Die Expression von Survivin und seine Relevanz für die Cisplatin-Resistenz von Keimzelltumoren

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

im Fachbereich Biologie

vorgelegt von

Christine Jacobsen

aus Hamburg

Hamburg 2014

1. Dissertationsgutachter: Prof. Dr. Carsten Bokemeyer
2. Dissertationsgutachter: Prof. Dr. Thomas Dobner

Tag der Disputation: 04.07.2014
Prüfungskommission:
Vorsitz: Prof. Dr. Wilhelm Schäfer, Disputationsgutacher: Prof. Dr. Julia Kehr, PD Dr. Sabine Hoffmeister-Ullerich

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis **1**
I Zusammenfassung **5**
II Abstract **9**
1 Einleitung **12**
1.1 Keimzellen – Der Ursprung von Gut und Böse 12
1.2 Keimzelltumore 13
1.3 Testikuläre Keimzelltumore 14
1.4 Cisplatin – der Glücksfund 17
1.5 Cisplatin und KZT – die Revolution 19
1.6 Resistenzmechanismen gegenüber Cisplatin 21
1.7 Inhibition der Apoptose als Resistenzmechanismus 22
1.8 Survivin – der Lebensretter 26
1.9 Die Funktionen von Survivin 27
1.10 Die Isoformen von Survivin 29
1.11 Die Bedeutung von Survivin und seiner Isoformen in Tumoren 30
1.11.1 Die Expression von Survivin in malignen Erkrankungen 30
1.11.2 Die Expression der Isoformen von Survivin in malignen Erkrankungen 31
1.11.3 Survivin als Target in der Antitumortherapie 32
1.12 Zielsetzung 35
2. Material und Methoden **37**
2.1 Materialien 37
2.1.1 Geräte 37
2.1.2 Verbrauchsmittel 37
2.1.3 Chemikalien 38
2.1.4 Kits, Enzyme und Lösungen 38
2.1.5 Protein- und DNA-Standards 39
2.1.6 Primer 39
2.1.7 Small interfering RNAs (siRNAs) 39
2.1.8 Antikörper 40
2.1.9 Zellkulturmedien und Zusätze 40
2.1.10 Zelllinien 41
2.1.11 Zytostatika 42
2.1.12 Software 42

2.2. Methoden ... 43
2.2.1 Zellkultur ... 43
2.2.2. Immunhistochemische Methoden ... 50
2.2.3 Proteinbiochemische Methoden ... 51
2.2.4 Molekularbiologische Methoden ... 54
3. Ergebnisse ... 57
3.1 Die Expression von Survivin und Survivin-2B in humanen Keimzelltumorzelllinien ... 57
3.1.1 Nachweis der Expression von Survivin und Survivin-2B auf mRNA-Ebene ... 57
3.1.2 Ermittlung der relativen Expressionsstärke mittels RT-qPCR ... 57
3.1.3 Nachweis der Expression von Gesamt-Survivin auf Proteinebene ... 59
3.1.4 Nachweis der Expression von Survivin-2B auf Proteinebene ... 60
3.2 Untersuchung der zellulären Lokalisation von Survivin und Survivin-2B mittels Fraktionierung und Western Blotting-Analyse ... 62
3.3 Nachweis der Herunterregulierung von Survivin und Survivin-2B durch RNA-Interferenz ... 64
3.3.1 Nachweis der Herunterregulierung der Survivin- und der Survivin-2B-mRNA durch RNA-Interferenz ... 65
3.3.2 Nachweis der Herunterregulierung von Survivin und Survivin-2B auf Proteinebene ... 66
3.4 Untersuchung der Wirkung der Inhibition von Survivin und Survivin-2B auf die ... 71
3.4.1 Untersuchung der Wirkung der Inhibition von Survivin und Survivin-2B auf die Proliferation von NT2-Zellen ... 72
3.4.2 Untersuchung der Wirkung der Inhibition von Survivin und Survivin-2B auf die Proliferation von NT2-R-Zellen ... 73
3.4.3 Untersuchung der Wirkung der Inhibition von Survivin und Survivin-2B auf die Proliferation von 2102Ep-Zellen ... 74
3.4.4 Untersuchung der Wirkung der Inhibition von Survivin und Survivin-2B auf die Proliferation von 2102Ep-R-Zellen ... 75
3.4.5 Untersuchung der Wirkung der Inhibition von Survivin und Survivin-2B auf die Proliferation von NCCIT-Zellen ... 76
3.4.6 Untersuchung der Wirkung der Inhibition von Survivin und Survivin-2B auf die Proliferation von NCCIT-R-Zellen ... 77
3.5 Bestimmungen der IC_{50} für YM155 für Keimzelltumorzelllinien ... 78
3.5.1 IC_{50}-Konzentrationsbestimmung für YM155 für die Behandlung von NT2-Zellen ... 79
3.5.2 IC_{50}-Konzentrationsbestimmung für YM155 für die Behandlung von NT2-R-Zellen ... 79
3.5.3 IC_{50}-Konzentrationsbestimmung für YM155 für die Behandlung von 2102Ep-Zellen ... 80
3.5.4 IC_{50}-Konzentrationsbestimmung für YM155 für die Behandlung von 2102Ep-R-Zellen ... 80
3.5.5 IC_{50}-Konzentrationsbestimmung für YM155 für die Behandlung von NCCIT-Zellen ... 81
3.5.6 IC_{50}-Konzentrationsbestimmung für YM155 für die Behandlung von NCCIT-R-Zellen ... 81

3.5.7 Untersuchung der Unterschiede in der IC_{50}-Konzentration für YM155 zwischen Cisplatin-sensitiven und Cisplatin-resistenten Zelllinien 82

3.6 Untersuchung der Wirkungen von YM155 und Cisplatin auf die Expression von Survivin und Survivin-2B auf mRNA-Ebene in NT2- und NT2-R-Zellen mittels RT-qPCR 84

3.7 Untersuchung der Wirkungen von YM155 und Cisplatin auf die Expression von G-Survivin und Survivin-2B auf Proteinebene in NT2- und NT2-R-Zellen 87

3.7.1 Untersuchung der Wirkung von YM155 und Cisplatin auf die Expression von G-Survivin und Survivin-2B auf NT2-Zellen 87

3.7.2 Untersuchung der Wirkung von YM155 und Cisplatin auf die Expression von G-Survivin und Survivin-2B auf NT2-R-Zellen 89

3.8 Untersuchung der Wirkung von YM155 und Cisplatin auf die Proliferation von Keimzelltumorzelllinien 91

3.8.1 Untersuchung der Wirkung von YM155 und Cisplatin auf die Proliferation von NT2-Zellen 92

3.8.2 Untersuchung der Wirkung von YM155 und Cisplatin auf die Proliferation von NT2-R-Zellen 93

3.8.3 Untersuchung der Wirkung von YM155 und Cisplatin auf die Proliferation von 2102Ep-Zellen 94

3.8.4 Untersuchung der Wirkung von YM155 und Cisplatin auf die Proliferation von 2102Ep-R-Zellen 95

3.8.5 Untersuchung der Wirkung von YM155 und Cisplatin auf die Proliferation von NCCIT-Zellen 96

3.8.6 Untersuchung der Wirkung von YM155 und Cisplatin auf die Proliferation von NCCIT-R-Zellen 97

3.9 Untersuchung der Wirkung von YM155 und Cisplatin auf die Fähigkeit von Keimzelltumorzelllinien Kolonien auszubilden 98

3.9.1 Untersuchung der Wirkung von YM155 und Cisplatin auf die Fähigkeit von NT2-Zellen Kolonien auszubilden 98

3.9.2 Untersuchung der Wirkung von YM155 und Cisplatin auf die Fähigkeit von NT2-R-Zellen Kolonien auszubilden 99

3.9.3 Untersuchung der Wirkung von YM155 und Cisplatin auf die Fähigkeit von 2102Ep-Zellen Kolonien auszubilden 100

3.9.4 Untersuchung der Wirkung von YM155 und Cisplatin auf die Fähigkeit von 2102Ep-R-Zellen Kolonien auszubilden 101

3.9.5 Untersuchung der Wirkung von YM155 und Cisplatin auf die Fähigkeit von NCCIT-Zellen Kolonien auszubilden 102

3.9.6 Untersuchung der Wirkung von YM155 und Cisplatin auf die Fähigkeit von NCCIT-R-Zellen Kolonien auszubilden 103

3.10 Analyse der Wirkung einer Inhibition von Survivin oder Survivin-2B alleine, oder in Kombination mit Cisplatin und YM155, auf die Zellzyklus-Verteilung von KZT-Zellen 104

3.10.1 Analyse der Wirkung einer Inhibition von Survivin oder Survivin-2B alleine, oder in Kombination mit Cisplatin und YM155, auf die Zellzyklus-Verteilung von NT2-Zellen 104

3.10.2 Analyse der Wirkung einer Inhibition von Survivin oder Survivin-2B alleine, oder in Kombination mit Cisplatin und YM155, auf die Zellzyklus-Verteilung von NT2-R-Zellen 108

3.11 Analyse der Wirkung einer Inhibition von Survivin oder Survivin-2B alleine, oder in Kombination mit Cisplatin und YM155, auf die Apoptose-Induktion in KZT-Zellen..... 112

3.11.1 Analyse der Wirkung einer Inhibition von Survivin oder Survivin-2B alleine, oder in Kombination mit Cisplatin und YM155, auf die Apoptose-Induktion in NT2-Zellen..... 112

3.11.2 Analyse der Wirkung einer Inhibition von Survivin oder Survivin-2B alleine, oder in Kombination mit Cisplatin und YM155, auf die Apoptose-Induktion in NT2-R-Zellen..... 115

3.12 Immunhistochemische Untersuchungen der Expression von G-Survivin und Survivin in unterschiedlichen Gewebeproben..... 119

3.12.1 Die Expression von G-Survivin und Survivin-2B in gesundem Hodengewebe 119

3.12.2 Die Expression von G-Survivin und Survivin-2B in CIS-Zellen..... 120

3.12.3 Die Expression von G-Survivin und Survivin-2B in Seminomen 121

3.12.4 Die Expression von G-Survivin und Survivin-2B in Embryonalkarzinomen 122

3.12.5 Die Expression von G-Survivin und Survivin-2B in Dottersacktumoren..... 123

3.12.6 Die Expression von G-Survivin und Survivin-2B in Chorionkarzinomen..... 124

3.12.7 Die Expression von G-Survivin und Survivin-2B in Cisplatin-sensitiven und Cisplatin-resistenten Keimzelltumoren..... 125

3.12.8 Statistische Auswertungen der immunhistochemischen Expressionsanalysen..... 126

4 Diskussion 132

4.1 Die Expression von Survivin und Survivin-2B in KZT-Zelllinien..... 133

4.2 Die Inhibition von Survivin in KZT-Zellen..... 134

4.3 Die Rolle von Survivin und Survivin-2B in der Proliferation von KZT-Zelllinien..... 137

4.4 Die Rolle von Survivin und Survivin-2B im Zellzyklus und der Apoptose-Induktion von KZT-Zellen..... 138

4.5 Die Wirkung von Cisplatin auf die Expression von Survivin und Survivin-2B..... 140

4.6 Ergebnisse zur Langzeitwirkung einer Survivin-Inhibition auf KZT-Zellen..... 142

4.7 Zusammenfassung der Erkenntnisse zu der Funktion von Survivin und Survivin-2B in KZT-Zellen..... 142

4.8 Die Expression von Survivin und Survivin-2B in KZT..... 144

Danksagung 149

Eidesstattliche Versicherung..... 151

Abkürzungsverzeichnis 152

Literaturverzeichnis..... 155

I Zusammenfassung

Humane Keimzelltumore (KZT) sind eine sehr heterogene Gruppe von Tumoren, die sowohl entwicklungsbiologisch, als auch unter tumorbiologischen Aspekten sehr interessant sind. Im Klassifikationssystem der *World Health Organisation* (WHO) werden KZT in fünf Entitäten unterteilt. Als Typ II-Tumore gelten Seminome und Nicht-Seminome (Embryonal-karzinome, Dottersacktumore, Chorionkarzinome und Teratome bei Jugendlichen und jungen Erwachsenen). Diese Tumore stellen die häufigste bösartige Erkrankung bei jungen Männern zwischen 20 und 40 Jahren dar, mit steigender Inzidenz in den westlichen Ländern. Die Mortalität von KZT-Patienten ist mit der Einführung einer Cisplatin-basierten Chemotherapie in den 1970er Jahren zwar drastisch gesunken, jedoch wird in bis zu 20% der Fälle entweder eine intrinsische oder eine erworbene Resistenz gegenüber Cisplatin beobachtet, was eine schlechte Prognose für die Patienten bedeutet. Cisplatin wirkt in der Zelle hauptsächlich über die Ausbildung von DNA-Addukten, welche in KZT-Zellen einen G2/M-Arrest auslösen, von welchem aus die Zellen dann in Apoptose gehen. Die außergewöhnliche Empfindlichkeit der KZT-Zellen gegenüber Cisplatin wird auf eine reduzierte Effektivität der DNA-Reparatur einerseits, und eine ungewöhnlich starke Antwort auf apoptose-induzierende Reize andererseits zurückgeführt. Unterschiedliche Mechanismen werden hingegen hinter der Entstehung von Cisplatin-Resistenzen vermutet. Hierzu zählt auch die Inhibition der Apoptoseantwort. Bei der Apoptose kommt es zum systematischen Abbau der Zelle, ohne das benachbarte Zellen oder Gewebe dadurch beschädigt werden. An der Regulierung der Apoptose sind viele unterschiedliche Proteine beteiligt, u.a. auch Survivin, ein Mitglied der *inhibitor of apoptosis protein family* (IAP-family). Neben der wichtigen Funktion als Inhibitor der Apoptose ist Survivin als Teil des *chromosomal passenger complex* (CPC) an der Mitose beteiligt und sowohl im Zellkern, als auch im Zytoplasma der Zellen lokalisiert. Wegen dieser zwei wichtigen Funktionen in der Zelle wird Survivin während der Embryogenese und in allen proliferierenden Geweben exprimiert, ist aber in normalen, ausdifferenzierten Geweben kaum nachweisbar. Eine weitere Besonderheit im Expressionsprofil von Survivin ist, ist das es in fast allen soliden Tumorentitäten zu einer erneuten Expression von Survivin kommt. Die erhöhte Expression von Survivin in Tumorzellen wurde demnach schon häufig mit der malignen Transformation dieser Zellen und fortgeschrittenen Tumorstadien, aber auch mit der Resistenz gegenüber Chemo- oder Radiotherapien und somit einer schlechten Prognose

für die Patienten in Verbindung gebracht. Die Expression von Survivin kann sowohl die Proliferation der Tumorzellen fördern, als auch die Induktion der Apoptose nach einer Behandlung der Zellen unterdrücken, was einen Überlebensvorteil für die Tumorzellen bedeutet. Neben der Haupt-Splicevariante von Survivin gibt es noch weitere Isoformen dieses Proteins, welche ebenfalls alle mit der malignen Transformation von Zellen in Verbindung gebracht werden konnten. Eine viel untersuchte, aber in ihrer Funktion immer noch umstrittene Isoform von Survivin ist Survivin-2B. Für Survivin-2B wurde in Tumorzellen bislang sowohl eine antiapoptotische, aber auch eine proapoptotische Funktion postuliert. Auch die Expressionsstärke von Survivin-2B in Tumoren wurde sowohl positiv als auch negativ mit der Aggressivität von Tumoren und der Prognose für Tumorpatienten korreliert.

In der vorliegenden Arbeit wurde die biologische Funktion von Survivin und Survivin-2B in KZT-Zellen untersucht und die Rolle dieser beiden Isoformen in der Resistenz der Tumorzellen gegenüber Cisplatin analysiert. Des Weiteren wurde die Expression von Survivin und der Isoform Survivin-2B in normalem Hodengewebe, CIS-Zellen (KZT-Vorläuferzellen), KZT-Proben unterschiedlicher Histologie, sowie Cisplatin-sensitiven und -resistenten Tumorproben untersucht, um die Expressionsstärke von Survivin und Survivin-2B mit der Aggressivität sowie der Cisplatin-Resistenz von KZT zu korrelieren.

Die Expression von Survivin und Survivin-2B konnte sowohl auf RNA-, als auch auf Proteinebene in allen untersuchten KZT-Zelllinien nachgewiesen werden. Dabei wurde bei dem Vergleich der Expressionsstärke zwischen Cisplatin-sensitiven und -resistenten Zelllinien eine Tendenz zu einer höheren Expression beider Isoformen in Cisplatin-resistenten Zellen festgestellt, was auf eine Beteiligung dieser Proteine in der Resistenzbildung hindeuten könnte. Durch den Einsatz spezifischer siRNAs gegen Survivin und Survivin-2B konnte die Expression der beiden Isoformen sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene signifikant reduziert werden.

Durch die Behandlung der Zellen mit der siRNA gegen Survivin, aber auch durch den Einsatz von YM155, einem *small molcule inhibitor*, welcher die Promotoraktivität der Survivin-Gens spezifisch hemmt und sich bereits in klinischer Testung befindet, konnten starke antiproliferative Effekte in allen KZT-Zelllinien beobachtet werden. In den Cisplatin-resistenten Zellen gelang es durch diese Herunterregulierung von Survivin die Resistenz gegenüber Cisplatin aufzuheben und die Zellen wieder auf Cisplatin zu sensibilisieren. Die Inhibition der Isoform Survivin-2B durch den Einsatz einer spezifischen siRNA hatte einen

geringeren antiproliferativen Effekt in den KZT-Zelllinien und konnte den antiproliferativen Effekt von Cisplatin nicht weiter verstärken, was gegen eine antiapoptotische Rolle von Survivin-2B in KZT-Zellen spricht. Die Herunterregulierung von Survivin durch RNA-Interferenz löste sowohl in den Cisplatin-sensitiven, als auch in den -resistenten Zellen einen G2/M-Arrest und Apoptose aus. In Kombination mit einer Cisplatin-Behandlung der Zellen konnten die Effekte von Cisplatin auf die Induktion des Zellzyklusarrests und das Auslösen von Apoptose deutlich verstärkt werden. Die Inhibition von Survivin durch den Einsatz von YM155 zeigte keinen großen Effekt auf die Verteilung der Zellen im Zellzyklus, jedoch konnte auch hier durch eine Kombination von YM155 und Cisplatin der Effekt von Cisplatin hinsichtlich der Apoptose-Induktion sowohl in den Cisplatin-sensitiven, als auch in den -resistenten Zellen verstärkt werden. Die Inhibition von Survivin-2B durch RNA-Interferenz zeigte in Bezug auf die Induktion eines G2/M-Arrests einen geringeren Effekt, als die Inhibition von Survivin. Auf die Induktion von Apoptose konnte nach der Behandlung der Zellen sogar ein geringgradiger protektiver Effekt einer Survivin-2B-Inhibition in Cisplatin-resistenten Zellen beobachtet werden, was für eine proapoptotische Funktion dieses Proteins in Cisplatin-resistenten KZT sprechen würde.
Die Koloniebildung der Tumorzellen konnte sowohl durch den Einsatz von Cisplatin, als auch durch die Behandlung der Zellen mit YM155 signifikant gehemmt werden, wobei die Kombination beider Substanzen den größten inhibitorischen Effekt auf die Ausbildung von Kolonien zeigte.
Expressions-analysen konnten sowohl eine nukleäre, als auch eine zytoplasmatische Lokalisation von Survivin in den Zellen nachweisen, was hinsichtlich der beiden Funktionen von Survivin den Erwartungen entspricht. Survivin-2B konnte vornehmlich im Zytoplasma der Zellen detektiert werden, was für eine hauptsächliche Rolle der Isoform bei der Regulierung der Apoptose spricht. Die Untersuchung der Expressionsstärke von Survivin zeigte, dass es nach einer Cisplatin-Behandlung der Zellen zu einer Zunahme von Survivin in den Zellen kommt. Ob diese Beobachtung einem Schutzmechanismus der behandelten Zellen gegen Apoptose entspricht, oder vielmehr der Tatsache geschuldet ist, dass die Zellen nach der Cisplatin-Behandlung in einen Zellzyklus-Arrest in der G2/M-Phase gehen, in der die Expression von Survivin generell am stärksten ist, wurde nicht weiter untersucht und muss derzeit offen bleiben. Survivin-2B wird auf Proteinebene nach einer Cisplatin-Behandlung der Zellen nur in Cisplatin-sensitiven Zellen verstärkt exprimiert. In den Cisplatin-resistenten Zellen konnte sogar eine leichte Abnahme von Survivin-2B nach einer Cisplatin-Behandlung

der Zellen beobachtet werden. Es darf aufgrund dieser Ergebnisse vermutet werden, dass die Apoptoseinduktion in KZT-Zellen ein Zusammenspiel der verschiedenen Splicevarianten erfordert, was aber Gegenstand zukünftiger Untersuchungen bleiben muss.
Die Analyse der Expression von Survivin und Survivin-2B in KZT-Proben konnte in allen untersuchten Geweben sowohl eine nukleäre, als auch eine zytoplasmatische Expression für beide Isoformen nachweisen. Die Expression von Survivin und Survivin-2B in normalem Hodengewebe kann sowohl mit dem proliferativen Potential der Spermatogenese, als auch mit einem erhöhten Apoptoseschutz dieses besonderen Gewebes erklärt werden. Die starke Expression von Survivin in CIS-Zellen, den Vorläufer-Zellen von KZT, lässt sich ebenfalls mit der Rolle von Survivin in der Proliferation und der Apoptose-Regulierung in Einklang bringen. Die generelle Expression von Survivin und Survivin-2B in KZT unterschiedlicher Histologie kann zum einen auf die maligne Transformation der Zellen zurückgeführt werden, wie auch für fast alle anderen soliden Tumorentitäten nachgewiesen werden konnte. Zum anderen konnte die Expression von Survivin und seinen Isoformen ebenfalls in humanen embryonalen Stammzellen nachgewiesen werden. KZT gelten als der maligne Gegenpart dieser Zellen, was die generelle Expression von Survivin in KZT ebenfalls erklären könnte. Bei KZT-Proben, die sich gegenüber einer Cisplatin-Behandlung resistent zeigten konnte im Vergleich zu sensitiven Tumoren eine erhöhte Expression von nukleärem und zytoplasmatischem Survivin festgestellt werden bei allerdings geringer Patientenfallzahl. Die nukleäre Expression von Survivin korrelierte signifikant mit der Cisplatin-Resistenz untersuchter Proben und mit der Aggressivität von KZT-Proben unterschiedlicher Histologie. Eine weitere signifikante Korrelation konnte für die Aggressivität der KZT und der Expression von zytoplasmatischem Survivin-2B festgestellt werden.

Die gewonnen Daten dieser Arbeit belegen, dass eine Inhibition von Survivin ein therapeutisches Potential zur Umgehung einer Cisplatin-Resistenz in KZT haben könnte. Die Inhibition von Survivin wirkte sowohl antiproliferativ, als auch apoptosefördend und hemmte zudem die Koloniebildung der Zellen. Alle beobachteten Effekte dieser Inhibition konnten durch eine zusätzliche Behandlung der KZT-Zelllinien mit Cisplatin verstärkt werden. Zudem konnte die Survivin-inhibition Cisplatin-resistente KZT-Zellen gegenüber einer Behandlung mit Cisplatin erneut sensibilisieren und so die Cisplatin-Resistenz aufheben. Die Funktion der Isoform Survivin-2B konnte hingegen nicht eindeutig aufgeklärt werden und bedarf weiteren Untersuchungen.

II Abstract

Germ cell tumors (GCT) are a very heterogeneous and interesting group of tumors. They are the most common malignancies amongst young men aged from 20 to 40 years. Since the introduction of cisplatin-based chemotherapy in the mid 1970-ies, the cure rate has increased dramatically. Up to 90% of GCT patients can be cured by surgery, radiotherapy, chemotherapy or combinations of the different approaches. However, intrinsic or induced resistance against chemotherapy occurs in up to 20% of all advanced cases, leading to treatment failure and poor prognosis in 50% of the patients. The cytotoxicity of cisplatin is mainly mediated by the formation of DNA-adducts, which leads to a cell cycle arrest in the G2/M phase and apoptosis induction in treated cells. The inhibition of apoptosis can be one mechanism mediating resistance against cisplatin in tumor cells. The “inhibitor of apoptosis” protein survivin was shown to play a role in the inhibition of apoptosis as a mechanism of resistance to different types of cancer treatment. It is known that survivin exerts two main functions in the cell, which are also determined by the subcellular localization in two distinct subcellular pools, one nuclear and one cytoplasmic. In the nucleus, survivin is an important part of the chromosomal passenger complex during mitosis. As mentioned earlier, the second function of survivin is the inhibition of apoptosis in cells by blocking directly or indirectly the activation of caspases. Several studies revealed that survivin is highly expressed in embryonic and proliferating cells, but almost undetectable in differentiated adult tissues. Additionally, survivin expression is found to be upregulated in virtually all solid tumors. Interestingly, in several entities, higher expression rates have been described in cisplatin resistant tumors compared to sensitive tumors. Therefore, survivin has been intensively studied as a predictive marker for therapy outcome and additionally as a potential therapeutic target in new strategies to overcome resistance against various treatments in different tumor types.

The aim of this study was to investigate the biological function of survivin and survivin-2B, one of the main splice variants, in GCT cells, and to analyze a potential role of the two isoforms in cisplatin resistance. In addition, the expression and localization of survivin and survivin-2B in samples of normal testis, CIS (carcinoma *in situ*), and GCT of different histology as well as in samples from cisplatin-sensitive and -resistant GCT was analyzed.

In all GCT cell lines examined, expression of survivin and survivin-2B was found on mRNA- and protein-level with a tendency to increased expression of both variants in the cisplatin-resistant

cells, pointing towards a potential involvement of these proteins in resistance to cisplatin. Consistent with its two functions, survivin was found to be expressed in both nuclei and cytoplasm, whereas survivin-2B mainly showed a cytoplasmic localization.

A specific siRNA-mediated down-regulation of survivin on mRNA-level showed strong antiproliferative effects in all cell lines investigated. Both the down regulation of survivin by siRNA, or the treatment of the cells with YM155, an inhibitor of the promoter of the gene, reduced the amount of viable cells significantly. The observed effects could be enhanced by co-treatment of the cells with cisplatin. A siRNA mediated down-regulation of survivin-2B also showed an antiproliferative effect, however to a lesser extent than the inhibition of survivin. Both the inhibition of survivin and the inhibition of survivin-2B by siRNA led to an increasein the population of cells in G2/M-arrest, notably in combination with cisplatin treatment. Increased induction of apoptosis was observed after a combination of inhibition of survivin and concomitant cisplatin treatment in cisplatin-sensitive and -resistant cells, compared to the effect of cisplatin alone. The inhibition of survivin-2B did not enhance apoptosis in cisplatin-sensitive GCT cells. In the cisplatin-resistant counterparts, a weak protective effect could be observed after the down-regulation of survivin-2B by siRNA, pointing towards a cell line dependent pro-apoptotic role of this splice variant.

The inhibition of survivin by YM155 significantly reduced the capacity for colony formation of all treated GCT cells. Again, these effects could be enhanced by an additional treatment of the cells with cisplatin.

In general, the treatment of GCT cells with cisplatin led to an increased expression of survivin on protein-level. It remains unclear whether this effect represents an attempt of the cells to counteract apoptosis, or is due to the fact that the treated cells arrest in the G2/M-phase of the cell cycle, where the expression of survivin peaks. Future research will have to clarify this issue.

An expression of survivin and survivin-2B on protein-level could be observed in all tissues examined. In normal testis, this expression is potentially due to the proliferative character of cells involved in spermatogenesis and a finely tuned balance between apoptosis and protection against apoptosis in this particular tissue. Recently, a high expression of survivin and its isoforms has been found in human embryonic stem cells as a component of the pluripotency. As these cells are considered to be the non-malignant counterpart of GCT, the expression of both variants in CIS or GCT of different histology might also be explained by this

context. An additional explanation for the expression of survivin and survivin-2B could be the malignant transformation of these cells. Almost every solid tumor was found to be positive for the expression of survivin and survivin-2B. In the investigated GCT tissues, nuclear and cytoplasmic staining of both survivin and survivin-2B could be observed in the present analysis. Uniformly, the expression of survivin was found to be higher than the expression of survivin-2B in all tissues. In addition, stronger survivin expression was found in the nuclei and cytoplasm of cisplatin resistant in comparison to sensitive tumors. A significant correlation of a strong nuclear survivin expression with resistance against cisplatin treatment was found. A second significant correlation was found between cytoplasmic expression of survivin-2B and the aggressiveness of the GCT according to histology. Lowest expression was found in CIS, moderately elevated expression of cytoplasmic survivin-2B was found in seminomas, whereas non-seminomas showed the highest expression of the protein.

The data generated in this analysis document a potential therapeutic effect of the down-regulation of survivin in overcoming cisplatin resistance in CGT. The inhibition of survivin resulted in antiproliferative effects as well as increased apoptosis. Additionally, the capacity to from colonies was significantly reduced by the inhibition of survivin in the cells. All effects mentioned could be significantly enhanced by concomitant treatment of the GCT cells with cisplatin. We therefore postulate that the down-regulation of survivin can sensitize resistant cells to cisplatin. Interestingly, the exact role and function of survivin-2B in GCT could not be fully clarified in this study and therefore deserves further investigation.

1 Einleitung

1.1 Keimzellen – Der Ursprung von Gut und Böse

Die Zellen der Keimbahn, auch Gameten genannt, sind einzigartige Zellen eines Organismus. Nur aus diesen Zellen kann nach der Verschmelzung zweier ein vollständiger neuer Organismus entstehen. Nur Gameten sind so in der Lage, das genetische Material eines Individuums an die nächste Generation weiter zu geben. Gameten sind haploide Zellen und werden schon während der Embryogenese aus sogenannten primordialen Keimzellen gebildet (1,2). Diese Vorläuferzellen entstehen aus dem Epiblast (bildet die drei Keimblätter Endoderm, Ektoderm und Mesoderm) und wandern während der embryonalen Entwicklung entlang der Mittellinie des Körpers bis zur Keimleiste, woraufhin dort die Ausbildung der Gonaden (Keimdrüsen) und die sexuelle Differenzierung folgt (3). Dieser Prozess ist unter anderem von der Expression des Oberflächenrezeptors c-Kit (CD117, SCFR, *stem cell growth factor receptor*) abhängig (3,4), über welchen sich primordiale Keimzellen auch nachweisen lassen. Ebenfalls zur Detektion der Zellen dient die Expression von weiteren spezifischen Markern wie alkalische Phosphatase (AP), OCT4 (*octamer binding transcription factor 4*), NANOG (*NANOG homeobox*), Stella (*developmental pluripotency associated protein 3*) oder VASA (*probable ATP-dependent RNA helicase DDX4*) (5,6). Je nach Konstitution der Gonosomen (XX- oder XY-Status) des Embryos und der entsprechenden Mikroumgebung entwickeln sich in den Gonaden die primordialen Keimzellen zu pluripotenten Gameten weiter (Gametogenese).
Liegt ein Y-Chromosom vor, erfolgt die Transkription des auf diesem Chromosom gelegenen SRY-Gens (*sex determining region on the chromosome Y*), welches für den Hoden-determinierenden Faktor (TDF, *testis determining factor*) kodiert. Durch diesen Faktor wird die Transkription unterschiedlicher Gene (im speziellen SOX9 aus der Familie der SOX-Gene, s*ry r*elated high mobility group b*ox* genes) aktiviert, welche unter anderem die Differenzierung von Sertoli-Zellen in der Keimleiste fördern. Diese stimulieren wiederum die Entwicklung von männlichen Keimzellen, Androgene-produzierenden Leydig-Zellen, Blutgefäßen und weiteren interstitiellen Zellen (7,8). Im reifen Hoden bilden Sertoli-Zellen die Blut-Hoden-Schranke und schützen die Spermien vor Giftstoffen. Die Zellen sind, ebenso wie die Keimzellen, intratubulär lokalisiert und haben zudem eine stützende Funktion in den Hodenkanälchen (Tubuli seminiferi). Des Weiteren tragen Sertoli-Zellen durch die Bildung von Inhibin und Activin (9,10), welche mit FSH (follikelstimulierendes Hormon) wechselwirken, zur Regulation der

Spermatogenese bei. Leydig-Zellen sind im Interstitium (Zwischengewebe) des Hodens lokalisiert und produzieren unter anderem Testosteron. Während der Embryogenese wird dies durch das humane Choriongonadotropin (hCG) gefördert und bewirkt die Differenzierung der Genitalwege und der äußeren Genitalien. Nach Wegfall des hCGs stellen die fetalen Leydig-Zellen die Testosteronproduktion ein. Nach Eintritt der Pubertät beginnt die Produktion jedoch erneut und stimuliert die Weiterentwicklung der sekundären Geschlechtsmerkmale und die Spermienproduktion (11,12).

Liegt jedoch ein XX-Status im Embryo vor, führt die Abwesenheit von TDF zur Regulation unterschiedlicher Gene (WNT4 (w*ingless-type MMTV integration site family, member 4*), FOXL2 (*forkhead box L2*)), was letztendlich zur Differenzierung der primordialen Keimzellen zu Primordial-Follikeln führt, aus denen später die Oocyten hervorgehen.

1.2 Keimzelltumore

Humane Keimzelltumore (KZT) stellen eine sehr heterogene und sowohl entwicklungsbiologisch, als auch unter tumorbiologischen Aspekten interessante Gruppe von Tumoren dar. Der vermutete Ursprung dieser Tumore aus primordialen Keimzellen stützt sich auf mehrere Beobachtungen. Zum einen können KZT außer in den Gonaden (Hoden oder Ovarien) auch entlang der Mittellinie des Körpers auftreten. Zu diesen Lokalisationen zählen das Retroperitoneum (Raum hinter dem Bauchfell), das Mediastinum (Mittelfellraum), der Hypothalamus (Abschnitt im Zwischenhirn) oder die Epiphyse (Zirbeldrüse). Dies könnte auf einen Zusammenhang mit der Migrationsroute der primordialen Keimzellen während der Embryogenese hindeuten (2). Ein anderer Aspekt, welcher für eine Abstammung der KZT von primordialen Keimzellen spricht, ist die Expression von VASA, einem keimzellspezifischen Protein, welches bei beiden Zelltypen nachgewiesen werden konnte (13). Des Weiteren sprechen ebenfalls epigenetische Beobachtungen, wie das spezifische Methylierungs-Muster dieser Tumore für ihre Abstammung von primordialen Keimzellen (14).

Klinisch gesehen können sowohl die Entstehung, als auch der Verlauf von KZT von einer Reihe von Faktoren beeinflusst werden, angefangen bei dem Geschlecht des Patienten über dessen Alter, die Lokalisation des Tumors bis hin zu seiner Histologie. Die Gruppe der KZT wurde 2003 im Klassifikationssystem der *World Health Organisation* (WHO) unter Berücksichtigung der oben genannten Parameter und chromosomaler Charakteristika in fünf Entitäten unterteilt

(15). Drei der Keimzelltumor-Typen stehen im Zusammenhang mit männlichen Keimzellen. Das sind zum einen die Typ I-Tumore, wozu Teratome (Tumore, die aus allen Komponenten der drei Keimblätter bestehen und somit unterschiedliche Gewebetypen enthalten können) und Dottersacktumore (zystische Tumore, welche nekrotische und hämorrhagische Anteile enthalten) bei Neugeborenen und Kindern gezählt werden. Als zweites sind Seminome (homogene Tumore, die frühen Keimzellen ähneln) und Nicht-Seminome (Embryonalkarzinome, Dottersacktumore, Chorionkarzinome (Tumor aus Trophoblasten-gewebe) und Teratome) bei Jugendlichen und jungen Erwachsenen) von Relevanz, die als Typ II-Tumore gelten. Spermatozytische Seminome des älteren Mannes werden als Typ III-Tumore bezeichnet. Mit weiblichen Keimzellen sind Tumore der Typen IV und V assoziiert, welche Dermoidzysten und Blasenmolen darstellen (16,17).

1.3 Testikuläre Keimzelltumore

Tumore der Typen I – III umfassen auch testikuläre Keimzelltumore (TKZT), wobei die Seminome und Nicht-Seminome der Gruppe II die größte Tumorentität unter allen Keimzelltumoren darstellt. In dieser Arbeit werden ausschließlich Typ II-Tumore behandelt.
Die direkte Vorläuferzelle testikulärer Typ II-Keimzelltumore wurde erstmals 1972 von Nils Skakkebaek beschrieben (18,19) und wird als Carcinoma *in situ* (CIS), oder *intratubular germ cell neoplasia unclassified* (IGCNU) oder aber auch als testikuläre intraepitheliale Neoplasie (TIN) bezeichnet. Der Phänotyp dieser CIS-Zellen entspricht neoplastisch entarteten primordialen Keimzellen (20), was auch in der Expression embryonaler Stammzellmarker wie alkalische Phosphatase, c-KIT, OCT4, NANOG, UTF1 (*undifferentiated embryonic cell transcription factor 1*) und AP-2γ (*activating enhancer-binding protein 2γ*) zum Ausdruck kommt (3). Eine typische Lokalisation der Zellen im Hoden ist in der Basalmembran der Hodenkanälchen, wo sie nach der intrauterinen Transformation während der Kindheit ruhen und sich der Tumor erst nach Eintritt der Pubertät, wahrscheinlich durch hormonelle Stimulation bedingt manifestiert (21).

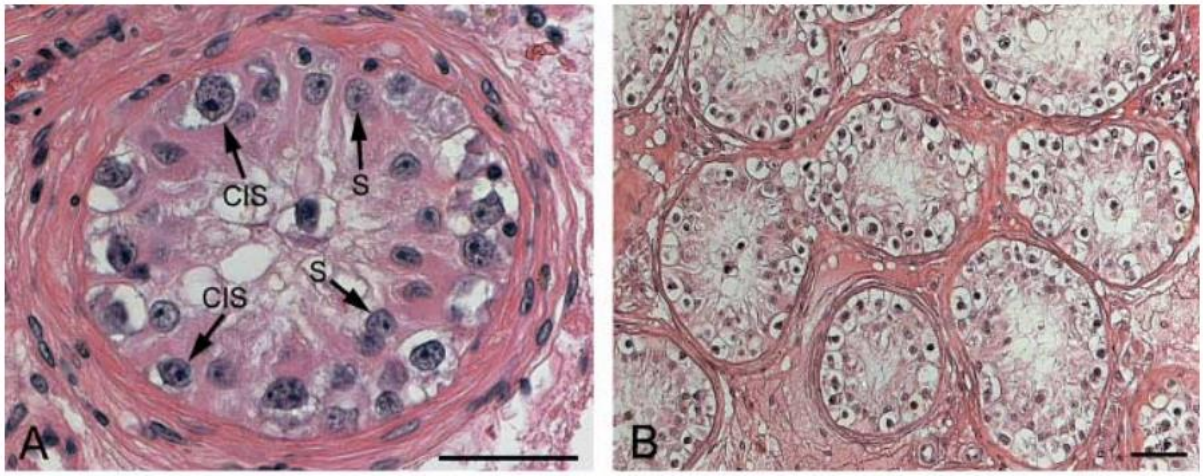


Abbildung 1: Verdeutlichung von CIS-Zellen durch eine Hämatoxilin-Eosin-Färbung einer Hodenbiopsie. (A) Tubulus seminiferus mit gekennzeichneten Sertoli-Zellen (S) und CIS-Zellen (CIS). (B) Übersicht über mehrere Tubuli Seminiferi. Aus (21).

Die Unterteilung von Typ II-KZT in Seminome und Nicht-Seminome erfolgt klinisch sowie histologisch (22,23). Seminome stellen mehr als 50% der TKZT dar, während Nicht-Seminome ca. 40% der TKZT ausmachen. Die restlichen 10% bilden gemischte TKZT, die aus beiden Tumorarten bestehen. Seminome sind histologisch einheitliche Tumore aus monomorphen Zellen, welche den primordialen Keimzellen und CIS-Zellen ähneln (24,25). Die sehr heterogene Gruppe von Nicht-Seminomen hingegen kann unterschiedlichste Histologien aufweisen. Diese entsprechen verschiedenen Differenzierungs-linien und -stadien der primordialen Keimzellen/Gonozyten während der Embryogenese. So kann man das Embryonalkarzinom der pluripotenten Stammzellkomponente gleich setzen. Von hier aus können sich zum einen embryonale Gewebe mit epithelialer, mesenchymaler oder neuronaler Differenzierung entwickeln, wie es etwa bei reifen oder unreifen Teratomen der Fall ist. Zum anderen ist auch eine extraembryonale Differenzierung möglich, wie bei Dottersacktumoren oder Chorionkarzinomen (26).

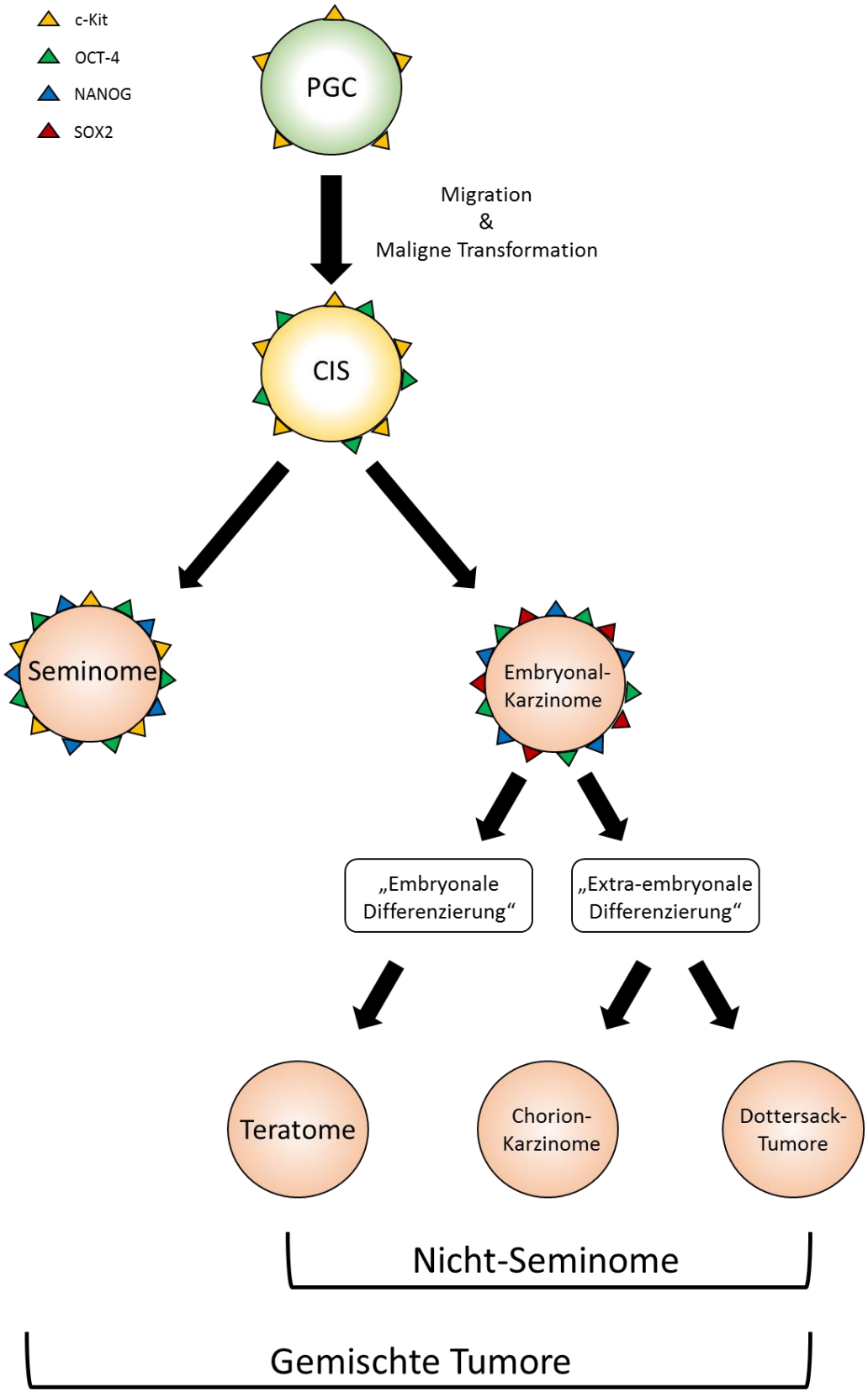


Abbildung 2: Unterschiedliche Entwicklungs- und Differenzierungsstufen von Testikulären Keimzelltumoren ausgehend von einer primordiellen Keimzelle. PGC: Primordial germ cell. CIS: Carcinoma in situ.

Zur Identifikation der unterschiedlichen TKZT-Typen können diese auf die Expression von verschiedenen Proteinmarkern getestet werden. Ein Faktor, dessen Expression sowohl bei primordialen Keimzellen, als auch bei CIS-Zellen und Seminome nachweisbar ist, ist der Oberflächenrezeptor c-Kit (27). Die Expression des Transkriptionsfaktors OCT-4 ist charakteristisch für CIS-, Seminom- und Embryonalkarzinomzellen, wohingegen sowohl Teratome, als auch Dottersacktumore diesen Marker nicht exprimieren (22). Embryonalkarzinome können durch den Nachweis der kombinierten Expression von OCT-4, NANOG und SOX2 identifiziert werden (28).

Als bekannte Risikofaktoren für TKZT gelten unter anderem der Maldescensus Testis (Hodenhochstand), eine bereits vorangegangene Keimzelltumorerkrankung, ein niedriges Geburtsgewicht (<3000 g), eine Frühgeburtlichkeit (≥2 Wochen) und eine familiäre Prädisposition. Es werden aber auch Zusammenhänge mit der Diät und anderen exogenen Einflüssen wie Chemikalien vermutet (29).

Auch wenn TKZT nur in etwa 1% der soliden Tumoren des Mannes ausmachen, stellen sie die häufigsten bösartigen Tumore junger Männer im Alter zwischen 20 und 40 Jahren dar. In den westlichen Ländern hat sich die Inzidenz der TKZT in den letzten 40 Jahren fast verdoppelt. Hervorzuheben ist, dass die Inzidenz für TKZT sowohl altersabhängig ist, als auch eine geographische und ethnische Abhängigkeit zeigt. So ist die altersabhängige Inzidenzrate zum Beispiel in der Schweiz und in Dänemark mit 10 bzw. 12/100.000 weltweit am höchsten und in Asien und Afrika mit 1/100.000 am niedrigsten. Auch in Deutschland ist die Inzidenz in den letzten Jahrzehnten signifikant gestiegen und liegt derzeit bei 9-10/100.000. Die Mortalität hingegen ist in allen industrialisierten Ländern auf 0,4/100.000 gesunken, was auf die Einführung einer sehr effektiven Cisplatin-basierten Chemotherapie in den 1970er Jahren zurückzuführen ist (29).

1.4 Cisplatin – der Glücksfund

Dass Cisplatin (*cis*-Diamindichloroplatin(II)) eine zytostatische Wirkung zeigt, entdeckte Barnett Rosenberg im Jahre 1965 zufällig bei seinen Untersuchungen zum Wachstumsverhalten von *Escherichia coli* im elektrischen Feld (30). Hierzu wurden die Bakterien in einer Ammoniumchlorid-haltigen Nährlösung kultiviert, welche mit Hilfe einer Platinelektrode unter Spannung gesetzt wurde. Hierbei bildeten sich an den Elektroden durch Oxidation

cis-Diamindichloroplatin(II) und *cis*-Diamintetrachloroplatin(IV) und Rosenberg beobachtete, dass die Teilungsfähigkeit der Bakterien gehemmt wurde. Die Bakterien zeigten stattdessen ein enormes Längenwachstum und Filamentbildung. Ein paar Jahre später folgte die nächste zukunftsträchtige Beobachtung Rosenbergs: In Versuchen mit Mäusen konnte gezeigt werden, dass Cisplatin eine große Antitumorwirkung hat (31). Eine der ersten klinischen Phase I-Studie wurde 1974 durchgeführt und schloss auch Hodentumorpatienten mit ein (32).
In der Medizin wird Cisplatin als Infusion in einer NaCl-Lösung verabreicht und liegt dort in komplexierter Form als *cis*-Diamindichloroplatin(II) vor. In wässriger Lösung dissoziieren die beiden Chlorid-Ionen und es entstehen Aquaplatin(II)-Komplexe mit einem sehr elektrophilen Platin-Atom. Dieses „aktivierte“ Cisplatin ist in der Lage mit nukleophilen Gruppen unterschiedlicher Moleküle zu reagieren. Im Blut liegt der größte Teil der Moleküle aufgrund der hohen Chlorid-Konzentration (100 mM) in unveränderter Form vor. Nachdem Cisplatin über passive Diffusion oder einen aktiven Transport durch Membran-proteine oder Transmembranpumpen (33) in die Zelle gelangt ist, kommt es auf Grund der wesentlich niedrigeren Konzentration an Chlorid-Ionen (4 mM) zur Hydrolyse des Platinkomplexes und somit zur Aktivierung des Cisplatins (34). Im Zytoplasma und im Zellkern finden sich unterschiedliche Moleküle, die eine oder mehrere nukleophile Gruppen aufweisen. Die zytotoxische Wirkung von Cisplatin beruht hauptsächlich auf der Reaktion des Moleküls mit der DNA (35,36). Hierbei entstehen unterschiedliche Cisplatin-Addukte, wobei eine Reaktion mit zwei benachbarten Guaninen eines DNA-Strangs mit ca. 65% am häufigsten zu beobachten ist.

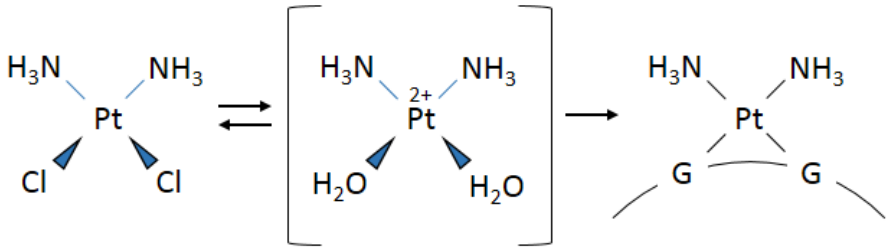


Abbildung 3: Drei mögliche Formen von Cisplatin. Vom chelatierten *cis*-Diamindichloroplatin(II) (links) über *cis*-Diamindiaquaplatin(II) (mitte) bis zum an die DNA gebundenen Cisplatin-Addukt (rechts).

Mit einer Häufigkeit von ca. 25% ist eine Vernetzung zwischen einem Guanin und einem benachbarten Adenin als zweithäufigstes Produkt zu finden. Wesentlich seltener treten andere Intrastrang-Vernetzungen oder Quervernetzungen zwischen zwei unterschiedlichen

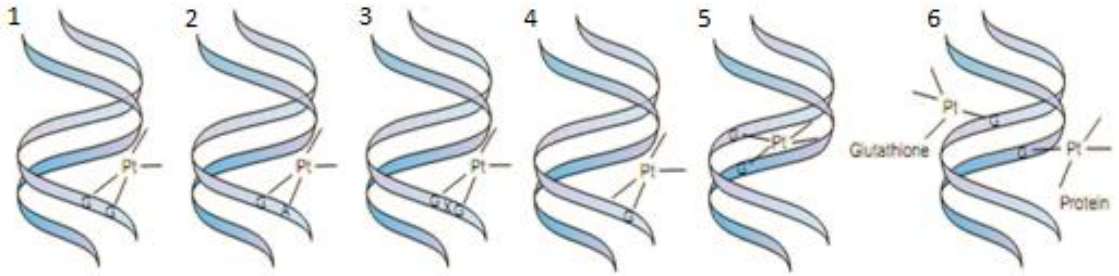


Abbildung 4: Unterschiedliche Cisplatin-Addukte. (1) Addukt mit zwei benachbarten Guaninen. (2) Addukt mit einem Guanin und einem benachbarten Adenin. (3) Addukt mit zwei Guaninen über eine Base desselben DNA-Strangs hinweg. (4) Mono-Addukt. (5) Interstrang-Addukt. (6) Intermolekulare Addukte. Verändert nach (37).

DNA-Strängen auf. Auch die Ausbildung von Mono-Addukten oder intermolekularen Addukten mit Proteinen oder anderen thiolhaltigen Molekülen kann selten beobachtet werden. Hervorzuheben sind hier Verbindungen wie Glutathion und Metallothionein, welche Cisplatin über ihre Thiolgruppen binden und inaktivieren können und so zu einer Detoxifikation der Zelle beitragen (37). Die weitere zytotoxische Wirkung der gebildeten Cisplatin-DNA-Addukte wird in Kapitel 1.5 weiter ausgeführt.

1.5 Cisplatin und KZT – die Revolution

Seit dem Einsatz von Cisplatin-haltiger Chemotherapie, besonders in Kombinationen mit anderen Chemotherapeutika wie Etoposid, Bleomycin oder Ifosfamid, gelten KZT seit Mitte der 1970er Jahre als eine der Tumorentitäten mit der größten Heilungschance. Zusammen mit der Radiotheraphie und der Chirurgie gehört die Cisplatin-basierte Chemotherapie heutzutage zu der Standardbehandlung von KZT (38). Aber auch andere Entitäten, wie kleinzellige Bronchialkarzinome, Tumore des Kopf-Hals-Bereiches und Ovarialkarzinome werden mit Cisplatin sehr erfolgreich behandelt (34). Es wurde sogar bei Patienten mit bereits metastasierten KZT von über 80%igen Heilungsraten durch eine Cisplatin-haltige Chemotherapie berichtet (39). Die Prognose für KZT-Patienten hängt generell von der Histologie des Tumors, dem Metastasierungsstadium und der Höhe der Tumormarker ab. Die Heilungschancen können je nach Prognose heutzutage bei bis zu 90% liegen (39,40). Als eine Ursache für die außerordentlich hohe Heilungsrate und der damit verbundenen hohen Sensitivität von KZT gegenüber einer Behandlung mit DNA-schädigenden Substanzen wie Cisplatin oder einer Radiotherapie, gilt der embryonale Ursprung dieser Tumore (41,42).

Die zytotoxische Wirkung von Cisplatin in der Zelle beginnt nach der Bildung von Addukten mit genomischer DNA. Obwohl diese nur ca. 1% des Cisplatins ausmachen (36), wird die gesamte zytotoxische Wirkung dieser Behandlung auf diese Reaktionen zurückgeführt. Die Schädigung der DNA wird in der Zelle von sogenannten *damage recognition proteins* detektiert, wozu auch unter anderem der XPC-HR23B-Proteinkomplex gehört (*xeroderma pigmentosum, complementation group c protein und UV excision repair protein RAD23 homolog B*) (43). Zur Beseitigung der DNA-Schäden wird nach ihrer Erkennung über den Transkriptionsfaktor p53 ein Zellzyklusarrest initiiert, unter welchem unterschiedliche DNA-Reparaturmechanismen durchgeführt werden können. Über eine posttranslationale Phosphorylierung von p53 wird dieses stabilisiert, akkumuliert in der Zelle und induziert so die Expression von p21 (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1A*). Durch p21 werden die Protein-Komplexe aus CyclinE-Cdk2 (*G1/S-specific cyclin-E2 und Cyclin-dependent kinase 2*) und CyclinD-Cdk4/6 (*G1/S-specific cyclin-D1* und *cyclin-dependent kinase 4* und *6*) inhibiert, welche die Freisetzung der E2F-Transkriptionsfaktorfamilie regulieren. Die Transkriptions-faktoren dieser Familie sind unter anderem für die spätere Wiederaufnahme des Zellzyklus verantwortlich. Nach erfolgreicher Beendigung der DNA-Reparatur gehen die Konzentrationen an p53 und p21 in der Zelle wieder zurück, die E2F-Transkriptionsfaktoren werden freigesetzt und die Zelle tritt wieder in den Zellzyklus ein. Die Tatsache, dass KZT im Vergleich zu anderen Tumoren ein erhöhtes Expressionslevel an p53 haben, unterstützt die bereits oben erwähnte These der hohen Chemosensitivität dieser Tumore (44).

Der tragende Reparaturmechanismus für Cisplatin-induzierte DNA-Schäden ist der sogenannte n*ucleotide excision repair* (NER) (45), aber auch andere Reparaturmechanismen, wie das *base excision repair system* (BER) oder das *DNA mismatch repair system* (MMR) können beteiligt sein. Es konnte nachgewiesen werden, dass KZT-Zellen eine verringerte DNA-Reparaturkapazität aufweisen, was u.a. mit einer verringerten Expression bestimmter am NER beteiligter Proteine assoziiert wurde (46). Diese Eigenschaft und auch ein fehlerhaftes MMR können Einfluss auf die Chemosensitivität der Zellen haben. So wurde zum Beispiel eine Fehlfunktion der MMR-Proteine mit der Resistenzentwicklung gegenüber Cisplatin und dem Auftreten vom Mikrosatelliteninstabilität (MSI) in Zusammenhang gebracht (47,48). Bei der Untersuchung von refraktären (Cisplatin unempfindlichen) KZT konnte in ca. 30% der Fälle eine MSI nachgewiesen werden, was auch auf eine mögliche Rolle bei der Resistenz-entwicklung gegenüber Cisplatin hindeutet (49). Wenn durch unzureichende oder gar

fehlerhafte Reparaturmechanismen keine vollständige Beseitigung der DNA-Schäden möglich ist, wird über die Akkumulation von p53 in der Zelle der intrinsische Apoptose-Signalweg aktiviert und die Zelle geht in den programmierten Zelltod (Apoptose) (50,51). Die Apoptose ist ein natürlicher, unter anderem auch während der Embryogenese oder zum Erhalt der Homöostase auftretender Prozess, der aber auch durch schädigende innere oder äußere Einflüsse in einer Zelle ausgelöst werden kann. Die Apoptose gewährleistet, dass Zellen abgebaut werden, ohne dass das umliegende Gewebe beeinflusst wird. Im Gegensatz hierzu werden bei der Nekrose, einer weiteren Form des Zelltods, durch unkontrolliertes Austreten von Zellbestandteilen in das umliegende Gewebe Entzündungsreaktionen hervorgerufen. Durch das kontrollierte Einleiten der Apoptose in Tumorzellen durch schädigende Substanzen können diese bekämpft werden, ohne dass benachbarte Gewebe oder Organe in Mitleidenschaft gezogen werden.

1.6 Resistenzmechanismen gegenüber Cisplatin

In bis zu 20% der Fälle von KZT kann eine intrinsische oder erworbene Resistenz gegenüber einer Behandlung mit Cisplatin auftreten, die einer schlechten Prognose in Bezug auf die Therapierbarkeit und die Heilungsrate für die Patienten gleichkommt. Die Mechanismen, die zu einer Resistenz gegenüber zytotoxischen Substanzen führen können, sind gerade in den letzten Jahren ein wichtiger Bestandteil der onkologischen Forschung, um die therapeutischen Ergebnisse stetig zu verbessern. Generell sind alle zellulären Eigenschaften und Prozesse, die zu einer Sensitivität gegenüber diesen Substanzen führen, auch denkbare Faktoren für Resistenzmechanismen. Es werden einige unterschiedliche Punkte in Bezug auf die Chemoresistenz gegenüber DNA-schädigenden Substanzen, wie Cisplatin diskutiert. Einer der ersten Punkte, der auch bei KZT untersucht wurde, ist die Zugänglichkeit der Zellen für Cisplatin, welches über passive Diffusion oder auch über aktive Transmembranpumpen in die Zelle gelangt (33). Ein Vergleich zwischen KZT-Zellen und anderen Tumorzellen, wie Kolonkarzinomzellen oder Blasenkarzinomzellen zeigte jedoch keinen Unterschied in Bezug auf die Aufnahme oder die Akkumulation von Cisplatin in den Zellen (52). Auch ein erhöhter Efflux durch ABC-Transporter (ATP binding cassette) oder Multi drug resistance-Proteine (MDR-Proteine) könnte zu einer geringeren Konzentration an Cisplatin in der Zelle führen (53). Es konnten jedoch in Bezug auf verschiedene Proteine dieser Familie (*breast cancer resistance*

protein (BCRP), *multidrug resistance protein 1* und *2* (MRP1 und MRP2), *lung resistance protein* (LRP) und *permeability glycoprotein* (PGP)) keine Unterschiede zwischen Cisplatin-sensitiven und -resistenten Zelllinien festgestellt werden (54). Ein weiterer Mechanismus, der zu einer Resistenzbildung führen könnte, ist die Detoxifikation von Cisplatin durch thiolgruppenhaltige Moleküle der Zellen, wie Glutathion oder Metallothionein. Durch die Bindung von Cisplatin an diese Proteine wird eine weitere Reaktion mit der DNA verhindert. Allerdings zeigten sich auch hier keine Unterschiede in der Expression von Metallothionein oder der Glutathion-S-Transferase zwischen Cisplatin-sensitiven und -refraktären KZT-Zelllinien oder -Tumorproben (54,55). Ein Punkt, der erst nach der Bindung von Cisplatin an die DNA greift, ist eine mögliche erhöhte Toleranz gegenüber DNA-Schäden. Sowohl eine unzureichende oder fehlerhafte Erkennung dieser Schäden, als auch eine verstärkte Reparatur der DNA durch das NER-System sind mögliche Gründe für diese Toleranz (56). Eine der Folgen wäre die Inhibition der Apoptose, wodurch die Zelle trotz der entstandenen Schäden überleben würde. Die Umgehung der Apoptose, auch über andere Wege, ist ein weiterer wichtiger Resistenzmechanismus und wird ausführlich in Kapitel 1.7 behandelt. Auch die Anzahl an gebildeten DNA-Addukten (46,57) und die Expression von *heat shock proteins* (Hsps) wurden als mögliche Faktoren für die Sensitivität oder Resistenz gegenüber Cisplatin untersucht, aber auch in diesen Untersuchungen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen KZT-Zelllinien, Zellen vom kleinzelligen Bronchialkarzinom, Kolonkarzinomzellen und Blasenkarzinomzellen festgestellt werden (58,59).

