

# **PEI-F25-LMW als Transfektionsreagenz für DNA und siRNA sowie seine Anwendung im Targeting von VEGF mittels siRNA in Prostatakarzinomzellen**

Diplomarbeit  
zur Erlangung des Grades eines Diplombiologen

vorgelegt dem Fachbereich Biologie  
der Philipps-Universität Marburg



von Robert Prinz  
aus Marburg

Marburg, August 2006

Die Arbeit wurde als externe Diplomarbeit am Fachbereich Humanmedizin  
der Philipps-Universität Marburg in der Arbeitsgruppe von  
Prof. Dr. F.Czubayko –Institut für Pharmakologie und Toxikologie–  
angefertigt

Beginn der Arbeit: 21.11.2005

Abgabe der Arbeit: 01.08.2006

Gutachter:

HD Dr. Achim Aigner

Prof. Dr. Michael Bölker

Prof. Dr. Alfred Batschauer

## Zusammenfassung

Vor allem in der Krebstherapie wird nach Alternativen zu viralen Gentherapie-Vektoren gesucht, da diese immunogene und tumorigene Nebenwirkungen entwickeln können. Polyethylenimine (PEIs) sind kationische Polymere mit der Fähigkeit Nukleinsäuren zu komplexieren. Durch diese Eigenschaft konnte gezeigt werden, dass sie sich als Transfektionsreagenz *in vitro* und *in vivo* eignen. Mit PEIs können Zellen *in vitro* und *in vivo* transfiziert werden, wenn auch nicht so effizient wie mit viralen Vektoren. Gezeigt wurde dies für DNA- bzw. siRNA-PEI-Komplexe, die meist in NaCl- oder Glucose-Lösung angesetzt und frisch transfiziert wurden. Die Transfektionen *in vitro* finden dabei oft in serumfreiem Zellkulturmedium statt, um eine ausreichende Transfektionseffizienz zu gewährleisten.

In dieser Arbeit wurde das Polyethylenimin PEI-F25-LMW charakterisiert und gezeigt, dass sich damit komplexierte DNAs bzw. siRNAs einfrieren und lagern lassen, ohne dadurch an Transfektionseffizienz zu verlieren. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass der Serumgehalt von Zellkulturmedium für *in vitro* Transfektionen keinen Einfluß auf die Transfektionseffizienz von DNA- oder siRNA-PEI-F25-LMW-Komplexen hat. Damit ergeben gute Möglichkeiten für *in vivo* Anwendungen, bei denen es zwangsläufig zu Interaktionen der Komplexe mit Serumproteinen kommt.

Durch PEI-F25-LMW-vermitteltes siRNA Targeting gegen VEGF an PC-3 und Du145 Prostatakarzinom-Zellen *in vitro* wurde gezeigt, dass dieses System eine effiziente Herunterregulation des VEGF-Proteins ermöglicht und somit die Untersuchung klinisch relevanter Fragestellungen erlaubt. Das Targeting wurde dabei durch QT-RT-PCR und VEGF-ELISA nachgewiesen. Die Auswirkungen auf das Zellwachstum wurden mit Proliferations- und Soft-Agar-Assays untersucht. Trotz effizienter Herunterregulation von VEGF wurde jedoch kein Effekt auf die Zellproliferation beobachtet. Damit spielt VEGF zumindest *in vitro* mit großer Wahrscheinlichkeit keine Rolle als autokrin wirkender Wachstumsfaktor.

Für Untersuchungen *in vivo* wurde ein Du145-Tumor-Modell etabliert. Dazu wurde die notwendige Zellzahl zur Initiation von subkutanen Du145 Tumoren an athymischen Nacktmäusen ermittelt, wobei sich eine Zellzahl von 5 Mio als sinnvoll erwies.



2.2.6.2 Herstellung von DNA- bzw. RNA-Transfektionskomplexen mit jetPEI®	33
2.2.6.3 Herstellung von DNA-Transfektionskomplexen mit Metafectene	33
2.2.6.4 Transfektion mit DNA- bzw. RNA-Komplexen	34
<b>2.2.7</b> Herstellung stabil eGFP-exprimierender klonaler Zelllinien	34
<b>2.2.8</b> Bestimmung von Transfektionseffizienzen mit dem Promega Luciferase Assay	35
<b>2.2.9</b> Bestimmung von Zytotoxizitäten mit dem Promega CytoTox Assay	36
<b>2.2.10</b> Bestimmung der Zahl lebender Zellen nach Transfektion mit PEI-F25-LMW-siRNA-Komplexen	37
<b>2.3</b> VEGF-Targeting	38
2.3.1 Quantitative RT-PCR	38
2.3.1.1 RT-PCR	38
2.3.1.2 Quantitative PCR	39
2.3.2 VEGF ELISA	40
2.3.3 Proliferations-Assay	41
2.3.4 Soft-Agar	42
<b>2.4</b> In vivo Wachstumskinetik von Du145 Zellen	42
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>44</b>
3.1 Transfektionseffizienzen von DNA- bzw. siRNA-Komplexen unter verschiedenen Lagerungsbedingungen	44
3.1.1 Ermittlung des optimalen N/P-Verhältnis für Transfektionen mit PEI-F25-LMW	44
3.1.2 Transfektionseffizienzen von PEI-F25-LMW-DNA-Komplexen für verschiedene Lagerungsbedingungen	45
3.1.3 Transfektionseffizienzen von PEI-F25-LMW-DNA-Komplexen aus Glucose-Lösung	46
3.1.4 Transfektionseffizienzen von jetPEI-DNA-Komplexen für verschiedene Lagerungsbedingungen	47

<b>3.1.5</b> Transfektionseffizienzen von PEI-F25-LMW-siRNA-Komplexen für verschiedene Lagerungsbedingungen	48
<b>3.1.6</b> Transfektionseffizienzen bei unterschiedlichem Serumgehalt	49
<b>3.1.7</b> Ermittlung von Transfektionseffizienzen für PEI-F25-LMW-siRNA-Komplexe mittels eGFP-Targeting	52
<b>3.2</b> Zytotoxizitäten von DNA- bzw. siRNA-PEI-F25-LMW-Komplexen nach verschiedenen Lagerungsbedingungen	53
<b>3.3</b> Bestimmung der Dosis-Wirkungskurve für PEI-F25-LMW-siRNA-Komplexe	54
<b>3.4</b> Auswirkungen eines VEGF-Targetings in vitro	57
<b>3.4.1</b> Nachweis des VEGF-Targetings auf RNA-Ebene mittels QT-RT-PCR	61
<b>3.4.2</b> Nachweis des VEGF-Targetings auf Protein-Ebene mittels ELISA	63
<b>3.4.3</b> Konsequenzen des VEGF-Targetings auf Zellproliferation	
3.4.3.1 Adhäsionsabhängige Zellproliferation	63
3.4.3.2 Adhäsionsunabhängige Zellproliferation	65
<b>3.5</b> Abhängigkeit der in vivo Wachstumskinetik von Du145 Zellen von der Zahl injizierter Zellen	65
<b>4 Diskussion</b>	<b>67</b>
<b>5 Ausblick</b>	<b>73</b>
<b>6 Literatur</b>	<b>74</b>
<b>7 Danksagung</b>	<b>83</b>
<b>8 Erklärung</b>	<b>84</b>

## Abkürzungen

2-D	zweidimensional
3-D	dreidimensional
Abs.	Absorption
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
bFGF	basic fibroblast growth factor
bp	Basenpaar(e)
BSA	bovine serum albumine
cDNA	complementary DNA
CP	crossing point
ddH <sub>2</sub> O	Bidestilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
ds-	double strand-
Du145	Humane Prostatakarzinom-Zelllinie, isoliert aus Gehirnmastase; ATCC <sup>®</sup> number: HTB-81 <sup>™</sup>
eGFP	enhanced green fluorescent protein
FCS	fetal calf serum
Flk-1	Fetal liver kinase 1
Flt-1	fms like tyrosine kinase 1
GFP	green fluorescent protein

HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
Her2/neu	human endothelial growth factor receptor 2
HIF	hypoxia inducible factor
IMDM	Iscove`s Modified Dulbecco`s Media
LB	Luria Broth
LDH	Lactatdehydrogenase
LMW	low molecular weight
LOH	loss of heterozygosity
M	Molar, Mol pro Liter
miRNA	microRNA
MMP	Metalloproteinasen
mRNA	messenger RNA
MVD	microvessel density
MW	Mediumwechsel, molekulare Masse oder Mittelwert: siehe Kontext
N/P-Verhältnis	Verhältnis von PEI-Aminostickstoffatomen zu Nukleinsäure-Phosphoratomen
NLS	nuclear localisation sequence
nt	Nukleotid(e)
PBS	phosphat buffered saline
PC-3	Humane Prostatakarzinom-Zelllinie, isoliert aus Knochenmetastase; ATCC <sup>®</sup> number: CRL 1435 <sup>™</sup>
PCR	polymerase chain reaction
pDNA	Plasmid-DNA
PEG	Polyethylenglycol
PEI	Polyethylenimin

PIGF	Placental growth factor
QT-RT-PCR	quantitative reverse-transcription PCR
RISC	RNA-induced silencing complex
RLU	relative light units
RNA	ribonucleic acid
RNAi	RNA Interferenz
RNase	Ribonuklease
RT	Reverse Transkriptase oder Raumtemperatur: siehe Kontext
RTK	Rezeptortyrosinkinase
RT-PCR	reverse transcription PCR
SD	standard deviation
SEM	standard error of the mean
shRNA	short hairpin RNA
siRNA	small interfering RNA
SKOV-3	Humane Ovarialkarzinom-Zelllinie, ATCC <sup>®</sup> number: HTB-77 <sup>™</sup>
SKOV-3-Luc-10	Stabil Luciferase exprimierende humane Ovarialkarzinomzelllinie
ss-	single strand-
TLR	toll-like receptor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
v/v	Volumen pro Volumen
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor
w/v	weight per volume, Gewicht pro Volumen
WST-1	4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate

# 1 Einleitung

## 1.1 Krebs als robustes System

Unter Krebs sind all jene Erkrankungen zu verstehen, die als Ursache die Transformation einer regulierten, normalen Körperzelle zu einem unregulierten und robusten, proliferierenden System haben (zur Übersicht: [3]). Wie die Bezeichnung „robust“ bereits impliziert, sind diese Systeme gegen eine Vielzahl internen bzw. externen Einflüssen wie z.B. DNA-Schäden oder Apoptose-Signale unempfindlich, was weitreichende Folgen für die Therapie solcher malignen Erkrankungen hat. Die Systembiologie (zur Übersicht: [4]) liefert einen wichtigen Ansatz im Verständnis von Krebs und betrachtet die Rolle regulatorischer Netzwerke innerhalb der Zelle (zur Übersicht: [5]), die das System als solches robust machen. Dabei gilt es die fragilen Punkte, oder besser Module [6] zu identifizieren, welche notwendig sind, um das System Krebs zusammenbrechen zu lassen. Wichtige Erkenntnisse hierzu kommen u.a. aus den Computerwissenschaften, insbesondere dem Bereich Netzwerke [7] und Modellierung [8, 9]. So konnten Barabesi und Bonabeau [7] zeigen, dass es einer gewissen Anzahl Module bedarf, die ausgeschaltet werden müssen, um ein System funktionsunfähig zu machen. Die Implikationen für eine erfolgreiche Krebstherapie sind offensichtlich: es wird mit großer Wahrscheinlichkeit nicht ausreichen, sich auf einzelne Zielstrukturen wie z.B. überexprimierte Proteine und die Reversion von LOH (loss of heterozygosity) Phänotypen etc. zu konzentrieren, vielmehr gilt es durch bessere Kenntnis zellulärer Signalwege und der zu Grunde liegenden Netzwerktopologie die bestmöglichen Zielstrukturen und Zielkombinationen auszuwählen (zur Übersicht: [10]).

## 1.2 Charakteristika und molekulare Mechanismen der Krebsentstehung

Krebserkrankungen basieren auf genetischen und epigenetischen Veränderungen von Zellen, die dadurch unkontrolliert proliferieren können. Oft reichen sehr wenige Mutationen aus um die Transformation einer normalen Körperzelle in eine Krebszelle zu ermöglichen (zur Übersicht: [11]).

Wesentliche Merkmale können die Unabhängigkeit von Wachstumsfaktoren oder ein Ausfall von Apoptose-Mechanismen sein. Hinzu kommt eine anhaltende Angiogenese (Gefäßbildung), Fähigkeit zur Invasion und der damit verbundenen Metastasierung im Körper. Diese Phänotypen können z.B. durch Mutationen oder Genamplifikationen erklärt werden, in deren Folge es z.B. zu Überexpression von Wachstumsfaktoren und/oder deren Rezeptoren kommt, und somit gesteigerter Zellproliferation. Pathogene Veränderungen in Transkriptom und Proteom von Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren sind ein wesentlicher Ansatzpunkt von Chemotherapien und es finden sich für beide Gruppen zahlreiche Antikörper, die durch spezifische Bindung eine Signalweiterleitung und damit verbundene Zellproliferation inhibieren. Ziel ist die autokrine Stimulation von Tumorzellen durch sekretierte Wachstumsfaktoren zu beenden bzw. die durch Überexpression von Wachstumsfaktor-Rezeptoren bedingte Sensitivität gegenüber Wachstumsfaktoren zu mindern. So finden sich z.B. monoklonale Antikörper gegen den Wachstumsfaktor VEGF (vascular endothelial growth factor, siehe Abschnitt 1.3) oder den Rezeptor Her2/neu (human epidermal growth factor receptor 2), der bei Brustkrebs eine wichtige Rolle spielt. Probleme ergeben sich bei der Verwendung von Antikörpern u.a. durch deren Immunigenität.

Auch spielen in der Krebsentstehung genomische Instabilitäten verursacht durch Schäden z.B. im Spindel-Checkpunkt oder der Kontrollverlust über DNA-Reparaturmechanismen eine Rolle. Es kann damit zu Aneuploidien bzw. in letzterem Fall zu erhöhter Mutationsrate in den Zellen kommen.

Neuere Modellvorstellungen setzen regulatorische RNAs, namentlich microRNAs (miRNAs) auf die Liste der Onkogene und Tumor-Suppressorgene (zur Übersicht: [12]) Erkenntnisse über Transkriptionsprofile in Säugerzellen [13-16] unterstreichen die Bedeutung regulatorischer RNAs und der dadurch gebildeten Kontrollebene als mögliche fragile Zielstruktur in der Krebstherapie, aber auch als Marker in der Krebsdiagnose und –prognose [17].

Bedeutsam wird auch das Modell der Krebs-Stammzelle, wonach Krebs zumindest in einigen Fällen durch Veränderungen adulter Stammzellen hervorgerufen wird (zur Übersicht: [18]). Ein fragiler Punkt in einem Tumor wäre(n) demnach die Krebs-Stammzelle(n) und dort wiederum entsprechende regulatorische Module, wobei der Großteil der Tumorzellen hingegen keiner intensiven Therapie bedürfte.

Unabhängig von der Ätiologie der jeweiligen malignen Erkrankung, sind nicht nur solide Tumoren auf Angiogenese, also einen Anschluß an das Blutgefäßsystem, zur weiteren Entwicklung angewiesen (zur Übersicht: [19]). Die Gefäße, deren Struktur stark von der normaler Gefäße abweicht, versorgen den Tumor mit Nährstoffen und Sauerstoff, ermöglichen aber auch Invasion und Metastasierung sowie Interaktion mit dem Immunsystem und wechselseitige Beeinflussung von Metastasen untereinander. Dies zeigt die große Tragweite der Angiogenese in der Krebsentwicklung. Aus diesem Grund hat sich die Anti-Angiogenese-Therapie in den letzten Jahren zu einem Ansatz in der Krebstherapie entwickelt. Neben direkten Problemen, die sich durch eine Anti-Angiogenese-Therapie ergeben, wie z.B. Adaptation des Tumors an die Therapie (zur Übersicht: [20]), ist allerdings zu beachten, dass Nebenwirkungen durch die physiologische Bedeutung der Angiogenese bei Wundheilung und Menstruationszyklus nicht auszuschließen sind. Tumorangiogenese wird durch verschiedene Faktoren wie z.B. VEGF, bFGF (basic fibroblast growth factor) und MMPs (Metalloproteinasen) stimuliert. Hypoxie induziert HIFs (hypoxia inducible factors), die ihrerseits in einem feedback loop die Expression vieler Angiogenesefaktoren steigern.

Sowohl bei der Angiogenese als auch beim Metastasierungsprozess spielt neben den von Tumorzellen überexprimierten oder defekten Proteinen auch das Tumor-Stroma eine wichtige Rolle (zur Übersicht: [21]), wodurch sich eine weitere Regulationsebene ergibt. Die Fähigkeit zur Metastasenbildung macht viele Krebsarten so gefährlich, da Patienten häufig nicht durch den Primärtumor sterben, sondern durch die Metastasen (zur Übersicht: [22]). Auch bei der Metastasenbildung spielt der genetische Hintergrund eines Patienten eine wichtige Rolle.

### **1.3 VEGF (vascular endothelial growth factor)**

Die VEGF Genfamilie besteht aus mehreren Mitgliedern (VEGF-A, -B, -C, -D und -E sowie PLGF [placental growth factor]). VEGF-A, der durch alternatives Spleißen in verschiedenen Isoformen vorkommt (u.a. mit 121, 145, 165, 189 und 206 Aminosäuren), nimmt die entscheidende Rolle bei der Angiogenese ein (Isoform VEGF<sub>165</sub>). Die Isoform VEGF<sub>165b</sub> enthält am C-Terminus ein anderes Exon als VEGF<sub>165</sub> und ist ein endogener Inhibitor von VEGF<sub>165</sub>. VEGF stimuliert u.a. Proliferation, Migration und Überleben von Endothelzellen (zur Übersicht: [23]). Besondere Aufmerksamkeit wird VEGF aber gerade wegen seiner Rolle bei der Tumor-Angiogenese zu Teil, da er von

vielen Tumorzellen exprimiert wird und neben der Angiogenese fördernden Wirkung auch autokrin proliferationssteigernd wirken kann [24, 25].

Es gibt mehrere VEGF-Rezeptoren (zur Übersicht: [26]). VEGF-A, -B und PLGF binden VEGFR1 (auch als Flt1 bekannt), VEGF-A und -E binden VEGFR2 (auch als Flk-1/KDR bekannt), VEGF-C und -D binden VEGFR3 (auch als Flt-4 bekannt). Sie gehören zur Superfamilie der Rezeptortyrosinkinasen (RTK), die durch Ligandenbindung dimerisieren und autophosphoryliert werden. Das Rezeptorsignal kann durch spezifische Phosphatasen und andere Mechanismen wieder beendet werden. Sowohl die Expression von VEGF-A wie auch von VEGFR1 wird u.a. direkt durch HIFs (hypoxia inducible factors) reguliert.

In klinischer Erprobung befinden sich eine Vielzahl von Therapeutika, die das VEGF/VEGFR System als Ziel haben (zur Übersicht: [27]). Bevacizumab (Avastin<sup>®</sup>) ist ein monoklonaler Antikörper gegen VEGF, der bereits auf dem Markt ist. In Phase III finden sich u.a. sogenannte „small-molecule tyrosine kinase receptor inhibitors“ die sich gegen VEGFRs richten, wie z.B. Vatalanib. Das VEGF Antisense Oligonucleotid (siehe Abschnitt 1.5) Veglin<sup>®</sup> (VEGF-AS) befindet sich in Phase I.

In der vorklinischen Forschung finden sich auch siRNAs (siehe Abschnitt 1.5) gegen VEGF [28] und VEGFR1 [29], die am Mausmodell getestet werden.

## **1.4 Prostatakarzinom**

Die Prostata ist eine exokrine Drüse unterhalb der Harnblase, deren Sekret dem Ejakulat beigemischt wird und Beweglichkeit der Spermien induziert. Ihr Wachstum wird v.a. durch testikuläre Androgene kontrolliert. Das Prostatakarzinom stellt eine klinisch besonders relevante maligne Erkrankung beim Mann dar, und ist hier neben Lungenkrebs zusammen mit Kolonkarzinom häufigste Todesursache durch Krebs in den USA [30]. Die Erkrankung wird i.d.R. erst mit fortgeschrittenem Alter diagnostiziert (70% der Fälle bei über 65-Jährigen). An der Pathogenese sind verschiedene Gene und Regulationswege beteiligt, so wird u.a. VEGF und dessen Rezeptoren von Prostatakarzinomzellen exprimiert [31, 32]. Neben Einflüssen bei der frühen Entwicklung der Prostata auf spätere maligne Veränderungen wird auch die Krebs-Stammzell-Theorie angeführt [33].

Im Folgenden sei jedoch nur auf die spezielle Rolle von VEGF in Prostatakarzinom(zelllinien) eingegangen.

Häufigste Verwendung als *in vitro* und *in vivo* Prostatakarzinom-Modelle finden die humanen Zelllinien PC-3 (aus Knochenmetastase), Du145 (aus Hirnmetastase) und LNCaP (aus Lymphknotenmetastase). In diesen Modell-Systemen konnten Holash et al. [34] die Bedeutung von VEGF für die Tumorangiogenese mittels eines VEGF-Blockers zeigen. Takei et al. [28] zeigten mittels siRNA Targeting gegen VEGF in PC-3 Zellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (athymische Nacktmäuse) geringere VEGF-Sekretion bzw. geringeres Tumorwachstum. Ausserdem konnten sie eine verminderte Gefäßdichte (microvessel density, MVD) in Tumoren der Behandlungsgruppe nachweisen. Wannenes et al. [35] nutzten einen shRNA (short hairpin RNA) Expressionsvektor gegen VEGF-A, um *in vitro* und *in vivo* die VEGF Sekretion von PC-3 Zellen zu verringern. Sie konnten damit wie auch Takei et al. geringere MVD und reduziertes Tumorwachstum zeigen. Yun et al. [36, 37] konnten in Du145 Zellen zeigen, dass die VEGF mRNA unter Glucosemangel-Bedingungen in diesen Zellen stabilisiert ist, womit die Wichtigkeit eines VEGF-Targetings unterstrichen wird, da es sich hierbei um einen Hypoxie-unabhängigen Weg der VEGF Regulation handelt.

## **1.5 RNA-Interferenz**

RNA Interferenz (RNAi) ist ein natürlicher Regelprozess eukaryotischer Zellen im Gesamtkontext des zellulären RNA-Stoffwechsels und der damit verbundenen Konsequenzen für Transkriptom und Proteom. Hinzu kommen Funktionen in der intrazellulären Immunantwort und der Genom-Regulation.

Grundlage ist das Zusammenspiel kleiner RNAs (microRNAs, siRNAs; ca. 21-26 Nukleotide) mit verschiedenen Proteinkomponenten, welches es der Zelle u.a. ermöglicht, RNAs endogenen oder exogenen Ursprungs abzubauen, zwischenzulagern oder deren Translation zu inhibieren. MicroRNAs werden in der Zelle von Introns oder Exons (70%) und intergenischen Regionen (30%) transkribiert. Dabei entstehen zunächst sogenannte Stamm-Schleife-Strukturen (engl. stem loops), in diesem Stadium als pri-miRNAs (primary-miRNA) bezeichnet, die in Folge intranukleärer Prozessierung durch das Enzym Drosha als pre-miRNAs mittels Exportin-5 aus dem Zellkern exportiert werden (siehe Abb. 1.1). Im Cytoplasma wird die pre-miRNA durch das Enzym Dicer weiter prozessiert, so dass letztlich eine ssRNA entsteht, die eine Translationsinhibition oder eine Degradation der Ziel-RNA bewirken kann.

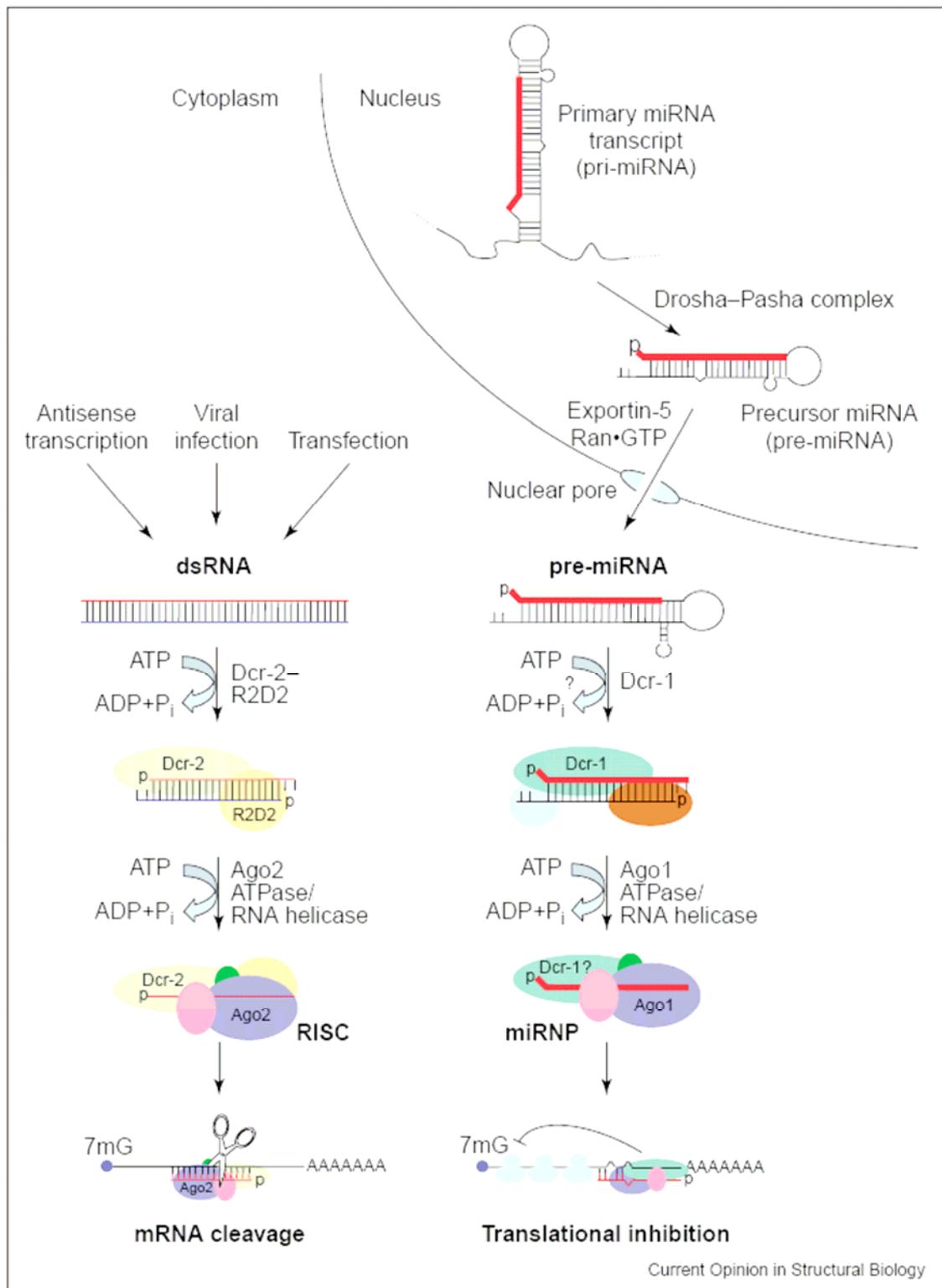


Abb. 1.1: Möglichkeiten der RNA-Interferenz, aus [2]

SiRNAs können durch Transkription beider Stränge bestimmter endogener Gen-Loci entstehen, oder durch Prozessierung von intrazellulärer dsRNA, die z.B. auch exogenen Ursprungs (Viren etc., Gentherapie) sein kann. Hier wird die dsRNA durch Dicer bearbeitet und in den RISC Komplex (RNA induced silencing complex) eingeführt, der die Erkennung und Verarbeitung der Ziel RNA (RNA, welche komplementär zu dem im RISC befindlichen RNA Fragment ist) vornimmt. Diese Prozessierung besteht in vielen Fällen in der Spaltung der Ziel (m)RNA. Bei Spezifität und Targetingeffizienz spielen Struktur und thermodynamische Eigenschaften der siRNA aber auch Struktur der Zielsequenz [38, 39] eine wichtige Rolle.

