

**Evaluierung des Wirkpotentials  
spezifischer  
Small interfering RNAs zur  
personalisierten Therapie des  
Prostatakarzinoms *in vitro***

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

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

**vorgelegt von  
Pietschke, Katharina  
2015**

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Professor Dr. I. Autenrieth

Professor Dr. H.P. Wendel

Professor Dr. J. Bedke

Meiner Familie



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>IV</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>VIII</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>IX</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Das Prostatakarzinom .....	1
1.1.1 Anatomie der Prostata .....	1
1.1.2 Epidemiologie .....	2
1.1.3 Karzinomentwicklung und Risikofaktoren .....	2
1.1.4 Symptomatik und Metastasierung .....	3
1.1.5 Früherkennung und Histologie .....	4
1.1.6 Diagnostik und Stadieneinteilung .....	5
1.1.7 Risiko-Einteilung und derzeitige Behandlungsmethoden .....	7
1.2 Small interfering RNAs .....	11
1.2.1 RNA-Interferenz.....	11
1.2.2 Eigenschaften exogen synthetisierter siRNA .....	13
1.2.3 Zielproteine für die Gen-Silencing Therapie .....	14
1.2.4 Apoptose .....	15
1.2.5 Survivin.....	17
1.2.6 E2F1 .....	18
1.2.7 HIF.....	19
1.2.8 STAT3.....	20
1.2.9 SRF.....	21
1.2.10 PSA-1 und PSA-2 .....	22
1.3 Transfektion.....	23
1.4 Zielsetzung.....	25
<b>2 Material</b> .....	<b>27</b>
2.1 Zelllinien .....	27
2.1.1 PC-3.....	27
2.1.2 DU-145 .....	27
2.1.3 LnCAP .....	28
2.1.4 Nährmedien .....	28

2.2	Chemikalien und Reagenzien.....	28
2.3	Kits.....	29
2.4	siRNAs.....	30
2.5	Primer .....	32
2.6	Geräte.....	33
2.7	Verbrauchsmaterial .....	35
<b>3</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>37</b>
3.1	Zellkultivierung.....	37
3.1.1	Kultivierung und Passagierung eukaryotischer Krebszellen .....	37
3.1.2	Zellzählung.....	38
3.1.3	Kryokonservierung und Auftauen.....	38
3.1.4	Anzucht auf 12-Well-Platte .....	39
3.2	Transfektion der Zellen mit siRNAs .....	39
3.3	mRNA-Isolierung .....	40
3.4	Konzentrationsmessung der mRNA und cDNA-Herstellung .....	41
3.4.1	Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung der Gesamt- mRNA .....	41
3.4.2	cDNA-Synthese .....	42
3.5	Quantitative Real-Time PCR .....	42
3.6	CASY® .....	44
3.7	Statistik .....	44
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>46</b>
4.1	Untersuchung der Expression der mRNA nach Transfektion.....	46
4.1.1	PC-3.....	47
4.1.2	DU-145.....	55
4.1.3	LnCAP.....	63
4.2	Ergebnisse der Zellzählung mittels CASY® nach der Transfektion .....	71
4.2.1	PC-3.....	72
4.2.2	DU-145.....	76
4.2.3	LnCAP.....	80
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>85</b>
5.1	Die Auswirkung der siRNAs auf die Genexpression .....	88
5.2	Die Auswirkung der siRNAs auf die Zellzahl .....	93

5.3 Klinische Relevanz .....	95
5.4 Fazit und Ausblick .....	101
<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>103</b>
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>105</b>
<b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>XI</b>
<b>Veröffentlichung .....</b>	<b>XII</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>XIII</b>
<b>Curriculum Vitae .....</b>	<b>XIV</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
A.	Arteria
APAF	Apoptotic Protease Activating Factor
ATP	Adenosintriphosphat
BAK	Bcl-2-Homologous Antagonist/Killer
BAX	Bcl-2-Associated X-Protein
Bcl-2	B-Cell Lymphoma-2
BIR-Domäne	Baculovirus IAP Domäne
BMP	Bone Morphogenetic Protein
bp	Basenpaare
BPH	Benigne Prostatahyperplasie
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CaMK	Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin-abhängige Kinase
Caspasen	Cysteiny-Aspartat Specific Protease
cDNA	Complementary DNA
cPSA	komplexiertes PSA
CT	Computertomographie
DPBS	Dulbecco's Phosphat Buffered Saline
DISC	Death-Inducing Signaling Complex
DNA	Desoxyribonucleinacid
DOPE	Dioleoylphosphatidylethanolamine
DRU	Digital-rektale Untersuchung
dsRNA	Double-stranded-RNA
DOTMA	N-[1-(2,3-dioleyloxy)propyl]-N,N,N-



## Abkürzungsverzeichnis

---

	trimethylammoniumchloride
EBRT	External beam Radiotherapy
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EERPE	Endoskopisch extraperitoneale radikale Prostatektomie
EGF	Epidermal Growth Factor
ERK	Extracellular-Signal-Regulated Kinase
Etc.	et cetera
ETS	E-twenty six
FADD	Fas-Associated Protein with Death Domain
FCS	Fetales Kälberserum
fPSA	Freies PSA
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
HDR-Brachytherapie	High-Dose-Rate-Brachytherapie
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HIF	Hypoxie-Induzierter Faktor
IAP	Inhibitoren der Apoptose
IEGs	Immediate Early Genes
IFNs	Interferone
IL	Interleukin
JNK	Jun N-terminal Kinase
KLK	Kallikrein
LDR-Brachytherapie	Low-Dose-Rate-Brachytherapie
LHRH	Luteinisierungs-Hormon-Releasing-Hormon
LIF	Leukemia inhibitor factor
Lig.	Ligamentum
LPA	Lysophosphatidsäure
LPS	Lipopolysaccharide

## Abkürzungsverzeichnis

---

LRPE	Laparoskopisch transperitoneale radikale Prostatektomie
MAC	Mitochondrial Apoptosis-Induced Channel
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
Min	Minuten
MRTFs	Myocardin Related Growth Factors
mRNA	Messenger RNA
N.	Nervus
NII.	Nodi lymphatici
Nn.	Nervi
NSLC	Nicht kleinzelliges Lungenkarzinom
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PIN	Prostatische intraepitheliale Neoplasie
PIWI-Domäne	P-Element Induced Wimpy Testis-Domäne
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
PSMA	Prostata-spezifisches Membranantigen
qRT-PCR	Quantitative Real-Time PCR
RARP	Roboter-assistierte radikale Prostatektomie
RB	Retinoblastom
Reverse Transkriptase	RNA-abhängige DNA-Polymerase
RISC	RNA-Induced Silencing Complex
RNA	Ribonucleinacid
RPP	Radikale perineale Prostatektomie
RRP	Retropubische radikale Prostatektomie
SCR	scrambled
SERCA	Sarco-/Endoplasmatisches Retikulum Calcium ATPase
siRNA	Small-Interfering RNA
shRNA	Small-Hairpin RNA
SMAC	Small Mitochondrial-Derived Activator Protein

## Abkürzungsverzeichnis

---

SRE	Serum Response Element
SRF	Serum Response Factor
ssRNA	Single stranded RNA
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription 3
TCFs	Ternary Complex Factors
TNF	Tumornekrosefaktor
TNM-Klassifikation	Tumor-Nodes-Metastasis-Klassifikation
TNS	Trypsin Neutralizing Solution
tPSA	Gesamt PSA
TRADD	TNF Receptor-Associated Protein with Death Domain
TRAIL	TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand Receptor
U	Uracil
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
USA	United States of America
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
Vv.	Venae
WHO	World Health Organization
z.B.	Zum Beispiel

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Zelllinien .....	27
Tabelle 2: Verwendete Chemikalien und Reagenzien .....	28
Tabelle 3: Verwendete Kits .....	29
Tabelle 4: Verwendete siRNAs .....	30
Tabelle 5: Verwendete Primer .....	32
Tabelle 6: Verwendete Geräte .....	33
Tabelle 7: Verwendete Materialien .....	35
Tabelle 8: Pipettierschema für eine Transfektion pro Well einer 12-Well-Platte	40
Tabelle 9: Zellzahlen nach Transfektion der PC-3 Zelllinie .....	73
Tabelle 10: Zellzahlen nach Transfektion der DU-145 Zelllinie .....	77
Tabelle 11: Zellzahlen nach Transfektion der LnCAP-Zelllinien .....	81

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Tumorausdehnung des Prostatakarzinoms T1, T2, T3, T4 .....	6
Abbildung 2: Mechanismus der RNA-Interferenz <sup>48</sup> .....	13
Abbildung 3: Relative Genexpression nach Transfektion mit Survivin-siRNA ...	47
Abbildung 4: Relative Genexpression nach Transfektion mit E2F1-siRNA .....	48
Abbildung 5: Relative Genexpression nach Transfektion mit HIF1 $\alpha$ -siRNA .....	49
Abbildung 6: Relative Genexpression nach Transfektion mit HIF2 $\alpha$ -siRNA .....	50
Abbildung 7: Relative Genexpression nach Transfektion mit STAT3-siRNA.....	51
Abbildung 8: Relative Genexpression nach Transfektion mit SRF-siRNA.....	52
Abbildung 9: Relative Genexpression nach Transfektion mit PSA-1-siRNA.....	53
Abbildung 10: Relative Genexpression nach Transfektion mit PSA-2-siRNA....	54
Abbildung 11: Relative Genexpression nach Transfektion mit Survivin-siRNA .	55
Abbildung 12: Relative Genexpression nach Transfektion mit E2F1-siRNA .....	56
Abbildung 13: Relative Genexpression nach Transfektion mit HIF1 $\alpha$ -siRNA ....	57
Abbildung 14: Relative Genexpression nach Transfektion mit HIF2 $\alpha$ -siRNA ....	58
Abbildung 15: Relative Genexpression nach Transfektion mit STAT3-siRNA ...	59
Abbildung 16: Relative Genexpression nach Transfektion mit SRF-siRNA.....	60
Abbildung 17: Relative Genexpression nach Transfektion mit PSA-1-siRNA....	61
Abbildung 18: Relative Genexpression nach Transfektion mit PSA-2-siRNA....	62
Abbildung 19: Relative Genexpression nach Transfektion mit Survivin-siRNA .	63
Abbildung 20: Relative Genexpression nach Transfektion mit E2F1-siRNA .....	64
Abbildung 21: Relative Genexpression nach Transfektion mit HIF1 $\alpha$ -siRNA ....	65
Abbildung 22: Relative Genexpression nach Transfektion mit HIF2 $\alpha$ -siRNA ....	66
Abbildung 23: Relative Genexpression nach Transfektion mit STAT3-siRNA... 67	
Abbildung 24: Relative Genexpression nach Transfektion mit SRF-siRNA.....	68
Abbildung 25: Relative Genexpression nach Transfektion mit PSA-1-siRNA....	69
Abbildung 26: Relative Genexpression nach Transfektion mit PSA-2-siRNA....	70
Abbildung 27: Zellzahlen nach Transfektion der PC-3 Zelllinie .....	72

## Abbildungsverzeichnis

---

Abbildung 28: Zellzahlen nach Transfektion der DU-145 Zelllinie.....	76
Abbildung 29: Zellzahlen nach Transfektion der LnCAP-Zelllinie .....	80
Abbildung 30: Potenz der siRNAs mit 25 nM in PC-3 Zellen .....	89
Abbildung 31: Potenz der siRNAs mit 100 nM in PC-3 Zellen .....	89
Abbildung 32: Potenz der siRNAs mit 25 nM in DU-145 Zellen .....	91
Abbildung 33: Potenz der siRNAs mit 100 nM in DU-145 Zellen .....	91
Abbildung 34: Potenz der siRNAs mit 25 nM in LnCAP Zellen .....	92
Abbildung 35: Potenz der siRNAs mit 100 nM in LnCAP Zellen .....	93

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Prostatakarzinom

### 1.1.1 Anatomie der Prostata

Die Prostata, auch Vorsteherdrüse genannt, ist ein etwa kastaniengroßes extraperitoneal gelegenes Organ, das direkt unter der Blase die männliche Harnröhre umgibt. Dorsal grenzt die Prostata an das Rektum, ventral ist sie im Spatium pubicum bindegewebig durch das Ligamentum (Lig.) puboprostaticum an der Symphyse befestigt und kaudal reicht sie durch den Hiatus urogenitalis. Entwicklungsgeschichtlich entsteht sie in der 12. fetalen Woche als Derivat des Urethraepithels. Testosteron ist für das Wachstum und die Funktion der Prostata essentiell und wird im Prostatagewebe durch die  $5\alpha$ -Reduktase in seinen aktiven Metaboliten Dihydrotestosteron umgewandelt. Die arterielle Versorgung erfolgt über Rami prostatici aus der Arteria (A.) vesicalis inferior und der A. rectalis media. Das venöse Blut fließt, über die lokalen Plexi venosi vesicalis und prostaticus in die Venae (Vv.) vesicales ab. Der Lymphabfluss erfolgt direkt oder pararektal über die Nodi lymphatici (Nll.) sacrales in die Nll. iliaci interna. Fasern aus dem Plexus hypogastricus inferior innervieren die Prostata. Anatomisch unterteilt man die Vorsteherdrüse in zwei Seitenlappen, den Lobus dexter und sinister, die vor der Urethra durch den Isthmus prostatae und hinter der Harnröhre durch den Lobus medius miteinander verbunden sind. Des Weiteren werden aufgrund embryologischer und funktioneller Unterschiede drei Zonen differenziert. Um die Urethra befindet sich die periurethrale Mantelzone, die nur 5 % der Prostata ausmacht und von der zentralen Zone umgeben wird. Diese umschließt den Ductus ejaculatorius und enthält von Bindegewebe und glatten Muskelzellen umgebene Drüsen. 75 % der Prostata wird von der peripheren Zone gebildet, die dorsal und lateral der zentralen Zone liegt. Histologisch besteht diese Zone aus 30-50 tubuloalveolären Drüsen und

fibromuskulärem Stroma. Die Drüsen münden über Ausführungsgänge in die Pars prostatica urethrae. Mit dem Alter kommt es zu einer gutartigen Vermehrung von Drüsen und Stroma in der periurethralen Zone, der benignen Prostatahyperplasie, und führt zu einer Einengung der Harnröhre. Das Prostatakarzinom dagegen entsteht meist subkapsulär in der Außenzone, ist aber selten (15 %) auch in der Transitionalzone zu finden.<sup>1,2</sup>

### **1.1.2 Epidemiologie**

Das Prostatakarzinom ist die häufigste Krebserkrankung des Mannes in Deutschland. Die Inzidenz ist weltweit unterschiedlich und zeigt in Europa ein Nord-Süd-Gefälle, dem vermutlich die chemoprotektive Wirkung von Cholecalciferol, dem aktiven Metaboliten von Vitamin D, zu Grunde liegt.<sup>3</sup> Gleichzeitig ist sie in Afrika und Asien signifikant niedriger und in den USA, besonders bei afroamerikanischen Männern am höchsten (globales Ost-West-Gefälle). Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt bei 69 Jahren. Das Prostatakarzinom ist die dritthäufigste, tödlich verlaufende Tumorerkrankung, in Deutschland. Die Sterblichkeit steigt linear mit dem Alter an. Die durchschnittliche Mortalitätsrate liegt bei 25 % - 40 %, ist aber ebenfalls abhängig von der ethnischen und geografischen Zugehörigkeit.<sup>4</sup> Risikofaktoren für die Entwicklung eines Prostatakarzinoms sind also vor allem das Alter, genetische und hormonelle, aber auch sozioökonomische und ernährungsbedingte Faktoren.<sup>5,6</sup>

### **1.1.3 Karzinomentwicklung und Risikofaktoren**

Die Entwicklung eines Prostatakarzinoms wird durch Testosteron begünstigt. So spielt die Unterscheidung einer androgen-sensitiven Phase von einer darauffolgenden nichtandrogen-sensitiven Phase, bei der es zu einer proliferativen inflammatorischen Atrophie kommt, eine wichtige Rolle. In der androgen-sensitiven Phase kann es durch Inaktivierung bestimmter Gene, zu der Entwicklung einer intraduktalen Epitheldysplasie kommen.<sup>7</sup> Aus dieser, auch



prostatistische intraepitheliale Neoplasie (PIN) genannten Präkanzerose, entwickelt sich innerhalb von zwei Jahren, bei über einem Drittel der Patienten, ein invasives Karzinom.<sup>8</sup> Allerdings zeigt sich eine solche Mutation nicht in allen Karzinomen und in den bisher 17 bekannten Subtypen gibt es kein spezifisches Mutationsmuster oder eine typische Adenom-Karzinom-Sequenz. In der Pathogenese scheinen Punktmutationen, wiederkehrende genomische Translokationen, vor allem die TMPRSS2-ERG-Translokation, der Verlust von Allelen oder Chromosomen und die Deletion oder Mutation von Tumorsuppressorgenen eine Rolle zu spielen.<sup>9</sup> Sexuell übertragbare Krankheiten oder die Entzündung der Prostata, sowie Prostatakarzinome in der Familie<sup>10</sup> erhöhen ebenfalls das Risiko daran zu erkranken. Der hohe Konsum von rotem Fleisch spielt durch die Freisetzung von Kanzerogenen beim Anbraten ebenfalls eine Rolle.<sup>11</sup> Patienten mit Leberzirrhose entwickeln hingegen seltener ein Prostatakarzinom, was sich auf den verminderten Östrogenabbau zurückführen lässt. Östrogen wirkt also karzinomprotektiv.<sup>12</sup> Auch konnte eine negative Korrelation, mit häufiger Ejakulation im frühen Erwachsenenalter bestätigt werden.<sup>13</sup> Einer Vasektomie konnte bisher kein Zusammenhang zur Entartung zugeordnet werden.<sup>14</sup>

### **1.1.4 Symptomatik und Metastasierung**

In den frühen Stadien ist das Prostatakarzinom im Gegensatz zu BPH meist symptomlos. Miktionsstörungen, wie nächtliches (Nykturie), schmerzhaftes (Algurie), erschwertes (Dysurie) oder vermehrtes (Pollakisurie) Wasserlassen entstehen erst im fortgeschrittenen Stadium. Meist erfolgt eine unvollständige Blasenentleerung. Erektionsstörungen bis zur Impotenz, verminderte oder schmerzhaftes Ejakulation und Blut in der Samenflüssigkeit oder im Urin können auftreten. Allgemeine Krankheitssymptome, wie Schwäche, Müdigkeit, Anämie und Gewichtsverlust treten meist erst nach Metastasierung des Prostatakarzinoms auf. Die Symptome sind dann abhängig vom Ort der Metastase. Diese treten zunächst in lokalen, retroperitonealen Lymphknoten

auf, führen zu Lymphödemen der Beine und des Hodensacks und infiltrieren die umliegenden Organe (Samenblase, Harnblase, Rektum). Später kommt es vor allem retrograd, über den prävertebralen Venenplexus zur hämatogenen Aussaat. 80 % - 90 % der Metastasen befinden sich im Achsenskelett und stimulieren das Osteoblastenwachstum durch Produktion des „prostatic osteoblastic factor“.<sup>15</sup> Dadurch kann es zu pathologischen Frakturen kommen, welche Hauptursache für die Mortalität und Morbidität des Prostatakarzinoms sind. Am häufigsten betroffen sind Becken, Kreuzbein, Oberschenkelknochen, Lendenwirbelsäule, Brustwirbelsäule und Rippen.<sup>16</sup>

### **1.1.5 Früherkennung und Histologie**

Zur Früherkennung gibt es die Möglichkeit des Prostata-spezifischen Antigen (PSA)-gestützten Screenings, der digital-rektalen Untersuchung (DRU) und falls notwendig die Biopsie. Eine Biopsie wird nur bei auffälliger DRU, einem plötzlich auffallendem PSA-Anstieg oder einem PSA-Wert  $\geq 4$  ng/ml empfohlen.<sup>17</sup> Bisher konnte jedoch nicht belegt werden, dass eine Früherkennungsuntersuchung auch zu einer Lebensverlängerung führt.<sup>18</sup> Makroskopisch lassen sich je nach Stadium in einem oder beiden Lobi derbe, unscharf begrenzte, gelbliche Herde finden. Histologisch zeigt sich das Prostatakarzinom meist als pluriformes Karzinom, das heißt, es liegen unterschiedliche Wachstumsmuster (atroph, muzinös, duktal etc.) gleichzeitig vor. Der Grad der Entdifferenzierung ist dabei wichtig für die Stadieneinteilung.<sup>19</sup> Eine Präkanzerose, aus der sich die meisten Prostatakarzinome entwickeln, ist die PIN. Je nach Menge der dysplastischen Zellen werden low und high grade PIN (PIN1, 2, 3) unterschieden. In der Vorsteherdrüse können Adenokarzinome und auch die selteneren Nicht-Adenokarzinome entstehen. Das azinäre Adenokarzinom ist der häufigste, das duktale dagegen ein seltener epithelialer Tumor mit schlechterer Prognose. Nicht-Adenokarzinome sind unterschiedlicher Herkunft. Urethralen Ursprung hat das Urothelkarzinom der Prostata, welches meist erst nach Metastasenbildung erkannt wird, aber nicht dem

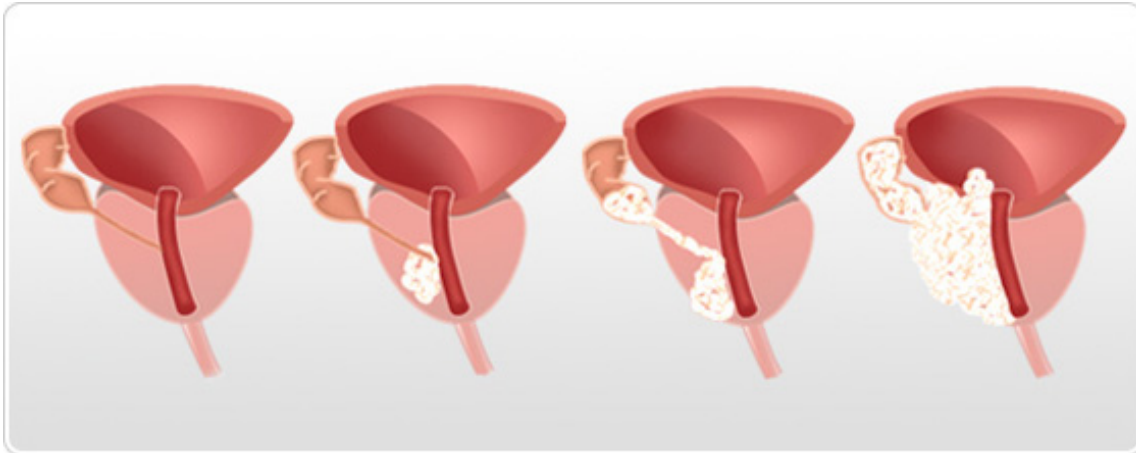
Urothelkarzinom der Harnblase entspricht. Durch stromale Entdifferenzierung entstehen Sarkome in der Vorsteherdrüse, bei Erwachsenen meist das Leiomyosarkom und bei Kinder das Rhabdomyosarkom. Osteolytische Knochenmetastasen kommen meist durch Plattenepithelkarzinome mit squamöser Differenzierung und gehen mit einer schlechten Prognose einher. Ein seltenes, hochaggressives Karzinom ist das kleinzellige Prostatakarzinom, das biologisch identisch und oft in Kombination mit dem kleinzelligen Bronchialkarzinom vorliegt. Eine neuroendokrine Differenzierung ist dann immunhistochemisch häufig nachzuweisen.<sup>20</sup>

### **1.1.6 Diagnostik und Stadieneinteilung**

Die Kombination einer DRU mit der PSA-Mengenbestimmung im Serum erhöht die Spezifität der Prostatakarzinom-Erkennung. Ein PSA-Wert  $\geq 4$  ng/ml ist karzinomverdächtig. Bei einer auffälligen DRU besteht die Möglichkeit ergänzender Bilddiagnostik mittels einer endorektalen MRT-Untersuchung oder dem transrektalem Ultraschall, zur genauen Größenbestimmung und Lokalisierung des Tumors. Erst eine Probeentnahme als Stanzbiopsie unter sonographischer Kontrolle und der Nachweis mit anschließendem Grading durch einen Pathologen, gilt beweisend für das Vorliegen eines Prostatakarzinoms. Grading beschreibt den Differenzierungsgrad des Tumors und wird in G1-G3 angegeben. Niedrig differenzierte Tumore (G3) können meist ihrem Ausgangsgewebe nicht mehr zugeordnet werden.<sup>21</sup> Nach Bestätigung der Diagnose erfolgt die Stadieneinteilung. Dazu ist ein Röntgenbild der Lunge, eine Ultraschalluntersuchung und je nach Tumorparametern ein CT der Organe und Lymphknoten des Beckens, sowie des Bauchraums nötig. Zur Beurteilung des Harnleiterverlaufs wird eine Ausscheidungsurographie der Nieren mit Kontrastmittel gemacht und eine Blasenspiegelung durchgeführt. Der Ausschluss von Knochenmetastasen erfolgt mittels Skelettszintigrafie.<sup>22</sup>

Zur Stadieneinteilung gibt es verschiedene Möglichkeiten. Es gibt die klassische TNM-Klassifikation, die den Tumor nach Größe (T, s. Abb. 1),

Lymphknotenbefall (N) und Metastasierung (M) einteilt oder die Union Internationale Contre le Cancer (UICC), welche die TNM-Klassifikation in Stadien I-IV unterteilt.



**Abbildung 1: Tumorausdehnung des Prostatakarzinoms T1, T2, T3, T4**

Dargestellt ist die Tumorausdehnung des Prostatakarzinoms in verschiedenen Größenstadien T1, T2, T3, T4.<sup>23</sup>

Nach WHO-Empfehlung hat sich jedoch eine dritte Einteilungsmöglichkeit bei Adenokarzinomen der Prostata durchgesetzt, der Gleason Score. Der Gleason Score unterteilt das Prostatakarzinom in fünf Differenzierungsgrade. Gleason 1 unterscheidet sich nur durch eine gestörte Drüsenarchitektur von der normalen Prostata und ist isoliert selten zu finden. Gleason 2 zeigt kleinere Drüsen und wenige zelluläre Atypien. Am häufigsten findet man Gleason 3, ein mäßig differenziertes Karzinom mit kleinen, unstrukturierten Drüsen, diffus infiltrierendem Gewebe und nukleären Atypien. Gleason 4 zeigt kribiforme Drüsenanordnungen, während Gleason 5 ein anaplastisches Karzinom mit polymorphen Zellen und zahlreichen Mitosen beschreibt. Der Score wird mittels Addition, des am häufigsten vorkommenden Differenzierungsgrades mit dem zweithäufigsten gebildet. Somit kann er Werte von 2 bis 10 annehmen.<sup>24,25</sup> Der Vorteil des Gleason Scores ist, dass die Heterogenität des Prostatakarzinoms beachtet wird und auf den Drüsenmustern, aber nicht auf zelluläre Atypien

beruht. Zusätzlich können immunhistochemische Marker, wie p63, PSA, PSMA etc. bestimmt werden.

### **1.1.7 Risiko-Einteilung und derzeitige Behandlungsmethoden**

Die Therapie des Prostatakarzinoms ist abhängig vom Stadium der Erkrankung. In jedem Stadium gibt es mehrere Behandlungsmöglichkeiten. Für jeden Patienten wird ein individueller Behandlungsplan, in interdisziplinären Tumorkonferenzen, entworfen und nach umfassender Aufklärung und Einverständniserklärung die Therapie begonnen. Es werden die lokal begrenzten, lokal fortgeschrittenen Tumore, sowie Lymphknoten- und Fernmetastasen unterschieden. Bei den lokal begrenzten Tumoren erfolgt zusätzlich noch eine Unterteilung in Patienten mit niedrigem, mittlerem und hohem Risikos, dass die Krankheit in absehbarer Zeit fortschreitet. Die radikale Prostatektomie oder die Strahlentherapie evtl. in Kombination mit Low-Dose-Rate-(LDR)-Brachytherapie sind empfohlene Behandlungsmöglichkeiten. Aktive Beobachtung und Abwarten wird Patienten mit niedrigem Risiko oder älteren Menschen mit Komorbiditäten empfohlen. Bei lokal fortgeschrittenen Tumoren wird zusätzlich zur Operation und Bestrahlung eine Hormontherapie erforderlich. In diesem Stadium sollte eine postoperative Bestrahlung nur erfolgen, wenn eine R0-Resektion nicht möglich war.

Die kurative Behandlung des Prostatakarzinoms ist nur im organbegrenzten Stadium möglich. Die Überlebenszeit von Patienten mit Lymphknotenmetastasen ist vor allem abhängig vom Ansprechen auf die Therapie. Obwohl eine Heilung meist nicht mehr möglich ist, ist die Todesursache bei den meisten Patienten dennoch nicht das Prostatakarzinom. Patienten mit Fernmetastasen haben nur noch die Möglichkeit einer palliativen Therapie.

Die wichtigsten prognostischen Parameter sind die TNM-Klassifikation, der Gleason Score, der PSA-Serumspiegel und die chirurgischen Resektionsränder.

