



Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Medizinische Fakultät Mannheim
Dissertations-Kurzfassung

**Optimierung der Chemotherapie mit Gemcitabin durch Applikation
von Antisense Oligonukleotiden zur Behandlung des
Urothelkarzinoms der Harnblase**

Autor: Andreas Becker
Institut / Klinik: Urologische Klinik
Doktorvater: Prof. Dr. M. S. Michel

Das Urothelkarzinom der Harnblase ist die zweithäufigste maligne urologische Erkrankung und die insgesamt vierthäufigste Tumorerkrankung bei Männern. Bei über 70% der Fälle liegt eine oberflächliche Erkrankung vor, deren Behandlung in einer transurethralen Resektion des Tumors mit anschließender Instillation eines Chemotherapeutikums wie z.B. Mitomycin C, oder später des Immunstimulanz BCG besteht. Die Erkrankung weist eine hohe Rezidivrate von bis zu 70% auf. Kommt es zu einer Progredienz der Erkrankung oder liegt ein primär muskelinvasiver Tumor vor, liegt die Fünf-Jahres-Überlebensrate trotz radikaler Zystektomie bei 50%. Da die Behandlungsoptionen für das Urothelkarzinom dringend optimiert werden müssen, wurde in dieser Arbeit die Effizienz einer kombinierten Behandlung mit dem Chemotherapeutikum Gemcitabin und Antisense Oligonukleotiden (AS-ODNs), die gegen die antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-xL gerichtet waren, an vier verschiedenen Urothelkarzinomzellreihen evaluiert. Gemcitabin hat beim Urothelkarzinom sowohl ex-vivo als auch in-vivo hohe antineoplastische Effekte gezeigt. AS-ODNs sind molekulargenetisch hergestellte kurze Nukleinsäuresequenzen, die die Proteinexpression von Zellen posttranskriptionell beeinflussen und so die Ansprechrate von Tumorzellen auf eine Chemotherapie potenziell erhöhen können. Die Zielproteine Bcl-2 und Bcl-xL sind Schlüsselproteine der Apoptoseregulation, die der Induktion des Zelltodes durch eine Chemotherapie entgegenwirken können. Sie stellen somit geeignete Zielstrukturen für eine Antisense-vermittelte Downregulation, die potenziell zu einer Sensibilisierung gegenüber Chemotherapeutika führen kann, dar. Um die Wirkung der Kombinationstherapie mit Gemcitabin und bcl-2 bzw. bcl-xL AS-ODNs zu testen, wurden die vier Zellreihen in einem ersten Schritt mittels Western Blot auf die Expression dieser Proteine hin untersucht. Weiterhin wurde geprüft, ob ihre Expression durch eine Behandlung mit Gemcitabin gesteigert wird und ob sich eine eventuelle Überexpression durch eine AS-ODNs Behandlung wieder rückgängig machen lässt. In einem zweiten Schritt wurde die zytotoxische Wirkung einer Gemcitabin-Monotherapie mit der einer kombinierten Therapie mit Gemcitabin und bcl-2 oder bcl-xL AS-ODNs verglichen. Abschließend wurde in einem standardisierten photometrischen Verfahren die Zelltodrate ermittelt. Ausgewählte Mittelwerte der Zelltodrate wurden mithilfe eines zweiseitigen t-Tests für gepaarte Stichproben auf signifikante Unterschiede hin untersucht. Um den Einfluss der Faktoren Zellreihe, Konzentration von Gemcitabin, bcl-2 AS-ODNs und bcl-xL AS-ODNs auf die Zelltodrate statistisch simultan zu evaluieren, wurde ein allgemeines lineares Modell mit vier Einflussgrößen erstellt. Die Stärke der Einflussfaktoren konnte für jede Zellreihe getrennt mit einer multiplen Regressionsanalyse evaluiert werden. Wir konnten zeigen, dass alle Zellreihen die Proteine Bcl-2 und Bcl-xL exprimieren. Bei RT 112 Zellen ließ sich eine Gemcitabin-induzierte Überexpression von Bcl-2 sowie eine Aufhebung dieser Überexpression durch AS-ODNs beweisen. Auf die Monotherapie mit Gemcitabin reagierten alle Zellreihen mit einer dosisabhängigen Steigerung der Zelltodrate. Besonders sensibel reagierten T 24/83 Zellen mit Zelltodraten bis zu 88% bei 100 nM Gemcitabin. Das etablierte statistische Modell eignet sich, um den Einfluss verschiedener Behandlungsmodi auf die Zelltodrate bei in-vitro-Experimenten zu analysieren und könnte bei der Auswahl von Zellreihen und Substanzen für aufwändigere in-vivo-Studien hilfreich sein. Bei allen Zellreihen außer T 24/83 ergaben sich für den Einfluss der Konzentration von Gemcitabin, von bcl-2 AS-ODNs und von bcl-xL auf die Zelltodrate sehr kleine p-Werte. Dies zeigt, dass jeder der verwendeten Parameter einen eigenständigen Einfluss auf die Zelltodrate hat. Besonders ausgeprägt war der Effekt bei HT 1197 Zellen sowohl mit 5 µM bcl-2 AS-ODNs als auch mit 5 µM bcl-xL AS-ODNs. Bei diesen Zellen konnte die maximale Zelltodrate durch den Zusatz von AS-ODNs mehr als verdoppelt werden. Die kombinierte Anwendung von Gemcitabin und bcl-2/bcl-xL AS-ODNs stellt einen viel versprechenden

Ansatz für weitere Experimente an ex-vivo-Modellen und in-vivo dar und könnte die Effektivität der Chemotherapie beim Urothelkarzinom der Harnblase entscheidend verbessern.