, Gautschi O, Luedke GH, Natt F, Häner R, Martin P, Hall J, Nalin CM, Stahel RA: A novel bispecific antisense oligonucleotide inhibiting both bcl-2 and bcl-xL expression efficiently induces apoptosis in tumor cells. *Clin Cancer Res*. 2000; 6: 2547-55.
- Zhang H, Kolb FA, Jaskiewicz L, Westhof E, Filipowicz W: Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell*. 2004; 118: 57-68.
- Zhang S, Ding F, Luo A, Chen A, Yu Z, Ren S, Liu Z, Zhang L: XIAP is highly expressed in esophageal cancer and its downregulation by RNAi sensitizes esophageal carcinoma cell lines to chemotherapeutics. *Cancer Biol Ther*. 2007; 6: 973-80.
- Zhang Y, Chen ZD, Du CJ, Xu G, Luo W: siRNA targeting survivin inhibits growth and induces apoptosis in human renal clear cell carcinoma 786-O cells. *Pathol Res Pract*. 2009; 205: 823-7.
- Zhu H, Guo W, Zhang L, Davis JJ, Wu S, Teraishi F, Cao X, Smythe WR, Fang B: Enhancing TRAIL-induced apoptosis by Bcl-X(L) siRNA. *Cancer Biol Ther*. 2005; 4: 393-7.
- Zhu H, Zhu Y, Hu J, Hu W, Liao Y, Zhang J, Wang D, Huang X, Fang B, He C: Adenovirus-mediated small hairpin RNA targeting Bcl-XL as therapy for colon cancer. *Int J Cancer*. 2007; 121: 1366-72.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die direkt oder indirekt zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Karl-Heinz van Pée danke ich für die Ermöglichung dieser Arbeit, die akademische Betreuung und die wertvollen Hinweise.

Herrn Prof. Manfred P. Wirth danke ich für die Möglichkeit, dieses interessante Thema im Forschungslabor der Klinik und Poliklinik für Urologie des Universitätsklinikums „Carl Gustav Carus“ bearbeiten zu können. Darüber hinaus bedanke ich mich für seine kontinuierliche Unterstützung sowie für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ein ganz großes Dankeschön geht an meine lieben Kollegen des urologischen Forschungslabors. Herzlichen Dank für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die stete Hilfsbereitschaft und die vielen schönen Stunden abseits des Labors. Im Besonderen möchte ich mich bei Frau PD Dr. Susanne Füssel für ihre beständige Unterstützung und die wertvollen Ratschläge, die maßgeblich für die Anfertigung dieser Arbeit waren, sowie für die kritische Durchsicht derselben bedanken. Herrn Dr. Kai Krämer danke ich für die bereitwillige praktische Hilfe und das kritische Korrekturlesen meiner Arbeit. Frau Andrea Lohse-Fischer und Frau Ulrike Lotzkat möchte ich für die Unterstützung bei der qPCR und der Herstellung der shRNA-Vektor-Vorratslösungen danken.

Vielen Dank allen Mitarbeitern des Fraunhofer-Instituts für Zelltherapie und Immunologie in Leipzig, die zum Gelingen der tierexperimentellen Untersuchungen beigetragen haben. Insbesondere möchte ich Herrn Dr. Johannes Boltze, Herrn Dr. Christoph Schimmelpfennig, Frau Dr. Franziska Werner, Herrn Christopher Oelkrug und Frau Natalia Shurawel für die Unterstützung und Durchführung dieser Arbeiten danken.

Für die stete Hilfsbereitschaft bei den durchflusszytometrischen Messungen danke ich Herrn Dr. Matthias Kotzsch und Frau Antje Zobjack. Frau Dr. Daniela Wuttig und Frau Dr. Marianne Großer danke ich für Ihre Hilfe bei den *Microarray*-Analysen.

Weiterhin danke ich der Doktor Robert Pfleger-Stiftung und der Else Kröner-Fresenius-Stiftung für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit. Ebenso danke ich der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität Dresden für die Bereitstellung verschiedener Reisestipendien und finanzieller Mittel.

Mein herzlichster Dank gilt meinen Eltern, meinem Freund René und seinen Eltern für ihre Liebe und Unterstützung, durch die sie maßgeblich zum Abschluss meiner Promotion beigetragen haben.

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die vorliegende Dissertation wurde im urologischen Forschungslabor der Klinik und Poliklinik für Urologie des Universitätsklinikums „Carl Gustav Carus“ Dresden unter der wissenschaftlichen Betreuung von Herrn Prof. K.-H. van Pée, Herrn Prof. M. P. Wirth und Frau PD Dr. S. Füssel angefertigt.

Hiermit erkenne ich die Promotionsordnung der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften der Technischen Universität Dresden vom 23. Februar 2011 an.

Dresden, den 20. Mai 2011.

Doreen Kunze