### **1.1.7.1 Operation**

Die Therapie der Wahl beim lokal begrenzten Prostatakarzinom ist die radikale Prostatektomie. Dabei können die Prostata, die Samenbläschen und regionale Lymphknoten auf fünf unterschiedliche Arten entfernt werden. Die beiden offenen Operationen sind die radikale perineale Prostatektomie (RPP) und die retropubische radikale Prostatektomie (RRP). Diese wurden in den letzten Jahren zunehmend durch die minimal-invasiven Verfahren abgelöst. Hier hat man die Möglichkeiten der laparoskopisch transperitonealen bzw. der endoskopisch extraperitonealen radikalen Prostatektomie (LRPE, EERPE) und der Roboter-assistierte radikalen Prostatektomie (RARP).<sup>26</sup> Das postoperative Outcome und die möglichen Nebenwirkungen sind bei diesen Verfahren ähnlich und hängen stark vom Operateur ab. Mögliche Nebenwirkungen sind hauptsächlich die Harninkontinenz und eine erektile Dysfunktion. Durch eine Modifikation der Operationsmethoden konnte jedoch die Häufigkeit der postoperativen Inkontinenz deutlich gesenkt werden und auch die beidseitige Erhaltung, der für die erektile Potenz verantwortlichen Nervi (Nn.) cavernosi häufiger erreicht werden.<sup>27</sup> Als weitere Nebenwirkung und auch als Folge der Durchtrennung der Nn. cavernosi wurde die Verkürzung des Penis durch Atrophie beobachtet.<sup>28,29</sup> Andere postoperative Komplikationen werden unter 1.1.7.2 besprochen.<sup>30</sup>

### **1.1.7.2 Strahlentherapie**

Eine Alternative zur operativen Entfernung des Tumors stellt die Bestrahlung dar. Sie erfolgt perkutan von außen durch einen Linearbeschleuniger oder durch Low-/High-Dose-Rate (LDR-/HDR) Brachytherapie und wird auch bei metastasierenden Tumoren und dem Wiederauftreten eines bereits operierten Prostatakarzinoms angewendet. Die alleinige LDR-Brachytherapie dient nur zur Behandlung des lokal begrenzten Prostatakarzinoms mit niedrigem Risikoprofil und erfolgt über eine sonographisch kontrollierte, permanente transperineale Applikation von Jod-Implantaten. Ein Vergleich der LDR-Brachytherapie

gegenüber den anderen möglichen Therapieoptionen des Prostatakarzinoms, liegt in einer randomisiert, kontrollierten Studie noch nicht vor. Die HDR-Brachytherapie wird zur Dosisescalation in Kombination mit der perkutanen Strahlentherapie bei lokal begrenzten Tumoren des mittleren und hohen Risikoprofils angewandt. Dabei werden Strahlenträger in das Tumorgewebe eingebracht. Im Vergleich mit einer EBR-Monotherapie (EBRT) kommt es so zu deutlich weniger intestinalen und urologischen Nebenwirkungen.<sup>31</sup> Außerdem kann die Behandlungsdauer im Vergleich zur externen Bestrahlung reduziert werden.<sup>32</sup> Die perkutane Strahlentherapie kann als Monotherapie oder in Kombination mit einer Hormontherapie bei lokal fortgeschrittenen Prostatakarzinomen angewendet werden, oder auch postoperativ als adjuvante Strahlentherapie.

Die Nebenwirkungen der Strahlentherapie entsprechen denen der Operation, liegen aber in unterschiedlicher Häufigkeit vor. Harninkontinenz und Harnverhalt treten häufiger nach radikaler Prostatektomie auf, während intestinale Komplikationen, wie erhöhte Stuhlfrequenz, rektale Blutungen häufiger bei LDR-Brachytherapie und am häufigsten nach perkutaner Strahlentherapie beobachtet wurde. Das Risiko einer erektilen Dysfunktion ist nach der Operation etwas höher als nach Bestrahlung. Auch die HDR-Brachytherapie führt möglicherweise zu den bisher genannten Komplikationen. Das Risiko der Entstehung von Zweitmalignomen durch Radiotherapie, ist bei der perkutanen Strahlentherapie signifikant erhöht, aber deutlich niedriger als die bisher genannten unerwünschten Nebenwirkungen.<sup>33</sup>

### **1.1.7.3 Lymphadenektomie**

Bei lokal begrenztem Prostatakarzinom steht die kurative Therapie im Vordergrund. Dafür müssen die Vor- und Nachteile einer Lymphknotenentfernung abgewogen und das Ausmaß der Entfernung bestimmt werden. Bei Patienten mit niedrigem Risikoprofil muss keine Entfernung erfolgen. Durch eine ausgedehnte Lymphadenektomie kann ein exaktes Staging

erfolgen und die adjuvante Therapie bestimmt werden. Dadurch kommt es allerdings vermehrt zu Nebenwirkungen, wie die Entstehung von Thrombosen, Lymphödemen und Lymphozelen. Eine genaue Therapie-Empfehlung kann bisher nicht gegeben werden.<sup>34</sup>

### **1.1.7.4 Hormontherapie**

Eine neo-/adjuvante Hormontherapie sollte bei einer operativen Entfernung des Prostatakarzinoms nur bei positiven Lymphknoten durchgeführt werden. Patienten mit lokal begrenztem Tumor und hohem Risikoprofil sollen zusätzlich zur EBRT eine Hormontherapie erhalten. Dadurch wurde eine Verbesserung des Überlebens gezeigt. Die Dauer der neo-/adjuvanten Hormontherapie wird individuell in Abhängigkeit von Alter, Staging und Komorbiditäten bestimmt. Zur Androgendeprivation besteht die Möglichkeit der Gabe von Luteinisierungshormon-Releasing-Hormon(LHRH)-Analoga, Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH)-Blocker, die bilaterale Orchiectomie oder die Antiandrogeneinnahme (Bicalutamid).<sup>35</sup>

### **1.1.7.5 Chemotherapie**

Die Chemotherapie findet bis jetzt nur Anwendung in der palliativen Behandlung bei einem Tumorrezidiv oder Versagen der Hormontherapie. Durch die Behandlung mit Docetaxel und Prednisolon konnte das Überleben der Patienten signifikant verlängert werden.<sup>36</sup>

### **1.1.7.6 Palliativtherapie**

In fortgeschrittenen Stadien, wenn keine kurative Behandlung mehr möglich ist, ist das Ziel die Beschwerden zu minimieren und gleichzeitig die Lebensqualität zu maximieren. Zur Linderung der Schmerzen werden Opiode nach dem WHO-Stufenschema gegeben.<sup>37</sup> Knochenschmerzen können auch durch gezielte lokale Bestrahlung und durch Applikation von Radionukliden, wenn auch nur unzureichend, behandelt werden. Bisphosphonate reduzieren die Häufigkeit der



pathologischen Frakturen durch Knochenmetastasen und vermindern die durch die Hormontherapie hervorgerufenen osteoporotischen Veränderungen.<sup>38,39</sup>

### **1.1.7.7 Aktives Beobachten**

Die Möglichkeit der „Active Surveillance“ besteht bei Patienten mit einem lokal begrenzten Prostatakarzinom. Nach Abwägung von Nutzen und Nebenwirkungen möglicher kurativer Therapieansätze kann der Patient sich entscheiden, zunächst abzuwarten und durch regelmäßige DRU und Bestimmung des PSA-Serumspiegels eine mögliche Übertherapie zu vermeiden und erst bei Progression der Erkrankung eine Therapie anstreben.<sup>40</sup> Allerdings besteht die Strategie des aktiven Beobachtens auch für Patienten mit Tumoren mittleren und hohen Risikos, wenn sie eine schlechte Prognose für jede mögliche Therapieoption haben.<sup>41,42</sup>

### **1.1.7.8 Watchful-Waiting**

Die Strategie des „Watchful-Waiting“ möchte erst bei symptomatischer Progression der Erkrankung eine palliative Therapie beginnen. Es besteht die Möglichkeit einer Hormonablation.<sup>43</sup> Sie ist nicht zu verwechseln mit der unter 1.1.7.6 beschriebenen „Active Surveillance“, welche primär eine Übertherapie nicht lebens einschränkender, heilbarer Karzinome vermeiden möchte.

## **1.2 Small interfering RNAs**

### **1.2.1 RNA-Interferenz**

Die RNA-Interferenz ist ein biologischer Mechanismus zur Kontrolle der Genexpression in Eukaryoten. Er wurde zum ersten Mal 1990 in Petunien bei dem Versuch, die Blütenfarbe durch die Überexpression eines Enzyms, der chalcone synthetase, zu verstärken, beobachtet. Entgegen der Erwartung waren die Blüten aber weniger pigmentiert, die Genexpression also vermindert.<sup>44</sup> Der genaue Mechanismus der RNA-Interferenz wurde erst 1998 bei der Untersuchung des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans* verstanden<sup>45</sup> und kann

in drei Phasen aufgeteilt werden. Im ersten Schritt werden die in den Zellen vorhandenen fremden, doppelsträngigen RNA Moleküle (dsRNA) durch das Enzym Dicer, eine Ribonuclease III, in kleine, 21-23 Basenpaare (bp) lange, doppelsträngige siRNAs geschnitten (s. Abb. 2). Diese werden im nächsten Schritt in den RNA-induced silencing complex (RISC) aufgenommen, in Einzelstränge (ssRNA) gespalten, aufgewunden und einer der Stränge, der sogenannte Leitstrang, oder auch antisense-Strang verbleibt im RISC. Die Selektion des Leitstrangs erfolgt durch die niedrigere Thermostabilität der Basenpaare am 5'-Ende.<sup>46</sup> Durch Aktivierung eines Argonautproteins mit einer sogenannten PiWi-Domäne, die eine Endonuklease-Aktivität besitzt (AGO2), wird im letzten Schritt, im Zentrum des Proteinkomplexes, die zum antisense-Strang komplementäre mRNA gebunden und anschließend gespalten. Auf diese Weise kontrolliert der Leitstrang, welche mRNA auf welche Weise gespalten wird und somit auch deren Expression und Funktion.<sup>47</sup> Die gespaltene mRNA wird durch intrazelluläre Nukleasen abgebaut, ist somit nicht mehr zur Translation verfügbar und das von ihr kodierte Protein kann nicht mehr synthetisiert werden.

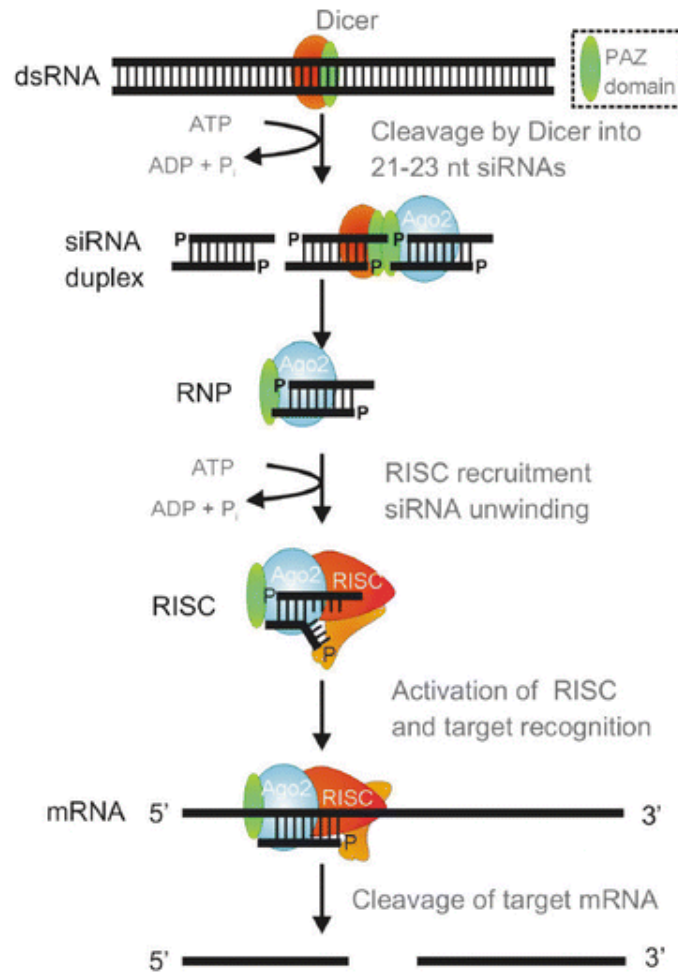


Abbildung 2: Mechanismus der RNA-Interferenz<sup>48</sup>

### 1.2.2 Eigenschaften exogen synthetisierter siRNA

Zur Untersuchung bestimmter Zellvorgänge oder noch unbekannter Funktionen eines Gens und dessen kodierten Proteins, wurde die small interfering RNA (siRNA) bisher hauptsächlich in der Grundlagenforschung genutzt. Zum gezielten Ausschalten eines Proteins wird seine Expression, durch das Einbringen künstlich synthetisierter 21-23 bp langer siRNA Moleküle in die Zelle, gehemmt. Damit diese eingebrachten siRNA Moleküle hocheffizient wirken, wurden, abgeleitet aus den Selektionsmechanismen des RISCs, vier nötige

Eigenschaften definiert: „Adenosin (A)/Uracil (U) am 5'-Ende des Antisensestranges, Guanin (G)/Cytosin (C) am 5'-Ende des Sensestranges, eine Fülle an A/U-Paarungen im Drittel des 5'-Endes des Antisensestranges und das Fehlen jeglicher G/C-Abschnitte, welche über 9 bp lang sind“.<sup>49</sup> Ebenso wichtig wie die hocheffiziente Wirkung des synthetisierten Moleküls, ist die spezifische Wirkung, der ebenfalls zwei Eigenschaften zugesprochen wurden. Zum Einen sollte eine „umfassende Effizienz der Basenpaarung zwischen siRNA und mRNA und zum Anderen Watson-Crick-Basenpaarungen zwischen siRNA und mRNA an der zentralen Position gegenüber der Endonuklease-Domäne des RISC bestehen.“<sup>50</sup> Bereits ein nichtkomplementäres Basenpaar kann die optimale Bindung und damit die RNA-Interferenz blockieren und das Gen-Silencing verhindern. Des Weiteren muss darauf geachtet werden, dass sogenannte „Off-target-Effekte“ reduziert werden. Diese kommen durch unerwünschte Bindung der siRNA an weitere homologe mRNA Moleküle zustande und werden bei weniger als elf zusammenhängenden, komplementären Nukleotiden beobachtet.<sup>51</sup> Zur genaueren Bestimmung der Spezifität wurden „Off-target-Effekte“ näher untersucht und mit der Mismatch-Toleranz charakterisiert. Durch weitere Forschung erhofft man sich, die unerwünschte Bindung der siRNA an homologe mRNA-Sequenzen auf ein Minimum zu reduzieren.<sup>52</sup>

### **1.2.3 Zielproteine für die Gen-Silencing Therapie**

Das gezielte Gen-Silencing, zur Behandlung von Krankheiten, wird durch die Anwendung der RNA-Interferenz möglich. Um das Wachstum von Krebszellen zu beeinflussen, bietet es sich an Proteine, die den Zellzyklus positiv regulieren auszuschalten. Ebenso können überexprimierte Krebsmarker ausgeschaltet werden und deren Effekt auf die Krankheit untersucht werden. Den von uns verwendeten siRNAs konnte schon ein positiver Effekt *in vitro* auf einige Krebserkrankungen zugeschrieben werden. Plattenepithelkarzinome der Speiseröhre (SRF),<sup>53</sup> Magen- (SRF),<sup>54</sup> Pankreaskarzinome (HIF<sup>55</sup>, Survivin<sup>56</sup>),

Gliome (HIF),<sup>57</sup> Ovarialzellkarzinome (Survivin),<sup>58</sup> Mamma- (Survivin<sup>59</sup>, STAT3<sup>60</sup>) und nicht kleinzellige Bronchialkarzinomen (NSLC) (E2F1, SRF, Survivin)<sup>61</sup> sind nur einige davon. Auch konnte gezeigt werden, dass die Nutzung der RNA-Interferenz bei chemoresistentem Adenokarzinom der Lunge in einer signifikanten Reduktion der Zellzahl resultierte und somit eine gute adjuvante therapeutische Option darstellen könnte.<sup>62</sup>

### 1.2.4 Apoptose

Um die normale Gewebshomöostase aufrecht zu erhalten, müssen neue Zellen gebildet und gleichzeitig alternde, überschüssige, funktionslose und entartete Zellen eliminiert werden, es muss also eine Balance von Zellproliferation und Zelltod aufrechterhalten werden. Der dazu genutzte physiologische Vorgang des programmierten Zelltods wird als Apoptose bezeichnet.<sup>63</sup> Er muss unterschieden werden vom pathologischen Zelluntergang, der Nekrose. Wenn eine Zelle zu stark geschädigt wurde, ist sie nicht mehr fähig die Apoptose einzuleiten. Es kommt zur Schwellung und schließlich zum Platzen der Zelle und geht meist mit einer Aktivierung von Entzündungs- und anderen immunologischen Reaktionen einher. Die Apoptose hingegen stört die umliegenden Zellen nicht. Sie ist an physiologischen, sowie pathophysiologischen Vorgängen des Körpers beteiligt. Auch in der Embryonalentwicklung spielt sie eine große Rolle bei der gezielten Elimination bestimmter Zellen, z.B. zur Modellierung unserer Hände und Füße. Bei dem programmierten Zelltod kommt es zunächst zu einem Kontaktverlust zu den umliegenden Zellen, der Zellkern und das Zytoplasma kondensieren, die Zelle schrumpft (Pyknose). Das Zytoskelett kollabiert, die Kernmembran wird aufgelöst. An der Zellmembran bilden sich schließlich membranumschlossene „apoptotische Körperchen“, die sich abschnüren und von Makrophagen beseitigt werden. Auf diese Weise werden alle Zellbestandteile beseitigt, ohne dass es zum Kontakt mit dem umliegenden Gewebe kommt.<sup>64</sup> Diese komplexen Mechanismen unterliegen einer strengen Regulation und führen schließlich,

durch eine Reihe von Signalkaskaden und der Aktivierung von zellulären Proteasen, den so genannten Caspasen, zum Zelltod.<sup>65</sup> Bisher wurden zwei Apoptoseregulatoren entdeckt, die Bcl-2- und die Apoptose-Inhibitor (IAP)-Proteinfamilien.

Die Apoptose wird in die Initiationsphase und die Effektorphase unterteilt. In der Initiationsphase werden wiederum der extrinsische Weg und der intrinsische, mitochondrial vermittelte Weg unterschieden. Je nach Art des Signalweg werden verschiedene Initiatorcaspasen, jedoch die gleiche Effektorcaspasen aktiviert. Die beiden Apoptosewege haben also eine gemeinsame Endstrecke.

Die Bindung von Botenstoffen, wie Zytokinen (z.B. Tumornekrosefaktor (TNF)), Hormonen, Toxinen etc. an einen membranständigen „Todesrezeptor“ aktivieren die extrinsische Apoptoseinduktion. Diese sogenannten Todesrezeptoren gehören zu der TNF $\alpha$ -Rezeptorfamilie. Sie bestehen aus einer extrazellulären Cystein-reichen Region, welche für die spezifische Ligandenbindung entscheidend ist und einer intrazellulären, aus ca. 80 Aminosäuren bestehenden, Todesdomäne. Die bekanntesten proapoptotischen Rezeptoren sind Fas (CD<sub>95</sub>/APO-1), TNF-Rezeptor 1 (TNF-R1), sowie TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 1 (TRAIL-R1) und 2 (TRAIL-R2). Durch Ligandenbindung kommt es zu einer Trimerisierung des Rezeptors. Diese Konformationsänderung rekrutiert verschiedene, mit dem Rezeptor verbundene Proteine, wie dem Fas-associated protein with death domain (FADD) oder dem TNF receptor-associated protein with death domain (TRADD). Die Adapterproteine führen schließlich zur Aktivierung der Initiatorcaspasen 8 und 10. FADD und die Caspasen 8 und 10 bilden den Death-Inducing Signaling Complex (DISC). Die hohe Konzentration und räumliche Nähe der Initiatorcaspasen führt auf bisher nicht genau bekanntem Weg zu ihrer Aktivierung und Freilassung ins Zytoplasma. Dort aktivieren sie die Effektorcaspasen 3, 6 und 7 und es kommt schließlich zur DNA-Fragmentierung und dem Untergang der Zelle.<sup>66</sup>

Der intrinsische Apoptoseweg wird durch DNA-Schädigung, oxidativen Stress, hohe Calcium-Konzentrationen oder fehlende Überlebenssignale über Mitochondrien vermittelt. Die Mitochondrienaktivierung führt zu einer Änderung des Membranpotentials und erhöht die Membranpermeabilität. Die Membranstabilisierung wird von Proteinen der Bcl-2 Familie (Bcl-2, Bcl-X, BAX, BAK etc.) kontrolliert. Regulatoren der Bcl2-Gruppe, wie p53, können je nach Stimulation pro- und antiapoptotische Signale geben.<sup>67</sup> Bcl-2- und Bcl-X-Aktivierung wirkt antiapoptotisch. Die Aktivierung von BAX (Bcl-2-assoziiertes X-Protein) und BAK (Bcl-2-homologous Antagonist/Killer) führen zur Bildung eines mitochondrial apoptosis-induced Channel (MAC) und zur Freilassung von mitochondrialen Enzymen, wie Cytochrom C und SMACs (small mitochondrial-derived activator of caspases) ins Zytoplasma.<sup>68, 69</sup> Cytochrom C bindet daraufhin das zytosolische Protein APAF-1 (apoptose protease activating factor-1) wodurch die Affinität zu ATP (Adenosintriphosphat) erhöht wird. Nach Bindung von ATP oligomerisiert der Komplex, bindet und aktiviert Procaspase 9. Dieser Komplex wird „Apoptosom“ genannt und induziert daraufhin die Effektorcaspasen 3, 6 und 7 und die gleiche Endstrecke, wie bei dem extrinsischen Apoptoseweg erfolgt.<sup>70</sup> Gleichzeitig binden die SMACs an IAPs und deaktivieren sie.<sup>71</sup>

Durch antiapoptotische Signale kann der Zelluntergang auch verhindert werden. Fehlende oder gestörte Regulation kann zu einer Reihe von Krankheiten führen. Eine erhöhte Apoptoserate spielt vor allem bei der Entwicklung von neurodegenerativen Erkrankungen, wie Alzheimer, eine Rolle. Ein verminderter programmierter Zelltod kann hingegen zu der Entstehung von Autoimmunkrankheiten und malignen Tumoren führen.<sup>72</sup>

### **1.2.5 Survivin**

Survivin gehört zu der Gruppe der „Apoptose-hemmenden Proteine“.<sup>73</sup> Die IAPs wirken nur antiapoptotisch durch Hemmung der Caspase. Die ersten IAPs wurden in einem Baculovirus entdeckt, bisher gehören mindestens sieben

Proteine zu dieser Genfamilie. Alle enthalten dabei bis zu drei „baculovirus IAP repeat (BIR)-Domänen“, welche zur Protein-Protein Interaktion dienen.<sup>74</sup>

Survivin ist das einzige IAP mit nur einer BIR-Domäne und wird während des Zellzyklus nur in der G2/M-Phase exprimiert. Während der Embryonalentwicklung hat Survivin eine wichtige Funktion in der Mitose und bei der Zellzyklusprogression, in differenzierten gesunden Zellen eines Erwachsenen ist es hingegen nur selten vorhanden. So wird ihm eine Rolle beim Überleben embryonaler Stammzellen und bei der Proliferation transformierender Zellen zugeschrieben.<sup>75</sup> Survivin wird von den Zellen vieler Malignome (Lunge, Leber, Gastrointestinaltrakt und Mamma) produziert und wurde auch bei 50 % der high-grade Non Hodgkin's Lymphome entdeckt.<sup>76</sup> Oft geht diese erhöhte Survivinexpression mit einem Verlust von Wild-Typ p53 einher, es wird vermutet, dass die Überaktivität durch eine p53-Inaktivität entsteht. Eine genauere Untersuchung des Survivinpromotors führte zu dem Ausschluss, dass eine veränderte Methylierung oder single-nucleotide Polymorphismen nicht der Grund für die erhöhte Expression sind.<sup>77</sup> Die genauen Mechanismen, der antiapoptotischen Funktion von Survivin, konnten bisher nicht verstanden werden. Trotzdem wird es, da es nicht im Normalgewebe eines Erwachsenen vorkommt, als Biomarker für Krebserkrankungen verwendet und als Ziel verschiedener Therapieansätze diskutiert.<sup>78,79</sup>

### **1.2.6 E2F1**

Die E2F-Familie der Transkriptionsfaktoren spielt eine wichtige Rolle bei der Kontrolle des Zellzyklus-Fortschritts und reguliert die Expression von Genen, die für den G1/S-Phasen-Übergang notwendig sind. Die transkriptionelle Aktivität und die DNA-Bindungsaffinität von E2F1 erhöhen sich durch Heterodimerbildung mit DP-Protein.<sup>80</sup> Bei der Regulation der Genaktivität spielen virale Onkoproteine, Cycline, die das Zellwachstum fördern und Tumorsuppressorproteine, wie die Pocketproteinfamilie bestehend aus



Retinoblastom (RB), p107 und p130, eine Rolle.<sup>81</sup> pRb bindet und inhibiert die Aktivität der E2F1 Transkriptionsfaktorfamilie und hat bei vielen Tumoren eine gestörte Funktion durch Mutation oder Interaktionen mit Proteinen, die von DNA-Tumor Viren kodiert werden. Die Bindung von hypophosphoriliertem pRB führt zur Bildung eines Transkriptionsrepressors und zum G1-Arrest. Durch erneute Phosphorylierung durch eine cyclin-abhängige Kinase in der späten G1-Phase, dissoziiert der ppRB/E2F1/DP-Komplex und der aktive E2F1/DP-Komplex versetzt als Transkriptionsaktivator eine Zelle in die S-Phase.<sup>82</sup> Eine veränderte Regulierung der E2F-Familie ist in vielen Krebsarten zu finden. Eine Überexpression von E2F1 führt zum Eintritt in die S-Phase und zur DNA-Synthese, allerdings kann eine veränderte E2F1-Aktivität während der S-Phase auch Zellzyklusarrest und Apoptose auslösen.<sup>83</sup> E2F1 ist der einzige Transkriptionsfaktor der E2F-Familie der zur Proliferation wie auch zum Zelltod führen kann.

