

***Transkingdom* RNAi: Modulation der klassischen und atypischen Multidrugresistenz mittels bakteriell übertragener RNAi Effektoren**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Andrea Katja Krühn

aus Berlin

2013

Diese Arbeit wurde von Juli 2008 bis März 2013 am Institut für Pathologie der Charité Universitätsmedizin Berlin unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. Hermann Lage angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Hermann Lage
2. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel

Disputation am: 08.07.2013

Das menschliche Denken ist wie eine trübe Flüssigkeit,
die sich im Laufe der Jahrhunderte langsam klärt.

Christian Morgenstern

Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	IV
TABELLENVERZEICHNIS.....	VI
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 RNA Interferenz.....	1
1.1.1 <i>RNAi Mechanismus.....</i>	2
1.1.2 <i>RNAi Effektoren und Delivery.....</i>	3
1.1.2.1 <i>Transkingdom RNAi.....</i>	5
1.2 Krebs, Chemotherapie und Zytostatikaresistenz.....	9
1.2.1 <i>ABCB1 und klassische MDR.....</i>	10
1.2.1.1 <i>Forschungsansätze zur Reversion der ABCB1 bedingten klassischen MDR..</i>	12
1.2.2 <i>ABCG2 und atypische MDR.....</i>	14
1.2.2.1 <i>Forschungsansätze zur Reversion der ABCG2 bedingten atypischen MDR..</i>	15
1.3 Hypothesen.....	17
2 MATERIAL UND METHODEN.....	18
2.1 Material.....	19
2.1.1 <i>Organismen.....</i>	19
2.1.1.1 <i>Humane Karzinomzelllinien.....</i>	19
2.1.1.2 <i>Mikroorganismen.....</i>	20
2.1.2 <i>Geräte.....</i>	20
2.1.3 <i>Verbrauchsmaterialien.....</i>	22
2.1.4 <i>Chemikalien.....</i>	22
2.1.5 <i>Antikörper.....</i>	25
2.1.6 <i>Enzyme.....</i>	25
2.1.7 <i>Kits.....</i>	26
2.1.8 <i>Nukleinsäuren.....</i>	26
2.1.9 <i>Software.....</i>	28
2.2 Methoden.....	29
2.2.1 <i>Sterilisierung.....</i>	29
2.2.2 <i>Bakterielle Methoden.....</i>	29

2.2.2.1	Bakterienkultur	29
2.2.2.2	Resuspension lyophilisierter Plasmide	30
2.2.2.3	Herstellung chemisch kompetenter Bakterien	30
2.2.2.4	Transformation	30
2.2.2.5	ÜN-Minikultur.....	31
2.2.2.6	Plasmid-Isolation	32
2.2.2.7	Anzucht invasiver Bakterien.	32
2.2.2.8	DAPI-Färbung und Nachweis intrazellulärer Bakterien	32
2.2.3	<i>Zellkultur Methoden</i>	33
2.2.3.1	Humane Zellkultur	33
2.2.3.2	Einfrieren und Auftauen humaner Karzinomzellen.....	35
2.2.3.3	Infektion humaner Karzinomzellen mit tkRNAi Bakterien	35
2.2.3.4	Akkumulationsassay	36
2.2.3.5	Zytotoxizitätsassay mittels Sulforhodamin B (SRB)	37
2.2.4	<i>Molekularbiologische Methoden</i>	39
2.2.4.1	Photometrische Nukleinsäure-Konzentrationsbestimmung	39
2.2.4.2	Isolation von Gesamt-RNA.....	39
2.2.4.3	Reverse Transkription von Gesamt-RNA.....	39
2.2.4.4	Isolation von si- und miRNA	40
2.2.4.5	Adaptermarkierung und Reverse Transkription von si- und miRNA.....	40
2.2.4.6	Quantitative real-time PCR.....	40
2.2.4.7	Sequenzierung	43
2.2.4.8	Membranprotein-Isolation	43
2.2.4.9	Protein-Konzentrationsbestimmung	44
2.2.4.10	Western Blot Analyse.....	46
2.2.5	<i>Statistische Auswertung</i>	49
3	ERGEBNISSE	50
3.1	Reversion des klassischen MDR Phänotyps durch tkRNAi-TRIP anti-ABCB1	52
3.1.1	<i>Nachweis der bakteriellen Invasion und Lyse</i>	52
3.1.2	<i>Nachweis von anti-ABCB1-shRNAs</i>	53
3.1.3	<i>Determinierung des Zeitpunktes der maximalen ABCB1 mRNA Inhibition</i>	54

3.1.4	<i>Immunologischer Nachweis der ABCB1 Inhibition</i>	55
3.1.5	<i>Funktionelle Auswirkungen der ABCB1 Inhibition</i>	56
3.2	Reversion des klassischen MDR Phänotyps durch tkRNAi-pMBV43 anti-ABCB1	58
3.2.1	<i>Nachweis der bakteriellen Invasion und Lyse</i>	58
3.2.2	<i>Nachweis von anti-ABCB1-shRNAs</i>	59
3.2.3	<i>Determinierung des Zeitpunktes der maximalen ABCB1 mRNA Inhibition</i>	61
3.2.4	<i>Immunologischer Nachweis der ABCB1 Inhibition</i>	65
3.2.5	<i>Funktionelle Auswirkungen der ABCB1 Inhibition</i>	66
3.3	Reversion des atypischen MDR Phänotyps durch tkRNAi-pMBV43 anti-ABCG2	71
3.3.1	<i>Nachweis der bakteriellen Invasion und Lyse</i>	71
3.3.2	<i>Nachweis von anti-ABCG2-shRNAs</i>	72
3.3.3	<i>Determinierung des Zeitpunktes der maximalen ABCG2 mRNA Inhibition</i>	73
3.3.4	<i>Immunologischer Nachweis der ABCG2 Inhibition</i>	74
3.3.5	<i>Funktionelle Auswirkungen der ABCG2 Inhibition</i>	75
4	DISKUSSION	78
4.1	Reversion des klassischen MDR Phänotyps durch tkRNAi-TRIP anti-ABCB1	79
4.2	Reversion des klassischen MDR Phänotyps durch tkRNAi-pMBV43 anti-ABCB1	82
4.3	Reversion des atypischen MDR Phänotyps durch tkRNAi-pMBV43 anti-ABCG2	90
4.4	Schlussbetrachtung und Ausblick	92
5	ZUSAMMENFASSUNG	95
6	SUMMARY	96
	LITERATURVERZEICHNIS	97
	PUBLIKATIONEN	115
	LEBENS LAUF	116
	DANKSAGUNG	117
	ANHANG	118
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	122
	EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG	126

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Mechanismus der RNAi (verändert nach Hammond *et al.*, 2001)..... 3

Abbildung 2: Schematische Darstellung des TRIPs (verändert nach Lage *et al.*, 2012)..... 7

Abbildung 3: Mechanismus der tkRNAi (verändert nach Krühn *et al.*, 2009) 8

Abbildung 4: Schematische Darstellung des Transmembrantransporterproteins ABCB1 (verändert nach Sorrentino, 2002) 11

Abbildung 5: Schematische Darstellung des funktionellen ABCG2 Dimers (verändert nach Sorrentino, 2002) 14

Abbildung 6: Analytische Vorgehensweise zur Überprüfung der Hypothesen 18

Abbildung 7: Invasion und Lyse von *E. coli* BL21(DE3) + TRIP anti-*ABCB1* in EPG85-257RDB (verändert nach Krühn, 2008 und Krühn *et al.*, 2009)..... 52

Abbildung 8: Nachweis von anti-*ABCB1*-shRNAs in EPG85-257RDB post tkRNAi-TRIP anti-*ABCB1* Behandlung (verändert nach Krühn *et al.*, 2009, Analyse mit zusätzlichen Kontrollen wiederholt) 53

Abbildung 9: Zeitkinetik der *ABCB1* mRNA Expression von EPG85-257RDB post tkRNAi-TRIP anti-*ABCB1* Behandlung 54

Abbildung 10: *ABCB1* Expression in EPG85-257RDB post tkRNAi-TRIP anti-*ABCB1* Behandlung (verändert nach Krühn *et al.*, 2009, Analyse mit zusätzlichen Kontrollen wiederholt) 55

Abbildung 11: Funktionelle Analysen von *ABCB1* in EPG85-257RDB post tkRNAi-TRIP anti-*ABCB1* Behandlung (verändert nach Krühn, 2008 und Krühn *et al.*, 2009)..... 57

Abbildung 12: Invasion und Lyse von *E. coli* ceq221 + pMBV43 anti-*ABCB1* in EPG85-257RDB (verändert nach Lage und Krühn, 2010, Analyse mit zusätzlichen Zeitpunkten wiederholt) und in MaTu/ADR 59

Abbildung 13: Nachweis von anti-*ABCB1*-shRNAs in EPG85-257RDB und MaTu/ADR post tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCB1* Behandlung 60

Abbildung 14: Zeitkinetik der *ABCB1* mRNA Expression in EPG85-257RDB und MaTu/ADR post tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCB1* Behandlung 62

Abbildung 15: *ABCB1* mRNA Expression in MaTu/ADR 72 h post tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCB1* Behandlung 64

Abbildung 16: ABCB1 Expression von EPG85-257RDB (verändert nach Lage und Krühn, 2010, Analyse mit zusätzlichen Kontrollen wiederholt) und MaTu/ADR post tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCB1* Behandlung 66

Abbildung 17: Funktionelle Analysen von ABCB1 in EPG85-257RDB post tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCB1* Behandlung (verändert nach Lage und Krühn, 2010) 68

Abbildung 18: Funktionelle Analysen von ABCB1 in MaTu/ADR post tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCB1* Behandlung 70

Abbildung 19: Invasion und Lyse von *E. coli* ceq221 + pMBV43 anti-*ABCG2* in EPG85-257RNOV..... 72

Abbildung 20: Nachweis von anti-*ABCG2*-shRNAs in EPG85-257RNOV post tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCG2* Behandlung 73

Abbildung 21: Zeitkinetik der *ABCG2* mRNA Expression in EPG85-257RNOV post tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCG2* Behandlung..... 74

Abbildung 22: *ABCG2* Expression in EPG85-257RNOV post tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCG2* Behandlung 75

Abbildung 23: Funktionelle Analysen von *ABCG2* in EPG85-257RNOV post tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCG2* Behandlung 77

Abbildung 24: Vektorkarten der verwendeten tkRNAi Plasmide (von Cequent Pharmaceuticals, Inc. zur Verfügung gestellt) 120

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete tkRNAi Varianten und MDR Modelle	17
Tabelle 2: Verwendete humane Karzinomzelllinien	19
Tabelle 3: Verwendete <i>E. coli</i> Stämme.....	20
Tabelle 4: Verwendete Geräte	20
Tabelle 5: Verwendete Verbrauchsmaterialien	22
Tabelle 6: Verwendete Chemikalien	22
Tabelle 7: Verwendete Antikörper	25
Tabelle 8: Verwendete Enzyme.....	25
Tabelle 9: Verwendete Kits	26
Tabelle 10: Verwendete Nukleinsäuren.....	26
Tabelle 11: Verwendete Primer	26
Tabelle 12: Verwendete tkRNAi Plasmide	27
Tabelle 13: Verwendete Oligonukleotide für die shRNA Klonierung.....	27
Tabelle 14: Verwendete Software.....	28
Tabelle 15: Zusammensetzung LB-Medium.....	29
Tabelle 16: Zusammensetzung LB-Agar.....	29
Tabelle 17: Zusammensetzung SOC-Medium	31
Tabelle 18: Zusammensetzung DAPI-Stocklösung	33
Tabelle 19: Zusammensetzung DAPI-Arbeitslösung	33
Tabelle 20: Zusammensetzung modifiziertes L15-Medium.....	34
Tabelle 21: Verwendete Zytostatika für die Standardzellkultur der MDR Sublinien	34
Tabelle 22: Verwendete Substanzen für die Zellkultur 24 h vor Infektion	35
Tabelle 23: Verwendete Substanzen für die Zellkultur nach Infektion	36
Tabelle 24: Verwendete Zytostatikakonzentrationen für die Akkumulationsassays	37
Tabelle 25: Verwendete Zytostatikakonzentrationen für die Zytotoxizitätsassays.....	38
Tabelle 26: Zusammensetzung der quantitativen real-time PCR Ansätze.....	41
Tabelle 27: LightCycler Programm (mRNA Quantifizierung)	41
Tabelle 28: LightCycler Programm (si- und miRNA Quantifizierung).....	42
Tabelle 29: Hybridisierungstemperaturen (T_H) für die verwendeten Primer	42
Tabelle 30: Zusammensetzung Cocktailtablettenlösung	44

Tabelle 31: Zusammensetzung Hypolysepuffer.....	44
Tabelle 32: Zusammensetzung 4x SDS-Probenpuffer.....	44
Tabelle 33: Zusammensetzung Amidoschwarz-Färbelösung.....	45
Tabelle 34: Zusammensetzung Entfärbelösung.....	45
Tabelle 35: Zusammensetzung Elutionspuffer	45
Tabelle 36: Zusammensetzung 7,5 %iges Trenngel	46
Tabelle 37: Zusammensetzung 4,0 %iges Sammelgel.....	46
Tabelle 38: Zusammensetzung 10x Laufpuffer.....	47
Tabelle 39: Zusammensetzung 1x Transferpuffer.....	47
Tabelle 40: Durchgeführte Reaktionschritte für die Western Blot Analysen.....	48
Tabelle 41: Zusammensetzung Blocklösung.....	48
Tabelle 42: Zusammensetzung 1x TBST.....	48
Tabelle 43: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper mit eingesetzten Verdünnungen..	49
Tabelle 44: IC ₅₀ -Werte Daunorubicin (tkRNAi-TRIP anti- <i>ABCB1</i>).....	118
Tabelle 45: IC ₅₀ -Werte Daunorubicin (tkRNAi-pMBV43 anti- <i>ABCB1</i>).....	118
Tabelle 46: IC ₅₀ -Werte Doxorubicin (tkRNAi-pMBV43 anti- <i>ABCB1</i>)	118
Tabelle 47: IC ₅₀ -Werte Mitoxantron (tkRNAi-pMBV43 anti- <i>ABCG2</i>)	119
Tabelle 48: Varianten der klonierten shRNA kodierenden Sequenzen am Beispiel der anti- <i>ABCB1</i> -shRNA	121

1 Einleitung

1.1 RNA Interferenz

RNA Interferenz (RNAi) ist ein natürlich vorkommender, hoch konservierter, posttranskriptioneller Mechanismus eukaryotischer Organismen, der die Expression von Genen spezifisch inhibiert und durch Zielgen homologe ds(*double stranded*)RNA initiiert wird (Elbashir *et al.*, 2001; Xiang *et al.*, 2009). Physiologisch übt RNAi einerseits einen natürlichen Schutzmechanismus gegen Fremd-RNA, beispielweise viralen Ursprungs, aus und ist andererseits an der Genregulation unterschiedlicher Gene, die wichtige Rollen in der Zellentwicklung und -differenzierung einnehmen, beteiligt (Lage *et al.*, 2012).

Erstmals wurde das Phänomen der RNAi, damals als *Co-Suppression* oder PTGS (*post-transcriptional gene silencing*) bezeichnet, bei dem Versuch, die Blütenfarbe in Petunien zu intensivieren, beobachtet. Nach dem Einschleusen eines Gens für die Anthocyan synthese erfolgte durch die Reduktion des endogenen farbstoffproduzierenden Enzyms eine Blütenaufhellung (Napoli *et al.*, 1990). Romano und Macino zeigten, dass durch Einführen homologer RNA in *N. crassa* eine spezifische Geninhibition („*Quelling*“) einsetzt (Romano und Macino, 1992). In *C. elegans* konnten RNAi Effekte erstmals bei Tieren durch Einschleusen von *antisense* RNA gezeigt werden (Guo und Kemphues, 1995). Es wurde angenommen, dass die Hybridisierung der *antisense* RNA mit homologer endogener mRNA eine translationale Inhibition oder mRNA-Degradation bewirkt. Basierend auf den konträren Ergebnissen von Guo und Kemphues (1995), dass auch *sense* RNA regulatorische Eigenschaften aufweist, postulierten Fire *et al.* (1998), dass diese Ergebnisse auf eine Kontamination der einzelsträngigen RNA (ssRNA) mit doppelsträngiger RNA (dsRNA) zurückzuführen ist (Fire *et al.*, 1998; Sen und Blau, 2006). Anhand des Vergleiches der inhibitorischen Eigenschaften von *sense* RNA, *antisense* RNA und dsRNA in *C. elegans* konnte aufgeklärt werden, dass dsRNA eine vielfach höhere Effektivität bezüglich der Geninhibition aufweist (Fire *et al.*, 1998; Caplen *et al.*, 2001; Sen und Blau, 2006). Für diese Entdeckung wurde Andrew Z. Fire und Craig C. Mello 2006 der Nobelpreis verliehen.

In der Vergangenheit für die RNAi bedingte Genrepression verwendete, über 30 Nukleotide (nt) lange dsRNAs rufen in Mammalia eine Interferonantwort hervor, deren Folge die unspezifische mRNA Degradation und die globale Translationsinhibition ist (Elbashir *et al.*, 2001;

Dykxhoorn *et al.*, 2003). Die Erkenntnis, dass chemisch synthetisierte 21-22 nt kurze dsRNAs mit 2 nt langen Überhängen am 3'-Ende zu einer spezifischen Geninhibition führen, ohne eine Immunantwort auszulösen, stellte einen entscheidenden Durchbruch für den gezielten Einsatz der RNAi in Mammalia dar (Zamore *et al.*, 2000; Elbashir *et al.*, 2001; Sen und Blau, 2006).

Der Eingriff in die Proteinbiosynthese anhand der RNAi bietet eine Möglichkeit, Gene und deren Funktion durch Knockout zu beschreiben und Gendysregulationen, die pathologische Folgen nach sich ziehen, potentiell entgegen zu steuern. Neben der Modifikation der eingeschleusten dsRNA für eine maximale Inhibition der Genexpression (Zamore *et al.*, 2000; Elbashir *et al.*, 2001; Chiu und Rana, 2003, Vickers *et al.*, 2003; Soutschek *et al.*, 2004; Manoharan *et al.*, 2011; Takahashi *et al.*, 2012) beschäftigen sich verschiedene wissenschaftliche Untersuchungen intensiv mit der Übermittlung (*Delivery*) von RNAi Effektoren in Zielzellen und -gewebe (Kapitel 1.1.2). Neben Forschungsansätzen, die sich unterschiedlicher Modellsysteme bedienen, fanden bereits über 30 verschiedene klinische Studien zur Untersuchung des therapeutischen Nutzens der RNAi statt (Übersicht bis 2011: Burnett *et al.*, 2011).

1.1.1 RNAi Mechanismus

RNAi wird durch die Prozession zytoplasmatischer dsRNAs (RNAi Effektoren) durch das RNase III Enzym Dicer eingeleitet, wobei 19-21 nt lange si(*small interfering*)RNAs entstehen (Bernstein *et al.*, 2001). Diese weisen 2-3 nt lange, symmetrische 3'-Überhänge, eine 3'-Hydroxylgruppe und ein 5'-Phosphat auf (Zamore *et al.*, 2000; Elbashir *et al.*, 2001; Nykänen *et al.*, 2001). Über die Interaktion der PAZ(*PIWI-Argonaute-Zwille/Pinhead*)-Domäne mit dem 3'-Ende einer siRNA wird diese in den Multiprotein-RISC (*RNA induced silencing complex*) inkorporiert (Cerutti *et al.*, 2000). Im Anschluss an die ATP-abhängige, helikale Entwindung der RISC gebundenen siRNA (*guide* siRNA) ist ein Großteil des *antisense* siRNA-Stranges frei zugänglich für die homologe Ziel-mRNA. Nach der Bindung der Ziel-mRNA bewirkt die PIWI-Domäne, auf der die Ziel-mRNA liegt, deren Spaltung 10 nt entfernt vom 5'-Ende des *guide* siRNA/mRNA Duplexes (Elbashir *et al.*, 2001). Die folgende Degradation der Ziel-mRNA erfolgt durch RNasen (Elbashir *et al.*, 2001; Scherr und Scherr, 2003) (Abb. 1).

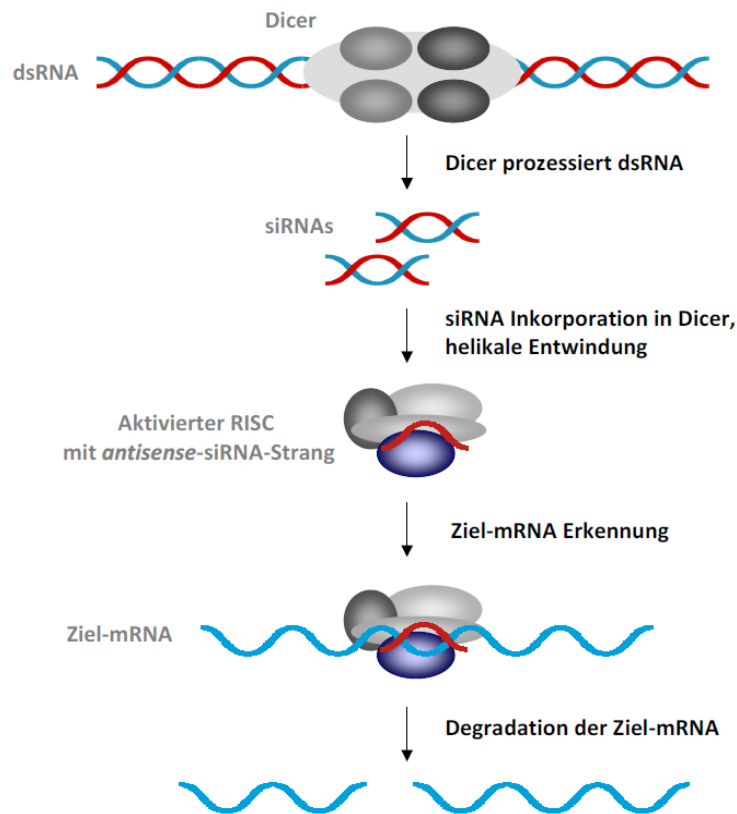


Abbildung 1: Mechanismus der RNAi (verändert nach Hammond *et al.*, 2001)

Dicer prozessiert zytoplasmatische dsRNAs in 21 nt lange siRNAs. Durch Inkorporation einer siRNA und durch helikale Entwindung dieser wird der RISC aktiviert. Der siRNA *antisense*-Strang dient als Matrize zur sequenz-spezifischen Bindung der Ziel-mRNA. Es folgt die endonukleolytische Spaltung der gebundenen Ziel-mRNA durch den RISC. Daraufhin findet die Exonuklease bedingte Degradation der Ziel-mRNA statt.

1.1.2 RNAi Effektoren und *Delivery*

RNAi Effektoren können natürlichen Ursprungs sein, wie z.B. endogene mi(*micro*)RNAs, die der Genregulation dienen (Dyxhoorn *et al.*, 2003; Bartel, 2004; Rana, 2007). Fremd-RNA viralen Ursprungs oder die RNA-Zwischenstufe von Transposons können ebenfalls RNAi Effektoren darstellen (Rana, 2007). Die Degradation zellfremder RNA dient dem zellulären Schutz.

Künstlich generierte siRNAs sind RNAi Effektoren, die für die gezielte Genregulation eingesetzt werden. Die Gewinnung von siRNAs kann durch *in vitro* Prozession längerer dsRNAs durch die *E. coli* RNase III oder mit Hilfe eines rekombinanten humanen Dicers, durch *in vitro* Transkription unter Nutzung der T7 RNA Polymerase mit oder ohne anschließender deoxyribosymatischer Prozession oder durch Isolation aus embryonalen *D. melanogaster* Extrakten erreicht werden (Calegari *et al.*, 2002; Donze und Picard, 2002; Myers *et al.*, 2003; Dyxhoorn

et al., 2003; Kawasaki *et al.*, 2003; Sohail *et al.*, 2003). Bei diesen Methoden werden multiple siRNAs generiert, die sich gegen unterschiedliche Zielsequenzen innerhalb der gleichen Ziel-mRNA richten. Die Effektivität von siRNAs ist nicht ausschließlich auf die richtige Basenzusammensetzung zurückzuführen, sondern auch abhängig von der Sekundärstruktur der Ziel-mRNA im Bereich der Zielsequenz und von den Proteinbindeeigenschaften der siRNA (Dyxhoorn *et al.*, 2003). Entsprechend variabel sind die Effektivitäten der multiplen, gegen ein und dieselbe mRNA gerichteten, siRNAs, die aus einer langen dsRNA generiert werden. Chemisch synthetisierte siRNAs richten sich spezifisch gegen eine Zielsequenz, weshalb unspezifische Effekte und die Variabilität bezüglich der Effektivitäten entfallen (Elbashir *et al.*, 2001). Aufgrund ihrer Spezifität werden überwiegend chemisch synthetisierte siRNAs für gezielte Knockout-Versuche zur Determinierung von Genfunktionen eingesetzt (Dyxhoorn *et al.*, 2003). Je nach Zielsequenz weisen auch chemisch synthetisierte siRNAs große Unterschiede bezüglich ihrer „*silencing*“ Aktivität auf (Holen *et al.*, 2002). Nach der RNase H-Methode können besonders geeignete Positionen innerhalb von Ziel-mRNAs für die Synthese der entsprechenden siRNAs determiniert werden, da RNase H-Schnittstellen gleichzeitig besonders gute Zielsequenzen für siRNAs darstellen (Vickers *et al.*, 2003).

Die Übermittlung (*Delivery*) von siRNAs in Zielzellen kann beispielsweise durch Transfektion, Elektroporation oder Mikroinjektion erreicht werden (Nieth *et al.*, 2003; Glover *et al.*, 2005; Buttaro und Fruehauf, 2010). Der regulatorische Effekt nach siRNA Übermittlung ist transient, setzt nach 1-2 Tagen ein und dauert 3-5 Tage an (Lage, 2005). Stabilisierungen, z.B. anhand einer Cholesterol-Kopplung der siRNAs oder Verpackung von siRNAs, z.B. in so genannte SNALPS (*stable nucleic acid lipid particles*), haben sich in der Vergangenheit als besonders effiziente RNAi Effektoren *Delivery*-Strategie erwiesen (Soutschek *et al.*, 2004; Zimmermann *et al.*, 2006; Tiemann und Rossi, 2009).

Eine spezifische, gegebenenfalls, durch die Möglichkeit der Selektion transfizierter Zellen, auch stabile Genregulation kann unter Verwendung von Expressionsvektoren erreicht werden, die eine si- oder sh(*short hairpin*)RNA kodierende Expressionskassette enthalten. Eine siRNA Expressionskassette enthält sowohl eine *sense*- als auch eine *antisense*-Strang kodierende Sequenz der siRNA. Nach der Expression der Einzelstränge entsteht durch deren Hybridisierung die funktionelle siRNA (Miyagishi und Taira, 2002). Das Transkript von shRNA-Expressionskassetten umfasst eine der Ziel-mRNA homologe Sequenz, deren reverses Kom-

plement und dazwischen einen 3-11 nt langen *Spacer*. Der *Spacer* weist keine Homologie zu den anderen beiden Sequenzen auf, weshalb sich im Anschluss an die homologe Basenpaarung des *sense*- und *antisense-Stranges* ein sogenannter *Loop* bildet, der dem Molekül eine haarnadelförmige Struktur gibt (Brummelkamp *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2002). Funktionelle siRNAs entstehen nach Dicer bedingter Abtrennung des Loops.

RNAi Effektoren exprimierende Vektoren können, wie siRNAs, durch verschiedene Methoden, wie Transfektion oder Jet-Injektion in Zielzellen eingebracht werden (Stege *et al.*, 2004; Stein *et al.*, 2008). Weiterhin werden verschiedene Virus basierte Strategien für die Übermittlung shRNA exprimierender Vektoren eingesetzt, die eine höhere Effektivität gegenüber anderen Methoden aufweisen (Dittgen *et al.*, 2004; Babcock *et al.*, 2005; Ong *et al.*, 2005; Kaszubiak *et al.*, 2007). Virale Vektoren besitzen jedoch Nachteile, wie z.B. die virale Rekombination und die Insertionsmutagenese (Bain *et al.*, 2004; Hacein-Bey-Abina *et al.*, 2008; Stein *et al.*, 2008). Adenovirale Vektoren stellen aufgrund ihrer episomalen Eigenschaften im Vergleich zu Retro- und Lentiviren ein vergleichsweise geringeres Gesundheitsrisiko dar (Bain *et al.*, 2004).

Die Übermittlung spezifischer RNAi Effektoren stellt nach wie vor eine große Herausforderung dar. Nackte siRNAs sind Nukleasen und der Hydrolyse frei ausgesetzt (Rana, 2007). Zudem ist die chemische Modifikation von siRNAs, z.B. durch Liposomkopplung, aufwendig und kostspielig. Virus-basierte Ansätze sind sehr effektiv, gehen jedoch auch mit gewissen Gesundheitsrisiken einher und sind ebenfalls aufwendig bezüglich der Handhabung (Xiang *et al.*, 2006).

Folgend wird die in der vorliegenden Arbeit genutzte Form des *Deliveries*, die *transkingdom* RNAi (tkRNAi), und deren Potential bezüglich der RNAi-Vermittlung erläutert. (Kapitel 1.1.2.1).

1.1.2.1 *Transkingdom RNAi*

Basierend auf Erkenntnissen, dass unterschiedliche Bakterien in Tumorpatienten und in *in vivo* Modellen tumorkolonisierende Eigenschaften, sowie antitumorale Effekte aufweisen, befassen sich diverse Forschungsarbeiten bis heute mit der gezielten Ausnutzung dieser

Effekte im Bereich der Krebstherapie (Carey *et al.*, 1967; Busch, 1868; Nauts, 1980; Pawelek *et al.*, 1997; Low *et al.*, 1999; Toso *et al.*, 2002; Lage und Fruehauf, 2011).

Während paralleler Untersuchungen rein bakterieller antitumoraler Effekte, teilweise gentechnisch modifizierter Mikroorganismen, und der zunehmenden Erkenntnisgewinnung bezüglich des Transfers genetischen Materials, sowie der Struktur RNAi initiiierender Moleküle, lag die Überlegung nahe, RNAi Effektoren intrabakteriell zu exprimieren und die Bakterien gleichzeitig als Transportmittel der therapeutischen Moleküle im Bereich der Krebsforschung einzusetzen. Um Krebs-assoziierte Gene spezifisch durch den bakteriellen Transfer therapeutischer Moleküle auszuschalten, müssen die eingesetzten Bakterien (1) in Mammaliazellen eindringen können und (2) die Fähigkeit aufweisen, die therapeutischen Moleküle anschließend im Zielzellzytoplasma freizugeben (Buttaro und Fruehauf, 2010; Lage und Fruehauf, 2011).

(1) Ralph R. Isberg und Mitarbeiter konnten 1987 einen Zusammenhang zwischen der Fähigkeit des pathogenen Bakteriums *Yersinia pseudotuberculosis*, Mammaliazellen zu penetrieren und dem bakteriellen Protein Invasin (*inv*, 2,3 kb) herstellen (Isberg *et al.*, 1987). Es wurde gezeigt, dass *E. coli*, die von Natur aus nicht invasiv sind, nach Transformation mit *inv*-kodierenden Plasmiden, in Mammaliazellen eindringen können. Das membranoberflächenexponierte Protein Invasin (103 kDa) fungiert als Ligand, welcher an β 1-Integrin-positive Mammaliazellen bindet. Infolge der Ligand-Rezeptor-Interaktion erfolgt eine Reorganisation des Zielzellzytoskeletts, wodurch die Bakterien endozytotisch in das Zytoplasma eindringen (Young *et al.*, 1992).

(2) *Listeria monocytogenes*, ein pathogenes, fakultativ intrazelluläres Bakterium, exprimiert das Zytolysin Listeriolysin O (LLO). LLO, das von *hlyA* (1,5 kb) kodiert wird, ermöglicht *L. monocytogenes*, das endozytotische Vesikel zu verlassen, indem die Membran des Endozytosevesikels lysiert wird.

Mit Hilfe von *inv*- und *hlyA*-exprimierender *E. coli* können Transgene und Proteine *in vitro* und *in vivo* in Zielzellen eingebracht werden (Grillot-Courvalin *et al.*, 1998; Critchley *et al.*, 2004).

Basierend auf diesen Ergebnissen entwickelten Xiang *et al.* (2006) das tkRNAi Plasmid (TRIP). Dieses kodiert neben *inv* und *hlyA* eine shRNA-kodierende Sequenz nach Wahl, die unter Kontrolle eines Bakteriophagen T7 Promoters steht (Xiang *et al.*, 2006) (Abb. 2).

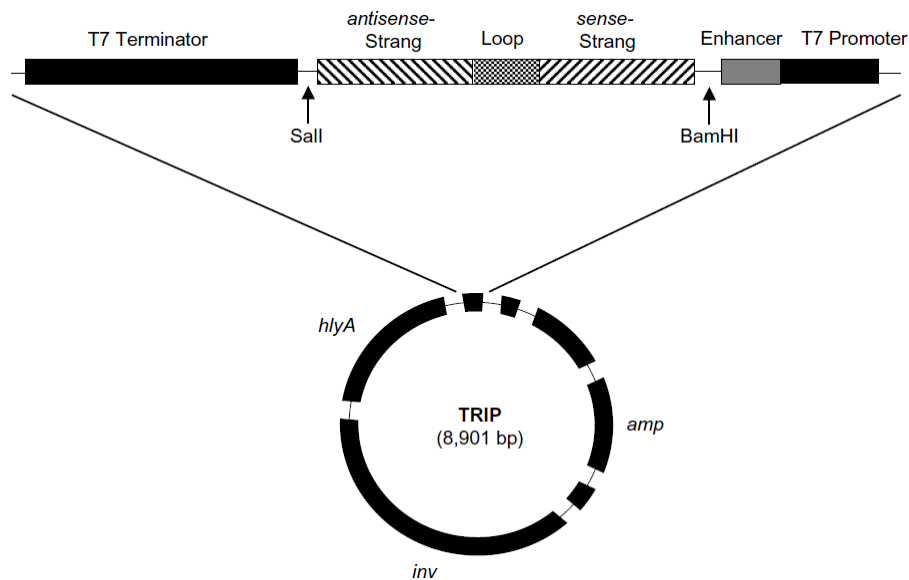


Abbildung 2: Schematische Darstellung des TRIPs (verändert nach Lage *et al.*, 2012)

Mithilfe des TRIPs werden intrabakteriell shRNAs exprimiert, die durch die bakterielle Penetration und Lyse in das Zytoplasma der Zielzellen abgegeben werden. Anschließend findet RNAi-bedingt die sequenzspezifische Degradation der Ziel-mRNA statt. Diese Technik wird als tkRNAi (tkRNAi-TRIP) bezeichnet (Xiang *et al.*, 2006) (Abb. 3).

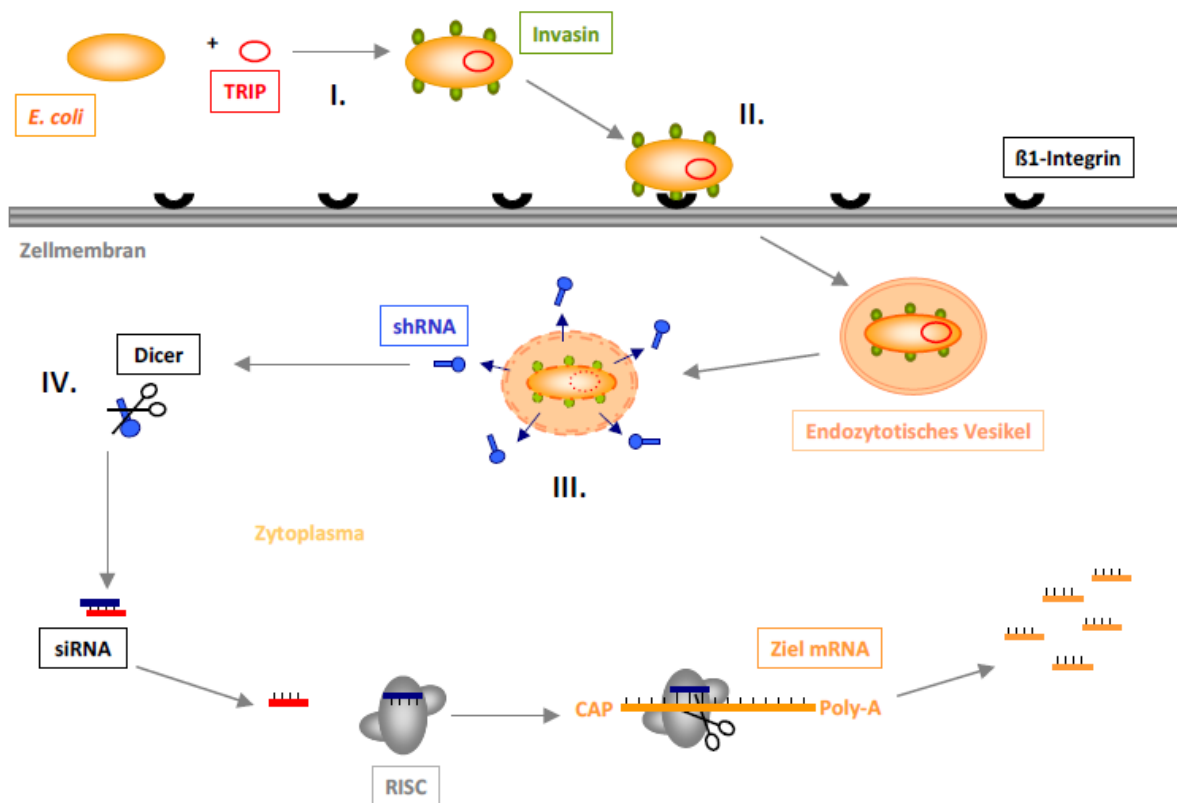


Abbildung 3: Mechanismus der tkRNAi (verändert nach Krühn *et al.*, 2009)

I. Durch das TRIP und die Expression von Invasin werden *E. coli* invasiv. II. Ein Invasin exprimierendes Bakterium bindet an das membranständige $\beta 1$ -Integrin einer Mammaliazelle, wird anschließend internalisiert und in ein endozytotisches Vesikel eingeschlossen. III. Listeriolysin O bewirkt die Freisetzung der shRNAs in das Zytoplasma der Zielzelle. IV. Dicer prozessiert die shRNAs, was die RNAi-bedingte Degradation der Ziel-mRNA zur Folge hat.

Aufgrund des natürlichen Vorkommens von *E. coli* im menschlichen Darm, wäre die Verwendung der *E. coli* vermittelten tkRNAi besonders geeignet zur Behandlung intestinaler Erkrankungen, wie beispielsweise chronisch-entzündliche Darmerkrankungen oder Kolonkarzinome (Lage und Fruehauf, 2011). Die Wirksamkeit der Technologie wurde erstmals am Beispiel des Kolonkarzinom assoziierten Onkogens $\beta 1$ -Catenin (*CTNNB1*) untersucht (Xiang *et al.*, 2006). *In vitro* wurde, nach Applikation der tkRNAi-TRIP anti-*CTNNB1*, eine signifikant verminderte *CTNNB1* Expression in der Kolonkarzinomzelllinie SW480 beobachtet. *In vivo* Versuche zeigten weiterhin, dass die orale Applikation der Technologie zu einer verminderten *CTNNB1* Expression der intestinalen Gewebe von Mäusen führt. Die intravenöse systemische Gabe von anti-*CTNNB1*-shRNA exprimierenden *E. coli* wurde in SW480 Kolonkarzinomzell-Xenograft-Mäusen getestet. Die transplantierten Tumorzellen wiesen ebenfalls eine tkRNAi

bedingte *CTNNB1* Inhibition auf. Nachteilige Effekte der Behandlung auf die Mäuse, wie Unverträglichkeiten oder epitheliale Schäden, wurden nicht verzeichnet (Xiang *et al.*, 2006).