Grundsätzlich bestehen viele Parallelen in miRNA/siRNA-Biogenese und den jeweiligen Effektormechanismen. Unterschiede finden sich v.a. im Ursprung der beiden Molekülarten und den Targets (zur Übersicht: [40]); so haben endogene siRNAs häufig Targets desselben Genlocus von dem sie abstammen (sog. auto-silencing), miRNAs wirken dagegen auf die Transkripte anderer Loci (sog. hetero-silencing).

Attraktiv sind diese regulatorischen Systeme wegen der Effizienz der Herunterregulation (engl. knock-down) bestimmter Ziel-RNAs, weshalb sich RNAi zu einem weiten Feld biologischer und medizinischer Grundlagenforschung entwickelt hat, aber auch heute schon als Standardmethode in Labors etabliert ist (zur Übersicht: [41]).

Die Targeting-Effizienz ist unabhängig von der Menge der vorhandenen Ziel-mRNA, wie Detwiler et al. [42] zeigen konnten: ein durch Hypoxie bedingter Anstieg der VEGF-A Expression in HT1080 Zellen hatte keinen Einfluß auf die Effizienz des siRNA Targetings von VEGF-A.

Klassische Knock-out Modelle können so z.B. durch Knock-down Modelle ersetzt werden, zudem sind Untersuchungen möglich, die bisher auf Grund lethaler Knock-outs nicht möglich waren. Ebenfalls erweitert RNAi das Methodenspektrum im Hochdurchsatzbereich (engl. high throughput) und trägt damit zur schnelleren Aufklärung von Reaktionswegen bei [43].

Wie bereits erwähnt, ermöglichen hohe Spezifität des Targetings und Ausnutzung intrazellulärer Mechanismen den Eingriff in die RNA-Regulationsebene, wodurch es möglich wird, (onkogene) Proteine schon vor ihrer Entstehung auszuschalten. In der Praxis ergeben sich allerdings eine Reihe von kritischen Punkten, die es zu beachten gilt (zur Übersicht: [44]). So steht am Anfang die Auswahl einer Zielsequenz und die

Ableitung einer entsprechenden siRNA. Hierfür stehen verschiedene Programme und Algorithmen zur Verfügung, die z.T. auch von (Biotech)Firmen zur kostenfreien Nutzung bereitgestellt werden. Sowohl die Struktur der mRNA, als auch Struktur der siRNA spielen eine Rolle im Targeting. Probleme können sich aber nicht nur aus sterischen Gründen ergeben, sondern gewisse RNA-Motive werden von TLRs (toll-like receptors) erkannt und können eine Immunantwort auslösen [45-47]. Sioud [48] konnte in diesem Zusammenhang zeigen, dass ss-siRNAs immunstimulierender wirken als ds-siRNAs. Auch sogenannte off-target Effekte können auftreten, indem andere Sequenzen als die ausgewählte vom Targeting betroffen werden. Wesentlich ist auch die Stabilität der siRNA im Hinblick auf den Abbau durch Endo- bzw. Exonukleasen, sowohl in vitro als auch in vivo. Deshalb kommen bereits eine Vielzahl chemischer Modifikationen in siRNAs zum Einsatz [49, 50], die vor Nukleasen schützen, die Kinetik der siRNAs verbessern und off-target Effekte verringern sollen [51].

Weiterhin muss geklärt werden, ob ein transientes Targeting oder ein stabiles Targeting mittels Expressionsvektoren beabsichtigt wird.

Schwierig gestaltet sich der Transport von siRNAs in definierte Zellen in vivo (z.B. Krebs-Stammzelle, Tumorzellen). Hierbei ergibt sich vor allem die Frage nach dem Vektor zum Transport (engl. delivery). Einen Überblick über in vivo delivery von siRNAs gibt z.B. Aigner [1, 52]. Immer mehr Studien belegen die Realisierbarkeit eines in vivo-Targetings durch siRNAs [53-55] bzw. siRNA-Expressionssysteme [56]. In Abschnitt 1.6 werden einige der gängigen Transfektionsvehikel genannt, wobei der besondere Schwerpunkt aber auf dem in Abschnitt 1.7 beschriebenen kationischen Polymer Polyethylenimin (PEI) liegt.

## **1.6 Vektoren für eine RNAi-basierte Krebstherapie**

Bei einer möglichen, auf RNAi basierenden Therapie bedarf es effektiver Vektoren zum Einbringen der siRNAs (oder DNAs im Falle von Expressionsvektoren) in Zellen. Man findet derzeit verschiedenste Vektoren für diesen Zweck (zur Übersicht: [57]).

Viren werden wegen ihrer natürlichen Fähigkeit Zellen zu infizieren und der damit verbundenen hohen Transfektionseffizienz schon lange als Transfektionsvektoren untersucht. Risiken ergeben sich aber durch deren immunogene Eigenschaften sowie möglicher Insertionen ins Genom und der damit verbundenen Mutagenese, welche ebenfalls Krebs auslösen kann.

Liposomen werden ebenso genutzt, um Nukleinsäuren zu applizieren (zur Übersicht: [58]). In der Regel handelt es sich dabei um micelläre Strukturen mit einer oder mehreren Lipidschichten, die die zu transportierenden Nukleinsäuren umschließen. Einige neuere Studien zeigen, wie durch modifizierte Liposomen siRNAs besser in Zellen eingebracht werden können [59]. Hassani et al. [60] zeigen die Lipid-vermittelte in vivo Delivery von siRNA.

Guo et al. konnten in vitro [61, 62] und in vivo [63], siRNA-Delivery mittels RNA-Nanopartikeln zeigen.

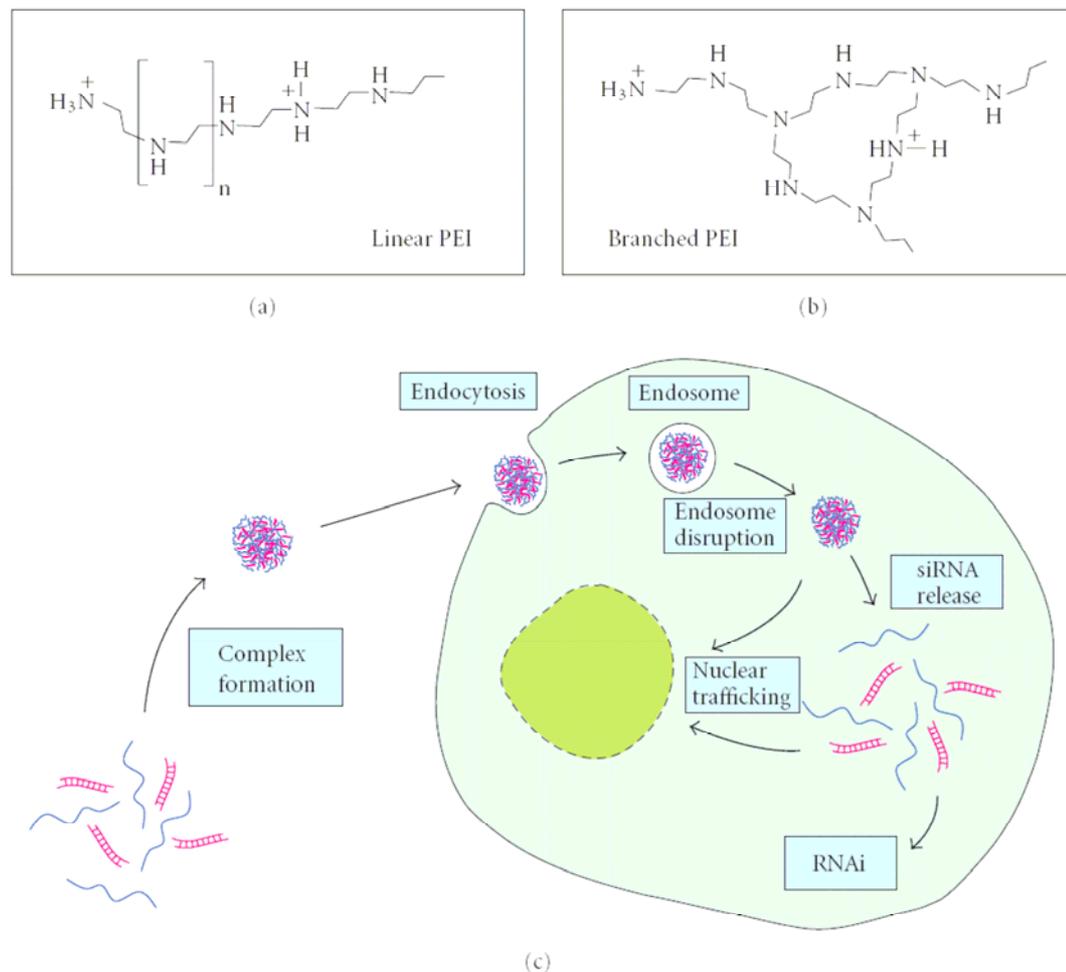
Eine hydrodynamische Applikation von siRNAs, wie am Mausmodell gezeigt [64], ist beim Menschen nicht möglich, da hier große Volumina (im Verhältnis zum Gesamtblutvolumen) venös verabreicht werden müssten. Zudem sind die siRNAs nicht vor Abbau durch Nukleasen geschützt und erreichen nur auf unspezifischem Weg ihre Wirkorte.

Die bestehende Lücke der in vivo-Delivery von siRNAs könnte jedoch von Polyethylenimin (siehe folgender Abschnitt) geschlossen werden.

## **1.7 Polyethylenimin (PEI)**

Bei Polyethylenimin (PEI) handelt es sich um ein kommerziell erhältliches Polymer (siehe Abb. 1.2). Durch die enthaltenen Stickstoffatome ist PEI positiv geladen und eignet sich somit gut, negativ geladene Oligonukleotide zu komplexieren. Verschiedene Syntheseverfahren erlauben die Herstellung linearer und verzweigter PEIs unterschiedlicher Größe. Für die Transfektionseffizienz ist das Verhältnis der Zahl der N-Atome im PEI zur Zahl der Phosphoratome der DNA bzw. RNA entscheidend, und es gilt das optimale N/P Verhältnis für jedes PEI bzw. jede Zelllinie zu ermitteln. Nach Komplexierung tragen die entstandenen Komplexe eine positive Nettoladung. Durch Interaktion mit der Zellmembran kommt es zur Endozytose der Komplexe. Verzweigte PEIs bilden kleinere Komplexe und weisen höhere Transfektionseffizienzen auf als lineare PEIs (zur Übersicht: [65]). In Endosomen können freie N-Atome des PEI Protonen anlagern, wodurch es zu einem Nachstrom von Gegenionen wie Chlorid aber auch von H<sub>2</sub>O in das Endosom kommt. Gleichzeitig wird durch die Protonenakzeptorfunktion der PEIs die Ansäuerung des Endosoms abgepuffert, und damit der Abbau von siRNAs durch Nukleasen, die im saurem Milieu des Endosoms

aktiv sind, verhindert. In der letzter Konsequenz führt dieser Vorgang, auch als „proton sponge effect“ bekannt, zur osmolytischen Auflösung der endosomalen Vesikel (siehe Abb. 1.2) [66]. Wie genau die transportierten Oligonukleotide dann in den Zellkern gelangen (v.a. auch in wenig teilungsaktiven Zellen), ist noch weitgehend unbekannt [67, 68] (zur Übersicht: [69]).



**Abb. 1.2** Struktur von linearem PEI (a) und verzweigtem PEI (b) sowie Transportweg in die Zelle (c) aus Ref. [1]

Um jedoch die Toxizität von PEIs weiter zu senken und ein spezifisches Targeting zu ermöglichen, zeigen einige Studien die Verwendung modifizierter PEIs. Zu den Modifikationen gehören z.B. Kopplung mit Polyethylenglycol (PEG) [70-73], Melittin [74, 75], Cyclodextrin [76, 77], g-Chitosan [78], Sulfonamiden [79], Hydrazin [80], Folat [81], PEG-Folat [82] und NLS (nuclear localization signal) [83].

Der Einbau von z.B. PEG führt unter Umständen spaltbare Bindungen in das PEI ein, verbessert ausserdem dessen Löslichkeit und vermindert unspezifische Interaktionen mit Serumproteinen.

Unterschiede in Toxizität und Transfektionseffizienz ergeben sich sowohl durch Molekülgrößen [84-86] als auch durch den Verzweigungsgrad [87-89]. Verzweigte PEIs haben oft bessere Transfektionseffizienzen als unverzweigte PEIs gleicher Masse, was aber mit einer höheren Zytotoxizität einhergeht. Es wird eine Interaktion aggregierter kationischer Komplexe mit der Zellmembran vermutet, die zu deren Destabilisierung und letztlich zur Nekrose der betroffenen Zellen führt, und somit für die Toxizität verantwortlich ist [90, 91]. Boeckle et al. zeigten, dass auch freie Polymermoleküle zur Toxizität beitragen [92]. Ein Vorteil von PEIs ist u.a. auch der Schutz der komplexierten Nukleinsäuren vor DNasen bzw. RNasen, wie z.B. Godbey et al. [93], Ge et al. [94] und Urban-Klein et al. [95] zeigten.

Die Möglichkeit der *in vivo* delivery von siRNAs mit PEI konnte für kommerziell erhältliche PEIs z.B. von Urban-Klein et al. [95] und Grzelinski et al. [96] gezeigt werden. Da bezüglich molekularer Masse und Verzweigungsgrad stark unterschiedliche PEIs existieren, gilt es für die *in vivo* delivery von siRNAs optimal geeignete PEIs zu finden bzw. die Transfektionseffizienz vorhandener PEIs zu optimieren. Auch sind Einflußgrößen wie z.B. Komplexierungsmedium oder Lagerung im Hinblick auf Transfektionseffizienz zu evaluieren. Für DNA beschrieben wurde u.a. der Einfluß von Gefriertrocknen sowie Langzeit-Lagerung auf das Transfektionsverhalten *in vitro* von PEI-DNA-Komplexen [97]. Werth et al. [84] beschreiben sowohl für PEI-siRNA-Komplexe als auch für PEI-DNA-Komplexe den Einfluß des Komplexierungsmediums auf die Transfektionseffizienz frischer und lyophilisierter Komplexe *in vitro*.

## **1.8 Zielsetzung**

Ziel der Arbeit war zum einen die Charakterisierung des Transfektionsverhaltens von PEI-F25-LMW nach verschiedenen Lagerungsbedingungen (z.B. Lagerung bei Raumtemperatur, -20°C etc.) und Analyse entsprechender Zytotoxizitäten in vitro für DNA und RNA.

Zum anderen sollte ebenfalls in vitro die Herunterregulation von VEGF in den Prostatakarzinomzelllinien PC-3 und Du145 mittels PEI-F25-LMW-siRNA-Komplexen untersucht werden. Hier galt es v.a. den Einfluß von VEGF als möglichem autokrinen Stimulator auf das Proliferationsverhalten dieser Zelllinien zu zeigen.

In vivo sollte die Wachstumskinetik von Du145 Zellen im subkutanen Tumormodell an athymischen Nacktmäusen analysiert werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Gerätebezeichnung	Hersteller
Optipure Analytical (Reinstwasseranlage)	MembraPure, Bodenhausen
pH-Meter GPHR 1400 A	Greisinger Electronic, Regenstauf
Varioklav 500E Dampfsterilisator	Greisinger Electronic, Regenstauf
Mikrowelle	Sharp Electronics, Hamburg
Inkubator	Forma Scientific, Marietta, Ohio, USA
Schüttelinkubator	Forma Scientific, Marietta, Ohio, USA
Einhängethermostat Julabo MP	Julabo Labortechnik, Seelbach
Digitaler Blockheizer HX-2	peqLAB, Erlangen
Heizblock Digitherm	SEL Laboratory Products, England
Magnetrührer IKAMAG®REO	IKA, Staufen
Eppendorf Biophotometer und DPU-414 thermal printer	Eppendorf, Hamburg
Helios $\gamma$ (Photometer)	Unicam Instruments, Cambridge, UK
MRX Microplate Reader	Dynatech Laboratories, Denkendorf
Gene Amp PCR System 2400	Perkin Elmer Instruments, Rodgau-Jügesheim
LightCycler 2.0	Roche Diagnostics, Penzberg
Sterilbank Hera Safe	Heraeus Instruments, Hanau
Zellkultur-Inkubator: CO <sub>2</sub> water jacketed incubator	Forma Scientific, Marietta, Ohio, USA
Nalge™ Cryo 1°C Freezing Container	Nalge Nunc, Rochester, NY, USA
Durchlichtmikroskop Wilovert A	Hund, Wetzlar
Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axiovert 200M, AxioCam MRC, Software AxioVision Rel. 4.3	Carl Zeiss, Oberkochen
FB12 Luminometer	Berthold, Vista, CA, USA
Vortex Genie™ 2	Scientific Industries, Bohema, NY, USA

Vortexer VF	Janke + Kunkel, IKA- Labortechnik, Staufen
Heraeus Biofuge pico	Heraeus Instruments, Hanau
Eppendorf Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Heraeus Megafuge 1.0R	Heraeus Instruments, Hanau
Sorvall RC-5 Superspeed Refrigerated Centrifuge	Du Pont Instruments, Bad Nauheim
Laborwaage Sartorius 1264MP	Sartorius, Göttingen
Feinwaage Mettler AE200	Mettler-Toledo, Giessen
Mikropipetten, Gilson Pipetman	Gilson, Middleton, WI, USA
Mikropipetten, Beta Pette	CLP, San Diego, CA, USA
Pipettierhilfe pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Multipette plus	Eppendorf, Hamburg
Distri-man	Gilson, Middleton, WI, USA
Digital-Kamera Kodak EasyShare DX6440	Kodak, Stuttgart

### 2.1.2 Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Hersteller
50 mm Filter Unit 250 ml	Nalge Nunc, Rochester, NY, USA
Nitrozellulosefilter	Schleicher & Schuell BioScience, Dassel
Spin-X .22 Centrifuge Tube Filter	Corning, NY, USA
Millex®-GS syringe driven filter unit (0,22 µm)	Millipore, Bedford, MA, USA
Rotilabo®-Spritzenfilter 0,22 µm	Roth, Karlsruhe
Sterilfilter FP Point 2-S 0,2 µm	Schleicher & Schuell, Dassel
Spritzen, 1 ml	BD Biosciences Clontech, Heidelberg / Transcoject
Spritzen 5 ml, 10 ml, 20 ml	B. Braun, Melsungen
Kanüle, Ø 0,8 mm, Ø 0,45 mm	B. Braun, Melsungen
Einmalskalpelle, (FEATHER®) versch. Größen, steril	pfm, Köln
Pasteur-Pipetten	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Pipettenspitzen, 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht-Rommelsdorf

Pipettenspitzen, Gilson Diamond DL10, D200	Gilson, Middleton, WI, USA
MULTI Guard Filterspitzen	Sorensen BioScience, Utah, USA
Combitips für Multipette 5 ml, 10 ml oder 5 ml, 10 ml Biopur	Eppendorf, Hamburg
DistriTip maxi 12,5 ml und DistriTip mini 1250 µl für Distriman, je steril oder unsteril	Gilson, Middleton, WI, USA
2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml Einmal-Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht-Rommelsdorf
6-, 24-, 96-Zellkultur-Platten	Sarstedt, Nümbrecht-Rommelsdorf
Zellkultur Multiwellplatte, Cellstar® 12 well	Greiner bio-one, Kremsmünster
Zellkulturflaschen 25, 75 und 175 cm <sup>2</sup>	Sarstedt, Nümbrecht-Rommelsdorf
Petrischalen, versch. Größen	Cellstar, Briercroft, Texas, USA
Mikroschraubröhre, 2ml	Sarstedt, Nümbrecht-Rommelsdorf
15 ml, 50 ml Reagenzröhren	Sarstedt, Nümbrecht-Rommelsdorf
1,5 ml / 2 ml Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht-Rommelsdorf
Polystyrol-Rundbodenröhrchen (75*12mm)	Sarstedt, Nümbrecht-Rommelsdorf
PCR-tubes 0,2 ml	Roth, Karlsruhe
Cloning Cylinder, Polystyrene, steril, versch. Größen	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Zellkulturschaber, cell scraper 16 cm	Sarstedt, Nümbrecht-Rommelsdorf
LightCycler Capillaries 20 µl	Roche Diagnostics, Penzberg

### 2.1.3 Chemikalien, Puffer und andere Reagenzien

Standard-Reagenzien, die nicht in der folgenden Tabelle gelistet sind, wie z.B. NaCl, Tris, HEPES usw. wurden von den Firmen Carl Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Merck (Darmstadt) und Fluka BioChemika (Neu-Ulm) bezogen und entsprachen p.a. Definitionen.

Bezeichnung	Hersteller
peqGOLD TriFast <sup>TM</sup>	peqlab Biotechnologie, Erlangen
RNase Erase®	Qbiogene, Heidelberg
peqGold Universal Agarose	peqlab Biotechnologie, Erlangen
PBS (phosphate buffered saline) steril	PAA Laboratories, Cölbe

PEI-F25-LMW	Sabrina Höbel, FB Medizin, Institut für Pharmakologie und Toxikologie Marburg
jetPEI™	Qbiogene, Heidelberg
Metafectene™	Biontex Laboratories, München
Forene® (Inhalationsnarkotikum)	Abbot, Wiesbaden

#### 2.1.4 Kits und Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
Luciferase Assay System	Promega, Madison, WI, USA
Cell Proliferation Reagent WST-1	Roche, Mannheim
CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay	Promega, Madison, WI, USA
Random hexamer primer	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
dNTP-Mix (10 mM)	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
DyNAmo™ Capillary SYBR Green 2-step qRT-PCR Kit F-440S	NEB, Ipswich, MA, USA
QuantiTect™ SYBR®Green PCR Kit	Qiagen, Hilden
DuoSet ELISA Development System human VEGF	R & D Systems, Minneapolis, MN, USA
DuoSet ELISA Substrate Reagent Pack	R & D Systems, Minneapolis, MN, USA
EvenCoat Goat Anti-mouse IgG Microplates	R & D Systems, Minneapolis, MN, USA
Plasmid DNA Purification NucleoBond	Macherey-Nagel, Düren

#### 2.1.5 Bakterien, Zelllinien, Zellkultur

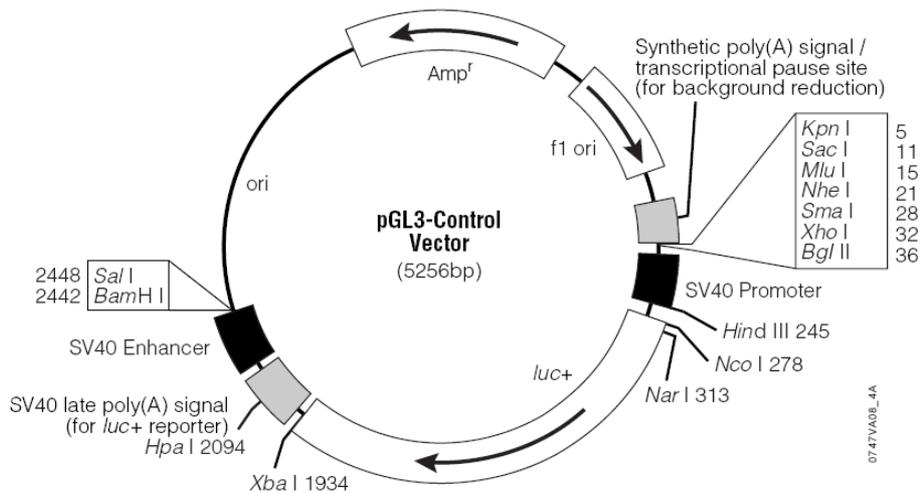
Bezeichnung	Hersteller
SKOV-3 Zellen	ATCC, Manassas, VA, USA
SKOV-3-Luc-10-Zellen	Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Philipps-Universität Marburg
PC-3 Zellen	ATCC, Manassas, VA, USA
Du145 Zellen	ATCC, Manassas, VA, USA
IMDM-Medium	PAA Laboratories, Cölbe

FCS (fötales Kälber-Serum), steril	PAA Laboratories, Cölbe
MEM10x Medium	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
PBS ( phosphate buffered saline) steril	PAA Laboratories, Cölbe
Viralex™ Trypsin/EDTA	PAA Laboratories, Cölbe
MycoKill AB, 50x	PAA Laboratories, Cölbe
Penicillin-Streptomycin, 100x	PAA Laboratories, Cölbe
G418	PAA Laboratories, Cölbe
E.coli DH5α	Pharmacia, Erlangen
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kanamycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

### 2.1.6 Oligonukleotide und Vektoren

Bezeichnung	Hersteller
LG2 (Luciferase GL2 siRNA) unspezifisch 5'-CGUACGCGGAUUACUUCGATT-3'	MWG Biotech, Ebersberg
LG3 (Luciferase GL3 siRNA) spezifisch 5'-CUUACGCUGAGUAGUUGCATT-3'	MWG Biotech, Ebersberg
LA5 (Luciferase-siRNA) spezifisch	Dr. A. Aigner, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Philipps-Universität Marburg
EGFP-1 siRNA 5'-GCAGCACGACUUCUUCAAGTT -3'	Ambion, Austin, Texas, USA
VE1 (VEGF-siRNA) 5'-GGAGGAGGGCAGAAUCAUCTT-3'	Ambion, Austin, Texas, USA
VA1 (VEGF-siRNA)	Dr. A. Aigner, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Philipps-Universität Marburg
VA4 (VEGF-siRNA)	Dr. A. Aigner, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Philipps-Universität Marburg
VEGF Primer (hin) QT-PCR 5'-GCA AAC CAG CAG AAA GAG GA-3'	MWG Biotech, Ebersberg

VEGF Primer (rück) QT-PCR 5'-GTC ACT CAC TTT GCC CCT GT-3'	MWG Biotech, Ebersberg
Actin Primer (hin) QT-PCR 5'-CCA ACC GCG AGA AGA TGA-3'	MWG Biotech, Ebersberg
Actin Primer (rück) QT-PCR 5'-CCA GAG GCG TAC AGG GAT AG-3'	MWG Biotech, Ebersberg
DNA- Luciferase Expressions-Vektor pGL3-Control siehe Abb. 2.1	Promega, Mannheim
DNA- eGFP Expressionsvektor-Vektor pEGFP-N1 siehe Abb. 2.2	Clontech, Mountain View, CA,USA



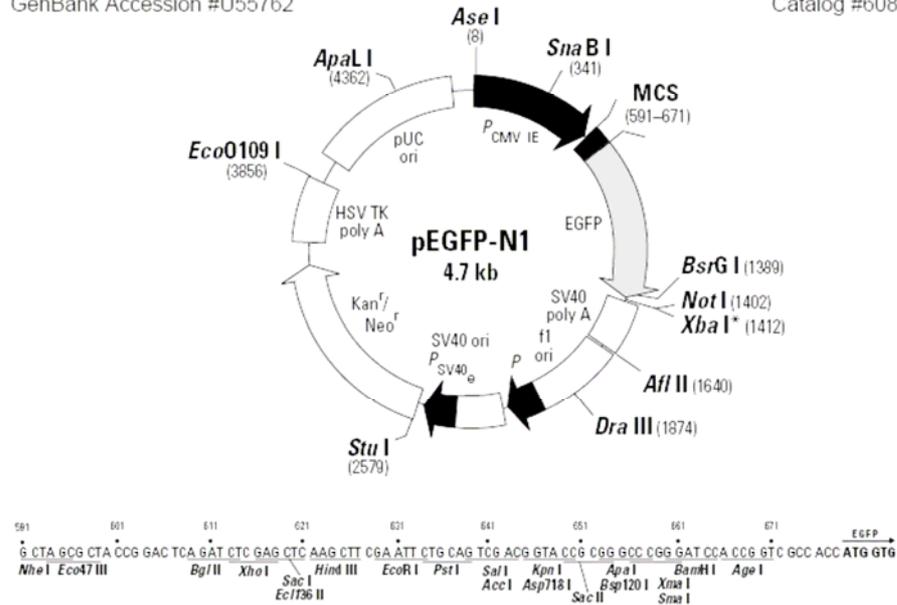
**Abb. 2.1** Vektor pGL3-Control von Promega

**pEGFP-N1 Vector Information**

GenBank Accession #U55762

PT3027-5

Catalog #6085-1



**Abb. 2.2** Vektor pEGFP-N1 von Clontech

**2.1.7 Versuchstiere**

Athymische Nacktmäuse (Hsd: Athymic Nude-Foxn1 nu/nu): Harlan, Indiana, USA.