1.7 Inhibition der Apoptose als Resistenzmechanismus

Es konnte gezeigt werden, dass KZT-Zelllinien nach einer Behandlung mit Cisplatin erst in einen Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase und von dort in die Apoptose gehen (60). Nach der Initiation der Apoptose können verschiedene morphologische Veränderungen der Zelle beobachtet werden. Hierzu gehören das Abrunden und Schrumpfen der Zellen, die Ausbildung und Abschnürung von Membran-Vesikeln (membrane blebbing, Bildung von Apoptosekörper) durch den Abbau des Zyto-Skeletts, die Kondensation des Chromatins und die Fragmentierung der DNA und anderer zellulärer Komponenten (61). Während dieses Vorganges gelangt Phosphatidylserin (PS), ein eigentlich intrazelluläres Membranprotein, auf die Zelloberfläche und markiert die Zelle für die Phagozytose durch Makrophagen, die dieses Protein über

Rezeptoren erkennen und die Apoptosekörper aufnehmen, bevor ihr Inhalt nach außen gelangen und eine Entzündungsreaktion hervorrufen kann (62).

Es gibt zwei unterschiedliche Wege, durch welche die Apoptose ausgelöst werden kann: Der extrinsische Weg und der intrinsische Weg. Der extrinsische Weg wird über die Stimulation von Rezeptoren der tumor necrosis-factor receptor family (TNFR family) auf der Zellmembran ausgelöst. Über eine Signalkaskade kommt es zur Aktivierung der Caspasen 8 und 10. Das Wort „Caspase" leitet sich aus dem englischen von ***c**ysteinyl-**a**spartate **s**pecific **p**rote**ase*** (deutsch: Cystein-Proteasen) ab und beschreibt die eigentliche Funktion dieser Enzyme. Es gibt zwei unterschiedliche Arten von Caspasen: Die Initiator-Caspasen (2, 8, 9 und 10) und die Effektor-Caspasen (3, 6, und 7). Alle Caspasen liegen zunächst in ihrer inaktiven Form als Zymogene oder sogenannte Pro-Caspasen in der Zelle vor und müssen enzymatisch gespalten werden um in die aktive Form überzugehen (63). Initiator-Caspasen besitzen zum einen eine konzentrationsabhängige autokatalytische Aktivität. Zum anderen sind sie im aktiven Zustand in der Lage, Effektor-Caspasen proteolytisch zu spalten und diese so zu aktivieren. Für die Effektor-Caspasen sind mittlerweile über 280 Substrate bekannt, welche Funktionen in allen zellulären Vorgängen haben. Die enzymatische Fragmentierung all dieser Proteine hat zur Folge, dass der gesamte Stoffwechsel der Zelle zum Erliegen kommt, und die einzelnen Komponenten abgebaut werden (64). Sowohl die autokatalytische Aktivierung der Initiator-Caspasen, als auch die proteolytische Aktivierung von nachfolgenden Effektor-Caspasen werden unter dem Begriff „Caspase-Kaskade" zusammengefasst, da sie, einmal angestoßen, die Eigenschaften einer Kettenreaktion innehaben.

Auch der intrinsische Apoptoseweg endet in der Aktivierung von Effektor-Caspasen und der systematischen Zerstörung der Zelle. Er wird auch als mitochondrialer Weg bezeichnet und kann unter anderem durch intrazellulären Stress, wie DNA-Schäden durch Chemo- oder Radiotherapie, ROS (*reactive oxygen species*), ER-Stress (Endoplasmatisches Reticulum-Stress) oder Hypoxie, aber auch durch die Inhibition von Signalwegen ausgelöst werden (65,66). Diese Stress-Signale lösen die Formation von Poren in der äußeren mitochondrialen Membran und so die Freisetzung von proapoptotischen Markern, wie z.B. Cytochrom c aus den Mitochondrien ins Zytoplasma aus. Das zytosolische Cytochrom c bindet an APAF1 (*apoptotic protease-activating factor-1*), was zur Ausbildung eines heptameren Komplexes, dem sogenannten Apoptosom, führt. Diese Oligomerisierung rekrutiert die Pro-Form der Initiator-

Caspase 9, welche autokatalytisch aktiviert wird und daraufhin proteolytisch die Effektor-Caspasen 3 und 7 aktiviert und so den oben beschriebenen Abbau der Zelle auslöst (67,68).

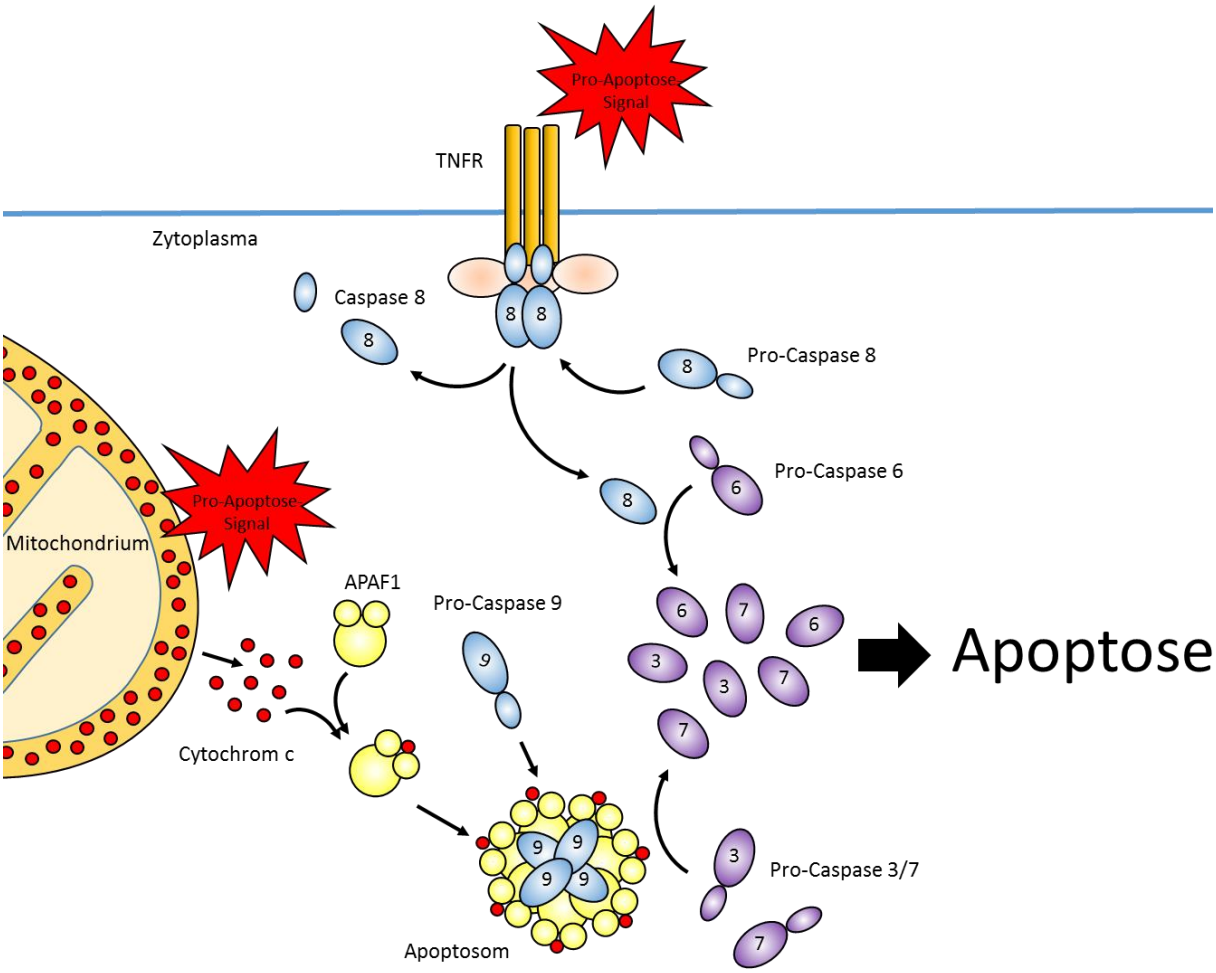


Abbildung 5: Schematische Darstellung des extrinsischen und des intrinsischen Apoptosewegs. Erläuterung siehe Text.

Neben proapoptotischen Proteinen, die die Freisetzung von proapoptotischen Markern aus den Mitochondrien fördern, gibt es auch Antagonisten, welche eine Induktion der Apoptose über den mitochondrialen Weg inhibieren können. Jeder einzelne Schritt in der Apoptose unterliegt strenger Kontrolle auf unterschiedlichen Ebenen und kann sowohl ein Grund für eine besonders hohe Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika sein, als auch ein Angriffspunkt zur Entwicklung einer Resistenz darstellen. In diesem Zusammenhang wurde berichtet, dass es denkbar ist, dass die Chemosensitivität von KZT hauptsächlich auf eine sehr hohe Apoptose-Anfälligkeit der Zellen zurückzuführen ist (69). In vielen KZT konnte zum Beispiel eine verringerte Expression des proapoptotischen Markers Bcl-2 nachgewiesen werden (70), was eine Resistenz fördern könnte. Es können aber auch antiapoptotische Regulatoren überexprimiert oder verstärkt aktiviert sein, oder die Funktion der Caspasen kann

inhibiert werden, um nur einige weitere denkbare Szenarien einer Resistenzentwicklung zu nennen. Ein wichtiges Beispiel für den zuletzt genannten Punkt stellen die *inhibitor of apoptosis proteins* (IAPs) dar. Die IAPs charakterisieren sich dadurch, dass alle Proteine dieser Familie eine oder mehrere BIR-Domänen (*baculoviral IAP repeat-domain*) enthalten. Die ersten IAPs konnten in Baculoviren nachgewiesen werden, was auch namensgebend war. Einige der IAPs tragen RING-Domänen (*really interesting new gene/zinc-finger domain*), welche eine Rolle in der Ubiquitinierung von Proteinen spielt (71). Die Proteine werden von den BIRC-Genen (*Baculoviral IAP repeat-containing*) kodiert und Mitglieder dieser Familie sind in Tabelle 1 aufgeführt (72,73). Für alle diese Proteine wurde eine direkte Inhibition der Aktivität der Effektor-Caspasen 3 und 7 beschrieben, für die meisten unter ihnen konnte ebenfalls eine Inhibition der Initiator-Caspase 9 nachgewiesen werden. Die inhibierende Wirkung der IAPs erfolgt über unterschiedliche Mechanismen. Zum einen können die meisten IAPs die Caspasen direkt über ihre BIR-Domänen binden und so ihre Wirkung unterdrücken. Zum anderen sind einige der IAPs in der Lage, als Ubiquitin-Protein-Ligase zu fungieren und bestimmte Proteine so über eine erhöhte Ubiquitinierung einer schnelleren Degradierung durch das Proteasom zuzuführen (74). Neben der Selbstregulation durch die Ubiquitinierung von anderen IAPs (75), gehören sowohl die Caspasen zu den Zielmolekülen, als auch das Protein DIABLO (*direct IAP-binding protein with low pI*, Synonym: SMAC). DIABLO ist ein proapoptotisches Protein, welches nach einem entsprechenden Signal zusammen mit Cytochrom c aus den Mitochondrien ins Zytoplasma gelangt. Dort kann es den intrinsischen Apoptoseweg zum einen durch die Aktivierung der Caspasen fördern, aber auch durch die direkte Inhibierung der IAPs (76).

Tabelle 1: Übersicht über die humanen IAPs und ausgewählte Funktionen.

Name	BIRs	Inhibierte Caspasen	Weitere Interaktionspartner
NAIP	3	Caspase 3 und 7	APAF1, Hippocalcin
c-IAP1	3	Caspase 3, 7 und 9	DIABLO, Survivin
c-IAP2	3	Caspase 3, 7 und 9	DIABLO
XIAP	3	Caspase 3, 7 und 9	DIABLO
Survivin	1	Caspase 3, 7 und 9*	DIABLO, BRUCE, c-IAP1, AURORA B/C, INCENP, β-Tubulin
BRUCE	1	Caspase 3, 6, 7 und 9	DIABLO, Survivin, MEK1
Livin	1	Caspase 3, 7 und 9	DIABLO
ILP2	1	Caspase 9	Nicht bekannt

* Für Survivin wurden unterschiedliche Mechanismen für die Inhibition des intrinsischen Apoptosewegs postuliert. Die Erläuterung erfolgt in Kapitel 1.8. NAIP: *Baculoviral IAP repeat-containing protein 1*; c-IAP1: *Baculoviral IAP repeat-containing protein 2*; c-IAP2: *Baculoviral IAP repeat-containing protein 3*; XIAP: *E3 ubiquitin-protein ligase XIAP*; BRUCE: *BIR repeat-containing ubiquitin-conjugating enzyme*; Livin: *Baculoviral IAP repeat-containing protein 7*; ILP2: *Inhibitor of apoptosis-like protein 2*).

Betrachtet man die Rolle der IAPs in Bezug auf die Differenzierung oder Aggressivität von Tumoren, die Wirksamkeit von Medikationen und die Entstehung von Resistenzen, konnten in den letzten Jahren einige Zusammenhänge festgestellt werden. So wurden sowohl eine aberrante Expression als auch eine spezifische zelluläre Lokalisation von IAPs in den meisten untersuchten Fällen mit einem schlechteren Ansprechen auf Chemo- und Radiotherapie, einer höheren Metastasierungsrate, einer fortgeschrittenen Differenzierung des Tumorgewebes, sowie einem schlechteren progressionsfreien und Gesamt-Überleben der Patienten in Verbindung gebracht (77,78). IAPs wurden in den letzten Jahren häufig als diagnostische Marker und spezifische Targets einer Antitumortherapie untersucht und diskutiert. Es gibt unterschiedliche Wege, IAPs zu inhibieren und die Tumorzellen für Therapie-induzierte Apoptose zu sensibilisieren. Ein sowohl als Tumormarker, als auch als mögliches Ziel einer spezifischen Antitumortherapie häufig diskutiertes Protein der IAP-Familie ist Survivin, welches im nächsten Kapitel näher behandelt wird.

1.8 Survivin – der Lebensretter

Survivin ist mit 142 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 16,389 kDa das kleinste Mitglied der IAP-Familie. Es wurde 1997 von Ambrosini, Adida und Altieri zum ersten Mal beschrieben und direkt mit malignen Transformationen und der Inhibition der Apoptose in Zusammenhang gebracht. Das Survivin-Gen wurde durch ein Hybridisierungsscreening einer humanen Genom-Bibliothek mit der cDNA des EPR-1-Gens (*effector of cell protease receptor-1*) entdeckt, welches auf dem komplementären Strang liegt (79). Das Gen umfasst 14.7 kb, ist auf dem Chromosom 17q25 lokalisiert (80) und enthält drei Introns und vier Exons (81). Survivin verfügt im Gegensatz zu anderen IAPs nur über eine N-terminale, globuläre BIR-Domäne und enthält außerdem keine RING-, sondern carboxyterminal eine sogenannte *coiled-coil*-Domäne. Das Monomer besteht aus vier α-Helices und drei β-Faltblattstrukturen. In der Zelle liegt Survivin sowohl in monomerer Form, als auch als Homodimer vor, dessen Form als „*bow tie-shaped*“ (Fliegen-förmig) beschrieben wurde (82). Survivin zeigt ein außergewöhnliches Expressionsmuster. Zum einen ist Survivin in gesunden, adulten Geweben kaum nachweisbar, wird jedoch sowohl in fetalen, schnell proliferierenden Geweben, als auch in fast allen soliden Tumorentitäten sehr stark exprimiert (83). Kein anderes Protein der IAP-

Familie zeigt in Bezug auf die gewebsspezifische Expression ein ähnliches Bild. Außerdem unterliegt die Expression von Survivin einer zellzyklusspezifischen Kontrolle. Die Expression ist schwach in der G1-Phase, steigt nur geringfügig in der S-Phase an und gipfelt in einer sehr starken Expression in der G2/M-Phase des Zellzyklus (84). Der Promoter des Survivin-Gens enthält unter anderem einige CpG-Inseln, mehrere Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor Sp1 (zum Beispiel beteiligt an der Regulation der Differenzierung, Apoptose, Immunantwort und Erkennung von DNA-Schäden) und außerdem drei *cell-cycle dependent elements* (CDCs) und eine c*ell-cycle gene homology region* (CHR). Die letzten beiden Elemente sind charakteristisch für Gene, die während der G2/M-Phase exprimiert werden (85).

1.9 Die Funktionen von Survivin

Das Expressionsmuster ist eng an die unterschiedlichen Funktionen von Survivin gekoppelt. In der Funktion als IAP ist Survivin an der Regulation der Apoptose beteiligt, welche sowohl während der Embryogenese bei der Entwicklung und Differenzierung von Zellen und Geweben auftritt, aber auch bei der malignen Transformation von Zellen, der Bildung von Tumoren oder der Entwicklung von Resistenzen gegen Chemotherapeutika oder anderer Substanzen involviert sein kann. Neben der Rolle in der Apoptose ist Survivin als ein wichtiger Teil des *chromosomal passenger complex* (CPC) an der korrekten Segregation der Chromosomen während der Mitose beteiligt. Wegen diesen sehr unterschiedlichen Aufgaben tritt Survivin an mehreren Lokalisationen in der Zelle auf (86). Im Nukleus ist Survivin essentiell für die Verbindung von Borealin (*cell division cycle-associated protein 8*), INCENP (*inner centromere protein*) und Aurorakinase B zum CPC.

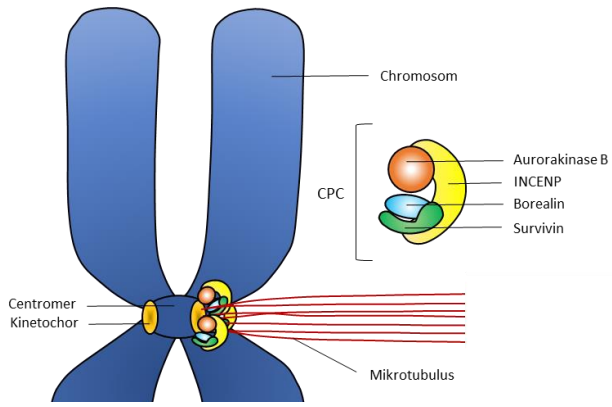


Abbildung 6: Schematische Darstellung von Survivin und seinen Interaktionspartnern als Teil des *chromosomal passenger complex* (CPC) während der Mitose. INCENP: *Inner centromer protein*.

Während der gesamten Mitose fungiert der CPC immer wieder als „*checkpoint*“ und erfüllt unterschiedliche Funktionen. Das Fortschreiten der Mitose in Abwesenheit von Survivin führt zu einer fehlerhaften Verteilung der Chromosomen, einer unvollständigen Zytokinese und schließlich zum Zelltod (87–89).

Als Apoptose-Inhibitor wird Survivin, angeregt durch ein proapoptotisches Signal, zusammen mit Cytochrom c aus dem Intermembranraum der Mitochondrien ins Zytoplasma entlassen. Dort trägt Survivin zur dynamischen Balance zwischen pro- und antiapoptotischen Faktoren in der Apoptose bei. Anfänglich wurde davon ausgegangen, dass Survivin direkt mit den Caspasen 3, 7 und 9 interagieren und diese so hemmen kann. Dies wurde unter anderem durch *in vitro* Experimente gestützt, in welchen Survivin direkt die Aktivität von Caspasen inhibiert hat (90). Es gibt jedoch Hinweise dafür, dass Survivin lediglich die Wirkung der Caspase 9 inhibiert und dass es dafür die Interaktion mit HBXIP (*hepatitis B virus X-interacting protein*) benötigt. Survivin verfügt im Gegensatz zu anderen IAPs, die Caspasen direkt binden können, nicht über eine sogenannte CARD-Domäne (*caspase activation and recruitment domain*). Es wird davon ausgegangen, dass Survivin zusammen mit HBXIP die Formation des Apoptosoms und die autokatalytische Aktivierung der Caspase 9 inhibiert (91). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Survivin direkt an XIAP binden kann. XIAP kann die Caspasen 3, 7 und 9 sowohl durch eine direkte Interaktion inhibieren, als auch durch seine E3-Ubiquitin-Ligase-Funktion die proteasomale Degradation der Caspasen fördern. Es wird postuliert, dass die Bindung von Survivin an XIAP dieses stabilisiert und so synergistisch auf die Inhibition der Caspase 9 wirkt (92).

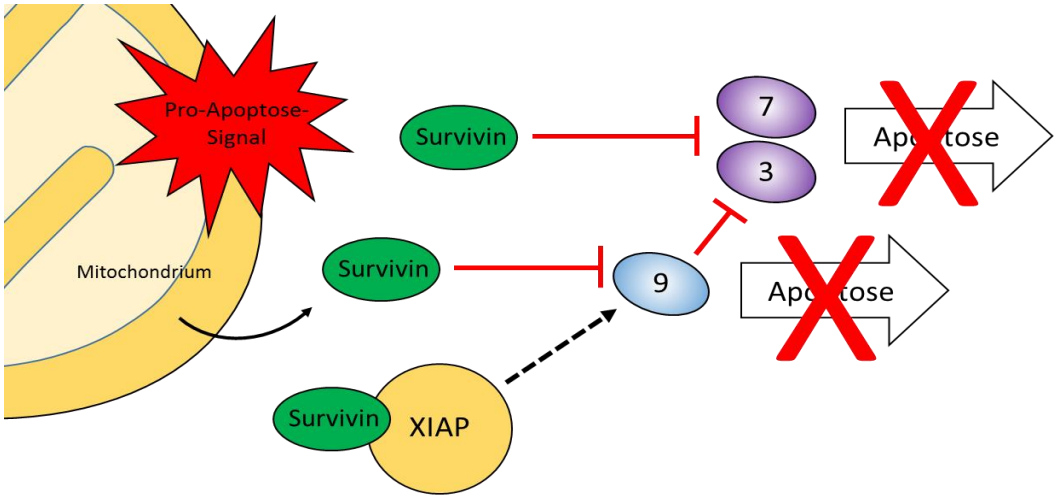


Abbildung 7: Schematische Darstellung von Survivin und seiner inhibitorischen Wirkung (rote Balken) auf die Caspasen 3, 7 und 9 und seine stabilisierende Bindung mit XIAP, die die proteasomale Degradation von Caspase 9 fördert (gestrichelter Pfeil). Survivin kann über diese möglichen Interaktionen die Apoptose inhibieren.

1.10 Die Isoformen von Survivin

Eine weitere Besonderheit von Survivin, welche allerdings noch in den Anfängen der Aufklärung steht, ist die Entdeckung von bislang mindestens sechs unterschiedlichen Isoformen von Survivin (93). Neben der ersten Isoform von Survivin, welche auch als Haupt-Splicevariante oder Wildtyp-Survivin bezeichnet wird, gibt es noch die Isoformen Survivin-2B, Survivin-3B, Survivin-ΔEx3, Survivin-2α und Survivin-3α. Die Isoformen Survivin-ΔEx3 und Survivin-2B wurden im Jahre 1999 zum ersten Mal von Mahotka et al. beschrieben (94). Die Entdeckung der Isoformen Survivin-3B und Survivin-2α folgten in den Jahren 2004 und 2005 durch Badran et al. (95), bzw. Caldas et al. (96). Die Isoform Survivin-3α konnte bis jetzt ausschließlich auf mRNA-Ebene von Vietri et al. in einer humanen Leukämie-Zelllinie nachgewiesen werden (97). Es wird bislang angenommen, dass alle Isoformen durch alternatives *splicing* einer Survivin prä-mRNA entstehen, welche aus vier Exons und drei Introns besteht. Die Haupt-Splicevariante wird aus den vier Exons gebildet, während der mRNA der Isoform Survivin-ΔEx3 das dritte Exon fehlt. Die mRNA von Survivin-2B enthält ein zusätzliches Exon 2B, welches aus einem Teil des zweiten Introns besteht. Die mRNA der Isoform Survivin-3B enthält einen Teil des dritten Introns als zusätzliches Exon 3B. Die stark verkürzte mRNA der Variante Survivin-2α besteht nur aus den ersten beiden Exons und einer kurzen Sequenz des zweiten Introns (98). Betrachtet man die daraus resultierenden Proteinstrukturen der einzelnen Isoformen, enthalten nur die Haupt-Splicevariante und Survivin-3B die vollständige BIR-Domäne, wohingegen Survivin-ΔEx3 und Survivin-2α nur über einen verkürzten Teil dieser Domäne verfügen. Bei der Isoform Survivin-2B wird die Aminosäuresequenz der BIR-Domäne durch das zusätzliche Exon 2B unterbrochen (99).

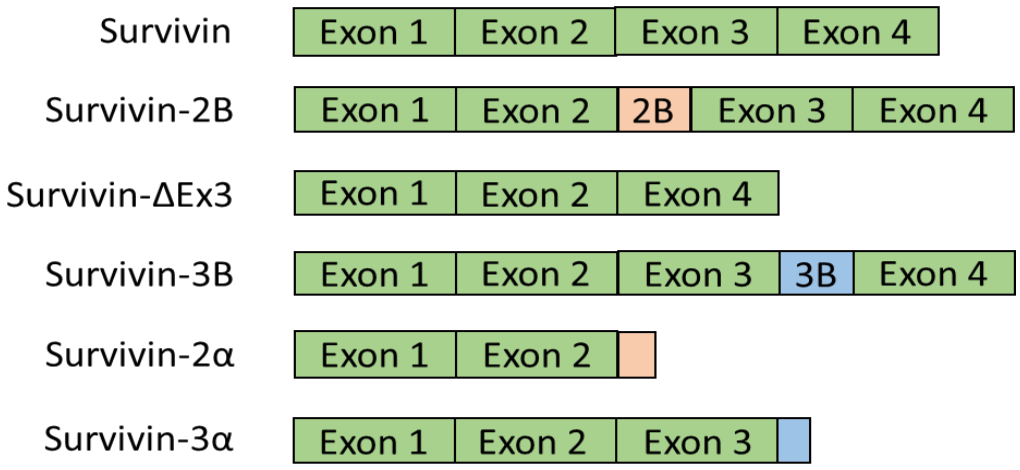


Abbildung 8: Schematische Darstellung der mRNAs der Survivin-Isoformen, die durch alternatives splicing gebildet werden. Erläuterungen siehe Text.

Auch die Expression der Isoformen von Survivin wurde in unterschiedlichen Tumorentitäten nachgewiesen, ist aber im Allgemeinen schwächer als die der Haupt-Splicevariante (98,100). Arbeiten zu verschiedenen Entitäten und mit Tumorzelllinien unterschiedlichen Ursprungs konnten auch die Isoformen von Survivin direkt in Zusammenhang mit einer malignen Transformation und Chemoresistenz in Verbindung bringen. Bislang wurde die Expression der Isoformen sogar ausschließlich in Bezug zu malignen Geweben oder Zellmodellen von unterschiedlichen Tumorentitäten erwähnt. Die Erkenntnisse der Bedeutung von Survivin und seiner Isoformen in dem Feld der Tumorforschung wird ausführlich im nachfolgenden Kapitel behandelt.

1.11 Die Bedeutung von Survivin und seiner Isoformen in Tumoren

1.11.1 Die Expression von Survivin in malignen Erkrankungen

Die Tatsache, dass Survivin in allen ausdifferenzierten Geweben kaum detektierbar ist, jedoch in nahezu jeder Tumorentität überexprimiert wird, macht es zu einem wichtigen Zielmolekül der gegenwärtigen Tumorforschung. Zahlreiche Untersuchungen zur Rolle von Survivin als biologischem Marker, prognostischem Faktor oder auch Target für neue Behandlungsstrategien in sehr vielen soliden Tumoren oder hämatopoetischen malignen Erkrankungen lieferten vielversprechende Ergebnisse in Bezug auf die Verbesserung der Diagnostik und Behandlung für eine Vielzahl von Krebserkrankungen. Zum einen lieferten die Untersuchungen von Tumorproben unterschiedlicher Entitäten klare Aussagen in Bezug auf die Expressionsstärke von Survivin in Zusammenhang mit dem Krankheitsbild der Patienten. Ein gesteigerter Expressionsstatus von Survivin korrelierte mit einem Überlebensvorteil für die Tumorzellen durch eine geringere Apoptoserate (101), einer höheren Differenzierung der Tumore, schlechteren Prognosen für die Patienten und einer höheren Mortalität (102–106). Diese eindeutigen klinischen Beobachtungen konnten auch durch funktionelle Experimente bestätigt werden. So wurde zum einen die Überexpression von Survivin in vielen Tumorzelllinien mit einem Überlebensvorteil für die Zellen durch eine verringerte Apoptoserate und einer gesteigerte Resistenz gegenüber Chemo- oder Radio-therapien korreliert. Zum anderen konnten Untersuchungen an Tumorzellen vieler Entitäten gerade in Bezug auf eine Sensibilisierung gegenüber einer Behandlung mit Chemo- oder Radiotherapie

zeigen, dass durch die Inhibition von Survivin mit Hilfe unterschiedlicher Verfahren Erfolge erzielt werden können (107–111). Ergebnisse von Experimenten, in denen die Expression von Survivin künstlich gesteigert wurde, untermauerten andererseits die Theorie, dass die Überexpression von Survivin in Tumoren einen wichtigen Resistenzmechanismus darstellt, da die Zellen dadurch weniger anfällig für Apoptose und resistenter gegenüber den eingesetzten Therapien wurden (84,88). Aber nicht nur die Haupt-Splicevariante, sondern auch die Isoformen von Survivin rücken immer stärker in den Fokus der Tumorforschung. Besonderes Augenmerk liegt hier auf den beiden Varianten Survivin-2B und Survivin-ΔEx3, da diese am längsten bekannt sind und für umfassende Analysen auch molekularbiologische Werkzeuge, wie spezifische Antikörper, zur Verfügung stehen.

1.11.2 Die Expression der Isoformen von Survivin in malignen Erkrankungen

In Bezug auf Survivin-ΔEx3 zeigten alle Untersuchungen den Zusammenhang einer Expression des Proteins mit anderen nachteiligen klinischen Faktoren und/oder einer schlechteren Prognose (zusammengefasst in (93)). Die Untersuchung der Isoform Survivin-2α ist zwar bislang weniger umfangreich, zeigt aber auch eine eindeutige Tendenz in dieselbe Richtung, nämlich dass eine Überexpression mit fortgeschrittenen Tumorstadien (Kolonkarzinom, (112)) oder einem kürzeren Rezidiv-freien Überleben und einer Resistenz gegenüber Chemotherapie (Mammakarzinom (113,114)) korreliert. Auch in unterschiedlichen Tumorzelllinien zeigte sich eine erhöhte Expression der Isoform Survivin-2α (96). Für die Isoform Survivin-2B ist das Bild in der Tumorforschung eher inhomogen. Viele widersprüchliche Ergebnisse wurden in den letzten Jahren sowohl in Bezug auf die Korrelation der Expression von Survivin-2B in Tumorgewebe und dem klinischen Verlauf, aber auch in Bezug auf die Funktion und die zelluläre Lokalisation des Proteins im Allgemeinen und nach maligner Transformation veröffentlicht. Sogar für Untersuchungen bezüglich derselben Tumorentität (Kolonkarzinom (112,115), Astrozytom (116,117)) wurde eine Überexpression von Survivin-2B zum einen mit einem vorangeschrittenen Stadium der Krankheit und einer schlechten Prognose, von einer anderen Forschergruppe hingegen mit einem besseren klinischen Ausgang assoziiert. Eine mögliche Fehlerquelle für diese widersprüchlichen Aussagen könnte die Untersuchung der Funktion von Survivin-2B mit Hilfe von artifiziellen Systemen (z.B. Überexpressions-Experimenten) sein. Da die endogene Expression dieser Isoform zwar nur in malignen

Geweben nachweisbar, aber trotzdem relativ gering ist, ist die Verwendung von artifiziellen Systemen ein gängiger Ansatz. Es deuten jedoch alle bisher durchgeführten Experimente, die eine zytoplasmatische oder eine mitochondriale Lokalisation von Survivin-2B zeigen konnten, auf eine Rolle des Proteins bei der Regulierung der Apoptose hin. Ob das Protein eine pro- oder eine antiapoptotische Wirkung hat, konnte bislang nicht hinreichend geklärt werden. Auch die möglichen Mechanismen der Regulationen bleiben weiterhin offen.
All diese Ergebnisse in Bezug auf die Überexpression von Survivin und seinen Isoformen in fast allen Tumorentitäten und in Bezug auf den Zusammenhang zu Resistenzen gegenüber unterschiedlichen Therapieansätzen haben in den letzten Jahren zu einer intensiven Forschung zur Entwicklung von Strategien geführt, die auf Survivin als ein geeignetes Antitumor-Target abzielen. Diese werden im nächsten Kapitel genauer beleuchtet.

1.11.3 Survivin als Target in der Antitumortherapie

Survivin stellt auf Grund seiner Eigenschaften als Mitoseregulator und Apoptose-Inhibitor einen zentralen Knotenpunkt in der malignen Transformation von Zellen, der Metastasierung und der Entwicklung von Resistenzen gegenüber Antitumortherapien dar. Außerdem und wohl gerade aus diesem Grund konnten viele klinische Studien die Expression von Survivin als prognostischen Marker sowohl für ein Ansprechen auf mögliche Therapieansätze, als auch für das progressionsfreie und das Gesamtüberleben von Patienten identifizieren. Die unterschiedlichen Ansätze, die bislang entwickelt wurden, zielen deshalb auch meist auf mehr, als nur auf einen Aspekt ab. So wird mit der gezielten Inhibition von Survivin nicht nur eine antiproliferative Wirkung hervorgerufen. Auch sensibilisierende Effekte gegenüber unterschiedlichen Therapien könnten hierdurch erzielt werden. Durch die Herunterregulierung von Survivin in proliferierenden Endothelzellen werden diese ebenfalls anfälliger für Chemotherapeutika gemacht und man kann so in soliden Tumoren die Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff einschränken, in dem man die Tumorvaskularisierung inhibiert. Survivin gilt generell als kein klassisches Zielmolekül für die Entwicklung von Arzneimitteln, das es z.B. nicht wie ein Enzym eine Kinase-Domäne besitzt, die inhibiert werden könnte und auch kein Oberflächenmolekül von Tumorzellen ist (118). Trotzdem wurden schon früh in der Survivin-Forschung Versuche unternommen, Survivin zu inhibieren und so seine Tumor-unterstützende Wirkung zu unterdrücken oder auszuschalten.

Zu diesen Ansätzen gehören mittlerweile die Entwicklung von molekularen Antagonisten der Survivin-mRNA wie Antisense-Molekülen oder Ribozymen, die Testung von immuntherapeutischen Ansätzen (Anti-Survivin-Impfstoffe), die Entwicklung von *small molecule inhibitors* (nieder-molekulare Inhibitoren) die z.B. gegen die Survivin-Transkription gerichtet sind (YM155, Terameprocol), seiner Phosphorylierung (CDK1-Inhibitoren) oder Stabilisierung (Hsp90-Inhibitoren, Peptido-mimetika), sowie gentherapeutische Ansätze.

1.11.3.1 Molekulare Antagonisten

Etliche Studien in unterschiedlichen Tumorzelllinien erbrachten das Ergebnis, dass eine spezifischen Inhibition der Survivin-mRNA und des Proteins sowohl antiproliferativ auf die Zellen wirkt, als auch in Kombination mit Chemo- oder Radiotherapie Apoptose-fördernd ist. Hierzu wurden die Antisense-Oligonukleotide entweder durch virale Transduktion oder Lipofektion in Form von sh- oder siRNA (107,108,110,111,119,120) oder in Form eines Ribozyms (121) in die Zellen gebracht. Viele dieser Ansätze befinden sich immer noch in der präklinischen Entwicklung (98). Zwei Oligonukleotide (LY2181308 und SPC3042) haben die Hürde zur klinischen Testung bereits überwunden und zeigen dort sowohl gute Verträglichkeit, als auch eine spezifische Herunterregulierung von Survivin (122,123).

1.11.3.2 Gentherapeutische Ansätze

In der gleichen Arbeit wie zu der Untersuchung der Wirkung eines gegen die Survivin-mRNA gerichteten Antisense-Oligonukleotids von Grossman et al. wurde auch die Wirkung einer dominant negativen Mutante des Survivin-Proteins untersucht (124). Durch die Überexpression einer funktionsunfähigen Mutante, konnte bereits in mehreren Versuchsansätzen sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* die Proliferation von Tumorzellen gehemmt und auch Apoptose ausgelöst werden (98,125).

Ein weiterer gentherapeutischer Ansatz macht sich den Promotor des Survivin-Gens zu Nutze, indem die Expression von zytotoxischen Genen durch den Promotor gefördert wird. Ein generell hohes Expressions-Level von Survivin in den meisten Tumorentitäten im Gegensatz zu gesunden Geweben ist hier ein entscheidender Vorteil. Ansätze mit nachgeschalteten

Genen, die proapoptotische oder onkolytische Proteine kodieren, wurden bereits *in vitro* erfolgreich getestet (126–132).

1.11.3.3 Immuntherapeutische Ansätze

Wie auch schon bei anderen tumorspezifisch exprimierten Proteinen, wurde für Survivin angenommen, dass es in Krebspatienten zu einer Immunantwort gegen das Protein kommen kann (133). Tatsächlich konnten sowohl zytotoxische T-Zellen und Antikörper gegen Survivin in Plasmen von Tumorpatienten detektiert werden (134–136) und mittlerweile befinden sich Survivin-Vakzine in klinischer Testung mit guten Ergebnissen zur Sicherheit und Wirksamkeit einer Impfung (137–139).

1.11.3.4 Small molecule inhibitors

Bei der Entwicklung von *small molecule inhibitors* gegen Survivin gibt es unterschiedliche Ansatzmöglichkeiten. Zum einen beschäftigt sich die Forschung mit der Entwicklung und Testung von Substanzen, die die Funktion des Survivin-Proteins in der Zelle manipulieren. Hierzu gehören unter anderem CDK1-Inhibitoren (*cyclin dependent kinase 1*), die eine Phosphorylierung von Survivin an Thr^{34} unterbinden und so seine Funktion als Apoptose-Inhibitor während der Mitose stören, seinen Abbau fördern und sowohl *in vitro* die mitochondriale Apoptose steigern, als auch *in vivo* eine Antitumor-Aktivität zeigen (140). Zum anderen befinden sich Hsp90-Inhibitoren in der präklinischen Entwicklung. Für Shepherdin, ein Peptidomimetika der Survivin Aminosäuresequenz Lys^{79}-Leu^{87}, konnte bisher nicht nur eine inhibierende Wirkung auf die stabilisierende Bindung von Hsp90 nachgewiesen werden, sondern auch zu anderen Hsp90-Interaktionspartnern, wie z.B. Akt, Telomerase und CDK6. Shepherdin zeigte in präklinischen Modellen mit unterschiedlichen Tumorzellen sowohl *in vitro* eine zytotoxische Wirkung, als auch *in vivo* eine gute Verträglichkeit und eine hohe Spezifität für Tumorzellen (141,142).

Ein ganz anderer Angriffspunkt für *small molcule inhibitors* gegen Survivin ist der erste Schritt seiner Synthese in der Zelle. Die Moleküle Nordihydroguajaretsäure (Terameprocol, EM-1421) und Sepantroniumbromid (YM155) wirken als Repressoren der Transkription des Survivin-

Gens durch die Inhibition der Promotor-Aktivität. Terameprocol befindet sich mittlerweile in der Testung in zwei klinischen Phase I-Studien und zeigt dort sowohl eine anti-tumorale Wirkung, als auch eine gute Sicherheit und eine relativ gute Verträglichkeit (143,144). Sowohl für Terameprocol, als auch für YM155 wird postuliert, dass sie die Bindung des Transkriptionsfaktors Sp1 an den Survivin-Promotor blockieren und so seine Transkription hemmen (141). YM155 wurde durch ein *high-throughput screening* entdeckt und zeigte in vielen erfolgreichen präklinischen Untersuchungen eine antiproliferative Wirkung auf Tumorzellen und eine Induktion der Apoptose ((145–150), Review: (151)). Auch eine inhibitorische Wirkung auf das Tumorwachstum *in vivo* konnte in mehreren Modellen beobachtet werden ((145,149,150,152), Review: (151)), sowie eine Sensibilisierung von resistenten Tumorzellen gegenüber unterschiedlichen Chemotherapeutika (152–154). Mittlerweile wurden und werden mehrere Phase I- und Phase II-Studien zur Wirksamkeit von YM155 in Patienten mit unterschiedlichen Tumorentitäten durchgeführt. Alle Ergebnisse weisen zum einen auf eine relativ gute Verträglichkeit mit minimalen und reversiblen Nebenwirkungen und zum anderen auch auf die Stabilisierung des Krankheitsbilds von Patienten oder sogar auf Teilerfolge in der Remission der Tumore hin (155–161).

1.12 Zielsetzung

Eine Cisplatin-haltige Chemotherapie gehört zusammen mit der Radiotherapie und der Chirurgie zu den Standardbehandlungen von KZT (38). Die Heilungsraten von KZT-Patienten liegen in Abhängigkeit der Histologie der Tumore, der Höhe der Tumormarker im Blut der Patienten und dem Metastasierungsstadium heutzutage bei 90% und darüber (39,40). In ca. 20% der Fälle liegt jedoch eine intrinsische oder erworbene Resistenz der Tumore gegenüber einer Cisplatin-basierten Chemotherapie vor, was mit einer schlechten Prognose in Bezug auf die Therapierbarkeit und somit die Heilungsraten für die Patienten einhergeht. Die Suche nach neuen Therapieansätzen, welche eine Resistenz umgehen können, ist deswegen unerlässlich.

Survivin, ein Mitglied der *inhibitor of apoptosis proteins* (IAP), ist bereits seit Längerem Gegenstand der Tumorforschung. Die Untersuchung der Rolle von Survivin und seinen Isoformen bei unterschiedlichen Tumorerkrankungen brachte bereits eine Vielzahl an erfolgversprechenden Ergebnissen. Eine gesteigerte Expression von Survivin konnte nicht nur

als prognostischer Marker, sondern auch als möglicher Resistenzfaktor gegenüber verschiedenen Antitumortherapien identifiziert werden (162). Die Tatsache, dass Survivin in nahezu allen soliden Tumorentitäten überexprimiert wird, jedoch in gesunden, ausdifferenzierten Geweben kaum nachzuweisen ist, macht es zu einer ausgezeichneten therapeutischen Zielstruktur. Survivin existiert in zwei unterschiedlichen zellulären Pools, die direkt mit seinen beiden essentiellen Funktionen in der Zelle in Verbindung stehen. Zum einen ist es im Zellkern ein wichtiger Bestandteil des *chromosomal passenger complex* (CPC) und damit an der Segregation der Chromosomen während der Mitose beteiligt. Zum anderen inhibiert Survivin im Zytoplasma Induktion und Ausführung der Apoptose in Zellen (90,92). Eine Unterdrückung der Apoptose in Tumorzellen durch eine gesteigerte Expression von Survivin konnte bereits in verschiedenen experimentellen Ansätzen als ein Resistenz-mechanismus gegenüber unterschiedlichen Therapien identifiziert werden. Eine gezielte Inhibition von Survivin in Tumorzellen verfolgt somit zwei therapeutische Ziele. Einerseits wird die Mitose und somit die Proliferation der Tumorzellen gehemmt. Zum anderen werden die Induktion und die Ausführung der Apoptose nach einer Behandlung der Zellen gefördert.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von Survivin und seiner Isoform Survivin-2B in normalem Hodengewebe, CIS-Zellen, KZT-Proben unterschiedlicher Histologie, sowie Cisplatin-sensitiven und -resistenten Tumorproben analysiert. Dies ermöglichte u.a. die Korrelation der Expressionsstärke von Survivin oder Survivin-2B mit der Aggressivität sowie der Cisplatin-Resistenz von KZT.

Des Weiteren wurde die biologische Funktion, die zelluläre Lokalisation und die Rolle von Survivin und der Isoform Survivin-2B bei der Cisplatin-Resistenz von KZT-Zelllinien untersucht. Unter Verwendung des *small molecule inhibitors* YM155, welcher bereits klinisch getestet wird, einerseits, und einer Herunterregulation von Survivin oder Survivin-2B durch RNA-Interferenz in den Tumorzellen andererseits, wurde die Survivin-Inhibition als therapeutischer Ansatz für Cisplatin-resistente KZT analysiert.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Tabelle 2: Verwendete Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Agarose-Gelelektrophoresekammer	Mini Sub Cell GT/ Wide Mini Sub Cell GT	Bio-Rad (Hercules, USA)
Chemolumineszenz-Detektionssystem	Fusion-SL 4 3500 WL	Vilber Lourmat (Sud Torcy, Frankreich)
CO_2-Inkubator	Heraeus BB 16 CU	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Dampfgarer	MultiGourmet	Braun (Kronberg, Deutschland)
Durchflusszytometer	FACSCalibur	Becton Dickinson (Franklin Lakes, USA)
Geldokumentationssystem	EBOX VX2 2.0 MP	Peqlab (Erlangen, Deutschland)
Kamera (Mikroskop)	AxioCam MRc	Carl Zeiss (Jena, Deutschland)
Kryokonservierungsbehälter	Cryo 1°C Freezing Container	Nalgene (Roskilde, Dänemark)
Light Cycler	Light Cycler II	Roche (Basel, Schweiz)
Mikroskope	Axiovert 40c AxioScope.A1	Carl Zeiss (Jena, Deutschland)
PCR Cycler	MyCycler	Bio-Rad (Hercules, USA)
Photometer	Nanodrop-1000 DU 530	Peqlab (Erlangen, Deutschland) Beckman Coulter (Brea, USA)
Röntgenfilm-Entwickler	Curix 60	AGFA (Mortsel, Belgien)
Scanner	Densitometer GS-800	Bio-Rad (Hercules, USA)
Sicherheitswerkbank	Heras*safe*	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Spannungsquelle	PowerPac	Bio-Rad (Hercules, USA)
Wasserdeonisierungsanlage	MilliQ Plus	Merck Millipore (Billerica, USA)
Western Blot Kammer	Mini-PROTEAN 3	Bio-Rad (Hercules, USA)
Western Blot Transferkammer	Trans-Blot SD Semi-Dry	Bio-Rad (Hercules, USA)
Zellzählgerät	VI-CELL™ XR Cell Viability Analyzer	Beckman Coulter (Brea, USA)
Zentrifugen	Centrifuge 5810 R EBA 12 R Rotofix 32A	Eppendorf(Hamburg, Deutschland) Hettich (Tuttlingen, Deutschland) Hettich (Tuttlingen, Deutschland)

2.1.2 Verbrauchsmittel

Tabelle 3: Verwendete Verbrauchsmittel

Bezeichnung	Hersteller
Blot Papier (PROTEAN XL, Extra dick)	Bio-RAD (Hercules, USA)
CL-XPosure Film	Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA)
Multiwell Platten (6 Well-Format)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Objektträger	Marienfeld (Lauda-Königshofen, Deutschland)
Pipetten	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Pipettenspitzen	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

PVDF-Membran (Immobilion-P)	Millipore (Billerica, USA)
Reaktionsgefäße (1.5 mL, 2 mL)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Reaktionsgefäße (15 mL, 50 mL)	Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland)
Zytokammern (mit Dichtung, 30 mm^2)	Hettich (Tuttlingen, Deutschland)
Zellkulturflaschen (25 cm^2, 75 cm^2, 175 cm^2) traditionelle Zellkulturoberfläche	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Zellkulturschalen (6 × 1.5 cm, 10 × 20 cm) traditionelle Zellkulturoberfläche	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Zellschaber	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)

2.1.3 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders aufgeführt, von den Firmen Applichem (Darmstadt, Deutschland), Becton Dickinson (Franklin Lakes, USA), Bio-Rad (Hercules, USA), GE Healthcare (Chalfont St Giles, Großbritannien), JT Baker (Center Valley, USA), Life Technologies (Carlsbad, USA), Merck (Darmstadt, Deutschland), Roche (Basel, Schweiz), Roth (Karlsruhe, Deutschland), Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) und Thermo (Fisher) Scientific (Rockford, USA) bezogen. Der Reinheitsgrad der Chemikalien entsprach „pro analysi (p.a.)“.

2.1.4 Kits, Enzyme und Lösungen

Tabelle 4: Verwendete Kits, Enzyme und Lösungen.

Bezeichnung	Hersteller
AB Serum	Biotest (Dreieich, Deutschland)
Annexin V-FITC	Becton Dickinson (Franklin Lakes, USA)
Aquatex®	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad (Hercules, USA)
cOmplete Mini Protease Inhibitor Tablets	Roche (Basel, Schweiz)
CloneJET™ PCR Cloning Kit	Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA)
DAKO Real™ Target Retrieval Solution pH 6.0	Dako Denmark (Glostrup, Dänemark)
DNase I, Amplification Grade	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
dNTP-Mix (10 mM)	Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA)
DreamTaq Green PCR Master Mix (2×)	Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA)
Epimet Fixierlösung B	AS Diagnostk (Hückeswagen, Deutschland)
Giemsas Azur-Eosin-Methylenblaulösung	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Hämatoxylin (Mayer)	Medite (Burgdorf, Deutschland)
Lane Marker Reducing Sample Buffer (5×)	Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA)
Lipofectamine® RNAiMAX Reagent	Life Technologies (Carlsbad, USA)
Maxima First-Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR	Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA)
Nuclear Extract Kit	Active Motif (Hulpe, Belgien)
Oligo-(dT)-Primer (100 µM)	Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA)
Pierce® ECL Western Blotting Substrate	Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA)
RevertAid™ Reverse Transkriptase	Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA)

RiboLock™ RNase Inhibitor	Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA)
Ribonuklease A	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
SYBR® *Premium Ex Taq*™ II	Takara (Otsu, Japan)
TRIzol®-Reagenz	Life Technologies (Carlsbad, USA)
Vectashield Mounting Medium H-1000	Vector Laboratories (Burlingame, USA)
Xylolersatz Medium	National Diagnostics (Atlanta, USA)
ZytoChem HRP Kit (AEC), Broad Spectrum	Zytomed Systems (Berlin, Deutschland)

2.1.5 Protein- und DNA-Standards

Tabelle 5: Verwendete Protein- und DNA-Standards

Bezeichnung	Hersteller
DNA Ladder Mix Orange G	Peqlab (Erlangen, Deutschland)
Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA)

2.1.6 Primer

Tabelle 6: Verwendete Primer

Target	Test	Sequenz 5'→ 3' Forward	Reverse	Amplifikat-größe	Annealing-Temp.
Survivin HV	RT-PCR	CCACCGCATCTCTACATTCA	TATGTTCCTCTATGGGGTCG	185 bp	55°C
Survivin HV	RT-qPCR	GACGACCCCATAGAGGAA	AATTCTTTCTTCTTATTGTTGGTTTC	161 bp	61°C
Survivin-2B	RT-PCR	CCACCGCATCTCTACATTCA	AGTGCTGGTATTACAGGCGT	241 bp	57°C
Survivin-2B	RT-qPCR	CCACCGCATCTCTACATTCA	AGTGCTGGTATTACAGGCGT	214 bp	57°C
GAPDH	RT-PCR	TGCACCACCAACTGCTTA	GAGGCAGGGATGATGTTC	176 bp	61°C
GAPDH	RT-qPCR	TGCACCACCAACTGCTTA	GAGGCAGGGATGATGTTC	176 bp	63°C

Alle verwendeten Primer wurden mit der Primer3-Software (Whitehead Institute for Biomedical Research) designt und von der Firma MWG Eurofins (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert.

2.1.7 Small interfering RNAs (siRNAs)

Tabelle 7: Verwendete siRNAs

siRNA	Target	Sequenz 5'→ 3'
siSurvivin	Survivin Haupt-Splicevariante	CCCCAUAGAGGAACAUAAA(dTdT)
si2B	Splicevariante Survivin-2B	CCUGUAAUACCAGCACUUU(dTdT)
AllStars Negative Control siRNA (siK)	-	-

Die siRNAs siSurvivin und si2B wurden als 21 nt lange siMAX siRNA Oligomere über MWG Eurofins (Ebersberg, Deutschland) bezogen. Die *AllStars Negative Control siRNA* (siK) wurde von Qiagen (Venlo, Niederlande) bezogen und der Hersteller garantiert, dass die siRNA zu keiner bekannten humanen mRNA-Sequenz Komplementarität zeigt.

2.1.8 Antikörper

Tabelle 8: Verwendete Antikörper

Antikörper	Klonalität	Wirt	Verdünnung	Hersteller	Katalog-nummer
Anti-GAPDH Antibody	monoklonal	Maus	1:10.000 (WB)	Applied biological materials (Richmond, Kanada)	G041
Anti-Kaninchen IgG-HRP	-	Ziege	1:5000 (WB)	Cell Signaling (Danvers, USA)	7074
Anti-Maus IgG-HRP	-	Schaf	1:10.000 (WB)	GE Healthcare (Chalfont St Giles, GB)	NXA931-1ML
Anti-Survivin 2B Antibody	polyklonal	Kaninchen	1:500 (WB) 1:50 (IHC) 1:250 (IF)	Abcam (Cambridge, GB)	ab3729
Nucleolin Antibody	monoklonal	Maus	1:100 (WB)	Active Motif (Hulpe, Belgien)	39541
Survivin Antibody	polyklonal	Kaninchen	1:1000 (WB) 1:250 (IF)	Novus Biologicals (Littleton, USA)	NB500-201
Survivin Antibody	polyklonal	Kaninchen	1:50 (IHC)	Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA)	PA5-16859

2.1.9 Zellkulturmedien und Zusätze

Tabelle 9: Verwendete Medien und Zusätze

Medium	Hersteller	Zusätze	Zelllinien
Cryo-safe I	c.c.pro (Oberdorla, Deutschland)	-	NTERA-2, NTERA-2-R 2102Ep, 2102Ep-R NCCIT, NCCIT-R HL60
DMEM/F12 (1:1)	Life Technologies (Carlsbad, USA)	10% FBS 50 u/mL Penicillin 50µg/mL Streptomycin 2 mM L-Glutamin	2102Ep, 2102Ep-R, NCCIT, NCCIT-R
DMEM high glucose with UltraGlutamine	Lonza (Basel, Schweiz)	10% FBS 50 u/mL Penicillin 50µg/mL Streptomycin	NTERA-2, NTERA-2-R
Opti-MEM (Phenolrot, L-Glutamin)	Life Technologies (Carlsbad, USA)	-	NTERA-2, NTERA-2-R 2102Ep, 2102Ep-R NCCIT, NCCIT-R

Die Lösungen und Zusätze D-PBS, Fetales Bovines Serum (FBS), L-Glutamin und Penicillin-Streptomycin-Lösung wurden von der Firma Life Technologies (Carlsbad, USA) bezogen. Die Trypsin-EDTA-Stocklösung (Trypsin/EDTA 10× (0.5%/0.2% in PBS)) wurde von der Firma GE Healthcare (Chalfont St Giles, Großbritannien) bezogen und vor gebrauch im Verhältnis 1:10 mit PBS verdünnt.

2.1.10 Zelllinien

Tabelle 10: Verwendete Zelllinien

Bezeichnung	Typ	Charakteristika	IC_{50} Cisplatin	Bezug
NTERA-2	Nicht-Seminom (Teratokarzinom)	adhärente Epithelzellen mit deutlichen Einlagerungen (Granula), pluripotent	0.4 µM	DSMZ
NTERA-2-R	Sublinie von NTERA-2		5 µM	Generiert von S. Gläsener / F. Honecker
2102Ep	Nicht-Seminom (Teratokarzinom + Dottersacktumor)	adhärent, nullipotent	0.8 µM	Zur Verfügung gestellt von P. Andrews (Sheffield, GB)
2102Ep-R	Sublinie von 2102EP		5 µM	Generiert von S. Gläsener / F. Honecker
NCCIT	Nicht-Seminom (Teratokarzinom)	adhärente Epithelzellen, pluripotent, p53 mutiert	1.7 µM	ATCC
NCCIT-R	Sublinie von NCCIT		5 µM	Generiert von S. Gläsener / F. Honecker

Die Zelllinien NTERA-2 (NT2) und 2102Ep entstammen tesikulären Keimzelltumoren, wohingegen die Zelllinie NCCIT einem mediastinal gelegenen extragonadalen Keimzelltumor entstammt. Die Cisplatin-resistenten Sublinien NTERA-2-R (NT2-R), 2102Ep-R und NCCIT-R wurden ausgehend von ihren parentalen Zelllinien von Dr. Stephanie Gläsener im Rahmen ihrer Promotion unter der Anleitung von PD Dr. Dr. Friedemann Honecker generiert und freundlicherweise für weitere Experimente zur Verfügung gestellt. Hierzu erfolgte die Kultivierung der Zelllinien unter Zusatz von subletalen Cisplatin-Dosen über einen Zeitraum von 18 Monaten.

2.1.11 Zytostatika

Tabelle 11: Verwendete Zytostatika

Zytostatikum	Hersteller	Arzneistoffgruppe	Lösungsmittel	Molekulargewicht
Anisomycin	Merck (Darmstadt, Deutschland)	Antibiotikum	DMSO	265.31 g/mol
Cisplatin	Teva (Ulm, Deutschland)	Platin-Derivat	NaCl-Lösung	300.1 g/mol
YM155	Sellek Chemicals Houston, USA)	*small molecule inhibitor*	DMSO	443,29 g/mol

2.1.12 Software

Tabelle 12: Verwendete Software

Software	Version	Hersteller
AxioVision Rel	4.8.2-SP2	Carl Zeiss (Jena, Deutschland)
Bio1D		Vilber Lourmat (Sud Torcy, Frankreich)
CellQuest	3.3	Becton Dickinson (Franklin Lakes, USA)
GraphPad Prism® 5	5.01	GraphPad Software Inc. (La Jolla, USA)
IBM SPSS Statistics	18	IBM (Armonk, USA)
Magicscan 32	V4.5	Techville (Dallas, USA)
MS Office	2003/2013	Mircosoft (Redmond, USA)
Photoshop CS3 Extended	10.0.1	Adobe (San Jose, USA)
Primer3		Whitehead Institute for Biomedical Research (Boston, USA)
Quantity One®	4.5.2	Bio-Rad (Hercules, USA)

2.2. Methoden

2.2.1 Zellkultur

Alle verwendeten Zelllinien wurden in einem CO_2-Inkubator bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO_2 inkubiert.

2.2.1.1 Auftauen von Zellen

Zum Auftauen wurden die gefrorenen Zellen ca. 1 min im Wasserbad bei 37°C inkubiert, in 5 mL warmem Medium aufgenommen und für 5 min bei 450 × g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die pelletierten Zellen in frischem Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt.

2.2.1.2 Kryokonservierung von Zellen

Zur Lagerung von Zellen in flüssigem Stickstoff oder kurzfristig bei -80°C wurden 1×10^6 Zellen in 800 µL Cryo-Safe I Medium aufgenommen und in Röhrchen zur Kryokonservierung überführt. Diese wurden mit Hilfe des Cryo 1°C Freezing Containers um ein Grad Celsius die Minute auf -80°C herunter gekühlt und gegebenenfalls zur langfristigen Lagerung in einen Tank mit flüssigem Stickstoff überführt.

2.2.1.3 Kultivierung von Zelllinien

Die Kultivierung der Zellen erfolgte bis zu einer maximalen Konfluenz von 80 – 90%. Das Passagieren erfolgte alle 2 – 3 Tage mit Hilfe von Trypsinierung. Hierzu wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und anschließen mit Trypsin-Lösung inkubiert. Je nach Größe der verwendeten Zellkulturflasche wurde eine entsprechende Menge an Trypsin-Lösung auf die Zellen gegeben (25 cm^2 ≙ 0.5 mL; 75 cm^2 ≙ 1 mL; 175 cm^2 ≙ 2 mL) und diese dann anschließend für ca. 2 min im Brutschrank inkubiert. Die Wirkung des Trypsins wurde zusätzlich durch leichtes seitliches Schlagen an die Zellkulturflasche unterstützt. Anschließend wurde die Trypsin-Reaktion mit 10 mL des jeweiligen Mediums abgestoppt und auch die

restlichen die Zellen vom Flaschenboden abgespült. Nach Zentrifugieren für 5 min und 450 × g wurden die pelletierten Zellen in 4 – 5 mL des entsprechenden Mediums resuspendiert wovon 1 mL wieder ausgesät wurde.

