

Aus der  
Universitätsklinik für Thorax-, Herz und Gefäßchirurgie Tübingen

**Der Einfluss von scrambled siRNAs auf das  
Zellverhalten unterschiedlicher Zelllinien**

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

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

**vorgelegt von**

**Kirstin Andrea Wocken, geb. Müller**

**2023**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. A. Nolte-Karayel  
2. Berichterstatter: Professor Dr. T. Stafforst

Tag der Disputation: 18.07.2023

Gewidmet meiner Familie und in lieber Erinnerung an meinen Papa

## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>VII</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VIII</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Einführung.....	1
1.2 Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom (NSCLC) .....	2
1.2.1 A549 Zelllinie.....	3
1.2.2 Das Protein Survivin.....	3
1.2.3 Der Transkriptionsfaktor E2F1 .....	4
1.2.4 Der Transkriptionsfaktor Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) .....	4
1.3 Die Atherosklerose.....	5
1.3.1 EA.hy926 Zelllinie.....	7
1.3.2 Das Interzelluläre Adhäsionsmolekül ICAM-1 .....	8
1.3.3 Der Tumornekrosefaktor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) .....	8
1.4 Die Benigne Prostatahyperplasie (BPH) .....	9
1.4.1 Fibroblasten.....	10
1.4.2 Der Transkriptionsfaktor Serum- Response- Faktor (SRF) .....	10
1.5 Das Prostatakarzinom.....	11
1.5.1 PC-3 Zelllinie .....	12
1.6 Gen- Silencing durch RNA- Interferenz (RNAi) mit siRNA.....	12
1.6.1 Aufbau und Struktur von siRNA .....	13
1.6.2 Mechanismus der RNAi.....	14
1.6.3 Transfektion der siRNA .....	15

1.6.4 Off- Target- Effekte und Probleme beim RNAi Mechanismus .....	16
1.6.5 Scrambled- bzw. Non- targeting- siRNA (SCR-siRNA).....	16
1.7 Fragestellung .....	17
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>19</b>
2.1 Material .....	19
2.1.1 Geräte .....	19
2.1.2 Software .....	21
2.1.3 Verbrauchsmaterialien .....	21
2.1.4 Chemikalien.....	23
2.1.5 Zelllinien .....	26
2.1.6 Verwendete Medien bei Zellkultivierung.....	27
2.1.7 siRNA Sequenzen .....	28
2.1.8 Scrambled siRNA Sequenzen.....	29
2.1.9 qRT-PCR Primer Sequenzen .....	30
2.2 Methoden .....	31
2.2.1 Versuchsaufbau .....	31
2.2.2 Kultivierung der Zellen.....	32
2.2.3 Transfektion der Zellen mit siRNA.....	33
2.2.4 Extraktion der RNA für qRT-PCR Versuche.....	34
2.2.5 Messung der RNA Konzentration.....	35
2.2.6 Umschreibung der RNA in cDNA .....	36
2.2.7 Quantitative Echtzeit- Polymerase- Kettenreaktion (qRT-PCR).....	37
2.2.8 Aktivierung der EA.hy926 Zellen mit TNF- $\alpha$ .....	39
2.2.9 Antikörperfärbung des Oberflächenrezeptors ICAM-1 .....	39
2.2.10 Fluoreszenzaktivierte Durchflusszytometrie (engl. fluorescence-activated cell sorting = FACS) .....	40
2.2.11 Zellzählung mit CASY®.....	41
2.3 Statistische Auswertung.....	42

<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>43</b>
3.1 Versuch 1 (V1): Auswertung der Zellzahl und mRNA Expression nach Transfektion von A549 Zellen mit siRNA, INTERFERin® und SCR-siRNA.....	44
3.1.1 Ergebnisse der qRT-PCR.....	45
3.1.2 Ergebnisse der Zellzählung mit CASY® .....	50
3.2 Versuch 2 (V2): Auswertung der qRT-PCR und der fluoreszierenden Durchflusszytometrie nach Transfektion von EA.hy926 Zellen mit siRNA gegen ICAM-1, INTERFERin® und SCR-siRNA .....	51
3.2.1 Ergebnisse der qRT-PCR.....	52
3.2.2 Ergebnisse der fluoreszierenden Durchflusszytometrie (FACS) .....	53
3.3 Versuch 3 (V3): Auswertung der qRT-PCR sowie der Zellzahl nach Transfektion von Fibroblasten mit siRNA gegen SRF, INTERFERin® und SCR- siRNA.....	57
3.3.1 Ergebnisse der qRT-PCR.....	57
3.3.2 Ergebnisse der Zellzählung mit CASY® .....	59
3.4 Versuch 4 (V4): Auswertung der mRNA Expression sowie der relativen Zellzahl nach Transfektion von PC-3 Zellen mit siRNA gegen SRF und STAT3, INTERFERin® sowie SCR-siRNA .....	60
3.4.1 Ergebnisse der qRT-PCR.....	61
3.4.2 Ergebnisse der relativen Zellzahl mit CASY®.....	64
<b>4. Diskussion</b> .....	<b>66</b>
4.1 Überblick: Von der Entdeckung der RNA-Interferenz bis zur Entwicklung und Zulassung von siRNA basierten Medikamenten	66
4.2 Die aktuelle Entwicklung von siRNA in Bezug auf die benigne Prostatahyperplasie, NCLC, Atherosklerose und dem Prostatakarzinom .....	69
4.3 Schlussfolgerung.....	78
<b>5. Zusammenfassung</b> .....	<b>79</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>81</b>
<b>7. Erklärung zum Eigenanteil</b> .....	<b>91</b>

<b>8. Danksagung .....</b>	<b>92</b>
----------------------------	-----------

## **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Ergebnis der relativen Expression von E2F1 unter Verwendung der siRNAs gegen E2F1, Survivin und STAT3 sowie nach Transfektion mit INTERFERin® und den SCR-siRNAs in A549 Zellen.....	<b>45</b>
Abbildung 2: Ergebnis der relativen Expression von STAT3 unter Verwendung der siRNAs gegen STAT3, Survivin und E2F1 sowie nach Transfektion mit INTERFERin® und den vier SCR-siRNAs in A549 Zellen.....	<b>47</b>
Abbildung 3: Ergebnis der relativen Expression von Survivin unter Verwendung der siRNAs gegen Survivin, STAT3 und E2F1 sowie nach Transfektion mit INTERFERin® und den vier SCR-siRNAs in A549 Zellen.....	<b>48</b>
Abbildung 4: Ergebnis der relativen Zellzahl nach Transfektion mit siRNA gegen E2F1, Survivin, STAT3 sowie INTERFERin® und den SCR-siRNAs von A549 Zellen.....	<b>50</b>
Abbildung 5: Ergebnis der relativen mRNA- Expression von ICAM-1 nach Transfektion von siRNA gegen ICAM-1, INTERFERin® und den SCR-siRNAs in EA.hy926 Zellen.....	<b>52</b>
Abbildung 6: Ergebnis der relativen Expression von ICAM-1 auf Proteinebene nach Transfektion von siRNA gegen ICAM-1, INTERFERin® und den SCR-siRNAs in EA.hy926 Zellen.....	<b>53</b>
Abbildung 7: Ergebnis der relativen Expression von SRF nach Transfektion mit siRNA gegen SRF, INTERFERin® und den SCR-siRNAs in Fibroblasten.....	<b>57</b>
Abbildung 8: Ergebnis der relativen Zellzahl nach Transfektion mit siRNA gegen SRF, INTERFERin® und den SCR-siRNAs von Fibroblasten.....	<b>59</b>
Abbildung 9: Ergebnis der relativen Expression von SRF nach Transfektion mit siRNA gegen SRF und STAT3, INTERFERin® sowie den vier SCR-siRNAs in PC 3 Zellen.....	<b>61</b>
Abbildung 10: Ergebnis der relativen Expression von STAT3 nach Transfektion mit siRNA gegen STAT3 und SRF, INTERFERin® sowie den vier SCR-siRNAs in PC 3 Zellen.....	<b>62</b>

Abbildung 11: Ergebnis der relativen Zellzahl nach Transfektion mit siRNA gegen SRF und STAT3, INTERFERin® sowie den vier SCR-siRNAs von PC-3 Zellen.....**64**

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte.....	19
Tabelle 2: Verwendete Software.....	21
Tabelle 3: Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	21
Tabelle 4: Verwendete Chemikalien, Reagenzien und Antikörper.....	23
Tabelle 5: Verwendete Zelllinien.....	27
Tabelle 6: Verwendete siRNAs.....	28
Tabelle 7: Verwendete scrambled siRNAs, die miteinander verglichen wurde.	29
Tabelle 8: Verwendete Primer bei qRT-PCR.....	30
Tabelle 9: Verwendete Zelllinie und die spezifischen siRNAs.....	31
Tabelle 10: Verwendete Zelllinie und die angewendete Methode.....	32
Tabelle 11: Konzentrationen der Transfektionsreagenzien für 12-Well Platten .....	33
Tabelle 12: Darstellung der signifikanten Unterschiede bei einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,001^{***}$ .....	55
Tabelle 13: Darstellung der signifikanten Unterschiede bei einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,01^{**}$ .....	55
Tabelle 14: Darstellung der signifikanten Unterschiede bei einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05^*$ .....	56
Tabelle 15: Darstellung der Versuche V1-V4 in Bezug auf die Erkrankung und die verwendeten Zellarten.....	68

## **Abkürzungsverzeichnis**

Abb.	Abbildung
Ago2	Agonaute-2 Protein
ANOVA	Analysis of variance
AK	Antikörper
ALK	Anaplastische Lymphokinase
ATCC®	American Type Culture Collection
ATF6	Aktivierender Transkriptionsfaktor 6
BMS	Bare Metal Stent
BPH	Benigne Prostatahyperplasie
CCL2	CC-Chemokin-Ligand 2
CD 54	Cluster of Differentiation 54
cDNA	engl. complementary DNA, dt. komplementär DNA
DES	Drug eluting Stent
dt.	deutsch
dsRNA	engl. double-stranded RNA, dt. doppelsträngige RNA
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
engl.	englisch
et al.	et alii
FACS	engl. fluorescence-activated cell sorting, dt. fluoreszenzaktivierte Durchflusszytometrie
IAP	Inhibitoren der Apoptose

ICAM-1	engl. Intercellular Adhesion Molecule 1, dt. Interzelluläres Adhäsionsmolekül 1
IEG	Immediate Early Gene
IGF1	Insulin-like growth factor
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
IRS	In-Stent-Restenose
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDL	Low Density Lipoprotein
LPA	Lysophosphatidsäure
LPS	Lipopolysaccharide
MCP-1	Monocyte chemotactic protein 1
mRNA	engl. messenger RNA, dt. Boten-RNA
miRNA	microRNA
n	Anzahl der Versuchsdurchläufe
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
Nr	Nummer
NSCLC	engl. non small cell lung carcinoma, dt. nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom
PAF	Plättchenaktivierender Faktor
PCR	engl. polymerase chain reaction, dt. Polymerase-Kettenreaktion
PD	Privatdozentin
PO	Phosphodiester

pRB	Retinoplastom Protein
PS	Phosphorothioat
qRT PCR	engl. quantitative- real-time PCR, dt. Quantitative Echtzeit- PCR
RISC	RNA- induced silencing complex
RNA	Ribunukleinsäure
RNAi	RNA- Interferenz
ROS1	Protoonkogen-Tyrosin-Protein-Kinase
rRNA	Ribosomale RNA
SCLC	engl. small cell lung carcinoma = dt. kleinzelliges Lungenkarzinom
SCR-siRNA	scrambled siRNA
SD	engl. Standard deviation = Standardabweichung
s	Sekunden
siRNA	engl. small interfering RNA, dt. kleine eingreifende RNA
SRF	Serum- Response- Faktor
STAT3	Signal Transducers and Activators of Transcription 3
THG-Labor	Thorax- Herz- und Gefäßchirurgisches Labor, Tübingen
TNF- $\alpha$ /TNFR	Tumornekrosefaktor- $\alpha$ /Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TNM Klassifikation	Tumor-Nodus-Metastasis Klassifikation
tPA	Gewebespezifischer Plasminogen Aktivator
TRBP	Transactivation response element binding Protein
tRNA	Transfer RNA

TUR-P	Transurethrale Prostatektomie
u.a.	unter anderem
UICC	Union internationale contre le cancer (dt: Internationale Vereinigung gegen Krebs)
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule- 1
Vgl.	Vergleich
vs	Versus
z.B.	zum Beispiel
$\alpha$	Alpha
$\beta$	Beta

# 1. Einleitung

## 1.1 Einführung

Jährlich sterben ca. 1,6 Millionen Menschen an einem Lungenkarzinom (Torre et al., 2015). In ca. 85% der Fälle handelt es sich um nicht-kleinzellige Lungenkarzinome (engl. non small cell lung carcinoma, NSCLC). Abhängig von ihrem histologischen sowie histochemischen Erscheinungsbild, werden Lungenkarzinome weiter differenziert (Herbst et al., 2018).

Die Atherosklerose und deren Folgeerkrankungen wie z.B. die Koronare Herzkrankheit oder der Schlaganfall zählen weltweit zu den häufigsten Erkrankungen mit tödlichem Verlauf (Go et al., 2013, Lusic, 2000, Ross, 1999).

Während das Prostatakarzinom zu den häufigsten malignen Tumoren bei Männern zählt, ist die benigne Prostatahyperplasie einer der häufigsten benignen Tumoren bei Männern (Lai et al., 2018, Roehrborn, 2005).

Alle hier aufgeführten Erkrankungen können nicht nur schlussendlich zum Tode führen, sondern sie bedeuten oft schon weit vorher eine erhebliche Einschränkung der Lebensqualität. Auch wenn es in den letzten Jahren gelungen ist, neue Therapieoptionen für die jeweiligen Erkrankungen zu entwickeln oder die zur Verfügung stehenden Therapien zu verbessern, sind diese immer noch mit teilweise erheblichen Nebenwirkungen verbunden. So kann es beispielsweise bei der Therapie von nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen mit Inhibitoren des Epidermal-Growth-Factor Rezeptors (EGFR) wie Cetuximab zu starken akneartigen Hautreaktionen kommen (Wollenberg et al., 2010). Die Nebenwirkungen können so stark sein, dass eine eigentlich wirksame Therapie, im schlimmsten Fall abgebrochen werden muss (Wollenberg et al., 2010). Vor diesem Hintergrund ist eine stetige Entwicklung weiterer Therapieoptionen, als auch eine Optimierung bereits bestehender Therapien von großer Bedeutung. Ein möglicher Ansatz neuer Therapien könnten die Verwendung von small interfering RNAs (siRNAs) sein, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden.

## **1.2 Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom (NSCLC)**

Das Lungenkarzinom zählt weltweit zu den häufigsten malignen Tumoren, wobei Männer häufiger betroffen sind als Frauen. Bei Männern ist das Lungenkarzinom die häufigste Krebsart, die zum Tode führt, bei Frauen steht diese an dritter Stelle. Einer der Hauptrisikofaktoren ist das Rauchen (Torre et al., 2015, Griesinger et al., 2017). Es werden kleinzellige Lungenkarzinome (engl. small-cell lung carcinoma = SCLC) von nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen (engl. non-small-cell lung carcinoma = NSCLC) unterschieden. Dabei handelt es sich bei ca. 15% der diagnostizierten Lungenkarzinome um sehr schnell und aggressiv wachsende SCLC und in ca. 85% um NSCLC (Dela Cruz et al., 2011). Der Zeitpunkt der Diagnosestellung eines NSCLC hat einen entscheidenden Einfluss auf den Verlauf der Erkrankung. Während die 5-Jahres-Überlebensrate bei einer frühen Diagnosestellung bei 75-80% liegt, sinkt diese bei späterer Diagnose erheblich (Griesinger et al., 2017).

Die Therapiewahl erfolgt stadienabhängig, basierend auf der sogenannten Tumor, Nodus, Metastasis (TNM) Klassifikation und den International Union against Cancer (UICC) Kriterien. Als klassische Therapien stehen zur Verfügung die operative Therapie, die Radio- und Chemotherapie (Griesinger et al., 2017). In den letzten Jahren wuchs die therapeutische Bedeutung der weiteren Unterteilung der NSCLC in Subtypen wie das Adenokarzinom, das Plattenepithelkarzinom oder das großzellige Karzinom. Dabei sind nicht nur histologische und genetische Merkmale von Bedeutung, sondern auch histochemische Tests werden im Hinblick auf eine individualisierte Therapie immer wichtiger. So haben Untersuchungen ergeben, dass der Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR), die Anaplastische Lymphokinase (ALK) und die Protoonkogen-Tyrosin-Protein-Kinase ROS1 Mutationen vor allem in NSCLC vom Subtyp Adenokarzinom vorkommen und dass der Wirkstoff Pemetrexed eine bessere Wirkung bei fortgeschrittenem Adenokarzinom im Vergleich zum Plattenepithelkarzinom zeigt (Travis et al., 2015).

Trotz intensiver Forschung in den letzten Jahren ist die Mortalität von Lungenkarzinomen immer noch sehr hoch und Therapien sind mit zahlreichen

Nebenwirkungen verbunden (Makowiecki et al., 2014, Griesinger et al., 2017, Kris et al., 2017). Deshalb wird intensiv an alternativen, individuellen Therapiemöglichkeiten geforscht wie z.B. der Einsatz von siRNA zur Behandlung von NSCLC (Walker et al., 2013).

Um eine nebenwirkungsarme und spezifische Therapie zu entwickeln, stehen bestimmte Tumorzelllinien zur Verfügung. Eine der Zelllinien, die in dieser Arbeit verwendet wird, ist die A549 Zelllinie.

### **1.2.1 A549 Zelllinie**

Für die Etablierung von neuen, spezifischen Krebstherapien bedarf es zunächst in vitro Versuche, die an Zellen durchgeführt werden, die in ihrem Verhalten den Eigenschaften eines jeweiligen Tumors entsprechen. Aus diesem Grund wurde 1973 aus einem humanen pulmonalem Adenokarzinom die Zelllinie A549 etabliert (Giard et al., 1973). Diese ist heute Bestandteil zahlreicher Forschungen zur Entwicklung neuer Krebstherapien. Da verschiedene Zelltypen verschiedene Eigenschaften haben und damit auch verschiedene Angriffsziele für eine Therapie bieten, ist eine Überprüfung bzw. Charakterisierung eines Tumorzelltyps für eine individuelle Therapie unabdingbar. Im Folgenden werden Proteine beschrieben, die oftmals in Tumoren in großen Mengen gebildet oder angereichert werden und somit Ansatzpunkte für eine Therapie bieten und in dieser Arbeit an A549 Zellen getestet wurden.

### **1.2.2 Das Protein Survivin**

1997 wurde das Protein Survivin erstmals beschrieben (Ambrosini et al., 1997). Es gehört zu der Proteinfamilie der Inhibitoren der Apoptose (IAP). Es zählt heute zu den wichtigsten Tumormarkern. Außer in embryonalem Gewebe ist Survivin im gesunden Gewebe nicht nachweisbar. In vielen Tumoren wie dem Lungenkarzinom, Blasenkarzinom, Pankreaskarzinom oder Prostatakarzinom ist die Survivin Expression hochreguliert (Jaiswal et al., 2015, Kishi et al., 2004). Neben Apoptose hemmenden Eigenschaften, nimmt Survivin Einfluss auf den

Zellzyklus und fördert die Angiogenese in Krebszellen (Garg et al., 2016). Aufgrund seiner zentralen Stellung in Krebszellen, bildet die Regulierung von Survivin einen wichtigen Ansatz in der Krebstherapieforschung auch auf molekularer Ebene (Liu et al., 2017, Ryan et al., 2009).

### **1.2.3 Der Transkriptionsfaktor E2F1**

Das Protein E2F1 zählt zu der Familie der E2F-Transkriptionsfaktoren. Es spielt eine wichtige Rolle vor allem in der G1-Phase des Zellzykluses und wird von dem Tumorsuppressor Protein pRb reguliert. Es ist an der Apoptose Regulation sowie an der Expression von Zytokinen und Wachstumsfaktoren beteiligt (Ertosun et al., 2016). Während in nicht veränderten Zellen E2F1 eine Schutzfunktion übernimmt, wirkt es in aggressiven Tumorzellen, wie denjenigen des malignen Melanoms oder in Zellen des Prostatakarzinoms, als Onkogen. Eine mögliche Ursache könnte in einer Störung des programmierten Zelltodes durch die Inhibition von Tumorsuppressorgenen liegen. Die genauen Mechanismen sind jedoch ungeklärt (Knoll et al., 2013).

### **1.2.4 Der Transkriptionsfaktor Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3)**

Der Transkriptionsfaktor Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) gehört zu der STAT-Familie, die sowohl Signalübertragung durch das Zytoplasma vermitteln, als auch an der Transkription beteiligt sind. STAT3 übernimmt eine wichtige Funktion in der Regulation zellulärer Prozesse wie Zellproliferation, Differenzierung, Apoptose oder bei Entzündungsreaktionen. Aktiviert wird STAT3 auf unterschiedlichen Wegen u.a. durch Zytokine, Toll-like Rezeptoren, Wachstumsfaktoren oder microRNA (miRNA) (Kuchipudi, 2015, Yuan et al., 2015). Während in gesunden Zellen die Aktivierung von STAT3 einer strengen Kontrolle unterliegt, konnte in unterschiedlichen Tumorarten eine konstitutive Aktivierung von STAT3 beobachtet werden, wodurch STAT3 an der Entstehung und Progression von Tumoren wie dem Mammakarzinom oder dem Adenokarzinom beteiligt ist. Ähnlich wie Survivin, stellt die Regulierung von

STAT3 einen weiteren Ansatz in der Krebstherapie dar (Zhou et al., 2015, Banerjee and Resat, 2016, Yu et al., 2014).

### **1.3 Die Atherosklerose**

Die Atherosklerose ist eine chronisch entzündliche Erkrankung der arteriellen Gefäße. Die durch Atherosklerose bedingten Folgeerkrankungen wie koronare Herzerkrankungen (KHK) oder Schlaganfälle zählen zu den häufigsten Todesursachen, nicht nur in Europa, sondern auch in den USA und in Teilen Asiens (Ross, 1999, Lusic, 2000, Go et al., 2013). Zu den Risikofaktoren zählen Diabetes mellitus, Hypertonie, Hyperlipidämie und Rauchen (Altman, 2003).

Die Endothelzellschicht stellt in gesunden Arterien eine selektive Barriere zwischen Blut und Gefäß dar, dient dem Stoffaustausch und bildet zusammen mit einer subendothelialen Bindegewebsschicht sowie der Membrana elastica interna, die Tunica intima. Die Tunica intima ist eine von drei Schichten, aus denen Arterien aufgebaut sind. Die äußere Schicht bildet die Tunica adventitia, gefolgt von der Tunica media und der Tunica intima (Lüllman-Rauch, 2009, Aumüller et al., 2007). Zu Beginn der Atherogenese kommt es zu einer Schädigung der Endothelzellen (Kuhlmann et al., 2014). Schließlich nimmt die Intima durch extra- und intrazelluläre Lipidablagerungen zu und in Folge dessen kommt es zu einer chronischen Inflammation (Welsch and Deller, 2010).

Stellen, an denen sich Blutgefäße verengen oder krümmen, sind besonders von atherosklerotischen Veränderungen betroffen. Gleiches gilt für Bifurkationen. Der Grund hierfür liegt in der Hämodynamik (Kuhlmann et al., 2014). Endothelzellen reagieren sensibel auf Veränderungen des Blutflusses. An den Verengungen oder Krümmungen kommt es zu einem niedrigeren Scherstress, d.h. zu einer Verringerung der auf den Blutfluss wirkenden Kraft (Pan, 2009, Bruhn et al., 2011). Dies führt zu einer Veränderung der Morphologie der Endothelzellen und in Folge dessen zu einem vermehrten Durchtritt von Low Density Lipoprotein (LDL) in das subendotheliale Gewebe (Kuhlmann et al., 2014). LDL ist für den Transport des Cholesterins im Blut verantwortlich. In Studien konnte nachgewiesen werden, dass hohe Cholesterinkonzentrationen einen großen

Einfluss auf Herz-Kreislaufkrankungen haben (Hansson and Hermansson, 2011).

Die vermehrte Ansammlung von LDL im subendothelialen Gewebe führt zu einer initialen Gefäßwandläsion und ist kennzeichnend für eine beginnende Atherosklerose. Ein weiteres Charakteristikum ist die Bildung von Schaumzellen. Die Akkumulation von LDL und dessen Oxidation führt zu einer Aktivierung der Endothelzellen, wodurch es u.a. zu einer vermehrten Expression von Chemokinen wie dem monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1) sowie von Adhäsionsmolekülen wie intercellular adhesion molecule-1 ICAM-1, vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) und E-Selektin kommt. Dies führt zu einer Steigerung der Rekrutierung von Lymphozyten und Monozyten aus der Blutbahn in die Tunica Intima. Die Monozyten proliferieren vermehrt zu ortsständigen Makrophagen, die über Scavenger- Rezeptoren unkontrolliert LDL aufnehmen. Es kommt zur Schaumzellbildung durch die lipidgefüllten Makrophagen und zur Aufrechterhaltung und Steigerung der vaskulären Inflammation. Entzündungsmediatoren wie Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) oder Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) werden verstärkt exprimiert, sodass es zu einer Ausdehnung des entzündlichen Prozesses auf die Tunica media kommt. Akkumulierte Schaumzellen werden von einer fibrösen Kappe überzogen, die im inneren einen lipidreichen Kern enthalten und auch als Plaques bezeichnet werden. Kommt es zu einer Ausdünnung der fibrösen Kappe, kann es zu einer Plaqueruptur kommen (Zimmer, 2013, Kuhlmann et al., 2014, Hansson and Hermansson, 2011). Dabei kommt Thromboplastin, ein Protein, welches die Blutgerinnung beeinflusst und von Endothelzellen, Schaumzellen, Monozyten sowie aus dem Plaquekern exprimiert wird, in Kontakt mit den im Blut zirkulierenden Gerinnungsfaktoren. Folglich kommt es zur Thrombenbildung und zu einem erhöhten Risiko des Gefäßverschlusses (Kuhlmann et al., 2014).

Abhängig vom Schweregrad der Atherosklerose werden konservative, medikamentöse oder chirurgische Therapieverfahren gewählt. Die medikamentöse Therapie zielt auf die Behandlung der Grunderkrankung wie z.B. Diabetes mellitus, Hypertonie oder Fettstoffwechselstörungen ab (Piepoli et al., 2016). Neben der Bypassoperation zählt die minimalinvasive perkutane

transluminale coronare Angioplastie mit Stentimplantation zu den Standardtherapiemaßnahmen. In der Stenttherapie werden entweder unbeschichtete, Bare Metal Stents (BMS) oder beschichtete, Medikamente freisetzende Stents, sogenannte Drug eluting Stents (DES) genutzt. Bei beiden Stentformen kann es zu Komplikationen kommen. Insbesondere bei BMS traten In-Stent-Restenosen (IRS) sowie Stentthrombosen (ST) auf. Durch den Einsatz von DES konnten Verringerungen dieser Komplikationen erzielt werden, jedoch traten neue Nebenwirkungen auf, wie die durch eine verzögerte Reendothelialisierung verlängerte Hemmung der Thrombozytenaggregation (Byrne et al., 2015, Toklu and Bangalore, 2014, Koenig et al., 2017b). Vor diesem Hintergrund werden neue Beschichtungsverfahren untersucht, die zum Ziel haben, in die endotheliale Dysfunktion einzugreifen.