Zur Überprüfung der Übertragbarkeit der tkRNAi-TRIP auf weitere therapierelevante Zielgene wurden *in vitro* Untersuchungen unter Verwendung der Technologie mit dem Ziel der Aufhebung der *ABCB1* (*ATP-binding cassette, sub-family B, member 1*) assoziierten klassischen Multidrugresistenz (MDR) (Kapitel 1.2.1) humaner MDR Zellen, an der Krebstherapien häufig scheitern, durchgeführt (Krühn *et al.*, 2009). Die Ergebnisse dieser publizierten Arbeit sind Bestandteil der vorliegenden Dissertation und in Kapitel 3.1 nachzulesen.

Unter der Leitung von Dr. Dr. Johannes Fruehauf (Cequent Pharmaceuticals, Inc.) wurde die tkRNAi-TRIP weiterentwickelt. Die resultierende tkRNAi-pMBV43 Variante soll, anhand des DAP(2,6-Diaminopimelsäure)-auxotrophen, RNase III deletierten *E. coli* Stammes ceq221 und durch das modifizierte Plasmid pMBV43, das ein noch distinkteres Transkriptionsabbruchsignal für das shRNA-Transkript als TRIP aufweist, zu einer höheren Anzahl funktioneller siRNAs im Zielzellzytoplasma führen. Die Effizienzsteigerung der tkRNAi-pMBV43 Variante wurde ebenfalls am Beispiel der Reversion des klassischen MDR Phänotyps untersucht (Lage und Krühn 2010). Die Ergebnisse dieser Studie sind ebenso Bestandteil der vorliegenden Arbeit (Kapitel 3.2).

Im Folgenden wird auf die Chemoresistenz von Tumoren (1.2) und näher auf die *ABCB1* bedingte klassische (1.2.1) und die *ABCG2* (*ATP-binding cassette transporter, subclass B, member 2*) bedingte atypische MDR (1.2.2) eingegangen, deren Reversion mittels tkRNAi jeweils Bestandteil der vorliegenden Arbeit ist.

1.2 Krebs, Chemotherapie und Zytostatikaresistenz

Krebs bzw. maligne Neoplasien (Tumore) sind durch Mutationen, die den Zellzyklus beeinflussen, bedingt. Im Gegensatz zu onkogenen bzw. dominanten Mutationen (*gain of function*) ist bei rezessiven Mutationen (*loss of function*) ein homozygotisches Auftreten vorausgesetzt (Griffith *et al.*, 2005). Maligne Tumore entstehen durch die ausbleibende Apoptose von Zellen, die vermehrte Zellteilung oder durch beides.

Je nach Tumorentität wird eine Chemotherapie, eine Strahlentherapie, eine chirurgische Resektion oder eine Kombinationstherapie für die Behandlung gewählt (Dold, *et al.*, 1993). Bei der Chemotherapie werden zytotoxische Substanzen, allgemein als Zytostatika bezeichnet, eingesetzt, die eine chemisch heterogene Substanzgruppe umfassen und meist systemisch verabreicht werden.

Eine Chemoresistenz, also das ausbleibende Ansprechen des Tumors auf die Behandlung, kann intrinsisch bzw. primär oder erworben bzw. sekundär vorliegen (Pastan und Gottesman, 1987). Folgende zelluläre Faktoren können beispielsweise eine Chemoresistenz bedingen (Soldan *et al.*, 1996; Gottesman *et al.*, 2002; Gottesman *et al.*, 2006):

- verminderte zelluläre Aufnahme von Medikamenten,
- **verstärkter Efflux von Medikamenten aus der Zelle,**
- Metabolisierung/Inaktivierung von Medikamenten, Detoxifizierung,
- Kompartimentierung intrazellulärer Medikamente,
- Rezeptormutationen/Mutationen der Zellzykluskontrollpunkte/fehlerhafte, Signaltransduktion
- Induktion von „Notfallgenen“/DNA-Reparaturgenen,
- verstärkte Expression zellulärer Medikamententargets.

Von einer Multidrugresistenz (MDR) wird gesprochen, wenn ein Tumor gleichzeitig auf mehrere chemisch und funktionell unterschiedliche Zytostatika nicht mehr anspricht (Biedler und Riehm, 1970; Lehnert, 1994). Neben der klassischen MDR, die auf die Überexpression des ABC(ATP binding cassette)-Transporters ABCB1 zurückzuführen ist (Kap. 1.2.1), kann auch eine atypische MDR in Folge weiteren Resistenzmechanismen, wie der Überexpression weiterer ABC-Transporter, auftreten.

1.2.1 ABCB1 und klassische MDR

Juliano und Ling gelang es 1976 erstmals, den ABC-Transporter ABCB1 (ATP-binding cassette, sub-family B, member 1, 170 kDa) in Colchizin-resistenten CHO(*Chinese hamster ovary*)-Zellen nachzuweisen und zu isolieren (Juliano und Ling, 1976). Synonyme Bezeichnungen sind P-gp (*permeability glycoprotein*) oder MDR1 (*multidrug resistance protein 1*).

Die chromosomale Position des *ABCB1* Gens ist 7q21.12 (Shen *et al.*, 1986). Der Funktion entsprechend, weist *ABCB1* zwei hydrophile Nukleotid (ATP)-bindende Domänen (NBD) auf der zytoplasmatischen Seite und zwei hydrophobe Transmembrandomänen (TMD) mit jeweils sechs membranübergreifenden alpha-Helices auf (Chen *et al.*, 1986; Choi, 2005) (Abb. 4). Jede NBD enthält ein Walker A Motiv und ein hydrophobes Walker B Motiv, die an der ATP-Bindung beteiligt sind, sowie ein ABC-Motiv, dessen Funktion die Übertragung der, bei der Hydrolyse des ATPs, frei werdenden Energie auf den Transportvorgang ist (Walker *et al.*, 1982; Hyde *et al.*, 1990; Krishna und Mayer, 2000).

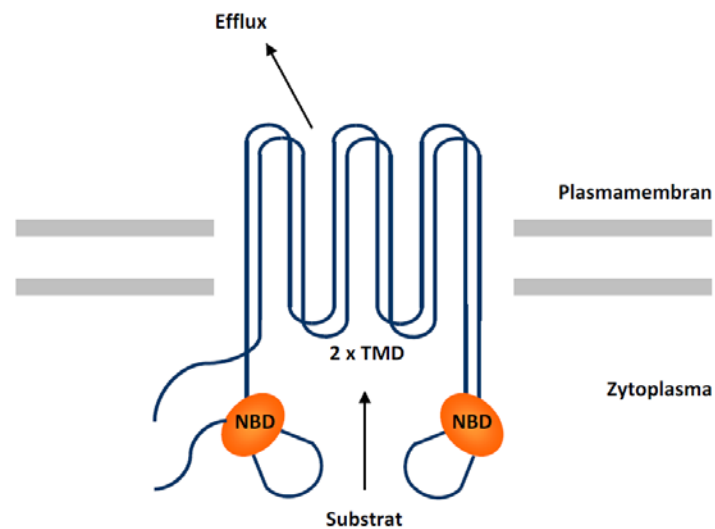


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Transmembrantransporterproteins ABCB1 (verändert nach Sorrentino, 2002)

Der Effluxtransporter ABCB1 wird in vielen humanen epithelialen Geweben, wie beispielsweise in der Leber, der Niere und der Blut-Hirnschranke konstitutiv exprimiert, wo er eine wichtige exkretorische und detoxifizierende Rolle einnimmt (Cordon-Cardo *et al.*, 1989; Thomas *et al.*, 2003). Zu den von ABCB1 transportierten, hydrophoben Substanzen, zählen verschiedenste Medikamente und Xenobiotika (Jin *et al.*, 2012).

Die Überexpression von ABCB1 maligner Tumore wird mit der klassischen MDR in Zusammenhang gebracht (Kartner *et al.*, 1983; Riordan *et al.*, 1985). Der klassische MDR Phänotyp ist durch eine verminderte Akkumulation hydrophober Substanzen durch den verstärkten ABCB1 bedingten Efflux und eine Kreuzresistenz gegenüber chemisch und funktionell unter-

schiedlicher Substanzgruppen gekennzeichnet (Kartner *et al.*, 1983; Zini *et al.*, 1995, Borowski *et al.*, 2005). Die Reversion des MDR Phänotyps kann anhand verschiedener MDR Modulatoren, wie z.B. Verapamil und Cyclosporin A, erreicht werden (Twentyman *et al.*, 1990; Lage, 2003).

Die verstärkte Expression des ABC-Transporters kann entweder natürlich vorliegen oder durch verschiedene Induktoren erfolgen. Hierzu gehören z.B. die Selektion mit antineoplastischen Substanzen, wie den Anthrazyklinen Dauno- und Doxorubicin, physischem Stress, wie Hitzeschock, oder UV-Strahlung in Zellkulturen, oder *in vivo* eine chemotherapeutische Behandlung (Ueda *et al.*, 1987; Miyazaki *et al.*, 1992; Chaudhary und Roninson, 1993; Kohono *et al.*, 1993; Takara *et al.*, 2003; Uchiumi *et al.*, 1993; Nakagawa *et al.*, 1997; Labialle *et al.*, 2002; Hui *et al.*, 2008).

Aufgrund des häufigen MDR bedingten Scheiterns chemotherapeutischer Krebstherapien ist die Überwindung des MDR Phänotyps von hoher klinischer Relevanz und Gegenstand diverser wissenschaftlicher Studien.

1.2.1.1 Forschungsansätze zur Reversion der ABCB1 bedingten klassischen MDR

Forschungsansätze mit dem Ziel der MDR Reversion beschäftigen sich u.a. mit dem Einsatz sogenannter MDR Modulatoren, wie Kalzium-Kanalblocker (z.B. Verapamil), Immunsuppressiva (z.B. Cyclosporin A) oder Steroidhormone (z.B. Cortisol) (Tsuruo *et al.*, 1981; Robert und Jarry, 2003). Die Wirkung dieser, auch als *Chemosensitizer* bezeichneten, pharmakologisch aktiven Substanzen, basiert auf kompetitiven Substrateigenschaften oder auf einer allosterischen Hemmung von ABCB1, wodurch dessen Effluxaktivität unterbunden wird (Kellen, 2003; Robert und Jarry, 2003; Thomas und Coley, 2003). Aufgrund der hohen Plasmakonzentrationen verschiedener MDR Modulatoren, die für eine MDR Modulation erforderlich sind, und der pharmakologischen Eigenwirkung der ersten MDR Modulatoren, ergaben sich in klinischen Studien starke, teilweise lebensbedrohliche Toxizitäten (Krishna und Mayer, 2000; Tan *et al.*, 2000). Auch folgende Generationen von MDR Modulatoren zeigten partiell Nebenwirkungen, wie beispielsweise die verstärkte Aktivität von Leberenzymen und dem damit einhergehenden Abbau der Medikamente (Lage, 2006). Neuere MDR Modulatoren,

sowie Strukturanaloga vorhandener MDR Modulatoren, ohne vergleichbare pharmakologische Nebenwirkungen, werden zunehmend erforscht (Baumert und Hilgeroth, 2009).

Der Einsatz von RNA Technologien mit dem Ziel der posttranskriptionellen Inhibition des MDR assoziierten ABC-Transporters ABCB1 stellt einen vielversprechenden Forschungsansatz dar, um MDR Modulatoren bedingte toxische Nebenwirkungen zu umgehen. Erste experimentelle Untersuchungen beschäftigten sich mit *Antisense*-Oligonukleotiden (ASO), die durch komplementäre Basenpaarung an die mRNA des Zielgens die Translation inhibieren (Vasanthakumar *et al.*, 1989). Weiterhin wurden *in vitro* unter Verwendung von Ribozymen bzw. *Hammerhead*-Ribozymen teils starke Reversionen des MDR Phänotyps verschiedener MDR Zelllinien verzeichnet (Holm *et al.*, 1994; Kobayashi *et al.*, 1994). Ribozyme sind einzelsträngige RNAs mit katalytischen Eigenschaften, die komplementäre Ziel-mRNAs riboendonukleolytisch spalten (Kobayashi *et al.*, 1994). Ein besonderer Fokus der Forschung liegt auf dem Potential der RNAi zur Überwindung der klassischen MDR. In der Vergangenheit eingesetzte RNAi Effektoren, welche die spezifische und selektive posttranskriptionelle Geninhibition von *ABCB1* bewirkten, umfassen z.B.

- anti-*ABCB1*-siRNAs (Nieth *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2003; Duan *et al.*, 2004; Peng *et al.*, 2004; Stierle *et al.*, 2004, Xu *et al.*, 2004),
- anti-*ABCB1*-shRNA Expressionsvektoren (Celius *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2004; Stege *et al.*, 2004; Yagüe *et al.*, 2004; Stein *et al.*, 2008) und
- adenoviral bzw. adeno-assoziiert viral übermittelte anti-*ABCB1*-shRNA Expressionsvektoren (Xu *et al.*, 2005; Kaszubiak *et al.*, 2007).

Abhängig davon, ob siRNAs oder shRNAs verwendet werden, welcher Promoter in Expressionsvektoren die Expression der RNAi vermittelnden RNAs kontrolliert, welches Modellsystem vorliegt und welche Zielsequenz für das siRNA beziehungsweise shRNA Design gewählt wird, erfolgt eine unterschiedlich starke MDR Modulation (Stege *et al.*, 2004; Kaszubiak *et al.*, 2007). Die uneinheitlich eingesetzten analytischen Verfahren erschweren die Vergleichbarkeit der Ergebnisse (Duan *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2004; Lage, 2005).

1.2.2 ABCG2 und atypische MDR

ABCG2 (*ATP-binding cassette, sub-family G, member 2*; 72 kDa) wurde 1998 erstmals in humanen MCF-7/AdrVp Brustkarzinomzellen entdeckt und beschrieben, weshalb dieser ABC-Transporter auch BCRP (*breast cancer resistance protein*) genannt wird (Doyle *et al.*, 1998). Weitere synonyme Bezeichnungen sind MXR (*Mitoxantrone resistance-associated protein*) und ABCP (*placenta-specific ABC gene*) (Allikmets *et al.*, 1998; Miyake *et al.*, 1999).

Die chromosomale Lokalisation des humanen ABCG2 Gens ist 4q22. Der ABC-Transporter liegt in der zellulären Plasmamembran als Halbtransporter vor (Litman *et al.*, 2000; Rocchi *et al.*, 2000). Im Gegensatz zu ABCB1 muss der ABCG2 Transporter, der nur eine TMD und eine NBD aufweist, zum Erlangen der vollen Funktionalität ein Dimer bilden (Abb. 5). Dimerisierung ist für alle ABC-Transporter der Klasse G erforderlich, um funktionsfähig zu sein (Lage und Dietel, 2000; Robey *et al.*, 2011).

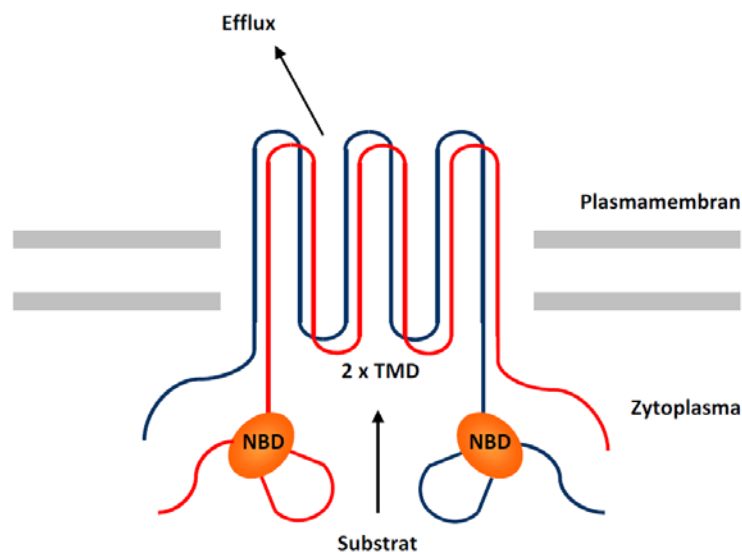


Abbildung 5: Schematische Darstellung des funktionellen ABCG2 Dimers (verändert nach Sorrentino, 2002)

Neben chemotherapeutischen Agenzien, wie z.B. dem Antibiotikum Mitoxantron, den Anthrazyklinen Dauno- und Doxorubicin, sowie dem Topoisomerasehemmer Topotecan (Steinbach *et al.*, 2002; Doyle und Ross, 2003), werden Krebs therapie unabhängige Stoffe, wie beispielsweise verschiedene Karzinogene (van Herwaarden *et al.*, 2003, 2006), weitere Antibiotika (Merino *et al.*, 2006; Ando *et al.*, 2007) oder Antiviralen (Wang *et al.*, 2004),

transportiert. Zwischen ABCG2, ABCB1 und einem weiteren ABC-Transporter, ABCC2 (*ATP-binding cassette transporter, class C, member 1*), besteht eine überschneidende Substratspezifität (Yue *et al.*, 2009).

Die im Vergleich zu vielen anderen Geweben verstärkte Expression von ABCG2 im Plazentagewebe legt nahe, dass der Transporter eine wichtige Rolle in der plazentaren Barriere einnimmt (Lage, 2003). Weiterhin konnte die ABCG2 Expression in der Blut-Hoden- und der Blut-Hirn-Schranke nachgewiesen werden (Robey *et al.*, 2007). Die Höhe der ABCG2 Expression nimmt vom oberen Teil des gastrointestinalen Traktes zum unteren Teil hin ab (Gutmann *et al.*, 2005). Wahrscheinlich ist der ABC-Transporter in diesem Bereich unter anderem verantwortlich für den Transport von, in Nahrungsmitteln enthaltenden, Karzinogenen (Robey *et al.*, 2011). Weiterhin wird die Rolle von ABCG2 bei der renalen Exkretion diskutiert (Fetsch *et al.*, 2006).

In unterschiedlichen Mitoxantron selektierten Tumorzelllinien, in denen weder ABCB1 noch ABCC2 überexprimiert vorliegen, kann trotzdem eine verminderte intrazelluläre Medikamentenakkumulation beobachtet werden (Dietel *et al.*, 1990; Nakagawa *et al.*, 1992; 1997; Hazlehurst *et al.*, 1999). Durch die Aufklärung dieses ABCG2 bedingten Phänomens und anhand weiterer Untersuchungen wurde festgestellt, dass ABCG2 in einer Vielzahl humaner atypischer MDR Karzinomzelllinien, die durch *in vitro* Expositionen mit den Zytostatika Mitoxantron oder Doxorubicin selektiert wurden, überexprimiert wird (Doyle *et al.*, 1998; Ross *et al.*, 1999). Weiterhin konnte durch die ABCG2 cDNA Transfektion in Chemotherapeutikasensitive Karzinomzellen ein atypischer MDR Phänotyp erzeugt werden (Doyle *et al.*, 1998). In ABCB1 defizienten Mäusen wurde im Vergleich zu Wildtypmäusen eine signifikant höhere ABCG2 Expression gemessen, was eine kompensatorische Funktion von ABCG2 vermuten lässt (Cisternio *et al.*, 2004).

1.2.2.1 Forschungsansätze zur Reversion der ABCG2 bedingten atypischen MDR

Zu den ABCG2 inhibierenden Substanzen zählen beispielsweise das sekundäre Metabolit Fumitremorgin C (FTC) von *Aspergillus fumigatus* (Rabindran *et al.*, 1998), das Antibiotikum Novobiocin (Hausner *et al.*, 1999), verschiedene Flavonoide (Zhang *et al.*, 2004; Ahmed-Belkacem *et al.*, 2005), unterschiedliche Tyrosinkinaseinhibitoren (Ozvegy-Laczka *et al.*,

2004), sowie die ABCB1 Inhibitoren Elacridar (de Bruin *et al.*, 1999), Biricodar (Minderman *et al.*, 2004), Dofequidar (Katayama *et al.*, 2009) und Tariquidar (Robey *et al.*, 2004). Anders als bei ABCB1 führen Verapamil und Cyclosporin A zu keiner Reversion der ABCG2 bedingten atypischen MDR (Litman *et al.*, 2000). Verschiedene ABCG2 *Chemosensitizer* sind in den erforderlichen Plasmakonzentrationen, wie Modulatoren der klassischen MDR, toxisch, wie beispielsweise das neurotoxische FTC, oder wirken nicht spezifisch genug, um unvorhersehbare Nebenwirkungen ausschließen zu können (Doyle und Ross, 2003). Hinzu kommt, dass Resistenzen gegenüber der ABCG2 Modulatoren auftreten können (Kowalski *et al.*, 2002).

RNA-Technologien bieten, wie für die Reversion der klassischen MDR, erfolgsversprechende Alternativen zu toxisch wirkenden ABCG2 Inhibitoren. Unter Verwendung eines anti-ABCG2 *Hammerhead* Ribozyms konnten beispielsweise verminderte ABCG2 mRNA- und Proteinmengen, sowie eine gesteigerte Mitoxantronakkumulation und die partielle Reversion der atypischen MDR in einer humanen atypischen MDR Zelllinie festgestellt werden (Kowalski *et al.*, 2002). Die RNAi vermittelte Reversion der ABCG2 bedingten atypischen MDR wurde in der Vergangenheit u.a. durch die Applikation von

- anti-ABCG2-siRNAs (Ee *et al.*, 2004; Pribsch *et al.*, 2006),
- anti-ABCG2-siRNA Expressionsvektoren (Li *et al.*, 2005),
- anti-ABCG2-shRNA Expressionsvektoren (Pribsch *et al.*, 2006; Lv *et al.*, 2007),
- adenoviral übermittelte anti-ABCG2-shRNA Expressionsvektoren (Yue *et al.*, 2009) und
- lentivirale anti-ABCG2-shRNA Vektoren (Zhang *et al.*, 2009) erzielt.

1.3 Hypothesen

Ein großes Hindernis für den gentherapeutischen Einsatz der RNAi ist die effektive Übermittlung von RNAi Effektoren. Nachdem Xiang *et al.* (2006) die spezifische Inhibition von *CTNNB1* durch die tkRNAi gelang, wird in der vorliegenden Arbeit die Übertragbarkeit und das Potential dieser Technologie am Beispiel der klinisch relevanten klassischen und atypischen MDR diskutiert. Folgende Hypothesen wurden im Rahmen der vorliegenden Dissertation untersucht:

1. **Hypothese:** Die tkRNAi-TRIP ist auf ein humanes MDR Karzinomzellkulturmodell mit dem Ziel der *ABCB1* Inhibition und der Reversion der klassischen MDR übertragbar.
2. **Hypothese:** Die tkRNAi-pMBV43 weist im gleichen humanen MDR Karzinomzellkulturmodell eine höhere Effizienz bezüglich der *ABCB1* Inhibition und der Reversion der klassischen MDR auf als die tkRNAi-TRIP.
3. **Hypothese:** Die tkRNAi-pMBV43 ist auf ein weiteres humanes MDR Karzinomzellkulturmodell mit dem Ziel der *ABCB1* Inhibition und der Reversion der klassischen MDR übertragbar.
4. **Hypothese:** Die tkRNAi-pMBV43 ist auf ein humanes atypisches MDR Karzinomzellkulturmodell mit dem Ziel der *ABCG2* Inhibition und der Reversion der atypischen MDR übertragbar.

Zur Überprüfung der Hypothesen kamen folgende tkRNAi Varianten und gut etablierte klassische und atypische MDR Karzinomzelllinien zum Einsatz (Tab. 1):

Tabelle 1: Verwendete tkRNAi Varianten und MDR Modelle

Überprüfung	1. Hypothese	2. Hypothese	3. Hypothese	4. Hypothese
tkRNAi Variante	TRIP	pMBV43	pMBV43	pMBV43
MDR Modell	EPG85-257RDB (klassische MDR)	EPG85-257RDB (klassische MDR)	MaTu/ADR (klassische MDR)	EPG85-257RNOV (atypische MDR)
Zielgen	<i>ABCB1</i>	<i>ABCB1</i>	<i>ABCB1</i>	<i>ABCG2</i>
Kapitel	3.1	3.2		3.3

2 Material und Methoden

Die Analysen zur Überprüfung der Hypothesen glichen einander und sind Abbildung 6 zu entnehmen.

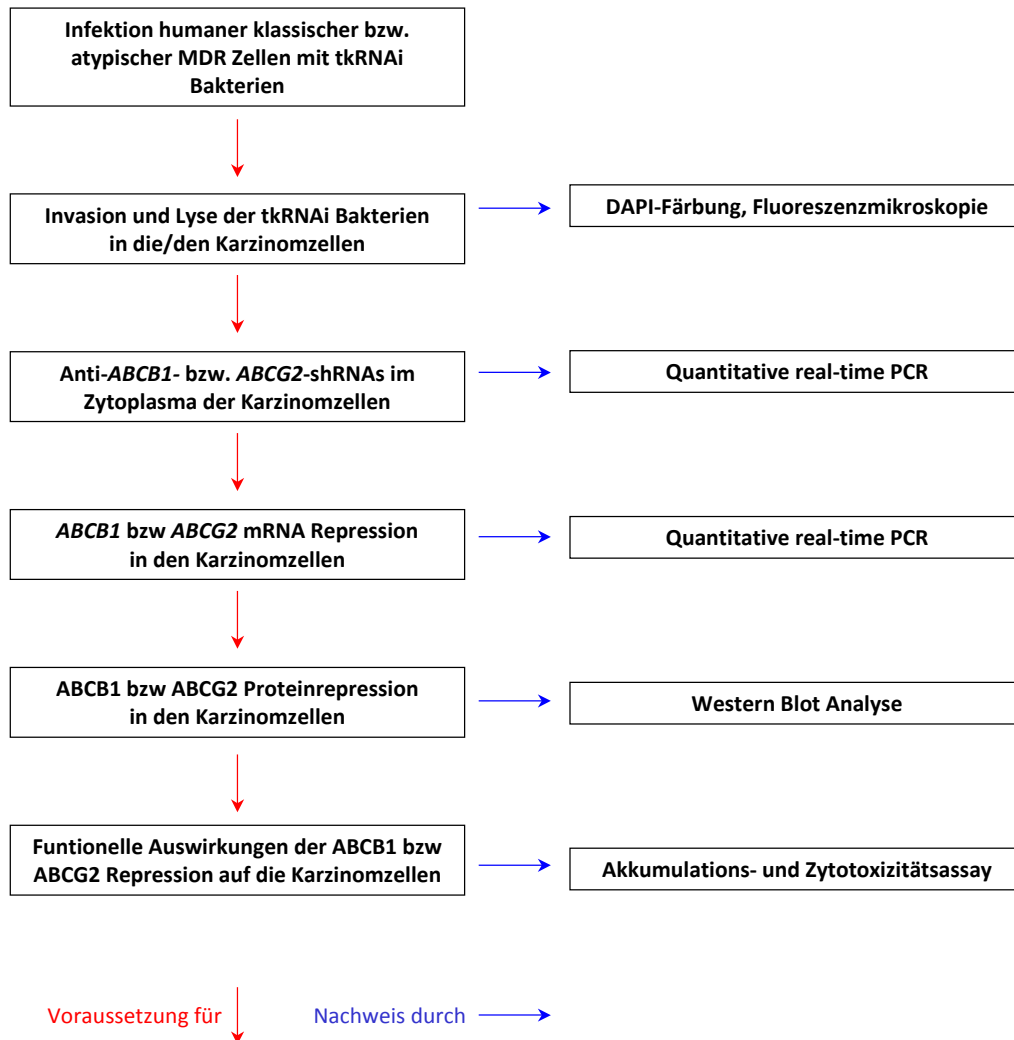


Abbildung 6: Analytische Vorgehensweise zur Überprüfung der Hypothesen

In den folgenden Kapiteln 2.1 und 2.2 werden die für die vorgenommenen Analysen verwendeten Materialien und die Methoden näher beschrieben.

2.1 Material

2.1.1 Organismen

2.1.1.1 Humane Karzinomzelllinien

Die humanen Karzinomzelllinien (Tab. 2) wurden vom Institut für Pathologie der Charité Universitätsmedizin Berlin zur Verfügung gestellt.

Tabelle 2: Verwendete humane Karzinomzelllinien

Zelllinie	Ursprung/Sublinie	Referenz
EPG85-257P	Magenkarzinom	Dietel <i>et al.</i> , 1990
EPG85-257RDB	Daunorubicin selektierte, klassische MDR Sublinie	Lage <i>et al.</i> , 2000
EPG85-257RDB/anti- <i>ABCB1</i> -shRNA* ²	Zeocin selektierte, stabile Transfektante	Stege <i>et al.</i> , 2004
EPG85-257RNOV	Mitoxantron selektierte, atypische MDR Sublinie	Dietel <i>et al.</i> , 1990
MaTu* ¹	Zervixkarzinom	Widmaier <i>et al.</i> , 1974
MaTu/ADR	Doxorubicin selektierte, klassische MDR Sublinie	Stein <i>et al.</i> , 1997
MaTu/ADR/anti- <i>ABCB1</i> -shRNA* ³	Zeocin selektierte, stabile Transfektante	Stein <i>et al.</i> , 2008

*¹ Die Zelllinie MaTu wurde ursprünglich als Mammakarzinom-abgeleitete Zelllinie beschrieben, bei der es sich jedoch nach neueren Analysen um HeLa Zellen (Zervixkarzinom-abgeleitete Zellen) handelt (MacLeod *et al.*, 1999). *² Synonyme Bezeichnung für EPG85-257RDB/shRNA clone 2. *³ Synonyme Bezeichnung für MaTu/ADR/psiRNA/MDR-C

2.1.1.2 Mikroorganismen

Tabelle 3: Verwendete *E. coli* Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
BL21(DE3)	F- <i>ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm</i>	Grunberg-Manago, 1999; Kido <i>et al.</i> , 1996; Lopez <i>et al.</i> , 1999
ceq221	MM294 <i>dapArnc</i>	Cequent Pharmaceuticals, Inc.

Der *E. coli* Stamm BL21(DE3) (Invitrogen) wurde bereits chemisch kompetent geliefert, während die chemische Kompetenz der *E. coli* ceq221 (Cequent Pharmaceuticals, Inc.) mittels Calciumchloridmethode generiert wurde (Kap. 2.2.2.3).

2.1.2 Geräte

Tabelle 4: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
BioKineticsReader EL 340 (ELISA)	Bio-Tec Instruments
Brutschrank Steri Cult 200	Lifescience
Brutschrank für Bakterienkultur	Heraeus Instruments GmbH
Dampfsterilisator, Varioklav Typ 300/400/500 EP-Z	H+P Labortechnik GmbH
Digitalkamera PSC300SX	Leica
Digital Printer UP-D860E/Gel Print 2000i	Sony
DNA Thermal Cycler 480	Perkin Elmer
Durchlicht-Mikroskop LSM II	Zeiss
Epifluoreszenzmikroskop DMRX	Leica
Expositionskassette (Hypercassette)	Amersham Biosciences
Fluoreszenzmikroskopfilter:	
- DAPI bandpass	Vysis
Gelelektrophoresekammer:	

- mini Protean II	Bio-Rad Laboratories GmbH
- mini Sub Cell GT	Bio-Rad Laboratories GmbH
- Wide mini-Sub Cell GT	Bio-Rad Laboratories GmbH
Laborwaage BL1500S	Sartorius AG
LightCycler Instrument	Roche Diagnostics GmbH
Magnetrührer RCT Basic	IKA-Labortechnik
MP 220 pH-Meter	Mettler Toledo GmbH
Multikanalpipette	Eppendorf
Nalgene Cryo.s 1 °C Freezing Container	Nalgene Europe Ltd.
Pipetboy acu	Integra Bioscience
Photometer GeneQuant II	Amersham Biosciences Europe GmbH
Reinstwasseranlage Milli-RO 10/Milli-Q Plus	Millipore Corp.
SmartSpec Plus Spectrophotometer	Bio-Rad Laboratories GmbH
Steri-Cult 200 Incubator	Forma Scientific, Inc.
Stromversorgungsgerät Power Pac 200	Bio-Rad Laboratories GmbH
Thermomixer 5436	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH
Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH
Trio Thermoblock	Biometra
Schüttelinkubator WT16	Biometra
Steril-Bank Lamin Air HBB 2472	Heraeus Instruments GmbH
UV Crosslinker UVC1000	Hofer
UV-Transilluminator	MWG-Biotech AG
Varioklave Dampfsterilisator Typ 300 Vortex VF 2	IKA-Labortechnik
Wasserbad 1002	GFL
Zentrifugen	
- Kühlzentrifuge J2-MC	Beckman Coulter
(Rotor: JA25.5 und JA 14)	
- Optima LE80K Ultrazentrifuge	Beckman Coulter
- Tischzentrifuge 5415 C	Eppendorf AG
Zellzählkammer Fuchs-Rosenthal	HBG

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Glasgefäße wurden von der Firma Schott bezogen. Weitere Verbrauchsmaterialien, wie Pipettenspitzen, wurden bei der Firma Eppendorf bestellt. Zell- und Bakterienkulturmaterialien, wie Zellkulturflaschen oder serologische Pipetten, wurden von der Firma Falcon verwendet.

Tabelle 5: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Chromatographiepapier 3MM CHR	Whatman
Chamber Slide System (LAB-TEK II)	Nalge Nunc International
Einfrierröhrchen Cellstar Cryo.s	Greiner Bio-One GmbH
Einmal-Küvetten Plastibran	Brand GmbH + Co KG
FACS-Röhrchen	Nalgene Nunc International
Handschuhe SafeSkin SatinPlus	Kimberley-Clark Corp.
Hyperfilm ECL	Amersham Biosciences Europe GmbH
Kodak BioMax MR Film	Eastman Kodak Company
Light Cycler Capillaries (20 µl)	Roche Diagnostics
Nylontransfermembran Hybond-N ⁺	Amersham Biosciences Europe GmbH
Protran BA 85 Zellulosenitrat	Schleicher & Schuell

2.1.4 Chemikalien

Die Chemikalien wurden mit dem Reinheitsgrad *pro analysi* erworben.

Tabelle 6: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Acrylamid-Bis-Acrylamid (19:1)	Qbiogene
Agarose Ultra Pure	Invitrogen GmbH
Amidoschwarz (naphthol blue black)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck KgaA
Amphotericin	Biochrom AG

Ampicillin Natriumsalz	Carl Roth GmbH
Antibody Diluent, Background Reducing	DakoCytomation
Bacto Agar	Difco Laboratories
Bacto Hefeextrakt	Difco Laboratories
Bacto Trypton	Difco Laboratories
Blue/Orange 6 x Loading Dye	Promega GmbH
Bovines Serumalbumin Fraktion V (BSA)	SERVA Electrophoresis GmbH
Color Markers (high range, 29-205 kDa)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Complete (Proteinase-Inhibitor)	Roche Diagnostics GmbH
Daunorubicin Hydrochlorid (Daunoblastin)	Pfizer Deutschland
Denhardt's Reagenz	Fluka
2'-Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphate	Roche Diagnostics GmbH
4',6-Diamidino-2-phenylindol x 2 HCl (DAPI)	Sigma Aldrich
2,6-Diaminopimelsäure	Sigma Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
DL-Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Entwickler RP X-OAT EX	Eastman Kodak Company
Essigsäure	J.T. Baker
Ethanol absolut	J.T. Baker
Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Ethylendiamintetraessigsäure-di-Natriumsalz (EDTA)	SERVA Electrophoresis GmbH
Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	Merck KgaA
ExpressHyb™ Hybridization Solution	BD Biosciences – Clontech
Fetuin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Fixierer RP X-OMAT LO	Eastman Kodak Company
Fötales Kälberserum (FKS)	Biochrom AG
Formaldehyd (37 %)	J.T. Baker
Formamid	Merck KgaA
Gentamycin (10 mg/ml)	Biochrom AG

D(+)-Glukose-Lösung (45 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
L-Glutamin (200 mM)	Cambrex Bio Science
Glyzerin (pflanzlich)	SERVA Electrophoresis GmbH
Harnstoff	Merck KgaA
H-Insulin (40 IE/ml), Insuman Rapid	Aventis Pharma
Leibovitz L-15 Medium ohne L-Glutamin	BioWhittaker Europe
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid	Sigma Aldrich
Magermilch (skim milk)	Difco Laboratories
MEM-Vitamine (100 x)	Biochrom AG
Methanol	J.T. Baker
Molekularbiologisches Wasser	Eppendorf AG
3-(n-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS)	Merck KgaA
Natriumazetat	Merck KgaA
Natriumbikarbonat 7,5 % (w/v)	Biochrom AG
Natriumchlorid	Merck KgaA
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck KgaA
Natriumhydrogenkarbonat	Merck KgaA
NorthernMax Formaldehyde Load Dye	Ambion (Europe) Ltd
OptiMEM mit GlutaMax™ I	Invitrogen GmbH
D-PBS (10 x)	Invitrogen GmbH
Penicillin (5000 U/ml)	Invitrogen GmbH
Primary Mouse Negative Control	DakoCytomation
2-Propanol	J.T. Baker
RNAlater	Ambion (Europe) Ltd
VLE RPMI 1640 mit L-Glutamin	Biochrom AG
Streptomycin (5000 μ g/ml)	Invitrogen GmbH
Sulforhodamin B (SRB)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Transferrin	Roche Diagnostics GmbH
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck KgaA

Trichloressigsäure (TCA)	Merck KgaA
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris-Base)	Merck KgaA
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-hydrochlorid (Tris-HCl)	Merck KgaA
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Trypsin-EDTA-Lösung 0,5 % / 0,2 % (w/v) in PBS (10X)	Biochrom AG
Tween 20	SERVA Electrophoresis GmbH
Zeocin	Invitrogen GmbH

2.1.5 Antikörper

Tabelle 7: Verwendete Antikörper

Antikörper	Hersteller
<i>Goat anti-Mouse IgG</i> , (H+L), Peroxidase konjugiert	Science Deutschland GmbH
<i>Mouse monoclonal anti-α-Aktin</i>	Chemicon International, Inc.
<i>Mouse monoclonal anti-ABCB1(C219)</i>	Alexis Biochemicals
<i>Mouse monoclonal anti-ABCG2 (BXP-21)</i>	Alexis Biochemicals

2.1.6 Enzyme

Tabelle 8: Verwendete Enzyme

Enzym	Hersteller
RNase, DNase-frei (500 μ g/ml)	Roche Diagnostics GmbH
Super Script II Reverse Transkriptase	Invitrogen GmbH

2.1.7 Kits

Tabelle 9: Verwendete Kits

Kit	Hersteller
ECL Western Blotting Analysis System	Amersham Biosciences Europe GmbH
LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I	Roche Diagnostics GmbH
<i>mirVana</i> [™] miRNA Isolation Kit	Ambion
Qiaprep miniprep	Qiagen GmbH
Qiaprep midiprep	Qiagen GmbH
Qiaprep maxiprep	Qiagen GmbH
RNeasy mini Kit	Qiagen GmbH
QuantiMir RT Kit	SBI
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate	Perbio Science Deutschland GmbH
SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR	Invitrogen GmbH
Western Blot Recycling Kit	Alpha Diagnostic

2.1.8 Nukleinsäuren

Tabelle 10: Verwendete Nukleinsäuren

Nukleinsäure	Hersteller
GeneRuler 100 bp DNA Ladder	Fermentas GmbH
Hyperladder I Bionline	Bionline
Oligonukleotide für PCR (Tab. 11)	MWG Biotech AG
Oligonukleotide für shRNAs (Tab. 13)	MWG Biotech AG
tkRNAi Plasmide (Tab. 12)	Cequent Pharmaceuticals, Inc.