2.2.1.4 Bestimmung der Zellzahl mit der Trypanblau-Ausschlussmethode

Die Bestimmung der Lebend- oder Gesamtzellzahl von Zellsuspensionen erfolgte mit Hilfe des VI-CELL™ XR Cell Viability Analyzer (Kurz: ViCell Analyzer). Hierzu wurden die Zellen mit Trypsinierung geerntet und in PBS resuspendiert. Bei behandelten Proben wurden die gesamten Zellen in 1 mL PBS resuspendiert und komplett analysiert. Zum Aussäen wurden die Zellen in 10 mL PBS resuspendiert, wovon ebenfalls 1 mL mit dem ViCell Analyzer analysiert wurde. Das Gerät unterscheidet lebende und tote Zellen nach der Trypanblau-Ausschlussmethode. Der Farbstoff Trypanblau wird aus-schließlich von toten, perforierten Zellen, jedoch aber nicht von lebenden Zellen aufgenommen. So erscheinen tote Zellen in der Analyse blau angefärbt. Nach der Messung erhält man sowohl die Lebend- als auch die Gesamtzellzahl einer Probe und kann diese Werte für weitere Berechnungen verwenden.

2.2.1.5 Lipofektion von Zellen

Zur Untersuchung der Wirkung von unterschiedlichen siRNAs auf die Proliferation, den Zellzyklus, die Aktivierung der Apoptose oder die Regulation von mRNAs in Zellen wurden diese per Lipofektion in die Zellen eingebracht. Hierzu wurden in Multiwell-Platten (6-well Fomat) je 0,2 × 10^6 Zellen pro well in 2 mL des entsprechenden Mediums ohne Penicillin und Streptomycin ausgesät und nach 24 h transfiziert. Nach Erneuerung des Mediums erfolgte die Transfektion mit 400 pmol siRNA und 7,5 µL Lipofectamine® RNAiMAX Transfection Reagent pro 0,2 × 10^6 Zellen. Die siRNA und das Transfektions-Reagenz wurden in 488,5 µL Opti-MEM für 20 min bei RT inkubiert und dann tröpfchenweise zu den 2 mL Medium pro well dazugegeben. Je nach Versuchsansatz wurden die Zellen 24 h nach Transfektion weiterbehandelt oder 48 h nach Transfektion geerntet. Alle Ansätze erfolgten in Triplikaten, wobei jeder Versuch mindestens zweimal durchgeführt wurde.

2.2.1.6 Proliferations-Assay

Die Untersuchung der antiproliferativen Wirkung von Cisplatin oder YM155 alleine oder in Kombination auf die unterschiedlichen Zelllinien erfolgte mit Hilfe eines Proliferations-Assays. Hierzu wurden in Multiwell-Platten (6-well Format) je 0,2 × 10^6 Zellen pro well in 2 mL des entsprechenden Mediums ausgesät und nach 24 h mit den jeweiligen IC_{50}-Konzentrationen der Substanzen (in Triplikaten, Tabelle 20) oder einer Kombination aus beiden behandelt. Die mittels siRNA transfizierten Zellen (2.2.6) wurden 24 h nach Transfektion nach dem gleichen Schema behandelt. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Zellen nach einer Inkubationszeit von 48 h durch Trypsinierung geerntet und mit dem ViCell Analyzer analysiert. Alle Ansätze erfolgten in Triplikaten und jeder Versuch wurde mindestens zweimal durchgeführt. Die gewonnenen Daten wurden mit Hilfe der GraphPad Prism 5® Software ausgewertet (2.1.12).

2.2.1.7 IC_{50}-Konzentrationsbestimmung für YM155

Zur Bestimmung der IC_{50}-Konzentration (inhibitorische Konzentration einer Substanz, bei der 50% der Zellpopulation abstirbt, kurz IC_{50}) von YM155 auf unterschiedliche Zelllinien wurden diese mit einer Zellzahl von 0,2 × 10^6 Zellen in 2 mL des entsprechenden Mediums in Multi-well Platten (6-well Format) ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von YM155 in Triplikaten behandelt und für weitere 48 h inkubiert. Die Zellen wurden per Trypsinierung geerntet und mit dem ViCell Analyzer analysiert. Die erhaltenen Werte für die Lebendzellzahl/mL wurden in Prozentwerte umgerechnet, auf die Lösungsmittelkontrolle (DMSO) normalisiert und mittels der GraphPad Prism 5® Software in einer nicht-linearen Regression gegen die logarithmierten YM155-Konzentrationen aufgetragen (exemplarische Darstellung in Abbildung 9). Der Versuchsansatz zur IC_{50}-Bestimmung von YM155 wurde pro Zelllinie mindestens dreimal durchgeführt.

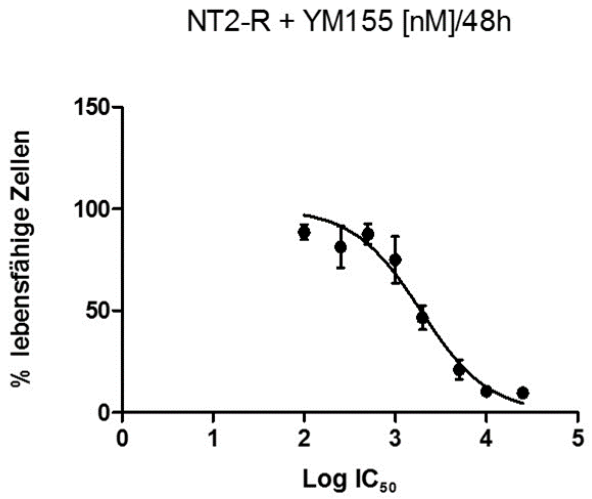


Abbildung 9: Auftragung der prozentualen Lebendzellzahl gegen die logarithmierten Werte der eingesetzten YM155-Konzentrationen.

2.2.1.8 Colony-Formation-Assay

Zur Untersuchung der Auswirkung von Cisplatin und YM155 auf die Fähigkeit von Zellen Kolonien auszubilden, wurden 3 × 10^5 Zellen in Petrischalen in 5 mL des entsprechenden Mediums ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen mit der jeweiligen IC_{50} für Cisplatin oder YM155 (in Triplikaten, Tabelle 20) oder einer Kombination der unterschiedlichen Substanzen behandelt und für weitere 48 h inkubiert. Die Zellen wurden per Trypsinierung geerntet und mit dem ViCell Analyzer analysiert. Es wurden 100 lebende Zellen pro well in Multiwell-platten (6 well-Format, in Triplikaten) in 3 mL entsprechendem Medium wieder ausgesät und für 10 Tage inkubiert. Zur Analyse der gebildeten Kolonien wurde das Medium entfernt und die Kolonien mit PBS gewaschen. Nach der Fixierung der Zellen mit 100% Methanol für 25 min bei RT wurden die Kolonien getrocknet und anschließend mit 1:10 verdünnter Giemsa-Lösung (Azur-Eosin-Methylenblaulösung) für 25 min bei RT gefärbt. Die Kolonien wurden mit dH2O gewaschen, getrocknet und mit bloßem Auge ausgezählt. Der Colony-Formation-Assay wurde mindestens zweimal pro Zelllinie durchgeführt und die erhaltenen Werte wurden mit der GraphPad Prism® 5 Software analysiert (2.1.12).

2.2.1.9 Durchflusszytometrie

Bei der durchflusszytometrischen Analyse (FACS, ***f****luorescece* ***a****ctivated* ***c****ell* ***s****orting*) von Zellen können diese auf unterschiedliche Parameter untersucht werden. Hierzu gehören zum einen die Größe (FSC, ***f****orward* ***sc****atter*) und die Granularität (SSC, ***s****ide* ***sc****atter*) von Zellen aber auch andere Merkmale, wie Oberflächenmoleküle oder Antigene innerhalb der Zellen können durch spezifische Anfärbungen erfasst und analysiert werden. Die Zellen passieren in einer fokussierenden Trägerflüssigkeit einzeln einen Laserstrahl woraufhin das entstehende Streulicht oder Fluoreszenzsignal unterschiedliche Filter passiert und von Detektoren erfasst wird. Hierbei korreliert die Menge des gestreuten Lichts mit der Größe und der Komplexität der Zelle wohingegen die Intensität von Fluoreszenzsignalen mit der Anzahl der gebundenen Zielmoleküle korreliert. So erhält man quantifizierbare Messwerte zu jeder einzelnen Zelle einer Probe, welche sich einfach graphisch darstellen lassen.

2.2.1.9.1 Zellzyklus-Analyse durch Propidiumiodid-Färbung

Proliferierende Zellen durchlaufen den Zellzyklus, welcher die Interphase, die Mitose und die Zellteilung umfasst. Die Interphase besteht aus der G1-Phase (G von engl. *gap* = Lücke), der S-Phase (Synthesephase) und der G2-Phase. Während der einzelnen Phasen der Interphase unterscheiden sich die Zellen unter anderem in ihrem Desoxyribonukleinsäure-Gehalt (*deoxyribonucleic acid*, DNA). In der G1-Phase, der ersten Phase nach der Zellteilung, besteht jedes Chromosom aus einer Chromatide. In der S-Phase werden die Chromosomen durch die Bildung der zweiten Chromatiden vervollständig, welches in der G2-Phase abgeschlossen ist. Somit ist der DNA-Gehalt einer Zelle in der G_2-Phase doppelt so hoch, wie in der G1-Phase. Nach der G2-Phase erfolgen die Mitose mit der Teilung der Chromatiden und des Zellkerns und die eigentliche Zellteilung (Zytokinese), wobei diese beiden Teilungen zum Teil parallel verlaufen können. In einigen Fällen können die Zellen aus der G1-Phase in die G0-Phase übergehen, einem Zustand in dem sich die Zellen nicht teilen. Auch die Rückkehr von Zellen aus der G0-Phase in die G1-Phase ist möglich, wenn diese den Zellzyklus wieder aufnehmen sollen.

Durch das Anfärben der DNA in den Zellen mit Propidiumiodid (PI) kann Rückschluss darauf gezogen werden, in welcher Phase im Zellzyklus sich die Zellen befinden. PI ist ein

fluoreszierendes Molekül, welches in die DNA interkaliert. Anhand des unterschiedlichen Fluoreszenzsignals von Zellen der G1-, S- und G2-Phase kann die Verteilung der Zellen in den Phasen als Gipfel („*peaks*“) in einem Histogramm dargestellt werden. Ebenfalls sichtbar sind apoptotische oder nekrotische Zellen, deren DNA bereits fragmentiert vorliegt. Diese Zellen bilden sich in einem subG1-Peak ab (Abb. 10). Da PI auch in doppelsträngige RNA interkaliert, müssen die zu untersuchenden Proben vor der Analyse mit RNAse behandelt werden.

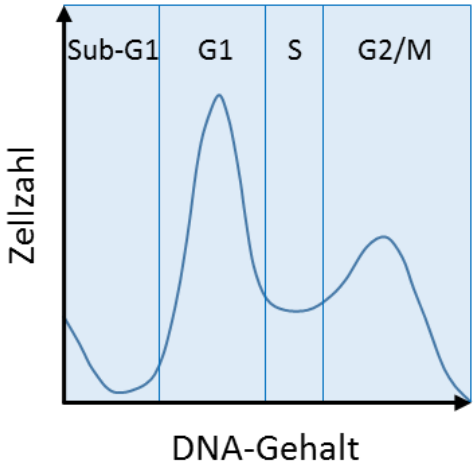


Abbildung 10*:* Schematische Darstellung eines Histogramms in der Zellzyklusanalyse mit PI-Färbung.

Zur Untersuchung der Wirkung von Substanzen oder der Transfektion mit unterschiedlichen siRNAs (oder der Kombination dieser Ansätze) auf die Verteilung der Zellen im Zellzyklus wurden diese nach entsprechender Behandlung durch Trypsinierung geerntet und nach Zentrifugieren für 5 min bei 450 × g und RT mit 1 mL kaltem PBS gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren wurde der Überstand verworfen und jedes Zellpellet in 300 µL PBS resuspendiert. Dieser Zellsuspension wurde anschließend zur Fixierung der Zellen unter langsamem Durchmischen 700 µL hundertprozentigen Ethanols hinzugefügt. Die Proben wurden für mindestens 24h bei -20°C gelagert und anschließend erneut zentrifugiert. Nach einmaligem Waschen der Zellen mit 1 mL kaltem PBS und Verwerfen des Überstandes wurden die Pellets je nach Größe in 50 – 200 µL der PI-Färbelösung (20 µg/mL PI, 1 mg/mL RNase A in PBS) aufgenommen, in FACS-Röhrchen überführt und für 30 min bei RT unter Lichtausschluss inkubiert. Unmittelbar vor der Analyse der Zellen mit dem Durchflusszytometer FACSCalibur und der Software CellQuest 3.3 (2.1.12) wurde das Volumen jeder Probe mit PBS (RT) auf 1 mL aufgefüllt.

2.2.1.9.2 Nachweis von Apoptose durch Doppelfärbung mit Annexin V-FITC und PI

Durch eine Doppelfärbung mit Annexin V-FITC und PI können apoptotische Zellen durchfluss-zytometrisch bestimmt werden. Phosphatidylserin (PS), ein negativ geladenes Phospholipid der Zellmembran, wird im Verlauf der Apoptose von der Innenseite der Zellmembran an die äußere Zelloberfläche transloziert. Annexin V, ein Calcium abhängiges Phospholipid-bindendes Protein, zeigt eine hohe Affinität zu PS und kann als Fluorochrom-gekoppeltes Molekül (hier: Annexin V-FITC) zu dessen Detektion eingesetzt werden. Auch bei nekrotischen Zellen, deren Zellmembran nicht mehr intakt ist, kann Annexin V an das PS der Zelle binden. Deswegen setzt man bei einer Färbung zur Unterscheidung von apoptotischen und nekrotischen Zellen als zusätzlichen Marker Propidiumiodid (PI) ein, welches in die DNA interkaliert. PI kann die intakte Zellmembran nicht durchdringen und färbt somit keine apoptotischen, aber nekrotische oder tote Zellen an. Durch diese Doppelfärbung mit Annexin V-FITC und PI können Annexin V-positive und PI-negative Zellen eindeutig als apoptotische Zellen identifiziert werden.

Die für den Apoptosenachweis einzusetzenden Zellen wurden durch Trypsinierung geerntet,d einmal mit kaltem PBS gewaschen und bei 450 × g für 5 min bei RT pelletiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen in 100 µL Färbelösung (Tabelle 13) resuspendiert und für 15 min bei RT unter Lichtausschluss inkubiert. Anschließend wurden jeder Probe 400 µL Inkubationspuffer (Tabelle 14) hinzugefügt und diese dann unverzüglich am Durchflusszytometer FACSCalibur mit Hilfe der Software CellQuest 3.3 analysiert (2.1.12).

Tabelle 13: Zusammensetzung der Färbelösung

Substanz	Volumen
Annexin V-FITC	20 µL
Inkubationspuffer	1 mL
Propidiumiodid (50 µg/mL)	20 µL

Tabelle 14: Zusammensetzung des Inkubationspuffers

Substanz	Endkonzentration
HEPES/NaOH (pH 7,4)	10 mM
NaCl	140 mM
$CaCl_2$	5 mM

2.2.2. Immunhistochemische Methoden

2.2.2.1 Immunhistochemische Analyse von Gewebeproben

Die Expression von Survivin (gesamt) und der Splicevariante Survivin-2B wurde mittels immunhistochemischer Analyse an in Paraffin eingebetteten Gewebeproben durchgeführt. Die Färbungen wurden mit dem Kit ZytoChem HRP-AEC durchgeführt. Als primär-Antikörper wurden anti-Survivin und anti-Survivin-2B verwendet. Die Färbung erfolgte nach folgendem Protokoll: Zur Vorbehandlung wurden die Gewebeschnitte zunächst zweimal für 10 min in Xylolersatz Medium und dann der Reihe nach für je 5 min in 100% Ethanol, 96% Ethanol, 80% Ethanol, 70% Ethanol und dH_2O deparaffiniert. Die Antigendemaskierung erfolgte für 20 min in Dako Real™ Target Retrieval Solution in einem Dampfgarer. Anschließend wurden die Schnitte auf RT abgekühlt und für 10 min in PBS inkubiert. Es wurde mit 3%iger H_2O_2-Lösung für 30 min ein Peroxidblock durchgeführt, woraufhin ein 2 minütiger Waschschritt in PBS folgte. Mit dem Reagenz 1 aus dem ZytoChem HRP-AEC Kit erfolgte für 5 min ein Proteinblock und erneut ein Waschschritt in PBS für 2 min. Die Schnitte wurden über Nacht mit den jeweiligen primär-Antikörpern in einer Verdünnung von 1:50 in PBS/BSA/NaN_3 (0,2% BSA, 0,1% NaN_3 in PBS) inkubiert und anschließend dreimal für 2 min mit PBS gewaschen. Der polyvalente, biotinylierte sekundär-Antikörper aus dem ZytoChem HRP-AEC Kit (Reagenz 2) wurde für 15 min auf den Gewebeschnitten inkubiert, worauf diese erneut dreimal für 2 min mit PBS gewaschen wurden. Nach der Inkubation mit dem Streptavidin-HRP-Enzymkonjugat (Reagenz 3) für 15 min wurden die Gewebeschnitte wiederholt dreimal für 2 min mit PBS gewaschen und mit der AEC-Substratlösung inkubiert. Die Inkubation dauerte 6 min für Gewebeschnitte, welche mit dem primär-Antikörper anti-Survivin behandelt wurden, und 8 min für Schnitte, für welche der primär-Antikörper gegen die Splicevarinate Survivin-2B verwendet wurde. Die Entwicklung wurde mit einem Waschschritt in dH_2O gestoppt und die Gewebeschnitte mit Hämatoxylin (Mayer) zur Darstellung von Zell- und Gewebestrukturen, wie z.B. Zellkernen, Mitochondrien, Myelin, Elastin und Kollagen für 3 min gegengefärbt. Nach zweimaligem Waschen in dH_2O wurden die Gewebeschnitte für 30 sec in Ammoniaklösung (0,6 – 0,7%) inkubiert und erneut zweimal für 2 min mit dH_2O gewaschen. Die Proben wurden mit Aquatex Eindeckmedium eingedeckt und mit dem AxioScope.A1 Mikroskop und der AxioVision Rel 4.8.2 Software (2.1.12) analysiert und dokumentiert. Die Analyse der Färbungen erfolgte nach einem bereits publizierten Bewertungssystem (163,164). Die

Überprüfung der Ergebnisse auf mathematisch signifikante Unterschiede erfolgte mittels des nicht-parametrischen Mann-Whitney-Tests mit Hilfe der IBM SPSS Statistics-Software (2.1.12).

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 Herstellung von Protein-Lysaten

Zur Herstellung von Protein-Lysaten wurden die Zellen nach entsprechender Behandlung mit Hilfe von Trypsinierung geerntet und mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in Ripa-Puffer (Tabelle 15) resuspendiert, wobei für 1×10^6 Zellen ein Volumen von 100 µL Ripa-Puffer verwendet wurde. Nach einer 30 minütigen Inkubation auf Eis, wurden die Lysate für mindestens 2 h bei -20°C eingefroren. Nach erneutem Auftauen der Proben auf Eis wurden größere Zelltrümmer bei 4°C und 11.000 × g für 10 min abzentrifugiert und anschließend der proteinhaltige Überstand zur weiteren Analyse verwendet.

Tabelle 15: Zusammensetzung des Ripa-Puffers

Substanz	Endkonzentration
NaCl	150 mM
Tris-HCl (pH 7.6)	50 mM
Nonidet-P40	1% (v/v)
Natriumdesoxycholat 10%	0.25 (v/v)
Phenylmethylsulfonylfluorid	1 mM
Natriumorthovanadat ($Na3VO_4$)	1 mM
Protease Inhibitor Cocktail Tabletten	1 Tablette/10 mL

2.2.3.2 Fraktionierung von Zellen mit dem Nuclear Extract Kit

Zur Anreicherung von Proteinen der jeweiligen nukleären und der zytoplasmatischen Fraktion von Zellen wurde das Nuclear Extract Kit der Firma Active Motif verwendet. Die Isolierung der Proteinfraktionen erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Fraktionen erfolge nach der Bradford Methode (2.2.3.3).

2.2.3.3 Konzentrationsbestimmung von Protein-Lysaten

Zur Bestimmung der Konzentration von Protein-Lysaten wurde die Bradford-Methode verwendet. Diese Methode beruht auf der Ausbildung von Komplexen zwischen dem Farbstoff

Coomassie Brilliant Blue G-250 und den Proteinen (hauptsächlich kationischen und unpolaren Seitenketten der Aminosäuren) einer Probe in saurem Milieu. Durch diese Komplexbildung verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 470 nm auf 595 nm und kann photometrisch erfasst werden. Die Zunahme der Absorption korreliert hierbei mit der Konzentration an Proteinen in der Lösung. Zur Kalibrierung wurde eine Eichreihe von 0 – 10 µg/µL mit dem Standard-Protein BSA angelegt. Als Leerwert diente der jeweilige Puffer der Proteinlösung.

Es wurden für den Test je 3 µL Probe mit 27 µL 0,011 M HCl und 870 µL 1:5 verdünntem Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate versetzt, für 5 min bei RT unter Lichtausschluss inkubiert und anschließend mit Hilfe des DU 530 Photometers analysiert.

2.2.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Analyse der Proteine aus den Lysaten wurden 30 µg Protein einer Probe mit nach dem in Tabelle 16 aufgeführten Schema mit dH_2O und dem Proben Puffer Lane Marker Reducing Sample Buffer (5 ×) versetzt, für 5 min bei 99°C denaturiert und anschließend 2 min auf Eis abgekühlt. Das pro Tasche verwendete maximale Probenvolumen betrug 40 µL.

Tabelle 16: Zusammensetzung der Proben für die Analyse per SDS-PAGE

30µg Protein	5 × Probenpuffer	dH_2O	Endvolumen
x µL Probe	8 µL	40 µL – x µL	40 µL

Zur Auftrennung der Proteine in den Proben wurden 15%ige Trenngele (Tabelle 17), Mini-PROTEAN 3 Kammern und SDS-Laufpuffer (0,96 M Glycin, 1,2 M Tris-Base, 17,3 mM SDS) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte zunächst bei 80 V für 30 min wobei die Proteine in das 4%ige Sammelgel (Tabelle 18) einliefen. Die anschließende Auftrennung der Proteine im Trenngel erfolgte für ca. 2 h bei 120 V.

Tabelle 17: Zusammensetzung des Trenngels

Substanz	Endkonzentration
30% Acrylamid	15% (v/v)
1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)	1 M
20% SDS	0.13% (v/v)
10% Ammoniumperoxidsulfat	0.1% (v/v)
TEMED	0.05% (v/v)

Tabelle 18: Zusammensetzung des Sammelgels

Substanz	Endkonzentration
30% Acrylamid	4% (v/v)
0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	0.22 M
20% SDS	0.18% (v/v)
10% Ammoniumperoxidsulfat	0.1% (v/v)
TEMED	0.05% (v/v)

Als Referenz für die Proteingröße wurde der Marker Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder verwendet. Die aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe von einer Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer-Kammer, Tansferpuffer (0,6% Tris (w/v), 0,3% Glycin (w/v), 0,04% SDS (w/v), 20% Methanol) und PROTEAN XL Blot Papier auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Aktivierung der Membran erfolgte durch eine Inkubation für 15 sec in 100%igem Methanol mit einem anschließenden Waschschritt in dH_2O für 2 min und einem Äquilibrationsschritt in Transferpuffer für 5 min. Der Transfer der Proteine erfolgte für 1 h bei 25 V und RT. Der Erfolg des Transfers konnte durch die Übertragung des bereits gefärbten Markers, sowie die Übertragung des Farbstoffes aus dem Proben-Ladepuffer auf die Membran überprüft werden.

2.2.3.5 Immunoblot-Verfahren (Western Blotting)

Die Untersuchung der Expressionsstärke der Zielproteine erfolgte durch spezifische Antikörper und Detektion mittels Chemolumineszenz. Zur Minimierung unspezifischer Bindungen an die Membran wurde diese nach dem Transfer der Proteine 15 sec in 100%igem Methanol inaktiviert und getrocknet. Anschließend wurde die Membran für 1 h bei RT in 5% BSA in TBS-T (60 mM Tris-Base, 160 mM NaCl, 30 mM KCl, 0,05% (v/v) Tween 20; pH 8) geblockt. Die Inkubation der primär-Antikörper erfolgte über Nacht bei 4°C ebenfalls in 5% BSA-TBS-T. Nach dreimaligem Waschen für je 5 min in TBS-T wurden die Membranen für 1 h mit Horseradish-Peroxidase-gekoppelten (HRP-gekoppelten) sekundär-Antikörpern, ebenfalls in TBS-T verdünnt, inkubiert. Nach Wiederholung des Waschvorgangs wurden die gebundenen Antikörper mit Hilfe des Pierce® ECL Western Blotting Substrate detektiert, wobei das entstehende Chemolumineszenzsignal entweder mit Hilfe des Fusion-SL 4 3500 WL Detektionssystems oder mit Röntgenfilmen analysiert wurde. Die erhaltenen Bilder wurden densitometrisch mit der Bio1D- oder Quantity One®-Software analysiert (2.1.12).

2.2.4 Molekularbiologische Methoden

2.2.4.1 RNA-Isolierung

Zur Isolierung der Gesamt-RNA aus Zellen wurden durch Trypsinierung geerntet, einmal mit PBS gewaschen und erneut bei 450 × g für 5 min bei RT pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet bis zur vollständigen Lyse der Zellen in 1 mL TRIzol®-Reagenz resuspendiert und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde den Lysaten 200 µL Chloroform hinzugefügt, vermischt und für 3 min bei RT inkubiert. Zur Abtrennung der wässrigen Phase wurden die Proben für 15 min bei 5.700 × g und 4°C zentrifugiert. Der RNA-haltigen wässrigen Phase wurden 500 µL Isopropanol hinzugefügt und für 10 min bei RT inkubiert. Die Probe wurde erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert und das erhaltenen Pellet zweimal mit kaltem 75%igem Ethanol gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 30 – 50 µL dH_2O resuspendiert. Zur weiteren Verarbeitung wurden die Ansätze mit DNAse I nach Herstellerangaben behandelt und die Konzentration der RNA-Lösung mit dem NanoDrop Photometer bestimmt.

2.2.4.2 cDNA-Synthese für RT-PCR

Zum Umschreiben von isolierter RNA in cDNA wurde das Enzym RevertAid™ Reverse Transkriptase verwendet. Hierzu wurden zu 2 – 5 µg RNA 1 µL Oligo-(dT)-Primer und 1 µL dNTP-Mix gegeben und auf 12 µL mit dH_2O aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde für 5 min bei 65°C inkubiert und anschließen auf Eis abgekühlt. Es wurden 4 µL Reaktions-Puffer, 1 µL RiboLock™ RNase Inibitor, 1 µL RevertAid™ Reverse Transkriptase und 1 µL dH_2O hinzugefügt und der Ansatz wurde für 50 min bei 42°C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym für 15 min bei 72°C inaktiviert.

2.2.4.3 cDNA-Synthese für RT-qPCR

Die cDNA-Synthese für Proben, die mit der Reverse Transkriptase quantitativen Real Time PCR (RT-qPCR) analysiert werden sollten, erfolgte mit Hilfe des Maxima First-Strand cDNA

Synthesis Kits for RT-qPCR nach Herstellerangaben. Es wurden 1 – 5 µg RNA in für die cDNA-Synthese verwendet.

2.2.4.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur selektiven Anreicherung von definierten Nukleinsäure-Sequenzen wurden mit Hilfe der Software Primer3 designte Primer (Tabelle 6) und das DreamTaq Green PCR Master Mix-Kit nach Herstellerangaben verwendet. In dem MyCycler Thermocycler wurden die Ansätze dem in Tabelle 19 aufgeführten PCR-Programm unterzogen. Die unterschiedlichen Annealing-Temperaturen sind in Tabelle 6 ersichtlich.

Tabelle 19: Schritte des PCR-Programms

Schritt	Temperatur	Zeit	Wiederholung
1. Initiale Denaturierung	95°C	4 min	-
2. Denaturierung	95°C	1 min	
3. Annealing	Siehe Tab. 6	1 min	25 – 30-fach
4. Elongation	72°C	1 min	
5. Finale Elongation	72°C	10 min	-
6. Stopp d. Reaktion + Verwahrung	4°C	∞	-

2.2.4.5 Reverse Transkriptase quantitative Real Time PCR (RT-qPCR)

Die Untersuchung der relativen Menge an exprimierter mRNA in unterschiedlichen Proben erfolgte mit Hilfe des SYBR® *Premium Ex Taq*™ II Kits und eines kapillar-basierten Light Cyclers. Als Referenz für die Analyse wurden Plasmide verwendet, welche die zu untersuchende cDNA enthielten und in logarithmischen Verdünnungen eingesetzt wurden. Zur Herstellung der Plasmide wurde das entsprechende cDNA-Produkt in einen pJET1.2/blunt Cloning Vektor (CloneJET PCR Cloning Kit) kloniert. Die erhaltenen Daten wurden auf die Expressionsdaten des Haushaltsgens GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydroxygenase) normalisiert und mittels MS Excel und der GraphPad Prism® 5 Software (2.1.12) ausgewertet. Die verwendeten Primer und Annealing-Temperaturen können Tabelle 6 entnommen werden.

2.2.4.6 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse von PCR- und RT-q-RT-PCR-Produkten wurden diese in 1%igen Agarosegelen, welche 1 µg/mL Ethidiumbromid enthielten, bei 120 V für ca. 1 h mit Hilfe von Agarosegel-elektrophoresekammern und TAE-Puffer (40 mM Tris-HCL, 20 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA, pH 8,2) aufgetrennt. Anschließen wurde das Bandenmuster der durch das interkalierte Ethidiumbromid sichtbaren DNA-Fragmente mit dem E-BOX VX2 2.0 MP Geldokumentations-system dokumentiert. Als Referenz für die Größe der Amplifikate diente der DNA Ladder Mix Orange G Standard.

3. Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen dargestellt. Wenn nicht anders angegeben, wird die Haupt-Splicevariante als Survivin bezeichnet. Die generelle Bezeichnung aller Isoformen lautet hingegen Gesamt-Survivin (G-Survivin).

3.1 Die Expression von Survivin und Survivin-2B in humanen Keimzelltumorzelllinien

3.1.1 Nachweis der Expression von Survivin und Survivin-2B auf mRNA-Ebene

Die Untersuchung der Expression von Survivin und Survivin-2B auf mRNA-Ebene erfolgte durch qualitative RT-PCR (2.2.4.4). Ein Ergebnis für die Auswertung der RT-PCR mittels Agarosegelelektrophorese (2.2.4.6) ist in Abbildung 11 dargestellt.

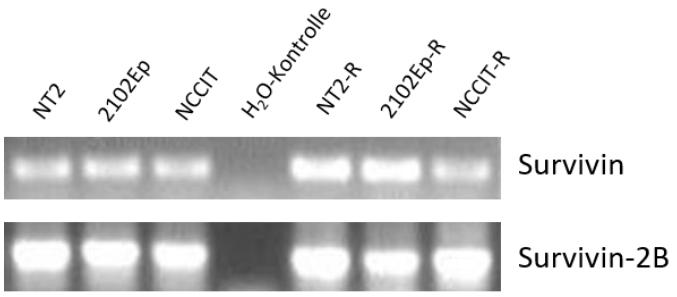


Abbildung 91: Nachweis der Expression von Survivin und Survivin-2B auf mRNA-Ebene durch qualitative RT-PCR. Bei allen untersuchten Zelllinien konnte eine Expression von Survivin und Survivin-2B auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden.

In allen untersuchten Keimzelltumor-Zelllinien (KZT-Zelllinien) konnte die Expression der beiden Isoformen auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden. Mittels *reverse transcriptase qualitative real time PCR* (RT-qPCR) wurde die relative Expressionsstärke von Survivin und Suvivin-2B in allen Zelllinien semi-quantitativ bestimmt.

3.1.2 Ermittlung der relativen Expressionsstärke mittels RT-qPCR

Die relative Expressionsstärke von Survivin und Survivin-2B auf mRNA-Ebene wurde mittels RT-qPCR (2.2.4.5) analysiert. Die erhaltenen Werte für jede KZT-Zelllinie wurden auf die Expression von GAPDH derselben Probe normalisiert. Die Vergleiche der Cisplatin-sensitiven

und -resistenten Pärchen der Zelllinien sind in den Abbildungen 12 und 13 graphisch dargestellt.

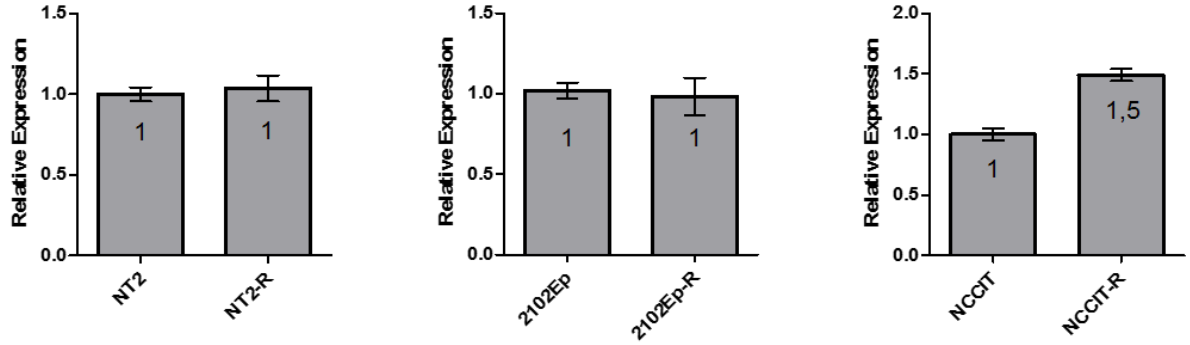


Abbildung 12: Vergleich der Expressionsstärke von Survivin auf mRNA-Ebene zwischen den Cisplatin-sensitiven und -resistenten Zelllinien. Die Expression von Survivin auf mRNA-Ebene unterscheidet sich nur zwischen NCCIT- und NCCIT-R-Zellen. Zwischen den NT2- und NT2-R-, bzw. 2102Ep- und 2102Ep-R-Zellen konnte kein Unterschied festgestellt werden.

Im Vergleich von NT2- und NT2-R-, bzw. 2102Ep und 2102Ep-R-Zellen konnte kein Unterschied der Expression von Survivin auf mRNA-Ebene festgestellt werden. Die Expression von Survivin in den NCCIT-R-Zellen war im Vergleich zu den NCCIT-Zellen um 50% erhöht (Abbildung 12).

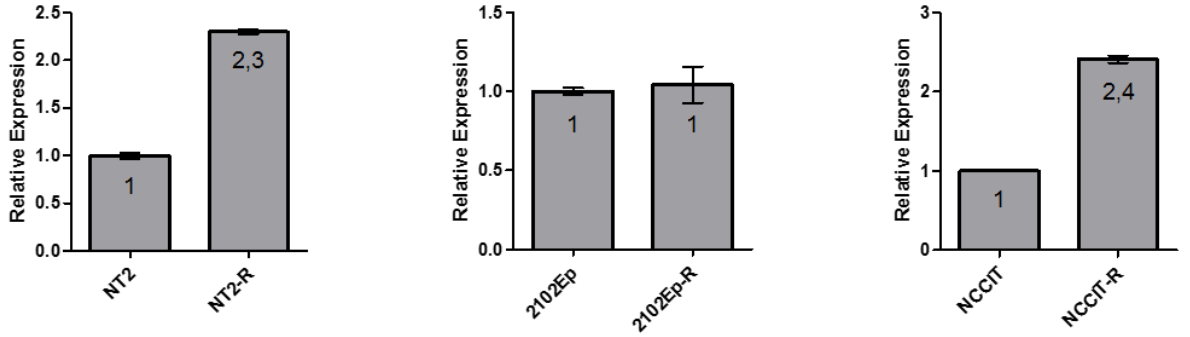


Abbildung 13: Vergleich der Expressionsstärke von Survivin-2B auf mRNA-Ebene zwischen den Cisplatin-sensitiven und -resistenten Zelllinien. Die Expression von Survivin-2B auf mRNA-Ebene ist in den Cisplatin-resistenten NT2-R- und NCCIT-R-Zellen mehr als doppelt so stark, wie in den jeweiligen Cisplatin-sensitiven Zelllinien. Zwischen den 2102Ep- und den 2102Ep-R-Zellen unterscheidet sich die Expressionsstärke von Survivin-2B nicht.

Für die Expression von Survivin-2B auf mRNA-Ebene konnte zwischen 2102Ep- und 2102Ep-R-Zellen kein Unterschied festgestellt werden. In den Cisplatin-resistenten NT2-R-Zellen war die Expression der Survivin-2B-mRNA um das 2,3-fache erhöht im Vergleich zu den Cisplatin-sensitiven NT2-Zellen. Auch die Cisplatin-resistenten NCCIT-R-Zellen lagen in der Expression von Survivin-2B auf mRNA-Ebene 2,3-fach höher als die Cisplatin-sensitiven NCCIT-Zellen (Abbildung 13).

3.1.3 Nachweis der Expression von Gesamt-Survivin auf Proteinebene

Die Analyse der Expression von G-Survivin auf Proteinebene erfolgte mittels Western Blotting (2.2.3.5) unter Verwendung eines Antikörpers, welcher alle Isoformen von Survivin detektieren kann. Zur internen Kontrolle der eingesetzten Proteinmenge und zur Quantifizierung der G-Survivin-Expression wurde Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet. Das Ergebnis der Western Blotting-Analyse ist in Abbildung 14 beispielhaft dargestellt.

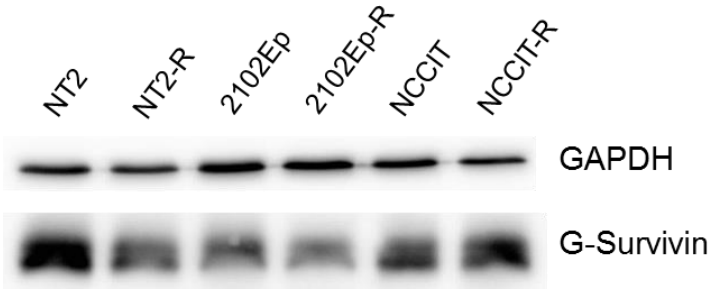


Abbildung 14: Nachweis der Expression von G-Survivin auf Proteinebene durch Western Blotting. In allen untersuchten Zelllinien konnte G-Survivin auf Proteinebene nachgewiesen werden. Die Expressionsstärke zeigte deutliche Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Zelllinien.

Die erhaltenen Bilder wurden zur densitometrischen Quantifizierung mittels der Bio1D-Sofware (2.1.12) verwendet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 15 graphisch dargestellt. Die Quantifizierung zeigte, dass sich die Paare der Cisplatin-sensitiven und –resistenten Zelllinien in der Stärke der G-Survivin-Expression unterschieden. NT2-R, die Cisplatin-resistente Sublinie, exprimierte hier 30% weniger G-Survivin als NT2. Zwischen der Expressionsstärke von 2102Ep- und 2102Ep-R-Zellen zeigte sich kein Unterschied. Dagegen war die Expression von G-Survivin in den Cisplatin-resistenten NCCIT-R-Zellen um 50% höher als in den Cisplatin-sensitiven NCCIT-Zellen. Der Vergleich zwischen 2102Ep- und 2102Ep-R-Zellen und zwischen NCCIT- und NCCIT-R-Zellen bestätigt die Ergebnisse der relativen Expressionsstärke von Survivin auf mRNA-Ebene. Zwischen NT2- und NT2-R-Zellen konnte hingegen auf mRNA-Ebene kein Unterschied in der Expressionsstärke detektiert werden, auf Proteinebene war jedoch ein geringer Unterschied detektierbar.

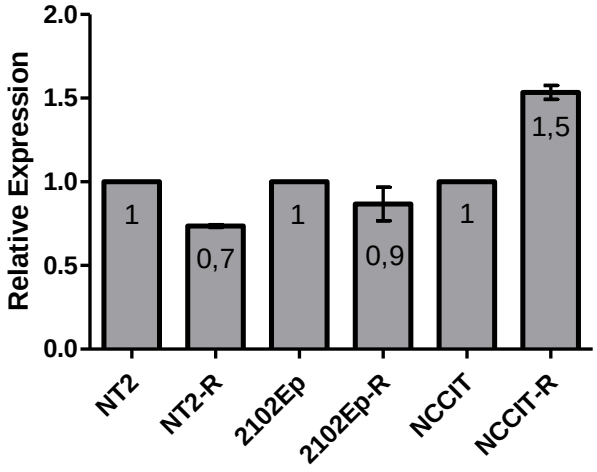


Abbildung 15: Ergebnis der densitometrischen Quantifizierung der Expressionsstärke von G-Survivin in den untersuchten Zelllinien. Gezeigt ist die relative Expression von G-Survivin der Cisplatin-resistenten Zelllinien in Bezug zur Expression in der zugehörigen Cisplatin-sensitiven Zelllinie. Die Expression von G-Survivin variiert zwischen den jeweiligen Cisplatin-sensitiven und -resistenten Zelllinien.

3.1.4 Nachweis der Expression von Survivin-2B auf Proteinebene

Die Expression von Survivin-2B wurde mittels Western Blotting (2.2.3.5) unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers gegen die Isoform Survivin-2B analysiert und ist in Abbildung 16 zu sehen. Als interne Ladungskontrolle der Proteinmenge und zur Quantifizierung der Expressionsstärke von Survivin-2B wurde GAPDH verwendet.

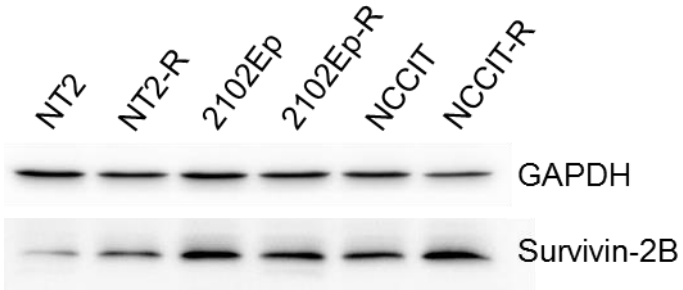


Abbildung 16: Nachweis der Expression von Survivin-2B auf Proteinebene durch Western Blotting. In allen untersuchten Zelllinien konnte Survivin-2B auf Proteinebene nachgewiesen werden. Die Expressionsstärke variierte zwischen den verschiedenen Zelllinien.

In allen untersuchten KZT-Zelllinien konnte eine Expression von Survivin-2B auf Proteinebene nachgewiesen werden. Die densitometrische Quantifizierung der erhaltenen Signale erfolgte wiederum mittels der Bio1D-Sofware (2.1.12) und ist graphisch in Abbildung 17 dargestellt.

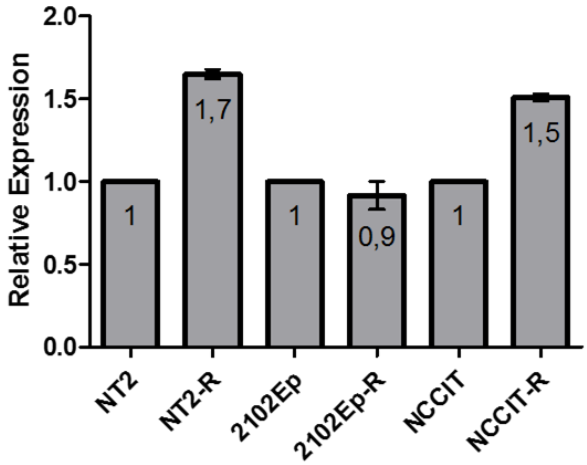


Abbildung 17: Ergebnis der densitometrischen Quantifizierung der Expressionsstärke von Survivin-2B in den untersuchten Zelllinien. Abgebildet ist die relative Expression von Survivin-2B in den Cisplatin-resistenten Zelllinien in Bezug auf die Expressions-stärke in den jeweiligen Cisplatin-sensitiven Zelllinien. Die Zelllinien NT2-R und NCCIT-R zeigen erhöhte Expressionslevel an Survivin-2B im Vergleich zu den jeweiligen Cisplatin-sensitiven Zellen.

Die Ergebnisse der Quantifizierung der Expression auf Proteinebene (Abbildung 17) bestätigen die Daten der relativen Expressionsstärke von Survivin-2B auf mRNA-Ebene für alle Zelllinien. 2102Ep- und 2102Ep-R-Zellen unterschieden sich nicht in der Expressionsstärke des Proteins. Bei den anderen beiden Zelllinien-Pärchen exprimiert jeweils die Cisplatin-resistente Zelllinien (NT2-R bzw. NCCIT-R) mehr Survivin, als die Cisplatin-sensitiven Linien (NT2 bzw. NCCIT).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sowohl auf RNA-, als auch auf Proteinebene eine Expression von Survivin und Survivin-2B in allen untersuchten KZT-Zelllinien nachgewiesen werden konnte. Dabei wurde bei dem Vergleich der Expressionsstärke zwischen Cisplatin-sensitiven und -resistenten Zelllinien eine Tendenz zu einer höheren Expression beider Isoformen in Cisplatin-resistenten Zellen festgestellt.

3.2 Untersuchung der zellulären Lokalisation von Survivin und Survivin-2B mittels Fraktionierung und Western Blotting-Analyse

Die zelluläre Lokalisation von Survivin und Survivin-2B auf Proteinebene wurde mittels Anreicherung der nukleären und zytoplasmatischen Proteinfraktionen unter Verwendung des Nuclear Extract Kits (2.2.3.2) und anschließendem Western Blotting (2.2.3.5) untersucht. Als Referenz-Protein für die Anreicherung der nukleären Proteine wurde Nucleolin verwendet. Zum Nachweis der Anreicherung der zytoplasmatischen Proteinfraktion diente die Detektion von GAPDH. Anhand der Bestimmung der Lokalisation der Survivin-Isoformen in der Zelle konnten Rückschlüsse auf mögliche Funktionen der Proteine gezogen werden. Das Ergebnis der Western Blotting-Analyse für G-Survivin und Survivin-2B nach der Fraktionierung von NT2- und NT2-R-Zellen ist in Abbildung 18 dargestellt, die Ergebnisse für 2102Ep- und 2102Ep-R-Zellen finden sich in Abbildung 19 und die Ergebnisse für die NCCIT- und NCCIT-R-Zellen sind in Abbildung 20 zu sehen.

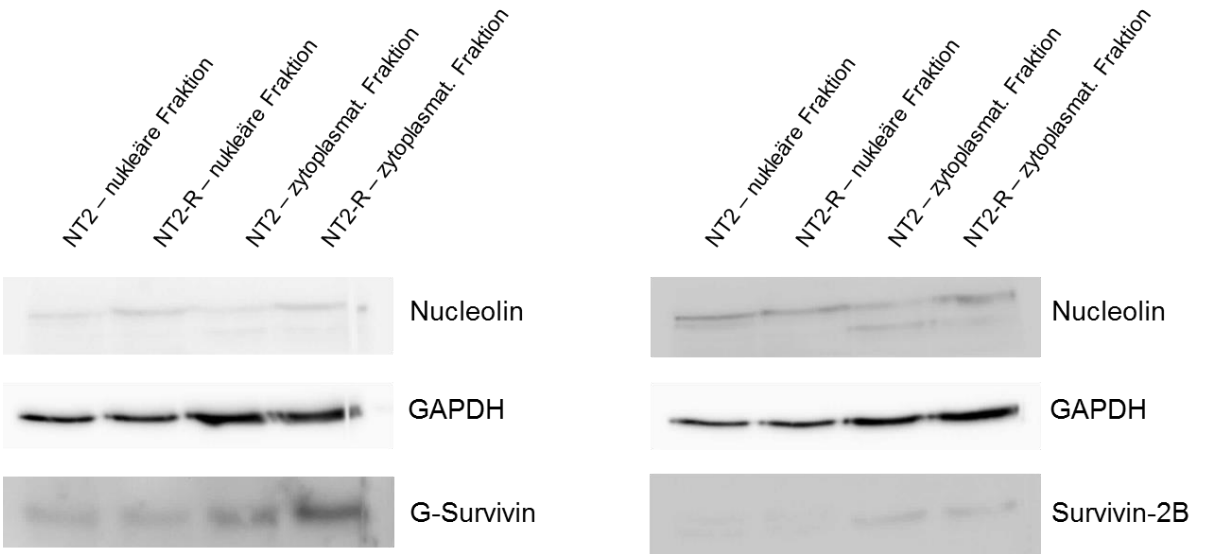


Abbildung 18: Western Blotting-Analyse der Lokalisation von G-Survivin (links) und Survivin-2B (rechts) nach der Anreicherung der nukleären und der zytoplasmatischen Proteinfraktionen von NT2- und NT2-R-Zellen.

Die Anreicherung der nukleären und zytoplasmatischen Proteine aus NT2- und NT2-R Zellen war am besten anhand der GAPDH-Fraktionierung erkennbar. Eine Expression von G-Survivin (Abbildung 18, links) war sowohl im Nukleus, als auch im Zytoplasma detektierbar, mit leichter Tendenz zu einer höheren Expression im Zytoplasma. Eine vorwiegende Lokalisation von

Survivin-2B (Abbildung 18, rechts) in der zytoplasmatischen Fraktion ließ sich deutlich erkennen.

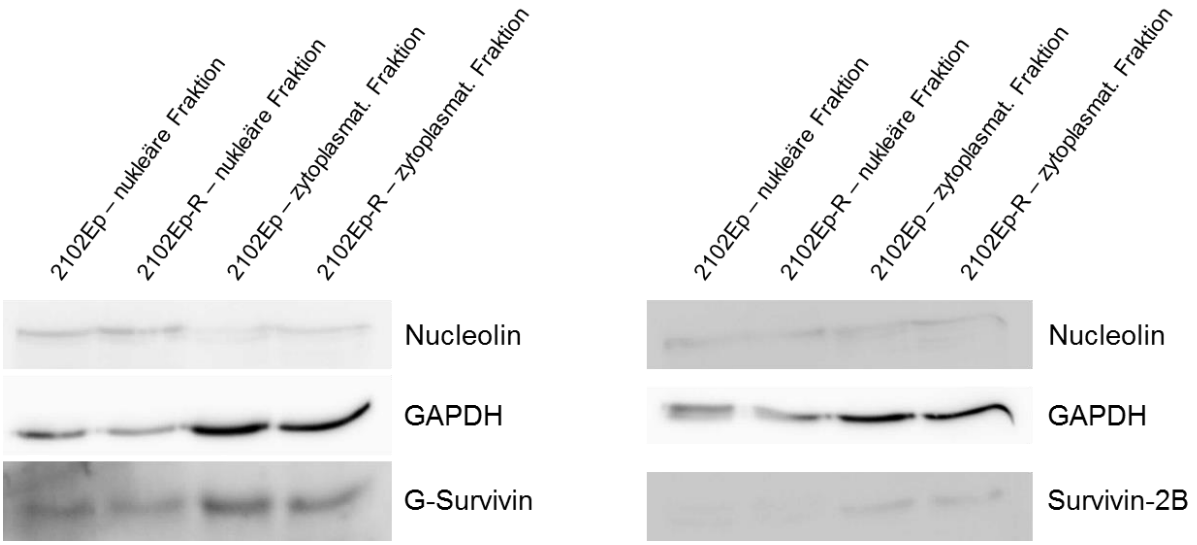


Abbildung 19: Western Blotting-Analyse der Lokalisation von G-Survivin (links) und Survivin-2B (rechts) nach der Anreicherung der nukleären und der zytoplasmatischen Proteinfraktionen von 2102Ep- und 2102Ep-R-Zellen.

Die Fraktionierung der nukleären und zytoplasmatischen Proteine von 2102Ep- und 2102Ep-R-Zellen und die anschließende Western Blotting-Analyse ergaben den Nachweis von G-Survivin (Abbildung 19, links) sowohl im Nukleus, als auch im Zytoplasma. Survivin-2B (Abbildung 19, rechts) war auf Proteinebene vornehmlich im Zytoplasma zu detektieren.

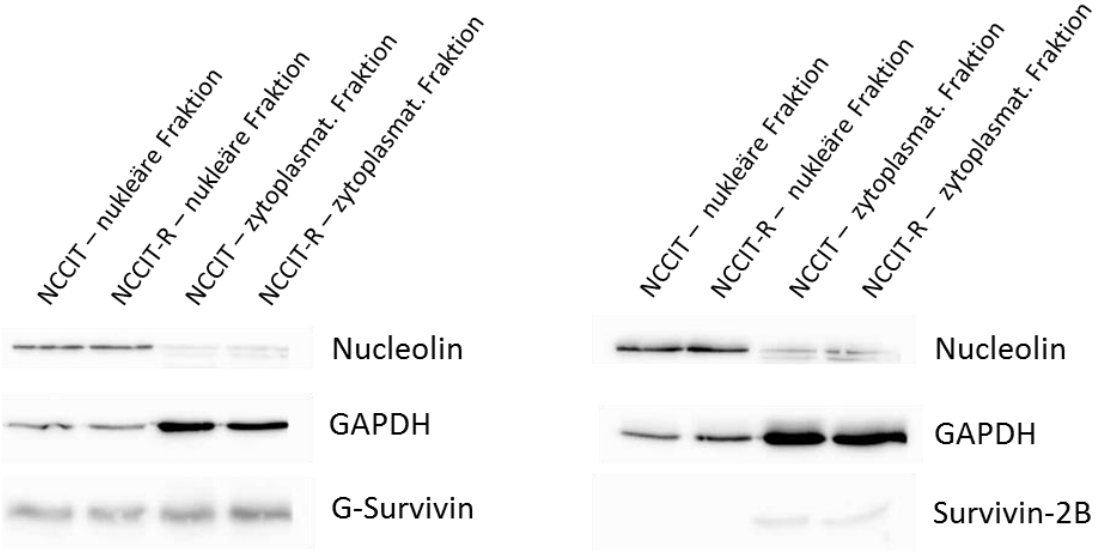


Abbildung 20: Western Blotting-Analyse der Lokalisation von G-Survivin (links) und Survivin-2B (rechts) nach der Anreicherung der nukleären und der zytoplasmatischen Protein-Fraktionen von NCCIT- und NCCIT-R-Zellen.

Nach der erfolgreichen Anreicherung der nukleären und zytoplasmatischen Proteine mittels des Nuclear Extract Kits aus NCCIT- und NCCIT-R-Zellen war zu erkennen, dass G-Survivin

(Abbildung 20, links) sowohl im Nukleus, als auch im Zytoplasma lokalisiert ist. Survivin-2B (Abbildung 20, rechts) konnte auf Proteinebene nur in den zytoplasmatischen, nicht aber in den nukleären Fraktionen nachgewiesen werden.
Das Ergebnis für die Lokalisation von G-Survivin sowohl im Zellkern, als auch im Zytoplasma bei KZT-Zelllinien deckt sich mit den Angaben aus der Literatur zu anderen Tumorzelllinien. So konnte bereits für andere Zelllinien nachgewiesen werden, dass Survivin, als Teil des CPC und als Apoptose-Regulator, Aufgaben sowohl im Zellkern, als auch im Zytoplasma erfüllt (86). Die hauptsächliche Anreicherung von Survivin-2B in der zytoplasmatischen Fraktion der Zelllinien deutet hingegen auf eine Rolle von Survivin-2B in der Regulation der Apoptose hin.

3.3 Nachweis der Herunterregulierung von Survivin und Survivin-2B durch RNA-Interferenz

Durch das Einbringen von siRNA-Oligomeren in die Zellen wurde eine spezifische Herunterregulierung der mRNA für die Haupt-Splicevariante von Survivin und die Isoform Survivin-2B über den Mechanismus der RNA-Interferenz herbeigeführt. Hierbei werden die siRNAs in die Zellen eingebrachten und dort als einzelsträngige Moleküle in den sogenannten *RNA-induced silencing complex* (RISC) aufgenommen. In diesem Komplex sind sie dann, über eine komplementäre Bindung an die Ziel-mRNAs in der Lage, zum einen die Translation dieser mRNAs zu inhibieren, und zum anderen den Abbau der gebundenen mRNAs durch eine Endonuklease-Aktivität einer RISC-Komponente herbeizuführen. Das Resultat ist die spezifische Herunterregulierung von mRNAs und konsekutiv auch der entsprechenden Proteinen in der Zelle.
Zur Untersuchung der biologischen Funktion von Survivin und Survivin-2B in KZT-Zelllinien wurden diese spezifisch inhibiert. Hierfür wurden entsprechende siRNAs (siSurvivin oder si2B, siehe 2.1.7) über Lipofektion (2.2.1.5) in die Zellen eingebracht und die Herunterregulierung der Isoformen auf mRNA- (2.2.4.5) und Proteinebene (2.2.3.5) untersucht. Zum Nachweis der Spezifität der beiden siRNAs und zum Auschluss unspezifischer Effekte der eingebrachten siRNA im Allgemeinen wurde zudem bei jedem Versuch ein Ansatz mit einer Kontroll-siRNA (siK, siehe 2.1.7) durchgeführt. Die Kontroll-siRNA zeigt laut Herstellerangaben keine Komplementarität zu humanen mRNA-Sequenzen und ist somit zum Ausschluss von unspezifischen Nebeneffekten bei RNA-Interferenzversuchen geeignet. Die Ergebnisse der inhibitorischen Wirkung der siRNA gegen Survivin und Survivin-2B auf mRNA-Ebene in NT2-

Zellen sind in den Abbildungen 21 und 22 graphisch dargestellt. Die Auswertungen der Effekte der RNA-Interferenz auf Proteinebene sind in den Abbildungen 23 bis 26 zu sehen.

3.3.1 Nachweis der Herunterregulierung der Survivin- und der Survivin-2B-mRNA durch RNA-Interferenz

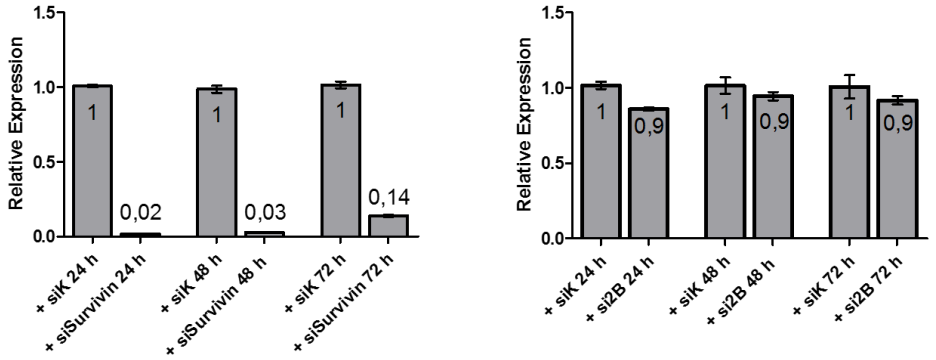


Abbildung 21: Analyse der Wirkung der siRNA gegen Survivin (links) und der siRNA gegen Survivin-2B (rechts) auf die Expression von Survivin auf mRNA-Ebene in NT2 Zellen nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubation, normalisiert auf die Expressionsstärke in der jeweiligen Kontroll-siRNA-transfizierten Probe.

Durch die Transfektion von NT2-Zellen mit der siRNA gegen Survivin (Abbildung 21, links) konnte die Expressionsstärke auf mRNA-Ebene signifikant reduziert werden ($p < 0,05$). Die Expression entsprach nach 24 h Inkubation dem 0,02-fachen der siK-transfizierten Probe, nach 48 h dem 0,03-fachen der siK-transfizierten Probe und nach 72 h dem 0,14-fachen der siK-transfizierten Probe. Durch die Transfektion der Zellen mit der siRNA gegen Survivin-2B (Abbildung 21, rechts) wurde nach 24 h eine zwar statistisch signifikante, aber insgesamt nur schwache Reduktion der Survivin-mRNA-Expression auf das 0,9-fache des mit der Kontroll-siRNA transfizierten Ansatzes beobachtet ($p < 0,05$). Die Effekte der Transfektion nach 48 h und 72 h zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Expressionsstärke von Survivin (n. s.).

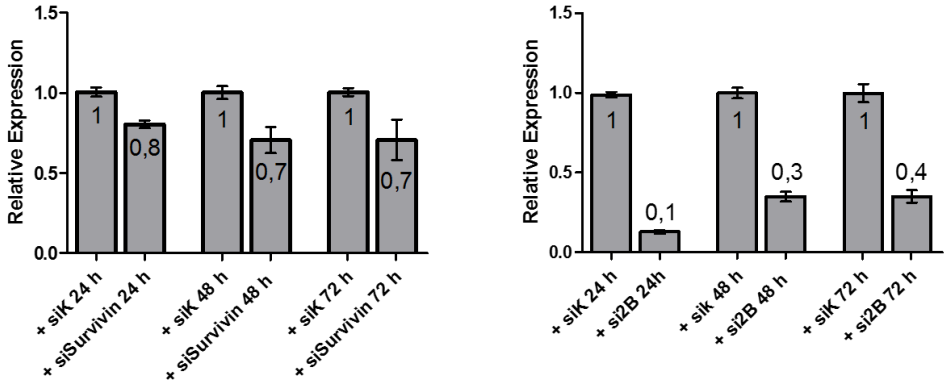


Abbildung 22: Analyse der Wirkung der siRNA gegen Survivin (links) und der siRNA gegen Survivin-2B (rechts) auf die Expression von Survivin-2B auf mRNA-Ebene in NT2 Zellen nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubation, normalisiert auf die Expressionsstärke in der jeweiligen Kontroll-siRNA-transfizierten Probe.