Die Therapie auf molekularer Ebene ist dabei ein vielversprechender Ansatz (Koenig et al., 2017a). Hierzu benötigt man Modellzellen wie die folgend beschriebene immortalisierte Endothelzelllinie EA.hy926 sowie ein beispielhaftes Ziel (ICAM-1), dessen Expressionsverringern durch siRNA zur verbesserten Einheilung eines Stents beitragen würde.

### **1.3.1 EA.hy926 Zelllinie**

Zellen aus der EA.hy926 Zelllinie sind Epithelzellen, die aus einer Hybridisierung von Endothelzellen der humanen Vena Umbilicalis sowie aus der Zelllinie A549 eines Lungenkarzinoms hervorgegangen sind (Edgell et al., 1983). Dabei weisen diese Zellen ähnliche Eigenschaften auf, wie die reiner vaskulärer Endothelzellen. Zu diesen Eigenschaften gehören z.B. die Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1, der Gewebefibrinolyseaktivator tPA sowie das Peptidhormon Endothelin-1 (Emeis and Edgell, 1988, Aranda and Owen, 2009).

### **1.3.2 Das Interzelluläre Adhäsionsmolekül ICAM-1**

Das Adhäsionsmolekül ICAM-1 auch als Cluster of Differentiation (CD 54) bekannt, ist ein Glycoprotein, welches der Superfamilie der Immunglobuline zugeordnet werden kann und das von verschiedenen Zellen wie den Endothelzellen oder Zellen des Immunsystems (z.B. Leukozyten) exprimiert wird (Roy et al., 2001). Bei Patienten mit Atherosklerose oder koronaren Herzerkrankungen kommt es zu einer Steigerung der ICAM-1 Konzentration. ICAM-1 ist maßgeblich an Entzündungsprozessen sowie an der Plaquebildung beteiligt (Lawson and Wolf, 2009). Durch den Einsatz von siRNA gegen ICAM-1 konnte eine Suppression des Proteins in Endothelzellen festgestellt werden (Walker et al., 2005, Koenig et al., 2017b).

### **1.3.3 Der Tumornekrosefaktor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )**

Entzündliche Prozesse im Körper werden durch zahlreiche Mechanismen gesteuert u.a. durch das entzündungsfördernde Zytokin TNF- $\alpha$ , das zur TNF/TNFR Superfamilie gehört. TNF- $\alpha$  wirkt über zwei Signalwege, über den Rezeptor TNF-R1 und den Rezeptor TNF-R2. Auf diese Weise nimmt TNF- $\alpha$  Einfluss auf die Produktion wichtiger entzündlicher Mediatoren wie z.B. proinflammatorische Zytokine, Prostaglandine oder den plättchenaktivierenden Faktor (PAF), der an der Thrombozytenaggregation beteiligt ist. Darüber hinaus beeinflusst es auch die Zellproliferation, die Differenzierung und den programmierten Zelltod. TNF- $\alpha$  wird hauptsächlich durch Makrophagen und T-Lymphozyten produziert. Zahlreiche weitere Zellen wie B-Lymphozyten, Fibroblasten oder Endothelzellen können ebenfalls TNF- $\alpha$  exprimieren (De Paepe et al., 2012, Parameswaran and Patial, 2010, Bradley, 2008).

Untersuchungen ergaben, dass TNF- $\alpha$  nicht nur eine entscheidende Rolle bei entzündlichen Prozessen spielt sondern auch Einfluss auf entzündliche Erkrankungen wie die rheumatoide Arthritis, Psoriasis oder Atherosklerose hat (Bradley, 2008).

## **1.4 Die Benigne Prostatahyperplasie (BPH)**

Unter der benignen Prostatahyperplasie (BPH) versteht man eine Vergrößerung der Prostata durch eine Hyperplasie des stromalen und epithelialen Gewebes (Dhingra and Bhagwat, 2011). Sie tritt mit einer Prävalenz von 20% bei Männern um 40 Jahre auf und steigt bis auf 90% bei Männern zwischen 80 und 90 Jahren. Damit zählt die BPH zu einem der häufigsten benignen Tumore bei Männern (Roehrborn, 2005). Zu den klinischen Symptomen zählen Störungen der Blasenentleerung sowie erektile Dysfunktionen, die die Lebensqualität erheblich beeinträchtigen können (Gratzke et al., 2015, Vuichoud and Loughlin, 2015).

Die Prostata (Vorsteherdrüse) ist eine Drüse, die einen Großteil des männlichen Ejakulats produziert. Sie ist von einer bindegewebigen Kapsel umgeben und befindet sich an der Basis der Harnblase. Mit einem Lobus dexter und sinister umfasst die Prostata die Harnröhre (Urethra) (Aumüller et al., 2007). Klinisch werden drei Zonen unterschieden: die innere, urethrale Zone umfasst die Harnröhre, gefolgt von der Transitionalzone, einer breiten Zwischenzone sowie einer Außenzone der Prostata (Lippert, 2007). Bei der BPH kommt es zu einer Vergrößerung vornehmlich der Transitionalzone.

Die Ätiopathogenese der BPH ist komplex und bis heute nicht geklärt. Es wird davon ausgegangen, dass unterschiedliche Faktoren Einfluss auf die Entwicklung einer BPH nehmen. Hormone wie Androgene, wozu auch Dihydrotestosteron zählt und Östrogene spielen dabei eine wichtige Rolle. Medikamente wie 5 $\alpha$ -Reduktase-Inhibitoren zur Senkung der Dihydrotestosteron Konzentration finden therapeutische Anwendung, jedoch nicht immer mit dem gewünschten Erfolg (Nicholson and Ricke, 2011, Roosen et al., 2013). In klinischen Studien konnte nachgewiesen werden, dass auch inflammatorische Prozesse Einfluss auf die Entwicklung einer BPH nehmen und die Proliferation der epithelialen und stromalen Zellen begünstigen (Roosen et al., 2013, Delongchamps et al., 2008). Darüber hinaus spielt auch die genetische Disposition eine Rolle bei der Entwicklung einer BPH (Pearson et al., 2003).

Die BPH wird sowohl pharmakologisch als auch operativ behandelt. Die Wahl des Therapieverfahrens richtete sich nach dem Schweregrad der Erkrankung

(Gratzke et al., 2015). Der Goldstandard beim operativen Vorgehen sind minimalinvasive Eingriffe wie die transurethrale Prostatektomie (TUR-P) oder transurethrale Prostatektomie sowie die lasergestützte Operation. Bei allen operativen Therapieverfahren besteht die Gefahr einer Harnröhrenstriktur. Dabei kommt es zu einer narbigen Verengung der Harnröhre durch eine erhöhte Proliferation von Fibroblasten und infolgedessen zu Miktionsstörungen (Nath et al., 2015, Tritschler et al., 2013). Aufgrund der Komplexität der Entstehungsursache einer BPH und der mit der Therapie verbundenen Nebenwirkungen und Risiken mit z.B. hohen Rezidivraten nach einer Behandlung von Harnröhrenstrikturen, könnte der Einsatz von siRNA zur Hemmung der Zellproliferation ein weiterer Therapieansatz sein (Chen et al., 2016, Nolte et al., 2013).

#### **1.4.1 Fibroblasten**

Fibroblasten sind Zellen des Bindegewebes. Sie sind an der Synthese der Extrazellulärmatrix beteiligt und überwachen deren Abbau. Es werden zwei Zellformen unterschieden Fibroblast und Fibrozyt. Dabei handelt es sich bei Fibroblasten um die aktive Zellform und bei Fibrozyten um die inaktive Zellform. Kommt es zu einer Steigerung der Fibroblastenaktivität z.B. bei inflammatorischen Prozessen, führt dies zu einer Vermehrung von Kollagen und als Folge zu funktionaler Beeinträchtigung von Geweben und Organen (Lüllman-Rauch, 2009, Welsch and Deller, 2010).

#### **1.4.2 Der Transkriptionsfaktor Serum- Response- Faktor (SRF)**

Der Serum- Response- Faktor zählt zu den Transkriptionsfaktoren und ist ein im menschlichen Organismus ubiquitär auftretendes Protein, welches genregulatorische Wirkung besitzt. Über eine spezifische DNA-Sequenz CC(A/T)<sub>6</sub>GG auch genannt CArG-Box, bindet dieses sich an das entsprechende Zielgen und ist beteiligt am Zellwachstum, der Differenzierung, am Zellzyklus, der Apoptose, an der Organisation des Zytoskeletts und an der Regulation von Immediate early Genen (IEG's) wie dem Protoonkogen c-Fos (Huet et al., 2005,

Chai and Tarnawski, 2002, Prencipe et al., 2015). Aktiviert wird SRF u.a. durch Lysophosphatidsäuren (LPA), Lipopolysaccharide (LPS), Zytokinen und TNF- $\alpha$ . Die SRF Expression selbst wird dabei auf unterschiedlichen Wegen gesteuert z.B. durch Co-Faktoren, zelluläre Signaltransduktion oder weiteren Transkriptionsfaktoren wie ATF6 (Chai and Tarnawski, 2002).

Studien haben gezeigt, dass es einen Zusammenhang zwischen SRF und der Entwicklung eines Prostatakarzinoms gibt. SRF beeinflusst nicht nur das Überleben von Prostatakarzinomzellen, sondern es konnte auch der Einfluss von SRF auf den Differenzierungsgrad eines Prostatakarzinoms festgestellt werden (Fitzgerald et al., 2014).

Untersuchungen auf molekularer Ebene haben ergeben, dass mit Hilfe von siRNA gegen SRF die Expression von SRF sowohl in primären Fibroblasten als auch in primären glatten Muskelzellen reduziert werden konnte (Nolte et al., 2013, Werth et al., 2010). Dies wiederum führte zu einer verringerten Zellvermehrung und könnte als mögliches therapeutisches Ziel dazu dienen, das Risiko der Entstehung von Harnröhrenstrikturen zu verringern.

## **1.5 Das Prostatakarzinom**

Bei Männern zählt das Prostatakarzinom zu einer der häufigsten, potenziell tödlichen Krebserkrankungen. Die Ursache ist bisher noch ungeklärt, es gibt jedoch bestimmte Risikofaktoren und weitergehende Hypothesen über Entstehungsursachen. Neben dem Alter (das mittlere Erkrankungsalter liegt in Deutschland bei 72 Jahren) gilt auch genetische Disposition als Risikofaktor (RKI, 2018 , Daniyal et al., 2014). Auch wird vermutet, dass eine Prostatitis oder sexuell übertragbare Erkrankungen das Risiko an einem Prostatakarzinom zu erkranken erhöhen (RKI, 2018 ). Histologisch geht das Prostatakarzinom häufig vom Drüsengewebe aus, ein sogenanntes Adenokarzinom. Die Erkrankung kann lange Zeit symptomlos verlaufen. Erste Anzeichen können Beschwerden bei der Miktion oder erektile Dysfunktion sein (Alizadeh and Alizadeh, 2014). Die Therapie ist abhängig vom Stadium des Prostatakarzinoms. Aktuelle Therapiemaßnahmen sind Prostataektomie, Radiotherapie und endokrine

Therapie. Die Therapiemaßnahmen werden einzeln oder in Kombination angewendet (Litwin and Tan, 2017). Sowohl die Prostataektomie als auch die Radiotherapie weisen Nebenwirkungen auf, die die Lebensqualität erheblich beeinträchtigen wie z.B. Inkontinenz, erektile Dysfunktion, Strikturen der Harnröhre, Strahlenproktitis oder eine durch Strahlen verursachte Entzündung der Urethra (Chen et al., 2014, Pietschke et al., 2014).

Mit zunehmendem Alter steigt nicht nur das Risiko an einem Prostatakarzinom zu erkranken, sondern auch die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Begleiterkrankungen, häufig aus dem kardiovaskulären Bereich. Dies kann dazu führen, dass eine Behandlung erschwert bzw. unmöglich wird. Kommt es durch das Prostatakarzinom zu einer Harnröhrenstriktur und ist eine Operation nicht möglich, können thermo expandierbare Stents zur Behandlung der Striktur eingesetzt werden (Pietschke et al., 2014, Sethi et al., 2017). Dabei handelt es sich jedoch nur um ein Verfahren, die Symptome zu lindern. Studien laufen, um ein Beschichtungsverfahren mit siRNA zu etablieren, um auf die Zellproliferation der Krebszellen einzuwirken und diese im Wachstum zu hemmen (Pietschke et al., 2014).

### **1.5.1 PC-3 Zelllinie**

Die epitheliale PC-3 Zelllinie wurde 1979 etabliert und zählt zu den am häufigsten verwendeten Zelllinien zur Forschung im Bereich des Prostatakarzinoms (ATCC, 2021b, Tai et al., 2011). Diese Zellen stammen von einem humanen in den Knochen metastasierenden Prostatakarzinom, zeichnen sich unter anderem durch ein sehr aggressives Wachstum aus (Kaighn et al., 1979, Tai et al., 2011).

## **1.6 Gen- Silencing durch RNA- Interferenz (RNAi) mit siRNA**

In den vorherigen Abschnitten wurde deutlich, dass obwohl die unterschiedlichsten Krankheiten individuelle Therapiekonzepte benötigen, siRNA ein gemeinsamer Nenner sein kann. siRNA hat nicht nur großes Potential zur Entwicklung neuer Therapiestrategien, sondern kann auch dabei helfen bereits

bestehende Therapien zu unterstützen beispielsweise durch die gleichzeitige Verwendung von Chemotherapie und siRNA.

Im Jahr 1990 entdeckten Forscher erstmals den Mechanismus der RNA-Interferenz in Pflanzen, der später auch in tierischen Zellen nachgewiesen wurde und für den 2006 die Forscher Andrew Zachary Fire und Craig Cameron Mello den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin erhielten. Heute stellt diese Entdeckung einen wichtigen Bestandteil der molekularen Grundlagenforschung dar. RNAi ist ein endogener Prozess, bei dem durch siRNA oder microRNA (miRNA) Einfluss auf die Regulation der Proteinsynthese in eukaryotischen Zellen genommen wird. Ziel dieses Mechanismus ist das Gen-Silencing, bei dem die Expression von Target-Genen vermindert bis vollständig unterdrückt wird (Lee et al., 2013).

### **1.6.1 Aufbau und Struktur von siRNA**

Unter Small interfering RNA (siRNA) versteht man doppelsträngige, nicht kodierende Moleküle aus Ribonukleinsäure, die aus 20 bis 25 Nukleotide bestehen. Es gibt sowohl endogen als auch exogen synthetisierte siRNA. Die Vorläufer siRNA Bildung erfolgt aus doppelsträngiger RNA (dsRNA), z.B. durch Viren oder künstlich eingebrachte siRNA. Strukturell unterscheidet man bei der siRNA ein phosphoryliertes 5`Ende sowie ein hydroxyliertes 3`Ende mit zwei überhängenden Nukleotide (Ryther et al., 2005).

Seit der Entdeckung des RNAi Mechanismus wird exogen synthetisierte siRNA in vielen Bereichen der Forschung eingesetzt, um neue Therapien zu entwickeln, bei z.B. inflammatorischen Erkrankungen, Virusinfektionen oder Krebserkrankungen (Chakraborty et al., 2017). Über die Jahre haben Studien gezeigt, dass exogen zugeführte siRNA das angeborene Immunsystem aktivieren kann. Ursachen hierfür sind u.a. die Sequenz der siRNA, die Struktur oder das Transportsystem, welches exogen zugeführte siRNA benötigt, um in Zellen eingeschleust zu werden (Meng and Lu, 2017). Eine Sequenzabhängige immunstimulatorische Wirkung wurde beispielsweise bei einer 5`-GUCCUCAA-3` Nukleotidabfolge des siRNA- Sense-Strangs beschrieben (Hornung et al.,

2005). Auch die Sequenzen 5`-UGU-3` und 5`-UGUGU-3` zeigten eine Stimulierung des Immunsystems (Judge et al., 2005). Während dieser sogenannte immunstimulatorische Effekt bei bestimmten Erkrankungen verheerend sein kann, kann bei anderen Erkrankungen wie z.B. bei Tumoren, dieser Effekt nützlich sein (Meng and Lu, 2017).

Der zweite, ebenso nicht zu vernachlässigende Effekt ist der sogenannte Off-Target-Effekt im Rahmen von Therapien. Dabei kann es sein, dass synthetisch hergestellte siRNA nicht nur der messenger RNA (mRNA) des stillzulegenden Proteins komplementär ist, sondern auch einer mRNA mit ähnlicher Basenabfolge dessen Proteinstillegung nicht Teil der Therapie ist. Im schlimmsten Fall werden dabei für die Zelle essenzielle Proteine stillgelegt.

### **1.6.2 Mechanismus der RNAi**

Der erste Schritt bei der Regulierung der Genexpression durch RNAi erfolgt durch Dicer, einem RNase Typ- III Enzym, dass die Synthese kurzer siRNA Fragmente aus langkettiger dsRNA katalysiert (Lau et al., 2012). Dicer hat u.a. eine PAZ-Bindungsdomäne (Piwi-Argonaute-Zwille/Pinhead Domäne), an die dsRNA gebunden wird sowie zwei RNase- III ähnliche Domänen, die an der Spaltung der dsRNA beteiligt sind (Vermeulen et al., 2005). Die entstandene siRNA enthält am 3`Ende einen 2-Nukleotid Überhang. Mit dem 5` Ende, welches thermodynamisch instabiler ist und mit Hilfe von Dicer und dem Transactivation response RNA binding Protein (TRBP), wird die siRNA in den sogenannten RNA-induced silencing complex (RISC Komplex) eingeschleust. RISC enthält u.a. Ago2, ein Protein aus der Argonauten Proteinfamilie. Die doppelsträngige siRNA wird getrennt und ein siRNA antisense Strang bindet sich komplementär an die einzelsträngige Ziel mRNA. Die mRNA wird gespalten und abgebaut. Hierdurch kommt es zu einer Verringerung der Ziel- Gene bis hin zum Knockdown (Dana et al., 2017, Gredell et al., 2010, Daniels and Gatignol, 2012).

### 1.6.3 Transfektion der siRNA

Unter Transfektion versteht man ein Verfahren zur Einbringung von siRNA in den Zellorganismus (Kim and Eberwine, 2010). Dabei sind sogenannte Transportvehikel notwendig, um die siRNA vor RNasen im Cytoplasma zu schützen. RNasen sind Enzyme, die am Abbau von RNA beteiligt sind. Ein weiterer Grund für die Notwendigkeit von Transportvehikeln ist die unterschiedliche Ladung von Zellmembran und siRNA. Die negative Ladung sowie die Hydrophilie der Zellmembran verhindern bzw. erschweren die Aufnahme nackter siRNA. Auch kann es vorkommen, dass die siRNA, aufgrund ihrer Größe von unter 10 Nanometer (nm), das Endothel der Nierenglomeruli passiert und auf diesem Weg schnell aus dem Körper ausgeschieden wird, ohne an ihren Wirkort zu gelangen. Aus diesem Grund wurden in den letzten Jahren unterschiedliche Ansätze verfolgt, so z.B. die chemische Modifikation der siRNA oder die Nutzung viraler und nicht-viraler Trägersysteme, um diese Problematiken zu umgehen. So ergab die Modifikation des Phosphodiester (PO) Gerüsts, bei dem die PO- Bindung durch eine Phosphorothioat (PS) Bindung, also Sauerstoff durch Schwefel ersetzt wird, unter anderem eine erhöhte Nukleaseresistenz. Jedoch kann eine umfangreiche PS-Optimierung auch zu erhöhter Zelltoxizität sowie zu unspezifischen Proteinbindungen führen (Roberts et al., 2016).

Die Verwendung viraler Vektorsysteme ist eine effektive Transfektionsmethode. Jedoch ist auch sie mit Nebenwirkungen verbunden. Es kann zur Zelltoxizität kommen, zu Entzündungsreaktionen mit schwerwiegenden Folgen sowie zu Genmutationen, da sich virale Vektoren nach dem Zufallsprinzip in den Wirt integrieren. Als Folge dessen, kann es zur Aktivierung von Onkogenen kommen oder zur Störung anderer wichtiger Gene (Kim and Eberwine, 2010).

Die Verwendung nicht- viraler Trägersysteme zur Transfektion von siRNA hat in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen und zählt zu den wichtigsten Transportsystemen. Dazu gehören u.a. kationische Polymere, kationische Lipide oder Peptid basierte Trägersysteme. So werden beispielsweise Liposomen bereits erfolgreich zur Transfektion von siRNA eingesetzt (Dana et al., 2017, Kim and Eberwine, 2010). Der Vorteil von nicht-

viralen Trägersystemen liegt u.a. in einer geringeren Zelltoxizität sowie darin, dass sie nur eine geringere oder keine Immunantwort auslösen. Nachteilig auswirken kann sich jedoch eine möglicherweise geringere Transfektionseffizienz (Oliveira et al., 2006). Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Transfektionsreagenz INTERFERin® zählt zu den nicht-viralen Trägersystemen und funktioniert auf Basis der Lipofektion. Unter Lipofektion versteht man das Einschleusen von DNA oder RNA in die Zelle mit Hilfe von kationischen Lipiden. Es kommt zu einer Fusion der RNA oder DNA mit den kationischen Lipiden. Dieser Komplex wird durch Endozytose in die Zelle aufgenommen und die RNA freigesetzt (Mühlhardt, 2006).

#### **1.6.4 Off- Target- Effekte und Probleme beim RNAi Mechanismus**

Unter Off- Target- Effekten versteht man solche Effekte, die neben der eigentlich erwarteten Reaktion auftreten. Während man zunächst davon ausging, dass siRNAs hochspezifisch sind, haben neuere Untersuchungen gezeigt, dass Off-Target-Effekte sowohl durch die verwendete siRNA selbst als auch durch das verwendete Transfektionssystem entstehen können (Jackson and Linsley, 2010). Sie zeigten sich z.B. in Form einer geringeren Spezifität der siRNA, in einer erhöhten Zelltoxizität sowie in der Aktivierung des angeborenen Immunsystems (Jackson and Linsley, 2010). Weitere Experimente zeigten einen Zusammenhang zwischen der siRNA Sequenz und Off-Target- Effekten. Zur Reduzierung solcher Off-Target-Effekte sollte ausgehend vom 5`Ende des Leitstrangs ein G/C Nukleotid auf Position 19 eingefügt werden. Eine G/C Abfolge sollte nicht länger als 9 Nukleotide sein sowie ein A oder U-Rest an Position 1 des Leitstrangs haben (Ui-Tei, 2013).

#### **1.6.5 Scrambled- bzw. Non- targeting- siRNA (SCR-siRNA)**

Scrambled siRNAs (SCR-siRNA) oder auch Non- targeting siRNAs werden als Negativkontrollen bei in In-vitro- und In-vivo-Studien eingesetzt. Denn um bestmögliche, zuverlässige Versuchsergebnisse zu erzielen ist es notwendig, bei experimentellen Versuchen Kontrollproben einzusetzen. Besonders Off-Target-

Effekte sind immer wieder der Grund für falsch positive Ergebnisse (Buehler et al., 2012, 2003).

SCR-siRNA sind so konzipiert, dass sie eigentlich keine Auswirkungen auf die Expression des Ziel-Gens haben sollten (Echeverri et al., 2006). Kritisch zu bewerten ist, dass auch solche Negativkontrollen Nebeneffekte auslösen können und Ergebnisse beeinträchtigen können (Echeverri et al., 2006, Nolte et al., 2013). Beispielsweise entdeckten Nolte et.al eine erhöhte Expression von SRF bei der Verwendung einer scrambled siRNA (Nolte et al., 2013). Vor diesem Hintergrund ist eine sorgfältige Auswahl der Negativkontrollen von erheblicher Bedeutung, um die Fehleranfälligkeit von Kontrolluntersuchungen zu reduzieren.

## **1.7 Fragestellung**

Ziel dieser Arbeit ist es, die small interfering RNA (siRNA) basierten Therapieoptionen im Bereich des Lungenkarzinoms, der Atherosklerose, des Prostatakarzinoms und der benignen Prostatahyperplasie, die Gegenstand der Forschung sind, im Klinischen Forschungslabor für Thorax-, Herz und Gefäßchirurgie Tübingen, zu unterstützen. In vorangegangenen siRNA basierten Versuchen, hatte sich gezeigt, dass die im Forschungslabor verwendete scrambled siRNA der Firma Qiagen, in der vorliegenden Arbeit als SCRalt-siRNA bezeichnet, Einfluss auf das Zellverhalten, in unterschiedlichem Ausmaß hatte. SCR-siRNAs werden in Versuchen als Kontroll-siRNAs eingesetzt und sollten in der gängigen Theorie keinen Einfluss auf die Stimulation oder dem Knockdown von Proteinen haben.

