

Aus der  
Universitätsklinik für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie Tübingen

**Potential der siRNA-Transfektion auf  
chemotherapieresistente NSCLC- und  
Pleuramesotheliumzellen -  
Auswirkungen auf Viabilität und Wachstumsverhalten**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Makowiecki, Christina Michaela**

**2021**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Prof. Dr. T. Walker

2. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Haap

Tag der Disputation: 12.02.2021

*Meiner Familie*

# **Inhaltsverzeichnis**

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Bronchialkarzinom	1
1.1.1 Therapie des NSCLC	6
1.1.2 Therapie des SCLC	7
1.1.3 Alternative Therapieansätze und neue Entwicklungen	8
1.2 Malignes Pleuramesotheliom	9
1.3 RNA-Interferenz	12
1.4 Ausgewählte Targets für die siRNA Applikation	16
1.4.1 Serum response factor (SRF)	16
1.4.3 Survivin (SV)	17
1.4.4 HIF1 $\alpha$ und HIF2 $\alpha$	17
1.4.2 E2F Transkriptionsfaktor 1 (E2F1)	18
1.4.5 STAT3	18
1.5 Ziele der Arbeit	19
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>20</b>
2.1 Material	20
2.1.1 Geräte	20
2.1.2 Chemikalien und Reagenzien	21
2.1.3 Medien	23
2.1.4 Zelllinien	24
2.1.5 SiRNA-Sequenzen	24
2.1.6 qRT-PCR Primer-Sequenzen	25
2.1.7 Westernblots	25
2.2 Methoden	28
2.2.1 Zellkultivierung und Anzuchten der Zellen	28
2.2.2 Transfektion	30
2.2.3 Quantitative Real-Time-Polymerase-Chain-Reaction (qRT-PCR)	32
2.2.3.1 Isolierung RNA und Umschreibung in cDNA	32
2.2.3.2 Quantitative Real-Time PCR	34
2.2.4 Zellzählung mittels CASY <sup>®</sup>	36

2.2.5 Transfektion Zelllinie CPC-N	37
2.2.5.1 Vorversuche	37
2.2.5.2 Optimierung der Transfektion der CPC-N Zellen	39
2.2.6 Untersuchung der Transfektionseffizienz von A549 und NCI-H460	42
2.2.7 Western Blots	42
2.2.8 Statistische Methoden	45
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>46</b>
3.1 Untersuchung der Transfektionseffizienz von A549 und NCI-H460	46
3.2 Adenokarzinomzelllinie A549	47
3.2.1 Knockdown in Adenokarzinomzelllinie A549	47
3.2.2 Zellzahl nach Transfektion von A549	49
3.3 Adenokarzinomzelllinie LXF-289	50
3.3.1 Knockdown in Adenokarzinomzelllinie LXF-289	50
3.3.2 Zellzahl nach Transfektion von LXF-289	52
3.4 Plattenepithelkarzinomzelllinie SK-MES	53
3.4.1 Knockdown in der Plattenepithelkarzinomzelllinie SK-MES	53
3.4.2 Zellzahl nach Transfektion von SK-MES	55
3.5 Großzellige Bronchialkarzinomzelllinie NCI-H460	57
3.5.1 Knockdown in großzelliger Bronchialkarzinomzelllinie NCI-H460	57
3.5.2 Zellzahl nach Transfektion von NCI-H460	59
3.6 Mesotheliomzelllinie JL-1	60
3.6.1 Knockdown in Mesotheliomzelllinie JL-1	60
3.6.2 Zellzahl nach Transfektion von JL-1	61
3.7 Sonderfall Kleinzelliges Bronchialkarzinomzelllinie CPC-N	62
3.7.1 Standardtransfektion CPC-N	62
3.7.2 Optimierung der Transfektion der CPC-N Zellen	64
3.8 Zusammenfassung der Ergebnisse	67
<b>4. Diskussion</b>	<b>71</b>
4.1 Ausblick	79
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>81</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>83</b>

<u>Abbildungsverzeichnis</u>	<u>97</u>
<u>Tabellenverzeichnis</u>	<u>99</u>
<u>Abkürzungsverzeichnis</u>	<u>100</u>
<u>Erklärung zum Eigenanteil</u>	<u>I</u>
<u>Publikationen</u>	<u>II</u>
<u>Danksagung</u>	<u>III</u>
<u>Lebenslauf</u>	<u>IV</u>

# **1. Einleitung**

## **1.1 Bronchialkarzinom**

Das Bronchialkarzinom nimmt in der heutigen Medizin einen immer größeren Stellenwert ein. So sind im Jahre 2014 in Deutschland rund 34.560 Männer und 19.280 Frauen neu an Lungenkrebs erkrankt [1]. Obwohl die Erkrankungshäufigkeit bei Männern nur an 2. Stelle aller Krebsarten liegt, (Abb. 1, links) ist es mit einem Anteil von 24,4% die häufigste Krebstodesursache (Abb. 2, links). Bei Frauen ist das Bronchialkarzinom zurzeit die zweithäufigste Krebstodesursache nach dem Mammakarzinom (Abb. 2, rechts) [2;3]. Dem „World Cancer Report 2014“ der WHO zufolge ist das Bronchialkarzinom auch weltweit für 1,59 Millionen Todesfälle im Jahre 2012 verantwortlich und belegt somit den ersten Platz [4]. Der Trend zeigt aber, dass die Inzidenz bei Männern rückläufig ist und bei Frauen steigt. Durch Veränderungen der Lebensumstände und Gewohnheiten, vor allem vermehrtes Rauchen als Risikofaktor Nr. 1, ist die Inzidenz des Bronchialkarzinoms bei Frauen in den letzten Jahren auf den zweiten Platz gestiegen [2].

Europaweit entstehen durch Lungenkrebs enorme volkswirtschaftliche Kosten. So verursachten Krebserkrankungen 2009 in Europa allgemein einen Schaden von 126 Milliarden Euro. Mit einem alleinigen Anteil von 15%, also etwa 19 Milliarden Euro, verursacht der Lungenkrebs durch z.B. medikamentöse Therapie, Krankenhausaufenthalt und Produktivitätsausfall die höchsten Kosten [5].

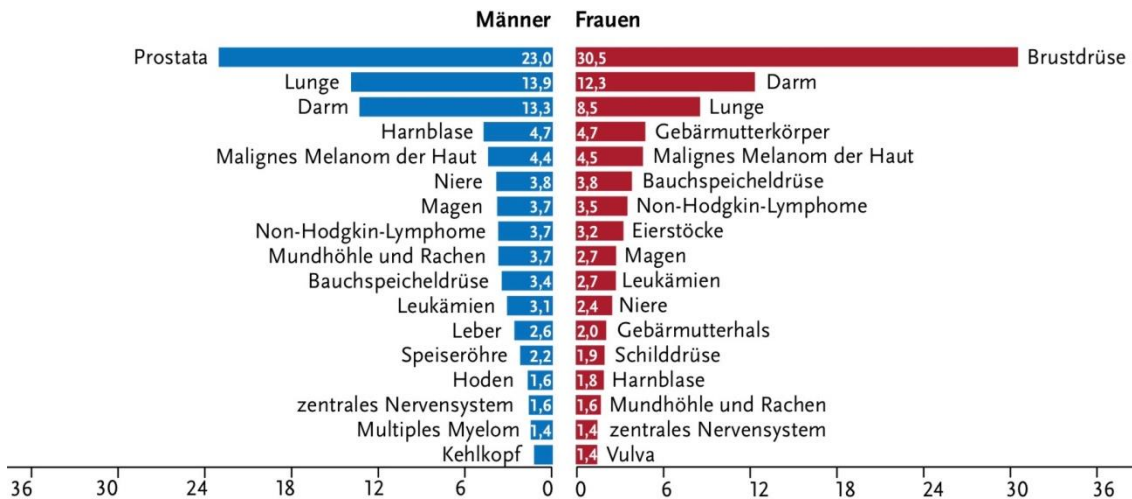


Abbildung 1: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2014 (ohne nicht-melanotischen Hautkrebs) [2]

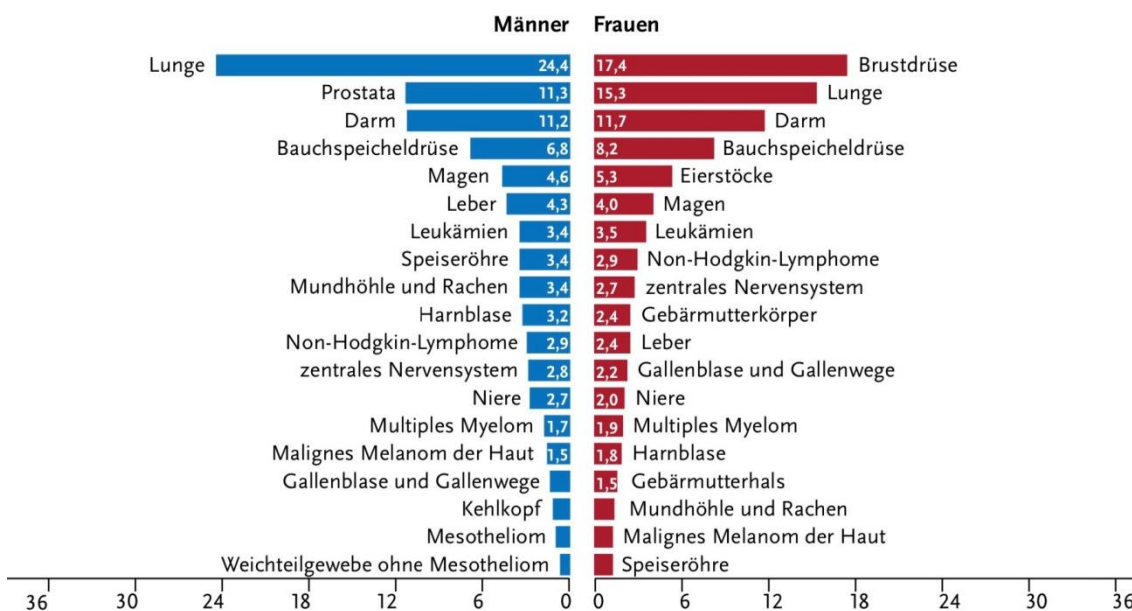


Abbildung 2: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebssterbefällen in Deutschland 2014 [2]



Der größte Risikofaktor und für 85% der Bronchialkarzinome verantwortlich ist das inhalative Zigarettenrauchen. Dabei bestimmen Dauer und Ausmaß des Zigarettenkonsums das Risiko. Für etwa 5% der Bronchialkarzinome sind berufliche Karzinogene verantwortlich. Asbest ist hier in 90% der Fälle der Auslöser. Aber auch z.B. Quarzstaub oder polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe zählen zu den Karzinogenen, die Lungenkrebs auslösen können. Die genetische Disposition kann auch die Ursache für ein Bronchialkarzinom sein. So haben Personen, bei denen ein Elternteil erkrankt ist ein 2-3 fach erhöhtes Risiko ebenfalls zu erkranken. Neben selteneren Auslösern wie z.B. ein Bronchialkarzinom aufgrund von Lungennarben oder umweltbedingten Karzinogenen, sind noch immer nicht alle Risikofaktoren bekannt [6].

Eingeteilt werden Bronchialkarzinome in zwei Hauptgruppen, die nicht-kleinzelligen-Bronchialkarzinome (NSCLC) und die kleinzelligen-Bronchialkarzinome (SCLC). Innerhalb der NSCLC, welche etwa 85% der Bronchialkarzinome ausmachen, werden weiterhin histologisch drei Typen unterschieden:

-Das Plattenepithelkarzinom ist mit ca. 40-45% Vorkommen noch der am häufigsten vorkommende Subtyp. Er wächst meistens zentral und mit einer Verdopplungszeit von etwa 300 Tagen eher langsam [6].

-Das Adenokarzinom mit einer Häufigkeit von ca. 35% ist bekannt als die häufigste Bronchialkarzinomform von Nichtrauchern und Frauen. Seine Inzidenz ist steigend. Er wächst vor allem peripher und hat eine Verdopplungszeit von etwa 150 Tagen [6].

-Das großzellige Bronchialkarzinom kommt in ca. 10% der Fälle vor. Die Tumorzellen sind undifferenziert und lassen sich histologisch keiner anderen Kategorie zuordnen [6].

Häufig haben Patienten im Frühstadium keine oder nur sehr unspezifische Symptome. Meist treten diese erst später auf, sodass die Diagnose sehr oft in einem fortgeschrittenen Stadium gestellt wird. Zu den typischen Symptomen gehören z.B. hartnäckiger Husten, Hämoptysen, Dyspnoe sowie Thoraxschmerzen. Bei einem SCLC können paraneoplastische Symptome je nach sezerniertem Hormon variieren [7].

Die Stadieneinteilung des NSCLCs erfolgt nach der TNM-Klassifikation der IASLC/AJC (International Association for the Study of Lung Cancer/ American Joint Committee for Cancer Staging) sowie der UICC (Union internationale contre le cancer) von 2017 [1] [8] (siehe Tab. 1-2).

Tabelle 1: Vereinfachte TNM-Klassifikation des NSCLC

T	T <sub>is</sub>	Carcinoma in situ
	T <sub>1</sub>	Größter Durchmesser <3cm, umgeben von Lungengewebe oder viszeraler Pleura, Hauptbronchus nicht beteiligt
	T <sub>2</sub>	Größter Durchmesser >3 cm aber <5 cm <i>oder</i> Infiltration des Hauptbronchus unabhängig vom Abstand von der Carina aber ohne direkte Invasion der Carina <i>oder</i> -Infiltration der viszeralen Pleura <i>oder</i> -tumorbedingte partielle Atelektase oder obstruktive Pneumonie, die bis in den Hilus reichen, Teile der Lunge oder die gesamte Lunge umfassen
	T <sub>2a</sub>	-größter Durchmesser >3 cm, aber <4 cm
	T <sub>2b</sub>	-größter Durchmesser >4 cm, aber <5 cm
	T <sub>3</sub>	Größter Durchmesser >5 cm, aber <7 cm <i>oder</i> -Infiltration von Thoraxwand (inklusive parietale Pleura und Superior Sulcus), N. phrenicus, oder parietales Perikard <i>oder</i> -zusätzlicher Tumorknoten im selben Lungenlappen wie der Primärtumor

	T <sub>4</sub>	größter Durchmesser > 7cm <i>oder</i> -mit direkter Infiltration von Diaphragma, Mediastinum, Herz, großen Gefäßen, Trachea, N. laryngeus recurrens, Ösophagus, Wirbelkörper oder Carina <i>oder</i> -zusätzlicher Tumorknoten in einem anderen ipsilateralen Lungenlappen
N	N <sub>0</sub>	keine Lymphknotenmetastase(n)
	N <sub>1</sub>	Metastase(n) in ipsilateralen, peribronchialen und/oder ipsilateralen hilären Lymphknoten und/oder intrapulmonalen Lymphknoten oder direkte Invasion dieser Lymphknoten
	N <sub>2</sub>	Metastase(n) in ipsilateralen mediastinalen und/oder subkarinalen Lymphknoten
	N <sub>3</sub>	Metastase(n) in kontralateralen mediastinalen, kontralateralen hilären, ipsi-oder kontralateral tief zervikalen, supraclaviculären Lymphknoten
M	M <sub>0</sub>	Keine Fernmetastasen
	M <sub>1a</sub>	Separater Tumor im kontralateralen Lungenlappen, Pleurametastasen, maligner Perikard-, oder Pleuraerguss
	M <sub>1b</sub>	Fernmetastasen vorhanden
	M <sub>1c</sub>	mehrere Fernmetastasen (>1) in einem oder mehreren Organen

Tabelle 2: Vereinfachte Stadieneinteilung NSCLC

0	Tis N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>
I	T <sub>1</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub> und T <sub>2a</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>
II	T <sub>1</sub> N <sub>1</sub> M <sub>0</sub> , T <sub>2b</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub> , T <sub>2</sub> N <sub>1</sub> M <sub>0</sub> und T <sub>3</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>
III	jedes T mit N <sub>2</sub> und N <sub>3</sub> , jedes T <sub>4</sub> , T <sub>3</sub> ab N <sub>1</sub> , aber alles M <sub>0</sub>
IV	Jedes T, jedes N mit M <sub>1</sub>

Das kleinzellige Bronchialkarzinom, welches in ca. 15% der Fälle vorkommt, hat vor allem das besondere Merkmal, dass es nicht wie das NSCLC als solider Tumor wächst, sondern sich verteilt und durch die Form seiner Zellen den Beinamen „oat cell carcinoma“ (Haferzellkarzinom) bekam. Es ist meistens zentral lokalisiert und bei der Diagnose bereits metastasiert. Die Zellen haben eine sehr kurze Verdopplungszeit von nur 10-15 Tagen und sind außerdem oft in der Lage Hormone wie z.B. das Adrenocorticotrope Hormon (ACTH) zu sezernieren, was zu paraneoplastischen Endokrinopathien führt. Die Einteilung geschieht meistens wie folgt:

Very limited disease beschreibt einen auf die Lunge begrenzten Tumor. Es sind keine mediastinalen Lymphknoten befallen.

Im Stadium der Limited disease zeigt sich nur ein ipsilateraler Befall, sowie befallene Lymphknoten im kontra- oder ipsilateralen Mediastinum oder supraklavikulär.

Extensive disease entspricht dem Stadium IV der TNM Klassifikation (siehe Tabelle 2) und beschreibt jede Ausbreitung, die größer ist als im Stadium der Limited disease [6;9].

### **1.1.1 Therapie des NSCLC**

Zurzeit erfolgt die Therapie des NSCLC gemäß der S3-Leitlinie von 2018 und steht vor allem auf drei Säulen [1] [10].

1. Der Chirurgie: sie stellt die einzige kurative Therapieoption dar. Je nach Typ, Lokalisation und Stadium wird die chirurgische Therapie angepasst. Da leider in über 50% der Fälle schon ein fortgeschrittenes Stadium vorliegt, ist eine kurative Resektion oft nicht mehr möglich oder der Tumor nicht operabel [3]. Durch eine neoadjuvante Radio-Chemotherapie kann ein Tumor verkleinert, und somit teilweise erst operabel gemacht werden [11;12].

2. Der Chemotherapie: sie kann vor (neoadjuvant) oder nach (adjuvant) einer Operation oder in weit fortgeschrittenen Stadien kombiniert mit Radiotherapie oder als alleinige kombinierte Chemotherapie erfolgen.
3. Der Radiotherapie: sie wird eingesetzt in frühen Stadien kombiniert mit Chemotherapie oder bei einer nicht vollständigen Resektion des Tumors zur Bestrahlung des Randes. Auch ist eine definitive Radiatio bei funktioneller Inoperabilität (z.B. bei starker Lungenfunktionseinschränkung) oder Brustwandinfiltrationen möglich.

### **1.1.2 Therapie des SCLC**

Die Therapie des kleinzelligen Bronchialkarzinoms besteht primär aus einer systemischen Therapie. Im Stadium der very limited disease und manchmal auch bei limited disease kann eine Resektion in kurativer Absicht erfolgen. Hier kann eine Neoadjuvante Chemo- und/oder Radiotherapie eingesetzt werden, um den Tumor präoperativ zu verkleinern. Durch einen bimodalen Ansatz aus der systemischen Chemotherapie mit einer Kombination aus Cisplatin und Etoposid und der Radiotherapie des Mediastinums und prophylaktischer Schädelbestrahlung werden hohe Remissionsraten erreicht. Diese sind aber oft nur von kurzer Dauer.

Im Stadium der Extensive disease wird ein palliativer, unimodaler Therapieansatz angewendet. Es erfolgt eine Polychemotherapie, die je nach Patient angepasst wird. Eine Radiatio wird nur durchgeführt bei bereits vorhandenen Hirn-, oder Skelettmetastasen [10].

### 1.1.3 Alternative Therapieansätze und neue Entwicklungen

Zurzeit ist trotz intensiver Therapie der Ausgang oft frustrierend. Zusätzlich treten aufgrund der hohen Toxizität der Chemotherapeutika eine hohe Anzahl an unerwünschten Nebenwirkungen auf. Auch bei relativ neuen Medikamenten sind die Nebenwirkungen teilweise erheblich. Diese sind zum großen Teil für die oft stark eingeschränkte Lebensqualität der Patienten verantwortlich. Nicht selten führt dies zum verfrühten Therapieabbruch oder zu einer Limitation der Therapiemöglichkeiten [13].

Seit ein paar Jahren werden außerdem zusätzlich neuere Therapieansätze verfolgt, die aber nur für bestimmte Patientengruppen in Frage kommen. So werden bestimmte molekulare Strukturen als Ziele für Medikamente eingesetzt. Dazu gehören unter anderem der monoklonale Antikörper Bevacizumab, der die Bindung des Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF), der vor allem an der Angiogenese beteiligt ist, an seine Rezeptoren verhindert [14;15]. Seit einigen Jahren zugelassen sind die Tyrosinkinase-Inhibitoren Erlotinib, Gefitinib und Afatinib. Diese Substanzen haben eine aktivierende Mutation des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors EGFR als Target. Dessen Hemmung hat eine Abtötung der Krebszellen zur Folge und erhöht so die Überlebenszeit von Patienten [16]. Die aktivierende Mutation, welche besonders bei Frauen, Nichtrauchern und Adenokarzinomen vorkommt, ist mit einem Auftreten von nur etwa 5-15% in Europa und den USA selten [17]. Aus diesem Grund profitiert nur eine kleine Gruppe von Patienten von diesem Medikament [18]. Bei dieser Gruppe von Patienten ist Erlotinib gerade auf dem Weg als Erstlinien-Therapie zugelassen zu werden [19]. Leider können relativ früh durch erneute Mutationen des Rezeptors Resistenzen entstehen, was die Substanzen unwirksam macht. Auch deswegen und um die Medikamente für ein breiteres Patientenkollektiv zur Verfügung zu stellen, werden neue Generationen von Tyrosinkinase-Inhibitoren, welche nicht mehr nur Mutationen als Target haben, in klinischen Studien getestet [20].

Trotz dieser Neuerungen in den letzten Jahren, ist die Überlebenszeit immer noch kurz. Auch deswegen sind neue Therapiemöglichkeiten ein bedeutender und notwendiger Gegenstand der Forschung. So wird zurzeit der Fokus auf die molekularen Eigenschaften, genetischen Veränderungen und die Überexpression von Faktoren in Krebszellen gesetzt [21;22].

## **1.2 Malignes Pleuramesotheliom**

Das maligne Pleuramesotheliom (MPM) ist ein primärer maligner Tumor der Pleura und gehört zur Gruppe der Mesotheliome. Er entsteht aus Zellen des Mesothels, dem mittleren, zweiten Keimblatt der Embryogenese.

Bei Tumoren der Pleura wird allgemein zwischen primären und sekundären Tumoren unterschieden.

Die primären Tumoren in Form von Pleuramesotheliomen sind mit einem Auftreten von 3% selten. Man unterscheidet weiterhin zwischen dem seltenen lokalisierten Pleuramesotheliom und dem diffusen malignen Pleuramesotheliom (MPM) durch Asbestexposition.

Weitaus häufiger kommen sekundäre Tumoren der Pleura in Form einer Pleurakarzinose, einer Lymphangiosis carcinomatosa der Pleura und einer Ausbreitung per continuitatem vor. Die häufigsten Primärherde sind dabei vor allem Lungen-, Mamma-, Pankreas-, Leberkarzinome, sowie Karzinome des Magen-Darm-Traktes [23].

2010 erkrankten in Deutschland 1320 Männer und 350 Frauen an einem Mesotheliom. 90% davon betreffen die Pleura. Durch eine relative 5-Jahres-Überlebensrate von 8-9% bei Männern und 14-15% bei Frauen gehört das Pleuramesotheliom zu den Karzinomen mit einer besonders schlechten Prognose [24].

Bei der Ätiologie stellt vor allem die Asbestexposition die wichtigste Ursache dar [25]. Da das Risiko ein MPM zu entwickeln durch eine kontinuierliche Exposition um das ca. 1000-fache im Vergleich zur Normalbevölkerung erhöht ist, wurde

es als Berufskrankheit anerkannt [26]. Seit dem Verbot von Asbest nimmt die Zahl der Erkrankungen bei den unter 65 Jährigen ab. Durch die lange Latenzzeit steigt sie bei der älteren Bevölkerung allerdings weiterhin an [27]. Da Asbest aber noch immer in anderen Ländern in großen Mengen produziert und verwendet wird, ist die Entwicklung dieser Zahlen ungewiss [28]. Auch andere Einflüsse wie z.B. virale Ursachen werden als Auslöser eines MPM diskutiert [29].

Oft werden MPMs erst in einem fortgeschrittenen Stadium entdeckt, da die angegebenen Frühsymptome, wie z.B. anhaltender Husten, Dyspnoe und Brustschmerzen sehr leicht ausfallen können. Typische Tumorsymptome wie z.B. Müdigkeit, Nachtschweiß und Gewichtsverlust kommen am Anfang selten vor, sodass sich Patienten oft wegen einer Dyspnoe an einen Arzt wenden [30].

Die Stadieneinteilung erfolgt an Anlehnung an die internationale TNM-Klassifikation der UICC (siehe Tabelle 3-4).

Tabelle 3: Vereinfachte TNM des Pleuramesothelioms

T <sub>0</sub>	Kein Primärtumor
T <sub>1</sub>	Ipsilaterale parietale Pleura befallen mit höchstens fokaler Beteiligung der viszeralen Pleura
T <sub>2</sub>	Ipsilaterale parietale Pleura befallen mit konfluierender Beteiligung der viszeralen Pleura und/oder Infiltration in ipsilaterale Lunge und/oder Zwerchfell
T <sub>3</sub>	Ipsilaterale parietale Pleura befallen mit Beteiligung der endothorakalen Faszie und/oder Infiltration in das benachbarte Weichteilgewebe
T <sub>4</sub>	Ipsilaterale parietale Pleura befallen mit diffuser Infiltration von Thoraxwand, und/oder knöcherne benachbarte Strukturen und/oder Peritoneum, kontralateraler Pleura und/oder Myokard und/oder Plexus brachialis



N <sub>0</sub>	Keine Lymphknotenmetastasen
N <sub>1</sub>	Ipsilaterale peribronchiale oder hiläre Lymphknotenmetastasen
N <sub>2</sub>	Ipsilaterale mediastinale, an der A. Mammaria interna und/oder subcarinale Lymphknotenmetastasen
N <sub>3</sub>	Jede kontralaterale Lymphknotenmetastase und/oder ipsilaterale Skelenus- oder supraklavikuläre Lymphknotenmetastase
M <sub>0</sub>	Keine Fernmetastasen
M <sub>1</sub>	Fernmetastasen nachweisbar

Tabelle 4: Vereinfachte Stadieneinteilung des Pleuramesothelioms

I	T <sub>1</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>
II	T <sub>2</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>
III	T <sub>3</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub> und T <sub>1-3</sub> N <sub>1-2</sub> M <sub>0</sub>
IV	jedes T <sub>4</sub> , jedes N <sub>3</sub> , jedes M <sub>1</sub>

Die Therapie besteht zurzeit je nach Stadium aus einem multimodalen Konzept aus der chirurgischen Intervention, der Chemo- und der Radiotherapie.

Da das Pleuramesotheliom allerdings oft erst in späten Stadien diagnostiziert wird, kommt es meistens zur Anwendung eines palliativ ausgerichteten Therapiekonzepts zur Lebensverlängerung und Verbesserung der Lebensqualität. Dort steht an erster Stelle vor allem die Symptomkontrolle.

Zum Beispiel kann zur Verhinderung von neuen Pleuraergüssen und damit verbundener Dyspnoe, eine Pleurodes (Einbringen von Talkum in den Pleuraspalt) durchgeführt werden [31].

Nur in seltenen Fällen und sehr frühen Stadien kann ein kurativer Therapieansatz verfolgt werden. Dafür ist eine vollständige makro- und mikroskopische Entfernung der Tumorzellen erforderlich, was selbst in erfahrenen und spezialisierten Zentren eine Herausforderung darstellt.

Eine Chemotherapie kann mit den Wirkstoffen Cisplatin und Permetrexed oder Raltitrexed als Kombination erfolgen. Die lebensverlängernde Wirkung ist

allerdings umstritten. Eine bekannte Studie zeigte keinen Unterschied zwischen Placebo-, und Chemotherapiegabe [32]. Diese Studie wird aber wegen angeblicher methodischer Schwächen diskutiert. Andere Studien weisen allerdings auf eine Wirksamkeit von einer Kombichemotherapie hin [33-35].

Radiotherapie ist ebenfalls eine umstrittene Behandlungsmöglichkeit. Sie kommt häufig als palliative Therapie zum Einsatz, z.B. zur Behandlung von Schmerzen, wenn die Brustwand infiltriert wurde [36].

Trotz dieser Maßnahmen ist die Prognose sehr schlecht. So liegt die mittlere Überlebenszeit nach Erstdiagnose bei ca. 4 – 12 Monaten [37].

Auch beim MPM gibt es neue Therapieansätze. So werden auch hier neue Ziele gesucht. Erste Arbeiten zeigen, dass die Forschung der targeted therapy (gezielte Therapie) großes Potential hat [38].

### **1.3 RNA-Interferenz**

Für die Entdeckung der RNA-Interferenz (RNAi) erhielten Fire und Mello 2006 den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin [39]. Die RNAi ist ein natürlich vorkommender Prozess. Unter anderem dient er Menschen, Tieren, Pflanzen, Pilzen und Bakterien als Abwehrmechanismus gegen virale RNA oder zur Regulation der Expression von Genen [40].

Um ein Protein z.B. einen Transkriptionsfaktor herzustellen, wird im Zellkern die entsprechende DNA für das Gen abgelesen und über mehrere Zwischenschritte in Form einer messenger-RNA (mRNA) im Zytoplasma von den Ribosomen in ein Protein translatiert. Bei der RNAi wird die Proteinbiosynthese durch eine Anheftung kleiner komplementärer dsRNA-Moleküle an die mRNA unterbrochen. Dabei wird die mRNA gespalten und im Anschluss von Nukleasen verdaut, somit kommt es zu einem Knockdown der Genexpression.