Die Tiere wurden nach den Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes gehalten.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Transformation von *E. coli* und Bakterienkultur

Zur Transformation von *Escherichia coli* mit dem Plasmid pGL3-Control wurden Kryostocks kompetenter *E. coli* DH $\alpha$  5 Zellen verwendet. Dazu wurde ein Kryostock mit 100  $\mu$ l Bakteriensuspension auf Eis aufgetaut und anschließend eine Pipettenspitze, die zuvor in eine Plasmid-enthaltende Lösung getaucht wurde, in der Bakteriensuspension umgerührt. Anschließend wurde die Suspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 90 sec bei 42°C inkubiert. Nach 5 min. Inkubation auf Eis wurden 400  $\mu$ l LB-Medium hinzugegeben und für 1 Stunde bei 37°C und 250 rpm im Schüttler inkubiert. Von der Suspension wurden dann 100  $\mu$ l bzw. 20  $\mu$ l auf LB-Amp-Agar-Platten ausgestrichen und die Platten über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Am folgenden Tag wurde von einer Platte eine einzelne Kolonie gepickt und in 2 ml LB-Medium angeimpft und für 2 h bei 37°C und 250rpm schüttelnd inkubiert. Die entstandene Vorkultur wurde komplett in 200 ml LB-Medium überführt und bei 37°C und 250 rpm über Nacht inkubiert. Vor Ernte der Bakterien wurden Kryostocks derselben angefertigt. Dazu wurden 1 ml Bakteriensuspension entnommen und mit 400  $\mu$ l Glycerin in einem 2 ml Schraubröhrchen vermischt und bei -80°C gelagert. Alternativ wurden aber auch 900  $\mu$ l Bakteriensuspension mit 100  $\mu$ l DMSO vermischt und bei -80°C gelagert.

Um Kontaminationen zu vermeiden wurde bei allen Schritten neben der Flamme eines Brenners gearbeitet.

LB-Medium: 5 g/L Hefeextrakt

10 g/L Baktotrypton

10 g/L NaCl

für Agarplatten: 15 g/L Agar Agar

Nach dem Autoklavieren und Abkühlen wurde das hitzeempfindliche Antibiotikum Ampicillin (oder Kanamycin im Falle von pEGFP-N1) steril hinzugegeben und auf eine Endkonzentration von 50  $\mu$ g/ml eingestellt. Der Agar wurde vor dem Gießen der Platten erhitzt und nach Abkühlen auf ca. 55°C wurden entsprechend Antibiotika hinzupipettiert.

### 2.2.2 Plasmidpräparation

Die DNA-Plasmid-Präparation erfolgte mit dem NucleoBond® Kit von Macherey-Nagel im Midi-Format nach Herstellervorschrift. Danach wurden die Bakterien aus der Übernachtskultur mit 5000x g für 15 min bei 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 4 ml Puffer S1 resuspendiert und anschließend 4 ml Puffer S2 hinzupipettiert und gemischt. Nach 5 min Inkubation bei RT wurden 4 ml Puffer S3 hinzugegeben, gemischt, und für 5 min auf Eis inkubiert. Während dieses Inkubationsschrittes wurden die Ionenaustauschchromatographie-Säulen mit 2,5 ml Puffer N2 äquilibriert. Anschließend wurde das Lysat mittels Trichter und im Kit enthaltenem Filter, der zuvor mit Puffer N2 benetzt wurde, direkt auf die Säule aufgebracht. Nachdem das filtrierte Lysat durch die Säule gelaufen war, wurde die Säule mit 2 mal 5 ml Puffer N3 gewaschen. Mit 5 ml Puffer N5 wurde dann die DNA von der Säule eluiert. Anschließend wurde diese mit 3,5 ml Isopropanol präzipitiert und für 30 min bei 4°C und 15000x g zentrifugiert. Der Überstand wurde danach abgenommen und das Pellet mit 2 ml 70% Ethanol gewaschen. Nach Abnahme des Ethanols wurde das Pellet 5 min an der Luft getrocknet und anschließend in 100 µl sterilem ddH<sub>2</sub>O resuspendiert und bei 4°C oder -20°C gelagert.

Zusammensetzung der Puffer:

Puffer S1: 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A, pH 8,0

Puffer S2: 200 mM NaOH, 1 % SDS

Puffer S3: 2,8 M Kaliumacetat, pH 5,1

Puffer N2: 100 mM Tris, 15 % Ethanol, 900 mM KCl, 0,15 % Triton X-100, eingestellt auf pH 6,3 mit H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>

Puffer N3: 100 mM Tris, 15 % Ethanol, 1,15 M KCl, eingestellt auf pH 6,3 mit H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>

Puffer N5: 100 mM Tris, 15 % Ethanol, 1 M KCl, eingestellt auf pH 8,5 mit H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>

### 2.2.3 RNA-Präparation

Die RNA-Präparation erfolgte mit peqGOLD TriFast™ nach Hersteller-Handbuch. Jeweils 1 ml TriFast-Zelllysat in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden aufgetaut und mit 200 µl Chloroform versetzt, geschüttelt und für 5 min bei RT inkubiert. Danach

wurde in einer Tischzentrifuge bei 13000 rpm für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden in neue Reaktionsgefäße überführt und mit 500 µl Isopropanol versetzt und fünfmal invertiert. Nach 5 min Inkubation bei RT wurde für 25 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und auf das Pellet wurden 1 ml eiskalter Ethanol (70% Ethanol in DEPC-Wasser) gegeben. Nach Zentrifugation für 10 min bei 13000 rpm und 4°C wurden die Überstände abgenommen, das Pellet ca. 5 min an der Luft getrocknet und anschließend in 12 µl sterilem DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen.

#### **2.2.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

RNA- bzw. DNA-Konzentrationen wurden mittels Photometer gemessen. Durch Eingabe der jeweiligen Nukleinsäure (RNA bzw. DNA) und Verdünnung berechnete das Gerät automatisch Konzentration und Proteingehalt der Proben. Das Gerät hat die Absorption bei 260 nm gemessen und legte für DNA bei Absorption 1 den Faktor 50 µg DNA pro ml, für RNA 40 µg pro ml zu Grunde. Der Proteingehalt wird aus der Ratio Abs. 260 nm / 280 nm bestimmt. Die Ratios lagen zwischen 1,7 und 1,9.

#### **2.2.5 Zellkultur**

In dieser Arbeit wurde mit den Ovarialkarzinomzelllinien SKOV-3 und SKOV-3-Luc-10 (die stabil Luciferase exprimiert) sowie den Prostatakarzinomzelllinien PC-3 und Du145 gearbeitet. Bei allen Zelllinien handelt es sich um adhärent wachsende Zellen. Die Zelllinien wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> steril kultiviert. Für alle Zellen wurde IMDM 10% FCS als Nährmedium verwendet (so nicht für Experimente anders angegeben). Die Kultivierung erfolgte in Zellkulturflaschen mit 75 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche. Zur Passage der Zellen wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit 3 ml PBS (vorgewärmt auf 37°C) gewaschen. Nach Abnahme des PBS wurden 2-3 ml Trypsin-EDTA auf die Zellen pipettiert und für 2-5 min bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Danach wurde das Trypsin mit 4-8 ml IMDM 2%, 5% oder 10% FCS abgestoppt. Zur Zellzahlbestimmung wurden die Zellsuspension gut geschüttelt und anschließend wurde mit einer Pasteurpipette ein Tropfen Suspension entnommen und in eine Neubauerzählkammer gegeben. Es wurden 4 oder 8 große Quadrate der Zählkammer ausgezählt und die Zellzahl wie folgt berechnet:

Zellzahl pro ml = (gezählte Zellzahl / 4 oder 8) x 10000

Die benötigten Zellzahlen wurden in entsprechenden Volumina und mit gewünschtem Serumgehalt in Zellkulturgefäße eingesät. Nicht benötigte Zellen wurden entweder verworfen, weiterkultiviert oder eingefroren.

Zum Einfrieren von Zellen wurden diese wie oben beschrieben abgelöst. Anschließend wurden sie in 15 ml Röhren bei 23°C mit 1000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in 2 ml Einfriermedium (IMDM 20% FCS, 5% DMSO) resuspendiert. Daraus wurden 2 Aliquots in 2 ml Schraubenröhren pipettiert und in einer Nalgene Cryo Box bei -80°C eingefroren und später in andere Behältnisse bei -80°C umgelagert. Je nach Bedarf wurden dann auch Zellen von -80°C in Tanks mit flüssigem Stickstoff umgelagert. Zellen wurden wieder in Kultur genommen, indem sie im Wasserbad bei 37°C aufgetaut wurden und in eine Zellkulturflasche mit ca. 10 ml IMDM 10% FCS überführt wurden. In der Regel erfolgte spätestens nach 24 h ein Mediumwechsel, um das für die Zellen schädliche DMSO zu entfernen.

Um Kontaminationen mit Mycoplasmen zu vermeiden, wurden die Zellen regelmäßig mit Mycokill AB behandelt. Die Zellen wurden dafür 1 bis 2 Wochen in Medium kultiviert, dem Mycokill zugesetzt war.

### **2.2.6 Herstellung von DNA- bzw. RNA-Transfektionskomplexen**

Im Folgenden werden die Begriffe PEI/DNA- bzw. PEI/RNA-Ratio und N/P-Verhältnis verwendet, die deshalb an dieser Stelle erklärt werden. Die PEI/DNA- bzw. PEI/RNA-Ratio gibt das Verhältnis der PEI-Menge zur Nukleinsäuremenge an (angegeben z.B. in µg) und ist ein Massenverhältnis. Das N/P-Verhältnis ist das Verhältnis der Zahl der N-Atome im PEI zur Zahl der Phosphoratome der DNA bzw. RNA und ist ein molares Verhältnis. Bei PEI-F25-LMW entspricht Ratio 10 einem N/P-Verhältnis von 33.

Zum Ansetzen der Komplexe mit PEI-F25-LMW und jetPEI™ wurde eine sterilfiltrierte 150 mM NaCl-Lösung mit 10 mM HEPES und pH 7,4 verwendet, die im Folgenden nur noch als HEPES-NaCl bezeichnet wird. Für einen Versuch wurde statt HEPES-NaCl mit einer sterilen 5% Glucose-Lösung (pH 7,4) komplexiert.

#### 2.2.6.1 Herstellung von DNA- bzw. RNA-Transfektionskomplexen mit PEI-F25-LMW

Das verwendete PEI-F25-LMW wurde in der AG Czubayko / Aigner aus einem kommerziell erhältlichen PEI fraktioniert [84]. Es handelt sich um ein verzweigtes PEI mit einer Masse von ca. 10 kDa.

Bei der Herstellung der Komplexe wurde Ratio 10 eingesetzt. Ein well einer 24-well-Platte wurde mit 0,5 µg DNA transfiziert. Dazu wurden 0,5 µg DNA in 40 µl HEPES-NaCl aufgenommen. 5 µg PEI-F25-LMW wurden ebenfalls in 40 µl NaCl aufgenommen. Anschließend wurde die PEI-F25-LMW-Verdünnung zu der DNA-Verdünnung pipettiert und kurz gevortext. Der Ansatz wurde ca. 1 h bei RT inkubiert. Danach war die Komplexierung abgeschlossen und die Komplexe standen für Experimente zur Verfügung. Analog wurden die PEI-F25-LMW-siRNA-Komplexe angesetzt. Hier wurden jedoch pro well einer 24-well-Platte 0,8 µg eingesetzt, was 60 pmol entsprach.

Die eingesetzten Mengen für andere Plattenformate werden bei den entsprechenden Experimenten genannt.

#### 2.2.6.2 Herstellung von DNA- bzw. RNA-Transfektionskomplexen mit jetPEI

Die Herstellung der Komplexe erfolgte nach Hersteller-Angaben. Hierbei kam ein Verhältnis von 1:2 (DNA/RNA [µg] zu jetPEI [µl]) zur Anwendung. Für ein well einer 24-well-Platte wurden 0,5 µg DNA in 50 µl HEPES-NaCl aufgenommen und 1 µl jetPEI in 50 µl HEPES-NaCl. Die jetPEI-Verdünnung wurde dann zur DNA-Verdünnung pipettiert und kurz gevortext. Nach 20-30 min Inkubation bei RT waren die Komplexe fertig. Die Komplexe mit siRNAs wurden analog dazu angesetzt, jedoch mit 0,8 µg siRNA pro well einer 24-well-Platte.

#### 2.2.6.3 Herstellung von DNA-Transfektionskomplexen mit Metafectene

Die Herstellung der Komplexe erfolgte nach Hersteller-Angaben. Ein Verhältnis von 1:5 (DNA [µg] zu Metafectene [µl]) wurde dabei eingesetzt. Es wurden 2 µg DNA in 200 µl IMDM (serumfrei, Raumtemperatur) verdünnt. 10 µl Metafectene wurden ebenfalls in 200 µl IMDM aufgenommen. Anschließend wurden die beiden Ansätze vereinigt und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gemischt. Nach 15-20 min wurde ein solcher Ansatz komplett zur Transfektion eines wells einer 6-well-Platte verwendet, wobei die Zellzahl versuchsabhängig war.

#### 2.2.6.4 Transfektion von Zellen mit Komplexen

Die Komplexe wurden frisch transfiziert oder unter verschiedenen Bedingungen gelagert. Dazu gehörten Lagerung für 3 d bei RT, 4°C, -20°C, -80°C und flüssiger Stickstoff. Weiterhin wurden Komplexe für 5 min oder 2 h in flüssigem N<sub>2</sub> gelagert, oder für 2 h bei -80°C. Frisch oder nach Auftauen wurden dann die Komplexe auf die Zellen pipettiert und kurz geschwenkt, um eine gleichmäßige Verteilung zu gewährleisten.

#### 2.2.7 Herstellung stabil eGFP-exprimierender klonaler Zelllinien

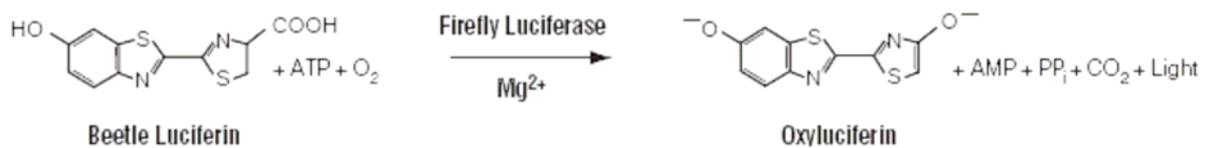
Die Zelllinien SKOV-3, PC-3 und Du145 wurden mit dem Plasmid pEGFP-N1 wie in Abschnitt 2.2.6.3 beschrieben transfiziert. Hierbei wurde im 6-well-Format gearbeitet. Es wurden pro Zelllinie 2 wells á 150000 Zellen ausgesät. 5 h nach Aussat der Zellen, erfolgte die Transfektion wie unter 2.2.6.3 beschrieben, hier mit 2 µg bzw. 3 µg Plasmid-DNA pro well einer 6-well-Platte. Nach ca. 48 h wurde dem Medium das Antibiotikum G418 in einer Konzentration von 1 mg/ml zugesetzt. Fortan wurden die Zellen für 3-4 Wochen bei dieser G418-Konzentration kultiviert, um gegen untransfizierte Zellen zu selektionieren. Nach Ablauf der Selektionierung waren die Zellen stabil und konnten weiter verarbeitet werden.

Mit Hilfe eines Fluoreszenz-Mikroskops konnten die Zellen charakterisiert werden. Zum Einsatz kam ein Filter für die Wellenlänge 460-480nm. Es zeigte sich, dass nicht alle Zellen gleich stark fluoreszierten, da es sich in diesem Stadium noch um massentransfizierte Zellen handelte. Deshalb wurde eine Vereinzelung vorgenommen, um klonale Zelllinien zu erhalten. Dazu wurden die massentransfizierten Zellen gesplittet und in wells einer 96-well-Platte ausgesät, so dass statistisch pro well 5, 2, 1 oder 0,5 Zellen in 200 µl Medium enthalten waren. Die Verwendung mehrerer Zellzahlen ergibt sich aus der Gefahr, durch Zählungenauigkeiten weniger Zellen pro well zu erhalten als berechnet. 24-72 h nach Aussat der Zellen wurden alle wells einer 96-well-Platte unter dem Lichtmikroskop nach einzelnen Zellen abgesucht. Wells mit einzelnen Zellen wurden markiert und einige Tage später unter dem Fluoreszenzmikroskop auf Stärke der eGFP-Expression hin visuell untersucht. Stark leuchtende Klone wurden ausgewählt, zunächst weiterkultiviert, und ab einer Zellzahl von mindestens 100 Zellen pro well gesplittet. Dazu wurden die Zellen in einem well einer 96-well-Platte nach

Abnahme des Mediums zweimal mit 200 µl PBS gewaschen und mit 150 µl Trypsin-EDTA für 2-5 min bei 37°C inkubiert. Es wurde mit 150 µl IMDM 10% FCS abgestoppt. Die Zellen wurden anschließend in wells einer 6-well-Platte überführt oder in Zellkulturflaschen mit 25 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche. Sobald die Zellen im jeweiligen Format konfluent waren, wurden sie weiter in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen kultiviert.

### 2.2.8 Bestimmung von Transfektionseffizienzen mit dem Promega Luciferase Assay

Die DNA- bzw. siRNA-Transfektionseffizienzen wurden quantitativ mit dem Luciferase Assay Kit von Promega bestimmt. Der Assay basiert auf der Umsetzung von Luciferin zu Oxyluciferin durch Luciferase (Abb. 2.3). Bei dieser Reaktion wird Licht freigesetzt. Diese Lichtfreisetzung ist proportional zur Luciferase-Menge in den Zellen.



**Abb. 2.3** Prinzip des Luciferase Assay (Promega)

Für diesen Zweck wurden Komplexe wie unter 2.2.6.1 beschrieben angesetzt und transfiziert. In einem well einer 24-well-Platte waren dafür 40000 Zellen SKOV-3 oder SKOV-3-Luc-10 pro well ausgesät. Es wurden bei jedem Versuch mindestens Doppelansätze bestimmt. 48 h nach der Transfektion wurden die Transfektionseffizienzen bestimmt. Dazu wurde das Medium abgenommen und die die Zellen 15 min mit 100 µl 1x Zell-Lysepuffer (Promega) bei RT inkubiert. Von dem Lysat wurden 10 µl zu 25 µl Luciferase Assay Substrat in ein Polystyrolröhrchen pipettiert und durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Sofort nach dem Mischen wurden mit dem Luminometer relative Lichteinheiten (RLU= relative light units) für einen Zeitraum von 10 sec bestimmt.

### 2.2.9 Bestimmung von Zytotoxizitäten mit dem Promega CytoTox Assay

Die Zytotoxizitäten von F25-PEI-siRNA-Komplexen wurden mit dem CytoTox Assay von Promega bestimmt. Der Assay wurde nach Hersteller-Angaben durchgeführt. Prinzip ist die Messung der Freisetzung von Lactat-Dehydrogenase (LDH) aus lysierten

lebenden Zellen. Die LDH-Aktivität wird als Farbreaktion gemessen, indem es zur Umwandlung eines Tetrazoliums Salzes in ein Formazan (rote Farbe) kommt. Diese Farbreaktion ist proportional zur Anzahl lysierter Zellen.

Die Komplexe wurden wie in 2.2.6.1 beschrieben angesetzt und auch unter verschiedenen Bedingungen für 72 h gelagert. In wells einer 24-well-Platte wurden 40000 Zellen SKOV-3 oder SKOV-3-Luc-10 pro well ausgesät. Alle Bestimmungen wurden in Duplikaten durchgeführt. 72 h nach der Transfektion mit den Komplexen wurde die Überstände von den transfizierten bzw. untransfizierten Zellen abgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt (zur Messung der LDH-Freisetzung). Mit den verbleibenden Zellen wurde eine Transfektionseffizienzbestimmung wie unter 2.2.8 beschrieben durchgeführt. Weiterhin wurden transfizierte bzw. untransfizierte Zellen mit einem Zellkulturschaber samt Medium abgeerntet (inklusive Medium) und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt (zur Messung der maximalen LDH-Menge). Diese wurden anschließend in flüssigen Stickstoff gefroren und im Heizblock bei 65°C wieder aufgetaut, was zweimal durchgeführt wurde, um die Zellen auf diese Weise zu lysieren. Anschließend wurden alle Proben für 5 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Von den Überständen wurden 50 µl entnommen und in wells einer 96-well-Platte pipettiert (je in Duplikaten). Dazu wurden je 50 µl Assay Substrat pipettiert und nach 30 min Inkubation bei RT und unter Lichtausschluß mit 50 µl Stopp-Lösung abgestoppt. Dann wurde die Absorption bei 490 nm gemessen.

Die Berechnung der Zytotoxizitäten erfolgte nach folgender Formel:

$$\left( \frac{LDH\ REL - LDH\ REL_{untr.} * \left( \frac{\max.LDH}{\max.LDH\ untr.} \right)}{\frac{\max.LDH}{\max.LDH\ untr.}} * 100 \right)$$

LDH REL = LDH Freisetzung der transfizierten Zellen

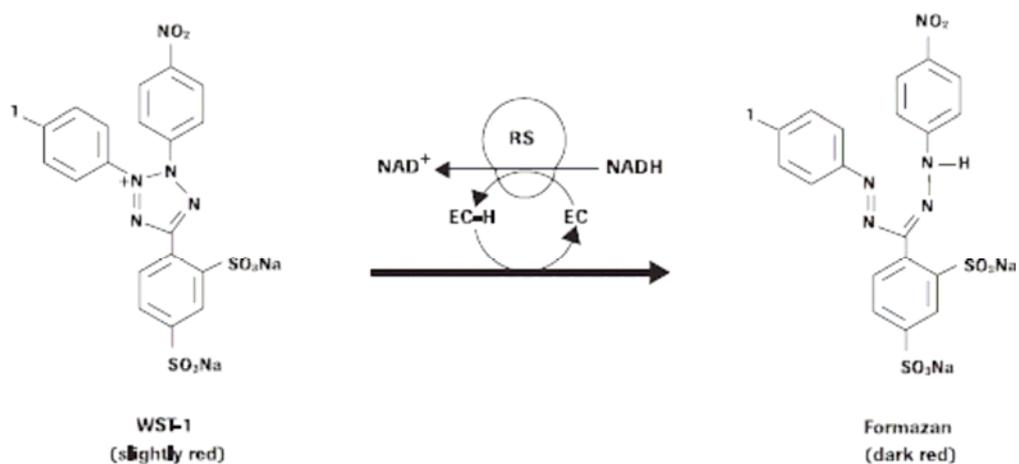
max. LDH = maximale LDH-Menge der transfizierten Zellen

untr. steht für untransfizierte Negativkontrolle

### 2.2.10 Bestimmung der Zahl lebender Zellen nach Transfektion mit PEI-F25-LMW-siRNA-Komplexen

Die Bestimmung der  $EC_{50}$ -Kurven wurde mit dem Cell Proliferation Reagent WST-1 von Roche durchgeführt. Es handelte sich dabei um eine Endpunktbestimmung der Zahl lebender Zellen. WST-1 ist ein Tetrazoliumsalz, welches durch mitochondriale Dehydrogenasen aus lebenden Zellen zu einem Formazan (rote Farbe) oxidiert wird (Abb. 2.4).

Um die  $EC_{50}$ -Kurven für PEI-F25-LMW-siRNA-Komplexe zu bestimmen wurden in wells einer 96-well-Platte je 1500 Zellen PC-3 bzw. Du145 in 200  $\mu$ l IMDM 10% oder 2% FCS ausgesät. Die Komplexe wurden wie in 2.2.6.1 beschrieben angesetzt. Es wurden die siRNA-Mengen 30, 10, 3, 1, 0,3, 0,1 und 0,01 pmol pro well eingesetzt. Der Versuch wurde in Quadruplikaten durchgeführt für die Mengen 0,01-30 pmol und für 100 pmol siRNA in Duplikaten durchgeführt. Alle Komplexe wurden im Transfektionsvolumen mit HEPES-NaCl aufeinander abgestimmt, so dass in jedes zu transfizierende well ein gleiches Gesamtvolumen pipettiert wurde. Als Nullwert wurde eine entsprechende Menge HEPES-NaCl hinzupipettiert. Der Versuch wurde mit bzw. ohne einen Mediumwechsel 5 h nach Transfektion durchgeführt. Nach 72 h wurde das Medium abgenommen und auf jedes well 50  $\mu$ l einer 1x WST-1 Lösung in IMDM 10% FCS pipettiert. Es wurde für eine Stunde bei 37°C und 5%  $CO_2$  inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 450 nm gemessen.



**Abb. 2.4** Umwandlung von WST-1 durch mitochondriale Dehydrogenasen (Roche)

## 2.3 VEGF-Targeting an PC-3 und Du145 Zellen

### 2.3.1 Quantitative RT-PCR

Für die quantitative PCR wurden in 6-wells je 100000 Zellen pro well PC-3 oder Du145 ausgesät. 5-6 h nach Aussat der Zellen wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und die Zellen auf IMDM ohne FCS gesetzt. Transfiziert wurde in Duplikaten mit 1 µg siRNA VA1, VA4 und LA5 pro well wie unter 2.2.61. beschrieben. Dies wurde für 3 bzw. 4 Zeitpunkte parallel durchgeführt. Falls nicht anders angegeben, wurden die Zellen und Medien nach 2, 3, 4 und 7 d gesammelt. Dazu wurde das Medium abgenommen, in 2 Aliquots pro Ansatz aufgeteilt und bei -20°C gelagert. Danach wurde 1 ml TriFast pro 6-well auf die verbliebenen Zellen pipettiert, für 5 min bei RT inkubiert und anschließend in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bei -80°C gelagert (siehe weiter unter 2.2.3 RNA Präparation).

#### 2.3.1.1 RT-PCR

Mit den RNA-Proben (Präparation siehe 2.2.3) wurde zunächst eine reverse Transkription mit der RevertAid™ M-MuLV RT von Fermentas nach Hersteller-Protokoll durchgeführt. Eingesetzt wurden 0,5 µg RNA von jeder Probe. Die RNA wurde zusammen mit 1 µl random primer ad 11 µl mit Nuklease-freiem Wasser in ein PCR-tube pipettiert und anschließend für 5 min bei 70°C inkubiert. Die Ansätze wurden dann auf Eis abgekühlt und es wurde 8 µl Mastermix bestehend aus 4 µl 5x reaction buffer, 2 µl 10 mM 4 dNTP Mix und 2 µl Nuklease-freiem Wasser, hinzugegeben. Nach einer 5 minütigen Inkubation bei 25°C wurde 1 µl M-NuLV RT (=200 units) hinzupipettiert. Es folgten die Inkubationsschritte 10 min 25°C, 60 min 42°C, 10 min 70°C und Abkühlen auf Eis. Die erhaltenen cDNAs wurden bei -20°C gelagert.