### 1.2.7 HIF

Hypoxie-induzierter Faktor (HIF) ist ein heterodimerer Transkriptionsfaktor, bestehend aus einer sauerstoffabhängig regulierten  $\alpha$ -Untereinheit, von der es drei Isoformen gibt HIF1 $\alpha$ , HIF2 $\alpha$  und HIF3 $\alpha$  und einer konstitutiv exprimierten  $\beta$ -Untereinheit.<sup>84</sup> Er reguliert die Versorgung der Zelle mit Sauerstoff und ist somit an vielen, auch für das Tumorstadium bedeutenden Vorgängen, wie die Erythropoese, Angiogenese, Invasion und dem Glukose-Metabolismus beteiligt.<sup>85</sup> Bei der Untersuchung von HIF erkannte man, dass Hypoxie zu Apoptose (z.B. NIX und NIP3) und Nekrose führen kann, aber auch zur Tumorstadium<sup>86</sup> und zu anderen pathophysiologischen Prozessen mit physiologischer Adaption an die neuen Bedingungen durch genetische Veränderung und Überexpression.<sup>87</sup> Otto Warburg entdeckte, dass Tumorzellen zur Energiegewinnung wie fast alle Organismen die oxidative Phosphorylierung und Glykolyse nutzen. Durch das schnelle Tumorstadium kommt es zur Hypoxie und Ansammlung von Abfallprodukten in einigen Bereichen. Dies führt

zur Aktivierung von HIF-regulierten Genen, was einerseits zur Umstellung des Energiestoffwechsels auf die Glykolyse mit erhöhter Expression von Glukose-Transportern (Glut-1 und Glut-3) und vermehrtem Glukosemetabolismus führt und andererseits zur Verminderung der Mitochondrienaktivität und -anzahl in den Zellen.<sup>88</sup> Auch der Abbau von Glutamin wird von proliferierenden Zellen zur Energiegewinnung genutzt, allerdings nicht induziert durch vermindertem Sauerstoffgehalt. Durch diese Stoffwechselvorgänge entstehen toxische Abfallprodukte, die durch HIF1 $\alpha$  aktivierte Gene abgebaut werden. HIF1 $\alpha$ -induzierte Gene kontrollieren außerdem, unabhängig vom Sauerstoffgehalt einer Zelle, den intrazellulären pH-Wert (carbonische Anhydrase).<sup>89</sup>

Erhöhte intrazelluläre HIF1 $\alpha$ -Werte wurden bei einigen soliden Tumoren wie Ösophagus-, Magen-, Kolon-, Pankreas-, Prostata-, Lungen-, Mamma- und Ovarialkarzinomen gemessen. HIF2 $\alpha$  wurde bisher bei Nierenkarzinomen und zerebellaren Hämangioblastomen, vor allem in Makrophagen, nachgewiesen und spielt eine zentrale Rolle bei der Angiogenese in kolorektalen Karzinomen.<sup>90,91</sup>

### **1.2.8 STAT3**

Der „Signal transducer and activator of transcription 3“ ist ein Transkriptionsfaktor der STAT-Familie. Die Bindung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren wie Interferone (IFNs), epidermal growth factor (EGF), Interleukin 5 (IL5), IL6, hepatocyte growth factor (HGF), leukemia inhibitor factor (LIF) und bone morphogenetic protein (BMP) führt zur Aktivierung des JAK-STAT-Signalwegs und zunächst der Phosphorylierung von Tyrosin an ihrem Rezeptor und der Bindung und darauffolgenden Phosphorylierung von STAT3. Die aktivierte Form des STATs bildet ein Homo- oder Heterodimer und hat durch Translokation in den Zellkern Einfluss auf das Wachstum und das Überleben der Zelle.<sup>92</sup> In Tumorzellen konnte STAT3 die Rolle eines Onkogens, aber auch die eines Tumorsuppressors zugeordnet werden. In nicht kleinzelligen Lungentumoren (NSLC) und glialen Hirntumoren führt eine STAT3-Aktivierung

durch mutierte EGFRs zur Veränderung des STAT3-Phänotyps und hat eine antiapoptotische und proliferative Wirkung.<sup>93</sup> Den gleichen Effekt zeigt die dauerhafte Aktivierung von STAT3, was bisher in Tumoren der Prostata, der Ovarien, des Pankreas, bei Hals-/Kopftumoren, in kolorektalen und Plattenepithelkarzinomen nachgewiesen werden konnte.<sup>94,95,96</sup> Bei kolorektalen und Prostatakarzinomen, sowie glialen Hirntumoren zeigte STAT3 allerdings auch schon tumorsuppressive Funktion, in Abhängigkeit vom Stadium und der Mutationseigenschaften des Tumors.<sup>97,98,99</sup>

### **1.2.9 SRF**

Der Serum Response Faktor gehört zu den MADS-Box-Proteinen. Die MADS-Box ist eine konservierte DNA-Bindungsdomäne, bestehend aus 56 bis 60 Aminosäuren, welche nach den Initialen der zuerst gefundenen Gene benannt wurde (MCM1 und Arg80 in *Saccharomyces cerevisiae*, Agamous und Deficiens in Pflanzen und SRF im *Homo sapiens*). Die MADS-Box-Proteine sind Transkriptionsfaktoren und binden als Homodimer in der Promotorregion des Zielgens an einer bestimmten DNA-Sequenz. Diese konservierte DNA-Sequenz wird CArG-Box genannt. Sie liegt in einem regulatorischen Element des Promotors, dem serum response element (SRE) und hat in den bisher über 200 entdeckten Genen eine Konsensussequenz CC(A/T)GG.<sup>100</sup> Das SRE in der Promotorregion enthalten vor allem Zellen, deren Transkription schnell und vorübergehend durch verschiedene Wachstumsfaktoren oder mitotische Stimulation aktiviert werden, wie die „immediate-early genes (IEGs)“.<sup>101</sup> Durch Kontrolle der Expression der IEGs (c-fos, fosB, junB, egr-1/-2), der muskulären Gene (Aktin, Myosin, Troponin, Tropomyosin, Sarco-/Endoplasmatisches Retikulum Calcium ATPase (SERCA)) und der neuronalen Gene (nurr1, nurr77), kann SRF in Interaktion mit seinen Partnerproteinen, wie zum Beispiel TCFs (ternary complex factors) oder MRTFs (myocardin related growth factors), die Proliferation und Differenzierung der Zellen, die Entwicklung und Funktion der Muskulatur und die Signalübertragung der Nervenzellen regulieren. Die

Aktivierung von SRF erfolgt durch unterschiedliche Stimuli, wie unter anderem UV-Licht, Antioxidantien, Lipopolysaccharide (LPS), Lysophosphatidsäure (LPA), hohe Calciumspiegel, Zytokine, Tumornekrosefaktor  $\alpha$ , virale Proteine, aktivierte Onkogene und Protoonkogene.<sup>102</sup> Die SRF vermittelte Transkription erfolgt über einen TCF-abhängigen oder TCF-unabhängigen Signalwege. Der TCF-abhängige Signalweg führt zur Phosphorylierung und Aktivierung von TCFs und SRF durch drei MAP-Kinasen-Kaskaden, die ERK (extracellular-signal-regulated-kinase), den JNK (Jun N-terminal kinase) und die p38-K (stress-activated protein kinase) und damit zum Zellwachstum und Proliferation.<sup>103,104</sup> Die TCF-unabhängige Signaltransduktion erfolgt durch unterschiedliche Signalkaskaden. Eine Aktivierung von GTPasen der Rho-Familie führt zu einer Veränderung des Zytoskeletts durch Aktin-Polymerisierung.<sup>105</sup> Wachstumsfaktoren oder Mitogene aktivieren die PI3-Kinase, welche durch SRF-abhängige Transkription die Proliferation von IEGs stimuliert.<sup>106</sup> Ein erhöhter intrazellulärer Calcium (Ca)-Spiegel führt nach Bindung von SRF an die CArG-Box eines c-fos Gens zur Aktivierung der Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-abhängigen Kinase (CaMK) und mit Hilfe anderer Mediatoren, wie Elk1, ein Transkriptionsfaktor der E-twenty six (ETS)-Familie, zur Phosphorylierung von SRF und zur Transkription.<sup>107</sup> Diese unterschiedlichen Eigenschaften von SRF werden den unterschiedlichen Isoformen zugeschrieben, die durch alternatives Splicen und unterschiedliche posttranslationale Modifikation wie Phosphorylierungen und Glykosylierungen entstehen.<sup>108,109</sup>

### **1.2.10 PSA-1 und PSA-2**

Das prostataspezifische Antigen ist eine Serinprotease der Peptidase-S1-Familie, die vom Drüsenepithel der Prostata gebildet wird. Die Bildung ist androgenabhängig. Das Enzym liegt aufgrund der inhibitorischen Wirkung und dem hohen Gehalt von Zink in der Prostata in inaktiver Form vor und wird durch Kallikrein2 (KLK2) aktiviert. Das PSA wird dem Ejakulat beigefügt und durch Spaltung seines Substrats, dem Protein Semenogelin-I, verflüssigt sich die

Gelmatrix und die Spermatozoen können sich freier bewegen.<sup>110</sup> Es dient als Gewebemarker in der Urologie und ist bei Veränderungen der Prostata erhöht. Dabei können Entzündungen, eine benigne Prostatahyperplasie oder ein Prostatakarzinom, aber auch eine digital-rektale Untersuchung<sup>111</sup> und kürzliche Ejakulation<sup>112</sup>, die Ursache für den erhöhten PSA-Wert sein. PSA liegt in freier (fPSA) und gebundener (cPSA) Form vor, es wird als Gesamt PSA (tPSA) gemessen. Je höher der PSA-Wert ist, desto wahrscheinlicher ist es, dass eine Erkrankung vorliegt. Werte zwischen 4-10, wobei 27 % oder weniger fPSA gemessen wird, werden als verdächtig eingestuft und es sollte eine Gewebeprobe entnommen werden.<sup>113</sup> Die Messung des PSA-Wertes führte dazu, dass in den letzten Jahren deutlich mehr Prostatakarzinome, vor allem in Frühstadien entdeckt wurden. Ein generelles PSA-Screening wird bisher allerdings nicht empfohlen, da durch die frühe Behandlung, bisher keine verminderte Mortalität festgestellt wurde.<sup>114</sup> Anders hingegen sieht es mit der Verlaufskontrolle nach behandeltem Prostatakarzinom aus. Ein Rezidiv ohne PSA-Anstieg ist sehr selten und das Screening gilt daher als bestes Verfahren zur Verlaufskontrolle.

### **1.3 Transfektion**

Als Transfektion wird das Einbringen von fremden Nukleinsäuren in eukaryotische Zellen bezeichnet. Dabei wird zwischen der transienten, also der vorübergehenden und der stabilen, dauerhaften Transfektion unterschieden. Zum therapeutischen Zweck macht man sich meist das transiente Verfahren zu Nutze, bei welchem die siRNA nicht konstant in das Genom der Wirtszelle integriert wird und dadurch auch keine irreversible Änderung der Genexpression erfolgt. Es gibt eine Vielzahl unterschiedlicher chemischer, physikalischer und biologischer Transfektionsmethoden, um je nach Zellart eine möglichst hohe Transfektionseffizienz zu erreichen. Diese ist abhängig von der Anzahl zu transfizierender Zellen und der Menge der siRNA, die in die Zelle gebracht wird.

Bei der therapeutischen Anwendung von siRNAs ist außerdem wichtig, dass für den Transfer genutzte Vektoren effizient, sicher und wiederholt appliziert werden können.<sup>115</sup> Für das Einbringen von Nukleinsäuren in Zellen, hat sich die sogenannte Lipofektion bewährt. Hierbei binden die negativ geladenen Nukleinsäuren an positiv geladene Liposomen und bilden positiv geladene Komplexe. Diese Komplexe fusionieren mit der negativ geladenen Zellmembran und werden über Endozytose ins Zytoplasma aufgenommen. Die am häufigsten verwendeten kationischen Lipidreagenzien sind DOPE (Dioleoylphosphatidylethanolamine) und DOTMA (N-[1-(2,3-dioleyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniumchloride).<sup>116</sup> Sie bestehen aus einem kationischen Lipid-Molekül und einem neutralem Phospholipid und bilden uni- und multilamelläre Vesikel.<sup>117</sup> Kürzlich veröffentlichte Studien zeigen, dass diese positiv geladenen Liposomen proapoptotische und proinflammatorische Effekte auslösen können, weshalb die optimalen Verhältnisse und Mengen von Lipiden zu Nukleinsäuren, je nach Zellart, geprüft werden müssen.<sup>118</sup>

### 1.4 Zielsetzung

Jährlich erkranken etwa 58.000 Männer in Deutschland am Prostatakarzinom, ungefähr 20 % davon sterben an den Folgen ihrer Erkrankung. Aufgrund des demographischen Wandels und der immer älter werdenden Bevölkerung, steigen die Zahlen der neu diagnostizierten, bösartigen Tumorerkrankungen der Vorsteherdrüse stets weiter an. Die bisherigen etablierten Therapieoptionen des Prostatakarzinoms sind mit starken, teils irreversiblen Nebenwirkungen, wie Inkontinenz und sexueller Dysfunktion, welche die Lebensqualität der Patienten deutlich beeinträchtigen, behaftet. Des Weiteren bestehen die allgemeinen Risiken einer OP oder Bestrahlung, die es vor allem für multimorbide Patienten schwierig machen überhaupt mit einem therapeutischen Ansatz behandelt werden zu können. Durch das Fortschreiten der Erkrankung oder als Folge einer OP kann es zu Strikturen der Harnröhre kommen. Die Applikation eines „thermo-expandable“ Stents in einem kurzen, in Lokalanästhesie durchführbaren Eingriff, macht es seit einigen Jahren möglich, die Harnröhre offen zu halten. Die Idee diesen Stent, über die Nutzung der RNA-Interferenz, mit einem therapeutischen Ansatz zu kombinieren, könnte eine neue Möglichkeit sein, Patienten mit geringeren Nebenwirkungen behandeln zu können. Auch bereits therapierte Patienten könnten durch eine adjuvante Anwendung profitieren. Des Weiteren kann nach genetischer Untersuchung des Tumors eine genaue Auswahl der siRNA zur Beschichtung des Stents individuell erfolgen. So kann dem immer größer werdenden Wunsch nach personalisierter Medizin entsprochen werden. Diese sieht es vor, eine mögliche Übertherapie zu vermeiden und einen an jedes Individuum angepassten Behandlungsplan zu erstellen, während Nebenwirkungen minimiert und gleichzeitig die Effizienz einer Therapie maximiert werden soll.

Ziel dieser Arbeit war es, die Möglichkeit der Anwendung von RNA-basierten Therapieoptionen beim Prostatakarzinom zu untersuchen. Erfolgreiches Gen-Silencing soll dabei die Zahl der Prostatakarzinomzellen

vermindern. Im Rahmen dieser Arbeit werden hierfür drei Prostatakrebszelllinien (PC-3, DU-145, LnCAP) mit siRNAs gegen Survivin, E2F1, HIF1 $\alpha$ , HIF2 $\alpha$ , STAT3, SRF, PSA-1 und PSA-2, zunächst einzeln und dann in Kombination transfiziert. Die relative Transkriptmenge der mRNA wurde mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR), die Auswirkung auf die Zellzahl mit dem CASY® cell counter system untersucht. Durch das beschriebene Verfahren sollen sich neue Therapieansätze für die Inhibition des Zellwachstums beim Prostatakarzinom ergeben.



## 2 Material

Die für die Versuche verwendeten Materialien werden im Folgenden aufgelistet.

### 2.1 Zelllinien

Die folgenden drei Zelllinien wurden in dieser Arbeit untersucht.

**Tabelle 1: Verwendete Zelllinien**

Zelllinie	Hersteller	Basalmedium
PC-3	ATCC, Manassas, USA	F-12K (ATCC Manassas, USA)
DU-145	ATCC, Manassas, USA	EMEM (Invitrogen, Karlsruhe)
LnCAP	ATCC, Manassas, USA	RPMI 1640 (PAA Laboratories, Pasching)

#### 2.1.1 PC-3

Die PC-3-Prostatakarzinomzelllinie wurde 1979 zum ersten Mal aus einer Knochenmetastase isoliert. PC-3-Zellen zeigen eine hohe Metastasierungsrate,<sup>119</sup> sie sind androgen-unabhängig und exprimieren kein PSA und PSMA.<sup>120</sup>

#### 2.1.2 DU-145

Die DU-145-Prostatakarzinomzelllinie wurde erstmals 1978 aus einer Hirnmetastase bei einem Patienten, der zusätzlich an lymphatischer Leukämie erkrankt war, isoliert.<sup>121</sup> DU-145-Zellen zeigen eine mäßige Metastasierungsrate. Sie sprechen nicht auf Hormone an und exprimieren kein PSA.

### 2.1.3 LnCAP

Die LnCAP-Prostatakarzinomzelllinie wurde 1977 zum ersten Mal aus einer supraklavikulären Lymphknotenmetastase isoliert.<sup>122</sup> LnCAP-Zellen zeigen eine geringe Metastasierungsrate.

### 2.1.4 Nährmedien

Sämtliche Flüssigmedien, die der Anzucht der Zellen dienten, wurden erst kurz vor der Verwendung 50 ml FCS Endkonzentration 10 %, sowie 5 ml Pen/Strep Endkonzentration 100U Pen/100µg Strep zugesetzt. Des Weiteren wurde dem Medium RPMI 1640 5 ml 200 mM L-Glutamin (Endkonzentration 2 mM) hinzugefügt. Die Flüssigmedien wurden generell bei 4 °C aufbewahrt.

## 2.2 Chemikalien und Reagenzien

**Tabelle 2: Verwendete Chemikalien und Reagenzien**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
CASY®-Ton	Roche Diagnostics GmbH
1000 U Penicillin/ 1000 µg Streptomycin/ ml (Pen/Strep)	Invitrogen, Karlsruhe
DEPC-treated water	Ambion, USA
Dulbecco's PBS (1x), ohne Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup>	PAA Laboratories, Pasching (A)
EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ethanol absolut	AppliChem GmbH, Darmstadt

**Tabelle 2: Verwendete Chemikalien und Reagenzien (Fortsetzung)**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Ethanol absolut	AppliChem GmbH, Darmstadt
FCS (Fetales Kälberserum)	Invitrogen, Karlsruhe
Interferin	PEQLAB, Erlangen, Deutschland
L-Glutamin (200mM)	Invitrogen, Karlsruhe
Nukleasefreies Wasser	Qiagen GmbH, Hilden
TNS (0,05 % Trypsin Inhibitor, 0,1 % BSA)	Promo Cell, Heidelberg
Trypan Blue Solution 0,4 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland)
0,04 % Trypsin / 0,03 % EDTA	Promo Cell, Heidelberg
VascuLifeBasal-Medium	Lifeline Cell Technology, (Wakersville, USA)

### 2.3 Kits

Die Anwendung der aufgelisteten Kits erfolgte laut Herstellerangaben.

**Tabelle 3: Verwendete Kits**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Verwendung</b>	<b>Hersteller</b>
Aurum™ Total RNA Mini Kit	mRNA-Isolierung	Bio-Rad Laboratories GmbH, München

**Tabelle 3: Verwendete Kits (Fortsetzung)**

iScript cDNA Synthesis Kit	cDNA-Synthese	Bio-Rad Laboratoriens GmbH, München
iQ™ Custom SYBR Green Supermix	PCR	Bio-Rad Laboratoriens Inc., Hercules CA (USA)

## 2.4 siRNAs

Die Transfektion der Zellen erfolgte mit folgenden siRNAs:

**Tabelle 4: Verwendete siRNAs**

siRNA	SEQUENZ	Hersteller
SCR	Nicht veröffentlicht, aber der Hersteller garantiert durch Untersuchung mit Micro-Arrays, dass keine Homologie zum menschlichen Transkriptom existiert	Qiagen, Hilden, DE
Survivin	5' - GGACCACCGCAUCUCUACA - 3' 5' - UGUAGAGAUGCGGUGGUCC - 3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
E2F1	5' - GACGUGUCAGGACCUUCGU - 3' 5' - ACGAAGGUCCUGACACGUC - 3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg

**Tabelle 4: Verwendete siRNAs (Fortsetzung)**

HIF1 $\alpha$	5' – AGAGGUGGAUAUGUGUGGG – 3' 5' – CCCACACAUAUCCACCUCU- 3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
HIF2 $\alpha$	5' – AGAUUCCUCGUUAUUGUUG – 3' 5' – CAACAAUAACGAGGAAUCU – 3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
STAT3	5' – GCCUCUCUGCAGAAUUCAA – 3' 5' – UUGAAUUCUGCAGAGAGGC – 3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
SRF	5' – GAUGGAGUUCAUCGACAACAA – 3' 5' – UUGUUGUCGAUGAACUCCAUC – 3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
PSA-1 Transkriptvaria nte 1	5' - UGACCAGGCCAAGACUCAA – 3' 5' - UUGAGUCUUGGCCUGGUCA-3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
PSA-2 Transkriptvaria nte 2	5' - CCUCGCCAUAAAGGCACUUA-3' 5' - UAAGUGCCUUAUGGCGAGG-3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg

## 2.5 Primer

Tabelle 5: Verwendete Primer

Name	Sequenz	Hersteller
SCR	Nicht veröffentlicht	Qiagen, Hilden, DE
Survivin	Forward: 5' CCTTCTTGGAGGGCTGCGCC 3' Reverse: 5' TGGGGTCGTCACTCTGGCTCC 3'	Eurofins MWG, Operon, Ebersberg
E2F1	Forward: 5' ACCATCAGTACCTGGCCGAGAGC 3' Reverse: 5' ATAGCGTGACTTCTCCCCCGGG 3'	Eurofins MWG, Operon, Ebersberg
HIF1 $\alpha$	Forward: 5' GCAGAATGCTCAGAGAAAGCGAA 3' Reverse: 5' GCTGCATGATCGTCTGGCTGCT 3'	Eurofins MWG, Operon, Ebersberg
HIF2 $\alpha$	Forward: 5' TGTCAGGCATGGCAAGCCGG 3' Reverse: 5' GCACGGGCACGTTACCTCA 3'	Eurofins MWG, Operon, Ebersberg

**Tabelle 5: Verwendete Primer (Fortsetzung)**

STAT3	Forward: 5' CGGAGAAACAGTTGGGACCCCT 3' Reverse: 5'GAGCTGCTCCAGGTACCGTGT 3'	Eurofins MWG, Operon, Ebersberg
SRF	Forward: 5'CGCTACACGACCTTCAGCAA -3' Reverse: 5' TGTCAGCGTGGACAGCTCATA 3'	Eurofins MWG, Operon, Ebersberg
PSA-1 Transkript- variante 1	Forward: 5' GCACCCCCAGTGGGTCC 3' Reverse: 5' GCTGTGCCGACCCAGCA 3'	Eurofins MWG, Operon, Ebersberg
PSA-2 Transkript- variante 2	Forward: 5'GTCACCATGTGGGTCCC 3', Reverse: 5'CCCCAACCATGGCCCCT 3'	Eurofins MWG, Operon, Ebersberg

## 2.6 Geräte

**Tabelle 6: Verwendete Geräte**

Gerät	Hersteller
Absaugpumpe	KNF Neuberger GmbH, Freiburg
Autoklav	System DX-23, Wetzlar
BioPhotometer	Eppendorf AG, Hamburg

**Tabelle 6: Verwendete Geräte (Fortsetzung)**

Brutschrank	Heraeus Begasungsbrutschrank, Langenselbold
CASY® Cellcounter	ABX Micros 60 von AxonLab AG, Reichenbach
Inverses Mikroskop Axiovert 135	Zeiss, Jena
Kühlschrank	Liebherr Premium, Kirchdorf
Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
PCR Gerät	Workstation von PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
PCR-Plattenschweißgerät	ABgene von Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Photometer	Mithras von Berthold Technologies Firmen, Bad Wildbad
qRT-PCR Cycler	iCycler iQ5 von Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Sterilwerkbank	BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen
Tischzentrifuge MiniSpin plus	Eppendorf AG, Hamburg



## Material

**Tabelle 6: Verwendete Geräte (Fortsetzung)**

Thermomixer	Thermomixer compact von Eppendorf AG, München
Vortex	Bio Vortex V1 von PEQLAB Mixer Uzusio VTX-3000L von Laboratory & Medical Supplies
Wasserbad GFL 1083	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwendel
Zentrifuge 5415R	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge Cryofuge 5500i	Heraeus Instrument GmbH, Osterode

## 2.7 Verbrauchsmaterial

**Tabelle 7: Verwendete Materialien**

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
0,5 ml DNA LoBind Tube	Eppendorf AG, Hamburg
1,5 ml DNA LoBind Tube	Eppendorf AG, Hamburg
Safe Lock Tubes 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Multiply – pro Gefäß 0,2 ml	Sarsted AG & Co, Nümbrecht
15 ml Cellstar Tube	Greiner Bio-One, International AG, Kremsmünster

**Tabelle 7: Verwendete Materialien (Fortsetzung)**

50 ml BD Falcon	BD, Biosciences, Heidelberg
12 well Platte	Corning Incorporated, New York, USA
UVette 220 -1600 nm (RNase-, DNA-, Protein-frei)	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen Dualfilter (PCR clean, steril); 10 µl, 20 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Twin.tec PCR plate 96 (wells)	Eppendorf AG, Hamburg
PCR Heatsealing Film	Eppendorf AG, Hamburg
Zellkulturflasche 75 cm <sup>2</sup>	Corning Incorporated, New York, USA
Zellkulturflasche klein	Corning Incorporated, New York, USA

## **3 Methoden**

Im Folgenden werden die bei den Versuchen angewendeten Methoden beschrieben. Für die Arbeit mit DNA oder biologischem Material wurden mit sterilen Lösungen gearbeitet oder es wurden steril verpackte Einmalartikel verwendet. Sämtliche Arbeiten wurden, wenn nicht anders beschrieben, unter einer sterilen Werkbank durchgeführt. Die Materialien wurden vor Überführung unter die Werkbank mit Ethanol desinfiziert. Die Experimente wurden, falls nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur durchgeführt.

### **3.1 Zellkultivierung**

#### **3.1.1 Kultivierung und Passagierung eukaryotischer Krebszellen**

Die Kultivierung der unter 2.1 genannten humanen Krebszelllinien erfolgte im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> mit den unter 2.2 genannten Nährmedien. Der Mediumswechsel erfolgte alle drei Tage. Nach regelmäßiger mikroskopischer Kontrolle und einem konfluenten Wachstum von 80 % wurden die adhärennten Zellen passagiert. Zunächst wurde das Nährmedium abgesaugt und die Zellkulturen zweimalig mit 6 ml DPBS für 30 Sekunden gewaschen. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 6 ml Trypsin/EDTA und nach kurzer Inkubation bei 37 °C durch Klopfen von der Kulturflasche gelöst. Die Trypsinaktivität wurde durch Zugabe von 6 ml TNS gestoppt und die Zellsuspension in ein steriles 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und 5 Minuten bei 300 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet mit 1 ml Medium resuspendiert. Schließlich wurde die Zellsuspension entweder auf fünf neue Kulturflaschen mit je 200 µl passagiert oder mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer zur Anzucht mit definierter Zellzahl auf 12-Well-Platten oder zur Kryokonservierung unter dem Mikroskop gezählt.

### 3.1.2 Zellzählung

Die unter 2.1 genannten Zellen wurden wie unter 3.1.1 beschrieben abgelöst und zentrifugiert. Zur Kryokonservierung und der Anzucht auf 12-Well-Platten wird eine definierte Zelldichte benötigt. Dafür wurden 20 µl der Zellsuspension mit 80 µl Trypanblau gemischt. Das Deckglas der verwendeten Neubauer-Zählkammer wurde so aufgebracht, dass die Newtonschen Ringe sichtbar wurden. Die angefärbte Suspension wurde mit einer Pipette in die Zählkammer gefüllt, bis diese gefüllt war. Nach 1-2 Minuten, die die Zellen benötigten, um sich am Boden abzusetzen, wurde die Zellzahl am Mikroskop bestimmt. Als vital galten weiß bis hellblaue Zellen, tote Zellen waren dunkelblau gefärbt. Gezählt wurden nur Zellen, die oben und rechts auf einer Linie lagen. Die Neubauer-Zählkammer hat 4x16 Quadrate, jedes der 4 großen hat eine Seitenlänge von 1 mm und somit eine Fläche von 1 mm<sup>2</sup>, eine Tiefe von 0,1 mm und ein Volumen von 0,1 µl. Die Berechnung der Zellzahl erfolgte nach der Zählung von einem der 4 großen Quadranten:

$$\text{Zellen}/\mu\text{l} = \text{Zellzahl} \times 4 \times 12,5$$

### 3.1.3 Kryokonservierung und Auftauen

Die unter 2.1 genannten Zellen wurden wie unter 3.1.1 und 3.1.2 beschrieben abgelöst, zentrifugiert und gezählt. Zur Konservierung wurde 1 ml Medium für die Resuspension von mindestens 2 Millionen Zellen mit 50 µl DMSO zum Gefrierschutz versetzt. Nach der Überführung in sterile Kryoröhrchen wurden sie in einem speziellen, mit Isopropanol gefüllten Einfrierbehälter, langsam auf -80 °C abgekühlt und nach 24 Stunden in Flüssigstickstoff gelagert. Das Auftauen erfolgte schnell durch schwenken im 37 °C warmen Wasserbad und sofortiger Überführung der Zellsuspension in ein 15 ml Falconröhrchen, welches vorher mit 7 ml Medium befüllt wurde. Anschließend wurde für 5 min bei 300 x g zentrifugiert, der DMSO-haltige Überstand abgesaugt, die Zellen in frischem

Medium resuspendiert und in eine mit 15 ml Medium gefüllte Kulturflasche überführt und bei 37 °C gelagert.

### **3.1.4 Anzucht auf 12-Well-Platte**

Die unter 2.1 genannten Zellen wurden wie unter 3.1.1 und 3.1.2 beschrieben abgelöst, zentrifugiert und gezählt. Die für die Transfektion und Auswertung benötigte Zellzahl wurde zu Beginn festgelegt. Für das CASY® cell counter system wurden 40.000 Zellen, für die qRT-PCR 100.000 Zellen pro Well einer 12-Well-Platte benötigt. Die 12-Well-Platten wurden beschriftet und in jedes Well 1 ml Medium gegeben. Die benötigte Menge der Zellsuspension, um die passende Zelldichte zu erreichen, wurde errechnet und in die Mitte des Wells pipettiert. Zuletzt wurde die Platte leicht geschwenkt und bei 37 °C im Brutschrank kultiviert.

## **3.2 Transfektion der Zellen mit siRNAs**

Um die Wirksamkeit verschiedener siRNAs auf die Prostatakarzinomzelllinien zu untersuchen, wurden die Zellen mit den siRNAs SCR, Survivin, E2F1, HIF1 $\alpha$ , HIF2 $\alpha$ , STAT3, SRF, PSA-1 und PSA-2 transfiziert. Die Zellen wurden einen Tag vorher, wie unter 3.1.4 beschrieben, auf 12-Well-Platten angesetzt. Für jeden Versuch wurden Kontrollen ohne siRNA und mit scrambled-siRNA (SCR) mit angesetzt. Die Kontrollen ohne siRNA wurden während der Transfektion mit Basalmedium versetzt, während die SCR-siRNA wie funktionelle siRNAs angesetzt wurde. Das Ansetzen der Transfektionskomplexe erfolgte in Eppendorfgefäßen. Die für die Transfektion benötigte Menge siRNA wurde in Basalmedium gelöst, Interferin hinzugegeben und die Lösung gevortext. Anschließend wurde sie 20 Minuten bei Raumtemperatur zur Bildung von Transfektionskomplexen inkubiert. Das Medium der angezüchteten Zellen wurde abgesaugt, die Zellen mit 500  $\mu$ l DPBS gewaschen und wieder abgesaugt. In jedes Well wurde 300  $\mu$ l des Transfektionskomplexes gegeben. Die Zellen

wurden 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Transfektionskomplexe abgesaugt und 1 ml neues Medium zu den Zellen gegeben.