Tabelle 11: Verwendete Primer

Oligonukleotid	Sequenz 5'-3'	Verwendungszweck
Aldolase fw	ATC GTG GCT GCA CAT GAG TC	mRNA Quantifizierung
Aldolase rev	GCC CTT GTC TAC CTT GAT GC	mRNA Quantifizierung

ABCB1 fw	CAG CTA TTC GAA GAG TGG GC	mRNA Quantifizierung
ABCB1 rev	CCT GAC TCA CCA CAC CAA TG	mRNA Quantifizierung
ABCG2 fw	CTT ACA GTT CTC AGC AGC TCT TCG	mRNA Quantifizierung
ABCG2 rev	CGA GGC TGA TGA ATG GAG AAG	mRNA Quantifizierung
ABCB1 <i>antisense</i> (MDR-A)*	GAA GGA AAA GAA ACC AAC T	shRNA Quantifizierung
ABCB1 <i>antisense</i> (MDR-C)	AGT GCT TGT CCA GAC AAC A	shRNA Quantifizierung
ABCG2 <i>antisense</i>	GAA GAC ATC TGG AGA GTT T	shRNA Quantifizierung
miR-16	TAG CAG CAC GTA AAT ATTGGC G	shRNA Quantifizierung
pMBV43 <i>antisense</i>	TAA TAC GAC TCA CTA TAG	Sequenzierung pMBV43
TRIP <i>antisense</i> -21	TTT CAG GCT CAT TTC ACT ATG	Sequenzierung TRIP

* Die ABCB1 *antisense* (MDR-A) Sequenz diente als *forward* Primer für die anti-ABCB1-shRNA Quantifizierung in der stabilen Transfektante EPG85-257RDB/anti-ABCB1-shRNA (Stege *et al.*, 2004), da das Design der anti-ABCB1-shRNA Expressionskassette eine abweichende ABCB1 Zielsequenz (NM_000927, nt 505-523) aufweist, als die verwendeten tkRNAi Plasmide.

Tabelle 12: Verwendete tkRNAi Plasmide

Plasmid	bp	Resistenz	Hersteller
TRIP	8901	Ampicillin	Cequent Pharmaceuticals, Inc.
pMBV43	8427	Kanamycin	Cequent Pharmaceuticals, Inc.

Tabelle 13: Verwendete Oligonukleotide für die shRNA Klonierung

Oligonukleotid	Sequenz 5'-3'	Referenzsequenz
shRNA ABCB1 (MDR-C)	TGTTGTCTGGACAAGCACT TTCAAGAGAAGTGCTTGT CCAGACAACA	NM_000927.2, nt 3052-3072 (Stein <i>et al.</i> , 2008)
shRNA ABCC2 (ABCC2-B)	AGGGCACCCTGCCTATGT TTCAAGAGAACATAGGCA GTGGTGCCCT	NM_000392.2, nt 2129-2249 (Materna <i>et al.</i> , 2006)
shRNA ABCG2 (BCRP-B)	AAACTCTCCAGATGTCTTC TTCAAGAGAGAAGACATC TGGAGAGTTT	NM_004827, nt 481-501 (Pribsch <i>et al.</i> , 2006)
shRNA GFP	GACGGTATCGATAAGCTTGAT	EU_056364, nt 895-918

TTCAAGAGAATCAAGCTT
 ATCGATACCGTC

Loop TTCAAGAGA Stege *et al.*, 2004

Die für das pMBV43 verwendeten shRNA Sequenzen wurden am 3'-Terminus mit 10 zusätzlichen Ts versehen (Tabelle 48, siehe Anhang).

Die shRNA-kodierenden Sequenzen (Tab. 13) wurden an die Firma Cequent Pharmaceuticals, Inc. (Cambridge, MA, USA) gesandt, wo die shRNA-Expressionskassetten zwischen die Restriktionsschnittstellen der Restriktionsendonukleasen *Sall* und *BamHI* des TRIP bzw. des pMBV43 Vektors mit der resultierenden Reihenfolge *Sall* – *antisense*-Strang – Loop – *sense*-Strang – *BamHI* kloniert wurden.

2.1.9 Software

Tabelle 14: Verwendete Software

Software	Hersteller
Adobe Photoshop 6.0	Adobe Systems Inc.
BLAST	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
GraphPad Prism 3.02	GraphPad Software
KineticAde Version 2.12 (ELISA-Reader)	Bio Tek
LightCycler Software 3.0	Roche
Microsoft Office 2010, 2013	Microsoft Corporation
Microsoft Internet Explorer 7.0	Microsoft Corporation
RealQuant	Roche Diagnostics

2.2 Methoden

2.2.1 Sterilisierung

Zum Befreien von DNasen und zum Sterilisieren hitzestabiler Lösungen und Geräte wurden diese 30 min bei 121 °C und 2 bar behandelt. Bei Glasgeräten wurde teilweise trockene Hitze für 3 h bei 180 °C eingesetzt und hitzeinstabile Lösungen wurden mit Hilfe von Membranfiltern (Porengröße 0,2 µm) sterilisiert.

2.2.2 Bakterielle Methoden

2.2.2.1 Bakterienkultur

Die *E. coli* Bakterienkultur erfolgte bei 37 °C in LB-Medium (Tab. 15) auf dem Schüttler bei 180 rpm oder auf LB-Agar (Tab. 16) im Brutschrank. Die Medien wurden vor dem Gebrauch autoklaviert, auf 60 °C abgekühlt und entsprechend der zu selektierenden Bakterien mit 100 µg/ml Ampicillin (*E. coli* BL21(DE3) + TRIP) oder 100 µg/ml Kanamycin (*E. coli* ceq221 + pMBV43) versehen und setzten sich wie folgt zusammen:

Tabelle 15: Zusammensetzung LB-Medium

LB-Medium	
Bacto Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
Bacto Trypton	1,0 % (w/v)
NaCl	0,6 % (w/v)
in ddH ₂ O	

Tabelle 16: Zusammensetzung LB-Agar

LB-Agar	
LB-Medium	
Bacto Agar	1,5 % (w/v)

Dem LB-Medium/-Agar des DAP(2,6-Diaminopimelsäure)-auxotrophen *E. coli* Stammes ceq221 wurden zusätzlich 50 µg/ml DAP zugesetzt.

2.2.2.2 Resuspension lyophilisierter Plasmide

Die tkRNAi Vektoren TRIP und pMBV43 mit den entsprechenden shRNA kodierenden Expressionskassetten wurden jeweils als lyophilisierte Proben auf Whatman Papier von Cequent Pharmaceuticals, Inc. bereitgestellt. Die Plasmide wurden jeweils mit 50 µl ddH₂O in 1,5 ml Eppendorfgefäßen gelöst, wonach die photometrische Konzentrationsbestimmung der Nucleinsäurelösungen erfolgte (Kap. 2.2.4.1).

2.2.2.3 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Die *E. coli* BL21(DE3) wurden bereits chemisch kompetent geliefert. Die chemische Kompetenz der *E. coli* ceq221 wurde durch die Calciumchloridmethode generiert. Hierzu wurden 50 ml LB-Medium 1:100 mit einer ÜN-Minikultur (Kap. 2.2.2.5) angeimpft und für 2 h bei 37 °C und 180 rpm geschüttelt. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurden 20 ml der Bakterien-suspension in 50 ml Falcontubes überführt und 10 min bei 4 °C und 4500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 20 ml eisgekühlter 0,1 M MgCl₂-Lösung resuspendiert und 10 min bei 4 °C und 4500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 10 ml 0,1 M MgCl₂-Lösung resuspendiert und 20 min auf Eis gelagert. Anschließend wurde die Bakterien-suspension erneut für 10 min bei 4 °C und 4500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert. Die Bakterien-suspension wurde folgend mit 0,25 ml sterilem Glycerin versetzt und zu je 200 µl in 1,5 ml Eppendorftubes portioniert. Die Lagerung der chemisch kompetenten Bakterien fand bei -80 °C statt.

2.2.2.4 Transformation

Die tkRNAi Plasmide TRIP anti-*GFP* und TRIP anti-*ABCB1* wurden in den *E. coli* Stamm BL21(DE3) (Invitrogen) und die tkRNAi Plasmide pMBV43 anti-*ABCB1*, pMBV43 anti-*ABCC2*, pMBV43 anti-*ABCG2* wurden in den *E. coli* Stamm ceq221 (Cequent Pharmaceuticals ,Inc.) transformiert. Hierzu wurden je 5-10 ng Plasmid-DNA in 50 µl chemisch kompetente *E. coli* pipettiert und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien im Wasserbad bei 42 °C für 90 s einem Hitzeschock ausgesetzt, 10 min auf Eis gelagert, jeweils mit 250 µl SOC-

Medium (Tab. 17) versetzt und 60 min bei 37 °C bei 180 rpm geschüttelt. 250 µl der Transformationsansätze wurden jeweils auf LB-Agar-Platten mit Ampicillin (100 µg/ml) für die *E. coli* + TRIP Selektion bzw. Kanamycin (100 µg/ml) für die *E. coli*+pMBV43 Selektion ausplattiert und ÜN (über Nacht) bei 37 °C inkubiert.

Tabelle 17: Zusammensetzung SOC-Medium

SOC-Medium	
Bacto Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
Bacto Trypton	3 % (w/v)
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM
Glukose	20 mM
in ddH ₂ O	

2.2.2.5 ÜN-Minikultur

Im Anschluss an die Transformation der *E. coli* mit dem TRIP bzw. dem pMBV43 (Kap. 2.2.2.4) wurden gewachsene Klone mit einem sterilen Zahnstocher von den LB-Agar Platten gepickt und in 5 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum (100 µg/ml Ampicillin für TRIP Klone, 100 µg/ml Kanamycin für pMBV43 Klone) überführt. Die LB-Agarplatten wurden mit Parafilm verschlossen und bei 4 °C gelagert. Die Minikulturen wurden ÜN bei 37 °C und 180 rpm auf den Schüttler gestellt. Die gewachsenen Kulturen wurden am folgenden Tag mit 1,25 ml sterilem Glycerin versetzt, zu je 1 ml in Kryoröhrchen portioniert und bei –80 °C als Dauerkulturen weggefroren. Als Vorbereitung der Infektion humaner MDR Karzinomzellen mit tkRNAi Bakterien (Kap. 2.2.3.3) wurden ebenfalls ÜN-Minikulturen angeimpft. Hierzu wurde je ein steriler Zahnstocher in eine bereits vorhandene, bei –80 °C gelagerte Dauerkultur getaucht und in 5 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum gegeben.

2.2.2.6 Plasmid-Isolation

Die Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* aus ÜN-Kulturen erfolgte abgewandelt nach Birnboim und Doly (1979) mit Hilfe des QIAprep Miniprep Kits (Qiagen) entsprechend der Anweisungen des Herstellers. Hierzu wurden ÜN-Minikulturen 14-18 h auf dem Schüttler bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Im Anschluss an die alkalische Lyse der Bakterien wurde die Plasmid-DNA in einer Anionenaustauschsäule gebunden, aufgereinigt und in 30 µl ddH₂O gelöst und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Im Abschluss an die photometrische Konzentrationsbestimmung (Kap. 2.2.4.1) wurden die Plasmide sequenziert (Kap. 2.2.4.7).

2.2.2.7 Anzucht invasiver Bakterien.

Die Vorbereitung invasiver Bakterien für die Infektion humaner Zellen wurde abgewandelt nach Xiang *et al.* (2006) durchgeführt. 100 ml LB-Selektionsmedium mit dem entsprechenden Antibiotikum (100 µg/ml Ampicillin für *E. coli* BL21(DE3) + TRIP; 100 µg/ml Kanamycin für *E. coli* ceq221 + pMBV43) wurden 1:100 in einem 1 l Erlenmyerkolben mit einer Übernachtskultur der entsprechenden Bakterien unter Zugabe von 2 mM IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) angeimpft. Nach ca. 2,5 h bei einer optischen Dichte von OD₆₀₀ = 0,5 (entspricht $1,66 \times 10^8$ Bakterien) wurden die, sich in der frühen logarithmischen Phase befindlichen, Bakterien zweimal in 1x PBS (Phosphate Buffered Saline) gewaschen. Zum Erreichen entsprechender MOIs (*multiplicity of infection*, Ratio Karzinomzellen : infektiöse Bakterien) wurden die *E. coli* anschließend in FKS-freiem Zellkulturmedium entsprechend verdünnt und für die Infektion der humanen MDR Karzinomzellen verwendet (Kap. 2.2.3.3).

2.2.2.8 DAPI-Färbung und Nachweis intrazellulärer Bakterien

Aufgrund der Bindeeigenschaften von DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol x 2 HCl) an A-T-reiche DNA Abschnitte werden fluoreszierende DAPI-DNA Komplexe ($E_{\max} = 488 \text{ nm}$) gebildet. Die DAPI-Färbung wurde abgewandelt nach Jagielski *et al.* (1976) durchgeführt, um die Invasion und Lyse von tkRNAi Bakterien nach Infektion humaner MDR Karzinomzellen nachzuweisen. Die Infektion wurde auf LapTekII Chamber Slides durchgeführt (Kap 2.2.3.3). Die DAPI-Färbung der infizierten MDR Karzinomzellen wurde nach der Infektion bis zum Zeitpunkt der

vollständigen Lyse aller intrazellulären tkRNAi Bakterien stündlich durchgeführt. Hierzu wurden zu jedem Zeitpunkt Proben einmal mit DAPI-Arbeitslösung (Tab. 19) gewaschen und 30 min bei 37 °C mit DAPI-Arbeitslösung inkubiert. Nach dem Waschen der infizierten MDR Karzinomzellen mit absolutem Methanol und dem Entfernen der LapTekII Chamber Slides Kammern wurden die Objektträger mit 1x PBS eingedeckt. Das Ergebnis wurde fluoreszenzmikroskopisch (Durchlicht-Mikroskop LSM II, Zeiss, DAPI bandpass Filter ($\lambda_{em} = 640 \text{ nm}$), 40x Objektiv) stündlich bis zum Abschluss der bakteriellen Lyse dokumentiert. Als Kontrolle dienten ebenfalls DAPI-gefärbte, nicht infizierte Karzinomzellen.

Tabelle 18: Zusammensetzung DAPI-Stocklösung

DAPI-Stocklösung

DAPI-Kristalle	0,05 % (w/v)
in ddH ₂ O	

Tabelle 19: Zusammensetzung DAPI-Arbeitslösung

DAPI-Arbeitslösung

DAPI-Stocklösung	2,0 % (v/v)
in absolutem Methanol	

2.2.3 Zellkultur Methoden

2.2.3.1 Humane Zellkultur

Die Zellkulturarbeiten wurden an einer Laminar Flow Bench unter Verwendung steriler Materialien und Substanzen durchgeführt.

Die Standardkultivierung der adherent wachsenden Karzinomzellen fand bei 37 °C in einer mit 5 % CO₂ versetzten, wasserdampfgesättigten Atmosphäre in T75 Zellkulturflaschen (75 cm²) statt. Für die Zelllinien MaTu, MaTu/ADR und MaTu/ADR/anti-*ABCB1*-shRNA wurde RPMI Medium und für die Zelllinien EPG85-257P, EPG85-257RDB, EPG85-257RDB/anti-*ABCB1*-shRNA und EPG85-257RNOV modifiziertes L-15 Medium (Tab. 20) verwendet. Zur Aufrechterhaltung der Resistenz der jeweiligen MDR Sublinien wurden die Medien mit den entsprechenden Zytostatika supplementiert (Tab. 21). Die Kultivierung der Zelllinien EPG85-

257RDB/anti-*ABCB1*-shRNA (Stege *et al.*, 2004) und MaTu/ADR/anti-*ABCB1*-shRNA (Stein *et al.*, 2008), bei denen es sich um stabile Transfektanten handelt, die jeweils ein Plasmid mit einer anti-*ABCB1*-shRNA-Expressionskassette und einem Zeocinresistenzgen für die Selektion enthalten, fand unter Zugabe von 400 µg/ml Zeocin statt.

Die Zellen wurden zweimal wöchentlich nach dem Erreichen einer ca. 70 %igen Konfluenz passagiert. Hierzu wurde das Zellkulturmedium entfernt, wonach die Zellen mit 2 ml 0,05 %iger Trypsin/EDTA-Lösung gespült und anschließend mit 3 ml 0,05 %iger Trypsin/EDTA-Lösung bei 37 °C inkubiert wurden. Nachdem alle Zellen gelöst waren, wurde die gewünschte Zellmenge (i.e. 1/10) in der Kulturflasche mit 10 ml des entsprechenden, gegebenenfalls supplementierten Mediums versetzt.

Tabelle 20: Zusammensetzung modifiziertes L15-Medium

Modifiziertes L-15 Medium

L15-Medium	500 ml
Fetuin	3,75 mg
FKS	10%
D(+)-Glukose (45 %)	0,05 % (w/v)
L-Glutamin	1,0 mM
Insulin	40 IE
NaHCO ₃	0,1125 % (w/v)
MEM-Vitamine	1x
Transferrin	1,25 mg
Trasylol	0,002 % (w/v)

Tabelle 21: Verwendete Zytostatika für die Standardzellkultur der MDR Sublinien

Zelllinie	Zytostatikum	Konzentration
EPG85-257RDB	Daunorubicin	2,5 µg/ml
EPG85-257RNOV	Mitoxantron	200 ng/ml
MaTu/ADR	Doxorubicin	0,1 µg/ml

2.2.3.2 Einfrieren und Auftauen humaner Karzinomzellen

Trypsinierte Zellen wurden mit 10 ml Medium versetzt und anschließend in 15 ml Falcontubes überführt. Nachdem die Zellen 5 min bei 1000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert (Zentrifuge GS-6KR, Beckman-Coulter) wurden und der Überstand entfernt wurde, fand die Resuspension des Zellpellets in 1 ml Einfriermedium (95 % FKS mit 5% DMSO) statt. Mit Hilfe einer FUCHS-ROSENTHAL-Kammer wurde die Zellkonzentration bestimmt und auf eine Zellzahl von 10^6 pro Falcontube mit Einfriermedium verdünnt. Anschließend wurden 1 ml-Aliquots in Einfrierröhrchen über Nacht in einer mit Isopropanol gefüllten Einfrierbox auf -80 °C abgekühlt. Die dauerhafte Lagerung erfolgte bei -80 °C .

Das Auftauen fand schnell im 37 °C warmen Wasserbad statt, wonach die Zellen in 12 ml Medium resuspendiert und 5 min bei 1000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert (Zentrifuge GS-6KR, Beckman-Coulter) wurden. Das Zellpellet wurde nach dem Entfernen des Überstandes in 15 ml Medium resuspendiert und in eine T75 Zellkulturflasche überführt. 24 h später erfolgte ein Mediumwechsel, gegebenenfalls mit Zugabe entsprechender Selektionssubstanzen (Kap. 2.2.3.1, Tab. 21).

2.2.3.3 Infektion humaner Karzinomzellen mit tkRNAi Bakterien

Die Infektion der humanen Karzinomzellen mit tkRNAi Bakterien wurde nach Lage und Kröhn (2010) durchgeführt. Zellen der humanen klassischen MDR Karzinomzelllinien EPG85-257RDB, MaTu/ADR bzw. der humanen atypischen MDR Karzinomzelllinie EPG85-257RNOV wurden 24 Stunden vor bakterieller Infektion in 10-cm Petrischalen in 10 ml ($1,5 \times 10^6$ Zellen) bzw. in LapTek II Chamber Slides in 1 ml Zellkulturmedium (5×10^4 Zellen) unter Zusatz folgender Substanzen kultiviert (Tab. 22):

Tabelle 22: Verwendete Substanzen für die Zellkultur 24 h vor Infektion

Substanz	Konzentration
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 $\mu\text{g/ml}$
Amphotericin	2,5 $\mu\text{g/ml}$

30 min vor Infektion wurde das Zellkulturmedium durch FKS-freies Medium, ohne Zusatz weiterer Substanzen, ersetzt.

Die für die Invasion vorbereiteten Bakterien (Kap. 2.2.2.7), die in 10 ml (für 10-cm Petrischalen) bzw. 1 ml (für LapTek II Chamber Slides) des entsprechenden Zellkulturmediums in der gewünschten MOI resuspendiert wurden, wurden auf die Karzinomzellen pipettiert. Nach zweistündiger Co-Inkubation bei 37 °C in einer mit 5 % CO₂ versetzten, wasserdampfgesättigten Atmosphäre wurden die Karzinomzellen zweimal mit 1x PBS und einmal mit Zellkulturmedium gewaschen. Die anschließende Kultivierung der Zellen fand in 10 ml (10-cm Petrischale) bzw. 1 ml (LapTek II Chamber Slides) Zellkulturmedium unter Zusatz folgender Substanzen statt (Tab. 23):

Tabelle 23: Verwendete Substanzen für die Zellkultur nach Infektion

Substanz	Konzentration
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml
Amphotericin	2,5 µg/ml
Gentamycin	150 µg/ml
Ampicillin	100 µg/ml

2.2.3.4 Akkumulationsassay

Die Bestimmung der intrazellulären Daunorubicin-, Doxorubicin- bzw. Mitoxantronakkumulation wurde anhand durchflusszytometrischer Messungen abgewandelt nach Allen *et al.* (1999) vorgenommen. Dies ist aufgrund der fluoreszierenden Eigenschaften der genannten Zytostatika möglich. Die Karzinomzellen wurden für 1 h bei 37 °C und 5 %iger, wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit folgenden Zytostatikakonzentrationen inkubiert (Tab. 24):

Tabelle 24: Verwendete Zytostatikakonzentrationen für die Akkumulationsassays

Zelllinie/Probe	Zytostatikum	Konzentration
EPG85-257P; EPG85-257RDB/anti- <i>ABCB1</i> -shRNA EPG85-257RDB; Kontrollen; tkRNAi anti- <i>ABCB1</i>	Daunorubicin	1 μ M
EPG85-257P; EPG85-257RNOV; Kontrollen; tkRNAi anti- <i>ABCG2</i>	Mitoxantron	19,3 μ M
MaTu; MaTu/ADR/anti- <i>ABCB1</i> -shRNA MaTu/ADR; Kontrollen; tkRNAi anti- <i>ABCB1</i>	Doxorubicin	17 μ M

Anschließend wurden die Karzinomzellen zweimal mit 1x PBS gewaschen, trypsinisiert und in 15 ml Falcontubes überführt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt mit 1000 rpm und 4 °C für 5 min. Nach Entfernen des Überstands folgten zwei Waschschrte mit 1x PBS, nach denen die Zellsuspensionen jeweils erneut bei 1000 rpm und 4 °C für 5 min zentrifugiert wurden. Nach Entfernen des Überstandes wurden die Pellets in 500 μ l 1x PBS suspendiert, in FACS-Röhrchen überführt und bis zur Messung auf Eis gelagert. Im Anschluss erfolgte die durchflusszytometrische Messung der intrazellulären Zytostatikaakkumulation. Die Zellen wurden mit einem Laser der Wellenlänge von 488 nm angeregt. Die Emission des Daunorubicins und des Doxorubicins wurde bei 580 nm und die Emission des Mitoxantrons bei 630 nm gemessen. Je Probe wurden 10000 Zellen in die Messung mit einbezogen. Die relative Fluoreszenz wurde jeweils auf die Fluoreszenz unbehandelter parentaler Zellen bezogen, die 100 % gesetzt wurde.

2.2.3.5 Zytotoxizitätsassay mittels Sulforhodamin B (SRB)

Basierend auf der Linearität der mittels Sulforhodamin B (SRB) angefärbten Proteinmenge und der Zellzahl stellt der Zytotoxizitätsassay mittels SRB eine geeignete Methode zur Bestimmung der Überlebensrate der Zellen im Anschluss an die Zytostatikaexposition dar (Skehan *et al.*, 1990). Hierzu wurde nach Trypsinierung der jeweiligen Karzinomzellen die Zellzahl mittels einer FUCHS-ROSENTHAL-Kammer bestimmt. Je 100 μ l (750 Zellen) Karzinomzellsuspension wurden in 3 x 10 Kavitäten einer 96-well Mikrotiterplatte ausgesät. 48 h nach

Aussat wurden je Kavität 100 µl Zellkulturmedium mit den folgenden Endkonzentrationen der Zytostatika hinzugegeben (Tab. 25):

Tabelle 25: Verwendete Zytostatikakonzentrationen für die Zytotoxizitätsassays

Zelllinie/Probe	Daunorubicin [nM]
EPG85-257P;	0; 4,43; 8,87; 17,73; 44,33; 88,65;
EPG85-257RDB/anti- <i>ABCB1</i> -shRNA	177,30; 886,50; 1773,00
EPG85-257RDB;	0; 8,87; 44,33; 88,65; 177,30; 886,50;
Kontrollen; tkRNAi-TRIP/-pMBV43 anti- <i>ABCB1</i>	1773,00; 8865,00; 17731,00; 44326,00
	Mitoxantron [nM]
EPG85-257P	0; 0,71; 1,42; 4,50; 7,11; 14,22; 45,00; 71,10; 142,20; 450,00
EPG85-257RNOV;	0; 4,50; 7,11; 14,22; 45,00; 71,10; 142,20;
Kontrollen; tkRNAi-pMBV43 anti- <i>ABCG2</i>	450,00; 711,00; 1422,00; 4500,00
	Doxorubicin [nM]
MaTu;	0; 0,17; 0,86; 1,72; 4,31; 8,62; 17,24;
MaTu/ADR/anti- <i>ABCB1</i> -shRNA	43,10; 86,20; 172,40; 431,00
MaTu/ADR;	0; 1,72; 4,31; 8,62; 17,24; 43,10; 86,21;
Kontrollen; tkRNAi-pMBV43 anti- <i>ABCB1</i>	172,41; 431,03; 862,07; 1724,10

5 Tage im Anschluss an die Zytostatikazugabe wurde das Medium verworfen und die Zellen wurden mit 200 µl 10 %iger Trichloressigsäure für 2 h bei 4 °C fixiert. Nach fünfmaligem Waschen mit Wasser wurden die Zellen für 10 min bei Raumtemperatur mit SRB (0,4 % (w/v) gefärbt. Nach fünfmaligem Waschen mit 1 %iger Essigsäure wurden die Platten über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurden die Protein-SRB-Komplexe in 300 µl 20 mM Tris-Base (pH 10) gelöst, wonach die Farbeintensitäten mit dem Plattenlesegerät EL-340 bei 562 nm gegen 690 nm (Referenzwellenlänge) photometrisch bestimmt wurden. Die Resistenzfaktoren stellen jeweils das Vielfache des IC₅₀-Wertes unbehandelter parentaler Zellen (Resistenzfaktor = 1), dar.

2.2.4 Molekularbiologische Methoden

2.2.4.1 Photometrische Nukleinsäure-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde unter Einbezug der Verdünnung mit Hilfe eines UV-Spektrometers bestimmt. Die Messung erfolgte jeweils bei einer Wellenlänge von 260 nm, wobei eine optische Dichte (OD) OD_{260} von 1 einer Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ doppelsträngiger DNA bzw. 40 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ einzelsträngiger DNA oder RNA entspricht. Zur Determination der Nukleinsäurereinheit wurde zusätzlich die OD bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt, was dem Absorptionsmaximum von Proteinen entspricht. Reine DNA sollte einen Ratiowert (OD_{260}/OD_{280}) von 1,8 und reine RNA von 2,0 nicht unterschreiten.

2.2.4.2 Isolation von Gesamt-RNA

Die Isolation von Gesamt-RNA aus humanen Karzinomzellen wurde mittels RNeasy mini Kit (Qiagen) durchgeführt. Hierzu wurden Zellen mit ca. 70 %iger Konfluenz einmal mit 0,05 %iger Trypsin/EDTA-Lösung gewaschen und trypsinisiert. Nach dem Lösen der Zellen wurde die Suspension für 5 min bei 1000 rpm und 4 °C zentrifugiert (Zentrifuge GS-6KR, Beckman-Coulter), das Zellpellet einmal mit 1× PBS gewaschen und anschließend erneut zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 350 μl RLT Puffer mit 2- β -Mercaptoethanol (10 μl je 1 ml RLT Puffer) resuspendiert. Zum besseren Aufschluss der Zellen wurden diese über Nacht bei -80 °C gelagert. Das Zelllysat wurde auf Eis aufgetaut, wonach gemäß der Anleitung des Herstellers Qiagen weiterverfahren wurde. Die Lagerung der Gesamt-RNA fand bei -80 °C statt.

2.2.4.3 Reverse Transkription von Gesamt-RNA

Die reverse Transkription von Gesamt-RNA wurde mittels SuperScript First-Strand Synthesis System (Roche) nach Angaben des Herstellers durchgeführt und diente der Umschreibung von Gesamt-RNA in cDNA. In dieser Arbeit wurden 0,2 – 2 μg isolierter Gesamt-RNA, mit Hilfe der RNA abhängigen DNA-Polymerase SuperScript II und Hexanukleotid-Zufallsprimern in cDNA transkribiert. Die Lagerung der cDNA fand bei -20 °C statt.

2.2.4.4 Isolation von si- und miRNA

Die Isolation von si- und miRNAs erfolgte mittels *mirVana*[™] miRNA Isolation Kit (Ambion). Hierzu wurden Zellen mit ca. 70 %iger Konfluenz trypsinisiert, in 1x PBS gewaschen und für 5 min bei 1000 rpm und 4 °C zentrifugiert (Zentrifuge GS-6KR, Beckman-Coulter). Das Pellet wurde in 150 µl *RNAlater*[®] resuspendiert, bei -80°C ÜN gelagert und nach dem Auftauen erneut zentrifugiert. Anschließend wurde nach Angaben des Herstellers weiterverfahren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

2.2.4.5 Adaptermarkierung und Reverse Transkription von si- und miRNA

Die Adaptermarkierung und die Reverse Transkription von si- und miRNA in cDNA wurde mittels QuantiMir RT Kit (SBI, Mountain View) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Es wurden jeweils 500 ng Adapter-markierter RNAs umgeschrieben. Die Lagerung der cDNA fand bei -20 °C statt.

2.2.4.6 Quantitative real-time PCR

In der vorliegenden Arbeit wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I (Roche Diagnostics) zur cDNA-Detektion im LightCycler nach Angaben des Herstellers verwendet. Der Nachweis der anti-*ABCB1*- bzw. anti-*ABCG2*-shRNAs fand indirekt über die Quantifizierung der entsprechenden siRNAs statt, die nach Dicerprozession entstehen. Hierfür wurden anstelle klassischer fw Primer (wie sie für die mRNA Quantifizierung eingesetzt wurden) die entsprechenden *antisense* siRNAs und zur Normalisierung miR-16 verwendet und jeweils mit dem Universal reverse primer des QuantiMir RT Kits (SBI, Mountain View) nach Anleitung des Herstellers kombiniert. Während die Zusammensetzung der real-time PCR-Ansätze, sowohl für die mRNA als auch für die siRNA Quantifizierungen, gleich waren (Tab. 26), wurde für die mRNA Quantifizierung ein anderes LightCycler Programm gewählt (Tab. 27) als für die siRNA Quantifizierung (Tab. 28).

Tabelle 26: Zusammensetzung der quantitativen real-time PCR Ansätze

Substanz	Volumen	Endkonzentration
ddH ₂ O	11,6 µl	
DNA Master SYBR Green I	2,0 µl	(1x)
MgCl ₂ (25 mM)	2,4 µl	(4 mM)
Primer fw (10 µM)	1,0 µl	(500 nM)
Primer rev (10 µM)	1,0 µl	(500 nM)
cDNA (1:10)	2,0 µl	

Folgendes Programm wurde für die Amplifikation der cDNA aus mRNA im LightCycler angelegt (Schritte 2.-4. 40x) (Tab. 27):

Tabelle 27: LightCycler Programm (mRNA Quantifizierung)

Schritt	t	T [°C]	
1.	10 min	95 °C	Enzymaktivierung
2.	15 sec	95 °C	Denaturierung der dsDNA
3.	5 sec	Tab. 29	Hybridisierung der Primer
4.	15 sec	72 °C	Elongation der Primer
5.	30 sec	von 95 °C auf 65 °C	Schmelzkurve
6.	30 sec	von 65 °C auf 40 °C	Abkühlung

Folgendes Programm wurde für die Amplifikation der cDNA aus si- und miRNA im LightCycler angelegt (Schritte 2.-4. 40x) (Tab. 28):

Tabelle 28: LightCycler Programm (si- und miRNA Quantifizierung)

Schritt	t	T [°C]	
1.	10 min	95 °C	Enzymaktivierung
2.	15 sec	95 °C	Denaturierung der dsDNA
3.	10 sec	Tab. 29	Hybridisierung der Primer
4.	30 sec	72 °C	Elongation der Primer
5.	30 sec	von 95 °C auf 65 °C Schmelzkurve	
6.	30 sec	von 65 °C auf 40 °C Abkühlung	

Tabelle 29: Hybridisierungstemperaturen (T_H) für die verwendeten Primer

Primer (mRNA)	T _H [°C]	PCR-Produktlänge [bp]
Aldolase fw/rev	56	249
ABCB1 fw/rev	58	299
ABCG2 fw/rev	62	361
Primer (shRNA)		
ABCB1 <i>antisense</i> (MDR-A)*	52	19
ABCB1 <i>antisense</i> (MDR-C)*	52	19
ABCG2 <i>antisense</i>	52	19
miR-16	52	22
Universal reverse primer	52	19

* Für den Nachweis der anti-*ABCB1*-siRNAs der Transfektante EPG85-257RDB/anti-*ABCB1*-shRNA (Stege *et al.*, 2004) wurde *ABCB1 antisense* (MDR-A) als forward Primer verwendet. Die verwendete *ABCB1* Zielsequenz (MDR-A) für das anti-*ABCB1*-shRNA Design weicht von der in dieser Arbeit für die Klonierung in TRIP bzw. pMBV43 verwendeten Zielsequenz (MDR-C, Stein *et al.*, 2008) ab.

Für die mRNA- bzw. shRNA-Quantifizierung wurden jeweils ein real-time PCR Lauf mit den Zielgen-Primern (*ABCB1 fw/rev*; *ABCG2 fw/rev*; *ABCB1 (MDR-A bzw. MDR-C) antisense/Universal reverse primer*; *ABCG2 antisense/Universal reverse primer*) und einer mit den Referenz-Gen Primern (*Aldolase fw/rev*; *miR-16/Universal reverse primer*) durchgeführt, bei denen neben der Probe jeweils cDNA Proben aus Zellen der entsprechenden MDR oder atypischen MDR Zellkulturmodells (EPG85-257RDB; EPG85-257RNOV; MaTu/ADR) mit einer seriellen Verdünnung (10^7 - 10^0) eingesetzt wurden. Zusätzlich diente ein Kalibrator der Real-

Quant Software als interner Standard, um die Vergleichbarkeit verschiedener real-time PCR Läufe gewährleisten zu können, bei dem es sich ebenfalls um cDNA aus den entsprechenden Zelllinien handelte. Jede Messung beinhaltete Doppelbestimmungen der Proben, sowie Nullkontrollen (ddH₂O). Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der RealQuant Software. bzw. in Excel mittels $2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode (Livak und Schmittgen, 2001). Die mRNA Expression wurde jeweils auf die mRNA Expression unbehandelter MDR Zellen bezogen, die 100 % gesetzt wurde. Die anti-*ABCB1*- bzw. anti-*ABCG2*-siRNA Quantität wurde jeweils als ein Vielfaches der miR-16 Expression unbehandelter Zellen, die 1 gesetzt wurde, dargestellt.

2.2.4.7 Sequenzierung

Im Anschluss an die Aufreinigung der zu sequenzierenden Plasmid-DNA, zur Überprüfung der TRIP und pMBV43 Sequenzen, wurde diese auf eine Konzentration von 150 ng/ μ l verdünnt. Die Sequenzierung wurde von Herrn Dr. Martin Meixner am Institut für Genetik der Humboldt-Universität zu Berlin mittels eines ABI-373 DNA Sequenzierungsautomaten und des ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits nach der ursprünglichen Kettenabbruchmethode von Sanger (Sanger *et al.*, 1977) durchgeführt. Die Sequenzen der verwendeten Sequenzierungsprimer sind in Tabelle 11 (Kap. 2.1.8) aufgeführt.

2.2.4.8 Membranprotein-Isolation

Für die Isolation von Membranproteinen aus den verwendeten Karzinomzelllinien wurden Zellen in 10-cm Petrischalen bei 37 °C, 5 % CO₂ in Wasserdampf gesättigter Atmosphäre bis zu einer Konfluenz von ca. 80 % kultiviert. Nach dem Absaugen des Zellkulturmediums wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem 1x PBS gewaschen und die Petrischalen auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Zellen mit 3 ml Hypolysepuffer (Tab. 31) versehen, geschwenkt und für 5 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden durch einen Schabers gelöst und die Suspension in einen Homogenisator überführt. Die Homogenisierung fand anhand der, durch zehnmaliges Hoch- und Runterbewegen eines Pistills, entstehenden Scherkräfte statt. Die Suspension wurde in 15 ml-Saarstedtröhrchen überführt und 10 min bei 4 °C und 3000 rpm (Beckman, Rotor JA 25.5) zentrifugiert. Der Membranproteine beinhaltende Überstand wurde nach dem Überführen in Ultrazentrifugen-Röhrchen für 30 min bei 4 °C und 60000 rpm

(Beckman, Optima) zentrifugiert. Das Pellet wurde in 50-100 μ l 2x SDS-Probenpuffer gelöst (4x SDS-Probenpuffer Tab. 32), in ein Eppendorfgefäß überführt und für 10 min bei 95 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 5 min bei 4 °C und 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Tabelle 30: Zusammensetzung Cocktailtablettenlösung

Cocktailtablettenlösung

1 Cocktailtablette mit Proteinaseinhibitoren
in 2 ml ddH₂O

Tabelle 31: Zusammensetzung Hypolysepuffer

Hypolysepuffer

Cocktailtablettenlösung	4 % (v/v)
Tris HCL (10 mM)	96 % (v/v)

Tabelle 32: Zusammensetzung 4x SDS-Probenpuffer

4 x SDS-Probenpuffer

Tris-HCl, (pH 6,8)	160 mM
DTT	100 mM
SDS	10 % (v/v)
Glyzerin	2 % (v/v)
Bromphenolblau	Krümel

2.2.4.9 Protein-Konzentrationsbestimmung

Für die Konzentrationsbestimmung von Proteinproben, die in SDS-Probenpuffer gelöst sind, wurde die abgewandelte Methode nach Dieckmann-Schuppert und Schnittler (1996) angewandt.

Analog zu der Anzahl zu bestimmender Proteinproben wurden in entsprechend viele 2 ml Eppendorfgefäße je 1 ml Elutionspuffer (Tab. 35) für die Proteinfärbung vorgelegt. Auf eine Nitrozellulosemembran wurden aufgereiht je 2 μ l der zu bestimmenden Proteinlösungen und für die Eichreihe BSA-Proben (in 1x PBS) bekannter Proteinkonzentrationen in Doppelbe-

stimmungen aufgetragen. Die anschließende Färbung der Membran fand für 2 min mit Amidoschwarz-Färbelösung (Tab. 33) statt. Nach dem Entfernen der Färbelösung wurde die Membran mit Entfärbelösung (Tab. 34) gewaschen, bis deutlich abgrenzbare blaue Punkte auf der Nitrozellulosemembran sichtbar wurden. Die Punkte wurden mit einem Skalpell, in Form gleich großer Nitrozellulosemembranquadrate, ausgeschnitten und in die vorbereiteten Eppendorfgefäße mit dem Elutionspuffer gegeben. Als Referenzwert für die Eliminierung der Ergebnis verfälschenden Hintergrundfärbung der Membran wurde ein Proben-freies Quadrat ausgeschnitten und ebenfalls in Elutionspuffer überführt. Die Proben wurden für 60 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Die nun gefärbten Lösungen wurden in Einmal-Küvetten mit Hilfe des Spektrophotometers bei einer Wellenlänge von 630 nm vermessen. Die Ermittlung der jeweiligen Proteinkonzentration fand anhand der Eichgerade statt.