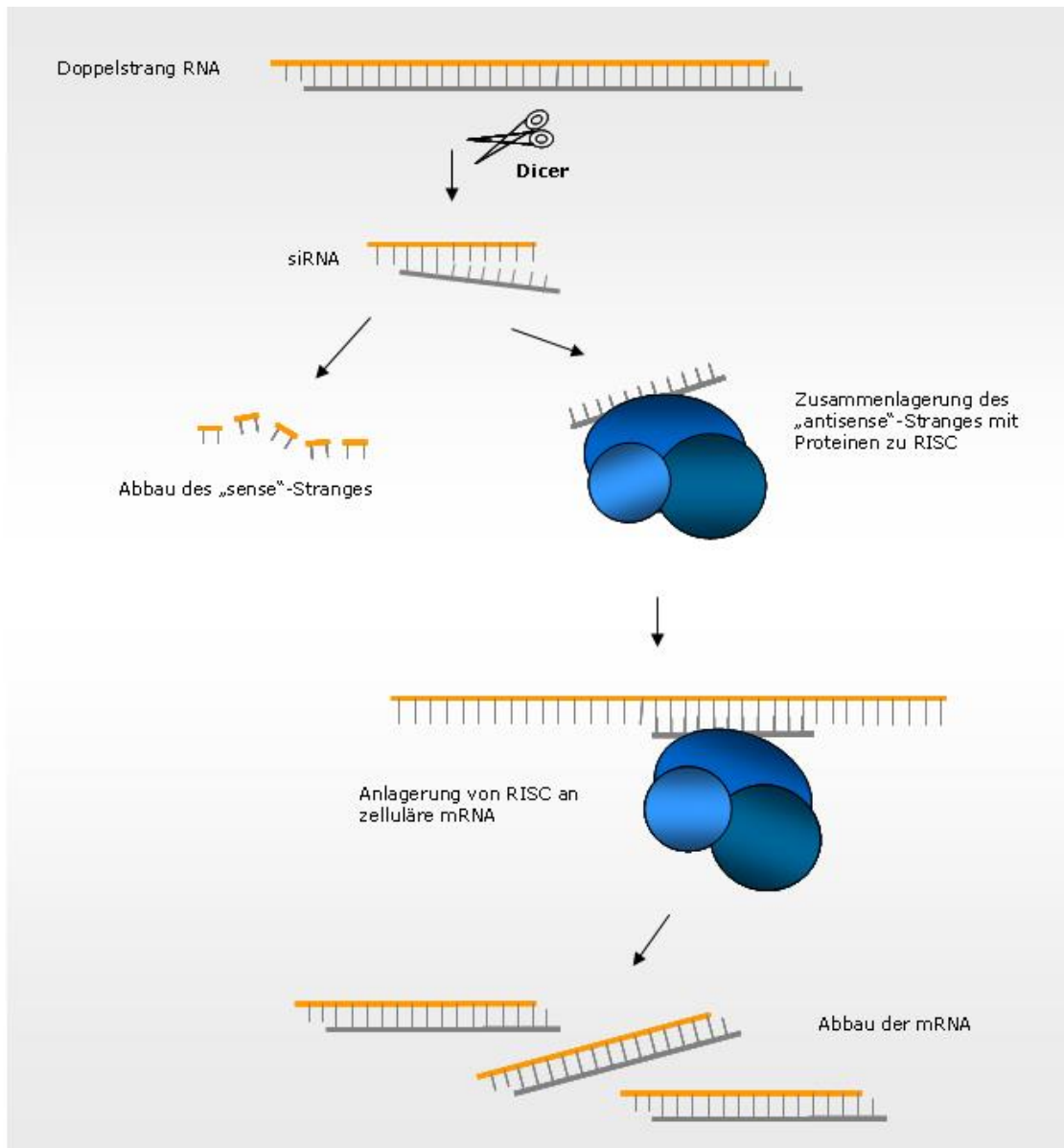
In der Zelle kommen zwei verschiedene Arten dieser kleinen dsRNA-Moleküle vor, die bei der RNAi eine Rolle spielen. Die mikroRNAs (miRNA) und die small-interfering RNAs (si-RNAs) [41]. Diese Arbeit hat ausschließlich siRNAs verwendet, sodass nur diese weiterhin beschrieben werden.

SiRNAs können z.B. aus doppelsträngigen RNAs hergestellt werden, die von Viren eingeschleust wurden. Dabei wird die Virus mRNA durch natürliche Prozesse in der Zelle in siRNAs geschnitten. Synthetisch hergestellte siRNAs können aber auch direkt von außen in die Zelle eingeschleust werden.

Aufgrund Ihrer Größe und Ihrer negativen Ladung brauchen sie aber einen Carrier, der sie in die Zelle schleust. Das kann z.B. ein viraler Vektor sein. In diese Arbeit wurde Interferin™, ein kationisches Lipid verwendet [42-44].

Die doppelsträngigen RNAs binden im Zytoplasma an Endoribonukleasen, welche die dsRNA in kleine doppelsträngige Fragmente schneiden. Diese Fragmente haben meistens eine Länge von 21-23 Nukleotiden und hängen an den 3'-Enden jeweils um 2 Nukleotide über [45].

Die so entstandenen doppelsträngigen siRNAs binden anschließend an Argonauten-Proteine, welche die doppelsträngige siRNA in Einzelstränge spaltet. Dabei verbleibt der Leitstrang, der den antisense Strang zur mRNA darstellt, in der Verbindung mit dem Argonautenprotein. Der andere Strang wird abgebaut (siehe Abb. 2) [46].



**Abbildung 3: Mechanismus der RNA-Interferenz [42]**

Die Verbindung aus ssRNA (single stranded RNA), Argonauten-Protein und weiteren Proteinen wird als RISC (RNA-Induzierter-Silencing-Komplex - RNA-induced- silencing-complex) bezeichnet. Die siRNA besitzt eine spezifische Basenfolge, die komplementär zur mRNA des gewünschten Zielgens ist. So ist es möglich, dass der RISC genau an spezifische mRNAs bindet und die Spaltung dieser mRNA katalysieren kann. Die mRNA wird anschließend abgebaut [47].

Die RNA-Interferenz bietet also eine mögliche Methode, um in Krebszellen z.B. überexprimierte antiapoptotische Proteine, Transkriptionsfaktoren oder Gene, die für Medikamentenresistenzen verantwortlich sind, spezifisch zu hemmen. So könnte das weitere Krebszellwachstum verringert werden oder eventuell sogar ein Rückgang der Zellen möglich sein [48].

Zurzeit befinden sich bereits verschiedene siRNAs, die als Therapie gegen Krankheiten quer durch die medizinischen Fachbereiche verwendet werden sollen, in den unterschiedlichen Phasen der Entwicklung.

So beschäftigen sich z.B. Arbeitsgruppen der Augenheilkunde weltweit mit dem Einsatz von siRNA gegen die altersbedingte Makuladegeneration (AMD). Eine sehr bekannte Studie davon ermittelte die Auswirkungen von Bevasiranib, einer siRNA gegen VEGF (Vascular-endothelial-growth-faktor) zur Inhibition der AMD [49]. Allerdings wurde der weitere Einsatz als Medikaments nach einer Phase-III-Studie ausgesetzt [50]. Weitere siRNAs sind aber noch in der klinischen Erprobung [51].

Ein weiteres großes medizinisches Fachgebiet, in dem die RNAi zum Einsatz kommt, ist die Infektiologie. Neben Ansätzen die auf eine Behandlung von HIV zielen [52], ist auf Grund aktueller Ereignisse in Westafrika ein anderes Thema in den Fokus gerückt. So ist eine Studie bekannt geworden, in der siRNAs zur Therapie von Ärzten eingesetzt wurde, die sich während Ihrer Arbeit mit Ebola infiziert haben [53]. Auch erregte eine Studie Aufmerksamkeit, bei der Makaken mit siRNA gegen das dem Ebolavirus verwandten Filovirus Marburg behandelt wurden. Alle Affen, die siRNA appliziert bekamen überlebten, während alle nicht Behandelten an dem hämorrhagischen Fieber starben [54].

Aber auch zur Behandlung von Volkskrankheiten werden siRNAs zurzeit in Studien getestet. So gibt es eine Studie, die siRNAs gegen die Proprotein-convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) zur Therapie der Hypercholesterinämie einsetzt. Erste Ergebnisse dieser Phase-I-Studie lassen auf eine Weiterführung des Prozesses auf dem Weg zum Medikament hoffen [55]. Es gibt noch viele weitere Studien, die siRNA als mögliche Therapien testen [56;57]. Zum Beispiel gibt es auch in der Neurologie Ansätze, die

unheilbare genetisch bedingte Krankheit Chorea Huntington mittels siRNA zu behandeln [58]. Aber auch in der Krebstherapie gibt es bereits erste Studien, z.B. die siRNA zur Behandlung von Lymphomen einsetzen [59].

#### **1.4 Ausgewählte Targets für die siRNA Applikation**

Als Kontrolle, ob die Transfektion als solche der Auslöser für eine Reduktion der Genexpression oder des Zellwachstums war, wurden die Zellen bei jedem Versuchsdurchgang mit SCR-siRNA ebenfalls in den jeweils verwendeten Konzentrationen transfiziert.

Die verwendeten siRNAs wurden ausgesucht auf Grund Ihrer Rolle als Transkriptionsfaktoren oder Aktivierung/ Hemmung der Apoptose von Krebszellen, verbunden mit ihrer Expression oder Überexpression in malignen Zellen.

##### **1.4.1 Serum response factor (SRF)**

SRF ist ein Protein mit einer molekularen Größe von etwa 52 kD. Es ist vor allem wichtig bei der Regulation sogenannter Early genes und ist zusätzlich an einer großen Anzahl von wichtigen Zellregulationsystemen beteiligt, wie z.B. Zellzyklus, Apoptose, Zellwachstum und Zelldifferenzierung [60]. SRF wird in den Zellen vieler Malignome überexprimiert und wird unter anderem mit erhöhter Zellproliferation und Invasion in Verbindung gebracht [61]. Eine Hemmung von SRF hatte eine geringere Metastasierungstendenz bei Prostatakarzinomzellen zur Folge [62].

### **1.4.3 Survivin (SV)**

Survivin (oder baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing 5 (BIRC5)) wird vor allem in Krebszellen oder während der Embryonalentwicklung produziert [63]. Es ist vor allem als Inhibitor der Caspaseaktivität an der Hemmung der Apoptose beteiligt [64]. Auch bei Survivin wird eine Überexpression mit einer reduzierten Prognose und einer erhöhten Metastasierungstendenz assoziiert [65]. In Gewebeproben von Karzinompatienten wurden bei 65% der an einem Magenkarzinom erkrankten sowie bei 53% der an einem Bronchialkarzinom erkrankten Patienten eine Expression von Survivin gefunden [66;67].

Zusätzlich wird Survivin mit einer Resistenz der Karzinomzellen auf Chemo- und Radiotherapie assoziiert [68;69].

### **1.4.4 HIF1 $\alpha$ und HIF2 $\alpha$**

Hypoxie-Induzierter-Faktor 1 $\alpha$  und 2 $\alpha$  sind wichtige Transkriptionsfaktoren, die die Zelle bei einem Sauerstoffmangel produziert. Mit Hilfe einer Induktion von Angiogenese und Zelldifferenzierung versucht die Zelle, sich an den Sauerstoffmangel anzupassen [70-73]. Die Expression von HIF1 $\alpha$  wird mit einer allgemein schlechteren Prognose in Verbindung gebracht [74].

Das Enzym Cezanne, eine Deubiquitinase, hat einen direkten Einfluss auf die Stabilität und die Expression von HIF1 $\alpha$  [75]. In einer weiteren Studie wurde die Deubiquitinase Cezanne ebenfalls mit der E2F1 abhängigen Expression von HIF2 $\alpha$  in Verbindung gebracht [76].

### **1.4.2 E2F Transkriptionsfaktor 1 (E2F1)**

E2F1 ist ein Protein, welches zur Familie der E2F Transkriptionsfaktoren gehört. Es spielt unter anderem eine wichtige Rolle bei der Initiierung der Apoptose [77]. Eine Überexpression von E2F1 in Karzinomzellen, z.B. bei SCLC oder kolorektalem Karzinom, wird ebenfalls mit einer schlechteren Prognose, erhöhter Invasivität und direkten DNA-Schäden in Verbindung gebracht [78-80].

### **1.4.5 STAT3**

Signal transducer and activator of transcription 3 ist ein Transkriptionsfaktor, der eine wichtige Rolle in der Tumorangio-genese, Zellproliferation und die Hemmung von Apoptose spielt. Er interagiert unter anderem auch mit den Akute-Phase-Proteinen des Immunsystems und spielt eine Rolle in der Embryogenese, wo die Abwesenheit von STAT3 tödlich endet. Durch eine alternative Spleiß-Stelle in einem Exon existieren zwei Isoformen STAT3 $\alpha$  und STAT3 $\beta$  [81-83]. Es wurde festgestellt, dass STAT3 in Zellen vieler Krebsarten überexprimiert wird [84]. Gleichzeitig scheint diese Überexpression von STAT3 mit einer schlechteren Prognose, welche unter anderem auf Grund einer früheren Metastasierung beruht, zusammen zu hängen [85].



## **1.5 Ziele der Arbeit**

„Targeted Therapies“ und die personalisierte Medizin gewinnen immer mehr an Bedeutung. Da die heutigen Optionen zur Behandlung von Lungenkrebs und eines Pleuramesothelioms schon in frühen Stadien an Ihre Grenzen stoßen, ist die Entwicklung neuer Therapieansätze essentiell. Auch differenzieren zurzeit die Therapien kaum nach histologischen Subtyp oder anderen molekularen Strukturen.

Genau hier liegt das Potential der Arbeit. Die molekulare Reduktion von Faktoren könnte einen großen Effekt auf das Verhalten der Zellen haben. Bevor allerdings die Spirale bis hin zum fertigen Medikament beginnen kann, ist es unerlässlich, in der Grundlagenforschung wie bei dieser Arbeit, die Faktoren zu identifizieren, die eine Auswirkung auf die Zelle haben.

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss des Knockdowns vermittelt durch die oben beschriebenen siRNAs auf Bronchialkarzinom- und Pleuramesotheliomzellen zu ermitteln. Dazu wurden einerseits das Ausmaß der reduzierten Genexpression durch die siRNA und andererseits die daraus resultierende Auswirkung auf die Zellzahl untersucht. Eine Nebenaufgabe der hier vorliegenden Arbeit war die Optimierung der Transfektion der SCLC-Zelllinie.

Da es sich beim Bronchialkarzinom um eine der am häufigsten auftretenden malignen Erkrankungen handelt, könnte mit einer verbesserten Therapie vielen Patienten geholfen werden. Wegen des häufigen Auftretens, der schlechten Prognose und dem damit verbundenen Arbeitsausfall entstehen sehr hohe volkswirtschaftliche Kosten.

Eine zukünftige optimale Therapie sollte auf der personalisierten Medizin basieren. Das bedeutet, dass die Therapie an die Besonderheiten des beim Patienten auftretenden Tumors angepasst werden muss.

So könnten sowohl unerwünschte Nebenwirkungen als auch die damit assoziierten Therapieabbrüche vermieden werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Tabelle 5: Verwendete Geräte

Gerät	Name	Firma (Ort, Land)
Absaugpumpe	Absaugpumpe KNF Lab	KNF Neuberger GmbH (Freiburg, Deutschland)
Autoklav	Autoklav Systec DX-23	Systec GmbH (Wettenberg, Deutschland)
Blot Apparatur	Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell	BIO RAD Laboratories (Hercules, Kalifornien, USA)
Brutschrank	Heraeus 6000	Thermo Fisher Scientific (Langenselbold, Deutschland)
CASY	CASY Zell Counter System	Schärfe System (Reutlingen, Deutschland)
cDNA- Cycler	Mastercycler®gradient Eppendorf	Eppendorf AG, (Hamburg, Deutschland)
FACS	FACScan BD	BD Biosciences, (Heidelberg, Deutschland)
Kammer zur SDS-Page	Mini-PROTEAN®	BIO RAD Laboratories (Hercules, Kalifornien, USA)
Mikroskop	Axiovert 135	Carl Zeiss AG (Jena, Deutschland)
Photometer	BioPhotometer Eppendorf	Eppendorf AG, (Hamburg, Deutschland)
qRT-PCR-Cycler	iCycler BIO RAD	BIO RAD Laboratories (Hercules, Kalifornien, USA)
Vortexer	Vortex-Schüttler	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)

Werkbank 1	Sicherheitswerkbank Klasse 2	BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH (Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland)
Werkbank 2	Sicherheitswerkbank Herasafe HS12	Thermo Fisher Scientific (Langenselbold, Deutschland)
Zentrifuge 1	Heraeus sepatech Varifuge RF INERT	Thermo Fisher Scientific (Langenselbold, Deutschland)
Zentrifuge 2	Zentrifuge MiniSpin plus Eppendorf	Eppendorf AG, (Hamburg, Deutschland)
Zentrifuge 3	Zentrifuge 5415 Eppendorf	Eppendorf AG, (Hamburg, Deutschland)
Zentrifuge für Platten	Rotana 460 R	Hettich Lab Technology (Tuttlingen, Germany)

## 2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 6: Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Medium/Lösung	Firma	Standort
Dulbecco's PBS ohne Ca & Mg	PAA Laboratories GmbH	Cölbe, Deutschland
FCS (Fetal calf serum)		
Pen /Strep		
L-Glutamin		
Acrylamid Mix (30%)	Sigma-Aldrich	Saint Louis, Missouri, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	RheinPerChemie GmbH	Hamburg, Deutschland
Ampuwa, steriles, pyogenfreies Wasser	Fresenius Kabi Deutschland	Bad Homburg, Deutschland
Bovine Serum Albumin	Merck Chemicals GmbH	Darmstadt, Deutschland
Bromphenolblau	Merck Chemicals GmbH	Darmstadt, Deutschland
Cell Dissociation Solution	Sigma-Aldrich	Seelze, Germany
DEPC treated Water (Diethylpyrocarbonat)	Ambion Applied Biosystems	Austin Texas, USA
Dithiothreitol	Sigma-Aldrich	Saint Louis, Missouri, USA

Essigsäure 1%	Merck GmbH	Chemicals	Darmstadt, Deutschland
Fast Green 0,1%	Merck GmbH	Chemicals	Darmstadt, Deutschland
Glycerin (87%)	Merck GmbH	Chemicals	Darmstadt, Deutschland
Glycin	Sigma-Aldrich		Saint Louis, Missouri, USA
Interferin™	Polyplus Transfektion		Illkirch, Frankreich
iQ™ SYBR® Green Supermix	Bio-Rad Inc.,	Laboratories	Hercules, CA, USA
Isopropanol	Sigma-Aldrich		Saint Louis, Missouri, USA
Methanol	Merck GmbH	Chemicals	Darmstadt, Deutschland
Molecular Weight Marker für SDS-Page	Sigma-Aldrich		Saint Louis, Missouri, USA
NaCl	Merck GmbH	Chemicals	Darmstadt, Deutschland
NaN <sub>3</sub>	Merck GmbH	Chemicals	Darmstadt, Deutschland
NaOH	Merck GmbH	Chemicals	Darmstadt, Deutschland
RIPA-Lysis-Buffer	Thermo Fisher Scientific		Bonn, Germany
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	Merck GmbH	Chemicals	Darmstadt, Deutschland
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich		Saint Louis, Missouri, USA
Trypan Blue Solution	Sigma-Aldrich		Dorset, Großbritannien
Trypsin-Neutralisations- Solution (TNS)	PromoCell	bioscience alive	Heidelberg, Deutschland
Trypsin/EDTA	PromoCell	bioscience alive	Heidelberg, Deutschland
Trizma® Base	Sigma-Aldrich		Saint Louis, Missouri, USA
Trizma® Hydrochlorid	Sigma-Aldrich		Saint Louis, Missouri, USA
Tween 20	Merck GmbH	Chemicals	Darmstadt, Deutschland
5-bromo-4-chloro-3- indolyl-phosphate/nitro blue tetrazolium (BCIP®/NBT)	Sigma-Aldrich		Seelze, Germany

Reaktionskits		
iScript™ cDNA Synthesis Kit	BIO RAD Laboratories GmbH	Hercules, CA, USA
Aurum™ total RNA Mini Kit	BIO RAD Laboratories GmbH	Hercules, CA, USA

### 2.1.3 Medien

Tabelle 7: Verwendete Medien

Medium + Zusätze	Zelllinien	Firma
DMEM high-glucose + 10% FCS, 5ml Penicillin / Streptomycin, 5ml L-Glutamin	A549, SK-MES	PAA, Cölbe, Deutschland
Ham's F10 + 10% FCS, 5ml Penicillin / Streptomycin, 5ml L-Glutamin	LXF-289	
RPMI + 10% FCS, 5ml Penicillin / Streptomycin, 5ml L-Glutamin	NCI-H460	
DNEM high-glucose + 20% FCS, 5ml Penicillin / Streptomycin, 5ml L-Glutamin	JL-1	
McCoy's + 10% FCS, 5ml Penicillin / Streptomycin, 5ml L-Glutamin	CPC	
VascuLife Basalmedium		

## 2.1.4 Zelllinien

Tabelle 8: Verwendete Zelllinien

Name	Histologischer Typ	Firma
A549	Adenokarzinom	DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Deutschland
LXF-289	Adenokarzinom	
NCI-H-460	Großzelliges Bronchialkarzinom	
SK-MES	Plattenepithelkarzinom	
CPC-N	Kleinzelliges Bronchialkarzinom	
JL-1	Pleuramesotheliom	

## 2.1.5 SiRNA-Sequenzen

Tabelle 9: Verwendete siRNA-Sequenzen

Name	Strang	Sequenz 5' nach 3'	Firma
FITC		Sequenz wird nicht bereit gestellt von Firma	Qiagen, Hilden, Deutschland
SCR			
SRF	sense	-GAUGGAGUUCAUCGACAACAA-	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
	antisense	-GUUGUCGAUGAACUCCAUCUU-	
Survivin	sense	-GGACCACCGCAUCUCUACA-	
	antisense	-UGUAGAGAUGCGGUGGUCC-	
HIF1	sense	-AGAGGUGGAUAUGUGUGGG-	
	antisense	-CCCACACAUAUCCACCUCU-	
HIF2	sense	-AGAUUCCUCGUUAUUGUUG-	
	antisense	-CAACAAUAACGAGGAAUCU-	
STAT3	sense	-GCCUCUCUGCAGAAUUCAA-	
	antisense	-UUGAAUUCUGCAGAGAGGC-	
E2F1	sense	-GACGUGUCAGGACCUUCGU-	
	antisense	-ACGAAGGUCCUGACACGUC-	

Die Firma Quiagen (Hilden, Deutschland) stellt zwar die genaue Sequenz nicht zur Verfügung, garantiert aber, dass es keine Interaktion mit bekannten Genen gäbe.

### 2.1.6 qRT-PCR Primer-Sequenzen

Tabelle 10: Sequenzen der verwendeten qRT-PCR Primer

Name	Richtung	Sequenz 5' nach 3'	Firma
GAPDH	for	-TCAACAGCGACACCCACTCC-	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
	rev	-TGAGGTCCACCACC-CTGTTG-	
SRF	for	-AGTGCAGGCCATTCAAGT-	
	rev	-ACGGATGACGTCATGATGGTG-	
Survivin	for	-CTTTCTTGGAGGGCTGC-	
	rev	-TGGGGTTCGTCATCTGGC-	
HIF1	for	-TGCAGAATGCTCAGAGAA-	
	rev	-GCTGCATGATCGTCTGGCTGCT-	
HIF2	for	-TGTCAGGCATGGCAAGCCGG-	
	rev	-GCACGGGCACGTTACCTCA-	
STAT3	for	-CGGAGAAACAGTTGGGACCCCT-	
	rev	-GAGCTGCTCCAGGTACCGTGT-	
E2F	for	-ACCATCAGTACCTGGCCGAGAGC-	
	rev	-ATAGCGTGACTTCTCCCCCGGG-	

### 2.1.7 Westernblots

Antikörper:

Tabelle 11: Verwendete Antikörper

Antikörper	Firma
anti-STAT3 Antikörper (K-15)	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
anti-Actin Antikörper (SPM 161) aus Maus	
Sekundärantikörper mit alkalischer Phosphatase konjugiert	Sigma Aldrich, Seelze, Deutschland

Transferpuffer: 3 g Tris, 14,4 g Glycin, 1 g SDS, 200 ml Methanol mit H<sub>2</sub>O bidest. auf 1 l aufgefüllt

TTBS: 20 mM Tris (pH 7,5), 500 nM NaCl, 20% Tween 20 (0,5 ml Tween 20 auf 1 l TBS)

TBS: 2,43 g Trizma-Hydrochlorid, 29,24 g NaCl in 800 ml H<sub>2</sub>O bidest. gelöst, auf pH 7,5 eingestellt und auf 1 l mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt

Außerdem wurden die UltraCruz<sup>®</sup> Nitrocellulose Pure Transfer Membrane (Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland) mit der Porengröße 0.45 µm und Whatman<sup>®</sup> Cellulose Filter Paper (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) verwendet.

### **2.1.8 Sodiumdodecylsulfate-PAGE**

10% APS: 1 g/10 ml H<sub>2</sub>O

10% SDS: 1 g/ml

Elektrodenpuffer (Laufpuffer): 3 g Tris, 14,4 g Glycin, 1 g SDS auf 1 L mit Ampuwa aufgefüllt

Trenngelpuffer: 22,68 g 5 x Tris auf 100 ml H<sub>2</sub>O; auf pH 8,8 eingestellt

Sammelgelpuffer: 7,56 g 5 x Tris auf 100 ml H<sub>2</sub>O; auf pH 6,8 eingestellt

Gelpuffer: 18,8 g Tris, 0,4 g SDS, 0,01 g NaN<sub>3</sub>, 80 ml Ampuwa; auf pH 8,8 eingestellt; auf 100 ml mit Ampuwa aufgefüllt



Reduzierender Probenpuffer: 2,5 ml Gelpuffer, 2 g SDS, 10 mg Bromphenolblau, 0,5 g Dithiothreitol, 20 ml Glycerin (87%); auf 100 ml mit Ampuwa aufgefüllt

Trenngel (10%): 8,3 ml Acrylamidmix (30%), 5 ml Trenngelpuffer, 11,7 ml Ampuwa, 250 µl SDS (10%), 12,5 µl TEMED und 250 µl APS (10%)

Sammelgel (4%): 3,3 ml Acrylamidmix (30%), 5 ml Sammelgelpuffer, 16,6 ml Ampuwa, 250 µl SDS (10%), 25 µl TEMED und 375 µl APS (10%)

## **2.2 Methoden**

Die Versuche befassten sich erstens mit der Erfassung des Knockdowns der mRNA auf molekularer Ebene, welcher mittels quantitativer Real-Time-Polymerase-Chain-Reaction (qRT-PCR) und Western Blots erfasst wurde und zweitens mit der Ermittlung des Wachstums der Zellen mittels CASY-Zellzählung. Beides wurde nach einem festen Tagesschema durchgeführt. Jeder Zyklus umfasste zusätzlich als Vergleich eine Leerprobe und Zellen, die mit SCR siRNA transfiziert wurden. Alle Versuche wurden mit 12-Well-Platten durchgeführt. Ausnahmen werden gesondert erwähnt.

Die Zelllinie CPC-N stellte als einzige Suspensionskultur eine Ausnahme dar und wird in 2.2.5 beschrieben.

### **2.2.1 Zellkultivierung und Anzüchten der Zellen**

Zu Beginn jedes Durchgangs wurde die gewünschte Zelllinie aufgetaut in eine Kulturflasche überführt und mit dem entsprechenden Medium versehen in den Brutschrank gestellt. Wenn der Boden der Kulturflasche zu 80% mit Zellen konfluent war, wurde das Medium in regelmäßigen Abständen gewechselt.

Um die für die unterschiedlichen Versuchsansätze gewünschte Zellzahl von 10.000 bzw. 150.000 pro Well zu erhalten, wurden die Zellen wie folgt aus der Kulturflasche abgelöst und gezählt:

Zur Ablösung der Zellverbände aus den Kulturflaschen wurde zunächst das Medium abgesaugt und 6 ml Dulbeccos PBS (PBS) hinzu pipetiert, geschwenkt und abgesaugt. Dieser Schritt wird als Waschen beschrieben. Danach wurden 6 ml Trypsin/EDTA zu den Zellen gegeben, um die Zellen vom Boden und untereinander zu lösen. Unter dem Mikroskop wurde der Vorgang kontrolliert und gegebenenfalls mit leichtem Klopfen beschleunigt. Um weitere Zellschäden zu vermeiden, wurde 6 ml Trypsin-Neutralisations-Solution (TNS) in die Flasche gegeben und damit die Reaktion neutralisiert.

Die Suspension wurde dann in ein Zentrifugenröhrchen überführt und 5 min bei 300 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet mit 1 ml Medium je nach Zelllinie resuspendiert.

Danach wurden 20 µl der Suspension in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt und mit 80 µl Trypanblau gemischt, um bei der Zählung lebende von toten Zellen zu unterscheiden. Von dieser Mischung wurden 20 µl in eine Neubauer Zählkammer überführt und die vitalen Zellen unter dem Mikroskop bestimmt.

Von der Anzahl der Zellen in einem Quadrat wurde die Zellzahl pro µl errechnet. Somit ließ sich die exakte Menge bestimmen, die gebraucht wurde, um die gewünschte Zellzahl pro Well zu erreichen.

Formeln:

1.  $\text{gezählte Zellen im Quadrat} * 4 * 12,5 = X \text{ Zellen}/\mu\text{l}$

2.  $\frac{\text{Zahl gewünschte Zellen}}{X \text{ Zellen}/\mu\text{l}} = \mu\text{l Zellen}$

Für die Untersuchung des Knockdowns mittels qRT-PCR, wurden pro Well einer 12-Well Platte 150.000 Zellen in 1 ml Medium angesetzt.

Für die CASY® Zellzählung wurden pro Well einer 12-Well Platte 10.000 Zellen in 1 ml Medium angesetzt.

## 2.2.2 Transfektion

Nachdem die gewünschte Zellzahl angezchtet war, blieben die Platten bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> eine Nacht im Brutschrank, damit die Zellen an den Boden der Wells adhäreren konnten.

Am nächsten Tag wurde die Transfektion für jede zu testende siRNA wie folgt durchgeführt:

Für die verschiedenen Fragestellungen waren unterschiedliche si-RNA Konzentrationen gewünscht.

Für die Ansätze der qRT-PCR waren 25 nM und 100 nM gewollt und für die CASY® Zellzählung 50 nM.

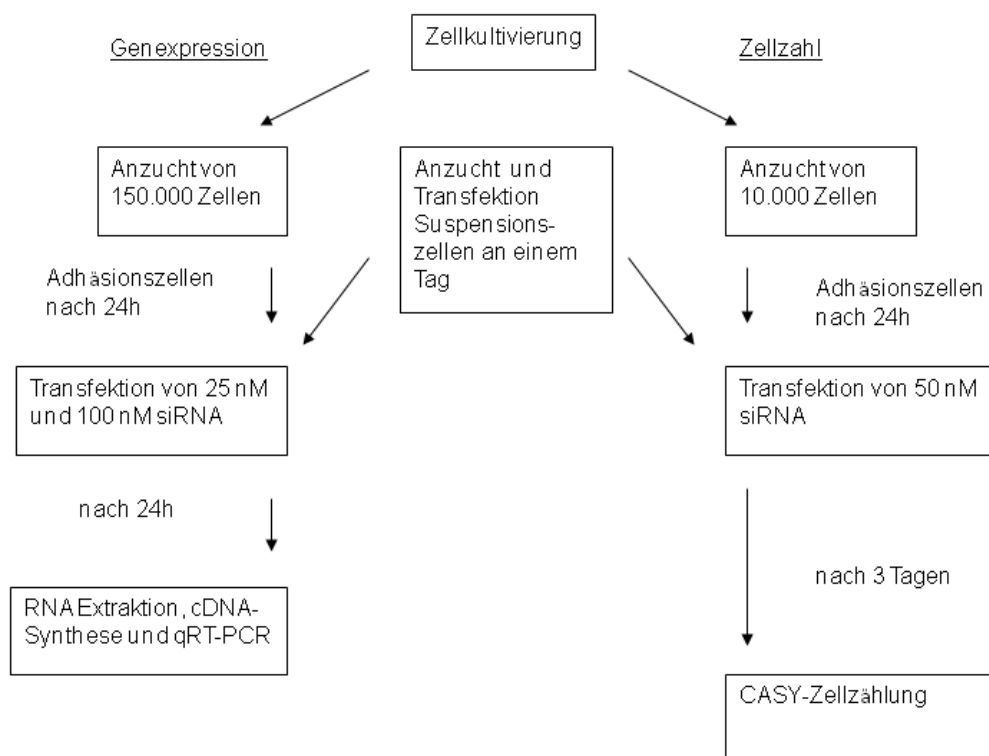


Abbildung 4: Flussdiagramm Versuchsablauf

Nach folgendem Schema wurden die Transfektionsansätze jeweils in einem Eppendorfreaktionsgefäß angesetzt.