**Tabelle 8: Pipettierschema für eine Transfektion pro Well einer 12-Well-Platte**

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

Für die Untersuchung der Viabilität mittels CASY® wurde eine siRNA-Konzentration von 50 nM verwendet. Die Zellen verblieben bis zur Viabilitätsuntersuchung für 72 Stunden im Brutschrank.

Für die Auswertung mittels qRT-PCR wurden siRNA-Konzentrationen von 25 nM und 100 nM verwendet. Die transfizierten Zellen verblieben einen Tag im Brutschrank.

### 3.3 mRNA-Isolierung

Zur Messung der Transkriptmenge wurde 24 Stunden nach Transfektion die Gesamt-RNA aus den Zellen isoliert. Dies erfolgte mit Hilfe des Aurum Total RNA Mini Kit und wurde nach den Herstellerangaben durchgeführt. Zunächst wurde das Medium abgesaugt und zur Waschung der Zellen 500  $\mu\text{l}$  PBS hinzugegeben und wieder abgesaugt. Abweichend der Herstellerangaben, wurden 175  $\mu\text{l}$  Lysepuffer und 175  $\mu\text{l}$  70 % Ethanol in jedes Well gegeben und auf und ab pipettiert. Der Lysepuffer enthält  $\beta$ -Mercaptoethanol und

Guanidiniumisothiozyanat (GTC) zur vollständigen Lyse der Zellen und gleichzeitiger RNase-Inaktivierung. Das Ethanol hilft bei der Bindung an die Membran der RNA-Säulchen. Im Weiteren wurde dem Protokoll gefolgt und die mRNA durch einige Waschschrirte und Zentrifugation von Verunreinigungen, wie Zellresten, Proteinen und Salzen befreit. Bei der Elution der mRNA aus der Säule wurden 60 µl Elutionslösung genutzt. Die isolierte mRNA musste für darauffolgende Arbeiten auf Eis gelagert oder bei -80 °C eingefroren werden.

### 3.4 Konzentrationsmessung der mRNA und cDNA-Herstellung

#### 3.4.1 Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung der GesamtmRNA

Zur Konzentrationsmessung der zuvor isolierten mRNA wurde 5 µl mRNA mit 45 µl DEPC-behandeltem Wasser in eine Küvette gegeben. Als Leerprobe wurde eine mit 50 µl des Wassers gefüllte Küvette verwendet. Die Messung erfolgte durch ein Photometer bei 260 nm, dem Absorptionsmaximum von Nucleinsäuren, und bei 280 nm, dem Absorptionsmaximum von Proteinen. Eine  $OD_{260}$ , ein spezifischer Multiplikationsfaktor für DNA/RNA, entsprach dabei 40 µg/ml RNA. Die Berechnung der Nucleinsäurekonzentration erfolgte mit folgenden Formeln:

1. 
$$\frac{1 \text{ OD}}{40 \text{ µg/ml}} = \frac{\text{OD bei 260 nm}}{x}$$
2. 
$$x = \frac{\text{OD bei 260 nm} \cdot 40 \text{ µg/ml}}{1}$$
3.  $x = \text{RNA in µg/ml in der Küvette}$
4.  $\text{RNA}_{\text{Probein}} \text{ µg/ml} = x \cdot \text{Verdünnungsfaktor}$

Für den cDNA-Ansatz wurde 15 µl RNA-Lösung mit 200 ng RNA benötigt.

### 3.4.2 cDNA-Synthese

Die cDNA-Herstellung erfolgte mit dem i-Script Reaktionskit der Firma BioRad. Die 15 µl RNA-Lösung wurde wie unter 3.4.1 berechnet in einem 0,5 ml Eppendorfgefäß vorbereitet und ein Ansatz aus 4 µl 5-fach Reaktionspuffer und 1 µl Reverse Transkriptase zugegeben. Zur optimalen Durchmischung wurde der fertige cDNA-Ansatz gevortext, zentrifugiert und anschließend in einem Mastercyclergradient der Firma Eppendorf in cDNA umgeschrieben. Die cDNA-Synthese erfolgte nach den Herstellerangaben (5 Minuten bei 25 °C, 30 Minuten bei 42 °C und 5 Minuten bei 85 °C).

### 3.5 Quantitative Real-Time PCR

Die quantitative Real-Time PCR wurde genutzt um den Effekt der siRNAs auf mRNA-Ebene zu untersuchen. Die PCR dient der in vitro Amplifizierung kurzer Genabschnitte und verläuft in sich immer wiederholenden Zyklen, wobei die Produkte vorheriger Zyklen, als Ausgangsstoffe für die folgenden Zyklen dienen. Durch Einlagerung eines Fluoreszenzfarbstoffs wie SYBR Green an die amplifizierte DNA und der Messung des emittierten Fluoreszenzsignals, kann im Gegensatz zur herkömmlichen Endpunkt-PCR, nach jedem Zyklus, eine quantitative Aussage über die Template-Menge in einer Reaktion und im Vergleich zu anderen Proben erfolgen. Die qRT-PCR beruht somit auf dem Prinzip der konventionellen PCR und dient zusätzlich zur absoluten und relativen Quantifizierung von Nukleinsäuren wie DNA und mRNA.<sup>123, 124</sup> Zunächst wird die zu amplifizierende cDNA denaturiert und in komplementäre Einzelstränge getrennt. Durch die Hybridisierung komplementärer Oligonukleotide, sogenannte Primer, an die gewünschten Abschnitte der cDNA-Matrize (Annealing), und deren Elongation durch hitzestabile Taq-Polymerasen am 3'-Ende bis zum Ende des Templates, verdoppeln sich mit jedem Zyklus die Zahl der cDNA-Doppelstränge. Der Kurvenverlauf wird in zwei Phasen geteilt. In der exponentiellen Phase verdoppelt sich die Menge der DNA in jedem Zyklus.



Bei zunehmendem Verbrauch der PCR Zusätze wird die Amplifikation verlangsamt, ein Plateau wird erreicht. Dies ist die sogenannte nicht-exponentielle Phase. Durch Zunahme des Templates und damit einhergehender Fluoreszenzerhöhung, wird ein Schwellenwert erreicht ab dem die erhöhte Fluoreszenz über der des Hintergrundes liegt. Der Zyklus, bei dem die Fluoreszenz diese Maß erreicht, wird als  $C_T$  bezeichnet.

Die qRT-PCRs wurden mit einem Reaktionsvolumen von 15  $\mu$ l durchgeführt. Zunächst wurde die cDNA im Verhältnis 1:25 (4  $\mu$ l cDNA + 96  $\mu$ l  $H_2O$ ) mit nukleasefreiem Wasser verdünnt. Die Primermixe bestehen aus 800  $\mu$ l  $H_2O$ , 15  $\mu$ l sense- (100  $\mu$ M) und 15  $\mu$ l antisense-Primer (100  $\mu$ M). Für jede cDNA wurde ein Mastermix, bestehend aus Primermix und SYBR Green im Verhältnis 1:3 hergestellt. Schließlich wurde 36  $\mu$ l des Mastermix mit 18  $\mu$ l der verdünnten cDNA vermischt und davon je 15  $\mu$ l in drei von 96 Vertiefungen der PCR-Platte pipettiert. Die Platte wurde mit hitzebeständiger Folie verschlossen. Die qRT-PCR erfolgte mit dem BioRad iCycler und CFX. Die Auswertung erfolgte durch Berechnung der relativen Expression mit folgenden Formeln:

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

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

Die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) wurde als Housekeeping-Gen verwendet, da es bei jeder Säugierzelle vorkommt und unabhängig von Umwelteinflüssen immer gleich exprimiert wird. GAPDH ist nötig, um Unterschiede in den Proben, wie unterschiedliche RNA-Mengen oder qualitativ unterschiedliche RNAs in Relation miteinander vergleichen zu können. Im Idealfall soll sich die Templatemenge pro Zyklus verdoppeln, dafür steht die Zahl 2 in der Formel zur Berechnung der relativen Expression. Die Kontrollprobe (unbehandelte Zellen) wurde auf 1 gesetzt und die Werte der transfizierten Proben in Relation dazu berechnet.

Für jede Zellreihe wurde die Genexpression der mRNA dreimal untersucht. Anschließend wurde der Mittelwert berechnet und die Standardabweichung bestimmt.

### **3.6 CASY®**

72 Stunden nach der Transfektion der Zellen mit siRNA wurde die Zellzahl mit Hilfe des elektrischen Feld erzeugenden Zellzählers CASY® bestimmt. Dafür wurde zunächst das Medium abgesaugt und die Zellen mit 500 µl PBS gewaschen und wieder abgesaugt. Die Zellen eines Wells wurden mit 500 µl Trypsin/EDTA abgelöst und das Trypsin anschließend mit 500 µl TNS neutralisiert. In ein CASY®-Cup wurden 5 ml CASY®-Ton, eine isotonische Flüssigkeit, gegeben, 50 µl der Zellsuspension hinein pipettiert und mit 5 ml CASY®-Ton aufgefüllt. Die Messung erfolgte mit den folgenden Einstellungen: Kapillare: 150 µm, Probenvolumen: 400 µl, x-Achse: 50 µm, Zyklen: 3, Verdünnung: 1:200, Evaluationscursor: 11,25 µm – 50 µm, Normalisierungscursor: 7,5 µm - 50 µm. Für jede transfizierte siRNA und die Kontrollen erfolgte pro Versuch eine Vierfachbestimmung der Zellzahl. Die Kontrollen bestanden aus nichttransfizierten und mit SCR-siRNA transfizierten Zellen. Für jeden Versuch wurde die Zellzahl gemittelt und der Mittelwert der unbehandelten Zellen auf 100 % gesetzt. Die Standardabweichung wurde aus drei Versuchsreihen berechnet.

### **3.7 Statistik**

Jeder Versuch wurde pro Zelllinie mindestens dreimal durchgeführt. Aus den drei Ergebnissen wurde der Mittelwert, sowie die Standardabweichung berechnet.

Für die Auswertung der Ergebnisse der qRT-PCR wurde die Kontrolle auf 1 gesetzt und davon ausgehend die relative Expression der mRNA der transfizierten Zellen berechnet, sowie der Mittelwert bestimmt.

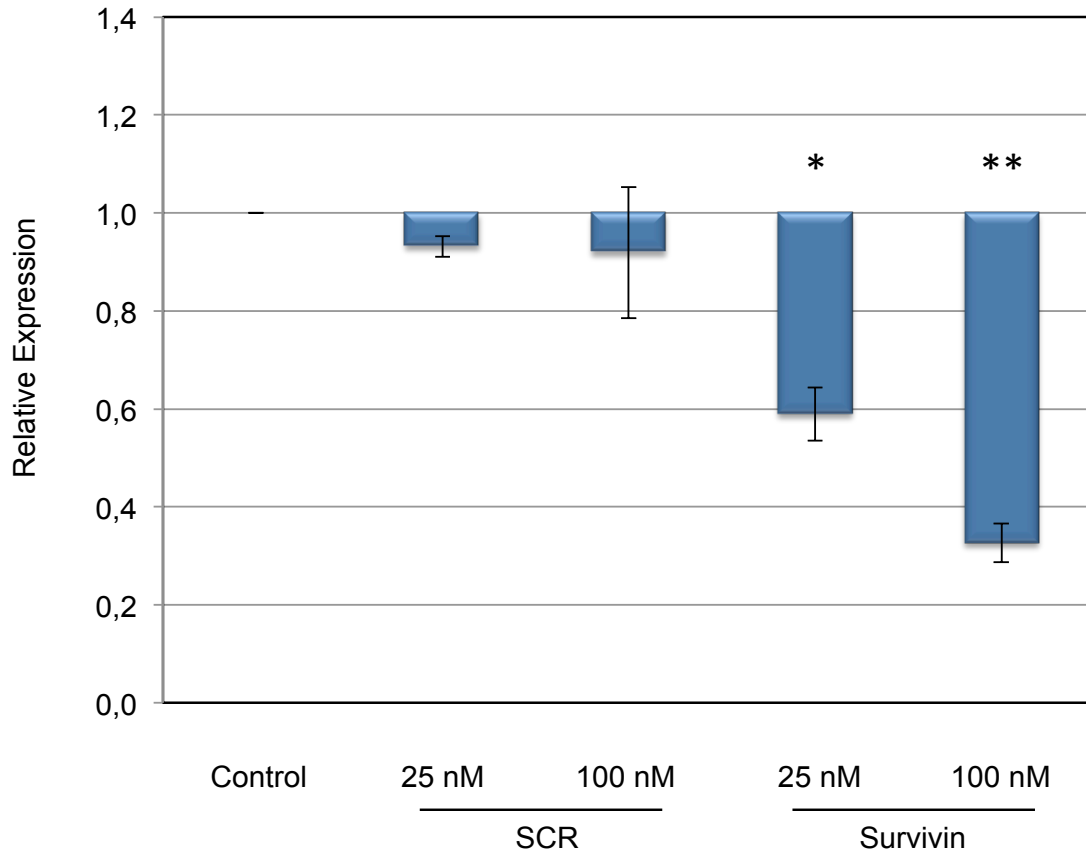
Für die Auswertung der Ergebnisse des CASY® Cellcounters wurde die Kontrolle auf 100 % gesetzt und davon ausgehend die Prozentzahlen der transfizierten Zellen berechnet und so auch der Mittelwert in Prozent bestimmt. Zuletzt wurde mithilfe von Graphpad der Paired-t-Test angewendet. Das Signifikanzniveau wurde dabei auf  $p < 0,05$  festgelegt, wobei \* =  $0,01 < p < 0,05$  signifikant, \*\* =  $0,001 < p < 0,01$  sehr signifikant und \*\*\* =  $p < 0,001$  hoch signifikant bedeutet.

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Untersuchung der Expression der mRNA nach Transfektion**

Die Wirksamkeit acht verschiedener siRNAs auf die Expression der mRNA wurde bei den drei Prostatakrebszelllinien PC-3, DU-145 und LnCAP untersucht. Für die Untersuchung der jeweiligen Genexpression wurden siRNA-transfizierte, SCR-siRNA-transfizierte und unbehandelte Zellen untersucht. Die Transfektion erfolgte mit einer Konzentration von 25 nM und 100 nM. Ein Tag nach der Transfektion wurde die mRNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Zuletzt wurde eine qRT-PCR durchgeführt. Die Auswertung erfolgte über die relative Expression jedes einzelnen Gens im Vergleich zur Expression des selben Gens in unbehandelten Zellen, welche mit dem Wert 1 festgelegt wurde. Für jede Zelllinie erfolgte eine Dreifachbestimmung der Expression, die Bestimmung des Mittelwerts, die Berechnung der Standardabweichung und des p-Wertes.

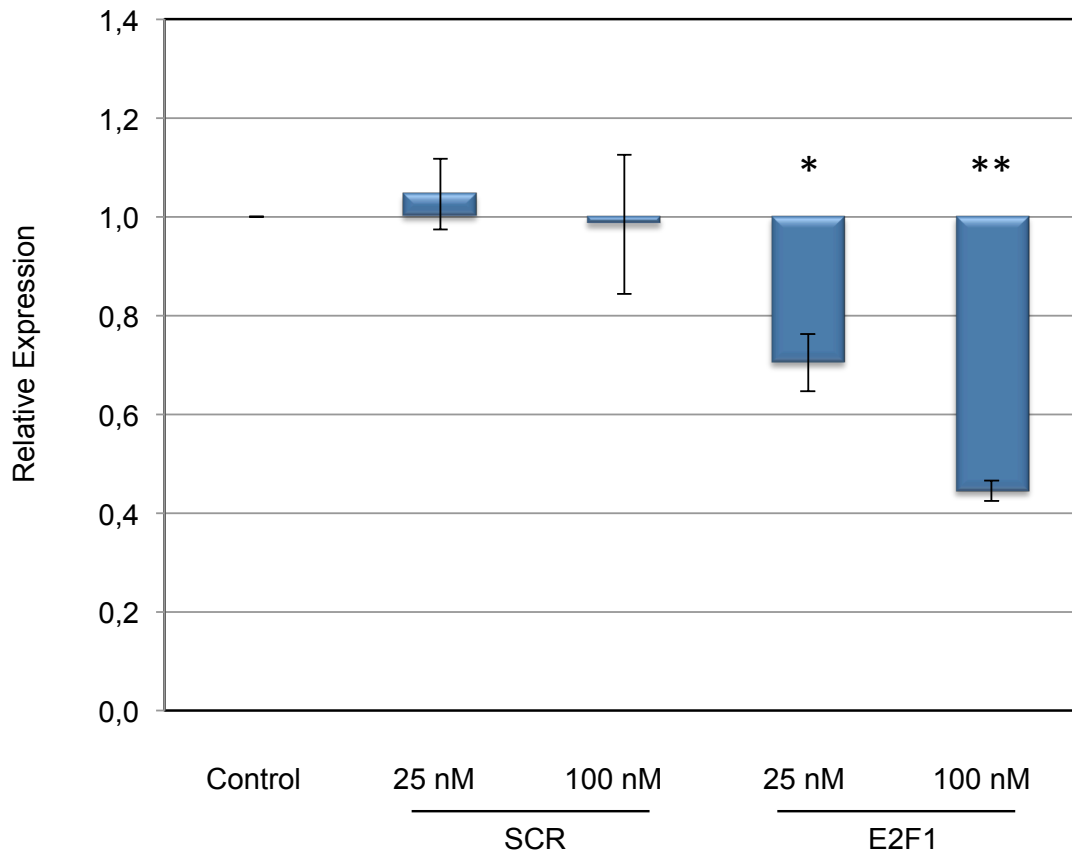
4.1.1 PC-3



**Abbildung 3: Relative Genexpression nach Transfektion mit Survivin-siRNA**

Die x-Achse zeigt die Transfektionsproben. Die y-Achse zeigt die relative Expression dieser Gene. Das Signifikanzniveau wurde auf den Wert  $p^* \leq 0,05$ , sowie  $p^{**} \leq 0,01$  gesetzt. Signifikante Änderungen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

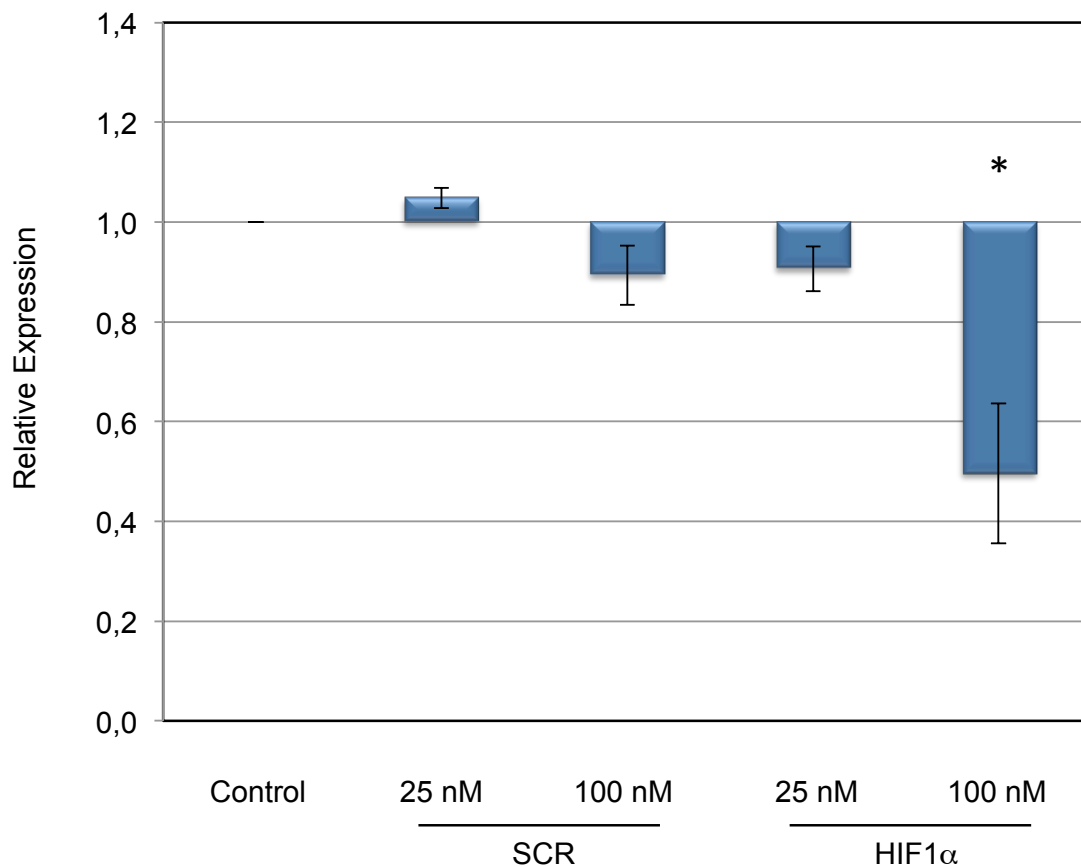
Aus der Auswertung der Genexpression der mRNA von Survivin geht hervor, dass die SCR-siRNA keinen signifikanten Einfluss auf die Genexpression hatte. Die Transfektion mit siRNA gegen Survivin bewirkte einen Knockdown der Expression von 41 % bei einer Konzentration von 25 nM und einen Knockdown von 67 % bei einer Konzentration von 100 nM (s. Abb. 3).



**Abbildung 4: Relative Genexpression nach Transfektion mit E2F1-siRNA**

Die x-Achse zeigt die Transfektionsproben. Die y-Achse zeigt die relative Expression dieser Gene. Das Signifikanzniveau wurde auf den Wert  $p^* \leq 0,05$ , sowie  $p^{**} \leq 0,01$  gesetzt. Signifikante Änderungen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

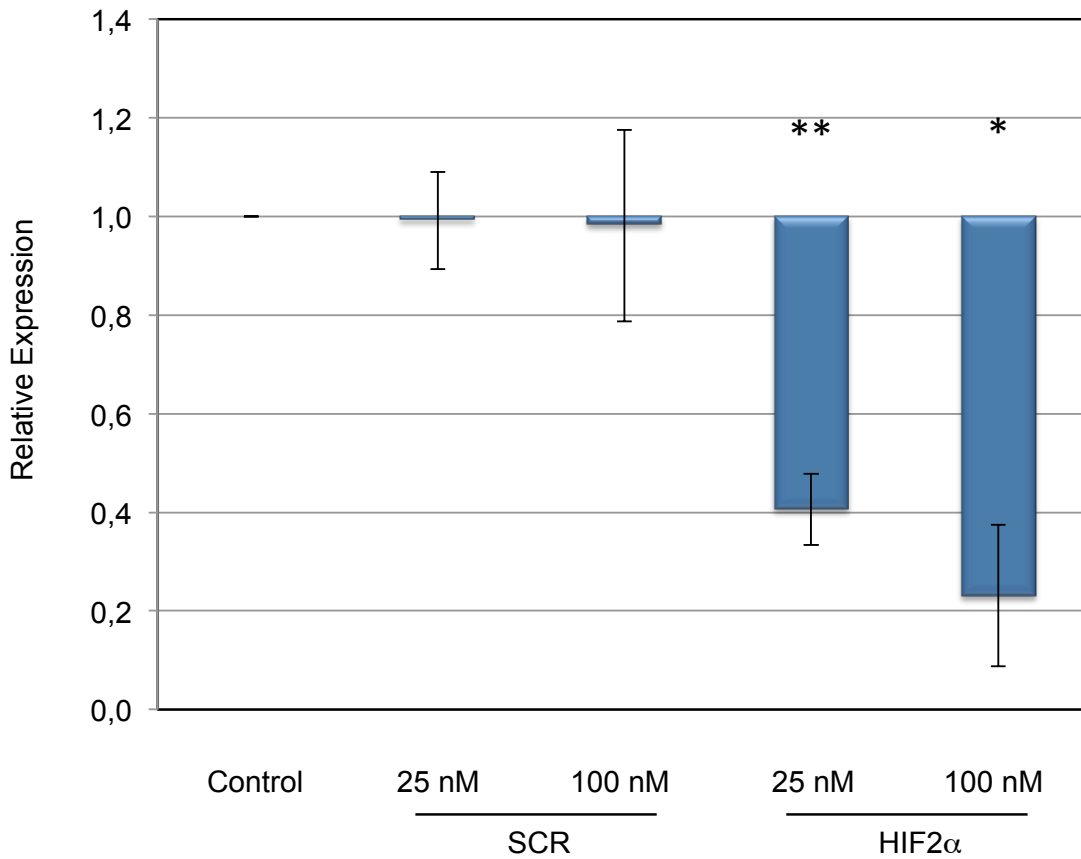
Eine signifikant veränderte Genexpression wurde nach Transfektion mit siRNA gegen E2F1 beobachtet. Die Auswertung zeigte eine Reduktion der Expression der mRNA von E2F1 um knapp ein Drittel bei einer Konzentration von 25 nM und um 55 % bei 100 nM. Die SCR-siRNA beeinflusste die Genexpression nicht signifikant (s. Abb. 4).



**Abbildung 5: Relative Genexpression nach Transfektion mit HIF1α-siRNA**

Die x-Achse zeigt die Transfektionsproben. Die y-Achse zeigt die relative Expression dieser Gene. Das Signifikanzniveau wurde auf den Wert  $p^* \leq 0,05$ , sowie  $p^{**} \leq 0,01$  gesetzt. Signifikante Änderungen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

Aus der Untersuchung der Auswirkung nichtfunktioneller SCR-siRNA auf die Genexpression der mRNA von HIF1α geht hervor, dass auch hier kein signifikanter Einfluss zu verzeichnen war. Die funktionelle siRNA gegen HIF1α erreichte eine Reduktion der Genexpression der mRNA von HIF1α um 9 % bei einer Konzentration von 25 nM und halbierte sie signifikant bei einer Konzentration von 100 nM (s. Abb. 5).

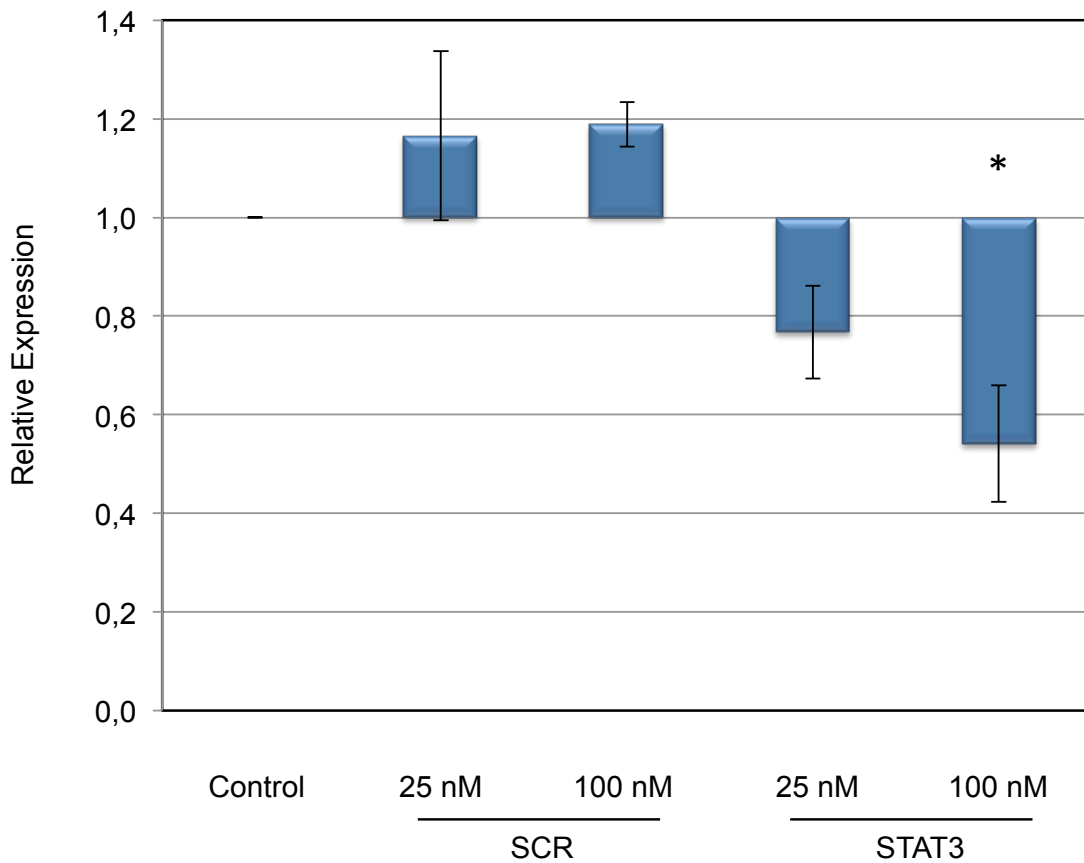


**Abbildung 6: Relative Genexpression nach Transfektion mit HIF2 $\alpha$ -siRNA**

Die x-Achse zeigt die Transfektionsproben. Die y-Achse zeigt die relative Expression dieser Gene. Das Signifikanzniveau wurde auf den Wert  $p^* \leq 0,05$ , sowie  $p^{**} \leq 0,01$  gesetzt. Signifikante Änderungen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

Bei der Untersuchung der Wirksamkeit der siRNA gegen HIF2 $\alpha$  wurde festgestellt, dass die Transfektion bei einer Konzentration von 25 nM eine signifikant reduzierte Genexpression um 59 % und bei 100 nM um 81 % zur Folge hatte. Mit SCR-siRNA wurde keine signifikant veränderte Genexpression erreicht (s. Abb. 6).