Tabelle 33: Zusammensetzung Amidoschwarz-Färbelösung

Amidoschwarz-Färbelösung

Amidoschwarz	0,1 % (w/v)
Methanol	45 % (v/v)
Essigsäure	10 % (v/v)
in ddH ₂ O	

Tabelle 34: Zusammensetzung Entfärbelösung

Entfärbelösung

Methanol	45 % (v/v)
EDTA (pH 8,0)	1 % (v/v)

Tabelle 35: Zusammensetzung Elutionspuffer

Elutionspuffer

Ethanol	50 % (v/v)
EDTA (pH 8,0)	500 µM
NaOH	25 mM
in ddH ₂ O	

2.2.4.10 Western Blot Analyse

2.2.4.10.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS/PAGE)

Zu Beginn der Western Blot Analyse wurden die isolierten Membranproteine (Kap. 2.2.4.8) elektrophoretisch in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Zur Bildung einer ebenen Gelkante während der Polymerisation wurde das Trenngel (Tab. 36) mit 2-Propanol überschichtet. Nach Abschluss der Polymerisation des Trenngels, wurde das 2-Propanol vor dem Gießen des Sammelgels (Tab. 37) entfernt.

Tabelle 36: Zusammensetzung 7,5 %iges Trenngel

7,5 %iges Trenngel	
Acrylamid-Bis-Acrylamid (19:1)	3,75 ml
ddH ₂ O	10,95 ml
10 % SDS	200 µl
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	5,0 ml
10 % APS	150 µl
TEMED	15 µl

Tabelle 37: Zusammensetzung 4,0 %iges Sammelgel

4,0 %iges Sammelgel	
40 % Acrylamid-Bis-Acrylamid	0,5 ml
ddH ₂ O	3,2 ml
10 % SDS	50 µl
0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	1,25 ml
10 % APS	25 µl
TEMED	5 µl

20 µg der Proteine wurden in 10 µl 2x SDS-Probenpuffer verdünnt, für 5 min bei 95 °C denaturiert und anschließend auf Eis gelagert. Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) erfolgte in 1x Laufpuffer (Tab. 38) in einer vertikalen Elektrophorese-Apparatur. Nach dem Auftragen der Proteinlösungen auf das Gel wurde bis zum Erreichen

der Proben der Grenze zwischen Sammel- und Trenngel zunächst 60 V und anschließend 95 V angelegt.

Tabelle 38: Zusammensetzung 10x Laufpuffer

10x Laufpuffer

40 Glyzin	150 mM
SDS	0,1 % (w/v)
Tris-Base	25 mM
in ddH ₂ O	

2.2.4.10.2 Transfer

Nach Beendigung der Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde das Sammelgel abgetrennt und verworfen. Das Trenngel, eine Zellulosenitrat-Membran und 2 Lagen Whatman Papier wurden in 1x Transferpuffer (Tab. 39) gelegt, bis die Komponenten vollständig durchtränkt waren. Der Transfer erfolgte in einer *semi-dry* Blotapparatur bei ca. 150 mA (pro 1 cm² wurden 3 mA angelegt) für 60 min. Die Schichtung der Komponenten entsprach: Whatman Papier, Zellulosenitrat-Membran, Gel, Whatman Papier.

Tabelle 39: Zusammensetzung 1x Transferpuffer

1x Transferpuffer

40 Glyzin	150 mM
Methanol	20 % (v/v)
Tris-Base	25 mM
in ddH ₂ O	

2.2.4.10.3 Chemolumineszenz-Nachweis von Proteinen

Der Nachweis ausgewählter, auf der Membran gebundener Proteine wurde immunologisch durch eine gekoppelte Reaktion durchgeführt. Der primäre Antikörper bindet hierbei an die zu detektierenden Proteine und der sekundäre Antikörper, welcher an das Enzym Meerrettichperoxidase (*horse radish peroxidase*, HRP) für den Chemilumineszenz-Nachweis konjugiert ist, bindet anschließend an den primären Antikörper. Für die Chemilumineszenzreaktion

zum Nachweis der entsprechenden Proteine wurden geblottete Membranen in eine Petrischale überführt und nacheinander in den folgenden Lösungen geschwenkt (Schritt 1: 4 °C; Schritte 2 – 6: Raumtemperatur) (Tab. 40):

Tabelle 40: Durchgeführte Reaktionschritte für die Western Blot Analysen

Schritt	t	Substanz
1.	ÜN	Blocklösung (Tab. 41)
2.	120 min	primärer Antikörper (Tab. 43)
3.	4 x 7 min	1x TBST (Tab. 42)
4.	60 min	sekundärer Antikörper (Tab. 43)
5.	4 x 10 min	1x TBST (Tab. 42)
6.	2 x 5 min	1x TBS

Tabelle 41: Zusammensetzung Blocklösung

Blocklösung

Milchpulver 5 % (w/v)

in 1x TBST

Tabelle 42: Zusammensetzung 1x TBST

1x TBST (pH 7,4-7,6)

NaCl 150 mM

Tris-Base 7 mM

Tris-HCl 43 mM

Tween 20 0,05 % (v/v)

in ddH₂O

Tabelle 43: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper mit eingesetzten Verdünnungen

Primärantikörper	Verdünnung in 1 % Milchpulver in 1x TBST
<i>Mouse monoclonal anti-Aktin</i>	1:5000
<i>Mouse monoclonal anti-ABCB1 (C219)</i>	1:100
<i>Mouse monoclonal anti-ABCG2 (BXP-21)</i>	1:100
Sekundärantikörper	Verdünnung in 1x TBST
<i>Goat anti-Mouse IgG (H+L), Peroxidase-konjugiert</i>	1:10000

Die Antikörperdetektion wurde mittels SuperSignal West Pico Chemoluminescent Substrate nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Der Blot wurde auf Hyperfilm ECL exponiert.

2.2.5 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse der statistisch ausgewerteten Analysen stellen jeweils den arithmetischen Mittelwert mit Standardabweichung aus mindestens zwei bis drei unabhängigen biologischen Replikaten dar. Jeder Versuch wurde in Doppelbestimmung angesetzt. Die Determination der Signifikanzen erfolgte anhand des zweiseitigen, gepaarten student's t-Tests in Excel.

3 Ergebnisse

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte das Potential der tkRNAi bezüglich der Überwindung der *ABCB1* bedingten klassischen und der *ABCG2* bedingten atypischen MDR überprüft werden.

Nachdem die für diese Arbeit relevanten Sequenzen der shRNAs (anti-*ABCB1*, anti-*ABCG2*, Kontrolle: anti-*ABCC2*) von Herrn Prof. Dr. Dr. Hermann Lage der Charité Universitätsmedizin Berlin an Cequent Pharmaceuticals, Inc. (Cambridge, USA) gesandt wurden, fand dort die Klonierung der Sequenzen in die tkRNAi Plasmide statt. Die Ziel-mRNA Sequenzen der shRNAs, sowie der verwendete Loop haben sich in vergangenen Studien für die RNAi bedingte posttranskriptionelle Genregulation als geeignet erwiesen (Steger *et al.*, 2004; Materna *et al.*, 2006; Pribsch *et al.*, 2006; Stein *et al.*, 2008). Die anti-*GFP*-shRNA kodierende Sequenz (Kontrolle) wurde von Cequent Pharmaceuticals, Inc. zur Verfügung gestellt.

Nach Transformation und Vervielfachung der gelieferten Plasmide TRIP anti-*ABCB1* und TRIP anti-*GFP* in *E. coli* BL21(DE3) (tkRNAi-TRIP) und der Plasmide pMBV43 anti-*ABCB1*, pMBV43 anti-*ABCG2* und pMBV43 anti-*ABCC2* in *E. coli* ceq221 (tkRNAi-pMBV43), konnten die Plasmidsequenzen durch Sequenzierung überprüft und bestätigt werden (nicht gezeigt).

Vorversuche ergaben, dass eine MOI (*multiplicity of infection*, Karzinomzellen : Bakterien) > 1:500 kritisch für das Überleben der verwendeten Karzinomzellen ist. Im Vergleich zu unbehandelten Karzinomzellen nahm die Anzahl apoptotischer (frei im Zellkulturmedium schwimmender) Karzinomzellen visuell wahrnehmbar 24 h post Infektion ab einer MOI > 1:500 deutlich zu (nicht gezeigt). Für die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen zum Nachweis der Invasion und Lyse der eingesetzten tkRNAi Bakterien wurde zur besseren visuellen Wahrnehmung dennoch eine MOI von 1:1000 eingesetzt, die für den Zeitraum der Analyse (14 h) jeweils von den Karzinomzellen toleriert wurde. Alle weiteren Untersuchungen erfolgten nach Infektion mit einer MOI von 1:500.

Im Anschluss an die Vorversuche erfolgten die methodischen Vorgehensweisen zur Überprüfung der Hypothesen (Kap. 1.3) der vorliegenden Arbeit jeweils nach dem gleichen Schema (Abb. 6, Kap. 2).

Teile der in den Kapiteln 3.1 und 3.2 beschriebenen Ergebnisse wurden in ähnlicher Form bereits veröffentlicht (Krühn *et al.*, 2009; Lage und Krühn, 2010), wobei teilweise zusätzliche Messungen in der vorliegenden Arbeit mit einbezogen wurden (gekennzeichnet). In Lage und Krühn (2010) wird einleitend die erste Generation der tkRNAi Plasmide, TRIP, beschrieben, da zum Publikationszeitpunkt noch keine Unterscheidung bezüglich der Terminologie von TRIP und pMBV43 stattfand und beide Vektoren als TRIP zusammengefasst wurden. Bei den entsprechenden Ergebnissen in Kapitel 3.2 handelt es sich jedoch um Effekte, die nach tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCB1* Behandlung eintraten. Die differenzierte Terminologie ist im Rahmen der vorliegenden Arbeit relevant und soll der besseren Verständlichkeit während vergleichender Aussagen über die tkRNAi-TRIP und tkRNAi-pMBV43 Potentiale bezüglich der MDR Reversion dienen.

Die Ergebnisse der Abbildungen 7 (Kap. 3.1.1) und 11 A (Kap. 3.1.5) wurden in ähnlicher Form bereits in der Diplomarbeit, die der vorliegenden Dissertation voranging, dargestellt (Krühn, 2008). Der Einbezug dieser Ergebnisse soll der Vollständigkeit der Gesamtergebnisse dienen, da alle weiteren Ergebnisse des Kapitels 3.1 auf der Invasion und Lyse der eingesetzten Bakterien basieren (Kap. 3.1.1) und die *ABCB1* mRNA Quantifizierung am Tag der stärksten tkRNAi-TRIP bedingten *ABCB1* mRNA Regulation (Kap. 3.1.5, Abb. 11 A) den Zusammenhang zu den funktionellen Auswirkungen der *ABCB1* Repression verdeutlicht.

3.1 Reversion des klassischen MDR Phänotyps durch tkRNAi-TRIP anti-*ABCB1*

Zur Überprüfung der 1. Hypothese (Kap. 1.3) wurden das Magenkarzinomzellkulturmodell EPG85-257P und die Daunorubicin selektierte, *ABCB1* überexprimierende MDR Sublinie EPG85-257RDB gewählt. Zum Ausschluss bakterieller oder unspezifischer shRNA Effekte auf die *ABCB1* Expression wurden die Kontrollen EPG85-257RDB + *E. coli* BL21(DE3) und EPG85-257RDB + *E. coli* BL21(DE3) + TRIP anti-*GFP* in den entsprechenden Analysen mitgeführt.

3.1.1 Nachweis der bakteriellen Invasion und Lyse

Die fluoreszenzmikroskopische Zeitkinetik in Abbildung 7 zeigt, dass 1 h nach Infektion von EPG85-257RDB Zellen mit *E. coli* BL21(DE3) + TRIP anti-*ABCB1*, Bakterien um die Zellnuklei der MDR Zelle auszumachen waren und die bakterielle Invasion stattgefunden hat. Bis 12 h post Infektion waren ähnliche bakterielle Quantitäten wie zum Zeitpunkt 1 h sichtbar (2h – 11 h, nicht dargestellt). Ab 12 h nach Infektion konnte eine deutliche Abnahme der intrazellulären Bakterien ausgemacht werden, bis nach 14 h nahezu keine Bakterien mehr um die Zellkerne detektiert wurden und die bakterielle Lyse eingetreten ist. Die nicht infizierten MDR Kontrollzellen wiesen zu keinem Zeitpunkt intrazelluläre Bakterien auf.

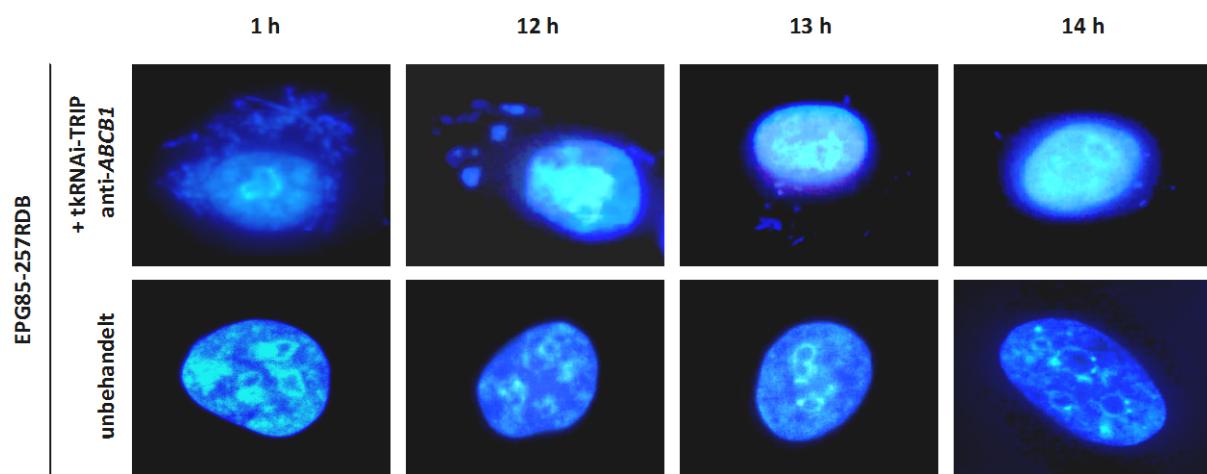


Abbildung 7: Invasion und Lyse von *E. coli* BL21(DE3) + TRIP anti-*ABCB1* in EPG85-257RDB (verändert nach Krühn, 2008 und Krühn *et al.*, 2009)

Zeitkinetischer Nachweis der bakteriellen Invasion und Lyse DAPI-gefärbter MDR Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie, EPG85-257RDB 1 h, 12 h, 13 h und 14h post Infektion mit *E. coli* BL21(DE3) + TRIP anti-*ABCB1* (MOI 1:1000) und Kontrollzellen (unbehandelte EPG85-257RDB Zellen). DAPI bandpass Filter ($\lambda_{em} = 640$ nm), 40x Objektiv.

3.1.2 Nachweis von anti-*ABCB1*-shRNAs

Nach Bestätigung der bakteriellen Invasion und Lyse von *E. coli* BL21(DE3) + TRIP anti-*ABCB1* (Kap. 3.1.1) wurde mittels quantitativer real-time PCR untersucht, ob eine bakterielle Übermittlung der anti-*ABCB1*-shRNAs stattgefunden hat (Abb. 8). Der Nachweis erfolgte indirekt über die Quantifizierung der anti-*ABCB1*-siRNAs (*antisense*), die nach Dicer bedingter Prozession der anti-*ABCB1*-shRNAs entstehen.

Aus Abbildung 8 geht hervor, dass die parentale Zelllinie EPG85-257P und die Kontrollen zum Ausschluss bakterieller und unspezifischer shRNA bedingter Effekte je keinen signifikanten Unterschied bezüglich der anti-*ABCB1*-shRNA Expression zu unbehandelten EPG85-257RDB Zellen (1-fach) aufwiesen. Die MDR Zellen zeigten nach tkRNAi-TRIP anti-*ABCB1* Behandlung eine signifikant 4,2-fach erhöhte anti-*ABCB1*-shRNA Quantität.

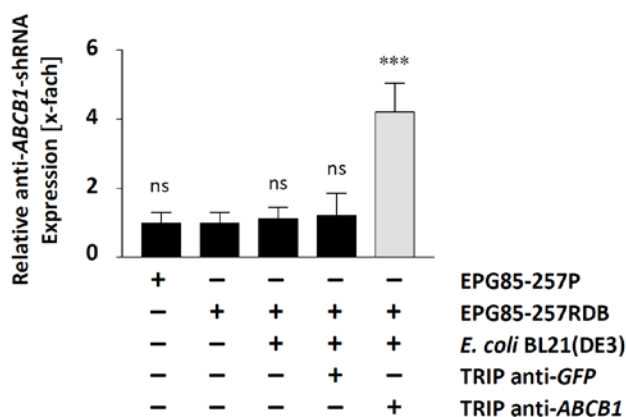


Abbildung 8: Nachweis von anti-*ABCB1*-shRNAs in EPG85-257RDB post tkRNAi-TRIP anti-*ABCB1* Behandlung (verändert nach Krühn *et al.*, 2009, Analyse mit zusätzlichen Kontrollen wiederholt)

Relative anti-*ABCB1*-shRNA Quantifizierung mittels quantitativer real-time PCR von EPG85-257P und EPG85-257RDB (unbehandelt; + *E. coli* BL21(DE3); + *E. coli* BL21(DE3) + TRIP anti-*GFP*; + *E. coli* BL21(DE3) + TRIP anti-*ABCB1*) 24 h post Infektion (MOI 1:500). miR-16 diente der Normalisierung. Alle Werte stellen das Vielfache der miR-16 Expression unbehandelter EPG85-257RDB, die 1 gesetzt wurde, dar. Die Signifikanz wurde jeweils anhand des zweiseitigen Student's t-Tests bezogen auf unbehandelte EPG85-257RDB Zellen bestimmt (ns = nicht signifikant, *** = $p < 0,001$).

3.1.3 Determinierung des Zeitpunktes der maximalen ABCB1 mRNA Inhibition

Die posttranskriptionellen Auswirkungen der bakteriell übermittelten anti-ABCB1-shRNAs auf die ABCB1 mRNA Expression wurden mittels quantitativer real-time PCR untersucht. Aus Abbildung 9 geht hervor, dass die unbehandelten MDR Zellen eine 500-fache ABCB1 mRNA Überexpression (100 %, Zeitpunkt 0 h) bezogen auf die chemosensitiven parentalen Zellen (0,2 %) zeigten. Während 24 h post tkRNAi-TRIP anti-ABCB1 Behandlung der MDR Zellen keine signifikante ABCB1 mRNA Inhibition eintrat, wurde 48 h - 120 h nach Infektion jeweils eine signifikant verminderte ABCB1 mRNA Expression detektiert. Nach 48 h betrug diese 80,8 % und nach 72 h, zum Zeitpunkt der stärksten Regulation, 38,3 %. 96 h post Infektion stieg das ABCB1 mRNA Niveau auf 72,2 % an, wonach 120 h nach Infektion ein leichter ABCB1 mRNA Expressionsrückgang auf 64,4 % gemessen wurde.

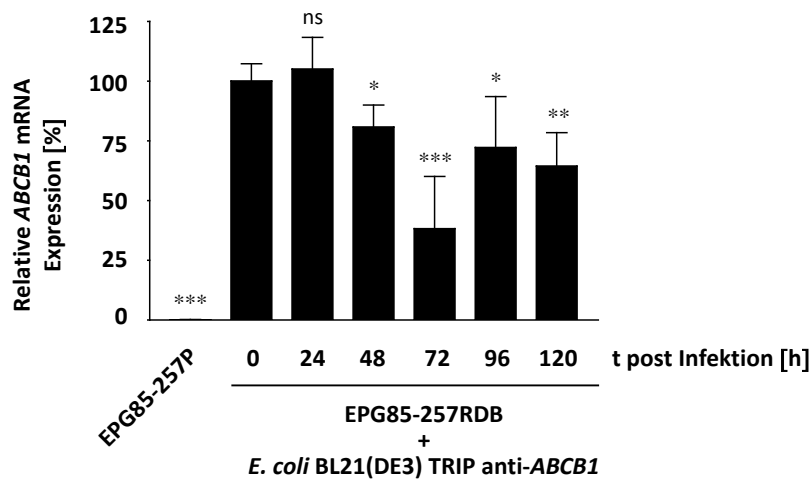


Abbildung 9: Zeitkinetik der ABCB1 mRNA Expression von EPG85-257RDB post tkRNAi-TRIP anti-ABCB1 Behandlung

Relative ABCB1 mRNA Quantifizierung mittels quantitativer real-time PCR von EPG85-257P und EPG85-257RDB (0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h post Infektion mit *E. coli* BL21(DE3) + TRIP anti-ABCB1, MOI 1:500). Das Housekeeping-Gen Aldolase diente der Normalisierung. Die ABCB1 mRNA Expression un behandelter EPG85-257RDB (0 h) entspricht 100 %. Alle weiteren Werte wurden relativ auf diesen Wert bezogen. Die Signifikanz wurde jeweils anhand des zweiseitigen Student's t-Tests bezogen auf un behandelte EPG85-257RDB Zellen bestimmt (ns = nicht signifikant, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$).

3.1.4 Immunologischer Nachweis der ABCB1 Inhibition

Die inhibitorische Wirkung der tkRNAi-TRIP anti-*ABCB1* auf ABCB1 wurde mittels Western Blot Analyse bestätigt. Aus Abbildung 10 geht hervor, dass in der parentalen Zelllinie EPG85-257P keine immunologisch nachweisbare ABCB1 Menge detektiert wurde. Die unbehandelten MDR Zellen und die zum Ausschluss bakterieller oder shRNA unspezifischer Effekte mitgeführten Kontrollen zeigten jeweils ähnlich hohe ABCB1 Überexpressionen. Im Vergleich dazu, wiesen die MDR Zellen 96 h post tkRNAi-TRIP anti-*ABCB1* Behandlung ein deutlich reduziertes ABCB1 Signal auf.

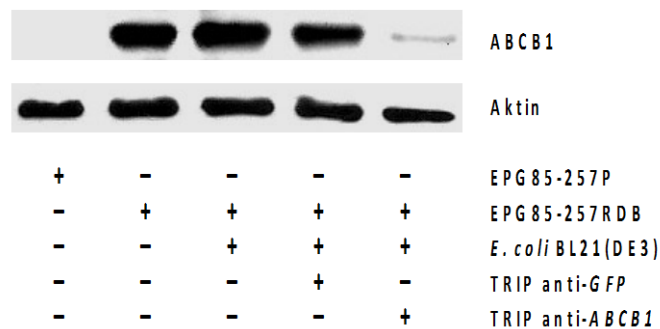


Abbildung 10: ABCB1 Expression in EPG85-257RDB post tkRNAi-TRIP anti-*ABCB1* Behandlung (verändert nach Krühn *et al.*, 2009, Analyse mit zusätzlichen Kontrollen wiederholt)

Nachweis der ABCB1 Proteinexpression mittels Western Blot Analyse von EPG85-257P und EPG85-257RDB (unbehandelt; + *E. coli* BL21(DE3); + *E. coli* BL21(DE3) + TRIP anti-GFP; + *E. coli* BL21(DE3) + TRIP anti-*ABCB1*) 96 h post Infektion (MOI 1:500). Primäre Antikörper: mAb C219 (1:100, ABCB1 bei 170 kDa, obere Bande), mAb anti-Aktin als Ladekontrolle (1:5000, Aktin bei 42 kDa, untere Bande), sekundärer Antikörper: mouse POD (1:10 000).

3.1.5 Funktionelle Auswirkungen der ABCB1 Inhibition

Die funktionellen Auswirkungen der tkRNAi-TRIP anti-*ABCB1* bedingten *ABCB1* Inhibition wurden mittels Zytostatikaakkumulations- (Abb. 11 B) und Zytotoxizitätsassays (Abb. 11 C) untersucht. Zum besseren Verständnis bestehender Zusammenhänge wurden die Ergebnisse der, am Tag der stärksten Regulation, mittels quantitativer real-time PCR determinierten, *ABCB1* mRNA Expression (Abb. 11 A) in die Darstellung mit einbezogen.

Aus Abbildung 11 A geht hervor, dass die MDR Zelllinie EPG85-257RDB eine 333-fache *ABCB1* mRNA Überexpression (100 %) bezogen auf die parentalen Zellen (0,3 %) aufwies. Die Kontrollen zum Ausschluss bakterieller oder unspezifischer shRNA bedingter Effekte zeigten jeweils keine signifikante *ABCB1* mRNA Inhibition. Die *ABCB1* mRNA Expression der tkRNAi-TRIP anti-*ABCB1* behandelten MDR Zellen lag mit 55,5 % signifikant vermindert vor.

Abbildung 11 B zeigt, dass die Daunorubicinakkumulation der parentalen Zelllinie EPG85-257P (100 %) 30-fach höher war als die Akkumulation der MDR Zellen (3,3 %). Die Kontrollen zum Ausschluss bakterieller oder unspezifischer shRNA bedingter Effekte zeigten jeweils keine signifikante Änderung der Daunorubicinakkumulation im Vergleich zu den unbehandelten MDR Zellen. Die tkRNAi-TRIP anti-*ABCB1* behandelten MDR Zellen wiesen eine signifikant gesteigerte Daunorubicinakkumulation von 44,7 % auf.

Wie Abbildung 11 C darstellt, entsprach die Daunorubicinresistenz der unbehandelten MDR Zelllinie EPG85-257RDB dem 470-fachen Wert der parentalen Zelllinie EPG85-257P (Resistenzfaktor = 1). Die Kontrollen zum Ausschluss bakterieller oder unspezifischer shRNA Effekte zeigten jeweils keine signifikante Resistenzänderung zu den unbehandelten MDR Zellen. Die tkRNAi-TRIP anti-*ABCB1* behandelten MDR Zellen wiesen eine signifikant verminderte, 188,5-fache Resistenz auf, was einer Reversion des MDR Phänotyps um 59,9 %, bezogen auf unbehandelte MDR Zellen, entspricht. Alle IC_{50} Werte, anhand welcher die Resistenzfaktoren berechnet wurden (x-facher IC_{50} Wert der EPG85-257P Zellen), sind Tabelle 44 (siehe Anhang) zu entnehmen.

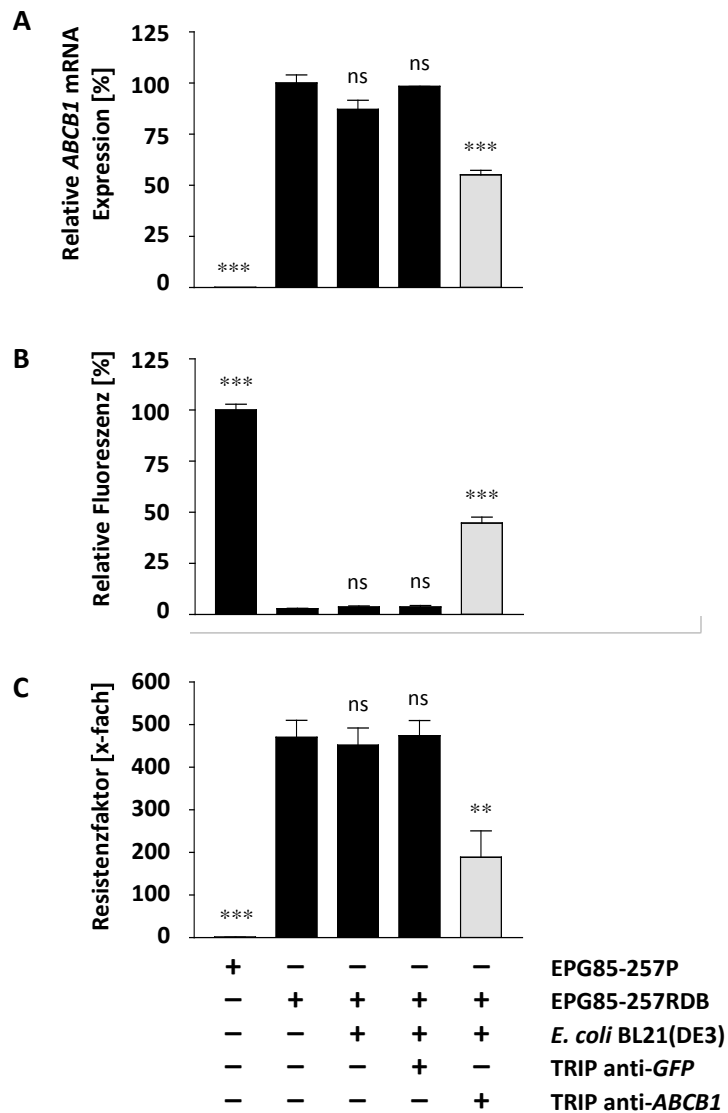


Abbildung 11: Funktionelle Analysen von ABCB1 in EPG85-257RDB post tkRNAi-TRIP anti-ABCB1 Behandlung (verändert nach Krühn, 2008 und Krühn et al., 2009)

ABCB1 mRNA Expression und funktionelle Analysen von EPG85-257P und EPG85-257RDB (unbehandelt; + *E. coli* BL21(DE3); + *E. coli* BL21(DE3) + TRIP anti-GFP; + *E. coli* BL21(DE3) + TRIP anti-ABCB1) post Infektion (MOI 1:500). (A) Relative ABCB1 mRNA Quantifizierung mittels quantitativer real-time PCR 72 h post Infektion. Das Housekeeping-Gen Aldolase diente der Normalisierung. Die ABCB1 mRNA Expression unbehandelter EPG85-257RDB entspricht 100 %. Alle weiteren Werte wurden relativ auf diesen Wert bezogen. (B) Relative Daunorubicinakkumulationsbestimmung mittels Durchflusszytometrie 96 h post Infektion. Die Daunorubicinakkumulation von EPG85-257P entspricht 100 %. Alle weiteren Werte wurden relativ auf diesen Wert bezogen. (C) Relative Daunorubicinresistenzbestimmung mittels Zytotoxizitätsassay 96 h post Infektion. Die Resistenzfaktoren wurden als ein Vielfaches des IC₅₀-Werts von EPG85-257P (Resistenzfaktor = 1) dargestellt. Die Signifikanz wurde jeweils anhand des zweiseitigen Student's t-Tests bezogen auf unbehandelte EPG85-257RDB Zellen bestimmt (ns = nicht signifikant, ** = p < 0,01, *** = p < 0,001).

3.2 Reversion des klassischen MDR Phänotyps durch tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCB1*

Die Analysen zur Überprüfung der 2. und 3. Hypothese (Kap. 1.3) der vorliegenden Arbeit wurden erneut unter Verwendung der parentalen Magenkarzinomzelllinie EPG85-257P und ihrer MDR Sublinie EPG85-257RDB und weiterhin anhand der parentalen Zervixkarzinomzelllinie MaTu, sowie deren Doxorubicin selektierten, *ABCB1* überexprimierenden MDR Subline MaTu/ADR vorgenommen. Neben den genannten unbehandelten Zelllinien wurden Kontrollen zum Ausschluss einer rein bakteriellen (EPG85-257RDB bzw. MaTu/ADR + *E. coli* ceq221) oder shRNA unspezifischen (EPG85-257RDB bzw. MaTu/ADR + *E. coli* ceq221 + pMBV43 anti-*ABCC2*) *ABCB1* Inhibition in verschiedenen Analysen mitgeführt. Weiterhin dienten die in unserer Arbeitsgruppe etablierten stabilen Transfektanten EPG85-257RDB/anti-*ABCB1*-shRNA (Stege *et al.*, 2004) und MaTu/ADR/anti-*ABCB1*-shRNA (Stein *et al.*, 2008), in denen *ABCB1* jeweils, anhand eines anti-*ABCB1*-shRNA exprimierenden Vektors, inhibiert wird, als Vergleich des tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCB1* Potentials in beiden MDR Zelllinien zu jeweils einem weiteren RNAi Ansatz mit hoher Effektivität. In den Transfektanten wurden in der Vergangenheit vollständige MDR Reversionen beobachtet (Stege *et al.*, 2004, Stein *et al.*, 2008).

3.2.1 Nachweis der bakteriellen Invasion und Lyse

Die fluoreszenzmikroskopischen Ergebnisse der Zeitkinetiken in Abbildung 12 zeigen, dass Invasion und Lyse von *E. coli* ceq221 + pMBV43 anti-*ABCB1* in beiden MDR Zelllinien, EPG85-257RDB (12 A) und MaTu/ADR (12 B), zu den gleichen Zeitpunkten nach Infektion eintraten, die bereits nach tkRNAi-TRIP anti-*ABCB1* Behandlung der EPG85-257RDB Zellen ermittelt wurden (Kap. 3.1.1). 1 h nach tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCB1* Behandlung waren jeweils intrazelluläre *E. coli* im MDR Karzinomzellzytoplasma erkennbar, weshalb die Invasion festgestellt werden konnte. Zu den Zeitpunkten 2 h - 11 h post Infektion ähnelten die Bakterienquantitäten jeweils dem Bild der ersten Stunde (nicht dargestellt). Ab 12 h nach Infektion wurde eine graduelle Abnahme der Bakterienzahlen ausgemacht, bis nach 14 h keine *E. coli* im Zytoplasma der MDR Karzinomzellen mehr zu erkennen waren und die bakterielle Lyse abgeschlossen war. In den jeweiligen nicht infizierten Kontrollzellen befanden zu keinem Zeitpunkt intrazelluläre Bakterien.

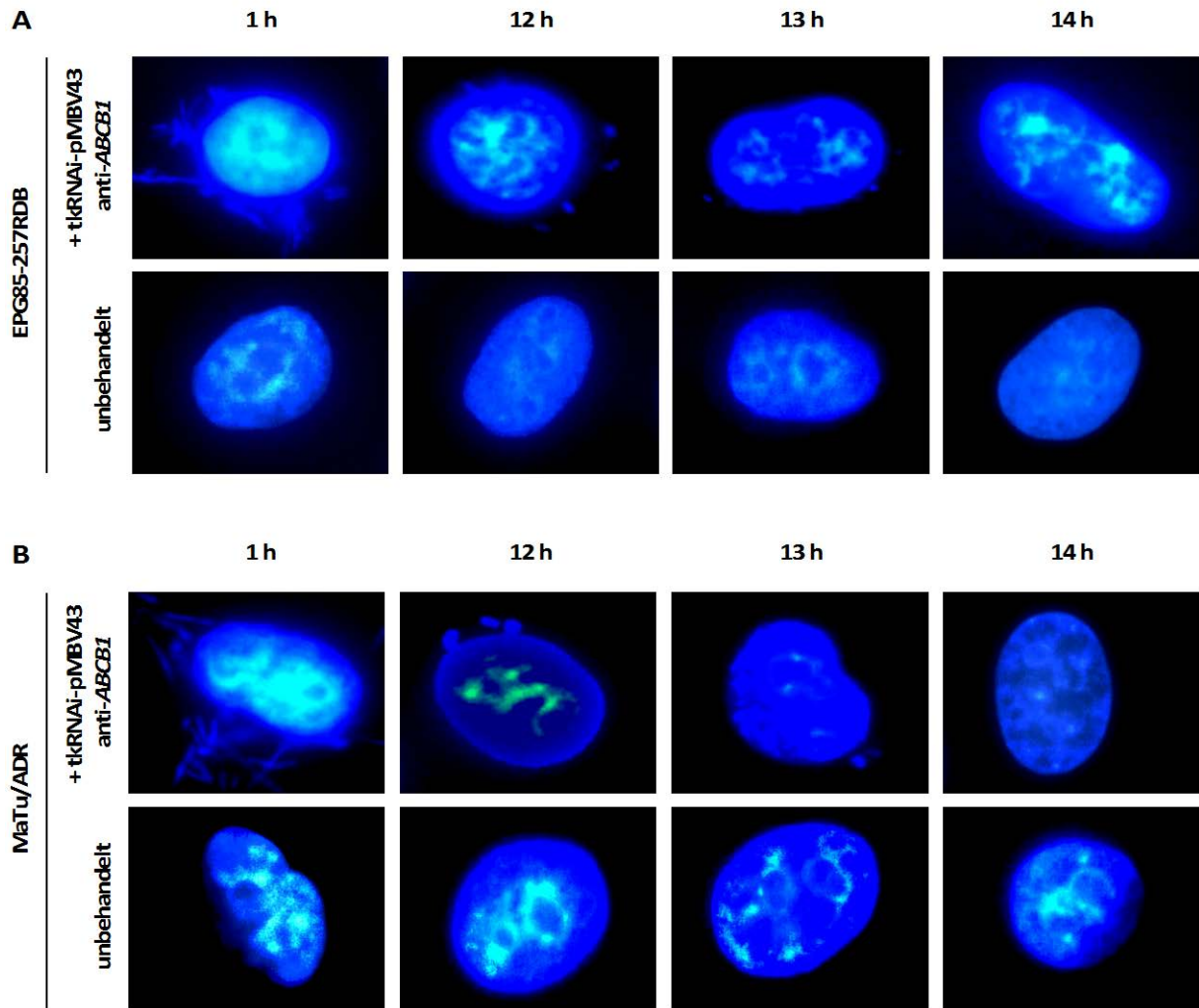


Abbildung 12: Invasion und Lyse von *E. coli* ceq221 + pMBV43 anti-ABCB1 in EPG85-257RDB (verändert nach Lage und Krühn, 2010, Analyse mit zusätzlichen Zeitpunkten wiederholt) und in MaTu/ADR

Zeitkinetischer Nachweis der bakteriellen Invasion und Lyse DAPI-gefärbter MDR Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie. (A) EPG85-257RDB 1 h, 12 h, 13 h und 14 h post Infektion mit *E. coli* ceq221 + pMBV43 anti-ABCB1 (MOI 1:1000) und Kontrollzellen (unbehandelte EPG85-257RDB Zellen). (B) MaTu/ADR 1 h, 12 h, 13 h und 14 h post Infektion mit *E. coli* ceq221 + pMBV43 anti-ABCB1 (MOI 1:1000) und Kontrollzellen (unbehandelte MaTu/ADR Zellen). DAPI bandpass Filter ($\lambda_{em} = 640 \text{ nm}$), 40x Objektiv.

3.2.2 Nachweis von anti-ABCB1-shRNAs

Abbildung 13 zeigt das, mittels quantitativer real-time PCR ermittelte, Ergebnis der anti-ABCB1-shRNA Detektion in den Zelllinien EPG85-257RDB (13 A) und MaTu/ADR (13 B) nach tkRNAi-pMBV43 anti-ABCB1 Behandlung. Beide parentalen Zelllinien, EPG85-257P und MaTu, und die jeweiligen Kontrollen, zum Ausschluss bakterieller oder unspezifischer shRNA bedingter Effekte, wiesen keine signifikant veränderten anti-ABCB1-shRNA Quantitäten zu den entsprechenden, unbehandelten MDR Zellen (1-fach) auf.

In Abbildung 13 A ist zu sehen, dass die Transfektante EPG85-257RDB/anti-*ABCB1*-shRNA eine signifikant 182,7-fach und die tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCB1* behandelten EPG85-257RDB Zellen eine signifikant 70,5-fach gesteigerte anti-*ABCB1*-shRNA Quantität zeigten.

Aus Abbildung 13 B geht hervor, dass die Transfektante MaTu/ADR/anti-*ABCB1*-shRNA eine signifikant 90,3-fach und die tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCB1* behandelten MaTu/ADR Zellen eine signifikant 53,4-fach erhöhte anti-*ABCB1*-shRNA aufwiesen.