Zuerst wird die entsprechende Menge siRNA in Basalmedium gelöst und danach das Interferin hinzugegeben.

Pipettierschema pro Well:

Tabelle 12: Pipettierschema pro Well

siRNA Konzentration	Basalmedium in $\mu\text{l}$	siRNA in $\mu\text{l}$	Interferin in $\mu\text{l}$
25 nM	318	0,4	1,17
100 nM	316,7	1,6	1,75
50 nM	317,5	0,8	1,75

Nach gründlichem Mischen wurden die Ansätze 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, damit sich die Transfektionskomplexe bilden konnten.

Nach kurzem vorsichtigem Aufmischen der Komplexe wurden 300  $\mu\text{l}$  der Suspension in jedes zuvor mit 500  $\mu\text{l}$  PBS gewaschene Well gegeben. Auf die Kontrollen ohne siRNA-Transfektion wurden 300  $\mu\text{l}$  Basalmedium pipettiert.

Zur Inkubation wurden die Platten dann für 2 h in den Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> gestellt.

Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Komplexe wieder abgesaugt, frisches Medium entsprechend der jeweiligen Zelllinie in jedes Well gegeben und die Platten über Nacht weiter bei 37°C inkubiert.

Um auszuprobieren, welche Wirkung eine Mischung (Cocktail) verschiedener siRNAs hat, wurden zusätzlich für die CASY Zellzählung zwei siRNAs jeweils einzeln (e) in zwei und zusammen (z) in einem Eppendorfreaktionsgefäß angesetzt. Dazu wurde eine Konzentration von 25 nM je siRNA verwendet.

Die Cocktails von je zwei unterschiedlichen siRNAs wurden wie in Tabelle 13 dargestellt pro Well angesetzt.

Tabelle 13: Pippettierschema pro Well Cocktails

Cocktail	Basalmedium in $\mu\text{l}$ /Well	siRNA in $\mu\text{l}$ / Well	Interferin in $\mu\text{l}$ /Well
E2F + Survivin			
zusammen	317,5	0,4 je siRNA	1,75
einzel	318	0,4	1,75
HIF1 + HIF2			
zusammen	317,5	0,4 je siRNA	1,75
einzel	318	0,4	1,75
E2F1 + STAT3			
zusammen	317,5	0,4 je siRNA	1,75
einzel	318	0,4	1,75

Für die Ansätze der Cocktails bei getrennt angesetzten Transfektionskomplexen mussten jeweils 150  $\mu\text{l}$  der beiden siRNAs in ein Well gegeben werden.

Die Transfektion erfolgte sonst wie oben beschrieben.

### 2.2.3 Quantitative Real-Time-Polymerase-Chain-Reaction (qRT-PCR)

#### 2.2.3.1 Isolierung RNA und Umschreibung in cDNA

Ein Ziel dieser Experimente war es, den spezifischen Knockdown der Genexpression durch die Transfektion mit der entsprechenden siRNA nachzuweisen. Dafür musste die Menge genspezifischer RNA bestimmt werden. Dieses war mit Hilfe der qRT-PCR möglich (siehe 2.2.3.2). Allerdings kann keine einzelsträngige RNA amplifiziert werden, denn für die Aktivität der spezifischen DNA-Polymerasen wird doppelsträngige DNA benötigt. Um diese zu erhalten wurde ein Enzym namens Reverse Transkriptase verwendet,

welches in der Lage ist RNA als Matrize zu verwenden und in cDNA umzuschreiben.

Folgende Einzelschritte waren dafür notwendig:

Am dritten Tag der Versuchsreihe (einen Tag nach der Transfektion) wurde die RNA aus den Zellen isoliert.

Zuerst wurden das Medium aus jedem Well abgesaugt und die Zellen mit 500  $\mu$ l PBS gewaschen.

Die Isolation der RNA erfolgte nach der Vorgabe des hierzu benutzen Aurum™ Total RNA Mini Kit der Firma BIO RAD.

Dazu wurden zuerst mit Lysepuffer die Zellen aufgebrochen und im Anschluss Ethanol dazugegeben. Mittels RNA-bindenden Säulen wurden die Zellbestandteile wie DNA, Proteine usw. in mehreren Waschschritten herausgelöst und die verbleibende RNA aus den Säulen eluiert.

Um die für die qRT-PCR benötigten Doppelstränge zu erhalten, folgte danach die Synthese von complementary DNA (cDNA). Dafür musste zuerst die Konzentration der eluierten RNA ermittelt werden, da für die Umschreibung 200 ng RNA benötigt werden.

Mit einem Photometer wurde bei einer Nullprobe von 50  $\mu$ l DEPC behandeltem Wasser und einem Gemisch aus 45  $\mu$ l DEPC behandeltem Wasser und 5  $\mu$ l einer RNA-Probe die optische Dichte (OD) bei den Wellenlängen  $\lambda = 260$  nm (Absorptionsmaximum für Nukleinsäuren) und  $\lambda = 280$  nm (Absorptionsmaximum für Proteine) gemessen. Der Quotient  $OD_{260}/OD_{280}$  zeigte die Reinheit der isolierten Nukleinsäure an. Für RNA sollte dieser um die 2 liegen. Davon stark abweichende Werte zeigen eine Verunreinigung an. Kleinere Werte deuten auf Reste von Proteinen oder Polysacchariden und Werte über 2 deuten auf eine Verschmutzung mit Ethanol hin.

Neben der Reinheit wurde auch die Konzentration der RNA in  $\mu$ g/mL angezeigt. Der Wert konnte in die Formel 1 eingesetzt werden. Daraus konnte dann die

gewünschte Menge an 200 ng RNA in  $\mu\text{l}$  bestimmt werden. Diese Menge wurde mit DEPC behandeltem Wasser gemischt, sodass sich zusammen ein Volumen von 15  $\mu\text{l}$  ergab.

Formel 1: 
$$\frac{200 \text{ ng} / 1 \mu\text{l}}{\text{Konzentration in } \mu\text{g} / 1000 \mu\text{l}} = \text{Menge benötigter RNA pro } \mu\text{l}$$

Danach erfolgte die Synthese der cDNA mittels iScript™ cDNA Synthesis Kit der Firma BIO RAD Laboratories GmbH.

Das Endvolumen von 20  $\mu\text{l}$  pro Ansatz setzte sich zusammen aus einem Gemisch von 15  $\mu\text{l}$  DEPC behandeltem Wasser versetzt mit 200 ng RNA, 4  $\mu\text{l}$  Reaktions-Mix und 1  $\mu\text{l}$  Reverse Transkriptase des I-Script Kits der Fa BioRAD.

Damit nur mRNA als Matrize zur cDNA Synthese verwendet wird, wurden Oligo-dT-Primer verwendet. Damit wurde sichergestellt, dass keine rRNA (ribosomale RNA) oder tRNA (transfer-RNA) ebenfalls in cDNA umgeschrieben wird. Die Proben sollten zusätzlich frei von DNA sein, was bei der RNA-Isolation mit dem Einsatz von DNA verdauenden DNAsen erreicht wurde.

Die Ansätze wurden dann im Mastercycler®gradient nach Anleitung des Herstellers 5 Minuten bei 25°C, 30 Minuten bei 42°C, 5 Minuten bei 85°C inkubiert und am Ende auf 4°C gekühlt.

Die hergestellte cDNA konnte jetzt für die qRT-PCR verwendet werden.

### 2.2.3.2 Quantitative Real-Time PCR

Beruhend auf dem Prinzip der normalen Polymerase-Chain-Reaktion (PCR), bei der DNA Templates vervielfältigt werden, ist es mit der qRT-PCR möglich, in Echtzeit (real-time) die Quantität von Transkripten zu bestimmen.



Um diese zu detektieren, wurde in dieser Arbeit der Fluoreszenzfarbstoff SYBR® -Green verwendet. Dieser wird in doppelsträngige DNA eingelagert, sodass die Fluoreszenz mit der exponentiellen Zunahme der Produkte der PCR korreliert und so bei jedem Zyklus quantifiziert werden kann.

Der Ablauf einer PCR lässt sich in drei Phasen einteilen. In der ersten Phase ist die Wahrscheinlichkeit, dass sich Template, Primer und Polymerase treffen noch relativ gering. In der zweiten Phase steigt diese Wahrscheinlichkeit exponentiell an und die Fluoreszenz der Templates übersteigt die Hintergrundfluoreszenz. In der dritten Phase ist die Menge der Templates zu hoch und gleichzeitig die Substrate größtenteils verbraucht, sodass sich die Amplifikation verlangsamt.

Das Entscheidende dieser Methode ist, dass die Anzahl der Zyklen ermittelt wird, nach denen die Fluoreszenz der Templates die Hintergrundfluoreszenz überschreitet. Dieser Punkt wird Schwellenwert (Threshold) genannt. Die Anzahl der Zyklen, die benötigt werden, um den Threshold zu passieren, wird als  $C_T$ -Wert (Cycle threshold) bezeichnet.

Für eine relative Quantifizierung wurde ein endogenes Haushaltsgen benötigt. In dieser Arbeit wurde GAPDH als Referenz verwendet. Hier wurde für jeden Ansatz der  $C_T$  von GAPDH mitbestimmt.

Um die relative Expression zu bestimmen wurde  $\Delta C_T$  wie folgt berechnet:

$$\Delta C_T (\text{Zielgen}) = C_T (\text{Zielgen}) - C_T (\text{Haushaltsgen})$$

Daraus ließ sich die relative Expression mit folgender Formel berechnen:

$$\text{Rel. Expression} = 2^{-\Delta C_T}$$

Die untransfizierte Kontrolle wurde vom Programm bei jedem Versuch auf eins gesetzt.

Eine qRT-PCR wurde durchgeführt, indem zuerst die im vorherigen Schritt hergestellte cDNA mit DEPC behandeltem Wasser im Verhältnis 1:25 verdünnt wurde. Pro Well wurde dann 7,5 µl SYBR Green, 2,5 µl Primer-Mix (400 ng forward und reverse Primer) und 5 µl cDNA angesetzt. Das Totalvolumen betrug somit pro Well 15 µl. Die qRT-PCR wurde in 96-Well PCR-Platten durchgeführt, bei denen die Detektion und Aufzeichnung der Fluoreszenz von oben durch den durchsichtigen Deckel erfolgte.

Die Ansätze durchliefen dann folgendes Standardprogramm:

3 Minuten bei 95°C

40 Zyklen:

mit 15 Sekunden bei 95°C zur Denaturierung

30 Sekunden bei 60°C zum Annealen

10 Sekunden bei 72°C zur Extension

Zum Schluss fand eine finale Extension bei 72°C für 10 Minuten statt.

Um die qRT-PCR durchzuführen wurde der Thermocycler iCycler der Firma BIO RAD verwendet. Die Auswertung erfolgte mittels der iCycler Software.

#### **2.2.4 Zellzählung mittels CASY®**

Am fünften Tag der Versuchsreihe (drei Tage nach Transfektion) wurde das Wachstum der Zellen ermittelt.

Dazu wurde jedes Well wie oben beschrieben mit 500 µl PBS gewaschen und mit 500 µl Trypsin/EDTA abgelöst. 500 µl TNS stoppte diese Reaktion.

In 10 ml CASY-TON wurden 50 µl Zellen gegeben. Zur besseren Durchmischung wurden zuerst 5 ml CASY-Ton in ein CASY Cup gegeben,

dann die Zellen hinein pipetiert und dann das Cup mit 5 ml CASY-Ton aufgefüllt.

Die Funktionsweise des CASY® Cell Counter Systems beruht auf dem niedrigeren elektronischen Widerstand von Zellen ohne intakte Zellmembran. Vitale Zellen besitzen eine intakte Zellmembran, die den ausgesendeten elektronischen Puls ablenkt und so mittels elektronischer Pulsflächenanalyse die Größe der Zelle gemessen wird. Ist die Zellmembran nicht intakt, kann der Impuls diese durchdringen und die Zellen werden mit der Größe des Zellkerns erfasst und als tote Zellen angezeigt.

Ein gespeichertes Programm errechnete dann die Zellzahl pro ml. Die verwendeten Programme hatten folgende Einstellungen:

Programm 2 (HEK): 50 µl Zellen in 10 ml also 1:200 – für die NSCSLC-Zelllinien und JL-1

Programm 17: 100 µl Zellen in 10 ml also 1:100 – für die CPC-N-Zelllinie

Da in jedem Well genau 1 ml enthalten war, konnte diese Zahl direkt mit der Menge der angezüchteten Zellen verglichen werden.

Für die Auswertung wurde die Zahl der nicht transfizierten Zellen auf 100% gesetzt.

## **2.2.5 Transfektion Zelllinie CPC-N**

### 2.2.5.1 Vorversuche

Da es sich bei den CPC-N –Zellen als SCLC nicht um adhärenente, sondern um in großen Zellaggregaten wachsende Suspensionszellen handelt, mussten einige Schritte entsprechend angepasst werden:

Anzüchten und Transfizieren der Zellen konnte an einem Tag durchgeführt werden, weil sich die Zellen nicht an den Boden anheften mussten.

Da es nicht möglich war, das Medium einfach abzusaugen, wurde das Waschen der Zellen mit PBS nicht in der Zellkulturflasche, sondern in einem Falcon-Röhrchen durchgeführt.

Dafür wurde zuerst das Medium mit den Zellen in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und für 5 min bei 300 x g zentrifugiert. Nun konnte das Medium entfernt werden und die Zellen mit 1 ml PBS resuspendiert werden. Nach erneuter Zentrifugation konnte das PBS abgesaugt und mit 1 ml Medium die Zellen resuspendiert werden.

Danach wurden sie wie die anderen Zelllinien auch mit Trypanblau gefärbt, mittels der Neubauer Zählkammer gezählt und die genaue Menge an Suspension für die gewünschte Zellzahl bestimmt.

Für die Transfektion wurden in 200 µl Vollmedium, 150.000 Zellen für qRT-PCR und 50.000 für die CASY Zellzählung benötigt. Dazu wurden 100 µl Transfektionskomplexe gegeben, die wie folgt angesetzt wurden:

Tabelle 14: Pippettierschema pro Well CPC-N Vorversuche

siRNA Konzentration	Basalmedium in µl	siRNA in µl	Interferin in µl
25 nM	118	0,4	1,17
100 nM	116,7	1,6	1,75
50 nM	117,5	0,8	1,75

Auf die Kontrollen wurde 100 µl Basalmedium gegeben.

Die Platten wurden dann bis zum nächsten Tag zur Inkubation in den Brutschrank bei 37°C gestellt.

Da bei der RNA-Isolation die Zellen nicht im Well mit PBS gewaschen werden konnten, wurden jeweils zwei gleiche Wells in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß

überführt, zentrifugiert (5 min, 300 x g), das Medium abgesaugt, mit 500 µl PBS resuspendiert, erneut zentrifugiert, abgesaugt, mit 350 µl Lyse-Puffer und anschließend mit 350 µl EtOH behandelt. Der restliche Ablauf war wie bereits unter 2.2.3.1 beschrieben.

Die Synthese der cDNA und die qRT-PCR wurden genau wie bei den anderen Zelllinien durchgeführt.

Die CASY Zellzählung erfolgte, bis auf die oben erwähnten Unterschiede beim Waschen, wie bei den anderen Zelllinien auch. Allerdings wurde auf Grund der etwas größeren Zellen ein anderes Programm verwendet. (Siehe 2.2.4)

#### 2.2.5.2 Optimierung der Transfektion der CPC-N Zellen

Da es allerdings auf Grund der großen Zellaggregate in den CPC-N Zellen zu Schwierigkeiten des Zählens, sowohl in der Neubauer Zählkammer, als auch mit dem CASY® Zellzähler und der Transfektion kam, versuchten wir diese folgendermaßen temporär zu trennen:

Mechanisch wurde bei jedem Ansatz versucht durch häufiges und starkes auf und ab Pippettieren, sowie durch regelmäßiges und gründliches Vortexen, die Aggregate zu verkleinern. Zusätzlich wurde ausprobiert, ob ein Filtern der Zellen einen positiven Effekt zur Folge hatte.

Da auch dieses nicht den gewünschten Effekt erzielte, wurden in Form von Vorversuchen bei denen nur SCR und Survivin si-RNA transfiziert und anschließend eine qRT-PCR durchgeführt wurde, verschiedene Dinge getestet, um die Transfektion und Zellzählung der CPC-N Zellen zu optimieren.

Zuerst wurde versucht, die Zellen chemisch mit verschiedenen Lösungen zu separieren. So behandelte man 1 ml Zellsuspension nach dem Zentrifugieren und Waschen mit 1 ml PBS mit 500 µl Trypsin und beendete die Reaktion mit 500 µl TNS.

In einem weiteren Versuch wurde die Verwendung der Cell Dissociation Solution (CDS) von Sigma-Aldrich untersucht. Dafür wurden 5 ml

Zellsuspension 5 min zentrifugiert, das Medium abgesaugt, anschließend mit 1 ml PBS gewaschen und anschließend wieder 5 min zentrifugiert. Nachdem das PBS abgesaugt war, wurden die Zellen mit 1 ml CDS resuspendiert und für 3 min inkubiert. Nach 5 min Zentrifugation wurde das CDS abgesaugt und die Zellen für die Transfektion in 5 ml Basalmedium resuspendiert. Die mit CDS behandelten Zellen wurden wie gewohnt mit SCR und Survivin siRNA in den Konzentrationen 25 nM und 100 nM transfiziert. 4 h nach der Transfektion wurde hier 700 µl Vollmedium auf die Zellen gegeben.

Am nächsten Tag wurde wie bereits beschrieben mit der RNA-Extraktion fortgefahren.

Als nächstes wurde eine geringere Konzentration der siRNAs von 5 nM mit gleichzeitig erhöhter Menge Interferin ausprobiert. Dabei ergab sich für die Transfektion folgendes Pippettierschema:

Tabelle 15: Pippettierschema pro Well CPC-N Optimierungsversuch 2

siRNA Konzentration	Basalmedium in µl	siRNA in µl	Interferin in µl
5 nM	118	0,08	2
25 nM	118	0,4	2
100 nM	116,7	1,6	4

Danach wurde mit einer Plattenzentrifuge versucht, die Zellen am Boden der Wells besser Transfizieren zu können. Dafür wurden 48 Well Platten verwendet. Zusätzlich wurde der Effekt der doppelten Menge an Interferin sowie einer niedrigeren siRNA Konzentration getestet. Nach folgendem Schema wurden die Transfektionskomplexe für SCR und Survivin si-RNA pro Well angesetzt:

Tabelle 16: Pippettierschema pro Well CPC-N Optimierungsversuch 3

siRNA Konzentration	Basalmedium in $\mu\text{l}$	siRNA in $\mu\text{l}$	Interferin in $\mu\text{l}$
5 nM	118	0,08	2
25 nM	118	0,4	2
100 nM	116,7	1,6	4
5 nM	118	0,08	4
25 nM	118	0,4	4
100 nM	116,7	1,6	8

Auf die vorher wie bekannt angezüchteten 200  $\mu\text{l}$  Zellsuspension wurden pro Well 100  $\mu\text{l}$  der Transfektionskomplexe hinzugegeben. Danach wurden die Platten 3 min bei 200 x g zentrifugiert und vorsichtig in den Brutschrank gestellt.

Am nächsten Tag wurde nach dem bekannten Schema die RNA extrahiert, in cDNA umgeschrieben und eine qRT-PCR angesetzt.

Auf Grund der Ergebnisse dieses Vorversuchs gab es einen zweiten Durchgang.

Bei diesem wurde folgendes Pippettierschema pro Well eingesetzt:

Tabelle 17: Pippettierschema pro Well CPC-N Optimierungsversuch 4

siRNA Konzentration	Basalmedium in $\mu\text{l}$	siRNA in $\mu\text{l}$	Interferin in $\mu\text{l}$
25 nM	118	0,4	8
100 nM	116,7	1,6	8

Zusätzlich wurde die Zeit der Zentrifugation auf 5 min bei 200 x g erhöht.

Danach wurde wie gewohnt fortgefahren.

### **2.2.6 Untersuchung der Transfektionseffizienz von A549 und NCI-H460**

Um die Effizienz der Transfektion unabhängig vom Knockdown zu untersuchen, wurden Zellen mit 10, 25 und 50 nM Fluorescein isothiocyanate (FITC) – labelled nonsense si-RNA transfiziert. Am nächsten Tag wurden die Zellen wie gewohnt mit PBS gewaschen und mit Trypsin und TNS abgelöst.

Die Zellsuspension wurde dann in ein Falcon überführt, 5 min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Pellet wurde mit 2,5% Paraformaldehyd in PBS fixiert.

Die Messung erfolgte dann per Durchflusszytometrie, wobei 5000 Zellen pro Durchgang verwendet wurden.

Für die Auswertung wurde das geometrische Mittel der 5000 gezählten Zellen bestimmt.

### **2.2.7 Western Blots**

Um den Knockdown von Proteinen darzustellen, wurden Western Blots durchgeführt. Dafür wurden wie bereits in den Punkten 2.2.1 und 2.2.2 beschrieben die NSCLC Zelllinien mit 50 nM STAT3-siRNA transfiziert.

Einen Tag später wurden mit RIPA-Lysis-Buffer die Proteine aus den Zellen isoliert.

Dafür wurden zuerst die Zellen wie gewohnt mit 1 ml PBS gewaschen und mit Trypsin und TNS abgelöst. Je zwei Wells des gleichen Ansatzes wurden in ein Falconröhrchen von 15 ml gegeben und 5 min zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgesaugt war, wurde das Zellpellet mit 80 µl RIPA-Puffer resuspendiert. Nach gründlichen Vortexen, 5 min Lagerung auf Eis und erneuten Vortexen wurde die Lösung in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Dort wurde pro Eppendorfreaktionsgefäß 1 µl Protease Inhibitor und 1 µl Dithiothreitol (DTT) hinzugegeben und für 5 min in einer auf 4°C gekühlten Zentrifuge mit 16.000 x g zentrifugiert.



Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, in ein frisches Eppendorfreaktionsgefäß gegeben, sofort auf Eis gelagert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

Danach wurden die isolierten Proteine mit einer SDS-PAGE (Sammelgel 4%, Trenngel 10%) elektrophoretisch aufgetrennt.

Dafür wurde zuerst das Trenngel (10%) gegossen, anschließend mit Isopropanol überschichtet und das Gel trocknen gelassen. Danach wurde das Propanol wieder abgegossen und mit  $\text{H}_2\text{O}$  nachgespült.

Anschließend wurde das Sammelgel (4%) über das Trenngel gegossen, mit einem Kamm versehen und getrocknet.

Die Vorbereitung der Proben (Proteinkonzentration von 4-25  $\mu\text{g}$ ) wurde wie folgt durchgeführt.

Die Proben wurden entsprechend verdünnt und im Verhältnis von 1:1 mit Probenpuffer gemischt. Die entstandene Mischung wurde 5 min bei  $95^{\circ}\text{C}$  im Heizblock denaturiert, kurz stehen gelassen und zusammen mit einem Molekular Weight Marker auf das Gel aufgetragen.

Im Mini-PROTEAN® der Firma BIO RAD wurde die Kammer mit SDS-PAGE Laufpuffer gefüllt. Anfangs wurde die Elektrophorese bei 100 V laufen gelassen, bis die Proben das Trenngel erreicht haben. Anschließend wurde auf 120 V erhöht und das Gel ca. eine Stunde laufen gelassen, bis die Banden das Gelende erreicht haben.

Anschließend erfolgten der Proteintransfer und die irreversible Fixierung auf eine Blotting-Membran aus Nitrozellulose.

Dafür wurden zuerst das Gel, die Nitrozellulosemembran und 2 Whatman-Filterpapiere 15 min in Transferpuffer inkubiert. Danach folgte zum Blotten ein Aufbau aus einem Whatman-Filterpapier, gefolgt von der Nitrozellulosemembran, dem Gel und einem weiteren Whatman-Filterpapier. In

der Blotting Apparatur Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell der Firma BIO RAD wurde 30 min. bei 15 V geblottet.

Anschließend wurde eine reversible FastGreen Färbung durchgeführt. Dafür wurde das Gel 5 min in 0,1% FastGreen in 1% Essigsäure inkubiert. Dies dient zum Nachweis des Proteinübertritts vom Gel auf die Membran. Im Anschluß wurde das Gel mit 0,2 M NAOH wieder entfärbt und anschließend 1x kurz mit H<sub>2</sub>O bidest. gespült.

Danach erfolgte die irreversible Antikörperfärbung. Dafür wurden zuerst die freien unspezifischen Bindungsstellen mit 5% Rinderserumalbumin in PBS (Bovine serum Albumin – BSA) bis zum nächsten Tag geblockt und anschließend in TTBS 1 min gewaschen.

Dann wurde die Membran 3 x 5 min in TBS gewaschen.

Darauf folgend wurde die Membran in 15 ml TBS und einer 1:500 Verdünnung von Anti-STAT3 (K-15) und Anti-Actin (SPM161) Antikörpern für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Nachdem diese 5 x 2 min TBS gewaschen war, wurde der mit Alkalischer-Phosphatase konjugierte Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:5.000 auf der Membran appliziert und mit 15 ml TBS für 2 Stunden inkubiert.

Anschließend wurde die Membran noch 5 x 2 min mit TBS gewaschen.

Die Detektion erfolgte mit 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphat (BCIP®)/ nitro blue tetrazolium (NBT) Liquid Substrat von Sigma Aldrich.

Die Reaktion wurde durch mehrmaliges Waschen mit H<sub>2</sub>O bidest. gestoppt und ein Foto der gefärbten Membran angefertigt.

Für die Berechnung der relativen Expression des Proteinlevels wurde das Programm Image J benutzt und die Expression von Actin als Referenz verwendet.

### **2.2.8 Statistische Methoden**

Die Ergebnisse zeigen den Mittelwert von mindestens drei unabhängigen Versuchsdurchläufen, wenn nicht anders angegeben.

Es wurden pro Versuch Duplikate für die qRT-PCR und Quadruplikate für die CASY-Messung in Wells angesetzt.

Zur Darstellung der Ergebnisse wurde der Mittelwert, sowie die Standardabweichung ermittelt.

Um einen signifikanten Knockdown zu bestätigen, wurde bei  $n \geq 3$  eine ANOVA durchgeführt mit einer Bonferroni-Korrektur als Post-Test. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p < 0,05$  festgelegt.

### **3. Ergebnisse**

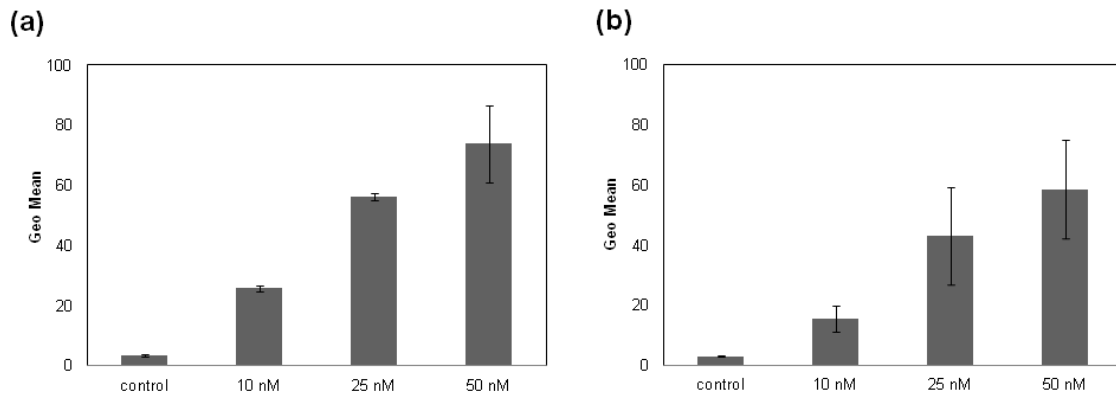
Die Ergebnisse der im Kapitel Material und Methoden erläuterten Experimente sind im Folgenden nach Zelllinien geordnet dargestellt.

#### **3.1 Untersuchung der Transfektionseffizienz von A549 und NCI-H460**

Die Transfektion mit Fluorescein isothiocyanate (FITC) –markierter nonsense siRNA der A549 und NCI-H460 Zellen zeigte, dass die Fluoreszenz mit Höhe der siRNA Konzentration ansteigt (Abb. 5).

Dabei war der Anstieg der Fluoreszenz bei beiden verwendeten Zelllinien nahezu gleich. Bei 25 nM siRNA Konzentration war etwa die Hälfte der untersuchten Zellen mit fluoreszenter siRNA transfiziert. Es ist anzunehmen, dass bei 100 nM alle Zellen transfiziert sind und sogar eine Übersättigung der siRNA zu erkennen wäre. Dies würde sich in einem unspezifischen Knockdown der SCR-siRNA bei 100 nM siRNA Konzentration zeigen. Daher wurden für eine konzentrationsabhängige Aussage über den siRNA-vermittelten Knockdown, 25 und 100 nM siRNA für die Untersuchung der Genexpression mittels qRT-PCR verwendet.

Da mehr als die Hälfte der Zellen bei einer 50 nM siRNA Konzentration transfiziert wurden, ist davon auszugehen, dass hier der Einfluss auf die Zellzahl durch den siRNA-vermitteltem Knockdown am sichtbarsten sein würde. Deshalb wurden die Zellzahluntersuchungen mit einer 50 nM siRNA Konzentration durchgeführt.



**Abbildung 5: Durchflusszytometrie von (a) A549 und (b) NCI-H460 Zelllinien 24h nach Transfektion mit FITC markierter nonsense-siRNA.**

Die x-Achse zeigt die Konzentration der verwendeten siRNA, während die y-Achse den Mittelwert der Fluoreszenz von jeweils 5000 gemessenen Zellen darstellt.

## **3.2 Adenokarzinomzelllinie A549**

### **3.2.1 Knockdown in Adenokarzinomzelllinie A549**

Nach der Transfektion der A549 Zelllinie mit den verschiedenen siRNAs zeigten sich folgende Veränderungen in der Expression der entsprechenden Gene.