#### 2.3.1.2 Quantitative PCR

Die Quantifizierung erfolgte mit dem Roche LightCycler 2.0 unter Verwendung des QuantiTect® SYBR® Green PCR Kits. Ein Ansatz bestand aus 5 µl Quantitect SYBR Green PCR Master Mix, 2 µl Primerpaar (5 µM), 1 µl PCR-grade water und 2 µl einer 1:10 Verdünnung der entsprechenden cDNAs. Als Referenzgen diente Actin. Deshalb kamen für jeden Ansatz Actin-Primer und VEGF-Primer zum Einsatz. Es wurden Duplikate oder Triplikate gemessen. Die einzelnen Ansätze wurden auf Eis pipettiert,

wobei Filterspitzen verwendet wurden. Die kompletten Ansätze wurden in LightCycler Kapillaren überführt und nach Anzentrifugieren in einem Kapillaren-Zentrifugen-Adapter bei 2000 rpm für 5 sec in einen LightCycler Rotor eingesetzt.

Eine PCR beinhaltet folgende Schritte:

1. Initiale Denaturierung: 95°C, 15 min
2. Amplifikation: 95°C, 10 sec  
(50 Zyklen) 55°C, 20 sec  
72°C, 12 sec
3. Schmelzkurve: 95°C, 0 sec
4. Kühlen: 40°C, 10 sec

Die LightCycler-Software berechnete dann CPs (crossing points) der einzelnen Reaktionen (für nähere Informationen sei auf das LightCycler-Handbuch Relative Quantification verwiesen). Mit diesen wurde nach folgender Formel die Actin / VEGF-Ratio berechnet:

$$\text{Ratio} = 2^x \text{ mit } x = (\text{MW}_{\text{CP Actin}} - \text{MW}_{\text{CP VEGF}}); \quad \text{MW: Mittelwert}$$

Für zwei Zeitpunkte wurde zum Vergleich auch eine Quantifizierung mit dem DyNAmo™ Capillary SYBR® Green 2-step qRT-PCR Kit durchgeführt. Einmal erfolgte nur die Quantifizierung mit diesem Kit, es wurde aber auch einmal eine RT mit dem Kit und anschließender Quantifizierung durchgeführt. Es wurde strikt nach Hersteller-Protokoll gearbeitet. Die RT-PCR mit diesem Kit sah wie folgt aus: Für eine Reaktion wurden 10 µl 2x RT Puffer, 1 µl random hexamer primer, 0,5 µg RNA, 2 µl M-MuLV H<sup>+</sup> RT zusammenpipettiert und mit RNase-freiem Wasser ad 20 µl aufgefüllt. Die RT beinhaltet folgendes Programm:

1. 25°C, 10 min
2. 37°C, 60 min
3. 85°C, 5 min
4. 4°C / Abkühlen auf Eis

Für die quantitative PCR wurden 10 µl 2x Master mix, 2 µl Primerpaar (5 µM), 1,6 µl cDNA (1:10 Verd.) zusammenpipettiert und mit RNase-freiem Wasser ad 20 µl

aufgefüllt. Die Ansätze wurden dann in LightCycler Kapillaren überführt. Von hier an ging es weiter wie oben für das QuantiTect Kit beschrieben.

### **2.3.2 VEGF ELISA**

Für VEGF-ELISAs wurden pro well einer 12-well-Platte 50000 Zellen ausgesät. Ca. 5 h nach Aussat der Zellen wurde ein Mediumwechsel auf IMDM ohne FCS durchgeführt (1,5 ml pro well). Transfiziert wurde dann in Triplikaten mit 0,8 µg siRNA (VA1, VA4 und LA5) pro well einer 12-well-Platte wie unter 2.2.6.1 beschrieben. 24 h nach Transfektion wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. 2 d nach Transfektion wurde für den ersten Zeitpunkt das Medium abgenommen und pro Ansatz zwei Aliquots bei -20°C gelagert. Auf die Zellen wurden wieder 1,5 ml serumfreies IMDM gegeben. Nach 3 d und 4 d wurde ebenso verfahren.

Der Assay wurde mit dem DuoSet ELISA Development System von R&D nach Hersteller-Protokoll durchgeführt. Verwendet wurden EvenCoat™ Goat Anti-mouse IgG Microplates ebenfalls von R&D. 100 µl einer 1 µg/ml mouse anti-human VEGF Lösung in PBS wurden dazu in die wells einer 96-well-Platte pipettiert und für 1 h bei RT auf einem Schwenktisch inkubiert. Anschließend wurde jedes well mit 400 µl Wasch-Puffer dreimal gewaschen. Danach wurden 100 µl Probe aufgetragen. Weiterhin wurde eine Standard-Reihe mit dem im Kit enthaltenen rekombinanten humanen VEGF von 2000 µg/ml in 1:1 Verdünnungen bis 31,25 µg/ml aufgetragen. Die Standard-Reihe wurde mit IMDM angesetzt. Wurden ELISAs mit Proben durchgeführt, die Serum enthielten, wurde die Standardreihe ebenfalls mit IMDM in entsprechender Serumkonzentration angesetzt. Nach Auftragen von Proben und Standard mit anschließender zweistündiger Inkubation auf einem Schwenktisch bei RT wurde wie bereits beschrieben gewaschen. Dann wurden pro well 100 µl einer 50 ng/ml Detektions-Antikörper-Lösung (biotinylated goat anti-human VEGF) in PBS-1% BSA pipettiert. Nach wiederum 2 h Inkubation wurde gewaschen wie beschrieben. Dann wurden 100 µl einer 1:200 Verdünnung Streptavidin-HRP Lösung in PBS-1% BSA pro well pipettiert und für 20 min unter Lichtausschluß inkubiert. Wie beschrieben wurde gewaschen und anschließend 100 µl Substratlösung pro well pipettiert und für 20 min unter Lichtausschluß inkubiert. Mit 50 µl Stopp-Lösung pro well wurde dann abgestoppt. Es folgte die Wellenlängenmessung in einem Mikroplattenleser bei 450 nm und 595 nm.

Zur Berechnung wurde aus Meßwerten, die in Duplikaten oder Quadruplikaten für jeweilige Transfektionen erhoben wurden, die Mittelwerte aus 450 nm - 595 nm gebildet und in die durch die Standardreihe gegebene Geradengleichung eingesetzt. 595 nm ist eine Korrektur der Wellenlänge für Artefakte oder Verunreinigungen der Platte.

PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4, 0,2 µm filtriert

Wasch-Puffer: PBS / 0,05% Tween 20, pH 7,4

Substratlösung: 1:1 Mischung aus Color Reagent A (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) und Color Reagent B (Tetramethylbenzidine)

Stopp-Lösung: 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

### **2.3.3 Proliferations-Assay**

Für Proliferations-Assays wurde im 96-well Format gearbeitet. Dazu wurden 250, 500, 750, 1000 oder 1500 Zellen pro well ausgesät. Dies geschah in IMDM serumfrei, 2% FCS oder 10% FCS. Transfiziert wurde mindestens in Quadruplikaten mit 1,5 pmol, 2 pmol oder 6 pmol siRNA (VA1, VA4, VE1 und LA5) pro well. Der Assay wurde mit dem Cell Proliferation Reagent WST-1 von Roche wie unter 2.2.10 beschrieben durchgeführt. Dies geschah je nach Entwicklung der Zelldichte im Abstand von 1 bis 3 d für 5 Zeitpunkte. Der Nullwert wurde entweder 5 h oder 24 h nach der Transfektion gemessen.

### **2.3.4 Soft-Agar**

Der Soft-Agar diente der Messung des adhäsionsunabhängigen Zellwachstums [98]. Für den Assay wurden 300000 Zellen pro 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche in IMDM 10% FCS ausgesät und mit 4,8 µg siRNA (VA1, VE1 und LA5) pro Flasche wie unter 2.2.6.1 beschrieben transfiziert. Nach der Transfektion erfolgte kein Mediumwechsel mehr.

Es wurden 12,5 ml 2,4% Agar hergestellt und autoklaviert. In einer Mikrowelle wurde der Agar aufgeköcht und auf 55°C abgekühlt. Unter der Sterilbank wurden dann in einem 42°C Wasserbad 1,25 ml 10x MEM und 37,5 ml IMDM 10% FCS (bereits auf 42°C) hinzupipettiert. Mit dem entstandenen 0,6% Agargemisch wurden wells einer

6-well-Platte á 1 ml gegossen und in der Sterilbank bei RT abgekühlt (damit entstand der Bodenagar). Die am Vortag transfizierten Zellen wurden nun gesplittet und so eingestellt, dass sich in 1,33 ml 80000 Zellen befanden. Diese wurden mit 2 ml Agargemisch durchmischt und sofort je 800 µl auf den Bodenagar pipetiert und gleichmäßig durch Schwenken verteilt. Dies geschah in Triplikaten für jeden Ansatz. Analog wurde auch ein Soft-Agar in 2% FCS angefertigt. Anschließend wurden die Platten bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Innerhalb der ersten 24 h wurde für jedes well mit Hilfe eines Zählraster-Okulars die Anfangszellzahl bestimmt. Die Inkubation erfolgte je nach Wachstum über 1 bis 4 Wochen. Dann wurden die herangewachsenen Kolonien bei 150-facher Vergrößerung mit Hilfe eines Zählraster-Okulars gezählt. Dabei wurden nur die Kolonien innerhalb eines Zählrasters gezählt, die größer waren als ein Feld des Zählrasters. Die erhaltenen Werte wurden noch durch die Anfangszellzahl dividiert.

## **2.4 In vivo Wachstumskinetik von Du145 Zellen**

Um das Wachstumsverhalten von Du145 Zellen in vivo zu untersuchen wurden zwei athymischen Nacktmäusen (ca. 3 Monate alt) je 2 bzw. 3 Mio Zellen subkutan in die Flanken injiziert. Einer weiteren Maus (ca. 3 Monate alt) wurden in jede Flanke 5 Mio Zellen injiziert. Für diesen Zweck wurden entsprechend Zellen gesplittet. Die benötigte Menge an Zellen wurde bei 1000 rpm und 23°C für 5 min abzentrifugiert und anschließend das Medium abgenommen. Die Zellen wurden im Falle von 2 und 3 Mio Zellen so in PBS aufgenommen, dass in 100 µl 1 Mio Zellen enthalten waren. Im zweiten Fall enthielten 200 µl 5 Mio Zellen. Nach Injektion der Zellen wurde 2-3 mal pro Woche die Tumorgröße nach Länge x Breite x Höhe mit einem handelsüblichen Lineal bestimmt. Nach Versuchsende wurden die Mäuse mit einer Überdosis des Inhalations-Narkosemittels Forene<sup>®</sup> betäubt und durch Überstrecken des Genicks getötet.

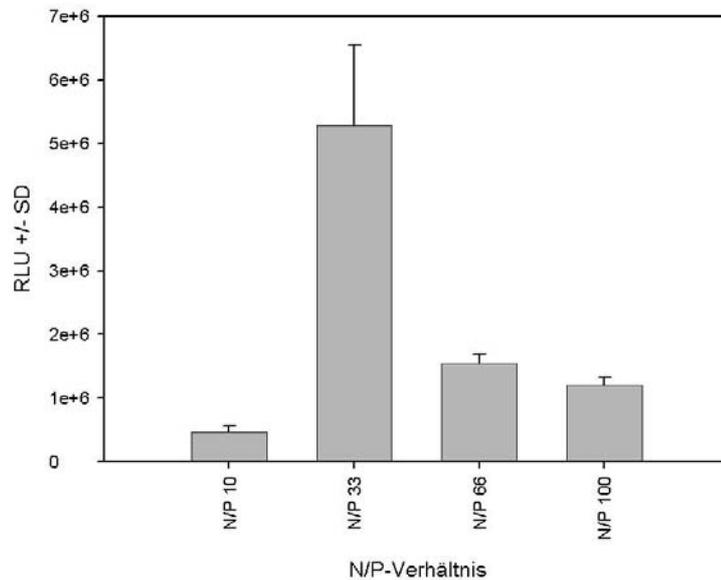
## 3 Ergebnisse

### 3.1 Transfektionseffizienzen von DNA- bzw. siRNA-Komplexen unter verschiedenen Lagerungs- und Transfektionsbedingungen

#### 3.1.1 Ermittlung des optimalen N/P-Verhältnis für Transfektionen mit PEI-F25-LMW

Zur Ermittlung des optimalen N/P-Verhältnis für die Transfektion mit PEI-F25-LMW-DNA-Komplexen wurden 0,5 µg DNA eingesetzt. Die Menge an PEI-F25-LMW wurde für die N/P-Verhältnisse 10, 33, 66 und 100 entsprechend angepasst. Zur Bestimmung wurden SKOV-3 Zellen verwendet. Es zeigte sich die beste Transfektionseffizienz für das N/P-Verhältnis 33 (Abb. 3.1). Bei ca. 1/3 der Versuche erreichte N/P 66 etwa 80% der Transfektionseffizienz von N/P 33. Numerisch lagen die Ergebnisse verschiedener Versuchsreihen oft deutlich auseinander, so dass für eine Versuchsreihe die Werte im Bereich von einigen 100000 RLUs lagen, wohingegen bei anderen Experimenten im Bereich von mehreren Millionen.

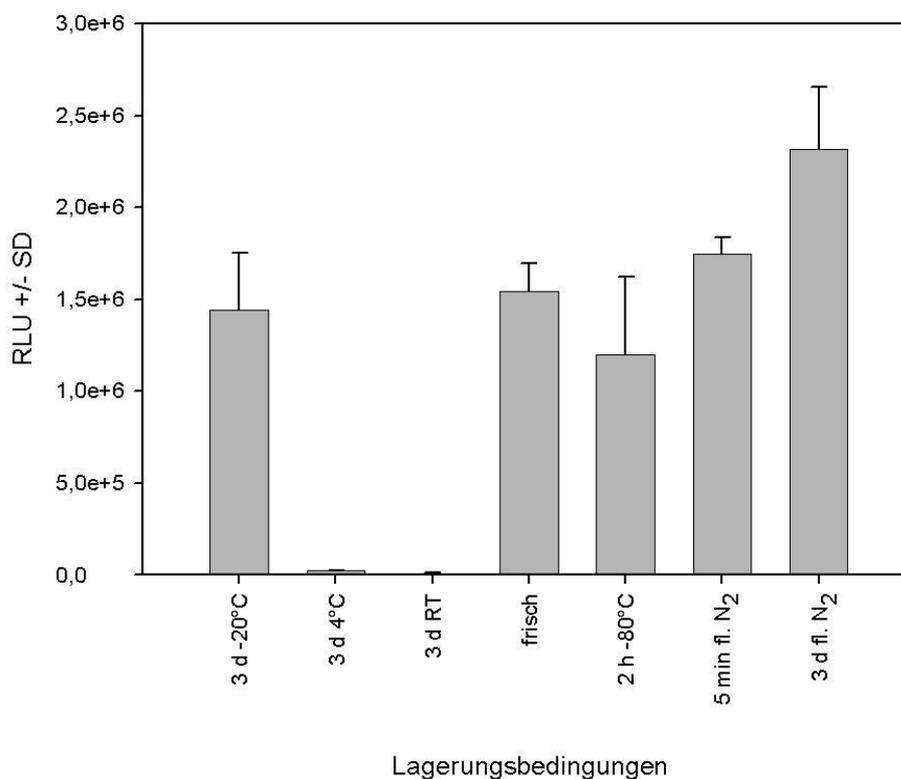
Die in Abbildung 3.1 gezeigten Transfektionseffizienzen sind charakteristisch für die verwendete PEI-F25-LMW Charge. Ein kommerziell erhältliches 25 kDa PEI wurde über ein Säule nach Größe aufgetrennt und die gesammelten Fraktionen, die PEI von ca. 10 kDa enthielten, vereinigt. Diese bildeten dann die verwendeten PEI-Chargen. Diese Fraktionierung wurde von S. Höbel durchgeführt und ist in [84] beschrieben. Deshalb wurden alle weiteren Versuche mit N/P 33 durchgeführt, so nicht anders angegeben.



**Abb. 3.1** Abhängigkeit der Transfektionseffizienz von PEI-F25-LMW-DNA-Komplexen vom N/P-Verhältnis

### 3.1.2 Transfektionseffizienzen von PEI-F25-LMW-DNA-Komplexen für verschiedene Lagerungsbedingungen

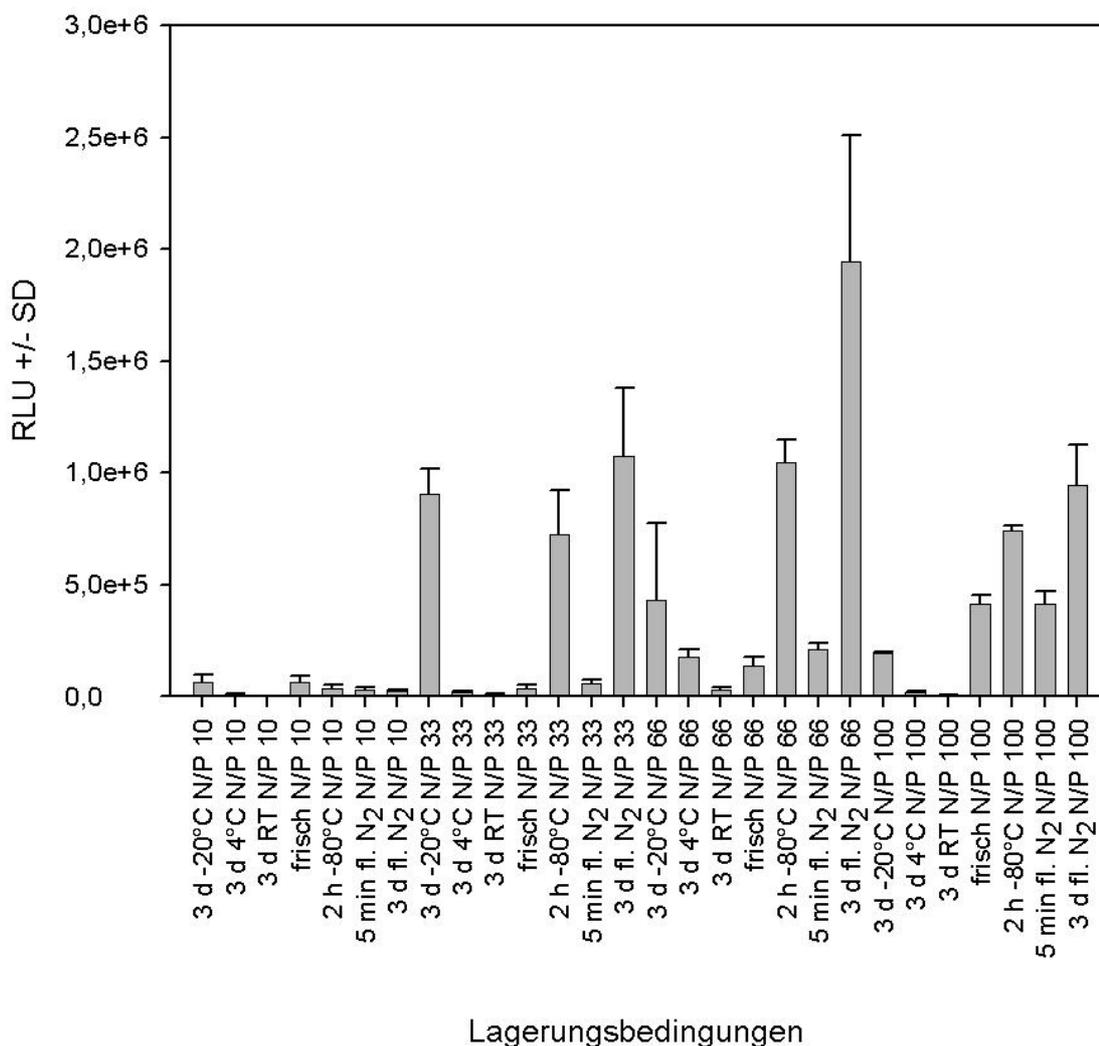
Zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Lagerungsbedingungen auf die Transfektionseffizienz von PEI-F25-LMW-DNA-Komplexen wurden die Komplexe nach dem Ansetzen für 3 d bei RT, 4°C, -20°C oder in flüssigem Stickstoff gelagert. Weiterhin wurden neben frischen Komplexen auch noch Komplexe für 5 min in flüssigem Stickstoff gefroren oder für 2 h bei -80°C gelagert. Mit den Komplexen wurden SKOV-3 Zellen transfiziert. Es zeigte sich, dass ein Einfrieren der Komplexe sich nicht nachteilig auf die Transfektionseffizienz auswirkt (Abb. 3.2). Hingegen war im Vergleich dazu nach Lagerung bei RT oder bei 4°C quasi keine Transfektionseffizienz mehr vorhanden (Abb. 3.2). In den Versuchen zeigte sich immer eine geringfügig höhere Transfektionseffizienz bei 4°C als bei RT, was aber im Vergleich mit frischen oder eingefrorenen Komplexen zu vernachlässigen war. Für N/P 66 zeigten sich die gleichen relativen Verhältnisse für die Lagerungsbedingungen, jedoch mit den unter 3.1 angesprochenen schlechteren Transfektionseffizienzen.



**Abb. 3.2** Transfektionseffizienzen von F25-PEI-LMW-DNA-Komplexen nach Lagerung unter verschiedenen Bedingungen

### 3.1.3 Transfektionseffizienzen von PEI-F25-LMW-DNA-Komplexen aus Glucose-Lösung

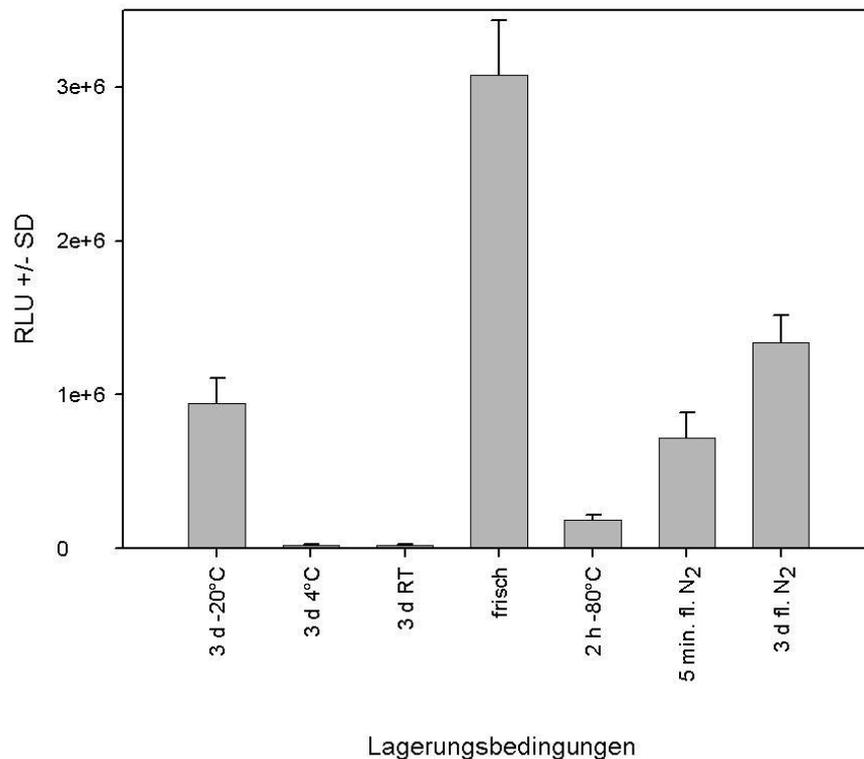
Glucose-Lösung ist neben NaCl-Lösung eine häufig verwendete Lösung zum Ansetzen von PEI-Komplexen, v.a. auch für in vivo Anwendungen. Deshalb wurden analog zu NaCl für alle N/P-Verhältnisse und Lagerungsbedingungen die Transfektionseffizienzen für Komplexe bestimmt, die mit einer 5% Glucoselösung angesetzt wurden. Hierbei zeigte sich, dass N/P 10 unter allen Lagerungsbedingungen geringe Transfektionseffizienzen hatte (Abb. 3.3). Bei den N/P-Verhältnissen 33, 66 und 100 zeigte sich eine zunehmende Transfektionseffizienz für frische Komplexe. Die Lagerung in flüssigem Stickstoff und für 2 h bei -80°C ergab für die N/P-Verhältnisse 33, 66 und 100 ähnliche Transfektionseffizienzen, die bis 25-fach über denen für frische Komplexe lagen. Die Transfektionseffizienz für dreitägige Lagerung bei -20°C nimmt von N/P 33 nach N/P 100 ab, für 5 min in flüssigem Stickstoff nimmt sie zu (Abb. 3.3). Es zeigte sich, dass Glucose-Lösung nur etwa in der Hälfte der durchgeführten Versuche zu erfolgreicher Transfektion führte und sich damit als sehr unstetig erwies.



**Abb. 3.3** Transfektionseffizienzen nach verschiedenen Lagerungsbedingungen für F25-PEI-LMW-DNA-Komplexe, die mit 5% Glucose-Lösung angesetzt wurden

### 3.1.4 Transfektionseffizienzen von jetPEI-DNA-Komplexen für verschiedene Lagerungsbedingungen

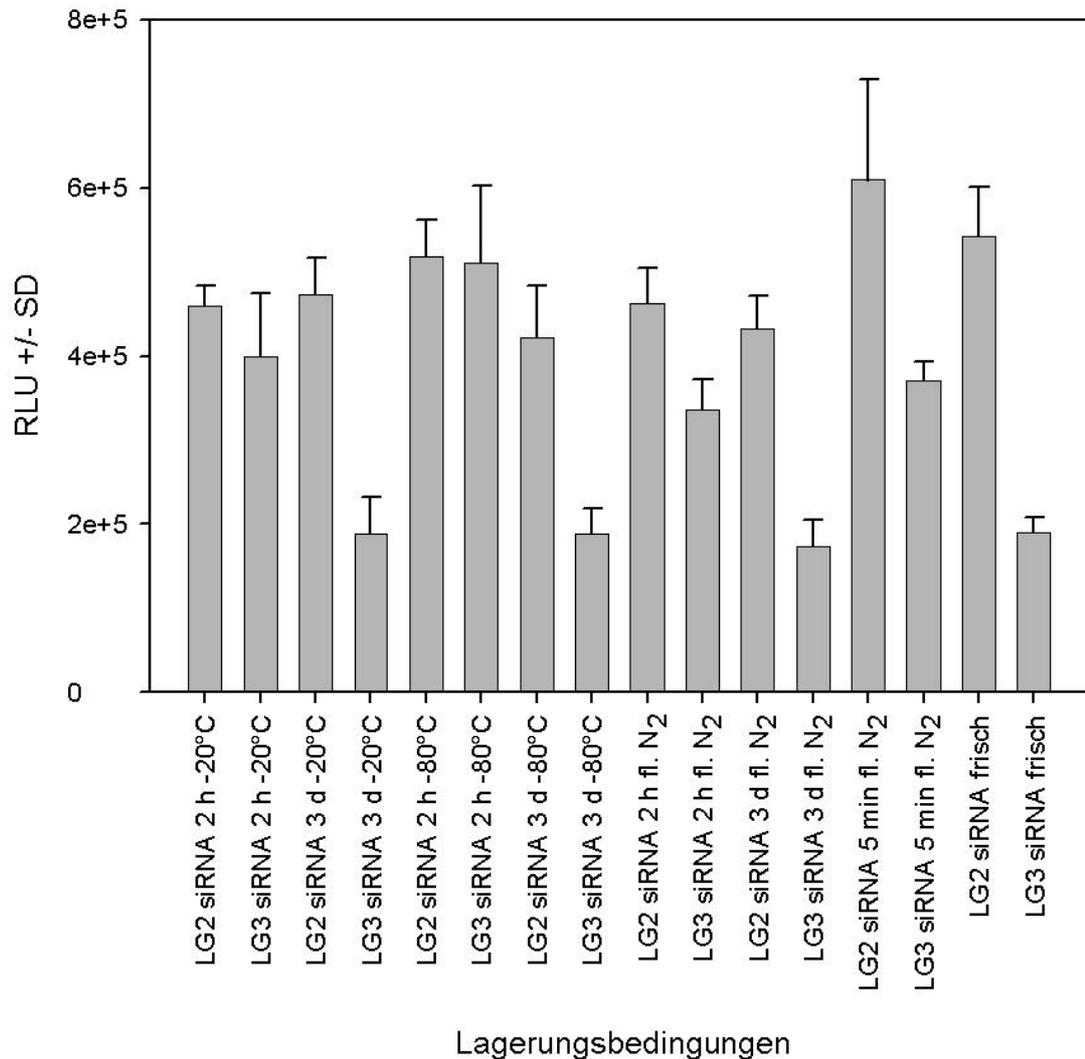
Für das kommerziell erhältliche jetPEI wurden die beschriebenen Lagerungs- und Einfrierbedingungen ebenfalls getestet. Hierbei zeigte sich in allen Versuchen, dass gefrorene Komplexe, die in flüssigem Stickstoff oder bei -20°C gelagert wurden, nur etwa 1/3 der Transfektionseffizienz frischer Komplexe aufwiesen (Abb 3.4). Nach Lagerung bei RT und 4°C war so gut wie keine Transfektionseffizienz mehr vorhanden. Im Vergleich mit PEI-F25-LMW erreichten frische jetPEI-DNA-Komplexe ähnliche Transfektionseffizienzen.