Durch die Transfektion von NT2-Zellen mit der siRNA gegen Survivin (Abbildung 22, links) konnte nach 24 h Inkubation eine zwar signifikante, aber ebenfalls wenig ausgeprägte Reduktion der Expressionsstärke der Survivin-2B-mRNA auf das 0,8-fache der siK-transfizierten Kontrolle festgestellt werden ($p < 0,05$). Nach 48 h Inkubation verringerte sich die Expression der Survivin-2B-mRNA signifikant auf das 0,7-fache der siK-transfizierten Kontrolle ($p < 0,05$). 72 h nach der Transfektion von NT2-Zellen mit der siRNA gegen Survivin konnte ebenfalls eine signifikante Reduktion des Expressionslevels der Survivin-2B-mRNA auf das 0,7-fache der mit der Kontroll-siRNA transfizierten Probe beobachtet werden ($p < 0,05$). Durch die Transfektion der NT2-Zellen mit der siRNA gegen Survivin-2B (Abbildung 22, rechts) konnte nach 24 h Inkubation eine deutliche und statistisch signifikante Abnahme der Expression der Survivin-2B-mRNA auf das 0,1-fache beobachtet werden ($p < 0,05$). Nach 48 h bzw 72 h Inkubation konnten signifikante Reduktionen auf das 0,3- bzw. 0,4-fache der jeweiligen siK-transfizierten Proben festgestellt werden ($p < 0,05$).

Die siRNA gegen Survivin zeigte in den Interferenz-Untersuchungen große Spezifität und hatte nur sehr geringe Auswirkungen auf die Expression von Survivin-2B auf mRNA-Ebene. Die siRNA gegen Survivin-2B reduzierte die Expression der Survivin-mRNA andererseits nur leicht, hingegen kam es durch die siRNA gegen Survivin-2B zu einer Herunterregulierung der Survivin-2B-mRNA, die um ein Vielfaches größer war und bei einem geeigneten Versuchsaufbau einen definitiven Effekt erzielen kann.

3.3.2 Nachweis der Herunterregulierung von Survivin und Survivin-2B auf Proteinebene durch RNA-Interferenz

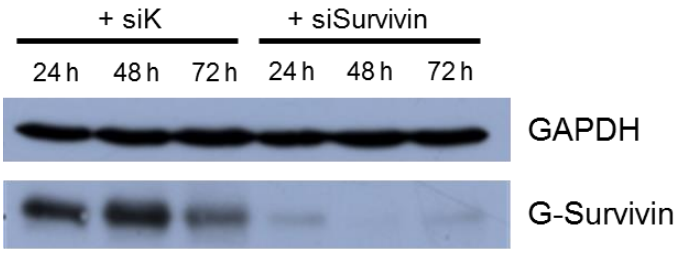


Abbildung 23: Analyse der Wirkung der Kontroll-siRNA und der siRNA gegen Survivin auf die Expression von G-Survivin auf Proteinebene in NT2 Zellen nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubation.

Es ist eine starke Herunterregulierung von G-Survivin auf Proteinebene nach einer Transfektion von NT2-Zellen mit der siRNA gegen Survivin zu erkennen (Abbildung 23). Auch die Transfektion der Zellen mit der Kontroll-siRNA scheint die Expression von G-Survivin auf Proteinebene zu beeinflussen. Die Bilder wurden zur densitometrischen Quantifizierung der Expressionsstärke mittels der Quantity One®-Software (2.1.12) eingesetzt und die Ergebnisse sind graphisch in Abbildung 24 dargestellt. Die Expression von GAPDH wurde als Referenz eingesetzt und die Werte für die relative Expression von G-Survivin auf die jeweilige siK-transfizierte Probe normalisiert.

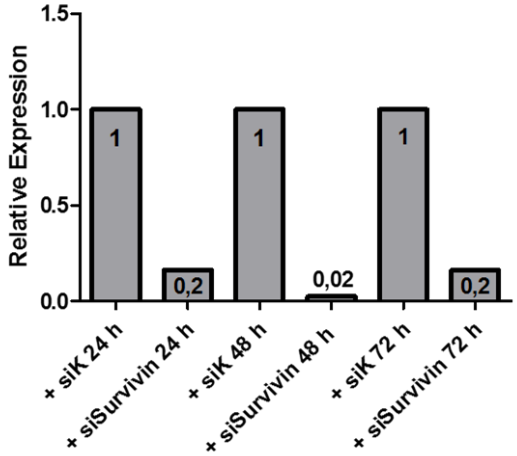


Abbildung 24: Ergebnisse der densitometrischen Quantifizierung der Expression von G-Survivin auf Proteinebene nach der Transfektion von NT2-Zellen mit der Kontroll-siRNA oder der siRNA gegen Survivin nach 24 h, 48 h und 72 h, normalisiert auf die Expressionsstärke in der jeweiligen Kontroll-siRNA-transfizierten

Durch die Transfektion von NT2-Zellen mit der siRNA gegen Survivin konnte die Expression von G-Survivin im Vergleich zur entsprechenden siK-transfizierten Probe bereits nach 24 h deutlich um 80% reduziert werden (Abbildung 24). Nach einer Inkubation von 48 h konnte, verglichen mit der siK-transfizierten Probe, nur noch eine Expression von 2% festgestellt werden. Die Herunterregulierung der Expressionsstärke von G-Survivin durch die Transfektion der Zellen mit der siRNA gegen Survivin hielt auch nach 72h Inkubation noch an, wo eine relative Expressionsstärke von 20% im Vergleich zu der entsprechenden Kontrolle beobachtet werden konnte.

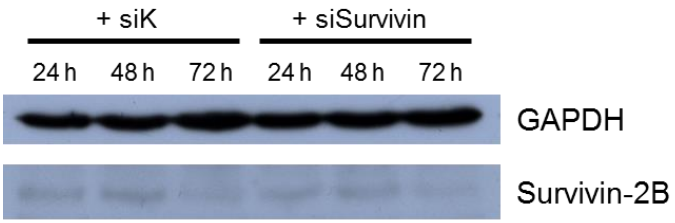


Abbildung 25: Analyse der Wirkung der Kontroll-siRNA und der siRNA gegen Survivin auf die Expression von Survivin-2B auf Proteinebene in NT2 Zellen nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubation.

Die Ergebnisse der Western Blotting-Analyse der Expression von Survivin-2B nach der Transfektion von NT2-Zellen mit der Kontroll-siRNA oder der siRNA gegen Survivin (Abbildung 25) wurden zur weiteren Analyse mittels der Quantity One®-Software eingesetzt (2.1.12). Die relative Expressionsstärke von Survivin-2B wurde densitometrisch analysiert und die Ergebnisse sind graphisch in Abbildung 26 zu sehen. Die Expression von GAPDH diente als Referenz und die Werte für die relative Expressionsstärke von Survivin-2B wurden auf die Werte der entsprechenden siK-transfizierten Ansätze normalisiert.

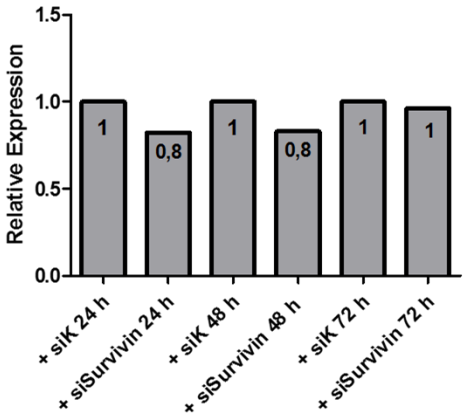


Abbildung 26: Ergebnisse der densitometrischen Quantifizierung der Expression von Survivin-2B auf Proteinebene nach der Transfektion von NT2-Zellen mit der Kontroll-siRNA oder der siRNA gegen Survivin nach 24 h, 48 h und 72 h, normalisiert auf die Expressionsstärke in der jeweiligen Kontroll-siRNA-transfizierten Probe.

Die densitometrische Auswertung der Expressionsstärke von Survivin-2B nach der Transfektion von NT2-Zellen mit der Kontroll-siRNA oder der siRNA gegen Survivin (Abbildung 26) zeigte sowohl nach 24 h, als auch nach 48 h eine geringfügige Abnahme der Expression von 20% im Vergleich zu den entsprechenden mit der Kontroll-siRNA transfizierten Ansätzen. Nach einer Inkubation von 72 h konnte kein Unterschied in der Expressionsstärke von Survivin-

2B zwischen der siK-transfizierten und der mit der siRNA gegen Survivin transfizierten Probe festgestellt werden.

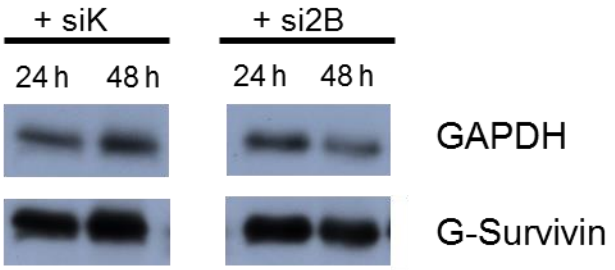


Abbildung 27: Analyse der Wirkung der Kontroll-siRNA und der siRNA gegen Survivin-2B auf die Expression von G-Survivin auf Proteinebene in NT2 Zellen nach 24 h und 48 h Inkubation.

Nach der Transfektion von NT2-Zellen mit der Kontroll-siRNA und der siRNA gegen Survivin-2B waren gewisse regulatorische Effekte auf die Expression von G-Survivin auf Proteinebene zu beobachten (Abbildung 27). Die Ergebnisse der Western Blotting-Analyse wurden zur densitometrischen Quantifizierung mittels der Quantity One®-Software eingesetzt (2.1.12), wobei die Expressionsstärke von GAPDH als Referenz diente. Die Werte für die Expression von G-Survivin wurden auf die entsprechenden mit der Kontroll-siRNA transfizierten Proben normalisiert und sind in Abbildung 28 zu sehen.

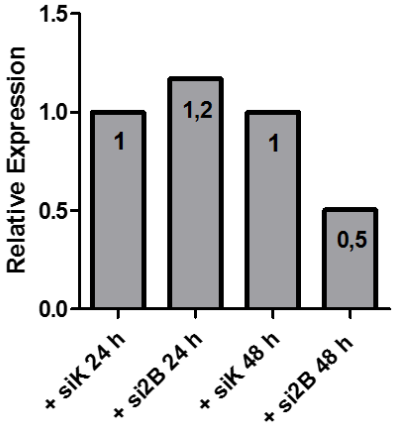


Abbildung 28: Ergebnisse der densitometrischen Quantifizierung der Expression von G-Survivin auf Proteinebene nach der Transfektion von NT2-Zellen mit der Kontroll-siRNA oder der siRNA gegen Survivin-2B nach 24 h und 48 h, normalisiert auf die Expressionsstärke in der jeweiligen Kontroll-siRNA-transfizierten Probe.

Die Ergebnisse der densitometrischen Quantifizierung der Expression von G-Survivin auf Proteinebene (Abbildung 28) nach der Transfektion von NT2-Zellen mit der Kontroll-siRNA oder der siRNA gegen Survivin-2B ergaben zunächst eine leichte Steigerung der Expression von G-Survivin um 20% nach 24 h Inkubation im Vergleich zur entsprechenden siK-

transfizierten Probe. Nach 48 h Inkubation war hingegen eine Abnahme der Expressionsstärke von G-Survivin auf 50% verglichen mit dem entsprechenden siK-transfizierten Kontroll-Ansatz zu beobachten.

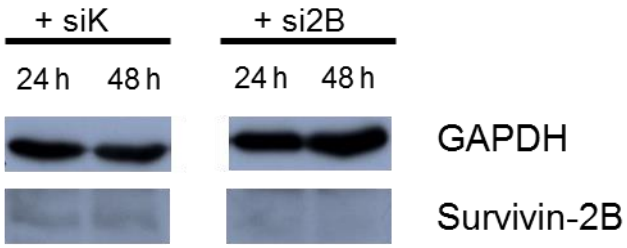


Abbildung 29: Analyse der Wirkung der Kontroll-siRNA und der siRNA gegen Survivin-2B auf die Expression von Survivin-2B auf Proteinebene in NT2 Zellen nach 24 h und 48 h Inkubation.

Die Ergebnisse der Western Blotting-Analyse der Expression von Survivin-2B (Abbildung 29) nach der Transfektion von TN2-Zellen mit der Kontroll-siRNA oder der siRNA gegen Survivin-2B wurden zur densitometrischen Quantifizierung mittels der Quantity One®-Software eingesetzt (2.1.12). Die Expressionsstärke von GAPDH diente als Referenz, wobei die Werte für die relative Expressionsstärke von Survivin-2B auf die Werte der entsprechenden siK-transfizierten Ansätze normalisiert wurden. Die Ergebnisse der Analyse sind in Abbildung 30 zu sehen.

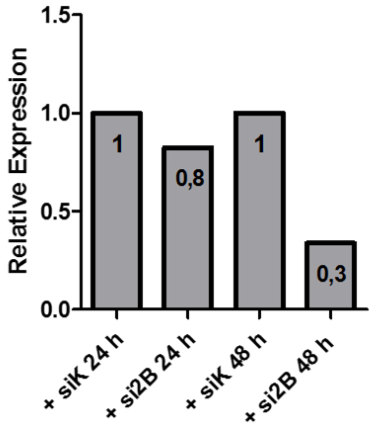


Abbildung 30: Ergebnisse der densitometrischen Quantifizierung der Expression von Survivin-2B auf Proteinebene nach der Transfektion von NT2-Zellen mit der Kontroll-siRNA oder der siRNA gegen Survivin-2B nach 24 h und 48 h, normalisiert auf die Expressionsstärke in der jeweiligen Kontroll-siRNA-transfizierten Probe.

Nach einer Inkubation von NT2-Zellen mit der siRNA gegen Survivin-2B war eine Abnahme der Expressionsstärke um 20% im Vergleich zum entsprechenden siK-transfizierten Ansatz zu

sehen (Abbildung 30). Nach 48 h Inkubation konnte die Expressionsstärke von Survivin-2B, verglichen mit der entsprechenden siK-transfizierten Probe, deutlich auf 30% reduziert werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass durch den Einsatz spezifischer siRNAs gegen Survivin und Survivin-2B die Expression der beiden Isoformen sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene signifikant reduziert werden konnte. Zudem scheint es auf Proteinebene eine gegenseitige Beeinflussung der Proteinexpression nach spezifischer Hemmung der Splicevarianten zu geben, welche hinsichtlich der Regulation von Survivin-2B durch siRNA gegen Survivin stärker ausgeprägt ist als diejenige, die von einer siRNA gegen Survivin-2B auf Survivin ausgeübt wird.

3.4 Untersuchung der Wirkung der Inhibition von Survivin und Survivin-2B auf die Proliferation von Keimzelltumorzelllinien

Die Auswirkung einer siRNA-vermittelten Inhibition von Survivin auf die Proliferation von KZT-Zelllinien alleine und in Kombination mit einer Cisplatin-Behandlung wurde durch Proliferations-Assays (2.2.1.6) bestimmt. Hierfür wurden die bereits transfizierten Cisplatin-sensitiven Zelllinien mit der in früheren Untersuchungen bestimmten IC_{50} für Cisplatin über 48 h inkubiert. Die Cisplatin-resistenten Zellen wurden entweder mit der niedrigeren IC_{50} des jeweiligen Cisplatin-sensitiven Pendants, oder mit ihrer eigentlichen IC_{50} für Cisplatin behandelt. Beispielhafte Ergebnisse der Proliferations-Assays für die unterschiedlichen Zelllinien sind in den Abbildungen 31 bis 36 graphisch dargestellt.

3.4.1 Untersuchung der Wirkung der Inhibition von Survivin und Survivin-2B auf die Proliferation von NT2-Zellen

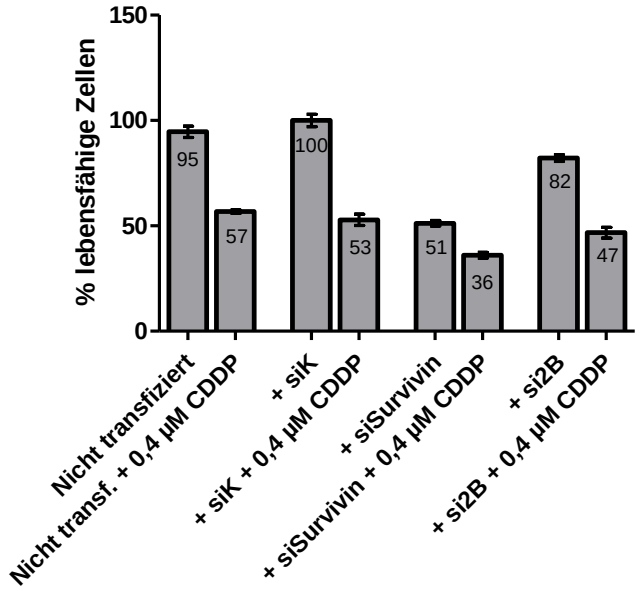


Abbildung 31: Analyse der Wirkung einer Inhibition von Survivin und Survivin-2B mittels siRNA alleine und in Kombination mit einer CDDP-Behandlung auf die Proliferation von NT2-Zellen. Wenn im Text nicht anders angegeben, zeigen die Vergleiche aller Proben statistisch signifikante Unterschiede.

Die Transfektion von NT2-Zellen mit der Kontroll-siRNA (Abbildung 31) zeigte keine Auswirkung auf die Proliferation der Zellen (n. s.). Die Behandlung der nicht-transfizierten und der mit der Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen mit der IC_{50} für Cisplatin (0,4 µM) reduzierte die Anzahl an lebensfähigen Zellen auf 57%, bzw. 53% der jeweiligen Kontrolle ($p < 0,05$). Die Transfektion der Zellen mit der siRNA gegen Survivin führte nach 48 h ebenfalls zu einer Reduktion der lebensfähigen Zellen auf 51% und zeigte damit eine vergleichbare Wirkung wie eine Behandlung der Zellen mit der IC_{50} von Cisplatin ($p < 0,05$). Eine zusätzliche Behandlung der Zellen mit der IC_{50} von Cisplatin reduzierte die Anzahl an lebensfähigen Zellen um weitere 15% auf insgesamt 36%. Der beobachtete Unterschied war statistisch signifikant ($p < 0,05$), sowohl im Vergleich zur Transfektion der Zellen mir der siSurvivin alleine, als auch im Vergleich zum entsprechenden Cisplatin-behandelten Ansatz mit der Kontroll-siRNA. Das bedeutet, dass die Kombination der siRNA gegen Survivin mit einer Cisplatin-Behandlung die Anzahl an lebensfähigen Zellen um ca. 20% mehr reduzierte ($p < 0,05$), als eine Behandlung mit Cisplatin alleine. Die Inhibition von Survivin-2B zeigte ebenfalls eine antiproliferative Wirkung auf die NT2-Zellen ($p < 0,05$). Eine zusätzliche Behandlung mit Cisplatin reduzierte die Anzahl an

lebensfähigen Zellen auf 47%, was hingegen in etwa dem alleinigen Effekt einer Cisplatin-Behandlung entspricht (n. s.).

3.4.2 Untersuchung der Wirkung der Inhibition von Survivin und Survivin-2B auf die Proliferation von NT2-R-Zellen

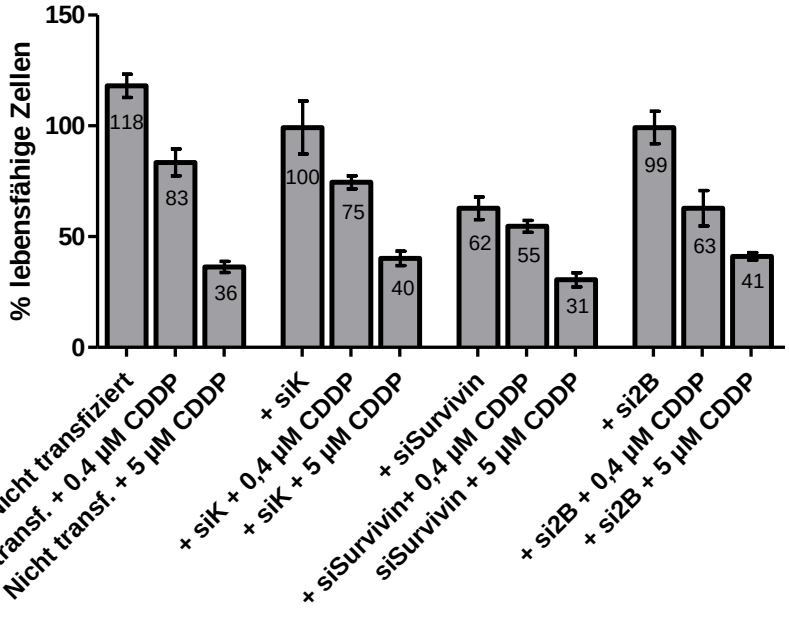


Abbildung 32: Analyse der Wirkung einer Inhibition von Survivin und Survivin-2B mittels siRNA alleine und in Kombination mit einer CDDP-Behandlung auf die Proliferation von NT2-R-Zellen. Wenn im Text nicht anders angegeben, zeigen die Vergleiche aller Proben statistisch signifikante Unterschiede.

Die Transfektion von NT2-R-Zellen mit der Kontroll-siRNA (Abbildung 32) zeigte eine leichte antiproliferative Wirkung. Die zusätzliche Behandlung der Zellen mit der IC_{50} der Cisplatin-sensitiven Zelllinie NT2 (0,4 µM) reduzierte die Anzahl an lebensfähigen Zellen um 25% im Vergleich zur Transfektion allein ($p < 0,05$). Eine Behandlung der transfizierten NT2-R-Zellen mit der eigentlichen IC_{50} (5 µM) verringerte die Anzahl an lebensfähigen Zellen auf 40% ($p < 0,05$). Eine Transfektion der NT2-R-Zellen mit der siRNA gegen Survivin reduzierte die Anzahl an lebensfähigen Zellen auf 62% im Vergleich zu der siK-transfizierten Probe ($p < 0,05$). Eine zusätzliche Behandlung der Zellen mit der IC_{50} der Cisplatin-sensitiven Linie NT2 (0,4 µM) verringerte die Anzahl an lebensfähigen Zellen um weitere 7% (n. s.). Wurden die Zellen jedoch mit Cisplatin in der Dosierung der IC_{50} für resistente Zellen behandelt, konnte die Anzahl an lebensfähigen Zellen auf 31% reduziert werden ($p < 0,05$). Das bedeutet eine zusätzliche Verringerung der Anzahl an lebensfähigen Zellen durch eine Kombination der Transfektion der

Zellen mit der siRNA gegen Survivin mit einer Cisplatin-Behandlung um ca. 10% im Vergleich zu einer Cisplatin-Behandlung der Zellen alleine ($p < 0,05$). Die Transfektion der NT2-R-Zellen mit der siRNA gegen Survivin-2B zeigte keine Wirkung auf die Proliferation der Zellen (n. s.). Eine zusätzliche Behandlung der Zellen mit der IC_{50} für die Cisplatin-sensitive Linie NT2 (0,4 µM) konnte die Anzahl an lebensfähigen Zellen hingegen auf 63% reduzieren, was der gleichen Prozentzahl einer Transfektion der Zellen mit der siRNA gegen Survivin entspricht (n.s.). Eine zusätzliche Behandlung von NT2-R-Zellen, die mit der siRNA gegen Survivin-2B transfiziert wurden mit der eigentlichen IC_{50} dieser Zelllinie (5 µM), brachte den gleichen Effekt, wie eine Behandlung mit Cisplatin in dieser Konzentration alleine. Deshalb zeigte ein Vergleich dieser beiden Proben auch keinen statistisch signifikanten Unterschied.

3.4.3 Untersuchung der Wirkung der Inhibition von Survivin und Survivin-2B auf die Proliferation von 2102Ep-Zellen

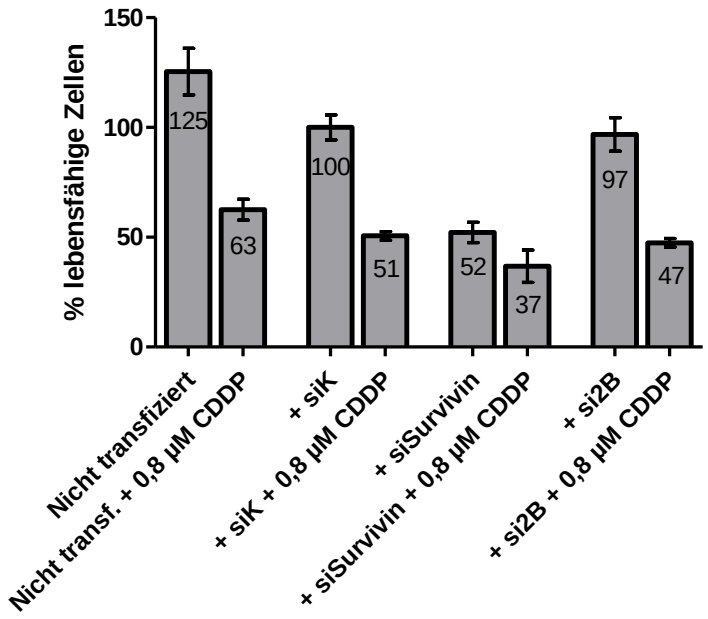


Abbildung 33: Analyse der Wirkung einer Inhibition von Survivin und Survivin-2B mittels siRNA alleine und in Kombination mit einer CDDP-Behandlung auf die Proliferation von 2102Ep-Zellen. Wenn im Text nicht anders angegeben, zeigen die Vergleiche aller Proben statistisch signifikante Unterschiede.

Im Vergleich zu den nicht-transfizierten Zellen zeigte eine Transfektion von 2102Ep-Zellen mit der Kontroll-siRNA (Abbildung 33) eine leichte inhibitorische Wirkung auf die Proliferation. Eine zusätzliche Behandlung der Zellen mit Cisplatin (0,8 µM) zeigte die erwartete

Verringerung an lebensfähigen Zellen auf 51% ($p < 0,05$). Ein nahezu identischer Effekt konnte durch die Transfektion der Zellen mit der siRNA gegen Survivin erzielt werden ($p < 0,05$ gegenüber siK-transfizierten Zellen). Wurden die Zellen zusätzlich mit Cisplatin behandelt, konnte die Anzahl an lebensfähigen Zellen um weitere 15% auf 37% reduziert werden ($p < 0,05$). Eine Inhibition von Survivin durch die Transfektion der Zellen mit der si2B hatte wie schon bei der Zelllinie NT2-R keinen Einfluss auf die Proliferation der Zellen (n. s.). Auch eine zusätzliche Behandlung der Zellen mit Cisplatin konnte nur in etwa gleiche Effekte erzielen wie eine Behandlung der Zellen mit Cisplatin alleine (n. s.).

3.4.4 Untersuchung der Wirkung der Inhibition von Survivin und Survivin-2B auf die Proliferation von 2102Ep-R-Zellen

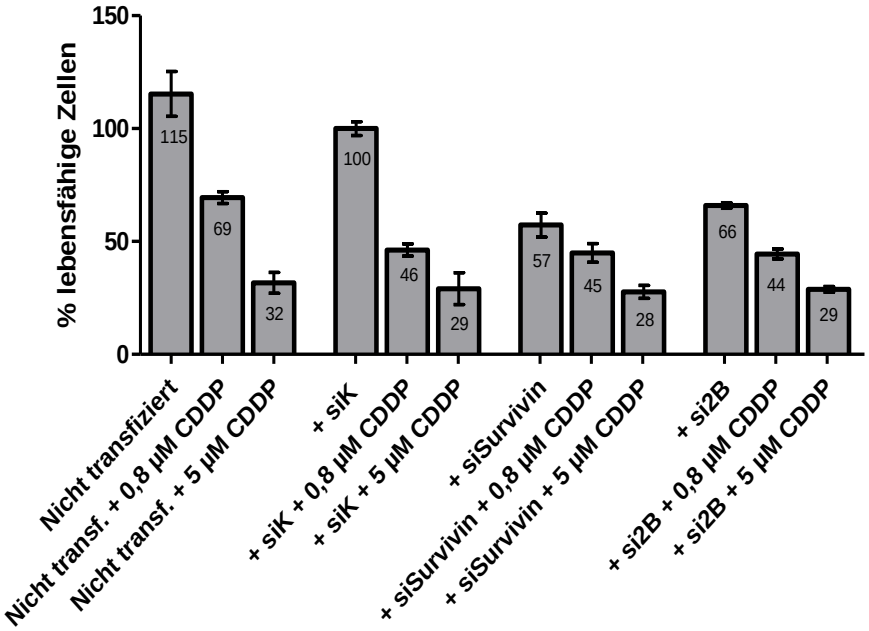


Abbildung 34: Analyse der Wirkung einer Inhibition von Survivin und Survivin-2B mittels siRNA alleine und in Kombination mit einer CDDP-Behandlung auf die Proliferation von 2102Ep-R-Zellen. Wenn im Text nicht anders angegeben, zeigen die Vergleiche aller Proben statistisch signifikante Unterschiede.

Die Transfektion von 2102Ep-R-Zellen mit der Kontroll-siRNA (Abbildung 34) zeigte einen leichten antiproliferativen Effekt. Die Effekte der Behandlung der Zellen mit der IC_{50} für die Cisplatin-sensitive Linie 2102Ep und insbesondere der eigentlichen IC_{50} dieser Linie zeigten hingegen größere Effekte (jeweils $p < 0,05$). Durch eine Transfektion der Zellen mit der siRNA gegen Survivin konnte die Anzahl an lebensfähigen Zellen auf 57% im Vergleich zu siK-transfizierten Probe reduziert werden ($p < 0,05$). Eine zusätzliche Behandlung der Zellen mit

0,8 µM Cisplatin brachte eine weitere Verringerung der Zellzahl um 12% auf insgesamt 45% ($p<0,05$). Dieser Effekt konnte allerdings bereits durch die Behandlung der siK-transfizierten Zellen mit der IC_{50} für die Cisplatin-sensitive Linie (0,8 µM) erreicht werden. Auch der Effekt einer Kombination aus einer Transfektion mit der siRNA gegen Survivin und der Behandlung der Zellen mit der eigentlichen IC_{50} dieser Zelllinie (5 µM) konnte keine Verstärkung des antiproliferativen Effekts bewirken, im Vergleich zur Behandlung der Zellen mit Cisplatin in der hohen Dosierung alleine (n. s.). Die Transfektion der 2102Ep-R-Zellen mit der siRNA gegen Survivin-2B konnte die Anzahl an lebensfähigen Zellen auf 66% der siK-transfizierten Probe verringern ($p < 0,05$). Allerdings konnten auch hier, durch eine zusätzliche Behandlung der Zellen mit Cisplatin (0,8 µM / 5 µM), keine verstärkten Effekte in Bezug auf die antiproliferative Wirkung im Vergleich zu einer Behandlung der Zellen mit Cisplatin alleine festgestellt werden (n. s.).

3.4.5 Untersuchung der Wirkung der Inhibition von Survivin und Survivin-2B auf die Proliferation von NCCIT-Zellen

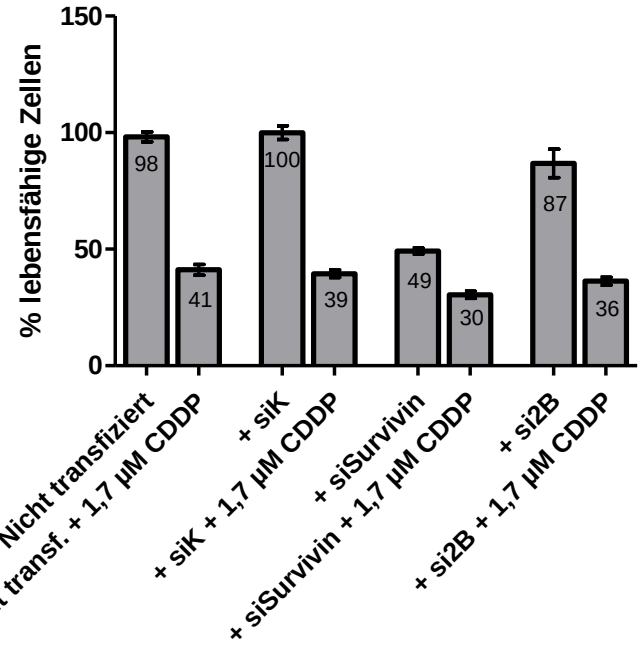


Abbildung 35: Analyse der Wirkung einer Inhibition von Survivin und Survivin-2B mittels siRNA alleine und in Kombination mit einer CDDP-Behandlung auf die Proliferation von NCCIT-Zellen. Wenn im Text nicht anders angegeben, zeigen die Vergleiche aller Proben statistisch signifikante Unterschiede.

Nach der Transfektion von NCCIT-Zellen mit der Kontroll-siRNA (Abbildung 35) konnten keine Effekte auf die Proliferation beobachtet werden (n. s.). Die zusätzliche Behandlung der Zellen mit Cisplatin (1,7 µM) zeigte einen deutlichen Effekt ($p < 0,05$). Durch die Transfektion der Zellen mit der siRNA gegen Survivin konnte die Anzahl an lebensfähigen Zellen auf 49% im Vergleich zur siK-transfizierten Probe verringert werden ($p < 0,05$). Eine zusätzliche Cisplatin-behandlung reduzierte die Anzahl um weitere 10% ($p < 0,05$). Eine Transfektion der Zellen mit der siRNA gegen Survivin-2B verringerte die Anzahl an lebensfähigen Zellen auf 87% im Vergleich zur siK-transfizierten Probe (n. s.). Eine zusätzliche Behandlung der Zellen mit Cisplatin brachte eine weitere Abnahme der Anzahl an lebensfähigen Zellen auf insgesamt 36%. Der Vergleich dieser Probe mit der siK-transfizierten und Cisplatin-behandelten Probe zeigte allerdings keinen statistisch signifikanten Unterschied.

3.4.6 Untersuchung der Wirkung der Inhibition von Survivin und Survivin-2B auf die Proliferation von NCCIT-R-Zellen

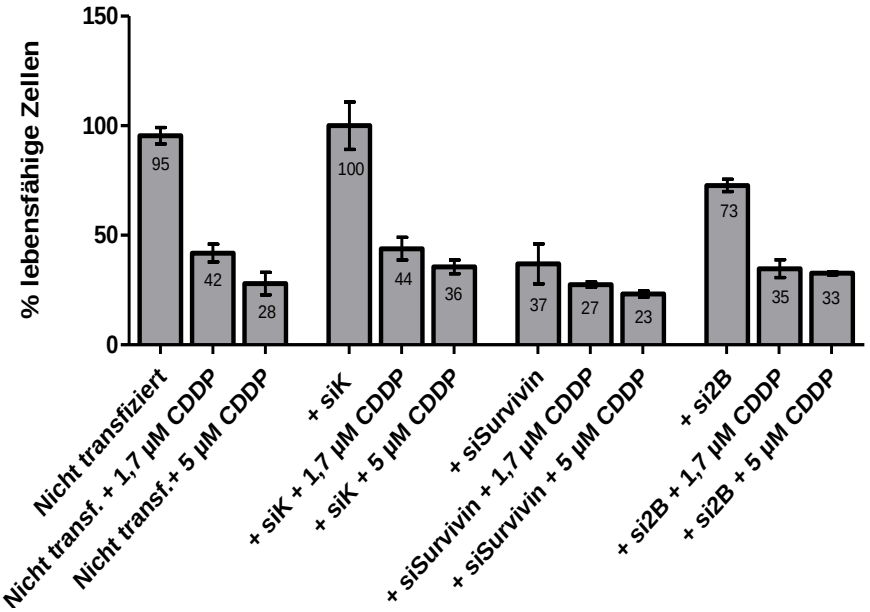


Abbildung 36: Analyse der Wirkung einer Inhibition von Survivin und Survivin-2B mittels siRNA alleine und in Kombination mit einer CDDP-Behandlung auf die Proliferation von NCCIT-R-Zellen. Wenn im Text nicht anders angegeben, zeigen die Vergleiche aller Proben statistisch signifikante Unterschiede.

Die Transfektion von NCCIT-R-Zellen mit der Kontroll-siRNA (Abbildung 36) zeigte keinen Effekt auf die Proliferation der Zellen (n. s.). Die Behandlung der Zellen mit der IC_{50} für die Cisplatin-sensitive Linie NCCIT (1,7 µM) hatte bereits einen deutlichen Effekt. Das Gleiche war

der Fall für die Behandlung der Zellen mit der eigentlichen IC_{50} (5 µM) ($p < 0,05$). Durch die Transfektion der Zellen mit der siRNA gegen Survivin konnte eine deutliche Abnahme der Anzahl an lebensfähigen Zellen auf 37% im Vergleich zur siK-transfizierten Kontrolle erreicht werden ($p < 0,05$). Eine zusätzliche Behandlung der Zellen mit 1,7 µM bzw. 5 µM Cisplatin verringerte die Anzahl an lebensfähigen Zellen in den Proben auf 27 bzw. 23%, allerdings ohne mathematische signifikante Unterschiede in den Vergleichen. Die Inhibition von Survivin-2B durch die Transfektion der Zellen mit der entsprechenden siRNA verringerte die Anzahl an lebensfähigen Zellen um 27% auf 73% im Vergleich zur siK-transfizierten Probe ($p < 0,05$). Aber auch hier zeigten sich durch eine zusätzliche Behandlung der Proben mit 1,7 µM oder 5 µM Cisplatin keine signifikanten Reduktionen der Anzahl an lebensfähigen Zellen im Vergleich zu den entsprechenden siK-transfizierten und mit Cisplatin-behandelten Proben.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass durch die Behandlung der Zellen mit der siRNA gegen Survivin, starke antiproliferative Effekte sowohl in den Cisplatin-sensitiven, als auch in den -resistenten KZT-Zelllinien beobachtet werden konnten. In den Cisplatin-resistenten Zellen gelang es durch diese Herunterregulierung von Survivin, die Resistenz gegenüber Cisplatin aufzuheben und die Zellen wieder auf Cisplatin zu sensibilisieren. Die Inhibition der Isoform Survivin-2B durch den Einsatz einer spezifischen siRNA hatte einen geringeren antiproliferativen Effekt in den KZT-Zelllinien als die Inhibition von Survivin. Der Einsatz dieser siRNA konnte den antiproliferativen Effekt von Cisplatin nicht weiter verstärken, was gegen eine antiapoptotische Rolle von Survivin-2B in KZT-Zellen spricht.

3.5 Bestimmungen der IC_{50} für YM155 für Keimzelltumorzelllinien

Der *small molcule inhibitor* YM155 wurde auf seine biologische Aktivität in Keimzelltumorzelllinien getestet. Hierfür stand am Anfang die Bestimmung der IC_{50} in den einzelnen KZT-Zelllinien. Die Analyse erfolgte durch Proliferations-Assays (2.2.1.7). Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in den Graphen 37 bis 42 dargestellt und in Tabelle 18 zusammengefasst.

3.5.1 IC_{50}-Konzentrationsbestimmung für YM155 für die Behandlung von NT2-Zellen

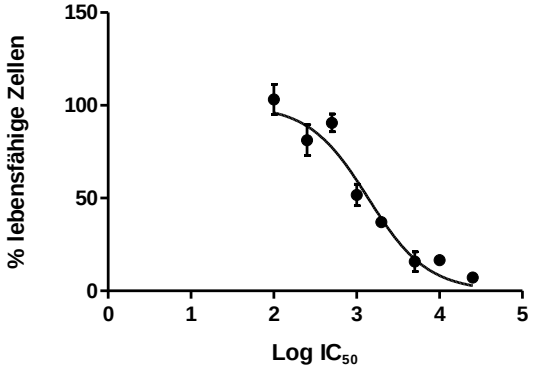


Abbildung 37: Auftragung der prozentualen Lebendzellzahl von NT2-Zellen gegen die logarithmierten Werte der eingesetzten YM155-Konzentrationen.

Die Untersuchungen zur IC_{50}-Bestimmung für NT2-Zellen (Abbildung 37) ergab eine Konzentration von 1,3 nM YM155 bei einer Inkubationszeit von 48 h.

3.5.2 IC_{50}-Konzentrationsbestimmung für YM155 für die Behandlung von NT2-R-Zellen

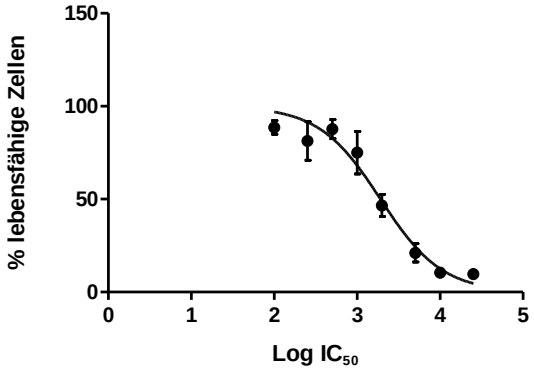


Abbildung 38: Auftragung der prozentualen Lebendzellzahl von NT2-R-Zellen gegen die logarithmierten Werte der eingesetzten YM155-Konzentrationen.

Für eine Inkubationszeit von 48 h wurde bei den Untersuchungen zur IC_{50}-Bestimmung für NT2-R-Zellen (Abbildung 38) eine Konzentration von 1,7 nM YM155 festgestellt.

3.5.3 IC_{50}-Konzentrationsbestimmung für YM155 für die Behandlung von 2102Ep-Zellen

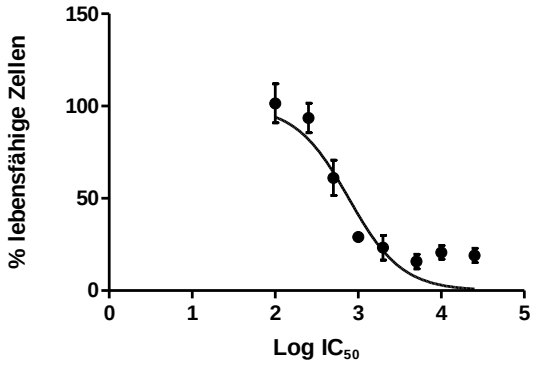


Abbildung 39: Auftragung der prozentualen Lebendzellzahl von 2102Ep-Zellen gegen die logarithmierten Werte der eingesetzten YM155-Konzentrationen.

Die IC_{50} von YM155 für 2102Ep-Zellen (Abbildung 39) liegt bei 0,8 nM für eine Inkubation über 48 h.

3.5.4 IC_{50}-Konzentrationsbestimmung für YM155 für die Behandlung von 2102Ep-R-Zellen

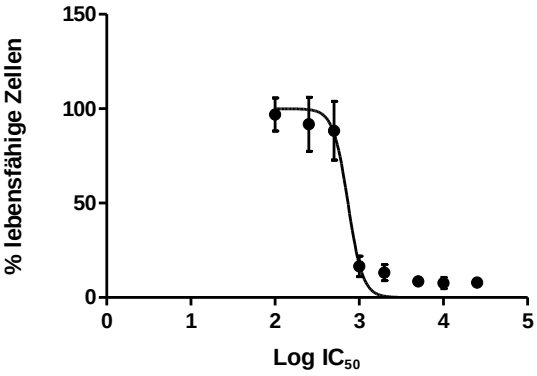


Abbildung 40: Auftragung der prozentualen Lebendzellzahl von 2102Ep-R-Zellen gegen die logarithmierten Werte der eingesetzten YM155-Konzentrationen.

Die Untersuchung zur IC_{50}-Bestimmung von YM155 für 2102EP-R-Zellen (Abbildung 40) ergab eine Konzentration von 0,8 nM für eine Inkubationszeit von 48 h.

3.5.5 IC_{50}-Konzentrationsbestimmung für YM155 für die Behandlung von NCCIT-Zellen

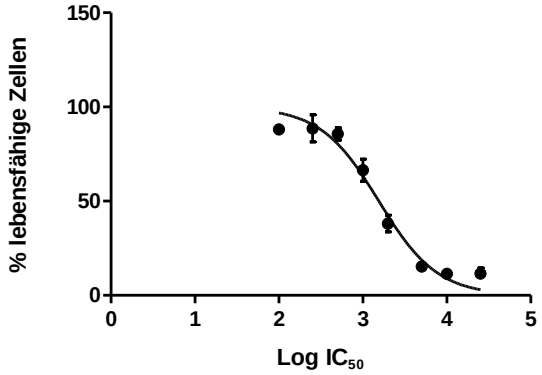


Abbildung 41: Auftragung der prozentualen Lebendzellzahl von NCCIT-Zellen gegen die logarithmierten Werte der eingesetzten YM155-Konzentrationen.

Bei den Untersuchungen zur IC_{50}-Bestimmung von YM155 für NCCIT-Zellen (Abbildung 41) konnte für eine Inkubation über 48 h eine Konzentration von 1,7 nM ermittelt werden.

3.5.6 IC_{50}-Konzentrationsbestimmung für YM155 für die Behandlung von NCCIT-R-Zellen

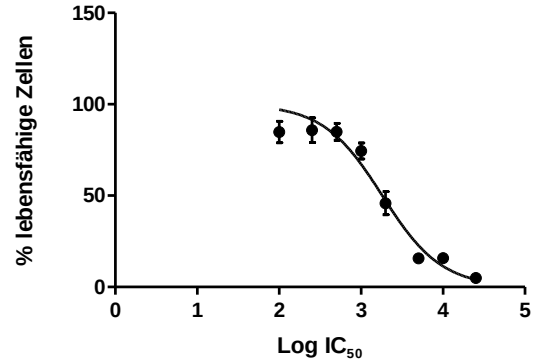


Abbildung 42: Auftragung der prozentualen Lebendzellzahl von NCCIT-R-Zellen gegen die logarithmierten Werte der eingesetzten YM155-Konzentrationen.

Die Untersuchungen zur IC_{50}-Bestimmung von YM155 für NCCIT-R-Zellen (Abbildung 42) ergaben eine Konzentration von 2,6 nM für eine Inkubationszeit von 48 h.

In Tabelle 20 sind zur Übersicht alle IC_{50}-Konzentrationen für Cisplatin und für YM155 zusammengestellt.

Tabelle 20: Übersicht über die IC_{50}-Konzentartionen für Cisplatin und YM155 für die untersuchten Zelllinien

Zelllinie	Cisplatin IC_{50} [µM]	YM155 IC_{50} [nM]
NT-2	0.4	1.3
NT-2-R	5	1.7
2102Ep	0.8	0.8
2102Ep-R	5	0.8
NCCIT	1.7	1.3
NCCIT-R	5	2.6

3.5.7 Untersuchung der Unterschiede in der IC_{50}-Konzentration für YM155 zwischen Cisplatin-sensitiven und Cisplatin-resistenten Zelllinien

Um festzustellen, ob bei den Cisplatin-resistenten Zellen eine Kreuzresistenz gegen YM155 besteht, wurden die Ergebnisse der IC_{50}-Bestimmung für die Zelllinien-Pärchen auf statistisch signifikante Unterschiede überprüft. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in den Abbildungen 43 bis 45 graphisch dargestellt.

3.5.7.1 Untersuchung der Unterschiede in der IC_{50}-Konzentration für YM155 zwischen NT2- und NT2-R- Zellen

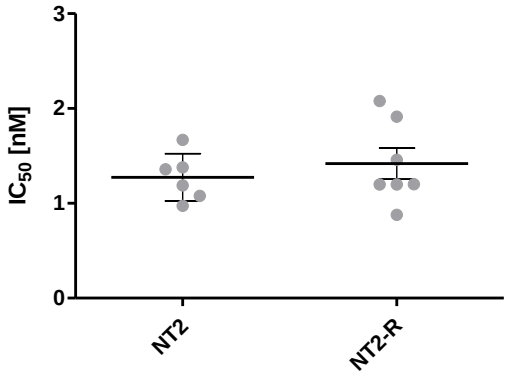


Abbildung 43: Vergleich der IC_{50}-Konzentrationen für YM155 von NT2- und NT2-R-Zellen. Aufgetragen sind die Ergebnisse von sechs unterschiedlichen Versuchsansätzen zur Bestimmung der IC_{50} in beiden Zelllinien (p = 0,4783).

Trotz der geringen Unterschiede in der IC_{50}-Konzentration für YM155 von NT2- (1,3 nM) und NT2-R-Zellen (1,7 nM), zeigten sich bei dem Vergleich keine statistisch signifikanten Unterschiede (Abbildung 43, p = 0,4873). Somit kann eine Kreuzresistenz der NT2-R-Zellen für Cisplatin und YM155 ausgeschlossen werden.

3.5.7.2 Untersuchung der Unterschiede in der IC_{50}-Konzentration für YM155 zwischen 2102Ep- und 2102Ep-R- Zellen

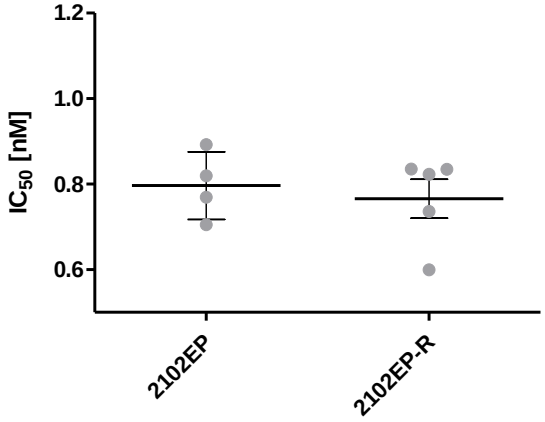


Abbildung 44: Vergleich der IC_{50}-Konzentrationen für YM155 von 2102Ep- und 2102Ep-R-Zellen. Aufgetragen sind die Ergebnisse von vier bzw. fünf unterschiedlichen Versuchsansätzen zur Bestimmung der IC_{50} in beiden Zelllinien (p = 0,6359).

Bei der Untersuchung zur IC_{50}-Bestimmung für YM155 von 2102EP- und 2102EP-R-Zellen (Abbildung 44, p = 0,6359) konnte kein Unterschied bezüglich der Sensitivität zwischen den Zelllinien festgestellt werden. Es liegt somit keine Kreuzresistenz der 2102Ep-R-Zellen zwischen Cisplatin und YM155 vor.

3.5.7.3 Untersuchung der Unterschiede in der IC_{50}-Konzentration für YM155 zwischen NCCIT- und NCCIT-R- Zellen

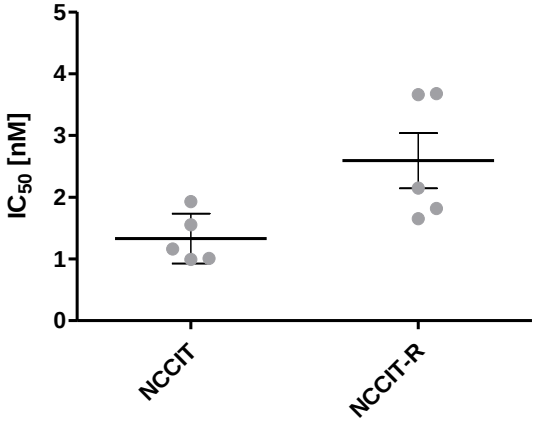


Abbildung 45: Vergleich der IC_{50}-Konzentrationen für YM155 von NCCIT- und NCCIT-R-Zellen. Aufgetragen sind die Ergebnisse von fünf unterschiedlichen Versuchsansätzen zur Bestimmung der IC_{50} in beiden Zelllinien (p = 0,0309).

Die IC_{50}-Konzentration für YM155 von den NCCIT-R-Zellen (2,6 nM) ist doppelt so hoch, wie die der NCCIT-Zellen (1,3 nM). In der Resistenz gegenüber Cisplatin unterscheiden sich die Zellen um den Faktor 3 (1,7 µM bzw. 5 µM). Ein Vergleich der IC_{50}-Konzentrationen der beiden Zelllinien für YM155 zeigt statistisch signifikante Unterschiede (Abbildung 45, p = 0,0309), was auf eine Kreuzresistenz der Cisplatin-resistenten Zellen gegenüber Cisplatin schließen lässt.

3.6 Untersuchung der Wirkungen von YM155 und Cisplatin auf die Expression von Survivin und Survivin-2B auf mRNA-Ebene in NT2- und NT2-R-Zellen mittels RT-qPCR

YM155 ist ein *small molecule inhibitor*, welcher spezifisch die Promotorregion des Survivin-Gens hemmt und somit die Bildung der mRNAs aller Isoformen von Survivin inhibiert. Cisplatin verursacht in den Zellen DNA-Schäden, die letztendlich zur Apoptose von behandelten Zellen führen. Bei der Regulation der Apoptose kann Survivin eine entscheidende Rolle spielen. Der Effekt einer Behandlung von NT2- und NT2-R-Zellen mit der jeweiligen IC_{50} für YM155 (1,3nM bzw. 1,7 nM), Cisplatin (0,4 µM bzw. 5 µM) oder einer Kombination beider Substanzen auf die Expression von Survivin und Survivin-2B in den Zelllinien wurde mittels RT-qPCR (2.2.4.5) untersucht. Die Cisplatin-resistenten NT2-R-Zellen wurden zusätzlich mit der IC_{50} für Cisplatin der Cisplatin-sensitiven NT2-Zellen, oder einer Kombination dieser und der IC_{50} für YM155

behandelt. Die Ergebnisse der Analysen für die Expression von Survivin in NT2- und NT2-R Zellen nach 48 h Inkubation sind in der Abbildung 46, und die Ergebnisse für die Expression von Survivin-2B sind in der Abbildung 47 zu sehen.

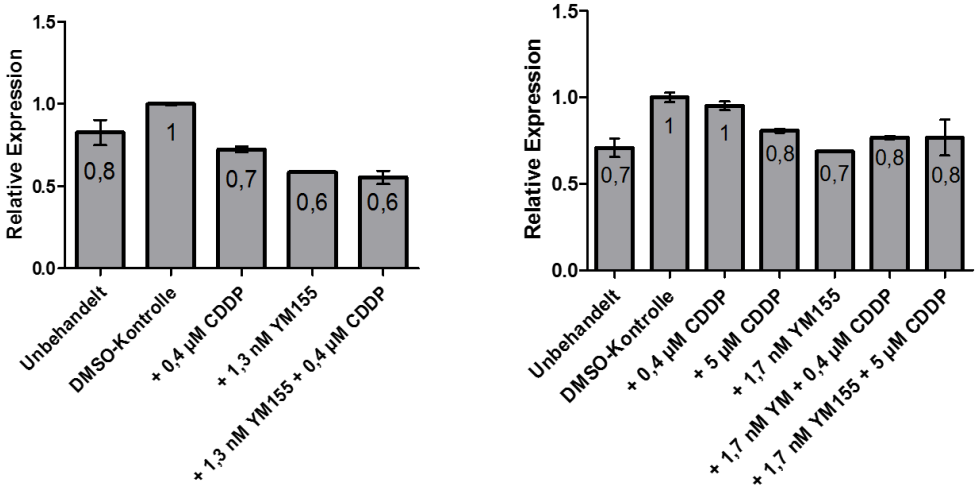


Abbildung 46: Effekt der Behandlung von NT2-Zellen (links) und NT2-R-Zellen (rechts) mit der IC_{50} für YM155, Cisplatin, oder einer Kombination beider Substanzen auf die Expression von Survivin auf mRNA-Ebene. Die CDDP-resistenten Zellen wurden zusätzlich mit der IC_{50} für Cisplatin der CDDP-sensitiven NT2-Zellen, oder einer Kombination dieser und der IC_{50} für YM155 behandelt. Da YM155 in DMSO gelöst war, wurde zusätzlich ein Ansatz mit DMSO-behandelten Zellen als Lösemittelkontrolle mitgeführt.

Die Behandlung von NT2-Zellen (Abbildung 46, links) mit dem reinen Lösemittel DMSO erhöhte die Expression von Survivin leicht im Vergleich zur unbehandelten Kontroll-Probe. Die Inkubation der Zellen mit der IC_{50} für Cisplatin (0,4 µM) führte zu einer leichten Herunterregulierung der Expression von Survivin auf 70% der Expressionsstärke der DMSO-Kontrolle. Auch eine Behandlung mit der IC_{50} für YM155 (1,3 nM) zeigte eine gewisse inhibitorische Wirkung auf die Expression der Survivin-mRNA in den Zellen und reduzierte die Expression auf 60% im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Eine kombinierte Behandlung der Zellen mit Cisplatin und YM155 zeigte keinen additiven Effekt auf die Expressionsstärke, sondern führte zu einer Verringerung der Expression von Survivin in einem vergleichbaren Ausmaß, wie die Behandlung mit YM155 alleine (60%). Auch in den NT2-R-Zellen (Abbildung 46, rechts) führte eine Behandlung mit DMSO als Lösemittelkontrolle ebenfalls zu einer leichten Erhöhung der Expressionsstärke der Survivin-mRNA im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Im Vergleich zur DMSO-Kontrolle führte die Behandlung der Zellen mit der IC_{50} der Cisplatin-sensitiven NT2-Zellen (0,4 µM) zu keiner Regulation der Expression, wohingegen die Inkubation der Zellen mit der eigentlichen IC_{50} für Cisplatin (5 µM) eine leichte Abnahme der Expressionsstärke auf 80% im Vergleich zur DMSO-Kontrolle zeigte. Eine Behandlung der Zellen mit der IC_{50} für YM155 (1,7 nM) inhibierte die Expression der Survivin-mRNA ebenfalls

leicht und führte zu einer Herunterregulierung dieser auf 70% des DMSO-Kontrollansatzes. Die kombinierten Behandlung der NT2-R-Zellen mit der IC_{50} für YM155 und den unterschiedlichen IC_{50}-Konzentrationen für Cisplatin konnten bei einer Abnahme der Expressionsstärke auf jeweils 80% der DMSO-Kontrolle keine zusätzlichen Effekte auf die Expression der mRNA für Survivin zeigen.

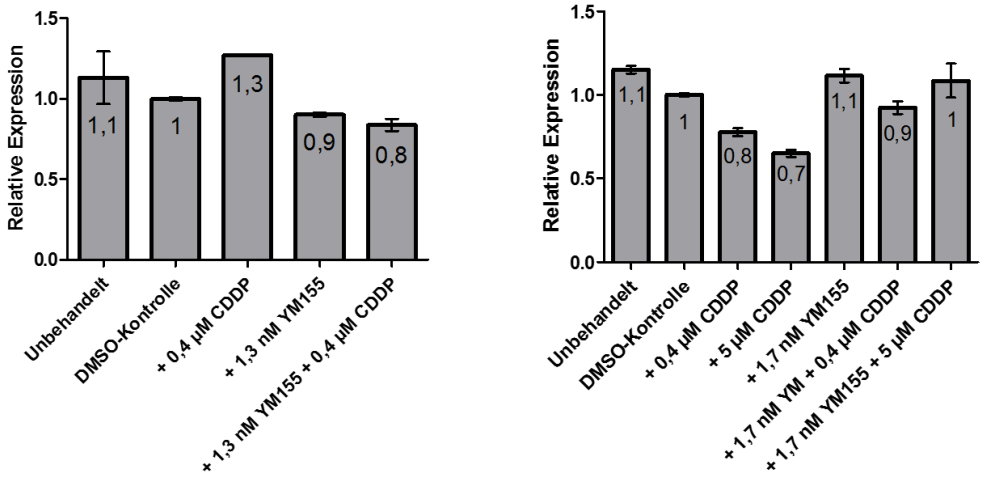


Abbildung 47: Effekt der Behandlung von NT2-Zellen (links) und NT2-R-Zellen (rechts) mit der IC_{50} für YM155, Cisplatin, oder einer Kombination beider auf die Expression der Survivin-2B-mRNA. Die CDDP-resistenten Zellen wurden zusätzlich mit der IC_{50} für Cisplatin der CDDP-sensitiven NT2-Zellen, oder einer Kombination dieser und der der IC50 für YM155 behandelt. Da YM155 in DMSO gelöst war, wurde jeweils ein Ansatz mit DMSO-behandelten Zellen als Lösemittelkontrolle mitgeführt.