Im Speziellen geht es darum, diejenige scrambled siRNA zu identifizieren, die den geringsten Einfluss auf das Zellverhalten hat und die somit am geeignetsten ist, als Referenz für weitere Versuche zu dienen. Dabei wurde die SCRalt-siRNA der Firma Qiagen zusammen mit drei weiteren SCR-siRNAs (in der vorliegenden Arbeit als SCR1-, SCR2-, SCR3-siRNA bezeichnet) der Firma Eurofins MWG Operon an unterschiedlichen Zelllinien untersucht. Die unterschiedlichen Zelllinien, sollten vier unterschiedliche Erkrankungen repräsentieren: das nicht-kleinzellige Lungenkarzinom, die Atherosklerose, die benigne

Prostatahyperplasie sowie das Prostatakarzinom. Zusätzlich wurde auch das Transfektionsmittel INTERFERin® untersucht, inwieweit es Einfluss auf das Zellverhalten hat.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Tabelle 1: Verwendete Geräte

<b>Gerätetyp</b>	<b>Hersteller</b>
Autoklav: Systec dx-23	Systec GmbH, Linden, Deutschland
Axiovert 40 CFL Mikroskop von Carl Zeiss™	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
BioPhotometer Plus (RNA-Konzentrationsmessung)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Brutschrank Heraeus® 6000	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
CASY® Cellcounter & Analyzer	Schärfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland
CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, Vereinigte Staaten von Amerika
DPU- 414 Thermal Printer	Seiko Instruments GmbH, Neu- Isenburg, Deutschland
FACScan®	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
FACScan®: PC Programm CellQuestPro Version 4	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Gefrierschrank -20°C	Liebherr, Kirchdorf, Deutschland

Gefrierschrank -80°C	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Heraeus® Herasafe® Sicherheitswerkbank	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau, Deutschland
Laminar-Flow-Sicherheitswerkbank BDK Klasse 2 (Sterilwerkbank)	BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl, Deutschland
Liebherr Premium Kühlschrank	Liebherr, Kirchdorf, Deutschland
Mastercycler® Gradient	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
PCR-Platten Zentrifuge PerfectSpin P	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Stickstoffbehälter LS 750	tec-lab GmbH, Taunusstein, Deutschland
Tischzentrifuge: Centrifuge 5415 R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Inc., New York, Vereinigte Staaten von Amerika
Vortexer UZUSIO VTX-3000L	LMS Corp., Tokio, Japan
Wasserbad GFL 1083	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
Zentrifuge Zellkultur: Varifuge 3.2RS	Heraeus Sepatech, Hanau, Deutschland

## 2.1.2 Software

Tabelle 2: Verwendete Software

	Software	Version	Firma
FACS® Auswertung	CellQuestPro		BD Bioscience, San Jose, Vereinigte Staaten von Amerika
qRT-PCR Auswertung	CFX Manager	3.1	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, Vereinigte Staaten von America
Statistik Programm	GraphPad Prism 5	5.01	GraphPad Software, La Jolla, Vereinigte Staaten von Amerika

## 2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Verwendete Verbrauchsmaterialien

<b>Materialien</b>	<b>Hersteller</b>
12- Well- Zellkulturplatte	Corning® Inc., New York, Vereinigte Staaten von Amerika
95- Well- PCR- Platte, Twin.tec Plate 96	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
0,2 ml Eppendorf Tube® safe-lock PCR clean DNA lowBind	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
0,5 ml Eppendorf Tube® safe lock PCR clean DNA lowBind	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

1,5 ml Eppendorf Tube® safe lock PCR clean DNA lowBind	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
2 ml Eppendorf Tube® safe lock PCR clean DNA lowBind	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
5 ml Stripette	Corning Inc., New York, Vereinigte Staaten von Amerika
10 ml Stripette	Corning Inc., New York, Vereinigte Staaten von Amerika
25 ml Stripette	Corning Inc., New York, Vereinigte Staaten von Amerika
FACS- Röhrchen PP steril, 15 ml	BD Bioscience, San Jose, Vereinigte Staaten von Amerika
Falcon 15 ml	BD Bioscience, San Jose, Vereinigte Staaten von Amerika
Messküvette für Photometer UVette® 220-1600 nm	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipette 10 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipette 20 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipette 100 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipette 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen Dualfilter 10 µl (PCR clean, steril)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen Dualfilter 20 µl (PCR clean, steril)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen Dualfilter 100 µl (PCR clean, steril)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen Dualfilter 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

(PCR clean, steril)	Deutschland
Zellkulturflasche Cellstar® 175 cm <sup>2</sup>	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturflasche 75 cm <sup>2</sup>	Corning Inc., New York, Vereinigte Staaten von Amerika

#### 2.1.4 Chemikalien

Tabelle 4: Verwendete Chemikalien, Reagenzien und Antikörper

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Ambion® DEPC-Treated Water Nuklease freies Wasser	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Antikörper PE Mouse Anti-Human CD 54	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Aurum™ Total RNA Mini Kit	Bio- Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, Vereinigte Staaten von Amerika
β-Mercaptoethanol	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
CASYton®	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Ethanol absolut	AppliChem Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
FACS™ Clean	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
FACS™ Rinse	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

FACS™- Lösung (12,5g Paraformaldehyd in 500µl DPBS)	Hersteller siehe Einzelkomponenten
Gibco® by Life Technologies™ Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline (DPBS)	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Gibco® by Life Technologies™ Dulbecco`s Modified Eagle Medium, high Glucose (DMEM)	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Gibco® by Life Technologies™ Heat inactivated Fetal Bovine Serum (FBS/FCS)	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Gibco® by Life Technologies™ Pen Strep (Penicillin-Streptomycin) (10,000 Units/mL Penicillin + 10,000 µg/mL Streptomycin)	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Gibco® by Life Technologies™ 0,05% Trypsin-EDTA	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Ham`s F-12K Medium (für PC-3 Zellen)	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
INTERFERin®	Polyplus-transfection®, Illkirch, Frankreich
iQ™ SYBR® Green Supermix	Bio- Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, Vereinigte Staaten von Amerika
iSkript™ cDNA Synthesis Kit	Bio- Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, Vereinigte Staaten von Amerika
L-Glutamin	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte,

	Deutschland
RNase Zap	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Trypsin Neutralizing Solution (TNS)	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland
Tris Puffer	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Paraformaldehyd	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

### 2.1.5 Zelllinien

Für die Versuche wurden vier unterschiedliche Zelllinien verwendet:

1. **PC-3** Zellen sind humane Epithelzellen, die aus einem Prostatakarzinom stammen. Im Vergleich zu anderen Prostatakarzinom-Zelllinien haben PC-3 Zellen ein hohes Risiko zu metastasieren (Pulukuri et al., 2005). Die Zellen wurden von der American Type Culture Collection bezogen = ATCC® CRL-1435™ (ATCC, 2021b).

2. Bei **A549** Zellen handelt es sich um Epithelzellen aus einem humanen Alveolarkarzinom (ATCC, 2021a).

3. **EA.hy926** Zellen sind humane hybrid Epithelzellen, die aus einer Hybridisierung von Endothelzellen der humanen Vena Umbilicalis sowie aus humanen Karzinomzellen hervorgegangen sind (Emeis and Edgell, 1988).

4. **Fibroblasten** sind Zellen, die im Bindegewebe vorkommen und mesenchymalen Ursprungs sind (Lüllman-Rauch, 2009). Sie sind an der Synthese von Proteinen beteiligt, die Kollagen und Elastin produzieren. Beide Produkte sind wichtige Bestandteile der Extrazellulärmatrix (Lynch and Watt, 2018). Die hier verwendeten humanen Fibroblasten stammen aus der Prostata von Patienten, die sich einer transurethralen Resektion der Prostata unterzogen hatten (Nolte et al., 2013). Die Zellen wurden isoliert und eingefroren von Studenten des THG-Labors, Tübingen. Die Passagen 1-3 wurden verwendet.

Tabelle 5: Verwendete Zelllinien

<b>Zelllinie</b>	<b>Hersteller</b>
PC-3 (ATCC® CRL-1435™)	LGC Standards GmbH, Wesel, Deutschland
A549 (ATCC®, Nr. CRL-185™).	LGC Standards GmbH, Wesel, Deutschland
EA.hy926 (ATCC® CRL-2922™).	LGC Standards GmbH, Wesel, Deutschland
Fibroblasten	Isolierte Zellen aus der Prostata durch Studenten des THG-Labors, Tübingen, Deutschland Passagen 1-3

### **2.1.6 Verwendete Medien bei Zellkultivierung**

Zur Kultivierung der Zellen werden Medien zu ihrer Ernährung benötigt. Für die Zelllinien A549, EA.hy926 und Fibroblasten wurde Dulbecco's Modified Eagle's Medium high glucose 500ml (DMEM) zur Anzucht verwendet. Diesem wurde 10% fetales Kälberserum (engl. fetal bovine serum = FBS) zur Unterstützung des Zellwachstums, 5 ml Pen Strep zur antibiotischen Abdeckung sowie 5 ml der Aminosäure L-Glutamin beigefügt. Für die PC-3 Zellen wurde das Medium Ham's F-12K verwendet und ebenfalls mit 10% FBS, 5 ml Penicillin und Streptomycin sowie 5 ml L-Glutamin versetzt. Die Medien wurden bei einer Temperatur von 4°C gelagert.

## 2.1.7 siRNA Sequenzen

Tabelle 6: Verwendete siRNAs:

Name siRNA	Strang	Sequenz (5` nach 3`)
ICAM-1 hum	Sense	GCCUCAGCACGUACCUCUA
	<b>Antisense</b>	<b>AGAGGUACGUGCUGAGGC</b>
STAT3	Sense	GCCUCUCUGCAGAAUUCAA
	<b>Antisense</b>	<b>UUGAAUUCUGCAGAGAGGC</b>
SRF	Sense	GAUGGAGUUCAUCGACAACAA
	<b>Antisense</b>	<b>GUUGUCGAUGAACUCCAUCUU</b>
SURVIVIN	Sense	GGACCACCGCAUCUCUACA
	<b>Antisense</b>	<b>UGUAGAGAUGCGGUGGUCC</b>
E2F1Val	Sense	GACGUGUCAGGACCUUCGU
	<b>Antisense</b>	<b>ACGAAGGUCCUGACACGUC</b>

Alle in Tabelle 6 aufgeführten siRNAs wurden von der Firma Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland bezogen

## 2.1.8 Scrambled siRNA Sequenzen

Tabelle 7: Verwendete scrambled siRNAs, die miteinander verglichen wurden:

Scrambled siRNA	Strang	Sequenz (5` nach 3`)
<b>Non-specific control Nr. 1</b>	Sense	UAAUGUAAUUGGAACGCAUA
	<b>Antisense</b>	<b>UAUGCGUUCCAAUACAUA</b>
<b>Non-specific control Nr. 2</b>	Sense	AGGUAGUGUAAUCGCCUUG
	<b>Antisense</b>	<b>CAAGGCGAUUACACUACCU</b>
<b>Non-specific control Nr. 3</b>	Sense	UGC GCUAGGCCUCGGUUGC
	<b>Antisense</b>	<b>GCAACCGAGGCCUAGCGCA</b>
<b>Scrambled siRNA alt (SCRalt-siRNA)</b>	Sense	Die Sequenz wird nicht bekannt gegeben.
	<b>Antisense</b>	

Die Non-specific control siRNAs Nr.1-3 wurden von der Firma Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland bezogen und bisher nicht für Versuche im klinischen Forschungslabor für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie Tübingen verwendet.

Die Non-specific control siRNA (hier als SCRalt-siRNA bezeichnet), die bisher im klinischen Forschungslabor für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie, Tübingen bei Versuchen Verwendung fand, wurde von der Firma Qiagen, Hilden, Deutschland bezogen. Die Sequenz wird vom Hersteller nicht bekannt gegeben. Die Firma versichert jedoch, dass die siRNA gegen keine mRNA des menschlichen Genoms bindet.

### 2.1.9 qRT-PCR Primer Sequenzen

Das Primer Design erfolgte mit der Software Primer 3 (Rozen and Skaletsky, 2000) sowie mit der Software Primer Premier 5 von PREMIER Biosoft International, San Francisco, USA. Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) wurde als Referenzgen verwendet.

Tabelle 8: Verwendete Primer bei qRT-PCR

Name	Richtung	Sequenz 5` nach 3`
ICAM-1 hum	Forward	CTTGAGGGCACCTACCTCTGTC
	<b>Reverse</b>	<b>CGGCTGCTACCACAGTGATG</b>
STAT3	Forward	CGGAGAAACAGTTGGGACCCCT
	<b>Reverse</b>	<b>GAGCTGCTCCAGGTACCGTGT</b>
SRF	Forward	CGCTACACGACCTTCAGCAA
	<b>Reverse</b>	<b>TGTCAGCGTGGACAGCTCATA</b>
Survivin	Forward	CCTTCTTGGAGGGCTGCGCC
	<b>Reverse</b>	<b>TGGGGTCGTCATCTGGCTCC</b>
E2F1	Forward	ACCATCAGTACCTGGCCGAGAGC
	<b>Reverse</b>	<b>ATAGCGTGACTTCTCCCCCGGG</b>
GAPDH	Forward	TCAACAGCGACACCCACTCC
	<b>Reverse</b>	<b>TGAGGTCCACCACCCTGTTG</b>
TNF- $\alpha$	Forward	CCGTCTCCTACCAGACCAAGG
	<b>Reverse</b>	<b>CTGGAAGACCCCTCCCAGATA</b>

Alle Primer wurden von Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland bezogen.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Versuchsaufbau

Alle vier Zelllinien wurden mit unterschiedlichen spezifischen siRNAs (siehe Tab. 6), sowie mit der bisher verwendeten SCR- siRNA und den drei neuen SCR-siRNAs transfiziert. Dabei wurde auch immer der Effekt vom Transfektionsreagenz INTERFERin® auf die jeweiligen Zellen untersucht. Als Referenz wurden unbehandelte Zellen verwendet, die dann mit den transfizierten Zellen verglichen wurden.

Tabelle 9: Verwendete Zelllinie und die spezifischen siRNAs

Zelllinie	Verwendete siRNAs
PC-3	STAT 3, SRF
A549	STAT3, Survivin, E2F1
EA.hy926	ICAM-1
Fibroblasten	SRF

Für die Auswertung der Versuche wurden drei Methoden angewandt:

1. Die Auswirkungen auf das Zellwachstum durch Messung der Zellzahl mittels CASY®
2. Die Untersuchung des Knockdowns auf mRNA Ebene durch quantitative-Echtzeit- Polymerase- Kettenreaktion (qRT-PCR)
3. Die Untersuchung des Knockdowns auf Proteinebene mittels fluoreszenzaktivierter Durchflusszytometrie (FACS)

Für jede Zelllinie wurden zwei Methoden verwendet (siehe Tab. 10).

Tabelle 10: Verwendete Zelllinie und die angewendete Methode

<b>Zelllinie</b>	<b>Angewandte Methode</b>
PC-3	qRT-PCR und CASY®
A549	qRT-PCR und CASY®
EA.hy926	qRT-PCR und FACS
Fibroblasten	qRT-PCR und CASY®

### **2.2.2 Kultivierung der Zellen**

Alle vier verwendeten Zelllinien waren bei -80° C tiefgefroren und mussten vor Verwendung aufgetaut werden. Nach dem Auftauen, wurden die Zellen in Zellkulturflaschen von 75 cm<sup>2</sup> Größe überführt. Bei einer Temperatur von 37° C und einem CO<sub>2</sub> Gehalt von 5 % wurden sie inkubiert. Den Kulturflaschen wurde vorab 26 ml der unter Kapitel 2.1.6 beschriebenen Nährmedien hinzugegeben, welche alle drei bis vier Tage gewechselt wurden. Das Zellwachstum wurde regelmäßig unter dem Mikroskop überprüft sowie auf Verunreinigungen kontrolliert. War eine Konfluenz von 80% der adhärent wachsenden Zellen erreicht, wurden diese nach folgendem Schema abgelöst:

- Absaugung des vorhandenen Mediums (DMEM oder Ham`s F-12K)
- Reinigung der Zellen mit 10 ml Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline (DPBS) ohne Calcium und Magnesium,
- Gabe von 6 ml 0,05% Trypsin-EDTA auf die Zellen zum Ablösen,
- nach ca. 6 min unter Beobachtung durch das Mikroskop stoppen des Ablöseprozesses mit 6 ml supplementiertem DMEM oder Ham`s F12.

Dies Zellsuspension wurde in ein FALCON-Röhrchen gegeben und die Zellen bei 300 x g abzentrifugiert. Nach Absaugen des Überstands wurde zu den Zellen 1 ml frisches Nährmedium hinzugegeben.

Im nächsten Schritt wurden die Zellen für die jeweiligen Versuche in 12-Well-Zellkulturplatten ausgesät. Für die Versuche, zur Ermittlung der Zellzahl mit CASY®, wurden 50.000 bis 100.000 Zellen pro Well benötigt und für die qRT-PCR sowie die Durchflusszytometrie 100.000 bis 150.000 Zellen pro Well einer 12-Well-Zellkulturplatte. Um die entsprechende Anzahl an Zellen aussäen zu können, musste die Zellzahl der zuvor abgelösten Zellen mit CASY® bei einer Verdünnung von 1:200 ermittelt werden. 50 µl Zellsuspension wurden mit 10 ml CASYton® gemischt und anschließend die Zellzahl gemessen. Anhand der gemessenen Zellzahl wurde die benötigte Zellsuspension in µl berechnet, die für die jeweiligen Versuche notwendig war. In jedes Well einer 12-Well Platte wurde dann 1 ml Medium vorgegeben sowie die benötigte Menge an Zellsuspension in µl. Anschließend wurden die Zellen für einen Tag inkubiert.

### 2.2.3 Transfektion der Zellen mit siRNA

Die Transfektion der Zellen mit siRNA erfolgte einen Tag nach Anzucht der Zellen in den 12-Well-Kulturplatten. Als Transfektionsreagenz wurde INTERFERin® genutzt. Von diesem wird angenommen, dass es auch in der Gegenwart von Antibiotika wirksam ist (Nolte et al., 2009).

Tabelle 11: Konzentrationen der Transfektionsreagenzien für 12-Well Platten

<b>siRNA Konzentration</b>	<b>Menge siRNA pro Well in µl</b>	<b>Menge Basalmedium pro Well in µl</b>	<b>Menge INTERFERin® pro Well in µl</b>
25 nM	0,4	318	1,17
50 nM	0,8	317,5	1,75
100 nM	1,6	316,7	1,75

Die Transfektionsreagenzien wurden wie in Tabelle 11 angegeben für die entsprechend benötigte siRNA Konzentration angesetzt. Zuerst wurde die siRNA in Basalmedium ohne Zusätze für die jeweilige Zelllinie gelöst und danach INTERFERin® hinzugegeben und die Lösung dann zur vollständigen

Durchmischung gevortext. Zur Bildung der Transfektionskomplexe (Komplexierung zwischen der siRNA und den Lipidkationen des INTERFERins®), mussten die Transfektionsansätze für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert werden. Anschließend wurde das Medium der zuvor angezüchteten Zellen abgesaugt, die Zellen mit 500 µl DPBS gewaschen und anschließend 300 µl der Transfektionsansätze in jedes Well pipettiert. Die Zellen wurden nun für 2h bei 37° C inkubiert. Anschließend wurden die Transfektionskomplexe abgesaugt und 1 ml frisches Medium (DMEM oder Ham`s F-12K) in jedes Well gegeben.

Die EA.hy926 Zellen, bei denen eine Transfektion mit ICAM-1 durchgeführt worden war, wurden noch am selben Tag nach der Transfektion mit TNF- $\alpha$  aktiviert (siehe Kapitel 2.2.8). Im Anschluss daran erfolgte entweder eine qRT-PCR oder eine fluoreszenzaktivierte Durchflusszytometrie.

#### **2.2.4 Extraktion der RNA für qRT-PCR Versuche**

Die Ermittlung der Genexpression auf mRNA Ebene, wurde mittels qRT-PCR durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.7). Bei der messenger RNA (mRNA), handelt es sich um ein einzelsträngiges RNA-Transkript, welches komplementär zu einem Teilabschnitt der DNA ist, das ein Gen codiert. Da eine qRT-PCR nur mit complementary DNA (cDNA) und nicht mit RNA möglich ist, aufgrund von für die PCR benötigten DNA abhängigen Polymerasen, wurde zuerst die Gesamt-RNA aus den Zellen extrahiert, die RNA Konzentration gemessen und diese anschließend in cDNA transkribiert.

Die RNA Isolierung erfolgte 24 Stunden nach der Transfektion der Zellen mit Hilfe des Aurum™ Total RNA Mini Kit von BioRad. Dabei wurde, gemäß den Herstellerangaben wie folgt vorgegangen:

- Im ersten Schritt wurden die Zellen mit 500 µl DPBS pro Well gewaschen und anschließend der Puffer wieder abgesaugt.

- Der Zellaufschluss erfolgte, indem 175 µl Lysis-Solution in jedes Well pipettiert wurden und 12 Mal zur mechanischen Unterstützung bei der Homogenisierung der Zellen resuspendiert wurde.
- Danach wurden 175 µl einer 70%igen EtOH Lösung in jedes Well hinzugegeben.
- Das Lysat von zwei Wells pro Probe wurde in ein Trennsäulchen pipettiert, die in beschriftete Eppendorf-Reaktionsgefäß mit einem Fassungsvermögen von 2 ml gestellt wurden. Bei 12.000 x g und einer Raumtemperatur von 22 °C wurde das Lysat für 30 Sekunden abzentrifugiert und anschließend der Überstand verworfen. Die Nukleinsäuren waren nun in der in den Trennsäulen befindlichen Membran gebunden und wurden mit 700 µl Low-stringency-wash pro Well gereinigt und anschließend für 30 Sek. abzentrifugiert.

Um eine Kontamination der RNA mit DNA zu vermeiden, was letztendlich zu einer Verfälschung der mRNA Konzentration und Störung in der PCR führen könnte, wurde das Enzym DNase I, welches ausschließlich DNA abbaut, eingesetzt. 80 µl des Enzyms wurde in jedes Well gegeben und für 15 Minuten inkubiert. Danach wurde das Filtrat wieder für 30 Sekunden zentrifugiert. Es folgten zwei Waschschrte zuerst mit 700 µl High-stringency-wash pro Well und anschließend mit 700 µl Low-stringency-wash. Die Säulen wurden nach jedem Waschschrte zentrifugiert

Zur Elution der RNA von der Membran wurden 60 µl einer auf 70 °C erhitzten Elution-Lösung auf die Membran pipettiert. Anschließend wurde für eine Minute inkubiert und abschließend zentrifugiert.

### **2.2.5 Messung der RNA Konzentration**

Die Konzentration der RNA wurde im Eppendorf Photometer gemessen. Zum Verfahren: Nukleinsäuren absorbieren bei einer Wellenlänge von 260 Nanometer (nm). Um nicht nur die Konzentration, sondern auch die Qualität der Probe zu bestimmen werden Messungen auch bei einer Wellenlänge von 280 nm (Detektion von Proteinen) durchgeführt. Um eine Aussage über die Reinheit einer

Probe machen zu können, werden die Verhältnisse zwischen einer Absorption von 260 nm zu 280 nm bestimmt. Der Quotient aus 260/280 sollte bei nahe 2 liegen. Liegt er darüber, sind Reste von z.B. EtOH vorhanden. Liegen die Werte weit unterhalb von 2, enthält die Probe zu viele Proteine.

Für die Messung wurden 45 µl DEPC Water sowie 5 µl der jeweiligen RNA (Verhältnis 1:10) in eine Küvette pipettiert und anschließend die Konzentration sowie die Reinheit im Eppendorf Photometer gemessen.

### **2.2.6 Umschreibung der RNA in cDNA**

Um eine qRT-PCR durchführen zu können, muss die gewonnene RNA in komplementär DNA (engl. complementary DNA = cDNA) umgeschrieben werden, da die für die qRT-PCR benötigten DNA-Polymerasen DNA-abhängig sind und keine RNA amplifizieren können. Die cDNA wird mittels des Enzyms Reverse Transkriptase (RT), einer viralen, RNA-abhängigen DNA- Polymerase, komplementär zu einer mRNA Matrize, synthetisiert.

Die RT benötigt für die Synthese der cDNA einen Primer. Es gibt verschiedene Primer mit unterschiedlichen Eigenschaften. Die hier verwendeten Oligo-dt-Nukleotide sind Primer, die sich selektiv an den Poly-A-Schwanz von mRNA binden. Damit wird verhindert, dass transfer RNA (tRNA) oder ribosomale RNA (rRNA) ebenfalls in cDNA transkribiert werden.

Zunächst wurden 200 µg RNA in 15 µl Nuklease-freiem Wasser gelöst. Aus der gemessenen RNA-Konzentration wurde das Verhältnis RNA zu Nuklease freiem Wasser ermittelt. Für die Synthese der cDNA wurde das iSkript™ cDNA Synthesis Kit von Bio-Rad verwendet. Es besteht aus Reverse Transkriptase sowie einem Reaction-Mix. 15 µl der RNA-Lösung, 1 µl iSkript™ Reverse Transkriptase sowie 4 µl iSkript™ Reaction-Mix wurden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert, sodass jede Probe ein Gesamtvolumen von 20 µl hatte. Die Proben wurden kurz gevortext und in den Mastercycler zur Inkubation für ca. 45 Minuten gestellt. Die Inkubationszeiten richteten sich nach folgenden Angaben des Herstellers:

- 5 Minuten bei 25°C (Bindungsphase)
- 20 Minuten bei 46°C (Transkriptionsphase)
- 1 Minuten bei 95°C (Inaktivierungsphase)
- 20 Minuten Herunterkühlungsphase auf 4°C

Nach erfolgter Inkubation war die RNA in cDNA transkribiert und konnte für die qRT-PCR verwendet werden.

### **2.2.7 Quantitative Echtzeit- Polymerase- Kettenreaktion (qRT-PCR)**

Zur Untersuchung der Genexpression in Bezug auf die Expression von mRNA Transkripten ist die qRT-PCR eine gängige Methode. Die Vervielfältigung der Transkripte erfolgt durch das Verfahren der Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Dabei kommt es zuerst zum Aufschmelzen (Denaturierung) der zur vervielfältigenden DNA. Danach erfolgt die Hybridisierung der Primer an die jeweiligen Stränge gefolgt von der Elongation durch eine DNA-Polymerase. Die Menge des amplifizierten Fragments wird entweder während oder nach einem PCR-Zyklus in Echtzeit (daher der Name „Real-Time“) gemessen. Hier liegt ein wesentlicher Unterschied zwischen der qRT-PCR Methode und anderen quantitativen PCR-Methoden, bei denen eine Auswertung erst nach Ablauf der PCR möglich ist. Die Quantifizierung wird mittels Messung der Fluoreszenz ermittelt, die proportional zu den PCR-Produkten zunimmt. Die Fluoreszenzmessung erfolgt während beziehungsweise nach jedem PCR-Zyklus. Die Detektion der Fluoreszenz kann neben sequenzspezifischer Sonden-Hybridisierung oder Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) auch durch fluoreszierende Farbstoffe erfolgen. SYBR<sup>™</sup>Green, der bei dieser Arbeit verwendete fluoreszierende Farbstoff, lagert sich in die doppelsträngige DNA ein und nimmt abhängig von der Menge des amplifizierten Fragments zu (Holzapfel and Wickert, 2007).

Vor der Durchführung der qRT-PCR wurde die cDNA mit Nuklease freiem Wasser im Verhältnis 1:25 verdünnt (4 µl cDNA und 96 µl Nuklease freies Wasser). Die Verdünnung ist notwendig, da bei einer zu hohen Konzentration die Fluoreszenz zu früh auftritt. Ein Mastermix, bestehend aus  $\frac{3}{4}$  SYBR<sup>™</sup> Green und

¼ des zur siRNA gehörigen Primers, wurde angesetzt. 36 µl Mastermix (SYBR™ Green und Primer) und 18 µl verdünnte cDNA wurden gemischt. Anschließend wurden 15 µl dieses Gemisches in jedes Well einer für qRT-PCR geeignete Mikrotiterplatte pipettiert, mit einer hitzebeständigen Folie verschlossen und zentrifugiert. Da eine Dreifachbestimmung erfolgte, wurden je drei Wells pro Probe genutzt. Um eine Vergleichbarkeit der Proben zu gewährleisten, wurde für jede Probe ein Referenzgen, hier Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), angesetzt. GAPDH ist ein sogenanntes housekeeping Gen. Es wird unabhängig von äußeren Einflüssen in Zellen exprimiert, da es als ein Enzym der Glykolyse, Bestandteil des Grundstoffwechsels der Zelle ist (Barber et al., 2005). GAPDH zählt zu den am häufigsten verwendeten Referenzgenen (Barber et al., 2005). Zur Durchführung der qRT-PCR wurde das Gerät von Bio-Rad CFX-Connect™ verwendet.

Für die Auswertung wird als Maß für die Quantifizierung der Fluoreszenz ein Schwellenwert festgelegt, der zwischen Start- und Plateauphase, in der exponentiellen Phase liegt. Dieser Schwellenwert wird so gewählt, dass die Fluoreszenz signifikant die Hintergrundfluoreszenz übersteigt. Der Zyklus, bei dem der Schwellenwert erreicht wird, wird als threshold cycle = C<sub>t</sub>-Wert bezeichnet. Der Wert gibt an, wie stark ein Gen exprimiert wird. Liegt ein niedrigerer Wert vor, so hat eine starke Expression der mRNA stattgefunden (Pfaffl, 2004).

Zur Vergleichbarkeit der Proben wird das Referenzgen GAPDH benötigt. Dieses wird zur Normalisierung der Expression des Zielgens eingesetzt. Wichtig dabei ist, dass alle Proben mit dem Referenzgen verglichen werden. Wird nun der C<sub>t</sub>-Wert vom Referenzgen von dem Zielgen subtrahiert, ist eine Vergleichbarkeit möglich.

Es ergibt sich folgende Berechnung der relativen Expression eines Gens:

$$\Delta C_t\text{-Wert: } \Delta C_t (\text{Zielgen}) = C_t(\text{Zielgen}) - C_t (\text{Referenzgen})$$

Daraus leitet sich die relative Expression ab:

$$\text{Rel. Expression} = 2^{-\Delta C_t(\text{Zielgen})}$$

Die in der Formel angegebene Zahl 2 steht für die Effizienz eines PCR-Zykluses, wobei von einer Verdopplung des Zielgens pro PCR-Zyklus ausgegangen wird. Darüber hinaus wird für die Auswertung eine Negativkontrolle benötigt, deren relative Expression auf den Wert 1 indiziert wird. Die relative Expression aller weiteren Proben wird dann als ein Vielfaches dieses ersten Wertes angegeben (Pfaffl, 2004). Die Auswertung erfolgte durch den CFX-Manager der Firma Bio-Rad.