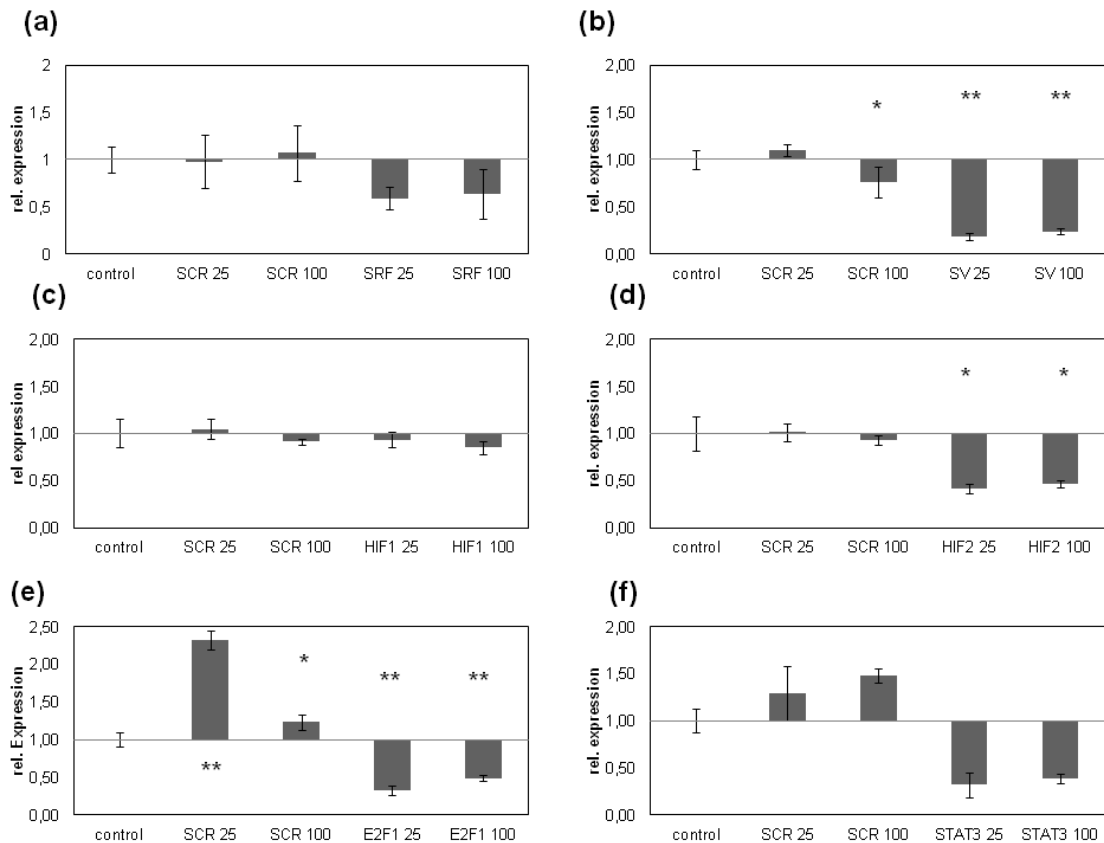
Die mit SRF transfizierten Zellen wiesen eine Reduktion von 41% bei 25 nM und 37% bei einer Konzentration von 100 nM auf (Abb. 6(a)).

Bei den mit Survivin transfizierten Zellen zeigte sich allerdings ein höchst signifikanter Knockdown der Expression von 82% bei 25 nM, sowie 76% bei 100 nM siRNA Konzentration. Mit einer Reduktion von 24% und einem p-Wert von 0,0438 erwies sich auch die Transfektion von SCR siRNA in der Konzentration von 100 nM als statistisch signifikant (Abb. 6(b)).

Die Expression von HIF1 $\alpha$  zeigte sich nach Transfektion unverändert. Wohingegen die Transfektion mit HIF2 $\alpha$  siRNA eine Reduktion der Expression bei 25 nM von 58% und bei 100 nM von 53% bewirkte (Abb. 6(c-d)).

Es konnten außerdem statistisch signifikante Reduktionen der Expression nach der Transfektion von E2F1 von 67% bei 25 nM und 51% bei 100 nM beobachtet

werden. Zusätzlich zeigte die Transfektion von SCR-siRNA bei der Konzentration 25 nM eine statistisch signifikante Erhöhung der Expression um das Zweifache, sowie eine signifikante Erhöhung bei 100 nM um 24% (Abb. 6(e)).



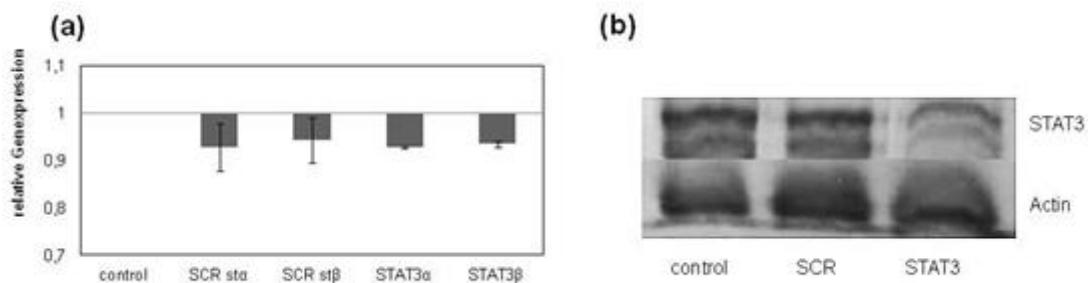
**Abbildung 6: Relative Expression von (a) SRF, (b) Survivin, (c) HIF1α, (d) HIF2α, (e) E2F1 und (f) STAT3 24 Stunden nach Transfektion der Zelllinie A549**

Die x-Achse beschreibt die verschiedenen siRNAs und die verwendete Konzentration, während die y-Achse die relative Expression der entsprechenden mRNA zeigt, wobei die untransfizierten Zellen (control) auf 1 gesetzt sind.

Jedes Diagramm zeigt die mittlere  $\pm$  Standardabweichung bei (a) und (f)  $n=1$ , (b)  $n=4$ , (c), (d) und (e)  $n=3$ . Bei mehr als 3 unabhängigen Versuchen wurde eine ANOVA durchgeführt. Ein P-Wert  $< 0,05$  wurde als statistisch signifikant bewertet. \*= $p<0,05$ ; \*\*= $p<0,01$

Die Transfektion von STAT3 siRNA in der Konzentration von 25 nM resultiert in einer Reduktion der Expression von 68% und von 61% bei 100 nM (Abb. 6(f)). Bei den Western Blots wurde eine Reduktion des Proteinlevels um 7% nach der Transfektion von 50 nM STAT3-siRNA ermittelt (Abb. 7(a)). Zusätzlich zeigte sich ein 7%iger Rückgang des Proteinlevels auch bei SCR-siRNA, wohingegen

in der qRT-PCR eine Erhöhung der Expression sowohl bei 25 nM als auch bei 100 nM siRNA zu sehen war.



**Abbildung 7: Relatives Proteinlevel und Western Blot der Zelllinie A549**

(a) Zeigt das relative Proteinlevel von STAT3 $\alpha$  und STAT3 $\beta$  24h nach Transfektion mit 50 nM STAT3-siRNA verglichen mit untransfizierten Zellen (control). Zur Berechnung der relativen Expression wurde die Expression von Actin gemessen.

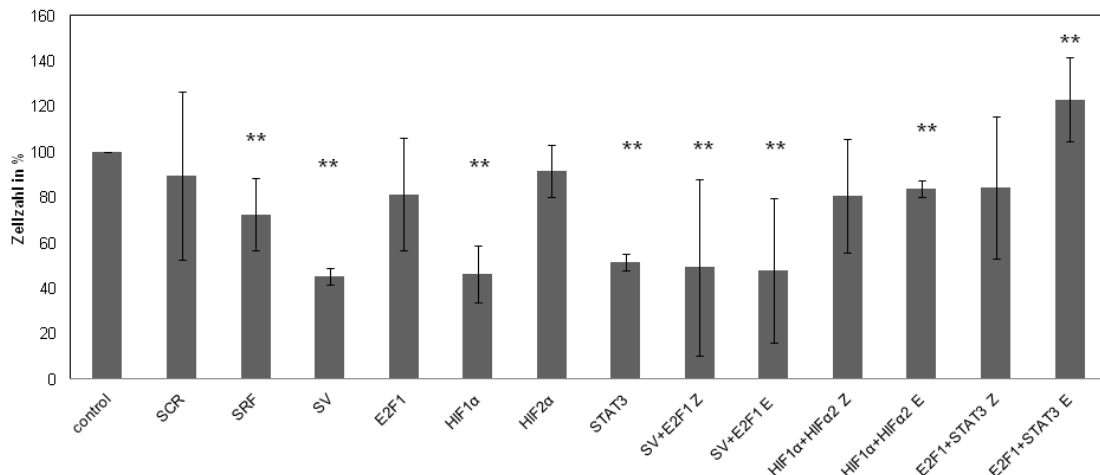
Die x-Achse zeigt das Transfektionsmittel, während die y-Achse das relative Proteinlevel darstellt. Untransfizierte Zellen sind dabei auf 1 gesetzt.

(b) Western Blot der STAT3 Expression nach Transfektion mit 50 nM STAT3-siRNA mit n=2.

### 3.2.2 Zellzahl nach Transfektion von A549

Die Transfektion mit den verwendeten siRNAs in der Konzentration von 50 nM siRNA brachte folgende Ergebnisse:

Die Zellzahl wurde signifikant reduziert nach der Transfektion mit SRF- (um 27%), Survivin- (um 55%), HIF1 $\alpha$ - (um 54%) und STAT3-siRNA (um 49%). Auch durch die Transfektion von zwei verschiedenen siRNAs resultierte bei der Kombination von Survivin- und E2F1-siRNA in einer statistisch signifikanten Reduktion der Zellzahl von 51% bei den zusammen angesetzten und von 52% bei den einzeln angesetzten Proben. Die 17%ige Reduktion des einzeln angesetzten Cocktails von HIF1 $\alpha$ - und HIF2 $\alpha$ -siRNA erwies sich ebenfalls als statistisch signifikant. Der Cocktail aus E2F1-, und STAT3-siRNA zeigte einen statistisch relevanten Anstieg der Zellzahl um 23% (Abb. 8).



**Abbildung 8: Zellzahl in % drei Tage nach Transfektion der Zelllinie A549**

Die x-Achse zeigt die verwendete siRNA mit der Konzentration von 50 nM und die y-Achse die Zellzahl in Prozent. Nichttransfizierte Zellen (control) wurden dabei auf 100% gesetzt.

Das Diagramm zeigt die mittlere  $\pm$  Standardabweichung bei control und SCR n=7, SRF, E2F1, HIF1 $\alpha$ +HIF2 $\alpha$  Z, HIF1 $\alpha$ +HIF2 $\alpha$  E, E2F1 +STAT3 Z und E2F1+STAT3 E n=3, Survivin, HIF1 $\alpha$ , HIF2 $\alpha$ , STAT3, Survivin+E2F1 Z und Survivin+ E2F1 E n=4.

Bei mehr als 3 unabhängigen Versuchen wurde eine ANOVA durchgeführt. Ein P-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant bewertet. \*= $p < 0,05$ ; \*\*= $p < 0,01$

### 3.3 Adenokarzinomzelllinie LXF-289

#### 3.3.1 Knockdown in Adenokarzinomzelllinie LXF-289

Die Transfektion der verschiedenen siRNAs wies bei der LXF-289 Zelllinie folgende Auswirkung auf die Genexpression auf.

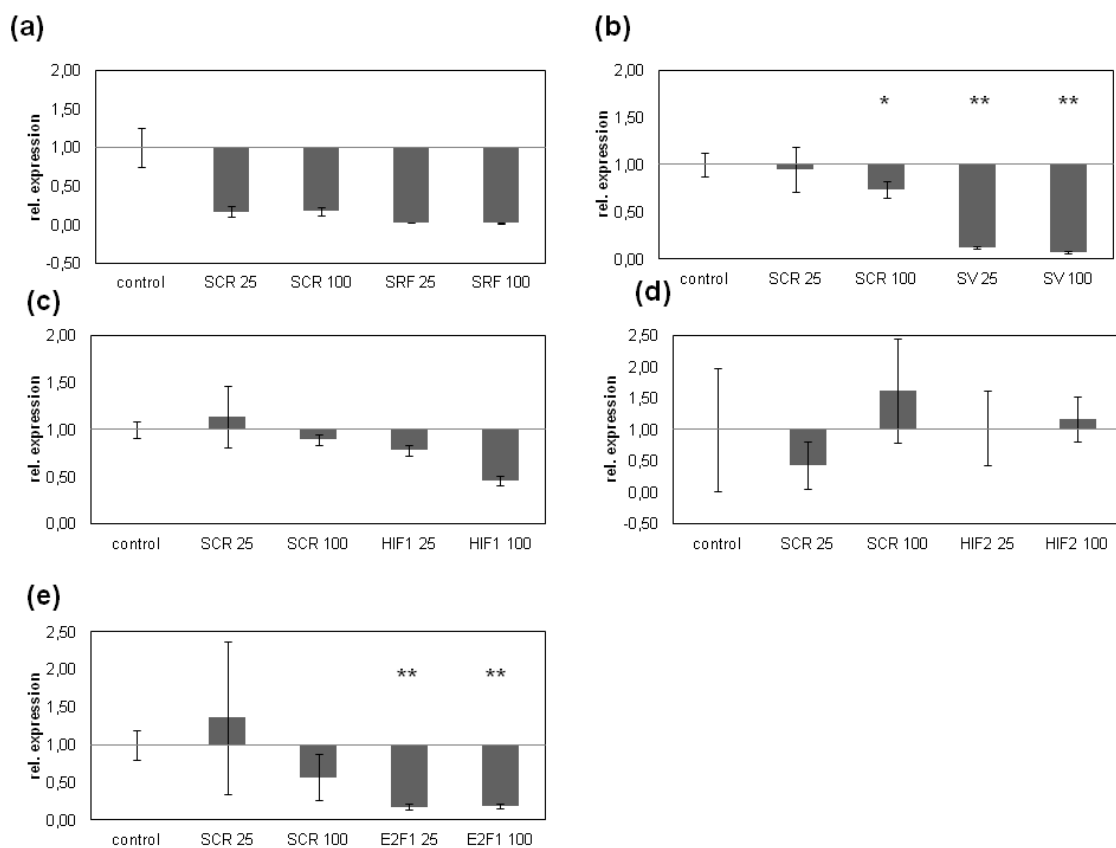
Nach der Transfektion von SRF zeigte sich eine Reduktion der Expression um 97% bei 25 nM und 98% bei 100 nM. Allerdings wurde auch eine Reduktion von 83% bei 25 nM und 82% nach der Transfektion von 100 nM SCR-siRNA ermittelt (Abb. 9(a)).

Bei den mit Survivin siRNA transfizierten Zellen stellten sich statistisch signifikante Reduktionen der Expression von 88% bei 25 nM und 93% bei 100 nM heraus. Die Transfektion von SCR-siRNA zeigte bei der Konzentration von 100 nM eine signifikante Reduktion um 26% (Abb. 9(b)).



Die Expression nach der Transfektion mit HIF1 $\alpha$ -siRNA wies nur in der Konzentration von 100 nM eine Reduktion von 50% auf (Abb. 9(c)). Allerdings ließ sich nach der Transfektion von unterschiedlichen Konzentrationen von HIF2 $\alpha$ -siRNA kein Knockdown darstellen (Abb. 9(d)).

Wohingegen nach der Transfektion von E2F1-siRNA eine statistisch signifikante Reduktion der Expression von 82% bei 25 nM und 81% bei 100 nM ermittelt wurde (Abb. 9(e)).

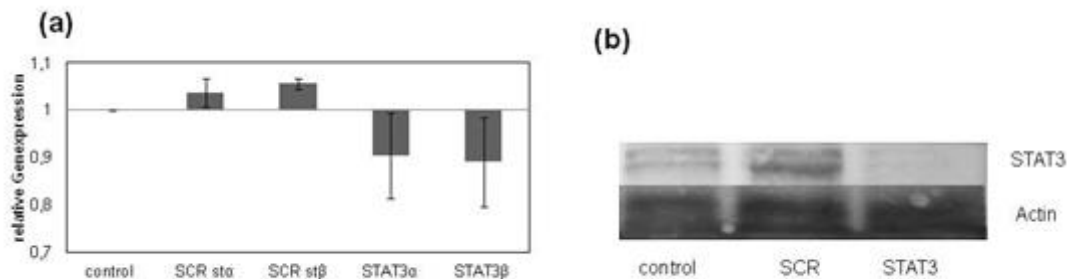


**Abbildung 9: Relative Expression von (a) SRF, (b) Survivin, (c) HIF1 $\alpha$ , (d) HIF2 $\alpha$ , (e) E2F1 24 Stunden nach Transfektion der Zelllinie LXF-289**

Die x-Achse beschreibt die verschiedenen siRNAs und die verwendete Konzentration, während die y-Achse die relative Expression der entsprechenden mRNA zeigt, wobei die untransfizierten Zellen (control) auf 1 gesetzt sind.

Jedes Diagramm zeigt die mittlere  $\pm$  Standardabweichung bei (a)  $n=1$ , (b) und (e)  $n=3$ , (c) und (d)  $n=2$ . Bei mehr als 3 unabhängigen Versuchen wurde eine ANOVA durchgeführt. Ein P-Wert  $< 0,05$  wurde als statistisch signifikant bewertet. \*= $p<0,05$ ; \*\*= $p<0,01$

Zusätzlich reduzierte sich nach einer Transfektion von 50 nM STAT3-siRNA in den Western Blots das Proteinlevel um 10% (Abb. 10(a)).



#### Abbildung 10: Relatives Proteinlevel und Western Blot der Zelllinie LXF-289

(a) Zeigt das relative Proteinlevel von STAT3α und STAT3β 24h nach Transfektion mit 50 nM STAT3-siRNA verglichen mit untransfizierten Zellen (control). Zur Berechnung der relativen Expression wurde die Expression von Actin gemessen.

Die x-Achse zeigt das Transfektionsmittel, während die y-Achse das relative Proteinlevel darstellt. Untransfizierte Zellen sind dabei auf 1 gesetzt.

(b) Western Blot der STAT3 Expression nach Transfektion mit 50 nM STAT3-siRNA mit n=2.

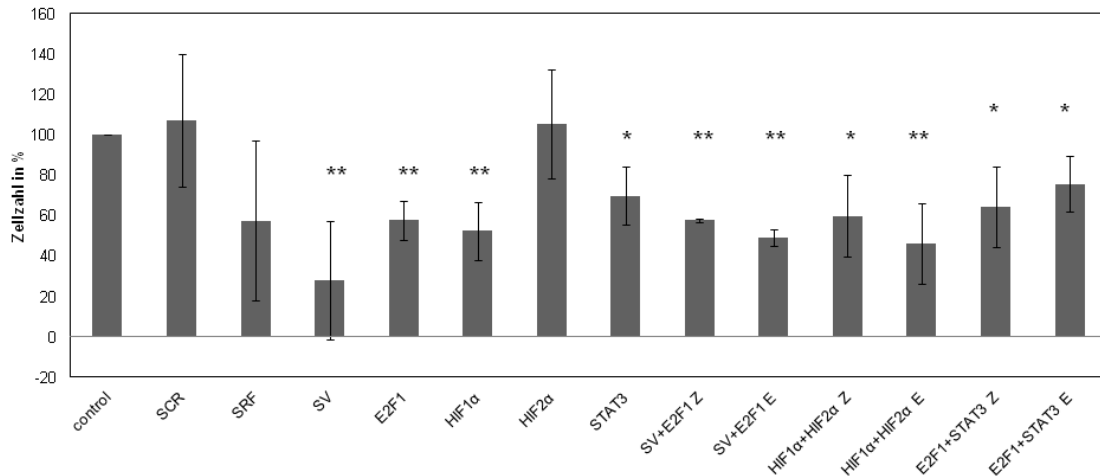
### 3.3.2 Zellzahl nach Transfektion von LXF-289

Die Zellzahl wurde durch die Transfektion von 50 nM siRNAs signifikant reduziert. Die Prozentzahlen beziehen sich immer auf untransfizierte Zellen als Kontrolle, die auf 100% gesetzt wurde.

So zeigte sich eine Reduktion von 72% durch Survivin-siRNA, 42% durch E2F1-siRNA, 48% durch HIF1α-siRNA und 30% durch die Transfektion von STAT3-siRNA. Bei den mit HIF2α transfizierten Zellen zeigte sich keine statistisch signifikante Auswirkung auf die Zellzahl. Durch SRF-siRNA ließ sich eine Reduktion von 43% erreichen.

Zusätzlich wurde durch die Kombination zweier siRNAs sowohl bei einzeln als auch bei zusammen angesetzten Proben die Zellzahl reduziert. Der Cocktail aus Survivin-, und E2F1-siRNA zeigte eine Reduktion von 42% bei zusammen angesetzten und 51% bei getrennt angesetzten Proben. Durch die Transfektion von einem Cocktail aus HIF1α-, und HIF2α-siRNA wurde eine Reduktion der Zellzahl von 40% bei zusammen und 54% bei getrennt angesetzten Proben

erreicht. Auch die Kombination von E2F1- und STAT3-siRNA zeigte eine statistisch signifikante Reduktion von 36% bei zusammen und von 25% bei getrennt angesetzten Proben (Abb. 11).



**Abbildung 11: Zellzahl in % drei Tage nach Transfektion der Zelllinie LXF-289**

Die x-Achse zeigt die verwendete siRNA mit der Konzentration von 50 nM und die y-Achse die Zellzahl in Prozent. Nichttransfizierte Zellen (control) wurden dabei auf 100% gesetzt.

Das Diagramm zeigt die mittlere  $\pm$  Standardabweichung bei control, SCR, Survivin und E2F1 n=4, SRF n=1, HIF1 $\alpha$ , HIF2 $\alpha$ , STAT3, Survivin+E2F1 Z, Survivin+E2F1 E, HIF1 $\alpha$ +HIF2 $\alpha$  Z, HIF1 $\alpha$ +HIF2 $\alpha$  E, E2F1 + STAT3 Z und E2F1+STAT3 E n=3.

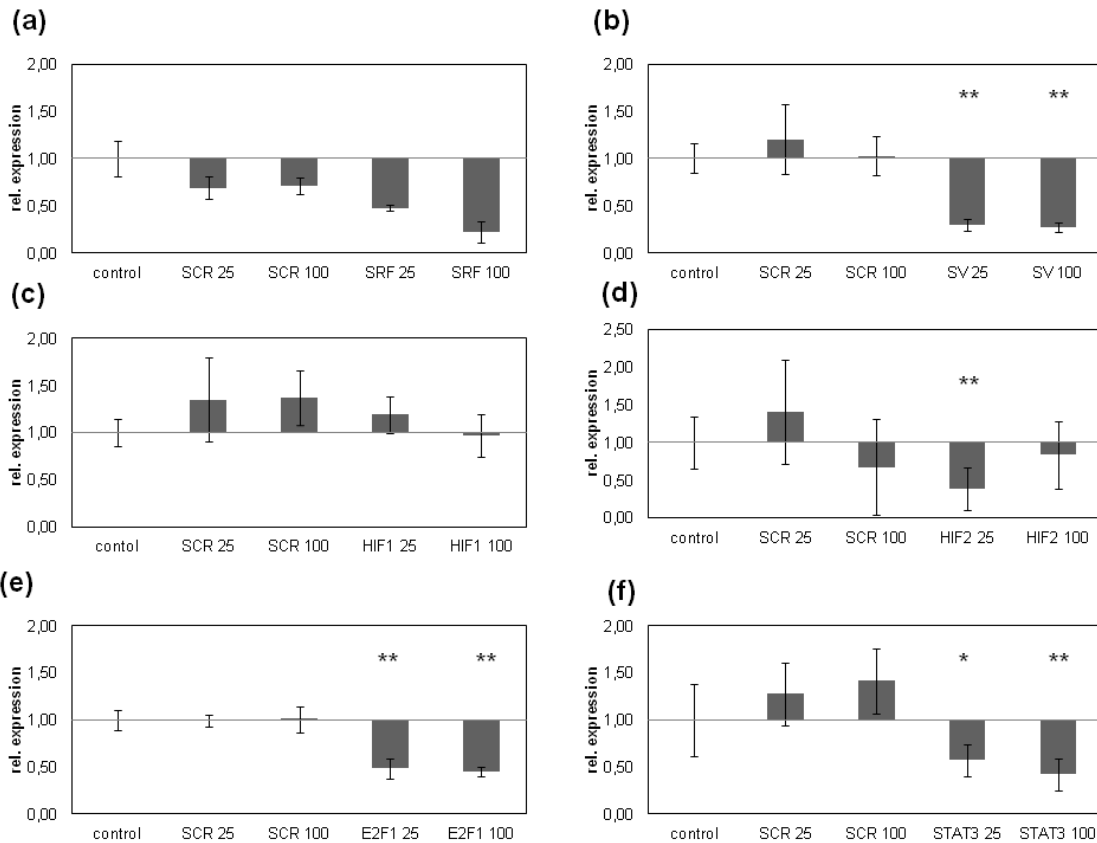
Bei mehr als 3 unabhängigen Versuchen wurde eine ANOVA durchgeführt. Ein P-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant bewertet. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$

### **3.4 Plattenepithelkarzinomzelllinie SK-MES**

#### **3.4.1 Knockdown in der Plattenepithelkarzinomzelllinie SK-MES**

Durch die Transfektion der SK-MES Zelllinie mit den verwendeten siRNAs wurden folgende Ergebnisse ermittelt.

Bei den mit SRF transfizierten Zellen zeigte sich eine 52%ige Reduktion der Genexpression bei einer Konzentration von 25 nM und 78 % bei einer Konzentration von 100 nM (Abb. 12(a)).



**Abbildung 12: Relative Expression von (a) SRF, (b) Survivin, (c) HIF1α, (d) HIF2α, (e) E2F1 und (f) STAT3 24 Stunden nach Transfektion der Zelllinie SK-MES**

Die x-Achse beschreibt die verschiedenen siRNAs und die verwendete Konzentration, während die y-Achse die relative Expression der entsprechenden mRNA zeigt, wobei die untransfizierten Zellen (control) auf 1 gesetzt sind.

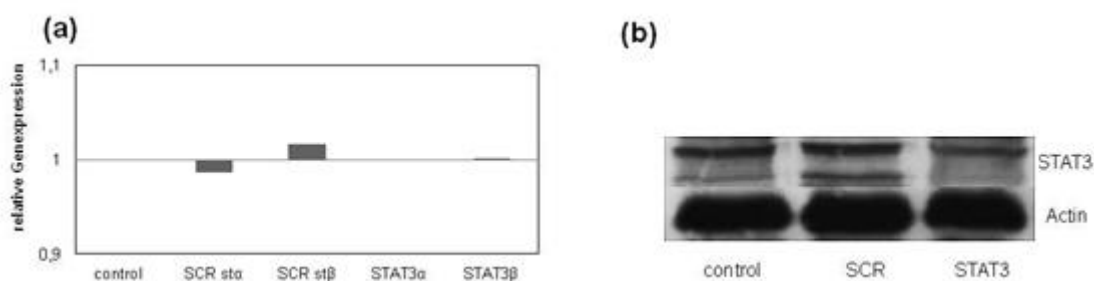
Jedes Diagramm zeigt die mittlere  $\pm$  Standardabweichung bei (a)  $n=1$ , (b)  $n=4$ , (c), (d), (e) und (f)  $n=3$ . Bei mehr als 3 unabhängigen Versuchen wurde eine ANOVA durchgeführt. Ein P-Wert  $< 0,05$  wurde als statistisch signifikant bewertet. \*= $p<0,05$ ; \*\*= $p<0,01$

Die Transfektion von Survivin siRNA wies einen statistisch signifikanten Knockdown der Expression von 71% bei 25 nM und 73% bei 100 nM auf (Abb. 12(b)).

Die Expression von HIF1α zeigte keine Reduktion nach Transfektion von HIF1α-siRNA, aber einen leichten Anstieg durch SCR-siRNA Transfektion. Daneben wurde die Expression von HIF2α durch Transfektion mit 25 nM um 60% reduziert. Diese Reduktion ist statistisch signifikant (Abb. 12(c-d)).

Die mit E2F1-siRNA transfizierten Zellen wiesen außerdem eine statistisch signifikante Reduktion der Expression von 51% bei 25 nM und 55% bei 100 nM auf (Abb. 12(e)).

Zellen, die mit STAT3-siRNA transfiziert wurden, zeigten einen statistisch signifikanten 40%igen Knockdown der Expression bei 25 nM und einen 60%igen bei 100 nM (Abb. 12(f)). Allerdings wurde in den Western Blots keine Veränderung des Proteinlevels festgestellt (Abb. 13(a)).



**Abbildung 13: : Relatives Proteinlevel und Western Blot der Zelllinie SK-MES**

(a) Zeigt das relative Proteinlevel von STAT3 $\alpha$  und STAT3 $\beta$  24h nach Transfektion mit 50 nM STAT3-siRNA verglichen mit untransfizierten Zellen (control). Zur Berechnung der relativen Expression wurde die Expression von Actin gemessen.

Die x-Achse zeigt das Transfektionsmittel, während die y-Achse das relative Proteinlevel darstellt. Untransfizierte Zellen sind dabei auf 1 gesetzt.

(b) Western Blot der STAT3 Expression nach Transfektion mit 50 nM STAT3-siRNA mit n=2.

### 3.4.2 Zellzahl nach Transfektion von SK-MES

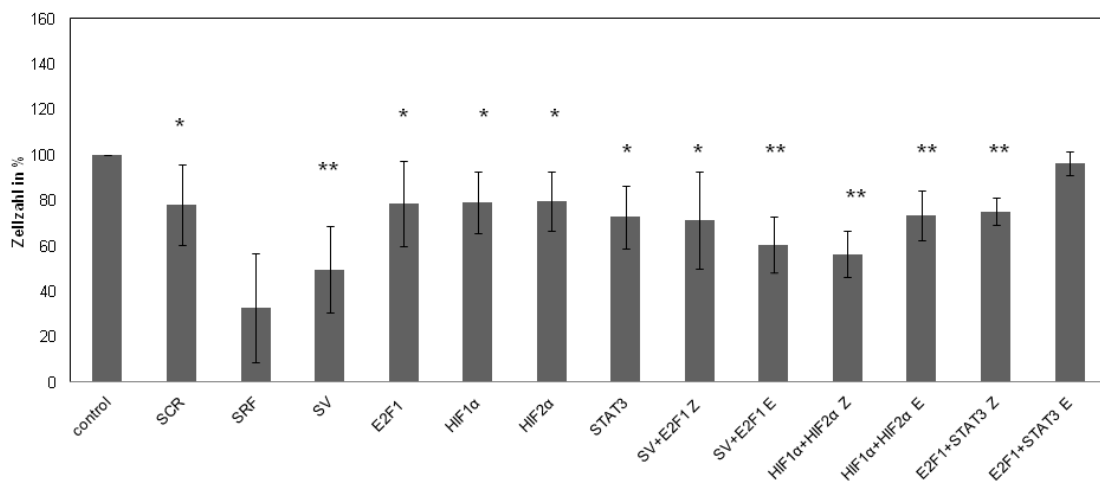
Bei der Ermittlung der Auswirkung der Transfektion einer siRNA mit der Konzentration von 50 nM sowie drei Kombinationen mit der Konzentration von 25 nM je siRNA (E2F2+SV, HIF1 $\alpha$ +HIF2 $\alpha$ , STAT3+E2F1) auf die Zellzahl wurden folgende statistisch signifikante Ergebnisse erzielt:

Nach der Transfektion von Survivin-siRNA zeigte sich eine Zellzahlreduktion von 50%. Jeweils 21% Reduktion wurde durch E2F1-, und HIF1 $\alpha$ -siRNA erreicht, sowie 20% und 27% Reduktion durch die Transfektion von HIF2 $\alpha$  und STAT3.