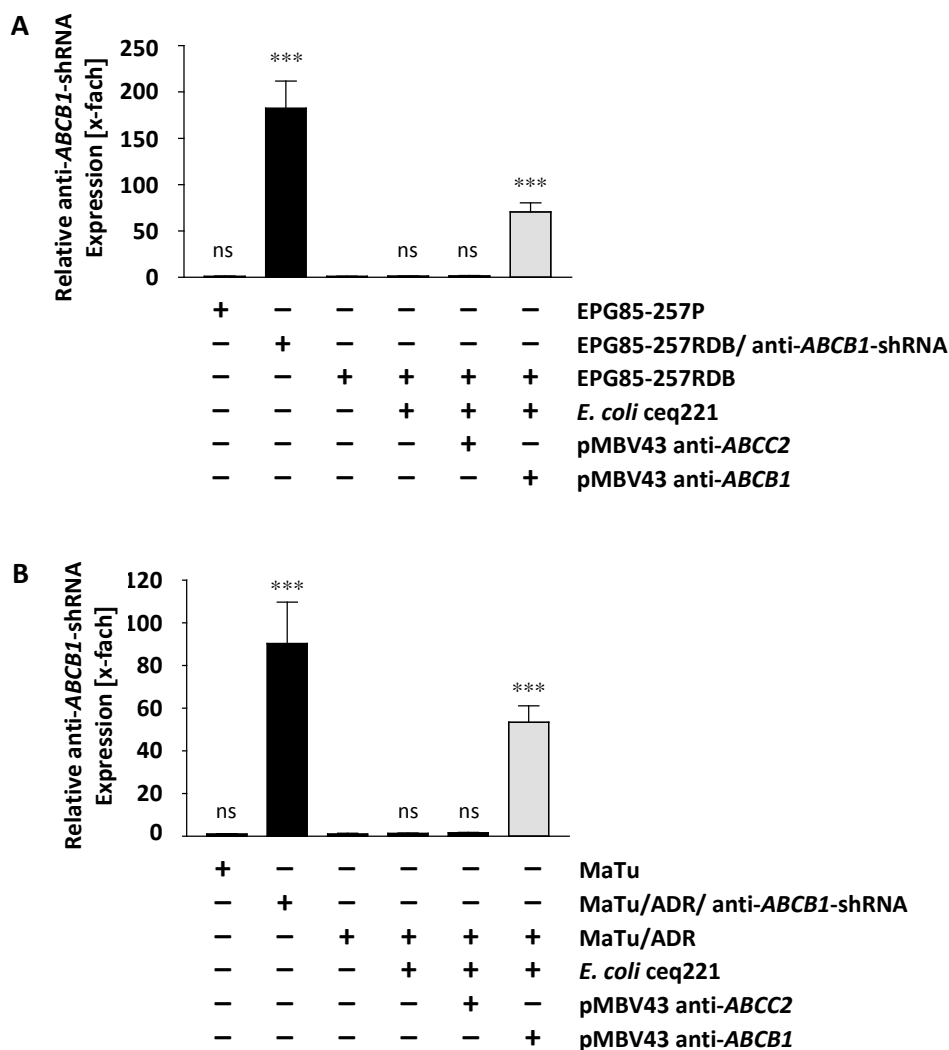


Abbildung 13: Nachweis von anti-*ABCB1*-shRNAs in EPG85-257RDB und MaTu/ADR post tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCB1* Behandlung

Relative anti-*ABCB1*-shRNA Quantifizierung mittels quantitativer real-time PCR 24 h post tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCB1* Behandlung (MOI 1:500). (A) EPG85-257P, EPG85-257RDB/anti-*ABCB1*-shRNA und EPG85-257RDB (unbehandelt; + *E. coli* ceq221; + *E. coli* ceq221 + pMBV43 anti-*ABCC2*; + *E. coli* ceq221 + pMBV43 anti-*ABCB1*). (B) MaTu, MaTu/ADR/anti-*ABCB1*-shRNA und MaTu/ADR (unbehandelt; + *E. coli* ceq221; + *E. coli* ceq221 + pMBV43 anti-*ABCC2*; + *E. coli* ceq221 + pMBV43 anti-*ABCB1*). miR-16 diente der Normalisierung. Alle Werte stellen das Vielfache der miR-16 Expression unbehandelter MDR Zellen dar. Die Signifikanz wurde jeweils anhand des zweiseitigen Student's t-Tests bezogen auf die jeweiligen unbehandelten MDR Zellen bestimmt (ns = nicht signifikant, *** = $p < 0,001$).

3.2.3 Determinierung des Zeitpunktes der maximalen *ABCB1* mRNA Inhibition

Abbildung 14 zeigt die, mittels quantitativer real-time PCR zeitkinetisch ermittelten, *ABCB1* mRNA Expressionen der MDR Zelllinien EPG85-257RDB (14 A) und MaTu/ADR (14 B) nach tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCB1* Behandlung.

Abbildung 14 A ist zu entnehmen, dass die parentalen EPG85-257P Zellen eine *ABCB1* mRNA Expression von 0,08 % in Bezug auf die unbehandelten MDR Zellen (100 %, Zeitpunkt 0 h) aufwiesen. Die Untersuchung tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCB1* behandelter EPG85-257RDB Zellen ergab, dass zu jedem gemessenen Zeitpunkt nach Infektion eine signifikante *ABCB1* mRNA Inhibition auszumachen war. Nach 24 h wurde bereits eine verminderte *ABCB1* mRNA Expression von 47 % festgestellt, wonach eine stetige Abnahme der *ABCB1* mRNA Expression bis 72 h eintrat, wobei es sich mit 27 % *ABCB1* mRNA Expression um den Zeitpunkt der stärksten Regulation post tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCB1* Behandlung handelte. Anschließend stieg die *ABCB1* mRNA Expression bis 144 h auf 64,4 % an und sank 168 h nach Infektion auf ein Niveau von 60 %.

In Abbildung 14 B ist dargestellt, dass die *ABCB1* mRNA Expression unbehandelter MaTu/ADR Zellen (100 %) 250-fach höher vorlag, als die *ABCB1* mRNA Expression der parentalen MaTu Zellen (0,4 %). 24 h nach tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCB1* Behandlung der MaTu/ADR Zellen wurde keine signifikante *ABCB1* mRNA Expressionsänderung im Vergleich zu den unbehandelten MDR Zellen ausgemacht. 48 h nach Infektion stieg die *ABCB1* mRNA Expression auf 200 % und erreichte nach 72 h ihr Maximum von 291,6 %, was jeweils eine signifikante Expressionssteigerung darstellt. 96 h und 120 h nach Infektion lag die *ABCB1* mRNA Expression mit 208 % und 164,2 % weiterhin signifikant erhöht vor. Nach 144 h wurde eine signifikant verminderte *ABCB1* mRNA Expression von 42,5 % festgestellt. Die stärkste, signifikante *ABCB1* mRNA Inhibition nach tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCB1* Behandlung trat mit 41,6 % nach 168 h ein. Nach 196 h erfolgte ein leichter *ABCB1* mRNA Expressionsanstieg auf 56,6 %, wobei dieser Wert weiterhin signifikant niedriger ist, als der der unbehandelten MaTu/ADR Zellen. Zum Zeitpunkt 216 h erreichte die *ABCB1* mRNA Expression mit 101,7 % nahezu ihren Ausgangswert.

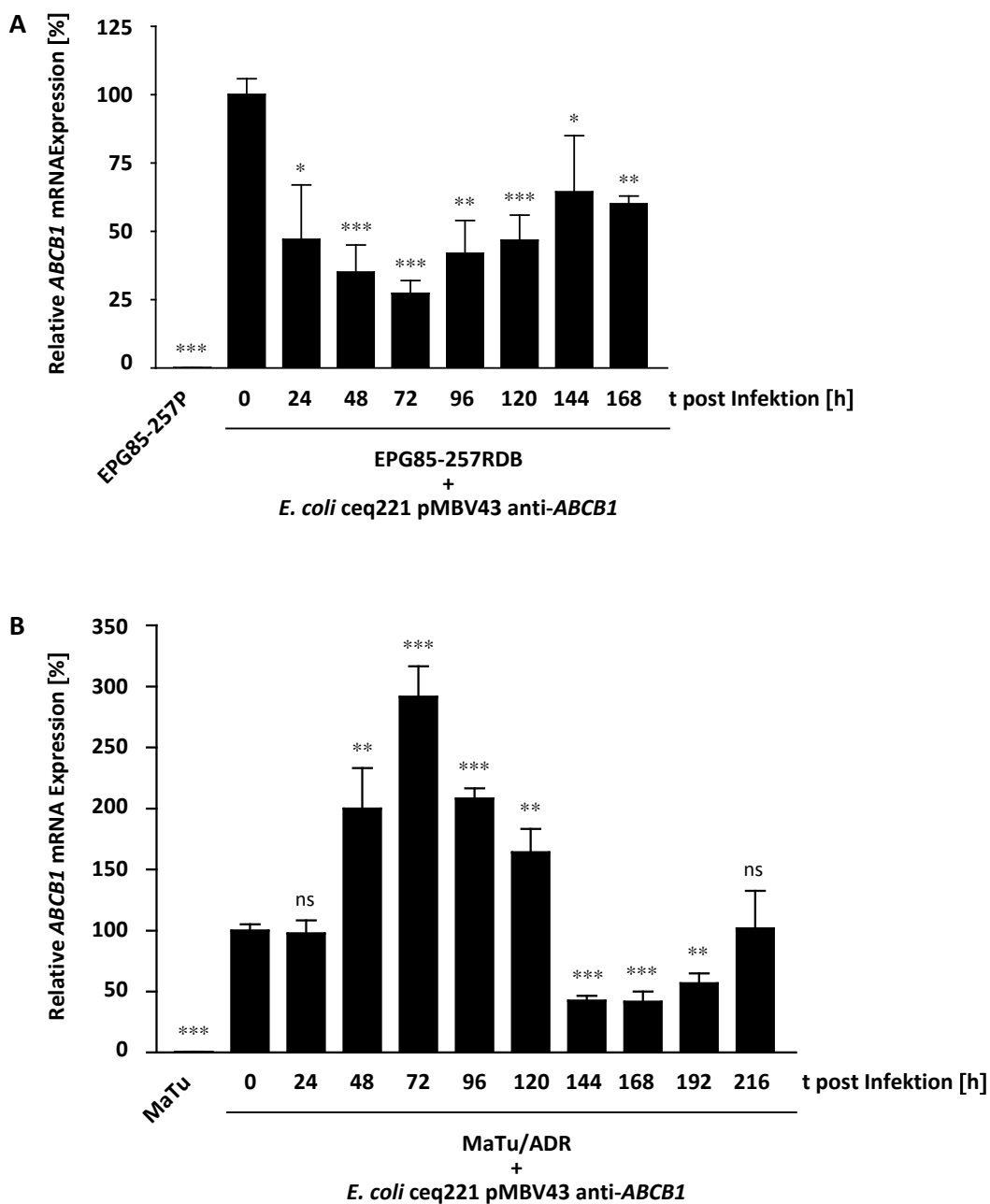


Abbildung 14: Zeitkinetik der ABCB1 mRNA Expression in EPG85-257RDB und MaTu/ADR post tkRNAi-pMBV43 anti-ABCB1 Behandlung

Relative ABCB1 mRNA Quantifizierung mittels quantitativer real-time PCR. (A) EPG85-257P und EPG85-257RDB (0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h, 144 h, 168 h post Infektion mit *E. coli* ceq221 + pMBV43 anti-ABCB1, MOI 1:500). (B) MaTu und MaTu/ADR (0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h, 144 h, 168 h, 192 h, 216 h post Infektion mit *E. coli* ceq221 + pMBV43 anti-ABCB1, MOI 1:500). Das Housekeeping-Gen Aldolase diente der Normalisierung. Die ABCB1 mRNA Expression un behandelter MDR Zellen (0 h) entspricht jeweils 100 %. Alle weiteren Werte wurden relativ auf diesen Wert bezogen. Die Signifikanz wurde jeweils anhand des zweiseitigen Student's t-Tests bezogen auf die jeweiligen un behandelten MDR Zellen bestimmt (ns = nicht signifikant, * = p < 0,05, ** = p < 0,01, *** = p < 0,001).

Aufgrund der unerwarteten *ABCB1* mRNA Hochregulation in der Zelllinie MaTu/ADR nach tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCB1* Behandlung wurden 72 h nach Infektion (Zeitpunkt der stärksten Hochregulation) weitere *ABCB1* mRNA Quantifizierungen unter Einbezug zusätzlicher Kontrollen durchgeführt, um Ursachen des Phänomens zu klären (Abb. 15). Neben der Untersuchung unbehandelter parentaler und unbehandelter MDR Zellen, sowie tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCB1* behandelte MDR Zellen wurde auch die Auswirkungen der tkRNAi-TRIP anti-*ABCB1* Variante auf die *ABCB1* mRNA Expression von MaTu/ADR determiniert. Zusätzlich wurden die jeweiligen Kontrollen zum Ausschluss bakterieller und unspezifischer shRNA Effekte beider tkRNAi Varianten in die Messungen mit einbezogen.

Abbildung 15 ist zu entnehmen, dass die *ABCB1* mRNA Expression parentaler MaTu Zellen mit 0,3 % signifikant niedriger vorlag, als die der MDR Zellen (100 %). Die zur Kontrolle mit *E. coli* BL21(DE3) + TRIP anti-*GFP* behandelte MaTu/ADR Zellen wiesen mit 115,1 % eine leichte, aber dennoch signifikante *ABCB1* mRNA Überexpression bezogen auf unbehandelte MDR Zellen auf. Alle weiteren Kontrollen unterschieden sich nicht signifikant bezüglich der *ABCB1* mRNA Expression von unbehandelten MaTu/ADR Zellen. Die tkRNAi-TRIP anti-*ABCB1*, sowie die tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCB1* behandelte MDR Zellen zeigten jeweils eine signifikante *ABCB1* mRNA Überexpression von 158,8 % bzw. 195 %.

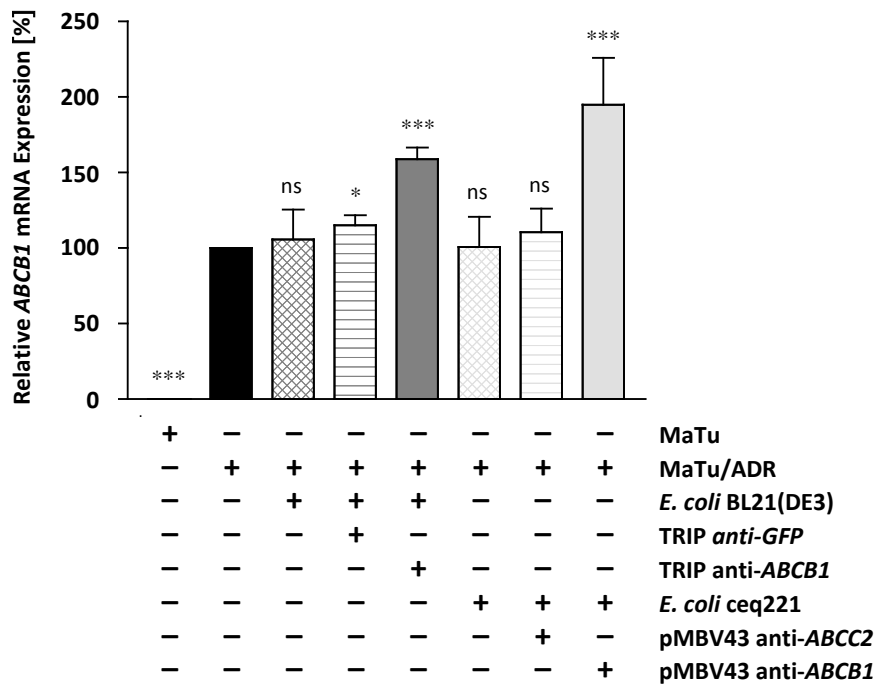


Abbildung 15: ABCB1 mRNA Expression in MaTu/ADR 72 h post tkRNAi-pMBV43 anti-ABCB1 Behandlung

Relative ABCB1 mRNA Quantifizierung mittels quantitativer real-time PCR von MaTu und MaTu/ADR (unbehandelt; + *E. coli* BL21(DE3); + *E. coli* BL21(DE3) + TRIP anti-GFP; + *E. coli* BL21(DE3) + TRIP anti-ABCB1; + *E. coli* ceq221; + *E. coli* ceq221 + pMBV43 anti-ABCC2; + *E. coli* ceq221 + pMBV43 anti-ABCB1) 72 h post Infektion (MOI 1:500). Das Housekeeping-Gen Aldolase diente der Normalisierung. Die ABCB1 mRNA Expression unbehandelte MaTu/ADR entspricht 100 %. Alle weiteren Werte wurden relativ auf diesen Wert bezogen. Die Signifikanz wurde jeweils anhand des zweiseitigen Student's t-Tests bezogen auf unbehandelte MaTu/ADR bestimmt (ns = nicht signifikant, * = $p < 0,05$, *** = $p < 0,001$).

3.2.4 Immunologischer Nachweis der ABCB1 Inhibition

Abbildung 16 zeigt die, mittels Western Blot Analyse detektierte, reprimierende Wirkung der tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCB1* Behandlung auf die ABCB1 Proteinexpression von EPG85-257RDB (Abb. 16 A) und MaTu/ADR Zellen (Abb. 16 B).

Abbildung 16 A ist zu entnehmen, dass von den parentalen EPG85-257P Zellen und den Zellen der Transfektante EPG85-257RDB/anti-*ABCB1*-shRNA kein nachweisbares ABCB1 Signal ausging. Die unbehandelten EPG85-257RDB Zellen, sowie die Kontrollen zum Ausschluss bakterieller oder unspezifischer shRNA Effekte zeigten im Gegensatz dazu eine jeweils ähnlich starke ABCB1 Überexpression. Nach tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCB1* Behandlung der MDR Zellen zeigten diese eine deutliche Reduktion der ABCB1 Expression.

Aus Abbildung 16 B geht hervor, dass die parentale Zelllinie MaTu, sowie die Transfektante MaTu/ADR/anti-*ABCB1*-shRNA je keine detektierbare ABCB1 Expression aufwiesen. Die unbehandelten MaTu/ADR Zellen und die Kontrollen zum Ausschluss bakterieller bzw. unspezifischer shRNA bedingter Einflüsse zeigten jeweils ähnlich hohe ABCB1 Expressionen. In MaTu/ADR Zellen wurde eine deutlich verminderte ABCB1 Expression nach tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCB1* Behandlung verzeichnet.



Abbildung 16: ABCB1 Expression von EPG85-257RDB (verändert nach Lage und Krühn, 2010, Analyse mit zusätzlichen Kontrollen wiederholt) und MaTu/ADR post tkRNAi-pMBV43 anti-ABCB1 Behandlung

Nachweis der ABCB1 Proteinexpression mittels Western Blot Analyse. (A) EPG85-257P, EPG85-257RDB/anti-ABCB1-shRNA und EPG85-257RDB (unbehandelt; + *E. coli* ceq221; + *E. coli* ceq221 + pMBV43 anti-ABCC2; + *E. coli* ceq221 + pMBV43 anti-ABCB1) 96 h post Infektion (MOI 1:500). (B) MaTu, MaTu/ADR/anti-ABCB1-shRNA und MaTu/ADR (unbehandelt; + *E. coli* ceq221; + *E. coli* ceq221 + pMBV43 anti-ABCC2; + *E. coli* ceq221 + pMBV43 anti-ABCB1) 192 h post Infektion (MOI 1:500). Primäre Antikörper: mAb C219 (1:100, ABCB1 bei 170 kDa, obere Bande), mAb anti-Aktin als Ladekontrolle (1:5000, Aktin bei 42 kDa, untere Bande), sekundärer Antikörper: mouse POD (1: 10 000).

3.2.5 Funktionelle Auswirkungen der ABCB1 Inhibition

Folgend sind die Ergebnisse der ABCB1 mRNA Quantifizierung am Tag der stärksten Regulation und der, mittels Zytostatikaakkumulations- und Zytotoxizitätsassays determinierten, funktionellen Auswirkungen der ABCB1 Inhibition der MDR Zelllinien EPG85-257RDB (Abb. 17 A-C) und MaTu/ADR (Abb. 18 A-C), jeweils nach tkRNAi-pMBV43 anti-ABCB1 Behandlung, dargestellt.

In Abbildung 17 A ist zu erkennen, dass die ABCB1 mRNA Expression der MDR Zellen dem 500-fachen Wert (100 %) der parentalen Zellen (0,2 %) entsprach. Die Transfektante EPG85-257RDB/anti-ABCB1-shRNA zeigte eine geringe ABCB1 mRNA Expression von 0,9 %, während

sich die Kontrollen zum Ausschluss bakterieller und unspezifischer shRNA Effekte hinsichtlich der *ABCB1* mRNA Expression nicht signifikant von den unbehandelten EPG85-257RDB Zellen unterschieden. Nach tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCB1* Behandlung wiesen die MDR Zellen mit 25,9 % eine signifikant verminderte *ABCB1* mRNA Expression auf.

Abbildung 17 B zeigt, dass die Daunorubicinakkumulation der parentalen Zelllinie EPG85-257P dem 14,7-fachen (100 %) und die der Transfektante EPG85-257RDB/anti-*ABCB1*-shRNA dem 13,9-fachen (94,4 %) Wert der unbehandelten MDR Zelllinie EPG85-257RDB (6,8 %) entsprach. Die Daunorubicinakkumulation der Kontrollen zum Ausschluss bakterieller oder unspezifischer shRNA Effekte wiesen jeweils keinen signifikanten Unterschied zu den unbehandelten MDR Zellen auf. Nach tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCB1* Behandlung zeigten die MDR Zellen eine signifikant, 13,7-fach erhöhte Akkumulation, was 93,1 %, bezogen auf die parentalen Zellen, entspricht.

Abbildung 17 C stellt dar, dass die Transfektante EPG85-257RDB/anti-*ABCB1*-shRNA eine 0,8-fache Daunorubicinresistenz bezogen auf die parentalen Zellen (Resistenzfaktor = 1) aufwies. Der Resistenzfaktor der unbehandelten MDR Zellen betrug 324,5-fach. Die Kontrolle zum Ausschluss bakterieller Effekte zeigte keinen signifikanten Unterschied und die Kontrolle zum Ausschluss unspezifischer shRNA Effekte ließ eine signifikant leicht erhöhte Resistenz in Bezug auf die unbehandelten EPG85-257RDB Zellen erkennen. Die tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCB1* behandelten MDR Zellen zeigten eine verminderte, 37,3-fache Resistenz, was einer signifikanten MDR Reversion von 88,5 %, bezogen auf die unbehandelten MDR Zellen, entspricht. Tabelle 45 (siehe Anhang) fasst die IC_{50} Werte, anhand der die Resistenzfaktoren berechnet wurden (x -facher IC_{50} Wert der EPG85-257P Zellen), zusammen.

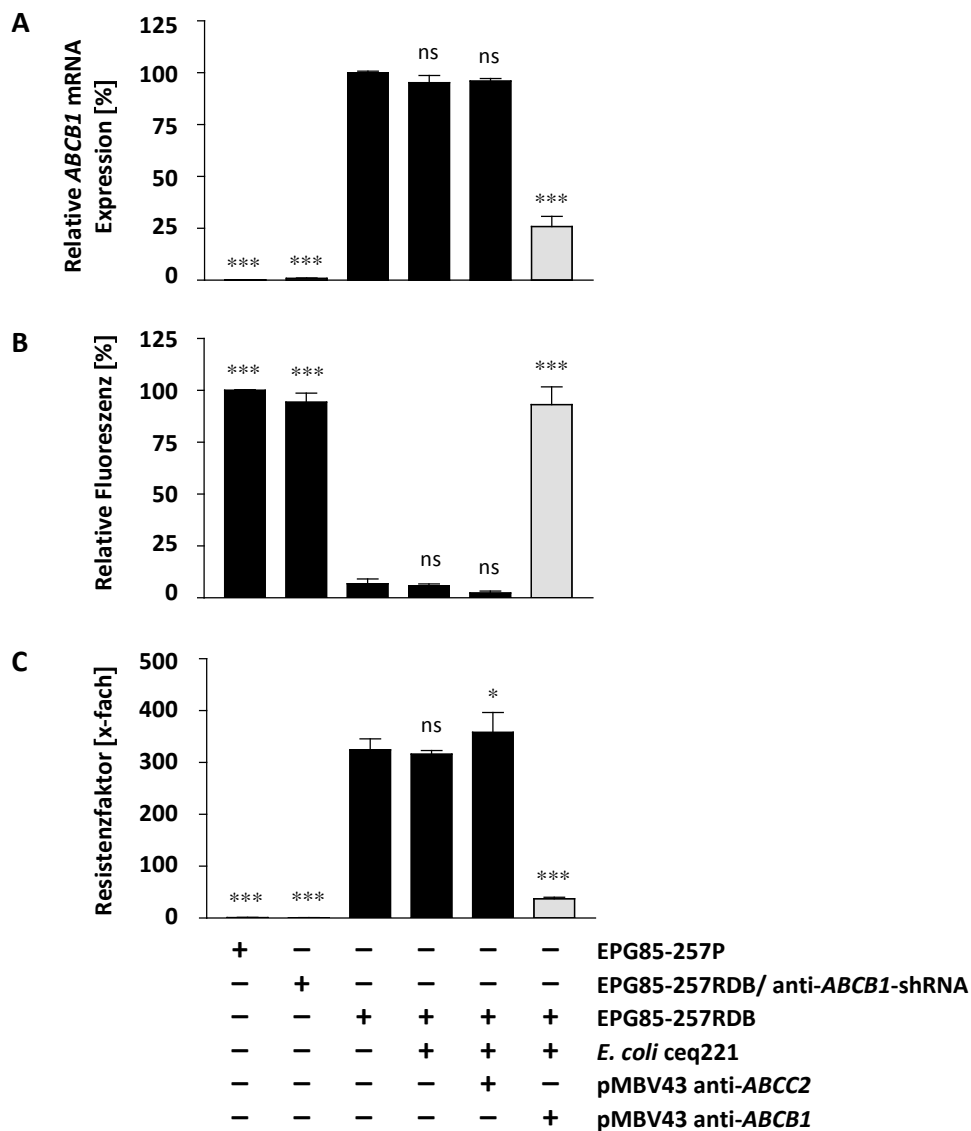


Abbildung 17: Funktionelle Analysen von ABCB1 in EPG85-257RDB post tkRNAi-pMBV43 anti-ABCB1 Behandlung (verändert nach Lage und Krühn, 2010)

ABCB1 mRNA Expression und funktionelle Analysen von EPG85-257P, EPG85-257RDB/anti-ABCB1-shRNA und EPG85-257RDB (unbehandelt; + *E. coli* ceq221; + *E. coli* ceq221 + pMBV43 anti-ABCC2; + *E. coli* ceq221 + pMBV43 anti-ABCB1) post Infektion (MOI 1:500). (A) Relative ABCB1 mRNA Quantifizierung mittels quantitativer real-time PCR 72 h post Infektion. Das Housekeeping-Gen Aldolase diente der Normalisierung. Die ABCB1 mRNA Expression unbehandelter EPG85-257RDB entspricht 100 %. Alle weiteren Werte wurden relativ auf diesen Wert bezogen. (B) Relative Daunorubicinakkumulationsbestimmung mittels Durchflusszytometrie 96 h post Infektion. Die Daunorubicinakkumulation von EPG85-257P entspricht 100 %. Alle weiteren Werte wurden relativ auf diesen Wert bezogen. (C) Relative Daunorubicinresistenzbestimmung mittels Zytotoxizitätsassay 96 h post Infektion. Die Resistenzfaktoren wurden als ein Vielfaches des IC₅₀-Werts von EPG85-257P (Resistenzfaktor = 1) dargestellt. Die Signifikanz wurde jeweils anhand des zweiseitigen Student's t-Tests bezogen auf unbehandelte EPG85-257RDB Zellen bestimmt (ns = nicht signifikant, * = p < 0,05, *** = p < 0,001).

Aus Abbildung 18 A geht hervor, dass die *ABCB1* mRNA Expression der parentalen Zelllinie MaTu 0,3 % und die der Transfektante MaTu/ADR/anti-*ABCB1*-shRNA 2,9 % betragen. Die *ABCB1* mRNA Expression der unbehandelten MDR Zelllinie MaTu/ADR wies eine 333-fache *ABCB1* mRNA Überexpression (100 %) im Vergleich zu der parentalen Zelllinie auf. Die Kontrollen zum Ausschluss unspezifischer bakterieller oder unspezifischer shRNA bedingter Effekte zeigten keinen signifikanten Unterschied bezüglich der *ABCB1* mRNA Expression im Vergleich zu der unbehandelten MDR Zelllinie. Die tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCB1* Behandlung der MDR Zellen bewirkte eine signifikante Verminderung der *ABCB1* mRNA Expression auf 35,5 %.

Wie in Abbildung 18 B dargestellt ist, lag die Doxorubicinakkumulation der parentalen Zellen signifikant 200-fach (100 %) und die der Transfektante MaTu/ADR/anti-*ABCB1*-shRNA signifikant 37-fach (18,5 %) höher vor, als die Akkumulation der MaTu/ADR Zellen (0,5 %). Die Kontrollen zum Ausschluss bakterieller oder unspezifischer shRNA Effekte zeigten keinen signifikanten Unterschied in Bezug auf die Doxorubicinakkumulation der unbehandelten MDR Zellen. Nach tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCB1* Behandlung wiesen die MaTu/ADR Zellen eine signifikant 152,4-fach (76,2 %) erhöhte Akkumulation bezogen auf die unbehandelten MDR Zellen auf.

In Abbildung 18 C ist zu sehen, dass die Transfektante MaTu/ADR/anti-*ABCB1*-shRNA eine 6,8-fache (87,2 % MDR Reversion, bezogen auf unbehandelte MDR Zellen) und die unbehandelten MaTu/ADR Zellen eine 53,5-fache Doxorubicinresistenz, bezogen auf die parentalen MaTu Zellen (Resistenzfaktor = 1), zeigten. Die Resistenz der Kontrollen zum Ausschluss bakterieller oder unspezifischer shRNA bedingter Effekte zeigte jeweils keinen signifikanten Unterschied zu der unbehandelten MDR Zelllinie. Die Doxorubicinresistenz der MDR Zellen wurde durch die tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCB1* Behandlung auf das 5,6-fache signifikant vermindert, was einer MDR Reversion von 89,5 %, bezogen auf die unbehandelten MaTu/ADR Zellen, entspricht. Die IC_{50} Werte, aus denen die Resistenzfaktoren berechnet wurden (x -facher IC_{50} Wert der MaTu Zellen), sind in Tabelle 46 (siehe Anhang) zusammengefasst dargestellt.

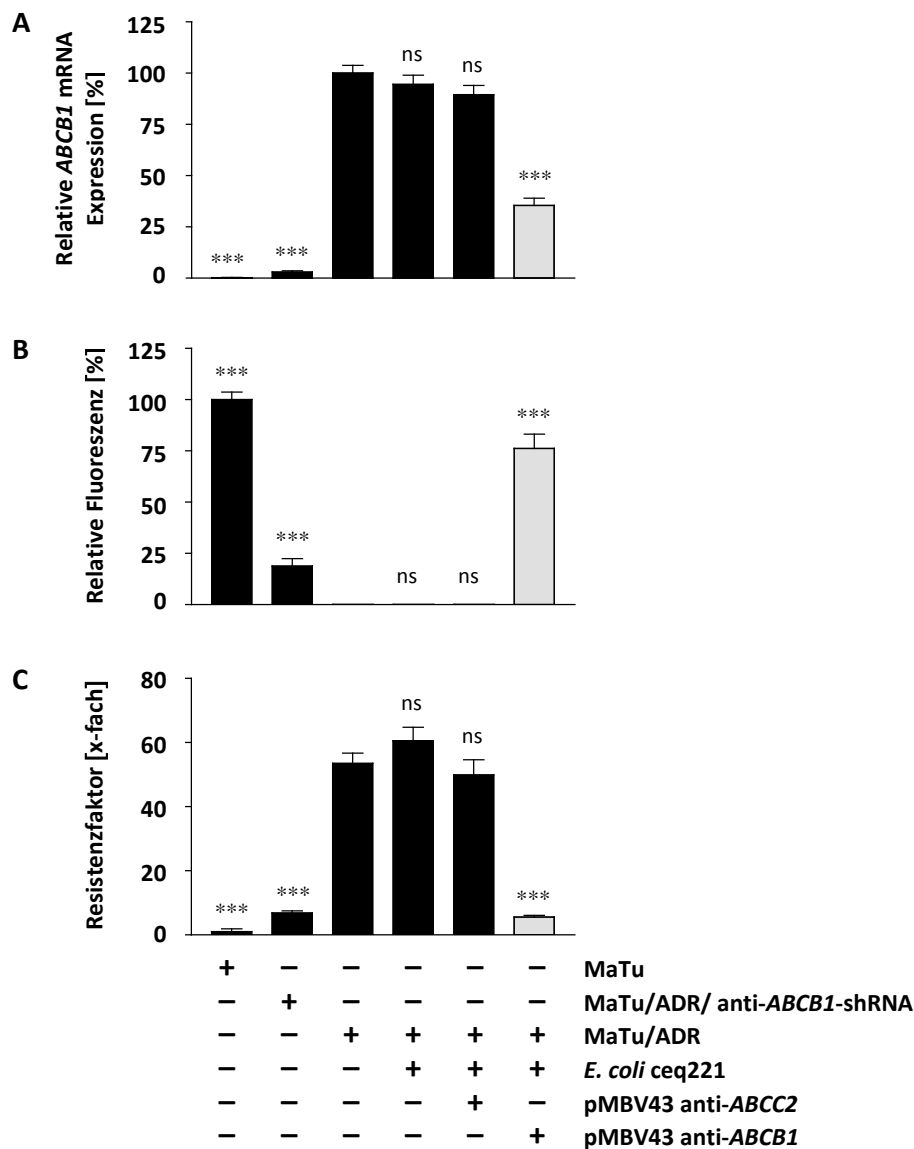


Abbildung 18: Funktionelle Analysen von ABCB1 in MaTu/ADR post tkRNAi-pMBV43 anti-ABCB1 Behandlung

ABCB1 mRNA Expression und funktionelle Analysen von MaTu, MaTu/ADR/anti-ABCB1-shRNA und MaTu/ADR (unbehandelt; + *E. coli* ceq221; + *E. coli* ceq221 + pMBV43 anti-ABCC2; + *E. coli* ceq221 + pMBV43 anti-ABCB1) post Infektion (MOI 1:500). (A) Relative ABCB1 mRNA Quantifizierung mittels quantitativer real-time PCR 168 h post Infektion. Das Housekeeping-Gen Aldolase diente der Normalisierung. Die ABCB1 mRNA Expression unbehandelter MaTu/ADR entspricht 100 %. Alle weiteren Werte wurden relativ auf diesen Wert bezogen. (B) Relative Doxorubicinakkumulationsbestimmung mittels Durchflusszytometrie 192 h post Infektion. Die Doxorubicinakkumulation von MaTu entspricht 100 %. Alle weiteren Werte wurden relativ auf diesen Wert bezogen. (C) Relative Doxorubicinresistenzbestimmung mittels Zytotoxizitätsassay 192 h post Infektion. Die Resistenz wurde als ein Vielfaches des IC₅₀-Werts von MaTu (Resistenzfaktor = 1) dargestellt. Die Signifikanz wurde jeweils anhand des zweiseitigen Student's t-Tests bezogen auf die unbehandelte MaTu/ADR Zellen bestimmt (ns = nicht signifikant, *** = p < 0,001).

3.3 Reversion des atypischen MDR Phänotyps durch tkRNAi-pMBV43 anti-ABCG2

Für die Überprüfung der 4. Hypothese der vorliegenden Arbeit (Kap. 1.3) wurden die Mitoxantron selektierte, atypische MDR Zelllinie EPG85-257RNOV, die *ABCG2* überexprimiert, sowie die parentale Ursprungszelllinie EPG85-257P gewählt. Wie in vorherigen Untersuchungen des tkRNAi Potentials bezüglich der Reversion der klassischen MDR (Kap. 3.1 und 3.2), wurden auch in den folgenden Analysen Kontrollen zum Ausschluss bakterieller (EPG85-257RNOV + *E. coli* ceq221) und unspezifischer shRNA Effekte (EPG85-257RNOV + *E. coli* ceq221 + pMBV43 anti-*ABCC2*) auf die *ABCG2* Inhibition in verschiedene Messungen mit einbezogen.

3.3.1 Nachweis der bakteriellen Invasion und Lyse

Aus Abbildung 19 geht hervor, dass auch in der atypischen MDR Zelllinie EPG85-257RNOV, Invasion und Lyse der verwendeten tkRNAi Bakterien, in diesem Fall von *E. coli* ceq221 + pMBV43 anti-*ABCG2*, im gleichen zeitlichen Rahmen eintraten, wie in allen zuvor untersuchten klassischen MDR Zelllinien (Kap. 3.1.1 und 3.2.1). 1 h nach tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCG2* Behandlung konnte die Invasion anhand erkennbarer Bakterien im Karzinomzellzytoplasma festgestellt werden. Bis 11 h nach Infektion wurden ähnliche intrazelluläre Bakterienquantitäten ausgemacht (nicht dargestellt). Ab 12 h nach Infektion setzte eine Abnahme der Bakterien ein, bis nach 14 h keine Bakterien mehr sichtbar waren und die bakterielle Lyse abgeschlossen war. In den unbehandelten Kontrollzellen wurden zu keinem Zeitpunkt Bakterien detektiert.

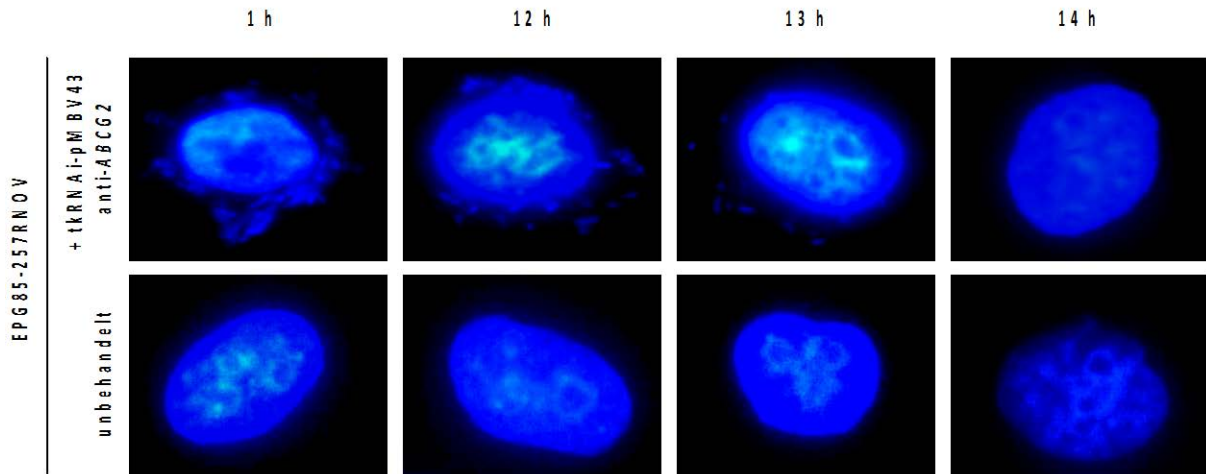


Abbildung 19: Invasion und Lyse von *E. coli* ceq221 + pMBV43 anti-ABCG2 in EPG85-257RNOV

Zeitkinetischer Nachweis der bakteriellen Invasion und Lyse DAPI-gefärbter MDR Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie, EPG85-257RNOV 1 h, 12 h, 13 h und 14h post Infektion mit *E. coli* ceq221 + pMBV43 anti-ABCG2 (MOI 1:1000) und Kontrollzellen (unbehandelte EPG85-257RNOV Zellen). DAPI bandpass Filter ($\lambda_{em} = 640 \text{ nm}$), 40x Objektiv.

3.3.2 Nachweis von anti-ABCG2-shRNAs

Der quantitative Nachweis tkRNAi-pMBV43 anti-ABCG2 übermittelter anti-ABCG2-shRNAs erfolgte, analog zu vorherigen anti-ABCB1-shRNA Quantifizierungen, indirekt über die Quantifizierung der anti-ABCG2-siRNAs (*antisense*) mittels quantitativer real-time PCR (Abb. 20).