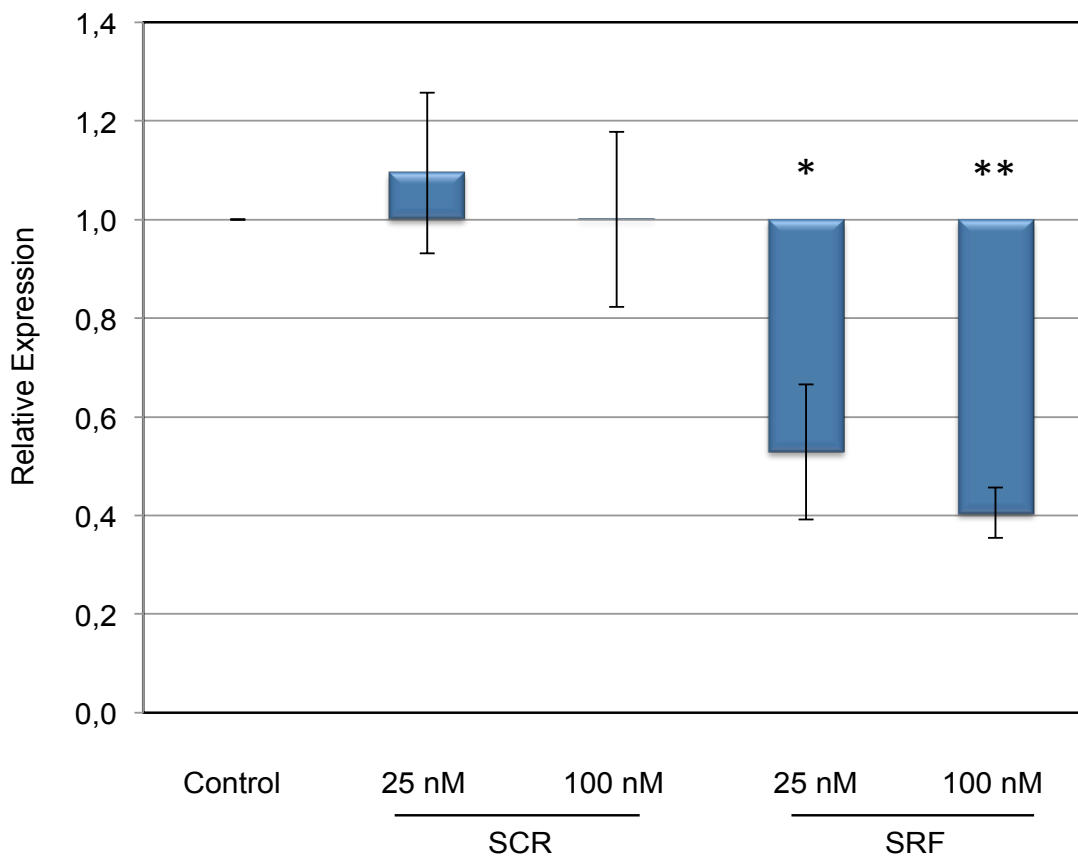




**Abbildung 7: Relative Genexpression nach Transfektion mit STAT3-siRNA**

Die x-Achse zeigt die Transfektionsproben. Die y-Achse zeigt die relative Expression dieser Gene. Das Signifikanzniveau wurde auf den Wert  $p^* \leq 0,05$ , sowie  $p^{**} \leq 0,01$  gesetzt. Signifikante Änderungen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

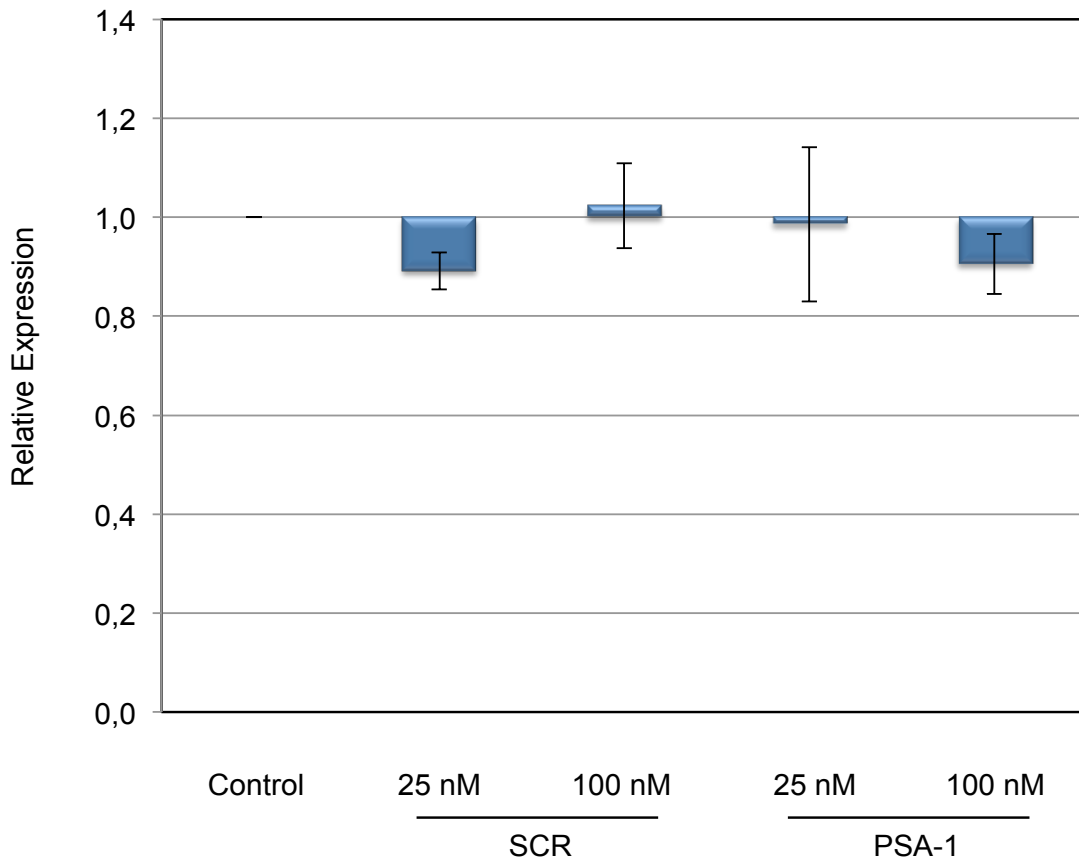
Der Effekt der SCR-siRNA auf die Genexpression der mRNA von STAT3 war eine nicht signifikante Steigerung um 17 % und 19 % bei Konzentrationen von 25 nM und 100 nM. Die Auswertung der Genexpression auf mRNA-Ebene nach Transfektion mit siRNA gegen STAT3 zeigte eine Senkung um 23 % und signifikant um 56 % bei 25 nM und 100 nM (s. Abb. 7).



**Abbildung 8: Relative Genexpression nach Transfektion mit SRF-siRNA**

Die x-Achse zeigt die Transfektionsproben. Die y-Achse zeigt die relative Expression dieser Gene. Das Signifikanzniveau wurde auf den Wert  $p^* \leq 0,05$ , sowie  $p^{**} \leq 0,01$  gesetzt. Signifikante Änderungen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

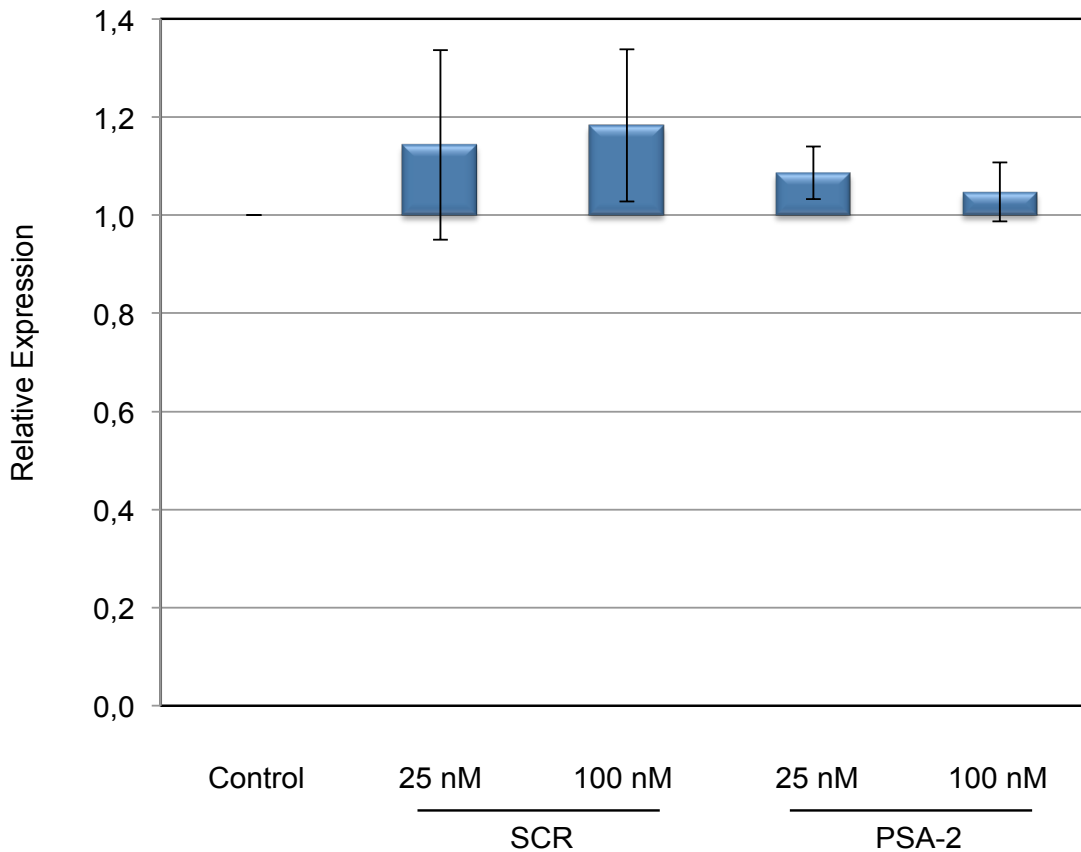
In der Auswertung der Genexpression der mRNA von SRF ist zu sehen, dass die SCR-siRNA die Expression auf mRNA-Ebene nicht signifikant veränderte. Die Transfektion mit siRNA gegen SRF hingegen bewirkte einen signifikanten Knockdown um 47 % bei 25 nM und um 60 % bei 100 nM (s. Abb. 8).



**Abbildung 9: Relative Genexpression nach Transfektion mit PSA-1-siRNA**

Die x-Achse zeigt die Transfektionsproben. Die y-Achse zeigt die relative Expression dieser Gene. Das Signifikanzniveau wurde auf den Wert  $p^* \leq 0,05$ , sowie  $p^{**} \leq 0,01$  gesetzt. Signifikante Änderungen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

Eine signifikant verminderte Genexpression der mRNA von PSA-1 wurde nach der Transfektion von SCR-siRNA sowie funktioneller siRNA gegen PSA-1 nicht beobachtet. Die Transfektion mit PSA-1-siRNA reduzierte die Expression der mRNA von PSA-1 um 1 % und 9 % bei 25 nM bzw. 100 nM (s. Abb. 9).

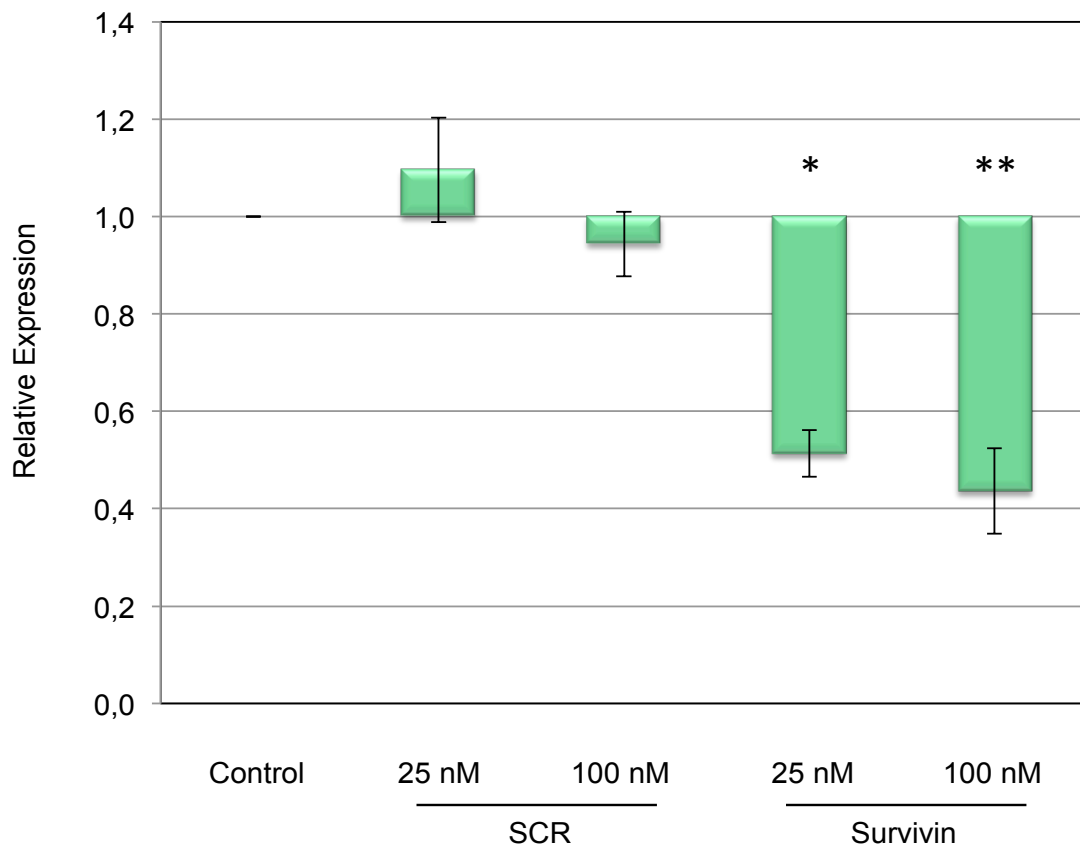


**Abbildung 10: Relative Genexpression nach Transfektion mit PSA-2-siRNA**

Die x-Achse zeigt die Transfektionsproben. Die y-Achse zeigt die relative Expression dieser Gene. Das Signifikanzniveau wurde auf den Wert  $p^* \leq 0,05$ , sowie  $p^{**} \leq 0,01$  gesetzt. Signifikante Änderungen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

Die Auswertung der Genexpression der mRNA von PSA-2 zeigte keine signifikanten Veränderungen nach der Transfektion mit funktioneller siRNA gegen PSA-2. Die Expression steigerte sich um 9 % bei einer Konzentration von 25 nM und um 5 % bei einer Konzentration von 100 nM. Die Transfektion mit nicht funktioneller SCR-siRNA erhöhte die Genexpression der mRNA von PSA-2 nicht signifikant um 14 % und 18 % bei 25 nM und 100 nM (s. Abb. 10).

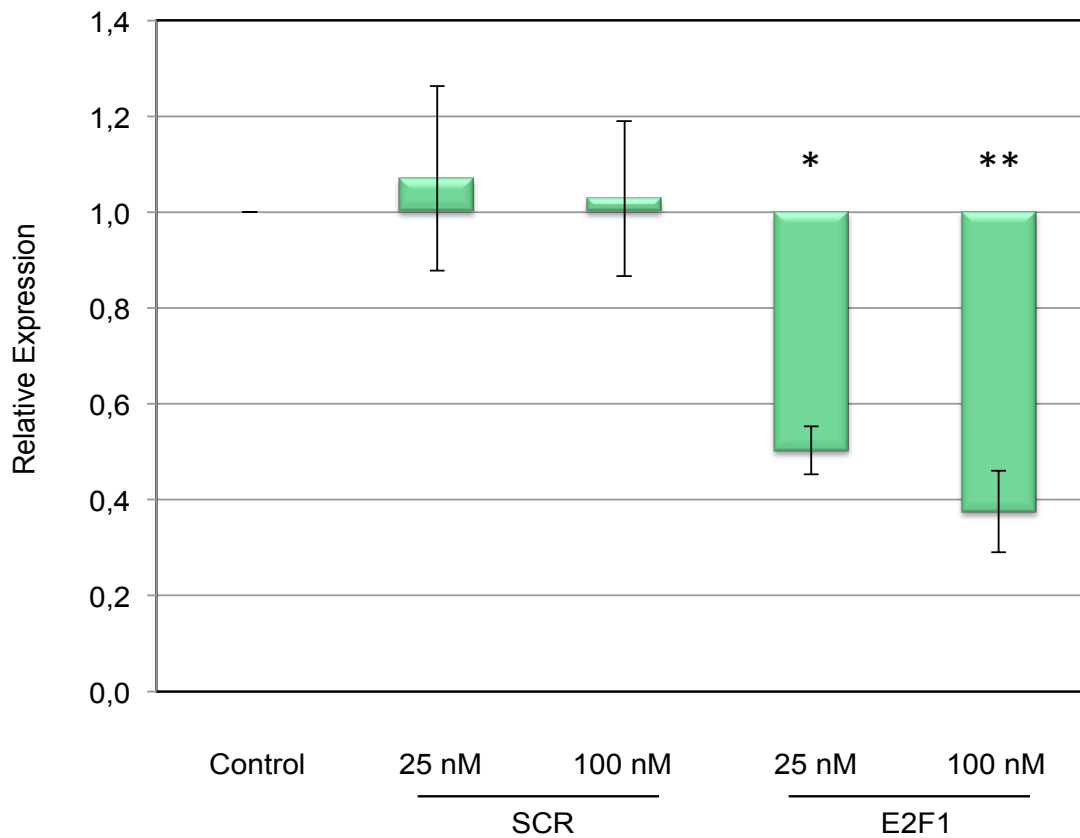
#### 4.1.2 DU-145



**Abbildung 11: Relative Genexpression nach Transfektion mit Survivin-siRNA**

Die x-Achse zeigt die Transfektionsproben. Die y-Achse zeigt die relative Expression dieser Gene. Das Signifikanzniveau wurde auf den Wert  $p^* \leq 0,05$ , sowie  $p^{**} \leq 0,01$  gesetzt. Signifikante Änderungen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

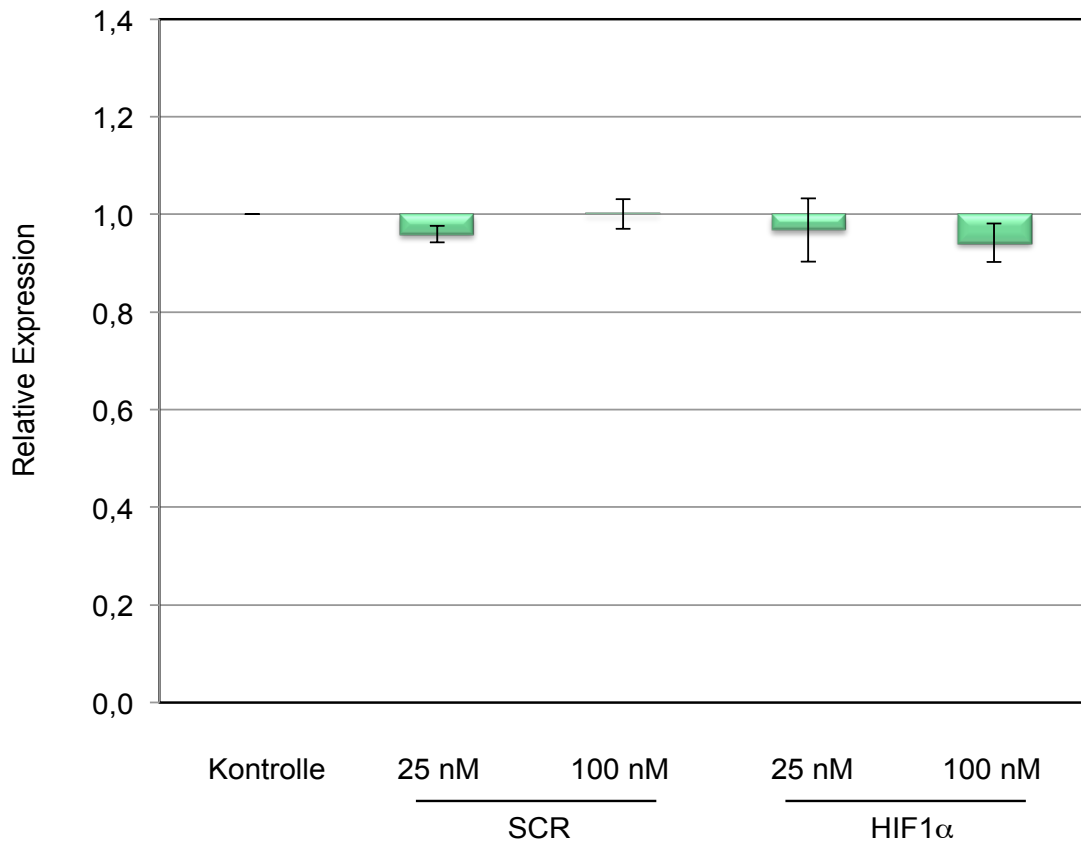
Aus der Untersuchung der Wirksamkeit der siRNA gegen Survivin geht hervor, dass die SCR-siRNA die Genexpression nicht signifikant beeinflusst. Die Transfektion funktioneller siRNA gegen Survivin bewirkte einen signifikanten Knockdown um 49 % bei 25 nM und um 56 % bei 100 nM (s. Abb. 11).



**Abbildung 12: Relative Genexpression nach Transfektion mit E2F1-siRNA**

Die x-Achse zeigt die Transfektionsproben. Die y-Achse zeigt die relative Expression dieser Gene. Das Signifikanzniveau wurde auf den Wert  $p^* \leq 0,05$ , sowie  $p^{**} \leq 0,01$  gesetzt. Signifikante Änderungen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

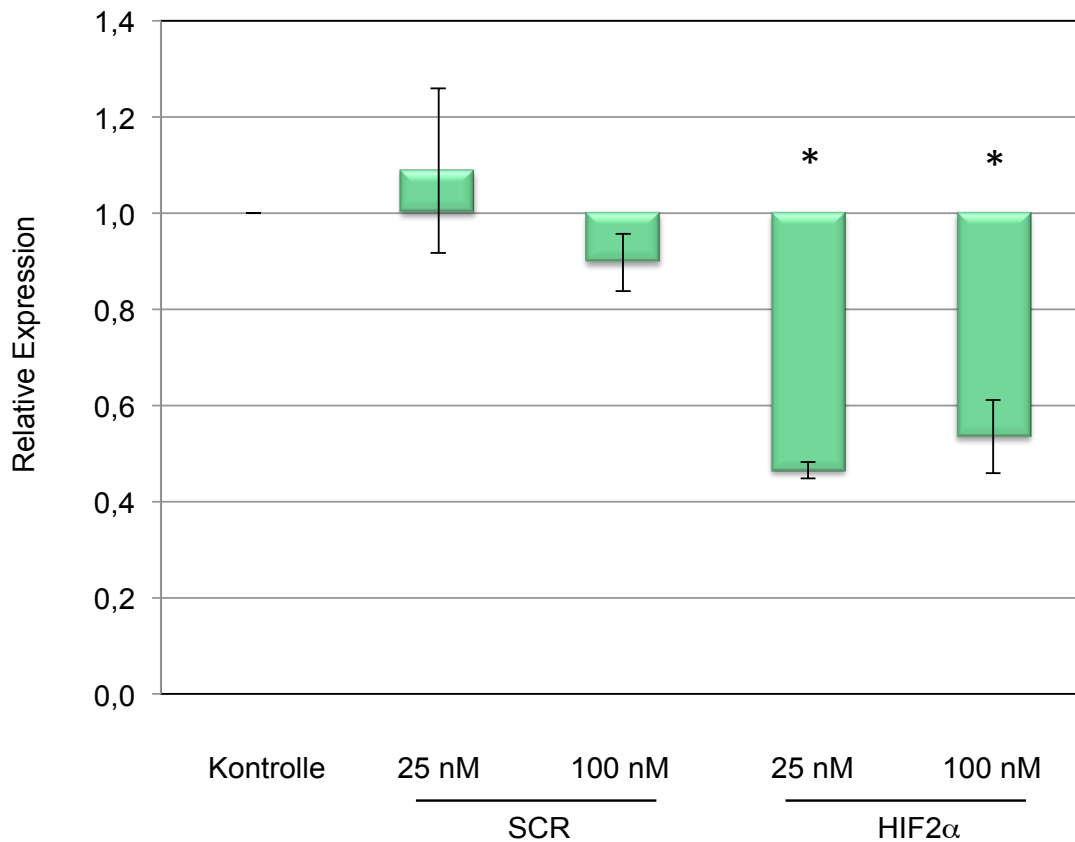
Bei der Auswertung der Genexpression auf mRNA-Ebene von E2F1 ist zu sehen, dass die SCR-siRNA keine signifikante Veränderung erzielte. Die Expression von E2F1 durch E2F1-siRNA halbierte sich bei 25 nM und verringerte sich um 62 % bei 100 nM signifikant (s. Abb. 12).



**Abbildung 13: Relative Genexpression nach Transfektion mit HIF1 $\alpha$ -siRNA**

Die x-Achse zeigt die Transfektionsproben. Die y-Achse zeigt die relative Expression dieser Gene. Das Signifikanzniveau wurde auf den Wert  $p^* \leq 0,05$ , sowie  $p^{**} \leq 0,01$  gesetzt. Signifikante Änderungen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

Eine signifikant verminderte Genexpression wurde bei der Auswertung der mRNA von HIF1 $\alpha$  nicht beobachtet. Die SCR-siRNA verursachte keine signifikant veränderte Genexpression. SiRNA gegen HIF1 $\alpha$  veränderte die Genexpression um 3 % sowie 6 % bei Konzentrationen von 25 nM und 100 nM (s. Abb. 13).

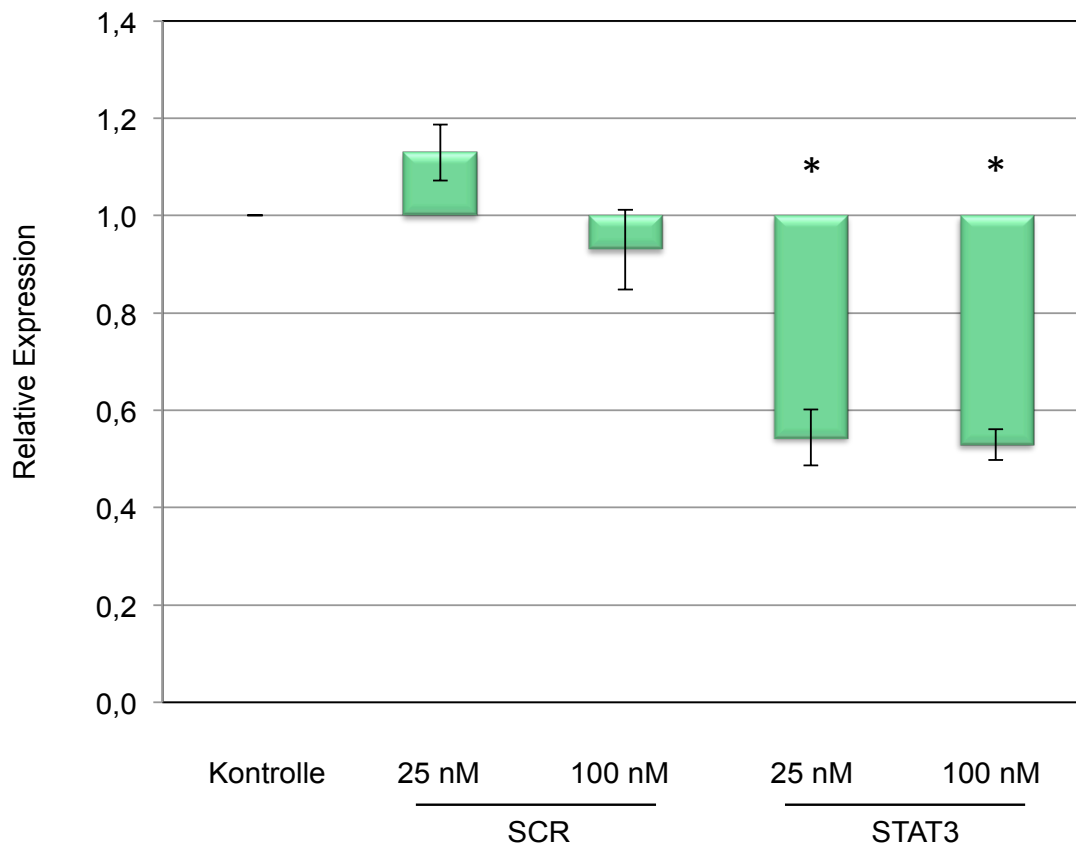


**Abbildung 14: Relative Genexpression nach Transfektion mit HIF2α-siRNA**

Die x-Achse zeigt die Transfektionsproben. Die y-Achse zeigt die relative Expression dieser Gene. Das Signifikanzniveau wurde auf den Wert  $p^* \leq 0,05$ , sowie  $p^{**} \leq 0,01$  gesetzt. Signifikante Änderungen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

Die Auswertung der Wirksamkeit der siRNA gegen HIF2α zeigte, dass die SCR-siRNA die Genexpression nicht signifikant beeinflusste. Die siRNA gegen HIF2α erreichte eine signifikante, verminderte Genexpression auf mRNA-Ebene um 54 % bei 25 nM und 47 % bei 100 nM (s. Abb. 14).