Die DMSO-behandelten NT2-Zellen zeigten keinen Unterschied in der Expression der Survivin-2B-mRNA im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (Abbildung 47, links). Eine Behandlung der Zellen mit der IC_{50} für Cisplatin (0,4 µM) führte jedoch zu einer Steigerung der Expressionsstärke auf das 1,3-fache der DMSO-Kontrolle. Die Inkubation der Zellen mit der IC_{50} für YM155 (1,3 nM) konnte nur eine leichte Verringerung an Survivin-2B-mRNA in den Zellen herbeiführen (Abnahme auf 90% der DMSO-Kontrolle). Auch die kombinierte Behandlung der Zellen mit Cisplatin und YM155 reduzierte die Expressionsstärke der mRNA für Survivin-2B leicht auf 80% der DMSO-Kontrolle. Die Behandlung von NT2-R-Zellen mit DMSO als Lösemittelkontrolle (Abbildung 47, rechts) führte zu einer leichten Zunahme der Expression der Survivin-2B-mRNA um 10% im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Durch die Inkubation der Zellen mit der IC_{50} für Cisplatin der Cisplatin-sensitiven NT2-Zellen (0,4 µM) oder der eigentlichen IC_{50} (5 µM), wurde die Expressionsstärke der mRNA für Survivin-2B im Vergleich zur DMSO-Kontrolle auf 80% bzw. 70% reduziert. Die Behandlung der Zellen mit der IC_{50} für YM155 erhöhte die Expression von Survivin-2B auf RNA-Ebene leicht auf das 1,1-fache

der DMSO-Kontrolle. Die zusätzliche Behandlung der Zellen mit der IC_{50} für Cisplatin der Cisplatin-sensitiven Zellen (0,4 µM), bzw. der eigentlichen IC_{50} (5 µM) dieser Linie reduzierte die Expression der Survivin-2B-mRNA entweder auf 90% der DMSO-Kontrolle, oder zeigte keinen Einfluss auf die Expressionsstärke.

3.7 Untersuchung der Wirkungen von YM155 und Cisplatin auf die Expression von G-Survivin und Survivin-2B auf Proteinebene in NT2- und NT2-R-Zellen mittels Western Blotting

Neben der Untersuchung der Wirkung von YM155 und Cisplatin auf die Expression von Survivin und Survivin-2B auf mRNA-Ebene (3.6) sollte auch der Effekt dieser Substanzen auf die Expression der beiden Isoformen auf Proteinebene in NT2- und NT2-R-Zellen untersucht werden. Mögliche Effekte der unterschiedlichen Behandlungen wurden unter Verwendung von Antikörpern gegen G-Survivin und Survivin-2B mittels Western Blotting (2.2.3.5) aus Gesamtproteinlysat analysiert und in den Abbildungen 48 bis 53 zusammengestellt. Als interne Ladekontrolle der Proteinmenge und zur Quantifizierung der Expressionsstärke wurde GAPDH verwendet.

3.7.1 Untersuchung der Wirkung von YM155 und Cisplatin auf die Expression von G-Survivin und Survivin-2B auf Proteinebene in NT2-Zellen

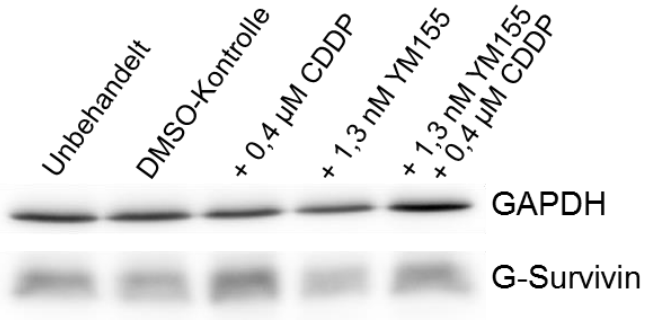


Abbildung 48: Western Blotting-Analyse des Effekts von YM155 und Cisplatin auf die Expression von G-Survivin auf Proteinebene in NT2-Zellen. Die Zellen wurden entweder mit der IC50 für YM155, Cisplatin oder einer Kombination beider Substanzen behandelt.

Die erhaltenen Signale wurden zur densitometrischen Quantifizierung der Expressionsstärke durch die Bio1D-Software eingesetzt. Die Resultate der Auswertung sind graphisch in Abbildung 50 dargestellt.

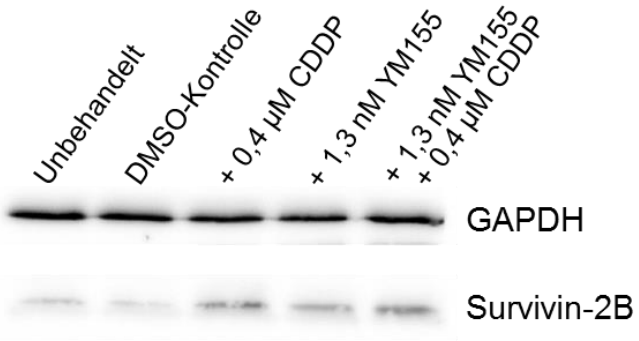


Abbildung 49: Western Blotting-Analyse des Effekts von YM155 und Cisplatin auf die Expression von Survivin-2B auf Proteinebene in NT2-Zellen. Die Zellen wurden entweder mit der IC_{50} für YM155, Cisplatin oder einer Kombination beider Substanzen behandelt.

Auch bei der Untersuchung der Expression von Survivin-2B wurde GAPDH als Ladekontrolle und als Referenz zur weiteren Auswertung verwendet. Die detektierten Signale wurden ebenfalls zur Analyse durch densitometrische Quantifizierung mit Hilfe der Bio1D-Software eingesetzt. Die Auswertung ist in Abbildung 50 zu sehen.

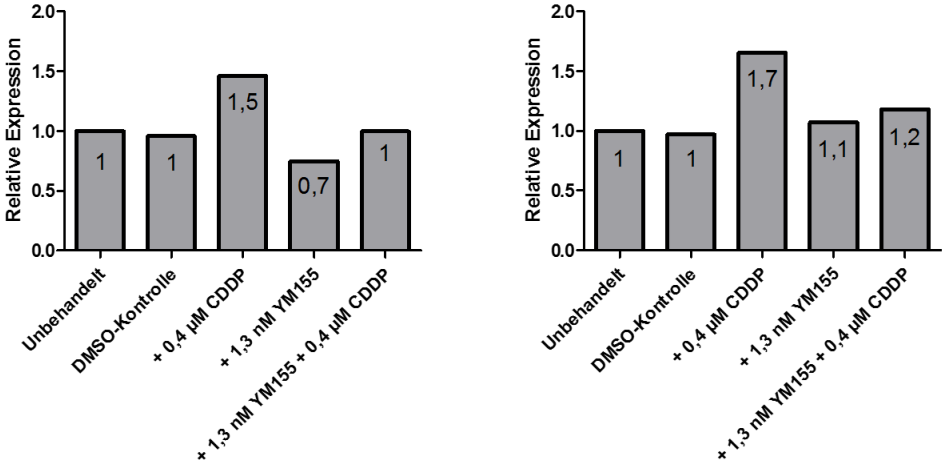


Abbildung 50: Ergebnisse der densitometrischen Quantifizierung der Expressionsstärke von G-Survivin (links) und Survivin-2B (rechts) nach einer Behandlung von NT2-Zellen mit Cisplatin, YM155 oder einer Kombination beider Substanzen.

Die Behandlung der NT2-Zellen mit DMSO als Lösemittelkontrolle zeigte keine Wirkung auf die Expression von G-Survivin (Abbildung 50, links) oder Survivin-2B (Abbildung 50, rechts) auf Proteinebene im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Nach der Behandlung der Zellen mit der

IC_{50} für Cisplatin (0,4 µM) konnte ein Anstieg der Proteinexpression auf das 1,5-fache für G-Survivin und das 1,7-fache für Survivin-2B im Vergleich zur DMSO-Kontrolle beobachtet werden. Durch die Behandlung der Zellen mit der IC_{50} für YM155 (1,3 nM) wurde die Expressionsstärke von G-Survivin im Vergleich zur DMSO-Kontrolle auf 70% reduziert und das von Survivin-2B dagegen leicht auf das 1,1-fache erhöht. Durch die kombinierte Behandlung der NT2-Zellen mit Cisplatin und YM155 in der jeweiligen IC_{50}-Konzentration wurden die gegenläufigen Effekte in der G-Survivin-Expression aufgehoben und die Expressionsstärke entsprach wieder derjenigen der DMSO-Kontrolle. Für die Expression von Survivin-2B war dieser Effekt nicht zu beobachten. Hier stieg die Expression des Proteins im Vergleich zur DMSO-Kontrolle nach der kombinierten Behandlung auf das 1,2-fache an.

3.7.2 Untersuchung der Wirkung von YM155 und Cisplatin auf die Expression von G-Survivin und Survivin-2B auf Proteinebene in NT2-R-Zellen

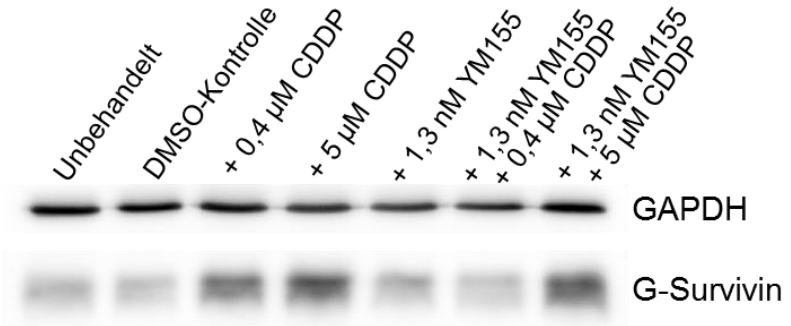


Abbildung 51: Western Blotting-Analyse des Effekts von YM155 und Cisplatin auf die Expression von G-Survivin auf Proteinebene in NT2-R-Zellen. Die Zellen wurden entweder mit der IC_{50} für Cisplatin für die CDDP-sensitiven Zellen, der eigentlichen IC_{50} für Cisplatin, der IC_{50} für YM155 oder einer Kombination dieser, und der unterschiedlichen Cisplatin-Konzentrationen behandelt.

Eine Regulation von G-Survivin in NT2-R-Zellen (Abbildung 51) nach der Behandlung der NT2-R-Zellen mit Cisplatin und YM155 war klar zu erkennen. Die Bilder der Western Blotting-Analyse für die Expression von G-Survivin wurden zur densitometrischen Auswertung mittels der Bio1D-Software verwendet, wobei die Expression von GAPDH als interne Ladekontrolle und Referenz für die Quantifizierung diente. Die Ergebnisse für die Quantifizierung sind in Abbildung 53 zu sehen.

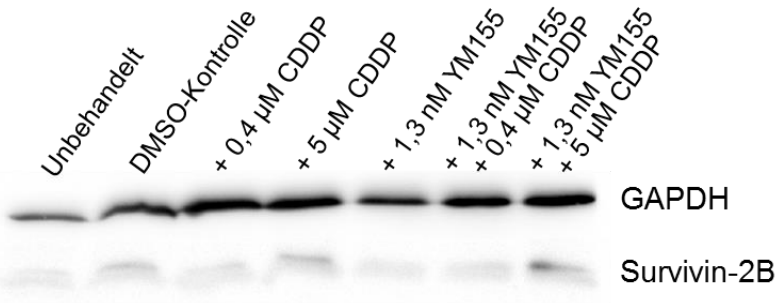


Abbildung 52: Western Blotting-Analyse des Effekts von YM155 und Cisplatin auf die Expression von Survivin-2B auf Proteinebene in NT2-R-Zellen. Die Zellen wurden entweder mit der IC_{50} für Cisplatin für die CDDP-sensitiven Zellen, der eigentlichen IC_{50} für Cisplatin, der IC_{50} für YM155 oder einer Kombination dieser, und der unterschiedlichen Cisplatin-Konzentrationen behandelt.

Auch in den NT2-R-Zellen konnte eine Regulation von Survivin-2B auf Proteinebene beobachtet werden (Abbildung 52). Die Signale der Western Blotting-Untersuchung wurden zur densitometrischen Quantifizierung mit der Bio1D-Software eingesetzt und sind in Abbildung 53 graphisch dargestellt. Die Expression von GAPDH diente hier als Referenz zur Quantifizierung und als interne Ladekontrolle.

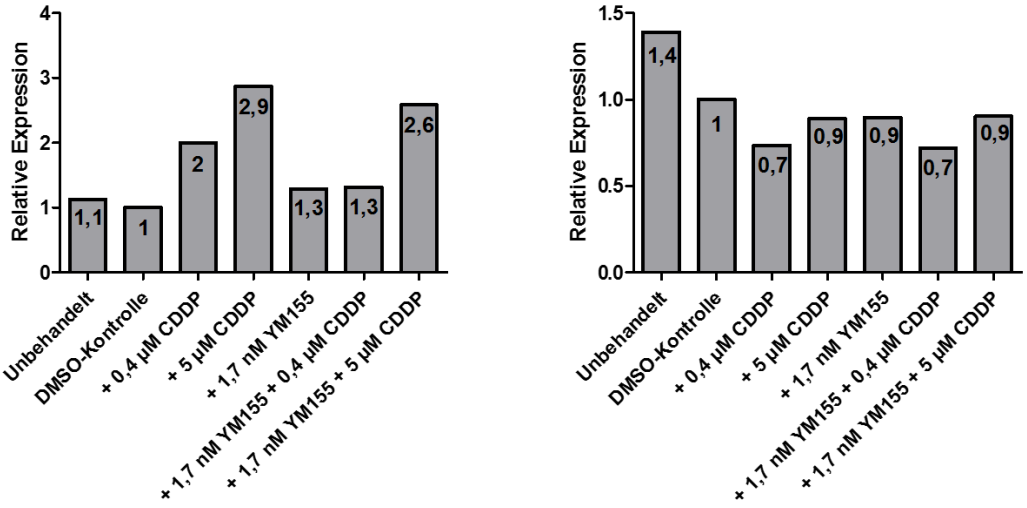


Abbildung 53: Ergebnisse der densitometrischen Quantifizierung der Expressionsstärke von G-Survivin (links) und Survivin-2B (rechts) nach einer Behandlung von NT2-R-Zellen mit Cisplatin, YM155 oder unterschiedlicher Kombinationen beider Substanzen.

Nach der Behandlung von NT2-R-Zellen mit DMSO als Lösemittelkontrolle konnte ein leichter Anstieg der Protein-Expression von G-Survivin (Abbildung 53, links) im Vergleich zu unbehandelten Zellen beobachtet werden. Die Expressionsstärke von Survivin-2B (Abbildung 53, rechts) dagegen wurde durch eine Behandlung der NT2-R-Zellen mit DMSO im Vergleich zu unbehandelten Zellen um 40% reduziert. Eine Behandlung der Zellen mit der IC_{50} für

Cisplatin der Cisplatin-sensitiven (0,4 µM) bzw. der eigentlichen IC_{50} (5 µM) erhöhte die Expression von G-Survivin auf das 2- bzw. 2,9-fache der DMSO-Kontrolle. Die Proteinexpression von Survivin-2B dagegen verringerte sich durch die genannten Behandlungen auf 70% bzw. 90% der DMSO-Kontrolle. Eine Inkubation der Zellen mit der IC_{50} für YM155 (1,7 nM) erhöhte zum einen die G-Survivin-Expression auf das 1,3-fache der DMSO-Kontrolle, reduzierte aber zum anderen die Expressionsstärke von Survivin-2B auf 90% dieser Kontrolle. In Bezug auf die Expression von G-Survivin konnte die kombinierte Behandlung der Zellen mit der IC_{50} für YM155 (1,7 nM) und der IC_{50} für Cisplatin der Cisplatin-sensitiven Zellen (0,4 µM) keinen weiteren Effekt zeigen als eine Behandlung der Zellen mit der IC_{50} für YM155 alleine. Sie zeigte die 1,3-fache Expressionsstärke der DMSO-Kontrolle. Eine Behandlung der Zellen mit der IC_{50} für YM155 in Kombination mit der eigentlichen IC_{50} dieser Zellen (5 µM) erhöhte die Expression von G-Survivin allerdings auf das 2,6-fache der DMSO-Kontrolle. Die Expression von Survivin-2B wurde durch die Behandlung von NT2-R-Zellen mit der IC_{50} für YM155 auf 90% der DMSO-Kontrolle verringert. Die zusätzliche Behandlung der Zellen mit der IC_{50} der Cisplatin-sensitiven Linie (0,4 µM) verringerte die Survivin-2B-Expression weiter auf 70% der DMSO-Kontrolle. Eine weitere Inkubation der YM155-behandelten Zellen mit der eigentlichen IC_{50} für Cisplatin (5 µM) brachte keinen zusätzlichen Effekt auf die Expression von Survivn-2B auf Proteinebene im Vergleich zur YM155-Behandlung alleine.

3.8 Untersuchung der Wirkung von YM155 und Cisplatin auf die Proliferation von Keimzelltumorzelllinien

Mittels Proliferations-Assays (2.2.1.6) wurden die Effekte einer Behandlung von Keimzelltumorzelllinien mit YM155, Cisplatin oder Kombinationen beider Substanzen untersucht. Beispielhafte Ergebnisse der Untersuchungen sind in den Abbildungen 54 bis 59 graphisch dargestellt.

3.8.1 Untersuchung der Wirkung von YM155 und Cisplatin auf die Proliferation von NT2-Zellen

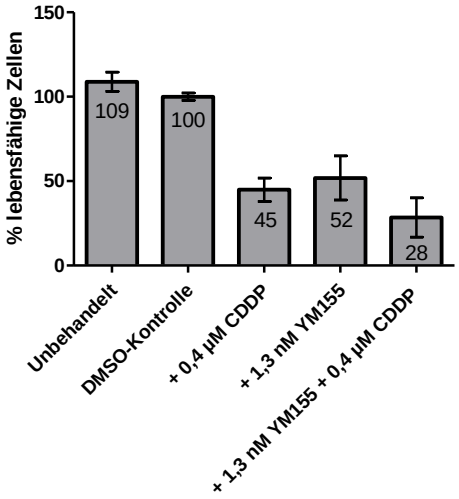


Abbildung 54: Analyse der Wirkung der Behandlung von NT2-Zellen mit Cisplatin, YM155 oder einer Kombination beider Substanzen. Wenn im Text nicht anders angegeben, zeigen alle Vergleiche statistisch signifikante Unterschiede.

Durch die Behandlung von NT2-Zellen mit DMSO als Lösemittelkontrolle verringerte sich die Anzahl an lebensfähigen Zellen um 9% im Vergleich zu unbehandelten Zellen ($p < 0,05$) (Abbildung 54). Die Behandlungen den Zellen mit der jeweiligen IC_{50} für Cisplatin (0,4 µM) oder YM155 (1,3 nM) verringerte die Anzahl an lebensfähigen Zellen erwartungsgemäß auf 45% bzw. 52% der DMSO-Kontrolle ($p < 0,05$). Die kombinierte Behandlung der Zellen mit beiden Substanzen in den entsprechenden IC_{50}-Konzentrationen konnte eine zusätzliche Abnahme der Anzahl an lebensfähigen Zellen auf insgesamt 23% der DMSO-Kontrolle bewirken ($p < 0,05$.).

3.8.2 Untersuchung der Wirkung von YM155 und Cisplatin auf die Proliferation von NT2-R-Zellen

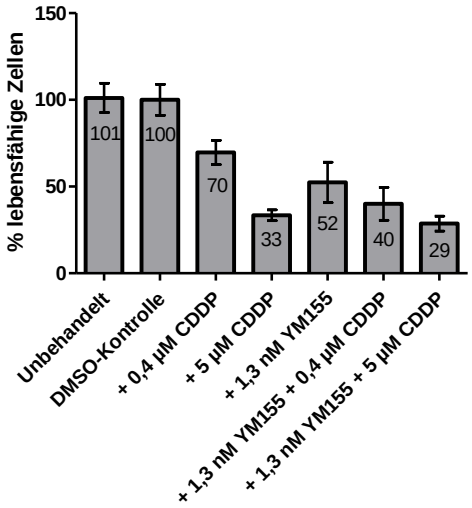


Abbildung 55: Analyse der Wirkung der Behandlung von NT2-R-Zellen mit Cisplatin, YM155 oder unterschiedlicher Kombinationen beider Substanzen. Wenn im Text nicht anders angegeben, zeigen alle Vergleiche mathematisch signifikante Unterschiede.

Die Behandlung von NT2-R-Zellen mit DMSO als Lösemittel-Kontrolle (Abbildung 55) hatte keinen Effekt auf die Proliferation der Zellen. Nach der Behandlung der Zellen mit der IC_{50} für Cisplatin für die Cisplatin-sensitiven NT2-Zellen (0,4 µM) konnte eine Abnahme der Anzahl an lebensfähigen Zellen auf 70% der DMSO-Kontrolle festgestellt werden ($p < 0,05$). Die Behandlung der NT2-R-Zellen mit der eigentlichen IC_{50} dieser Zellen für Cisplatin (5 µM) verringerte die Anzahl an lebensfähigen Zellen auf 33% der DMSO-Kontrolle ($p < 0,05$). Der Effekt der Behandlung von NT2-R-Zellen mit der IC_{50} für YM155 (1,7 nM) entsprach mit einer Abnahme der Anzahl an lebensfähigen Zellen auf 52% der DMSO-Kontrolle den Erwartungen ($p < 0,05$). Die Kombination der IC_{50} von YM155 (1,7 nM) und der IC_{50} der Cisplatin-sensitiven NT2-Zellen (0,4 µM) als Behandlung der NT2-R-Zellen verringerte die Anzahl an lebensfähigen Zellen signifikant im Vergleich zu den jeweiligen Einzelbehandlungen ($p < 0,05$). Auch die Kombination der IC_{50} für YM155 und der eigentlichen IC_{50} der NT2-R-Zellen für Cisplatin konnte die Anzahl an lebensfähigen Zellen im Vergleich zu den jeweiligen Einzelbehandlungen signifikant reduzieren ($p < 0,05$).

3.8.3 Untersuchung der Wirkung von YM155 und Cisplatin auf die Proliferation von 2102Ep-Zellen

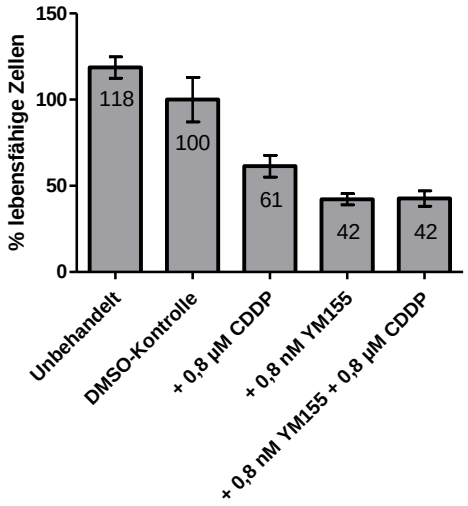


Abbildung 56: Analyse der Wirkung der Behandlung von 2102Ep-Zellen mit Cisplatin, YM155 oder einer Kombination beider Substanzen. Wenn im Text nicht anders angegeben, zeigen alle Vergleiche mathematisch signifikante Unterschiede.

Eine Behandlung von 2102Ep-Zellen mit DMSO als Lösemittelkontrolle (Abbildung 56) zeigte einen leichten antiproliferativen Effekt auf die Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Die Inkubation der Zellen mit der IC_{50} für Cisplatin (0,8 µM) konnte die Anzahl an lebensfähigen Zellen auf 61% der DMSO-Kontrolle verringern ($p < 0,05$). Durch die Behandlung der Zellen mit der IC_{50} für YM155 (0,8 nM) konnte die Anzahl der lebensfähigen Zellen auf 42% der DMSO-Kontrolle reduziert werden ($p < 0,05$). Eine kombinierte Behandlung der Zellen mit der jeweiligen IC_{50} für Cisplatin und YM155 bewirkte keinen größeren antiproliferativen Effekt, als die Behandlung der Zellen mit der IC_{50} für YM155 alleine (n. s.).

3.8.4 Untersuchung der Wirkung von YM155 und Cisplatin auf die Proliferation von 2102Ep-R-Zellen

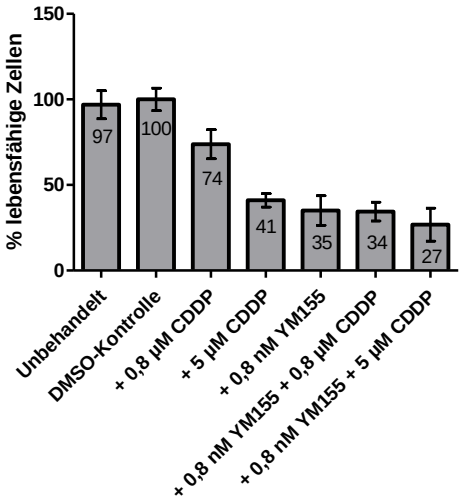


Abbildung 57: Analyse der Wirkung der Behandlung von 2012Ep-R-Zellen mit Cisplatin, YM155 oder unterschiedlicher Kombinationen beider Substanzen. Wenn im Text nicht anders angegeben, zeigen alle Vergleiche mathematisch signifikante Unterschiede.

Nach der Behandlung von 2102Ep-R-Zellen mit DMSO als Lösemittelkontrolle (Abbildung 57) waren keine Unterschiede in der Proliferation im Vergleich zu unbehandelten Zellen erkennbar. Die Inkubation der Zellen mit der IC_{50} für Cisplatin für die Cisplatin-sensitiven 2102Ep-Zellen (0,8 µM) zeigte einen geringen, gleichwohl statistisch signifikanten antiproliferativen Effekt und verringerte die Anzahl an lebensfähigen Zellen in der Probe auf 74% der DMSO-Kontrolle ($p < 0,05$). Die Effekte der Inkubation der Zellen mit der eigentlichen IC_{50} für Cisplatin (5 µM) oder der IC_{50} für YM155 waren größer und reduzierten die Anzahl an lebensfähigen Zellen auf 41%, bzw. 35% der DMSO-Kontrolle ($p < 0,05$). Im Vergleich zur Einzelbehandlung der 2102Ep-R-Zellen mit der IC_{50} für YM155, konnte weder die Kombination der IC_{50} für YM155 mit der IC_{50} für Cisplatin der Cisplatin-sensitiven Linie (0,8 µM), noch eine Kombination der IC_{50} für YM155 mit der eigentlichen IC_{50} für Cisplatin (5 µM) die Anzahl an lebensfähigen Zellen signifikant verringern.

3.8.5 Untersuchung der Wirkung von YM155 und Cisplatin auf die Proliferation von NCCIT-Zellen

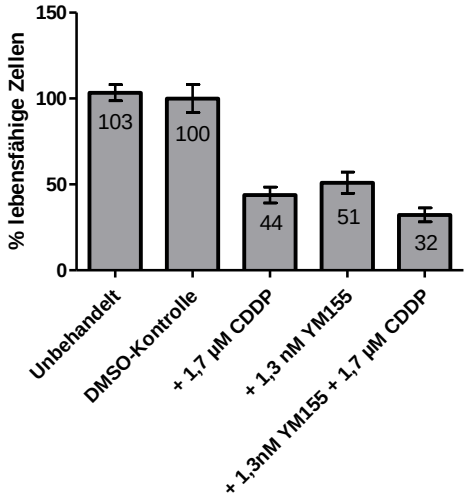


Abbildung 58: Analyse der Wirkung der Behandlung von NCCIT-Zellen mit Cisplatin, YM155 oder einer Kombination beider Substanzen. Wenn im Text nicht anders angegeben, zeigen alle Vergleiche mathematisch signifikante Unterschiede.

Die Behandlung der NCCIT-Zellen mit DMSO als Lösemittelkontrolle (Abbildung 58) hatte keinen Effekt auf die Proliferation der Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Nach der Inkubation der Zellen mit der IC_{50} für Cisplatin (1,7 µM) konnte eine Abnahme der Anzahl an lebensfähigen Zellen auf 44% der DMSO-Kontrolle beobachtet werden ($p < 0,05$). Die Behandlung der Zellen mit der IC_{50} für YM155 (1,3 nM) verringerte die Anzahl an lebensfähigen Zellen in der Probe auf 51% im Vergleich zur DMSO-Kontrolle ($p < 0,05$). Eine kombinierte Behandlung der NCCIT-Zellen mit der jeweiligen IC_{50} für Cisplatin und YM155 zeigte einen statistisch signifikanten Unterschied im Vergleich zu den Einzelbehandlungen, und reduzierte die Anzahl an lebensfähigen Zellen auf 32% der DMSO-Kontrolle ($p < 0,05$).

3.8.6 Untersuchung der Wirkung von YM155 und Cisplatin auf die Proliferation von NCCIT-R-Zellen

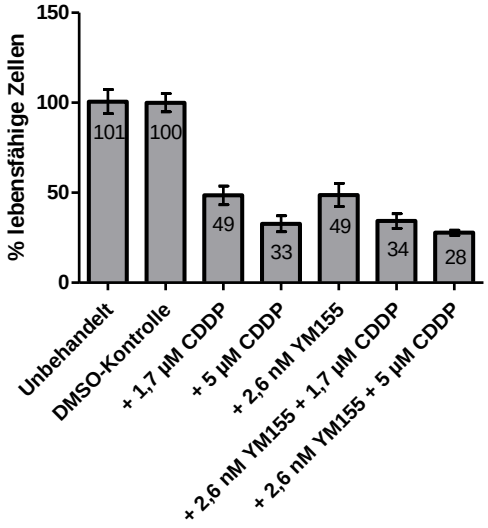


Abbildung 59: Analyse der Wirkung der Behandlung von NCCIT-R-Zellen mit Cisplatin, YM155 oder unterschiedlicher Kombinationen beider Substanzen. Wenn im Text nicht anders angegeben, zeigen alle Vergleiche mathematisch signifikante Unterschiede.

Durch die Behandlung von NCCIT-R-Zellen mit DMSO als Lösemittelkontrolle (Abbildung 59) konnte kein Effekt auf die Proliferation der Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen festgestellt werden. Die Behandlung der Zellen mit der IC_{50} für Cisplatin der Cisplatin-sensitiven (1,7 µM) oder der eigentlichen IC_{50} der NCCIT-R-Zellen (5 µM) wurden größere antiproliferative Effekte beobachtet. Die Anzahl an lebensfähigen Zellen in den Proben verringerte sich auf 49% (1,7 µM) bzw. 33% (5 µM) im Vergleich zur DMSO-Kontrolle ($p < 0,05$). Nach der Behandlung der NCCIT-R-Zellen mit der IC_{50} für YM155 (2,6 nM) reduzierte sich die Anzahl an lebensfähigen Zellen in der Probe, im Vergleich zur DMSO-Kontrolle, auf 49% ($p < 0,05$). Durch die zusätzliche Inkubation von YM155-behandelten Zellen mit der IC_{50} für Cisplatin der Cisplatin-sensitiven NCCIT-Zellen (1,7 µM) oder der eigentlichen IC_{50} der NCCIT-R-Zellen für Cisplatin (5 µM) konnte die Anzahl an lebensfähigen Zellen in den Ansätzen auf 34% bzw. 28% der DMSO-Kontrolle verringert werden. Der Vergleich der Effekte der kombinierten Behandlungen zeigte statistisch signifikante Unterschiede zur Einzelbehandlung der Zellen mit YM155 ($p < 0,05$).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass zwischen Cisplatin und YM155, einem small molecule inhibitor, nur in einer von drei Zelllinien eine gewisse Kreuzresistenz zu beobachten

war. Durch den Einsatz von YM155 konnten starke antiproliferative Effekte sowohl in den Cisplatin-sensitiven, als auch in den -resistenten KZT-Zelllinien beobachtet werden. In den Cisplatin-resistenten Zellen gelang es auch durch den Einsatz von YM155, die Resistenz gegenüber Cisplatin zu verringern und die Zellen wieder auf Cisplatin zu sensibilisieren.

3.9 Untersuchung der Wirkung von YM155 und Cisplatin auf die Fähigkeit von Keimzelltumorzelllinien Kolonien auszubilden

Die Wirkung von YM155 und Cisplatin auf die Fähigkeit von KZT-Zellen Kolonien auszubilden wurde mit Hilfe des Colony-Formation-Assays untersucht (2.2.1.8). Die Ergebnisse der Analyse sind in den Abbildungen 60 bis 65 graphisch dargestellt.

3.9.1 Untersuchung der Wirkung von YM155 und Cisplatin auf die Fähigkeit von NT2-Zellen Kolonien auszubilden

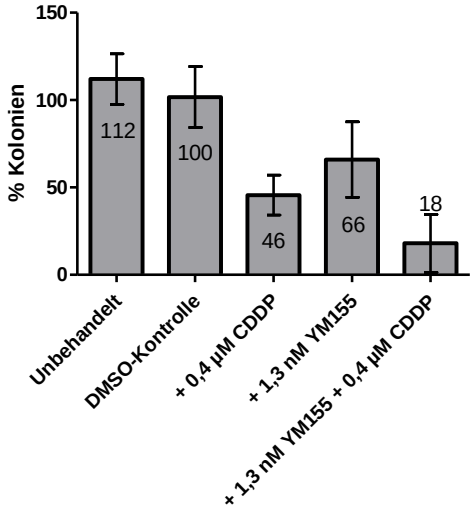


Abbildung 60: Analyse der Effekte von YM155 und Cisplatin auf die Fähigkeit von NT2-Zellen Kolonien auszubilden. Wenn im Text nicht anders angegeben, zeigten alle Vergleiche mathematisch signifikante Unterschiede.

Durch die Behandlung von NT2-Zellen mit DMSO als Lösemittelkontrolle (Abbildung 60) konnten leichte inhibitorische Effekte auf die Fähigkeit der Zellen Kolonien auszubilden festgestellt werden. Eine Behandlung der Zellen mit der IC_{50} für Cisplatin (0,4 µM) verringerte

die Anzahl an Kolonien signifikant auf 46% im Vergleich zur DMSO-Kontrolle ($p < 0,05$). Nach einer Inkubation der Zellen mit der IC_{50} für YM155 (1,3 nM) konnte eine Abnahme an gebildeten Kolonien auf 66% der DMSO-Kontrolle beobachtet werden ($p < 0,05$). Die kombinierte Behandlung der NT2-Zellen mit der jeweiligen IC_{50} für Cisplatin und YM155 verringerte die Anzahl an gebildeten Kolonien deutlich und statistisch signifikant im Vergleich zu den Einzelbehandlungen mit den beiden Substanzen ($p < 0,05$) auf nur 18% der DMSO-Kontrolle.

3.9.2 Untersuchung der Wirkung von YM155 und Cisplatin auf die Fähigkeit von NT2-R-Zellen Kolonien auszubilden

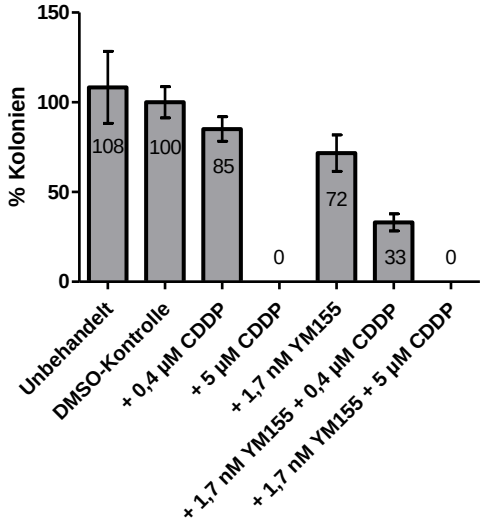


Abbildung 61: Analyse der Effekte von YM155 und Cisplatin in unterschiedlichen Konzentrationen auf die Fähigkeit von NT2-R-Zellen Kolonien auszubilden. Wenn im Text nicht anders angegeben, zeigten alle Vergleiche mathematisch signifikante Unterschiede.

Eine Behandlung von NT2-R-Zellen mit DMSO als Lösemittelkontrolle (Abbildung 61) zeigte einen leichten inhibitorischen Effekt auf die Fähigkeit der Zellen Kolonien auszubilden. Die Inkubation der Zellen mit der IC_{50} für Cisplatin für die Cisplatin-sensitiven NT2-Zellen (0,4 µM) reduzierte die Anzahl an gebildeten Kolonien statistisch signifikant auf 85% der DMSO-Kontrolle ($p < 0,05$), jedoch geringer als in Cisplatin-sensitiven NT2-Zellen (s.o.). Nach der Behandlung der NT2-R-Zellen mit der eigentlichen IC_{50} für Cisplatin (5 µM) konnte hingegen keine Koloniebildung im Ansatz festgestellt werden ($p < 0,05$). Die Behandlung der Zellen mit

der IC_{50} für YM155 reduzierte die Anzahl an gebildeten Kolonien signifikant auf 72% der DMSO-Kontrolle ($p < 0,05$). Durch die Behandlung der Zellen mit einer Kombination der IC_{50} für YM155 und der IC_{50} für Cisplatin der Cisplatin-sensitiven NT2-Zellen (0,4 µM) konnte eine Abnahme der Anzahl an gebildeten Kolonien auf 33% der DMSO-Kontrolle beobachtet werden ($p < 0,05$). Der Vergleich des Effekts dieser Kombination mit den Effekten der jeweiligen Einzelbehandlungen zeigt statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Nach der Kombinierten Behandlung der Zellen mit der IC_{50} für YM155 und der IC_{50} für Cisplatin (5 µM) konnten, wie auch schon nach der Behandlung der Zellen mit dieser Cisplatin-Konzentration alleine, keine Kolonien mehr detektiert werden. Dies lässt auf einen supralethalen Effekt der höheren Cisplatindosis im Langzeitversuch des Colony-Formation-Assays schliessen.

3.9.3 Untersuchung der Wirkung von YM155 und Cisplatin auf die Fähigkeit von 2102Ep-Zellen Kolonien auszubilden

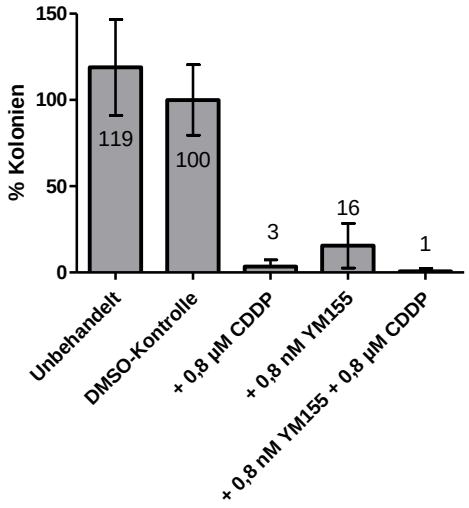


Abbildung 62: Analyse der Effekte von YM155 und Cisplatin auf die Fähigkeit von 2102Ep-Zellen Kolonien auszubilden. Wenn im Text nicht anders angegeben, zeigten alle Vergleiche mathematisch signifikante Unterschiede.

Nach der Behandlung von 2102Ep-Zellen mit DMSO als Lösemittelkontrolle (Abbildung 62) konnte ein leichter inhibitorischer Effekt auf die Fähigkeit der Zellen Kolonien auszubilden beobachtet werden. Die Inkubation der Zellen mit der IC_{50} für Cisplatin (0,8 µM) oder der IC_{50} für YM155 (0,8 nM) hatten große Effekte auf die Fähigkeit der Zellen Kolonien auszubilden und verringerte die Anzahl an gebildeten Kolonien signifikant auf 3% bzw. 16% der DMSO-

Kontrolle (jeweils $p < 0,05$). Durch die kombinierte Behandlung der Zellen mit den jeweiligen IC_{50} für Cisplatin und YM155 verringerte sich die Anzahl an gebildeten Kolonien in dem Ansatz auf 1% der DMSO-Kontrolle ($p < 0,05$). Der Vergleich der Kombinationsbehandlung mit der Einzelbehandlung der Zellen mit der IC_{50} für YM155 zeigte aufgrund der insgesamt geringen Koloniezahl jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede (n. s.).

3.9.4 Untersuchung der Wirkung von YM155 und Cisplatin auf die Fähigkeit von 2102Ep-R-Zellen Kolonien auszubilden

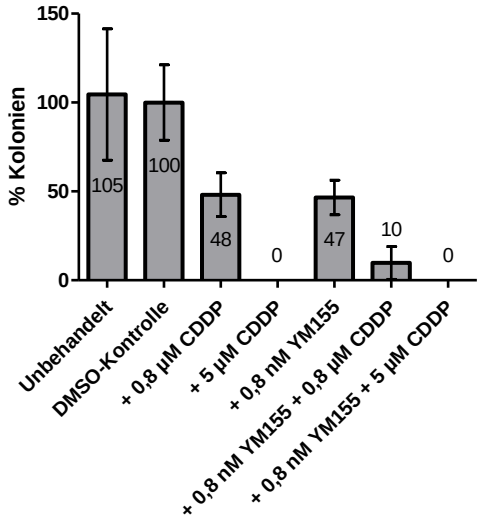


Abbildung 63: Analyse der Effekte von YM155 und Cisplatin in unterschiedlichen Konzentrationen auf die Fähigkeit von 2102EP-R-Zellen Kolonien auszubilden. Wenn im Text nicht anders angegeben, zeigten alle Vergleiche mathematisch signifikante Unterschiede.

Durch die Behandlung von 2102Ep-R-Zellen mit DMSO als Lösemittelkontrolle (Abbildung 63) konnte keine inhibitorische Wirkung auf die Fähigkeit der Zellen Kolonien auszubilden festgestellt werden. Die Inkubation der Zellen mit der IC_{50} für Cisplatin der Cisplatin-sensitiven 2102EP-Zellen (0,8 µM) konnte die Anzahl an gebildeten Kolonien zwar signifikant auf 48% der DMSO-Kontrolle reduzieren ($p < 0,05$), der Effekt war jedoch deutlich geringer als in den Cisplatin-sensitiven 2102Ep-Zellen (s.o.). Durch die Behandlung der 2102Ep-R-Zellen mit der eigentlichen IC_{50} für Cisplatin (5 µM) wurde die Fähigkeit der Zellen Kolonien auszubilden allerdings vollständig gehemmt, und es konnten keine Kolonien mehr detektiert werden ($p < 0,05$). Nach der Inkubation der Zellen mit der IC_{50} für YM155 (0,8 nM) war eine signifikante

Abnahme der Anzahl an gebildeten Kolonien auf 47% im Vergleich zur DMSO-Kontrolle zu beobachten ($p < 0,05$). Im Vergleich zu den Einzelbehandlungen konnte die Kombination dieser YM155-Konzentration mit der IC_{50} für Cisplatin der Cisplatin-sensitiven 2102EP-Zellen (0,8 µM) die Anzahl an gebildeten Kolonien signifikant auf 10% der DMSO-Kontrolle reduzieren. Nach der Behandlung der 2102Ep-R-Zellen mit einer Kombination von YM155 und Cisplatin in der jeweiligen IC_{50}-Konzentraion dieser Zelllinie konnten erwartungsgemäß keine Kolonien mehr detektiert werden.

3.9.5 Untersuchung der Wirkung von YM155 und Cisplatin auf die Fähigkeit von NCCIT-Zellen Kolonien auszubilden

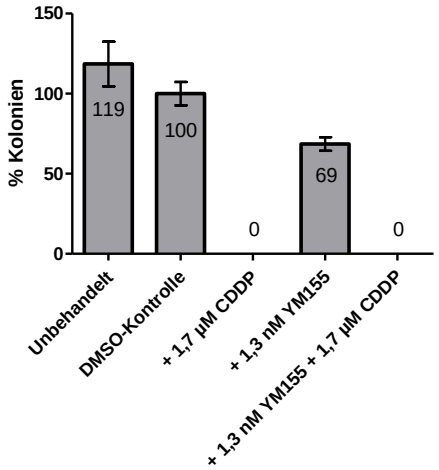


Abbildung 64: Analyse der Effekte von YM155 und Cisplatin auf die Fähigkeit von NCCIT-Zellen Kolonien auszubilden. Wenn im Text nicht anders angegeben, zeigten alle Vergleiche mathematisch signifikante Unterschiede.

Die Behandlung der NCCIT-Zellen mit DMSO als Lösemittel-Kontrolle (Abbildung 64) zeigte einen leichten inhibitorischen Effekt auf die Fähigkeit der Zellen Kolonien auszubilden. Nach der Behandlung der Zellen mit der IC_{50} für Cisplatin (1,7 µM) konnte keine Koloniebildung in dem Ansatz detektiert werden. Eine Inkubation der NCCIT-Zellen mit der IC_{50} für YM155 (1,3 nM) reduzierte die Anzahl an gebildeten Kolonien signifikant auf 69% der DMSO-Kontrolle ($p < 0,05$). Wie auch schon nach der Behandlung der Zellen mit der IC_{50} für Cisplatin alleine, konnte nach der kombinierten Behandlung der NCCIT-Zellen mit dieser Cisplatin-Konzentration und der IC_{50} für YM155 keine Koloniebildung beobachtet werden.

3.9.6 Untersuchung der Wirkung von YM155 und Cisplatin auf die Fähigkeit von NCCIT-R-Zellen Kolonien auszubilden

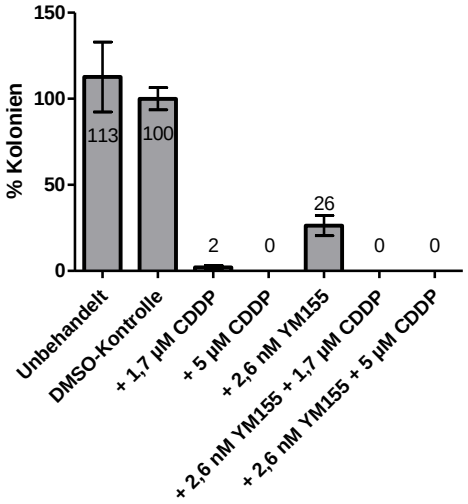


Abbildung 65: Analyse der Effekte von YM155 und Cisplatin in unterschiedlichen Konzentrationen auf die Fähigkeit von NCCIT-R-Zellen Kolonien auszubilden. Wenn im Text nicht anders angegeben, zeigten alle Vergleiche mathematisch signifikante Unterschiede.

Durch die Behandlung von NCCIT-R-Zellen mit DMSO als Lösemittelkontrolle (Abbildung 65) konnte ein leichter inhibitorische Effekt auf die Fähigkeit der Zellen Kolonien auszubilden festgestellt werden. Nach einer Inkubation der Zellen mit der IC_{50} für Cisplatin der Cisplatin-sensitiven NCCIT-Zellen (1,7 µM) wurde die Anzahl an gebildeten Kolonien auf 2% der DMSO-Kontrolle reduziert ($p < 0,05$). Die Behandlung der NCCIT-R-Zellen mit der eigentlichen IC_{50} für Cisplatin (5 µM) hemmte die Fähigkeit der Zellen Kolonien auszubilden vollständig und es war keine Koloniebildung festzustellen. Durch eine Inkubation der Zellen mit der IC_{50} für YM155 (2,6 nM) konnte die Anzahl an gebildeten Kolonien auf 26% der DMSO-Kontrolle verringert werden ($p < 0,05$). Die zusätzliche Behandlung der Zellen mit den IC_{50}-Konzentrationen der Cisplatin-sensitiven bzw. -resistenten Zelllinie inhibierte die Koloniebildung wiederum vollständig und es konnten in beiden Ansätzen keine gebildeten Kolonien detektiert werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Langzeiteffekte einer Cisplatin- und YM155-Behandlung im Colony-Formation-Assay gewisse Unterschiede zu den nach kurzzeitiger Behandlung ausgewerteten Proliferationsassays zeigen: die Wirkung von Cisplatin war meist stärker, als die YM155-Behandlung. Dennoch zeigte die Kombination der beiden Substanzen, insbesondere bei den nicht supralethalen Dosen, einen zusätzlichen inhibitorischen Effekt.

3.10 Analyse der Wirkung einer Inhibition von Survivin oder Survivin-2B alleine, oder in Kombination mit Cisplatin und YM155, auf die Zellzyklus-Verteilung von KZT-Zellen

Es wurde bereits in früheren Untersuchungen nachgewiesen, dass eine Behandlung von KZT-Zellen mit Cisplatin einen G2/M-Arrest bewirkt und Apoptose induziert (60). Mittels der Zellzyklus-Analyse durch PI-Färbung (2.2.1.9.1) sollten nicht nur die Auswirkungen einer spezifischen Inhibition von Survivin oder Survivin-2B durch RNA-Interferenz alleine, sondern auch der Effekt einer Behandlung transfizierter Zellen mit YM155, Cisplatin oder einer Kombination beider Substanzen auf die Verteilung von NT2- und NT2-R-Zellen im Zellzyklus untersucht werden. Die Ergebnisse der Zellzyklus-Analyse für NT2-Zellen sind in Abbildung 66 und die Ergebnisse für NT2-R-Zellen in Abbildung 67 zu sehen.

3.10.1 Analyse der Wirkung einer Inhibition von Survivin oder Survivin-2B alleine, oder in Kombination mit Cisplatin und YM155, auf die Zellzyklus-Verteilung von NT2-Zellen

Die Zellzyklus-Analyse für nicht-transfizierte NT2-Zellen (Abbildung 66, A) ohne zusätzliche Behandlung zeigte eine Zellpopulation von 41% in der G2/M-Phase des Zellzyklus. In der Sub-G1-Population (Apoptose/Nekrose) fanden sich 4% der untersuchten Zellen. Auch die mit DMSO als Lösemittelkontrolle behandelten Zellen zeigten diese Verteilung. Nach einer Behandlung der Zellen mit der IC_{50} für Cisplatin (0,4 µM) enthielt die Sub-G1-Population 8% der untersuchten Zellen und der Anteil an Zellen in der G2/-Phase des Zellzyklus stiegen um 10% auf 51% der Zellpopulation an. Die Inkubation der nicht-transfizierten Zellen mit der IC_{50} für YM155 (1,3 nM) hatte geringere Auswirkungen auf eine Veränderung in der Zellzyklus-Verteilung und erhöhte die Population der G2/M-Phase lediglich um 3% auf 44% und die Population der Sub-G1-Fraktion um 2% auf 6% der untersuchten Zellen, verglichen mit der DMSO-Kontrolle. Die kombinierte Behandlung der Zellen mit der jeweiligen IC_{50} für Cisplatin und YM155 erhöhte den Anteil an Zellen in der G2/M-Phase des Zellzyklus im Vergleich zur DMSO-Kontrolle um 11% auf 52% der untersuchten Zellen und bleibt somit in der Größenordnung der alleinigen Cisplatin-Behandlung. Die Sub-G1-Population stieg nach der Kombinationsbehandlung ebenfalls auf vergleichbare 9%. Damit zeigte die kombinierte Behandlung der NT2-Zellen insgesamt einen ebenso großen Effekt, wie die Behandlung der Zellen mit der IC_{50} für Cisplatin alleine.

Die mit der Kontroll-siRNA transfizierten NT2-Zellen (Abbildung 66, B) zeigten ohne zusätzliche Behandlung eine ähnliche Zellzyklus-Verteilung, wie die entsprechenden nicht-transfizierten NT2-Zellen. Es befanden sich sowohl bei den unbehandelten Zellen, als auch in dem Ansatz der mit DMSO-behandelten Zellen 43% der Zellpopulation in der G2/M-Phase des Zellzyklus. Der Anteil der Population an apoptotischen oder nekrotischen Zellen (Sub-G1) betrug 6% bei den unbehandelten Zellen und 4% im Ansatz der mit DMSO behandelten Zellen. Auch die Effekte der unterschiedlichen Behandlungen der Zellen nach der Transfektion mit der Kontroll-siRNA glichen denen, die in den nicht-transfizierten Zellen beobachtet werden konnten. Die Behandlung der Zellen mit der IC_{50} für Cisplatin (0,4 µM) bewirkte, verglichen mit der DMSO-Kontrolle, einen Anstieg der G2/M-Population von 43% auf 48% und eine Zunahme der Sub-G1Population um 7% auf insgesamt 11%. Auch in den mit der Kontroll-siRNA transfizierten Zellen hatte eine Behandlung mit der IC_{50} für YM155 (1,3 nM) nur einen sehr geringen Effekt auf die Verteilung der Zellen im Zellzyklus. Die G2/M-Population und auch die Sub-G1-Population stiegen nach der YM155-Behandlung jeweils um 2% auf 45% bzw. 6% an. Nach der kombinierten Behandlung der Zellen mit den jeweiligen IC_{50} für Cisplatin und YM155 ergab sich fast das gleiche Bild für die Zellzyklus-Verteilung, wie nach der Behandlung der Zellen mit der IC0 für Cisplatin alleine. Auch hier zeigte die Kombinationsbehandlung keinen zusätzlichen Effekt auf die Größe der G2/M- oder Sub-G1-Population der NT2-Zellen.

Die Transfektion der NT2-Zellen mit der siRNA gegen Survivin (Abbildung 66, C) erhöhten hingegen den Anteil an Zellen in der G2/M-Phase des Zellzyklus auch ohne zusätzliche Behandlung schon um 7% auf 50% verglichen mit den siK-transfizierten Zellen. Auch die Population von apoptotischen und nekrotischen Zellen stieg bereits durch die Inhibition von Survivin in den Zellen und ohne weitere Behandlung auf insgesamt 10% an. Eine zusätzliche Behandlung der Zellen mit DMSO-als Lösemittelkontrolle zeigte einen Anteil an Zellen in der G2/M-Phase von 45%, was etwas niedriger ist, als in den unbehandelten Zellen. Der Anteil an Zellen in der Sub-G1-Population der DMSO-behandelten Zellen lag mit 11% um 1% höher, als der Anteil im Ansatz der unbehandelten Zellen. Nach der Behandlung der mit der siSurvivin transfizierten Zellen mit der IC_{50} für Cisplatin (0,4 µM) stieg der Anteil an Zellen in der G2/M-Phase des Zellzyklus um deutliche 15% auf 63% an, vergleichen mit dem gleichen Ansatz der siK-transfizierten Zellen. Die Sub-G1-Population erhöhte sich nach dieser Behandlung um 1% auf 15% im Vergleich zum entsprechenden Ansatz der siK-transfizierten Zellen. Die Behandlung der Zellen mit der IC50 für YM155 (1,3 nM) hatte hingegen keinen deutlichen

Effekt auf die Verteilung der Zellen im Zellzyklus. Verglichen mit dem Ansatz der siK-transfizierten Zellen änderte der Anteil von Zellen in der G2/M-Phase von 45% auf 47% und der Anteil an apoptotischen und nekrotischen Zellen von 6% auf 9%. Die Kombinationsbehandlung der siSurvivin-transfizierten Zellen mit der IC_{50} für Cisplatin und der IC_{50} für YM155 erhöhte den Anteil der G2/M-Population auf 65% und den Anteil der Sub-G1-Population auf 12% und zeigte damit fast die gleiche Zellzyklusverteilung, wie nach der Behandlung der Zellen mit der IC_{50} für Cisplatin alleine (63% G2/M- bzw. 12% Sub-G1-Zellen).

Die Transfektion von NT2-Zellen mit der siRNA gegen Survivin-2B (Abbildung 66, D) hatte in den Ansätzen der unbehandelten und der mit DMSO behandelten Zellen nur einen geringen Effekt auf die Verteilung der Zellen im Zellzyklus, verglichen mit den entsprechenden Ansätzen der siK-transfizierten Zellen. Ohne Behandlung änderte sich der Anteil an Zellen in der G2/M-Phase von 43% auf 46% und der Anteil an Zellen der Sub-G1-Population blieb mit 6% genauso groß, wie bei den mit der Kontroll-siRNA transfizierten Zellen. Nach der Behandlung der Zellen mit DMSO stieg der Anteil der G2/M-Population, verglichen mit dem Ansatz der siK-transfizierten Zellen, um 4% auf 47% und der Anteil an Sub-G1-Zellen von 4% auf 7%. Die Behandlung der Zellen mit der IC_{50} für Cisplatin (0,4 µM) zeigte ähnlich große Effekte auf die Verteilung der Zellen im Zellzyklus, wie sie auch nach der Inhibition von Survivin und der Behandlung mit Cisplatin zu beobachten waren. Der Anteil an Zellen in der G2/M-Population stieg, im Vergleich zum entsprechenden siK-transfizierten Ansatz, von 48% auf 64% an. Die Sub-G1-Population war mit 10% in etwa gleich groß wie die entsprechende Population des siK-transfizierten Ansatzes (11%). Eine Inkubation der Zellen mit der IC_{50} für YM155 (1,3 nM) ließ, im Vergleich zur entsprechenden siK-transfizierten Probe, den Anteil an Zellen in der G2/M-Phase des Zellzyklus um 5% auf 50% ansteigen. Der Anteil an Sub-G1-Zellen lag mit 5% um 1% niedriger, als beim entsprechenden mit der Kontroll-siRNA transfizierten Ansatz. Die Kombinationsbehandlung der mit der siRNA gegen Survivin-2B transfizierten NT2-Zellen hatte einen ebenso großen Effekt wie die Behandlung dieser Zellen mit Cisplatin alleine und ließ den Anteil an Zellen in der G2/M-Phase des Zellzyklus, verglichen mit dem siK-transfizierten Ansatz, ebenfalls von 47% auf 65% ansteigen. Die Größe der Sub-G1-Population war mit einem Anteil von 10% der untersuchten Zellen mit der Sub-G1-Population der siK-tranfizierten und kombinationsbehandelten Zellen vergleichbar (12%).

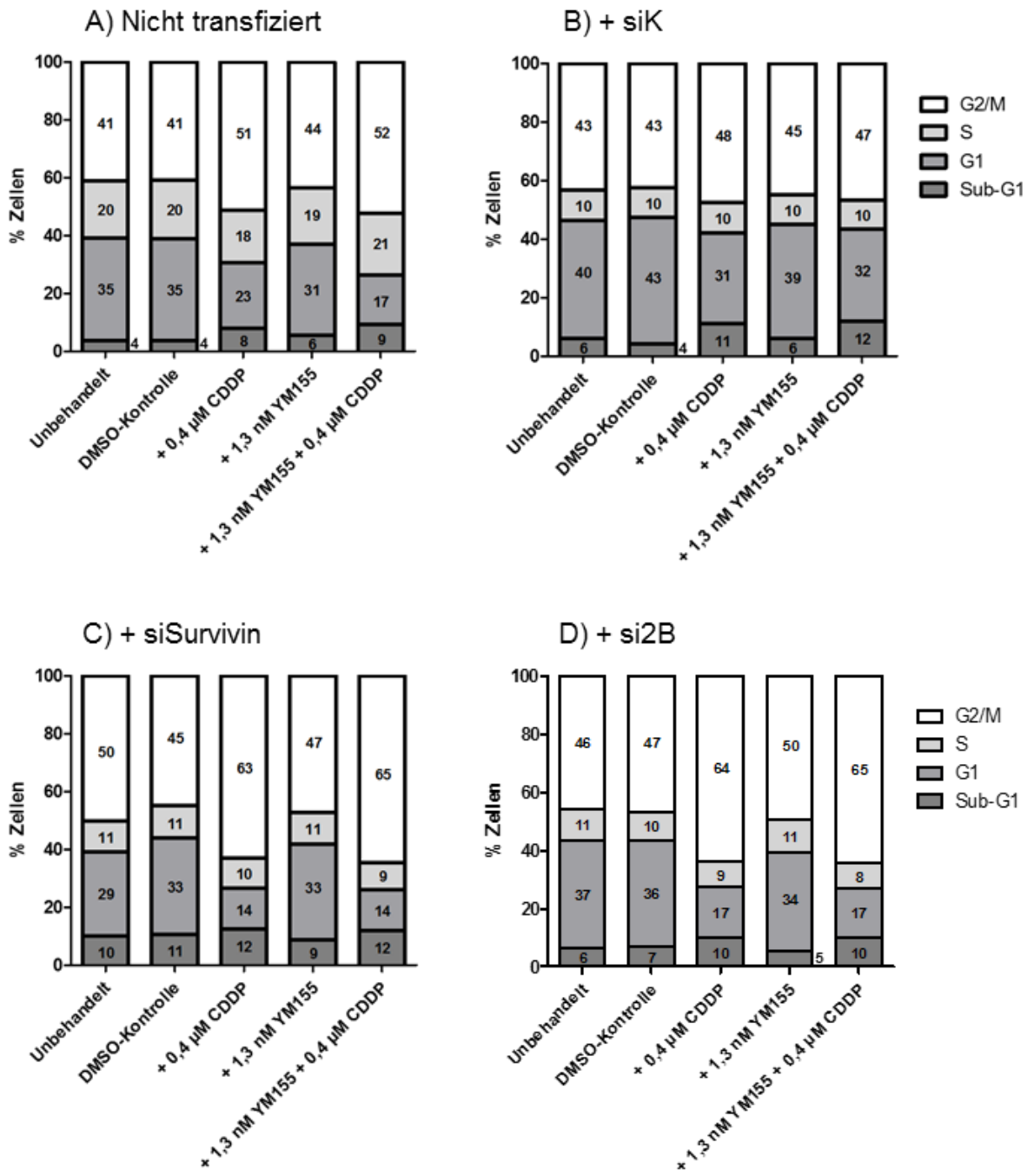


Abbildung 66: Ergebnisse der Zellzyklus-Analyse von NT2-Zellen. A) nicht transfiziert; B) mit der Kontroll-siRNA transfiziert; C) mit der siRNA gegen Survivin transfiziert; D) mit der siRNA gegen Survivin-2B transfiziert. Zusätzlich erfolgte eine Behandlung der Zellen mit DMSO als Lösemittelkontrolle, Cisplatin, YM155 oder einer Kombination beider Substanzen. Gezeigt sind die Daten eines Versuchsansatzes.