**Abb. 3.4** Transfektionseffizienzen für jetPEI-DNA-Komplexe für verschiedene Lagerungsbedingungen

### 3.1.5 Transfektionseffizienzen von PEI-F25-LMW-siRNA-Komplexen für verschiedene Lagerungsbedingungen

Der Einfluß von Lagerungsbedingungen auf die Transfektionseffizienz von PEI-F25-LMW-siRNA-Komplexen wurde an stabil Luciferase exprimierenden SKOV-3-Luc-10 Zellen getestet. Für einen Einzel-Ansatz wurde mit 0,8 µg spezifischer (LG3) oder unspezifischer (LG2) Luciferase siRNA transfiziert und die Herunterregulation durch die spezifische siRNA als Maß für die Transfektionseffizienz zu Grunde gelegt. Die Herunterregulation nach dreitägiger Lagerung bei -20°C, -80°C und in flüssigem Stickstoff betrug in allen Fällen etwas mehr als 50% (Abb. 3.5). Für frische Komplexe wurde eine Herunterregulation von ca. 60% erreicht. Nach zweistündiger Lagerung bei -20°C oder -80°C zeigte sich keine Transfektionseffizienz. Nach 5 min bzw. 2 h in flüssigem Stickstoff zeigte sich eine Herunterregulation um ca. 20%. Nachdem eigene Vorversuche und Ergebnisse aus unserer Arbeitsgruppe keinerlei Transfektionseffizienzen für Lagerung bei RT oder 4°C zeigten, wurden für diese Bedingungen keine weiteren Experimente durchgeführt.

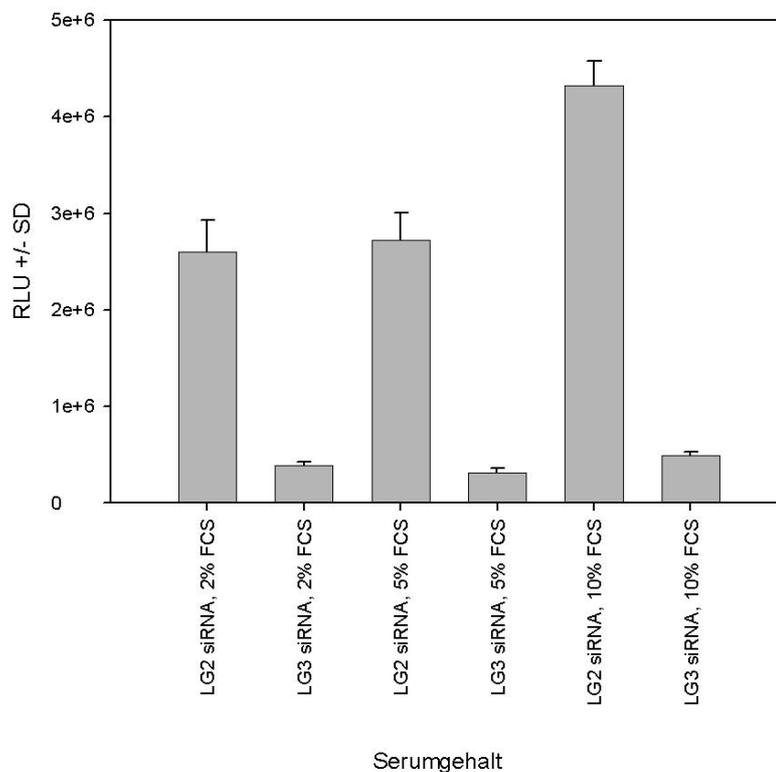


**Abb. 3.5** Transfektionseffizienzen für PEI-F25-LMW-siRNA-Komplexe nach verschiedenen Lagerungsbedingungen

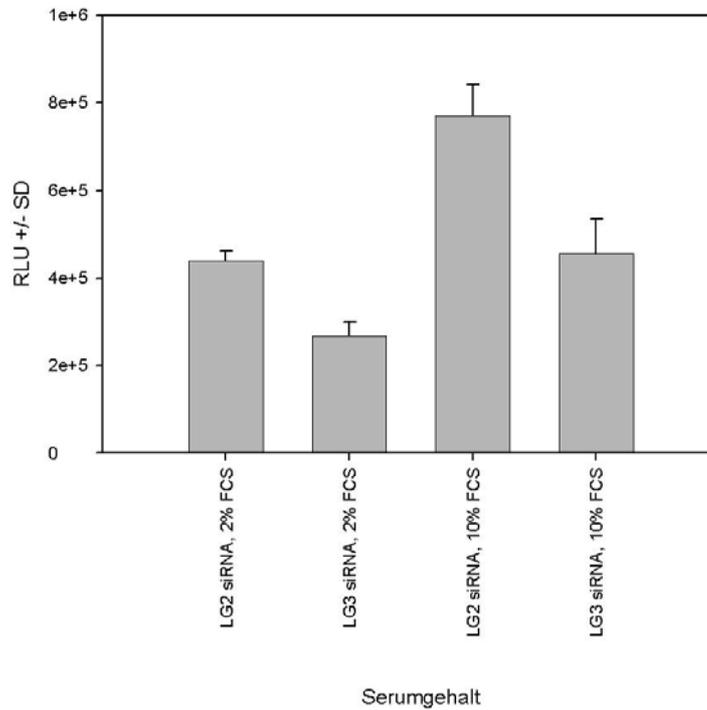
### 3.1.6 Transfektionseffizienzen bei unterschiedlichem Serumgehalt

Um die Abhängigkeit der Transfektionseffizienz vom Serumgehalt des Mediums zu bestimmen, wurden SKOV-3 Zellen für die Transfektion in 2%, 5% oder 10% IMDM ausgesät. Für PEI-F25-LMW erfolgte einmal eine transiente Kotransfektion mit 0,25 µg pGL3-control Plasmid DNA und 0,25 µg spezifischer (LG3) bzw. unspezifischer (LG2) Luciferase siRNA pro well einer 24-well-Platte. Wie Abbildung 3.6 zeigt, kommt es unter allen Serumbedingungen zu einer gleichermaßen effizienten Herunterregulation des Luciferase-Reportergens. Weiterhin wurde mit alleine mit siRNA transfiziert. SKOV-3-Luc-10 Zellen wurden zu diesem Zweck in 2% und 10% Serum ausgesät und

mit 0,5 µg LG3 siRNA pro well einer 24-well-Platte transfiziert. Auch hier zeigt sich kein Unterschied in der Herunterregulation der Luciferase (Abb. 3.7).

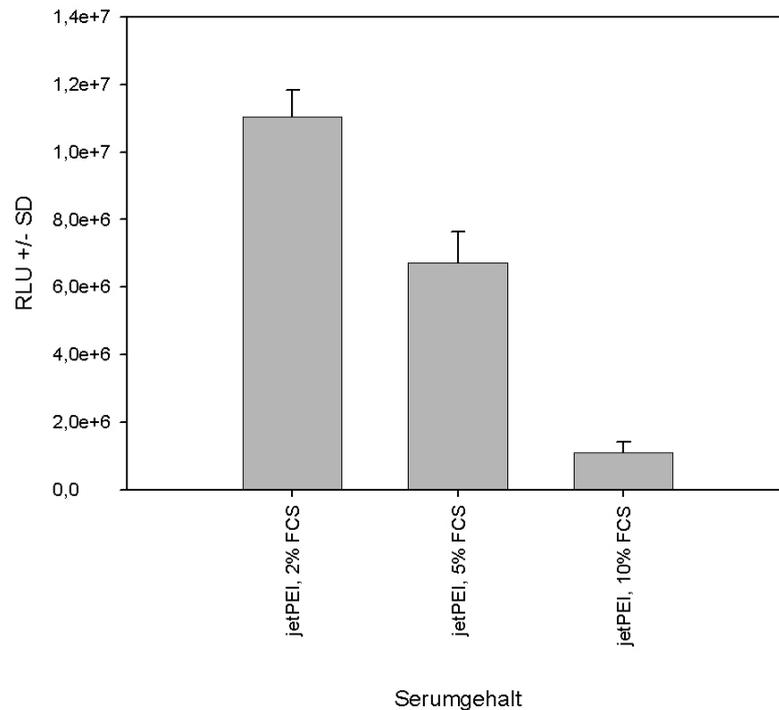


**Abb. 3.6** Serumabhängigkeit der Transfektionseffizienz für PEI-F25-LMW, hier für eine transiente Kotransfektion von pGL3-control mit den siRNAs LG2 bzw. LG3 in SKOV-3 Zellen



**Abb. 3.7** Serumabhängigkeit der Transfektionseffizienz für PEI-F25-LMW-siRNA-Komplexe, gezeigt an SKOV-3-Luc-10 Zellen

Für jetPEI wurde die Serumabhängigkeit der Transfektionseffizienz mit pGL-3-control DNA für die Transfektion von SKOV-3 Zellen bestimmt. Wie Abbildung 3.8 zeigt, nimmt die Transfektionseffizienz für jetPEI mit steigendem Serumgehalt des Mediums stark ab. So werden bei 10% Serumgehalt nur ca. 10% der Transfektionseffizienz erreicht, die bei 2% Serumgehalt beobachtet wird.

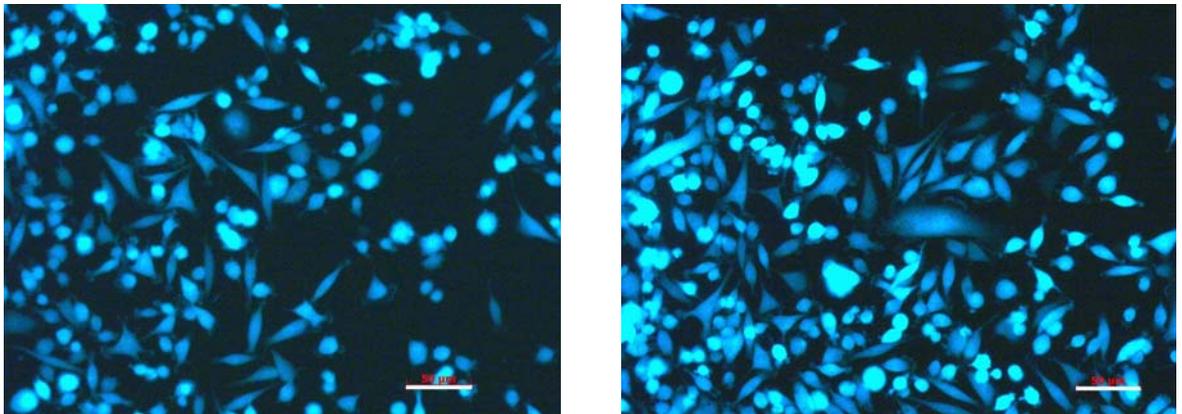


**Abb. 3.8** Serumabhängigkeit der Transfektionseffizienz von jetPEI, gezeigt für pGL3-control DNA an SKOV-3 Zellen

### 3.1.7 Ermittlung von Transfektionseffizienzen für PEI-F25-LMW-siRNA-Komplexe mittels eGFP-Targeting

Die Ermittlung der Transfektionseffizienzen für PEI-F25-LMW-siRNA-Komplexe sollte neben dem Luciferase-Reporter-System (Abschnitt 3.1.5) auch für ein anderes Reporter-System getestet werden. Dafür wurden PC-3-eGFP-Klon 1.3-Zellen verwendet, die wie unter 2.2.7 beschrieben u.a. zu diesem Zweck hergestellt wurden. Da die Zellen nach Transfektion und Integration von eGFP eine heterogene Population von sehr unterschiedlich intensiv fluoreszierenden Zellen bildeten, wurden diese zunächst über eine klonale Selektion vereinzelt. Dadurch entstanden klonale Zelllinien, deren Fluoreszenz sich zwischen den einzelnen Zellen nicht unterschied und sich erst deshalb zur Quantifizierung eines eGFP-Targetings eigneten. Für den Versuch wurden 1500 Zellen pro well einer 96-well-Platte ausgesät. Transfiziert wurde mit 6 pmol eGFP-spezifischer (EGFP-1) oder unspezifischer (LA5) siRNA pro well. Nach Transfektion wurden die Zellen für einen Zeitraum von 10 d im Abstand von 24 h unter dem Fluoreszenzmikroskop auf Herunterregulation der eGFP-Expression untersucht. Es

zeigte sich jedoch im gesamten Beobachtungszeitraum keinerlei Auswirkung des Targetings auf die eGFP-Expression (Abb. 3.9).



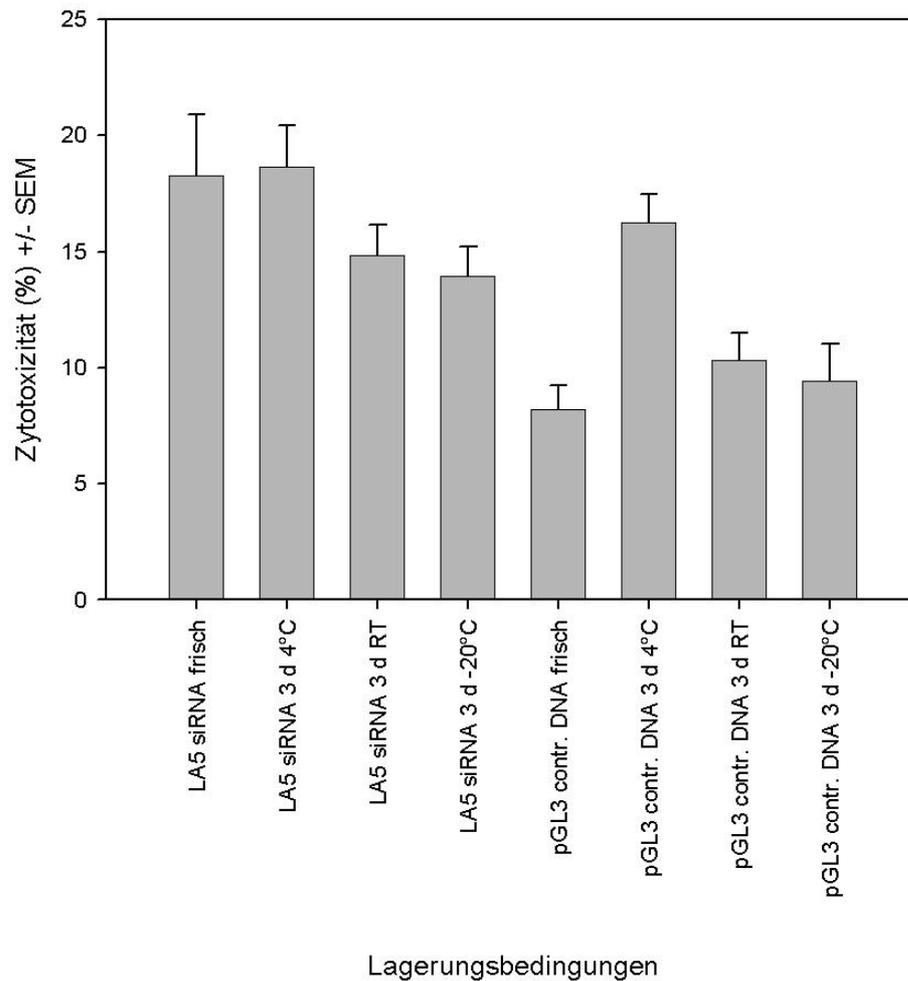
(a)

(b)

**Abb. 3.9** eGFP-Targeting an PC-3-eGFP Klon 1.3 Zellen nach 4 d für siRNA LA5 (a) und siRNA EGFP-1 (b), Maßstabsbalken 50  $\mu\text{m}$

### **3.2 Zytotoxizitäten von DNA- bzw. siRNA- PEI-F25-LMW-Komplexen für verschiedene Lagerungsbedingungen**

Die Zytotoxizitäten von PEI-F25-LMW-DNA-Komplexen wurden für 0,5  $\mu\text{g}$  DNA pGL3-control und einem N/P-Verhältnis von 16,5 ermittelt. Das N/P-Verhältnis 16,5 wurde in diesem Fall gewählt, da eine neue Charge des PEI-F25-LMW (siehe dazu 3.1.1) verwendet wurde, die eine optimale Transfektionseffizienz bei Ratio 5 (N/P 16,5) aufwies. Für RNA wurden 0,8  $\mu\text{g}$  siRNA LA5 bei N/P 16,5 pro well einer 24-well-Platte eingesetzt. Die Zytotoxizitäten für PEI-F25-LMW-DNA-Komplexe lagen für dreitägige Lagerung bei  $-20^{\circ}\text{C}$ , RT sowie für frische Komplexe bei 10% (Abb. 3.10). Für 3 d Lagerung bei  $4^{\circ}\text{C}$  lag sie zwischen 15% und 18%. Für PEI-F25-LMW-siRNA-Komplexe lagen die Zytotoxizitäten für dieselben Lagerungsbedingungen zwischen 8-10% (für  $4^{\circ}\text{C}$  bei ca. 16%) (Abb. 3.10).



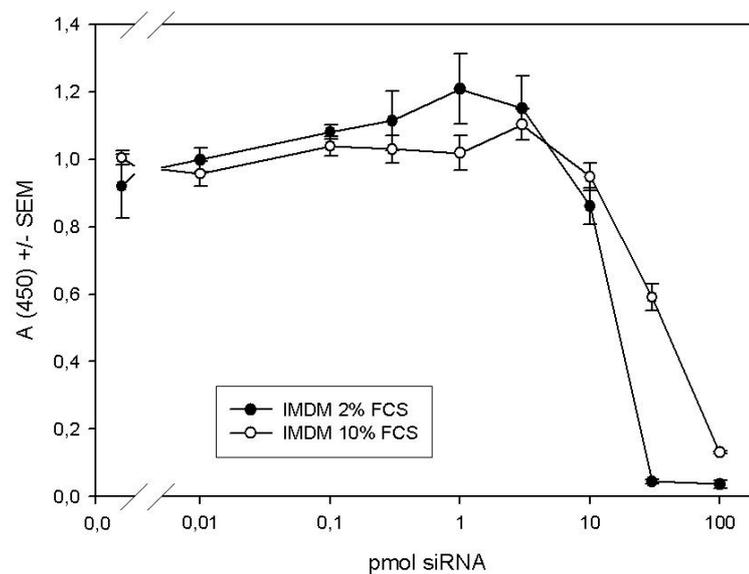
**Abb. 3.10** Zytotoxizitäten von DNA- bzw. siRNA-PEI-F25-LMW-Komplexen nach verschiedenen Lagerungsbedingungen

### 3.3 Bestimmung der Dosis-Wirkungskurve für PEI-F25-LMW-siRNA-Komplexe

Zur Bestimmung von  $EC_{50}$ -Kurven für PEI-F25-LMW-siRNA-Komplexe wurde im 96-well Format gearbeitet. Ausgesät waren 1500 Zellen PC-3 oder Du145 in 2% FCS oder 10% FCS pro well. Transfiziert wurde mit 0,01 pmol bis 100 pmol PEI-F25-LMW-komplexierter siRNA LA5 pro well mit oder ohne Mediumwechsel nach der Transfektion.

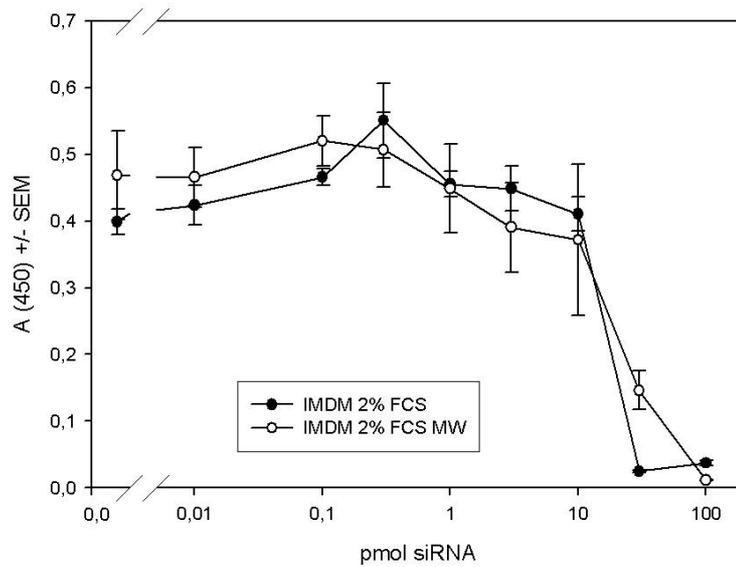
Für Du145 Zellen ergab sich eine Abhängigkeit der Zytoxizität vom Serumgehalt des Mediums, in dem die Zellen ausgesät waren (Abb. 3.11). So zeigt sich bei 10 pmol

siRNA für Zellen in 2% FCS und auch in 10% FCS Toxizität. Bei 30 pmol siRNA sind in 10% FCS noch ca. 60% lebende Zellen vorhanden, in 2% FCS sind es weniger als 5%. Bei 100 pmol siRNA fanden sich für beide Serumkonzentrationen <5% lebende Zellen.

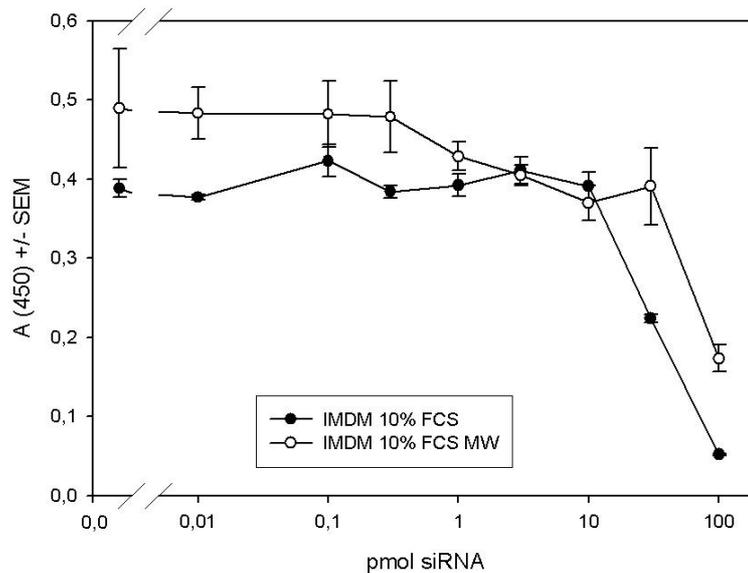


**Abb. 3.11** Abhängigkeit der Zytotoxizität von der Menge transfizierter siRNA und vom Serumgehalt des Mediums für Du145 Zellen

Ein Mediumwechsel 5 h nach der Transfektion wirkte sich sowohl bei 2% FCS als auch bei 10% FCS auf die Zytotoxizität aus. Bei 2% FCS-Gehalt überlebten nach Mediumwechsel noch ca. 30% der Zellen eine Transfektion mit 30 pmol siRNA, wohingegen die gleiche Menge ohne Mediumwechsel weniger als 5% der Zellen überleben ließ (Abb. 3.12). Bei 10% FCS-Gehalt überlebten die Transfektion mit 30 pmol siRNA nach einem Mediumwechsel noch ca. 90% der Zellen. Ohne einen Mediumwechsel überlebten diese Menge nur ca. 60% der Zellen (Abb. 3.13). Nach einem Mediumwechsel bei 10% FCS-Gehalt überleben noch ca. 30% der Zellen eine Transfektion mit 100 pmol siRNA (Abb. 3.13).



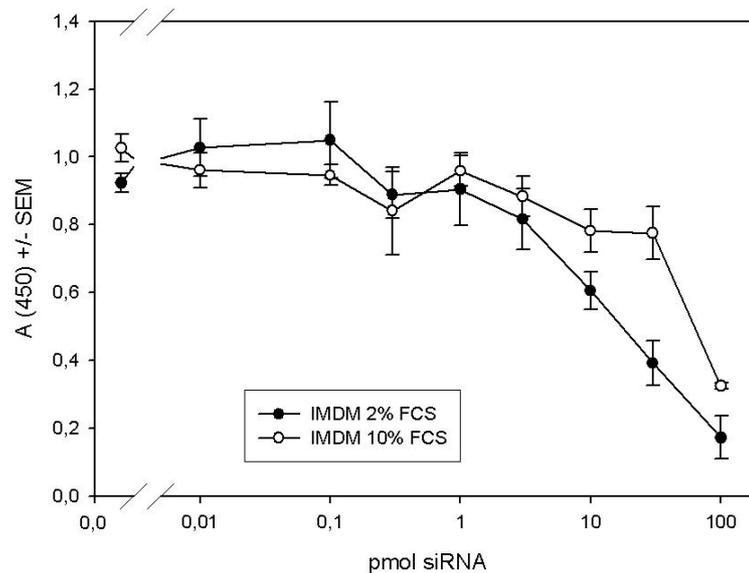
**Abb. 3.12** Einfluß eines Mediumwechsels nach siRNA-Transfektion auf die Zytotoxizität für Du145 Zellen bei 2% FCS



**Abb. 3.13** Einfluß eines Mediumwechsels nach siRNA-Transfektion auf die Zytotoxizität für Du145 Zellen bei 10% FCS

Für PC-3 Zellen wurden die Experimente wie bei den Du145 Zellen beschrieben durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass bei einem FCS-Gehalt von 2% bereits eine Transfektion mit 3 pmol pmol siRNA ca. 10% der Zellen nicht überleben (Abb. 3.14). Die Transfektion mit 10 pmol und 30 pmol siRNA überleben ca. 70% bzw. 40% der Zellen. Bei einem FCS-Gehalt von 10% zeigte sich Toxizität erst nach der Transfektion

mit 100 pmol siRNA. Dies überlebten noch 40% der Zellen. Ein Mediumwechsel nach der Transfektion zeigte bei PC-3 Zellen weder für 2% FCS noch für 10% FCS einen Effekt.