Die Transfektion von SRF-siRNA resultierte in einer um 67% reduzierten Zellzahl.

Auch die Mischung zweier siRNAs erwies sich als wirksam, die Zellzahl signifikant zu reduzieren. So wurde bei dem Cocktail aus Survivin- und E2F1-siRNA bei zusammen angesetzten Proben eine Reduktion von 29% und bei getrennt angesetzten Proben von 39% erreicht. Desweiteren zeigte die Kombination von HIF1 $\alpha$ - und HIF2 $\alpha$ -siRNA eine Verminderung der Zellzahl um 44% bei zusammen und 27% bei getrennt angesetzten Transfektionskomplexen. 25% Reduktion der Zellzahl zeigte der Cocktail von E2F1- und STAT3-siRNA bei zusammen angesetzten Proben. Bei getrennt angesetzten siRNAs von E2F1 und STAT3 zeigte sich keine signifikante Wirkung.

Auch die Transfektion von SCR-siRNA hatte eine statistisch signifikante Reduktion der Zellzahl um 22% zur Folge (Abb. 12).



**Abbildung 14: Zellzahl in % drei Tage nach Transfektion der Zelllinie SK-MES**

Die x-Achse zeigt die verwendete siRNA mit der Konzentration von 50 nM und die y-Achse die Zellzahl in Prozent. Nichttransfizierte Zellen (control) wurden dabei auf 100% gesetzt.

Das Diagramm zeigt die mittlere  $\pm$  Standardabweichung bei control und SCR n=5, SRF n=1, Survivin, E2F1 und Survivin+E2F1 Z n=4, HIF1 $\alpha$ , HIF2 $\alpha$ , STAT3, Survivin+E2F1 E, HIF1 $\alpha$ +HIF2 $\alpha$  Z, HIF1 $\alpha$ +HIF2 $\alpha$  E, E2F1 +STAT3 Z und E2F1+STAT3 E n=3

Bei mehr als 3 unabhängigen Versuchen wurde eine ANOVA durchgeführt. Ein P-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant bewertet. \*=p<0,05; \*\*= p<0,01

## **3.5 Großzellige Bronchialkarzinomzelllinie NCI-H460**

### **3.5.1 Knockdown in großzelliger Bronchialkarzinomzelllinie NCI-H460**

Die Transfektion der Zelllinie NCI-H460 mit den verwendeten siRNAs wirkte sich wie folgt auf die Genexpression aus.

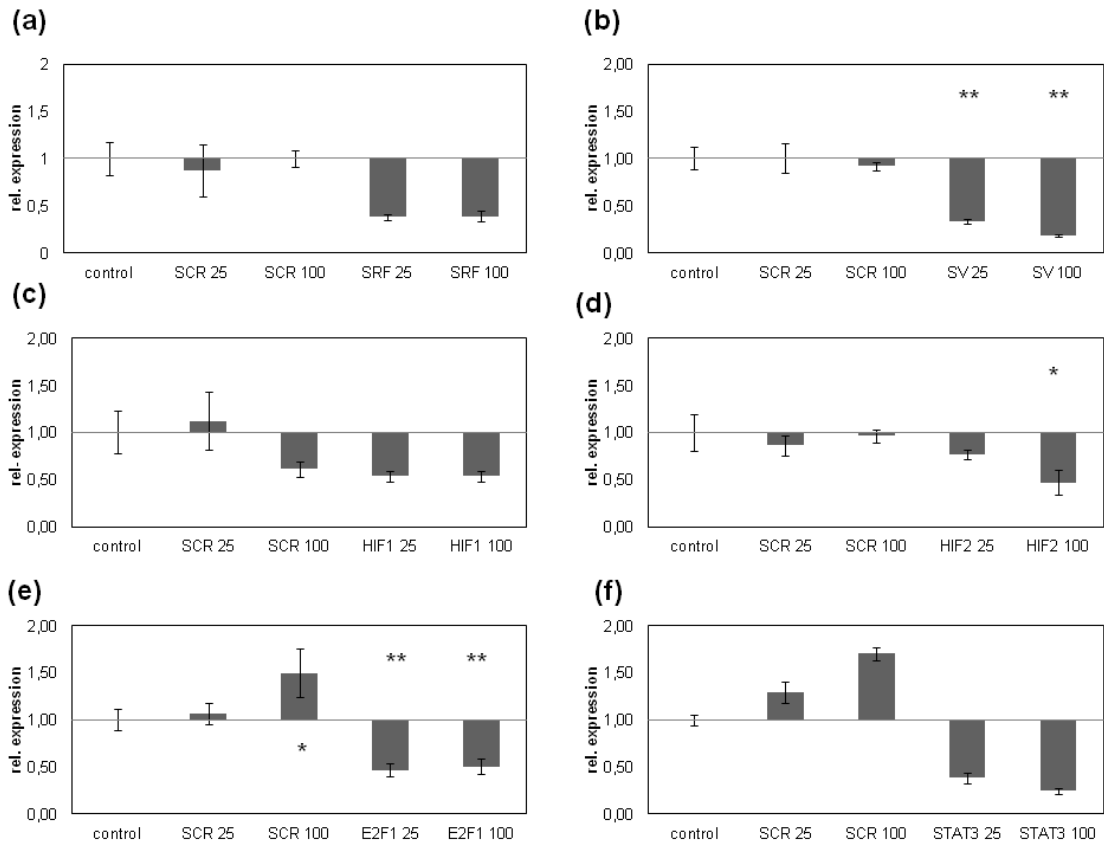
Die mit SRF transfizierten Zellen wiesen bei der verwendeten Konzentration von 25 nM eine Reduktion von 62% und bei 100 nM siRNA Konzentration eine Reduktion von 61% auf (Abb. 15(a)).

Daneben zeigte die Transfektion mit Survivin-siRNA einen statistisch signifikanten Knockdown von 66% (25 nM siRNA) und 82% (100 nM siRNA) (Abb. 15(b)).

Bei Zellen, die mit HIF1 $\alpha$ -siRNA transfiziert wurden, konnte eine Reduktion von 46% bei beiden Konzentrationen ermittelt werden (Abb. 15(c)). Die Transfektion mit 100 nM HIF2 $\alpha$ -siRNA zeigte eine statistisch signifikante, 53%ige Reduktion der Expression (Abb. 15(d)).

Einen statistisch signifikanten Knockdown zeigte die Transfektion mit E2F1-siRNA. So wurde eine Reduktion von 53% bei 25 nM und 49% bei 100 nM ermittelt. Zusätzlich wies die Transfektion von 100 nM SCR-siRNA einen statistisch relevanten Anstieg der Expression von 50% auf (Abb. 15(e)).

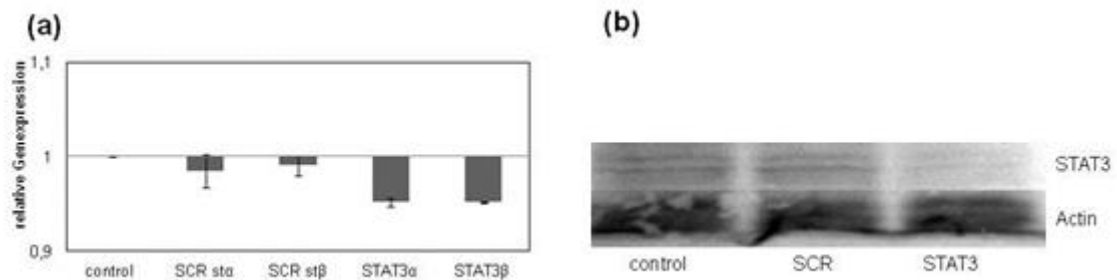
Außerdem zeigte sich eine reduzierte Expression von STAT3 von 70% nach Transfektion von 25 nM STAT3-siRNA und von 75% nach Transfektion von 100 nM STAT3-siRNA. Die Transfektion mit SCR-siRNA resultierte in einem Anstieg der Expression in der qRT-PCR (Abb. 15(f)), brachte aber keinen Anstieg des Proteinlevels im Western Blot (Abb. 16(a)). Wohingegen eine Transfektion mit 50 nM STAT3-siRNA eine 5%ige Reduktion des Proteinlevels zum Ergebnis hatte.



**Abbildung 15: : Relative Expression von (a) SRF, (b) Survivin, (c) HIF1 $\alpha$ , (d) HIF2 $\alpha$ , (e) E2F1 und (f) STAT3 24 Stunden nach Transfektion der Zelllinie NCI-H460**

Die x-Achse beschreibt die verschiedenen siRNAs und die verwendete Konzentration, während die y-Achse die relative Expression der entsprechenden mRNA zeigt, wobei die untransfizierten Zellen (control) auf 1 gesetzt sind.

Jedes Diagramm zeigt die mittlere  $\pm$  Standardabweichung bei (a) und (f)  $n=1$ , (b)  $n=4$ , (c), (d) und (e)  $n=3$ . Bei mehr als 3 unabhängigen Versuchen wurde eine ANOVA durchgeführt. Ein P-Wert  $< 0,05$  wurde als statistisch signifikant bewertet. \*= $p<0,05$ ; \*\*= $p<0,01$



**Abbildung 16: Relatives Proteinlevel und Western Blot der Zelllinie NCI-H460**

(a) Zeigt das relative Proteinlevel von STAT3 $\alpha$  und STAT3 $\beta$  24h nach Transfektion mit 50 nM STAT3-siRNA verglichen mit untransfizierten Zellen (control). Zur Berechnung der relativen Expression wurde die Expression von Actin gemessen.

Die x-Achse zeigt das Transfektionsmittel, während die y-Achse das relative Proteinlevel darstellt. Untransfizierte Zellen sind dabei auf 1 gesetzt.

(b) Western Blot der STAT3 Expression nach Transfektion mit 50 nM STAT3-siRNA mit  $n=2$ .

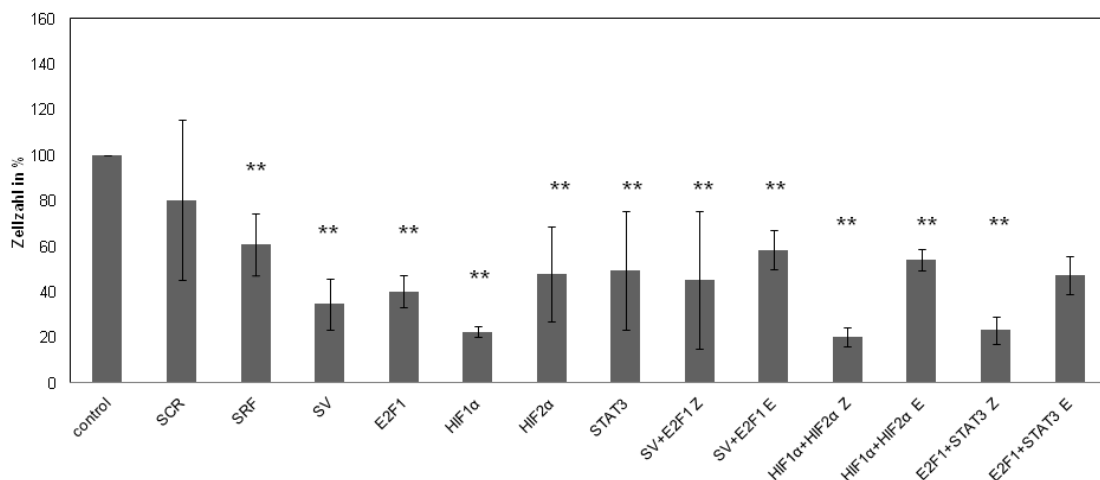


### 3.5.2 Zellzahl nach Transfektion von NCI-H460

Die Transfektion von jeweils 50 nM der verwendeten siRNAs resultierte bei der NCI-H460 Zelllinie im folgenden Ergebnis:

Bis auf die Transfektion mit SCR-siRNA zeigten alle Werte eine statistisch signifikante Reduktion der Zellzahl. Die Prozente beziehen sich auf untransfizierte Zellen als Kontrolle, die auf 100% gesetzt wurde.

So brachte die Transfektion von SRF-, Survivin- und E2F1-siRNA eine Verminderung der Zellzahl von 39%, 65% und 60%. HIF1 $\alpha$ -siRNA zeigte eine Reduktion von 80%, HIF2 $\alpha$ - und STAT3-siRNA hatte eine Verkleinerung der Zellzahl von 52% und 50% zur Folge (Abb. 17).



**Abbildung 17: Zellzahl in % drei Tage nach Transfektion der Zelllinie NCI-H460**

Die x-Achse zeigt die verwendete siRNA mit der Konzentration von 50 nM und die y-Achse die Zellzahl in Prozent. Nichttransfizierte Zellen (control) wurden dabei auf 100% gesetzt.

Das Diagramm zeigt die mittlere  $\pm$  Standardabweichung bei control und SCR n=8, SRF, HIF1 $\alpha$ +HIF2 $\alpha$  Z, HIF1 $\alpha$ +HIF2 $\alpha$  E, E2F1+STAT3 Z n=3, Survivin und Survivin+E2F1 Z n=5, E2F1, HIF1 $\alpha$ , HIF2 $\alpha$ , STAT3, Survivin+E2F1 E n=4 und E2F1+STAT3 E n=2

Bei mehr als 3 unabhängigen Versuchen wurde eine ANOVA durchgeführt. Ein P-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant bewertet. \*= $p < 0,05$ ; \*\*= $p < 0,01$

Auch die Transfektion der Zellen mit zwei verschiedenen siRNAs gleichzeitig verminderte die Zellzahl. Eine Mischung aus Survivin- und E2F1-siRNA erbrachte eine Reduktion von 55% (zusammen angesetzt) und 42% (einzeln angesetzt). HIF1 $\alpha$ -siRNA zusammen angesetzt mit HIF2 $\alpha$ -siRNA zeigte eine

Reduktion der Zellzahl von 80%. Die beiden siRNAs einzeln angesetzt brachte noch eine Verminderung von 46%. E2F1- und STAT3-siRNA hatte zusammen angesetzt 77% und einzeln 52% Reduktion zur Folge (Abb. 17).

### **3.6 Mesotheliomzelllinie JL-1**

#### **3.6.1 Knockdown in Mesotheliomzelllinie JL-1**

Die Auswirkungen der Transfektion mit den verschiedenen siRNAs sind die Folgenden:

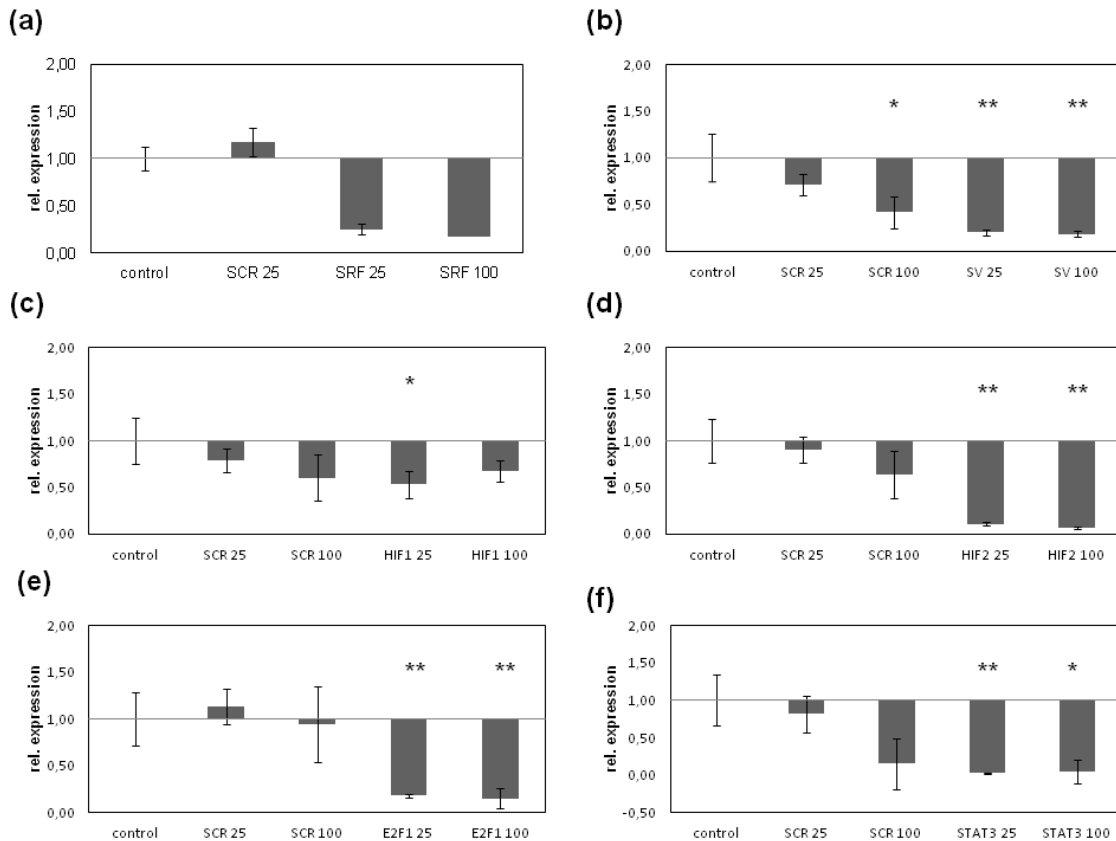
Durch die Transfektion mit SRF-siRNA wurde eine Reduktion der Genexpression von 75% bei 25 nM und von 82% bei 100 nM erreicht (Abb. 18(a)).

Die mit Survivin-siRNA transfizierten Zellen zeigten einen statistisch signifikanten Knockdown von 80% bei einer Konzentration von 25 nM und von 81% bei einer Konzentration von 100 nM. Zusätzlich wies die Transfektion mit 100 nM SCR-siRNA eine statistisch relevante Reduktion der Expression auf (Abb. 18(b)).

Das weiteren weisen nur die mit 25 nM HIF1 $\alpha$ -siRNA transfizierten Zellen eine statistisch signifikante Reduktion von 57% auf. Daneben zeigte die Transfektion mit HIF2 $\alpha$ -siRNA einen jeweils statistisch signifikanten Knockdown von 89% bei 25 nM und 94% bei 100 nM auf (Abb. 18(c-d)).

In der Abbildung 18(e) ist die Auswirkung der Transfektion mit E2F1-siRNA zu sehen. Der Knockdown ist statistisch signifikant und beträgt 82% bei 25 nM und 85% bei 100 nM.

Auch nach der Transfektion mit STAT3-siRNA zeigte sich eine statistisch signifikante Reduktion der Genexpression von 93% bei 25 nM und 95% nach der Transfektion von 100 nM siRNA (Abb. 18(f)).



**Abbildung 18: Relative Expression von (a) SRF, (b) Survivin, (c) HIF1 $\alpha$ , (d) HIF2 $\alpha$ , (e) E2F1 und (f) STAT3 24 Stunden nach Transfektion der Zelllinie JL-1**

Die x-Achse beschreibt die verschiedenen siRNAs und die verwendete Konzentration, während die y-Achse die relative Expression der entsprechenden mRNA zeigt, wobei die untransfizierten Zellen (control) auf 1 gesetzt sind.

Jedes Diagramm zeigt die mittlere  $\pm$  Standardabweichung bei (a)  $n=1$ , (b)  $n=4$ , (c), (d) (e) und (f)  $n=3$ . Bei mehr als 3 unabhängigen Versuchen wurde eine ANOVA durchgeführt. Ein P-Wert  $< 0,05$  wurde als statistisch signifikant bewertet. \*= $p<0,05$ ; \*\*= $p<0,01$

### 3.6.2 Zellzahl nach Transfektion von JL-1

Die Transfektion der JL-1 Zelllinie mit jeweils 50 nM der verwendeten siRNAs erzielte die folgenden Ergebnisse:

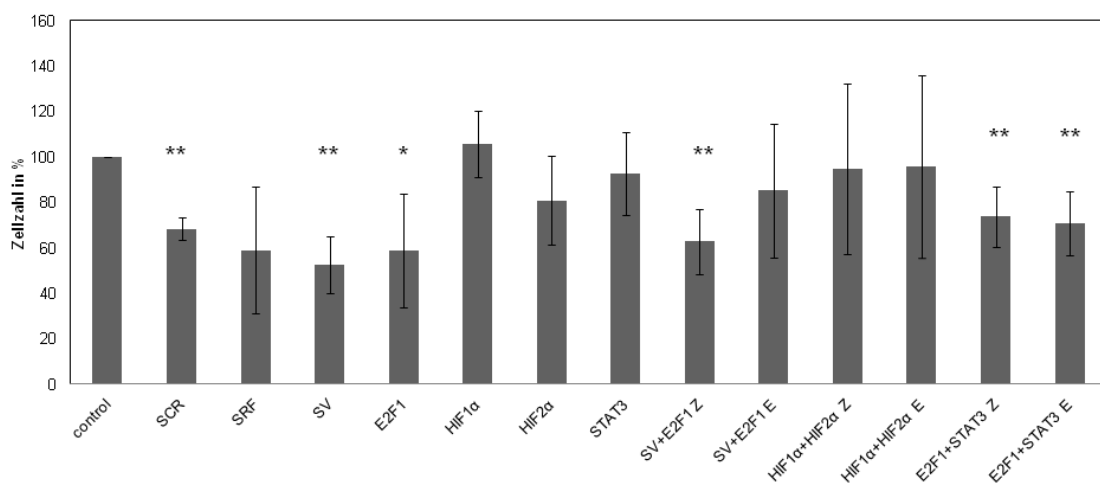
Nur nach der Transfektion mit Survivin- und E2F1-siRNA wurden mit 47% und 41% Reduktion der Zellzahl statistisch signifikante Ergebnisse gemessen.

Bei den mit einem Cocktail aus zwei verschiedenen siRNAs transfizierten Zellen zeigte die Mischung aus Survivin- und E2F1-siRNA eine 37%ige Verminderung, wenn die Transfektionskomplexe zusammen angesetzt wurden. Außerdem erwies sich die Mischung von E2F1-, und STAT3-siRNA mit einer statistisch

signifikanten Reduktion von 26% bei zusammen und 29% bei einzeln angesetzten Proben als wirksam.

Ebenfalls brachte die Transfektion mit SCR-siRNA eine statistisch signifikante Verminderung der Zellzahl um 32%.

Die Transfektion der restlichen verwendeten siRNAs und Cocktails brachten keine statistisch signifikanten Reduktionen der Zellzahl (Abb. 19).



**Abbildung 19: Zellzahl in % drei Tage nach Transfektion der Zelllinie JL-1**

Die x-Achse zeigt die verwendete siRNA mit der Konzentration von 50 nM und die y-Achse die Zellzahl in Prozent. Nichttransfizierte Zellen (control) wurden dabei auf 100% gesetzt.

Das Diagramm zeigt die mittlere  $\pm$  Standardabweichung bei control, SCR, Survivin und E2F1 n=4, SRF n=1, HIF1 $\alpha$ , HIF2 $\alpha$ , Survivin+E2F1 Z, Survivin+E2F1 E, HIF1 $\alpha$ +HIF2 $\alpha$  Z, HIF1 $\alpha$ +HIF2 $\alpha$  E, E2F1 +STAT3 Z und E2F1+STAT3 E n=3, STAT3 n=2.

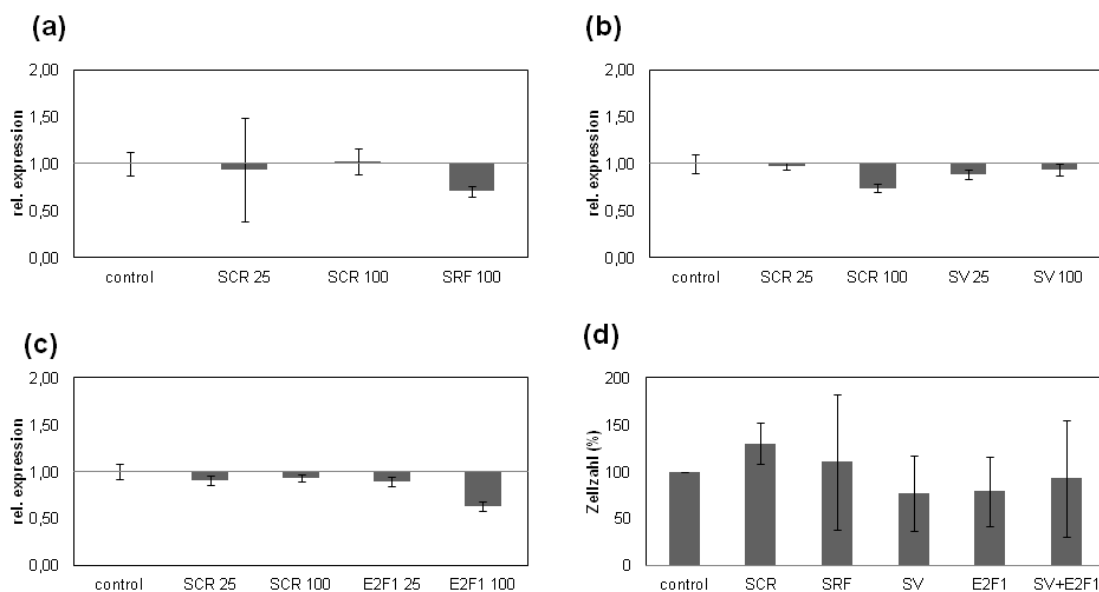
Bei mehr als 3 unabhängigen Versuchen wurde eine ANOVA durchgeführt. Ein P-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant bewertet. \*= $p < 0,05$ ; \*\*= $p < 0,01$

### **3.7 Kleinzelliges Bronchialkarzinomzelllinie CPC-N**

#### **3.7.1 Standardtransfektion CPC-N**

Bei den zuerst durchgeführten Transfektionsversuchen wurde nach der Transfektion mit SRF-siRNA nur in der Konzentration 100 nM ein Rückgang der Genexpression um 29% in der qRT-PCR festgestellt (Abb 20(a)). Daneben

erwies sich die Transfektion von Survivin-siRNA als wenig effektiv und resultierte nicht in einer Reduktion der Survivin Genexpression (Abb. 20 (b)). Bei der Ermittlung der E2F1 Genexpression nach siRNA Transfektion zeigte sich ein Rückgang der Genexpression um 37% (Abb. 20(c)). Nach Transfektion von SRF-siRNA erhöhte sich die Zellzahl um 10% (Abb. 20(d)).



**Abbildung 20: Relative Expression von (a) SRF, (b) Survivin, (c) E2F1 24 Stunden nach Transfektion sowie Zellzahl in % drei Tage nach Transfektion der CPC-N Zelllinie**

Die x-Achse beschreibt die verschiedenen siRNAs und die verwendete Konzentration, während die y-Achse die relative Expression der entsprechenden mRNA zeigt, wobei die untransfizierten Zellen (control) auf 1 gesetzt sind.

Bei (d) zeigt die x-Achse ebenfalls die Transfektionsmittel und die y-Achse die Zellzahl in Prozent. Nichttransfizierte Zellen (control) wurden dabei auf 100% gesetzt.

Jedes Diagramm zeigt die mittlere  $\pm$  Standardabweichung bei (a) , (b) ,(c) n=1, bei (d) control und SCR n=2, SRF, Survivin, E2F1 und Survivin+E2F1 n=1.

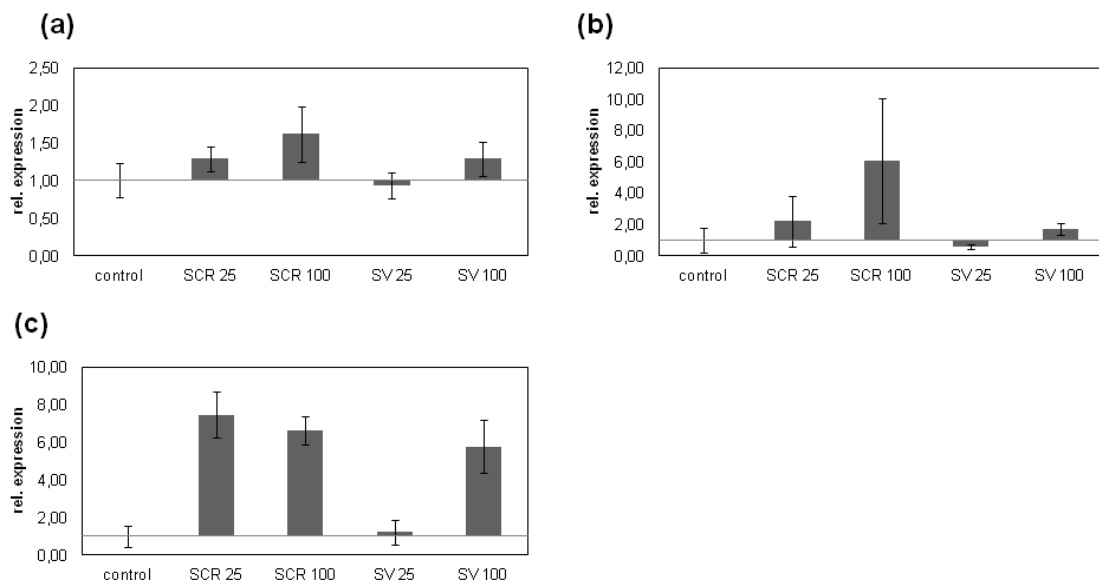
Die Transfektion von E2F1- und Survivin-siRNA resultierte in einer ca 20%igen Reduktion der Zellzahl (Abb. 20 (d)).

Die Kombination von Survivin- und E2F1-siRNA zeigte nur eine 7%ige Reduktion der Zellzahl. Außerdem resultierte die Transfektion von SCR-siRNA in einer Erhöhung der Zellzahl um 30% (Abb. 20(d)).

### 3.7.2 Optimierung der Transfektion der CPC-N Zellen

Da beim Standardversuch keine optimalen Ergebnisse im Hinblick auf den Knockdown und die Reduktion der Zellzahl erzielt wurden, wurden Optimierungen an der Transfektion durchgeführt. So wurden die Zellen vor der Transfektion mit einer Cell-Dissociation-Solution (CDS) von Sigma Aldrich vorbehandelt, um die zahlreichen Zellaggregate zu verkleinern und so die Transfektion effizienter zu machen. Abbildung 21(a) zeigt die standard transfizierten Zellen mit 25 nM und 100 nM Survivin-siRNA, wobei keine Reduktion der Genexpression erzielt wurde.

Auch nach der Vorbehandlung mit Sigma Aldrich CDS zeigte sich kein Rückgang der relativen Expression. Es wurde im Gegenteil ein deutlicher Anstieg der Expression nach SCR-siRNA-Transfektion beobachtet (Abb. 21(b)). Ebenfalls brachte ein Hinzufügen von Vollmedium nach 4h Inkubationszeit lediglich einen starken Anstieg der Genexpression nach der Transfektion sowohl von SCR-, als auch von 100 nM Survivin-siRNA (Abb. 21(c)).