3.10.2 Analyse der Wirkung einer Inhibition von Survivin oder Survivin-2B alleine, oder in Kombination mit Cisplatin und YM155, auf die Zellzyklus-Verteilung von NT2-R-Zellen

Die nicht transfizierten NT2-R-Zellen (Abbildung 67, A) ohne zusätzliche Behandlung zeigten einen Anteil von 31% an Zellen in der G2/M-Phase des Zellzyklus und einen Anteil von 4% an apoptotischen und nekrotischen Zellen. Nach der Behandlung dieser Zellen mit DMSO änderte sich die Größe der Sub-G1-Population nicht und der Anteil an Zellen in der G2/M-Phase erhöhte sich um 2% auf 33%. Die Behandlung der nicht-transfizierten Zellen mit der IC_{50} für Cisplatin für die Cisplatin-sensitiven NT2-Zellen (0,4 µM) vergrößerte die G2/M-Population auf 43% und den Anteil an Sub-G1-Zellen auf 5%. Eine Inkubation der Zellen mit der eigentlichen IC_{50} für Cisplatin (5 µM) löste hingegen einen starken G2/M-Arrest in den Zellen aus, welcher die Population auf 73% der untersuchten Zellen ansteigen ließ. Auch der Anteil an apoptotischen und nekrotischen Zellen stieg von 5% auf 13% an. Nach der Behandlung der Zellen mit der IC_{50} für YM155 (1,7 nM) war kein Anstieg in der Größe der Sub-G1-Population zu beobachten (5%). Allerdings erhöhte sich, verglichen mit der DMSO-Kontrolle, der Anteil der Zellen im G2/M-Arrest von 33% auf 43%. Die zusätzliche Behandlung der Zellen mit der IC_{50} der Cisplatin-sensitiven NT2-Zellen (0,4 µM) ließ diese Population um weitere 8% auf 51% anwachsen. Auch der Anteil an apoptotischen und nekrotischen Zellen stieg leicht von 5% auf 8% der untersuchten Zellen an. Die Kombinationsbehandlung mit den jeweiligen IC_{50}-Konzentrationen für Cisplatin und YM155 löste keinen größeren G2/M-Arrest in den Zellen aus, als die Behandlung der Zellen mit der IC_{50} für Cisplatin alleine. Die Größe dieser Population war sogar 5% geringer, als nach der Cisplatin-Einzelbehandlung (68% im Vergleich zu 72%). Allerdings vergrößerte die Kombinationsbehandlung die Sub-G1-Population von 13% auf 19% und löste somit mehr Apoptose und Nekrose in den Zellen aus.

Eine Transfektion der NT2-R-Zellen mit der Kontroll-siRNA (Abbildung 67, B) alleine erhöhte den Anteil an Zellen in der G2/M-Phase nur geringfügig von 31% auf 36% der untersuchten Zellen. Die Größe der Sub-G1-Population blieb gegenüber den nicht-transfizierten Zellen mit 4% konstant. Eine Behandlung der siK-transfizierten Zellen mit DMSO änderte, verglichen mit den unbehandelten Zellen, den Anteil an Zellen in der G2/M-Phase nicht. Die Sub-G1-Population war mit einem Anteil von 3% ebenfalls mit der der unbehandelten Zellen vergleichbar (4%). Nach der Behandlung der Zellen mit der IC_{50} für Cisplatin für die Cisplatin-sensitiven NT2-Zellen (0,4 µM) stiegen die Anteile an Zellen in der G2/M- und der Sub-G1-

Population auf 43% bzw. 5% an und es zeigte sich damit die gleiche Zellzyklus-Verteilung, wie in dem entsprechenden nicht-transfizierten Ansatz. Eine Inkubation der siK-transfizierten Zellen mit der eigentlichen IC_{50} für Cisplatin hatte ebenfalls vergleichbare Effekte, wie die gleiche Behandlung bei den nicht-transfizierten Zellen. Die G2/M-Population stieg im Vergleich zur DMSO-Kontrolle um 25% auf 68% an und die Sub-G1-Population erhöhte sich um 11% auf 14% der untersuchten Zellen. Die Behandlung der Zellen mit der IC_{50} für YM155 (1,7 nM) hatte nur einen geringen Effekt auf die Verteilung der Zellen im Zellzyklus. Der Anteil an Zellen in der G2/M-Phase stieg um 4% auf 40% und der Anteil an apoptotischen und nekrotischen Zellen änderte sich nicht (3%). Die kombinierte Behandlung der Zellen mit der IC_{50} für Cisplatin für die Cisplatin-sensitiven NT2-Zellen (0,4 µM) und der IC_{50} für YM155 erhöhte den Anteil an Zellen in der G2/M-Phase um 11% auf 47% der untersuchten Zellen. Die Sub-G1-Population vergrößerte sich von 3% auf 6%. Eine Kombinationsbehandlung der Zellen mit der jeweiligen IC_{50} für Cisplatin und YM155 löste, so wie auch die Cisplatin-Behandlung in dieser Konzentration alleine, einen starken G2/M-Arrest in den Zellen aus. Der Anteil dieser Population betrug 71% der untersuchten Zellen. Die Größe der Sub-G1-Population war mit 13% um 1 % geringer als nach der Behandlung der Zellen mit der IC_{50} für Cisplatin alleine.

Nach der Transfektion der NT2-R-Zellen mit der siRNA gegen Survivin (Abbildung 67, C) erhöhte sich bei den unbehandelten Zellen der Anteil der G2/M-Population um 9% auf 45% der untersuchten Zellen. Die Sub-G1-Population stieg von 4% auf 7% im Vergleich zum siK-transfizierten Ansatz. Die Zellzyklus-Verteilung der DMSO-behandelten Probe war mit der der unbehandelten Zellen identisch (45% G2/M-, 7% Sub-G1-Zellen). Die Behandlung der Zellen mit der IC_{50} für Cisplatin für die Cisplatin-sensitiven Zellen (0,4 µM) erhöhte den Anteil an Zellen in der G2/M-Phase auf 53% der untersuchten Zellen im Vergleich zum siK-transfizierten Ansatz. Der Anteil an apoptotischen und nekrotischen Zellen stieg von 5% auf 8% an. Eine Inkubation der Zellen mit der eigentlichen IC_{50} für Cisplatin (5 µM) löste einen starken G2/M-Arrest in den behandelten Zellen aus. Der Anteil an Zellen in der G2/M-Phase erhöhte sich, verglichen mit dem siK-transfizierten Ansatz, nur geringfügig von 68% auf 71% der untersuchten Zellen. Die Sub-G1-Population war mit einer Größe von 13% vergleichbar mit der des siK-transfizierten Ansatzes (14%). Durch eine Behandlung der Zellen mit der IC_{50} für YM155 (1,7 nM) konnte der Anteil an Zellen in der G2/M-Phase, im Vergleich zur entsprechenden siK-transfizierten Probe, um 7% auf 47% erhöht werden. Auch der Anteil an apoptotischen und nekrotischen Zellen stieg von 3% auf 8% an. Eine kombinierte Behandlung

der NT2-R-Zellen mit der IC_{50} für Cisplatin der Cisplatin-sensitiven NT2-Zellen (0,4 µM) und der IC_{50} für YM155 (1,7 nM) ließ den Anteil an Zellen in der G2/M-Phase um 13% auf 60% im Vergleich zum siK-transfizierten Ansatz ansteigen. Auch die Sub-G1-Population wuchs von 6% auf 11% an. Die Kombinationsbehandlung der NT2-R-Zellen mit der IC_{50} für Cisplatin und der IC_{50} mit YM155 löste einen starken G2/M-Arrest in den Zellen aus (65%) und vergrößerte die Sub-G1-Population von 13% auf 19% im Vergleich zum entsprechenden, mit der Kontroll-siRNA transfizierten Ansatz.

Die Transfektion von NT2-R-Zellen mit der siRNA gegen Survivin-2B (Abbildung 67, D) erhöhte den Anteil an Zellen in der G2/M-Phase um 9% auf 43% im Vergleich zum unbehandelten, siK-transfizierten Ansatz. Der Anteil an apoptotischen und nekrotischen Zellen verringerte sich nur um 1% auf 3% der untersuchten Zellen. Eine Behandlung der transfizierten Zellen mit DMSO als Lösemittelkontrolle zeigte keinen wirklichen Effekt auf die Verteilung der Zellen im Zellzyklus im Vergleich zur unbehandelten Probe. 40% der untersuchten Zellen befanden sich in der G/M-Phase und 3% der Zellen waren apoptotisch oder nekrotisch. Die Behandlung der Zellen mit der IC_{50} für Cisplatin der Cisplatin-sensitiven NT2-Zellen (0,4 µM) ließ den Anteil an Zellen in der G2/M-Phase um 9% auf 49% und den Anteil an apoptotischen und nekrotischen Zellen von 3% auf 5% ansteigen. Eine Inkubation der Zellen mit der eigentlichen IC_{50} (5 µM) vergrößerte die G2/M-Population auf 68%, was mit der Größe der G2/M-Population des siK-transfizierten Ansatzes identisch ist. Auch die Größe der Sub-G1-Population war mit 12% zu 14% vergleichbar. Die Behandlung der Zellen mit der IC_{50} für YM155 (1,7 nM) vergrößerte die Sub-G1-Population im Vergleich zum entsprechenden siK-transfizierten Ansatz nicht (3%). Allerdings befanden sich nach der Behandlung mit 51% der untersuchten Zellen, 11% mehr in der G2/M-Phase des Zellzyklus, als bei der entsprechenden mit der Kontroll-siRNA transfizierten Probe. Die kombinierte Behandlung der Zellen mit der IC_{50} für Cisplatin der Cisplatin-sensitiven NT2-Zellen und der IC_{50} für YM155 löste einen G2/M-Arrest in den Zellen aus. Nach der Behandlung fanden sich 61% der untersuchten Zellen in der G2/M-Phase des Zellzyklus. Die Größe der Sub-G1-Population war mit 5% mit der der entsprechenden, siK-transfizierten Probe (6%) vergleichbar. Die Kombinationsbehandlung mit den jeweiligen IC_{50}-Konzentrationen für Cisplatin und YM155 löste, verglichen mit dem entsprechenden siK-transfizierten Ansatz, sowohl etwas weniger G2/M-Arrest (66% zu 71%), als auch Apoptose oder Nekrose (11% zu 13%) in den behandelten Zellen aus.

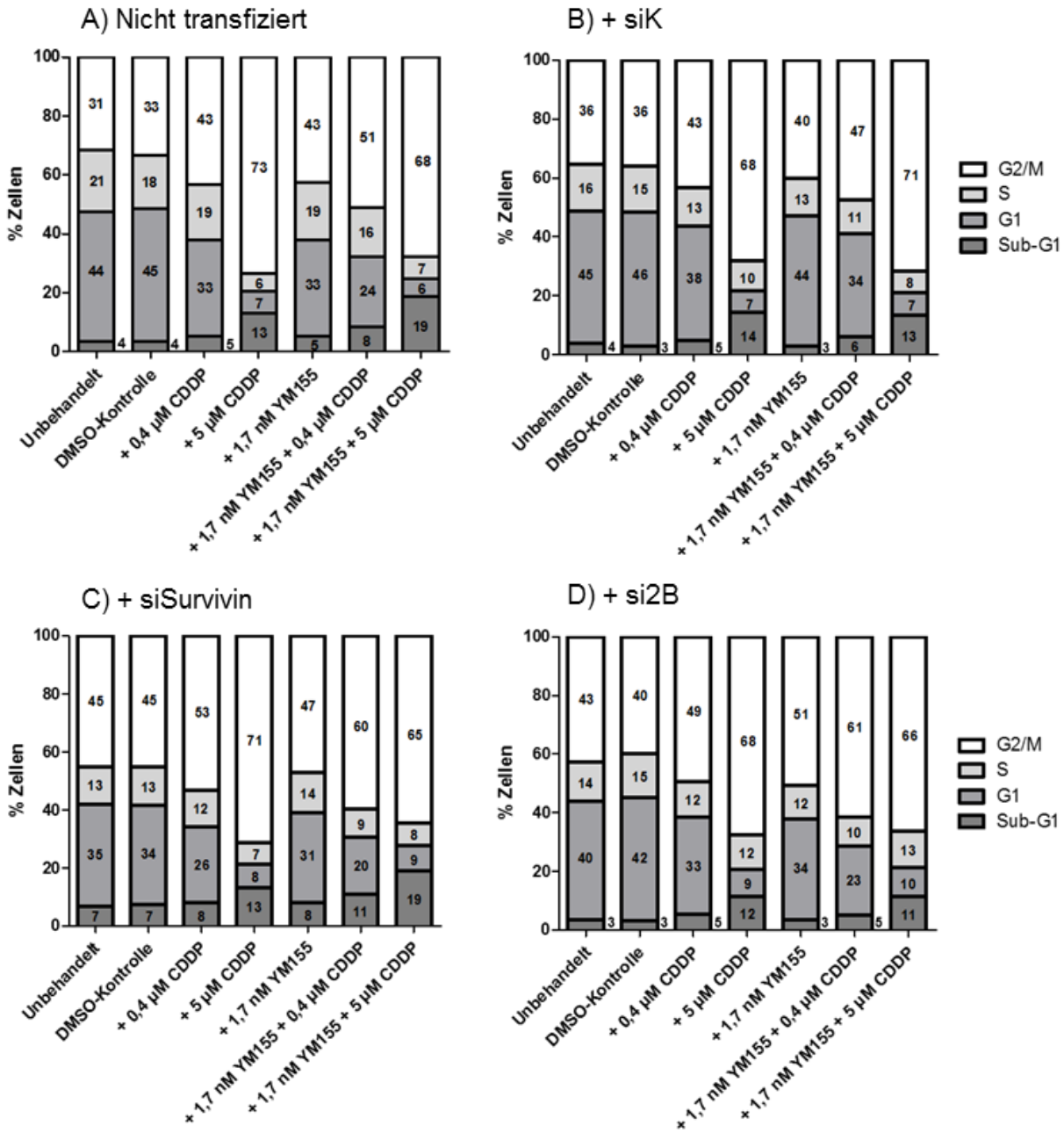


Abbildung 67: Ergebnisse der Zellzyklus-Analyse von NT2-R-Zellen. A) nicht transfiziert; B) mit der Kontroll-siRNA transfiziert; C) mit der siRNA gegen Survivin transfiziert; D) mit der siRNA gegen Survivin-2B transfiziert. Zusätzlich erfolgte eine Behandlung der Zellen mit DMSO als Lösemittelkontrolle, Cisplatin, YM155 oder einer Kombination beider Substanzen in unterschiedlichen Konzentrationen. Gezeigt sind die Daten eines Versuchsansatzes.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass durch Cisplatin ein G2/M-Arrest induziert wurde, welcher in den Cisplatin-resistenten NT2-R-Zellen dosisabhängig war. Die Behandlung beider Zelllinien mit siRNA gegen Survivin und in geringerem Maße gegen Survivin-2B löste ebenfalls einen G2/M-Arrest aus. Die Kombination der siRNAs mit Cisplatin erhöhte die Apoptoserate in den Zellen, wobei der Effekt der siRNA gegen Survivin-2B erneut etwas schwächer war als der Effekt der siRNA gegen Survivin. Der Effekt von YM155 alleine auf den

Zellzyklus und die Apoptose war gering, dabei hinsichtlich der Induktion eines G2/M-Arrests tendenziell etwas stärker in den Cisplatin-resistenten NT2-R-Zellen, und brachte in Kombination kaum zusätzliche Effekte, weder zu den siRNAs, noch zu Cisplatin.

3.11 Analyse der Wirkung einer Inhibition von Survivin oder Survivin-2B alleine, oder in Kombination mit Cisplatin und YM155, auf die Apoptose-Induktion in KZT-Zellen

Die Induktion von Apoptose in KZT-Zellen wurde mittels einer Doppelfärbung behandelter Zellen mit PI und Annexin V-FITC und anschließender durchflusszytometrischer Analyse (2.2.1.9.2) untersucht. Hierzu wurden NT2- oder NT2-R-Zellen entweder mit der Kontroll-siRNA, der siRNA gegen Survivin oder der siRNA gegen Survivin-2B transfiziert und zusätzlich mit YM155 und Cisplatin in unterschiedlichen Konzentrationen behandelt. Ein Kontroll-Ansatz mit nicht-transfizierten Zellen und gleichem Behandlungsschema wurde ebenfalls durchgeführt. Als Positivkontrolle für eine starke Apoptose-Induktion in den Zellen wurde jeweils ein Ansatz mit Anisomycin-behandelten Zellen mitgeführt. Die Ergebnisse für die Bestimmung des prozentualen Anteils an Zellen die sich in der frühen und späten Apoptose befanden sind für NT2-Zellen in Abbildung 68, und für NT2-R-Zellen in Abbildung 69 zu sehen.

3.11.1 Analyse der Wirkung einer Inhibition von Survivin oder Survivin-2B alleine, oder in Kombination mit Cisplatin und YM155, auf die Apoptose-Induktion in NT2-Zellen

In den nicht-transfizierten NT2-Zellen (Abbildung 68, A) ohne weitere Behandlung war eine apoptotische Zellpopulation von 3% der untersuchten Zellen zu beobachten. Durch die Behandlung mit DMSO als Lösemittelkontrolle wuchs diese Population um 2% auf 5% apoptotische Zellen insgesamt. Auch nach einer Behandlung der NT2-Zellen mit der IC_{50} für Cisplatin (0,4 µM) befanden sich 5% der untersuchten Zellen in Apoptose. Durch die Inkubation der Zellen mit der IC_{50} für YM155 (1,3 nM) stieg, verglichen mit der DMSO-Kontrolle, die apoptotische Population um 3% auf insgesamt 8% der untersuchten Zellen an. Nach der Kombinationsbehandlung der Zellen mit der jeweiligen IC_{50} für Cisplatin und YM155 konnte der Anteil an apoptotischen Zellen auf insgesamt 13% der untersuchten Zellen erhöht werden. Durch die Behandlung der NT2-Zellen mit Anisomycin (1 µM) als Positivkontrolle befanden sich 75% der untersuchten Zellen in Apoptose.

Die Transfektion von NT2-Zellen mit der Kontroll-siRNA (Abbildung 68, B) hatte keinen Effekt auf die Größe der apoptotischen Population der Zellen. Der Anteil an apoptotischen Zellen in der unbehandelten Probe war mit 3% genauso groß, wie in der entsprechenden Probe der nicht-transfizierten Zellen. Auch die Effekte aller weiteren Behandlungen der siK-transfizierten Zellen entsprachen den Ergebnissen der nicht-transfizierten Zellen. Eine Inkubation der Zellen mit DMSO als Lösemittelkontrolle erhöhte die apoptotische Population der Zellen auf 4%. Eine Behandlung mit der IC_{50} für Cisplatin (0,4 µM) löste in 5% der Zellen Apoptose aus. Die Behandlung mit der IC_{50} für YM155 (1,3 nM) brachte 8% der Zellen in Apoptose. Eine Kombinationsbehandlung der Zellen mit Cisplatin und YM155 in der jeweiligen IC_{50}-Konzentration erhöhte die apoptotische Population auf insgesamt 12% der untersuchten Zellen. Nach einer Inkubation der Zellen mit Anisomycin (1 µM) befanden sich 63% der untersuchten Zellen in Apoptose.

Nach einer Transfektion von NT2-Zellen mit der siRNA gegen Survivin (Abbildung 68, C) und ohne weitere Behandlung stieg, verglichen mit dem entsprechenden siK-transfizierten Ansatz, die apoptotische Population um 5% auf insgesamt 8% der untersuchten Zellen an. Auch der Anteil an apoptotischen Zellen in der DMSO-Kontrolle erhöhte sich um 2% auf 6%, im Vergleich mit der entsprechenden siK-transfizierten Probe. Nach der Behandlung der Zellen mit der IC_{50} für Cisplatin (0,4 µM) war ein deutlicher Anstieg der apoptotischen Population um 14% auf insgesamt 19% festzustellen. Durch die Inkubation der Zellen mit der IC_{50} für YM155 stieg der Anteil an apoptotischen Zellen in der Probe auf 15% an, was einem Zuwachs von 7% im Vergleich zum entsprechenden Ansatz der siK-transfizierten Zellen entspricht. Die kombinierte Behandlung der Zellen mit der jeweiligen IC_{50} für Cisplatin und YM155 konnte insgesamt 33% der untersuchten Zellen in Apoptose bringen. Das sind 21% mehr apoptotische Zellen als in dem entsprechenden siK-transfizierten Ansatz. Durch die Inkubation der Zellen mit Anisomycin (1 µM) konnte in insgesamt 66% der untersuchten Zellpopulation Apoptose ausgelöst werden.

Die Transfektion von NT2-Zellen mit der siRNA gegen Survivin 2B (Abbildung 68, D) alleine konnte nicht mehr Zellen in Apoptose bringen, als die Transfektion dieser Zellen mit der Kontroll-siRNA (2% bzw. 3%). Auch nach einer Behandlung der Zellen mit DMSO als Lösemittelkontrolle entsprach die Größe der apoptotischen Zellpopulation derjenigen der entsprechenden siK-transfizierten Probe 5% bzw 4%). Durch die Behandlung der Zellen mit

der IC_{50} für Cisplatin (0,4 µM) stieg der Anteil an apoptotischen Zellen in der Probe auf 11% an, was eine Steigerung von 6% im Vergleich zum entsprechenden siK-transfizierten Ansatz bedeutet. Eine Inkubation der Zellen mit der IC_{50} für YM155 brachte 6% der Zellen in Apoptose, was 2% weniger apoptotische Zellen, als in der entsprechenden mit der Kontroll-siRNA transfizierten Probe bedeutet. Auch die Kombinationsbehandlung der NT2-Zellen mit der jeweiligen IC_{50} für Cisplatin und YM155 zeigte weniger Effekt in der mit der si2B-transfizierten Probe, als in der entsprechenden Probe des siK-transfizierten Ansatzes. Die Inkubation der Zellen mit Anisomycin löste in 54% der untersuchten Zellen Apoptose aus.

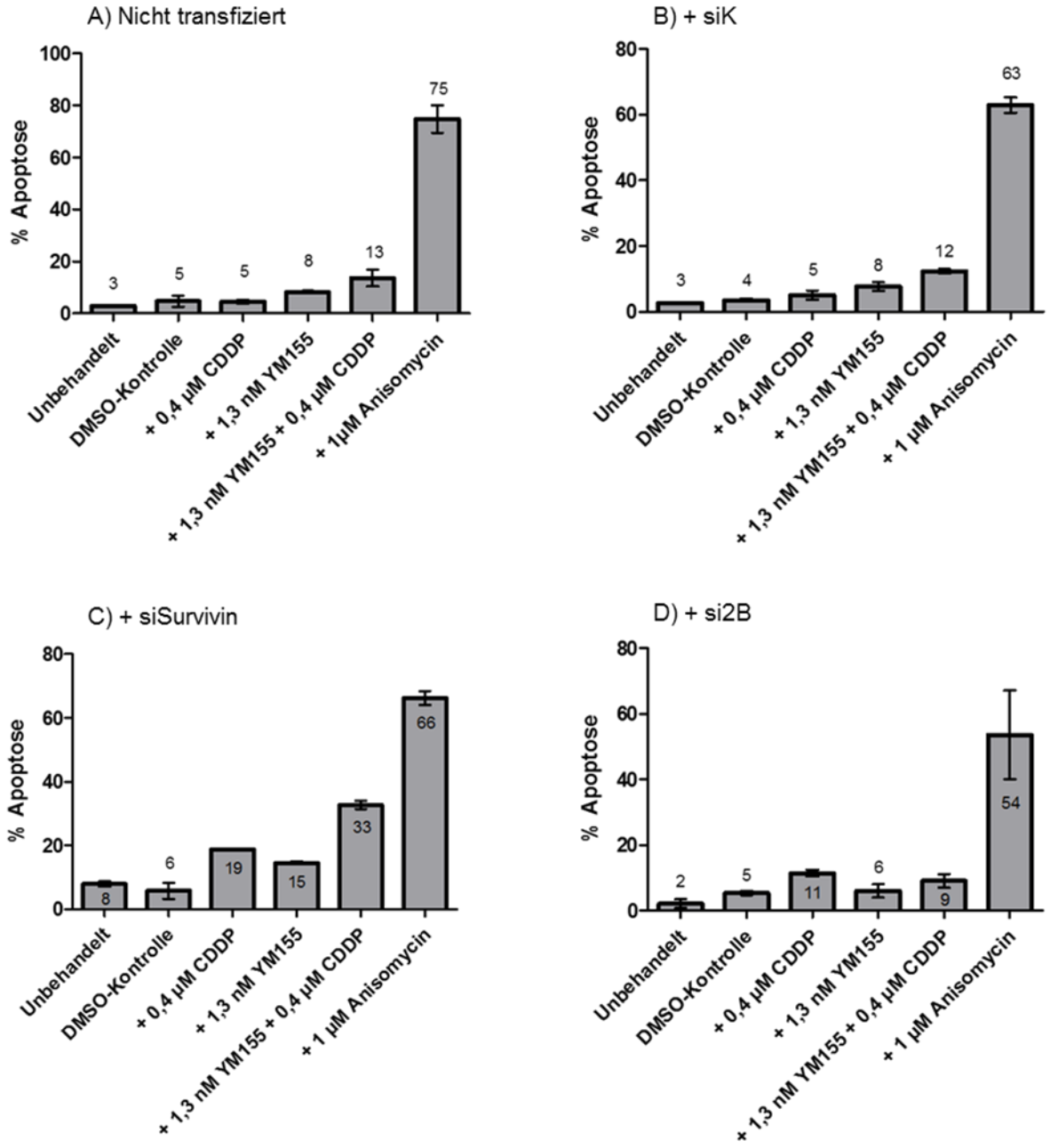


Abbildung 68: Ergebnisse der Untersuchung der Apoptose-Induktion in NT2-Zellen. A) nicht transfiziert; B) mit der Kontroll-siRNA transfiziert; C) mit der siRNA gegen Survivin transfiziert; D) mit der siRNA gegen Survivin-2B transfiziert. Zusätzlich erfolgte eine Behandlung der Zellen mit DMSO als Lösemittelkontrolle, Anisomycin als Positivkontrolle, Cisplatin, YM155 oder einer Kombination beider Substanzen. Gezeigt sind die Daten eines Versuchsansatzes (Duplikate).

3.11.2 Analyse der Wirkung einer Inhibition von Survivin oder Survivin-2B alleine, oder in Kombination mit Cisplatin und YM155, auf die Apoptose-Induktion in NT2-R-Zellen

In dem Ansatz der nicht-transfizierten NT2-R-Zellen (Abbildung 69, A) war ohne weitere Behandlung ein Anteil von 4% apoptotischen Zellen zu beobachten. Nach einer Behandlung der Zellen mit DMSO als Lösemittelkontrolle waren 2% der untersuchten Zellen apoptotisch. Die Inkubation der NT2-R-Zellen mit der IC_{50} für Cisplatin der Cisplatin-sensitiven NT2-Zellen (0,4 µM) erhöhte den Anteil an apoptotischen Zellen um 6% auf insgesamt 8% der untersuchten Zellen, im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Die Behandlung der Zellen mit der eigentlichen IC_{50} für Cisplatin für diese Zelllinie (5 µM) steigerte den Prozentsatz an apoptotischen Zellen auf 17%. Nach der Inkubation der Zellen mit der IC_{50} für YM155 (1,7 nM) war ein Anteil von 12% der untersuchten Zellen apoptotisch. Die kombinierte Behandlung der Zellen mit der IC_{50} für Cisplatin der Cisplatin-sensitiven NT2-Zellen (0,4 µM) und der IC_{50} für YM155 zeigte sich ein Anteil von 18% der untersuchten Zellen apoptotisch. Durch eine Kombinationsbehandlung der Zellen mit der jeweiligen IC_{50} für Cisplatin und YM155 stieg die apoptotische Zellpopulation auf 37% der untersuchten Zellen an. Die Behandlung der Zellen mit Anisomycin als Positivkontrolle löste in 45% der Zellen Apoptose aus.

Nach der Transfektion der NT2-R-Zellen mit der Kontroll-siRNA (Abbildung 69, B) waren in Bezug auf die Induktion von Apoptose ähnliche Ergebnisse nach den unterschiedlichen Behandlungen zu beobachten. In dem Ansatz ohne eine weitere Behandlung und dem DMSO-behandelten Kontroll-Ansatz war jeweils ein Anteil von 5% der untersuchten Zellen apoptotisch. Durch die Behandlung der Zellen mit der IC_{50} für Cisplatin der Cisplatin-sensitiven NT2-Zellen (0,4 µM) stieg der Anteil an apoptotischen Zellen auf 8% an, was dem Ergebnis der gleichen Behandlung in den nicht-transfizierten Zellen entsprach. Die Behandlung der Zellen mit der eigentlichen IC_{50} für Cisplatin (5 µM) erhöhte den Anteil an apoptotischen Zellen in dem Ansatz auf 23%, was im Vergleich zu dem entsprechenden Ansatz der nicht-transfizierten Zellen, eine Zunahme um 5% bedeutet. Eine Inkubation der Zellen mit der IC_{50} für YM155 (1,7 nM) löste in 8% der Zellen Apoptose aus, was etwas niedriger ist als der Anteil an apoptotischen Zellen in dem entsprechenden Ansatz der nicht-transfizierten Zellen (12%). Das Ergebnis der kombinierten Behandlung der Zellen mit der IC_{50} für Cisplatin der Cisplatin-sensitiven NT2-Zellen (0,4 µM) und der IC_{50} für YM155 entsprach mit 17% apoptotischen Zellen dem Ergebnis derselben Behandlung bei nicht-transfizierten Zellen (18%). Die

Kombinationsbehandlung der Zellen mit den jeweiligen IC_{50}-Konzentrationen für Cisplatin und YM155 hatte, mit einem Anteil von 37% apoptotischen Zellen, ebenfalls den gleichen Effekt, wie die gleiche Behandlung bei nicht-transfizierten Zellen (37%). Nach der Inkubation der Zellen mit Anisomycin als Positivkontrolle war ein Anteil von 42% der untersuchten Zellen apoptotisch, was ebenfalls mit dem Ergebnis des entsprechenden Ansatzes bei nicht-transfizierten vergleichbar war (45%).

Nach der Transfektion der NT2-R-Zellen mit der siRNA gegen Survivin (Abbildung 69, C) waren sowohl in dem Ansatz mit unbehandelten Zellen, als auch in dem mit DMSO als Lösemittelkontrolle behandelten Ansatz jeweils 4% der untersuchten Zellen apoptotisch. Die Behandlung der Zellen mit der IC_{50} für Cisplatin für die Cisplatin-sensitiven NT2-Zellen steigerte die apoptotische Zellpopulation auf einen Anteil von 9%, was mit dem Ergebnis der entsprechenden Probe der siK-transfizierten Zellen vergleichbar war. Eine Inkubation der Zellen mit der eigentlichen IC_{50} für Cisplatin dieser Zelllinie (5 µM) erhöhte den Anteil an apoptotischen Zellen auf 31%, was im Vergleich zum entsprechenden Ansatz der siK-transfizierten Zellen eine Steigerung um 8% bedeutet. Nach der Behandlung der Zellen mit der IC_{50} für YM155 (1,7 nM) war ein Anteil von 11% der untersuchten Zellen apoptotisch, was zwischen dem Ergebnis des entsprechenden Ansatzes bei siK-transfizierten, und dem Ergebnis des gleichen Ansatzes bei den nicht-transfizierten Zellen lag. Die zusätzliche Behandlung der Zellen mit der IC_{50} der Cisplatin-sensitiven Zelllinie steigerte den Anteil an apoptotischen Zellen in der Probe um 2% auf 13%. Die Kombinationsbehandlung der Zellen mit der jeweiligen IC_{50} für Cisplatin und YM155, war mit einem Ergebnis von 31% apoptotischen Zellen genauso wirksam, wie die Behandlung der Zellen mit der IC_{50} für Cisplatin alleine. Die Inkubation der Zellen mit Anisomycin als Positivkontrolle löste in 45% der Zellen Apoptose aus, was dem Ergebnis des gleichen Ansatzes der siK-transfizierten Zellen entsprach.

Die Transfektion von NT2-R-Zellen mit der siRNA gegen Survivin-2B (Abbildung 69, D) hatte weder ohne weitere Behandlung der Zellen, noch in Kombination mit der Behandlung der Zellen mit DMSO einen Effekt auf den Anteil an apoptotischen Zellen. In beiden Ansätzen waren 3% der untersuchten Zellen apoptotisch, was sogar 2% unter dem Ergebnis der entsprechenden siK-transfizierten Ansätze lag. Die Behandlung der Zellen mit der IC_{50} für Cisplatin für die Cisplatin-sensitive Zelllinie löste in 5% der Zellen Apoptose aus. Im Vergleich zu dem gleichen Ansatz der siK-transfizierten Zellen befanden sich 3% weniger Zellen in

Apoptose. Auch die Behandlung der Zellen mit der eigentlichen IC_{50} für Cisplatin für diese Zelllinie hatte einen geringeren Effekt auf die Zellen, verglichen mit dem entsprechenden Ansatz der siK-transfizierten Zellen. Mit einem Anteil von 13% apoptotischer Zellen nach dieser Behandlung lag das Ergebnis 10% unter dem des siK-transfizierten Ansatzes (23%). Nach der Behandlung der Zellen mit der IC_{50} für YM155 waren mit einem Anteil von 6% ebenfalls weniger Zellen apoptotisch, als in dem entsprechenden siK-transfizierten Ansatz (8%). Das Ergebnis der kombinierten Behandlung der Zellen mit der IC_{50} für Cisplatin für die Cisplatin-sensitiven NT2-Zellen (0,4 µM) und der IC_{50} für YM155 lag mit einer apoptotischen Zellpopulation von 8% ebenfalls unterhalb des Ergebnisses des entsprechenden Ansatzes der mit der Kontroll-siRNA transfizierten Zellen. Es waren 9% weniger apoptotische Zellen nach der Transfektion der Zellen und der kombinierten Behandlung festzustellen. Auch in der mit der Kombinationsbehandlung aus der IC_{50} für Cisplatin und der IC_{50} für YM155 behandelten Probe befanden sich 9% weniger apoptotische Zellen, als in der entsprechenden Probe der siK-transfizierten Zellen (28% bzw. 37% apoptotische Zellen). Nach der Inkubation der Zellen mit Anisomycin als Positivkontrolle war ein Anteil von 44% der untersuchten Zellen apoptotisch.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass eine Behandlung mit siRNA gegen Survivin sowohl spontan, als auch in Kombination mit YM155 und Cisplatin (oder der Kombination von beiden Substanzen) Apoptose in NT2-Zellen auslöste. Die Kombination aller drei Ansätze war sowohl in den Cisplatin-sensitiven wie -resistenten Zellen am effektivsten. Die siRNA gegen Survivin-2B hingegen hatte in NT2-Zellen alleine keinen und in Kombination mit Cisplatin nur einen mäßigen Effekt auf die Apoptoserate, welcher sich bei NT2-R-Zellen sogar ins Gegenteil verkehrte, wo eine verringerte Apoptoserate zu verzeichnen war.

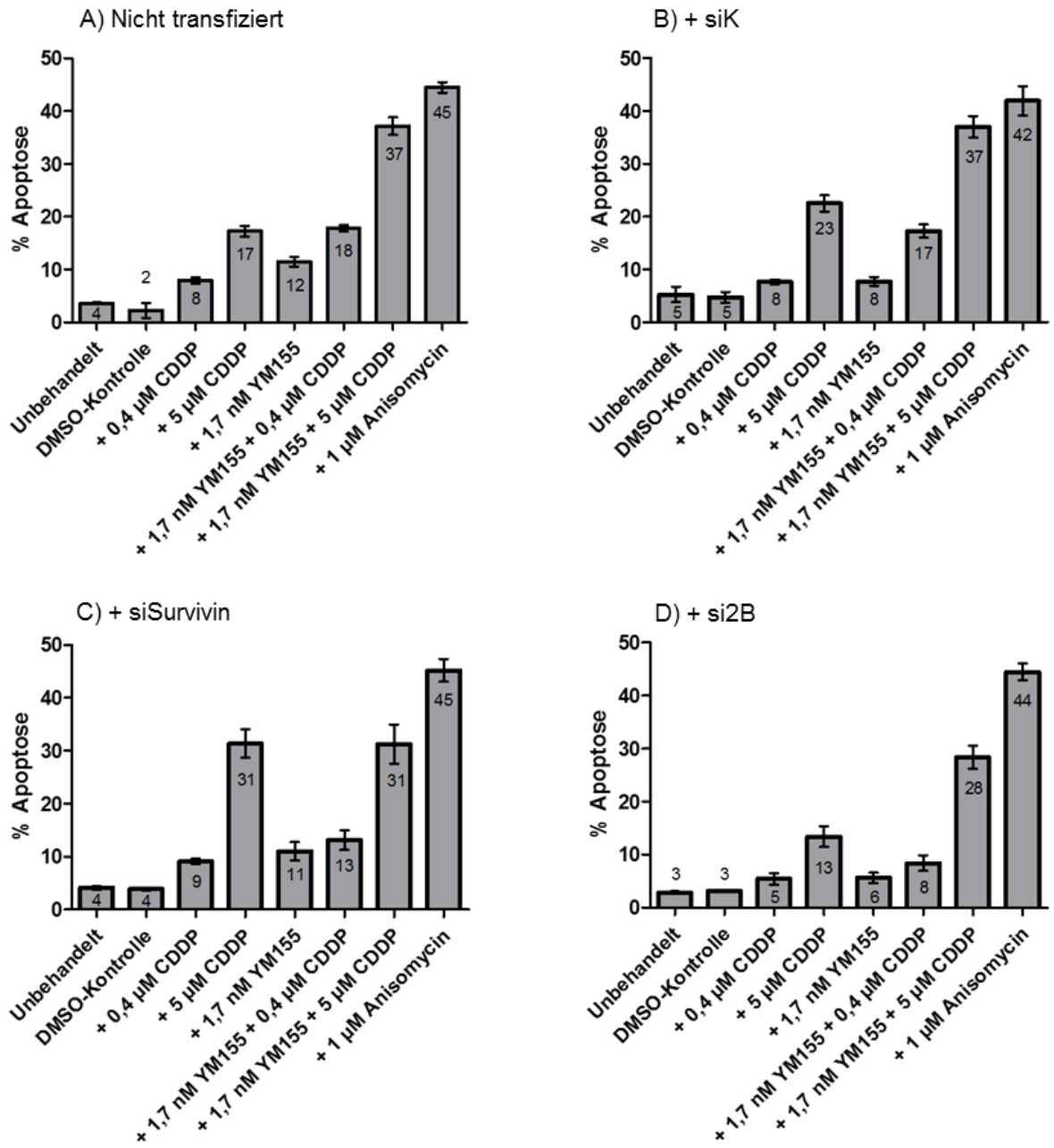


Abbildung 69: Ergebnisse der Untersuchung der Apoptose-Induktion in NT2-R-Zellen. A) nicht transfiziert; B) mit der Kontroll-siRNA transfiziert; C) mit der siRNA gegen Survivin transfiziert; D) mit der siRNA gegen Survivin-2B transfiziert. Zusätzlich erfolgte eine Behandlung der Zellen mit DMSO als Lösemittelkontrolle, Anisomycin als Positivkontrolle, Cisplatin, YM155 oder unterschiedlicher Kombination beider Substanzen. Gezeigt sind die Daten eines Versuchsansatzes (Duplikate).

3.12 Immunhistochemische Untersuchungen der Expression von G-Survivin und Survivin in unterschiedlichen Gewebeproben

Die Expression von G-Survivin und Survivin-2B in unterschiedlichen Gewebeproben sollte mittels immunhistochemische Färbungen untersucht werden (2.2.2.2). Untersucht wurden *tissue micro arrays* (TMA) von Gewebeproben von TKZT mit CIS-Zellen oder Anteilen von Embryonalkarzinomen, Dottersacktumoren, Chorionkarzinomen bzw. Seminomen, sowie jeweils 13 Gewebeschnitte von Keimzelltumoren, die sich entweder sensitiv oder resistent gegenüber einer Cisplatin-basierten Chemotherapie zeigten. Außerdem wurden Gewebe von gesunden Hodenbiopsien auf die Expression von G-Survivin und Survivin-2B hin untersucht. Hierbei wurde für die Beurteilung der Färbungsntensität eine bereits publizierte Einteilung („scoring“) benutzt (163,164). Die Überprüfung von Ergebnissen auf statistisch signifikante Unterschiede erfolgte mit der IBM SPSS Statistics-Software (2.1.12). Bei allen Färbungen wurde sowohl für G-Survivin, als auch für Survivin-2B zwischen einer nukleären und einer zytoplasmatischen Färbung unterschieden.

3.12.1 Die Expression von G-Survivin und Survivin-2B in gesundem Hodengewebe

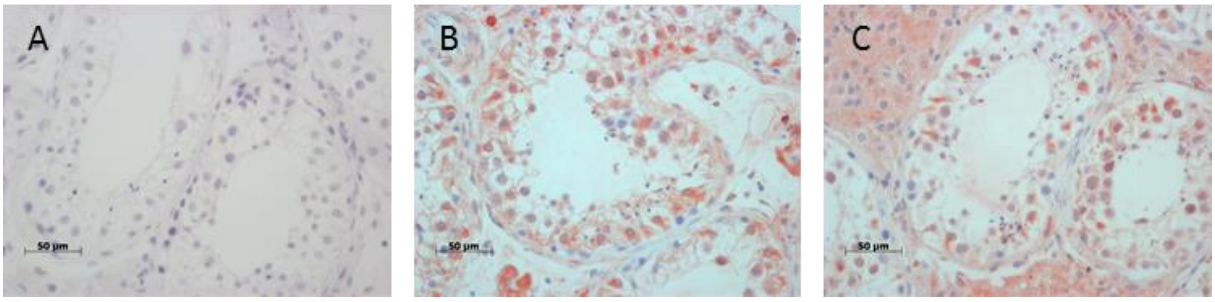


Abbildung 70: Immunhistochemische Untersuchung von gesundem Hodengewebe; A) Kontroll-Färbung, Inkubation nur mit dem sekundären Antikörper; B) Färbung von G-Survivin; C) Färbung von Survivin-2B. Zur Verdeutlichung von Zell- und Gewebestrukturen wurden die Gewebeproben mit Hämatoxylin gegengefärbt.

Die Färbung für G-Survivin von gesundem Hodengewebe (Abbildung 70, B) zeigte eine starke nukleäre und zytoplasmatische Färbung der Leydig-Zellen. Außerdem konnte eine moderate Färbung der der Sertoli-Zellen und der Spermatogonien für G-Survivin beobachtet werden. Auch Survivin-2B (Abbildung 70, C) zeigte eine überwiegend starke Färbung der Leydig-Zellen und eine moderate Färbung der Sertoli-Zellen sowie Spermatogonien.

3.12.2 Die Expression von G-Survivin und Survivin-2B in CIS-Zellen

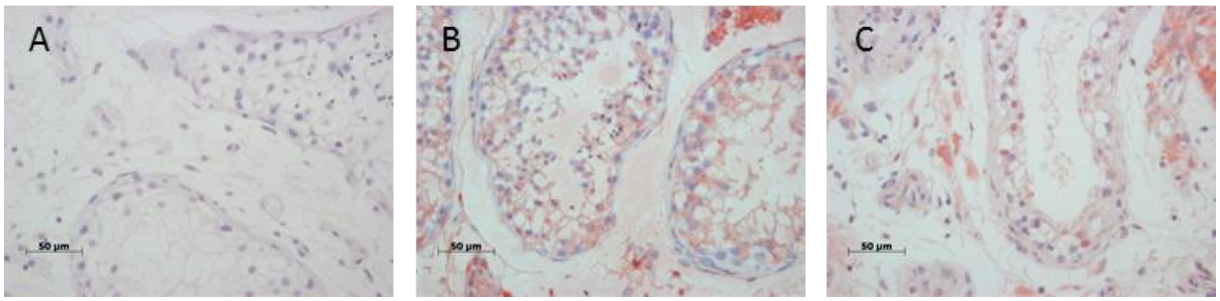


Abbildung 71: Beispiele für die immunhistochemische Untersuchung von TMA mit CIS-Zellen; A) Kontroll-Färbung, Inkubation nur mit dem sekundären Antikörper; B) Färbung von G-Survivin; C) Färbung von Survivin-2B. Zur Verdeutlichung von Zell- und Gewebestrukturen wurden die Gewebeproben mit Hämatoxylin gegengefärbt.

Es wurden 65 Gewebeproben mit Anteilen von CIS-Zellen auf die Expression von G-Survivin und Survivin-2B untersucht. Die Auswertung der Färbungsintensitäten für Survivin und Survivin-2B sind in Abbildung 72 graphisch dargestellt.

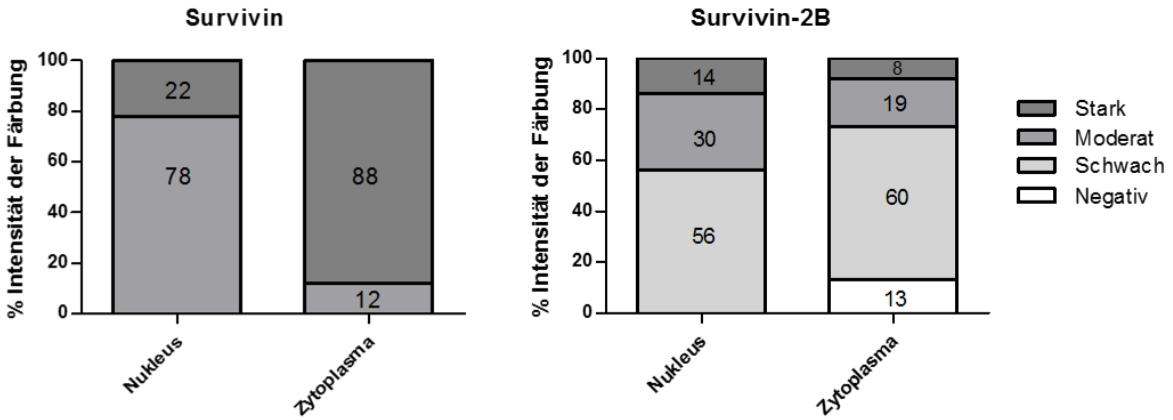


Abbildung 72: Analyse der immunhistochemischen Untersuchung der Expression und Lokalisation von G-Survivin (links) und Survivin-2B (rechts) in TMA mit Anteilen von CIS-Zellen. Gezeigt sind die prozentualen Anteile an stark gefärbten, moderat gefärbten, schwach gefärbten oder in Bezug auf die jeweilige Färbung negativen CIS-Zellen der Gewebeproben mit Unterscheidung der nukleären und der zytoplasmatischen Lokalisation.

In Bezug auf die Färbung von G-Survivin waren keine negativen oder schwach gefärbten CIS-Zellen in den Gewebeproben zu beobachten (Abbildung 72, links). Mit Anteilen von 88% starker und 12% moderater Färbung war das exprimierte G-Survivin in den CIS-Zellen vorwiegend im Zytoplasma lokalisiert. Die Färbung für Survivin-2B war in Bezug auf die Lokalisation stärker in den Zellkernen zu beobachten. Es konnten hierbei keine für die Survivin-2B-Färbung negativen CIS-Zellen festgestellt werden (Abbildung 72, rechts). Für die zytoplasmatische Färbung von Survivin-2B hingegen waren 13% der gefärbten Zellen negativ.

3.12.3 Die Expression von G-Survivin und Survivin-2B in Seminomen

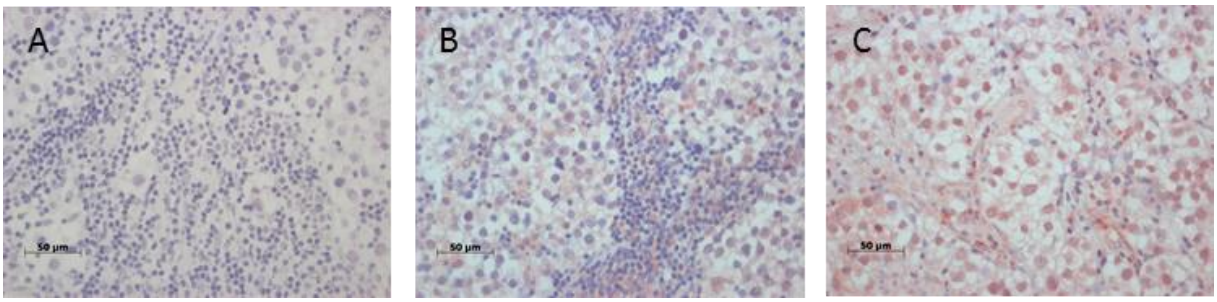


Abbildung 73: Beispiele für die immunhistochemische Untersuchung von TMA von Seminomen; A) Kontroll-Färbung, Inkubation nur mit dem sekundären Antikörper; B) Färbung von G-Survivin; C) Färbung von Survivin-2B. Zur Verdeutlichung von Zell- und Gewebestrukturen wurden die Gewebeproben mit Hämatoxylin gegengefärbt.

Insgesamt wurden 69 Gewebeproben von Seminomen auf die Expression von G-Survivin und Survivin-2B hin immunhistochemisch untersucht. Die Auswertungen für die Färbungsintensitäten von G-Survivin und Survivin-2B sind in Abbildung 74 zu sehen.

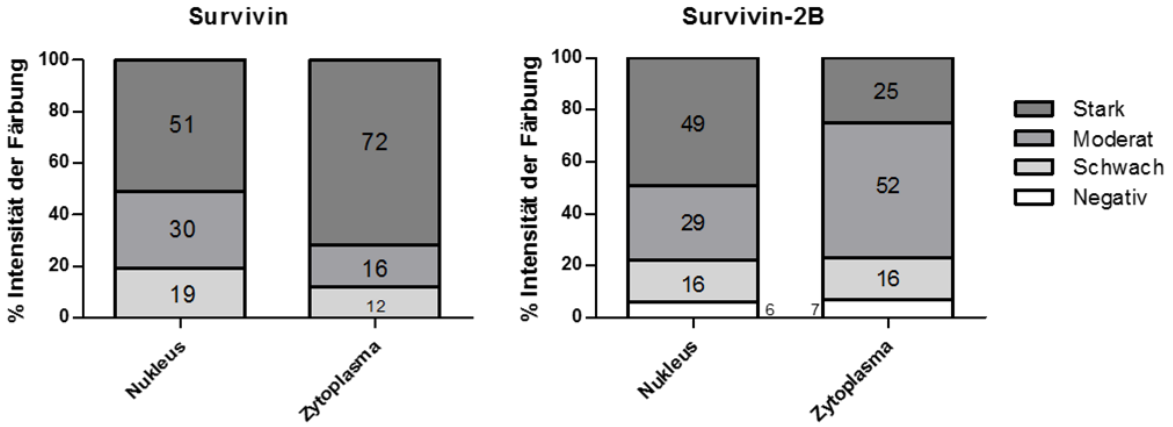


Abbildung 74: Analyse der immunhistochemischen Untersuchung der Expression und Lokalisation von G-Survivin (links) und Survivin-2B (rechts) in Seminomen. Gezeigt sind die prozentualen Anteile an stark gefärbten, moderat gefärbten, schwach gefärbten oder in Bezug auf die jeweilige Färbung negativen Zellen der Gewebeproben mit Unterscheidung der nukleären und der zytoplasmatischen Lokalisation.

Es konnten keine negativen Seminom-Zellen in Bezug auf die Färbung für G-Survivin festgestellt werden (Abbildung 74, links). Mit einem Anteil von 72% starker zytoplasmatischer Färbung im Vergleich zu einem Anteil von 51% starker nukleärer Färbung, war G-Survivin in Seminom-Zellen überwiegend im Zytoplasma lokalisiert. In Bezug auf die Färbung für Survivin-2B waren 6% bzw. 7% der Zellen negativ für eine nukleäre bzw. zytoplasmatische Färbung (Abbildung 74, rechts). Die höhere Expression von Survivin-2B wurde mit einem Anteil von 49% starker Färbung in den Nuklei der Seminom-Zellen festgestellt. Für die zytoplasmatische

Färbung von Survivin-2B zeigten sich nur 25% der untersuchten Seminom-Zellen stark angefärbt.

3.12.4 Die Expression von G-Survivin und Survivin-2B in Embryonalkarzinomen

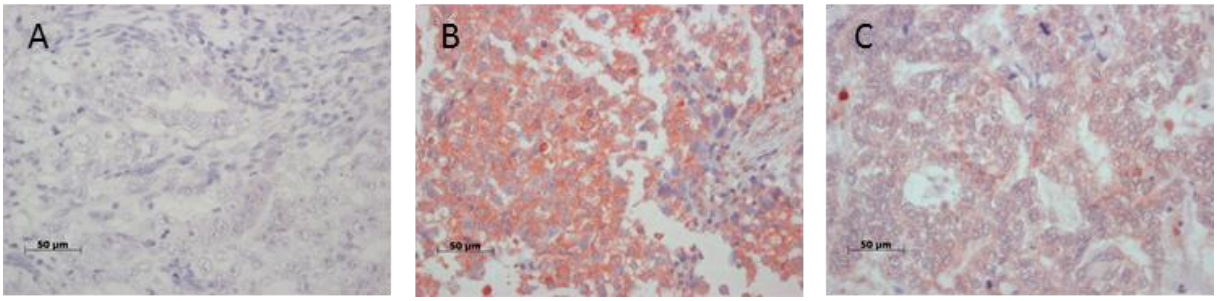


Abbildung 75: Beispiele für die immunhistochemische Untersuchung von TMA von Embryonalkarzinomen; A) Kontroll-Färbung, Inkubation nur mit dem sekundären Antikörper; B) Färbung von G-Survivin; C) Färbung von Survivin-2B. Zur Verdeutlichung von Zell- und Gewebestrukturen wurden die Gewebeproben mit Hämatoxylin gegengefärbt.

Es wurden 78 Gewebeproben von Embryonalkarzinomen auf die Expression von G-Survivin oder Survivin-2B hin untersucht. Die Ergebnisse der Analyse sind in Abbildung 76 graphisch dargestellt.

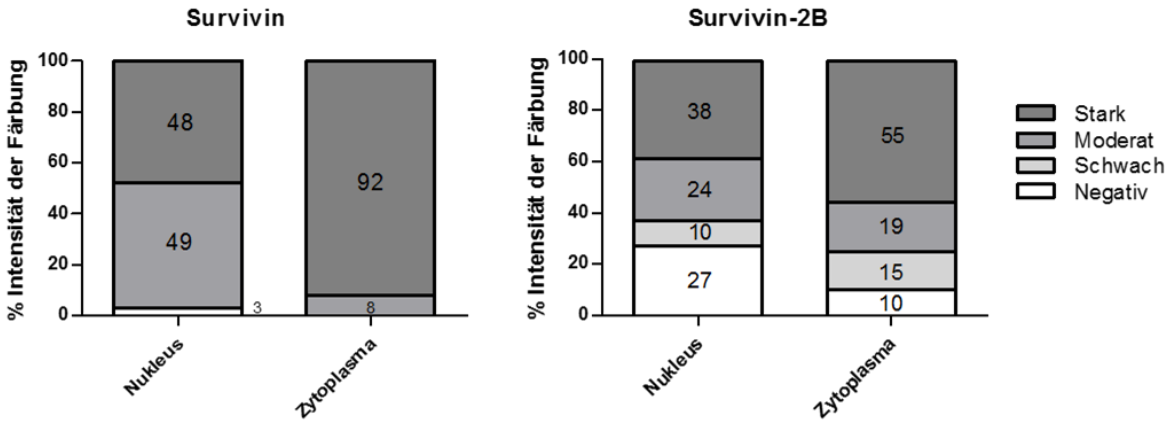


Abbildung 76: Analyse der immunhistochemischen Untersuchung der Expression und Lokalisation von G-Survivin (links) und Survivin-2B (rechts) in Embryonalkarzinomen. Gezeigt sind die prozentualen Anteile an stark gefärbten, moderat gefärbten, schwach gefärbten oder in Bezug auf die jeweilige Färbung negativen Zellen der Gewebeproben mit Unterscheidung der nukleären und der zytoplasmatischen Lokalisation.

Eine starke Färbung für zytoplasmatisches G-Survivin war in 92%, und eine moderate Färbung in 8% der Embryonalkarzinom-Zellen zu beobachten (Abbildung 76, links). Keine der untersuchten Gewebeproben war negativ für diese Färbung. Ein Anteil von 48% der Tumorzellen zeigte eine starke und, 49% der Zellen eine moderate nukleäre Färbung für G-

Survivin. Nur 3% der Tumorzellen waren in Bezug auf die Nuklei schwach mit G-Survivin angefärbt. In Bezug auf die Färbung mit Survivin-2B war in 55% der Zellen eine starke zytoplasmatische und in 38% der Zellen eine starke nukleäre Färbung zu beobachten (Abbildung 76, rechts). Keine Anfärbung mit Survivin-2B konnte in 27% der Tumorzellen in Bezug auf die Nuklei und in 10% der Zellen in Bezug auf das Zytoplasma festgestellt werden.

3.12.5 Die Expression von G-Survivin und Survivin-2B in Dottersacktumoren

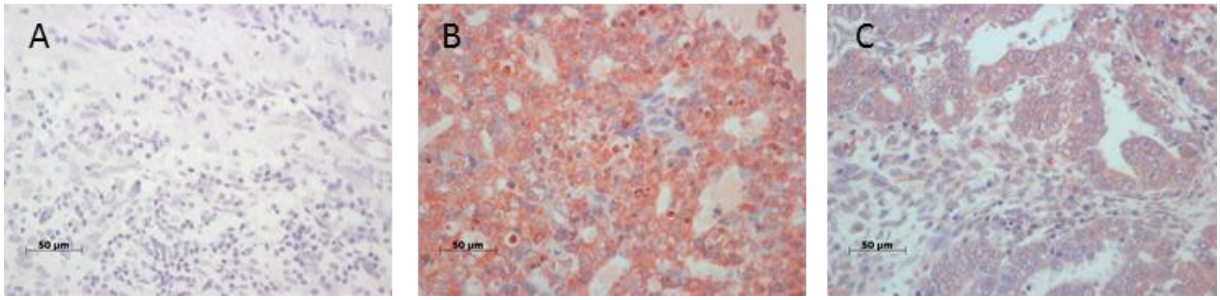


Abbildung 77: Beispiele für die immunhistochemische Untersuchung von TMA von Dottersacktumoren; A) Kontroll-Färbung, Inkubation nur mit dem sekundären Antikörper; B) Färbung von G-Survivin; C) Färbung von Survivin-2B. Zur Verdeutlichung von Zell- und Gewebestrukturen wurden die Gewebeproben mit Hämatoxylin gegengefärbt.

Insgesamt 62 Gewebeproben von Dottersacktumoren wurden auf die Expression von G-Survivin und Survivin-2B hin untersucht. Die Ergebnisse der Auswertung der Färbungen sind in Abbildung 78 zu sehen.

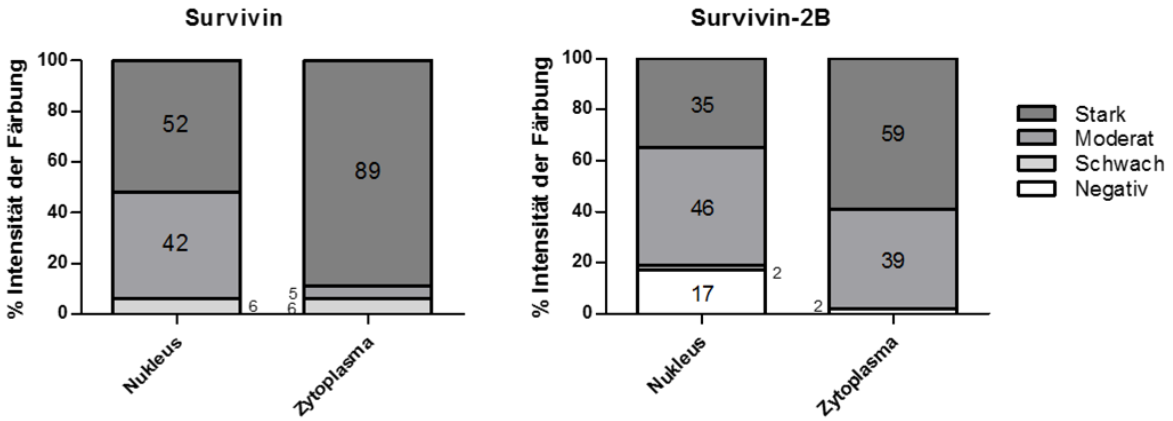


Abbildung 78: Analyse der immunhistochemischen Untersuchung der Expression und Lokalisation von G-Survivin (links) und Survivin-2B (rechts) in Dottersacktumoren. Gezeigt sind die prozentualen Anteile an stark gefärbten, moderat gefärbten, schwach gefärbten oder in Bezug auf die jeweilige Färbung negativen Zellen der Gewebeproben mit Unterscheidung der nukleären und der zytoplasmatischen Lokalisation.