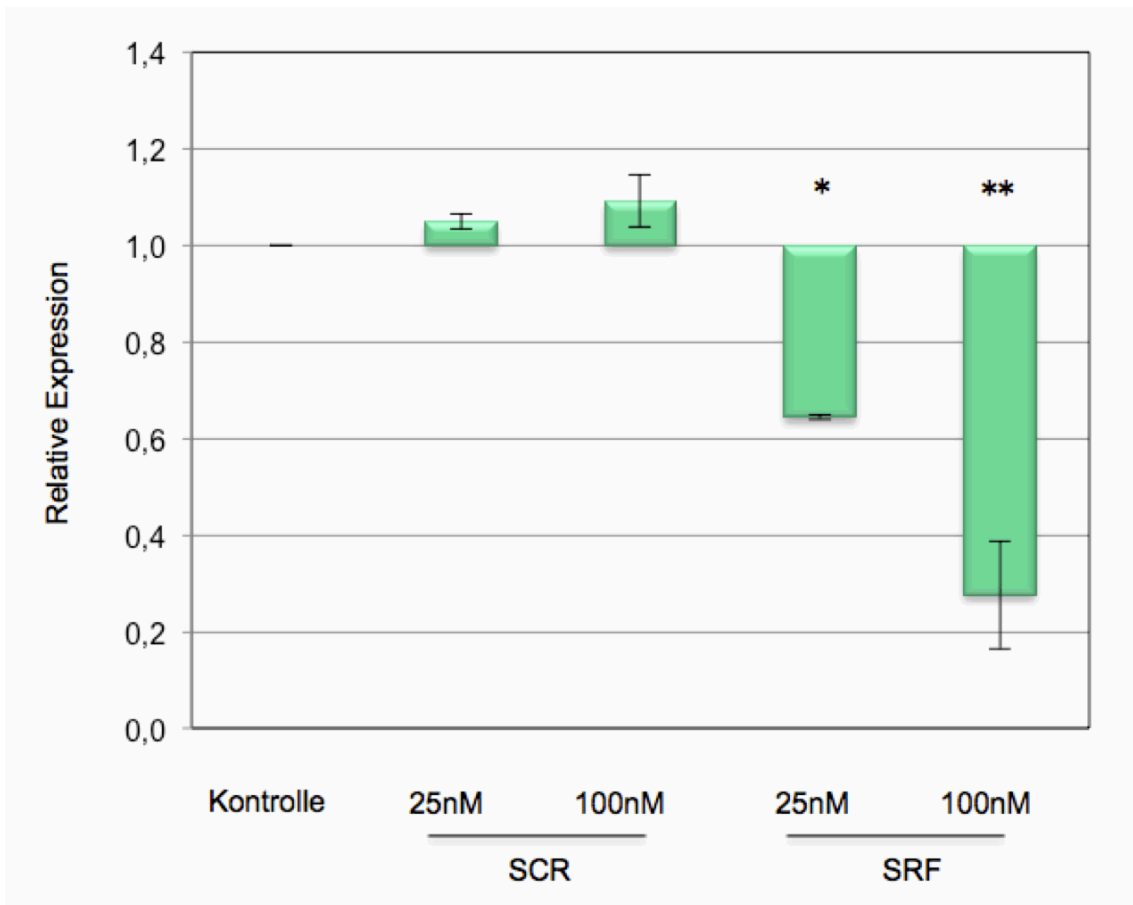




**Abbildung 15: Relative Genexpression nach Transfektion mit STAT3-siRNA**

Die x-Achse zeigt die Transfektionsproben. Die y-Achse zeigt die relative Expression dieser Gene. Das Signifikanzniveau wurde auf den Wert  $p^* \leq 0,05$ , sowie  $p^{**} \leq 0,01$  gesetzt. Signifikante Änderungen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

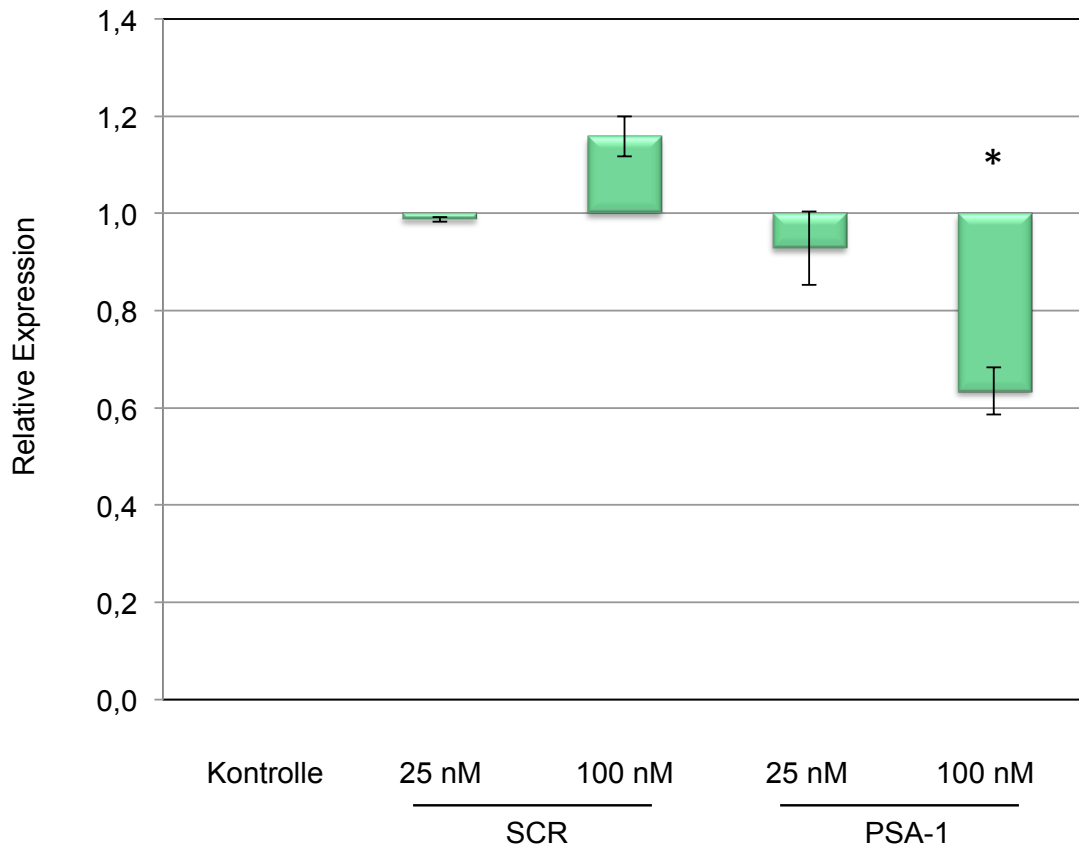
Der Effekt der SCR-siRNA auf die Genexpression der mRNA von STAT3 war eine nicht signifikante Steigerung um 13 % bei 25 nM, sowie eine nicht signifikante Reduktion um 7 % bei 100 nM. Die Behandlung mit funktioneller siRNA gegen STAT3 wirkte sich in einer signifikant verminderten Genexpression um 46 % bei einer Konzentration von 25 nM und um 47 % bei einer Konzentration von 100 nM aus (s. Abb. 15).



**Abbildung 16: Relative Genexpression nach Transfektion mit SRF-siRNA**

Die x-Achse zeigt die Transfektionsproben. Die y-Achse zeigt die relative Expression dieser Gene. Das Signifikanzniveau wurde auf den Wert  $p^* \leq 0,05$ , sowie  $p^{**} \leq 0,01$  gesetzt. Signifikante Änderungen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

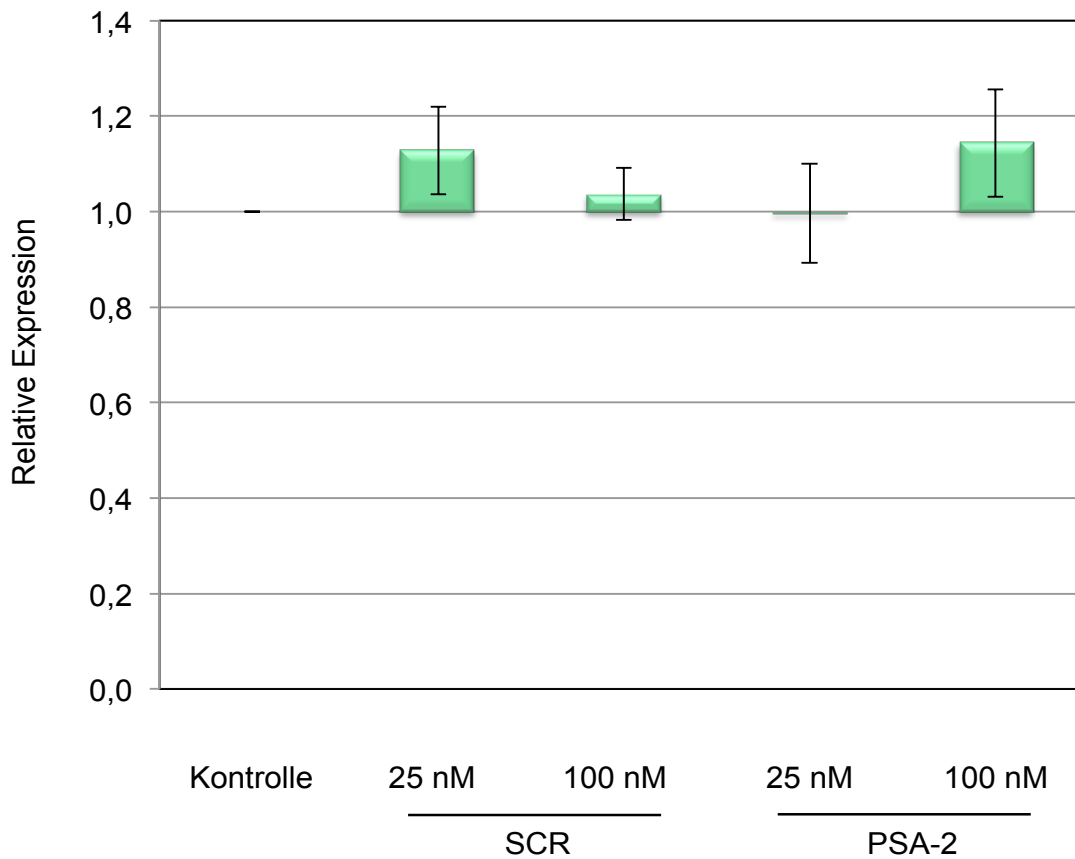
Die Auswertung der Genexpression nach Transfektion der siRNA gegen SRF zeigte einen signifikanten Knockdown um 36 % bei 25 nM sowie um 72 % bei 100 nM. Die SCR-siRNA verursachte keine signifikant veränderte Genexpression (s. Abb. 16).



**Abbildung 17: Relative Genexpression nach Transfektion mit PSA-1-siRNA**

Die x-Achse zeigt die Transfektionsproben. Die y-Achse zeigt die relative Expression dieser Gene. Das Signifikanzniveau wurde auf den Wert  $p^* \leq 0,05$ , sowie  $p^{**} \leq 0,01$  gesetzt. Signifikante Änderungen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

Die Untersuchung der Wirksamkeit der siRNA gegen PSA-1 ergab eine nicht signifikante Änderung der Expression auf mRNA-Ebene. Die Transfektion mit siRNA gegen PSA-1 bewirkte einen Knockdown um 7 % bei 25 nM und signifikant um 37 % bei 100 nM (s. Abb. 17).

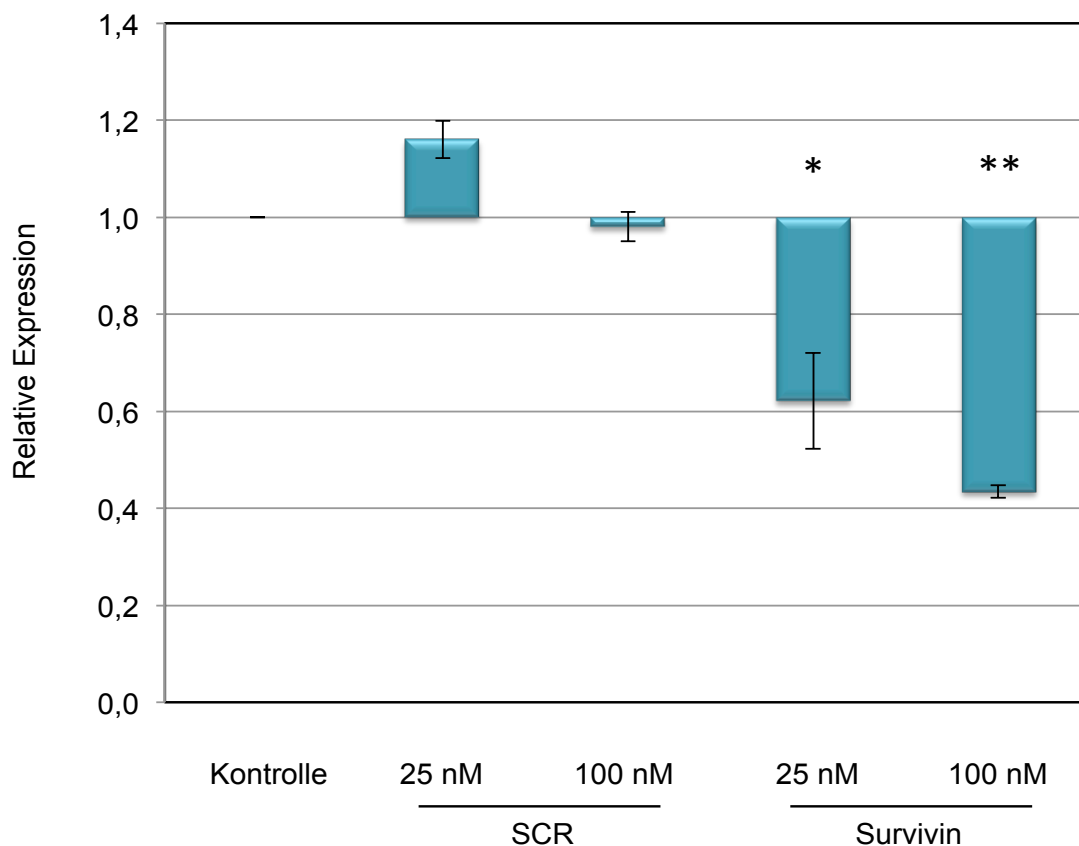


**Abbildung 18: Relative Genexpression nach Transfektion mit PSA-2-siRNA**

Die x-Achse zeigt die Transfektionsproben. Die y-Achse zeigt die relative Expression dieser Gene. Das Signifikanzniveau wurde auf den Wert  $p^* \leq 0,05$ , sowie  $p^{**} \leq 0,01$  gesetzt. Signifikante Änderungen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

Eine signifikant verminderte Genexpression konnte bei der Auswertung der siRNA gegen PSA-2 nicht gemessen werden. Die SCR-siRNA steigerte die Expression der mRNA bei 25 nM nicht signifikant um 13 %. Die funktionelle siRNA gegen PSA-2 erzielte keine signifikante Veränderung bei 25 nM und eine nicht signifikant erhöhte Expression um 14 % bei 100 nM (s. Abb. 18).

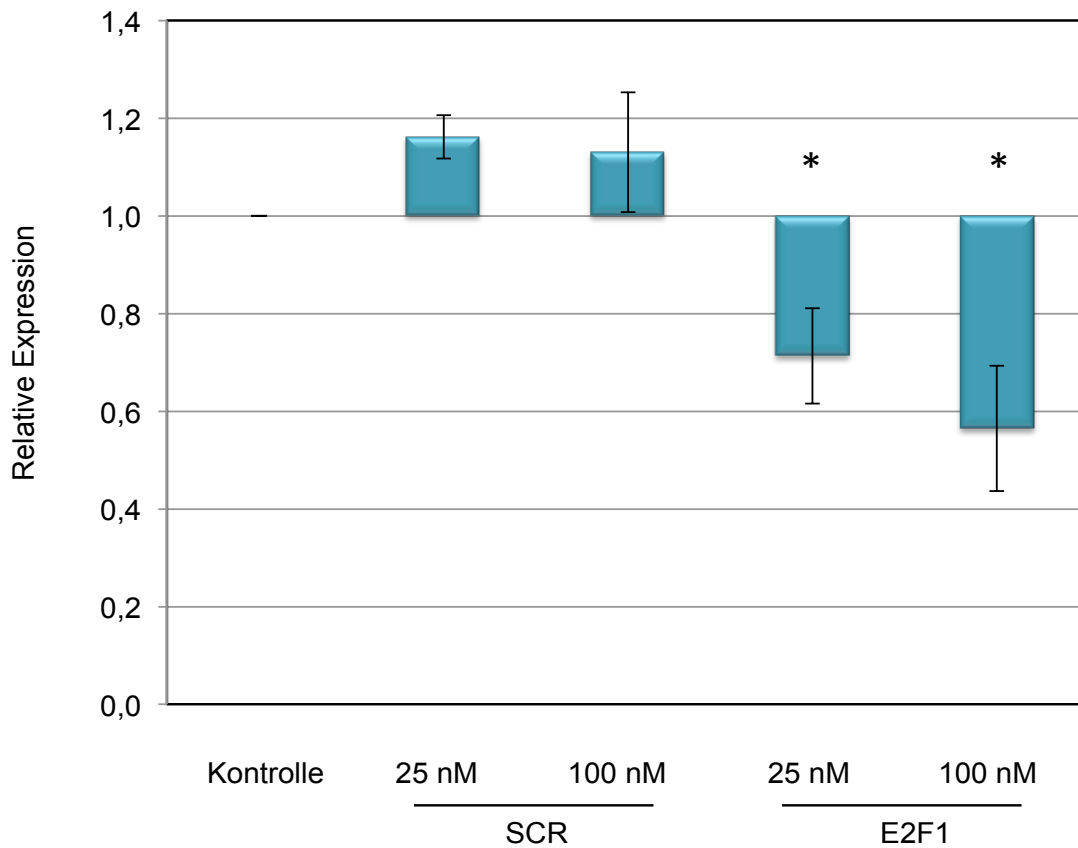
### 4.1.3 LnCAP



**Abbildung 19: Relative Genexpression nach Transfektion mit Survivin-siRNA**

Die x-Achse zeigt die Transfektionsproben. Die y-Achse zeigt die relative Expression dieser Gene. Das Signifikanzniveau wurde auf den Wert  $p^* \leq 0,05$ , sowie  $p^{**} \leq 0,01$  gesetzt. Signifikante Änderungen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

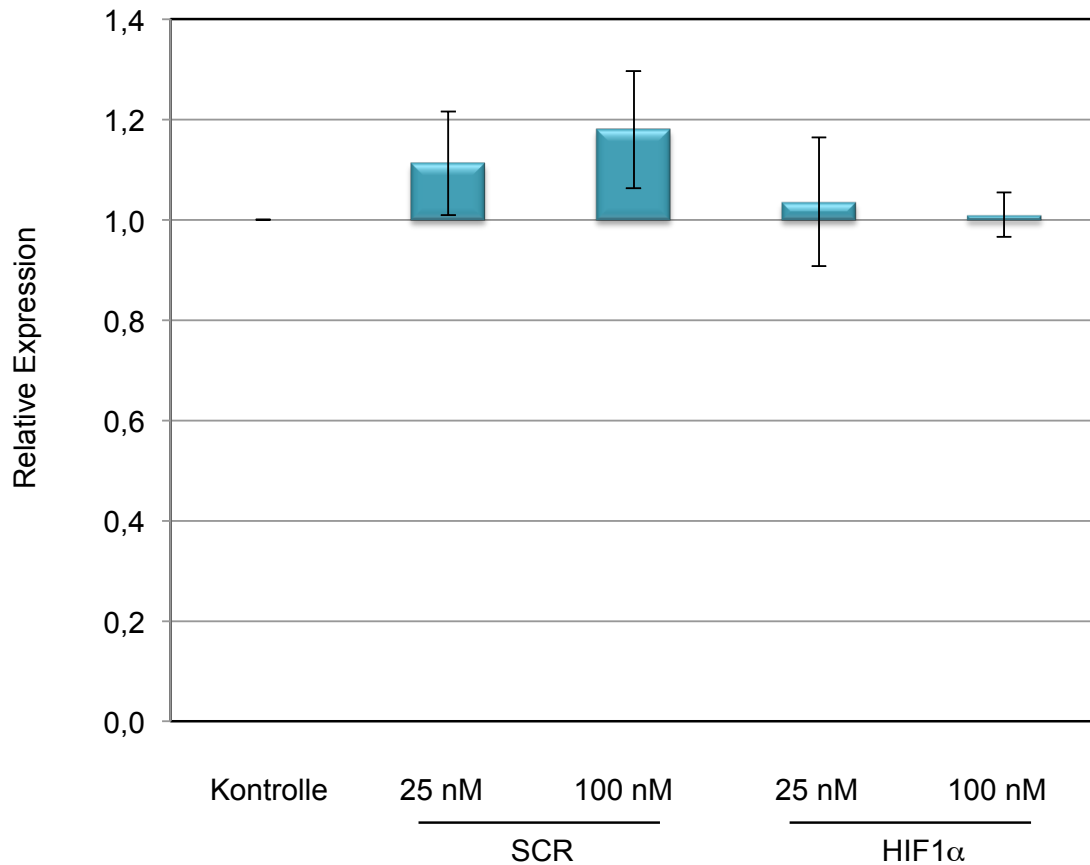
Die Auswertung der Genexpression der mRNA von Survivin nach Transfektion mit SCR-siRNA zeigt eine nicht signifikant erhöhte Expression um 16 % bei einer Konzentration von 25 nM und eine nicht signifikant verminderte Expression um 2 % bei 100 nM. Die Transfektion mit siRNA gegen Survivin erzielte eine signifikante Reduktion der Genexpression auf mRNA-Ebene um 38 % bei 25 nM und um 57 % bei 100 nM (s. Abb. 19).



**Abbildung 20: Relative Genexpression nach Transfektion mit E2F1-siRNA**

Die x-Achse zeigt die Transfektionsproben. Die y-Achse zeigt die relative Expression dieser Gene. Das Signifikanzniveau wurde auf den Wert  $p^* \leq 0,05$ , sowie  $p^{**} \leq 0,01$  gesetzt. Signifikante Änderungen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

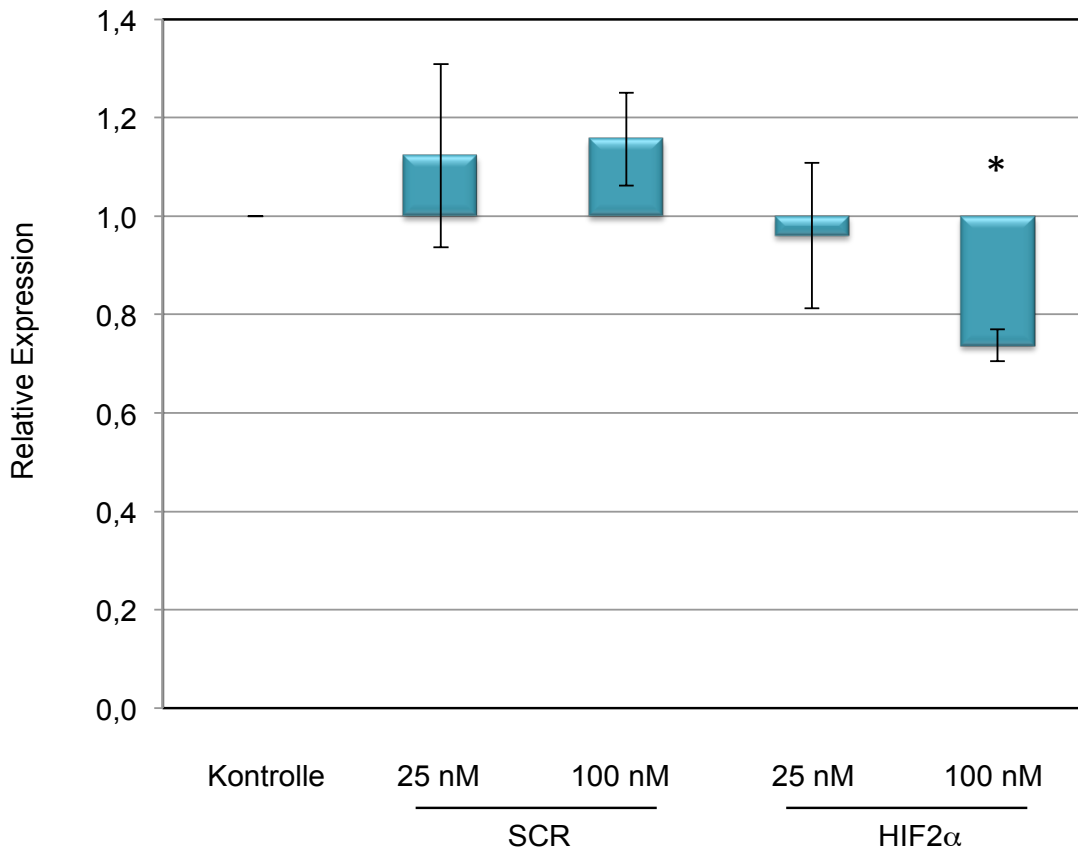
Die Untersuchung der Wirksamkeit der siRNA gegen E2F1 ergab eine signifikant verminderte Genexpression um 29 % und 44 % bei den Konzentrationen 25 nM und 100 nM. Die Transfektion mit SCR-siRNA steigerte die Expression nicht signifikant um 16 % bei einer Konzentration von 25 nM und um 13 % bei 100 nM (s. Abb. 20).



**Abbildung 21: Relative Genexpression nach Transfektion mit HIF1α-siRNA**

Die x-Achse zeigt die Transfektionsproben. Die y-Achse zeigt die relative Expression dieser Gene. Das Signifikanzniveau wurde auf den Wert  $p^* \leq 0,05$ , sowie  $p^{**} \leq 0,01$  gesetzt. Signifikante Änderungen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

Eine signifikante Veränderung der Genexpression bei der Untersuchung der mRNA von HIF1α wurde nicht festgestellt. Die nicht funktionelle SCR-siRNA beeinflusste die Genexpression nicht signifikant. Die Transfektion mit siRNA gegen HIF1α verursachte eine gesteigerte Expression um 4 % bei einer Konzentration von 25 nM und um 1 % bei einer Konzentration von 100 nM (s. Abb. 21).

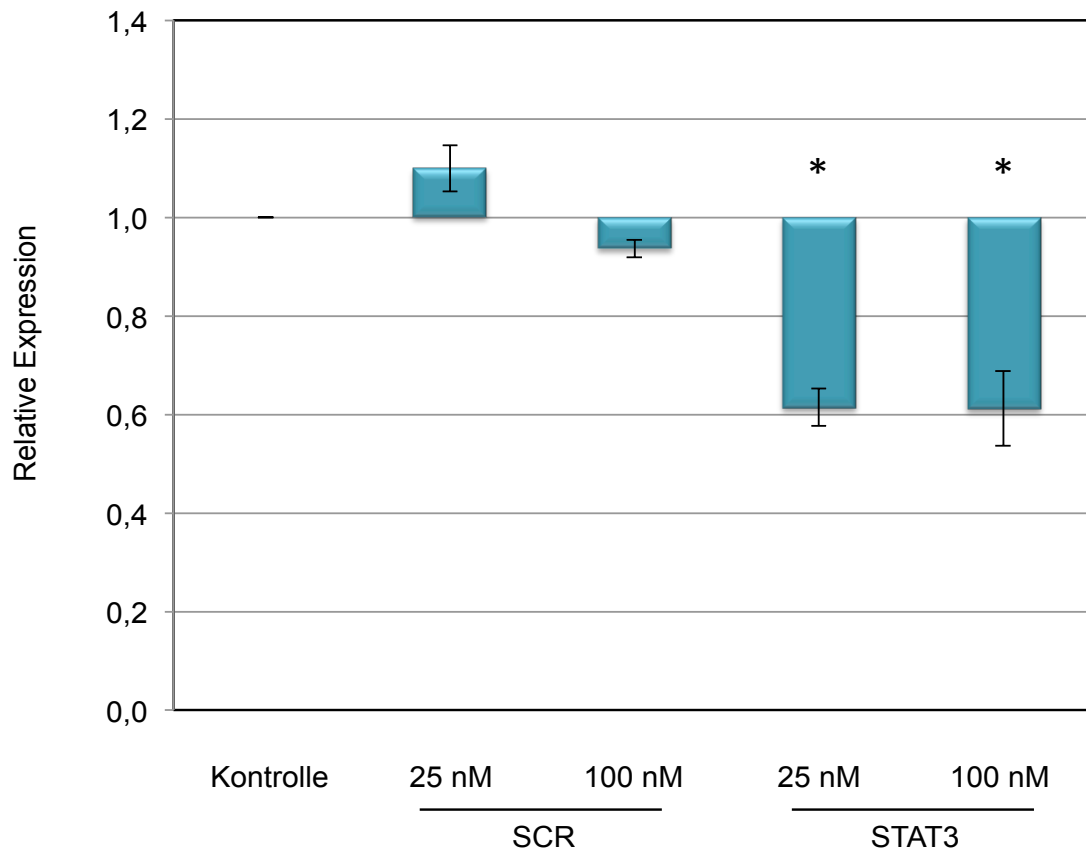


**Abbildung 22: Relative Genexpression nach Transfektion mit HIF2α-siRNA**

Die x-Achse zeigt die Transfektionsproben. Die y-Achse zeigt die relative Expression dieser Gene. Das Signifikanzniveau wurde auf den Wert  $p^* \leq 0,05$ , sowie  $p^{**} \leq 0,01$  gesetzt. Signifikante Änderungen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

Der Effekt der SCR-siRNA auf die Genexpression der mRNA von HIF2α war eine nicht signifikante Steigerung bei den Konzentrationen 25 nM und 100 nM um 12 % und 16 %. Die Behandlung mit funktioneller siRNA gegen HIF2α bewirkte eine reduzierte Expression auf mRNA-Ebene von 4 % bei 25 nM und signifikant um 26 % bei 100 nM (s. Abb. 22).