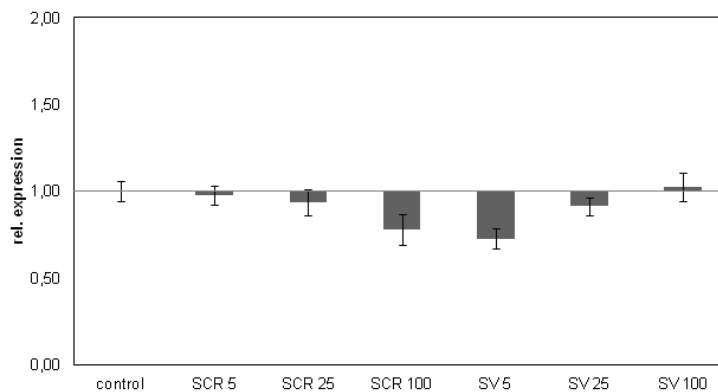


**Abbildung 21: Relative Expression von Survivin 24 Stunden nach Transfektion der CPC-N Zelllinie bei (a) normaler Transfektion, (b) Vorbehandlung mit Sigma Cell Dissociation Solution und (c) Zugabe von 700 µl Vollmedium 4h nach Transfektion**

Die x-Achse beschreibt die verschiedenen siRNAs und die verwendete Konzentration, während die y-Achse die relative Expression der entsprechenden mRNA zeigt, wobei die untransfizierten Zellen (control) auf 1 gesetzt sind.

Jedes Diagramm zeigt die mittlere  $\pm$  Standardabweichung bei (a), (b) und (c)  $n=1$ .

Beim nächsten Durchgang wurde versucht, mit einer doppelten Menge an Interferin den Transfektionserfolg zu verbessern. Dafür wurde zusätzlich noch eine neue Konzentration von 5 nM mit untersucht. Bis auf die Transfektion von 5 nM Survivin-siRNA und 100 nM SCR-siRNA, die eine Reduktion um 28% und 22% bewirkten, zeigten sich kaum Veränderungen der Genexpression (Abb. 22).



**Abbildung 22: Relative Expression von Survivin mit doppelter Menge Interferin 24 Stunden nach Transfektion der CPC-N Zelllinie**

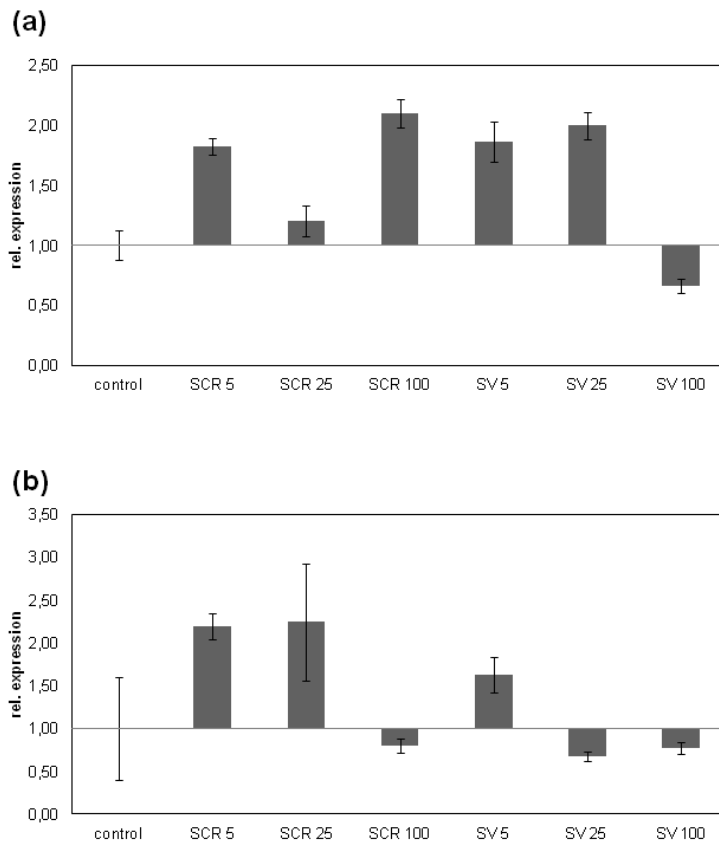
Die x-Achse beschreibt die verschiedenen siRNAs und die verwendete Konzentration, während die y-Achse die relative Expression der entsprechenden mRNA zeigt, wobei die untransfizierten Zellen (control) auf 1 gesetzt sind.

Jedes Diagramm zeigt die mittlere  $\pm$  Standardabweichung bei  $n=1$ .

Da auch diese Maßnahmen kaum Veränderungen zeigten, wurde versucht, wie auf Seite 39 beschrieben, mit Hilfe der Zentrifugalkraft die Effekte der Transfektion auf die Suspensionszellen zu verbessern. Die mit normaler Menge Interferin transfizierten und anschließend zentrifugierten Zellen zeigten nur bei 100 nM Survivin eine Reduktion der Genexpression um 34%. Die restlichen Zellen, die mit siRNA transfiziert wurden, zeigten einen leichten bis sehr starken Anstieg der Expression (Abb. 23(a)).

Auch nach der Transfektion mit doppelter Menge Interferin mit anschließender Zentrifugation wurde nur ein leichter Rückgang der Expression festgestellt. Die Transfektion von 25 nM und 100 nM Survivin-siRNA zeigte eine Reduktion von

32% und 22%. Die sonstigen Konzentrationen der verwendeten siRNAs resultierten wieder in einem teils sehr starken Anstieg der Genexpression (Abb. 23(b)).



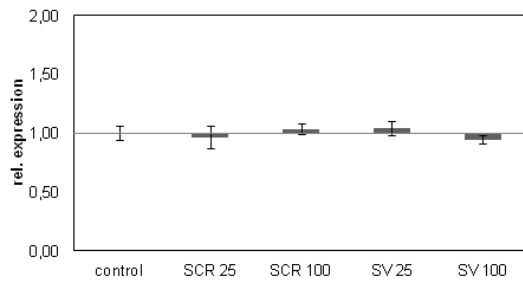
**Abbildung 23: Relative Expression von Survivin mit (a) normaler und (b) doppelter Menge Interferin 24 Stunden nach Transfektion mit Zentrifugation der CPC-N Zelllinie**

Die x-Achse beschreibt die verschiedenen siRNAs und die verwendete Konzentration, während die y-Achse die relative Expression der entsprechenden mRNA zeigt, wobei die untransfizierten Zellen (control) auf 1 gesetzt sind.

Jedes Diagramm zeigt die mittlere  $\pm$  Standardabweichung bei  $n=1$ .

Als letzter Versuch dieser Reihe wurde die Zeit der Zentrifugation erhöht und 8  $\mu$ l Interferin verwendet. Aber auch damit zeigte sich keine Reduktion der Genexpression (Abb. 24).





**Abbildung 24: Relative Expression von Survivin mit 8 µl Interferin 24 Stunden nach Transfektion der CPC-N Zelllinie**

Die x-Achse beschreibt die verschiedenen siRNAs und die verwendete Konzentration, während die y-Achse die relative Expression der entsprechenden mRNA zeigt, wobei die untransfizierten Zellen (control) auf 1 gesetzt sind.

Das Diagramm zeigt die mittlere ± Standardabweichung bei n=1.

### 3.8 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Tabellen 18 und 19 zeigen nochmal eine Übersicht der Zellzahlreduktion.

Tabelle 18: Zusammenfassung der Zellzahlreduktion

Zelllinie	Transfizierte siRNA							Summe
	SRF	Survivin	HIF1α	HIF2α	E2F1	STAT3	SCR	
A549	-27%*	-55%*	-54%*	-9%	-19%	-49%*	-10%	223
LXF-289	-43%	-72%*	-48%*	+5%	-42%*	-30%*	+7%	223
SK-MES	-67%	-50%*	-21%*	-20%*	-21%*	-27%*	-22%*	228
NCI-H	-39%*	-65%*	-80%*	-52%*	-60%*	-50%*	-20%	366
JL-1	-41%	-47%*	+5%	-19%	-41%*	-7%	-32%*	182
CPC-N	+10	-23%	/	/	-21%	/	+30%	4
Summe	207	312	198	95	204	163	47	

Angaben in % im Vergleich zu untransfizierten Zellen. P\* zeigt eine statistische Signifikanz bei P<0,05.

- signifikante Reduktion der Zellzahl
- Zelllinie die am besten anspricht
- siRNA mit dem besten Einfluss auf die Zellzahl

Tabelle 19: Zusammenfassung der Zellzahlreduktion bei Cocktails (z = zusammen angesetzt, e= einzeln angesetzt)

Zelllinie	Transfizierte siRNA						Summe
	SV+ E2/z	SV+ E2/e	HIF1 $\alpha$ + HIF2 $\alpha$ /z	HIF1 $\alpha$ + HIF2 $\alpha$ /e	E2F1+ ST3/z	E2F1+ ST3/e	
A549	-51%*	-52%*	-19%	-17%*	-16%	+23%*	132
LXF-289	-42%*	-51%*	-40%*	-54%*	-36%*	-25%*	248
SK-MES	-29%*	-39%*	-44%*	-27%*	-25%*	-4%	168
NCI-H460	-55%*	-42%*	-80%*	-46%*	-77%*	-52%	352
JL-1	-37%*	-15%	-5%	-4%	-26%*	-29%*	116
CPC-N	-7%	/	/	/	/	/	7
Summe	221	199	188	148	180	87	
Prozentangaben im Vergleich zu untransfizierten Zellen. P* zeigt eine statistische Signifikanz bei P<0,05.  <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: #ADD8E6; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></span> signifikante Reduktion der Zellzahl <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: #D2691E; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></span> Zelllinie die am besten anspricht <span style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: #9370DB; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></span> siRNAs mit dem besten Einfluss auf die Zellzahl							

Aus den beiden Tabellen lässt sich folgende Reihenfolge der Zelllinien nach Sensitivität aufstellen:

Die Zelllinie NCI-H460 lässt sich am besten beeinflussen, gefolgt von den Zelllinien LXF-289 und SK-MES, die dicht beieinander liegen. Kurz darauf folgt die Zelllinie A549. Mit Abstand folgt die Mesotheliomzelllinie JL-1 und weit abgeschlagen mit kaum einer Empfindlichkeit die Zelllinie CPC-N.

Es ergibt sich folgende Reihenfolge der Potenz der siRNA:

Den größten Einfluss, auf die Zellzahl aller Zellreihen gesehen, hatte mit Abstand die Transfektion von Survivin-siRNA. Darauf folgen SRF-, E2F1- und HIF1 $\alpha$ -siRNA. STAT3-siRNA folgt an 5. Stelle. Die HIF2 $\alpha$ -siRNA liegt mit weitaus weniger Einfluss auf dem 6. Platz. SCR-siRNA hatte wie erwartet den geringsten Einfluss auf die Zellen.

Die beiden Adenokarzinomzelllinien A549 und LXF-289 zeigten beide eine ausgeprägte Sensibilität gegenüber verschiedenen siRNAs, sowohl in der Genexpression als auch bei der Zellzahl. Vor allem die Transfektion von Survivin-, SRF-, HIF1 $\alpha$ - und STAT3-siRNA schien bei beiden Zelllinien einen großen Einfluss auf die mRNA Expression zu haben. Im Gegensatz dazu hatte HIF2 $\alpha$ -siRNA kaum einen Einfluss auf die Zellzahl (A549) oder resultierte sogar in einem Anstieg der Zellzahl (LXF-289) (Abb. 8+11). Obwohl beide Zelllinien zum gleichen Subtyp der Adenokarzinome gehören, wurden auch Unterschiede festgestellt. So war bei der Transfektion mit E2F1-siRNA nur bei der LXF-289 Zelllinie die Reduktion statistisch signifikant. Während Survivin bei LXF-289 Zellen mit 72% einen sehr großen Einfluss hatte, wurde bei A549 zwar mit 55% ein niedrigerer Wert erreicht, der aber immer noch sehr gut ist.

Bei der Zelllinie des Plattenepithelkarzinoms SK-MES zeigte sich auch eine Reaktion auf die siRNA Transfektion, vor allem nach Survivin-siRNA. Jedoch war der Einfluss auf die Zellzahl nicht so hoch, wie bei den anderen NSCLC Zelllinien und die Transfektion mit SCR-siRNA zeigte ebenfalls eine statistisch signifikante Reduktion der Zellzahl (Abb. 12+14).

Vor allem die Zelllinie des Großzelligen Bronchialkarzinoms NCI-H460 erwies sich als sehr sensibel auf die Transfektion mit siRNA. Sowohl bei der Genexpression als auch bei der Zellzahl wurden teils starke Reduktionen erreicht (Abb. 15+17).

Die Mesotheliomzelllinie JL-1 wiesen fast alle verwendeten siRNAs Reduktionen der Genexpression auf. Allerdings hatten nicht alle auch einen positiven Einfluss auf die Zellzahl. Im Gegenteil wurde bei einigen eher eine Zunahme beobachtet. Auch bei dieser Zelllinie zeigte die Transfektion von SCR-siRNA eine statistisch signifikante Reduktion der Zellzahl (Abb. 18+19).

Die SCLC Zelllinie CPC-N zeigte sich sehr resistent gegenüber der Transfektion. Keiner der Versuche zeigte eine wirkliche Verbesserung des Transfektionserfolges (Abb. 21–24).

Zusammenfassend lässt sich zum Einfluss der Cocktails auf die Zellen sagen, dass zusammen angesetzte Transfektionskomplexe insgesamt einen höheren Einfluss haben. Die Mischung aus Survivin und E2F1 war die potenteste, um die Zellzahl zu vermindern.

Interessanterweise ist hier die Verteilung der Sensitivität der einzelnen Zelllinien auf die Transfektion ein wenig anders, als bei den einzelnen siRNAs. Die Zelllinie NCI-H460 ist zwar wieder am sensibelsten und die JL-1 Zelllinie am unempfindlichsten, aber die Adenokarzinomzelllinie A549 ist bei den Cocktails unsensibler als die Plattenepithelkarzinomzelllinie SK-MES, während die andere Adenokarzinomzelllinie LXF-289 empfindlicher ist.

## **4. Diskussion**

In den letzten Jahren gab es im Bereich der Therapien des NSCLCs einige Fortschritte. So sind zur Standardtherapie, die aus einer Kombination von Chirurgie, Chemotherapie und Radiotherapie besteht, neue Medikamente und Therapieansätze hinzugekommen. Von diesen neuen Ansätzen profitieren vor allem Patienten in bereits fortgeschrittenen Stadien. So können z.B. eine neoadjuvante Chemotherapie oder Tyrosin-Kinase-Inhibitoren wie z.B. Erlotinib die Überlebenszeit verlängern [86] [87]. Auch erhält in Deutschland zurzeit die Palliativmedizin einen immer höheren Stellenwert, wovon viele Patienten weiterhin profitieren können. Trotz aller zurzeit bekannten Therapien ist das Outcome bei vielen Patienten mit einem Bronchialkarzinom unter einer Therapie weiterhin frustant. Vor allem da Frühsymptome unspezifisch ausfallen, wird die Krankheit oft erst in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert. Häufig sind dann bereits Lymphknoten- oder Fernmetastasen vorhanden. In diesem Fall ist die Prognose sehr limitiert und trotz der zurzeit zur Verfügung stehenden Therapieoptionen oft infaust. Zusätzlich variiert die Prognose stark in Abhängigkeit zum Stadium zum Zeitpunkt der Diagnosestellung, dem Grad der Differenzierung sowie dem histologischen Tumortyp. Die 5-Jahres-Überlebensrate mit der Diagnose eines Bronchialkarzinoms wird den den aktuellen Leitlinien mit etwa 16% bei Männern und 21% für Frauen angegeben. [1]

Das Pleuramesotheliom ist zwar ein deutlich selteneres, aber in seiner Prognose sehr limitierteres Malignom. Auch für diese Erkrankung gibt es nur sehr eingeschränkte Therapieoptionen.

Die drei Hauptsubtypen des NSCLC sind das Adeno-, das Plattenepithel- und das großzellige Karzinom. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen auffallend, dass jeder histologische Subtyp teilweise komplett unterschiedlich auf die Transfektion reagiert hat, mit unterschiedlichen Ergebnissen bei Knockdown und Zellzahl. Außerdem konnte in dieser Arbeit zum ersten Mal ermittelt

werden, dass selbst die beiden Adenokarzinom-Zelllinien Unterschiede bei Genexpression und Zellzahl zeigen [88].

Im Folgenden wird auf die einzelnen in dieser Studie applizierten siRNAs eingegangen.

Die Transfektion von siRNA gegen das Protein Survivin hat die größte Reduktion der Zellzahl zur Folge gehabt (siehe Tab. 18). Es erhielt seinen Namen unter anderem wegen seiner Verbindung zum Mechanismus des Zellüberlebens. Auch bei der Regulation der Mitose oder als Inhibitor der Caspase Aktivität und damit der Apoptose ist Survivin beteiligt [89-92]. Eine Besonderheit stellt die Tatsache dar, dass die Expression von Survivin in Krebszellen und embryonalen Zellen außergewöhnlich hoch ist. In sich normal teilenden adulten Zellen ist die Expression von Survivin sehr gering [93-95]. Bei Gewebeproben von Patienten mit NSCLC wurde in 53% eine Expression von Survivin nachgewiesen [96;97]. Die Inhibition von Survivin hatte den größten Effekt auf die Proliferation aller getesteten Zellenlinien. Auf Grund dieser Eigenschaften stellt Survivin ein interessantes Target für einen therapeutischen Einsatz von siRNA dar. Gesunde Zellen ohne Überexpression von Survivin bleiben unbeeinträchtigt. Genau hier ist ein weiterer Vorteil gegenüber der derzeitigen Standardtherapie mit Chemotherapeutika wie z.B. Cisplatin. Denn bei einer Therapie mit Zytostatika werden sowohl gesunde als auch maligne Zellen behandelt, was zu einem erheblichen Auftreten von unerwünschten Nebenwirkungen führt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit spiegeln die Ergebnisse anderer Studien wider, welche allerdings teilweise andere Karzinomtypen verwendeten. [98-102]. Zwei dieser Forschungsgruppen verwendeten ausschließlich Zelllinien für *in vitro* Versuche (Prostatakarzinomzelllinien [103] und Magenkarzinomzelllinien [104]). Bei einer Studie wurden sowohl *in vitro* Versuche mit Blasenkarzinomzelllinien als auch *in vivo* Versuche am Mausmodell mit intravesikaler Applikation der siRNA durchgeführt [105]. Diese Studien zeigen ebenfalls einen starken Einfluss von Survivin-siRNA auf die Karzinomzellen sowie am Mausmodell einen Rückgang des Tumolvolumens.

Auf dem zweiten Platz im Vergleich der Effizienz liegt die Transfektion mit SRF-siRNA, welche zur zweitbesten Reduktion der Zellzahlen geführt hat (siehe Tab. 18). Es spielt unter anderem eine wichtige Rolle in der Zellproliferation und Differenzierung [106-108]. Der Knockdown von SRF hatte bei der A459- und NCI-H-Zelllinie eine signifikante Erniedrigung der Zellzahl zur Folge. Auch bei der Plattenepithelkarzinomzelllinie SK-MES und der Mesotheliomzelllinie LJ-1 war die Zellzahl reduziert. Bei der zweiten Adenokarzinomzelllinie LXF-289 schien die Transfektion an sich einen Einfluss auf die Expression von SRF der Zellen zu haben. Auf der molekularen Ebene wurde sowohl nach Transfektion mit SCR-siRNA als auch mit SRF-siRNA ein starker Knockdown beobachtet. Dies könnte daran liegen, dass die SCR-siRNA der SRF-siRNA womöglich ähnlich ist und es durch die Transfektion mit SCR-siRNA zu ungewünschten Off-target Effekten bei der SRF-Genexpression kommt.

In einer von dieser Arbeit unabhängigen Studie des Labors konnten ebenfalls mit der Transfektion von SRF-siRNA sogar große Reduktionen von Genexpression und Zellzahl bei chemoresistenten Bronchialkarzinomzellen ermittelt werden [109]. Eine weitere Studie des Labors verwendete Prostatakarzinomzelllinien sowie die gleiche SRF-siRNA. Hierbei zeigten sich ebenfalls signifikante Reduktionen von Genexpression und Zellzahl nach der Transfektion von SRF-siRNA bei allen verwendeten Zelllinien [110].

In dieser Studie wurde mit der Transfektion mit E2F1-siRNA im Vergleich mit den anderen applizierten siRNAs das drittbeste Ergebnis erzielt (siehe Tab. 18). E2F1 ist ein Transkriptionsfaktor, der unter anderem wichtige Funktionen im Zellzyklus und Zellreproduktion erfüllt [111;112]. Die Ergebnisse zeigen, dass der Knockdown der E2F1 Genexpression große antiproliferative Effekte aufzeigt. Bei allen, mit Ausnahme der A549-Zelllinie, zeigte sich eine signifikante Hemmung der Zellzahl. Es ist jedoch interessant, dass die antiproliferative Wirkung nicht so hoch ist, wie es durch die deutliche Reduzierung der Genexpression zu vermuten wäre. Bei einer anderen unabhängigen Studie des Labors wurden an Prostatakarzinomzellen ebenfalls hohe Reduktionen von Genexpression und Zellzahl beobachtet [110]. In einer weiteren Studie wurde das Potential von E2F1-siRNA an Magenkarzinomzellen

ermittelt. Dabei wurden Reduktionen in Gen- und Proteinexpression sowie eine geringere Zellproliferation mit erhöhter Apoptoserate festgestellt [113]. Die Bedeutung von E2F1 als Target für eine siRNA Therapie ist auf Grund der Ergebnisse als gut anzusehen. Es lässt sich jedoch feststellen, dass der Knockdown von E2F1 anscheinend keine fatalen Folgen für die Krebszellen darstellt, wie zunächst erwartet.

Die Expression von HIF1 $\alpha$  und HIF2 $\alpha$ , was auch bekannt als endothelial PAS domain-containing protein (EPAS1) ist, wird durch das Vorhandensein einer Hypoxie reguliert. In Krebszellen spielen sie eine Schlüsselrolle als Transkriptionsfaktoren unter anderem in Angiogenese und Zellproliferation [88;114]. HIFs fördern die Aktivierung von Genen, welche an der Progression und Metastasierung von Malignomen beteiligt sind. Es wurde gezeigt, dass eine Hypoxie die Invasivität und das metastatische Potential von Tumorzellen erhöht, indem es die Gene reguliert, welche einen Zusammenbruch der extrazellulären Matrix begünstigen und die Mobilität und Adhäsion von Tumorzellen kontrollieren [88;115].

Die Transfektion von HIF1 $\alpha$  führte in allen NSCLC-Zelllinien zu einem signifikanten Rückgang der Zellzahl. Im Vergleich der Effizienz aller in dieser Studie verwendeten siRNAs liegt HIF1 $\alpha$ -siRNA auf dem vierten Platz. Auf der molekularen Ebene lässt sich allerdings bei der A549- und der SK-MES-Zelllinie kein Knockdown feststellen. Bei den restlichen Zelllinien ist ein Knockdown der Genexpression nachweisbar. Dies impliziert, dass der HIF1 $\alpha$ -siRNA mediierte Knockdown einen Einfluss auf die Zellproliferation in LXF-289, NCI-H- und JL-1-Zellen hat. Bei Zellen der A549- und SK-MES-Zelllinie kann dies nicht bestätigt werden. Die Prozedur der Transfektion scheint kaum einen Einfluss auf die Expression von HIF1 $\alpha$  gehabt zu haben, da nach Transfektion von SCR-siRNA keine signifikant veränderte Genexpression aufgetreten ist [88]. Auch bei einer anderen Studie des Labors, die chemoresistente A549-Bronchialkarzinomzellen verwendet hat, wurde keine signifikante Hemmung der Genexpression bei gleichzeitiger Reduktion der Zellzahl festgestellt [116]. Einer Gruppe aus den USA ist es gelungen, den Effekt von HIF1 $\alpha$ -siRNA *in vivo* zu zeigen. Bei



Mäusen mit einem Glioblastom wurde täglich HIF1 $\alpha$ -siRNA intrakranial injiziert. Nach 50 Tagen war die Tumormasse um 79% geringer als bei den Kontrollen [117].

Die Transfektion von HIF2 $\alpha$ -siRNA führte nur bei der SK-MES und der NCI-H-Zelllinie zu einer signifikanten Reduktion der Zellzahl. Damit steht HIF2 $\alpha$ -siRNA im Vergleich zu den anderen applizierten siRNAs nur an sechster Stelle. Die Genexpression konnte allerdings bei allen Zelllinien, bis auf die LXF-289-Zelllinie, bei mindestens einer Konzentration signifikant reduziert werden. Bei anderen Studien des Labors, wobei chemoresistente A549-Zellen und Prostatakarzinomzellen transfiziert wurden, konnte ebenfalls eine Hemmung der Genexpression mit einer Reduktion der Zellzahl ermittelt werden [110;118].

STAT3 kommt im Körper in zwei Isoformen vor, die eine Größe von 93 kda ( $\alpha$ -Isoform) und von 84 kda ( $\beta$ -Isoform) haben. Es spielt unter anderem in der Zellproliferation und der Angiogenese eine Rolle, interagiert aber auch mit anderen Faktoren wie z.B. dem Interleukin-6 [88;119]. In einigen Krebsarten wurde eine Aktivierung von STAT3 beobachtet, was oft auf eine schlechte Prognose hindeutet [88;120-123].

Bei allen NSCLC-Zelllinien zeigte die Transfektion eine signifikante Reduktion der Zellzahl, die auch zu der festgestellten Hemmung der Genexpression passt. Im Vergleich zu den anderen in dieser Arbeit applizierten siRNAs liegt die Effizienz von STAT3-siRNA nur auf dem fünften Platz. Die Analyse des Proteinlevels nach Transfektion mit STAT3-siRNA zeigte einen Rückgang des Proteinlevels von STAT3 $\alpha$  und  $\beta$  mit Ausnahme von der Plattenepithelkarzinomzelllinie bei allen untersuchten Zellen. Dies impliziert, dass STAT3-siRNA einen spezifischen Knockdown zur Folge hat und dieser einen antiproliferativen oder apoptotischen Effekt auf die Zellen hat. In weiteren Studien des Labors, einmal mit chemoresistenten A549-Zellen und einmal mit Prostatakarzinomzellen, wurden ebenfalls sowohl ein Rückgang der Zellzahl als auch eine Reduktion der Genexpression ermittelt [110;124]. Auch in Zellen anderer Krebsarten z.B. eines malignen Melanoms konnten mittels RNAi die relative Genexpression von STAT3 vermindert werden [125].

Interessanterweise zeigen die Mischungen verschiedener siRNAs nur in zwei Fällen zu einer deutlich verbesserten Reduktion der Zellzahl. So stellte sich nur der Cocktail aus HIF1 $\alpha$ - und HIF2 $\alpha$ -siRNA als potenter als die einzelne Transfektion der beiden siRNAs bei der Zelllinie SK-MES heraus. Bei der sehr sensiblen Zelllinie NCI-H460 war die Mischung aus STAT3- und E2F1-siRNA etwas potenter als die Transfektion der jeweiligen einzelnen siRNAs. Durch die Ergebnisse lässt sich darauf schließen, dass sich die antiproliferativen Effekte der siRNAs zwar nicht addieren, aber zumindest verbessern können. Außerdem ist zu beachten, dass der gemeinsame Ansatz von Transfektionskomplexen bei allen Cocktails eine bessere Reduktion der Zellzahl zur Folge hatte, verglichen mit einzeln angesetzten siRNA Transfektionskomplexen. (siehe Tab. 19) Der Effekt von siRNA-Cocktails wurde bisher kaum erforscht. Bei einer anderen Studie des Labors, in der verschiedene Prostatakarzinomzelllinien mit Kombinationen verschiedener siRNAs mit den gleichen Konzentrationen wie in dieser Studie transfiziert wurden, zeigten sich ebenfalls starke Reduktionen der Zellzahl. Auch hier war die Kombination von Survivin- und E2F1-siRNA besonders erfolgreich [110]. Bei beiden Studien wurde die Konzentration der siRNA insgesamt nicht verändert, sodass bei Standardversuchen zur Ermittlung der Zellzahl 50 nM siRNA und bei Mischungen zweier siRNAs immer 25 nM je siRNA verwendet wurden.

In einer aktuellen Studie, die *in vitro* siRNA gegen Bcl-xl, Bcl-2 und Mcl-1 einzeln und als Cocktail an Zervixkarzinom- und Promyelozytenleukämiezellen verwendet hat, war die Mischung der siRNAs, im Gegensatz zu unseren Ergebnissen, effizienter als die Transfektion der einzelnen siRNAs [126]. Diese Beobachtung ähnelt der einer anderen Studie, die 20 nM siRNA gegen VEGF und KSP (Kinesin Spindle Protein) bei Zellen des hepatozellulären Karzinoms einzeln und zusammen eingesetzt hat [127].

Die Transfektion der SCR-siRNA zeigte je nach Zelllinie unterschiedliche Ergebnisse. So wurde eine signifikant verminderte Zellzahl bei zwei Zelllinien (SK-MES und JL-1) gefunden. Im Gegenteil dazu zeigte die Adenokarzinomzelllinie LXF-289 eine leichte Erhöhung der Zellzahl. Bei der anderen Adenokarzinomzelllinie A549 sowie dem Großzeller NCI-H460

verzeichnete sich allerdings ein leichter Rückgang. Bei einigen Zelllinien hatte die Transfektion von SCR-siRNA auch Auswirkungen auf die Genexpression. Bei den beiden Adenokarzinomzelllinien A549 und LXF-289 ist nach der Transfektion von 100 nM SCR-siRNA ein statistisch signifikanter Knockdown der Expression von Survivin zu sehen, was auf eine Übersättigung der siRNA hindeuten könnte. Bei A549 ist auch eine signifikante Erhöhung der Expression von E2F1 sowie eine Erhöhung der Expression von STAT3 nach der Transfektion von 25 nM und 100 nM SCR-siRNA zu verzeichnen. Bei der LXF-289 Zelllinie zeigte sich außerdem eine Reduzierung der Expression von SRF nach der Transfektion sowohl von 25 nM als auch von 100 nM SCR-siRNA. Zusätzlich sind bei dieser Zelllinie noch weitere nicht signifikante Veränderungen der Genexpression zu erkennen. Auch bei der Zelllinie NCI-H460 sind Reduktionen oder Erhöhungen der Genexpression nach SCR-siRNA zu sehen, welche aber nicht signifikant sind. Bei der Mesotheliomzelllinie JL-1 zeigten sich ebenfalls, neben einer signifikanten Erhöhung der Genexpression von E2F1 nach der Transfektion von 100 nM SCR-siRNA, weitere nicht signifikante Reduktionen oder Erhöhungen von Genexpressionen sowohl nach der Transfektion von 25 nM als auch von 100 nM SCR-siRNA.