### **2.2.8 Aktivierung der EA.hy926 Zellen mit TNF- $\alpha$**

Nach der Transfektion der EA.hy926 Zellen mit ICAM-1 wurden diese noch am selben Tag mit TNF- $\alpha$  aktiviert. TNF- $\alpha$  spielt bei Entzündungsprozessen eine entscheidende Rolle. Für die Aktivierung wurden 5,5  $\mu$ l TNF- $\alpha$  und 100  $\mu$ l DMEM Medium pro Well gemixt und davon 100  $\mu$ l in jedes Well pipettiert. Bis auf drei Wells mit unbehandelten Zellen, wurden alle Proben mit TNF- $\alpha$  stimuliert. Die Aktivierung von ICAM-1 benötigt mindestens 12 Stunden und bleibt danach für 3-4 Stunden auf einem Plateau. Deshalb war darauf zu achten, dass wegen der Vergleichbarkeit der Versuchsbedingungen die Aktivierungszeit bei allen Versuchen gleich lang dauerte. Sowohl die Mengenangaben als auch die Zeitangaben wurde in vorherigen Versuchen am Institut für Thorax- Herz- und Gefäßchirurgie, Tübingen, ermittelt (Walker et al., 2007, Walker et al., 2005). Nach der Aktivierung wurde entweder eine qRT-PCR oder eine Antikörperfärbung mit CD54-PE anti human Antikörper und nachfolgend die fluoreszenzaktivierte Durchflusszytometrie durchgeführt.

### **2.2.9 Antikörperfärbung des Oberflächenrezeptors ICAM-1**

13 Stunden nach Aktivierung der Zellen mit TNF- $\alpha$  können diese mit einem spezifischen Phycoerythrin (PE) gelabelten Antikörper CD54-PE anti-human Antikörper (CD= Cluster of differentiation) für ICAM-1 gefärbt werden. Dieser Zwischenschritt wird für die unter 2.2.10 beschriebenen fluoreszenzaktivierte

Durchflusszytometrie benötigt. Für die Antikörperfärbung wurde ein Mastermix aus CD54 Antikörper sowie 0,5% FCS in DPBS hergestellt. Pro Well wurden 1,67 µl Antikörper in 500 µl 0,5% FCS in DPBS gelöst. Das Medium aller Wells wurde abgesaugt und die Zellen mit 500 µl DPBS gewaschen. Anschließend wurde in jedes Well 500 µl von dem Antikörpermix gegeben, außer in die drei Wells ohne Antikörper. Diese wurden nur mit 500 µl der 0,5% FCS in DPBS gefüllt. Anschließend wurden die Zellen für 30 Minuten bei 37° C inkubiert.

### **2.2.10 Fluoreszenzaktivierte Durchflusszytometrie (engl. fluorescence-activated cell sorting = FACS)**

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren zur gleichzeitigen Messung und Analyse von Zellzahl und Zelleigenschaften. Dabei werden Zellen an einem Laserstrahl vorbei geleitet und es kommt zu einer Streuung des Lichtes. Das Streulicht wird aus unterschiedlichen Winkeln detektiert. Es wird dabei zwischen Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht unterschieden. Mit dem Vorwärtsstreulicht (FSC= Forward Scatter), welches in Laserstrahlrichtung detektiert wird, wird die Größe der Zelle gemessen. Mit der Messung des Seitwärtsstreulichtes (SSC= Side Scatter), welches ungefähr im 90 °C Winkel zur Laserstrahlrichtung gemessen wird, können Aussagen über die Granularität der Zelle gemacht werden. Gleichzeitig können durch die Verwendung und anschließender Messung von Fluoreszenzfarbstoffen weitere Eigenschaften der zu untersuchenden Zellen bestimmt werden (McKinnon, 2018). Mit Farbstoffen wie Propidiumiodid oder 4',6-Diamidin-2-phenylindol kann die Menge an DNA innerhalb einer Zelle bestimmt werden. Um Informationen über Oberflächenproteine wie ICAM-1 zu erhalten, werden fluoreszierende Antikörper (CD54) eingesetzt.

Bevor die Zellen mittels Durchflusszytometer analysiert werden konnten, musste der unter 2.2.9 beschriebene Antikörpermix abgesaugt und die Zellen abgelöst werden. Dafür wurden die Zellen mit 500 µl DPBS pro Well gewaschen und anschließend 500 µl 0,05%iges Trypsin-EDTA für ca. 5 Minuten auf die Zellen pipettiert, um sie abzulösen. Mittels der Gabe von 500 µl DMEM wurde der

Ablösevorgang beendet. Die Zellsuspension eines jeden Wells wurde in ein FACS-Röhrchen überführt und bei 300 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig verworfen und das Zellpellett in 150 µl FACS™-Lösung aufgenommen und gevortext. Anschließend erfolgte die Messung mit dem FACS-Gerät. Die Fluoreszenzmessung erfolgte mit dem FL-2 Kanal. Für die Auswertung wurde der geometrische Mittelwert (Geo Mean) der Ergebnisse aus 5000 Messungen herangezogen.

### **2.2.11 Zellzählung mit CASY®**

Zur Beurteilung des Wachstumsverhaltens der mit siRNA, SCR-siRNA und INTERFERin® transfizierten Zellen sowie der unbehandelten Zellen, wurde die Zellzahl mit dem CASY® Zellzähler und –analyser gemessen. Mit diesem Verfahren kann nicht nur die Anzahl, sondern auch die Vitalität der Zellen gemessen werden. Es beruht auf einer Widerstandsmessung durch Pulsflächenanalyse. Dabei werden Zellen in 10 ml einer isotonischen Elektrolytlösung resuspendiert. Ein Teil dieser Zell-Elektrolytlösung wird dann durch eine Messkapillare, mit einem Messbereich von 0,7-120 µm gezogen, an die eine Spannung angelegt ist. Sobald eine Zelle durch die Messspore der Kapillare tritt, wird ein elektrischer Impuls ausgelöst, der abhängig vom Volumen und dem physiologischem Zustand der Zelle ist (Schmitz, 2011b).

3 Tage nach der Transfektion der Zellen mit siRNA und SCR-siRNA wurde die Zellzahl gemessen. Zu diesem Zeitpunkt war der Transfektions- oder Knockdowneffekt am größten. Für die Messung mussten die Zellen abgelöst werden. Das Medium DMEM bzw. Hams-F12-K Medium für PC-3 Zellen in den 12-Well Platten wurde abgesaugt und jedes Well mit 500 µl DPBS gewaschen. Anschließend wurde zur Zellablösung 500 µl 0,05% Trypsin-EDTA in jedes Well pipettiert und nach 5 Minuten mit 500 µl Medium neutralisiert. 50 µl der Zellsuspension wurden in 10 ml CASYton® pipettiert, resuspendiert und die Zellzahl gemessen. Jede Probe bestand aus 4-Wells deren Zellzahl jeweils mit CASY® bestimmt wurde. Aus den vier Messungen und deren Ergebnissen wurde der Mittelwert gebildet, der dann in die Auswertung einging.

### **2.3 Statistische Auswertung**

Für die Auswertung wurde das Programm Microsoft Excel sowie das Statistikprogramm GraphPad Prism 5.0 verwendet. Alle Versuche V1-V4 wurden mittels dem Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung getestet. Weiterhin wurden die Werte einem Ausreissertest nach Grubbs mit einem Signifikanzniveau von 0.05 unterzogen. Schlussendlich erfolgte zur Ermittlung signifikanter Unterschiede durch eine Varianzanalyse (ANOVA = engl. Analysis of Variance) der Daten sowie einer Bonferroni-Korrektur, zur Behebung einer Alphafehler-Kumulierung durch das Statistikprogramm GraphPad Prism 5.0. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p \leq 0,05$  festgelegt, das Signifikanzniveau mit  $p \leq 0,05 = *$ ,  $p \leq 0,01 = **$ ,  $p \leq 0,001 = ***$  gekennzeichnet

### 3. Ergebnisse

Insgesamt wurden vier Versuche (V1-V4) mit jeweils einer der Zelllinien: A549, EA.hy926, Fibroblasten und PC-3, durchgeführt. Im Zuge der Versuche wurden dabei die funktionalen siRNAs E2F1, Survivin, STAT3, SRF und ICAM-1 untersucht. Die Konzentrationen der siRNAs wurden so gewählt, dass der jeweilige Knockdown Effekt am ausgeprägtesten war. Diese ideale Konzentration war in vorherigen Versuchen im klinischen Forschungslabor für Thorax,- Herz- und Gefäßchirurgie ermittelt worden. Als Transfektionsmedium wurde INTERFERin® verwendet. Die Untersuchungen erfolgten durch

- Ermittlung der Zellzahl mit CASY®
- Ermittlung der Expression der mRNA mit Hilfe von qRT-PCR
- Ermittlung des Knockdowns auf Proteinebene mit der fluoreszierenden Durchflusszytometrie

Bei jedem Versuch wurden vier SCR-siRNAs von zwei unterschiedlichen Herstellern, gleichzeitig zu den funktionalen siRNAs verwendet. Zur Übersicht erhielten sie folgende Bezeichnungen: SCRalt-siRNA ist die Kontroll- siRNA, die bisher im klinischen Forschungslabor für Thorax,-Herz -und Gefäßchirurgie verwendet wurde. Die weiteren SCR-siRNAs, SCR1-siRNA, SCR2-siRNA, SCR3-siRNA waren neue scrambled-siRNAs. Ziel war es, diejenige SCR-siRNA zu finden, die keinen beziehungsweise am wenigsten Einfluss auf das jeweilige Zellverhalten hat. Gleichzeitig wurden Zellen auch nur mit dem Transfektionsmittel INTERFERin® behandelt, um zu prüfen, ob dies Auswirkungen auf die Genexpression hat.

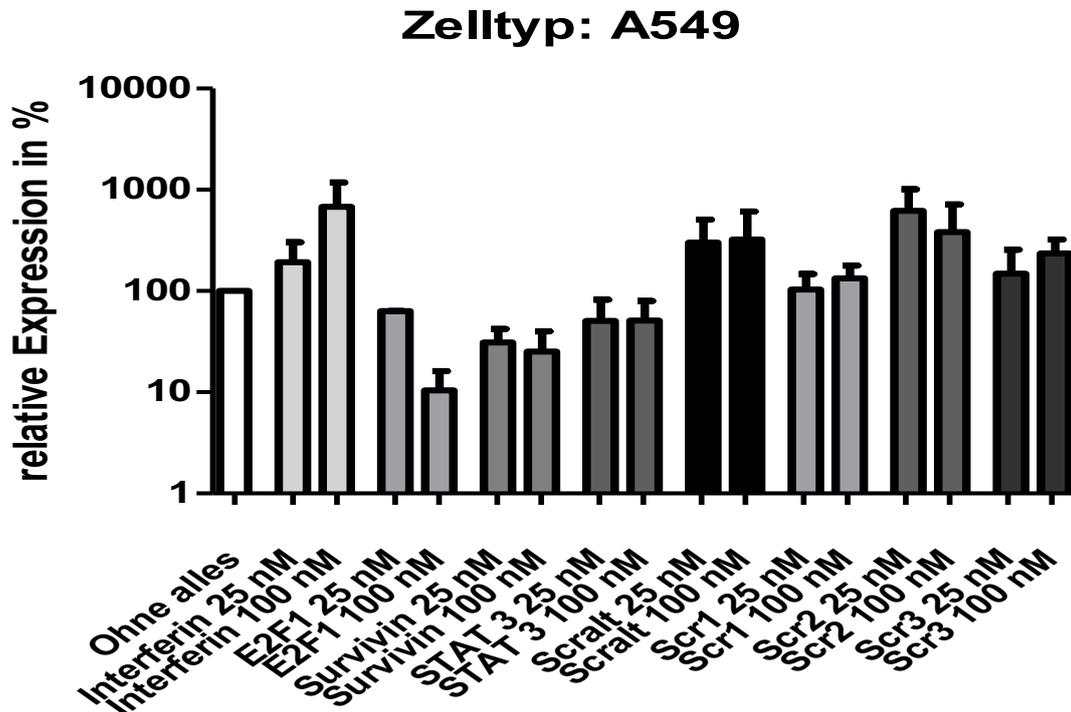
Die Durchführung der Versuche erfolgte mindestens drei Mal (als n=3 bzw. n=4 dargestellt). Bei jedem Versuch wurden dreifach (qRT-PCR und FACS) bzw. vierfach Ansätze (CASY®), d.h. drei bzw. vier Wells pro Probe einer 12-Well-Platte verwendet. Die Werte gleicher Proben wurden einem Ausreißer Test nach Grubbs unterzogen. Das Signifikanzniveau wurde auf  $\alpha = 0,05$  festgelegt. Signifikante Ausreißer wurden entfernt. Aus den Ergebnissen von drei bzw. vier gleichen Ansätzen wurde anschließend ein Mittelwert  $\pm$  eine

Standardabweichung (engl. standard deviation = SD) gebildet. Die Werte wurden anschließend in Prozent umgerechnet. Die unbehandelten Zellen wurden auf 100% und die behandelten ins Verhältnis dazu gesetzt.

### **3.1 Versuch 1 (V1): Auswertung der Zellzahl und mRNA Expression nach Transfektion von A549 Zellen mit siRNA, INTERFERin® und SCR-siRNA**

Im ersten Versuch wurde die Wirkung von siRNAs gegen E2F1, Survivin und STAT3 sowie den vier SCR-siRNAs, und INTERFERin® an Lungenkarzinomzellen mittels qRT-PCR untersucht. Um die Auswirkungen auf die Zellproliferation zu bestimmen, erfolgte die Bestimmung der Zellzahl mittels CASY®.

### 3.1.1 Ergebnisse der qRT-PCR



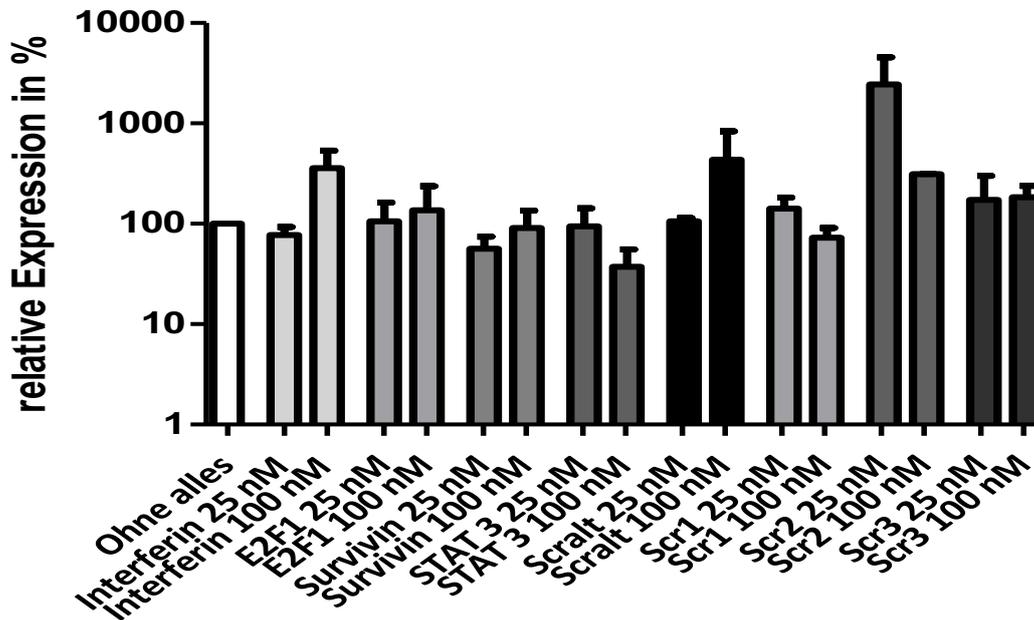
#### Einfluss verschiedener siRNAs auf E2F1

**Abbildung 1:** Ergebnis der relativen Expression von E2F1 unter Verwendung der siRNAs gegen E2F1, Survivin und STAT3 sowie nach Transfektion mit INTERFERin® und den SCR-siRNAs in A549 Zellen

Die Abbildung 1 zeigt die relative Genexpression von E2F1, nach Transfektion von A549 Zellen mit 25 nM und 100 nM siRNA gegen E2F1. Dabei wurde auch die siRNA gegen Survivin und STAT3 mituntersucht sowie die verschiedenen SCR-siRNAs und das Transfektionsmittel INTERFERin®. Auf der Y-Achse des Graphen ist die relative Expression in Prozent dargestellt. Die X-Achse zeigt die untersuchten siRNAs, SCR-siRNAs und das Transfektionsmittel in den Konzentrationen 25 nM und 100 nM. Die unbehandelten Zellen (ohne alles) dienen als Referenz und wurden auf 100% gesetzt und die jeweilig zu untersuchenden Proben ins Verhältnis dazu. Jeder Balken zeigt den Mittelwert  $\pm$  eine Standardabweichung (engl. standard deviation = SD) von n=3.

Bei Abbildung 1 liegt der Fokus auf der relativen Genexpression der siRNA gegen E2F1. Bei einer Konzentration von 100 nM ist ein deutlicher Knockdown der relativen Genexpression von E2F1 sichtbar. Bei 25 nM fiel der Knockdown geringer aus. Auch die zusätzlich getesteten siRNAs gegen Survivin und STAT3, zeigten eine Reduzierung der Genexpression. Die Untersuchung mit INTERFERin® ohne siRNA zeigte, dass eine vermehrte Genexpression stattfand, obwohl INTERFERin® keinen Einfluss auf die Genexpression haben sollte. Der Effekt war bei einer höheren Konzentration (100 nM) stärker. Beim Vergleich der vier SCR-siRNAs zeigte die SCR1-siRNA den geringsten Effekt auf die relative Genexpression bei 25 nM und eine minimale Verstärkung bei 100 nM. Wenig Einfluss auf die Genexpression zeigte auch die SCR3-siRNA bei einer Konzentration von 25 nM. Bei den anderen SCR-siRNAs fand eine deutliche Verstärkung der relativen Genexpression statt. Signifikant waren diese Unterschiede in der Expression nicht.

## Zelltyp: A549



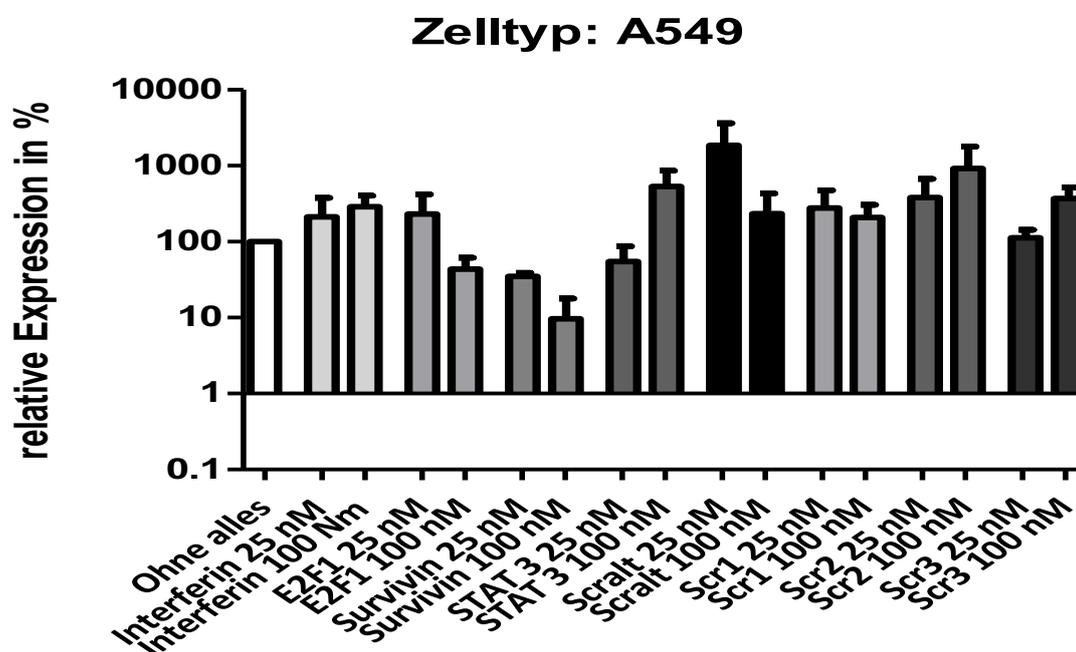
### Einfluss verschiedener siRNAs auf STAT3

**Abbildung 2:** Ergebnis der relativen Expression von STAT3 unter Verwendung der siRNAs gegen STAT3, Survivin und E2F1 sowie nach Transfektion mit INTERFERin® und den vier SCR-siRNAs in A549 Zellen

Die Abbildung 2 zeigt die relative Genexpression von STAT 3 nach Transfektion der A549 Zellen mit siRNA gegen STAT3 bei einer Konzentration von 25 nM und 100 nM. Die siRNA gegen E2F1 und Survivin wurden ebenfalls untersucht sowie INTERFERin® und die vier SCR-siRNAs. Die Y-Achse zeigt die relative Genexpression in Prozent, die X-Achse zeigt die untersuchten Genexpressionen der siRNAs, des Transfektionsmittels sowie der SCR- siRNAs in den Konzentrationen 25 nM und 100 nM. Die unbehandelten Zellen (ohne alles) dienen als Referenz und wurden auf 100% gesetzt und die jeweilig zu untersuchenden Proben ins Verhältnis dazu. Jeder Balken zeigt den Mittelwert  $\pm$  eine SD, n=3.

Abbildung 2 zeigt nur einen geringen Knockdown von STAT3 bei einer Konzentration von 25 nM. Bei einer Konzentration von 25 nM ist ein deutlicher Knockdown im Vgl. zu den unbehandelten Zellen zu sehen. Die siRNA gegen E2F1 zeigte bei 25 nM und 100 nM eine diskret vermehrte relative

Genexpression, Survivin bei einer Konzentration von 25 nM und 100 nM eine Verminderung der relativen Genexpression, wobei der Knockdown bei 25 nM größer war. INTERFERin® zeigte eine deutliche Hochregulation der relativen Genexpression bei 100 nM, im Vergleich zu Abb.1 jedoch geringer. Bei den SCR-siRNAs zeigte die SCRalt-siRNA bei 25 nM den geringsten Einfluss auf die Zellen, dicht gefolgt von der SCR1-siRNA bei einer Konzentration von 100 nM sowie 25 nM. Die SCR1-siRNA zeigte bei 100 nM einen leichten Knockdown der relativen Genexpression und bei 25 nM eine leicht vermehrte relative Genexpression.



### Einfluss verschiedener siRNAs auf Survivin

**Abbildung 3:** Ergebnis der relativen Expression von Survivin unter Verwendung der siRNAs gegen Survivin, STAT3 und E2F1 sowie nach Transfektion mit INTERFERin® und den vier SCR-siRNAs in A549 Zellen

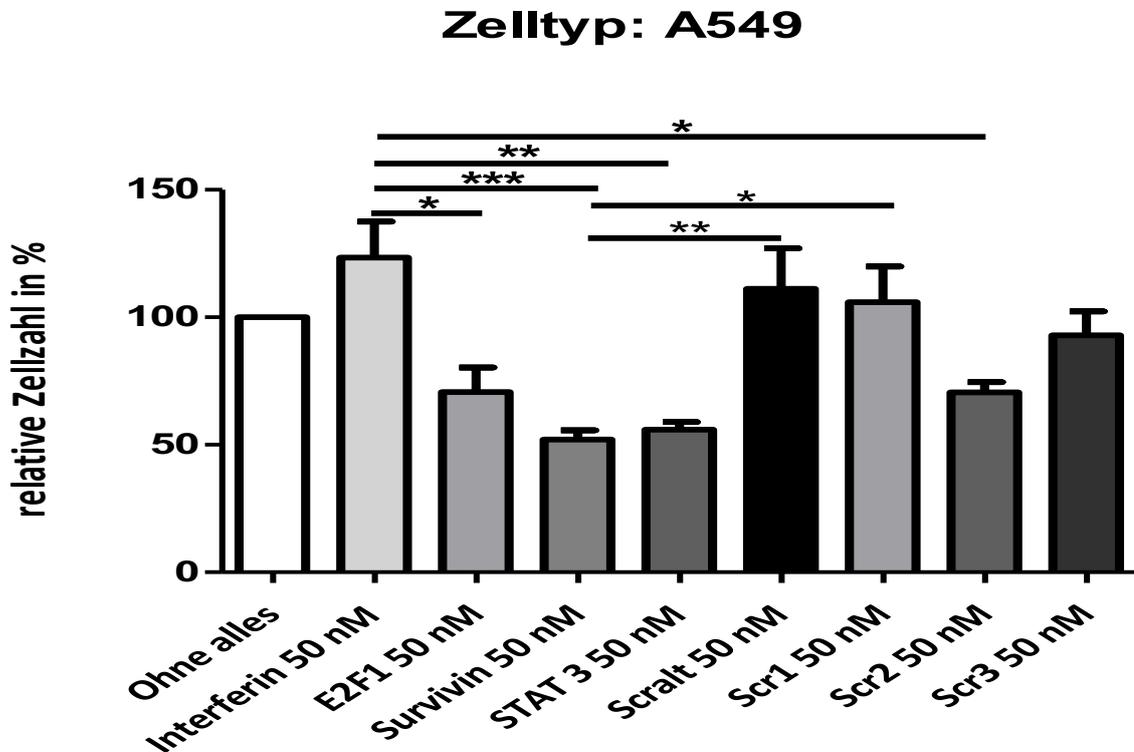
Die Abbildung 3 zeigt die relative Genexpression von Survivin, nach Transfektion von A549 Zellen mit 25 nM und 100 nM siRNA gegen Survivin. Dabei wurde auch die siRNA gegen E2F1 und STAT3 mituntersucht sowie die verschiedenen SCR-siRNAs und das Transfektionsmittel. Auf der Y-Achse des Graphen ist die relative Expression in Prozent dargestellt. Die X-Achse zeigt die untersuchten siRNAs, SCR-siRNAs und das Transfektionsmittel in den Konzentrationen 25 nM

und 100 nM. Die unbehandelten Zellen (ohne alles) dienen als Referenz und wurden auf 100% gesetzt und die jeweilig zu untersuchenden Proben ins Verhältnis dazu. Jeder Balken zeigt den Mittelwert  $\pm$  eine SD, n=3.

Die letzte Testreihe zeigte einen deutlichen Knockdown von Survivin bei Verwendung der siRNA gegen Survivin sowohl bei 25 nM als auch bei 100 nM, wobei bei 100 nM der Knockdown deutlich stärker war. Die siRNA gegen E2F1 zeigte bei 25 nM eine verminderte relative Genexpression und bei 100 nM eine deutliche Steigerung der relativen Genexpression. Die siRNA gegen STAT3 zeigte ebenfalls bei 25 nM eine deutliche Verminderung der relativen Genexpression und bei 100 nM eine deutliche Steigerung der relativen Genexpression. Bei INTERFERin® trat wieder eine Verstärkung der relativen Genexpression auf bei 25 nM und 100 nM. Diesmal zeigte die SCR3-siRNA bei einer Konzentration von 25 nM den geringsten Effekt auf die relative Genexpression, gefolgt von der SCR1-siRNA bei einer Konzentration von 100 nM. Signifikante Unterschiede gab es keine.