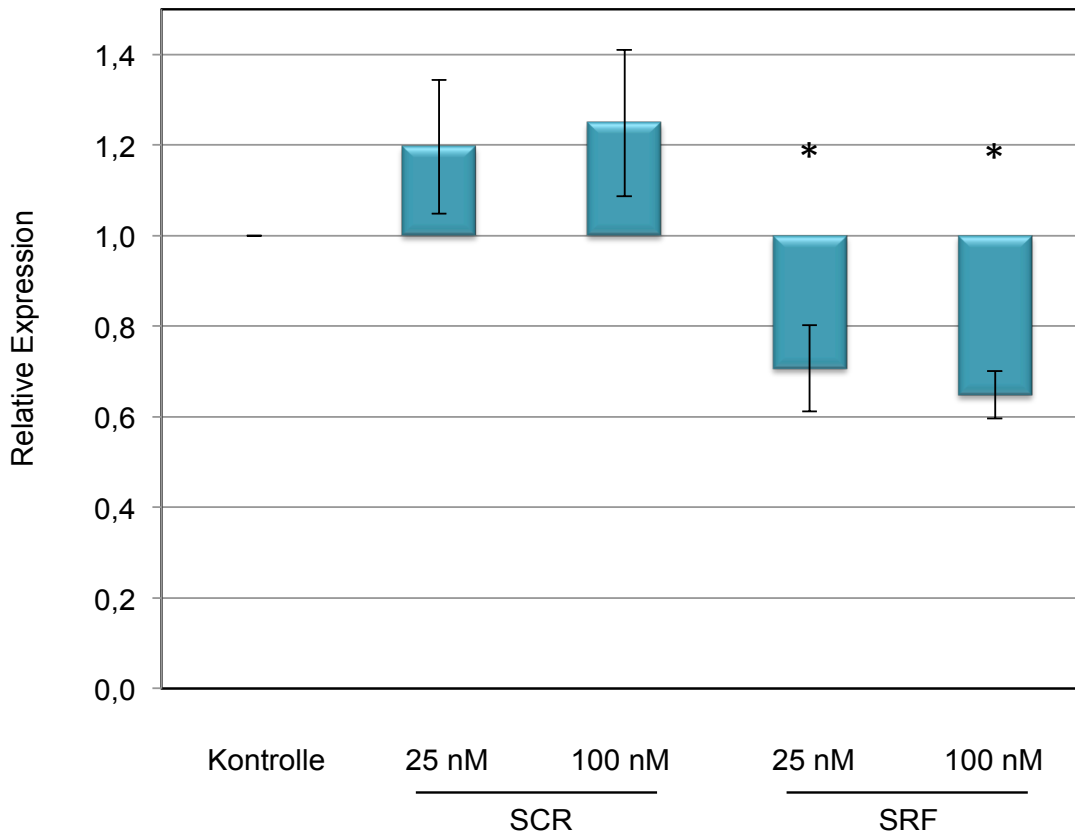




**Abbildung 23: Relative Genexpression nach Transfektion mit STAT3-siRNA**

Die x-Achse zeigt die Transfektionsproben. Die y-Achse zeigt die relative Expression dieser Gene. Das Signifikanzniveau wurde auf den Wert  $p^* \leq 0,05$ , sowie  $p^{**} \leq 0,01$  gesetzt. Signifikante Änderungen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

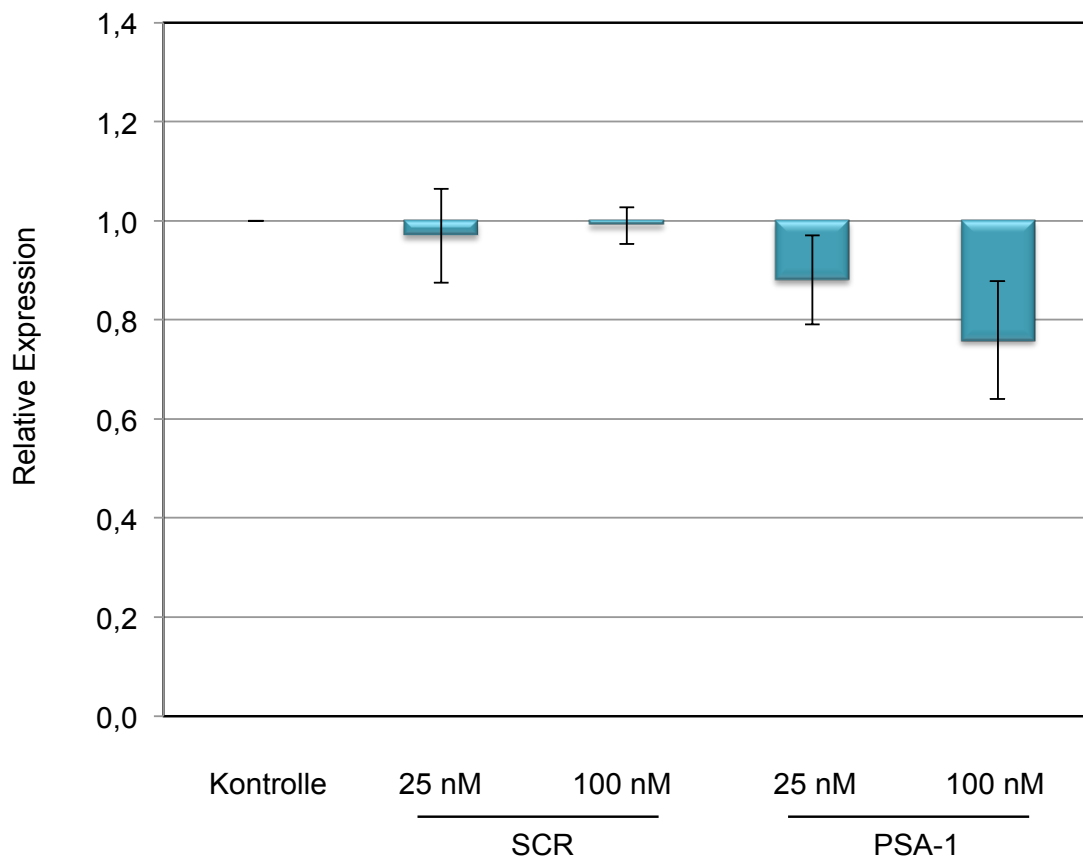
Aus der Untersuchung der Auswirkung nichtfunktioneller SCR-siRNA auf die Genexpression der mRNA von STAT3 geht hervor, dass die Genexpression nicht signifikant verändert wird. Die funktionelle siRNA gegen STAT3 erreichte eine signifikante Reduktion der Genexpression der mRNA von STAT3 um 39 % bei den Konzentrationen von 25 nM und 100 nM (s. Abb. 23).



**Abbildung 24: Relative Genexpression nach Transfektion mit SRF-siRNA**

Die x-Achse zeigt die Transfektionsproben. Die y-Achse zeigt die relative Expression dieser Gene. Das Signifikanzniveau wurde auf den Wert  $p^* \leq 0,05$ , sowie  $p^{**} \leq 0,01$  gesetzt. Signifikante Änderungen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

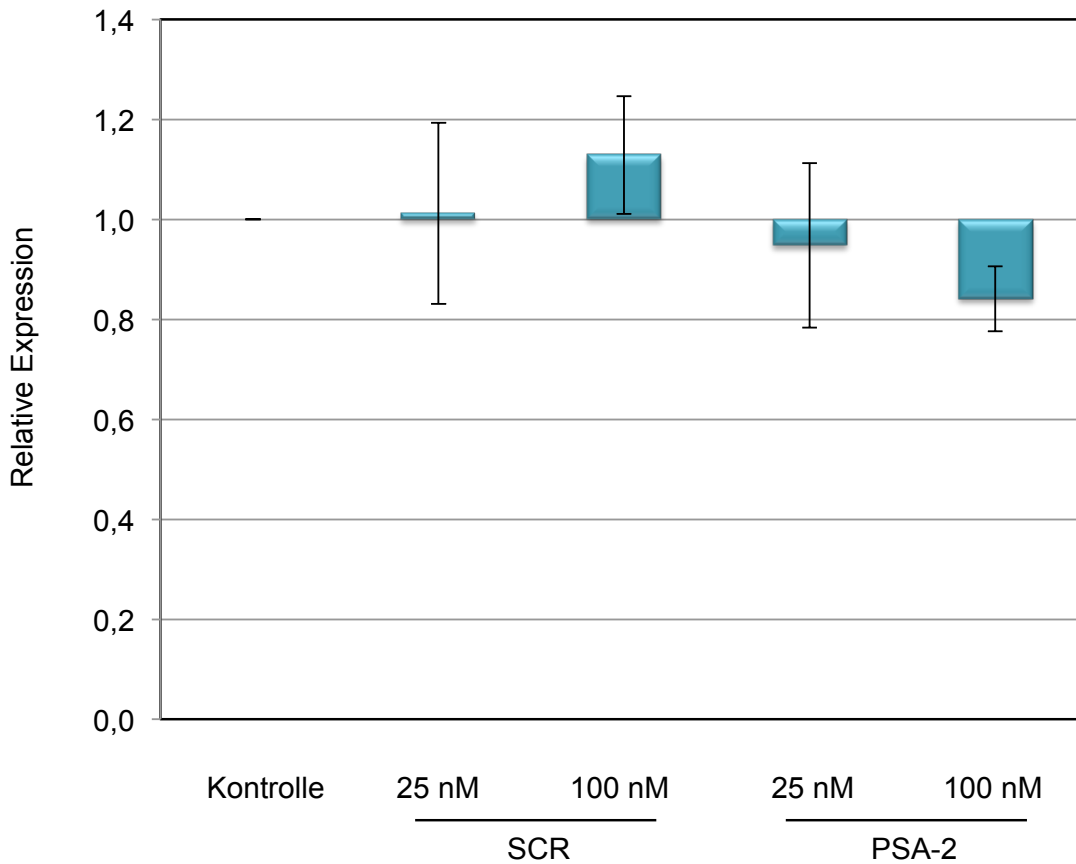
Bei der Auswertung der Genexpression auf mRNA-Ebene von SRF ist zu sehen, dass die SCR-siRNA eine nicht signifikante Erhöhung der Genexpression um 20 % bzw. 25 % bei 25 nM und 100 nM bewirkte. Die Expression von SRF durch SRF-siRNA verminderte sich signifikant bei einer Konzentration von 25 nM um 29 % und um 35 % bei einer Konzentration von 100 nM (s. Abb. 24).



**Abbildung 25: Relative Genexpression nach Transfektion mit PSA-1-siRNA**

Die x-Achse zeigt die Transfektionsproben. Die y-Achse zeigt die relative Expression dieser Gene. Das Signifikanzniveau wurde auf den Wert  $p^* \leq 0,05$ , sowie  $p^{**} \leq 0,01$  gesetzt. Signifikante Änderungen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

Eine signifikant verminderte Genexpression konnte bei der Auswertung der siRNA gegen PSA-1 nicht gemessen werden. Die SCR-siRNA reduzierte die Expression der mRNA nicht signifikant. Die funktionelle siRNA gegen PSA-1 erzielte eine Reduktion um 12 % bei 25 nM und eine um 24 % bei 100 nM (s. Abb. 25).



**Abbildung 26: Relative Genexpression nach Transfektion mit PSA-2-siRNA**

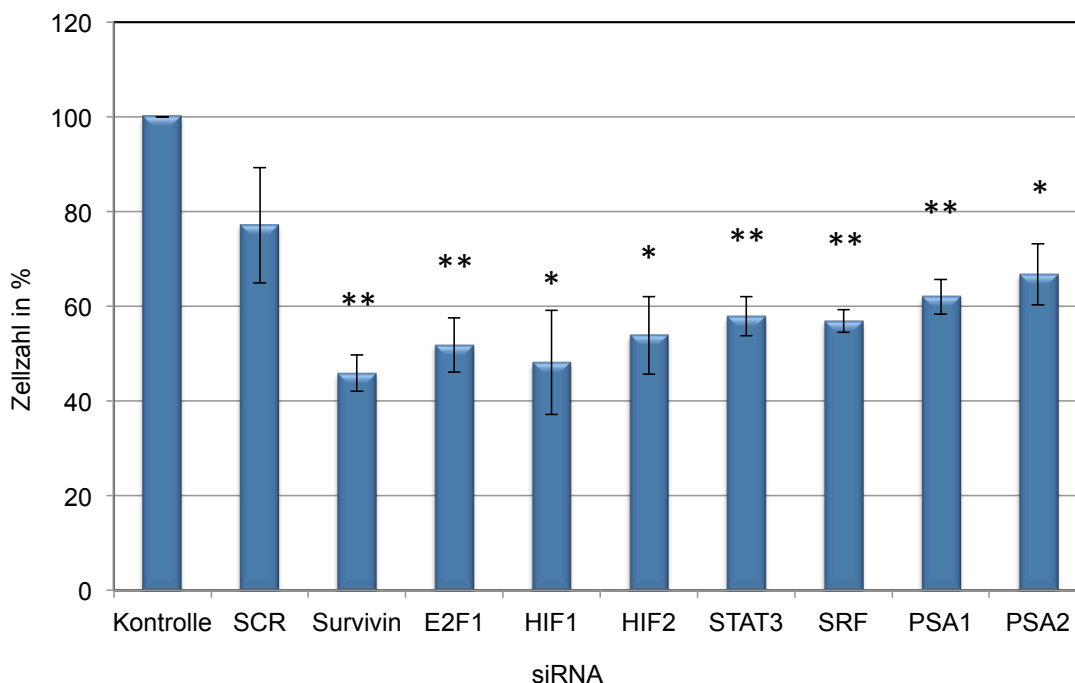
Die x-Achse zeigt die Transfektionsproben. Die y-Achse zeigt die relative Expression dieser Gene. Das Signifikanzniveau wurde auf den Wert  $p^* \leq 0,05$ , sowie  $p^{**} \leq 0,01$  gesetzt. Signifikante Änderungen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

Die Auswertung der Genexpression der mRNA von PSA-2 zeigte keine signifikanten Veränderungen nach der Transfektion mit funktioneller siRNA gegen PSA-2. Die Expression steigerte sich um 1 % bei einer Konzentration von 25 nM und um 13 % bei einer Konzentration von 100 nM. Die Transfektion mit nicht funktioneller SCR-siRNA reduzierte die Genexpression der mRNA von PSA-2 nicht signifikant um 5 % und 16 % bei 25 nM und 100 nM (s. Abb. 26).

## **4.2 Ergebnisse der Zellzählung mittels CASY® nach der Transfektion**

Der CASY® Zellzähler ist ein modernes Verfahren zur Bestimmung der Zellzahl und Zellviabilität. Das Verfahren beruht auf einer Widerstandsmessung der Zellmembranen und einer Auswertung über Pulsflächenanalyse. Hier wurde es genutzt um den Effekt der siRNAs auf die Zellzahl zu untersuchen. Die Anzucht der Zellen erfolgte in 12-Well-Platten. Für die Transfektion wurden 50 nM siRNA verwendet. Die Untersuchung wurde 72 Stunden später durchgeführt.

#### 4.2.1 PC-3



**Abbildung 27: Zellzahlen nach Transfektion der PC-3 Zelllinie**

Dargestellt sind die Zellzahlen in % nach der Transfektion mit Survivin-, E2F1-, HIF1 $\alpha$ -, HIF2 $\alpha$ -, STAT3-, SRF-, PSA-1 und PSA-2-siRNA. Die x-Achse zeigt die siRNAs mit der die Zellen transfiziert wurden. Die y-Achse zeigt die Zellzahl der transfizierten Zellen in Prozent, im Verhältnis zu den unbehandelten Zellen. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p^* \leq 0,05$  und  $p^{**} \leq 0,01$  festgelegt. Der Stern kennzeichnet Ergebnisse, welche sich signifikant von der Zellzahl der unbehandelten Kontrolle unterscheiden.





Die Zellzahlen der mit funktioneller siRNA transfizierten Zellen nahmen im Vergleich zu unbehandelten Zellen und der mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen signifikant ab. Nach der Transfektion mit SCR-siRNA konnten im Vergleich zur Kontrolle noch knapp 80 % vitale Zellen gezählt werden. Die Transfektion der siRNAs gegen STAT3, SRF, PSA-1 und PSA-2 erzielte eine signifikante Reduktion der vitalen Zellen von jeweils 42 % bis 32 %. Nach der Transfektion mit siRNA gegen Survivin, E2F1, HIF1 $\alpha$  und HIF2 $\alpha$  konnte sogar eine Reduktion der Zellzahl noch 45 % - 54 % gezeigt werden, wobei die

## Ergebnisse

---

Transfektion von Survivin-siRNA den größten signifikanten Einfluss auf die Viabilität der Zellen zeigte (s. Abb. 27).

In der Auswertung der Zellzahlen nach der Transfektion mit siRNA-Mixen konnte eine konstante und zumeist signifikante Reduktion der Zellzahlen, im Vergleich zur Kontrolle und zur Kontroll-siRNA gemessen werden. Es wurden immer je zwei siRNAs im Verhältnis 1:1 kombiniert. In der Tabelle sind die Zellzahlen in % nach Transfektion der siRNA-Mixe (siRNA1: 25 nM, siRNA2: 25 nM) dargestellt. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p^* \leq 0,05$  = signifikant,  $p^{**} \leq 0,01$  = sehr signifikant und  $p^{***} < 0,001$  hoch signifikant festgelegt. Die Zellzahlreduktion ist wie folgt unterschiedlich gekennzeichnet:

 0 % - 30 % Zellzahlreduktion	 30 % - 40 % Zellzahlreduktion
 40 % - 50 % Zellzahlreduktion	 Über 50 % Zellzahlreduktion

**Tabelle 9: Zellzahlen nach Transfektion der PC-3 Zelllinie**

	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung in %	t-Test
SCR	95 $\pm$ 4	Nicht signifikant
Survivin/E2F1	36 $\pm$ 4	**
Survivin/HIF1 $\alpha$	42 $\pm$ 7	**
Survivin/HIF2 $\alpha$	44 $\pm$ 6	**
Survivin/STAT3	51 $\pm$ 10	*
Survivin/SRF	44 $\pm$ 6	**
Survivin/PSA-1	37 $\pm$ 2	***
Survivin/PSA-2	51 $\pm$ 3	**

**Tabelle 9: Zellzahlen nach Transfektion der PC-3 Zelllinie (Fortsetzung)**

E2F1/HIF1 $\alpha$	58 $\pm$ 3	**
E2F1/HIF2 $\alpha$	34 $\pm$ 9	**
E2F1/STAT3	48 $\pm$ 7	**
E2F1/SRF	41 $\pm$ 7	**
E2F1/PSA-1	51 $\pm$ 7	**
E2F1/PSA-2	47 $\pm$ 13	*
HIF1 $\alpha$ /HIF2 $\alpha$	49 $\pm$ 8	**
HIF1 $\alpha$ /STAT3	47 $\pm$ 13	*
HIF1 $\alpha$ /SRF	40 $\pm$ 3	***
HIF1 $\alpha$ /PSA-1	38 $\pm$ 9	**
HIF1 $\alpha$ /PSA-2	50 $\pm$ 3	**
HIF2 $\alpha$ /STAT3	45 $\pm$ 7	**
HIF2 $\alpha$ /SRF	43 $\pm$ 12	*
HIF2 $\alpha$ /PSA-1	49 $\pm$ 8	**
HIF2 $\alpha$ /PSA-2	39 $\pm$ 10	**
STAT3/SRF	57 $\pm$ 15	*
STAT3/PSA-1	52 $\pm$ 6	**
STAT3/PSA-2	48 $\pm$ 8	**
SRF/PSA-1	37 $\pm$ 10	**
SRF/PSA-2	43 $\pm$ 3	**
PSA-1/PSA-2	48 $\pm$ 6	**

Die Kombinationen der siRNAs gegen Survivin mit HIF1 $\alpha$ , HIF2 $\alpha$  oder SRF konnten die Zellzahl signifikant auf 42 % - 45 % reduzieren. Die beste, signifikante Wirksamkeit mit nur noch 36 % vitalen Zellen im Vergleich zur Kontrolle zeigten die Kombinationen von Survivin mit E2F1 oder PSA-1. Die



Mixe aus siRNA gegen Survivin mit STAT3 oder PSA-2 erzielten eine signifikante Halbierung der Zellzahl.

Eine signifikante Senkung der vitalen Zellen auf 41 % - 51 % im Vergleich zur Kontrolle, konnte durch E2F1-siRNA in Kombination mit SRF, PSA-1, PSA-2 oder STAT3 erreicht werden. Der Mix aus siRNA gegen E2F1 mit HIF1 $\alpha$  erzielte signifikant weniger überlebende Zellen von 42 %. Die Kombinationen aus E2F1-siRNA mit HIF2 $\alpha$  oder Survivin ergaben eine 65%ige, signifikante Reduktion.

HIF1 $\alpha$ -siRNA erwirkte zusammen mit SRF-, Survivin-, PSA-1-, STAT3-, HIF2 $\alpha$ - oder PSA-2-siRNA eine signifikante Minderung der Zellzahl um 51 % - 62 % im Vergleich zur Kontrolle, mit der siRNA gegen E2F1 konnten noch 57 % vitale Zellen detektiert werden.

Die Kombinationen der siRNAs gegen HIF2 $\alpha$  mit Survivin, STAT3, PSA-2, SRF, PSA-1 oder HIF2 $\alpha$  verringerte die Zahl der vitalen Zellen signifikant auf 39 % - 49 %, während mit E2F1 noch 33 % im Vergleich zur Kontrolle erzielt werden konnten.

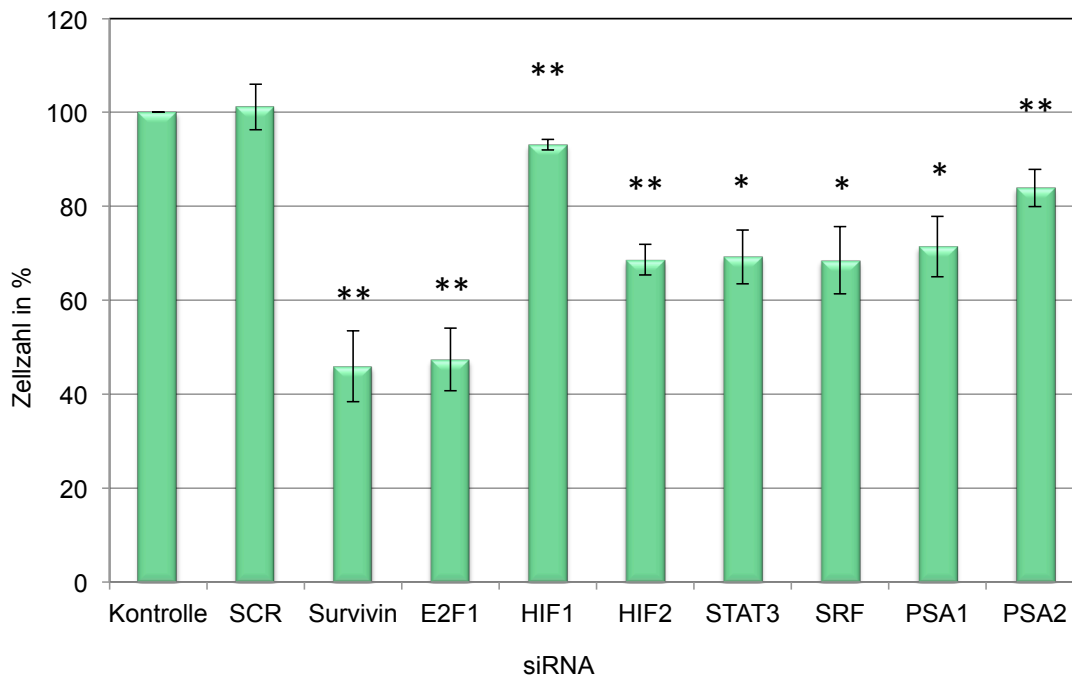
SiRNA-Kombinationen gegen STAT3 mit Survivin, HIF1 $\alpha$ , HIF2 $\alpha$ , STAT3, PSA-1 oder PSA-2 erreichten eine signifikante Zellzahlreduktion auf 45 % - 51 %, 57 % wurde zusammen mit SRF-siRNA erzielt.

Durch den Mix aus siRNA gegen SRF mit Survivin, E2F1, HIF1 $\alpha$ , HIF2 $\alpha$ , PSA-1 oder PSA-2 überlebten 37 % - 46 % der Zellen, im Vergleich zur Kontrolle. Die Kombination von SRF-siRNA mit STAT3 reduzierte die Zahl der vitalen Zellen signifikant um 33 %.

PSA-1-siRNA konnte gemeinsam mit E2F1-, HIF1 $\alpha$ -, HIF2 $\alpha$ -, STAT3-, SRF- oder PSA-2-siRNA die Zahl der lebenden Zellen signifikant halbieren, mit Survivin-oder SRF-siRNA überlebten 37 %.

PSA-2-siRNA erzielte in der Kombination mit STAT3, E2F1, PSA-1, HIF1 $\alpha$  oder Survivin eine Verminderung der Zellzahl um 46 % bis 51 % im Vergleich zur Kontrolle. Die Transfektion der PSA-2-siRNA mit HIF2 $\alpha$  bzw. SRF-siRNA reduzierte die Zellzahlen signifikant auf 39 % bzw. 43 %.

#### 4.2.2 DU-145



**Abbildung 28: Zellzahlen nach Transfektion der DU-145 Zelllinie**

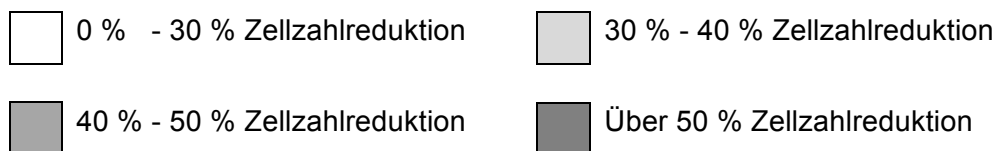
Dargestellt sind die Zellzahlen in % nach der Transfektion mit Survivin-, E2F1-, HIF1 $\alpha$ -, HIF2 $\alpha$ -, STAT3-, SRF-, PSA-1 und PSA-2-siRNA. Die x-Achse zeigt die siRNAs mit der die Zellen transfiziert wurden. Die y-Achse zeigt die Zellzahl der transfizierten Zellen in Prozent, im Verhältnis zu den unbehandelten Zellen. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p^* \leq 0,05$  und  $p^{**} \leq 0,01$  festgelegt. Der Stern kennzeichnet Ergebnisse, welche sich signifikant von der Zellzahl der unbehandelten Kontrolle unterscheiden.

Bei der Auswertung der Zellzählung mit dem CASY® Cellcounter wurde deutlich, dass die Transfektion mit funktioneller siRNA eine meist signifikante Reduktion der überlebenden Zellen im Vergleich zur Kontrolle, bestehend aus nicht transfizierten Zellen und zu den mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen, ergab. Die nichtfunktionelle SCR-siRNA hatte keinen Einfluss auf die vitalen Zellen. Die siRNA gegen Survivin und E2F1 zeigten eine signifikante Reduktion der Zellzahl auf 46 %. HIF2 $\alpha$ -, STAT3-, und SRF- siRNA erzielten einen

## Ergebnisse

signifikanten Knockdown von 31 %. HIF1 $\alpha$  und PSA-2 reduzierten die Zellzahl signifikant um 7 % bzw. 17 % (s. Abb. 28).