Im Vergleich zu den untransfizierten Zellen hatte die Transfektion von SCR-siRNA das Proteinlevel von STAT3 $\alpha$  und STAT3 $\beta$  bei den Zelllinien A549, LXF-289 und SK-MES nicht verändert. Wenn man die Expression der mRNA mit der Proteinexpression von STAT3 vergleicht, zeigen die NSCLC-Zelllinien eine Zunahme der mRNA-Expression. Jedoch gab es nur bei der LXF-289-Zelllinie eine Zunahme der Proteinexpression [88]. Die verwendete SCR-siRNA oder die Transfektion scheint Stress zu verursachen, welche proliferative oder antiproliferative Effekte zur Folge hat. In vorangegangenen Studien des Labors wurden erhöhte oder erniedrigte Expressionen der analysierten Gene nach der Transfektion mit SCR-siRNA gefunden [128;129]. In den meisten Fällen waren diese Veränderungen nicht signifikant. Es wird angenommen, dass diese Expressionsveränderungen von der Transfektion selber stammen und zu einem Teil von der Interaktion von SCR-siRNA. In einer der Studien des Labors wurden verschiedene Transfektionsmittel verglichen. Die Ergebnisse zeigten

weniger und kleinere toxische Effekte mit Interferin im Vergleich zu Lipofectamine<sup>2000</sup>® (Invitrogen) [88;130]. Da jedoch die kationische liposomale Transfektion auf Endocytose basiert, ist jede effiziente Transfektion von Zellstress begleitet. Dieser Zellstress kann zu einer höheren Expression von Faktoren wie z.B. STAT3 führen, was eine erhöhte Zellzahl zur Folge hat [88].

Auch wenn die SCR-siRNA vom Hersteller auf Off-Target Effekte untersucht wurde, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, dass die Sequenz der SCR-siRNA eine ähnliche Komplementarität zu den hier gewählten mRNA Targets aufweist und es damit zu Reduktionen in der Genexpression führt. Die Firma Qiagen veröffentlicht die Sequenz der siRNA nicht, so dass ein Vergleich der Sequenzen nicht möglich ist.

Die Zellen der SCLC-Zelllinie CPC-N wachsen als Suspensionszellkultur in großen Zellaggregaten. In den ersten Versuchen zeigte sich, dass die Transfektion dieser Aggregate fast keinen Effekt auf die Genexpression oder Zellzahl hatte. Es konnte kaum ein Knockdown auf molekularer Ebene detektiert werden und auch bei der Zellzahl gab es keine Verminderung.

Mit verschiedenen Mitteln wurde versucht, die Zellen erfolgreicher zu transfizieren. Weder die chemische noch die mechanische Trennung der Aggregate resultierten in einem Knockdown der Genexpression. Im Gegenteil wurde eher eine Erhöhung sowohl nach Transfektion von SV-siRNA als auch von SCR-siRNA beobachtet. Auch die Versuche durch Zentrifugation, Variation der Inkubationszeit oder die Verwendung einer größeren Menge Transfektionsmittels zeigte kaum eine Verbesserung.

Womöglich wäre die Anwendung mit fluoreszenter siRNA von Vorteil gewesen. Damit hätte man zunächst die Aufnahme der siRNAs in die Zelle verfolgen können. Wenn diese optimiert würde, wäre ein Knockdown und eine Reduktion der Zellzahl zu erwarten.

#### 4.1. Ausblick

Die Transfektion mit siRNA hatte in dieser Studie unterschiedlich ausgeprägte Reduktionen von Genexpression und Zellzahl zur Folge. Besonders ausgeprägt war die Zellzahlreduktion bei der Zelllinie NCI-H460. Hier gibt es ein hervorragendes Potential mit der RNA Interferenz große Effekte zu erzielen. Auch bei den übrigen Zelllinien ließ sich die Zellzahl stark reduzieren.

Bei den applizierten siRNAs hatte Survivin-siRNA den größten Effekt auf die Zellzahl, die anderen siRNAs hatten ebenfalls gute Effekte zur Folge.

Es wurde außerdem gezeigt, dass die Subtypen untereinander, aber auch innerhalb eines Subtyps Unterschiede auf das siRNA Ansprechen zeigten. Damit ist ein erster Schritt in Richtung personalisierter Medizin gelungen

Als langfristiges Ziel in der Zukunft soll es möglich werden, den Patienten Biopsien der Tumore zu entnehmen, diese in Hinblick auf die Subtypen zu klassifizieren und dazu die potentesten siRNAs zu verabreichen.

Dies erfordert jedoch sehr viel Arbeit, Gewebebanken, siRNA-Bibliotheken, Verbesserung der Effizienz der *in vivo* Applikation usw.

Zurzeit ist der Stand, dass *in vitro* die siRNA mit kationischen Lipiden direkt appliziert werden kann. Eine *in vivo* Anwendung mit diesen Transfektionskomplexen ist jedoch nicht effizient und führt zu einer Akkumulation der siRNAs in Leber, Milz und Niere. Die Transfektion muss daher entweder lokal am Tumor erfolgen, oder die Transfektionskomplexe besitzen ein zielgerichtetes Targeting mit Hilfe von Antikörpern, Peptiden oder Aptameren, die spezifisch an Tumorzellen binden. Ein weiterer Nachteil der siRNA-Therapie ist der zeitlich begrenzte Effekt.

Das bedeutet, dass in einem therapeutischen Ansatz zunächst wegen der Halbwertszeit der siRNAs die Applikation wiederholt werden müsste. Dann gibt es Transkriptionsfaktoren wie STAT3, die ständig produziert werden. Dabei ist der siRNA-Effekt in sich schnell teilenden Krebszellen auf Grund der dabei entstehenden Verdünnung der siRNA, limitiert.

In einem therapeutischen Ansatz müsste man also die siRNA regelmäßig applizieren, um das Proteinlevel von STAT3 signifikant zu reduzieren [88].

Eine mögliche Form der *in vivo* Applikation stellt eine isolierte Perfusion der Lunge unter Einsatz einer Herz-Lungen-Maschine, z.B. im Rahmen von thoraxchirurgischen Operationen, dar. Mit dieser wäre es auch möglich, die Akkumulation der siRNA in anderen Organen zu vermeiden.

Aber auch in Zukunft sollte weiterhin ein multimodales Therapiekonzept verfolgt werden. Die Anwendung der siRNA stellt unter anderem auf Grund der oben genannten Faktoren eine adjuvante Alternative dar und ist daher nicht als Monotherapie geeignet.

Die aktuellen Daten suggerieren, dass die personalisierte Therapie eine Voraussetzung für einen effektiven Kampf gegen Bronchialkarzinom und Pleuramesotheliom ist. Individuelles Gensilencing spezieller krebisrelevanter Zielgene könnte eine vielversprechende neue Strategie, vor allem von Chemotherapie resistenten Tumoren werden [131;132]. Außerdem legen die Ergebnisse der Arbeit nah, dass wenn der richtige Faktor in der korrekten Konzentration ausgewählt und ein sicherer Weg der klinischen Applikation gefunden wird, die RNAi eine mögliche neue adjuvante Methode einer multimodalen Krebstherapie sein könnte.

## **5. Zusammenfassung**

Mit weltweit über 1,5 Millionen Todesfällen pro Jahr ist das Bronchialkarzinom ein häufig auftretendes und gleichzeitig aggressives Malignom. Eine späte Diagnose und limitierte Therapiemöglichkeiten sind die Hauptursachen dafür, dass die Prognose, trotz neuer Therapieansätze, oft immer noch schlecht ist. Auch beim seltener auftretenden Pleuramesotheliom ist die Prognose schlecht mit limitierten Therapiemöglichkeiten. Dies sind wichtige Gründe, warum bei beiden Krankheitsbildern dringend neue Therapien benötigt werden.

Ein Ansatz könnte eine RNA-Interferenz vermittelte Hemmung bestimmter, für die Tumorzelle wichtiger Proteine darstellen. So gibt es bereits Studien, die siRNA als Therapie gegen verschiedene Krankheitsbilder aus diversen medizinischen Fachbereichen testen. In dieser Arbeit wurden mit SRF-siRNA, Survivin-siRNA, HIF1 $\alpha$ -siRNA, HIF2 $\alpha$ -siRNA, E2F1-siRNA und STAT3-siRNA siRNAs appliziert, die die Bildung von Proteinen inhibieren, welche an der Zellproliferation und Wachstum beteiligt sind.

Insgesamt zeigten die Untersuchungen der Genexpression und der Zellzahl ein unterschiedliches Verhalten der verschiedenen Zelllinien auf die Transfektion mit den siRNAs, selbst wenn der gleiche histologische Subtyp vorlag. Die Großzellige Bronchialkarzinomzelllinie NCI-H640 reagierte auf den siRNA vermittelten Knockdown mit der größten Reduktion der Zellzahl. Der Knockdown von Survivin reduzierte die Zellzahl bei allen Zelllinien am wirksamsten.

Als langfristiges Ziel steht die Behandlung von Patienten mit siRNA, die an einem Bronchialkarzinom oder einem MPM leiden. Dafür müssen die Effekte einer Therapie mittels RNAi *in vivo* geprüft werden. Unsere *in vitro* Ergebnisse legen allerdings nahe, dass mit der richtigen siRNA in der idealen Konzentration, große Effekte erzielt werden könnten.

In allem suggeriert diese Arbeit, dass eine personalisierte, multimodale Therapie zur Verbesserung des Überlebens unerlässlich ist. So könnte der

Einsatz von siRNA vor allem Patienten in fortgeschrittenen Stadien oder mit chemoresistenten Tumoren als alternative adjuvante oder neoadjuvante Therapie, z.B. in Form einer isolierten Lungenperfusion, von großem Nutzen sein.



## Literaturverzeichnis

- [1] S3-Leitlinie Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms  
Langversion 1.0-Februar 2018 AWMF-Registernummer: 020/007OL.  
Deutsche Krebsgesellschaft -  
[https://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/020-007OL\\_I\\_S3\\_Lungenkarzinom\\_2018-03.pdf](https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/020-007OL_I_S3_Lungenkarzinom_2018-03.pdf) . 1-2-2018.  
Ref Type: Electronic Citation
- [2] Robert Koch Institut - Zentrum für Krebsregisterdaten - Krebs in Deutschland 2013/2014.  
[https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs\\_in\\_Deutschland/kid\\_2017/kid\\_2017\\_c00\\_97\\_krebs\\_gesamt.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2017/kid_2017_c00_97_krebs_gesamt.pdf?__blob=publicationFile) . 6-12-2017.  
Ref Type: Electronic Citation
- [3] Robert Koch Institut. Zentrum für Krebsregisterdaten - Krebs in Deutschland 2013/2014.  
[https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs\\_in\\_Deutschland/kid\\_2017/kid\\_2017\\_c33\\_c34\\_lunge.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2017/kid_2017_c33_c34_lunge.pdf?__blob=publicationFile) . 6-12-2017.  
Ref Type: Electronic Citation
- [4] Bernard W. Stewart and Christopher P. Wild, (2014) World Cancer Report 2014.
- [5] R. Luengo-Fernandez, J. Leal, A. Gray, and R. Sullivan, Economic burden of cancer across the European Union: a population-based cost analysis. *Lancet Oncol.* 14 (2013) 1165-1174.
- [6] Herold und Mitarbeiter, (2011) Lungenkarzinom, in: *Innere Medizin*, 2011 pp. 386-391
- [7] S.G. Spiro, M.K. Gould, and G.L. Colice, Initial evaluation of the patient with lung cancer: symptoms, signs, laboratory tests, and paraneoplastic syndromes: ACCP evidenced-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest* 132 (2007) 149S-160S.
- [8] F.C. Detterbeck, D.J. Boffa, and L.T. Tanoue, The new lung cancer staging system. *Chest* 136 (2009) 260-271.
- [9] Markus Müller und Mitarbeiter, (2010) Bronchialkarzinom, in: *Chirurgie*, 2010 pp. 107-112
- [10] G. Goeckenjan et al., Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms; Interdisziplinäre S3-Leitlinie der Deutschen

Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin und der Deutschen Krebsgesellschaft. *Pneumologie* 64 (2010).

- [11] H.Bozcuk, H.Abali, and S.Coskun, The correlates of benefit from neoadjuvant chemotherapy before surgery in non-small-cell lung cancer: a metaregression analysis. *World J.Surg.Oncol.* 10 (2012) 161.
- [12] W.Y.Liao, J.H.Chen, M.Wu, J.Y.Shih, K.Y.Chen, C.C.Ho, J.C.Yang, and C.J.Yu, Neoadjuvant chemotherapy with docetaxel-cisplatin in patients with stage III N2 non-small-cell lung cancer. *Clin.Lung Cancer* 14 (2013) 418-424.
- [13] M.Sassier, A.E.Dugue, B.Clarisse, P.Lesueur, V.Avrillon, A.Bizieux-Thaminy, J.B.Auliac, L.Kaluzinski, J.Tillon, G.Robinet, C.H.Le, I.Monnet, A.Madroszyk, G.Boza, L.Falchero, P.Fournel, T.Egenod, A.C.Toffart, N.Leiber, P.Do, and R.Gervais, Renal insufficiency is the leading cause of double maintenance (bevacizumab and pemetrexed) discontinuation for toxicity to advanced non-small cell lung cancer in real world setting. *Lung Cancer*2015).
- [14] E.Cabebe and H.Wakelee, Role of anti-angiogenesis agents in treating NSCLC: focus on bevacizumab and VEGFR tyrosine kinase inhibitors. *Curr.Treat.Options.Oncol.* 8 (2007) 15-27.
- [15] L.C.Villaruz and M.A.Socinski, The Role of Anti-angiogenesis in Non-small-cell Lung Cancer: an Update. *Curr.Oncol.Rep.* 17 (2015) 448.
- [16] F.A.Shepherd, P.J.Rodrigues, T.Ciuleanu, E.H.Tan, V.Hirsh, S.Thongprasert, D.Campos, S.Maoleekoonpiroj, M.Smylie, R.Martins, K.M.van, M.Dediu, B.Findlay, D.Tu, D.Johnston, A.Bezjak, G.Clark, P.Santabarbara, and L.Seymour, Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N.Engl.J.Med.* 353 (2005) 123-132.
- [17] Frank Griesinger, Wilfried Eberhardt, Martin Früh, Oliver Gautschi, Wolfgang Hilbe, Hans Hoffmann, Robert Pirker, Christoph Pöttgen, Ron Pritzkeleit, Jan Stöhlmacher-Williams, Michael Thomas, Dieter Ukena, Bernhard Josef Wörmann, and Martin Wolf. Lungenkarzinom, nicht-kleinzellig (NSCLC). [https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/lungenkarzinom-nicht-kleinzellig-nsclc/@\\_@view/html/index.html](https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/lungenkarzinom-nicht-kleinzellig-nsclc/@_@view/html/index.html) . 2014. Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V.  
Ref Type: Electronic Citation
- [18] C.G.Azzoli, Baker S Jr, S.Temin, W.Pao, T.Aliff, J.Brahmer, D.H.Johnson, J.L.Laskin, G.Masters, D.Milton, L.Nordquist, D.G.Pfister, S.Piantadosi, J.H.Schiller, R.Smith, T.J.Smith, J.R.Strawn, D.Trent, and G.Giaccone, American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline update on chemotherapy for stage IV non-small-cell lung cancer. *J.Clin.Oncol.* 27 (2009) 6251-6266.

- [19] K.A.Lyseng-Williamson, Erlotinib : a guide to its use in first-line treatment of non-small-cell lung cancer with epidermal growth factor-activating mutations. *Mol.Diagn.Ther.* 17 (2013) 57-62.
- [20] M.Juchum, M.Gunther, and S.A.Laufer, Fighting cancer drug resistance: Opportunities and challenges for mutation-specific EGFR inhibitors. *Drug Resist.Updat.* 20 (2015) 12-28.
- [21] S.Ramalingam, G.Goss, R.Rosell, G.Schmid-Bindert, B.Zaric, Z.Andric, I.Bondarenko, D.Komov, T.Ceric, F.Khuri, M.Samarzija, E.Felip, T.Ciuleanu, V.Hirsh, T.Weehler, J.Spicer, R.Salgia, G.Shapiro, E.Sheldon, F.Teofilovici, V.Vukovic, and D.Fennell, A Randomized Phase 2 Study Of Ganetespib, A Heat Shock Protein 90 Inhibitor, In Combination With Docetaxel in Second-Line Therapy Of Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer (GALAXY-1). *Ann.Oncol.*2015).
- [22] J.Brahmer, K.L.Reckamp, P.Baas, L.Crino, W.E.Eberhardt, E.Poddubskaya, S.Antonia, A.Pluzanski, E.E.Vokes, E.Holgado, D.Waterhouse, N.Ready, J.Gainor, F.O.Aren, L.Havel, M.Steins, M.C.Garassino, J.G.Aerts, M.Domine, L.Paz-Ares, M.Reck, C.Baudelet, C.T.Harbison, B.Lestini, and D.R.Spigel, Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. *N.Engl.J.Med.*2015).
- [23] Herold und Mitarbeiter, (2011) Pleurale Erkrankungen, in: *Innere Medizin*, 2011 pp. 413-416
- [24] Robert Koch Institut. Zentrum für Krebsregisterdaten - Krebs in Deutschland 2009/2010 . 2013.  
Ref Type: Electronic Citation
- [25] J.C.WAGNER, C.A.SLEGGES, and P.MARCHAND, Diffuse pleural mesothelioma and asbestos exposure in the North Western Cape Province. *Br.J.Ind.Med.* 17 (1960) 260-271.
- [26] Markus Müller und Mitarbeiter, (2010) Pleuratumoren, in: *Chirurgie*, 2010 pp. 103-104
- [27] Robert Koch Institut. Zentrum für Krebsregisterdaten - Krebs in Deutschland 2009/2010 . 2013.  
Ref Type: Electronic Citation
- [28] Herold und Mitarbeiter, (2011) Durch Asbest verursachte pleuropulmonale Erkrankungen, in: *Innere Medizin*, 2011 pp. 381-383
- [29] B.Jasani and A.Gibbs, Mesothelioma not associated with asbestos exposure. *Arch.Pathol.Lab Med.* 136 (2012) 262-267.
- [30] A.Scherpereel, P.Astoul, P.Baas, T.Berghmans, H.Clayson, V.P.de, H.Dienemann, F.Galateau-Salle, C.Hennequin, G.Hillerdal, P.C.Le,

- L.Mutti, J.C.Pairon, R.Stahel, H.P.van, M.J.van, D.Waller, and W.Weder, Guidelines of the European Respiratory Society and the European Society of Thoracic Surgeons for the management of malignant pleural mesothelioma. *Eur.Respir.J.* 35 (2010) 479-495.
- [31] A.Scherpereel, P.Astoul, P.Baas, T.Berghmans, H.Clayson, V.P.de, H.Dienemann, F.Galateau-Salle, C.Hennequin, G.Hillerdal, P.C.Le, L.Mutti, J.C.Pairon, R.Stahel, H.P.van, M.J.van, D.Waller, and W.Weder, Guidelines of the European Respiratory Society and the European Society of Thoracic Surgeons for the management of malignant pleural mesothelioma. *Eur.Respir.J.* 35 (2010) 479-495.
- [32] M.F.Muers, R.J.Stephens, P.Fisher, L.Darlison, C.M.Higgs, E.Lowry, A.G.Nicholson, M.O'Brien, M.Peake, R.Rudd, M.Snee, J.Steele, D.J.Girling, M.Nankivell, C.Pugh, and M.K.Parmar, Active symptom control with or without chemotherapy in the treatment of patients with malignant pleural mesothelioma (MS01): a multicentre randomised trial. *Lancet* 371 (2008) 1685-1694.
- [33] A.Scherpereel, P.Astoul, P.Baas, T.Berghmans, H.Clayson, V.P.de, H.Dienemann, F.Galateau-Salle, C.Hennequin, G.Hillerdal, P.C.Le, L.Mutti, J.C.Pairon, R.Stahel, H.P.van, M.J.van, D.Waller, and W.Weder, Guidelines of the European Respiratory Society and the European Society of Thoracic Surgeons for the management of malignant pleural mesothelioma. *Eur.Respir.J.* 35 (2010) 479-495.
- [34] C.Manegold, J.Symanowski, U.Gatzemeier, M.Reck, P.J.von, C.Kortsik, K.Nackaerts, P.Lianes, and N.J.Vogelzang, Second-line (post-study) chemotherapy received by patients treated in the phase III trial of pemetrexed plus cisplatin versus cisplatin alone in malignant pleural mesothelioma. *Ann.Oncol.* 16 (2005) 923-927.
- [35] N.J.Vogelzang, J.J.Rusthoven, J.Symanowski, C.Denham, E.Kaukel, P.Ruffie, U.Gatzemeier, M.Boyer, S.Emri, C.Manegold, C.Niyikiza, and P.Paoletti, Phase III study of pemetrexed in combination with cisplatin versus cisplatin alone in patients with malignant pleural mesothelioma. *J.Clin.Oncol.* 21 (2003) 2636-2644.
- [36] A.Scherpereel, P.Astoul, P.Baas, T.Berghmans, H.Clayson, V.P.de, H.Dienemann, F.Galateau-Salle, C.Hennequin, G.Hillerdal, P.C.Le, L.Mutti, J.C.Pairon, R.Stahel, H.P.van, M.J.van, D.Waller, and W.Weder, Guidelines of the European Respiratory Society and the European Society of Thoracic Surgeons for the management of malignant pleural mesothelioma. *Eur.Respir.J.* 35 (2010) 479-495.
- [37] A.Scherpereel, P.Astoul, P.Baas, T.Berghmans, H.Clayson, V.P.de, H.Dienemann, F.Galateau-Salle, C.Hennequin, G.Hillerdal, P.C.Le, L.Mutti, J.C.Pairon, R.Stahel, H.P.van, M.J.van, D.Waller, and W.Weder, Guidelines of the European Respiratory Society and the European

Society of Thoracic Surgeons for the management of malignant pleural mesothelioma. *Eur.Respir.J.* 35 (2010) 479-495.

- [38] R.A.Stahel, W.Weder, E.Felley-Bosco, U.Petrausch, A.Curioni-Fontecedro, I.Schmitt-Opitz, and S.Peters, Searching for targets for the systemic therapy of mesothelioma. *Ann.Oncol.*2015).
- [39] A.Fire, S.Xu, M.K.Montgomery, S.A.Kostas, S.E.Driver, and C.C.Mello, Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391 (1998) 806-811.
- [40] J.Haasnoot, E.M.Westerhout, and B.Berkhout, RNA interference against viruses: strike and counterstrike. *Nat.Biotechnol.* 25 (2007) 1435-1443.
- [41] Y.Fujita, F.Takeshita, K.Kuwano, and T.Ochiya, RNAi Therapeutic Platforms for Lung Diseases. *Pharmaceuticals.(Basel)* 6 (2013) 223-250.
- [42] M.C.Garnett, Gene-delivery systems using cationic polymers. *Crit Rev.Ther Drug Carrier Syst.* 16 (1999) 147-207.
- [43] Y.Kodama, S.Harauchi, S.Kawanabe, N.Ichikawa, H.Nakagawa, T.Muro, N.Higuchi, T.Nakamura, T.Kitahara, and H.Sasaki, Safe and effective delivery of small interfering RNA with polymer- and liposomes-based complexes. *Biol.Pharm.Bull.* 36 (2013) 995-1001.
- [44] K.Tiemann and J.J.Rossi, RNAi-based therapeutics-current status, challenges and prospects. *EMBO Mol.Med.* 1 (2009) 142-151.
- [45] J.J.Rossi, Mammalian Dicer finds a partner. *EMBO Rep.* 6 (2005) 927-929.
- [46] G.Hutvagner and M.J.Simard, Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 9 (2008) 22-32.
- [47] Nationales Genomforschungsnetz. Regulation: Wie die Aktivität der Gene gesteuert wird. <http://www.ngfn.de/upload/mediapool/RNAinterferenze6.jpg> abgerufen am 11.07.2015. 2014.  
Ref Type: Electronic Citation
- [48] X.Wang, Y.Chen, J.Ren, and X.Qu, Small interfering RNA for effective cancer therapies. *Mini.Rev.Med.Chem.* 11 (2011) 114-124.
- [49] S.A.Mousa and S.S.Mousa, Current status of vascular endothelial growth factor inhibition in age-related macular degeneration. *BioDrugs.* 24 (2010) 183-194.
- [50] A.O.Garba and S.A.Mousa, Bevasiranib for the treatment of wet, age-related macular degeneration. *Ophthalmol.Eye Dis.* 2 (2010) 75-83.

- [51] D.Haussecker, The Business of RNAi Therapeutics in 2012. *Mol.Ther.Nucleic Acids* 1 (2012) e8.
- [52] E.Herrera-Carrillo and B.Berkhout, Gene therapy strategies to block HIV-1 replication by RNA interference. *Adv.Exp.Med.Biol.* 848 (2015) 71-95.
- [53] C.S.Kraft, A.L.Hewlett, S.Koepsell, A.M.Winkler, C.J.Kratochvil, L.Larson, J.B.Varkey, A.K.Mehta, G.M.Lyon, III, R.J.Friedman-Moraco, V.C.Marconi, C.E.Hill, J.N.Sullivan, D.W.Johnson, S.J.Lisco, M.J.Mulligan, T.M.Uyeki, A.K.McElroy, T.Sealy, S.Campbell, C.Spiropoulou, U.Stroher, I.Crozier, R.Sacra, M.J.Connor, Jr., V.Sueblinvong, H.A.Franch, P.W.Smith, and B.S.Ribner, The Use of TKM-100802 and Convalescent Plasma in 2 Patients With Ebola Virus Disease in the United States. *Clin.Infect.Dis.*2015).
- [54] E.P.Thi, C.E.Mire, R.Ursic-Bedoya, J.B.Geisbert, A.C.Lee, K.N.Agans, M.Robbins, D.J.Deer, K.A.Fenton, I.MacLachlan, and T.W.Geisbert, Marburg virus infection in nonhuman primates: Therapeutic treatment by lipid-encapsulated siRNA. *Sci.Transl.Med.* 6 (2014) 250ra116.
- [55] K.Fitzgerald, M.Frank-Kamenetsky, S.Shulga-Morskaya, A.Liebow, B.R.Bettencourt, J.E.Sutherland, R.M.Hutabarat, V.A.Clausen, V.Karsten, J.Cehelsky, S.V.Nochar, V.Kotelianski, J.Horton, T.Mant, J.Chiesa, J.Ritter, M.Munisamy, A.K.Vaishnav, J.A.Gollob, and A.Simon, Effect of an RNA interference drug on the synthesis of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) and the concentration of serum LDL cholesterol in healthy volunteers: a randomised, single-blind, placebo-controlled, phase 1 trial. *Lancet* 383 (2014) 60-68.
- [56] M.E.Davis, J.E.Zuckerman, C.H.Choi, D.Seligson, A.Tolcher, C.A.Alabi, Y.Yen, J.D.Heidel, and A.Ribas, Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles. *Nature* 464 (2010) 1067-1070.
- [57] K.Tiemann and J.J.Rossi, RNAi-based therapeutics-current status, challenges and prospects. *EMBO Mol.Med.* 1 (2009) 142-151.
- [58] A.C.Brett, T.R.Rosenstock, and A.C.Rego, Current therapeutic advances in patients and experimental models of Huntington's disease. *Curr.Drug Targets.* 15 (2014) 313-334.
- [59] D.Peer, Harnessing RNAi nanomedicine for precision therapy. *Mol.Cell Ther.* 2 (2014) 5.
- [60] D.Werth, G.Grassi, N.Konjer, B.Dapas, R.Farra, C.Giansante, R.Kandolf, G.Guarnieri, A.Nordheim, and O.Heidenreich, Proliferation of human primary vascular smooth muscle cells depends on serum response factor. *Eur.J.Cell Biol.* 89 (2010) 216-224.

- [61] X.He, H.Xu, M.Zhao, and S.Wang, Serum response factor is overexpressed in esophageal squamous cell carcinoma and promotes Eca-109 cell proliferation and invasion. *Oncol.Lett.* 5 (2013) 819-824.
- [62] J.C.Evans, J.McCarthy, C.Torres-Fuentes, J.F.Cryan, J.Ogier, R.Darcy, R.W.Watson, and C.M.O'Driscoll, Cyclodextrin mediated delivery of NF-kappaB and SRF siRNA reduces the invasion potential of prostate cancer cells in vitro. *Gene Ther.*2015).
- [63] A.N.Mull, A.Klar, and C.S.Navara, Differential localization and high expression of SURVIVIN splice variants in human embryonic stem cells but not in differentiated cells implicate a role for SURVIVIN in pluripotency. *Stem Cell Res.* 12 (2014) 539-549.
- [64] D.C.Altieri, Survivin, cancer networks and pathway-directed drug discovery. *Nat.Rev.Cancer* 8 (2008) 61-70.
- [65] S.Fukuda and L.M.Pelus, Survivin, a cancer target with an emerging role in normal adult tissues. *Mol.Cancer Ther.* 5 (2006) 1087-1098.
- [66] Y.Li, Y.Zhou, J.Zheng, C.Niu, B.Liu, M.Wang, H.Fang, and C.Hou, Downregulation of survivin inhibits proliferation and migration of human gastric carcinoma cells. *Int.J.Clin.Exp.Pathol.* 8 (2015) 1731-1736.
- [67] L.Kren, J.Brazdil, M.Hermanova, V.N.Goncharuk, B.V.Kallakury, P.Kaur, and J.S.Ross, Prognostic significance of anti-apoptosis proteins survivin and bcl-2 in non-small cell lung carcinomas: a clinicopathologic study of 102 cases. *Appl.Immunohistochem.Mol.Morphol.* 12 (2004) 44-49.
- [68] R.J.Kelly, A.Lopez-Chavez, D.Citrin, J.E.Janik, and J.C.Morris, Impacting tumor cell-fate by targeting the inhibitor of apoptosis protein survivin. *Mol.Cancer* 10 (2011) 35.
- [69] J.Huang, H.Lyu, J.Wang, and B.Liu, Influence of survivin-targeted therapy on chemosensitivity in the treatment of acute myeloid leukemia. *Cancer Lett.*2015).
- [70] W.Y.Kim, S.Perera, B.Zhou, J.Carretero, J.J.Yeh, S.A.Heathcote, A.L.Jackson, P.Nikolinakos, B.Ospina, G.Naumov, K.A.Brandstetter, V.J.Weigman, S.Zaghlul, D.N.Hayes, R.F.Padera, J.V.Heymach, A.L.Kung, N.E.Sharpless, W.G.Kaelin, Jr., and K.K.Wong, HIF2alpha cooperates with RAS to promote lung tumorigenesis in mice. *J.Clin.Invest* 119 (2009) 2160-2170.
- [71] F.Kamlah, B.G.Eul, S.Li, N.Lang, L.M.Marsh, W.Seeger, F.Grimminger, F.Rose, and J.Hanze, Intravenous injection of siRNA directed against hypoxia-inducible factors prolongs survival in a Lewis lung carcinoma cancer model. *Cancer Gene Ther.* 16 (2009) 195-205.