Zusammenfassend zeigten alle Testreihen ein Knockdown der relativen Genexpression bei Verwendung der entsprechenden Ziel siRNA, in unterschiedlichem Ausmaß, im Vgl. zu den unbehandelten Zellen. Da bei jedem Versuch nicht nur die Ziel-siRNA untersucht, sondern immer alle verwendeten funktionellen siRNAs, die an den A549 Zellen getestet wurden, zeigten die jeweils mit untersuchten siRNAs teilweise einen Knockdown und teilweise eine vermehrte relative Genexpression. Das Transfektionsmittel INTERFERin® zeigte insgesamt eine Verstärkung der relativen Genexpression sowohl bei 25 nM als auch bei 100 nM, bis auf Abb. 2, wo es zu einem leichten Knockdown kam bei 25 nM. Alle der in Abb. 1-3 dargestellten Ergebnisse waren nicht signifikant. Bei den SCR-siRNAs hatte in Abb. 1 die SCR1-siRNA bei 25 nM den geringsten Einfluss, in Abb.2 die SCRalt-siRNA bei einer Konzentration von 25 nM den geringsten Einfluss und in Abb.3 die SCR3-siRNA den geringsten Einfluss auf die Zellen.

### 3.1.2 Ergebnisse der Zellzählung mit CASY®



**Abbildung 4:** Ergebnis der relativen Zellzahl nach Transfektion mit siRNA gegen E2F1, Survivin, STAT3 sowie INTERFERin® und den SCR-siRNAs von A549 Zellen

Abbildung 4 zeigt die relative Zellzahl in Prozent nach Transfektion mit siRNA gegen E2F1, Survivin und STAT3 bei einer Konzentration von 50 nM. Die Y-Achse zeigt die relative Anzahl der Zellen in Prozent. Auf der X-Achse sind die verwendeten Transfektionsmedien inklusive siRNAs und SCR-siRNAs aufgetragen. Die unbehandelten Zellen wurden auf 100% gesetzt und die anderen Werte ins Verhältnis dazu. Die Balken zeigen den Mittelwert  $\pm$  eine SD, n=4. Kennzeichnung des Signifikanzniveaus mit  $p \leq 0,05 = *$ ,  $p \leq 0,01 = **$ ,  $p \leq 0,001 = ***$ .

Die verwendeten funktionellen siRNAs zeigten eine deutliche Verminderung der relativen Zellzahl bei einer Konzentration von 50nM im Vgl. zu den unbehandelten Zellen, wobei Survivin den stärksten Effekt auf die relative Zellzahl hatte. Auf das Transfektionsmittel INTERFERin® reagierten die Zellen mit einer deutlichen Vermehrung der relativen Zellzahl. Bei den SCR-siRNAs

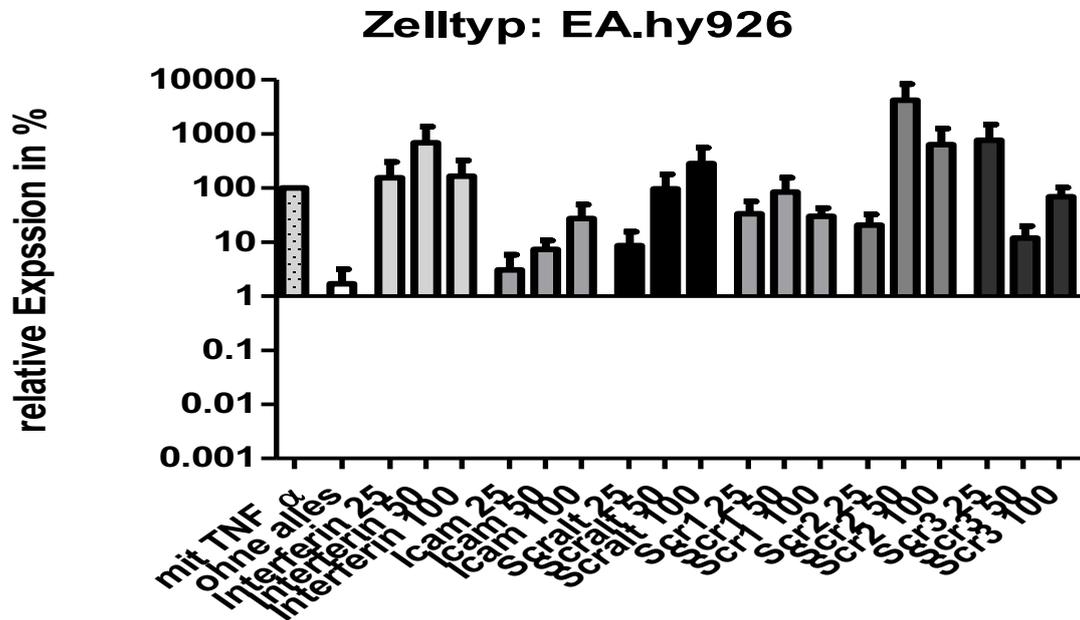
hatte die SCR1-siRNA den geringsten Einfluss gefolgt von der SCR3-siRNA und der SCRalt-siRNA im Vgl. zu den unbehandelten Zellen.

Der Übersichtlichkeit wegen sind in Abbildung 4, zwei signifikante Werte nicht gekennzeichnet, im ersten Fall beim Vergleich von der funktionellen siRNA gegen STAT 3 mit der SCRalt-siRNA sowie im zweiten Fall beim Vergleich von der funktionellen siRNA gegen STAT3 mit der SCR1-siRNA. Das Signifikanzniveau lag bei  $p < 0,05$ . Pro Well wurden 150.000 Zellen angezchtet. Weiterhin zeigt Abbildung 4 signifikante Unterschiede zwischen Zellen, die mit INTERFERin® transfiziert wurden und Zellen, die mit den siRNAs gegen E2F1, Survivin und STAT3 behandelt wurden. Es ist ersichtlich, dass die Zellproliferation durch die siRNAs deutlich gemindert wurde. Weiterhin gab es signifikante Unterschiede zu INTERFERin® und der SCR2-siRNA, Survivin und SCRalt-siRNA sowie zur SCR1-siRNA.

### **3.2 Versuch 2 (V2): Auswertung der qRT-PCR und der fluoreszierenden Durchflusszytometrie nach Transfektion von EA.hy926 Zellen mit siRNA gegen ICAM-1, INTERFERin® und SCR-siRNA**

Im zweiten Versuch wurde der Einfluss von siRNA gegen ICAM-1, den SCR-siRNAs sowie INTERFERin® auf immortalisierte Endothelzellen untersucht. Die Untersuchung erfolgte sowohl auf mRNA Ebene mittels qRT-PCR als auch auf Proteinebene mit der fluoreszierenden Durchflusszytometrie.

### 3.2.1 Ergebnisse der qRT-PCR



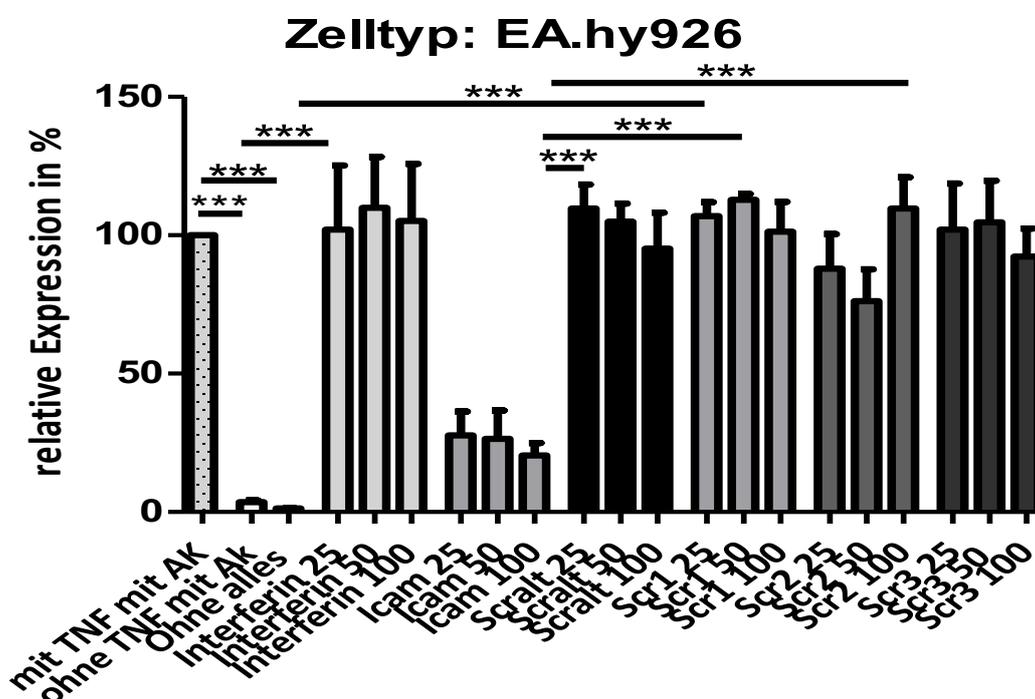
**Abbildung 5:** Ergebnis der relativen mRNA- Expression von ICAM-1 nach Transfektion von siRNA gegen ICAM-1, INTERFERin® und den SCR-siRNAs in EA.hy926 Zellen

Abbildung 5 zeigt die relative Expression der EA.hy926 Zellen nach der Transfektion mit siRNA gegen das Glykoprotein ICAM-1 in den Konzentrationen 25 nM, 50 nM, 100 nM, sowie nach Transfektion mit den SCR-siRNAs und INTERFERin®. Die Versuchsdurchführung erfolgte mittels qRT-PCR. Alle Zellen erhielten zusätzlich TNF- $\alpha$  außer den unbehandelten Zellen (gekennzeichnet als „ohne alles“). Die X-Achse zeigt die verwendeten Medien und deren Konzentrationsangaben, die Y-Achse zeigt die relative Expression in Prozent. Als Referenzzellen dienten die mit TNF- $\alpha$  behandelte Zellen, die auf 100% gesetzt wurden. Alle anderen Werte wurden ins Verhältnis dazu gesetzt. Die Balken zeigen den Mittelwert  $\pm$  eine SD, n=3.

Bei diesem Versuch bezog sich der Referenzwert mit 100% auf die mit TNF- $\alpha$  behandelten Zellen. Der Signalstoff TNF- $\alpha$  bewirkt eine vermehrte Expression von ICAM-1 in den Zellen. Bei allen transfizierten Zellen, erfolgte eine zusätzliche Behandlung mit TNF- $\alpha$ . Die Zellen, die mit der funktionellen siRNA gegen ICAM-1 behandelt wurden, zeigten die erwartete verminderte Expression von ICAM-1, wobei der Knockdown der relativen Expression bei einer Konzentration von 25

nM am stärksten war. INTERFERin® zeigte insgesamt eine vermehrte relative ICAM-1 Expression, wobei bei einer Konzentration von 50 nM die relative Expression am stärksten war. Zellen, die mit scrambled siRNAs behandelt wurden, sollten eigentlich eine ähnliche relative ICAM-1 Expression zeigen, wie die nur mit TNF- $\alpha$  behandelten Zellen. Diese Erwartung traf bei der SCRalt-siRNA bei einer Konzentration von 50 nM und der SCR1-siRNA ebenfalls bei einer Konzentration von 50 nM zu. Bei beiden SCR-siRNAs kam es zu einer diskreten Verringerung der relativen Expression Die mit SCR2-siRNA behandelten Zellen bei einer Konzentration von 50 nM zeigten eine deutliche Verstärkung der relativen Expression von ICAM-1. Signifikante Unterschiede gab es nicht.

### 3.2.2 Ergebnisse der fluoreszierenden Durchflusszytometrie (FACS)



**Abbildung 6:** Ergebnis der relativen Expression von ICAM-1 auf Proteinebene nach Transfektion von siRNA gegen ICAM-1, INTERFERin® und den SCR-siRNAs in EA.hy926 Zellen

Der in Abbildung 5 durchgeführte Versuch auf mRNA Ebene wurde auf Proteinebene mittels Durchflusszytometrie wiederholt (Abbildung 6). Die Y-Achse zeigt die relative Genexpression in Prozent. Auf der X-Achse sind die verwendeten Medien in den Konzentrationen 25 nM, 50 nM und 100 nM dargestellt. Alle Zellen wurden zusätzlich mit TNF- $\alpha$  behandelt bis auf die Zellen, die nur den Antikörper erhielten und die unbehandelten Zellen. Als Referenzzellen dienten die mit TNF- $\alpha$  behandelte Zellen, die auf 100% gesetzt wurden und alle anderen Werte ins Verhältnis dazu. Die Balken zeigen den Mittelwert  $\pm$  eine SD, n=4. Signifikante Werte wurden wie folgt gekennzeichnet: Signifikanzniveau mit  $p \leq 0,05 = *$ ,  $p \leq 0,01 = **$ ,  $p \leq 0,001 = ***$ . Zur besseren Übersicht sind weitere signifikanten Werte in Tabelle 12, 13 und 14 aufgelistet.

Um die ICAM-1 Expression mit der Durchflusszytometrie zu messen, wurden die Zellen mit einem fluoreszierenden ICAM-1 Antikörper gefärbt. Als Referenzzellen dienten Zellen, die mit TNF- $\alpha$  behandelt wurden. Abbildung 6 zeigt, dass die ICAM-1 Expression ohne Aktivierung mit TNF- $\alpha$  signifikant vermindert war sowohl bei den Zellen, die nur mit dem Antikörper behandelt wurden als auch bei den unbehandelten Zellen. In beiden Fällen lag das Signifikanzniveau bei  $p \leq 0,001$ . Die funktionelle siRNA gegen ICAM-1 zeigte bei allen Konzentrationen (25 nM, 50 nM, 100 nM) einen nicht signifikanten Knockdown der relativen Expression, wobei der Knockdown bei einer Konzentration von 100 nM am stärksten war. Die mit INTERFERIN® behandelten Zellen zeigten eine vermehrte relative Genexpression im Vgl. zu den Zellen, die nur mit TNF- $\alpha$  behandelt wurden, wobei diese bei einer 50 nM Konzentration am stärksten war. Insgesamt hatten alle verwendete scrambled siRNAs ähnliche Werte, wie die nur mit TNF- $\alpha$  behandelten Referenzzellen. Die SCR-siRNAs, deren Werte am nächsten an den Referenzzellen waren, waren die SCR1-siRNA, SCR3-siRNA und SCRalt-siRNA, wobei die SCR1-siRNA bei einer Konzentration von 100 nM den geringsten Einfluss auf die Zellen zeigte, gefolgt von SCR3-siRNA bei einer Konzentration von 25 nM. Neben den in Abbildung 6 dargestellten signifikanten Unterschieden gab es die in Tabelle 12-14 ersichtlichen, weiteren signifikanten Unterschiede:

Tabelle 12: Darstellung der signifikanten Unterschiede bei einem Signifikanzniveau von  $p \leq 0,001^{***}$

Ohne TNF- $\alpha$ mit AK vs	INTERFERin® 50nM, 100nM
Ohne TNF- $\alpha$ mit AK vs	SCRalt-siRNA 25nM, 50nM, 100nM
Ohne TNF- $\alpha$ mit AK vs	SCR1-siRNA 25nM, 50nM, 100nM
Ohne TNF- $\alpha$ mit AK vs	SCR2-siRNA 100nM
Ohne TNF- $\alpha$ mit AK vs	SCR3-siRNA 25nM, 50nM, 100nM
Ohne alles vs	INTERFERin® 25nM, 50nM, 100nM
Ohne alles vs	SCRalt-siRNA 25Nm; 50Nm; 100nM
Ohne alles vs	SCR1-siRNA 50nM, 100nM
Ohne alles vs	SCR2-siRNA 100nM
Ohne alles vs	SCR3-siRNA 25nM, 50nM, 100nM

Tabelle 13: Darstellung der signifikanten Unterschiede bei einem Signifikanzniveau von  $p \leq 0,01^{**}$

Ohne TNF $\alpha$ mit AK vs	SCR2-siRNA 25 nM
Ohne alles vs	SCR2-siRNA 25 nM, 50 nM
INTERFERin® 25 nM vs	ICAM-1 25 nM, 50 nM, 100 nM
INTERFERin® 50 nM vs	ICAM-1 25 nM, 50 nM
INTERFERin® 100 nM	ICAM-1 25 nM, 50 nM, 100 nM
ICAM-1 25 nM vs	SCRalt-siRNA 25 nM, 50 nM
ICAM-1 25 nM vs	SCR1-siRNA 50 nM
ICAM-1 25 nM vs	SCR2-siRNA 100 nM
ICAM-1 25 nM vs	SCR3-siRNA 25 nM, 50 nM
ICAM-1 50 nM vs	SCRalt-siRNA 25 nM, 50 nM
ICAM-1 50 nM vs	SCR1-siRNA 25 nM, 50 nM, 100 nM
ICAM-1 50 nM vs	SCR2-siRNA 100 nM
ICAM-1 50 nM vs	SCR3-siRNA 25 nM, 50 nM
ICAM-1 100 nM vs	SCRaltsiRNA 50 nM, 100 nM
ICAM-1 100 nM vs	SCR1-siRNA 25 nM, 100 nM

ICAM-1 100 nM vs	SCR3-siRNA 25 nM, 50 nM
------------------	-------------------------

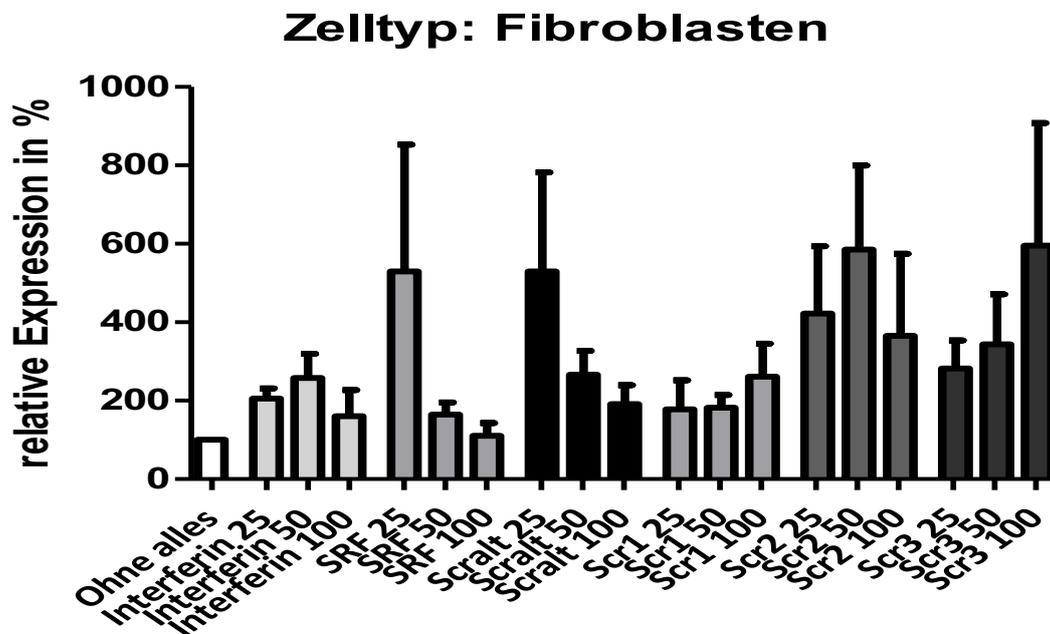
Tabelle 14: Darstellung der signifikanten Unterschiede bei einem Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$  \*

Ohne TNF- $\alpha$ mit AK vs	SCR2-siRNA 50 nM
ICAM-1 25 nM vs	SCRalt-siRNA 100 nM
ICAM-1 25 nM vs	SCR1-siRNA 25 nM, 100 nM
ICAM-1 50 nM vs	SCRalt-siRNA 100 nM
ICAM-1 100 nM vs	SCR3-siRNA 100 nM

### 3.3 Versuch 3 (V3): Auswertung der qRT-PCR sowie der Zellzahl nach Transfektion von Fibroblasten mit siRNA gegen SRF, INTERFERin® und SCR- siRNA

Im dritten Versuch wurde der Einfluss von siRNA gegen SRF in Fibroblasten untersucht sowie das Verhalten der SCR-siRNA und INTERFERin®. Die Untersuchung erfolgte auf mRNA Ebene sowie die Ermittlung der Anzahl der Zellen mit CASY®.

#### 3.3.1 Ergebnisse der qRT-PCR



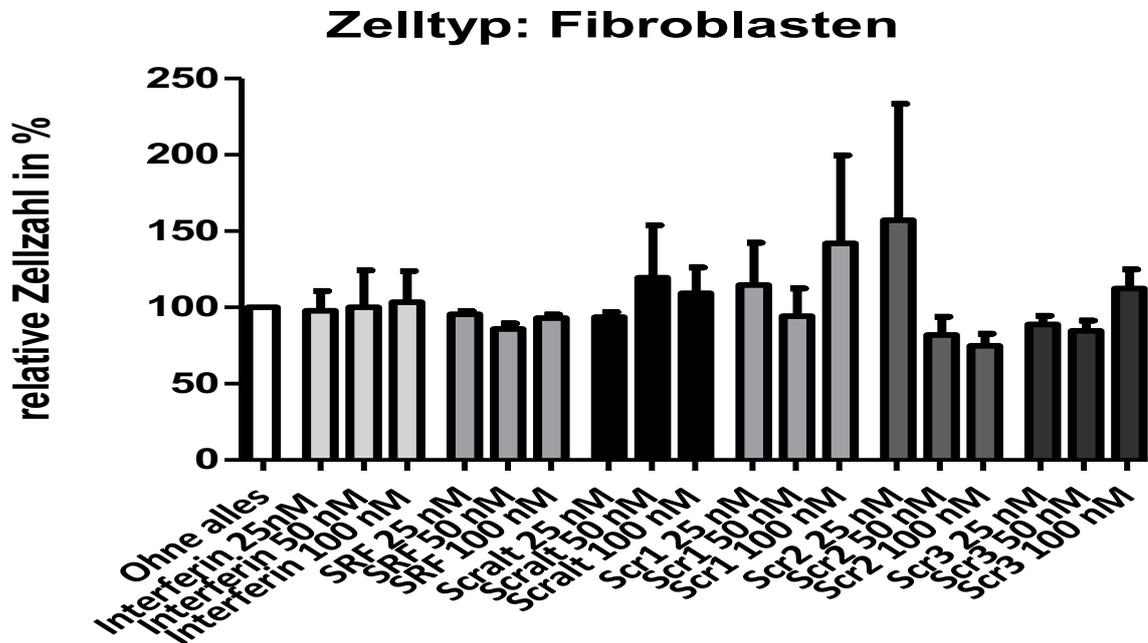
**Abbildung 7:** Ergebnis der relativen Expression von SRF nach Transfektion mit siRNA gegen SRF, INTERFERin® und den SCR-siRNAs in Fibroblasten

In Abbildung 7 dargestellt ist die relative Expression von SRF in Fibroblasten. Die Y-Achse zeigt die relative Expression in Prozent. Auf der X-Achse ist die siRNA gegen SRF, das Transfektionsmedium sowie die verwendeten SCR-siRNAs in den Konzentrationen 25 nM, 50 nM, 100 nM dargestellt. Die unbehandelten Zellen wurden auf 100% gesetzt und die anderen Werte ins Verhältnis dazu. Die Balken zeigen den Mittelwert  $\pm$  eine SD, n=5.

Insgesamt reagierten alle transfizierten Zellen mit einer vermehrten relativen SRF Expression in unterschiedlichen Ausprägungen im Vgl. zu den unbehandelten Zellen.

Insbesondere bei einer Konzentration von 25 nM der funktionellen siRNA gegen SRF kam es zu einem starken Anstieg der SRF Expression. Bei der 100 nM Konzentration kam es nur zu einem diskreten Anstieg der relativen Expression, nicht jedoch zu einem Knockdown, wie es zu erwarten gewesen wäre. Bei den scrambled siRNAs hatte die SCR1-siRNA in den Konzentrationen 25 nM und 50 nM den geringsten Einfluss auf die relative Expression im Vgl. zu den unbehandelten Zellen, gefolgt von der SCRalt-siRNA in einer 100 nM Konzentration. Signifikant waren beide Werte nicht. INTERFERin® zeigte ebenfalls eine Zunahme der relativen Expression, wobei bei einer Konzentration von 100 nM der Einfluss am geringsten war.

### 3.3.2 Ergebnisse der Zellzählung mit CASY®



**Abbildung 8:** Ergebnis der relativen Zellzahl nach Transfektion mit siRNA gegen SRF, INTERFERin® und den SCR-siRNAs von Fibroblasten

In Abbildung 8 ist auf der Y-Achse die relative Zellzahl abgebildet. Die X-Achse zeigt die Medien, mit denen die Fibroblasten transfiziert wurden (siRNA gegen SRF, das Transfektionsmedium INTERFERin® sowie die vier SCR-siRNAs) in den Konzentrationen 25 nM, 50 nM und 100 nM. Die unbehandelten Zellen wurden auf 100% gesetzt und die anderen Werte im Verhältnis dazu dargestellt. Die Balken zeigen den Mittelwert  $\pm$  eine SD, n=4.

Signifikante Unterschiede bei der relativen Zellzahl der behandelten und unbehandelten Fibroblasten gab es nicht. Eine diskrete Minderung der Zellproliferation gab es bei den Zellen, die mit funktioneller siRNA gegen SRF behandelt wurden, wobei bei einer Konzentration von 50 nM die relative Zellzahl am geringsten war. Bei den scrambled siRNAs gab es sowohl eine Verminderung als auch ein Anstieg der Zellproliferation. Den geringsten Einfluss auf die relative Zellproliferation zeigt die SCR1-siRNA bei einer Konzentration von 50 nM, gefolgt von der SCRalt-siRNA bei einer Konzentration von 25 nM. Die mit INTERFERin®

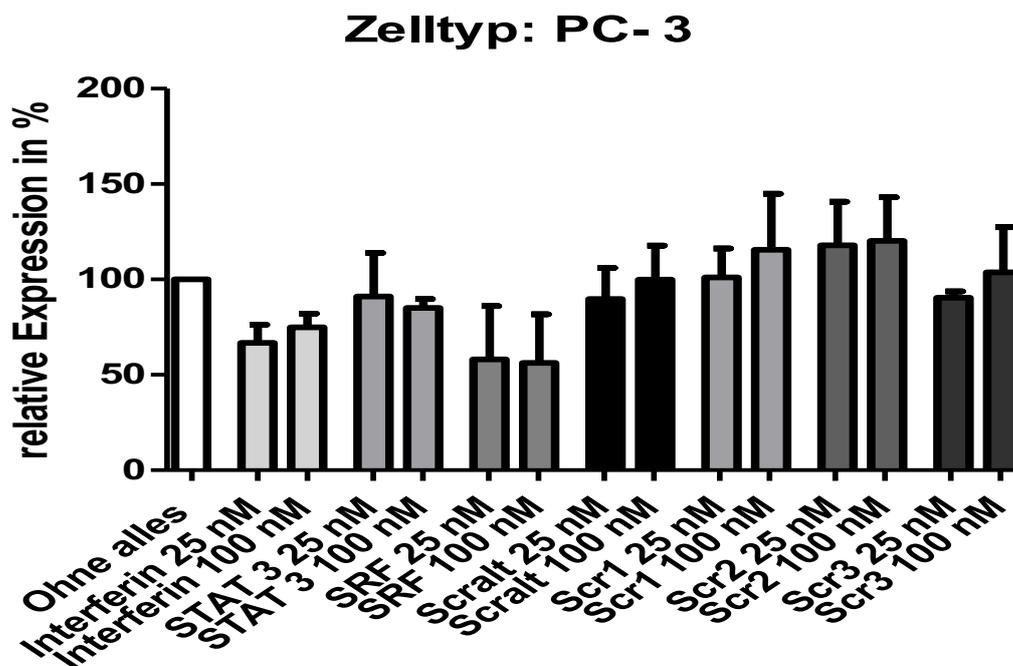
behandelten Zellen, zeigten bei einer 100 nM Konzentration einen leichten Anstieg der Zellproliferation und bei 25 nM eine leichte Verminderung der Zellproliferation.