Abbildung 20 zeigt, dass weder die parentale Zelllinie EPG85-257P, noch die Kontrollen zum Ausschluss bakterieller oder unspezifischer shRNA bedingter Effekte, signifikante Abweichungen der anti-ABCG2-shRNA Expression zu der unbehandelten Zelllinie EPG85-257RNOV (1-fach) aufwiesen. Nach tkRNAi-pMBV43 anti-ABCG2 Behandlung der MDR Zellen konnte ein 27-facher anti-ABCG2-shRNA Anstieg tendentiell festgestellt, jedoch nicht signifikant bestätigt werden.

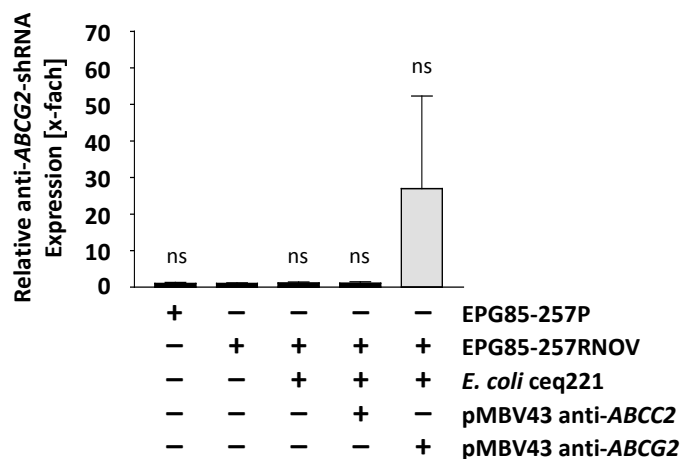


Abbildung 20: Nachweis von anti-*ABCG2*-shRNAs in EPG85-257RNOV post tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCG2* Behandlung

Relative anti-*ABCG2*-shRNA Quantifizierung mittels quantitativer real-time PCR in EPG85-257P und EPG85-257RNOV (unbehandelt; + *E. coli* ceq221; + *E. coli* ceq221 + pMBV43 anti-*ABCC2*; + *E. coli* ceq221 + pMBV43 anti-*ABCG2*) 24 h post Infektion (MOI 1:500). miR-16 diente der Normalisierung. Alle Werte stellen das Vielfache der miR-16 Expression unbehandelter EPG85-257RNOV, die 1 gesetzt wurde, dar. Die Signifikanz wurde jeweils anhand des zweiseitigen Student's t-Tests bezogen auf unbehandelte EPG85-257RNOV Zellen bestimmt (ns = nicht signifikant).

3.3.3 Determinierung des Zeitpunktes der maximalen *ABCG2* mRNA Inhibition

Die, mittels quantitativer real-time PCR determinierte, inhibitorische Auswirkung der bakteriell übermittelten anti-*ABCG2*-shRNAs auf die *ABCG2* mRNA Expression sind Abbildung 21 zu entnehmen. Unbehandelte EPG85-257RNOV Zellen (0 h) zeigten eine 111,1-fache *ABCG2* mRNA Überexpression (100 %), bezogen auf die parental Zellen (0,9 %). Die tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCG2* Behandlung atypischer MDR Zellen bewirkte zu jedem Zeitpunkt, bis einschließlich 144 h nach Infektion, eine signifikante Inhibition der *ABCG2* mRNA Expression. Während die *ABCG2* mRNA Expression bis 48 h nach Infektion, welches den Zeitpunkt der maximalen Inhibition darstellt, auf 4,8 % sank, nahm die *ABCG2* mRNA Expression anschließend wieder zu und erreichte nach 168 h einen Wert von 86,5 %.

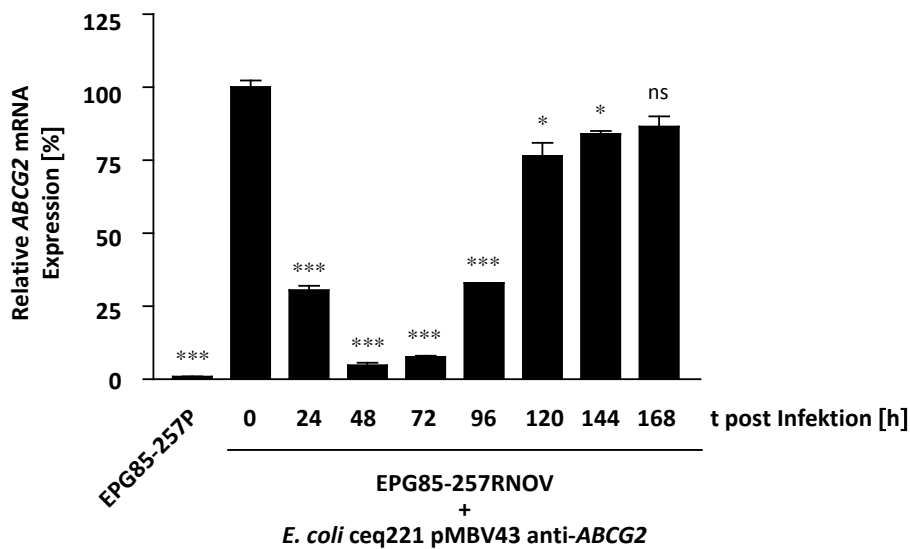


Abbildung 21: Zeitkinetik der ABCG2 mRNA Expression in EPG85-257RNOV post tkRNAi-pMBV43 anti-ABCG2 Behandlung

Relative ABCG2 mRNA Quantifizierung mittels quantitativer real-time PCR von EPG85-257P und EPG85-257RNOV (0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h, 144 h, 168 h post Infektion mit *E. coli* ceq221 + pMBV43 anti-ABCG2, MOI 1:500). Das Housekeeping-Gen Aldolase diente der Normalisierung. Die ABCG2 mRNA Expression un behandelter EPG85-257RNOV (0 h) entspricht 100 %. Alle weiteren Werte wurden relativ auf diesen Wert bezogen. Die Signifikanz wurde jeweils anhand des zweiseitigen Student's t-Tests bezogen auf un behandelte EPG85-257RNOV Zellen bestimmt (ns = nicht signifikant, * = $p < 0,05$, *** = $p < 0,001$).

3.3.4 Immunologischer Nachweis der ABCG2 Inhibition

Der mittels ABCG2 mRNA Quantifizierung beobachtete inhibitorische Effekt auf ABCG2 post tkRNAi-pMBV43 anti-ABCG2 Behandlung konnte auf Proteinebene bestätigt werden. Aus der, in Abbildung 22 dargestellten, Western Blot Analyse geht hervor, dass im Gegensatz zu den parentalen Zellen, in denen keine nachweisbare ABCG2 Expression detektiert wurde, in den atypischen MDR Zellen und den Kontrollen zum Ausschluss bakterieller oder unspezifischer shRNA Effekte jeweils starke ABCG2 Signale auftraten. Die tkRNAi-pMBV43 anti-ABCG2 Behandlung bewirkte eine deutliche Reduktion der ABCG2 Expression der infizierten atypischen MDR Zellen.

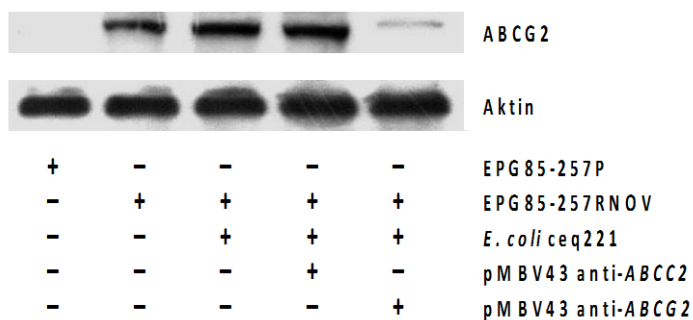


Abbildung 22: ABCG2 Expression in EPG85-257RNOV post tkRNAi-pMBV43 anti-ABCG2 Behandlung

Nachweis der ABCG2 Proteinexpression mittels Western Blot Analyse von EPG85-257P und EPG85-257RNOV (unbehandelt; + *E. coli* ceq221; + *E. coli* ceq221 + pMBV43 anti-ABCC2; + *E. coli* ceq221 + pMBV43 anti-ABCG2) 96 h post Infektion (MOI 1:500). Primäre Antikörper: mAb BXP-21 (1:100, ABCG2 bei 72 kDa, obere Bande), mAb anti-Aktin als Ladekontrolle (1:5000, Aktin bei 42 kDa, untere Bande), sekundärer Antikörper: mouse POD (1:10 000).

3.3.5 Funktionelle Auswirkungen der ABCG2 Inhibition

Aus Abbildung 23 gehen die, mittels quantitativer real-time PCR determinierten, ABCG2 mRNA Expressionen am Tag der stärksten Regulation (Abb. 23 A), die durchflusszytometrisch festgestellten Mitoxantronakkumulationen (Abb. 23 B) und die anhand Zytotoxizitätsassays ermittelten Resistenzfaktoren (Abb. 23 C) tkRNAi-pMBV43 anti-ABCG2 behandelter EPG85-257RNOV Zellen und der Kontrollen hervor.

Wie Abbildung 23 A zu entnehmen ist, wurde in der atypischen MDR Zelllinie EPG85-257RNOV eine 142,9-fache (100 %) ABCG2 mRNA Überexpression, bezogen auf die parentalen EPG85-257P Zellen (0,7 %), festgestellt. Die Kontrollen zum Ausschluss bakterieller oder unspezifischer shRNA Effekte zeigten bezüglich der ABCG2 mRNA Expression jeweils keinen signifikanten Unterschied zu den unbehandelten MDR Zellen. Die ABCG2 mRNA Expression tkRNAi-pMBV43 anti-ABCG2 behandelter atypischer MDR Zellen lag mit 5,7 % signifikant vermindert vor.

In Abbildung 23 B ist zu erkennen, dass die Mitoxantronakkumulation der parentalen Zellen (100 %) dem 15,2-fachen Wert der atypischen MDR Zellen (6,6 %) entsprach. Die Akkumulation der Kontrollen zum Ausschluss bakterieller oder unspezifischer shRNA bedingter Effekte unterschieden sich nicht signifikant von der, der unbehandelten atypischen MDR Zellen. Nach

tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCG2* Behandlung zeigten die EPG85-257RNOV Zellen eine signifikant gesteigerte Mitoxantronakkumulation von 45,8 %.

Aus Abbildung 23 C geht hervor, dass die Resistenz der unbehandelten atypischen MDR Zellen 55-fach höher vorlag, als die der parentalen Zellen. Die Kontrollen zum Ausschluss bakterieller oder unspezifischer shRNA Effekte zeigten jeweils keinen signifikanten Unterschied zu den unbehandelten atypischen MDR Zellen. Nach tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCG2* Behandlung der EPG85-257RNOV Zellen wiesen diese einen signifikant verminderten Resistenzfaktor von 25,6-fach auf, was einer MDR Reversion von 53,5 % bezogen auf die unbehandelten MDR Zellen entspricht. Tabelle 47 (siehe Anhang) fasst die ermittelten IC_{50} Werte, aus denen die Resistenzfaktoren berechnet wurden (x -facher IC_{50} Wert der EPG85-257P Zellen), zusammen.

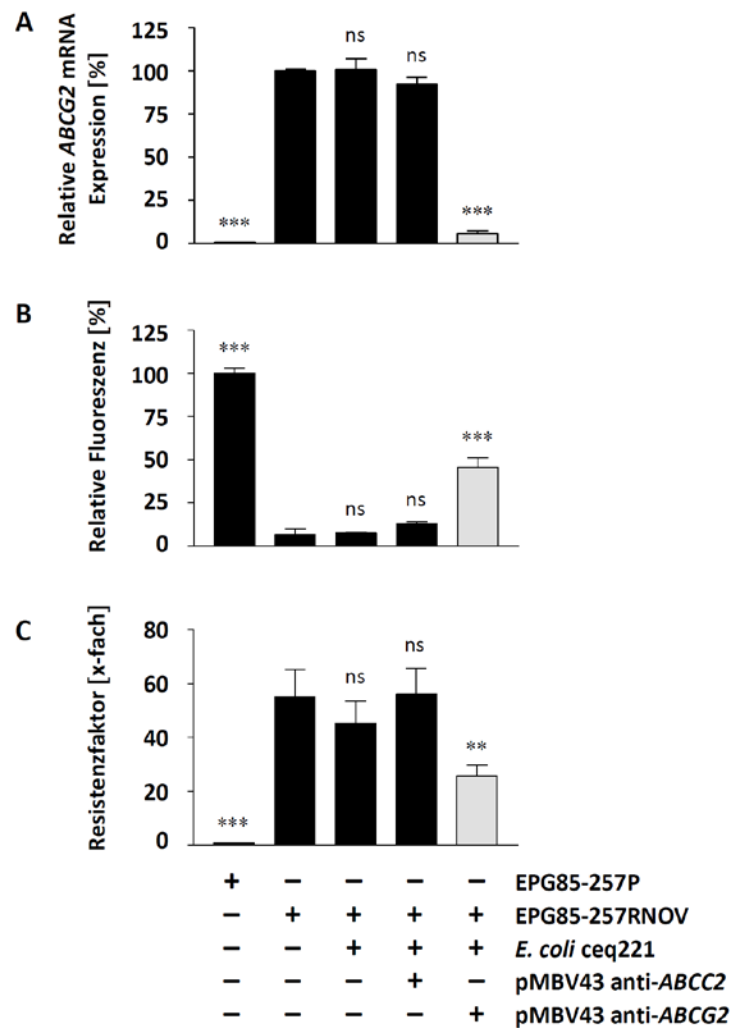


Abbildung 23: Funktionelle Analysen von ABCG2 in EPG85-257RNOV post tkRNAi-pMBV43 anti-ABCG2 Behandlung

ABCG2 mRNA Expression und funktionelle Analysen von EPG85-257P und EPG85-257RNOV (unbehandelt; + *E. coli* ceq221; + *E. coli* ceq221 + pMBV43 anti-ABCC2; + *E. coli* ceq221 + pMBV43 anti-ABCG2) post Infektion (MOI 1:500). (A) Relative ABCG2 mRNA Quantifizierung mittels quantitativer real-time PCR 48 h post Infektion. Das Housekeeping-Gen Aldolase diente der Normalisierung. Die ABCG2 mRNA Expression un behandelter EPG85-257RNOV entspricht 100 %. Alle weiteren Werte wurden relativ auf diesen Wert bezogen. (B) Relative Mitoxantronakkumulationsbestimmung mittels Durchflusszytometrie 96 h post Infektion. Die Mitoxantronakkumulation von EPG85-257P entspricht 100 %. Alle weiteren Werte wurden relativ auf diesen Wert bezogen. (C) Relative Mitoxantronresistenzbestimmung mittels Zytotoxizitätsassay 96 h post Infektion. Die Resistenz wurde als ein Vielfaches des IC₅₀-Werts von EPG85-257P (Resistenzfaktor = 1) dargestellt. Die Signifikanz wurde jeweils anhand des zweiseitigen Student's t-Tests bezogen auf un behandelte EPG85-257RNOV Zellen bestimmt (ns = nicht signifikant, ** = p < 0,01, *** = p < 0,001).

4 Diskussion

Aufgrund der Möglichkeit des sequenzspezifischen Eingriffs in die Proteinbiosynthese mittels RNAi beschäftigen sich diverse Forschungsarbeiten mit dem Einsatz des posttranskriptionellen Mechanismus, deren Ziel unter anderem die Behebung genetischer Dysregulationen und deren pathologischer Folgen ist. Die vermutlich größte Herausforderung bei dem Einsatz der RNAi als therapeutische Methode ist nach wie vor die Übermittlung von RNAi Effektoren in Zielzellen (Krühn *et al.*, 2009). Bislang wurden neben der, Nuklease-bedingt ineffizienten, Applikation unmodifizierter siRNAs oder shRNA-exprimierender Vektoren, beispielsweise Nanopartikel-, Lipid- und Virus basierte *Delivery*-Verfahren entwickelt (Tiemann und Ross, 2009; Burnett *et al.*, 2011; Lage *et al.*, 2011). Die Zahl in klinischen Studien untersuchter RNAi Ansätze ist mit ca. 30 verhältnismäßig begrenzt, da eine effektive und effiziente RNAi Applikation Zielgewebe und -gen spezifisch ist und teilweise unspezifische, toxische Nebenwirkungen auftreten (Burnett *et al.*, 2011).

Chemische Modifikationen von RNAi Effektoren sind kostspielig. Virale Ansätze sind aufgrund des Titrationsprozesses zeitaufwendig. Zudem bestehen, trotz besonderer Vorkehrungen und der Wahl replikationsunfähiger Adenoviren, Sicherheitsbedenken bezüglich der viralen Kontrolle. Im Vergleich zu den genannten Forschungsansätzen, weist die von Xiang *et al.* (2006) entwickelten tkRNAi als RNAi Effektoren *Delivery*-Methode entscheidende Vorteile auf. Die bakterielle Vervielfachung von RNAi Effektoren ist kostengünstig, *E. coli* sind im Labor einfach handhabbar und die Möglichkeit der antibiotischen Kontrolle der eingesetzten Bakterien vermindert potentielle Sicherheitsrisiken.

Nachdem Xiang *et al.* (2006) anhand des Einsatzes der tkRNAi-TRIP bereits eine spezifische, deutliche β 1-Catenin Repression *in vitro* und *in vivo* im Mausmodell erzielten, wurde im Zuge der vorliegenden Arbeit untersucht, ob sich die pharmakologische Effektivität der tkRNAi auf weitere klinisch relevante Zielgene übertragen lässt und ob Unterschiede bezüglich der Effizienz der tkRNAi-TRIP bzw. -pMBV43 bestehen. Die verwendeten, gut charakterisierten humanen MDR Zellkulturmodelle stellen hierfür eine ideale Voraussetzung dar, da viele Krebstherapien an der ABC-Transporter bedingten MDR scheitern. Gelingt die spezifische, RNAi bedingte Inhibition der entsprechenden ABC-Transporter, führt der verminderte Zytostatika-

efflux zu einer gesteigerten Akkumulation der Medikamente in den Krebszellen und einhergehend zu einer Reversion des jeweiligen MDR Phänotyps.

In vorangegangenen Studien wurden bereits unterschiedliche RNAi Techniken zur Reversion der MDR in den gleichen, in dieser Arbeit verwendeten, MDR Zelllinien untersucht, weshalb Vergleichsdaten zur Evaluation des regulativen Potentials der tkRNAi zu weiteren RNAi Techniken bestehen (Nieth *et al.*, 2003; Stege *et al.*, 2004; Kowalski *et al.*, 2005; Kaszubiak *et al.*, 2007; Stein *et al.*, 2008).

4.1 Reversion des klassischen MDR Phänotyps durch tkRNAi-TRIP anti-ABCB1

Der erste Schritt der vorliegenden Arbeit bestand darin, die tkRNAi-TRIP Technologie, mit der Xiang *et al.* (2006) die *CTNNB1* Hemmung in der humanen Kolonkarzinomzelllinie SW480 bewirkte, hinsichtlich der Übertragbarkeit auf ein humanes MDR Zellkulturmodell, in dem *ABCB1* inhibiert und die Reversion der MDR erreicht werden sollte, zu überprüfen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen wurden zum Teil bereits publiziert (Krühn *et al.*, 2009).

Nachdem sowohl Invasion und Lyse der *E. coli* BL21(DE3) + TRIP anti-*ABCB1* in den infizierten EPG85-257RDB Zellen, als auch die erfolgreiche bakterielle Übermittlung von anti-*ABCB1*-shRNAs gezeigt werden konnten, wurde eine signifikante *ABCB1* mRNA Repression 48 h post Infektion festgestellt. Der maximale inhibitorische Effekt der tkRNAi-TRIP anti-*ABCB1* auf die *ABCB1* mRNA Expression der MDR Zellen trat mit 38,3 % 72 h post Infektion ein. Xiang *et al.* (2006) detektierten die tkRNAi-TRIP anti-*CTNNB1* bedingte *CTNNB1* mRNA Regulation in der Kolonkarzinomzelllinie SW480 per Northern Blot Analyse bereits 16 h post Infektion. Mehrere Faktoren können ausschlaggebend für die zeitliche Abweichung sein. Xiang *et al.* (2006) haben eine MOI von 1:1000 eingesetzt, was in der vorliegenden Arbeit wegen der hohen Anzahl apoptotischer MDR Karzinomzellen, der bakteriellen Behandlung folgend, nicht möglich war (nicht gezeigt). Die tolerierte MOI ist vermutlich Zelllinien-spezifisch. Weiterhin kann angenommen werden, dass die Zeitspanne der intrazellulären bakteriellen Lyse ebenfalls abhängig von der Zelllinie ist. Da keine fluoreszenzmikroskopische Zeitkinetik für die SW480 Zellen besteht, kann dies jedoch nicht mit Sicherheit bestätigt werden. Vergleiche zu Studien, in denen die *ABCB1* mRNA Inhibition 24-120 h im Anschluss an die Behandlung von EPG85-257RDB Zellen mit anti-*ABCB1*-siRNAs (Nieth *et al.*, 2003) oder adenoviral übermittelten anti-

ABCB1-shRNA (Kaszubiak *et al.*, 2007) erzielt wurde, sind kritisch zu beurteilen, da diese Studien nicht-bakterielle Formen des *Deliverys* einsetzten und jeweils keine bakterielle Lyse vorausgesetzt wurde. Weiterhin wurden die *ABCB1* mRNA Expressionen in den genannten Studien zeitkinetisch mittels Northern Blot Analyse untersucht und Messungen mittels der sensitiveren quantitativen real-time PCR nur zu ausgewählten Zeitpunkten durchgeführt. Die abweichenden Verfahren erschweren den direkten Vergleich der Ergebnisse mit denen der vorliegenden Arbeit. Der Zeitpunkt der einsetzenden tkRNAi-TRIP anti-*ABCB1* bedingten signifikanten *ABCB1* mRNA Repression ab 48 h post Infektion scheint jedoch plausibel.

Analog zu der festgestellten *ABCB1* mRNA Inhibition, trat nach tkRNAi-TRIP anti-*ABCB1* Behandlung eine verminderte *ABCB1* Proteinexpression der EPG85-257RDB Zellen ein. Wie erwartet, bewirkte die Abnahme der *ABCB1* Expression eine verminderte Daunorubicinakkumulation und einhergehend eine partielle Reversion des MDR Phänotyps. Durch Einsatz chemisch synthetisierter anti-*ABCB1*-siRNAs wurde in der gleichen MDR Zelllinie (EPG85-257RDB) eine MDR Reversion von 58 % beobachtet (Nieth *et al.*, 2003), was vergleichbar mit der 59,9 %igen Reversion durch die tkRNAi-TRIP anti-*ABCB1* Behandlung ist. Anzumerken ist, dass Nieth *et al.* (2003) eine andere *ABCB1* Zielsequenz für das anti-*ABCB1*-siRNA Design (MDR-B) nutzten. Stege *et al.* (2004) erzielten, unter Verwendung der *ABCB1* Zielsequenz MDR-A für das Design der anti-*ABCB1*-shRNA-Expressionskassette, eine vollständige Reversion des MDR Phänotyps in der stabilen Transfektante EPG85-257RDB/anti-*ABCB1*-shRNA. Die Verwendung von MDR-B bewirkte in der gleichen Studie, entgegen des siRNA Ansatzes von Nieth *et al.* (2003), keine MDR Reversion. Es wurde angenommen, dass 2 Thymidine am 3'-Ende der MDR-B-shRNA-Expressionskassette zu einem unerwünschten Transkriptionsabbruch der anti-*ABCB1*-shRNAs führt, weshalb die biologische Stabilität der resultierenden shRNAs aufgrund des fehlenden 3'-Überhangs (zwei Uracile) beeinträchtigt wurde (Stege *et al.*, 2004; Kaszubiak *et al.*, 2007). Dies verdeutlicht die Relevanz des RNAi Effektoren Designs für verschiedene RNAi Strategien. Anhand der adenoviralen Übermittlung von anti-*ABCB1*-shRNAs, mit der in dieser Arbeit verwendeten *ABCB1* Zielsequenz (MDR-C), die keinen Transkriptionsabbruch nach sich zieht, wurde ebenfalls im gleichen Zellkulturmodell eine über 70 %ige MDR Reversion erreicht (Kaszubiak *et al.*, 2007). Dies entspricht einer 10,1 % stärkeren MDR Reversion im Vergleich zu der tkRNAi-TRIP anti-*ABCB1* Behandlung.

Insgesamt ist der direkte Vergleich des MDR modulierenden Effekts der tkRNAi-TRIP anti-*ABCB1* zu den genannten Studien aufgrund unterschiedlicher *Delivery*-Methoden, unterschiedlicher Promotoren der verwendeten anti-*ABCB1*-shRNA-Expressionsvektoren und verschiedener *ABCB1* Zielsequenzen der eingesetzten anti-*ABCB1*-shRNAs als kritisch zu beurteilen. Dennoch bieten die Analysen im gleichen MDR Modell (EPG85-257RDB) einen Anhaltspunkt über potentiell erreichbare RNAi Effekte.

Zusammenfassend ist die tkRNAi-TRIP Variante von der Kolonkarzinomzelllinie SW480 mit dem Zielgen *CTNNB1* (Xiang *et al.*, 2006) auf eine klassische MDR Zelllinie mit dem Zielgen *ABCB1* übertragbar, was die partielle Reversion des klassischen MDR Phänotyps der EPG85-257RDB Zellen nach tkRNAi-TRIP anti-*ABCB1* Behandlung belegt. Die aufgestellte Hypothese 1 (Kap. 1.3) kann angenommen werden, auch wenn die *ABCB1* Regulation Optimierungspotential aufweist. Eine mögliche Ursache für den weniger starken Effekt der tkRNAi-TRIP anti-*ABCB1* könnte u.a. die intrabakterielle Degradation der anti-*ABCB1*-shRNAs sein (Krühn *et al.*, 2009). Im folgenden Kapitel 4.2 wird auf bereits vorgenommene Optimierungen der tkRNAi-TRIP Variante eingegangen.

4.2 Reversion des klassischen MDR Phänotyps durch tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCB1*

Nachdem die Übertragbarkeit der tkRNAi-TRIP auf ein weiteres therapierelevantes Zielgen gezeigt werden konnte (Kap. 3.1, 4.1.), wurde untersucht, ob die, aus der Optimierung der tkRNAi-TRIP resultierende, tkRNAi-pMBV43 Variante, eine effizientere *ABCB1* Inhibition und eine stärkere MDR Reversion im gleichen MDR Zellkulturmodell (EPG85-257RDB) aufweist, als die tkRNAi-TRIP Variante. Weiterhin wurden die Effekte der tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCB1* auf die *ABCB1* Expression und den MDR Resistenzphänotypen in der MDR Zelllinie MaTu/ADR untersucht, um auszuschließen, dass sich die tkRNAi-pMBV43 bedingte Reversion des MDR Phänotyps auf eine Zelllinie beschränkt (Kap. 3.2). Teile der Ergebnisse tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCB1* behandelter EPG85-257RDB Zellen wurden bereits publiziert (Lage und Kröhn, 2010).

Die unter der Leitung von Dr. Dr. Johannes Fruehauf (Cequent Pharmaceuticals, Inc.) durchgeführten Optimierungen der tkRNAi-TRIP beinhalteten Plasmidmodifikationen des TRIPs, die vor allem das Ziel eines distinkteren Transkriptionsabbruchsignals in Form multipler Thymidine (10 Ts) nach der shRNA kodierenden Sequenz verfolgten. Dies hat theoretisch zur Folge, dass die Längenvariabilität der exprimierten shRNAs abnimmt. Lange shRNA-Überhänge führen zu einer inhibierenden Wirkung auf Dicer. Umgekehrt werden durch eine höhere Anzahl exprimierter shRNAs distinkter, kürzerer Länge mehr biologisch aktive siRNAs generiert (Vermeulen *et al.*, 2005). Dies sollte eine verstärkte posttranskriptionelle Regulation des Zielgens nach sich ziehen. Die Verwendung DAP-auxotropher *E. coli* ceq221 für die tkRNAi-pMBV43 soll die Applikation der tkRNAi mit Hinblick auf künftige *in vivo* Studien noch sicherer machen und zu einer beschleunigten Freigabe der intrabakteriell transkribierten shRNAs führen. DAP ist ein Bestandteil des in der bakteriellen Zellwand vorkommenden Peptidoglykans, weshalb die Mikroorganismen ohne Zugabe von DAP nicht überlebensfähig sind. Mit der DAP-Auxotrophie geht eine Destabilisierung der bakteriellen Zellmembran einher, die, nach β 1-Integrin bedingter zellulärer Internalisation, zum beschleunigten bakteriellen Tod innerhalb des Phagosoms führt (Vaze *et al.*, 2012). Weiterhin soll die RNase III Deletion (Δ rnc) der eingesetzten Bakterien einen verminderten Abbau der shRNAs bewirken, weshalb theoretisch mehr funktionelle RNAi Effektoren in das Zielzellzytoplasma übermittelt werden (Vaze *et al.*, 2012).

Der Feststellung, dass Invasion und Lyse von *E. coli* ceq221 + pMBV43 anti-*ABCB1*, ebenso wie bei den *E. coli* BL21(DE3) + TRIP anti-*ABCB1*, in EPG85-257RDB und MaTu/ADR Zellen stattfanden, konnte 24 h post tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCB1* Behandlung eine 70,5-fache (EPG85-257RDB) bzw. eine 53,4-fache (MaTu/ADR) anti-*ABCB1*-shRNA Quantität im jeweiligen MDR Karzinomzellzytoplasma festgestellt werden. Im Vergleich zu der detektierten 4,2-fachen anti-*ABCB1*-shRNA Menge nach tkRNAi-TRIP anti-*ABCB1* Behandlung, stellt dies, wie erwartet, jeweils eine deutliche Steigerung dar, die auf die Optimierungen der tkRNAi-pMBV43 Variante zurückzuführen ist. Die höhere Menge detektierter anti-*ABCB1*-shRNAs in der Zelllinie EPG85-257RDB als in der Zelllinie MaTu/ADR, jeweils nach tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCB1* Applikation, ist vermutlich auf Zelllinien-spezifische Unterschiede zurückzuführen. Die Transfektanten EPG85-257RDB/anti-*ABCB1*-shRNA (Stege *et al.*, 2004) und MaTu/ADR/anti-*ABCB1*-shRNA (Stein *et al.* 2008) zeigten eine 182,7-fache bzw. 90,3-fache anti-*ABCB1*-shRNA Expression, was jeweils deutlich höher ist, als die Werte der EPG85-257RDB bzw. MaTu/ADR Zellen nach tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCB1* Behandlung. Dies lässt sich auf die stabile Expression der RNAi Effektoren in beiden Transfektanten zurückführen. Für die Etablierung der Transfektanten wurde jeweils das Plasmid psiRNA genutzt. Dessen anti-*ABCB1*-shRNA Expressionskassette steht unter Kontrolle eines RNA Polymerase III spezifischen H1-RNA Promoters, weshalb die anti-*ABCB1*-shRNA Expression in Mammaliazellen möglich ist. Aufgrund der andauernden RNAi Effektoren Expression, können, über die Zeit gesehen, größere Quantitäten der anti-*ABCB1*-shRNAs im Karzinomzellzytoplasma akkumuliert werden. Diese Annahme wird durch die Referenzstudie Stein *et al.* (2008) unterstützt, da, nach Jet-Injektion des anti-*ABCB1*-shRNA exprimierenden Plasmids psiRNA/MDR-C, täglich steigende anti-*ABCB1*-shRNA Quantitäten im MaTu/ADR Karzinomzellzytoplasma detektiert wurden. 72 h nach Jet-Injektion lag die anti-*ABCB1*-shRNA Expression zwischen dem 25 - 50-fachen Wert (genauer Wert nicht angegeben) NaCl behandelte Kontrollzellen. Es ist anzunehmen, dass auch in dieser Studie, längere Zeit nach Jet-Injektion, noch höhere anti-*ABCB1*-shRNA Expressionen, wie in der vorliegenden Arbeit, hätten verzeichnet werden können, wären entsprechende Analysen vorgenommen worden. Im Gegensatz hierzu, vermindert sich die Quantität der tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCB1* übermittelten anti-*ABCB1*-shRNAs ab dem Zeitpunkt der bakteriellen Lyse Nuklease bedingt. Zudem steht die anti-*ABCB1*-shRNA Expressionskassette von pMBV43 unter Kontrolle eines Bakteriophagen T7 Promoters, weshalb die Expression der anti-*ABCB1*-shRNAs im Karzinomzellplasma mangels T7 Polymerase nicht möglich ist.

Eine signifikante *ABCB1* mRNA Repression in Folge der tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCB1* Behandlung trat bereits nach 24 h, statt, wie nach tkRNAi-TRIP anti-*ABCB1* Behandlung, erst nach 48 h, in den EPG85-257RDB Zellen ein. Dies ist sehr wahrscheinlich auf die wesentlich höhere Quantität bakteriell übermittelter anti-*ABCB1*-shRNAs der tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCB1* Variante zurückzuführen. Die maximale *ABCB1* mRNA Repression, in Folge der tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCB1* Behandlung, trat, wie bei der tkRNAi-TRIP anti-*ABCB1* Variante, nach 72 h ein, wobei eine effizientere *ABCB1* mRNA Inhibition (auf 27 %) als nach tkRNAi-TRIP anti-*ABCB1* Behandlung (38,3 %) festzustellen war.

Anders als bei EPG85-257RDB Zellen, setzte nach tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCB1* Behandlung der MaTu/ADR Zellen eine unerwartete *ABCB1* mRNA Hochregulation ein, die nach 72 h mit 291,6 % ihr Maximum erreichte. Anschließend nahm die Stärke der *ABCB1* mRNA Expression wieder ab, bis 168 h post Infektion der Zeitpunkt der stärksten *ABCB1* mRNA Repression erfolgte (41,6 %). In Stein *et al.* (2008) wurde durch Einsatz von anti-*ABCB1*-siRNAs (Zielsequenzen MDR-A und MDR-B) in MaTu/ADR eine *ABCB1* mRNA Repression 24 h - 72 h nach Transfektion beobachtet. Weiterhin führte die Jet-Injektion von anti-*ABCB1*-shRNA exprimierenden Vektoren (MDR-C, gleiche Zielsequenz, wie in der vorliegenden Arbeit) in subkutan transplantierten MaTu/ADR Zellen im Mausmodell bereits 24 h nach Jet-Injektion zu einer *ABCB1* mRNA Reduktion, ohne eine vorherige Hochregulation. Das Ergebnis der zusätzlichen *ABCB1* mRNA Quantifizierung am Tag der stärksten Hochregulation der vorliegenden Arbeit deutet dennoch auf einen anti-*ABCB1*-shRNA bedingten Effekt hin. Sowohl die tkRNAi-TRIP anti-*ABCB1* als auch die tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCB1* Behandlung bewirkten in der Zelllinie MaTu/ADR eine starke, hoch signifikante ($p < 0,001$) *ABCB1* mRNA Hochregulation. Neuere Studien zeigen, dass siRNAs auch als sa(*small activating*)RNAs eine RNA Aktivierung (RNAa) bewirken können, indem sie anhand ihrer Sequenzhomologie zu regulatorischen Sequenzen der Zielgene und der Interaktion mit unterschiedlichen regulatorischen Proteinen, statt zu einer Repression, zu einer Überexpression führen (Li *et al.*, 2006; Place *et al.*, 2010; Yue *et al.*, 2010; Portnoy *et al.*, 2011). Das Phänomen der saRNA bedingten Aktivierung wurde bereits bei der Hochregulation verschiedener Gene beobachtet (Li *et al.*, 2006; Janowski *et al.*, 2007; Yue *et al.*, 2010). Erstaunlich ist, dass konträre Ergebnisse bei der Regulation von *PR* (*Progesterone Receptor*) in verschiedenen Zelllinien verzeichnet wurden. Lag eine konstitutiv niedrige basale *PR* Expression vor, bewirkten die, in dieser Studie der Promotersequenz homologen

und als *ag(antigene)*RNAs bezeichneten, RNA Duplexe eine Genaktivierung, während bei einer konstitutiv hohen basalen Genexpression eine Geninhibition einsetzte (Yue *et al.*, 2010). Untersuchungen zur Aufklärung der molekularen Mechanismen der RNAa sind derzeit Gegenstand unterschiedlicher Forschungsarbeiten. Unter der Annahme, anti-*ABCB1*-shRNAs, bzw. nach Dicerprozessierung –siRNAs, seien Ursache für die in der vorliegenden Arbeit beobachtete *ABCB1* mRNA Hochregulation in MaTu/ADR Zellen, lässt sich der stärkere Effekt nach tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCB1* Behandlung durch die festgestellte, deutlich erhöhte anti-*ABCB1*-shRNA Expression der modifizierten Variante im Vergleich zu der tkRNAi-TRIP anti-*ABCB1* Variante erklären. Gegen diese Vermutung spricht, dass auch die zur Kontrolle mit *E. coli* BL21(DE3) + TRIP anti-*GFP* infizierten MaTu/ADR Zellen eine signifikante Hochregulation aufwiesen. Der beobachtete Effekt der Kontrolle ist jedoch vergleichsweise gering und weniger signifikant ($p < 0,05$) im Vergleich zu denen beider tkRNAi Varianten. Da keine der weiteren Kontrollbehandlungen eine *ABCB1* mRNA Hochregulation bewirkten, kann entweder von versuchsbedingten Schwankungen oder von einer anti-*GFP*-shRNA unspezifischen *ABCB1* mRNA Hochregulation ausgegangen werden. Wiederholungen des Versuchs unter Einbezug weiterer shRNA-Zielsequenzen, die sich nicht gegen *ABCB1* mRNA richten, könnten Aufschluss über unspezifische shRNA Effekte geben. Von einer zuerst angenommenen, immunologischen Reaktion, in Folge der bakteriellen Belastung, kann weitgehend abgesehen werden, da weder die rein bakteriellen Behandlungen, noch die *E. coli* ceq221 + pMBV43 anti-*ABCC2* Behandlung eine Hochregulation der *ABCB1* mRNA Expression bewirkten. Aufgrund der abweichenden Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit den Ergebnissen von Stein *et al.* (2008) unter Verwendung der gleichen *ABCB1* Zielsequenz in der gleichen Zelllinie, ist eine RNAa bedingte Hochregulation als kritisch zu beurteilen. Jedoch zeigt die Entdeckung der RNAa auf, dass die molekularen Mechanismen der Genregulation bis heute nicht vollständig aufgeklärt sind. Die Gründe der in der vorliegenden Arbeit bis auf 291,6 % angestiegenen *ABCB1* mRNA Expression können im Rahmen dieser Arbeit nicht mit Sicherheit bestimmt werden. Dennoch bietet das Phänomen eine Grundlage für künftige Forschungsarbeiten. Eine Übertragung der tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCB1* auf weitere MDR Modelle könnte beispielsweise Aufschluss darüber geben, ob die aufgetretene Hochregulation auch in weiteren Zelllinien erfolgt.

Den anti-*ABCB1*-shRNA Nachweisen, sowie den zeitkinetischen Untersuchungen der *ABCB1* mRNA Expression und der jeweils festgestellten inhibitorischen Wirkung der tkRNAi-pMBV43

anti-*ABCB1* auf *ABCB1* entsprechend, wurden verminderte *ABCB1* Proteinexpressionen der EPG85-257RDB und MaTu/ADR Zellen nach tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCB1* Behandlung festgestellt. Die Transfektanten EPG85-257RDB/anti-*ABCB1*-shRNA und MaTu/ADR/anti-*ABCB1*-shRNA zeigten keine detektierbare *ABCB1* Proteinexpression, also eine noch deutlichere *ABCB1* Inhibition, was anhand der wesentlich höheren Quantität der detektierten anti-*ABCB1*-shRNAs im jeweiligen Karzinomzellzytoplasma erklärt werden kann.