- [72] M.R.Pawlus, L.Wang, K.Ware, and C.J.Hu, Upstream stimulatory factor 2 and hypoxia-inducible factor 2alpha (HIF2alpha) cooperatively activate HIF2 target genes during hypoxia. *Mol.Cell Biol.* 32 (2012) 4595-4610.
- [73] B.Chiavarina, D.Whitaker-Menezes, G.Migneco, U.E.Martinez-Outschoorn, S.Pavrides, A.Howell, H.B.Tanowitz, M.C.Casimiro, C.Wang, R.G.Pestell, P.Grieshaber, J.Caro, F.Sotgia, and M.P.Lisanti, HIF1-alpha functions as a tumor promoter in cancer associated fibroblasts, and as a tumor suppressor in breast cancer cells: Autophagy drives compartment-specific oncogenesis. *Cell Cycle* 9 (2010) 3534-3551.
- [74] A.Bremm, S.Moniz, J.Mader, S.Rocha, and D.Komander, Cezanne (OTUD7B) regulates HIF-1alpha homeostasis in a proteasome-independent manner. *EMBO Rep.* 15 (2014) 1268-1277.
- [75] A.Bremm, S.Moniz, J.Mader, S.Rocha, and D.Komander, Cezanne (OTUD7B) regulates HIF-1alpha homeostasis in a proteasome-independent manner. *EMBO Rep.* 15 (2014) 1268-1277.
- [76] S.Moniz, D.Bandarra, J.Biddlestone, K.J.Campbell, D.Komander, A.Bremm, and S.Rocha, Cezanne regulates E2F1-dependent HIF2alpha expression. *J.Cell Sci.*2015).
- [77] B.M.Putzer, E2F1 death pathways as targets for cancer therapy. *J.Cell Mol.Med.* 11 (2007) 239-251.
- [78] Z.Li, Y.Guo, H.Jiang, T.Zhang, C.Jin, C.Y.Young, and H.Yuan, Differential regulation of MMPs by E2F1, Sp1 and NF-kappa B controls the small cell lung cancer invasive phenotype. *BMC.Cancer* 14 (2014) 276.
- [79] H.H.Lee, S.R.Lee, and S.H.Leem, Tristetraprolin regulates prostate cancer cell growth through suppression of E2F1. *J.Microbiol.Biotechnol.* 24 (2014) 287-294.
- [80] Z.Fang, C.Gong, H.Liu, X.Zhang, L.Mei, M.Song, L.Qiu, S.Luo, Z.Zhu, R.Zhang, H.Gu, and X.Chen, E2F1 promote the aggressiveness of human colorectal cancer by activating the ribonucleotide reductase small subunit M2. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*2015).
- [81] S.F.Schoppmann, B.Jesch, J.Friedrich, G.Jomrich, F.Maroske, and P.Birner, Phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) correlates with Her-2 status, carbonic anhydrase 9 expression and prognosis in esophageal cancer. *Clin.Exp.Metastasis* 29 (2012) 615-624.



- [82] A.Onishi, Q.Chen, J.O.Humtsoe, and R.H.Kramer, STAT3 signaling is induced by intercellular adhesion in squamous cell carcinoma cells. *Exp.Cell Res.* 314 (2008) 377-386.
- [83] K.Takeda, K.Noguchi, W.Shi, T.Tanaka, M.Matsumoto, N.Yoshida, T.Kishimoto, and S.Akira, Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94 (1997) 3801-3804.
- [84] S.H.Zhao, F.Zhao, J.Y.Zheng, L.F.Gao, X.J.Zhao, and M.H.Cui, Knockdown of stat3 expression by RNAi inhibits in vitro growth of human ovarian cancer. *Radiol.Oncol.* 45 (2011) 196-203.
- [85] T.Kusaba, T.Nakayama, K.Yamazumi, Y.Yakata, A.Yoshizaki, K.Inoue, T.Nagayasu, and I.Sekine, Activation of STAT3 is a marker of poor prognosis in human colorectal cancer. *Oncol.Rep.* 15 (2006) 1445-1451.
- [86] C.Gridelli, M.A.Bareschino, C.Schettino, A.Rossi, P.Maione, and F.Ciardello, Erlotinib in non-small cell lung cancer treatment: current status and future development. *Oncologist.* 12 (2007) 840-849.
- [87] C.Gridelli, P.A.Ascierto, F.Grossi, E.Baldini, A.Favaretto, M.C.Garassino, A.Morabito, M.R.Migliorino, A.Rossi, and M.F.de, Second-line Treatment of Advanced Non-small Cell Lung Cancer Non-oncogene Addicted: New Treatment Algorithm in the Era of Novel Immunotherapy. *Curr.Clin.Pharmacol.* 13 (2018) 76-84.
- [88] C.Makowiecki, A.Nolte, B.Sutaj, T.Keller, M.Avci-Adali, H.Stoll, C.Schlensak, H.P.Wendel, and Walker T., New basic approach to treat non-small lung cancer based on RNA-interference. *Thoracic Cancer* 5 (2013) 112-120.
- [89] R.J.Kelly, A.Lopez-Chavez, D.Citrin, J.E.Janik, and J.C.Morris, Impacting tumor cell-fate by targeting the inhibitor of apoptosis protein survivin. *Mol.Cancer* 10 (2011) 35.
- [90] O.P.Blanc-Brude, M.Mesri, N.R.Wall, J.Plescia, T.Dohi, and D.C.Altieri, Therapeutic targeting of the survivin pathway in cancer: initiation of mitochondrial apoptosis and suppression of tumor-associated angiogenesis. *Clin.Cancer Res.* 9 (2003) 2683-2692.
- [91] G.Ambrosini, C.Adida, and D.C.Altieri, A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat.Med.* 3 (1997) 917-921.
- [92] T.Walker, A.Nolte, V.Steger, C.Makowiecki, M.Mustafi, G.Friedel, C.Schlensak, and H.P.Wendel, Small interfering RNA-mediated suppression of serum response factor, E2-promotor binding factor and

- survivin in non-small cell lung cancer cell lines by non-viral transfection. *Eur.J.Cardiothorac.Surg.* 43 (2013) 628-633.
- [93] L.Kren, J.Brazdil, M.Hermanova, V.N.Goncharuk, B.V.Kallakury, P.Kaur, and J.S.Ross, Prognostic significance of anti-apoptosis proteins survivin and bcl-2 in non-small cell lung carcinomas: a clinicopathologic study of 102 cases. *Appl.Immunohistochem.Mol.Morphol.* 12 (2004) 44-49.
- [94] D.Escuin and R.Rosell, The anti-apoptosis survivin gene and its role in human cancer: an overview. *Clin.Lung Cancer* 1 (1999) 138-143.
- [95] T.Walker, A.Nolte, V.Steger, C.Makowiecki, M.Mustafi, G.Friedel, C.Schlensak, and H.P.Wendel, Small interfering RNA-mediated suppression of serum response factor, E2-promotor binding factor and survivin in non-small cell lung cancer cell lines by non-viral transfection. *Eur.J.Cardiothorac.Surg.* 43 (2013) 628-633.
- [96] L.Kren, J.Brazdil, M.Hermanova, V.N.Goncharuk, B.V.Kallakury, P.Kaur, and J.S.Ross, Prognostic significance of anti-apoptosis proteins survivin and bcl-2 in non-small cell lung carcinomas: a clinicopathologic study of 102 cases. *Appl.Immunohistochem.Mol.Morphol.* 12 (2004) 44-49.
- [97] T.Walker, A.Nolte, V.Steger, C.Makowiecki, M.Mustafi, G.Friedel, C.Schlensak, and H.P.Wendel, Small interfering RNA-mediated suppression of serum response factor, E2-promotor binding factor and survivin in non-small cell lung cancer cell lines by non-viral transfection. *Eur.J.Cardiothorac.Surg.* 43 (2013) 628-633.
- [98] F.Paduano, R.Villa, M.Pennati, M.Folini, M.Binda, M.G.Daidone, and N.Zaffaroni, Silencing of survivin gene by small interfering RNAs produces supra-additive growth suppression in combination with 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin in human prostate cancer cells. *Mol.Cancer Ther.* 5 (2006) 179-186.
- [99] T.Walker, A.Nolte, V.Steger, C.Makowiecki, M.Mustafi, G.Friedel, C.Schlensak, and H.P.Wendel, Small interfering RNA-mediated suppression of serum response factor, E2-promotor binding factor and survivin in non-small cell lung cancer cell lines by non-viral transfection. *Eur.J.Cardiothorac.Surg.* 43 (2013) 628-633.
- [100] R.Habib, J.Akhtar, M.Taqi, C.Yu, and C.Zhang, Lentiviral vector-mediated survivin shRNA delivery in gastric cancer cell lines significantly inhibits cell proliferation and tumor growth. *Oncol.Rep.* 34 (2015) 859-867.
- [101] M.G.Stoleriu, V.Steger, M.Mustafi, M.Michaelis, J.Cinatl, W.Schneider, A.Nolte, J.Kurz, H.P.Wendel, C.Schlensak, and T.Walker, A new strategy in the treatment of chemoresistant lung adenocarcinoma via specific

siRNA transfection of SRF, E2F1, Survivin, HIF and STAT3.  
*Eur.J.Cardiothorac.Surg.* 46 (2014) 877-886.

- [102] S.Seth, Y.Matsui, K.Fosnaugh, Y.Liu, N.Vaish, R.Adami, P.Harvie, R.Johns, G.Severson, T.Brown, A.Takagi, S.Bell, Y.Chen, F.Chen, T.Zhu, R.Fam, I.Maciagiewicz, E.Kwang, M.McCutcheon, K.Farber, P.Charmley, M.E.Houston, Jr., A.So, M.V.Templin, and B.Polisky, RNAi-based therapeutics targeting survivin and PLK1 for treatment of bladder cancer. *Mol.Ther.* 19 (2011) 928-935.
- [103] F.Paduano, R.Villa, M.Pennati, M.Folini, M.Binda, M.G.Daidone, and N.Zaffaroni, Silencing of survivin gene by small interfering RNAs produces supra-additive growth suppression in combination with 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin in human prostate cancer cells. *Mol.Cancer Ther.* 5 (2006) 179-186.
- [104] R.Habib, J.Akhtar, M.Taqi, C.Yu, and C.Zhang, Lentiviral vector-mediated survivin shRNA delivery in gastric cancer cell lines significantly inhibits cell proliferation and tumor growth. *Oncol.Rep.* 34 (2015) 859-867.
- [105] S.Seth, Y.Matsui, K.Fosnaugh, Y.Liu, N.Vaish, R.Adami, P.Harvie, R.Johns, G.Severson, T.Brown, A.Takagi, S.Bell, Y.Chen, F.Chen, T.Zhu, R.Fam, I.Maciagiewicz, E.Kwang, M.McCutcheon, K.Farber, P.Charmley, M.E.Houston, Jr., A.So, M.V.Templin, and B.Polisky, RNAi-based therapeutics targeting survivin and PLK1 for treatment of bladder cancer. *Mol.Ther.* 19 (2011) 928-935.
- [106] D.T.Brandt, J.Xu, H.Steinbeisser, and R.Grosse, Regulation of myocardin-related transcriptional coactivators through cofactor interactions in differentiation and cancer. *Cell Cycle* 8 (2009) 2523-2527.
- [107] S.K.Burley and K.Kamada, Transcription factor complexes. *Curr.Opin.Struct.Biol.* 12 (2002) 225-230.
- [108] T.Walker, A.Nolte, V.Steger, C.Makowiecki, M.Mustafi, G.Friedel, C.Schlensak, and H.P.Wendel, Small interfering RNA-mediated suppression of serum response factor, E2-promotor binding factor and survivin in non-small cell lung cancer cell lines by non-viral transfection. *Eur.J.Cardiothorac.Surg.* 43 (2013) 628-633.
- [109] M.G.Stoleriu, V.Steger, M.Mustafi, M.Michaelis, J.Cinatl, W.Schneider, A.Nolte, J.Kurz, H.P.Wendel, C.Schlensak, and T.Walker, A new strategy in the treatment of chemoresistant lung adenocarcinoma via specific siRNA transfection of SRF, E2F1, Survivin, HIF and STAT3. *Eur.J.Cardiothorac.Surg.* 46 (2014) 877-886.
- [110] K.Pietschke, T.Walker, S.Krajewski, J.Kurz, S.Aufderklamm, C.Schwentner, C.Schlensak, A.Stenzl, H.P.Wendel, and A.Nolte, The

chance of small interfering RNAs as eligible candidates for a personalized treatment of prostate cancer. *Curr.Pharm.Biotechnol.* 14 (2014) 1145-1154.

- [111] S.Emmrich and B.M.Putzer, Checks and balances: E2F-microRNA crosstalk in cancer control. *Cell Cycle* 9 (2010) 2555-2567.
- [112] T.Walker, A.Nolte, V.Steger, C.Makowiecki, M.Mustafi, G.Friedel, C.Schlensak, and H.P.Wendel, Small interfering RNA-mediated suppression of serum response factor, E2-promotor binding factor and survivin in non-small cell lung cancer cell lines by non-viral transfection. *Eur.J.Cardiothorac.Surg.* 43 (2013) 628-633.
- [113] Y.Xie, Y.Yin, L.Li, Y.Ma, and Q.Xiao, Short interfering RNA directed against the E2F-1 gene suppressing gastric cancer progression in vitro. *Oncol.Rep.* 21 (2009) 1345-1353.
- [114] J.Favier, S.Lapointe, R.Maliba, and M.G.Sirois, HIF2 alpha reduces growth rate but promotes angiogenesis in a mouse model of neuroblastoma. *BMC.Cancer* 7 (2007) 139.
- [115] S.C.Hanna, B.Krishnan, S.T.Bailey, S.J.Moschos, P.F.Kuan, T.Shimamura, L.D.Osborne, M.B.Siegel, L.M.Duncan, E.T.O'Brien, III, R.Superfine, C.R.Miller, M.C.Simon, K.K.Wong, and W.Y.Kim, HIF1alpha and HIF2alpha independently activate SRC to promote melanoma metastases. *J.Clin.Invest* 123 (2013) 2078-2093.
- [116] M.G.Stoleriu, V.Steger, M.Mustafi, M.Michaelis, J.Cinatl, W.Schneider, A.Nolte, J.Kurz, H.P.Wendel, C.Schlensak, and T.Walker, A new strategy in the treatment of chemoresistant lung adenocarcinoma via specific siRNA transfection of SRF, E2F1, Survivin, HIF and STAT3. *Eur.J.Cardiothorac.Surg.* 46 (2014) 877-886.
- [117] D.L.Gillespie, M.T.Aguirre, S.Ravichandran, L.L.Leishman, C.Berrondo, J.T.Gamboa, L.Wang, R.King, X.Wang, M.Tan, A.Malamas, Z.R.Lu, and R.L.Jensen, RNA interference targeting hypoxia-inducible factor 1alpha via a novel multifunctional surfactant attenuates glioma growth in an intracranial mouse model. *J.Neurosurg.* 122 (2015) 331-341.
- [118] M.G.Stoleriu, V.Steger, M.Mustafi, M.Michaelis, J.Cinatl, W.Schneider, A.Nolte, J.Kurz, H.P.Wendel, C.Schlensak, and T.Walker, A new strategy in the treatment of chemoresistant lung adenocarcinoma via specific siRNA transfection of SRF, E2F1, Survivin, HIF and STAT3. *Eur.J.Cardiothorac.Surg.* 46 (2014) 877-886.
- [119] A.Yadav, B.Kumar, J.Datta, T.N.Teknos, and P.Kumar, IL-6 promotes head and neck tumor metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition via the JAK-STAT3-SNAIL signaling pathway. *Mol.Cancer Res.* 9 (2011) 1658-1667.

- [120] J.V.Alvarez, H.Greulich, W.R.Sellers, M.Meyerson, and D.A.Frank, Signal transducer and activator of transcription 3 is required for the oncogenic effects of non-small-cell lung cancer-associated mutations of the epidermal growth factor receptor. *Cancer Res.* 66 (2006) 3162-3168.
- [121] L.Klampfer, Signal transducers and activators of transcription (STATs): Novel targets of chemopreventive and chemotherapeutic drugs. *Curr.Cancer Drug Targets.* 6 (2006) 107-121.
- [122] T.Kusaba, T.Nakayama, K.Yamazumi, Y.Yakata, A.Yoshizaki, K.Inoue, T.Nagayasu, and I.Sekine, Activation of STAT3 is a marker of poor prognosis in human colorectal cancer. *Oncol.Rep.* 15 (2006) 1445-1451.
- [123] W.Yin, S.Cheepala, J.N.Roberts, K.Syson-Chan, J.DiGiovanni, and J.L.Clifford, Active Stat3 is required for survival of human squamous cell carcinoma cells in serum-free conditions. *Mol.Cancer* 5 (2006) 15.
- [124] M.G.Stoleriu, V.Steger, M.Mustafi, M.Michaelis, J.Cinatl, W.Schneider, A.Nolte, J.Kurz, H.P.Wendel, C.Schlensak, and T.Walker, A new strategy in the treatment of chemoresistant lung adenocarcinoma via specific siRNA transfection of SRF, E2F1, Survivin, HIF and STAT3. *Eur.J.Cardiothorac.Surg.* 46 (2014) 877-886.
- [125] K.Ramji, D.W.Kulesza, S.Chouaib, and B.Kaminska, Off-target effects of plasmid-transcribed shRNAs on NFkappaB signaling pathway and cell survival of human melanoma cells. *Mol.Biol.Rep.* 40 (2013) 6977-6986.
- [126] V.Dzmitruk, A.Szulc, D.Shcharbin, A.Janaszewska, N.Shcharbina, J.Lazniewska, D.Novopashina, M.Buyanova, M.Ionov, B.Klajnert-Maculewicz, R.Gomez-Ramirez, S.Mignani, J.P.Majoral, M.A.Munoz-Fernandez, and M.Bryszewska, Anticancer siRNA cocktails as a novel tool to treat cancer cells. Part (B). Efficiency of pharmacological action. *Int.J.Pharm.* 485 (2015) 288-294.
- [127] C.Doan, L.Le, S.Hoang, S.Do, and D.Le, Simultaneous silencing of VEGF and KSP by siRNA cocktail inhibits proliferation and induces apoptosis of hepatocellular carcinoma Hep3B cells. *Biol.Res.* 47 (2014) 70.
- [128] A.Nolte, T.Walker, M.Schneider, O.Kray, M.vci-Adali, G.Ziemer, and H.P.Wendel, Small-interfering RNA-eluting surfaces as a novel concept for intravascular local gene silencing. *Mol.Med.* 17 (2011) 1213-1222.
- [129] A.Nolte, S.Aufderklamm, K.Scheu, T.Walker, O.Konig, M.Bottcher, J.Niederlaender, C.Schwentner, C.Schlensak, A.Stenzl, and H.P.Wendel, Small interfering RNA transfection against serum response factor mediates growth inhibition of benign prostatic hyperplasia fibroblasts. *Nucleic Acid Ther.* 23 (2013) 62-70.

- [130] A.Nolte, C.Raabe, T.Walker, P.Simon, G.Ziemer, and H.P.Wendel, Optimized basic conditions are essential for successful siRNA transfection into primary endothelial cells. *Oligonucleotides*. 19 (2009) 141-150.
- [131] T.Walker, A.Nolte, V.Steger, C.Makowiecki, M.Mustafi, G.Friedel, C.Schlensak, and H.P.Wendel, Small interfering RNA-mediated suppression of serum response factor, E2-promotor binding factor and survivin in non-small cell lung cancer cell lines by non-viral transfection. *Eur.J.Cardiothorac.Surg.* 43 (2013) 628-633.
- [132] M.G.Stoleriu, V.Steger, M.Mustafi, M.Michaelis, J.Cinatl, W.Schneider, A.Nolte, J.Kurz, H.P.Wendel, C.Schlensak, and T.Walker, A new strategy in the treatment of chemoresistant lung adenocarcinoma via specific siRNA transfection of SRF, E2F1, Survivin, HIF and STAT3. *Eur.J.Cardiothorac.Surg.* 46 (2014) 877-886.

## **Abbildungsverzeichnis**

<b>Abbildung 1:</b> Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2014 (ohne nicht-melanotischen Hautkrebs) [2]	2
<b>Abbildung 2:</b> Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebssterbefällen in Deutschland 2014 [2]	2
<b>Abbildung 3:</b> Mechanismus der RNA-Interferenz [42]	14
<b>Abbildung 4:</b> Flussdiagramm Versuchsablauf	30
<b>Abbildung 5:</b> Durchflusszytometrie von (a) A549 und (b) NCI-H460 Zelllinien 24h nach Transfektion mit FITC markierter nonsense-siRNA.	47
<b>Abbildung 6:</b> Relative Expression von (a) SRF, (b) Survivin, (c) HIF1 $\alpha$ , (d) HIF2 $\alpha$ , (e) E2F1 und (f) STAT3 24 Stunden nach Transfektion der Zelllinie A549	48
<b>Abbildung 7:</b> Relatives Proteinlevel und Western Blot der Zelllinie A549	49
<b>Abbildung 8:</b> Zellzahl in % drei Tage nach Transfektion der Zelllinie A549	50
<b>Abbildung 9:</b> Relative Expression von (a) SRF, (b) Survivin, (c) HIF1 $\alpha$ , (d) HIF2 $\alpha$ , (e) E2F1 24 Stunden nach Transfektion der Zelllinie LXF-289	51
<b>Abbildung 10:</b> Relatives Proteinlevel und Western Blot der Zelllinie LXF-289	52
<b>Abbildung 11:</b> Zellzahl in % drei Tage nach Transfektion der Zelllinie LXF-289	53
<b>Abbildung 12:</b> Relative Expression von (a) SRF, (b) Survivin, (c) HIF1 $\alpha$ , (d) HIF2 $\alpha$ , (e) E2F1 und (f) STAT3 24 Stunden nach Transfektion der Zelllinie SK-MES	54
<b>Abbildung 13:</b> Relatives Proteinlevel und Western Blot der Zelllinie SK-MES	55

<b>Abbildung 14:</b> Zellzahl in % drei Tage nach Transfektion der Zelllinie SK-MES	56
<b>Abbildung 15:</b> Relative Expression von (a) SRF, (b) Survivin, (c) HIF1 $\alpha$ , (d) HIF2 $\alpha$ , (e) E2F1 und (f) STAT3 24 Stunden nach Transfektion der Zelllinie NCI-H460	58
<b>Abbildung 16:</b> Relatives Proteinlevel und Western Blot der Zelllinie NCI-H460	58
<b>Abbildung 17:</b> Zellzahl in % drei Tage nach Transfektion der Zelllinie NCI-H460	59
<b>Abbildung 18:</b> Relative Expression von (a) SRF, (b) Survivin, (c) HIF1 $\alpha$ , (d) HIF2 $\alpha$ , (e) E2F1 und (f) STAT3 24 Stunden nach Transfektion der Zelllinie JL-1	61
<b>Abbildung 19:</b> Zellzahl in % drei Tage nach Transfektion der Zelllinie JL-1	62
<b>Abbildung 20:</b> Relative Expression von (a) SRF, (b) Survivin , (c) E2F1 24 Stunden nach Transfektion sowie Zellzahl in % drei Tage nach Transfektion der CPC-N Zelllinie	63
<b>Abbildung 21:</b> Relative Expression von Survivin 24 Stunden nach Transfektion der CPC-N Zelllinie bei (a) normaler Transfektion, (b) Vorbehandlung mit Sigma Cell Dissociation Solution und (c) Zugabe von 700 $\mu$ l Vollmedium 4h nach Transfektion	64
<b>Abbildung 22:</b> Relative Expression von Survivin mit doppelter Menge Interferin 24 Stunden nach Transfektion der CPC-N Zelllinie	65
<b>Abbildung 23:</b> Relative Expression von Survivin mit (a) normaler und (b) doppelter Menge Interferin 24 Stunden nach Transfektion mit Zentrifugation der CPC-N Zelllinie	66
<b>Abbildung 24:</b> Relative Expression von Survivin mit 8 $\mu$ l Interferin 24 Stunden nach Transfektion der CPC-N Zelllinie	67



## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Vereinfachte TNM-Klassifikation des NSCLC	4
Tabelle 2: Vereinfachte Stadieneinteilung NSCLC	5
Tabelle 3: Vereinfachte TNM des Pleuramesothelioms	10
Tabelle 4: Vereinfachte Stadieneinteilung des Pleuramesothelioms	11
Tabelle 5: Verwendete Geräte	20
Tabelle 6: Verwendete Chemikalien und Reagenzien	21
Tabelle 7: Verwendete Medien	23
Tabelle 8: Verwendete Zelllinien	24
Tabelle 9: Verwendete siRNA-Sequenzen	24
Tabelle 10: Sequenzen der verwendeten qRT-PCR Primer	25
Tabelle 11: Verwendete Antikörper	25
Tabelle 12: Pippettierschema pro Well	31
Tabelle 13: Pippettierschema pro Well Cocktails	32
Tabelle 14: Pippettierschema pro Well CPC-N Vorversuche	38
Tabelle 15: Pippettierschema pro Well CPC-N Optimierungsversuch 2	40
Tabelle 16: Pippettierschema pro Well CPC-N Optimierungsversuch 3	41
Tabelle 17: Pippettierschema pro Well CPC-N Optimierungsversuch 4	41
Tabelle 18: Zusammenfassung der Reduktion der Zellzahl	67
Tabelle 19: Zusammenfassung der Reduktion der Zellzahl bei Cocktails (z = zusammen angesetzt, e= einzeln angesetzt)	68

## **Abkürzungsverzeichnis**

Abb.	Abbildung
AMD	Altersbedingte Makuladegeneration
APS	Ammoniumpersulfat
BIRC5	Baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing protei 5
BCIP®/NBT	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate/nitro blue tetrazolium
BSA	Bovine serum Albumin
cDNA	Complementary DNA
CDC	Cell Dissociation Solution
C <sub>T</sub>	Cycle threshold
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
dsRNA	Doppelsträngige RNA
EGFR	Epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor
EPAS1	Endothelial PAS domain-containing protein 1
e	Einzeln
E2	E2F1
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FCS	Fetales Kälberserum

FITC	Fluorescein isothiocyanate
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
H1	HIF1 $\alpha$
H2	HIF2 $\alpha$
KSP	Kinesin Spindle Protein
miRNA	mikroRNA
MPM	Malignes Pleuramesotheliom
mRNA	messenger-RNA
Nr.	Nummer
NSCLC	Non Small Cell Lung Cancer
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphate Buffered Saline
Pen /Strep	Penicillin / Streptomycin
qRT-PCR	Quantitative Real-Time Polymerase-Chain- Reaction
RISC	RNA-Induced Silencing-Complex
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz

rRNA	Ribosomale RNA
tRNA	Transfer-RNA
SCR	Scrambled
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
siRNA	Small-Interfering RNA
SCLC	Small Cell Lung Cancer
SRF	Serum Response Factor
ssRNA	Single stranded RNA
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription 3
SV	Survivin
Tab.	Tabelle
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TNM	Tumor/ Nodus / Metastase
TNS	Trypsin-Neutralisations-Solution
UICC	Union internationale contre le cancer
USA	United States of America
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WHO	World Health Organisation
z	Zusammen
z.B.	Zum Beispiel

## **Erklärung zum Eigenanteil**

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Herrn PD Dr. Tobias Walker, Herrn Prof. Hans Peter Wendel und Frau Dr. Andrea Nolte-Karayel.

Bis auf wenige Ausnahmen wurden sämtliche Versuche nach Einarbeitung durch Frau Dr. Andrea Nolte-Karayel von mir eigenständig durchgeführt. Lediglich die Elektrophorese, das Blotting und die Färbung der Western Blots wurden von Frau Besmire Sutaj durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst zu haben, keine nicht erlaubten Hilfsmittel und keine weiteren, als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Mainz, der 10.09.2019

Unterschrift:

## **Publikationen**

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in den folgenden Publikationen veröffentlicht:

Christina Makowiecki, Andrea Nolte, Besmire Sutaj, Timea Keller, Meltem Avci-Adali, Heidi Stoll, Christian Schlensak, Hans-Peter Wendel und Tobias Walker

**New basic approach to treat non-small cell lung cancer based on RNA-interference**

Thoracic Cancer 5 (2014) 112–120

Tobias Walker, Andrea Nolte, Volker Steger, Christina Makowiecki, Migdat Mustafi, Godehard Friedel, Christian Schlensak und Hans-Peter Wendel

**Small interfering RNA-mediated suppression of serum response factor, E2-promotor binding factor and survivin in non-small cell lung cancer cell lines by non-viral transfection**

European Journal of Cardio-Thoracic Surgery 43 (2013) 628–634

## Danksagung

Mit den folgenden Zeilen möchte ich allen Menschen danken, die mich im Laufe der Zeit unterstützt und diese Arbeit von der ersten Idee bis zur Fertigstellung begleitet haben.

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Professor Walker für die anregende Lehrveranstaltung im ersten klinischen Semester bedanken, die mich zu einer spannenden Famulatur und anschließend zu dieser Dissertation inspiriert hat. Vielen Dank für Ihre Ideen, die bestärkenden Worte über den gesamten Zeitraum hinweg und alles, was zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen hat.

Ein riesiger herzlicher Dank geht auch an Dr. Andrea Nolte-Karayel. Ohne sie und ihre persönliche sowie fachliche Unterstützung und Begeisterung wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen. Danke außerdem für das immer offene Ohr, auch bei den hin und wieder trivialen Fragen und Problemen. Danke für all deine Mühe.

Danke auch an den Leiter des Labors Professor Wendel, der mir immer tatkräftig bei Problemen und Fragen zur Seite stand sowie für die Möglichkeit, diese Arbeit als Teil des Teams zu erstellen.

Natürlich danke ich auch dem Team des Labors. Danke für die gesamte spannende Zeit, die angenehme Arbeitsatmosphäre und dass ich ein Teil eurer Gemeinschaft sein durfte.

Besonders danke ich meiner Familie für die Geduld und die Unterstützung, auch und gerade in den schwierigen Phasen der letzten Jahre.

Danke für euren bedingungslosen Beistand.

Auch wenn meine Mutter leider die Fertigstellung dieser Dissertation nicht mehr erleben kann, hat sie mich trotzdem einen Großteil des Weges begleitet und mich stetig ermutigt und aufgefangen.

Ich danke dir für die richtigen Worte zur richtigen Zeit und dass du einfach für mich da warst.

## **Lebenslauf**

Name: Christina Michaela Makowiecki  
Geburtsdatum: 21.07.1986  
Geburtsort: Marburg  
Staatsangehörigkeit: Deutsch  
Familienstand: ledig

### **Schulbildung:**

09/97 – 06/06 Martin-Luther-Schule Marburg, Gymnasium  
Abschluss Abitur  
  
01/04 – 07/04 Copleston & Holywells Sixth Form, Ipswich, England,  
½ Jahr Schüleraustausch

### **Studium:**

10/06 – 04/08 Philipps-Universität Marburg, Studiengang  
B.sc. Biology  
  
04/08 – 12/14 Eberhard Karls Universität Tübingen, Studiengang  
Humanmedizin  
Absolvierung des Praktischen Jahres am Klinikum am  
Steinberg, Reutlingen. Wahlfach: Anästhesiologie  
09.12.14 Abschluss 2.Staatsexamen  
20.01.15 Approbation als Ärztin  
  
09/12 – 12/12 Auslandssemester im Rahmen des Erasmus-  
Programms in Bordeaux, Frankreich

### **Berufserfahrung:**

08/15 – 12/18 Assistenzärztin für Anästhesiologie und  
Intensivmedizin am Katholischen Klinikum Mainz,  
Mainz  
  
Seit 01/19 Assistenzärztin für Anästhesiologie und  
Intensivmedizin am Markus Krankenhaus, Frankfurt  
am Main