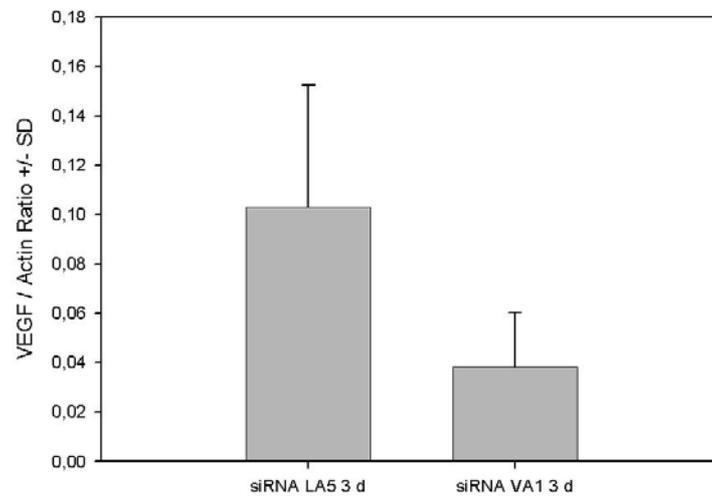
**Abb. 3.14** Abhängigkeit der Zytotoxizität von der Menge transfizierter siRNA und vom Serumgehalt des Mediums für PC-3 Zellen

### 3.4 Auswirkungen eines VEGF-Targetings in vitro

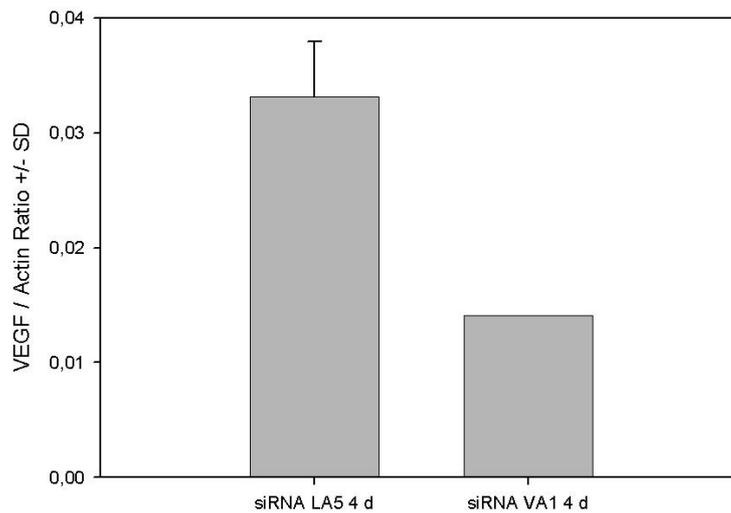
#### 3.4.1 Nachweis des VEGF-Targetings auf RNA-Ebene mittels QT-RT-PCR

Um das VEGF Targeting auf mRNA-Ebene nachzuweisen wurde VEGF über eine QT-RT-PCR quantifiziert. Actin diente dabei als Haushaltsgen zur Normierung. Als spezifische VEGF siRNAs wurden VA1 bzw. VA2 verwendet, als unspezifische siRNA LA5.

Für PC-3 Zellen konnte eine Herunterregulation von VEGF um ca. 60% 3 d und 4 d nach Transfektion gezeigt werden (Abb. 3.15).



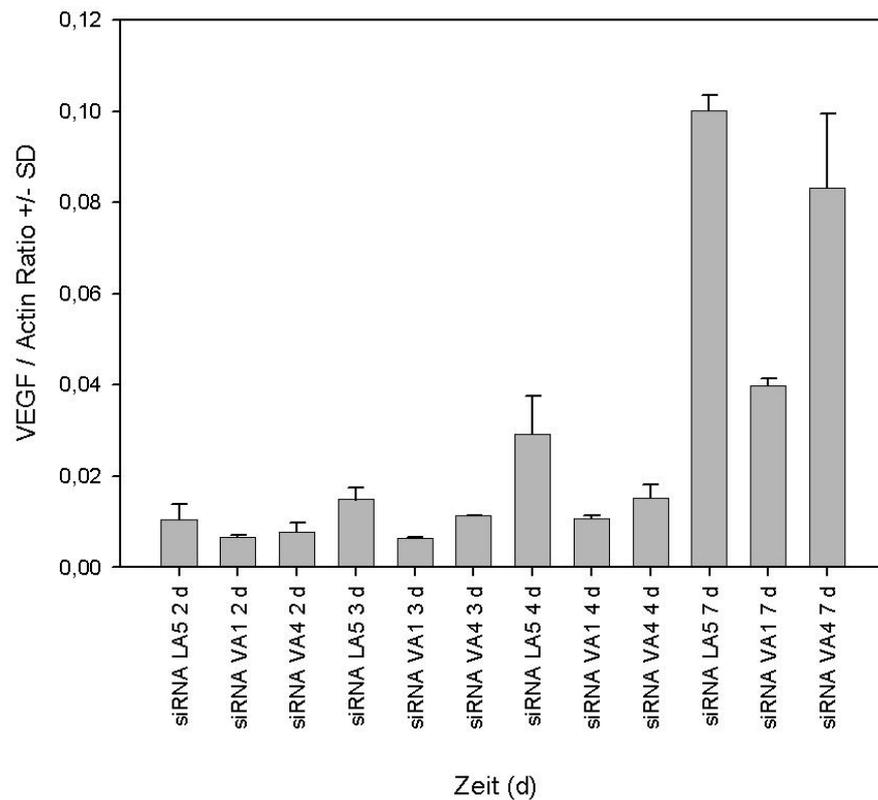
(a)



(b)

**Abb. 3.15** VEGF-Quantifizierung mittels QT-RT-PCR, 3 bzw. 4 d nach VEGF-Targeting an PC-3 Zellen

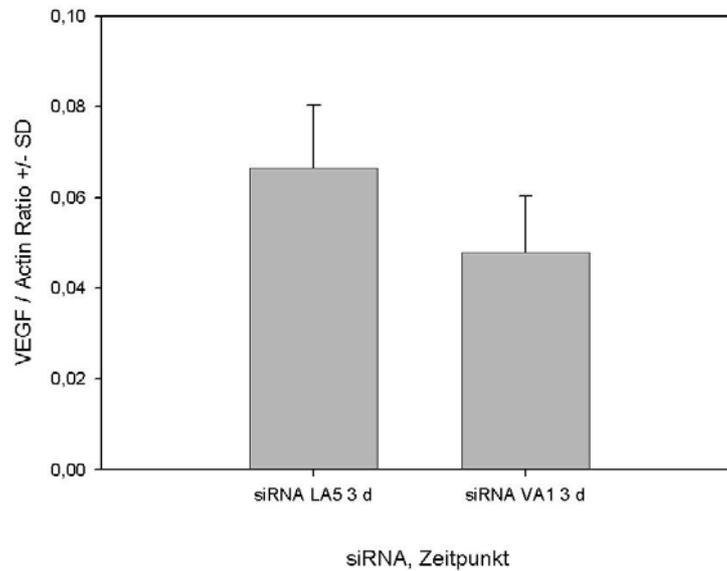
Bei Du145 Zellen fand mit der siRNA VA1 nach 2 d eine Herunterregulation der VEGF mRNA um 40%, nach 3, 4 und 7 d jeweils um ca. 60% statt (Abb. 3.16). Die siRNA VA4 erwies sich in diesem Experiment als nicht so effektiv, da sich hier nach 2 d eine Herunterregulation um 40%, nach 3 d um 25%, nach 4 d um 50% und 7 d um 20% ergab (Abb. 3.16).



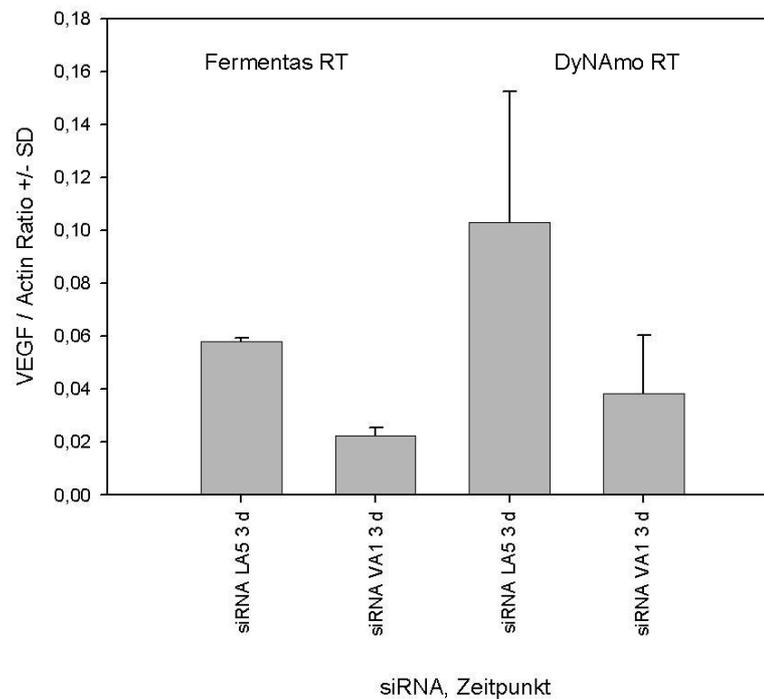
**Abb. 3.16** VEGF-Quantifizierung mittels QT-RT-PCR, 2, 3, 4 und 7 d nach VEGF-Targeting an Du145 Zellen

Da alle Experimente mit dem Qiagen QuantiTect™ Kit in Verbindung mit einer RT von Fermentas durchgeführt wurden, wurde für den Zeitpunkt 3 d nach Transfektion auch eine Quantifizierung mit dem DyNAmo™ Kit durchgeführt, um vergleichen zu können, ob mit einem anderen System ebenfalls der Nachweis des Targetings erbracht werden kann. Die Zyklus-Einstellung für den LightCycler war identisch mit der, die für die Quantifizierungen mit dem Qiagen Kit verwendet wurden. Abbildung 3.17 zeigt die Quantifizierung mit DyNAmo™ Kit 3 d nach Transfektion von PC-3 Zellen mit VEGF- bzw. Kontroll-siRNA. Es zeigte sich eine Herunterregulation der VEGF-mRNA um 30%. Mit dem Qiagen Kit zeigte sich für denselben Zeitpunkt eine Herunterregulation um 60% (Abb. 15a). Da oft die reverse Transkription eine Schwachstelle bei der QT-RT-PCR ist (zur Übersicht: [99]), wurden die cDNAs, die durch Umschreibung mit der RT aus dem DyNAmo™ Kit gewonnen wurden, mit dem Qiagen QuantiTect™ Kit quantifiziert. Dies zeigt Abbildung 3.18, in der zum Vergleich nochmals die Quantifizierung mit dem Qiagen QuantiTect™ Kit nach Umschreibung mit der Fermentas RT dargestellt ist. In beiden Fällen ist eine Herunterregulation der VEGF-

mRNA um ca. 60% nachgewiesen worden. Die Quantifizierung mit dem DyNAmo™ Kit zeigte also eine weniger deutliche Herunterregulation, was aber offensichtlich nicht durch die unterschiedliche RT dieses Kits bedingt war.



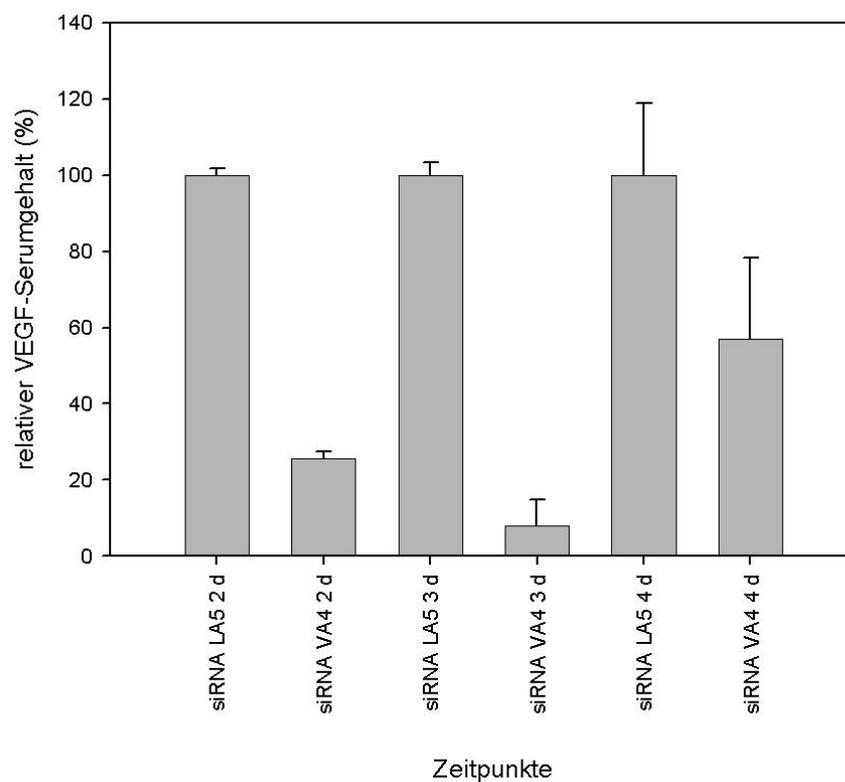
**Abb. 3.17** VEGF-Quantifizierung mit dem DyNAmo™ Kit 3 d nach VEGF-Targeting an PC-3 Zellen



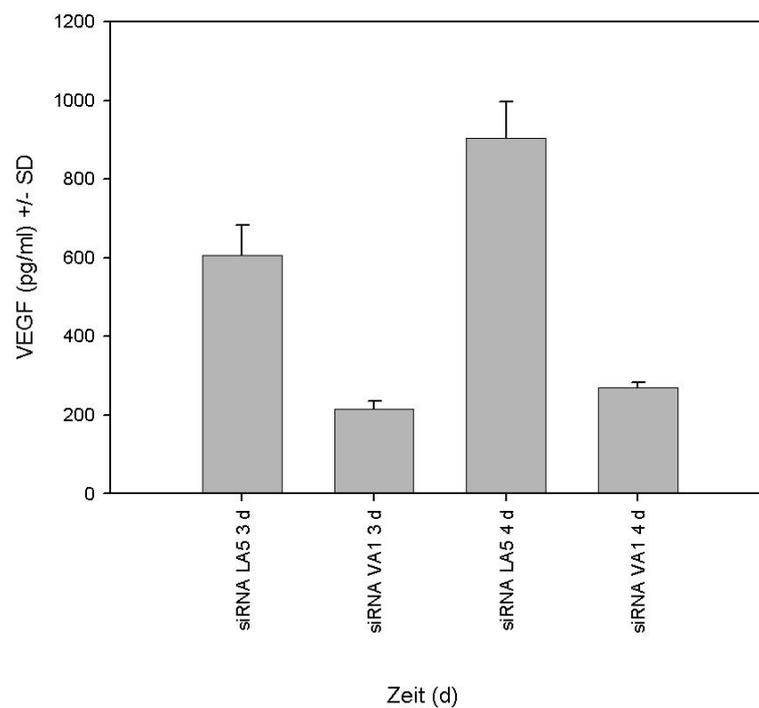
**Abb. 3.18** VEGF-Quantifizierung mit Qiagen Kit nach RT mit DyNAmo RT oder Fermentas RT, gezeigt für PC-3 Zellen 3 d nach VEGF-Targeting

### 3.4.2 Nachweis des VEGF-Targetings auf Protein-Ebene mittels ELISA

Die Herunterregulation von VEGF auf Proteinebene wurde mit dem DuoSet ELISA Development Kit von R&D für PC-3 und Du145 Zellen nachgewiesen. Als spezifische siRNAs kamen VA1 und VA4 zum Einsatz. Unspezifische siRNA war LA5. Die Überstände transfizierter Zellen wurden dazu in regelmäßigen Abständen (1-3 d) gesammelt und mit ELISA auf VEGF-Gehalt untersucht. Bei PC-3 Zellen ergab sich eine Herunterregulation von VEGF nach 2 d um 70% nach 3 d und 4 d waren es jeweils noch ca. 50% (Abb. 3.19). Abbildung 3.20 zeigt die Herunterregulation von VEGF mit Mediumüberständen aus den Proben, die für die unter 3.4.1 beschriebene Quantifizierung auf RNA-Ebene verwendet wurden. Nach 3 d bzw. 4 d ergab sich jeweils eine Herunterregulation von ca. 70%.

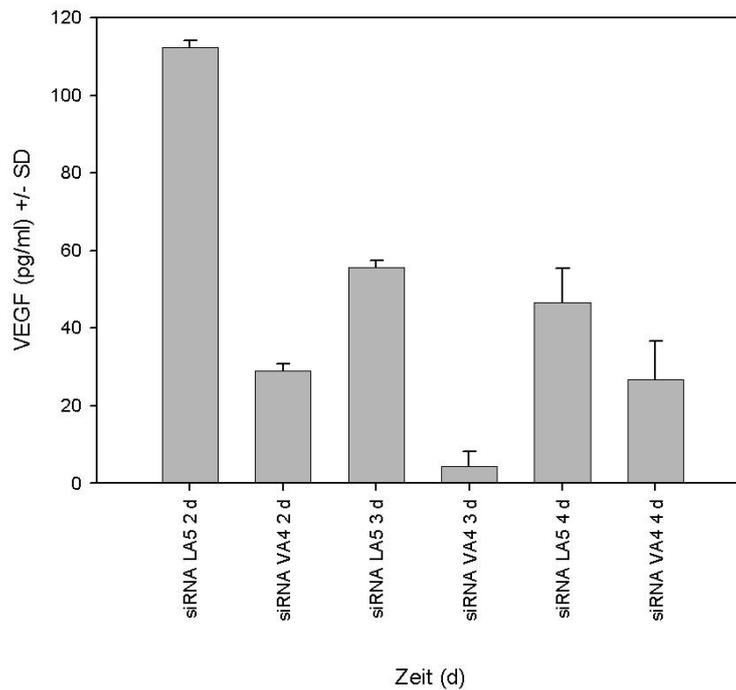


**Abb 3.19** Nachweis des VEGF-Targetings auf Proteinebene durch VEGF-ELISA, hier für PC-3 Zellen nach 2,3 und 4 d gezeigt. Die Werte wurden jeweils auf die unspezifische Kontroll siRNA LA5 normiert.



**Abb. 3.20** Nachweis des VEGF-Targetings auf Proteinebene durch VEGF-ELISA, hier für PC-3 Zellen mit denen auch die QT-RT-PCR durchgeführt wurde (vergleiche Abb. 3.15)

Für Du145 Zellen konnte ebenfalls eine Herunterregulation von VEGF auf Proteinebene nachgewiesen werden. Hier zeigte sich nach 2 d eine Herunterregulation um 75%, nach 3 d um 90% und nach 4 d um 40% (Abb. 3.21).



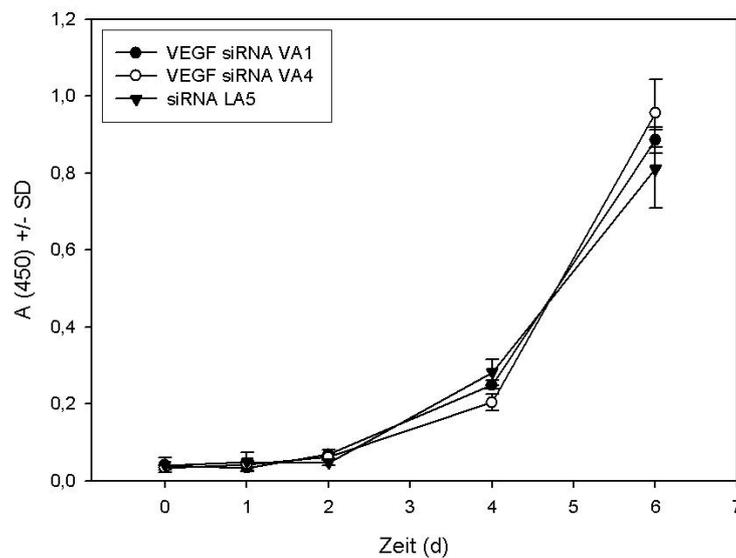
**Abb. 3.21** Nachweis des VEGF-Targetings auf Proteinebene durch VEGF-ELISA, gezeigt für Du145 Zellen

### 3.4.3 Konsequenzen des VEGF-Targetings auf Zellproliferation

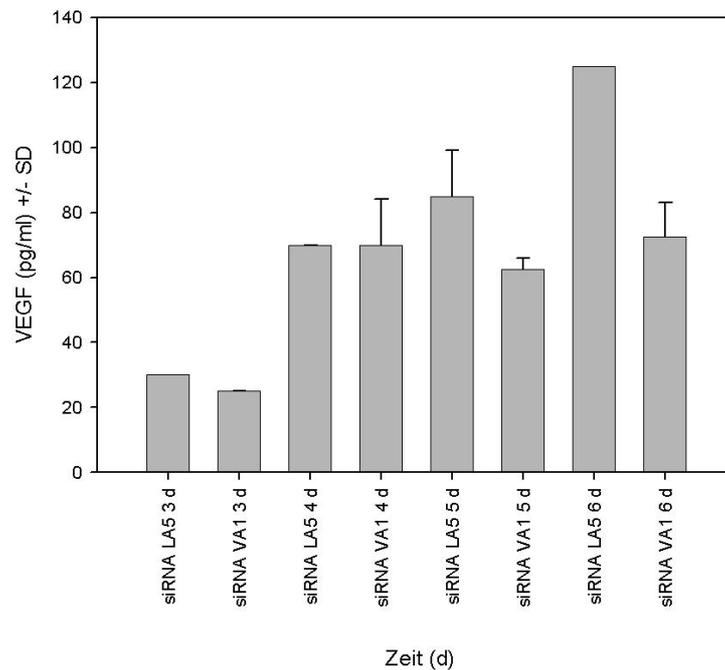
#### 3.4.3.1 Adhäsionsabhängige Zellproliferation

Um einen möglichen Einfluß von VEGF als autokrinem Stimulator der Zellproliferation auf PC-3 und Du145 Zellen zu untersuchen, wurde das Proliferationsverhalten der beiden Zelllinien nach VEGF-Targeting im 96-well Format untersucht. Dafür wurden sowohl für PC-3 als auch für Du145-Zellen Zellzahlen von 250 bis 1500 Zellen pro well einer 96-well-Platte ausgesät. Dies geschah in getrennten Experimenten in 2% oder 10% FCS (für serumfreie Experimente fand ca. 5 h nach Aussat ein MW auf serumfrei statt). Die Experimente wurden mit oder ohne Mediumwechsel nach der Transfektion durchgeführt. Nach dem Targeting mit Mengen von 2-6 pmol der siRNAs VA1, VA4 und VE1 sowie der unspezifischen siRNA LA5 wurden in regelmäßigen Abständen Bestimmungen der Lebendzellzahl mit dem WST-1 Reagenz vorgenommen. Es zeigte sich bei keinem der Versuche ein Unterschied in der Wirkung des VEGF-Targetings auf den Wachstumsverlauf von PC-3 bzw. Du145 Zellen. Als Beispiel zeigt Abbildung 3.22

den typischen Ausgang der Experimente, als deren Ergebnis sich stets exponentielle Wachstumskurven ergaben. Um nachzuweisen, dass in diesem Format (siehe unten) tatsächlich eine Herunterregulation von VEGF stattfand, wurde für eine der Bedingungen ein VEGF-ELISA durchgeführt. Dies fand statt für 1500 Zellen PC-3 pro well einer 96-well-Platte in serumfreiem Medium, wobei mit 6 pmol siRNA pro well transfiziert wurde. Nach 5 d zeigte sich eine VEGF-Herunterregulation von ca. 25% nach 6 d von ca. 40% (Abb. 3.23).



**Abb. 3.22** Wachstumskurve von Du145 Zellen in serumfreiem Medium (1000 Zellen / pro well) nach VEGF-Targeting



**Abb. 3.23** VEGF-ELISA nach VEGF-Targeting im 96-well Format mit 6 pmol siRNA / well, gezeigt für PC-3 Zellen (1500 Zellen / well, serumfrei)

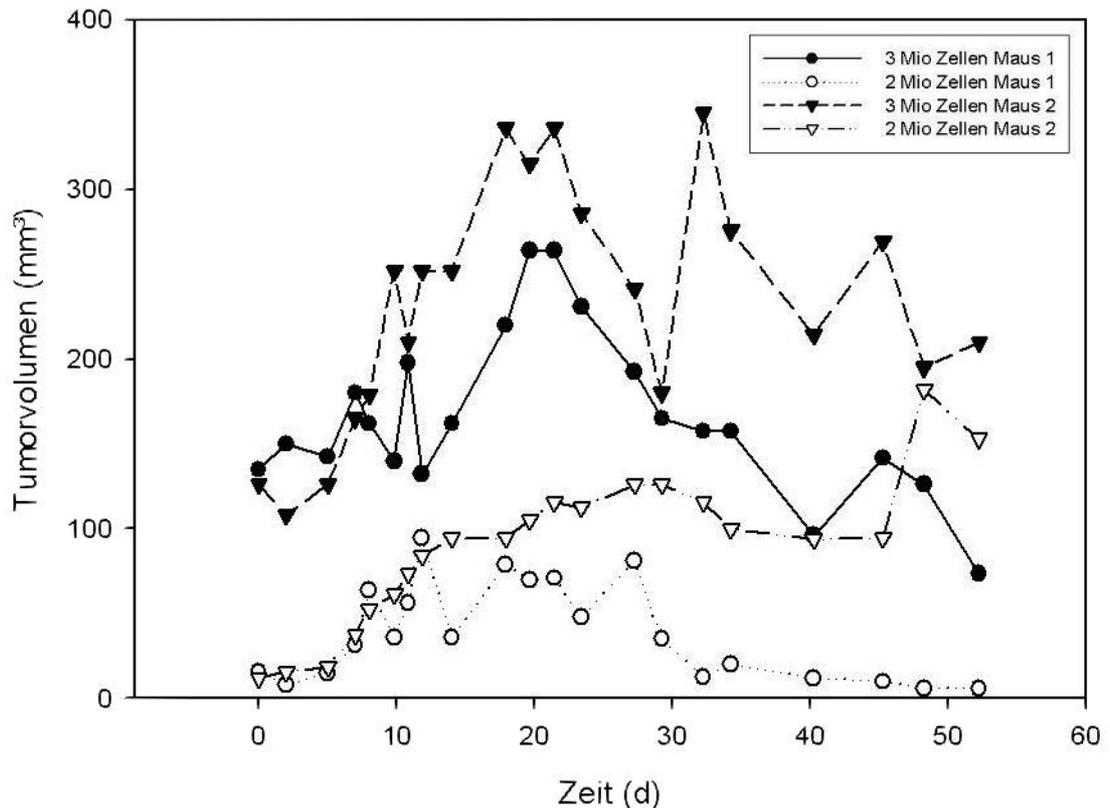
#### 3.4.3.2 Adhäsionsunabhängige Zellproliferation

Um die Auswirkungen eines VEGF-Targetings auf adhäsionsunabhängige Zellproliferation zu untersuchen wurden nach VEGF-Targeting PC-3 und Du145 in Softagars ausgesät. Anhand des Wachstums von Zellkolonien wurde der Effekt auf die Zellproliferation bestimmt. In einem Versuch wurden die Zellen in 2% FCS-haltigem Softagar ausgesät und es zeigte sich für die siRNA VA4 eine um ca. 40% verminderte Anzahl Kolonien festgelegter Größe im Vergleich zur Kontroll-siRNA (LA5) aber auch zur siRNA VA1. Die Ergebnisse ließen sich weder in einem weiteren Softagar mit 2% FCS noch mit 10% FCS reproduzieren.