In Bezug auf die Färbung mit G-Survivin konnten keine negativen Tumorzellen festgestellt werden (Abbildung 78, links). In 89% der untersuchten Tumorzellen konnte eine starke

Färbung für zytoplasmatisches G-Survivin beobachtet werden. Ein Anteil von 52% der Zellen war stark, und 42% der Zellen waren moderat in Bezug auf die nukleäre Färbung für G-Survivin. Keine der untersuchten Zellen war negativ für eine zytoplasmatische Färbung mit Survivin-2B (Abbildung 78, rechts). 59% bzw. 39% der Zellen zeigten eine starke bzw. moderate zytoplasmatische Survivin-2B-Färbung. In Bezug auf die nukleäre Färbung mit Survivin-2B zeigten sich 35% stark und 46% moderat angefärbt. 2% bzw. 17% der Nuklei in den untersuchten Zellen waren schwach bzw. gar nicht mit Survivin-2B angefärbt.

3.12.6 Die Expression von G-Survivin und Survivin-2B in Chorionkarzinomen

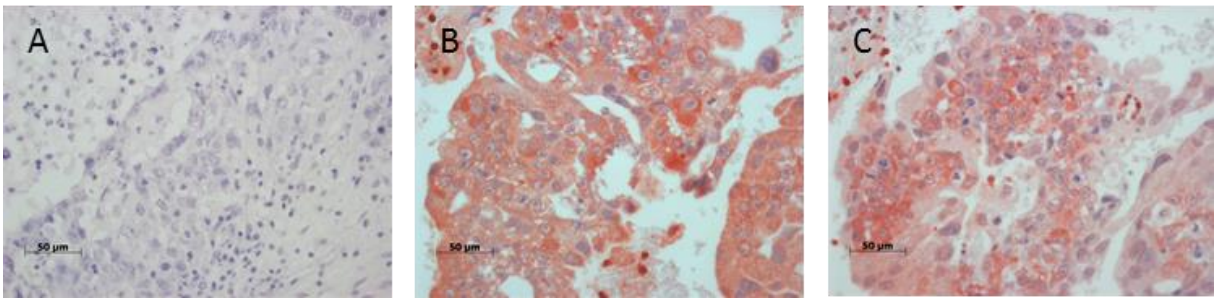


Abbildung 79: Beispiele für die immunhistochemische Untersuchung von TMA von Chorionkarzinomen; A) Kontroll-Färbung, Inkubation nur mit dem sekundären Antikörper; B) Färbung von G-Survivin; C) Färbung von Survivin-2B. Zur Verdeutlichung von Zell- und Gewebestrukturen wurden die Gewebeproben mit Hämatoxylin gegengefärbt.

Es wurden 32 Gewebeproben von Chorionkarzinomen auf die Expression von G-Survivin und Survivin-2B hin untersucht. Die Analysen der Färbungen sind in der Abbildung 80 zu sehen.

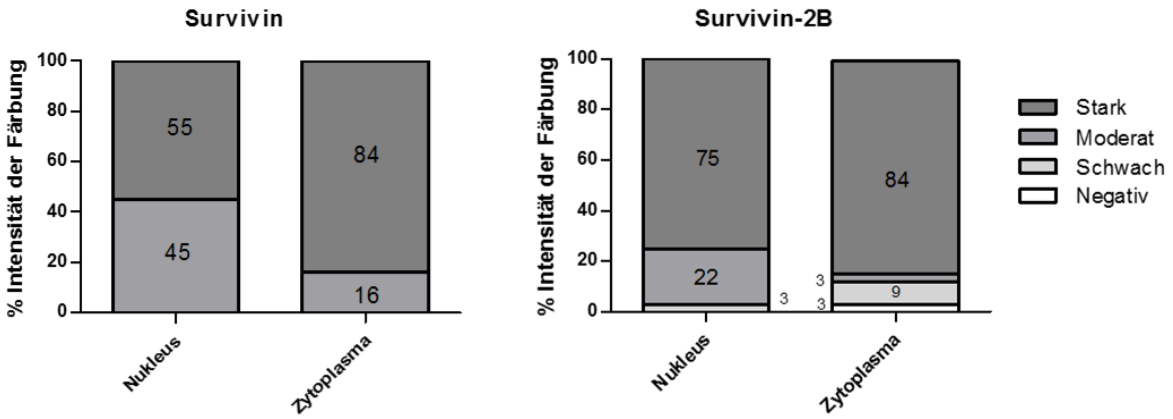


Abbildung 80: Analyse der immunhistochemischen Untersuchung der Expression und Lokalisation von G-Survivin (links) und Survivin-2B (rechts) in Chorionkarzinomen. Gezeigt sind die prozentualen Anteile an stark gefärbten, moderat gefärbten, schwach gefärbten oder in Bezug auf die jeweilige Färbung negativen Zellen der Gewebeproben mit Unterscheidung der nukleären und der zytoplasmatischen Lokalisation.

Keine der Tumorzellen war negativ für die Färbung mit G-Survivin (Abbildung 80, links). Es zeigten 84% der Zellen eine starke und 16% der Zellen eine moderate zytoplasmatische Färbung für G-Survivin. In Bezug auf die nukleäre Färbung mit G-Survivin waren 55% stark und 45% moderat angefärbt. In einem Anteil von 84% der untersuchten Zellen konnte eine starke zytoplasmatische Färbung für Survivin-2B festgestellt werden (Abbildung 80, rechts), wobei auch 75% der Zellen eine starke nukleäre Survivin-2B-Färbung zeigten. In 22% der Zellen war eine moderate nukeäre Färbung mit Survivin-2B zu beobachten.

3.12.7 Die Expression von G-Survivin und Survivin-2B in Cisplatin-sensitiven und Cisplatin-resistenten Keimzelltumoren

Es wurden jeweils 13 Gewebeschnitte von Cisplatin-sensitiven bzw. -resistenten KZT auf die Expression von Survivin und Survivin im Zytoplasma und den Nuklei der Zellen hin untersucht. Die Auswertungen der Ergebnisse der Färbungen sind in den Abbildungen 77 und 78 graphisch dargestellt.

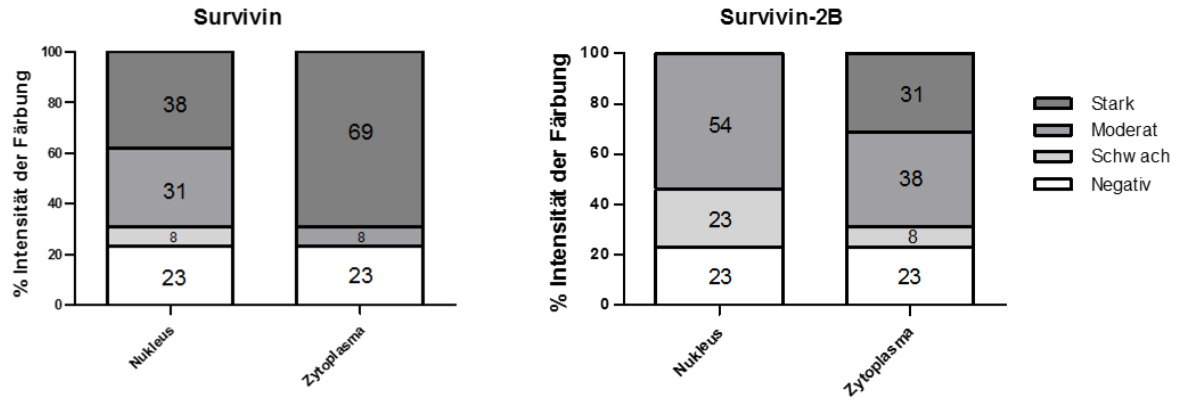


Abbildung 81: Analyse der immunhistochemischen Untersuchung der Expression und Lokalisation von G-Survivin (links) und Survivin-2B (rechts) in Cisplatin-sensitiven Tumoren. Gezeigt sind die prozentualen Anteile an stark gefärbten, moderat gefärbten, schwach gefärbten oder in Bezug auf die jeweilige Färbung negativen Zellen der Gewebeproben mit Unterscheidung der nukleären und der zytoplasmatischen Lokalisation.

In einem Anteil von 23% der Tumorzellen konnte weder im Zytoplasma, noch in den Nuklei der Zellen eine Färbung für G-Survivin festgestellt werden (Abbildung 81, links). In 69% der Zellen war eine starke, und in 8% eine moderate zytoplasmatische G-Survivin-Färbung zu beobachten. 38% der untersuchten Zellen zeigten eine starke, 31% eine moderate und 8% eine schwache nukleäre Färbung für G-Survivin. In Bezug auf die Färbung mit Survivin-2B waren ebenfalls 23% der Zellen negativ (Abbildung 81, rechts), sowohl für eine

zytoplasmatische, als auch für eine nukleäre Färbung. Es waren 31% der Zellen stark, 38% moderat und 8% schwach mit Survivin-2B im Zytoplasma angefärbt. In 54% der Zellen konnte eine starke, und in 23% eine moderate nukleäre Anfärbung mit Survivin-2B festgestellt werden.

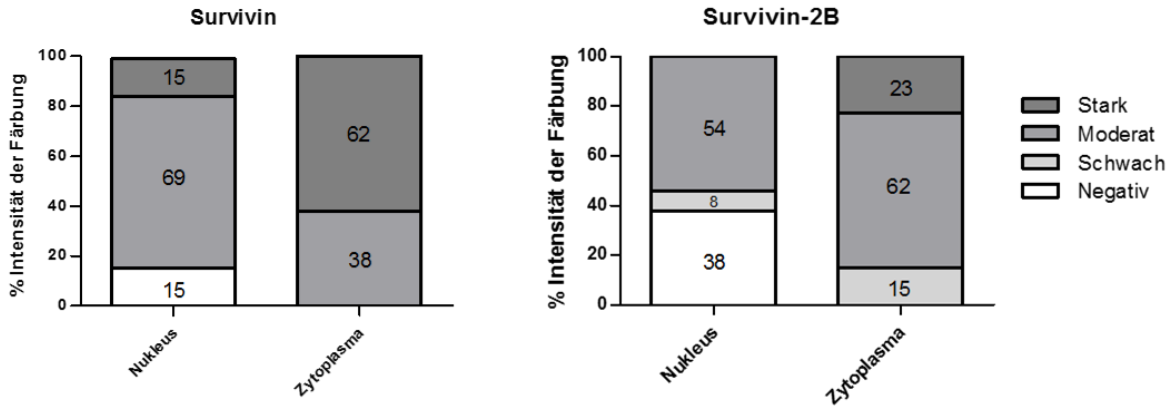


Abbildung 82: Analyse der immunhistochemischen Untersuchung der Expression und Lokalisation von G-Survivin (links) und Survivin-2B (rechts) in Cisplatin-resistenten Tumoren. Gezeigt sind die prozentualen Anteile an stark gefärbten, moderat gefärbten, schwach gefärbten oder in Bezug auf die jeweilige Färbung negativen Zellen der Gewebeproben mit Unterscheidung der nukleären und der zytoplasmatischen Lokalisation.

In den Cisplatin-resistenten Tumoren hingegen konnte in 62% der Zellen eine starke und in 38% eine moderate zytoplasmatische Färbung für G-Survivin festgestellt werden (Abbildung 82, links). 15% der untersuchten Zellen war negativ für eine nukleäre Färbung mit G-Survivin. Ein Anteil von 15% der Zellen war stark und ein Anteil von 69% der Zellen war moderat nukleär mit G-Survivin angefärbt. In Bezug auf die Färbung mit Survivin-2B zeigten (Abbildung 82, rechts) sich 23% der untersuchten Zellen stark, 62% moderat und 15% schwach zytoplasmatisch angefärbt. In 54% der Nuklei konnte ein moderate, in 8% eine schwache und in 38% gar keine Survivin-2B-Färbung beobachtet werden.

3.12.8 Statistische Auswertungen der immunhistochemischen Expressionsanalysen

Die Unterschiede in der Expressionsstärke von G-Survivin und Survivin-2B wurde mittels der IBM SPSS Statistics-Software (2.1.12) unter Verwendung des nicht-parametrischen Mann-Whitney-Tests auf statistisch signifikante Unterschiede überprüft. Die Ergebnisse der Analysen sind in Abbildung 83 bis 88 graphisch dargestellt.

3.12.8.1 Statistische Auswertungen der Expressionsanalysen von Cisplatin-sensitiven und Cisplatin-resistenten Tumorproben

In den Abbildungen 79 und 80 sind die Ergebnisse der statistischen Auswertung der Expressionsanalyse für G-Survivin und Survivin-2B in Cisplatin-sensitiven und -resistenten TKZT-Proben gezeigt.

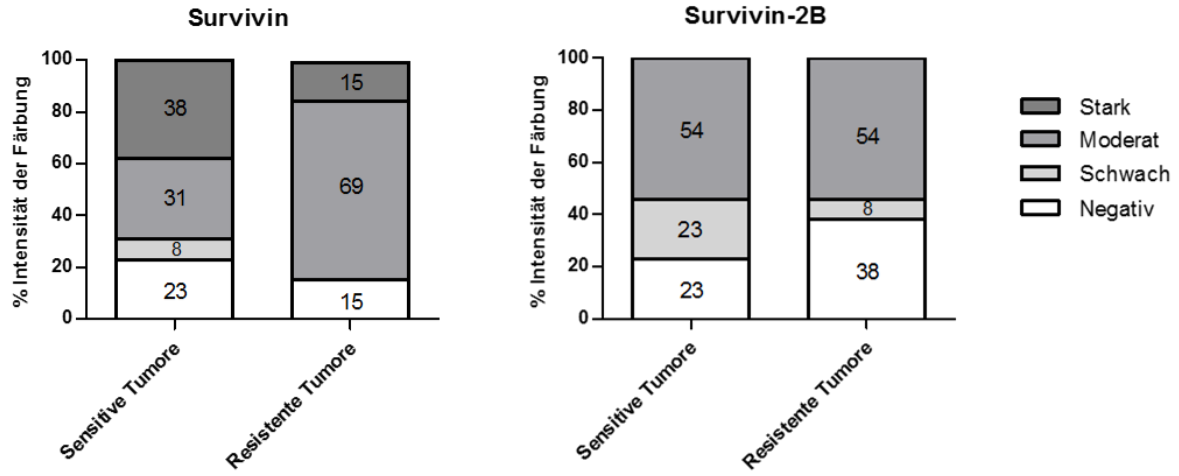


Abbildung 83: Übersicht über die Ergebnisse der nukleären Färbung für G-Survivin und Survivin-2B in Cisplatin-sensitiven und -resistenten KZT-Proben. Die Unterschiede der nukleären Färbung für G-Survivin zeigten mathematisch signifikante Unterschiede (p = 0,001), wohingegen die Unterschiede der nukleären Färbung für Survivin-2B nicht mathematisch signifikant (n.s.) waren.

Eine statistische Auswertung der Expressionsanalysen für nukleäres G-Survivin (Abbildung 83, links) konnte, im Vergleich zwischen Cisplatin-sensitiven und -resistenten KZT-Proben, statistisch signifikante Unterschiede in den Färbungsintensitäten für das Protein zeigen (p = 0,001). Die Unterschiede der Färbungsintensitäten für nukleäres Survivin-2B waren statistisch nicht signifikant (Abbildung 83, rechts, n.s.).

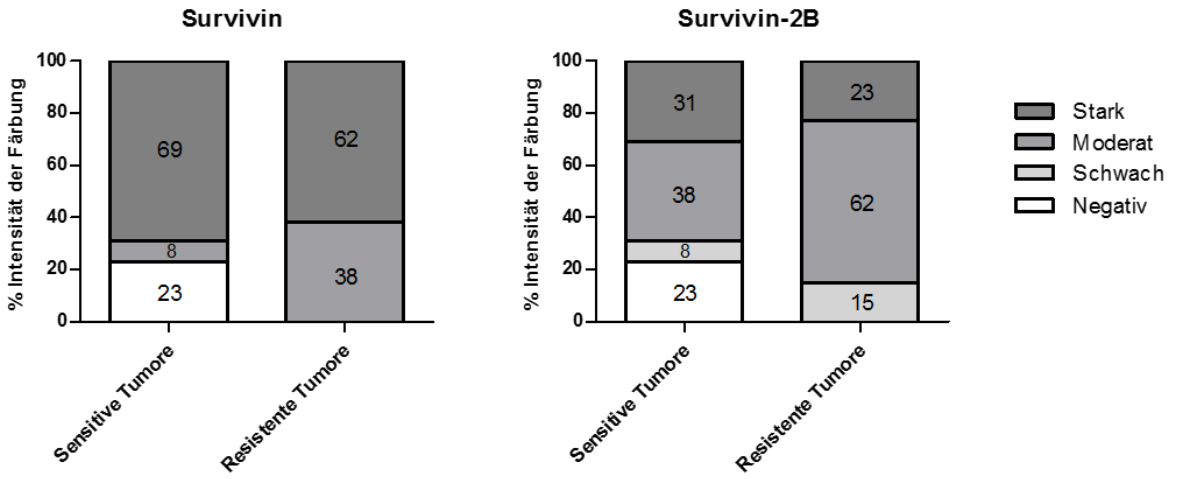


Abbildung 84: Übersicht über die Ergebnisse der zytoplasmatischen Färbung für G-Survivin und Survivin-2B in Cisplatin-sensitiven und -resistenten KZT-Proben. Weder die Ergebnisse der zytoplasmatischen Färbung für G-Survivin, noch die Ergebnisse der zytoplasmatischen Färbung für Survivin-2B zeigten mathematisch signifikante Unterschiede (n.s.).

Im Vergleich zwischen Cisplatin-sensitiven und -resistenten KZT-Proben zeigten sich zwar stärkere Färbungsintensitäten beider Proteine in den resistenten Tumoren im Zytoplasma, welche aber in der Auswertung keine statistische Signifikanz zeigten (Abbildung 84, n.s.).

3.12.8.2 Statistische Auswertungen der Expressionsanalysen von KZT-Proben unterschiedlicher Histologie

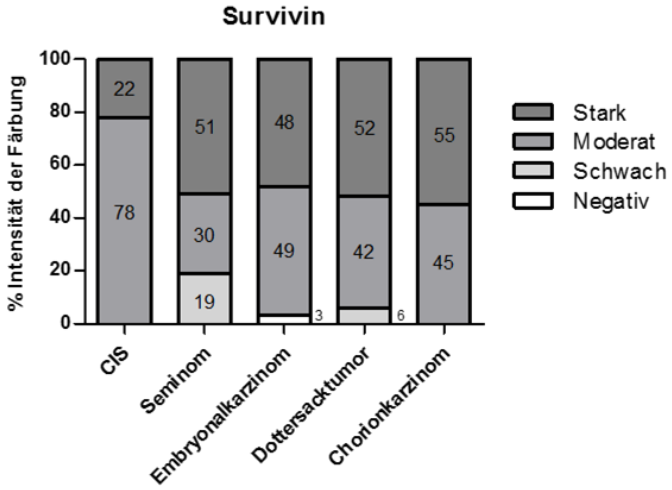


Abbildung 85: Übersicht über die Ergebnisse der nukleären Färbung für G-Survivin in unterschiedlichen KZT-Proben (TMA). Die Vergleiche der Ergebnisse der Färbung für nukleäres G-Survivin von KZT-Proben mit Anteilen von CIS-Zellen und Proben von Nicht-Seminomen (Embryonalkarzinome, Dottersacktumore und Chorionkarzinome) zeigten statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Bei dem Vergleich von Proben mit CIS-Zellen und Seminomen konnte keine mathematische Signifikanz in den Unterschieden festgestellt werden (n.s.).

Für die Ergebnisse der Färbung für nukleäres G-Survivin von Proben mit Anteilen von CIS-Zellen im Vergleich zu Nicht-Seminomen (Embryonalkarzinome, Dottersacktumore oder Chorionkarzinome) (Abbildung 85) konnten statistisch signifikante Unterschiede festgestellt werden ($p < 0,05$). Ein Vergleich der Unterschiede der gleichen Färbung von Proben mit Anteilen von CIS-Zellen und Seminomen zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede (n.s.).

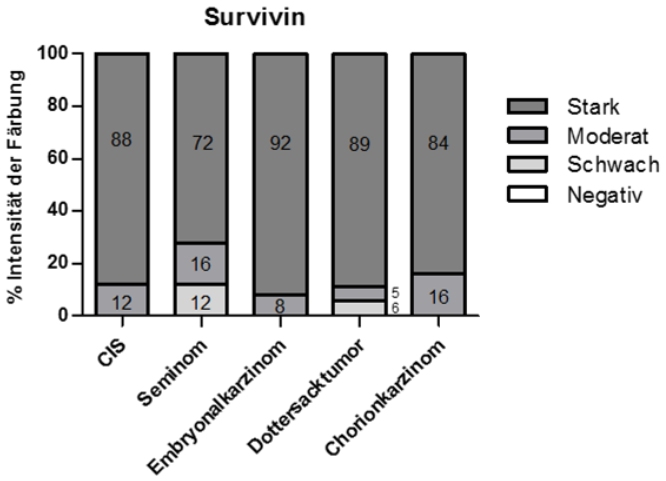


Abbildung 86: Übersicht über die Ergebnisse der zytoplasmatischen Färbung für G-Survivin in unterschiedlichen KZT-Proben (TMA). Die Vergleiche der Ergebnisse der Färbung für zytoplasmatisches G-Survivin von KZT-Proben mit Anteilen von CIS-Zellen und Proben von Nicht-Seminomen (Embryonalkarzinome, Dottersacktumore und Chorionkarzinome) zeigten keine statistisch signifikante Unterschiede (n.s.). Bei dem Vergleich von Proben mit CIS-Zellen und Seminomen konnte hingegen eine statistische Signifikanz in den Unterschieden festgestellt werden ($p < 0,05$).

Beim Vergleich der Ergebnisse für die zytoplasmatische Färbung für G-Survivin (Abbildung 86) konnten für die Unterschiede zwischen den Proben mit Anteilen von CIS-Zellen und denen von Nicht-Seminomen (Embryonalkarzinome, Dottersacktumore und Chorionkarzinome) keine statistischen Signifikanzen festgestellt werden (n.s.). Ein Vergleich der Unterschiede in der Färbung von KZT-Proben mit Anteilen von CIS-Zellen und Seminom-Proben hingegen zeigte statistische Signifikanz ($p < 0,05$).

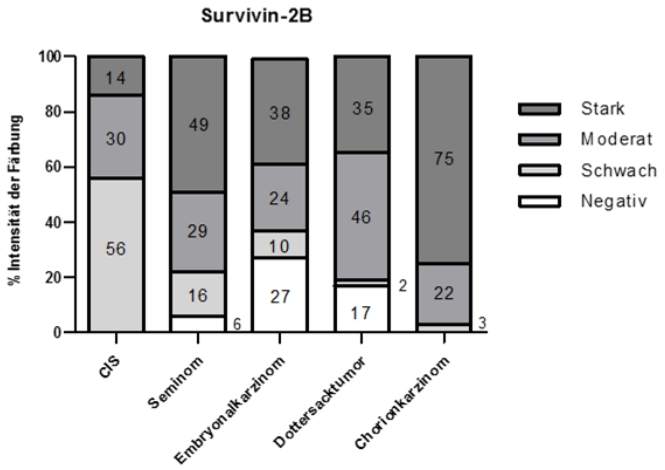


Abbildung 87: Übersicht über die Ergebnisse der nukleären Färbung für Survivin-2B in unterschiedlichen KZT-Proben (TMA). Die Vergleiche der Ergebnisse der Färbung für nukleäres Survivin-2B von KZT-Proben mit Anteilen von CIS-Zellen und Proben von Nicht-Seminomen zeigten nur für Dottersacktumore und Chorionkarzinome statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$), für Embryonalkarzinome hingegen nicht (n.s.). Bei dem Vergleich der Färbung von Proben mit CIS-Zellen und Seminomen konnten statistische signifikante Unterschiede festgestellt werden ($p < 0,05$).

Der Vergleich der Ergebnisse der nukleären Färbung für Survivin-2B (Abbildung 87) zwischen KZT-Proben mit Anteilen von CIS-Zellen und Seminom-Proben zeigte statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$), wie auch der Vergleich der Proben mit CIS-Zellen und Dottersacktumoren oder Chorionkarzinomen ($p < 0,05$). Nur der Vergleich der Unterschiede in der nukleären Färbung für Survivin-2B von KZT-Proben mit Anteilen von CIS-Zellen und Embryonalkarzinom-Proben zeigte keine statistische Signifikanz (n.s.).

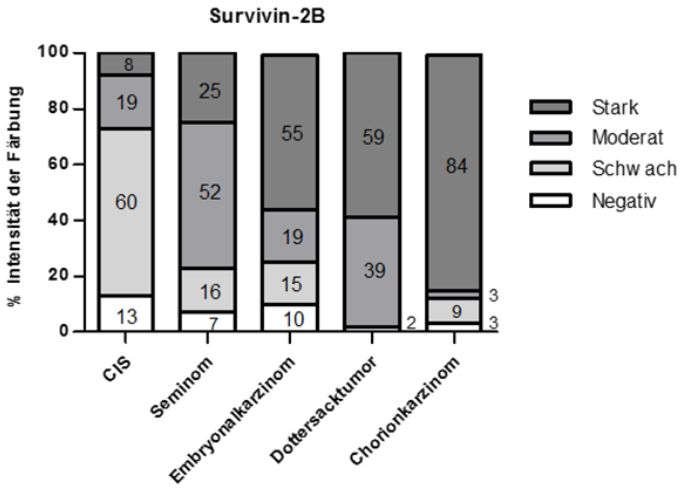


Abbildung 88: Übersicht über die Ergebnisse der zytoplasmatischen Färbung für Survivin-2B in unterschiedlichen KZT-Proben (TMA). Die Vergleiche der Ergebnisse der Färbung für zytoplasmatisches Survivin-2B von Proben mit Anteilen von CIS-Zellen und Proben von Embryonalkarzinomen, Dottersacktumoren, Chorionkarzinomen und Seminomen zeigten statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Auch die Vergleiche der Ergebnisse von Seminomen und Nicht-Seminomen (Embryonalkarzinomen, Dottersacktumore, Chorionkarzinome) zeigten statistisch Signifikanz in den Unterschieden ($p < 0,05$).

Für die Vergleiche der Ergebnisse der Färbung für zytoplasmatische Survivin-2B (Abbildung 88) von Proben mit Anteilen von CIS-Zellen mit den Ergebnissen der gleichen Färbung von Embryonalkarzinomen, Dottersacktumoren, Chorionkarzinomen und Seminomen konnten statistisch signifikante Unterschiede festgestellt werden ($p < 0,05$). Auch die Vergleiche der Ergebnisse der Seminom-Proben mit den Ergebnissen der Nicht-Seminom-Proben (Embryonalkarzinome, Dottersacktumore, Chorionkarzinome) zeigten statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass bei KZT-Proben von Tumoren, welche sich resistent gegenüber einer Behandlung mit Cisplatin zeigten im Vergleich zu sensitiven Tumoren eine erhöhte Expression von nukleärem und zytoplasmatischem Survivin festgestellt werden konnte bei allerdings insgesamt geringer Patientenfallzahl. Die nukleäre Expression von Survivin korrelierte signifikant mit der Cisplatin-Resistenz untersuchter Proben und mit der Aggressivität von KZT-Proben unterschiedlicher Histologie. Eine weitere signifikante Korrelation konnte für die Aggressivität der KZT und der Expression von zytoplasmatischem Survivin-2B festgestellt werden.

4 Diskussion

Trotz der enormen Fortschritte, welche gerade in den letzten Jahren auf dem Gebiet der Tumorforschung gemacht werden konnten, stellt die Behandlung von Patienten mit Keimzelltumoren (KZT), die gegenüber etablierten Krebstherapien resistent sind, die Onkologie immer wieder vor unlösbare Probleme. Die Entwicklung neuer Strategien zur Verbesserung der Heilungschancen dieser Patienten ist deswegen unerlässlich.

Durch die Einführung von Cisplatin als Chemotherapeutikum in den 1970er Jahren ist die Heilungsrate für Patienten, welche an KZT leiden, drastisch gestiegen. Heutzutage können, je nach Ausgangssituation und Prognosegruppe, bis zu 90% der KZT-Patienten durch die Standardbehandlungen der Tumore mit Radiotherapie, Chirurgie und Cisplatin-basierten Chemotherapien vollkommen geheilt werden (39,40). Das Auftreten von Resistenzen gegenüber diesen Therapieansätzen in bis zu 20% der Fälle stellt jedoch immer noch ein Problem dar, da in ca. 50% der Fälle keine Heilung mehr möglich ist. Neue Strategien, um Resistenzmechanismen in Tumoren aufzudecken und therapeutisch zu umgehen oder auszuschalten, sind ein wichtiger Bestandteil der gegenwärtigen Tumorforschung.

Das Protein Survivin zeigt in humanen Geweben ein spezielles Expressionsmuster. Zum einen ist es in ausdifferenzierten, gesunden Geweben kaum nachweisbar, wird jedoch in nahezu allen soliden Tumorentitäten exprimiert (83). Zum anderen wird Survivin in proliferierenden Zellen zellzyklusspezifisch exprimiert. Dies hängt mit der Funktion von Survivin während der Mitose zusammen: Als ein essentieller Bestandteil des *chromosomal passenger complex* (CPC) ist es an der Segregation der Chromosomen beteiligt. Die andere ebenso wichtige Aufgabe von Survivin in den Zellen ist die Regulation der Apoptose. Survivin gehört zu den *inhibitor of apoptosis proteins* (IAP) und ist maßgeblich an der Inhibierung der Apoptose beteiligt. Diese Umgehung des natürlichen oder induzierten Zelltods kann einen Resistenzmechanismus in Tumorzellen gegenüber Apoptose-induzierenden Substanzen darstellen. Interessanterweise konnte kürzlich nicht nur eine starke Expression von Survivin und seinen Splicevarianten in humanen embryonalen Stammzellen nachgewiesen werden. Survivin und seinen Isoformen konnten auch wichtige Rollen in der Regulation der Pluripotenz zugeschrieben werden. Humane embryonale Stammzellen gelten als nicht-maligner Gegenpart zu humanen Embryonalkarzinomzellen, was die Untersuchung dieser Proteine in KZT noch interessanter macht (165). Die Expression von Survivin konnte bereits in vielen Entitäten als prognostischer

Faktor in Bezug den Krankheitsverlauf (102–105), aber auch als prädiktiver Faktor in Bezug auf ein Ansprechen der Tumoren auf eine Chemo- oder Radiotherapien identifiziert werden (166,167).

In der vorliegenden Arbeit sollte zum einen die Rolle der Haupt-Splicevariante Survivin und der wichtigsten Isoform, dem Survivin-2B, welchem je nach Kontext z.T. gegensätzliche Funktionen bei der Apoptose zugeschrieben werden, in der Resistenz von KZT-Zellen gegenüber Cisplatin erforscht werden. Zum anderen sollte eine Hemmung dieser Proteine als möglicher neuer Therapieansatz bei KZT untersucht werden. Des Weiteren sollte die Expression von Survivin und Survivin-2B in ZKT-Proben unterschiedlicher Histologie und sowohl in Cisplatin-sensitiven, als auch in Cisplatin-resistenten KZT-Proben untersucht, und so ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Expressions-muster der Proteine und der Aggressivität sowie der Cisplatin-Resistenz der Tumore aufgedeckt werden.

4.1 Die Expression von Survivin und Survivin-2B in KZT-Zelllinien

Da bereits aus der Literatur bekannt war, dass eine Expression von Survivin und Survivin-2B mit der malignen Transformation von Zellen in Verbindung steht (79,94) und in humanen embryonalen Stammzellen hoch exprimiert wird (165), wurde untersucht, ob sich auch in KZT-Zelllinien auf mRNA- und Proteinebene eine Expression der beiden Survivin-Isoformen detektieren lässt.

Für alle untersuchten KZT-Zelllinien konnte sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene eine Expression für Survivin und Survivin-2B nachgewiesen werden. Beim Vergleich von Cisplatin-sensitiven und -resistenten Zellen konnte festgestellt werden, dass eine der resistenten Zelllinien eine erhöhte Expression von Survivin aufwies. Die Arbeit von Juliachs et al. konnte zeigen, dass in Cisplatin-resistenten KZT-Zellen eine erhöhte Aktivität des *platelet-derived growth factor receptor β* (PDGFRβ)-AKT Signalwegs vorliegt (168). In der Arbeit von Zhao et al. wurde berichtet, dass eine Aktivierung dieses Signalwegs zu einer gesteigerten Expression von Survivin führt (169), was auch in der Arbeit von Sun et al. (170) zu Magenkarzinomen bestätigt werden konnte. Auch hier führte eine verstärkte AKT-Signalweg-Aktivität zu einer erhöhten Survivin-Expression, welche direkt mit einer Resistenz gegenüber Cisplatin in den Zellen korreliert werde konnte. In einer weiteren Arbeit von Ganesh et al. (171) konnte auch in Bronchialkarzinomen eine Resistenz gegenüber Cisplatin mit einer erhöhten Survivin-

Expression korreliert werden. Obwohl der Mechanismus, der hinter der erhöhten Expression von Survivin in einer der hier untersuchten Cisplatin-resistenten KZT-Zelllinien steht, nicht weiter untersucht wurde, sind die Ergebnisse dieser Arbeit in Einklang mit bisherigen Ergebnissen in anderen Entitäten.

Die erhöhte Expression von Survivin-2B in zwei der untersuchten Cisplatin-resistenten KZT-Zelllinien könnte ein erster Hinweis darauf sein, dass auch diese Isoform eine Rolle bei der Resistenzentwicklung der Zellen gegenüber Cisplatin spielt. Sowohl zur Funktion von Survivin-2B, als auch zu seiner Rolle bei Resistenzen von Krebszellen gegenüber unterschiedlichen Behandlungen sind bislang widersprüchliche Daten publiziert worden (99,172–175). Auch in dieser Arbeit wurden zum Teil widersprüchliche Beobachtungen diesbezüglich gemacht, welche in den folgenden Abschnitten noch näher beleuchtet werden sollen.

4.2 Die Inhibition von Survivin in KZT-Zellen

In der vorliegenden Arbeit konnten Survivin und Survivin-2B in den KZT-Zellen sowohl durch RNA-Interferenz mittels spezifischer siRNAs, als auch durch den Einsatz des *small molecule inhibitors* YM155 effektiv herunterreguliert werden. Hierbei wurden nach der Transfektion der Zellen mit der siRNA gegen Survivin stärkere regulatorische Effekte beobachtet, als durch YM155. Mittels der siRNA gegen Survivin konnte die mRNA der Haupt-Splicevariante über einen Zeitraum von minimal 72 h auf Werte um 1% herunterreguliert werden. Die Effekte dieser siRNA auf die mRNA von Survivin-2B sind mit einer Herunterregulierung um ca. 20 - 30% deutlich schwächer. Durch den Einsatz der siRNA gegen Survivin-2B wurde die mRNA der Haupt-Splicevariante mit einer Abnahme von ca. 10% kaum, die mRNA von Survivin-2B hingegen deutlich um 60 - 90% in Abhängigkeit der Inkubationszeit reduziert. Diese Herunterregulierung führte auch zu einer deutlichen Reduktion der Proteinexpression beider Proteine. Die Transfektion von NT2-Zellen mit der siRNA gegen Survivin reduzierte die Expression von Survivin auf Proteinebene in Anhängigkeit von der Inkubationszeit deutlich um 80 - 92%, wohingegen die Expression von Survivin-2B auf Proteinebene mit einer Herunterregulierung von 0 - 20% deutlich geringer beeinflusst wurde. Nach der Transfektion von NT2-Zellen mit der siRNA gegen Survivin-2B war eine zum Teil nicht unerhebliche Regulierung der Expression von Survivin zu beobachten, welche zwischen einer Zunahme von 20% nach 24 h Inkubation und einer Abnahme der Expression von 50% nach 48 h Inkubation schwankte. In Bezug auf die

Expression von Survivin-2B auf Proteinebene nach der Transfektion der NT2-Zellen mit der siRNA gegen Survivin-2B war hingegen eine deutliche Abnahme der Expressionsstärke von 20 - 70% im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen zu erkennen. Die Beobachtungen, dass durch den Einsatz einer der beiden spezifischen siRNAs gegen Survivin oder Survivin-2B in den KZT-Zellen beide Isoformen von Survivin auf Proteinebene reguliert werden, könnten Effekte der Selbstregulation von Survivin sein. Es ist bereits nachgewiesen, dass die unterschiedlichen Isoformen von Survivin über Dimerisierung miteinander in Wechselwirkung treten können. Es wird angenommen, dass über ein so entstehendes „Netzwerk“ die funktionale Aktivität einzelner Isoformen reguliert werden kann (174,176). Die gewonnen Ergebnisse dieser Arbeit könnten darauf hindeuten, dass es durch einen Eingriff in dieses Netzwerk zu regulatorischen Effekten abseits der spezifischen Interaktionen kommen kann.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zur Inhibition der mRNA-Synthese von Survivin und Survivin-2B durch YM155 zeigten geringere Effekte. Nach 48 h Inkubation konnte eine Abnahme der Survivin-mRNA um 30 - 40% und eine Abnahme der Survivin-2B-mRNA um maximal 10% beobachtet werden. Auf Protein-Ebene konnte nur in den Cisplatin-sensitiven NT2-Zellen eine Abnahme der Proteinexpression von Survivin um 30% festgestellt werden. Für die Expression von Survivin-2B in beiden Zelllinien und für Survivin in den Cisplatin-resistenten Zellen zeigte sich kein eindeutiges Muster einer Regulation. Obwohl die Ergebnisse dieser Arbeit dies durch die Untersuchung der mRNA-Expression nach einer YM155-behandlung nicht bestätigen konnten, ist bekannt, dass YM155 die Promotoraktivität von Survivin inhibiert und so dessen Expression unterdrückt. In der Arbeit von Nakahara et al. wurde postuliert, dass YM155 die Bindung des Transkriptionsfaktors Sp1 an den Survivin-Promotor blockiert und so seine Transkription hemmt (177). Eine jüngere Arbeit aus derselben Arbeitsgruppe zum Wirkmechanismus von YM155 von Yamauchi et al. konnte nachweisen, dass das Molekül direkt an ILF3 bindet (*interleukin enhancer-binding factor 3*). Dieser Faktor bindet normalerweise an $p54^{nrb}$ (*Non-POU domain-containing octamer-binding protein*) und reguliert als Teil dieses Komplexes die Transkription des Survivin-Gens. Wird diese Bindung durch YM155 gestört, kommt es zu einer Inhibition der Transkription von Survivin in den Zellen (178). In verschiedenen Tumorzellen konnte durch eine Behandlung mit YM155 nicht nur eine antiproliferative Wirkung und die Induktion von Apoptose beobachtet (146–149,151,179), sondern auch eine Sensibilisierung der Zellen gegenüber unterschiedlichen Chemo-therapeutika hervorgerufen werden (152–154). In der Arbeit von Kumar et al. wurden

Plattenepithelkarzinom-Zellen mittels einer durch YM155 hervorgerufenen Herunterregulierung von zytoplasmatischem Survivin erneut gegenüber einer Behandlung mit Cisplatin sensibilisiert (152). Als Antitumortherapeutikum befindet sich YM155 bereits in fortgeschrittener klinischer Testung. Die neueste Phase I/II-Studie zum Nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom untersuchte die Wirkung von YM155 alleine in 19 Patienten mit fortgeschrittenem Stadium, die noch keine Therapie erhalten hatten, und die Wirkung einer Platin-kombinierten Therapie in 22 Patienten mit refraktären Tumoren. Von den 19 Patienten, die mit der Monotherapie behandelt wurden, konnte bei zwei Patienten eine Teilremission und bei zehn Patienten eine Stabilisierung des Krankheitsverlaufs festgestellt werden. Bei den mit der Kombinations-therapie behandelten Patienten mit den refraktären Tumoren, konnte ebenfalls bei knapp 50% ein Fortschreiten der Krankheit aufgehalten werden (161). Die IC_{50}-Konzentrationen für YM155 in KZT-Zelllinien, welche in dieser Arbeit bestimmt werden konnten, liegen im niedrigen nanomolaren Bereich (0,8 nM - 2,6 nM). Konzentrationen, welche im Plasma bei Patienten erreicht werden können, liegen hingegen bei 10 - 20 nM und somit 10- bis 20-fach höher (159). Es konnte in zwei von drei untersuchten KZT-Zelllinienpärchen keine Kreuzresistenz zwischen Cisplatin und YM155 festgestellt werden. Im Vergleich der NCCIT- und NCCIT-R-Zellen ist die Resistenz der R-Linie gegenüber YM155 doppelt so hoch wie bei den NCCIT-Zellen (1,3 nM bzw. 2,6 nM). Die Resistenz gegenüber Cisplatin ist fast dreimal so hoch in den NCCIT-R-Zellen, verglichen mit den NCCIT-Zellen (1,7 µM bzw. 5 µM). Somit wäre YM155 als Survivin-Inhibitor zur Umgehung von Cisplatin-Resistenzen auch für einen klinischen Einsatz bei KZT-Patienten denkbar.

Aber nicht nur YM155, sondern auch Antisense-Oligonukleotide gegen Survivin, die über den Mechanismus der RNA-Interferenz Wirkung zeigen, wurden in vielen experimentellen Ansätzen untersucht und befinden sich bereits in klinischer Testung. Die ersten Untersuchungen zur proapototischen Wirkung eines Antisense-Oligonukleotids zur Survivin-mRNA von Li et al. bzw. Grossman et al. zeigten, dass die Herunterregulierung von Survivin alleine schon ausreichend ist, um sowohl in Zervixkarzinom-, als auch Melanomzellen Apoptose zu induzieren (124,180). Es konnte auch in mehreren Studien eine Apoptose-fördernde Wirkung einer RNA-Interferenz-basierten Inhibition von Survivin in Kombination mit Chemo- oder Radiotherapie in Tumorzellen nachgewiesen werden (107,108,110,111,119,120). In einer klinischen Phase I-Studie mit Patienten in einem fortgeschrittenen Tumorstadium wurde eine zur Stabilisierung modifizierte Form des

Antisense-Oligonukleotids von Li et al., mit der Bezeichnung LY2181308 untersucht. Diese zeigte sowohl eine spezifische Herunterregulierung von Survivin, als auch gute Verträglichkeit (122). Auch ein weiteres Antisense-Oligonukleotid namens SPC3042 befindet sich mittlerweile in einer klinischen Phase I-Studie und zeigt ebenfalls ein gutes Sicherheitsprofil (123,181).
Die spezifische Inhibition von Survivin und Survivin-2B durch RNA-Interferenz oder mittels Einsatz von YM155 sollte in der vorliegenden Arbeit verwendet werden, um eine mögliche Rolle von Survivin und Survivin-2B bei der Entwicklung von Resistenzmechanismen gegenüber Cisplatin in KZT-Zellen zu untersuchen, sowie den Effekt der Herunterregulierung dieser Proteine als therapeutischen Ansatz zu analysieren.

4.3 Die Rolle von Survivin und Survivin-2B in der Proliferation von KZT-Zelllinien

Die Ergebnisse zur Wirkung einer Inhibition on Survivin hinsichtlich der Proliferation von KZT-Zellen zeigten, dass sowohl die Behandlung der Zellen mit der siRNA gegen Survivin, als auch eine Behandlung mit YM155 eine starke antiproliferative Wirkung hatte. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit der Tatsache, dass Survivin eine wichtige Rolle bei der Mitose spielt (182). Eine Inhibition von Survivin führt nicht nur zu einer fehlerhaften Verteilung der Chromosomen während der Mitose, sondern auch zu einer unvollständigen Zytokinese und anschließend zum Zelltod (87–89). In den in dieser Arbeit untersuchten KZT-Zelllinien konnte durch den Einsatz einer spezifischen siRNA gegen Survivin eine Proliferationshemmung von minimal 42% (2102Ep) bis maximal 63% (NCCIT-R) hervorgerufen werden, was einem Mittel von 48,5% entspricht. Die Herunterregulierung von Survivin-2B durch siRNA ergab eine Inhibition der Proliferation von minimal 1% (NT2-R) bis maximal 33% (2102Ep-R), was einem Durchschnitt von 15,8% entspricht. Somit war der antiproliferative Effekt einer Hemmung deutlich geringer. Diese Ergebnisse bestätigt die bisher allgemeingültige These, dass Survivin sowohl bei der Apoptose, als auch bei der Mitose von Zellen eine wichtige Rolle spielt (98), wohingegen für Survivin-2B, das vornehmlich im Zytoplasma lokalisiert ist, eine Rolle ausschließlich bei der Apoptose vermutet wird (172).
Auch durch eine Behandlung der Zellen mit der entsprechenden IC_{50} für YM155 konnte die Anzahl an lebensfähigen Zellen signifikant reduziert werden (im Mittel um 53,1%). Bei diesen Untersuchungen zeigte sich die Kombination von YM155 und Cisplatin als sehr effektiv und konnte die Anzahl an lebensfähigen Zellen um bis zu 73% reduzieren (im Durchschnitt sogar

um 69%), so dass hier von einem Synergismus ausgegangen werden kann. In den Cisplatin-resistenten Zelllinien konnte durch eine Kombination von YM155 und der IC_{50} für Cisplatin der jeweiligen sensitiven Linien ein stärkerer antiproliferativer Effekt beobachtet werden, als durch die Behandlung der Zellen mit der Cisplatin-IC_{50} für die sensitiven Linien alleine. Im Vergleich zu einer Cisplatin-Behandlung der Cisplatin-resistenten Zellen mit der IC_{50} für die Cisplatin-sensitiven Zellen alleine, lag die zusätzliche Hemmung durch eine kombinierte Behandlung der Zellen mit dieser Cisplatin-Konzentration und der IC_{50} für YM155 bei durchschnittlich 13,7%, was darauf schließen lässt, dass durch eine Behandlung der Cisplatin-resistenten Zellen mit YM155 die Cisplatin-Resistenz teilweise aufgehoben werden kann.
In Bezug auf die Untersuchung von Survivin in Zusammenhang mit der Wirkung einer Cisplatin-Behandlung konnte festgestellt werden, dass beide Ansätze zur Inhibition von Survivin einen verstärkenden Effekt auf die Behandlung von KZT-Zellen mit Cisplatin zeigten. Sowohl in Kombination mit der siRNA, als auch mit YM155 konnte durch eine Cisplatin-Behandlung der Zellen die Anzahl an lebensfähigen Zellen signifikant reduziert werden, verglichen mit einer alleinigen Behandlung der Zellen mit Cisplatin. In der Arbeit von Iwasa et al. (179) wurde gezeigt, dass eine Inhibition von Survivin durch YM155 die DNA-Reparatur nach Platin-basierten DNA-Schäden in Bronchialkarzinomzellen hemmt und dass eine kombinierte Therapie mit YM155 und Platinverbindungen Apoptose in den behandelten Zellen induzieren konnte. Ob die Verringerung der Anzahl an lebensfähigen KZT-Zellen nach der Inhibition von Survivin und Survivn-2B durch YM155 oder RNA-Interferenz auf einen antiproliferativen Effekt allein, oder auch auf die Induktion von Apoptose in den Zellen zurückzuführen war, wurde in dieser Arbeit durchflusszytometrisch mittels Zellzyklus-Analysen und Apoptose-Assays untersucht. Die Ergebnisse sollen im Folgenden näher betrachtet werden.

4.4 Die Rolle von Survivin und Survivin-2B im Zellzyklus und der Apoptose-Induktion von KZT-Zellen

Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass eine Behandlung von KZT-Zelllinien mit Cisplatin erst einen G2/M-Arrest in den Zellen auslöst, von welchem aus die Zellen in die Apoptose gehen (60), was auch in den Versuchen dieser Arbeit bestätigt werden konnte. Bei den Analysen zur Zellzyklusverteilung der Zellen stellte sich heraus, dass eine gezielte Inhibition

von Survivin oder Survivin-2B alleine schon ausreichte, um einen G2/M-Arrest in den Zellen hervorzurufen. Dabei löste die Inhibition von Survivin im selben Maße einen G2/M-Arrest in den Zellen aus, wie eine Behandlung der Zellen mit der niedrigen Cisplatin-Dosis der IC_{50} für die Cisplatin-sensitiven Zellen (jeweils ca. 10% Zunahme). Die Behandlung der Cisplatin-resistenten Zellen mit der hohen Cisplatin-Dosis erzeugte eine sehr starke Induktion eines G2/M-Arrests. Dieser starke Effekt konnte weder durch eine Inhibition von Survivin, noch durch die Inhibition von Survivin-2B noch verstärkt werden, wie es hingegen bei niedrigen Dosen von Cisplatin der Fall war. Die Herunterregulierung von Survivin-2B durch siRNA zeigte tendenziell geringere Effekte auf die Induktion eines G2/M-Arrests in den Zellen, konnte aber ebenfalls den Effekt einer Cisplatin-Behandlung mit der niedrigen IC_{50}-Dosis in den Zellen verstärken. Der Effekt des G2/M-Arrests wurde unter YM155 nicht beobachtet, was auf einen anderen Mechanismus der Apoptoseinduktion hindeuten könnte, der vom Zellzyklus unabhängig ist (möglicherweise direkte Vermittlung der Apoptose unter Umgehung des G2/M-Arrests?). Sowohl durch den Einsatz der siRNA gegen Survivin, als auch durch eine Behandlung der Zellen mit YM155 konnten außerdem die Effekte einer Cisplatin-Behandlung der Zellen deutlich verstärkt werden, wobei im gewählten *in vitro*-Modell die RNA-Interferenz größere Effekte erzielte, als die Inhibition von Survivin durch YM155.

In Bezug auf die Apoptoseinduktion konnte beobachtet werden, dass eine Behandlung der Cisplatin-sensitiven Zellen mit der siRNA gegen Survivin sowohl spontan, als auch in Kombination mit YM155 und Cisplatin (oder in Kombination mit beiden Substanzen) Apoptose auslöste. Die Apoptose-Induktion war sowohl in den Cisplatin-sensitiven, als auch in den -resistenten Zellen nach einer Kombination aller drei Ansätze (siRNA gegen Survivin, YM155 und Cisplatin) am stärksten. Dies könnte möglicherweise dafür sprechen, dass durch YM155 noch andere, hier nicht näher untersuchte anti-apoptotische Splicevarianten von Survivin (wie z.B. Survivin-2α oder Survivin-ΔEx3) gehemmt werden, was insbesondere dann den Effekt von Cisplatin verstärken dürfte, wenn der Großteil von Survivin bereits durch die siRNA herunterreguliert wurde. Eine Behandlung mit der siRNA gegen Survivin-2B hingegen hatte in den Cisplatin-sensitiven NT2-Zellen alleine keinen, und in Kombination mit der IC_{50} für Cisplatin nur einen mäßigen Effekt auf die Apoptoserate. Der Effekt der siRNA gegen Survivin-2B in den NT2-R-Zellen war sogar gegenläufig und verringerte die Apoptoserate nach der Behandlung der Zellen mit Cisplatin, was auf eine proapoptotische Funktion dieser Isoform hindeuten würde.

Generell lässt sich zusammenfassen, dass eine Inhibition von Survivin durch RNA-Interferenz oder durch den Einsatz von YM155 in KZT-Zellen sowohl eine antiproliferative, als auch eine G2/M-Arrest- und Apoptose-induzierende Wirkung hat, welche die Effekte einer Cisplatin-Behandlung der Zellen deutlich verstärken können. Alle Ergebnisse der vorgelegten Arbeit zu der Expression von Survivin in KZT-Zellen in Zusammenhang mit der Resistenz gegenüber Cisplatin stehen in Einklang zu bereits publizierten Ergebnissen für andere Entitäten. Auch Prostatakarzinom-, Magenkarzinom-, Lungenkarzinom- und Plattenepithel-karzinomzellen ließen sich durch eine Herunterregulierung von Survivin gegenüber einer entsprechenden Therapie mit Mikrotubuli-Hemmern, wie Paclitaxel oder Docetaxel (Taxane), bzw. den DNA-interkalierenden Substanzen Cisplatin oder Carboplatin sensibilisieren (108–111). Des Weiteren zeigten Überexpressionsversuche mit Survivin in murinen Fibroblasten (84) und humanen Zervixkarzinomzellen (88) eine gesteigerte Resistenz gegenüber einer Taxan-vermittelten Apoptose (Chemotherapeutikum) durch erhöhte Survivinlevel. Eine Studie mit gleich mehreren Krebszelllinien (Kolonkarzinom, Lungenkarzinom-, Prostatakarzinom-, Mammakarzinom- und Multiple Myelom-Zelllinien) brachte zum einen das Ergebnis, dass der Survivinstatus in den Zellen direkt von einer Regulation durch p53 abhängt. In p53-WT-Zellen (Wild-Typ) war die Survivin-Expression geringer, als in Zellen mit mutiertem, oder fehlendem p53. Des Weiteren waren die Zellen mit einem hohen Level an Survivin resistenter gegenüber einer Behandlung mit Bortezomib (Proteasom-Inhibitor), welche in sensitiven Zellen Apoptose auslöste. Eine Herunterregulation von Survivin durch RNA-Interferenz führte zu einer Sensibilisierung der resistenten Zellen gegenüber der Bortezomib-Behandlung (107). Eine weitere Arbeit mit Mammakarzinom-Zellen brachte die Erkenntnis, dass die Zellen durch eine Überexpression von Survivin ebenfalls resistent gegenüber einer Behandlung mit Tamoxifen wurden (119). In der Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine gezielte Hochregulierung von Survivin die Zellen resistenter und eine Herunterregulierung sensitiver gegenüber einer Tamoxifen-vermittelten Apoptose werden lässt.

4.5 Die Wirkung von Cisplatin auf die Expression von Survivin und Survivin-2B

In der Arbeit von Nakagawa et al. wurde bei Patienten mit Multiplem Myelom, welche nicht auf eine Behandlung mit Chemotherapeutika ansprachen, von einer Überexpression von

MDR1 (*multi drug resistance gene 1*) berichtet, welche sogar in über 50% der Fälle nach einer Chemotherapie noch anstieg. In dieser Patientengruppe konnte ebenfalls ein Anstieg der Survivin-Expression nach Chemotherapie festgestellt werden, was mit einer besonders schlechten Prognose für die Patienten korrelierte (183). Der direkte Einfluss einer Cisplatin-Behandlung auf die Expression von Survivin und Survivin-2B in KZT-Zellen wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls untersucht. Hierbei zeigte sich auf Proteinebene eine deutliche Zunahme der Survivin-Expression nach einer Behandlung der NT2- und NT2-R- Zellen mit Cisplatin. Die Frage, ob diese Hochregulierung ein Mechanismus zum Schutz der Zellen vor der Cisplatin-vermittelten Apoptose, oder der Tatsache geschuldet ist, dass die Zellen zuvor in einen G2/M-Arrest gehen, in welchem die Expression von Survivin generell am stärksten ist, bleibt offen. Die Beobachtung, dass Survivin nach einer Cisplatin-Behandlung von KZT-Zellen zwar auf Proteinebene, aber nicht auf mRNA-Ebene hochreguliert wird, belegt eine Regulation auf translationaler Ebene und lässt vermuten, dass die Akkumulation von Survivin hauptsächlich mit dem Arrest der Zellen in der G2/M-Phase zusammenhängt, und nur zum Teil mit seiner antiapoptotischen Funktion. Die Ergebnisse der hier vorgelegten Arbeit zur Bestimmung der zellulären Lokalisation sprechen ebenfalls für eine wichtige Rolle von Survivin in beiden Abläufen der Zelle – der Mitose und auch der Apoptose-Inhibition. Es war zwar bei allen drei Zelllinien-Pärchen eine eindeutige Tendenz für eine vorwiegend zytoplasmatische Lokalisation von Survivin erkennbar, doch auch in den nukleären Proteinfraktionen ließ sich eine starke Survivin-Expression nachweisen.

Die Expression von Survivin-2B auf mRNA-Ebene erhöhte sich nach einer Behandlung der NT2-Zellen mit Cisplatin leicht, während in den NT2-R-Zellen schwache gegenläufige Tendenzen beobachtet werden konnten. Auch auf Proteinebene war nach einer Cisplatin-Behandlung der NT2-Zellen eine deutliche Zunahme an Survivin-2B zu verzeichnen. In den NT2-R-Zellen bestätigte sich der Trend auf mRNA-Ebene und es war nach der Behandlung der Zellen mit Cisplatin eine Abnahme von Survivin-2B festzustellen. Die Regulation in den NT2-Zellen könnte mit einer antiapoptotischen Rolle von Survivin-2B zum Schutz der Zellen interpretiert werden, wohingegen die Herunterregulierung dieser Isoform in den NT2-R-Zellen nach einer Cisplatin-behandlung dagegen sprechen würde.

4.6 Ergebnisse zur Langzeitwirkung einer Survivin-Inhibition auf KZT-Zellen

Durch Untersuchungen zur Koloniebildung von KZT-Zellen nach einer Inhibition von Survivin durch YM155, einer Behandlung mit Cisplatin oder einer Kombination beider Substanzen sollten die Langzeitwirkungen dieser Behandlungen aufgeklärt werden. Durch den Einsatz von YM155 konnte in allen untersuchten Zelllinien die Koloniebildung signifikant um bis zu 84% reduziert werden. Auch die Behandlung der Zellen mit Cisplatin zeigten deutliche Langzeiteffekte. Es konnte festgestellt werden, dass eine Behandlung der Zellen mit der IC_{50}, welche für eine Inkubation der Zellen über 48 h festgelegt wurde, die Koloniebildung bereits vollständig inhibieren konnte. Die Auswirkungen der durch Cisplatin hervorgerufenen DNA-Schäden haben im Langzeitversuch (48 h Inkubation + 10 Tage „Erholung“) eine wesentlich größere Wirkung, als direkt nach einer 48 stündigen Inkubation (69). Dennoch konnte auch hier eine deutliche Tendenz zu verstärkter Wirkung einer kombinierten Therapie mit Cisplatin und YM155 beobachtet werden.

4.7 Zusammenfassung der Erkenntnisse zu der Funktion von Survivin und Survivin-2B in KZT-Zellen

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass alle untersuchten KZT-Zelllinien Survivin exprimieren. Cisplatin-resistente Zellen zeigen eine Tendenz zu einer höheren Expression des Proteins. Die Inhibition von Survivin in KZT-Zellen an sich wirkt antiproliferativ, löst einen G2/M-Arrest und Apoptose aus und inhibiert die Koloniebildung. Alle genannten Effekte lassen sich durch eine zusätzliche Kombination mit einer Cisplatin-Behandlung noch deutlich verstärken. Eine Inhibition von Survivin durch RNA-Interferenz oder YM155 kann in KZT einen effektiven und erfolgreichen Ansatz zur Umgehung einer Cisplatin-Resistenz darstellen Survivin ist somit ein geeignetes Target bei der Erforschung von neuen Therapieansätzen zur Umgehung der Cisplatin-Resistenz bei KZT.