Ein direkter Vergleich der *ABCB1* Proteinexpression zwischen den tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCB1* und den tkRNAi-TRIP anti-*ABCB1* behandelten EPG85-257RDB Zellen ist kritisch, da hierzu eine Western Blot Analyse mit beiden Proben gleichzeitig hätte durchgeführt werden müssen. Aufgrund versuchsbedingter Unterschiede, wie leicht abweichender Filmbelichtungszeiten und natürlicher biologischer Schwankungen der *ABCB1* Proteinexpression in den MDR Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten, können keine vergleichenden Aussagen hinsichtlich der Intensitäten der Proteinexpressionen anhand beider Western Blot Analysen getroffen werden. Von einer Wiederholung der Experimente für eine gemeinsame Western Blot Analyse wurde jedoch abgesehen, da sich die Effektivitäten beider tkRNAi Varianten vor allem in den Ergebnissen der funktionellen Analysen, insbesondere in Form der MDR Reversion, bezogen auf die jeweiligen unbehandelten MDR Zellen (100 %), widerspiegeln. Die Berechnung der MDR Reversion ermöglicht anhand der Relativierung einen direkten Vergleich beider tkRNAi Varianten.

Wie erwartet, bewirkte die starke Inhibition der *ABCB1* Proteinexpression, nach tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCB1* Behandlung, in den EPG85-257RDB Zellen eine deutliche Steigerung der Daunorubicinakkumulation und einhergehend eine starke MDR Reversion um 88,5 %, was einer Effizienzsteigerung von fast 30 % im Vergleich zu tkRNAi-TRIP anti-*ABCB1* (59,9 % MDR Reversion) entspricht. Trotz der nur gering verstärkten Daunorubicinakkumulation der stabilen Transfektante EPG85-257RDB/anti-*ABCB1*-shRNA von 94,4 %, im Vergleich zu den tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCB1* behandelten MDR Zellen (93,1 %), zeigte die Transfektante eine vollständige Reversion des MDR Phänotyps. Obwohl die Zelllinie EPG85-257RDB/anti-*ABCB1*-shRNA anhand der Transfektion der Zelllinie EPG85-257RDB mit einem anti-*ABCB1*-shRNA exprimierenden Plasmid generiert wurde, können sich mutationsbedingt weitere Unterschiede zwischen beiden Zelllinien über die Zeit manifestiert haben. Annähernd gleiche zytoplasmatische Zytostatikakonzentrationen können dementsprechend, z.B. durch unterschiedliche

zelluläre Medikamentenmetabolisierungen, zu verschiedenen stark ausgeprägten MDR Reversionen führen. Im Vergleich zu zwei weiteren RNAi Studien, mit dem Ziel der MDR Reversion in der gleichen Zelllinie (EPG85-257RDB), weist die tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCB1* eine um über 30 % (Nieth *et al.*, 2003, Transfektion von anti-*ABCB1*-siRNAs, 58 % MDR Reversion) bzw. um 18,5 % (Kaszubiak *et al.*, 2007, adenoviral übermittelte anti-*ABCB1*-shRNAs, 70 %ige MDR Reversion) effektivere MDR Reversion auf. Während Nieth *et al.* (2003) die *ABCB1* Zielsequenz MDR-B für das Design der anti-*ABCB1*-siRNAs verwendeten, weshalb der direkte Vergleich der Effektivitäten bezüglich der MDR Reversion als kritisch einzuordnen ist, wurde bei der adenoviralen Übermittlung der anti-*ABCB1*-shRNAs das gleiche Design, das in dieser Arbeit verwendet wurde, gewählt (Kaszubiak *et al.*, 2007). In tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCC2* behandelten EPG85-257RDB Zellen trat erstaunlicherweise eine signifikante Resistenzsteigerung auf. Diese könnte entweder auf biologische Schwankungen zurückzuführen sein oder darauf hindeuten, dass die anti-*ABCC2*-shRNAs induktorischen Einfluss auf Resistenz verursachende Gene nehmen. Ersteres wird durch die ausbleibende Abweichung dieser Kontrolle hinsichtlich der Daunorubicinakkumulation zu unbehandelten MDR Zellen unterstützt, da eine gesteigerte Resistenz theoretisch mit einer signifikant verminderten Akkumulation verbunden sein müsste. Die *ABCB1* mRNA dieser Probe wies am Tag der stärksten tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCB1* Regulation keine signifikante Expressionsänderung zu unbehandelten MDR Zellen auf, weshalb kein direkter Zusammenhang zwischen der Resistenzsteigerung und *ABCB1* erkennbar ist. Eine Klärung des Phänomens kann im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht mit Sicherheit erfolgen.

Obwohl die *ABCB1* mRNA Expression der MaTu/ADR Zellen zum Zeitpunkt der stärksten Inhibition nach tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCB1* Behandlung höher vorlag als in der Transfektante MaTu/ADR/anti-*ABCB1*-shRNA, wiesen die tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCB1* behandelten MDR Zellen eine deutlich stärkere Doxorubicinakkumulation von 76,2 % im Vergleich zu den 18,5 % der Transfektante auf. Entgegen den Erwartungen, zeigte die Transfektante dennoch eine 87,2 %ige MDR Reversion, was sich mit dem Wert der Referenzstudie, in der die Zelllinie MaTu/ADR/anti-*ABCB1*-shRNA etabliert wurde, deckt (Stein *et al.*, 2008). Dies deutet darauf hin, dass eine wenig erhöhte zytoplasmatische Doxorubicinakkumulation bereits genügt, um eine starke Reversion des MDR Phänotyps in der Transfektante zu erreichen, wobei in Stein *et al.* (2008) kein Anthrazyklinakkumulationsassay durchgeführt wurde. Ursache für die geringe

Doxorubicinakkumulation der Transfektante könnten zusätzliche Resistenzmechanismen der Zelllinie sein, die sich, wie bereits für die Transfektante EPG85-257RDB/anti-*ABCB1*-shRNA diskutiert wurde, mutationsbedingt eingestellt haben könnten. Aufgrund teilweise überschneidender Substratspezifitäten von *ABCB1* und *ABCG2* ist die Überexpression von *ABCG2* im Fall der Zelllinie MaTu/ADR/anti-*ABCB1*-shRNA denkbar, da diese unter Nutzung der Doxorubicin-selektierten MDR Zelllinie MaTu/ADR generiert wurde. Eine *ABCG2* Überexpression kann als Folge der Doxorubicinselektion auftreten (Chen *et al.*, 1990) und einen *ABCG2*-bedingten Doxorubicinefflux bewirken (Wang *et al.*, 2003; Turner *et al.*, 2005). Möglich ist, dass die in der vorliegenden Arbeit verwendeten und die für die Etablierung der Transfektante verwendeten MaTu/ADR Zellen aus verschiedenen weggefrorenen Chargen stammen, weshalb in den für die Transfektion in Stein *et al.* (2008) gewählten MaTu/ADR Zellen eine *ABCG2* Überexpression vorgelegen haben könnte. In künftigen Untersuchungen sollte die Transfektante hinsichtlich einer möglicherweise vorliegenden *ABCG2* Überexpression untersucht werden, um das Phänomen der verminderten Doxorubicinakkumulation, trotz verminderter *ABCB1* Expression, zu klären. Die tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCB1* Behandlung zeigte mit 89,5 % Reversion des MDR Phänotyps behandelter MaTu/ADR Zellen einen vergleichbaren Effekt zur stabilen Transfektante. Dieses Ergebnis gibt Anlass zu der Annahme, dass in *in vivo* Studien, wie bei der Transfektante (Stein *et al.*, 2008), durch Einsatz der tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCB1* eine starke bis vollständige MDR Reversion erzielt werden könnte.

Vorteil der tkRNAi ist der transiente Effekt der Anwendung. Ein stabiler Effekt, wie bei den Transfektanten EPG85-257RDB/anti-*ABCB1*-shRNA und MaTu/ADR/anti-*ABCB1*-shRNA, ist für die potentielle therapeutische Anwendung nicht unbedingt von Vorteil, da *ABCB1* eine physiologisch wichtige, detoxifizierende Rolle einnimmt und eine systemische Inhibition des ABC-Transporter gravierende gesundheitliche Folgen haben könnte. Eine stabile Suppression sollte lediglich lokal, wie z.B. in Stein *et al.* (2008) durch Jet-Injektion, in entsprechenden Geweben erfolgen. Dennoch muss das Erreichen einer kompletten MDR Reversion, wie sie in Stege *et al.* (2004) und Stein *et al.* (2008) erreicht wurde, auch das Ziel der tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCB1* sein.

Zusammenfassend kann bezüglich der *ABCB1* Inhibition und der MDR Reversion eine deutliche Verbesserung der tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCB1* Variante im Vergleich zur tkRNAi-TRIP anti-*ABCB1* Variante im gleichen MDR Zellkulturmodell (EPG85-257RDB) festgestellt werden.

Weiterhin wurde die Übertragbarkeit der tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCB1* auf ein weiteres klassisches MDR Karzinomzellkulturmodell (MaTu/ADR) gezeigt, wobei die genauen Ursachen der tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCB1* bedingt erfolgten *ABCB1* Überexpression vor der einsetzenden *ABCB1* Inhibition in künftigen Untersuchungen geklärt werden sollten. Die aufgestellten Hypothesen 2 und 3 (Kap. 1.3) können angenommen werden.

4.3 Reversion des atypischen MDR Phänotyps durch tkRNAi-pMBV43 anti-ABCG2

Neben *ABCB1* sollte die Anwendbarkeit der tkRNAi-pMBV43 Variante im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch für die posttranskriptionelle Regulation des, mit der atypischen MDR assoziierten, ABC-Transportergens *ABCG2* untersucht werden. Hierzu wurde eine gut etablierte, *ABCG2* überexprimierende, atypische MDR Zelllinie (EPG85-257RNOV) genutzt.

Anders als bei den vorherigen Anwendungen der tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCB1* (3.2), konnte, nach festgestellter Invasion und Lyse von *E. coli* ceq221 + pMBV43 anti-*ABCG2*, 24 h nach Behandlung zwar eine erhöhte, jedoch nicht signifikante anti-*ABCG2*-shRNA Quantität (27-fach, SD = 26-fach) im Zytoplasma der atypischen MDR Zellen detektiert werden. Die hohe Standardabweichung der quantifizierten anti-*ABCG2*-shRNAs ist vermutlich auf biologische Schwankungen zurückzuführen. Möglich ist, dass die bakteriell exprimierten anti-*ABCG2*-shRNAs, im Vergleich zu anti-*ABCB1*-shRNAs, eine geringere Stabilität oder tertiäre Molekülstrukturen aufweisen, die zu einer unregelmäßigeren Quantität biologisch aktiver anti-*ABCG2*-siRNAs nach Dicerprozessoren führen. Dennoch konnte bereits nach 24 h eine signifikant reduzierte *ABCG2* mRNA Expression der tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCG2* behandelten EPG85-257RNOV Zellen festgestellt werden, was für die Effizienz der eingesetzten RNAi Effektoren spricht. 48 h post Infektion stellte sich der maximal inhibitorische Effekt der bakteriell übermittelten RNAi Effektoren ein, der einer deutlich verminderten *ABCG2* mRNA Expression von 4,8 % entsprach.

Pribsch *et al.* (2006) stellten eine anti-*ABCG2*-siRNA inhibierende Wirkung auf die *ABCG2* Expression in EPG85-257RNOV 48 - 120 h nach Transfektion fest, wobei eine komplette Proteinrepression nach 96 h erfolgte. Um sicherzustellen, dass Effekte der tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCG2* Behandlung immunologisch feststellbar sind, wurden die Proteine zwei Tage nach dem Zeitpunkt der ermittelten maximalen *ABCG2* mRNA Inhibition isoliert, wonach die *ABCG2* Repression mittels Western Blot Analyse bestätigt wurde. Wie erwartet, konnte folgend, anhand der durchgeführten funktionellen Analysen, eine gesteigerte Mitoxantronakkumulation und eine verminderte Mitoxantronresistenz in den tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCG2* behandelten atypischen MDR Zellen vernommen werden. Basierend auf der stark verminderten *ABCG2* mRNA Expression, erneut gemessen am Tag der stärksten Regulation, von 5,7 % wurde jedoch eine noch stärkere Akkumulation als 45,8 % und eine deutlichere Reversion

der atypischen MDR als 53,5 % erwartet. Vermutlich bewirkt eine wenig erhöhte *ABCG2* Expression, im Vergleich zur parentalen Zelllinie, bereits ausreichend starke funktionelle Auswirkungen, so dass es, für eine vollständige Reversion der *ABCG2* bedingten atypischen MDR, einer kompletten Inhibition der Expression dieses ABC-Transporters bedarf. In Pribsch *et al.* (2006) wurde *ABCG2* in der Zelllinie EPG85-257RNOV ebenfalls mittels anti-*ABCG2*-shRNA exprimierender Vektoren stabil inhibiert. Durch die komplette *ABCG2* mRNA Repression, konnte eine der parentalen Zellen annähernd gleiche Mitoxantronakkumulation und die vollständige Reversion des atypischen MDR Phänotyps erreicht werden. Es kann davon ausgegangen werden, dass in Pribsch *et al.* (2006), aufgrund des stabil anti-*ABCG2*-shRNA exprimierenden Plasmids, eine höhere Quantität der RNAi Effektoren im Karzinomzellzytoplasma vorhanden war, weshalb eine deutlichere Inhibition der *ABCG2* Expression erfolgte, als in der vorliegenden Arbeit. Wie bereits diskutiert, ist von stabilen Ansätzen für die klinische Anwendung abzusehen, da *ABCG2*, wie *ABCB1*, eine physiologisch wichtige, detoxifizierende Rolle einnimmt. Dennoch sollte es auch für die tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCG2* das Ziel sein, langfristig zu einer vollständigen Reversion des atypischen MDR Phänotyps zu führen.

Die tkRNAi-pMBV43 lässt sich den Ergebnissen zu Folge, neben *ABCB1*, für die Regulation von *ABCG2* und für die partielle Reversion der atypischen MDR in einem atypischen MDR Zellkulturmodell anwenden, womit die Hypothese 4 (Kap. 1.3) unterstützt werden kann. Jedoch weist die tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCG2* Behandlung mit 53,5 % Reversion des atypischen MDR Phänotyps in der Zelllinie EPG85-257RNOV eine geringere Effizienz auf, als die tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCB1* Behandlung in den klassischen MDR Zelllinien EPG85-257RDB (88,5 % MDR Reversion) und MaTu/ADR (89,5 % MDR Reversion). In Studien, in denen gleiche RNAi Effektoren in verschiedenen Zelllinien zur Inhibition des gleichen Zielgens eingesetzt wurden, konnten unterschiedlich starke Effekte beobachtet werden. Beispielweise wurde in Nieth *et al.* (2003) eine über 30 %ige Differenz bezüglich der Reversion der klassischen MDR zwischen zwei verschiedenen Zelllinien, nach Verwendung der gleichen anti-*ABCB1*-siRNAs, festgestellt. Es wäre möglich, dass die tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCG2* in weiteren *ABCG2* bedingt atypischen MDR Zelllinien ebenfalls höhere Effizienzen aufweist, was künftig getestet werden sollte.

4.4 Schlussbetrachtung und Ausblick

Die tkRNAi Technologie, besonders die modifizierte Variante tkRNAi-pMBV43, erwies sich im Rahmen der vorliegenden Arbeit als vielversprechende Methode zur Reversion des klassischen MDR Phänotyps. Die erreichte MDR Reversion von bis zu 89,5 %, nach tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCB1* Behandlung, untermauert das Potential der Methode (Kapitel 3.2, 4.2). Die vergleichsweise geringere Reversion des atypischen MDR Phänotyps um 53,5 % weist Optimierungspotential auf, zeigt jedoch prinzipiell die Übertragbarkeit der tkRNAi-pMBV43 auf ein weiteres therapierelevantes Gen.

Der Einsatz von *E. coli* als Probiotikum wurde in einer Klinischen Studie, unter Berücksichtigung verträglicher Bakterienzahlen, bereits als sicher eingestuft (Rembacken *et al.*, 1999). Aufgrund des natürlichen Vorkommens von *E. coli* im Darm, scheint die Applikation der tkRNAi als besonders geeignet für Behandlungen intestinaler Erkrankungen. Xiang *et al.* (2006) beobachteten nach oraler Gabe anti-*CTNNB1*-shRNA exprimierender tkRNAi Bakterien bei Mäusen eine sequenzspezifische β 1-Catenin Repression im intestinalen Gewebe, bei gleichzeitig ausbleibenden epithelialen Schäden oder Ulzerationen. Basierend auf diesen Ergebnissen wird derzeit eine Klinische Studie Phase I initiiert, bei der die tkRNAi Technologie, ebenfalls oral appliziert, zur Behandlung der FAP (*Familial Adenomatous Polyposis*), die auf die Dysregulation von β 1-Catenin zurückgeht, eingesetzt werden soll (Burnett *et al.*, 2011). Ebenfalls denkbar ist auch ein oraler Einsatz der tkRNAi mit dem Ziel der MDR Reversion bei gastrointestinalen Tumoren. Problematisch bei dieser Form der Applikation ist jedoch, dass ein Großteil oral verabreichter therapeutischer Bakterien aufgrund der Magensäure nicht überlebensfähig ist und somit entsprechend weniger therapeutisch eingesetzte Bakterien zu dem Zielgewebe gelangen. Eine Steigerung der bakteriellen Überlebensrate nach oraler Einnahme könnte hypothetisch anhand einer temporären Magensäureneutralisation bewirkt werden. Bei der Behandlung von Kolonkarzinomen ist die bakterielle Applikation auch durch magensaftresistente Kapseln denkbar, womit ebenfalls eine höhere Anzahl therapeutischer Mikroorganismen lebend zum Zielgewebe vordringen könnte.

Trotz ausbleibender negativer Effekte nach intravenöser *in vivo* Applikation der tkRNAi in Mäusen (Xiang *et al.*, 2006), müssen die Auswirkungen einer systemischen, bakteriellen Behandlung am Menschen genau abgeklärt werden. Eine persistierende bakterielle Kontamina-

tion des Bluts kann zu einem Cytokinanstieg und zu einem septischen Schock führen, im schlimmsten Fall mit Todesfolge. Die *E. coli* bedingte Sepsis führt immer wieder zu Todesfällen, vor allem bei Neugeborenen (Dietzman *et al.*, 1974; Bizzarro *et al.*, 2008). Eine Phase I Studie, bei der Patienten *Salmonella typhimurium* systemisch verabreicht wurden, um anhand der bakteriellen Tumorkolonisation antimumorale Effekte zu erzielen, zeigte, dass die maximal tolerierte Bakteriendosis der in dieser Studie verwendeten Mikroorganismen 3×10^8 cfu (*colony forming units*) ist. Höhere Bakterienzahlen lösten bei den Probanden unter anderem Schwindelgefühl, Durchfall, Erbrechen, Anemie, Hypophosphatämie und Thrombozytopenie aus (Toso *et al.*, 2002). Für die therapeutische systemische Applikation der, bei der tkRNAi eingesetzten, *E. coli*, ist, aufgrund der mikrobiellen Belastung, eine sorgfältige Austestung der maximal verträglichen Dosis nötig, die von der maximal verträglichen Dosis von *S. typhimurium* abweichen kann. Neben einem Sepsisrisiko stellt weiterhin die systemische Suppression eines Zielgens, auch wenn diese nur transient besteht, ein entscheidendes Gesundheitsrisiko dar. Ein hypothetischer Forschungsansatz, der dieses Problem beheben könnte, ist die Identifikation von gewebespezifischen zellulären Rezeptoren und die entsprechende Modifikation der eingesetzten Bakterien. Die Rezeptor-spezifische Bakterienaufnahme der Zellen könnte unerwünschten Nebenwirkungen in weiteren Geweben vorbeugen.

Die intraperitoneale Verabreichung stellt eine weitere denkbare Form der tkRNAi Applikation dar, die beispielsweise für die Behandlung von Ovarialkarzinomen vorstellbar ist.

Vor einem klinischen Einsatz müsste die jeweilige Zielgen-spezifische siRNA Sequenz in jedem Fall hinsichtlich potentieller *off-target* Effekte oder Zielgenhochregulationen, wie sie in der vorliegenden Arbeit im MDR Zellkulturmodell MaTu/ADR auftraten, ausgeschlossen werden.

Weiterführende Untersuchungen, die an die Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit anknüpfen, sollten vor allem *in vivo* Mausversuche zur Untersuchung des tkRNAi Potentials zur Reversion der klassischen MDR einschließen. Die bisherigen Ergebnisse sind vielversprechend und geben Anlass zu der Annahme, dass multidrugresistente Tumore in klinischen Erprobungen, durch Einsatz der tkRNAi, resensitiviert und einhergehend chemotherapeutisch behandelbar werden.

Weiterhin sollte eine Ausweitung der *in vitro* Experimente auf weitere *ABCG2* assoziierte, atypische MDR Zelllinien stattfinden, um festzustellen, ob die verhältnismäßig geringere Reversion des atypischen MDR Phänotyps Zelllinien spezifisch ist.

Zusätzliche Untersuchungen des Potentials der tkRNAi hinsichtlich der Inhibition weiterer klinisch relevanter, mit der atypischen MDR assoziierter ABC-Transporter, wie beispielsweise *ABCC2*, sollten ebenfalls in Betracht gezogen werden.

5 Zusammenfassung

RNA Interferenz (RNAi) ist ein hoch effektiver, zellulärer Mechanismus eukaryotischer Organismen zur spezifischen Inhibition der Genexpression. Der therapeutische Einsatz des posttranskriptionellen Phänomens zur Behebung genetischer Dysregulationen, scheidet bislang vor allem an der Identifizierung effizienter Methoden zur Übermittlung (*Delivery*) der RNAi initiierenden Nukleinsäuren (RNAi Effektoren) in Zielzellen. Eine vielversprechende *Delivery*-Methode stellt die von Xiang *et al.* (2006) entwickelte *transkingdom* RNAi (tkRNAi) dar. Das hierbei verwendete tkRNAi Plasmid (TRIP), das Invasin (*inv*), Listeriolysin O (*hlyA*) und eine *sh(short hairpin)*RNA-Expressionskassette nach Wahl kodiert, ermöglicht nicht-pathogenen *E. coli* in Mammaliazellen einzudringen und die intrabakteriell exprimierten shRNAs, nach bakterieller Lyse, in das Zielzellzytoplasma zu übermitteln.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das therapeutische Potential der tkRNAi-TRIP Variante und der modifizierten Variante tkRNAi-pMBV43 am Beispiel der klinisch relevanten *ABCB1* assoziierten klassischen und der *ABCG2* assoziierten atypischen Multidrugresistenz (MDR) untersucht, an denen chemotherapeutische Krebstherapien häufig scheitern. Als Modelle dienten gut etablierte humane MDR Zelllinien. Invasion und Lyse der TRIP bzw. pMBV43 enthaltenden Bakterien, sowie die erfolgreiche Übermittlung der entsprechenden shRNAs in die Zielzellen konnten nach Infektion in allen Zelllinien bestätigt werden. Die tkRNAi-TRIP anti-*ABCB1* bewirkte eine spezifische *ABCB1* Repression und eine partielle Reversion des klassischen MDR Phänotyps um 59,9 %. Im gleichen MDR Modell (EPG85-257RDB) wies die tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCB1* eine 30 % stärkere MDR Reversion von 88,5 % auf, die in einem weiteren MDR Modell (MaTu/ADR) mit 89,5 % ähnlich deutlich ausfiel, jedoch zeitlich stark verzögert auftrat. Weiterhin resultierte die tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCG2* Behandlung der *ABCG2* überexprimierenden, atypischen MDR Zelllinie (EPG85-257RNOV) in einer deutlich reduzierten *ABCG2* Expression und einer partiellen Reversion der atypischen MDR um 53,5 %. Die *in vitro* Ergebnisse verdeutlichen die Effektivität und die Effizienz der tkRNAi, insbesondere der tkRNAi-pMBV43 Variante, bezüglich des RNAi Effektoren *Deliverys*. Einhergehend stellt das Potential der tkRNAi eine vielversprechende Chance dar, multidrugresistente Tumorzellen in *in vivo* Modellen und in letzter Konsequenz in künftigen klinischen Studien zu resensitivieren und somit eine chemotherapeutische Behandlung zu ermöglichen.

6 Summary

RNA interference (RNAi) is a highly effective cellular mechanism of eucaryotic organisms that specifically inhibits gene expression. A major obstacle for the therapeutic application of this post transcriptional phenomenon, with the aim to overcome genetic dysregulations, is the absence of efficient methods for delivering the RNAi initiating nucleic acids (RNAi effectors) into target cells. The *transkingdom* RNAi (tkRNAi) technology, developed by Xiang *et al.* (2006), represents a promising approach to overcome this obstacle. The tkRNAi plasmid (TRIP), encoding invasins (*inv*), listeriolysin O (*hlyA*), and a sh(*short hairpin*)RNA expression cassette, allows non-pathogenic *E. coli* to enter mammalian cells. The release of the intracellularly expressed shRNAs of interest into the target cells' cytoplasm takes place after bacterial lysis.

In the course of the presented study the tkRNAi variant tkRNAi-TRIP and the modified variant tkRNAi-pMBV43 were tested with respect to their therapeutic potential in the context of the clinically relevant classical *ABCB1*-mediated, and atypical *ABCG2*-mediated depending multi-drug resistance (MDR), which often cause failure of chemotherapy. Different classical and atypical MDR cell lines served as models. Invasion and lysis of bacteria containing TRIP or pMBV43 respectively as well as the successful delivery of the according shRNAs into the target cells had been observed in each cell line after infection. TkRNAi-TRIP anti-*ABCB1* caused a specific repression of *ABCB1* and a partial reversion of the classical MDR phenotype by 59.9 %. In the same MDR cell line (EPG85-257RDB) tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCB1* induced a 30 % stronger reversion of the MDR phenotype (88.5 %). The efficacy of the tkRNAi-pMBV43 variant was confirmed in a second classical MDR cell line (MaTu/ADR), which showed an equally strong, although in comparison to EPG85-257RDB cells largely delayed, reversion of the classical MDR phenotype by 89.5 %. Furthermore treatment of an *ABCG2* overexpressing atypical MDR cell line with tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCG2* resulted in a significantly reduced *ABCG2* expression and a partial reversion of the atypical MDR by 53.5 %.

These results illustrate that the tkRNAi technology, especially the tkRNAi-pMBV43 variant, is highly effective in terms of RNAi effector delivery. Hence tkRNAi represents a powerful opportunity to re-sensitize MDR tumor cells and to eliminate them by simultaneous chemotherapeutic treatment *in vivo*, and consequently also in clinical trials.

Literaturverzeichnis

- Ahmed-Belkacem, A., Pozza, A., Muñoz-Martínez, F., Bates, SE., Castanys, S., Gamarro, F., Di Pietro, A., Pérez-Victoria, JM. (2005). Flavonoid structure-activity studies identify 6-prenylchrysin and tectochrysin as potent and specific inhibitors of breast cancer resistance protein ABCG2. *Cancer Res.* 65, 4852—4860.
- Alemán, C., Annereau, JP., Liang, XJ., Cardarelli, CO., Taylor, B., Yin, JJ., Aszalos, A., Gottesman, MM. (2003). P-Glycoprotein, expressed in multidrug resistant cells, is not responsible for alterations in membrane fluidity or membrane potential. *Cancer Res.* 63, 3084—3091.
- Allen, JD., Brinkhuis, RF., Wijnholds, J., Schinkel, AH. (1999). The mouse Bcrp1/Mxr/Abcp gene: amplification and overexpression in cell lines selected for resistance to topotecan, mitoxantrone, or doxorubicin. *Cancer Res.* 59, 4237—4241.
- Allikmets, R., Schriml, LM., Hutchinson, A., Romano-Spica, V., Dean, M. (1998). A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance. *Cancer Res.* 58, 5337—5339.
- Ando, T., Kusuhara, H., Merino, G., Alvarez, AI., Schinkel, AH., Sugiyama, Y. (2007). Involvement of breast cancer resistance protein (ABCG2) in the biliary excretion mechanism of fluoroquinolones. *Drug Metab. Dispos.* 35, 1873—1879.
- Babcock, AM., Standing, D., Bullshields, K., Schwartz, E., Paden, CM., Poulsen, DJ. (2005). *In vivo* inhibition of hippocampal Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II by RNA interference. *Mol. Ther.* 11, 899—905.
- Bain, JR., Schisler, JC., Takeuchi, K., Newgard, CB., Becker, TC. (2004). An adenovirus vector for efficient RNA interference-mediated suppression of target genes in insulinoma cells and pancreatic islets of langerhans. *Diabetes* 53, 2190—2194.
- Bartel, DP. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281—297.
- Baumert, C., Hilgeroth, A. (2009). Recent advances in the development of P-gp inhibitors. *Anticancer Agents Med. Chem.* 9, 415—436.

- Bernstein, E., Caudy, AA., Hammond, SM., Hannon, GJ. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409, 363—366.
- Biedler, JL., Riehm, H. (1970). Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells *in vitro*: cross-resistance, radioautographic, and cytogenetic studies. *Cancer Res.* 30, 1174—1184.
- Birnboim, HC., Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513—1523.
- Bizzarro, MJ., Dembry, LM., Baltimore, RS., Gallagher, PG. (2008). Changing patterns in neonatal Escherichia coli sepsis and ampicillin resistance in the era of intrapartum antibiotic prophylaxis. *Pediatrics* 121, 689—696.
- Borowski, E., Bontemps-Gracz, MM., Piwkowska, A. (2005). Strategies for overcoming ABC-transporters-mediated multidrug resistance (MDR) of tumor cells. *Acta Biochim. Pol.* 52, 609—627.
- Brummelkamp, TR., Bernards, R., Agami, R. (2002). A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296, 550—553.
- Burnett, JC., Rossi, JJ., Tiemann, K. (2011). Current progress of siRNA/shRNA therapeutics in clinical trials. *Biotechnol. J.* 6, 1130—1146.
- Busch W. (1968). Verhandlungen Ärztlicher Gesellschaften. *Berl. Klin. Wochenschr.* 5, 137—138.
- Buttaro, C., Fruehauf, J. (2010). Engineered *E. coli* as vehicles for targeted therapeutics. *Curr. Gene Ther.* 10, 27—33.
- Calegari, F., Haubensak, W., Yang, D., Huttner, WB., Buchholz, F. (2002). Tissue-specific RNA interference in postimplantation mouse embryos with endoribonuclease-prepared short interfering RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 99, 14236—14240.
- Caplen, NJ., Parrish, S., Imani, F., Fire, A., Morgan, RA. (2001). Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 9742—9747.
- Carey, RW., Holland, JF., Whang, HY., Neter, E., Bryant, B. (1967). Clostridial oncolysis in man. *Eur. J. Cancer* 3, 37—46.

- Celius, T., Garberg, P., Lundgren, B. (2004). Stable suppression of MDR1 gene expression and function by RNAi in Caco-2 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 324, 365—371.
- Cerutti, L., Mian, N., Bateman, A. (2000). Domains in gene silencing and cell differentiation proteins: the novel PAZ domain and redefinition of the Piwi domain. *Trends Biochem. Sci.* 25, 481—482.
- Chaudhary, PM., Roninson, IB. (1993). Induction of multidrug resistance in human cells by transient exposure to different chemotherapeutic drugs. *J. Natl. Cancer Inst.* 85, 632—639.
- Chen, CJ., Chin, JE., Ueda, K., Clark, DP., Pastan, I., Gottesman, MM., Roninson, IB. (1986). Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrugresistant human cells. *Cell* 47, 381—389.
- Chen, YN., Mickley, LA., Schwartz, AM., Acton, EM., Hwang, JL., Fojo AT. (1990). Characterization of adriamycin-resistant human breast cancer cells which display overexpression of a novel resistance-related membrane protein. *J. Biol. Chem.*, 265, 10073—10080.
- Cheng, GM., To, KK. (2012). Adverse cell culture conditions mimicking the tumor microenvironment upregulate ABCG2 to mediate multidrug resistance and a more malignant phenotype. *ISRN Oncology*, doi: 10.5402/2012/ 746025. [Epub].
- Chiu, YL., Rana, TM. (2003). siRNA function in RNAi: A chemical modification analysis. *RNA* 9, 1034—1048.
- Choi, CH. (2005). ABC transporters as multidrug resistance mechanisms and the development of chemosensitizers for their reversal. *Cancer Cell Int.* 5, 1—13.
- Cisternino, S., Mercier, C., Bourasset, F., Roux, F., Scherrmann, JM. (2004). Expression, up-regulation, and transport activity of the multidrug-resistance protein *abcg2* at the mouse blood-brain barrier. *Cancer Res.* 64, 3296—3301.
- Cordon-Cardo, C., O'Brien, J.P., Posner, J.B. (1989). Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86, 695—698.

- Critchley, RJ., Jezzard, S., Radford, KJ., Goussard, S., Lemoine, NR., Grillot-Courvalin, C., Vassaux, G. (2004). Potential therapeutic applications of recombinant, invasive *E. coli*. *Gene Ther.* 11, 1224—1233.
- de Bruin, M., Miyake, K., Litman, T., Robey, R., Bates, SE. (1999). Reversal of resistance by GF120918 in cell lines expressing the ABC half-transporter, MXR. *Cancer Lett.* 146, 117—126.
- Dieckmann-Schuppert, A., Schnittler, HJ. (1997). A simple assay for quantification of protein in tissue sections, cell cultures, and cell homogenates, and of protein immobilized on solid surfaces. *Cell Tissue Res.* 288, 119—126.
- Dietel, M., Arps, H., Lage, H., Niendorf, A. (1990). Membrane vesicle formation due to acquired mitoxantrone resistance in human gastric carcinoma cell line EPG85-257. *Cancer Res.* 50, 6100—6106.
- Dietzman, DE., Fischer, GW., Schoenknecht, FD. (1974). Neonatal *Escherichia coli* septicemia—bacterial counts in blood. *J. Pediatr.* 85, 128—130.
- Dittgen, T., Nimmerjahn, A., Komai, S., Licznarski, P., Waters, J., Margrie, TW., Helmchen, F., Denk, W., Brecht, M., Osten, P. (2004). Lentivirus-based genetic manipulations of cortical neurons and their optical and electrophysiological monitoring *in vivo*. *PNAS* 101, 18206—18211.
- Dold, U., Hermanek, P., Hoffken, K., Sack, H. [Hrsg.](1993). Allgemeine Prinzipien der Tumortherapie. In: Praktische Tumortherapie. Die Behandlung maligner Organtumoren und Systemerkrankungen. S.49—108, *Thieme-Verlag*, Stuttgart.
- Donzé, O., Picard, D. (2002). RNA interference in mammalian cells using siRNAs synthesized with T7 RNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* 30, e46.
- Doyle, LA., Ross, DD. (2003). Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2). *Oncogene* 22, 7340—7358.
- Doyle, LA., Yang, W., Abruzzo, LV., Krogmann, T., Gao, Y., Rishi, AK., Ross, DD. (1998). A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 15665—15670.

- Duan, Z., Brakora, KA., Seiden, MV. (2004). Inhibition of ABCB1 (MDR1) and ABCB4 (MDR3) expression by small interfering RNA and reversal of paclitaxal resistance in human ovarian cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* 3, 833—838.
- Dykxhoorn, DM., Novina, CD., Sharp, PA. (2003). Killing the messenger: short rnas that silence gene expression. *Nature Rev. Mol.Cell Biol.* 4, 457—467.
- Elbashir, SM., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., Tuschl, T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494—498.
- Ee, PL., He, X., Ross, DD., Beck WT. (2004). Modulation of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) gene expression using RNA interference. *Mol. Cancer Ther.* 3, 1577—1583.
- Fetsch, P., Abati, A., Litman, T., Morisaki, K., Honjo, Y., Mittal, K., Bates, S. (2006). Localization of the ABCG2 mitoxantrone resistance-associated protein in normal tissues. *Cancer Lett.* 235, 84—92.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, MK., Kostas, SA., Driver, SE., Mello, CC. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806—811.
- Glover, DJ., Lipps, HJ., Jans, DA. (2005). Towards safe, non-viral therapeutic gene expression in humans. *Nat. Rev. Genet.* 6, 299—310.
- Gottesman, MM., Fojo, T., Bates, SE. (2002). Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat. Rev. Cancer* 2, 48—58.
- Gottesman, MM., Ludwig, J., Xia, D., Szakács, G. (2006). Defeating drug resistance in cancer. *Disco. Med.* 6, 18—21.
- Griffith, AJ., Wessler, SR., Lewontin, RC., Gelbart, WM., Suzuki, DT., Miller, JH. [Hrsg.](2005). Genetic regulation of cell number: Normal and cancer cells. In: Introduction to genetic analysis, 8. Aufl., S. 561—569. *Freeman and Company*, New York.
- Grillot-Courvalin, C., Goussard, S., Huetz, F., Ojcius, DM., Courvalin, P. (1998). Functional gene transfer from intracellular bacteria to mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* 16, 862—866.

- Grunberg-Manago, M. (1999). Messenger RNA stability and its role in control of gene expression in bacteria and phages. *Annu. Rev. Genet.* 33, 193—227.
- Guo, S., Kemphues, K.J. (1995). *par-1*, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell* 81, 611—620.
- Gutmann, H., Hruz, P., Zimmermann, C., Beglinger, C., Drewe, J. (2005). Distribution of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) mRNA expression along the human GI tract. *Biochem. Pharmacol.* 70, 695—699.
- Hacein-Bey-Abina, S., Garrigue, A., Wang, GP. *et al.* (2008). Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J. Clin. Invest.* 118, 3132—3142.
- Hammond, SM., Caudy, AA., Hannon, GJ. (2001). Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nat. Rev. Genet.* 2, 115.
- Hausner, P., Venzon, DJ., Grogan, L., Kirsch, IR. (1999). The comparative growth assay. *Neoplasia* 1, 356—367.
- Hazlehurst, LA., Foley, NE., Gleason-Guzman, MC., Hacker, MP., Cress, AE., Greenberger, LW., De Jong, MC., Dalton, WS. (1999). Multiple mechanisms confer drug resistance to mitoxantrone in the human 8226 myeloma cell line. *Cancer Res.*, 59, 1021—1028.
- Holen, T., Amarzguioui, M., Wiiger, MT., Babaie, E., Prydz, H. (2002). Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger tissue factor. *Nucleic Acids Res.* 30, 1757—1766.
- Holm, PS., Scanlon, KJ., Dietel, M. (1994). Reversion of multidrug resistance in the P-glycoprotein-positive human pancreatic cell line (EPP85-181RDB) by introduction of a hammerhead ribozyme. *Br. J. Cancer.* 70, 239—243.
- Hui, RC., Francis, RE., Guest, SK., Costa, JR., Gomes, AR., Myatt, SS., Brosens, JJ., Lam, EW. (2008). Doxorubicin activates FOXO3a to induce the expression of multidrug resistance gene *ABCB1* (*MDR1*) in K562 leukemic cells. *Mol. Cancer Ther.* 7, 670—678.
- Hyde, SC., Emsley, P., Hartshorn, MJ., Mimmack, MM., Gileadi, U., Pearce, SR., Gallagher, MP., Gill, DR., Hubbard, RE., Higgins, CF. (1990). Structural model of ATP-binding

- proteins associated with cystic fibrosis, multidrugresistance and bacterial transport. *Nature* 346, 362—365.
- Imai, Y., Ishikawa, E., Asada, S., Sugimoto, Y. (2005). Estrogen-mediated post transcriptional down-regulation of breast cancer resistance protein/ABCG2. *Cancer Res.* 65, 596—604.
- Isberg, RR., Voorhis, DL., Falkow, S. (1987). Identification of invasins: A protein that allows enteric bacteria to penetrate cultured mammalian cells. *Cell* 5, 769—778.
- Jagielski, M., Zaleska, M., Kaluzwski, S., Polna, I. (1976). Applicability of DAPI for the detection of mycoplasmas in cell cultures. *Medycyna doświadczalna i mikrobiologia* 28, 161—173.
- Janowski, BA., Younger, ST., Hardy, DB., Ram, R., Huffman, KE., Corey, DR. (2007). Activating gene expression in mammalian cells with promoter-targeted duplex RNAs. *Nat. Chem. Biol.* 3, 166—173.
- Jin, MS., Oldham, ML., Zhang, Q., Chen, J. (2012). Crystal structure of the multidrug transporter P-glycoprotein from *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, doi: 10.1038/nature11448. [Epub].
- Juliano, RL., Ling, V. (1976). A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochem. Biophys. Acta.* 455, 152—162.
- Kartner, N., Riordan, JR., Ling, V. (1983). Cell surface P-glycoprotein associated with multidrug resistance in mammalian cell lines. *Science* 221, 1285—1288.
- Kaszubiak, A., Holm, PS., Lage, H. (2007). Overcoming the classical multidrug resistance phenotype by adenoviral delivery of anti-MDR1 short hairpin RNAs and ribozymes. *Int. J. Oncol.* 31, 419—430.
- Katayama, R., Koike, S., Sato, S., Sugimoto, Y., Tsuruo, T., Fujita, N. (2009). Dofequidar fumarate sensitizes cancer stem-like side population cells to chemotherapeutic drugs by inhibiting ABCG2/BCRP-mediated drug export. *Cancer Sci.* 100, 2060—2068.
- Kawasaki, H., Suyama, E., Iyo, M., Taira, K. (2003). siRNAs generated by recombinant human Dicer induce specific and significant but target site-independent gene silencing in human cells. *Nucleic Acids Res.* 31, 981—987.
- Kellen, JA. (2003). The reversal of multidrug resistance: an update. *J. Exp. Ther. Oncol.* 3, 5—13.