#### **3.4 Versuch 4 (V4): Auswertung der mRNA Expression sowie der relativen Zellzahl nach Transfektion von PC-3 Zellen mit siRNA gegen SRF und STAT3, INTERFERin® sowie SCR-siRNA**

Im vierten Versuch wurde der Einfluss der vier unterschiedlichen scrambled siRNAs sowie des Transfektionsmittels INTERFERin® auf Prostatakarzinomzellen (PC-3 Zellen) untersucht. Weiterhin wurden die funktionalen siRNAs gegen SRF und STAT3 getestet. Die Messungen erfolgten auf mRNA Ebene mittels qRT-PCR. Des Weiteren wurde eine Messung der Zellzahl mit CASY® durchgeführt.

### 3.4.1 Ergebnisse der qRT-PCR

V4 wurde drei Mal bei Verwendung der siRNA gegen SRF sowie vier Mal bei Verwendung der siRNA gegen STAT3 durchgeführt.



### Einfluss verschiedener siRNAs auf SRF

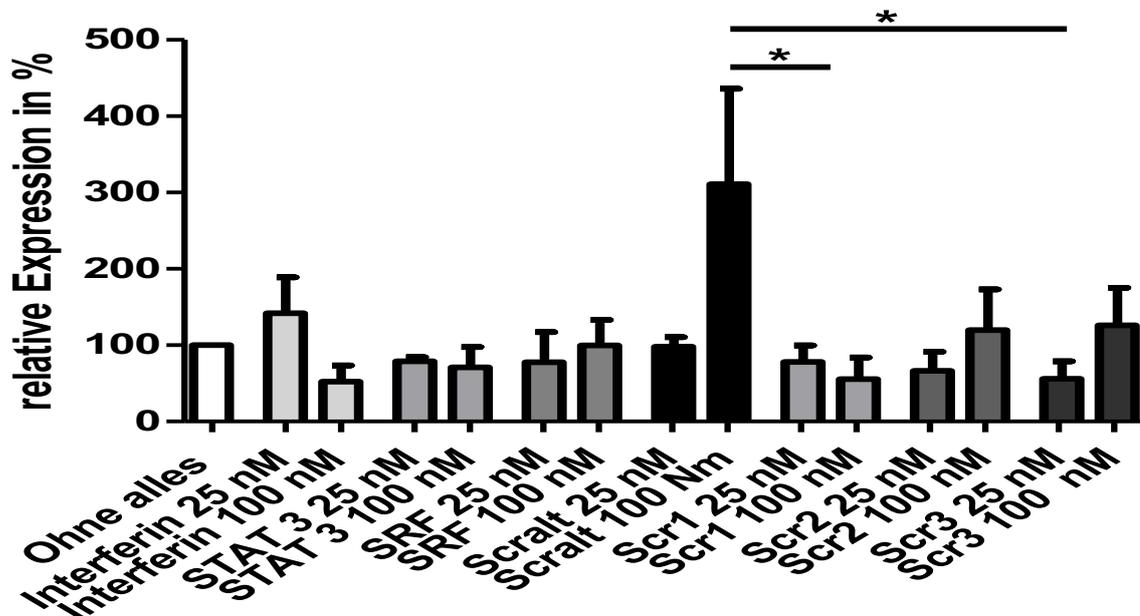
**Abbildung 9:** Ergebnis der relativen Expression von SRF nach Transfektion mit siRNA gegen SRF und STAT3, INTERFERin® sowie den vier SCR-siRNAs in PC 3 Zellen

In Abbildung 9 dargestellt ist die relative Genexpression nach Transfektion der Zellen mit 25 nM und 100 nM funktioneller siRNA gegen das Protein SRF. Gemessen wurde dabei die SRF mRNA Konzentration. Mituntersucht wurde auch die siRNA gegen STAT 3 sowie die Transfektion mit INTERFERin® und die vier SCR-siRNAs. Die Y-Achse zeigt die relative Genexpression in Prozent. Die X-Achse die unterschiedlichen Medien. Die unbehandelten Zellen wurden auf 100% gesetzt und die anderen Werte im Verhältnis dazu abgebildet. Die Balken zeigen den Mittelwert  $\pm$  die SD, n=3.

Abbildung 9 zeigt einen Knockdown relativen Genexpression von SRF nach Transfektion mit funktioneller siRNA gegen SRF, wobei es keinen wesentlichen

Unterschied gab zwischen einer Konzentration von 25 nM und 100 nM. Die siRNA gegen STAT3 zeigt nur eine geringe Verminderung der relativen Genexpression. Unter INTERFERin® zeigte sich eine Verringerung der relativen Genexpression sowohl bei 25 nM als auch bei einer Konzentration von 100 nM. Den geringsten Einfluss auf das Zellverhalten hatte die SCRalt-siRNA bei einer Konzentration von 100 nM und SCR1-siRNA bei einer Konzentration von 25 nM. Signifikante Unterschiede gab es keine.

### Zelltyp: PC-3



### Einfluss verschiedener siRNAs auf STAT3

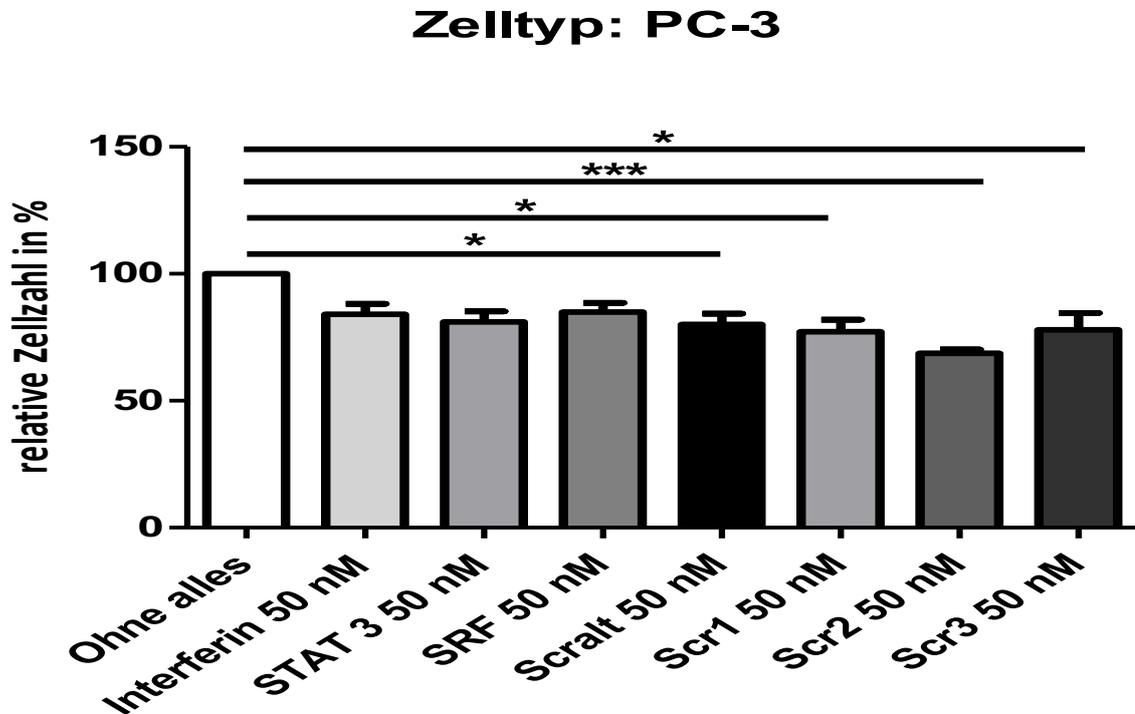
**Abbildung 10:** Ergebnis der relativen Expression von STAT3 nach Transfektion mit siRNA gegen STAT3 und SRF, INTERFERin® sowie den vier SCR-siRNAs in PC 3 Zellen

Dargestellt ist die relative Genexpression in Prozent nach der Transfektion mit der siRNA gegen den Transkriptionsfaktor STAT3. Untersucht wurde auch das Verhalten der siRNA gegen SRF auf die Genexpression sowie INTERFERin® und die vier SCR-siRNAs. Die Y-Achse zeigt die relative Genexpression in Prozent. Die X-Achse zeigt die unterschiedlichen Medien in den

Konzentrationen 25 nM und 100 nM. Die unbehandelten Zellen wurden auf 100% gesetzt und die anderen Werte im Verhältnis dazu abgebildet. Die Balken zeigen den Mittelwert  $\pm$  die SD, n=4. Signifikante Werte wurden wie folgt gekennzeichnet: Signifikanzniveau mit  $p \leq 0,05 = *$ ,  $p \leq 0,01 = **$ ,  $p \leq 0,001 = ***$ .

Abbildung 10 zeigt einen Knockdown der relativen Expression von STAT3 nach Transfektion mit der funktionellen siRNA im Vgl. zu den unbehandelten Zellen. Auch bei der funktionellen siRNA gegen SRF zeigt sich ein Knockdown der relativen Genexpression bei einer Konzentration 25 nM. Bei einer Konzentration von 100 nM zeigt sich kein Einfluss auf die relative Genexpression. Auf INTERFERin® reagieren die Zellen mit einer vermehrten relativen Genexpression bei 25 nM und mit einer Verminderung bei 100 nM. Im Vgl. zu den unbehandelten Zellen. Den geringsten Einfluss beim Vergleich der SCR-siRNAs hatte die SCRalt-siRNA bei einer 25 nM Konzentration, gefolgt von der SCR2-siRNA bei einer 100 nM Konzentration und der SCR1-siRNA bei einer Konzentration von 25 nM. Auffällig ist die Aktivierung der relativen Genexpression durch die SCRalt-siRNA bei 100 nM. Signifikante Unterschiede gab es zwischen der SCRalt-siRNA bei einer Konzentration von 100 nM und SCR1-siRNA bei einer Konzentration von 25 nM. Das Signifikanzniveau lag bei  $p \leq 0,05$ . Auch gab es einen signifikanten Unterschied zwischen der SCR1-siRNA bei einer Konzentration von 100 nM und der SCR3-siRNA bei einer Konzentration von 25 nM. Das Signifikanzniveau lag ebenfalls bei  $p \leq 0,05$ .

### 3.4.2 Ergebnisse der relativen Zellzahl mit CASY®



**Abbildung 11:** Ergebnis der relativen Zellzahl nach Transfektion mit siRNA gegen SRF und STAT3, INTERFERin® sowie den vier SCR-siRNAs von PC-3 Zellen

Bei diesem Versuch wurde die Anzahl der Zellen mittels CASY® bei einer Konzentration von 50 nM gemessen. Die X-Achse zeigt die relative Zellzahl. Auf der Y-Achse sind die verwendeten Transfektionsmedien dargestellt. Die unbehandelten Zellen wurden auf 100% gesetzt und die anderen Werte ins Verhältnis dazu. Die Balken zeigen den Mittelwert  $\pm$  und SD, n=5. Signifikante Werte wurden wie folgt gekennzeichnet: Signifikanzniveau mit  $p \leq 0,05 = *$ ,  $p \leq 0,01 = **$ ,  $p \leq 0,001 = ***$ .

Abbildung 11 zeigt bei den funktionellen siRNAs gegen STAT3 und SRF eine leichte Verminderung der Zellproliferation im Vgl. zu den unbehandelten Zellen. Auch die Zellen, die nur mit dem Transfektionsmittel INTERFERin® behandelt wurden, zeigten einen leichten Rückgang der Zellzahl. Alle SCR- siRNAs zeigten einen deutlichen Rückgang der Zellproliferation im Vergleich zu den unbehandelten Zellen, der signifikant war. Das Signifikanzniveau lag bei der

SCRalt-siRNA, SCR1-siRNA und der SCR3-siRNA bei  $p \leq 0,05$ . Bei der SCR2-siRNA war es am geringsten mit einem Signifikanzniveau von  $p \leq 0,001$ .

## 4. Diskussion

### 4.1 Überblick: Von der Entdeckung der RNA-Interferenz bis zur Entwicklung und Zulassung von siRNA basierten Medikamenten

Krankheiten wie die Atherosklerose, die benigne Prostatahyperplasie, das Prostatakarzinom oder Lungenkarzinome sind Erkrankungen mit unterschiedlicher Ätiologie und Verlauf. Sie haben jedoch gemeinsam, dass die derzeit verfügbaren Therapiemöglichkeiten limitiert sind, teilweise deutliche Nebenwirkungen haben und in ihrer Wirkung begrenzt sind. Der RNA-Interferenz Mechanismus wurde erstmals 1990 in Pflanzen beschrieben (Lee et al., 2013, Napoli et al., 1990). 1998 wiesen die Wissenschaftler Andrew Z. Fire und Craig C. Mello den RNAi-Mechanismus im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* nach. Hierfür erhielten sie 2006 den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin (Lee et al., 2013). Nach der Entdeckung dieses natürlichen Mechanismus der Genregulation wurde viel Hoffnung in einen sich daraus ergebenden breiten therapeutischen Nutzen, gesetzt. Es sollten jedoch noch 20 Jahre vergehen, von dieser Entdeckung bis zur Zulassung des ersten auf siRNA basierten Medikaments durch die U.S. Food and Drug Administration (FDA) im Jahr 2018 (Saw and Song, 2020). Zugelassen wurde das Medikament Onpatro® für die Behandlung der hereditären Transthyretin (TTR)-vermittelte Amyloidose (hATTR), eine seltene Erkrankung, bei der es zur vermehrten Proteinablagerung kommt (Adams et al., 2018). Von 2008 bis 2018 wurden 44 Studien zu weiteren Medikamenten auf siRNA Basis verzeichnet, die sich inzwischen in unterschiedlichen klinischen Testphasen befinden. Die Studien zielen auf die unterschiedlichsten Erkrankungen wie z.B. Krebserkrankungen, Virusinfektionen oder Kardiovaskuläre Erkrankungen ab (Saw and Song, 2020). Die Entwicklung zeigt, dass auf RNAi-Mechanismus basierte Medikamente vielversprechend sind und in den letzten Jahren immer mehr auf diesem Gebiet geforscht wurde. Jedoch gibt es nach wie vor noch einige Hürden bei der Medikamentenentwicklung zu überwinden wie z.B. der Umgang mit den Off-Target-Effekten (Kap.1.6.4), Effizienzsteigerung oder der Suche nach der scrambled siRNA mit dem geringsten oder im besten Fall mit keinem Einfluss auf

das Zellverhalten. Denn die Klärung dieser Herausforderungen bereits im Rahmen von in-vitro-Studien bildet die Grundlage dafür, dass weitere Versuche bis hin zu den klinischen Testphasen erfolgreich durchgeführt werden können.

Versuche, die am Institut von Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie durchgeführt wurden zeigten, dass die verwendeten scrambled siRNAs Auswirkungen auf das Zellverhalten und die Genexpression hatten, obwohl dies eigentlich ausgeschlossen sein sollte. Es wurde vermutet, dass diese Reaktion auf die Transfektionstoxizität zurückzuführen sei (Makowiecki et al., 2014, Walker et al., 2013, Stoleriu et al., 2014). Zwei Möglichkeiten könnten zu einer solchen Änderung des Zellverhaltens führen: Die Ursache hierfür kann entweder an der verwendeten SCR-siRNA zusammen mit dem Transfektionsmedium liegen oder das Transfektionsmedium allein kann ursächlich sein. Vor diesem Hintergrund wurde die Frage formuliert, welche scrambled siRNA keinen oder den geringsten Einfluss auf die Zelle und ihren Stoffwechsel hat, um eine Verfälschung von Untersuchungsergebnissen durch die SCR-siRNA so gering wie möglich zu halten. Diese SCR-siRNA mit der geringsten Beeinflussung würde dann für weitere Experimente verwendet werden. Bei allen Versuchen wurde auch immer das Transfektionsmedium, in dem Fall INTERFERin® allein mituntersucht, um dessen Verhalten auf die Zellen zu untersuchen.

Bezugnehmend auf die Fragestellung, welche scrambled siRNA den geringsten Einfluss auf das Zellverhalten hat, erfolgte die Auswahl der Zellen für alle vier in dieser Arbeit beschriebenen Versuche. Dabei war es wichtig für das Ergebnis, die scrambled siRNAs an unterschiedlichen Zellen zu testen, die zur Simulation verschiedener Erkrankungen in-vitro verwendet werden können. Zum Einsatz kamen sowohl immortalisierte Zellen wie die Zelllinien A549, EA.hy926 und PC-3 als auch Primärzellen in Form von Fibroblasten.

Tabelle 15: Darstellung der Versuche V1-V4 in Bezug auf die Erkrankung und die verwendeten Zellarten

<b>Versuch</b>	<b>V1</b>	<b>V2</b>	<b>V3</b>	<b>V4</b>
<b>Simulierte Erkrankung</b>	NSCLC	Atherosklerose	Benigne Prostatahyperplasie	Prostatakarzinom
<u>Immortalisierte Zellen</u>	A549	EA.hy926		PC-3
<u>Primärzellen</u>			Fibroblasten	

Immortalisierte Zellen haben den Vorteil, dass sie durch die Transformation, also durch Veränderungen an dem Zellmechanismus der Zellen, über eine unbegrenzte Teilbarkeit verfügen. Dadurch sind sie immer verfügbar und größere Studien können mit ihnen durchgeführt werden. Von Nachteil ist, dass durch die Transformation, viele ursprüngliche in-vivo-Merkmale verloren gegangen sind wie z.B. die Fähigkeit in Apoptose zu gehen oder eine Verringerung der Ansprechbarkeit auf Wachstumsfaktoren (Schmitz, 2011a). Aus diesem Grund wurden die Versuche der vorliegenden Arbeit nicht nur an immortalisierten Zellen, sondern auch an Primärzellen durchgeführt. Auch wenn die Handhabung von Primärzellen erschwert und ihre Verfügbarkeit begrenzt ist, ist ihr Einsatz bei Versuchen von erheblicher Relevanz, aufgrund dem menschlichen Organismus sehr ähnlichen Zellcharakteristika (Schmitz, 2011a). Denn Primärkulturen haben den Vorteil, dass die Zellen nur wenig verändert sind und in-vivo-Bedingungen besser repräsentieren. In diesem Fall wurden Fibroblasten aus der Prostata verwendet. Der limitierende Faktor bei Verwendung von Primärzellen liegt in der Zellseneszenz, also in der begrenzten Teilbarkeit (Schmitz, 2011a). Ein weiterer Nachteil ist die Unterschiedlichkeit der Primärzellen. Je nach Herkunft ist z.B. der Zell- Stoffwechsel anders, was wiederum dazu führt, dass die Vergleichbarkeit der Versuchsergebnisse erschwert ist (Schmitz, 2011a).

Bei den Versuchen wurde auf bereits etablierte Versuchsprotokolle zurückgegriffen. Alle eingesetzten siRNAs waren bereits zuvor an unterschiedlichen Zellen in Versuchsreihen am Institut für Herz-, Thorax-, und Gefäßchirurgie, Tübingen untersucht worden. In diesen Untersuchungen war es gelungen, den Knockdown durch die verwendeten funktionellen siRNAs nachzuweisen. Weiterhin wurden bei den vorliegenden Versuchen unterschiedliche Konzentrationen von 25 nM, 50 nM oder 100 nM des Transfektionsmittels INTERFERin®, der funktionellen siRNA und der SCR-siRNA verwendet, die sich bereits zuvor als besonders wirksam herausgestellt hatten. Vorherige Untersuchungen, hatten gezeigt, dass Zellen bereits bei einer Konzentration von 25 nM einen signifikanten Knockdown der Ziel mRNA aufwiesen. Wobei diese Konzentration nicht für alle Zelllinien gleich war. Einige Zelllinien wiesen erst bei einer Konzentration von 100 nM einen signifikanten Knockdown (Makowiecki et al., 2014, Walker et al., 2013, Pietschke et al., 2014) auf. Aus diesem Grund wurden die verwendeten Konzentrationen an die jeweiligen Zelllinien angepasst. Die Messung der Zellzahl bei einer Konzentration von 50 nM ergab sich ebenfalls aus vorangegangenen Versuchen (Nolte et al., 2013, Nolte et al., 2009). Versuche mit niedrigeren Konzentrationen führten zu keiner signifikanten Abnahme der Zellproliferation, Versuche mit höheren Konzentrationen führten zu vermehrtem Zellstress (Pietschke et al., 2014).

#### **4.2 Die aktuelle Entwicklung von siRNA in Bezug auf die benigne Prostatahyperplasie, NCLC, Atherosklerose und dem Prostatakarzinom**

Zunächst werden hier die Ergebnisse von V3, der Untersuchung an Primärzellen, in der vorliegenden Arbeit mit Fibroblasten, diskutiert. Bereits zuvor hatten Nolte et al. die Genexpression von funktioneller siRNA gegen SRF in Fibroblasten aus der Prostata von unterschiedlichen Probanden mit einer benignen Prostatahyperplasie untersucht. Sie konnten den erfolgreichen Knockdown mit siRNA gegen SRF in Primärzellen nachweisen und damit verbunden eine Reduktion der Zellzahl (Nolte et al., 2013). Die Ergebnisse führten zu der Schlussfolgerung, dass ein erfolgreiches Gen-Silencing von SRF zur Behandlung

von Harnröhrenstrikturen eingesetzt werden könnte (Nolte et al., 2013). In der medizinischen Praxis werden aktuell in erster Linie operative Verfahren zur Behandlung von Harnröhrenstrikturen empfohlen, wobei die Rezidivraten insbesondere bei der sehr häufig angewendeten Urethrotomie hoch sind (Strittmatter et al., 2017). Demzufolge wäre eine lokale siRNA-Therapie nach Urethrotomie zur Verminderung der Rezidivrate mit geringeren Nebenwirkungen und einem besseren Outcome sinnvoll.

Bei V3 wurde das Zellverhalten auf mRNA Ebene untersucht sowie die Zellzahl. Die Auswertung der relativen Expression auf mRNA Ebene von SRF in den Fibroblasten ergab insgesamt eine vermehrte SRF Expression unterschiedlicher Ausprägung sowohl bei der funktionellen siRNA gegen SRF, bei der Transfektion mit INTERFERin® als auch bei den SCR-siRNAs (siehe Abb.7). Theoretisch hätte es zu einem Knockdown der SRF Expression bei der verwendeten siRNA kommen sollen. Denn eine signifikante Verringerung der SRF Expression durch siRNA in Fibroblasten konnte durch Nolte et al. bereits nachgewiesen werden (Nolte et al., 2013). Es ist zu vermuten, dass die Ursache für das vorliegende Ergebnis in den verwendeten Fibroblasten selbst zu finden ist. SRF scheint in den Zellen vorhanden zu sein, jedoch scheint es entweder nicht so elementar für die Zellen oder die funktionelle siRNA war nicht potent genug. Bei den untersuchten SCR-siRNAs hatte die SCR1-siRNA bei einer Konzentration von 25 nM und 50 nM den geringsten Einfluss auf die SRF Expression im Vgl. zu den unbehandelten Zellen. Insgesamt zeigte die Zellen, die mit der SCR1- siRNA transfiziert wurden eine vermehrte SRF Expression, die nicht signifikant war. Das Ergebnis der Zellzählung mit CASY® ergab bei der verwendeten siRNA gegen SRF nur einen sehr geringen, nicht signifikanten Rückgang der relativen Zellzahl im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Ein Rückgang der Zellzahl war wünschenswert, da vermutet wird, dass mit einer Verminderten SRF Expression, es zu einer Reduzierung der Zellzahl kommt, was z.B. bei der Therapie von Harnröhrenstrikturen eine Rolle spielen könnte. Andere Untersuchungen zeigten jedoch auch, dass es trotz verminderter SRF Expression auf mRNA Ebene, es zu keiner nennenswerten Verminderung der Zellzahl gekommen war (Walker et

al., 2013). Bei den untersuchten SCR-siRNAs zeigte auch hier die SCR1-siRNA bei einer Konzentration von 50 nM, gefolgt von der SCRalt-siRNA bei einer Konzentration von 25 nM den geringsten Einfluss auf die relative Zellzahl im Vgl. zu den unbehandelten Zellen.

Für die Versuche V1, V2, V4 wurden immortalisierten Zellen verwendet. Die Untersuchungen bei V1 erfolgten an der Zelllinie A549 mit den funktionellen siRNAs gegen E2F1, Survivin und STAT3. Die Wirksamkeit von siRNA gegen E2F1, Survivin und STAT3 mit der Zelllinie A549 wurde bereits in vorangegangenen Versuchen bestätigt (Stoleriu et al., 2014). E2F1 ist ein Protein, welches zur Transkriptionsfaktorfamilie E2F1 zählt. Es spielt nicht nur eine zentrale Rolle im Zellzyklus sondern Forschungen der letzten Jahre zeigten auch, dass E2F1 Einfluss auf den Metabolismus der Zelle hat. Dabei beeinflusst E2F1 nicht nur den physiologischen, also den gesunden Stoffwechsel, sondern auch den pathologischen Stoffwechsel z.B. bei Adipositas oder bei Krebserkrankungen (Denechaud et al., 2017).

Das Protein Survivin wird in hoher Konzentration von Tumorzellen exprimiert, während es in gesundem Gewebe fast nicht nachweisbar ist (Jaiswal et al., 2015). Survivin hemmt die Apoptose und fördert den Zellzyklusprozess und damit die Karzinogenese. Aus diesem Grund ist es bereits seit einigen Jahren ein vielversprechendes therapeutisches Ziel in der Krebsforschung. Als therapeutische Ansätze werden indirekte Survivin Inhibitoren von direkten Inhibitoren unterschieden. Forschungen zeigten, dass es durch die Hemmung des Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) / Protein- Kinase-B (PKB) Signalwegs zu einer Inhibition der Survivin Expression kommt und somit indirekt auf die Survivin Expression Einfluss genommen werden kann. Zum Beispiel beeinflusst der Wirkstoff Lapatinib diesen Signalweg und wird u.a. bei der Behandlung von Brustkrebs eingesetzt. Die direkten Inhibitoren befinden sich derzeit noch in unterschiedlichen Testphasen (Martínez-García et al., 2019).

Der Transkriptionsfaktor STAT3 spielt eine zentrale Rolle in Zellprozessen und wird unter physiologischen Bedingungen normalerweise streng reguliert. Eine

dauerhafte Aktivierung konnte in vielen Krebsarten festgestellt werden, wie z.B. im Mamma- oder Prostatakarzinom. Eine konstitutive Aktivierung von STAT3 hat einen großen Einfluss auf die Zellproliferation, Angiogenese und Metastasierung von Karzinomen. Daneben ergaben Forschungen, dass STAT3 auch die Immunsuppression beeinflusst und damit auch die Kanzerogenese. Aus diesem Grund ist STAT3 ein wichtiger Therapieansatz sowohl in der konventionellen Krebstherapie als auch in der Immuntherapie gegen Krebs (Laudisi et al., 2018, Wang et al., 2018). Aktuelle Forschungen beschäftigen sich sowohl mit der indirekten als auch mit der direkten Hemmung von STAT3 in der Krebstherapie (Cao et al., 2020).