Die Ergebnisse zur Untersuchung der Rolle von Survivin-2B in KZT-Zelllinien sind weniger eindeutig. Eine Erhöhung der Expression von Survivin-2B auf mRNA- und Proteinebene wurde in Cisplatin-resistenten Zellen nachgewiesen, was eine antiapoptotische Funktion des Proteins vermuten lässt. In dieselbe Richtung gehen die Untersuchungen zur Lokalisation des Proteins in den Zellen. Der Nachweis einer vornehmlichen Lokalisation von Survivin-2B im Zytoplasma

der Zellen spricht ebenfalls für eine Rolle von Survivin-2B in der Regulierung der Apoptose. Gegen eine antiapoptotische Funktion des Proteins sprechen jedoch die Ergebnisse zur Untersuchung der Wirkung einer Inhibition von Survivin-2B in diesen Zellen. Es konnten nur mäßige Effekte durch eine Herunterregulierung von Survivin-2B auf die Proliferation der Zellen und die Induktionen eines G2/M-Arrests oder der Apoptose beobachtet werden. In den Cisplatin-resistenten NT2-R-Zellen konnte sogar ein leichter antiapoptotischer Effekt nach einer Herunterregulierung von Survivin-2B und einer zusätzlichen Behandlung der Zellen beobachtet werden, was wiederum für eine proapoptotische Funktion dieser Isoform sprechen würde. Auch in der Literatur finden sich widersprüchliche Aussagen zur Funktion und der damit bedingten zellulären Lokalisation von Survivin-2B in Tumorzellen. In der Arbeit von Knauer et al. zur Lokalisation von Survivin-2B und Survivin-3B in Zervixkarzinomzellen wurde berichtet, dass neben Survivin nur die Isoformen Survivin-2B und Survivin-3B über ein *nuclear export signal* verfügen und somit sowohl im Zellkern, als auch im Zytoplasma zu finden sind (100). In einer Veröffentlichung von Caldas et al. (184) wurde postuliert, dass die Isoformen Survivin-2B und Survivin-ΔEx3 über die Ausbildung von Heterodimeren mit Survivin dessen Funktion steuern und so sowohl die Proliferation, als auch die Apoptoserate von Daoy-Zellen (Medulloblastom-Zelllinie) beeinflussen können. In ALL-Zellen (Akute lymphatische Leukämie) konnte nachgewiesen werden, dass die Survivin-Expression unter Doxorubicin herunterreguliert, Survivin-2B während einer Doxorubicin-vermittelten Apoptose jedoch verstärkt exprimiert wurde, was für eine proapoptotische Funktion dieser Isoform sprechen würde (172). Im direkten Gegensatz dazu wurde in der Arbeit von Jacob et al. von einem inhibitorischen Effekt einer Überexpression von Survivin und Survivin-2B auf eine Doxorubicin-vermittelte Apoptose in Prostatakarzinom-Zellen berichtet (175). In der gleichen Arbeit wurde auch eine Rolle von Survivin-2B bei der Mitose in diesen Zellen ausgeschlossen, obwohl ein überexprimiertes Fusionsprotein aus Survivin-2B und einem Hämagglutinin-Signalpeptid sowohl im Zytoplasma, als auch im Nucleus lokalisiert werden konnte. Eine Überexpression von EGFP-Survivin-2B in HeLa-Zellen zeigte eine Lokalisation der Isoform in den Mitochondrien (99), wohingegen der erste Bericht von Survivin-2B von Mahotka et al. eine Lokalisation von Survivin-2B im Zytoplasma beschrieb (174). Auch in der Arbeit von Ling et al. konnte durch Überexpression von Survivin-2B eine mitochondriale Lokalisation von Survivin-2B gezeigt werden. Des Weiteren wurde auch eine Lokalisation an den Mikrotubuli-organisierenden Zentren (*microtubule organization center*, MTOC) beobachtet. Außerdem berichteten Ling et

al. nach der Überexpression von Survivin-2B von der Abnahme der mitotischen Zellpopulation, einer Blockade der Tubulin-Polymerisation und von der Induktion der mitochondrialen Apoptose. Die Autoren postulierten deshalb Survivin-2B als mögliches Tumorsuppressor-protein (173). In den Untersuchungen von Vivas-Mejia et al. zeigte der Vergleich von Ovarialkarzinomzellen, welche sich gegenüber einer Behandlung mit Taxanen sensitiv oder resistenten zeigten, eine deutlich gesteigerte Expression von Survivin-2B in den Taxan-resistenten Zellen. Des Weiteren gelang es der Arbeitsgruppe, die resistenten Zellen *in vitro* durch eine RNAi-vermittelte (RNA-Interferenz) Herunterregulierung der Survivin-2B-mRNA für eine Behandlung mit einem Taxan (Docetaxel) zu sensibilisieren, was sich auch *in vivo* bei Experimenten mit Nacktmäusen bestätigte. Hier führte die Herunterregulierung der Survivin 2B-mRNA zu einem verringerten Tumorwachstum und zu einem besseren Ansprechen auf eine Behandlung mit Docetaxel (185). Ein möglicher Grund für die sehr widersprüchlichen Ergebnisse zur Lokalisation und Funktion von Survivin-2B könnte im Versuchsaufbau vieler Experimente zu finden sein. Funktionelle Untersuchungen mit Hilfe eines Überexpressionssystems sind immer anfällig für die Generierung von Artefakten, da sie nicht den physiologischen Zustand der Zelle beschreiben, sondern die Menge an gebildetem Protein so erhöhen, dass ein künstliches Milieu generiert wird. Um verlässlichere Aussagen über die Funktion von Survivin-2B zu generieren, wäre es sicher sinnvoll, auf die Untersuchung des endogenen Proteins zurückzugreifen, soweit das möglich ist. Die Rolle von Survivin-2B in Tumorzellen konnte bis dato nicht hinreichend aufgeklärt werden und bedarf weiterer intensiver Forschung.

4.8 Die Expression von Survivin und Survivin-2B in KZT

Sowohl bei der Untersuchung von gesundem Hodengewebe, als auch in KZT-Proben unterschiedlicher Histologie konnte in der vorliegenden Arbeit mittels immunhistochemischer Färbungsanalysen eine Expression für Survivin und Survivin-2B nachgewiesen werden. Die generelle Expression von Survivin und Survivin-2B in Leydig-Zellen, Sertoli-Zellen und Spermatogonien kann auf die Besonderheit dieses Gewebes zurückgeführt werden. Zum einen handelt es sich hierbei mitunter um proliferierende Zelltypen, in denen Survivin während der Mitose eine tragende Rolle spielt. Zum anderen könnte es bei Spermatogonien im Gegensatz zu somatischen ausdifferenzierten Geweben eines besonderen Schutzes der

Zellen vor Apoptose bedürfen. In den Arbeiten von Wang et al. und Weikert et al. (186,187) konnte zudem eine zyklische Expression von Survivin in Ratten- und humanem Hodengewebe nachgewiesen werden, welche an die Dynamiken der Keim- und Leydig-Zell-Populationen geknüpft waren. Diese zyklische Expression von Survivin korrelierte mit der Spermatogenese und wurde mit einer Rolle des Proteins in der Meiose in Verbindung gebracht. Die starke Expression von Survivin in CIS-Zellen, den Vorläuferzellen von KZT lässt sich ebenfalls mit den beiden Funktionen des Proteins in der Proliferation (Mitose) und dem Apoptoseschutz vereinbaren. Denkbar wäre allerdings auch, wie bereits für viele andere Tumorentitäten nachgewiesen, dass die gesteigerte Expression von Survivin und Survivin-2B in KZT in Zusammenhang mit der malignen Transformation dieser Gewebe steht. Bei der Analyse von normalen und Tumorgeweben konnten Spaulding et al. (188) eine Expression von Survivin auf Proteinebene sowohl in epithelialen und weiteren proliferierenden Zellen wie Thymuszellen und Spermatogonien, aber auch in allen untersuchten Tumorgeweben nachweisen. Schon die erste Untersuchung von Survivin im Jahre 1997 brachte dessen Expression direkt mit der malignen Transformation von Zellen in Verbindung (79), und etliche weitere Studien bestätigten diese Verbindung (83,101–106,166,183,189–191). In der Arbeit von Mull et al. (165) wurde gezeigt, dass auch humane embryonale Stammzellen, welche wie bereits erwähnt als nicht-maligner Gegenpart zu humanen Embryonalkarzinomzellen gelten, die Isoformen von Survivin exprimiert werden. Sowohl für Survivin, als auch für Survivin-2B konnte eine nukleäre, aber auch eine zytoplasmatische Lokalisation nachgewiesen werden, was mit den Ergebnissen dieser Arbeit zu KZT in Einklang steht. Beim Vergleich der nukleären Expression von Survivin in Cisplatin-sensitiven und -resistenten KZT konnte ein signifikanter Unterschied in der Expressionsstärke festgestellt werden. Fasst man die beiden stärksten Färbungsintensitäten der Analyse zusammen, so ergibt sich für die Cisplatin-sensitiven Tumore ein Anteil von 69% und für die Cisplatin-resistenten Tumore ein Anteil von 84% in Bezug auf alle untersuchten Tumorproben. Auch in der Expressionsstärke von zytoplasmatischem Survivin konnte eine tendenziell höhere Expression in den Cisplatin-resistenten Tumoren beobachtet werden. Wie bereits erwähnt, konnte die Arbeit von Juliachs et al. (168) nachweisen, dass in Cisplatin-resistenten KZT-Zelllinien der PDGFRβ-AKT Signalweg verstärkt aktiv ist, was wiederum ein Grund für eine gesteigerte Survivin-Expression sein kann, wie in den Arbeiten von Zhao et al. und Sun et al. (169,170) festgestellt wurde. Die verstärkte Expression von Survivin in Cisplatin-resistenten KZT, sowohl nukleär als auch zytoplasmatisch,

könnte also ebenso mit der gesteigerten Aktivität des PDGFRβ-AKT Signalwegs in Zusammenhang stehen, was im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht weiter untersucht wurde. Beim Vergleich der nukleären Survivin-Färbung konnte ebenfalls ein Zusammenhang zwischen der Färbungsintensität und der Aggressivität der Histologie in den untersuchten KZT festgestellt werden. Die Intensität der nukleären Survivin-Färbung war in Nicht-Seminom-Proben (Embryonalkarzinome, Dottersacktumore und Chorionkarzinome) signifikant erhöht im Vergleich zu den CIS-Zellen, also die Vorläuferzellen dieser Tumore enthielten ($p < 0,05$). Die Färbungsintensität für nukleäres Survivin in den Chorionkarzinomen, also den aggressivsten Tumoren dieser Gruppe, war am stärksten. Der Vergleich der Färbungsintensität der weniger aggressiven Seminome und der Proben mit CIS-Zellen zeigte hingegen keine statistischen Unterschiede. Der genaue Mechanismus, der hinter der gesteigerten nukleären Expression von Survivin steht, muss derzeit offen bleiben. Denkbar wäre die generell höhere Proliferationsrate aggressiverer Tumore, in welcher Survivin als Teil des *chromosomal passenger complex* (CPC) während der Mitose eins der wichtigsten Proteine ist. Die yergleichende Analyse von Li et al. (192) von mehreren Studien zur Aussage einer nukleären Survivin-Färbung und der Prognose für Tumorpatienten kam zu dem Schluss, dass in 9 von 14 Studien der Nachweis einer solchen Färbung einen ungünstigen Faktor darstellt, wohingegen die übrigen 5 Studien zum gegenteiligen Schluss kamen. In Bezug auf eine zytoplasmatische Survivin-Expression in KZT konnte im Rahmen dieser Arbeit in allen untersuchten KZT-Proben unterschiedlicher Histologie mit Anteilen von 72 - 92% eine sehr starke Färbung beobachtet werden. Hierbei zeigte der Vergleich der Färbungsintensität zwischen KZT-Proben mit CIS-Zellen und Seminom-Proben statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$), der Vergleich zwischen KZT-Proben mit CIS-Zellen und Nicht-Seminom-Proben jedoch nicht. Die nukleäre und zytoplasmatische Färbung für Survivin-2B war weit weniger einheitlich und auch weniger intensiv, als die der entsprechenden Färbung für Survivin, was in Einklang damit steht, dass die Expression der Splicevarianten von Survivin im allgemeinen schwächer ist, als die der Haupt-Splicevariante (98,100). Verglichen mit KZT-Proben mit Anteilen von CIS-Zellen war die Färbung für nukleäres Survivin in den Seminom-Proben statistisch signifikant erhöht ($p < 0,05$). In Bezug auf die Aggressivität der Nicht-Seminome korrelierte eine Zunahme der Färbungsintensität für nukleäres Survivin-2B mit der Aggressivität. Zieht man die starken und die moderat gefärbten Anteile zusammen, so zeigte sich die Färbung in Embryonalkarzinomen am schwächsten und nahm über die Dottersacktumore bis hin zu den Chorionkarzinomen

deutlich zu. Bei dem Vergleich der Färbungsintensitäten für zytoplasmatisches Survivin konnten sowohl zwischen den KZT-Proben mit CIS-Zellen und den Seminom-Proben, als auch bei dem Vergleich der CIS-Zellen und den Nicht-Seminom-Proben (Embryonalkarzinome, Dottersacktumore und Chorionkarzinome) statistisch signifikante Unterschiede festgestellt werden ($p < 0,05$). Auch der Vergleich der Färbungsintensität zwischen den Seminom- und den Nicht-Seminom-Proben (Embryonalkarzinome, Dottersacktumore und Chorionkarzinome) zeigte Unterschiede mit statistischer Signifikanz ($p < 0,05$). Mit steigender Aggressivität der Tumore konnte eine eindeutige Zunahme der Färbungsintensität für zytoplasmatisches Survivin-2B festgestellt werden (Proben mit CIS-Zellen < Seminom-Proben < Embryonal-karzinom-Proben/Dottersacktumor-Proben < Chorionkarzinom-Proben). Generell kann in aggressiven, schnell proliferierenden Tumoren eine erhöhte Apoptoserate gefunden werden. Auf die steigende Expression von Survivin-2B in KZT mit aggressiverer Histologie angewendet, würde das für eine proapoptotische Rolle von Survivin-2B sprechen, was allerdings, wie bereits in 4.7 diskutiert, in den Untersuchungen zu KZT-Zelllinien nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte. In der Literatur finden sich z.T. widersprüchliche Aussagen in Bezug auf einem Zusammenhang zwischen der Expressionsstärke von Survivin-2B und sowohl der Aggressivität oder der Differenzierung von Tumoren, als auch zur Prognose für die Patienten. Die Ergebnisse dieser Arbeit stehen in Einklang mir Erkenntnissen von Studien zu Magenkarzinomen, wo nachgewiesen werden konnte, dass die gesteigerte Expression von Survivin-2B sowohl mit dem Tumorstadium, als auch mit der histologischen Typisierung der Tumore korreliert (193,194). Eine Untersuchung von Mammakarzinom-Proben hingegen zeigte den Zusammenhang einer niedrigen Survivin-2B-Expression mit einer größeren Anzahl von befallenen Lymphknoten (114). In Blasen-und Nierenzellkarzinomen wurde ebenfalls eine geringe Survivin-2B-Expression auf mRNA-Ebene mit einem fortgeschrittenen klinischen Stadium in Verbindung gebracht (93,195). Und auch die Ergebnisse eine Studie zum kleinzelligen Bronchialkarzinom gingen in die gleiche Richtung und korrelierten eine gesteigerte Expression von Survivin-2B mit einem rezidivfreien Überleben der Patienten (196).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass in allen untersuchten KZT-Geweben eine sowohl nukleäre, als auch zytoplasmatische Expression von Survivin und Survivin-2B nachgewiesen werden konnte. Beim Vergleich zwischen Cisplatin-sensitiven und -resistenten Tumoren konnte eine Korrelation der Expressionsstärke von Survivin und der Cisplatin-Resistenz festgestellt werden. Des Weiteren korrelierte die Expressionsstärke von zytoplasmatischem

Survivin-2B mit der Aggressivität der Histologie der untersuchten KZT-Proben. Beide Beobachtungen sollten auf ihr Potential als prognostischer Faktor in Bezug auf ein Ansprechen der Tumore auf eine Cisplatin-basierte Chemotherapie bei KZT weiter getestet werden. Um diese Erkenntnisse zukünftig klinisch anwendbar zu machen, sollten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit in weiteren Studien mit größeren Patientenfallzahlen verifiziert werden.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich gerne bei den Menschen bedanken, die mich im Rahmen meiner Promotion unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt dabei PD Dr. Dr. Friedemann Honecker, für die Möglichkeit an diesem interessanten Thema arbeiten zu können und dafür, dass ich mich in den letzten Jahren jederzeit auf seine Unterstützung verlassen konnte. Die vielen Diskussionen, Denkanstöße und Korrekturen - von nah und fern - haben mich stets vorangebracht. Ich hoffe auch weiterhin auf eine Zusammenarbeit in netter und fruchtbarer Atmosphäre.

Ein weiterer Dank gilt Dr. Daniel Koychev, der maßgeblich daran beteiligt war, dass dieses Projekt überhaupt ins Leben gerufen wurde. Außerdem danke ich Ihm für die Starthilfe bei meiner Promotion.

Ich möchte mich sowohl bei der Werner-Otto-Stiftung, als auch bei dem Forschungs-förderungsfonds Medizin bedanken, welche die Arbeiten zu meiner Dissertation unterstützt haben.

Weiterhin möchte ich mich bei Prof. Dr. Carsten Bokemeyer dafür bedanken, dass ich meine Promotion in der II Medizinischen Klinik des UKE durchführen konnte und natürlich für seine Unterstützung und nicht zuletzt für die Übernahme der Gutachterfunktion für meine Dissertation.

Auch bei Prof. Dr. Thomas Dobner möchte ich mich dafür bedanken, dass er als einer meiner Dissertationsgutachter fungiert.

Bei PD Dr. Guni von Amsberg möchte ich mich für die nette Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und die große Unterstützung gerade in den letzten Monaten meiner Promotion bedanken.

Des Weiteren danke ich allen Mitgliedern der AG Honecker/von Amsberg für ihre stete Unterstützung und die vielen netten Stunden im Labor. Ein ganz besonderer Dank gilt dabei Dipl.-Ing. Jessica Hauschild. Ohne ihre große, tatkräftige Hilfe wäre die Schlacht sicherlich anders ausgegangen.

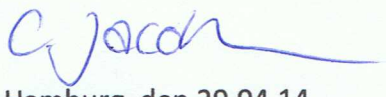
Auch bei allen weiteren Kollegen und Kolleginnen der II Medizinischen Klinik, die mich im Laufe meiner Promotion begleitet haben, möchte ich mich für die nette Zusammenarbeit bedanken.

Herausheben möchte ich hierbei besonders Dr. Jasmin Wellbrock und Dr. Kerstin Cornils, die mir nicht nur mit vielen fachlichen Ratschlägen, sondern auch in großer Freundschaft zur Seite gestanden und mich immer wieder aufgebaut haben.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die mir während der gesamten Zeit meiner Promotion beigestanden haben. Mein größter Dank gilt aber meinen Eltern, deren bedingungsloser Liebe und Unterstützung ich mir mein ganzes Leben sicher sein konnte. Auch bei Annika und Mo möchte ich mich ganz besonders bedanken, weil sie nicht nur viele nervenzehrende Zeiten mit mir durchgemacht, sondern auch viel dazu beigetragen haben, dass ich diese unbeschadet überstehen konnte. Ohne Euch vier wäre ich nicht da, wo ich jetzt bin. Danke!

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.



Hamburg, den 29.04.14

Abkürzungsverzeichnis

ad	Auffüllen auf (ein Volumen von)
ATCC	*American Type Culture Collection*
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
$CaCl_2$	Calciumdichlorid
CDDP	*cis*-Diamindichloroplatin(II)
cDNA	*complementary DNA* (komplementäre DNA)
cm	Zentimeter
cm^2	Quadratzentimeter
CO_2	Kohlendioxid
DMEM	*Dulbecco's Modified Eagle Medium*
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	*desoxyribonucleic acid* (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleotid-5'-Triphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
ECL	*enhanced chemoluminescence* (verbesserte Chemolumineszenz)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et altera (und andere)
FACS	*fluorescence activated cell sorting* (Durchflusszytometrie)
FBS	Fetales Bovines Serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm, mittlere Erdbeschleunigung

GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
G-Survivin	Gesamt-Survivin (alle Splicevarianten)
h	Stunde(n)
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HRP	*horseradish peroxidase* (Meerrettichperoxidase)
IC	inhibitorische Konzentration
kDa	Kilodalton
L	Liter
log	logarithmisch
M	molar
m	mili-, -Meter
µ	mikro-
min	Minute(n)
mol	Mol
mRNA	*messenger RNA* (Boten-RNA)
NaCl	Natriumchlorid
NaN_3	Natiumazid
NaOH	Natriumhydroxid
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	*polymerase chain reaction* (Polymerasekettenreaktion)
PI	Propidiumiodid
PS	Phosphatidylserin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	*ribonucleic acid* (Ribonukleinsäure)
RT	Raumtemperatur

RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
RT-qPCR	Reverse Transkriptase-quantitative PCR
s	Sekunde(n)
SDS	*sodium dodecyl sulfate* (Natrium-Dodecylsulfat)
siK	Kontroll-siRNA
siRNA	*small interfering RNA* (kurze interferierende RNA)
siSurvivin	siRNA, komplementär zu einem Teil der mRNA für Survivin HV
si2B	siRNA, komplementär zu einem Teil der mRNA für Survivin-2B
Survivin HV	Haupt-Splicevariante von Survivin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit 005% (v/v) Tween 20
TEMED	N,N,N´,N´-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	unter anderem
v/v	*volume per volume* (Volumen pro Volumen)
w/v	*weight per volume* (Gewicht pro Volumen)
YM155	Sepantroniumbromid
z.B.	zum Beispiel

Literaturverzeichnis

1. Donovan PJ. The germ cell--the mother of all stem cells. Int J Dev Biol. 1998;42:1043–50.

2. Wylie C. Germ cells. Curr Opin Genet Dev. 2000;10:410–3.

3. Oosterhuis JW, Looijenga LHJ. Testicular germ-cell tumours in a broader perspective. Nat Rev Cancer. 2005;5:210–22.

4. Gu Y, Runyan C, Shoemaker A, Surani A, Wylie C. Steel factor controls primordial germ cell survival and motility from the time of their specification in the allantois, and provides a continuous niche throughout their migration. Development. 2009;136:1295–303.

5. Honecker F, Stoop H, de Krijger RR, Chris Lau Y-F, Bokemeyer C, Looijenga LHJ. Pathobiological implications of the expression of markers of testicular carcinoma in situ by fetal germ cells. J Pathol. 2004;203:849–57.

6. Mamsen LS, Brøchner CB, Byskov AG, Møllgard K. The migration and loss of human primordial germ stem cells from the hind gut epithelium towards the gonadal ridge. Int J Dev Biol. 2012;56:771–8.

7. Kashimada K, Koopman P. Sry: the master switch in mammalian sex determination. Development. 2010;137:3921–30.

8. Brennan J, Capel B. One tissue, two fates: molecular genetic events that underlie testis versus ovary development. Nat Rev Genet. 2004;5:509–21.

9. De Jong FH. Inhibin. Physiol Rev. 1988;68:555–607.

10. O'Connor AE, De Kretser DM. Inhibins in normal male physiology. Semin Reprod Med. 2004;22:177–85.

11. Habert R, Lejeune H, Saez JM. Origin, differentiation and regulation of fetal and adult Leydig cells. Mol Cell Endocrinol. 2001;179:47–74.

12. Wilhelm D, Koopman P. The makings of maleness: towards an integrated view of male sexual development. Nat Rev Genet. 2006;7:620–31.

13. Zeeman A-M, Stoop H, Boter M, Gillis AJM, Castrillon DH, Oosterhuis JW, et al. VASA is a specific marker for both normal and malignant human germ cells. Lab Invest. 2002;82:159–66.

14. Van Der Zwan YG, Stoop H, Rossello F, White SJ, Looijenga LHJ. Role of epigenetics in the etiology of germ cell cancer. Int J Dev Biol. 2013;57:299–308.

15. Woodward P, Heidenreich A, Looijenga LH, Al. E. Pathology and Genetics of the Urinary and Male genital Organs. In: Eble J, Sauter G, Epstein J, Sesterhenn I, editors. World Heal Organ Tumors. Lyon; 2004. page 217–78.

16. Oosterhuis JW, Looijenga LH, Geurts van Kessel A, de Jong B. A cytogenetic classification of germ cell tumors, and its biological relevance. Eur Urol. 1993;23 Suppl 2:6–8.

17. Honecker F, Oosterhuis JW, Mayer F, Hartmann JT, Bokemeyer C, Looijenga LHJ. New insights into the pathology and molecular biology of human germ cell tumors. World J Urol. 2004;22:15–24.

18. Skakkebaek NE. Possible carcinoma-in-situ of the testis. Lancet. 1972;2:516–7.

19. Skakkebaek NE, Berthelsen JG, Giwercman A, Müller J. Carcinoma-in-situ of the testis: possible origin from gonocytes and precursor of all types of germ cell tumours except spermatocytoma. Int J Androl. 1987;10:19–28.

20. Jørgensen N, Rajpert-De Meyts E, Graem N, Müller J, Giwercman A, Skakkebaek NE. Expression of immunohistochemical markers for testicular carcinoma in situ by normal human fetal germ cells. Lab Invest. 1995;72:223–31.

21. Hoei-Hansen CE, Rajpert-De Meyts E, Daugaard G, Skakkebaek NE. Carcinoma in situ testis, the progenitor of testicular germ cell tumours: a clinical review. Ann Oncol. 2005;16:863–8.

22. Looijenga LHJ, Stoop H, de Leeuw HPJC, de Gouveia Brazao CA, Gillis AJM, van Roozendaal KEP, et al. POU5F1 (OCT3/4) identifies cells with pluripotent potential in human germ cell tumors. Cancer Res. 2003;63:2244–50.

23. Chaganti RS, Houldsworth J. Genetics and biology of adult human male germ cell tumors. Cancer Res. 2000;60:1475–82.

24. Rajpert-De Meyts E, Bartkova J, Samson M, Hoei-Hansen CE, Frydelund-Larsen L, Bartek J, et al. The emerging phenotype of the testicular carcinoma in situ germ cell. APMIS. 2003;111:267–78; discussion 278–9.

25. Looijenga LH, Gillis AJ, Van Putten WL, Oosterhuis JW. In situ numeric analysis of centromeric regions of chromosomes 1, 12, and 15 of seminomas, nonseminomatous germ cell tumors, and carcinoma in situ of human testis. Lab Invest. 1993;68:211–9.

26. Rajpert-De Meyts E, Kvist M, Skakkebaek NE. Heterogeneity of expression of immunohistochemical tumour markers in testicular carcinoma in situ: pathogenetic relevance. Virchows Arch. 1996;428:133–9.

27. Rajpert-De Meyts E, Skakkebaek NE. Expression of the c-kit protein product in carcinoma-in-situ and invasive testicular germ cell tumours. Int J Androl. 1994;17:85–92.

28. De Jong J, Stoop H, Dohle GR, Bangma CH, Kliffen M, van Esser JWJ, et al. Diagnostic value of OCT3/4 for pre-invasive and invasive testicular germ cell tumours. J Pathol. 2005;206:242–9.

29. Rübben H. Maligne Hodentumoren. Uroonkoloige. Springer Verlag; 2007. page 22–5.

30. ROSENBERG B, VANCAMP L, KRIGAS T. INHIBITION OF CELL DIVISION IN ESCHERICHIA COLI BY ELECTROLYSIS PRODUCTS FROM A PLATINUM ELECTRODE. Nature. 1965;205:698–9.

31. Rosenberg B, VanCamp L, Trosko JE, Mansour VH. Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. Nature. 1969;222:385–6.

32. Higby DJ, Wallace HJ, Albert DJ, Holland JF. Diaminodichloroplatinum: a phase I study showing responses in testicular and other tumors. Cancer. 1974;33:1219–5.

33. Ishida S, Lee J, Thiele DJ, Herskowitz I. Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99:14298–302.

34. Ott I, Gust R. Medizinische Chemie der Platinkomplexe: Besonderheiten anorganischer Zytostatika. Pharm Unserer Zeit. 2006;35:124–33.

35. Eastman A. Reevaluation of interaction of cis-dichloro(ethylenediamine)platinum(II) with DNA. Biochemistry. 1986;25:3912–5.

36. Eastman A. Activation of programmed cell death by anticancer agents: cisplatin as a model system. Cancer Cells. 2:275–80.

37. Masters JRW, Köberle B. Curing metastatic cancer: lessons from testicular germ-cell tumours. Nat Rev Cancer. 2003;3:517–25.

38. Schmoll HJ, Souchon R, Krege S, Albers P, Beyer J, Kollmannsberger C, et al. European consensus on diagnosis and treatment of germ cell cancer: a report of the European Germ Cell Cancer Consensus Group (EGCCCG). Ann Oncol. 2004;15:1377–99.

39. Williams SD, Birch R, Einhorn LH, Irwin L, Greco FA, Loehrer PJ. Treatment of disseminated germ-cell tumors with cisplatin, bleomycin, and either vinblastine or etoposide. N Engl J Med. 1987;316:1435–40.

40. Jones RH, Vasey PA. Part I: testicular cancer--management of early disease. Lancet Oncol. 2003;4:730–7.

41. Oosterhuis JW, Andrews PW, Knowles BB, Damjanov I. Effects of cis-platinum on embryonal carcinoma cell lines in vitro. Int J Cancer. 1984;34:133–9.

42. Parris CN, Arlett CF, Lehmann a R, Green MH, Masters JR. Differential sensitivities to gamma radiation of human bladder and testicular tumour cell lines. Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med. 1988;53:599–608.

43. Sugasawa K, Ng JM, Masutani C, Iwai S, van der Spek PJ, Eker a P, et al. Xeroderma pigmentosum group C protein complex is the initiator of global genome nucleotide excision repair. Mol Cell. 1998;2:223–32.

44. Kerley-Hamilton JS, Pike AM, Li N, DiRenzo J, Spinella MJ. A p53-dominant transcriptional response to cisplatin in testicular germ cell tumor-derived human embryonal carcinoma. Oncogene. 2005;24:6090–100.

45. Reed E. Platinum-DNA adduct, nucleotide excision repair and platinum based anti-cancer chemotherapy. Cancer Treat Rev. 1998;24:331–44.

46. Köberle B, Grimaldi KA, Sunters A, Hartley JA, Kelland LR, Masters JR. DNA repair capacity and cisplatin sensitivity of human testis tumour cells. Int J Cancer. 1997;70:551–5.

47. Aebi S, Kurdi-Haidar B, Gordon R, Cenni B, Zheng H, Fink D, et al. Loss of DNA mismatch repair in acquired resistance to cisplatin. Cancer Res. 1996;56:3087–90.

48. Fink D, Nebel S, Aebi S, Zheng H, Cenni B, Nehmé A, et al. The role of DNA mismatch repair in platinum drug resistance. Cancer Res. 1996;56:4881–6.

49. Honecker F, Wermann H, Mayer F, Gillis AJM, Stoop H, van Gurp RJLM, et al. Microsatellite instability, mismatch repair deficiency, and BRAF mutation in treatment-resistant germ cell tumors. J Clin Oncol. 2009;27:2129–36.

50. Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, Housman DE. P53-Dependent Apoptosis Modulates the Cytotoxicity of Anticancer Agents. Cell. 1993;74:957–67.

51. Chresta CM, Masters JR, Hickman JA. Hypersensitivity of human testicular tumors to etoposide-induced apoptosis is associated with functional p53 and a high Bax:Bcl-2 ratio. Cancer Res. 1996;56:1834–41.

52. Sark MW, Timmer-Bosscha H, Meijer C, Uges DR, Sluiter WJ, Peters WH, et al. Cellular basis for differential sensitivity to cisplatin in human germ cell tumour and colon carcinoma cell lines. Br J Cancer. 1995;71:684–90.

53. Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. J Natl Cancer Inst. 2000;92:1295–302.

54. Mayer F. Towards an understanding of the biological basis of response to cisplatin-based chemotherapy in germ-cell tumors. Ann Oncol. 2003;14:825–32.

55. Masters JR, Thomas R, Hall AG, Hogarth L, Matheson EC, Cattan AR, et al. Sensitivity of testis tumour cells to chemotherapeutic drugs: role of detoxifying pathways. Eur J Cancer. 1996;32A:1248–53.

56. De Laat WL, Jaspers NG, Hoeijmakers JH. Molecular mechanism of nucleotide excision repair. Genes Dev. 1999;13:768–85.

57. Burger H, Nooter K, Boersma a W, Kortland CJ, Stoter G. Lack of correlation between cisplatin-induced apoptosis, p53 status and expression of Bcl-2 family proteins in testicular germ cell tumour cell lines. Int J Cancer. 1997;73:592–9.

58. Richards EH, Hickman J a, Masters JR. Heat shock protein expression in testis and bladder cancer cell lines exhibiting differential sensitivity to heat. Br J Cancer. 1995;72:620–6.

59. Hettinga J V, Lemstra W, Meijer C, Los G, de Vries EG, Konings AW, et al. Heat-shock protein expression in cisplatin-sensitive and -resistant human tumor cells. Int J Cancer. 1996;67:800–7.

60. Mueller S, Schittenhelm M, Honecker F, Malenke E, Lauber K, Wesselborg S, et al. Cell-cycle progression and response of germ cell tumors to cisplatin in vitro. Int J Oncol. 2006;29:471–9.

61. Kurokawa M, Kornbluth S. Caspases and kinases in a death grip. Cell. 2009;138:838–54.

62. Savill J, Gregory C, Haslett C. Cell biology. Eat me or die. Science. 2003;302:1516–7.

63. Li J, Yuan J. Caspases in apoptosis and beyond. Oncogene. 2008;27:6194–206.

64. Fischer U, Jänicke RU, Schulze-Osthoff K. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. Cell Death Differ. 2003;10:76–100.

65. Ocker M, Höpfner M. Apoptosis-modulating drugs for improved cancer therapy. Eur Surg Res. 2012;48:111–20.

66. Sano R, Reed JC. ER stress-induced cell death mechanisms. Biochim Biophys Acta. Elsevier B.V.; 2013;1833:3460–70.

67. Gupta S. Molecular steps of death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis. Life Sci. 2001;69:2957–64.

68. Ow Y-LP, Green DR, Hao Z, Mak TW. Cytochrome c: functions beyond respiration. Nat Rev Mol Cell Biol. 2008;9:532–42.

69. Fenske AE, Glaesener S, Bokemeyer C, Thomale J, Dahm-Daphi J, Honecker F, et al. Cisplatin resistance induced in germ cell tumour cells is due to reduced susceptibility towards cell death but not to altered DNA damage induction or repair. Cancer Lett. Elsevier Ireland Ltd; 2012;324:171–8.

70. Burger H, Nooter K, Boersma AW, Kortland CJ, Stoter G. Expression of p53, Bcl-2 and Bax in cisplatin-induced apoptosis in testicular germ cell tumour cell lines. Br J Cancer. 1998;77:1562–7.

71. Srinivasula SM, Ashwell JD. IAPs: what's in a name? Mol Cell. 2008;30:123–35.

72. Liston P, Fong WG, Korneluk RG. The inhibitors of apoptosis: there is more to life than Bcl2. Oncogene. 2003;22:8568–80.

73. Bartke T, Pohl C, Pyrowolakis G, Jentsch S. Dual role of BRUCE as an antiapoptotic IAP and a chimeric E2/E3 ubiquitin ligase. Mol Cell. 2004;14:801–11.

74. Fulda S. Regulation of cell migration, invasion and metastasis by IAP proteins and their antagonists. Oncogene. Nature Publishing Group; 2014;33:671–6.

75. LaCasse EC, Mahoney DJ, Cheung HH, Plenchette S, Baird S, Korneluk RG. IAP-targeted therapies for cancer. Oncogene. 2008;27:6252–75.

76. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. Cell. 2000;102:33–42.

77. Fulda S, Vucic D. Targeting IAP proteins for therapeutic intervention in cancer. Nat Rev Drug Discov. 2012;11:109–24.

78. Dubrez L, Berthelet J, Glorian V. IAP proteins as targets for drug development in oncology. Onco Targets Ther. 2013;9:1285–304.

79. Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. Nat Med. 1997;3:917–21.

80. Ambrosini G, Adida C, Sirugo G, Altieri DC. Induction of apoptosis and inhibition of cell proliferation by survivin gene targeting. J Biol Chem. 1998;273:11177–82.

81. Sah NK, Khan Z, Khan GJ, Bisen PS. Structural, functional and therapeutic biology of survivin. Cancer Lett. 2006;244:164–71.

82. Chantalat L, Skoufias D a, Kleman JP, Jung B, Dideberg O, Margolis RL. Crystal structure of human survivin reveals a bow tie-shaped dimer with two unusual alpha-helical extensions. Mol Cell. 2000;6:183–9.

83. Adida C, Crotty PL, McGrath J, Berrebi D, Diebold J, Altieri DC. Developmentally regulated expression of the novel cancer anti-apoptosis gene survivin in human and mouse differentiation. Am J Pathol. 1998;152:43–9.

84. Li F, Ambrosini G, Chu EY, Plescia J, Tognin S, Marchisio PC, et al. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. Nature. 1998;396:580–4.

85. Boidot R, Végran F, Lizard-Nacol S. Transcriptional regulation of the survivin gene. Mol Biol Rep. 2014;41:233–40.

86. Fortugno P, Wall NR, Giodini A, O'Connor DS, Plescia J, Padgett KM, et al. Survivin exists in immunochemically distinct subcellular pools and is involved in spindle microtubule function. J Cell Sci. 2002;115:575–85.

87. Lens SM a, Vader G, Medema RH. The case for Survivin as mitotic regulator. Curr Opin Cell Biol. 2006;18:616–22.

88. Giodini A, Kallio MJ, Wall NR, Gorbsky GJ, Tognin S, Marchisio PC, et al. Regulation of microtubule stability and mitotic progression by survivin. Cancer Res. 2002;62:2462–7.

89. Altieri DC. Molecular circuits of apoptosis regulation and cell division control: the survivin paradigm. J Cell Biochem. 2004;92:656–63.

90. Tamm I, Wang Y, Sausville E, Scudiero DA, Vigna N, Oltersdorf T, et al. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. Cancer Res. 1998;58:5315–20.

91. Marusawa H, Matsuzawa S-I, Welsh K, Zou H, Armstrong R, Tamm I, et al. HBXIP functions as a cofactor of survivin in apoptosis suppression. EMBO J. 2003;22:2729–40.

92. Dohi T, Okada K, Xia F, Wilford CE, Samuel T, Welsh K, et al. An IAP-IAP complex inhibits apoptosis. J Biol Chem. 2004;279:34087–90.

93. Necochea-Campion R De, Chen C-S, Mirshahidi S, Howard FD, Wall NR. Clinico-pathologic relevance of Survivin splice variant expression in cancer. Cancer Lett. Elsevier Ireland Ltd; 2013;339:167–74.

94. Mahotka C, Wenzel M, Springer E, Gabbert HE, Gerharz CD. Survivin-deltaEx3 and survivin-2B: two novel splice variants of the apoptosis inhibitor survivin with different antiapoptotic properties. Cancer Res. 1999;59:6097–102.

95. Badran A, Yoshida A, Ishikawa K, Goi T, Yamaguchi A, Ueda T, et al. Identification of a novel splice variant of the human anti-apoptopsis gene survivin. Biochem Biophys Res Commun. 2004;314:902–7.

96. Caldas H, Honsey LE, Altura R a. Survivin 2alpha: a novel Survivin splice variant expressed in human malignancies. Mol Cancer. 2005;4:11.

97. Vietri M, Molinari A, Schiavone E, Al. E. Identification of a novel survivin splicing variant 3alpha in acute myeloid leukemia [Internet]. 2006. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/83744165

98. Pennati M, Folini M, Zaffaroni N. Targeting survivin in cancer therapy. Expert Opin Ther Targets. 2008;12:463–76.

99. Li F, Ling X. Survivin study: an update of “what is the next wave”? J Cell Physiol. 2006;208:476–86.

100. Knauer SK, Bier C, Schlag P, Fritzmann J, Dietmaier W, Rödel F, et al. The survivin isoform survivin-3B is cytoprotective and can function as a chromosomal passenger complex protein. Cell Cycle. 2007;6:1502–9.

101. Islam a, Kageyama H, Takada N, Kawamoto T, Takayasu H, Isogai E, et al. High expression of Survivin, mapped to 17q25, is significantly associated with poor prognostic factors and promotes cell survival in human neuroblastoma. Oncogene. 2000;19:617–23.

102. Monzó M, Rosell R, Felip E, Astudillo J, Sánchez JJ, Maestre J, et al. A novel anti-apoptosis gene: Re-expression of survivin messenger RNA as a prognosis marker in non-small-cell lung cancers. J Clin Oncol. 1999;17:2100–4.

103. Tanaka K, Iwamoto S, Gon G, Nohara T, Iwamoto M, Tanigawa N. Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas. Clin Cancer Res. 2000;6:127–34.

104. Kawasaki H, Altieri DC, Lu CD, Toyoda M, Tenjo T, Tanigawa N. Inhibition of apoptosis by survivin predicts shorter survival rates in colorectal cancer. Cancer Res. 1998;58:5071–4.

105. Satoh K, Kaneko K, Hirota M, Masamune a, Satoh a, Shimosegawa T. Expression of survivin is correlated with cancer cell apoptosis and is involved in the development of human pancreatic duct cell tumors. Cancer. 2001;92:271–8.

106. 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.

107. Ling X, Calinski D, Chanan-Khan A a, Zhou M, Li F. Cancer cell sensitivity to bortezomib is associated with survivin expression and p53 status but not cancer cell types. J Exp Clin Cancer Res. 2010;29:8.

108. Zhang M, Mukherjee N, Bermudez RS, Latham DE, Delaney M a, Zietman AL, et al. Adenovirus-mediated inhibition of survivin expression sensitizes human prostate cancer cells to paclitaxel in vitro and in vivo. Prostate. 2005;64:293–302.

109. Nakamura M, Tsuji N, Asanuma K, Kobayashi D, Yagihashi A, Hirata K, et al. Survivin as a predictor of cis-diamminedichloroplatinum sensitivity in gastric cancer patients. Cancer Sci. 2004;95:44–51.

110. Liu J, Wang Y, Jiang J, Kong R, Yang Y, Ji H, et al. Inhibition of survivin expression and mechanisms of reversing drug-resistance of human lung adenocarcinoma cells by siRNA. Chin Med J (Engl). 2010;123:2901–7.

111. Kojima H, Iida M, Yaguchi Y, Suzuki R, Hayashi N, Moriyama H, et al. Enhancement of Cisplatin sensitivity in squamous cell carcinoma of the head and neck transfected with a survivin antisense gene. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 2006;132:682–5.

112. Antonacopoulou AG, Floratou K, Bravou V, Kottorou A, Dimitrakopoulos F-I, Marousi S, et al. The survivin -31 snp in human colorectal cancer correlates with survivin splice

variant expression and improved overall survival. Anal Cell Pathol (Amst). 2010;33:177–89.

113. Boidot R, Vegran F, Lizard-Nacol S. Predictive value of survivin alternative transcript expression in locally advanced breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. Int J Mol Med. 2009;23:285–91.

114. Span PN, Tjan-Heijnen VCG, Heuvel JJTM, de Kok JB, Foekens J a, Sweep FCGJ. Do the survivin (BIRC5) splice variants modulate or add to the prognostic value of total survivin in breast cancer? Clin Chem. 2006;52:1693–700.

115. Suga K, Yamamoto T, Yamada Y, Miyatake S-I, Nakagawa T, Tanigawa N. Correlation between transcriptional expression of survivin isoforms and clinicopathological findings in human colorectal carcinomas. Oncol Rep. 2005;13:891–7.

116. Huang Y, Chen X, Chen N, Nie L, Xu M, Zhou Q. Expression and prognostic significance of survivin splice variants in diffusely infiltrating astrocytoma. J Clin Pathol. 2011;64:953–9.

117. Yamada Y, Kuroiwa T, Nakagawa T, Kajimoto Y, Dohi T, Azuma H, et al. Transcriptional expression of survivin and its splice variants in brain tumors in humans. J Neurosurg. 2003;99:738–45.

118. Altieri DC. Survivin, cancer networks and pathway-directed drug discovery. Nat Rev Cancer. 2008;8:61–70.

119. Moriai R, Tsuji N, Moriai M, Kobayashi D, Watanabe N. Survivin plays as a resistant factor against tamoxifen-induced apoptosis in human breast cancer cells. Breast Cancer Res Treat. 2009;117:261–71.

120. Rödel F, Hoffmann J, Distel L, Herrmann M, Noisternig T, Papadopoulos T, et al. Survivin as a radioresistance factor, and prognostic and therapeutic target for radiotherapy in rectal cancer. Cancer Res. 2005;65:4881–7.

121. Pennati M, Binda M, Colella G, Folini M, Citti L, Villa R, et al. Radiosensitization of human melanoma cells by ribozyme-mediated inhibition of survivin expression. J Invest Dermatol. 2003;120:648–54.

122. Molckovsky A, Siu LL. First-in-class, first-in-human phase I results of targeted agents: highlights of the 2008 American society of clinical oncology meeting. J Hematol Oncol. 2008;1:20.

123. Hansen JB, Fisker N, Westergaard M, Kjaerulff LS, Hansen HF, Thrue CA, et al. SPC3042: a proapoptotic survivin inhibitor. Mol Cancer Ther. 2008;7:2736–45.

124. Grossman D, McNiff JM, Li F, Altieri DC. Expression and targeting of the apoptosis inhibitor, survivin, in human melanoma. J Invest Dermatol. 1999;113:1076–81.

125. Tu SP, Cui JT, Liston P, Jiang XH, Xu R, Lin MCM, et al. Gene therapy for colon cancer by adeno-associated viral vector-mediated transfer of survivin Cys84Ala mutant. Gastroenterology. 2005;128:361–75.

126. Chen J-S, Liu J-C, Shen L, Rau K-M, Kuo H-P, Li YM, et al. Cancer-specific activation of the survivin promoter and its potential use in gene therapy. Cancer Gene Ther. 2004;11:740–7.

127. Van Houdt WJ, Haviv YS, Lu B, Wang M, Rivera A a, Ulasov I V, et al. The human survivin promoter: a novel transcriptional targeting strategy for treatment of glioma. J Neurosurg. 2006;104:583–92.

128. Wang W, Ji W, Hu H, Ma J, Li X, Mei W, et al. Survivin promoter-regulated oncolytic adenovirus with Hsp70 gene exerts effective antitumor efficacy in gastric cancer immunotherapy. Oncotarget. 2014;5:150–60.

129. Tanoue K, Wang Y, Ikeda M, Mitsui K, Irie R, Setoguchi T, et al. Survivin-responsive conditionally replicating adenovirus kills rhabdomyosarcoma stem cells more efficiently than their progeny. J Transl Med. Journal of Translational Medicine; 2014;12:27.

130. Wang Z, Zhou X, Li J, Liu X, Chen Z, Shen G, et al. Suppression of hepatoma tumor growth by systemic administration of the phytotoxin gelonin driven by the survivin promoter. Neoplasma. 2013;60:469–79.

131. Huang R, Zhao Z, Ma X, Li S, Gong R, Kuang a. Targeting of tumor radioiodine therapy by expression of the sodium iodide symporter under control of the survivin promoter. Cancer Gene Ther. 2011;18:144–52.

132. Luo X-R, Li J-S, Niu Y, Miao L. Targeted killing effects of double CD and TK suicide genes controlled by survivin promoter on gastric cancer cell. Mol Biol Rep. 2011;38:1201–7.

133. Andersen MH, Sørensen RB, Schrama D, Svane IM, Becker JC, Thor Straten P. Cancer treatment: the combination of vaccination with other therapies. Cancer Immunol Immunother. 2008;57:1735–43.

134. Schmidt SM, Schag K, Müller MR, Weck MM, Appel S, Kanz L, et al. Survivin is a shared tumor-associated antigen expressed in a broad variety of malignancies and recognized by specific cytotoxic T cells. Blood. 2003;102:571–6.

135. Rohayem J, Diestelkoetter P, Weigle B, Oehmichen A, Schmitz M, Mehlhorn J, et al. Antibody response to the tumor-associated inhibitor of apoptosis protein survivin in cancer patients. Cancer Res. 2000;60:1815–7.

136. Casati C, Dalerba P, Rivoltini L, Gallino G, Deho P, Rini F, et al. The apoptosis inhibitor protein survivin induces tumor-specific CD8+ and CD4+ T cells in colorectal cancer patients. Cancer Res. 2003;63:4507–15.

137. Trepiakas R, Berntsen A, Hadrup SR, Bjørn J, Geertsen PF, Straten PT, et al. Vaccination with autologous dendritic cells pulsed with multiple tumor antigens for treatment of patients with malignant melanoma: results from a phase I/II trial. Cytotherapy. 2010;12:721–34.

138. Berntsen A, Trepiakas R, Wenandy L, Geertsen PF, thor Straten P, Andersen MH, et al. Therapeutic dendritic cell vaccination of patients with metastatic renal cell carcinoma: a clinical phase 1/2 trial. J Immunother. 2008;31:771–80.

139. Wobser M, Keikavoussi P, Kunzmann V, Weininger M, Andersen MH, Becker JC. Complete remission of liver metastasis of pancreatic cancer under vaccination with a HLA-A2 restricted peptide derived from the universal tumor antigen survivin. Cancer Immunol Immunother. 2006;55:1294–8.

140. O'Connor DS, Wall NR, Porter ACG, Altieri DC. A p34(cdc2) survival checkpoint in cancer. Cancer Cell. 2002;2:43–54.

141. Altieri DC. Targeting survivin in cancer. Cancer Lett. Elsevier Ireland Ltd; 2013;332:225–8.

142. Plescia J, Salz W, Xia F, Pennati M, Zaffaroni N, Daidone MG, et al. Rational design of shepherdin, a novel anticancer agent. Cancer Cell. 2005;7:457–68.

143. Zhu X, Ma Y, Liu D. Novel agents and regimens for acute myeloid leukemia: 2009 ASH annual meeting highlights. J Hematol Oncol. 2010;3:17.

144. Smolewski P. Terameprocol, a novel site-specific transcription inhibitor with anticancer activity. IDrugs. 2008;11:204–14.

145. Iwasa T, Okamoto I, Takezawa K, Yamanaka K, Nakahara T, Kita a, et al. Marked anti-tumour activity of the combination of YM155, a novel survivin suppressant, and platinum-based drugs. Br J Cancer. Nature Publishing Group; 2010;103:36–42.

146. Wang Q, Chen Z, Diao X, Huang S. Induction of autophagy-dependent apoptosis by the survivin suppressant YM155 in prostate cancer cells. Cancer Lett. Elsevier Ireland Ltd; 2011;302:29–36.

147. Tyner JW, Jemal a M, Thayer M, Druker BJ, Chang BH. Targeting survivin and p53 in pediatric acute lymphoblastic leukemia. Leukemia. Nature Publishing Group; 2012;26:623–32.

148. Chen J, Pise-Masison C a, Shih JH, Morris JC, Janik JE, Conlon KC, et al. Markedly additive antitumor activity with the combination of a selective survivin suppressant YM155 and alemtuzumab in adult T-cell leukemia. Blood. 2013;121:2029–37.

149. Yamanaka K, Nakata M, Kaneko N, Fushiki H, Kita A, Nakahara T, et al. YM155, a selective survivin suppressant, inhibits tumor spread and prolongs survival in a

spontaneous metastatic model of human triple negative breast cancer. Int J Oncol. 2011;39:569–75.

150. Nakahara T, Kita A, Yamanaka K, Mori M, Amino N, Takeuchi M, et al. Broad spectrum and potent antitumor activities of YM155, a novel small-molecule survivin suppressant, in a wide variety of human cancer cell lines and xenograft models. Cancer Sci. 2011;102:614–21.

151. Rauch A, Hennig D, Schäfer C, Wirth M, Marx C, Heinzel T, et al. Survivin and YM155: How faithful is the liaison? Biochim Biophys Acta. Elsevier B.V.; 2014;1845:202–20.

152. Kumar B, Yadav A, Lang JC, Cipolla MJ, Schmitt AC, Arradaza N, et al. YM155 reverses cisplatin resistance in head and neck cancer by decreasing cytoplasmic survivin levels. Mol Cancer Ther. 2012;11:1988–98.

153. Yoon DH, Shin J-S, Jin D-H, Hong S-W, Jung K a, Kim S-M, et al. The survivin suppressant YM155 potentiates chemosensitivity to gemcitabine in the human pancreatic cancer cell line MiaPaCa-2. Anticancer Res. 2012;32:1681–8.

154. Okamoto K, Okamoto I, Hatashita E, Kuwata K, Yamaguchi H, Kita A, et al. Overcoming erlotinib resistance in EGFR mutation-positive non-small cell lung cancer cells by targeting survivin. Mol Cancer Ther. 2012;11:204–13.

155. Tolcher AW, Mita A, Lewis LD, Garrett CR, Till E, Daud AI, et al. Phase I and pharmacokinetic study of YM155, a small-molecule inhibitor of survivin. J Clin Oncol. 2008;26:5198–203.

156. Satoh T, Okamoto I, Miyazaki M, Morinaga R, Tsuya A, Hasegawa Y, et al. Phase I study of YM155, a novel survivin suppressant, in patients with advanced solid tumors. Clin Cancer Res. 2009;15:3872–80.

157. Lewis KD, Samlowski W, Ward J, Catlett J, Cranmer L, Kirkwood J, et al. A multi-center phase II evaluation of the small molecule survivin suppressor YM155 in patients with unresectable stage III or IV melanoma. Invest New Drugs. 2011;29:161–6.

158. Giaccone G, Zatloukal P, Roubec J, Floor K, Musil J, Kuta M, et al. Multicenter phase II trial of YM155, a small-molecule suppressor of survivin, in patients with advanced, refractory, non-small-cell lung cancer. J Clin Oncol. 2009;27:4481–6.

159. Tolcher a W, Quinn DI, Ferrari a, Ahmann F, Giaccone G, Drake T, et al. A phase II study of YM155, a novel small-molecule suppressor of survivin, in castration-resistant taxane-pretreated prostate cancer. Ann Oncol. 2012;23:968–73.

160. Cheson BD, Bartlett NL, Vose JM, Lopez-Hernandez A, Seiz AL, Keating AT, et al. A phase II study of the survivin suppressant YM155 in patients with refractory diffuse large B-cell lymphoma. Cancer. 2012;118:3128–34.

161. Kelly RJ, Thomas a, Rajan a, Chun G, Lopez-Chavez a, Szabo E, et al. A phase I/II study of sepantronium bromide (YM155, survivin suppressor) with paclitaxel and carboplatin in patients with advanced non-small-cell lung cancer. Ann Oncol. 2013;24:2601–6.

162. Cheung CHA, Huang C-C, Tsai F-Y, Lee JY-C, Cheng SM, Chang Y-C, et al. Survivin - biology and potential as a therapeutic target in oncology. Onco Targets Ther. 2013;6:1453–62.

163. Tennstedt P, Fresow R, Simon R, Marx A, Terracciano L, Petersen C, et al. RAD51 overexpression is a negative prognostic marker for colorectal adenocarcinoma. Int J Cancer. 2013;132:2118–26.

164. Minner S, Enodien M, Sirma H, Luebke AM, Krohn A, Mayer PS, et al. ERG status is unrelated to PSA recurrence in radically operated prostate cancer in the absence of antihormonal therapy. Clin Cancer Res. 2011;17:5878–88.

165. Mull AN, Klar A, Navara CS. Differential localization and high expression of SURVIVIN splice variants in human embryonic stem cells but not in differentiated cells implicate a role for SURVIVIN in pluripotency. Stem Cell Res. The Authors; 2014;12:539–49.

166. Als AB, Dyrskjøt L, von der Maase H, Koed K, Mansilla F, Toldbod HE, et al. Emmprin and survivin predict response and survival following cisplatin-containing chemotherapy in patients with advanced bladder cancer. Clin Cancer Res. 2007;13:4407–14.

167. Asanuma K, Moriai R, Yajima T, Yagihashi a, Yamada M, Kobayashi D, et al. Survivin as a radioresistance factor in pancreatic cancer. Jpn J Cancer Res. 2000;91:1204–9.

168. Juliachs M, Muñoz C, Moutinho C a, Vidal a, Condom E, Esteller M, et al. The PDGFRβ-AKT pathway contributes to CDDP-acquired resistance in testicular germ cell tumors. Clin Cancer Res. 2014;20:658–67.

169. Zhao P, Meng Q, Liu L-Z, You Y-P, Liu N, Jiang B-H. Regulation of survivin by PI3K/Akt/p70S6K1 pathway. Biochem Biophys Res Commun. Elsevier Inc.; 2010;395:219–24.

170. Sun X-P, Dong X, Lin L, Jiang X, Wei Z, Zhai B, et al. Up-regulation of survivin by AKT and hypoxia-inducible factor 1α contributes to cisplatin resistance in gastric cancer. FEBS J. 2014;281:115–28.

171. Ganesh S, Iyer AK, Weiler J, Morrissey D V, Amiji MM. Combination of siRNA-directed Gene Silencing With Cisplatin Reverses Drug Resistance in Human Non-small Cell Lung Cancer. Mol Ther Nucleic Acids. 2013;2:e110.

172. Li F. Role of survivin and its splice variants in tumorigenesis. Br J Cancer. 2005;92:212–6.

173. Ling X, Cheng Q, Black JD, Li F. Forced expression of survivin-2B abrogates mitotic cells and induces mitochondria-dependent apoptosis by blockade of tubulin polymerization and modulation of Bcl-2, Bax, and survivin. J Biol Chem. 2007;282:27204–14.

174. Mahotka C, Liebmann J, Wenzel M, Suschek C V, Schmitt M, Gabbert HE, et al. Differential subcellular localization of functionally divergent survivin splice variants. Cell Death Differ. 2002;9:1334–42.

175. Jacob NK, Cooley J V, Shirai K, Chakravarti A. Survivin splice variants are not essential for mitotic progression or inhibition of apoptosis induced by doxorubicin and radiation. Onco Targets Ther. 2012;5:7–20.

176. Li F. Survivin study: what is the next wave? J Cell Physiol. 2003;197:8–29.

177. Nakahara T, Kita A, Yamanaka K, Mori M, Amino N, Takeuchi M, et al. YM155, a novel small-molecule survivin suppressant, induces regression of established human hormone-refractory prostate tumor xenografts. Cancer Res. 2007;67:8014–21.

178. Yamauchi T, Nakamura N, Hiramoto M, Yuri M, Yokota H, Naitou M, et al. Sepantronium bromide (YM155) induces disruption of the ILF3/p54(nrb) complex, which is required for survivin expression. Biochem Biophys Res Commun. Elsevier Inc.; 2012;425:711–6.

179. Iwasa T, Okamoto I, Takezawa K, Yamanaka K, Nakahara T, Kita a, et al. Marked anti-tumour activity of the combination of YM155, a novel survivin suppressant, and platinum-based drugs. Br J Cancer. Nature Publishing Group; 2010;103:36–42.

180. Li F, Ackermann EJ, Bennett CF, Rothermel a L, Plescia J, Tognin S, et al. Pleiotropic cell-division defects and apoptosis induced by interference with survivin function. Nat Cell Biol. 1999;1:461–6.

181. Walker K, Padhiar M. AACR-NCI-EORTC--21st International Symposium. Molecular targets and cancer therapeutics--Part 1. IDrugs. 2010;13:7–9.

182. Van der Waal MS, Hengeveld RCC, van der Horst A, Lens SM a. Cell division control by the Chromosomal Passenger Complex. Exp Cell Res. Elsevier Inc.; 2012;318:1407–20.

183. Nakagawa Y, Abe S, Kurata M, Hasegawa M, Yamamoto K, Inoue M, et al. IAP family protein expression correlates with poor outcome of multiple myeloma patients in association with chemotherapy-induced overexpression of multidrug resistance genes. Am J Hematol. 2006;81:824–31.

184. Caldas H, Jiang Y, Holloway MP, Fangusaro J, Mahotka C, Conway EM, et al. Survivin splice variants regulate the balance between proliferation and cell death. Oncogene. 2005;24:1994–2007.

185. Vivas-Mejia PE, Rodriguez-Aguayo C, Han H-D, Shahzad MMK, Valiyeva F, Shibayama M, et al. Silencing survivin splice variant 2B leads to antitumor activity in taxane--resistant ovarian cancer. Clin Cancer Res. 2011;17:3716–26.

186. Wang Y, Suominen JS, Hakovirta H, Parvinen M, Martinand-Mari C, Toppari J, et al. Survivin expression in rat testis is upregulated by stem-cell factor. Mol Cell Endocrinol. 2004;218:165–74.

187. Weikert S, Christoph F, Schulze W, Krause H, Kempkensteffen C, Schostak M, et al. Testicular expression of survivin and human telomerase reverse transcriptase (hTERT) associated with spermatogenic function in infertile patients. Asian J Androl. 2006;8:95–100.

188. Spaulding B, Pan D, Ghadersohi a, Nielsen G, Jensen S, Gellert F, et al. Characterization of the 12C4 survivin monoclonal antibody and insight into the expression of survivin in human adult tissues. Histopathology. 2006;49:622–33.

189. Hattori M, Sakamoto H, Satoh K, Yamamoto T. DNA demethylase is expressed in ovarian cancers and the expression correlates with demethylation of CpG sites in the promoter region of c-erbB-2 and survivin genes. Cancer Lett. 2001;169:155–64.

190. Hinnis a R, Luckett JC a, Walker R a. Survivin is an independent predictor of short-term survival in poor prognostic breast cancer patients. Br J Cancer. 2007;96:639–45.

191. Adida C, Haioun C, Gaulard P, Lepage E, Morel P, Briere J, et al. Prognostic significance of survivin expression in diffuse large B-cell lymphomas. Blood. 2000;96:1921–5.

192. Li F, Yang J, Ramnath N, Javle MM, Tan D. Nuclear or cytoplasmic expression of survivin: what is the significance? Int J Cancer. 2005;114:509–12.

193. Meng H, Lu C, Mabuchi H, Tanigawa N. Prognostic significance and different properties of survivin splicing variants in gastric cancer. Cancer Lett. 2004;216:147–55.

194. Krieg A, Mahotka C, Krieg T, Grabsch H, Müller W, Takeno S, et al. Expression of different survivin variants in gastric carcinomas: first clues to a role of survivin-2B in tumour progression. Br J Cancer. 2002;86:737–43.

195. Mahotka C, Krieg T, Krieg A, Wenzel M, Suschek C V, Heydthausen M, et al. Distinct in vivo expression patterns of survivin splice variants in renal cell carcinomas. Int J Cancer. 2002;100:30–6.

196. Ling X, Yang J, Tan D, Ramnath N, Younis T, Bundy BN, et al. Differential expression of survivin-2B and survivin-DeltaEx3 is inversely associated with disease relapse and patient survival in non-small-cell lung cancer (NSCLC). Lung Cancer. 2005;49:353–61.