



**Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Fakultät für Klinische Medizin Mannheim
Dissertations-Kurzfassung**

**Neue gentherapeutische Behandlungsstrategien für das
Urothelkarzinom der Harnblase**

Autor: Axel Schaaf
Institut / Klinik: Urologische Universitätsklinik
Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. M. S. Michel

Das Harnblasenkarzinom ist inzwischen die vierthäufigste Tumorerkrankung der westlichen Welt und stellt in der Urologie nach dem Prostatakarzinom den zweithäufigsten Tumor dar. Die oberflächlich wachsenden Blasenkarzinome haben eine 5 Jahresüberlebensrate von 95%, jedoch eine Rezidivrate von über 70 %. 50 % der Patienten mit invasiven Tumoren versterben trotz frühzeitiger radikaler Zystektomie in einem Zeitraum von 5 Jahren an einer hämatogenen oder lymphogenen Metastasierung. Bei dem muskelinvasiven Blasenkarzinom ist je nach verwendetem Therapieschema mit maximalen Remissionsraten von 60 % bei einer medianen Überlebenszeit von lediglich 12-13 Monaten zu rechnen. Diese Daten sind alarmierend und verdeutlichen den Handlungsbedarf bei der Suche nach neuen Therapieoptionen sowohl für das oberflächliche als auch für das metastasierende Blasenkarzinom. Ziel dieser Arbeit war es daher, neue gentherapeutische Behandlungsstrategien für das Urothelkarzinom der Harnblase zu untersuchen.

Zunächst wurden zu diesem Zweck drei nichtvirale Transfektionsverfahren (Transfektion mit akustischer und optischer Energie, Lipofektion) an etablierten humanen Blasenkarzinomzelllinien (UM-UC-3, RT 112, HT 1197, T 24/83) untersucht. Die Applikation der akustischen Energie erfolgte in Form von Stoßwellen, wohingegen zur Applikation der optischen Energie ein in der Endourologie verwendeter Ho:YAG Laser eingesetzt wurde. Als Reportersystem diente in allen drei Fällen ein das Gen für das Enhanced green fluorescent protein (EGFP) enthaltendes Plasmid (pEGFP-N1). Die Analyse der Transfektionsraten erfolgte durch FACS und Fluoreszenz-Mikroskopie. Die Transfektion mit optischer Energie lieferte bei größeren Varianzen höhere Transfektionsraten (max. 46,1 %) als die Transfektion mit akustischer Energie (max. 27,1 %). Die Lipofektion resultierte im Vergleich in deutlich höheren Transfektionsraten bei geringeren Varianzen (max. 88,9 %).

Um verschiedene gentherapeutische Ansätze am mehrschichtigen Zellverband untersuchen zu können wurden im folgenden Schritt zwei unterschiedliche ex-vivo Modelle auf Basis unterschiedlicher Materialien etabliert. Das erste, bestehend aus einer Agarose Disc, einer geeigneten Membran (PET oder SIS) und etablierten Zellen, ermöglicht die mehrschichtige Kultivierung verschiedener Zelltypen. Das zweite Modell besteht aus einer speziell präparierten Schweineblase und ermöglicht die Untersuchung der Penetrationstiefe verschiedener gentherapeutischer Verfahren am nativ gewachsenen Gewebeverband. In Abhängigkeit der Fragestellung ermöglichen somit beide Modelle die ex-vivo Charakterisierung von Transfektionsverfahren.

Um ein gentherapeutisches Prinzip zur Anwendung zu bringen wurde die c-DNA der HSV-tk in ein Reporterplasmid (pEGFP-N1) kloniert und in humane Blasenkarzinomzellen durch Lipofektion transfiziert. Das neue Plasmid pEGFP-HSVtk verursachte trotz richtiger Orientierung der integrierten HSV-tk Sequenz eine hohe Autotoxizität durch unspezifische Phosphorylierungsreaktionen endogener Proteine. Bei Inkubation der pEGFP-HSVtk-transfizierten Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen Ganciclovir konnte keine Steigerung der Mortalität gegenüber den mit dem nativen Plasmid pEGFP-N1 transfizierten Zellen festgestellt werden.

Als alternativer gentherapeutischer Ansatz neben dem Einsatz von Plasmid-DNA wurden die Effekte von Antisense-Oligonukleotiden gegen die antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-xL zur Erhöhung der zytotoxischen Effekte der Zytostatika Cisplatin, Mitomycin C und Paclitaxel auf humane Blasenkarzinomzellen untersucht. Die Analyse erfolgte durch Proliferation-Assays. Im Rahmen dieser Untersuchungen konnten unterschiedlich ausgeprägte synergistische Effekte im Bezug auf die Zytotoxizität zwischen den eingesetzten Antisense-Oligonukleotiden und den Zytostatika nachgewiesen werden. Diese viel versprechenden Ergebnisse werden in weiterführenden Studien vertieft werden.