Bei V1 konnte ein Einfluss der relativen Expression von E2F1, Survivin und STAT3 im Vgl. zu unbehandelten Zellen bei den jeweils getesteten funktionellen siRNAs auf mRNA Ebene in A549 Zellen nachgewiesen werden. Der Einfluss war von unterschiedlicher Intensität (Vgl. Abb. 1-3), was erwartet wurde. Gleichzeitig konnte auch eine vermehrte Expression von E2F1 bei 25 nM (Abb.2 und 3) sowie bei 100 nM (siehe Abb.2) festgestellt werden. Ein Grund für den Anstieg der Genexpression durch die siRNA könnte sein, dass die verwendete siRNA möglicherweise nicht effektiv genug war und die Zellen durch die Stresssituation mit einer vermehrten Zellproliferation reagierten. Jedoch gibt es für einen solchen Zusammenhang bisher keine eindeutigen Belege. Die Auswertung der scrambled siRNAs ergaben, dass die SCR1-siRNA bei einer Konzentration von 25 nM gefolgt von 100 nM die geringste Auswirkung auf die relative Expression im Vgl. zu den unbehandelten Zellen hatte (Abb.1). Abbildung 2 zeigt, dass die SCRalt-siRNA bei einer Konzentration von 25 nM gefolgt von SCR1-siRNA mit 100 nM und 25 nM die geringste Auswirkung auf die Zellen im Vgl. zu den unbehandelten Zellen hatte. Abbildung 3 zeigt, dass die SCR3-siRNA bei einer Konzentration von 25 nM gefolgt von der SCR1-siRNA bei einer Konzentration von 100 nM den geringsten Einfluss auf die die Zellen im Vgl. zu unbehandelten Zellen hatte. Es lässt sich schlussfolgern, dass bei V1 bei der Untersuchung auf mRNA Ebene die SCR-1 siRNA insgesamt weniger starken Schwankungen unterlag im Vgl. zu den anderen SCR-siRNAs und somit am

wenigsten Einfluss auf die Zellen hatte. INTERFERin® zeigte bis auf ein Mal eine vermehrte Genexpression sowohl bei 25 nM als auch bei 100 nM. Zu vermuten ist, dass durch die Transfektion selbst, die Zellen gestresst wurden. Keiner der Einflüsse auf mRNA Ebene waren signifikant.

Neben der Untersuchung auf mRNA Ebene erfolgte auch die Ermittlung der relativen Zellzahl mit CASY®. Die relative Zellzahl ergab eine deutliche Abnahme der Zellzahl bei den verwendeten funktionellen siRNAs gegen E2F1, Survivin und STAT3 im Vgl. zu den unbehandelten Zellen. Dies lässt vermuten, dass ein Knockdown durch die verwendete siRNA zu einer Verringerung der Zellzahl führt. Dies kann dadurch erklärt werden, dass die Proteine E2F1, Survivin, STAT3 eine wichtige Rolle beim Zellzyklus spielen und diesen im Sinne einer Reduzierung der Zellteilung beeinflussen. Bei den verwendeten SCR-siRNAs zeigte ebenfalls die SCR1-siRNA den geringsten Einfluss auf die relative Zellzahl im Vgl. zu den unbehandelten Zellen, gefolgt von der SCR3-siRNA. Das Ergebnis war nicht signifikant. Durch INTERFERin® kam es zu einer vermehrten Expression von E2F1, STAT3 und SRF und demzufolge zu einem Anstieg der Zellzahl. Der Anstieg der relativen Zellzahl durch INTERFERin® war signifikant zu der verminderten relativen Zellzahl der verwendeten funktionellen siRNAs. INTERFERin® als Trägersubstanz sollte in der Theorie keinen Einfluss auf den Zellstoffwechsel haben. Trägersubstanzen sind notwendig für die Transfektion der Zelle mit siRNA. Neuere Forschungen zur Behandlung von Lungenkarzinomen mit siRNA, untersuchen Nanopartikel wie INTERFERin® als Trägersubstanzen für die sonst sehr instabile siRNA (Itani and Al Faraj, 2019). Denn ohne Trägersubstanz wäre die siRNA schnell abgebaut und ist somit wirkungslos. Allgemein wird in siRNA zur Behandlung von Lungenkarzinomen viel Hoffnung gesetzt, da nach wie vor diese Erkrankung zu der häufigsten Krebsform weltweit zählt mit letalem Ausgang (Nasim et al., 2019). Die Herausforderung besteht darin, die optimale Trägersubstanz zu entwickeln. Dies kann nicht nur bei der Behandlung von Lungenkarzinomen sondern auch bei anderen Krebsarten von Bedeutung sein.

Bei V2 erfolgte die Untersuchung der siRNA gegen ICAM-1 an der immortalisierten Zelllinie EA.hy926. Die Versuchsdurchführung fand sowohl auf mRNA Ebene, mit Hilfe der qRT-PCR als auch auf Proteinebene mit Hilfe der Durchflusszytometrie, statt. Ein Knockdown der relativen Expression konnte, bei Verwendung der siRNA gegen ICAM-1, sowohl auf mRNA Ebene als auch auf Proteinebene im Vgl. zu den Referenzzellen festgestellt werden (Abb.5 und 6). Die Werte waren nicht signifikant. Als Referenzzellen dienten Zellen, die zuvor mit TNF- $\alpha$  behandelt wurden, wodurch die ICAM-1 Expression stimuliert wurde. Dies bestätigte das Ergebnis vorangegangener Versuche von Walker et al. mit human venösen Endothelzellen (engl. human venous endothelial cells = hVECs) (Walker et al., 2005). Dabei kam es auch zu einem Knockdown von ICAM-1 bei der Verwendung der entsprechenden siRNA gegen das Adhäsionsmolekül ICAM-1 (Walker et al., 2005).

Die Auswertung der SCR-siRNAs auf mRNA Ebene im Vgl. zu den Referenzzellen ergab, dass die SCRalt-siRNA bei einer 50 nM Konzentration den geringsten Einfluss auf die relative ICAM-1 Expression hatte. Der zweitgeringste Einfluss wurde erzielt von der SCR1-siRNA bei einer Konzentration von ebenfalls 50 nM. Sowohl die Referenzzellen als auch die mit SCR-siRNA transfizierten Zellen wurden mit TNF- $\alpha$  aktiviert. Die Ergebnisse waren nicht signifikant. Die Auswertung der Durchflusszytometrie zeigte, dass die mit TNF  $\alpha$  behandelten EA.hy926 Zellen, wie vermutet zu einer erheblichen, signifikanten Steigerung der relativen ICAM-1 Expression gegenüber den unbehandelten Zellen mit einem Signifikanzniveau von  $p \leq 0,001$  führte. Dadurch wurden vorherige Versuche bestätigt: Der Einfluss auf die ICAM-1 Expression durch TNF- $\alpha$ , konnte bereits zuvor in mehreren Versuchen nachgewiesen werden (Xue et al., 2018, Voisard et al., 1998). Im Vergleich zeigten die SCR-siRNAs eine ähnliche ICAM-1 Expression wie die mit TNF- $\alpha$  aktivierten Zellen, wobei die SCR2-siRNA bei einer Konzentration von 50 nM eine deutlich verminderte ICAM-1 Expression zeigte und die SCR1-siRNA bei einer Konzentration von 100 nM den geringsten Einfluss auf die relative Expression hatte. Die Ergebnisse waren nicht signifikant. INTERFERin® zeigte auf mRNA Ebene eine Zunahme der ICAM-1 Expression bei allen verwendeten Konzentrationen (25 nM, 50 nM, 100 nM). Diese Zunahme

war im Verhältnis zu den mit TNF- $\alpha$  behandelten Zellen jedoch nicht signifikant. Auf Proteinebene war die relative ICAM-1 Expression bei den mit INTERFERin® und TNF- $\alpha$  behandelten Zellen signifikant erhöht, sowohl im Vgl. zu den untransfizierten EA.hy926 Zellen als auch im Vgl. zu den Zellen, die nur mit dem Antikörper behandelt wurden (Abb.6). Das Signifikanzniveau lag bei  $p < 0,001$ . Die Zunahme der relativen ICAM-1 Expression durch INTERFERin® lässt vermuten, dass dadurch die Zellen zusätzlich gestresst werden und als Immunreaktion mit einer vermehrten relativen Expression antworten.

Das Adhäsionsmolekül ICAM-1 war in den letzten Jahren immer wieder Gegenstand der Forschung. Es gilt als nachgewiesen, dass ICAM-1 von zahlreichen Zellen wie z.B. den Epithel-, Endothel- und Immunzellen exprimiert und bei inflammatorischen Prozessen hochreguliert wird (Salvador et al., 2016, Cao et al., 2020). Beispielsweise ist ICAM-1 am Leukozytentransfer durch die Epithelschicht in Gefäßen beteiligt. Dabei handelt es sich um eine Entzündungsreaktion, die eine große Rolle bei der Atherogenese spielt (Bui et al., 2020). Trotz der bisher guten Kenntnis des Adhäsionsmoleküls, waren bisherige Therapien erfolglos. Des Weiteren ergaben Forschungen in jüngster Zeit, dass ICAM-1 auch eine wesentliche Rolle in Tumorzellen spielt. Zum Beispiel ist ICAM-1 an der Entwicklung von oralen Plattenepithelkarzinomen, Lungenkarzinomen oder Magenkarzinomen beteiligt (Bui et al., 2020). Vor diesem Hintergrund ist das Interesse weiterhin groß, ein geeignetes Therapieverfahren zu entwickeln, welches die Regulierung der ICAM-1 Expression zum Gegenstand hat.

Bei V4 wurden immortalisierte Prostatakarzinomzellen PC-3 und die funktionellen siRNAs gegen STAT3 und SRF verwendet. Die Versuchsdurchführung erfolgte auf mRNA Ebene. Darüber hinaus wurde der Einfluss auf die Zellzahl untersucht. Ein erfolgreicher Knockdown von STAT3 und SRF bei Verwendung entsprechender siRNAs an PC-3 Zellen wurde bereits nachgewiesen (Pietschke et al., 2014).

Wie zu Beginn der Diskussion bereits erwähnt, spielt der Transkriptionsfaktor STAT3 eine zentrale Rolle in der Kanzerogenese sowie in der Entwicklung des Prostatakarzinoms (Wang et al., 2018). Therapiemöglichkeiten sind, aufgrund von medikamentösen Resistenzen, insbesondere bei weit fortgeschrittenem Prostatakarzinom oder bei metastasierenden Prostatakarzinomen, erschwert. Dementsprechend wichtig erscheint die Entwicklung neuer, alternativer Therapiemöglichkeiten (Don-Doncow et al., 2017).

SRF spielt eine wesentliche Rolle bei der Expression von Immediate Early Gene (IEG). Es wird vermutet, dass es neben weiteren Genen wie dem Insulin-like growth factor 1 (IGF1) und dem CC-Chemokin-Ligand 2 (CCL2) eine wesentliche Rolle in der Entwicklung von Prostatakrebs spielt (Gorlov et al., 2010). Neue Untersuchungen befassen sich u.a. mit SRF als Tumormarker zur Entwicklung und Optimierung bei der Therapie von Prostatakarzinomen (Prencipe et al., 2018), sowie mit Regulierung von SRF als therapeutisches Ziel selbst (Lundon et al., 2017).

Die Untersuchung der relativen Expression von SRF in PC-3 Zellen ergab eine Verminderung der relativen SRF Expression im Vgl. zu den unbehandelten Zellen durch die verwendete funktionelle siRNA gegen SRF. Der Knockdown der relativen Expression war bei beiden Konzentrationen (25 nM und 100 nM) beinahe gleich, jedoch nicht signifikant.

Die Untersuchung der siRNA gegen den Transkriptionsfaktor STAT3 zeigte im Vgl. zu den unbehandelten Zellen bei einer Konzentration von 100 nM den stärksten Knockdown der relativen Expression. Im Vgl. zu den Ergebnissen der siRNA gegen SRF fiel der Knockdown insgesamt allerdings geringer aus. Signifikante Unterschiede gab es weder bei der siRNA gegen STAT 3 noch bei der siRNA gegen SRF. Es lässt sich vermuten, dass die verwendete siRNA gegen STAT3 in PC-3 Zellen weniger potent ist. Bei den SCR-siRNAs zeigte die SCRalt- siRNA bei einer Konzentration von 100 nM den geringsten Einfluss auf die Genexpression im Vgl. zu den untransfizierten Zellen. Auch die SCR1-siRNA bei 25 nM zeigte nur einen geringen Einfluss (siehe Abb.9). Signifikant waren die Ergebnisse jeweils nicht. In Abb. 10 ist dargestellt, dass die SCRalt- siRNA bei

einer Konzentration von 25 nM im Vgl. zu den unbehandelten Zellen den geringsten Einfluss auf die rel. Expression hatte. Die SCRalt- siRNA bei 100nM zeigte eine deutliche Hochregulierung der relativen Expression, was als Artefakt gewertet werden kann. Die SCR1-siRNA bei 25 nM sowie die SCR2-siRNA bei 100 nM zeigten ähnliche Werte im Vgl. zu den untransfizierten Zellen, wobei die relative Expression bei der SCR1-siRNA leicht herunterreguliert und bei der SCR2-siRNA leicht hochreguliert war. Signifikant waren diese Ergebnisse ebenfalls nicht. Das Transfektionsmittel INTERFERin® zeigte sowohl eine verminderte Genexpression als auch eine Hochregulation der Genexpression im Vgl. zu den unbehandelten Zellen, die nicht signifikant war (s. Abb. 9 und 10). Eine mögliche Ursache dafür könnte sein, dass die Zellen durch das Transfektionsmittel gestresst waren.

Die Untersuchung der relativen Zellzahl ergab bei den verwendeten siRNAs gegen STAT3 und SRF sowie bei INTERFERin® nur eine diskrete Verringerung der Zellzahl im Vgl. zu den unbehandelten Zellen (s.Abb.11). Eine signifikante Minderung der relativen Zellzahl konnte jedoch bei allen SCR-siRNAs im Vergleich zu den unbehandelten Zellen festgestellt werden. Eine Abnahme der Zellzahl war bei der SCRalt-siRNA mit einem Signifikanzniveau bei  $p \leq 0,05$  am geringsten, gefolgt von der SCR1-siRNA und SCR3-siRNA. Bei der SCR2-siRNA kam es zu einer noch stärkeren Abnahme der Zellzahl. Das Signifikanzniveau lag bei  $p \leq 0,001$ . Ableitend aus den Ergebnissen kann davon ausgegangen werden, dass PC-3 Zellen auf die verwendeten funktionellen siRNAs nur schlecht reagieren. Bei den verwendeten SCR-siRNAs reagierten sie mit einem unerwarteten, vermehrten Zelltod. Eine mögliche Ursache könnte in den verwendeten Zellen liegen. Jedenfalls war in beiden Fällen das jeweils gegenteilige Ergebnis zu erwarten gewesen. D.h. die Transfektion mit der funktionellen siRNA gegen STAT3 und SRF hätte zu einer Reduzierung der Zellzahl führen sollen und bei Einsatz der SCR-siRNAs hätte es zu keiner Abnahme der Zellzahl im Vgl. zu den unbehandelten Zellen kommen sollen.

### **4.3 Schlussfolgerung**

Im Ergebnis zeigen die durchgeführten Versuche V1-V4, dass die verwendeten SCR-siRNAs unterschiedlich ausgeprägte Auswirkungen auf die untersuchten Zelllinien hatten. Im Vergleich aller vier Versuche, übte die SCR1-siRNA den geringsten Einfluss aus und unterlag weniger starken Schwankungen im Vgl. zu den anderen SCR-siRNAs. Den zweitgeringsten Einfluss über die gesamte Versuchsreihe übte die SCRalt-siRNA aus. Allerdings kam es in Abhängigkeit der Konzentration der SCR-siRNAs und der Art der verwendeten Zellen durchaus zu teilweise abweichenden Ergebnissen.

In der Gesamtschau lässt sich jedoch feststellen, dass für weitere Versuche die SCR1-siRNA der Firma Eurofins als Referenzkontrolle am geeignetsten erscheint. Wegen der zuvor beschriebenen Abweichungen wäre es darüber hinaus bei zukünftigen Versuchen zu überlegen, ob man nicht mindestens zwei Referenzkontrollen bzw. SCR-siRNAs nutzt, um eine bessere Vergleichbarkeit zu erzielen. Auch zeigten die obigen Versuche, dass das Transfektionsmittel INTERFERin® offenbar ebenfalls das Zellverhalten beeinflusst. Damit bestätigt die vorliegende Arbeit frühere Versuche, bei denen der Einfluss von Transfektionsmitteln, in dem Fall Lipofectamine®2000, auf das Zellverhalten festgestellt worden war (Nolte et al., 2009). Auch dies sollte weiter untersucht werden.

## 5. Zusammenfassung

Der Einsatz von siRNA als therapeutisches Instrument ist zweifellos in Zukunft eine vielversprechende Methode mit einem breiten therapeutischen Nutzen, um unterschiedlichste Erkrankungen wie die Atherosklerose, das Prostatakarzinom oder die benigne Prostatahyperplasie zu behandeln. Derzeit gibt es zwei zugelassene siRNA Medikamente, beide zur Behandlung seltener Erkrankungen: Onpratto mit dem Wirkstoff Patisiran zur Behandlung der hereditären Transthyretin- Amyloidose, zugelassen bei Erwachsenen mit Polyneuropathie der Stadien 1 und 2, sowie das Medikament Givlaari mit dem Wirkstoff Givosiran zur Behandlung einer akuten hepatischen Porphyrrie (Meier et al., 2020). Zwei weitere, auf siRNA basierte Medikamente haben bereits die Empfehlung zur Zulassung von der Europäischen Arzneimittelbehörde (EMA) erhalten (Meier et al., 2020). Gleichzeitig kommt es auch immer wieder zum Abbruch von Studien, wie z.B. bei dem Medikament Bevasiranib, dass sich bereits in der klinischen Testphase III, befand (Meier et al., 2020, Saw and Song, 2020). Viele Mechanismen und Wechselwirkungen zwischen dem menschlichen Organismus und siRNA als Medikament, sind bis heute noch nicht geklärt. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um Nebenwirkungen zu reduzieren und die Pharmakokinetik zu verbessern. Auch gibt es noch keine zuverlässigen Daten hinsichtlich Langzeitnebenwirkungen wie z.B. der Kanzerogenität (Meier et al., 2020).

In vitro Versuche liefern die Basis für weiterführende Versuche, wenn deren Ergebnisse vielversprechend sind. Der Einsatz von SCR-siRNA bei Versuchen dienen als zusätzlicher Kontrollmechanismus. Sie dient als Bestätigung der verwendeten funktionellen siRNA hinsichtlich ihrer Wirksamkeit. Die Fragestellung der vorliegenden Arbeit war, zu zeigen, ob SCR-siRNAs Einfluss haben auf das Zellverhalten und dies anhand unterschiedlicher Zelllinien zu testen. Die SCR-siRNA mit dem geringsten Einfluss auf das Zellverhalten, sollte dann für zukünftige Versuche verwendet werden. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass für Versuche vorgesehene SCR-siRNAs, die als Kontrolle dienen und eigentlich keinen Einfluss haben sollten auf das

Zellverhalten, doch Einfluss nehmen in unterschiedlichem Ausmaß. Auch konnte gezeigt werden, dass die Reaktion abhängig von der verwendeten Zelllinie ist. Eine der vier getesteten SCR-siRNAs zeigte einen geringeren Einfluss auf das Zellverhalten. Die SCR1-siRNA der Firma Eurofins MWG Operon zeigte die geringsten Schwankungen auf das Verhalten der Zellen. Die SCRalt-siRNA der Firma Qiagen, zeigte ebenfalls einen geringen Einfluss, jedoch nicht bei allen Zelllinien. Für weitere Versuche mit siRNAs sollte die SCR1-siRNA der Firma Eurofins als Kontrolle zurückgegriffen werden. Auch wäre zu überlegen, bereits im Vorfeld unterschiedliche SCR-siRNAs zu testen, die dann sowohl bei in vitro als auch bei den späteren in vivo Versuchen verwendet werden könnten.

In anderen Arbeiten, wurde bereits gezeigt, dass Transfektionsmittel wie Lipofectamine®2000 das Zellverhalten beeinflussen (Nolte et al., 2009). Auch konnte bei INTERFERin® eine Beeinflussung des Zellverhaltens festgestellt werden im Vergleich zu den unbehandelten Zellen, der allerdings nicht signifikant war. Dennoch sollte dies weiter untersucht werden.

Die Verwendung von siRNA als Wirkstoff ist vielversprechend, jedoch gilt es noch viele Hürden zu überwinden. Die Basis hierfür liefern die in vitro Versuche. Je genauer diese sind, desto aussagekräftiger die Ergebnisse.

## 6. Literaturverzeichnis

2003. Whither RNAi? *Nat Cell Biol*, 5, 489-90.
- ADAMS, D., GONZALEZ-DUARTE, A., O'RIORDAN, W. D., YANG, C. C., UEDA, M., KRISTEN, A. V., TOURNEV, I., SCHMIDT, H. H., COELHO, T., BERK, J. L., LIN, K. P., VITA, G., ATTARIAN, S., PLANTÉ-BORDENEUVE, V., MEZEI, M. M., CAMPISTOL, J. M., BUADES, J., BRANNAGAN, T. H., 3RD, KIM, B. J., OH, J., PARMAN, Y., SEKIJIMA, Y., HAWKINS, P. N., SOLOMON, S. D., POLYDEFKIS, M., DYCK, P. J., GANDHI, P. J., GOYAL, S., CHEN, J., STRAHS, A. L., NOCHUR, S. V., SWEETSER, M. T., GARG, P. P., VAISHNAW, A. K., GOLLOB, J. A. & SUHR, O. B. 2018. Patisiran, an RNAi Therapeutic, for Hereditary Transthyretin Amyloidosis. *N Engl J Med*, 379, 11-21.
- ALIZADEH, M. & ALIZADEH, S. 2014. Survey of clinical and pathological characteristics and outcomes of patients with prostate cancer. *Glob J Health Sci*, 6, 49-57.
- ALTMAN, R. 2003. Risk factors in coronary atherosclerosis athero-inflammation: the meeting point. *Thromb J*, 1, 4.
- AMBROSINI, G., ADIDA, C. & ALTIERI, D. C. 1997. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med*, 3, 917-21.
- ARANDA, E. & OWEN, G. I. 2009. A semi-quantitative assay to screen for angiogenic compounds and compounds with angiogenic potential using the EA.hy926 endothelial cell line. *Biol Res*, 42, 377-89.
- ATCC. 2021a. [https://www.atcc.org/products/ccl-185?slp=1&geo\\_country=de](https://www.atcc.org/products/ccl-185?slp=1&geo_country=de) [Online]. [Accessed 15.09. 2021].
- ATCC. 2021b. [www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-1435.aspx#generalinformation](http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-1435.aspx#generalinformation) [Online]. [Accessed 15.09.2021].
- AUMÜLLER, G., AUST, G., DOLL, A., ENGELE, J., KIRSCH, J., MENSE, S., REIßIG, D., SALVETTER, J., SCHMIDT, W., SCHMITZ, F., SCHULTE, E., SPANEL-BOROWSKI, K., WOLFF, W., WURZINGER, L. J. & ZILCH, H. G. 2007. *Anatomie*, Georg-Thieme Verlag, Stuttgart.
- BANERJEE, K. & RESAT, H. 2016. Constitutive activation of STAT3 in breast cancer cells: A review. *Int J Cancer*, 138, 2570-8.
- BARBER, R. D., HARMER, D. W., COLEMAN, R. A. & CLARK, B. J. 2005. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol Genomics*, 21, 389-95.
- BRADLEY, J. R. 2008. TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol*, 214, 149-60.
- BRUHN, H. D., HACH-WUNDERLE, V., SCHAMBECK, C. M. & SCHARF, R. E. 2011. *Hämostaseologie für die Praxis*, Stuttgart, Schattauer
- BUEHLER, E., CHEN, Y. C. & MARTIN, S. 2012. C911: A bench-level control for sequence specific siRNA off-target effects. *PLoS One*, 7, e51942.
- BUI, T. M., WIESOLEK, H. L. & SUMAGIN, R. 2020. ICAM-1: A master regulator of cellular responses in inflammation, injury resolution, and tumorigenesis. *J Leukoc Biol*, 108, 787-799.

- BYRNE, R. A., JONER, M. & KASTRATI, A. 2015. Stent thrombosis and restenosis: what have we learned and where are we going? The Andreas Gruntzig Lecture ESC 2014. *Eur Heart J*, 36, 3320-31.
- CAO, X. X., YANG, J. K. & WANG, L. 2020. Association between intercellular adhesion molecule 1 (ICAM1) polymorphisms and diabetic foot susceptibility: A case-control study. *Medicine (Baltimore)*, 99, e18052.
- CHAI, J. & TARNAWSKI, A. S. 2002. Serum response factor: discovery, biochemistry, biological roles and implications for tissue injury healing. *J Physiol Pharmacol*, 53, 147-57.
- CHAKRABORTY, C., SHARMA, A. R., SHARMA, G., DOSS, C. G. P. & LEE, S. S. 2017. Therapeutic miRNA and siRNA: Moving from Bench to Clinic as Next Generation Medicine. *Mol Ther Nucleic Acids*, 8, 132-143.
- CHEN, M. L., CORREA, A. F. & SANTUCCI, R. A. 2016. Urethral Strictures and Stenoses Caused by Prostate Therapy. *Rev Urol*, 18, 90-102.
- CHEN, R. C., HAMSTRA, D. A., SANDLER, H. M. & ZIETMAN, A. L. 2014. Complications of prostate cancer treatment. *Lancet Oncol*, 15, e150.
- DANA, H., CHALBATANI, G. M., MAHMOODZADEH, H., KARIMLOO, R., REZAIEAN, O., MORADZADEH, A., MEHMANDOOST, N., MOAZZEN, F., MAZRAEH, A., MARMARI, V., EBRAHIMI, M., RASHNO, M. M., ABADI, S. J. & GHARAGOUZLO, E. 2017. Molecular Mechanisms and Biological Functions of siRNA. *Int J Biomed Sci*, 13, 48-57.
- DANIELS, S. M. & GATIGNOL, A. 2012. The multiple functions of TRBP, at the hub of cell responses to viruses, stress, and cancer. *Microbiol Mol Biol Rev*, 76, 652-66.
- DANIYAL, M., SIDDIQUI, Z. A., AKRAM, M., ASIF, H. M., SULTANA, S. & KHAN, A. 2014. Epidemiology, etiology, diagnosis and treatment of prostate cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*, 15, 9575-8.
- DE PAEPE, B., CREUS, K. K. & DE BLEECKER, J. L. 2012. The Tumor Necrosis Factor Superfamily of Cytokines in the Inflammatory Myopathies: Potential Targets for Therapy. *Clin Dev Immunol*, 2012.
- DELA CRUZ, C. S., TANOUE, L. T. & MATTHAY, R. A. 2011. Lung Cancer: Epidemiology, Etiology, and Prevention. *Clin Chest Med*, 32.
- DELONGCHAMPS, N. B., DE LA ROZA, G., CHANDAN, V., JONES, R., SUNHEIMER, R., THREATTE, G., JUMBELIC, M. & HAAS, G. P. 2008. Evaluation of prostatitis in autopsied prostates--is chronic inflammation more associated with benign prostatic hyperplasia or cancer? *J Urol*, 179, 1736-40.
- DENECHAUD, P. D., FAJAS, L. & GIRALT, A. 2017. E2F1, a Novel Regulator of Metabolism. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 8, 311.
- DHINGRA, N. & BHAGWAT, D. 2011. Benign prostatic hyperplasia: An overview of existing treatment. *Indian J Pharmacol*, 43, 6-12.
- DON-DONCOW, N., MARGINEAN, F., COLEMAN, I., NELSON, P. S., EHRNSTRÖM, R., KRZYZANOWSKA, A., MORRISSEY, C., HELLSTEN, R. & BJARTELL, A. 2017. Expression of STAT3 in Prostate Cancer Metastases. *Eur Urol*, 71, 313-316.
- ECHEVERRI, C. J., BEACHY, P. A., BAUM, B., BOUTROS, M., BUCHHOLZ, F., CHANDA, S. K., DOWNWARD, J., ELLENBERG, J., FRASER, A. G., HACOEN, N., HAHN, W. C., JACKSON, A. L., KIGER, A., LINSLEY, P.