- Kido, M., Yamanaka, K., Mitani, T., Niki, H., Ogura, T., Hiraga, S. (1996). Rnase E polypeptides lacking a carboxyl-terminal half suppress a *mukB* mutation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 178, 3917—3925.
- Kobayashi, H., Dorai, T., Holland, JF., Ohnuma, T. (1994). Reversal of drug sensitivity in multidrug-resistant tumor cells by an MDR1 (PGY1) ribozyme. *Cancer Res.* 54, 1271—1275.
- Kohno, K., Sato, H., Takano, K., Kuwano, M. (1989). The direct activation of human multidrug resistance gene (MDR1) by anticancer agents. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 165, 1415—1421.
- Kowalski, P., Stein, U., Scheffer, GL., Lage, H. (2002). Modulation of the atypical multidrug-resistant phenotype by a hammerhead ribozyme directed against the ABC transporter BCRP/MXR/ABCG2. *Cancer Gene Ther.* 9, 579—586.
- Krishna, R., Mayer, LD. (2000). Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. *Europ. J. Pharm. Sci.* 11, 265—283.
- Krühn, A. (2008). Modulation des MDR-Phänotyps: Bakterieller Transfer von anti-ABCB1 shRNAs. *Diplomarbeit*. Freie Universität Berlin.
- Krühn, A., Wang, A., Fruehauf, JH., Lage, H. (2009). Delivery of short hairpin RNAs by transkingdom RNA interference modulates the classical ABCB1-mediated multidrug-resistant phenotype of cancer cells. *Cell Cycle* 8, 3349—3354.
- Labialle, S., Gayet, L., Marthinet, E. (2002). Transcriptional regulators of the human multidrug resistance 1 gene: recent views. *Biochem. Pharmacol.* 64, 943—948.
- Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680—685.
- Lage, H., Jordan, A., Scholz, R., Dietel, M. (2000). Thermosensitivity of multidrug-resistant human gastric and pancreatic carcinoma cells. *Int. J. Hyperthermia.* 16, 291—303.
- Lage, H. (2003). ABC-transporters: implications on drug resistance from microorganisms to human cancers. *Int. J. Antimicrob. Agents* 22, 188—199.

- Lage, H. (2005). Potential applications of RNA interference technology in the treatment of cancer. *Fut. Oncol.* 1, 103—113.
- Lage, H. (2006). MDR1/P-Glykoprotein (ABCB1) as target for RNA interference-mediated reversal of multidrug resistance. *Curr. Drug Targ.* 7, 813—821.
- Lage, H., Dietel, M. (2000). Effect of the breast cancer resistance protein on atypical multidrug resistance. *Lancet Oncol.* 1, 169—175.
- Lage, H., Fruehauf, JH. (2011). Delivery of therapeutic RNA molecules to cancer cells by bacteria. *Ther. Deliv.* 2, 441—449.
- Lage, H., Krühn, A. (2010). Bacterial delivery of RNAi effectors: transkingdom RNAi. *J. Vis. Exp.* 43, doi: 10.3791/2099 [Epub].
- Lage, H., Krühn, A., Fruehauf, H. (2012) Delivery of RNAi effectors by tkRNAi, In Molecular and Cellular Therapeutics, Hrsg. Whitehouse, D., Rapley, R., 1. Aufl., *Wiley Blackwell*, Oxford, UK.
- Lehnert, M. (1994). Multidrug resistance in human cancer. *J. Neurooncol.* 22, 239—243.
- Li, CB., Zhang, F., Shi, YR., Wei, XY., Yang, Y., Niu, RF. (2004). Reversing multidrug resistance in breast cancer cell line MCF-7/ADR by small interfering RNA. *Ai Zheng* 23, 1605—1610.
- Li, LC., Okino, ST., Zhao, H., Pookot, D., Place, RF., Urakami, S., Enokida, H., Dahiya, R. (2006). Small dsRNAs induce transcriptional activation in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 17337—17342.
- Li, WT., Zhou, GY., Song, XR., Chi, WL., Ren, RM., Wang, XW. (2005). Modulation of BCRP mediated atypical multidrug resistance phenotype by RNA interference. *Neoplasma* 52, 219—224.
- Litman, T., Brangi, M., Hudson, E., Fetsch, P., Abati, A., Ross, DD., Miyake, K., Resau, JH., Bates, SE. (2000). The multidrug-resistant phenotype associated with overexpression of the new ABC half-transporter, MXR (ABCG2). *J. Cell Sci.* 113, 2011—2021.
- Livak, KJ., Schmittgen, TD. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods* 25, 402—408.

- Lopez, PJ., Marchand, I., Joyce, SA., Dreyfus, M. (1999). The C-terminal half of RNase E, which organizes the *Escherichia coli* degradosome, participates in mRNA degradation but not rRNA processing *in vivo*. *Mol. Microbiol.* 33, 188—199.
- Low, KB., Ittensohn, M., Le, T., Platt, J., Sodi, S., Amoss, M., Ash, O., Carmichael, E., Chakraborty, A., Fischer, J., Lin, SL., Luo, X., Miller, SI., Zheng, L., King, I., Pawelek, JM., Bermudes, D. (1999). Lipid A mutant Salmonella with suppressed virulence and TNF α induction retain tumor-targeting *in vivo*. *Nat. Biotechnol.*, 17, 37—41.
- Lv, H., He, Z., Liu, X., Yuan, J., Yu, Y., Chen, Z. (2007). Reversal of BCRP-mediated multidrug resistance by stable expression of small interfering RNAs. *J. Cell Biochem.* 102, 75—81.
- MacLeod, RA., Dirks, WG., Matsuo, Y., Kaufmann, M., Milch, H., Drexler, HG. (1999). Widespread intraspecies cross-contamination of human tumor cell lines arising at source. *Int. J. Cancer* 83, 555—563.
- Manoharan, M., Akinc, A., Pandey, RK., Qin, J., Hadwiger, P., John, M., Mills, K., Charisse, K., Maier, MA., Nechev, L. (2011) Unique gene-silencing and structural properties of 2'-fluoro-modified siRNAs. *Angew. Chem. Int. Ed.* 50, 2284—2288.
- Materna, V., Stege, A., Surowiak, P., Priebisch, A., Lage, H. (2006). RNA interference-triggered reversal of ABCC2-dependent cisplatin resistance in human cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 348, 153—157.
- Merino, G., Alvarez, A., Pulido, M., Molina, A., Schinkel, A., Prieto, J. (2006). Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) transports fluoroquinolone antibiotics and affects their oral availability, pharmacokinetics, and milk secretion. *Drug Metab. Dispos.* 34, 690—695.
- Minderman, H., O'Loughlin, KL., Pendyala, L., Baer, MR. (2004). VX-710 (biricodar) increases drug retention and enhances chemosensitivity in resistant cells overexpressing P-glycoprotein, multidrug resistance protein, and breast cancer resistance protein. *Clin. Cancer Res.* 10, 1826—1834.
- Miyagishi, M., Taira, K. (2002). Development and application of siRNA expression vector. *Nucl. Acids Res.* 2, 113—114.

- Miyake, K., Mickley, L., Litman, T., Zhan, Z., Robey, R., Cristensen, B., Brangi, M., Greenberger, L., Dean, M., Fojo, T., Bates, SE. (1999). Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transport genes. *Cancer Res.* 59, 8—13.
- Miyazaki, M., Kohono, K., Uchiumi, T., Tanimura, H., Matsuo, K., Nasu, M., Kuwano, M. (1992). Activation of human multidrug resistance-1 gene promoter in response to heat shock stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187, 677—684.
- Myers, JW., Jones, JT., Meyer, T., Ferrell, JE.Jr. (2003). Recombinant Dicer efficiently converts large dsRNAs into siRNAs suitable for gene silencing. *Nature Biotechnol.* 21, 324—328.
- Nakagawa, M., Emoto, A., Nasu, N., Hanada, T., Kuwano, M., Cole, SP., Nomura, Y. (1997). Clinical significance of multi-drug resistance associated protein and P-glycoprotein in patients with bladder cancer. *J. Urol.* 157, 1260—1265.
- Nakagawa, M., Schneider, E., Dixon, KH., Horton, J., Kelley, K., Morrow, C., Cowan, KH. (1992). Reduced intracellular drug accumulation in the absence of P-glycoprotein (mdr1) overexpression in mitoxantrone-resistant human MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Res.* 52, 6175—6181.
- Napoli, C., Lemieux, C., Jorgensen, R. (1990). Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell.* 2, 279—289.
- Nauts, HC. [Hrsg.] (1980). The beneficial effects of bacterial infections on host resistance to cancer. End results in 449 cases. A study and abstracts of reports in the world medical literature (1775-1980) and personal communications, 2. Aufl., *Cancer Research Institute*, New York.
- Nieth, C., Priebisch, A., Stege, A., Lage, H. (2003). Modulation of the classical multidrug resistance (MDR) phenotype by RNA interference (RNAi). *FEBS Lett.* 545, 144—150.
- Nykänen, A., Haley, B., Zamore, PD. (2001). ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell* 107, 309—321.

- Ong, ST., Li, F., Du, J., Tan, YW., Wang, S. (2005). Hybrid cytomegalovirus enhancer-h1 promoter-based plasmid and baculovirus vectors mediate effective RNA interference. *Hum. Gene Ther.* 16, 1404—1412.
- Ozvegy-Laczka, C., Hegedus, T., Varady, G., Ujhelly, O., Schuetz, JD., Varadi, A., Keri, G., Orfi, L., Nemet, K., Sarkadi, B. (2004). High-affinity interaction of tyrosine kinase inhibitors with the ABCG2 multidrug transporter. *Mol. Pharmacol.* 65, 1485—1495.
- Pastan, I., Gottesman, MM. (1987). Multiple-drug resistance in human cancer. *N. Engl. J. Med.* 316, 1388—1393.
- Pawelek, JM., Low, KB., Bermudes, D. (1997). Tumour-targeted Salmonella as a novel anti-cancer vector. *Cancer Res.* 57, 4537—4544.
- Peng, Z., Xiao, Z., Wang, Y., Liu, P., Cai, Y., Lu, S., Feng, W., Han, ZC. (2004). Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance with small interference RNA (siRNA) in leukemia cells. *Cancer Gene Ther.* 11, 707—712.
- Place, RF., Noonan, EJ., Földes-Papp, Z., Li, LC. (2010). Defining features and exploring chemical modifications to manipulate RNAa activity. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 11, 518—526.
- Portnoy, V., Huang, V., Place, RF., Li, LC. (2011). Small RNA and transcriptional upregulation. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 2, 748—760.
- Pribsch, A., Rompe, F., Tönnies, H., Kowalski, P., Surowiak, P., Stege, A., Materna, V., Lage, H. (2006). Complete reversal of ABCG2-depending atypical multidrug resistance by RNA interference in human carcinoma cells. *Oligonucleotides* 16, 263—274.
- Rabindran, SK., He, H., Singh, M., Brown, E., Collins, KI., Annable, T., Greenberger, LM. (1998). Reversal of a novel multidrug resistance mechanism in human colon carcinoma cells by fumitremorgin C. *Cancer Res.* 58, 5850—5858.
- Rana, TM. (2007). Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 23—36.
- Rembacken, BJ., Snelling, AM., Hawkey, PM., Chalmers, DM., Axon, AT. (1999). Nonpathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial. *Lancet* 354, 635—639.

- Riordan, JR., Deuchars, K., Kartner, N. (1985). Amplification of P-glycoprotein genes in multidrug-resistant mammalian cell lines. *Nature* 316, 817—819.
- Robert, J., Jarry, C. (2003). Multidrug reversal agents. *J. Med. Chem.* 46, 4805—4817.
- Robey, RW., Ierano, C., Zhan, Z., Bates, SE. (2011). The challenge of exploiting ABCG2 in the clinic. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 12, 595—608.
- Robey, RW., Polgar, O., Deeken, J., To, KW., Bates, SE. (2007). ABCG2: determining its relevance in clinical drug resistance. *Cancer Metastasis Rev.* 26, 39—57.
- Robey, RW., Steadman, K., Polgar, O., Morisaki, K., Blayney, M., Mistry, P., Bates, SE. (2004). Pheophorbide is a specific probe for ABCG2 function and inhibition. *Cancer Res.* 64, 1242—1246.
- Rocchi, E., Khodjakov, A., Volk, EL., Yang, CHJ., Litman, T., Schneider, E. (2000). The product of the ABC half-transporter gene ABCG2 (BCRP/MXR/ABCP) is expressed in the plasma membrane. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 271, 42—46.
- Romano, N., Macino, G. (1992). Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Mol. Microbiol.* 6, 3343—3353.
- Ross, DD., Yang, W., Abruzzo, LV., Dalton, WS., Schneider, E., Lage, H., Dietel, M., Greenberger, L., Cole, SP., Doyle, LA. (1999). Atypical multidrug resistance: breast cancer resistance protein messenger RNA expression in mitoxantrone - selected cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.* 91, 429—433.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, AR. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 5463—5467.
- Scherr, M., Scherr, D. (2003). Das „Avery-Experiment“: Meilenstein der Molekularbiologie. *Biologie unserer Zeit* 33, 58—61.
- Sen, GL., Blau, HM. (2006). A brief history of RNAi: the silence of the genes. *FASEB J.* 20, 1293—1299.
- Shen, DW., Fojo, A., Roninson, IB. (1986). Multidrug resistance of DNA-mediated transformants is linked to transfer of the human *mdr1* gene. *Mol. Cell Biol.* 6, 4039—4045.

- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D. (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* 82, 1107—1112.
- Sohail, M., Doran, G., Riedemann, J., Macaulay, V., Southern, EM. (2003). A simple and cost-effective method for producing small interfering RNAs with high efficacy. *Nucl. Acids Res.* 31, e38.
- Soldan, M., Netter, KJ., Maser, E. (1996). Induction of daunorubicin carbonyl reducing enzymes by daunorubicin in sensitive and resistant pancreas carcinoma cells. *Biochem. Pharmacol.* 51, 117—123.
- Sorrentino, BP. (2002). Gene therapy to protect haematopoietic cells from cytotoxic cancer drugs. *Nature Rev. Cancer* 2, 431—441.
- Soutschek, J., Akinc, A., Bramlage et al. (2004). Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature* 432, 173—178.
- Stein, U., Walther, W., Lemm, M. Naumdorf, H., Fichtner, I. (1997). Development and characterisation of novel human multidrug resistant mammary carcinoma lines *in vitro* and *in vivo*. *Int. J. Cancer* 72, 885—891.
- Stein, U., Walther, W., Stege, A., Kaszubiak, A., Fichtner, I., Lage, H. (2008). Complete *in vivo* reversal of the multidrug resistance phenotype by jet-injection of anti-MDR1 short hairpin RNA-encoding plasmid DNA. *Mol. Ther.* 16, 178—186.
- Steinbach, D., Sell, W., Voigt, A., Hermann, J., Zintl, F., Sauerbrey, A. (2002). BCRP gene expression is associated with a poor response to remission induction therapy in childhood acute myeloid leukemia. *Leukemia* 16, 1443—1447.
- Stege, A., Priebisch, A., Nieth, C., Lage, H. (2004). Stable and complete overcoming of MDR1/P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in human gastric carcinoma cells by RNA interference. *Cancer Gene Ther.* 11, 699—706.
- Stierle, V., Laigle, A., Jolles, B. (2004). The reduction of P-glycoprotein expression by small interfering RNAs is improved in exponentially growing cells. *Oligonucleotides* 14, 191—198.

- Takara, K., Takagi, K., Tsujimoto, M., Ohnishi, N., Yokoyama, T. (2003). Digoxin up-regulates multidrug resistance transporter (MDR1) mRNA and simultaneously down-regulates steroid xenobiotic receptor mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 306, 116—120.
- Takahashi, M., Nagai, C., Hatakeyama, C., Minakawa, N., Harashima, H., Matsuda, A. (2012). Intracellular stability of 2'-OMe-40'-thioribonucleoside modified siRNA leads to long-term RNAi effect. *Nucleic Acids Res.* 40, 5787—5793.
- Tan, B., Piwnica-Worms, D., Ratner, L. (2000). Multidrug resistance transporters and modulation, *Curr. Opin. Oncol.* 12, 450—458.
- Thomas, H. Coley, HM. (2003). Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting P-glycoprotein. *Cancer Control* 10, 159—165.
- Tiemann, K., Rossi, JJ. (2009). RNAi-based therapeutics—current status, challenges and prospects. *EMBO Mol Med.* 1, 142—151.
- Toso, JF., Gill, VJ., Hwu, P. et al. (2002). Phase I study of the intravenous administration of attenuated *Salmonella typhimurium* to patients with metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.* 20, 142—152.
- Tsuruo, T., Lida, H., Tsukagoshi, S., Sakurai, Y. (1981). Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia *in vivo* and *in vitro* through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil, *Cancer Res.* 41, 1967—1972.
- Turner, JG., Gump, JL., Zhang, C., Cook, JM., Marchion, D., Hazlehurst, L., Munster, P., Schell, MJ., Dalton, WS., Sullivan, DM. (2006). ABCG2 expression, function, and promoter methylation in human multiple myeloma. *Blood* 108, 3881—3889.
- Twentyman, PR., Reeve, JG., Koch, G., Wright, KA. (1990). Chemosensitisation by verapamil and cyclosporin A in mouse tumour cells expressing different levels of P-glycoprotein and CP22 (sorcin). *Br. J. Cancer* 62, 89—95.
- Uchiumi, T., Kohono, K., Tanimura, H., Matsuo, K., Sato, S., Uchida, Y., Kuwano, M. (1993). Enhanced expression of the human multidrug resistance 1 gene in response to UV light irradiation. *Cell Growth Differ.* 4, 147—157.

- Ueda, K., Cardarelli, C., Gottesman, MM., Pastan, I. (1987). Expressing of a fulllength cDNA for the human MDR1 gene confers resistance to colchicine, doxorubicin, and vinblastine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 3004—3008.
- van Herwaarden, AE., Jonker, JW., Wagenaar, E., Brinkhuis, RF., Schellens, JH., Beijnen, JH., Schinkel, AH. (2003). The breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) restricts exposure to the dietary carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. *Cancer Res.* 63, 6447—6452.
- van Herwaarden, AE., Wagenaar, E., Karnekamp, B., Merino, G., Jonker, JW., Schinkel, AH. (2006). Breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) reduces systemic exposure of the dietary carcinogens aflatoxin B1, IQ and Trp-P-1 but also mediates their secretion into breast milk. *Carcinogenesis* 27, 123—130.
- Vasanthakumar, G., Ahmed, NK. (1989). Modulation of drug resistance in a daunorubicin resistant subline with oligonucleoside methylphosphonates. *Cancer Commun.* 1, 225—232.
- Vaze, MB., Wu T., Seth, S., Templin, M., Polisky, B. (2012). Engineering of trans kingdom RNAi (*tkRNAi*) against gastrointestinal polyps. *Cancer Research* 72 (Supplement), 5708.
- Vermeulen, A., Behlen, L., Reynolds, A., Wolfson, A., Marshall, W., Karpilow, J., Khvorova, A. (2005). The contributions of dsRNA structure to Dicer specificity and efficiency. *RNA* 5, 674—682.
- Vickers, TA., Koo, S., Bennett, CF., Crooke, ST., Dean, NM., Baker, BF. (2003). Efficient reduction of target RNAs by small interfering RNA and RNase H-dependent antisense agents. A comparative analysis. *J. Biol. Chem.* 278, 7108—7118.
- Walker, JE., Saraste, M., Runswick, MJ., Gay, NJ. (1982). Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* 1, 945—951.
- Wang, X., Furukawa, T., Nitanda T, Okamoto, M., Sugimoto, Y., Akiyama, S., Baba, M. (2003). Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) induces cellular resistance to HIV-1 nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Mol. Pharmacol.* 63, 65—72.

- Wang, X., Nitanda, T., Shi, M., Okamoto, M., Furukawa, T., Sugimoto, Y., Akiyama, S., Baba, M. (2004). Induction of cellular resistance to nucleoside reverse transcriptase inhibitors by the wild-type breast cancer resistance protein. *Biochem. Pharmacol.* 68, 1363—1370.
- Widmaier, R., Wildner, GP., Papsdorf, G., Graffi, I. (1974). Über eine neue, *in vitro* unbegrenzt wachsende Zelllinie MaTu von Mamma-Tumorzellen des Menschen. *Arch. Geschwulstforsch.* 44, 1—10.
- Wu, H., Hait, WN., Yang, JM. (2003). Small interfering RNA-induced suppression of MDR1 (P-glycoprotein) restores sensitivity to multidrug resistant cancer cells. *Cancer Res.* 63, 1515—1519.
- Xiang, S., Keates, AC., Fruehauf, J., Yang, Y., Guo, H., Ngyen, T., Li, CJ. (2009). *In vitro* and *in vivo* gene silencing by TransKingdom RNAi (tkRNAi). *Methods Mol Biol.* 487, 147—160.
- Xiang, S., Fruehauf, J., Li, CJ. (2006). Short hairpin RNA-expressing bacteria elicit RNA interference in mammals. *Nat. Biotechnol.* 24, 697—702.
- Xu, D., Kang, H., Fisher, M., Juliano, RL. (2004). Strategies for inhibition of MDR1 gene expression. *Mol. Pharmacol.* 66, 268—275.
- Xu, D., McCarty, D., Fernandes, A., Fisher, M., Samulski, RJ., Juliano, RL. (2005). Delivery of MDR1 small interfering RNA by self-complementary recombinant adeno-associated virus vector. *Mol. Ther.* 11, 523—530.
- Yagüe, E., Higgins, CF., Raguz, S. (2004). Complete reversal of multidrug resistance by stable expression of small interfering RNAs targeting MDR1. *Gene Ther.* 11, 1170—1174.
- Young, VB., Falkow, S., Schoolnik, GK. (1992). The invasin protein of *Yersinia enterocolitica*: Internalization of invasin-bearing bacteria by eukaryotic cells is associated with reorganisation of the cytoskeleton. *J. Cell Biol.* 116, 197—207.
- Yu, JY., DeRuiter, SL., Turner, DL. (2002). RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 99, 6047—6052.
- Yue, W., Abe, K., Brouwer, KL. (2009). Knocking down breast cancer resistance protein (bcrp) by adenoviral vector-mediated RNA interference (RNAi) in sandwich-cultured rat

- hepatocytes: A novel tool to assess the contribution of bcrp to drug biliary excretion. *Mol. Pharm.* 6, 134—143.
- Yue, X., Schwartz, J.C., Chu, Y., Younger, S.T., Gagnon, K.T., Elbashir, S., Janowski, B.A., Corey, D.R. (2010). Transcriptional regulation by small RNAs at sequences downstream from 3' gene termini. *Nat. Chem. Biol.* 6, 621—629.
- Zamore, P.D., Tuschl, T., Sharp, P.A., Bartel, D.P. (2000). RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101, 25—33.
- Zeng, Y., Yi, R., Cullen, B.R. (2003). MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100, 9779—9784.
- Zhang, S., Yang, X., Morris, M.E. (2004). Flavonoids are inhibitors of breast cancer resistance protein (ABCG2)-mediated transport. *Mol. Pharmacol.* 65, 1208—1216.
- Zhang, W., Li, J., Allen, S.M., Weiskircher, E.A., Huang, Y., George, R.A., Fong, R.G., Owen, A., Hidalgo, I.J. (2009). Silencing the breast cancer resistance protein expression and function in Caco-2 cells using lentiviral vector-based short hairpin RNA. *Drug Metab. Dispos.* 37, 737—744.
- Zimmermann, T.S., Lee, A.C., Akinc, A., Bramlage, B., Bumcrot, D., Fedoruk, M.N., Harborth, J., Heyes, J.A., Jeffs, L.B., John, M. et al. (2006). RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature* 441, 111—114.
- Zini, N., Scotlandi, K., Baldini, N., Nini, G., Sabatelli, P., Maraldi, N.M. (1995). Multidrug-resistance (MDR) phenotype of human osteosarcoma cells evaluated by quantitative morphological and electron microscopy analyses. *Biol. Cell* 84, 195—204.

Publikationen

Veröffentlichungen in Fachzeitschriften

Krühn, A., Fruehauf, JH., Lage, H. (2013). Transkingdom RNAi: A potent tool to modulate the classical ABCB1- and the atypical ABCG2-mediated multidrugresistance [in Arbeit].

Lage, H., **Krühn, A.** (2010). Bacterial delivery of RNAi effectors: Transkingdom RNAi. *J. Vis. Exp.* 43, doi: 10.3791/2099 [Epub].

Krühn, A., Wang, A., Fruehauf, JH., Lage, H. (2009). Delivery of short hairpin RNAs by transkingdom RNA interference modulates the classical ABCB1-mediated multidrug-resistant phenotype of cancer cells. *Cell Cycle* 8, 3349—3354.

Buchbeiträge

Lage, H., **Krühn, A.**, Fruehauf, JH. (2012) Delivery of RNAi effectors by tkRNAi. In: Molecular and Cellular Therapeutics, Hrsg. Whitehouse, D., Rapley, R., 1. Aufl., *Wiley Blackwell*, Oxford, UK.

Steger, A., **Krühn, A.**, Lage, H. (2009) Overcoming multidrug resistance in cancer. In: Methods in Molecular Biology, Hrsg. Zhou, J., 1. Aufl., 447—465. *Humana Press*, Totowa, USA.

Kongressbeitrag

Krühn, A., Wang, AJ., Fruehauf, J., Lage, H. (2009). Modulation of ABCB1-mediated multidrug resistance (MDR) by transkingdom RNA interference (tkRNAi). *American Association for Cancer Research 100th Annual Meeting*, AACR Meeting Abstracts, LB-199.

Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen ist der Lebenslauf in der Online-Version meiner Dissertation nicht enthalten.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt an erster Stelle Herrn Prof. Dr. Dr. Hermann Lage, der mir die Möglichkeit gab, meine Doktorarbeit am Institut für Pathologie der Charité Universitätsmedizin Berlin durchzuführen. Ich danke ihm weiterhin für seine Kritik und die stetige Förderung meiner wissenschaftlichen Arbeit.

Sehr herzlich danke ich auch Herrn Prof. Dr. Rupert Mutzel der Freien Universität Berlin dafür, sich als Gutachter für meine Dissertation zur Verfügung zu stellen.

Ebenfalls bedanke ich mich bei Herrn Dr. Dr. Johannes Fruehauf von Cequent Pharmaceuticals, Inc. bzw. Cambridge Biolabs für die Kooperation und die Bereitstellung der tkRNAi Plasmide.

Bei den ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern der AG Lage, Birgit Schaefer, Erika Bachmann, Katrin Hönig, Nadine Muller, Alaa Derwish, Juan Luo und besonders bei Dr. Denise Treue und Dr. Alexandra Stege, bedanke ich mich für die harmonische Zusammenarbeit und für ihre Unterstützung. Weiterhin danke ich Herrn Dr. Alexander Kaszubiak für die Inspiration bezüglich meiner beruflichen Zukunft.

Besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden Réka Kurucz, Stephanie Seibt und Sharif Morad für ihre unendliche Geduld und ihren Beistand.

Anhang

Tabelle 44: IC₅₀-Werte Daunorubicin (tkRNAi-TRIP anti-*ABCB1*)

Zelllinie/Behandlung	Daunorubicin IC ₅₀ [nM]	Signifikanz* ¹
EPG85-257P	15,7 ± 10,3	***
EPG85-257RDB	7379,3 ± 629,4	-
+ <i>E. coli</i> BL21(DE3)	7094,8 ± 634,5	ns
+ <i>E. coli</i> BL21(DE3) + TRIP anti- <i>GFP</i>	7448,08 ± 552,7	ns
+ <i>E. coli</i> BL21(DE3) + TRIP anti <i>ABCB1</i>	2959,5 ± 977,1	**

*¹ ns = nicht signifikant, ** = p < 0,01, *** = p < 0,001 (zweiseitiger Student's t-Test, bezogen auf unbehandelte EPG85-257RDB)

Tabelle 45: IC₅₀-Werte Daunorubicin (tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCB1*)

Zelllinie/Behandlung	Daunorubicin IC ₅₀ [nM]	Signifikanz* ¹
EPG85-257P	17,3 ± 7,0	***
EPG85-257RDB/anti- <i>ABCB1</i> -shRNA	13,8 ± 3,2	***
EPG85-257RDB	5613,3 ± 365,7	-
+ <i>E. coli</i> ceq221	5465,1 ± 125,1	ns
+ <i>E. coli</i> ceq221 + pMBV43 anti- <i>ABCC2</i>	6193,4 ± 663,9	*
+ <i>E. coli</i> ceq221 + pMBV43 anti- <i>ABCB1</i>	645,3 ± 47,2	***

*¹ ns = nicht signifikant, * = p < 0,05, *** = p < 0,001 (zweiseitiger Student's t-Test, bezogen auf unbehandelte EPG85-257RDB)

Tabelle 46: IC₅₀-Werte Doxorubicin (tkRNAi-pMBV43 anti-*ABCB1*)

Zelllinie/Behandlung	Doxorubicin IC ₅₀ [nM]	Signifikanz* ¹
MaTu	12,2 ± 1,1	***
MaTu/ADR/anti- <i>ABCB1</i> -shRNA	83,4 ± 8,8	***
MaTu/ADR	653,1 ± 39,0	-
+ <i>E. coli</i> ceq221	739,1 ± 51,2	ns
+ <i>E. coli</i> ceq221 + pMBV43 anti- <i>ABCC2</i>	609,1 ± 57,9	ns
+ <i>E. coli</i> ceq221 + pMBV43 anti- <i>ABCB1</i>	68,6 ± 6,2	***

*¹ ns = nicht signifikant, *** = p < 0,001 (zweiseitiger Student's t-Test, bezogen auf unbehandelte MaTu/ADR)

Tabelle 47: IC₅₀-Werte Mitoxantron (tkRNAi-pMBV43 anti-ABCG2)

Zelllinie/Behandlung	Mitoxantron IC ₅₀ [nM]	Signifikanz* ¹
EPG85-257P	20,7 ± 0,5	***
EPG85-257RNOV	1138,5 ± 213,7	-
+ <i>E. coli</i> ceq221	935,6 ± 172,4	ns
+ <i>E. coli</i> ceq221 + pMBV43 anti-ABCC2	1159,2 ± 199,2	ns
+ <i>E. coli</i> ceq221 + pMBV43 anti-ABCG2	529,9 ± 87,1	**

*¹ ns = nicht signifikant, ** = p < 0,01, *** = p < 0,001 (zweiseitiger Student's t-Test, bezogen auf unbehandelte EPG85-257RNOV)

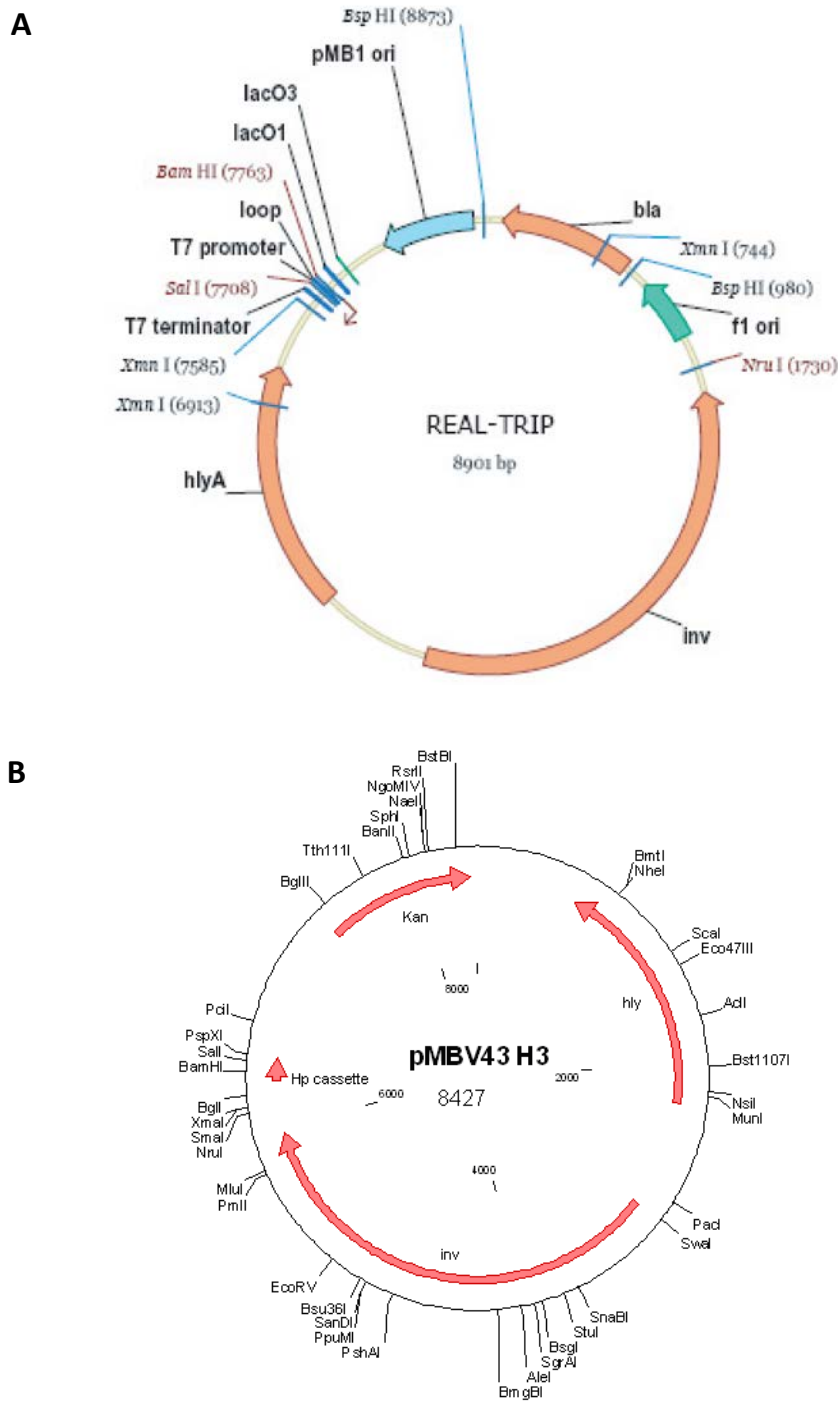


Abbildung 24: Vektorkarten der verwendeten tkRNAi Plasmide (von Cequent Pharmaceuticals, Inc. zur Verfügung gestellt)

(A) TRIP, (B) pMBV43. In die Plasmide wurden unter Leitung von Dr. Dr. Johannes Fruehauf (Cequent Pharmaceuticals, Inc., Cambridge, USA) die in Tabelle 13 aufgeführten shRNA kodierenden Sequenzen kloniert (TRIP: + anti-*ABCB1*-shRNA; + anti-*GFP*-shRNA; pMBV43: + anti-*ABCB1*-shRNA; + anti-*ABCC2*-shRNA; + anti-*ABCG2*-shRNA).

Tabelle 48: Varianten der klonierten shRNA kodierenden Sequenzen am Beispiel der anti-*ABCB1*-shRNA

Plasmid	anti- <i>ABCB1</i> -shRNA kodierende Variante (5'-ATG-sense-Loop-antisense-Ts-3')
TRIP	ATGTTGTCTGGACAAGCACTTCAAGAGAGTGCTTGTCCAGACAACATTT
pMBV43	ATGTTGTCTGGACAAGCACTTCAAGAGAGTGCTTGTCCAGACAACATTTTTTTTTTTT

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ABC	ATP-binding cassette
ABCB1	ATP-binding cassette, sub-family B, member 1
ABCC2	ATP-binding cassette, sub-family C, member 2
ABCG2	ATP-binding cassette, sub-family G, member 2
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ASO	Antisense-Oligonukleotid
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BCRP	breast cancer resistance protein
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
c.f.u.	colony forming units
ca.	circa
cDNA	complementary desoxyribonucleic acid
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CHO	chinese hamster ovary
DAPI	2,6-Diaminopimelsäure
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol x 2 HCl
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid
DNase	desoxyribonuclease
Drosha-DGCR8	Drosha-DiGeorge syndrome critical region gene-8
ds	double-stranded
DTT	DL-Dithiothreitol (1,4 – Dithiol 2,3 –dihydroxybutan)

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELC	Enhanced Chemoluminescence
E _{max}	Emissionsmaximum
<i>et al.</i>	et alii
FACS	fluorescence activated cell sorter
FKS	fetales Kälberserum
g	Gramm
G	Guanin
GFP	green fluorescent protein
h	Stunde
HRP	horseraddish peroxidase
IC ₅₀	half maximal inhibitory concentration
i.e.	in etwa
IPTG	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
k	Kilo
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
LB	liquid broth
M	Molar
m	milli
mAb	monoklonaler Antikörper
MDR	Multidrugresistenz
MDR1	multidrug resistance protein 1
MEM	Eagle's Minimum Essential
min	Minute
Mio.	Million
miRNA	mikroRNA
ml	Milliliter

MOI	multiplicity of infection
mRNA	messenger-RNA
MRP2	multidrug resistance-associated protein 2
n	nano
NBD	Nukleotid-Bindungsdomäne
nm	Nanometer
nt	Nukleotid
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAZ-Domäne	PIWI-Argonaute-Zwille/Pinhead-Domäne
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
P-gp	Permeability glycoprotein
PIWI	P-element Induced Wimpy Testis.
POD	Peroxidase
pre-miRNA	precursor-miRNA
pri-miRNA	primary-miRNA
RISC	RNA induced silencing complex
RNA	ribonucleic acid
RNAi	RNA Interferenz
RNase	Ribonuclease
rpm	rounds per minute
RT-PCR	reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion
s	Sekunde
SDS	sodium dodecyl sulfate
shRNA	small hairpin RNA
siRNA	small interfering RNA
SRB	Sulforhodamin B
ss	single strand
T	Thymin

Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Azetat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
T _H	Hybridisierungstemperatur von Primern
TMD	Transmembrandomäne
Tris-Base	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-hydrochlorid
U	unit
U	Uracil
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	volume/volume
w/v	weight/volume
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>
z.B.	zum Beispiel
Δ	delta
° C	Grad Celsius
λ	lambda (Wellenlänge)
μ	mikro

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe verfasst habe. Es wurden keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt.

Berlin, den 14.03.2013

.....

Andrea Krühn