### 3.5 Abhängigkeit der in vivo Wachstumskinetik von Du145 Zellen von der Zahl injizierter Zellen

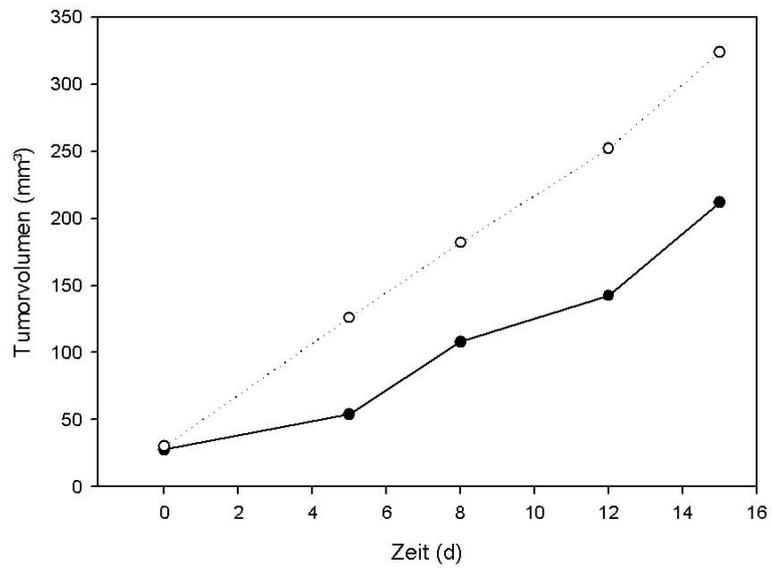
Um eine Wachstumskinetik für Du145 Zellen in vivo zu ermitteln wurden 2 athymischen Nacktmäusen je 2 Mio und 3 Mio Du145 Zellen subkutan in die Flanken injiziert. Einer dritten Maus wurden 5 Mio Zellen in beide Flanken injiziert. Für 2 Mio Zellen ergab sich innerhalb der ersten 15 d ein exponentielles Wachstum. Bei 3 Mio

Zellen ergab sich in den ersten 20 d nach Injektion ein nahezu exponentielles Wachstum (Abb. 3.24). Danach ging das Tumorstadium für beide Zellzahlen in eine Stagnation über, wobei ein Tumor mit 2 Mio Zellen (Anfangszellzahl) fast vollständig verschwunden war. Es ergab sich ein deutlicher Unterschied im Anfangstumorvolumen zwischen 2 Mio Zellen (ca. 8 mm<sup>3</sup>) und 3 Mio Zellen (ca. 130 mm<sup>3</sup>).



**Abb. 3.24** Tumorwachstum von Du145 Zellen in vivo, gezeigt für 2 und 3 Mio injizierte Zellen

Für 5 Mio Zellen ergab sich ein lineares Wachstum wie Abbildung 3.25 zeigt. Zum Vergleich von 2 bzw. 3 Mio Zellen mit 5 Mio Zellen zeigt Abbildung 3.26 Fotos von Tumoren die für 2 bzw. 3 Mio Zellen 11 Wochen nach Injektion gemacht wurden, für 5 Mio Zellen wurden die Fotos 3 Wochen nach Injektion gemacht.



**Abb. 3.25** Tumorwachstum von Du145 Zellen in vivo, gezeigt für 2 x 5 Mio injizierte Zellen



(a)

(b)

**Abb. 3.26** Tumoren im Vergleich (a) 2 bzw. 3 Mio Zellen nach 11 Wochen, (b) 2 x 5 Mio Zellen nach 3 Wochen

## 4 Diskussion

Zur Transfektion von Zellen *in vitro* und *in vivo* mit siRNAs werden bereits PEIs verwendet, die z.T. auch kommerziell erhältlich sind [94, 95]. In dieser Arbeit wurde das von Werth et al. beschriebene PEI-F25-LMW [84] weiter charakterisiert, um die Potentiale für eine *in vivo* siRNA-Delivery zu ermitteln. Neben der Charakterisierung von PEI-F25-LMW-siRNA-Komplexen bzw. PEI-F25-LMW-DNA-Komplexen wurde dieses Transfektions-System angewendet, um die Konsequenzen eines VEGF-Targetings mittels siRNA in den Prostatakarzinom-Zelllinien PC-3 und Du145 *in vitro* zu untersuchen.

Es konnte gezeigt werden, dass sich siRNA- bzw. DNA- PEI-F25-LMW-Komplexe unter verschiedenen Bedingungen einfrieren und lagern lassen und nach anschließendem Auftauen eine Transfektionseffizienz aufweisen, die der frischer Komplexe gleicht. Da die Lagerung bei 4°C bzw. RT zu einem nahezu vollständigen Verlust der Transfektionseffizienz sowohl der DNA- als auch der siRNA-Komplexe führt, bleibt zu klären, woher dieser Unterschied rührt. Möglicherweise kommt es bei 4°C und RT zu einer Aggregation der Komplexe und damit einer Größenzunahme und/oder Veränderung des Oberflächenpotentials der Komplexe (Höbel, S. et al. Publikation in Vorbereitung). Eine Veränderung von Größe oder Oberflächenpotential der Komplexe könnten eine Aufnahme in die Zelle über Endozytose unmöglich machen. Das Einfrieren der Komplexe könnte eine mögliche Aggregation der Komplexe und der damit verbundenen Konsequenzen verhindern. Im Gegensatz zu anderen PEIs [100-102] kommt es hier durch das Einfrieren offensichtlich nicht zu einer Aggregation der Komplexe. Auch eine Lagerung gefrorener Komplexe über mehrere Monate ohne Verlust der Transfektionseffizienz im Vergleich zu frischen Komplexen konnte von Höbel et al. (Publikation in Vorbereitung) gezeigt werden. Allerdings stehen die hier gezeigten Ergebnisse für das Verhalten von DNA-PEI-F25-LMW-Komplexen, die in Glucoselösung angesetzt wurden, z.T. in Widerspruch mit den Daten von Werth et al. [84], die zeigen konnten, dass die Transfektionseffizienz für in Glucose- bzw. NaCl-Lösung angesetzte frische Komplexe gleich ist. Dies bestätigte sich hier nicht, da Komplexe in Glucose-Lösung eine wesentlich schlechtere Transfektionseffizienz aufwiesen als in NaCl angesetzte Komplexe. Da in diesem Fall (Glucose) allerdings ein Einfrieren gegenüber frischen Komplexen eine erhebliche Verbesserung der

Transfektionseffizienz mit sich brachte (Abb. 3.3), bleibt zu klären, ob in Glucose eingefrorene Komplexe sich für eine Anwendung *in vivo* weiterhin verwenden lassen. Woher dieser Unterschied kommt wurde nicht geklärt. Wie z.B. Werth et al. [84] zeigen, sind in Glucose-Lösung angesetzte Komplexe kleiner als in NaCl-Lösung angesetzte Komplexe. Es ist nicht auszuschließen, dass die hier frisch angesetzten Komplexe bereits zu klein waren, um effizient durch Endozytose in die Zelle aufgenommen zu werden. Eventuell kam es durch das Einfrieren zu einer leichten Größenzunahme der Komplexe und damit zu besserer Aufnahme über Endozytose. Ungeklärt bleibt ebenfalls, warum für PEI-F25-LMW-siRNA-Komplexe nach zweistündigem Einfrieren bei  $-20^{\circ}\text{C}$  bzw.  $-80^{\circ}\text{C}$  keine Transfektionseffizienz zu beobachten war (Abb. 3.5).

Durch Einfrieren und Lagerung von PEI-F25-LMW-Komplexen ist es möglich Komplexe für eine Vielzahl von Versuchen zu einem Zeitpunkt herzustellen und je nach Bedarf aufzutauen um sie für *in vitro* und/oder *in vivo* Transfektionsexperimente einzusetzen. Damit verhindert man mögliche Schwankungen in der Transfektionseffizienz bei unterschiedlichen Versuchsreihen durch das jeweils frische Ansetzen der Komplexe. Der Vergleich von jetPEI® für einige Transfektionen mit DNA zeigte allerdings, dass dieses kommerziell erhältliche PEI für ein Einfrieren nicht so geeignet ist wie PEI-F25-LMW, also nicht automatisch alle PEIs in gleichem Maße für diese Anwendungsform zu gebrauchen sind.

Durch die Serum-Unabhängigkeit der Transfektionseffizienz für DNA- bzw. siRNA-PEI-F25-LMW-Komplexe können Experimente *in vitro* durchgeführt werden, ohne dass Zellen für die Transfektion auf Medium mit einem geringen Serumgehalt umgestellt werden müssen. Vor allem für *in vivo* Experimente ist es wichtig, dass durch Serumproteine mit keiner Minderung der Transfektionseffizienz zu rechnen ist. Im Gegensatz dazu zeigte z.B. das hier zum Vergleich eingesetzte jetPEI® mit steigendem Serumgehalt eine verminderte Transfektionseffizienz.

Anhand eines eGFP-Targetings in stabil eGFP-exprimierenden PC-3 Zellen mit PEI-F25-LMW-siRNA-Komplexen konnte visuell keine Herunterregulation von eGFP beobachtet werden. Hierbei war möglicherweise das Targeting nicht effizient, so dass der eGFP-mRNA-Gehalt nicht stark genug gemindert werden konnte und die verbleibende Expression ausreichte, die Zellen weiterhin scheinbar gleich stark

fluoreszieren zu lassen. eGFP hat eine Halbwertszeit von etwa 24 h und es konnte gezeigt werden, dass durch siRNA-Targeting von eGFP mit siRNA-Expressions-Vektoren eine maximale Herunterregulation (um ca. 60%) nach ca. 5 d erreicht wird [103]. Wenn hier also die Transfektionseffizienz nicht ausreichend war, konnte möglicherweise der noch verbleibende eGFP-Gehalt in den Zellen für eine Fluoreszenz sorgen, zumal eGFP hier unter der Kontrolle eines CMV-Promoters stand und damit viel eGFP von den Zellen gebildet wurde. eGFP hätte demnach also einen gewissen Sättigungsgehalt in der Zelle erreicht, dessen Zu- oder Abnahme die Intensität der Fluoreszenz bei zu geringer Transfektionseffizienz nicht weiter verändert. Um ein effizientes Targeting zu verifizieren, könnte eine mRNA-Quantifizierung von eGFP oder eine Bestimmung des eGFP-Proteingehalts nach dem VEGF-Targeting durchgeführt werden. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Transfektion der Zellen mit eGFP-siRNA-Expressions-Vektoren, die für einen längeren Zeitraum siRNAs in der Zelle bilden könnten. Da die Menge der Ziel-RNA für die Targetingeffizienz nicht relevant ist [42], bietet sich die Dauer des Targetings als Variable an. Unter Umständen könnte aber auch hier ein Effekt ausbleiben, da durch Zellteilungen der stark proliferierenden Zellen der siRNA-Expressionsvektor „titriert“ werden könnte.

Die Zytotoxizitäten von DNA- bzw. siRNA-PEI-F25-LMW-Komplexen sind wie in dieser Arbeit gezeigt als gleichwertig einzustufen. Der Unterschied zwischen DNA- und siRNA-Komplexen in Abbildung 3.10 kann damit begründet werden, dass mit 0,8 µg siRNA etwas mehr Nukleinsäure (und damit Komplex) eingesetzt wurde als bei den DNA-Transfektionen (0,5 µg). Die Werte von 8-10% Zytotoxizität für DNA-PEI-F25-LMW-Komplexe sind vergleichbar mit den von Werth et al. [84] beschriebenen Daten für frische Komplexe. Dass die Werte hier 3-5% nach oben abweichen, könnte daran liegen, dass die Zytotoxizität hier nach 72 h bestimmt wurde, bei Wert et al. hingegen schon nach 24 h. Es ist aber festzuhalten, dass die hier beschriebenen Zytotoxizitäten der PEI-F25-LMW-Komplexe deutlich unter denen für andere PEIs liegen. So beschreiben Sethuraman et al. [79] Zytotoxizitäten für ein 25 kDa PEI komplexiert mit DNA von bis zu 70%. Nimesh et al. [104] beschreiben für ein 750 kDa PEI komplexiert mit DNA Zytotoxizitäten von ca. 50 %. Problematisch bei solchen Vergleichen sind z.T. unterschiedliche Testsysteme für die Zytotoxizität und die Verwendung verschiedener Zelllinien in Kombination mit variierenden Komplex-Mengen. So konnte in der Arbeit gezeigt werden, dass bei PC-3 Zellen die Transfektion mit gleicher

Komplex-Menge noch nicht toxisch war, während dies bei Du145 Zellen bereits der Fall war (Abschnitt 3.3).

Die hier gezeigten Ergebnisse des VEGF-Targetings an den Prostatakarzinom-Zelllinien PC-3 und Du145 unterstreichen, dass sich PEI-F25-LMW als Transfektionsreagenz für verschiedene Zelllinien (zumindest *in vitro*) eignet. Allerdings konnte trotz der auf mRNA-Ebene und Protein-Ebene nachgewiesenen Herunterregulation von VEGF nicht gefunden werden, dass VEGF in diesen Zellen als autokriner Wachstumsstimulator wirkt, wie die durchgeführten Proliferationsassays und Soft-Agar-Assays belegten. Da Proliferationsassays kein vermindertes Zellwachstum nach einem VEGF-Targeting ergaben, könnte geschlussfolgert werden, dass die beiden Zelllinien zum Erhalt ihrer Proliferationsraten nicht auf eine VEGF-Stimulation angewiesen sind. Plausibel wäre auch die Möglichkeit, dass sich im Medium ausreichend andere Wachstumsfaktoren befinden, die hinreichend stimulierend wirken. Da aber die Versuche auch unter serumfreien Bedingungen durchgeführt wurden, erscheint diese Möglichkeit eher unwahrscheinlich. Zellen die adhärent (2-D) wachsen verhalten sich anders, als Zellen die z.B. in einem Soft-Agar wachsen (3-D), wie u.a. Aigner et al. [105] an Du145 Zellen zeigten. Dort wirkte sich ein Ribozym-Targeting gegen FGF-BP (fibroblast growth factor-binding protein) nicht auf die Proliferation adhärenter Zellen aus, wohl aber auf die Proliferation bzw. das Koloniewachstum in einem Soft-Agar. Zudem kommt adhäsionsunabhängiges Wachstum der *in vivo*-Situation näher als Wachstum in 2-D. Die im Rahmen der Arbeit durchgeführten Soft-Agar-Assays konnten allerdings kein vermindertes Koloniewachstum nach VEGF-Targeting an PC-3 oder Du145 Zellen zeigen. Nicht auszuschließen ist, dass mit weiteren Soft-Agar-Assays unter verschiedenen Bedingungen in Kombination mit variierenden Targeting-Protokollen (z.B. größere siRNA-Mengen, mehrere siRNAs) ein Effekt nachgewiesen werden kann. Da Soft-Agar-Assays mit einem relativ hohen Aufwand verbunden sind, würde sich eventuell das von Ke et al. [106] beschriebene Soft-Agar-System im 96-well Format eignen, um dieser „Kombinatorik“ gerecht zu werden. In Zukunft könnten aber auch Systeme wie das Inkjet-Printing von Zellen schnelle Hochdurchsatz-Lösungen für 3-D *in vitro*-Wachstumsanalysen bieten [107-109].

Die QT-RT-PCR-Daten zeigen allerdings auch, dass die Herunterregulation der mRNAs nur um ca. 60% stattfand. Auf Proteinebene konnten Herunterregulationen von bis zu

90% (Abb. 3.20) gezeigt werden. Da sich sowohl die QT-RT-PCR als auch der ELSIA als sehr robuste Assays erwiesen, können durch das Test-System verursachte Schwankungen der Nachweisgrenze ausgeschlossen werden. Inwieweit durch die Wahl anderer siRNAs oder der Verwendung mehrerer siRNAs in Kombination gegen VEGF eine noch stärkere Herunterregulation erreicht werden könnte, und ob diese dann einen Effekt hätte, bleibt zu klären. Da sich, wie u.a. auch in der Arbeit gezeigt, siRNAs in ihrer Effizienz unterscheiden können (Abb. 3.15), besteht die Möglichkeit, noch effizientere siRNAs oder Kombinationen aus diesen zu finden, um VEGF stärker herunterzuregulieren. Zudem wäre ein Doppel-Targeting von VEGF und VEGFR denkbar.

Als ein Knotenpunkt (engl. hub), in Analogie zu Barabesi und Bonabeau 's Netzwerk-Experiment [7], dessen Verlust sich wesentlich auf die „Systeme“ PC-3 bzw. Du145 auswirkt, kann VEGF damit zumindest in vitro nicht angesehen werden. Ein Effekt in vivo ist jedoch nicht auszuschließen, da durch verminderte VEGF-Sekretion der Zellen die Stimulation auf Endothelzellen und die damit verbundene Tumor-Angiogenese geringer ausfallen dürfte.

Die in vivo Wachstumskinetiken von Du145 Zellen in athymischen Nacktmäusen zeigten für 2 bzw. 3 Mio injizierte Zellen ein exponentielles Wachstum über einen Zeitraum von ca. 15 d. Danach stellte sich eine Stagnation ein oder die Tumoren verkleinerten sich wieder. Für die Injektion mit 5 Mio Zellen zeigte sich im gleichen Zeitraum ein lineares Wachstum, der Versuch wurde aber nach 15 d beendet, da die Tumoren in diesem Zeitraum ein deutlich größeres Volumen erreicht hatten, als es für die geringeren Ausgangszellzahlen der Fall war. Eine Stagnation oder gar Remission war hier nicht absehbar. Imai et al. [110] verwendeten in einem athymischen Nacktmaus-Modell ebenfalls 5 Mio Du145 Zellen (in PBS) zur subkutanen Injektion. Ikezoe et al. [111] injizierten 2 Mio Zellen subkutan in Matrigel, wodurch möglicherweise bessere Ausgangsbedingungen für die Zellen geschaffen wurden. Die Korrelation zwischen der Zahl injizierter Zellen und dem daraus resultierenden Unterschied in der Wachstumskinetik, lässt sich eventuell mit der Krebs-Stammzell-Theorie erklären. Polyak und Hahn [112] argumentieren damit, dass für die Tumorinitiation mit Zellen einer stabilen Tumorzelllinie nach gängiger Vorstellung auch eine geringe Menge an Zellen ausreichen sollte. Dies ist aber nicht der Fall, da in

der Regel sehr viele Zellen injiziert werden müssen (Millionen). Denkbar wäre also, dass unter diesen Zellen einige wenige Krebsstammzellen sind, die das Tumorwachstum aufrecht erhalten. Gelangen zu wenige davon mit in den injizierten Tumor, kann der Verlust von Tumorzellen z.B. durch Absterben nicht ausgeglichen werden. Dass die Tumoren mit wenigen Zellen hier erst bis zu einem gewissen Zeitpunkt gewachsen sind, könnte dann darauf zurückzuführen sein, dass vorhandene Krebs-Stammzellen -aus welchen Gründen auch immer- inaktiviert wurden und das „System“ deshalb zum Erliegen gekommen ist. Bei 5 Mio Zellen wären ausreichend Krebs-Stammzellen vorhanden gewesen. Burkert et al. [113] führen diesbezüglich eine Reihe von Beispielen an, in denen gezeigt werden konnte, dass nach Isolation bestimmter Tumorzellen eine Zellzahl von nur 100 (in einem anderen Fall 5000) ausreichend ist, um Tumore zu initiieren.

## 5 Ausblick

Das hier charakterisierte PEI-F25-LMW [84] [Höbel, S. et al. Publikation in Vorbereitung] ermöglicht Einfrieren und Lagerung von DNA- bzw. siRNA-PEI-F25-LMW-Komplexen ohne Beeinträchtigung der Transfektionseffizienzen. Weiterhin kann damit unabhängig vom Serumgehalt des Mediums transfiziert werden, was sich positiv auf in vivo Applikationen auswirken dürfte. Es gilt nun, PEI-F25-LMW auf Transfektionseffizienz und Toxizität im in vivo Modell zu untersuchen. Eine Derivatisierung des PEIs mit Antikörpern gegen bestimmte Tumorzellmarker könnte das Targeting noch effizienter gestalten und die Spezifität erhöhen, wie z.B. für andere PEIs von Moffatt et al. [114] und Shir et al. [115] gezeigt. Auch ist denkbar, das PEI mit diversen niedermolekularen Verbindungen zu derivatisieren, wie unter 1.7 für verschiedene andere PEIs beschrieben, um z.B. die Halbwertszeit der Komplexe in vivo zu erhöhen und die Toxizität zu mindern.

Hinsichtlich eines VEGF-Targetings an den in vivo charakterisierten Du145 Zellen, könnte sich, durch die wichtige Rolle von VEGF in der Tumorangiogenese, im in vivo Modell durchaus ein Effekt auf das Tumorwachstum einstellen, und so doch noch eine Schlüsselstellung von VEGF in diesem Modell etablieren. Durch die Komplexierung mehrerer siRNAs gegen verschiedene Targets mit PEI-F25-LMW könnte mit einem einzigen Ansatz möglicherweise eine ausreichende Zahl an tumorigenen Schlüsselmechanismen (hubs) in diesen Zellen ausgeschaltet werden und in Kombination mit Apoptosemechanismen eine vollständige Tumorregression bewirkt werden.

## 6 Literatur

1. Aigner, A. (2006). Delivery Systems for the Direct Application of siRNAs to Induce RNA Interference (RNAi) in vivo. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2006, 1-15.
2. Filipowicz, W., Jaskiewicz, L., Kolb, F.A., and Pillai, R.S. (2005). Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. *Curr Opin Struct Biol* 15, 331-341.
3. Kitano, H. (2004). Cancer as a robust system: implications for anticancer therapy. *Nat Rev Cancer* 4, 227-235.
4. O'Malley, M.A., and Dupre, J. (2005). Fundamental issues in systems biology. *Bioessays* 27, 1270-1276.
5. Alberghina, L., Chiaradonna, F., and Vanoni, M. (2004). Systems biology and the molecular circuits of cancer. *Chembiochem* 5, 1322-1333.
6. Callebaut, W., and Rasskin-Gutman, D. (2005). *Modularity : understanding the development and evolution of natural complex systems* (Cambridge, Mass.: MIT Press).
7. Barabasi, A.L., and Bonabeau, E. (2003). Scale-free networks. *Sci Am* 288, 60-69.
8. Guiot, C., Degiorgis, P.G., Delsanto, P.P., Gabriele, P., and Deisboeck, T.S. (2003). Does tumor growth follow a "universal law"? *J Theor Biol* 225, 147-151.
9. Guiot, C., Delsanto, P.P., Carpinteri, A., Pugno, N., Mansury, Y., and Deisboeck, T.S. (2006). The dynamic evolution of the power exponent in a universal growth model of tumors. *J Theor Biol* 240, 459-463.
10. Irish, J.M., Kotecha, N., and Nolan, G.P. (2006). Mapping normal and cancer cell signalling networks: towards single-cell proteomics. *Nat Rev Cancer* 6, 146-155.
11. Li, L., and Neaves, W.B. (2006). Normal stem cells and cancer stem cells: the niche matters. *Cancer Res* 66, 4553-4557.
12. Hammond, S.M. (2006). MicroRNAs as oncogenes. *Curr Opin Genet Dev* 16, 4-9.
13. Carninci, P., Kasukawa, T., Katayama, S., Gough, J., Frith, M.C., Maeda, N., Oyama, R., Ravasi, T., Lenhard, B., Wells, C., Kodzius, R., Shimokawa, K., Bajic, V.B., Brenner, S.E., Batalov, S., Forrest, A.R., Zavolan, M., Davis, M.J., Wilming, L.G., Aidinis, V., Allen, J.E., Ambesi-Impiombato, A., Apweiler, R., Aturaliya, R.N., Bailey, T.L., Bansal, M., Baxter, L., Beisel, K.W., Bersano, T., Bono, H., Chalk, A.M., Chiu, K.P., Choudhary, V., Christoffels, A., Clutterbuck, D.R., Crowe, M.L., Dalla, E., Dalrymple, B.P., de Bono, B., Della Gatta, G., di Bernardo, D., Down, T., Engstrom, P., Fagiolini, M., Faulkner, G., Fletcher, C.F., Fukushima, T., Furuno, M., Futaki, S., Gariboldi, M., Georgii-Hemming, P., Gingeras, T.R., Gojobori, T., Green, R.E., Gustincich, S., Harbers, M., Hayashi, Y., Hensch, T.K., Hirokawa, N., Hill, D., Huminiecki, L., Iacono, M., Ikeo, K., Iwama, A., Ishikawa, T., Jakt, M., Kanapin, A., Katoh, M., Kawasaki, Y., Kelso, J., Kitamura, H., Kitano, H., Kollias, G., Krishnan, S.P.,

- Kruger, A., Kummerfeld, S.K., Kurochkin, I.V., Lareau, L.F., Lazarevic, D., Lipovich, L., Liu, J., Liuni, S., McWilliam, S., Madan Babu, M., Madera, M., Marchionni, L., Matsuda, H., Matsuzawa, S., Miki, H., Mignone, F., Miyake, S., Morris, K., Mottagui-Tabar, S., Mulder, N., Nakano, N., Nakauchi, H., Ng, P., Nilsson, R., Nishiguchi, S., Nishikawa, S., Nori, F., Ohara, O., Okazaki, Y., Orlando, V., Pang, K.C., Pavan, W.J., Pavesi, G., Pesole, G., Petrovsky, N., Piazza, S., Reed, J., Reid, J.F., Ring, B.Z., Ringwald, M., Rost, B., Ruan, Y., Salzberg, S.L., Sandelin, A., Schneider, C., Schonbach, C., Sekiguchi, K., Semple, C.A., Seno, S., Sessa, L., Sheng, Y., Shibata, Y., Shimada, H., Shimada, K., Silva, D., Sinclair, B., Sperling, S., Stupka, E., Sugiura, K., Sultana, R., Takenaka, Y., Taki, K., Tammoja, K., Tan, S.L., Tang, S., Taylor, M.S., Tegner, J., Teichmann, S.A., Ueda, H.R., van Nimwegen, E., Verardo, R., Wei, C.L., Yagi, K., Yamanishi, H., Zabarovsky, E., Zhu, S., Zimmer, A., Hide, W., Bult, C., Grimmond, S.M., Teasdale, R.D., Liu, E.T., Brusic, V., Quackenbush, J., Wahlestedt, C., Mattick, J.S., Hume, D.A., Kai, C., Sasaki, D., Tomaru, Y., Fukuda, S., Kanamori-Katayama, M., Suzuki, M., Aoki, J., Arakawa, T., Iida, J., Imamura, K., Itoh, M., Kato, T., Kawaji, H., Kawagashira, N., Kawashima, T., Kojima, M., Kondo, S., Konno, H., Nakano, K., Ninomiya, N., Nishio, T., Okada, M., Plessy, C., Shibata, K., Shiraki, T., Suzuki, S., Tagami, M., Waki, K., Watahiki, A., Okamura-Oho, Y., Suzuki, H., Kawai, J., and Hayashizaki, Y. (2005). The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science* 309, 1559-1563.
14. Katayama, S., Tomaru, Y., Kasukawa, T., Waki, K., Nakanishi, M., Nakamura, M., Nishida, H., Yap, C.C., Suzuki, M., Kawai, J., Suzuki, H., Carninci, P., Hayashizaki, Y., Wells, C., Frith, M., Ravasi, T., Pang, K.C., Hallinan, J., Mattick, J., Hume, D.A., Lipovich, L., Batalov, S., Engstrom, P.G., Mizuno, Y., Faghihi, M.A., Sandelin, A., Chalk, A.M., Mottagui-Tabar, S., Liang, Z., Lenhard, B., and Wahlestedt, C. (2005). Antisense transcription in the mammalian transcriptome. *Science* 309, 1564-1566.
15. Ravasi, T., Suzuki, H., Pang, K.C., Katayama, S., Furuno, M., Okunishi, R., Fukuda, S., Ru, K., Frith, M.C., Gongora, M.M., Grimmond, S.M., Hume, D.A., Hayashizaki, Y., and Mattick, J.S. (2006). Experimental validation of the regulated expression of large numbers of non-coding RNAs from the mouse genome. *Genome Res* 16, 11-19.
16. Furuno, M., Pang, K.C., Ninomiya, N., Fukuda, S., Frith, M.C., Bult, C., Kai, C., Kawai, J., Carninci, P., Hayashizaki, Y., Mattick, J.S., and Suzuki, H. (2006). Clusters of internally primed transcripts reveal novel long noncoding RNAs. *PLoS Genet* 2, e37.
17. Lu, J., Getz, G., Miska, E.A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., Sweet-Cordero, A., Ebert, B.L., Mak, R.H., Ferrando, A.A., Downing, J.R., Jacks, T., Horvitz, H.R., and Golub, T.R. (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435, 834-838.
18. Al-Hajj, M., Becker, M.W., Wicha, M., Weissman, I., and Clarke, M.F. (2004). Therapeutic implications of cancer stem cells. *Curr Opin Genet Dev* 14, 43-47.
19. Kerbel, R., and Folkman, J. (2002). Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2, 727-739.
20. Kerbel, R.S., Yu, J., Tran, J., Man, S., Vilorio-Petit, A., Klement, G., Coomber, B.L., and Rak, J. (2001). Possible mechanisms of acquired resistance to anti-