- S., LUM, L., MA, Y., MATHEY-PREVOT, B., ROOT, D. E., SABATINI, D. M., TAIPALE, J., PERRIMON, N. & BERNARDS, R. 2006. Minimizing the risk of reporting false positives in large-scale RNAi screens. *Nat Methods*, 3, 777-9.
- EDGEELL, C. J., MCDONALD, C. C. & GRAHAM, J. B. 1983. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80, 3734-7.
- EMEIS, J. J. & EDGEELL, C. J. 1988. Fibrinolytic properties of a human endothelial hybrid cell line (Ea.hy 926). *Blood*, 71, 1669-75.
- ERTOSUN, M. G., HAPIL, F. Z. & OSMAN NIDAI, O. 2016. E2F1 transcription factor and its impact on growth factor and cytokine signaling. *Cytokine Growth Factor Rev*, 31, 17-25.
- FITZGERALD, K. A., EVANS, J. C., MCCARTHY, J., GUO, J., PRENCIPE, M., KEARNEY, M., WATSON, W. R. & O'DRISCOLL, C. M. 2014. The role of transcription factors in prostate cancer and potential for future RNA interference therapy. *Expert Opin Ther Targets*, 18, 633-49.
- GARG, H., SURI, P., GUPTA, J. C., TALWAR, G. P. & DUBEY, S. 2016. Survivin: a unique target for tumor therapy. *Cancer Cell Int*, 16.
- GIARD, D. J., AARONSON, S. A., TODARO, G. J., ARNSTEIN, P., KERSEY, J. H., DOSIK, H. & PARKS, W. P. 1973. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst*, 51, 1417-23.
- GO, A. S., MOZAFFARIAN, D., ROGER, V. L., BENJAMIN, E. J., BERRY, J. D., BORDEN, W. B., BRAVATA, D. M., DAI, S., FORD, E. S., FOX, C. S., FRANCO, S., FULLERTON, H. J., GILLESPIE, C., HAILPERN, S. M., HEIT, J. A., HOWARD, V. J., HUFFMAN, M. D., KISSELA, B. M., KITTNER, S. J., LACKLAND, D. T., LICHTMAN, J. H., LISABETH, L. D., MAGID, D., MARCUS, G. M., MARELLI, A., MATCHAR, D. B., MCGUIRE, D. K., MOHLER, E. R., MOY, C. S., MUSSOLINO, M. E., NICHOL, G., PAYNTER, N. P., SCHREINER, P. J., SORLIE, P. D., STEIN, J., TURAN, T. N., VIRANI, S. S., WONG, N. D., WOO, D. & TURNER, M. B. 2013. Executive summary: heart disease and stroke statistics--2013 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*, 127, 143-52.
- GORLOV, I. P., SIRCAR, K., ZHAO, H., MAITY, S. N., NAVONE, N. M., GORLOVA, O. Y., TRONCOSO, P., PETTAWAY, C. A., BYUN, J. Y. & LOGOTHETIS, C. J. 2010. Prioritizing genes associated with prostate cancer development. *BMC Cancer*, 10, 599.
- GRATZKE, C., BACHMANN, A., DESCAZEAUD, A., DRAKE, M. J., MADERSBACHER, S., MAMOULAKIS, C., OELKE, M., TIKKINEN, K. A. O. & GRAVAS, S. 2015. EAU Guidelines on the Assessment of Non-neurogenic Male Lower Urinary Tract Symptoms including Benign Prostatic Obstruction. *Eur Urol*, 67, 1099-1109.
- GREDELL, J. A., DITTMER, M. J., WU, M., CHAN, C. & WALTON, S. P. 2010. Recognition of siRNA asymmetry by TAR RNA binding protein. *Biochemistry*, 49, 3148-55.
- GRIESINGER, F., EBERHARDT, W., FRÜH, M., GAUTSCHI, O., HILBE, W., HOFFMANN, H., HUBER, R. H., PIRKER, R., PÖTTGEN, C., PRITZKULEIT, R., SEBASTIAN, M., THOMAS, M., UKENA, D., WOLF,

- J., WOLF, M. & WÖRMANN, B. 2017. *Lungenkarzinom, nicht-kleinzellig (NSCLC): Leitlinie* [Online]. Available: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/lungenkarzinom-nicht-kleinzellig-nsclc/@@view/html/index.html> [Accessed 30.04 2017].
- HANSSON, G. K. & HERMANSSON, A. 2011. The immune system in atherosclerosis. *Nat Immunol*, 12, 204-212.
- HERBST, R. S., MORGENZTERN, D. & BOSHOFF, C. 2018. The biology and management of non-small cell lung cancer. *Nature*, 553, 446-454.
- HOLZAPFEL, B. & WICKERT, L. 2007. Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete. *Biologie in unserer Zeit*, 37, 120-126.
- HORNUNG, V., GUENTHNER-BILLER, M., BOURQUIN, C., ABLASSER, A., SCHLEE, M., UEMATSU, S., NORONHA, A., MANOHARAN, M., AKIRA, S., DE FOUGEROLLES, A., ENDRES, S. & HARTMANN, G. 2005. Sequence-specific potent induction of IFN-alpha by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat Med*, 11, 263-70.
- HUET, A., PARLAKIAN, A., ARNAUD, M. C., GLANDIERES, J. M., VALAT, P., FERMANDJIAN, S., PAULIN, D., ALPERT, B. & ZENTZ, C. 2005. Mechanism of binding of serum response factor to serum response element. *Febs j*, 272, 3105-19.
- ITANI, R. & AL FARAJ, A. 2019. siRNA Conjugated Nanoparticles-A Next Generation Strategy to Treat Lung Cancer. *Int J Mol Sci*, 20.
- JACKSON, A. L. & LINSLEY, P. S. 2010. Recognizing and avoiding siRNA off-target effects for target identification and therapeutic application. *Nat Rev Drug Discov*, 9, 57-67.
- JAISWAL, P. K., GOEL, A. & MITTAL, R. 2015. Survivin: A molecular biomarker in cancer. *Indian J Med Res*, 141, 389-97.
- JUDGE, A. D., SOOD, V., SHAW, J. R., FANG, D., MCCLINTOCK, K. & MACLACHLAN, I. 2005. Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. *Nat Biotechnol*, 23, 457-62.
- KAIGHN, M. E., NARAYAN, K. S., OHNUKI, Y., LECHNER, J. F. & JONES, L. W. 1979. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest Urol*, 17, 16-23.
- KIM, T. K. & EBERWINE, J. H. 2010. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Anal Bioanal Chem*, 397, 3173-8.
- KISHI, H., IGAWA, M., KIKUNO, N., YOSHINO, T., URAKAMI, S. & SHIINA, H. 2004. Expression of the survivin gene in prostate cancer: correlation with clinicopathological characteristics, proliferative activity and apoptosis. *J Urol*, 171, 1855-60.
- KNOLL, S., EMMRICH, S. & PUTZER, B. M. 2013. The E2F1-miRNA cancer progression network. *Adv Exp Med Biol*, 774, 135-47.
- KOENIG, O., NOTHDURFT, D., PERLE, N., NEUMANN, B., BEHRING, A., DEGENKOLBE, I., WALKER, T., SCHLENSAK, C., WENDEL, H. P. & NOLTE, A. 2017a. An Atelocollagen Coating for Efficient Local Gene Silencing by Using Small Interfering RNA. *Mol Ther Nucleic Acids*, 6, 290-301.

- KOENIG, O., ZENGERLE, D., PERLE, N., HOSSFELD, S., NEUMANN, B., BEHRING, A., AVCI-ADALI, M., WALKER, T., SCHLENSAK, C., WENDEL, H. P. & NOLTE, A. 2017b. RNA-Eluting Surfaces for the Modulation of Gene Expression as A Novel Stent Concept. *Pharmaceuticals (Basel)*, 10.
- KRIS, M. G., GASPAR, L. E., CHAFT, J. E., KENNEDY, E. B., AZZOLI, C. G., ELLIS, P. M., LIN, S. H., PASS, H. I., SETH, R., SHEPHERD, F. A., SPIGEL, D. R., STRAWN, J. R., UNG, Y. C. & WEYANT, M. 2017. Adjuvant Systemic Therapy and Adjuvant Radiation Therapy for Stage I to IIIA Completely Resected Non-Small-Cell Lung Cancers: American Society of Clinical Oncology/Cancer Care Ontario Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Oncol*, Jco2017724401.
- KUCHIPUDI, S. V. 2015. The Complex Role of STAT3 in Viral Infections. *J Immunol Res*, 2015, 272359.
- KUHLMANN, I., CHIN, D. & RIMBACH, G. 2014. *Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen und Atherosklerose*, Wiesbaden, Springer Spektrum.
- LAI, Y., KONG, Z., ZENG, T., XU, S., DUAN, X., LI, S., CAI, C., ZHAO, Z. & WU, W. 2018. PARP1-siRNA suppresses human prostate cancer cell growth and progression. *Oncol Rep*, 39, 1901-1909.
- LAU, P. W., GUILLEY, K. Z., DE, N., POTTER, C. S., CARRAGHER, B. & MACRAE, I. J. 2012. The molecular architecture of human Dicer. *Nat Struct Mol Biol*, 19, 436-40.
- LAUDISI, F., CHERUBINI, F., MONTELEONE, G. & STOLFI, C. 2018. STAT3 Interactors as Potential Therapeutic Targets for Cancer Treatment. *Int J Mol Sci*, 19.
- LAWSON, C. & WOLF, S. 2009. ICAM-1 signaling in endothelial cells. *Pharmacol Rep*, 61, 22-32.
- LEE, S. J., SON, S., YHEE, J. Y., CHOI, K., KWON, I. C., KIM, S. H. & KIM, K. 2013. Structural modification of siRNA for efficient gene silencing. *Biotechnol Adv*, 31, 491-503.
- LIPPERT, H. 2007. *Lehrbuch Anatomie, 460-468*, Elsevier, Urban & Fischer, München, Jena.
- LITWIN, M. S. & TAN, H. J. 2017. The Diagnosis and Treatment of Prostate Cancer: A Review. *Jama*, 317, 2532-2542.
- LIU, Z., WANG, T., ZHANG, Z., TANG, S., FENG, S., YUE, M., HU, M., XUAN, L. & CHEN, Y. 2017. Survivin downregulation using siRNA nanoliposomes inhibits cell proliferation and promotes the apoptosis of MHCC-97H hepatic cancer cells: An in vitro and in vivo study. *Oncol Lett*, 13, 2723-30.
- LÜLLMAN-RAUCH, R. 2009. *Taschenlehrbuch Histologie 242-248*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- LUNDON, D. J., BOLAND, A., PRENCIPE, M., HURLEY, G., O'NEILL, A., KAY, E., AHERNE, S. T., DOOLAN, P., MADDEN, S. F., CLYNES, M., MORRISSEY, C., FITZPATRICK, J. M. & WATSON, R. W. 2017. The prognostic utility of the transcription factor SRF in docetaxel-resistant prostate cancer: in-vitro discovery and in-vivo validation. *BMC Cancer*, 17, 163.
- LUSIS, A. J. 2000. Atherosclerosis. *Nature*, 407, 233-241.

- LYNCH, M. D. & WATT, F. M. 2018. Fibroblast heterogeneity: implications for human disease. *J Clin Invest*, 128, 26-35.
- MAKOWIECKI, C., NOLTE, A., SUTAJ, B., KELLER, T., AVCI-ADALI, M., STOLL, H., SCHLENSAK, C., WENDEL, H. P. & WALKER, T. 2014. New basic approach to treat non-small cell lung cancer based on RNA-interference. *Thorac Cancer*, 5, 112-120.
- MARTÍNEZ-GARCÍA, D., MANERO-RUPÉREZ, N., QUESADA, R., KORRODIGREGÓRIO, L. & SOTO-CERRATO, V. 2019. Therapeutic strategies involving survivin inhibition in cancer. *Med Res Rev*, 39, 887-909.
- MCKINNON, K. M. 2018. Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol*, 120, 5.1.1-5.1.11.
- MEIER, T., BROHMANN, H., SACHS, B. & SCHOLL, C. 2020. Bulletin zur Arzneimittelsicherheit. *BfArM & PEI*, 40, 48-1.
- MENG, Z. & LU, M. 2017. RNA Interference-Induced Innate Immunity, Off-Target Effect, or Immune Adjuvant? *Front Immunol*, 8, 331.
- MÜHLHARDT, C. 2006. *Der Experimentator: Molekularbiologie / Genomics*, 240-248, Elsevier Spektrum Akademischer Verlag, München.
- NAPOLI, C., LEMIEUX, C. & JORGENSEN, R. 1990. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell*, 2, 279-289.
- NASIM, F., SABATH, B. F. & EAPEN, G. A. 2019. Lung Cancer. *Med Clin North Am*, 103, 463-473.
- NATH, N., SARASWAT, S. K., JAIN, S. & KOTESHWAR, S. 2015. Inhibition of proliferation and migration of stricture fibroblasts by epithelial cell-conditioned media. *Indian J Urol*, 31, 111-5.
- NICHOLSON, T. M. & RICKE, W. A. 2011. Androgens and estrogens in benign prostatic hyperplasia: past, present and future. *Differentiation*, 82, 184-99.
- NOLTE, A., AUFDERKLAMM, S., SCHEU, K., WALKER, T., KONIG, O., BOTTCHE, M., NIEDERLAENDER, J., SCHWENTNER, C., SCHLENSAK, C., STENZL, A. & WENDEL, H. P. 2013. Small interfering RNA transfection against serum response factor mediates growth inhibition of benign prostatic hyperplasia fibroblasts. *Nucleic Acid Ther*, 23, 62-70.
- NOLTE, A., RAABE, C., WALKER, T., SIMON, P., ZIEMER, G. & WENDEL, H. P. 2009. Optimized basic conditions are essential for successful siRNA transfection into primary endothelial cells. *Oligonucleotides*, 19, 50-141.
- OLIVEIRA, S., STORM, G. & SCHIFFELERS, R. M. 2006. Targeted delivery of siRNA. *J Biomed Biotechnol*, 2006, 63675.
- PAN, S. 2009. Molecular mechanisms responsible for the atheroprotective effects of laminar shear stress. *Antioxid Redox Signal*, 11, 1669-1682.
- PARAMESWARAN, N. & PATIAL, S. 2010. Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Signaling in Macrophages. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 20, 87-103.
- PEARSON, J. D., LEI, H. H., BEATY, T. H., WILEY, K. E., ISAACS, S. D., ISAACS, W. B., STONER, E. & WALSH, P. C. 2003. Familial aggregation of bothersome benign prostatic hyperplasia symptoms. *Urology*, 61, 781-5.
- PFAFFL, M. W. 2004. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum*, 10, 92-95.

- PIEPOLI, M. F., HOES, A. W., AGEWALL, S., ALBUS, C., BROTONS, C., CATAPANO, A. L., COONEY, M. T., CORRA, U., COSYNS, B., DEATON, C., GRAHAM, I., HALL, M. S., HOBBS, F. D., LOCHEN, M. L., LOLLGEN, H., MARQUES-VIDAL, P., PERK, J., PRESCOTT, E., REDON, J., RICHTER, D. J., SATTAR, N., SMULDERS, Y., TIBERI, M., BART VAN DER WORP, H., VAN DIS, I. & VERSCHUREN, W. M. 2016. 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: The Sixth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of 10 societies and by invited experts) Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR). *Atherosclerosis*, 252, 207-74.
- PIETSCHKE, K., WALKER, T., KRAJEWSKI, S., KURZ, J., AUFDERKLAMM, S., SCHWENTNER, C., SCHLENSAK, C., STENZL, A., WENDEL, H. P. & NOLTE, A. 2014. The chance of small interfering RNAs as eligible candidates for a personalized treatment of prostate cancer. *Curr Pharm Biotechnol*, 14, 1145-54.
- PRENCIPE, M., FABRE, A., MURPHY, T. B., VARGYAS, E., O'NEILL, A., BJARTELL, A., TASKEN, K. A., GRYTLI, H. H., SVINDLAND, A., BERGE, V., ERI, L. M., GALLAGHER, W. & WATSON, R. W. 2018. Role of serum response factor expression in prostate cancer biochemical recurrence. *Prostate*, 78, 724-730.
- PRENCIPE, M., O'NEILL, A., O'HURLEY, G., NGUYEN, L. K., FABRE, A., BJARTELL, A., GALLAGHER, W. M., MORRISSEY, C., KAY, E. W. & WATSON, R. W. 2015. Relationship between serum response factor and androgen receptor in prostate cancer. *Prostate*, 75, 1704-17.
- PULUKURI, S. M., GONDI, C. S., LAKKA, S. S., JUTLA, A., ESTES, N., GUJRATI, M. & RAO, J. S. 2005. RNA interference-directed knockdown of urokinase plasminogen activator and urokinase plasminogen activator receptor inhibits prostate cancer cell invasion, survival, and tumorigenicity in vivo. *J Biol Chem*, 280, 36529-40.
- RKI. 2018 Available:  
[https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Prostatakrebs/prostatakrebs\\_node.html;jsessionid=B79F265ECB41C2E7C206A228BAAC3925.1\\_cid363](https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Prostatakrebs/prostatakrebs_node.html;jsessionid=B79F265ECB41C2E7C206A228BAAC3925.1_cid363) [Accessed Zugriff: 09.06.2018 ].
- ROBERTS, T. C., EZZAT, K., EL ANDALOUSSI, S. & WEINBERG, M. S. 2016. Synthetic SiRNA Delivery: Progress and Prospects. *Methods Mol Biol*, 1364, 291-310.
- ROEHRBORN, C. G. 2005. Benign prostatic hyperplasia: an overview. *Rev Urol*, 7 Suppl 9, S3-s14.
- ROOSEN, A., GRATZKE, C., HERRLEMANN, A., MAGISTRO, G., STRITTMATTER, F., WEINHOLD, P., TRITSCHLER, S. & STIEF, C. G. 2013. [Etiology and pathophysiology of benign prostate hyperplasia]. *Urologe A*, 52, 186-92.
- ROSS, R. 1999. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*, 340, 115-26.

- ROY, J., AUDETTE, M. & TREMBLAY, M. J. 2001. Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) Gene Expression in Human T Cells is Regulated by Phosphotyrosyl Phosphatase Activity. *J Biol Chem*, 276, 14553-14561.
- ROZEN, S. & SKALETSKY, H. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol*, 132, 365-86.
- RYAN, B. M., O'DONOVAN, N. & DUFFY, M. J. 2009. Survivin: a new target for anti-cancer therapy. *Cancer Treat Rev*, 35, 553-62.
- RYTHER, R. C., FLYNT, A. S., PHILLIPS, J. A., 3RD & PATTON, J. G. 2005. siRNA therapeutics: big potential from small RNAs. *Gene Ther*, 12, 5-11.
- SALVADOR, A. M., NEVERS, T., VELÁZQUEZ, F., ARONOVITZ, M., WANG, B., ABADÍA MOLINA, A., JAFFE, I. Z., KARAS, R. H., BLANTON, R. M. & ALCAIDE, P. 2016. Intercellular Adhesion Molecule 1 Regulates Left Ventricular Leukocyte Infiltration, Cardiac Remodeling, and Function in Pressure Overload-Induced Heart Failure. *J Am Heart Assoc*, 5, e003126.
- SAW, P. E. & SONG, E. W. 2020. siRNA therapeutics: a clinical reality. *Sci China Life Sci*, 63, 485-500.
- SCHMITZ, S. 2011a. *Der Experimentator: Zellkultur*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- SCHMITZ, S. 2011b. *Zellbiologische und Routinemethoden*, Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.
- SETHI, K., BOZIN, M., JABANE, T., MCMULLIN, R., COOK, D., FORSYTH, R., DODDS, L. & PUTRA, L. J. 2017. Thermo-expandable prostatic stents for bladder outlet obstruction in the frail and elderly population: An underutilized procedure? *Investig Clin Urol*, 58, 447-452.
- STOLERIU, M. G., STEGER, V., MUSTAFI, M., MICHAELIS, M., CINATL, J., SCHNEIDER, W., NOLTE, A., KURZ, J., WENDEL, H. P., SCHLENSAK, C. & WALKER, T. 2014. 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, 877-86.
- STRITTMATTER, F., BECK, V., STIEF, C. G. & TRITSCHLER, S. 2017. [Urethral stricture : From diagnostics to appropriate treatment]. *Urologe A*, 56, 1047-1057.
- TAI, S., SUN, Y., SQUIRES, J. M., ZHANG, H., OH, W. K., LIANG, C. Z. & HUANG, J. 2011. PC3 Is a Cell Line Characteristic of Prostatic Small Cell Carcinoma. *Prostate*, 71, 1668-79.
- TOKLU, B. & BANGALORE, S. 2014. Choosing the right coronary stent in the modern era. *Curr Cardiol Rep*, 16, 469.
- TORRE, L. A., BRAY, F., SIEGEL, R. L., FERLAY, J., LORTET-TIEULENT, J. & JEMAL, A. 2015. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*, 65, 87-108.
- TRAVIS, W. D., BRAMBILLA, E., NICHOLSON, A. G., YATABE, Y., AUSTIN, J. H. M., BEASLEY, M. B., CHIRIEAC, L. R., DACIC, S., DUHIG, E., FLIEDER, D. B., GEISINGER, K., HIRSCH, F. R., ISHIKAWA, Y., KERR, K. M., NOGUCHI, M., PELOSI, G., POWELL, C. A., TSAO, M. S. & WISTUBA, I. 2015. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. *J Thorac Oncol*, 10, 1243-1260.

- TRITSCHLER, S., ROOSEN, A., FULLHASE, C., STIEF, C. G. & RUBBEN, H. 2013. Urethral stricture: etiology, investigation and treatments. *Dtsch Arztebl Int*, 110, 220-6.
- UI-TEI, K. 2013. Optimal choice of functional and off-target effect-reduced siRNAs for RNAi therapeutics. *Front Genet*, 4, 107.
- VERMEULEN, A., BEHLEN, L., REYNOLDS, A., WOLFSON, A., MARSHALL, W. S., KARPILOW, J. & KHVOROVA, A. 2005. The contributions of dsRNA structure to Dicer specificity and efficiency. *Rna*, 11, 674-82.
- VOISARD, R., OSSWALD, M., BAUR, R., JAKOB, U., SUSA, M., MATTFELDT, T., HEMMER, W., HANNEKUM, A., KOENIG, W. & HOMBACH, V. 1998. Expression of intercellular adhesion molecule-1 in human coronary endothelial and smooth muscle cells after stimulation with tumor necrosis factor-alpha. *Coron Artery Dis*, 9, 737-45.
- VUICHOUD, C. & LOUGHLIN, K. R. 2015. Benign prostatic hyperplasia: epidemiology, economics and evaluation. *Can J Urol*, 22 Suppl 1, 1-6.
- WALKER, T., NOLTE, A., STEGER, V., MAKOWIECKI, C., MUSTAFI, M., FRIEDEL, G., SCHLENSAK, C. & WENDEL, H. P. 2013. 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, 628-33; discussion 633-4.
- WALKER, T., WENDEL, H. P., TETZLOFF, L., HEIDENREICH, O. & ZIEMER, G. 2005. Suppression of ICAM-1 in human venous endothelial cells by small interfering RNAs. *Eur J Cardiothorac Surg*, 28, 816-20.
- WALKER, T., WENDEL, H. P., TETZLOFF, L., RAABE, C., HEIDENREICH, O., SIMON, P., SCHEULE, A. M. & ZIEMER, G. 2007. Inhibition of adhesion molecule expression on human venous endothelial cells by non-viral siRNA transfection. *J Cell Mol Med*, 11, 139-47.
- WANG, Y., SHEN, Y., WANG, S., SHEN, Q. & ZHOU, X. 2018. The role of STAT3 in leading the crosstalk between human cancers and the immune system. *Cancer Lett*, 415, 117-128.
- WELSCH, U. & DELLER, T. 2010. *Lehrbuch Histologie*, München, Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag.
- WERTH, D., GRASSI, G., KONJER, N., DAPAS, B., FARRA, R., GIANSANTE, C., KANDOLF, R., GUARNIERI, G., NORDHEIM, A. & HEIDENREICH, O. 2010. Proliferation of human primary vascular smooth muscle cells depends on serum response factor. *Eur J Cell Biol*, 89, 216-24.
- WOLLENBERG, A., KROTH, J., HAUSCHILD, A. & DIRSCHKA, T. 2010. [Cutaneous side effects of EGFR inhibitors--appearance and management]. *Dtsch Med Wochenschr*, 135, 149-54.
- XUE, M., QIQIGE, C., ZHANG, Q., ZHAO, H., SU, L., SUN, P. & ZHAO, P. 2018. Effects of Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and Interleukina 10 (IL-10) on Intercellular Cell Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) and Cluster of Differentiation 31 (CD31) in Human Coronary Artery Endothelial Cells. *Med Sci Monit*, 24, 4433-4439.
- YU, H., LEE, H., HERRMANN, A., BUETTNER, R. & JOVE, R. 2014. Revisiting STAT3 signalling in cancer: new and unexpected biological functions. *Nat Rev Cancer*, 14, 736-46.

- YUAN, J., ZHANG, F. & NIU, R. 2015. Multiple regulation pathways and pivotal biological functions of STAT3 in cancer. *Sci Rep*, 5, 17663.
- ZHOU, J., QU, Z., YAN, S., SUN, F., WHITSETT, J. A., SHAPIRO, S. D. & XIAO, G. 2015. Differential roles of STAT3 in the initiation and growth of lung cancer. *Oncogene*, 34, 3804-3814.
- ZIMMER, S. 2013. Ätiologie und Pathogenese der Atherosklerose. *CardioVasc*, 13, 28-34.

## **7. Erklärung zum Eigenanteil**

Die Arbeit wurde im klinischen Forschungslabor der Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie des Universitätsklinikums Tübingen unter Betreuung von PD Dr. Andrea Nolte-Karayel durchgeführt.

Die Konzeption der Versuche erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau PD Dr. Andrea Nolte-Karayel.

Alle Versuche, wurden (nach Einarbeitung durch Frau PD Dr. Andrea Nolte-Karayel) von mir selbstständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung wurde, nach Anleitung durch Frau PD Dr. Andrea Nolte-Karayel, von mir eigenständig durchgeführt.

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

Berlin, den 09.01.2022

---

Kirstin Andrea Wocken

## 8. Danksagung

Ein ganz herzlicher Dank gilt meiner Doktormutter und Betreuerin Frau PD Dr. Andrea Nolte-Karayel, die mich über den ganzen Zeitraum betreut und damit diese Doktorarbeit ermöglicht hat. Ein herzliches Dankeschön auch an Herrn Prof. Dr. Hans Peter Wendel, der diese Arbeit zu Beginn als Doktorvater unterstützt hat.

Ein Dankeschön geht auch an das gesamte Team des THG Forschungslabors, das mit Rat und Tat zur Seite stand.

Zuletzt gilt mein größter Dank meiner Familie. Meinen Eltern Ilona und Clemens, meinem Bruder Benjamin und vor allem meinem Mann, Ludger. Sie haben mich während des gesamten Studiums und während der Promotion zu jeder Zeit unterstützt und mir Mut gemacht. Ohne meine Familie wäre ich heute nicht da, wo ich jetzt bin. Danke!