- angiogenic drugs: implications for the use of combination therapy approaches. *Cancer Metastasis Rev* 20, 79-86.
21. Tlsty, T.D.C.L.M. (2006). Tumor Stroma and Regulation of Cancer Development. *The Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 1, 119-150.
  22. Mehlen, P., and Puisieux, A. (2006). Metastasis: a question of life or death. *Nat Rev Cancer* 6, 449-458.
  23. Byrne, A.M., Bouchier-Hayes, D.J., and Harmey, J.H. (2005). Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). *J Cell Mol Med* 9, 777-794.
  24. Graeven, U., Fiedler, W., Karpinski, S., Ergun, S., Kilic, N., Rodeck, U., Schmiegel, W., and Hossfeld, D.K. (1999). Melanoma-associated expression of vascular endothelial growth factor and its receptors FLT-1 and KDR. *J Cancer Res Clin Oncol* 125, 621-629.
  25. Lacal, P.M., Failla, C.M., Pagani, E., Odorisio, T., Schietroma, C., Falcinelli, S., Zambruno, G., and D'Atri, S. (2000). Human melanoma cells secrete and respond to placenta growth factor and vascular endothelial growth factor. *J Invest Dermatol* 115, 1000-1007.
  26. Cebe-Suarez, S., Zehnder-Fjallman, A., and Ballmer-Hofer, K. (2006). The role of VEGF receptors in angiogenesis; complex partnerships. *Cell Mol Life Sci* 63, 601-615.
  27. Jain, R.K., Duda, D.G., Clark, J.W., and Loeffler, J.S. (2006). Lessons from phase III clinical trials on anti-VEGF therapy for cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 3, 24-40.
  28. Takei, Y., Kadomatsu, K., Yuzawa, Y., Matsuo, S., and Muramatsu, T. (2004). A small interfering RNA targeting vascular endothelial growth factor as cancer therapeutics. *Cancer Res* 64, 3365-3370.
  29. Shen, J., Samul, R., Silva, R.L., Akiyama, H., Liu, H., Saishin, Y., Hackett, S.F., Zinnen, S., Kossen, K., Fosnaugh, K., Vargeese, C., Gomez, A., Bouhana, K., Aitchison, R., Pavco, P., and Campochiaro, P.A. (2006). Suppression of ocular neovascularization with siRNA targeting VEGF receptor 1. *Gene Ther* 13, 225-234.
  30. Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Murray, T., Xu, J., Smigal, C., and Thun, M.J. (2006). Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J Clin* 56, 106-130.
  31. Ferrer, F.A., Miller, L.J., Andrawis, R.I., Kurtzman, S.H., Albertsen, P.C., Laudone, V.P., and Kreutzer, D.L. (1998). Angiogenesis and prostate cancer: in vivo and in vitro expression of angiogenesis factors by prostate cancer cells. *Urology* 51, 161-167.
  32. Ferrer, F.A., Miller, L.J., Lindquist, R., Kowalczyk, P., Laudone, V.P., Albertsen, P.C., and Kreutzer, D.L. (1999). Expression of vascular endothelial growth factor receptors in human prostate cancer. *Urology* 54, 567-572.
  33. Taylor, R.A., Cowin, P.A., Cunha, G.R., Pera, M., Trounson, A.O., Pedersen, J., and Risbridger, G.P. (2006). Formation of human prostate tissue from embryonic stem cells. *Nat Methods* 3, 179-181.
  34. Holash, J., Davis, S., Papadopoulos, N., Croll, S.D., Ho, L., Russell, M., Boland, P., Leidich, R., Hylton, D., Burova, E., Ioffe, E., Huang, T., Radziejewski, C.,

- Bailey, K., Fandl, J.P., Daly, T., Wiegand, S.J., Yancopoulos, G.D., and Rudge, J.S. (2002). VEGF-Trap: a VEGF blocker with potent antitumor effects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 11393-11398.
35. Wannenes, F., Ciafre, S.A., Niola, F., Frajese, G., and Farace, M.G. (2005). Vector-based RNA interference against vascular endothelial growth factor-A significantly limits vascularization and growth of prostate cancer in vivo. *Cancer Gene Ther* 12, 926-934.
36. Lee, M., Hwang, J.T., Yun, H., Kim, E.J., Kim, M.J., Kim, S.S., and Ha, J. (2006). Critical roles of AMP-activated protein kinase in the carcinogenic metal-induced expression of VEGF and HIF-1 proteins in DU145 prostate carcinoma. *Biochem Pharmacol*.
37. Yun, H., Lee, M., Kim, S.S., and Ha, J. (2005). Glucose deprivation increases mRNA stability of vascular endothelial growth factor through activation of AMP-activated protein kinase in DU145 prostate carcinoma. *J Biol Chem* 280, 9963-9972.
38. Overhoff, M., Alken, M., Far, R.K., Lemaitre, M., Lebleu, B., Sczakiel, G., and Robbins, I. (2005). Local RNA target structure influences siRNA efficacy: a systematic global analysis. *J Mol Biol* 348, 871-881.
39. Schubert, S., Grunweller, A., Erdmann, V.A., and Kurreck, J. (2005). Local RNA target structure influences siRNA efficacy: systematic analysis of intentionally designed binding regions. *J Mol Biol* 348, 883-893.
40. Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281-297.
41. Pan, W.H., and Clawson, G.A. (2006). Antisense applications for biological control. *J Cell Biochem* 98, 14-35.
42. Detwiler, K.Y., Fernando, N.T., Segal, N.H., Ryeom, S.W., D'Amore, P.A., and Yoon, S.S. (2005). Analysis of hypoxia-related gene expression in sarcomas and effect of hypoxia on RNA interference of vascular endothelial cell growth factor A. *Cancer Res* 65, 5881-5889.
43. Neumann, B., Held, M., Liebel, U., Erfle, H., Rogers, P., Pepperkok, R., and Ellenberg, J. (2006). High-throughput RNAi screening by time-lapse imaging of live human cells. *Nat Methods* 3, 385-390.
44. Sandy, P., Ventura, A., and Jacks, T. (2005). Mammalian RNAi: a practical guide. *Biotechniques* 39, 215-224.
45. Sioud, M. (2005). Induction of inflammatory cytokines and interferon responses by double-stranded and single-stranded siRNAs is sequence-dependent and requires endosomal localization. *J Mol Biol* 348, 1079-1090.
46. Sledz, C.A., Holko, M., de Veer, M.J., Silverman, R.H., and Williams, B.R. (2003). Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol* 5, 834-839.
47. Judge, A.D., Sood, V., Shaw, J.R., Fang, D., McClintock, K., and MacLachlan, I. (2005). Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. *Nat Biotechnol* 23, 457-462.
48. Sioud, M. (2006). Single-stranded small interfering RNA are more immunostimulatory than their double-stranded counterparts: A central role for 2'-hydroxyl uridines in immune responses. *Eur J Immunol* 36, 1222-1230.

49. Dowler, T., Bergeron, D., Tedeschi, A.L., Paquet, L., Ferrari, N., and Damha, M.J. (2006). Improvements in siRNA properties mediated by 2'-deoxy-2'-fluoro-beta-D-arabinonucleic acid (FANA). *Nucleic Acids Res* 34, 1669-1675.
50. Morrissey, D.V., Lockridge, J.A., Shaw, L., Blanchard, K., Jensen, K., Breen, W., Hartsough, K., Macheimer, L., Radka, S., Jadhav, V., Vaish, N., Zinnen, S., Vargeese, C., Bowman, K., Shaffer, C.S., Jeffs, L.B., Judge, A., MacLachlan, I., and Polisky, B. (2005). Potent and persistent in vivo anti-HBV activity of chemically modified siRNAs. *Nat Biotechnol* 23, 1002-1007.
51. Jackson, A.L., Burchard, J., Leake, D., Reynolds, A., Schelter, J., Guo, J., Johnson, J.M., Lim, L., Karpilow, J., Nichols, K., Marshall, W., Khvorova, A., and Linsley, P.S. (2006). Position-specific chemical modification of siRNAs reduces "off-target" transcript silencing. *Rna*.
52. Aigner, A. (2006). Gene silencing through RNA interference (RNAi) in vivo: Strategies based on the direct application of siRNAs. *J Biotechnol* 124, 12-25.
53. Layzer, J.M., McCaffrey, A.P., Tanner, A.K., Huang, Z., Kay, M.A., and Sullenger, B.A. (2004). In vivo activity of nuclease-resistant siRNAs. *Rna* 10, 766-771.
54. Soutschek, J., Akinc, A., Bramlage, B., Charisse, K., Constien, R., Donoghue, M., Elbashir, S., Geick, A., Hadwiger, P., Harborth, J., John, M., Kesavan, V., Lavine, G., Pandey, R.K., Racie, T., Rajeev, K.G., Rohl, I., Toudjarska, I., Wang, G., Wuschko, S., Bumcrot, D., Kotliansky, V., Limmer, S., Manoharan, M., and Vornlocher, H.P. (2004). Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature* 432, 173-178.
55. 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., Judge, A.D., Lam, K., McClintock, K., Nechev, L.V., Palmer, L.R., Racie, T., Rohl, I., Seiffert, S., Shanmugam, S., Sood, V., Soutschek, J., Toudjarska, I., Wheat, A.J., Yaworski, E., Zedalis, W., Kotliansky, V., Manoharan, M., Vornlocher, H.P., and MacLachlan, I. (2006). RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature* 441, 111-114.
56. Zentilin, L., and Giacca, M. (2004). In vivo transfer and expression of genes coding for short interfering RNAs. *Curr Pharm Biotechnol* 5, 341-347.
57. Patil, S.D., Rhodes, D.G., and Burgess, D.J. (2005). DNA-based therapeutics and DNA delivery systems: a comprehensive review. *Aaps J* 7, E61-77.
58. Hart, S.L. (2005). Lipid carriers for gene therapy. *Curr Drug Deliv* 2, 423-428.
59. Zhang, C., Tang, N., Liu, X., Liang, W., Xu, W., and Torchilin, V.P. (2006). siRNA-containing liposomes modified with polyarginine effectively silence the targeted gene. *J Control Release* 112, 229-239.
60. Hassani, Z., Lemkine, G.F., Erbacher, P., Palmier, K., Alfama, G., Giovannangeli, C., Behr, J.P., and Demeneix, B.A. (2005). Lipid-mediated siRNA delivery down-regulates exogenous gene expression in the mouse brain at picomolar levels. *J Gene Med* 7, 198-207.
61. Guo, S., Tschammer, N., Mohammed, S., and Guo, P. (2005). Specific delivery of therapeutic RNAs to cancer cells via the dimerization mechanism of phi29 motor pRNA. *Hum Gene Ther* 16, 1097-1109.

62. Guo, S., Huang, F., and Guo, P. (2006). Construction of folate-conjugated pRNA of bacteriophage phi29 DNA packaging motor for delivery of chimeric siRNA to nasopharyngeal carcinoma cells. *Gene Ther* 13, 814-820.
63. Khaled, A., Guo, S., Li, F., and Guo, P. (2005). Controllable self-assembly of nanoparticles for specific delivery of multiple therapeutic molecules to cancer cells using RNA nanotechnology. *Nano Lett* 5, 1797-1808.
64. Bradley, S.P., Rastellini, C., da Costa, M.A., Kowalik, T.F., Bloomenthal, A.B., Brown, M., Cicalese, L., Basadonna, G.P., and Uknis, M.E. (2005). Gene silencing in the endocrine pancreas mediated by short-interfering RNA. *Pancreas* 31, 373-379.
65. Neu, M., Fischer, D., and Kissel, T. (2005). Recent advances in rational gene transfer vector design based on poly(ethylene imine) and its derivatives. *J Gene Med* 7, 992-1009.
66. Kichler, A., Leborgne, C., Coeytaux, E., and Danos, O. (2001). Polyethylenimine-mediated gene delivery: a mechanistic study. *J Gene Med* 3, 135-144.
67. Grosse, S., Thevenot, G., Monsigny, M., and Fajac, I. (2006). Which mechanism for nuclear import of plasmid DNA complexed with polyethylenimine derivatives? *J Gene Med* 8, 845-851.
68. Bausinger, R., von Gersdorff, K., Braeckmans, K., Ogris, M., Wagner, E., Brauchle, C., and Zumbusch, A. (2006). The transport of nanosized gene carriers unraveled by live-cell imaging. *Angew Chem Int Ed Engl* 45, 1568-1572.
69. Lechardeur, D., Verkman, A.S., and Lukacs, G.L. (2005). Intracellular routing of plasmid DNA during non-viral gene transfer. *Adv Drug Deliv Rev* 57, 755-767.
70. Glodde, M., Sirsi, S.R., and Lutz, G.J. (2006). Physicochemical properties of low and high molecular weight poly(ethylene glycol)-grafted poly(ethylene imine) copolymers and their complexes with oligonucleotides. *Biomacromolecules* 7, 347-356.
71. Merdan, T., Kunath, K., Petersen, H., Bakowsky, U., Voigt, K.H., Kopecek, J., and Kissel, T. (2005). PEGylation of poly(ethylene imine) affects stability of complexes with plasmid DNA under in vivo conditions in a dose-dependent manner after intravenous injection into mice. *Bioconjug Chem* 16, 785-792.
72. Ogris, M., Walker, G., Blessing, T., Kircheis, R., Wolschek, M., and Wagner, E. (2003). Tumor-targeted gene therapy: strategies for the preparation of ligand-polyethylene glycol-polyethylenimine/DNA complexes. *J Control Release* 91, 173-181.
73. Banerjee, P., Weissleder, R., and Bogdanov, A., Jr. (2006). Linear polyethyleneimine grafted to a hyperbranched poly(ethylene glycol)-like core: a copolymer for gene delivery. *Bioconjug Chem* 17, 125-131.
74. Boeckle, S., Fahrmeir, J., Roedl, W., Ogris, M., and Wagner, E. (2006). Melittin analogs with high lytic activity at endosomal pH enhance transfection with purified targeted PEI polyplexes. *J Control Release* 112, 240-248.
75. Boeckle, S., Wagner, E., and Ogris, M. (2005). C- versus N-terminally linked melittin-polyethylenimine conjugates: the site of linkage strongly influences activity of DNA polyplexes. *J Gene Med* 7, 1335-1347.

76. Forrest, M.L., Gabrielson, N., and Pack, D.W. (2005). Cyclodextrin-polyethylenimine conjugates for targeted in vitro gene delivery. *Biotechnol Bioeng* 89, 416-423.
77. Pun, S.H., Bellocq, N.C., Liu, A., Jensen, G., Machemer, T., Quijano, E., Schlupe, T., Wen, S., Engler, H., Heidel, J., and Davis, M.E. (2004). Cyclodextrin-modified polyethylenimine polymers for gene delivery. *Bioconjug Chem* 15, 831-840.
78. Wong, K., Sun, G., Zhang, X., Dai, H., Liu, Y., He, C., and Leong, K.W. (2006). PEI-g-chitosan, a novel gene delivery system with transfection efficiency comparable to polyethylenimine in vitro and after liver administration in vivo. *Bioconjug Chem* 17, 152-158.
79. Sethuraman, V.A., Na, K., and Bae, Y.H. (2006). pH-responsive sulfonamide/PEI system for tumor specific gene delivery: an in vitro study. *Biomacromolecules* 7, 64-70.
80. Pons, B., Mouhoubi, L., Adib, A., Godzina, P., Behr, J.P., and Zuber, G. (2006). omega-Hydrazino linear polyethylenimine: a monoconjugation building block for nucleic acid delivery. *Chembiochem* 7, 303-309.
81. Kim, S.H., Jeong, J.H., Chun, K.W., and Park, T.G. (2005). Target-specific cellular uptake of PLGA nanoparticles coated with poly(L-lysine)-poly(ethylene glycol)-folate conjugate. *Langmuir* 21, 8852-8857.
82. Kim, S.H., Mok, H., Jeong, J.H., Kim, S.W., and Park, T.G. (2006). Comparative evaluation of target-specific GFP gene silencing efficiencies for antisense ODN, synthetic siRNA, and siRNA plasmid complexed with PEI-PEG-FOL conjugate. *Bioconjug Chem* 17, 241-244.
83. Moffatt, S., Wiehle, S., and Cristiano, R.J. (2006). A multifunctional PEI-based cationic polyplex for enhanced systemic p53-mediated gene therapy. *Gene Ther.*
84. Werth, S., Urban-Klein, B., Dai, L., Hobel, S., Grzelinski, M., Bakowsky, U., Czubayko, F., and Aigner, A. (2006). A low molecular weight fraction of polyethylenimine (PEI) displays increased transfection efficiency of DNA and siRNA in fresh or lyophilized complexes. *J Control Release* 112, 257-270.
85. Ogris, M., Steinlein, P., Kursa, M., Mechtler, K., Kircheis, R., and Wagner, E. (1998). The size of DNA/transferrin-PEI complexes is an important factor for gene expression in cultured cells. *Gene Ther* 5, 1425-1433.
86. Ogris, M., Steinlein, P., Carotta, S., Brunner, S., and Wagner, E. (2001). DNA/polyethylenimine transfection particles: influence of ligands, polymer size, and PEGylation on internalization and gene expression. *AAPS PharmSci* 3, E21.
87. Wightman, L., Kircheis, R., Rossler, V., Carotta, S., Ruzicka, R., Kursa, M., and Wagner, E. (2001). Different behavior of branched and linear polyethylenimine for gene delivery in vitro and in vivo. *J Gene Med* 3, 362-372.
88. Thomas, M., Ge, Q., Lu, J.J., Chen, J., and Klivanov, A.M. (2005). Cross-linked small polyethylenimines: while still nontoxic, deliver DNA efficiently to mammalian cells in vitro and in vivo. *Pharm Res* 22, 373-380.
89. Chollet, P., Favrot, M.C., Hurbin, A., and Coll, J.L. (2002). Side-effects of a systemic injection of linear polyethylenimine-DNA complexes. *J Gene Med* 4, 84-91.

90. Fischer, D., Li, Y., Ahlemeyer, B., Krieglstein, J., and Kissel, T. (2003). In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials* *24*, 1121-1131.
91. Fischer, D., Bieber, T., Li, Y., Elsasser, H.P., and Kissel, T. (1999). A novel non-viral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine: effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity. *Pharm Res* *16*, 1273-1279.
92. Boeckle, S., von Gersdorff, K., van der Piepen, S., Culmsee, C., Wagner, E., and Ogris, M. (2004). Purification of polyethylenimine polyplexes highlights the role of free polycations in gene transfer. *J Gene Med* *6*, 1102-1111.
93. Godbey, W.T., Barry, M.A., Saggau, P., Wu, K.K., and Mikos, A.G. (2000). Poly(ethylenimine)-mediated transfection: a new paradigm for gene delivery. *J Biomed Mater Res* *51*, 321-328.
94. Ge, Q., Filip, L., Bai, A., Nguyen, T., Eisen, H.N., and Chen, J. (2004). Inhibition of influenza virus production in virus-infected mice by RNA interference. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 8676-8681.
95. Urban-Klein, B., Werth, S., Abuharbeid, S., Czubayko, F., and Aigner, A. (2005). RNAi-mediated gene-targeting through systemic application of polyethylenimine (PEI)-complexed siRNA in vivo. *Gene Ther* *12*, 461-466.
96. Grzelinski, M., Urban-Klein, B., Martens, T., Lamszus, K., Bakowsky, U., Hobel, S., Czubayko, F., and Aigner, A. (2006). RNA Interference-Mediated Gene Silencing of Pleiotrophin Through Polyethylenimine-Complexed Small Interfering RNAs In Vivo Exerts Antitumoral Effects in Glioblastoma Xenografts. *Hum Gene Ther*.
97. Reinisalo, M., Urtti, A., and Honkakoski, P. (2006). Freeze-drying of cationic polymer DNA complexes enables their long-term storage and reverse transfection of post-mitotic cells. *J Control Release* *110*, 437-443.
98. Wellstein, A., Lupu, R., Zugmaier, G., Flamm, S.L., Cheville, A.L., Delli Bovi, P., Basilico, C., Lippman, M.E., and Kern, F.G. (1990). Autocrine growth stimulation by secreted Kaposi fibroblast growth factor but not by endogenous basic fibroblast growth factor. *Cell Growth Differ* *1*, 63-71.
99. Wong, M.L., and Medrano, J.F. (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* *39*, 75-85.
100. Lenter, M.C., Garidel, P., Pelisek, J., Wagner, E., and Ogris, M. (2004). Stabilized nonviral formulations for the delivery of MCP-1 gene into cells of the vasculoendothelial system. *Pharm Res* *21*, 683-691.
101. Kurasa, M., Walker, G.F., Roessler, V., Ogris, M., Roedl, W., Kircheis, R., and Wagner, E. (2003). Novel shielded transferrin-polyethylene glycol-polyethylenimine/DNA complexes for systemic tumor-targeted gene transfer. *Bioconjug Chem* *14*, 222-231.
102. Hinrichs, W.L., Mancenido, F.A., Sanders, N.N., Braeckmans, K., De Smedt, S.C., Demeester, J., and Frijlink, H.W. (2006). The choice of a suitable oligosaccharide to prevent aggregation of PEGylated nanoparticles during freeze thawing and freeze drying. *Int J Pharm* *311*, 237-244.
103. Choi, I., Cho, B.R., Kim, D., Miyagawa, S., Kubo, T., Kim, J.Y., Park, C.G., Hwang, W.S., Lee, J.S., and Ahn, C. (2005). Choice of the adequate detection

- time for the accurate evaluation of the efficiency of siRNA-induced gene silencing. *J Biotechnol* *120*, 251-261.
104. Nimesh, S., Goyal, A., Pawar, V., Jayaraman, S., Kumar, P., Chandra, R., Singh, Y., and Gupta, K.C. (2006). Polyethylenimine nanoparticles as efficient transfecting agents for mammalian cells. *J Control Release* *110*, 457-468.
  105. Aigner, A., Renneberg, H., Bojunga, J., Apel, J., Nelson, P.S., and Czubayko, F. (2002). Ribozyme-targeting of a secreted FGF-binding protein (FGF-BP) inhibits proliferation of prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Oncogene* *21*, 5733-5742.
  106. Ke, N., Albers, A., Claassen, G., Yu, D.H., Chatterton, J.E., Hu, X., Meyhack, B., Wong-Staal, F., and Li, Q.X. (2004). One-week 96-well soft agar growth assay for cancer target validation. *Biotechniques* *36*, 826-828, 830, 832-823.
  107. Xu, T., Jin, J., Gregory, C., Hickman, J.J., and Boland, T. (2005). Inkjet printing of viable mammalian cells. *Biomaterials* *26*, 93-99.
  108. Roth, E.A., Xu, T., Das, M., Gregory, C., Hickman, J.J., and Boland, T. (2004). Inkjet printing for high-throughput cell patterning. *Biomaterials* *25*, 3707-3715.
  109. Boland, T., Mironov, V., Gutowska, A., Roth, E.A., and Markwald, R.R. (2003). Cell and organ printing 2: fusion of cell aggregates in three-dimensional gels. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* *272*, 497-502.
  110. Imai, M., Hwang, H.Y., Norris, J.S., and Tomlinson, S. (2004). The effect of dexamethasone on human mucin 1 expression and antibody-dependent complement sensitivity in a prostate cancer cell line in vitro and in vivo. *Immunology* *111*, 291-297.
  111. Ikezoe, T., Hisatake, Y., Takeuchi, T., Ohtsuki, Y., Yang, Y., Said, J.W., Taguchi, H., and Koeffler, H.P. (2004). HIV-1 protease inhibitor, ritonavir: a potent inhibitor of CYP3A4, enhanced the anticancer effects of docetaxel in androgen-independent prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Res* *64*, 7426-7431.
  112. Polyak, K., and Hahn, W.C. (2006). Roots and stems: stem cells in cancer. *Nat Med* *12*, 296-300.
  113. Burkert, J., Wright, N., and Alison, M. (2006). Stem cells and cancer: an intimate relationship. *J Pathol* *209*, 287-297.
  114. Moffatt, S., Papasakelariou, C., Wiehle, S., and Cristiano, R. (2006). Successful in vivo tumor targeting of prostate-specific membrane antigen with a highly efficient J591/PEI/DNA molecular conjugate. *Gene Ther* *13*, 761-772.
  115. Shir, A., Ogris, M., Wagner, E., and Levitzki, A. (2006). EGF receptor-targeted synthetic double-stranded RNA eliminates glioblastoma, breast cancer, and adenocarcinoma tumors in mice. *PLoS Med* *3*, e6.

## 7 Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. M. Bölker für die Ermöglichung der Arbeit als externe Arbeit am Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität, sowie der Übernahme des Zweitgutachtens.

Prof. Dr. F. Czubyko möchte ich für die Annahme als Diplomand in seiner Arbeitsgruppe danken.

HD Dr. A. Aigner danke ich für die Übernahme des Erstgutachtens und die hervorragende Betreuung der praktischen Arbeit, besonders der Hilfestellung und Anregung bei technischen Problemstellungen.

Prof. Dr. A. Batschauer danke ich für die Übernahme des Drittgutachtens.

Für die gute praktische Einarbeitung und Zusammenarbeit in der Arbeitsgruppe Czubyko / Aigner möchte ich besonders Marius Grzelinski und Sabrina Höbel danken. Weiterhin gilt mein Dank allen Mitgliedern der AG Czubyko / Aigner und Angehörigen des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie für die gute Zusammenarbeit. Hermann Kalwa möchte ich für einige Tipps und Tricks, sowie der Hilfe bei Computerproblemen danken.

Meinen Eltern möchte ich für die Ermöglichung des Studiums danken.

## **8 Erklärung**

Hiermit erkläre ich, Robert Prinz, geboren am 19.06.1981 in Marburg, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe. Sie wurde in dieser oder einer ähnlichen Form bei keiner anderen Hochschule eingereicht.

Marburg, den 1. August 2006