In der Auswertung der Zellzahlen nach der Transfektion mit siRNA-Mixen konnte eine konstante und zumeist signifikante Reduktion der Zellzahlen, im Vergleich zur Kontrolle und zur Kontroll-siRNA gemessen werden. Es wurden immer je zwei siRNAs im Verhältnis 1:1 kombiniert. In der Tabelle sind die Zellzahlen in % nach Transfektion der siRNA-Mixe (siRNA1: 25 nM, siRNA2: 25 nM) dargestellt. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p^* \leq 0,05$  = signifikant,  $p^{**} \leq 0,01$  = sehr signifikant und  $p^{***} < 0,001$  hoch signifikant festgelegt. Die Zellzahlreduktion ist wie folgt unterschiedlich gekennzeichnet:



**Tabelle 10: Zellzahlen nach Transfektion der DU-145 Zelllinie**

	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung in %	t-Test
SCR	93 $\pm$ 6	Nicht signifikant
Survivin/E2F1	43 $\pm$ 9	**
Survivin/HIF1 $\alpha$	72 $\pm$ 4	**
Survivin/HIF2 $\alpha$	69 $\pm$ 6	*
Survivin/STAT3	67 $\pm$ 5	**
Survivin/SRF	72 $\pm$ 5	*
Survivin/PSA-1	63 $\pm$ 4	**
Survivin/PSA-2	67 $\pm$ 6	**
E2F1/HIF1 $\alpha$	68 $\pm$ 2	*

**Tabelle 10: Zellzahlen nach Transfektion der DU-145 Zelllinie (Fortsetzung)**

E2F1/HIF2 $\alpha$	69 $\pm$ 5	**
E2F1/STAT3	68 $\pm$ 4	**
E2F1/SRF	45 $\pm$ 13	*
E2F1/PSA-1	76 $\pm$ 7	*
E2F1/PSA-2	75 $\pm$ 3	**
HIF1 $\alpha$ /HIF2 $\alpha$	61 $\pm$ 3	**
HIF1 $\alpha$ /STAT3	67 $\pm$ 7	*
HIF1 $\alpha$ /SRF	63 $\pm$ 8	*
HIF1 $\alpha$ /PSA-1	67 $\pm$ 11	*
HIF1 $\alpha$ /PSA-2	64 $\pm$ 3	**
HIF2 $\alpha$ /STAT3	71 $\pm$ 6	*
HIF2 $\alpha$ /SRF	78 $\pm$ 7	*
HIF2 $\alpha$ /PSA-1	76 $\pm$ 4	**
HIF2 $\alpha$ /PSA-2	76 $\pm$ 3	**
STAT3/SRF	62 $\pm$ 5	**
STAT3/PSA-1	72 $\pm$ 7	*
STAT3/PSA-2	69 $\pm$ 8	*
SRF/PSA-1	58 $\pm$ 7	**
SRF/PSA-2	72 $\pm$ 2	**
PSA-1/PSA-2	67 $\pm$ 7	*

Durch Transfektion mit siRNA-Kombinationen gegen Survivin mit PSA-1, PSA-2, STAT3, HIF2 $\alpha$ , SRF oder HIF1 $\alpha$  verblieben noch 62 % - 72 % signifikant vitale Zellen, während mit E2F1-siRNA die Zahl der überlebenden Zellen signifikant auf knapp 43 % reduziert werden konnte.

E2F1-siRNA reduzierte signifikant gemeinsam mit STAT3, HIF1 $\alpha$ , HIF2 $\alpha$ ,

PSA-2 oder PSA-1 die Zellzahl um 23 % - 32 %. Die Kombinationen aus E2F1 mit Survivin- oder SRF-siRNA erreichten die signifikante Verringerung der Zellzahl auf 43 % bzw. 60 %.

Die Transfektion der siRNA gegen HIF1 $\alpha$  erwirkte zusammen mit HIF2 $\alpha$ -, SRF-, PSA-2-, STAT3-, PSA-1-, E2F1- oder Survivin-siRNA eine signifikante Minderung der Zellzahl um 32 % - 39 % im Vergleich zur Kontrolle, mit der siRNA gegen HIF2 $\alpha$  konnte die Anzahl vitaler Zellen auf 61 % vitale Zellen signifikant reduziert werden.

Die Kombinationen der siRNAs gegen HIF2 $\alpha$  mit Survivin, E2F1, STAT3, PSA-2, PSA-1 oder SRF verringerte die Zahl der vitalen Zellen signifikant auf 69 % - 76 %, während mit HIF1 $\alpha$  eine Reduktion auf 61 % im Vergleich zur Kontrolle erzielt werden konnten.

SiRNA-Kombinationen gegen STAT3 mit Survivin, E2F1, PSA-2, HIF2 $\alpha$  oder PSA-1 erreichten eine signifikante Zellzahlreduktion um 28 % - 33 %, zusammen mit SRF-siRNA wurde die Zellzahl signifikant um 38 % im Vergleich zur Kontrolle reduziert.

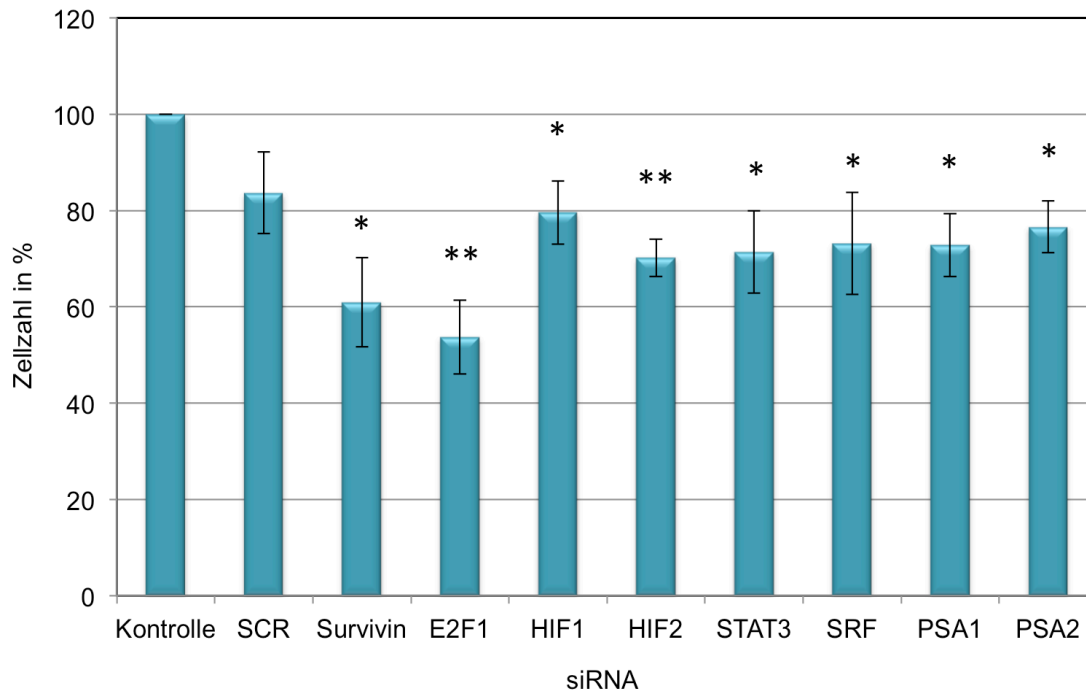
Nach Transfektion der DU-145 Zellen mit einem Mix aus SRF-siRNA mit PSA-2-, Survivin- oder HIF2 $\alpha$ -siRNA konnten noch 72 % und 76 % vitale Zellen gezählt werden. Eine signifikante 38%ige Reduktion erreichten die Kombinationen der siRNAs gegen SRF und HIF1 $\alpha$  oder STAT3. Eine Reduktion der Viabilität von 41 % konnte durch die Mixe von SRF-siRNA mit E2F1 und PSA-1 erzielt werden.

PSA-1-siRNA konnte gemeinsam mit Survivin-, HIF1 $\alpha$ -, STAT3- oder PSA-2-siRNA die Zahl der lebenden Zellen signifikant auf 62 % - 72 % reduzieren. Eine signifikante Reduktion um ein Drittel wurde mit siRNA gegen PSA-1 und E2F1 oder HIF2 $\alpha$  erreicht, nach Transfektion mit SRF-siRNA lag die Zellzahl bei 58 % im Vergleich zur Kontrolle.

In Kombination mit Survivin-, PSA-1-, STAT3-, SRF-, HIF2 $\alpha$ - oder E2F1-siRNA konnte PSA-2-siRNA die vitalen Zellen im Vergleich zur Kontrolle signifikant um 33 % - 27 % verringert werden. Nach der Transfektion einer

siRNA-Kombination gegen PSA-2 mit HIF1 $\alpha$  konnte eine signifikante Reduktion der Zellzahl auf 64 % gezeigt werden.

### 4.2.3 LnCAP



**Abbildung 29: Zellzahlen nach Transfektion der LnCAP-Zelllinie**

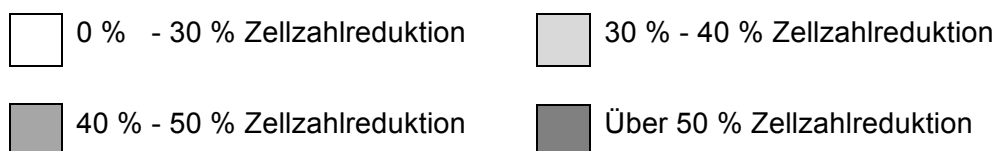
Dargestellt sind die Zellzahlen in % nach der Transfektion mit Survivin-, E2F1-, HIF1 $\alpha$ -, HIF2 $\alpha$ -, STAT3-, SRF-, PSA-1 und PSA-2-siRNA. Die x-Achse zeigt die siRNAs mit der die Zellen transfiziert wurden. Die y-Achse zeigt die Zellzahl der transfizierten Zellen in Prozent, im Verhältnis zu den unbehandelten Zellen. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p^* \leq 0,05$  und  $p^{**} \leq 0,01$  festgelegt. Der Stern kennzeichnet Ergebnisse, welche sich signifikant von der Zellzahl der unbehandelten Kontrolle unterscheiden.

Die Zellzahl der mit funktioneller siRNA transfizierten Zellen wurde im Vergleich zur Kontrolle und zur Kontroll-siRNA signifikant reduziert. Die Transfektion der Kontroll-siRNA führte zu einer nicht-signifikanten Reduktion um 16 %. HIF2 $\alpha$ , STAT3, PSA-1, SRF erreichten eine signifikante Zellzahlminderung um knapp

## Ergebnisse

30 %, PSA-2 und HIF1 $\alpha$  um 23 % bzw. 20 %. Die Transfektion der Zellen mit E2F1 halbierte die Zahl der überlebenden Zellen signifikant (s. Abb. 29).

Die Transfektion der LnCAP mit siRNA-Kombinationen führte ebenfalls zu unterschiedlich starker, signifikanter Reduktion der überlebenden Zellen. Es wurden immer je zwei siRNAs im Verhältnis 1:1 kombiniert. In der Tabelle sind die Zellzahlen in % nach Transfektion der siRNA-Mixe (siRNA1: 25 nM, siRNA2: 25 nM) dargestellt. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p^* \leq 0,05$  = signifikant,  $p^{**} \leq 0,01$  = sehr signifikant und  $p^{***} < 0,001$  hoch signifikant festgelegt. Die Zellzahlreduktion ist wie folgt unterschiedlich gekennzeichnet:



**Tabelle 11: Zellzahlen nach Transfektion der LnCAP-Zelllinien**

	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung in %	t-Test
SCR	90 $\pm$ 8	Nicht signifikant
Survivin/E2F1	51 $\pm$ 1	***
Survivin/HIF1 $\alpha$	58 $\pm$ 5	**
Survivin/HIF2 $\alpha$	65 $\pm$ 5	**
Survivin/STAT3	65 $\pm$ 5	**
Survivin/SRF	66 $\pm$ 6	**
Survivin/PSA-1	65 $\pm$ 3	**
Survivin/PSA-2	62 $\pm$ 6	**
E2F1/HIF1 $\alpha$	57 $\pm$ 3	*

**Tabelle 11: Zellzahlen nach Transfektion der LnCAP-Zelllinie (Fortsetzung)**

E2F1/HIF2 $\alpha$	72 $\pm$ 6	*
E2F1/STAT3	62 $\pm$ 9	**
E2F1/SRF	46 $\pm$ 5	**
E2F1/PSA-1	49 $\pm$ 2	***
E2F1/PSA-2	57 $\pm$ 7	*
HIF1 $\alpha$ /HIF2 $\alpha$	69 $\pm$ 2	**
HIF1 $\alpha$ /STAT3	65 $\pm$ 8	*
HIF1 $\alpha$ /SRF	84 $\pm$ 4	*
HIF1 $\alpha$ /PSA-1	71 $\pm$ 4	**
HIF1 $\alpha$ /PSA-2	69 $\pm$ 6	*
HIF2 $\alpha$ /STAT3	64 $\pm$ 9	*
HIF2 $\alpha$ /SRF	74 $\pm$ 5	*
HIF2 $\alpha$ /PSA-1	63 $\pm$ 7	*
HIF2 $\alpha$ /PSA-2	61 $\pm$ 14	*
STAT3/SRF	61 $\pm$ 0	***
STAT3/PSA-1	65 $\pm$ 7	*
STAT3/PSA-2	60 $\pm$ 2	**
SRF/PSA-1	74 $\pm$ 4	**
SRF/PSA-2	77 $\pm$ 2	**
PSA-1/PSA-2	57 $\pm$ 16	*

Die Mixe aus siRNA gegen Survivin und HIF1 $\alpha$ , PSA-2, HIF2 $\alpha$ , PSA-1, STAT3 oder SRF erreichten eine signifikante Verringerung der vitalen Zellen auf 58 % - 65 %. Zu einer hochsignifikanten Halbierung der Zellzahl führte die Transfektion von Survivin-siRNA in Kombination mit E2F1-siRNA.

E2F1-siRNA erwirkte mit HIF2 $\alpha$  eine signifikante Verringerung der



Zellzahlen um 30 %, mit STAT3 um 38 % und HIF1 $\alpha$  oder PSA-2 um knapp 45 %. Die Transfektion aus den siRNA-Kombinationen gegen E2F1 mit Survivin, PSA-1 oder SRF führten zu einer signifikanten Reduktion der Zellzahlen von 46 % - 50 %.

Eine signifikante Senkung der vitalen Zellen auf 65 % - 72 % im Vergleich zur Kontrolle konnte durch HIF1 $\alpha$ -siRNA in Kombination mit STAT3, HIF2 $\alpha$ , PSA-2 oder SRF erzielt werden. Die Transfektion von HIF1 $\alpha$ - und SRF-siRNA zeigte eine signifikante Reduktion der Zellzahl um 16 %, die Reduktion betrug 42 % bzw. 45 % bei HIF1 $\alpha$  Kombination mit E2F1 oder Survivin.

Die siRNA-Kombinationen gegen HIF2 $\alpha$  mit PSA-2, E2F1, PSA-1, STAT3, Survivin, HIF1 $\alpha$  oder SRF reduzierten die Zellzahl signifikant auf 61 % - 70 % im Vergleich zur Kontrolle.

STAT3-siRNA erreichte in Kombination mit PSA-2-, SRF-, E2F1-, HIF2 $\alpha$ -, PSA-1, Survivin- oder HIF1 $\alpha$ -siRNA eine 40 % - 46 % signifikant weniger Zellen im Vergleich zur Kontrolle.

Die Transfektion der siRNAs gegen SRF mit PSA-1, HIF2 $\alpha$  oder PSA-2 reduzierten die Zellzahl signifikant um knapp 25 %, während die Kombination von SRF-siRNA mit STAT3- oder Survivin-siRNA zu einer signifikanten Reduktion von 35 % bzw. 40 % führte.

Der Mix aus SRF- mit HIF1 $\alpha$ -siRNA erreichte eine Reduktion um 16 % im Vergleich zur Kontrolle, eine signifikante 64%ige Reduktion auf noch 46 % Zellen wurde durch die Kombination von SRF mit E2F1 erreicht.

PSA-1-siRNA erzielte in Kombination mit PSA-2, HIF2 $\alpha$ , Survivin, STAT3 oder HIF1 $\alpha$  eine signifikante Verringerung der Zellzahl auf 57 % - 65 %, mit SRF um 28 % und mit E2F1-siRNA eine signifikante Halbierung der Zahl der Zellen im Vergleich zur Kontrolle.

Durch siRNA Mixe aus PSA-2 mit STAT3, HIF2 $\alpha$  oder Survivin wurden 40 % signifikant weniger Zellen gezählt. Die Kombination von PSA-2-siRNA mit SRF führte zu einer 23%igen oder HIF1 $\alpha$  zu 31%igen, signifikanten Reduktion

## Ergebnisse

---

der überlebenden Karzinomzellen. Mit E2F1- oder PSA-1-siRNA konnten noch knapp 57 % signifikant im Vergleich zur Kontrolle gezählt werden.

## 5 Diskussion

Das Prostatakarzinom ist die häufigste Tumorerkrankung des Mannes. Fast 40 % der Männer haben das Risiko im Laufe ihres Lebens eine bösartige Veränderung der Vorsteherdrüse zu entwickeln. Man geht sogar soweit zu behaupten, dass sich der Anteil der Prostatakreberkrankungen bis 2050 verdoppelt. Auch der Anteil der über 60-jährigen Patienten soll auf über ein Drittel ansteigen und sich damit ebenfalls duplizieren.<sup>125</sup> Ein Grund dafür sind die verbesserten Screening-Methoden. Dies führt zum einen dazu, dass Karzinome der Prostata früher erkannt werden und auch in früheren Stadien therapiert werden können, zum anderen aber auch zu einer möglichen Übertherapie. Die radikale Prostatektomie und die Radiotherapie, beide mit eventueller neo-/adjuvanter Androgendeprivation, sind die bisherigen Standardtherapien. Beide Behandlungsmöglichkeiten bergen die allgemeinen Risiken einer Operation und einer Bestrahlung und gehen mit Nebenwirkungen einher, welche die Lebensqualität der Patienten deutlich einschränken. Die unerwünschten, therapeutischen Folgen treten je nach Behandlung in unterschiedlicher Häufigkeit auf: Erektile Dysfunktion bis zu 86 %, Dick- und Enddarmbeschwerden bis zu 3 % und Störungen der Kontinenz und Harnblasenfunktion bis zu 35 %. Genaue Angaben über die Wahrscheinlichkeit, welcher Patient welche erwünschten und unerwünschten Therapiefolgen zu erwarten hat, ist aufgrund der schwierig zu vergleichenden Studienlage bisher nur eingeschränkt möglich.<sup>126</sup> Es ist daher bei der Therapieplanung des Prostatakarzinoms, wie auch bei anderen Erkrankungen, sehr wichtig Schaden gegen Nutzen der Behandlung für jeden Patienten individuell abzuwägen. Eine besondere Herausforderung stellen dabei vor allem bereits therapierte oder ältere Patienten mit Komorbiditäten dar. Beim Fortschreiten der Erkrankung kommt es im Laufe der Zeit zu Harnabflussstörungen durch Strikturen der Urethra, wie bei der häufigen, gutartigen Prostatahyperplasie (BPH). Zur Beseitigung der auftretenden

Harnröhrenstrikturen wurden prostatistische Stents entwickelt, welche in weniger als 15 min in Lokalanästhesie appliziert werden können.<sup>127</sup> Insbesondere die Verwendung des „thermo-expandable Stent“ zeigte Erfolge.<sup>128</sup> Auf diese Weise wird zwar die Durchlässigkeit der Harnröhre verbessert, jedoch keine Reduktion oder Hemmung der Proliferation der malignen Tumorzellen erreicht.

Um den bisher rein symptomatischen Effekt der Stents mit einem therapeutischen Ansatz zu kombinieren, wurde in dieser Arbeit die Wirkung der RNA-Interferenz auf drei Prostatakarzinomzelllinien untersucht. Die Beschichtung eines Stents oder Katheters mit siRNA könnte eine lokalisierte, minimal-invasive Therapiemöglichkeit mit weniger Nebenwirkungen und besserem Ansprechen auf die bisherigen Behandlungsmethoden bei adjuvanter Anwendung sein und wäre daher auch für multimorbide und palliativ behandelte Patienten interessant. Nach genetischer Untersuchung der Krebszellen könnte für jeden Patienten eine spezifische Beschichtung mit unterschiedlichen, potenten siRNAs gewählt werden. Unter Einbeziehung des Patienten und der behandelnden Ärzte wäre durch die RNA-Interferenz eine personalisierte Behandlung möglich.

Die RNA-Interferenz spielt seit ihrer Entdeckung eine große Rolle in der Aufklärung noch unbekannter Genfunktionen. Durch die stetige Gewinnung neuer Erkenntnisse und einem besseren Verständnis der RNAi-Mechanismen, können RNA-basierte Therapieoptionen in naher Zukunft eine gute alternative oder zusätzliche Behandlungsmöglichkeit bieten. Durch Bindung der siRNA an komplementäre mRNA und der darauffolgenden Spaltung kann theoretisch jede Genexpression ausgeschaltet werden. Die hierdurch erreichte Hemmung der Expression des kodierten Proteins, bietet viele Therapieansätze für unterschiedliche, vor allem virale und genetische, aber auch für Tumorerkrankungen. Bis heute gibt es über 30 klinische Versuchsreihen für 14 verschiedene Krankheiten, in denen 21 unterschiedliche siRNA-haltige Therapeutika getestet werden.<sup>129</sup> Dabei handelt es sich vor allem um die systemische Wirkung der siRNA sowie drug-targeted-delivery und nicht um lokalisiertes Gen-Silencing. Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass auch die

Anwendung von RNA-basierten Therapiemethoden ihre Schwierigkeiten birgt und deshalb noch weiter modifiziert werden muss, bevor sie einen festen Stellenwert in der Liste möglicher Behandlungsverfahren einnimmt. Ein Problem sind die sogenannten Off-target Effekte, die durch Stimulation des Immunsystems oder durch unerwünschte Interaktionen mit anderen, homologen RNA-Abschnitten zu Stande kommen. Durch chemische Modifikation, Addition synthetischer Dicer Substrate<sup>130</sup> oder dual-targeting siRNAs<sup>131</sup> konnten diese Nebeneffekte aber schon deutlich reduziert werden. Auch die entzündliche Immunantwort wurde auf diese Weise verringert und gleichzeitig die Halbwertszeit des verabreichten Materials durch erhöhte Stabilität auf Tage bis Wochen verlängert. Eine weitere Schwierigkeit ergibt sich aus der unbemerkten Induktion einer Interferon-Antwort, welche sich aber mit Hilfe der qRT-PCR nachweisen lässt und mit Hilfe von Nukleotidmodifikationen verhindern lässt. Das größte Hindernis stellte bis vor kurzem die effiziente und sichere Übermittlung der siRNA *in vivo* dar. Durch Weiterentwicklung und Verbesserung können die Methoden aber inzwischen auch hier Anwendung finden. Die Verabreichung der siRNA oder ihrer Vorstufe, der small hairpin RNA (shRNA), kann mit natürlich vorkommenden Viren oder Bakterien, sowie künstlich hergestellten Vektoren, wie Lipiden, Liganden, Nanopartikeln oder Polymeren erfolgen. Ihre Größe, Ladung, Hydrophobie und Pufferkapazität sind ausschlaggebende Parameter für den effizienten Transport und der funktionellen Wirksamkeit der siRNA.<sup>132</sup> Die Wahl der Methode ist abhängig von der Applikationsweise, der benötigten Therapielänge und dem Zielgewebe. Je nach Gewebe oder Tumor kann die Verabreichung mittlerweile über *ex vivo* modifizierte Zellen, die in den Patienten transfundiert werden, durch intravenöse Injektion oder direkt in das Zielgewebe erfolgen. Man will damit eine möglichst hohe Spezifität und Effektivität erreichen und die toxischen Nebenwirkungen auf ein Minimum reduzieren.<sup>133,134,135</sup> Die Erkenntnisse über den Mechanismus des Gen-Silencing durch RNA-Interferenz wurden in den wenigen Jahren seit seiner Entdeckung deutlich erweitert. Anfängliche Schwierigkeiten konnten durch Weiterentwicklung stetig beseitigt werden und somit kann die

RNA-basierte Therapie bald Einzug in den klinischen Alltag finden. Die bisherigen Studien befassen sich mit dem Einsatz von siRNAs in der Behandlung von proliferativen Augenerkrankungen, wie der feuchten Makuladegeneration<sup>136</sup>, der Infektion mit dem respiratory syncytial virus (RSV)<sup>137</sup> und anderen Viren<sup>138</sup>, sowie neurodegenerative Erkrankungen<sup>139</sup> und Krebs.<sup>140</sup>

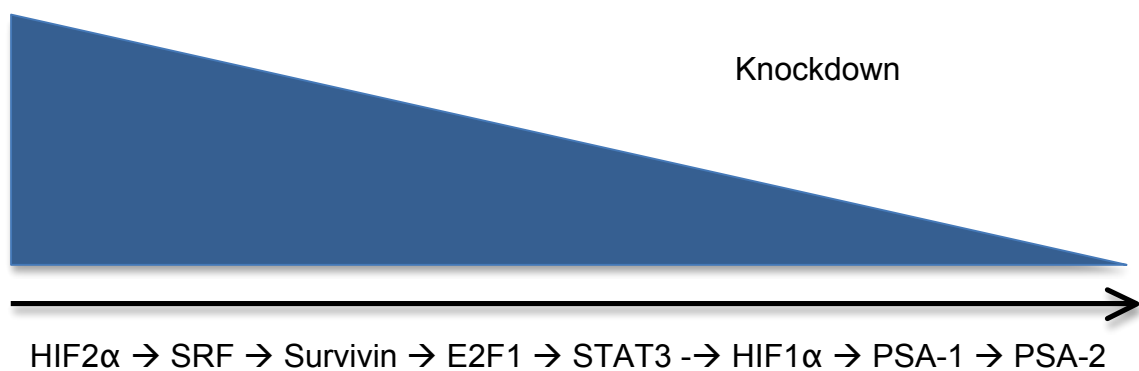
Um die Wirksamkeit der RNA-Interferenz auf Prostatakarzinomzellen zu untersuchen wurden in dieser Arbeit die drei Zelllinien PC-3, DU-145 und LnCAP mit jeweils acht siRNAs, zunächst einzeln und dann in Kombination transfiziert. Die Untersuchung der Genexpression auf mRNA-Ebene erfolgte mittels qRT-PCR. Die Auswirkung der Transfektion auf die Zellzahl wurde mit dem CASY® cell counter System analysiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte sowie mit nichtfunktioneller SCR-siRNA transfizierte Zellen.

## **5.1 Die Auswirkung der siRNAs auf die Genexpression**

Die Auswertung der Genexpression auf mRNA-Ebene nach Transfektion mit siRNAs gegen Survivin, E2F1, HIF1 $\alpha$ , HIF2 $\alpha$ , STAT3, SRF, PSA-1 und PSA-2 zeigte deutlich unterschiedliche Ergebnisse beim Vergleich der siRNAs untereinander und auch beim Vergleich der drei Zelllinien. Die Transfektion der SCR-siRNA diente als Kontrolle, um eine Aussage darüber machen zu können, ob ein Knockdown durch den Mechanismus der RNA-Interferenz stattfand oder durch die Transfektion selbst bedingt wurde. Eine signifikante Veränderung der Genexpression durch SCR-siRNA sollte daher nicht stattfinden, womit eine Schwankung der Genexpression um 20 % tolerierbar wäre.

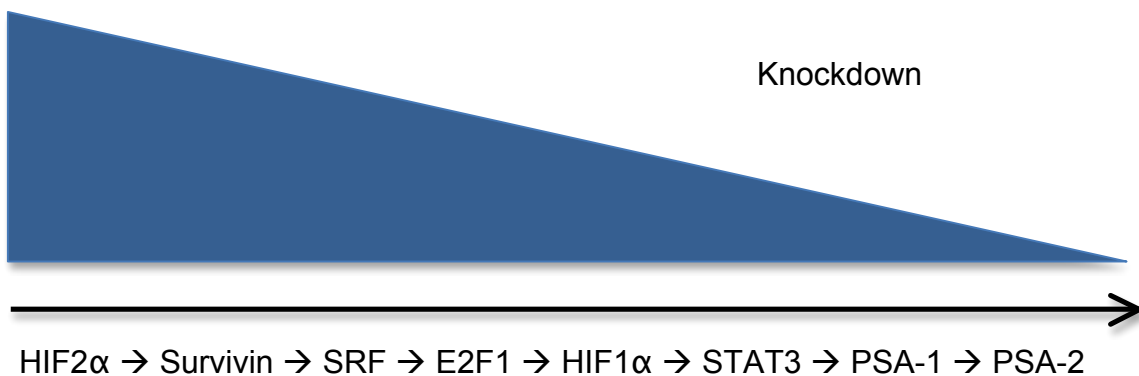
Von den drei untersuchten Zelllinien konnte durch Transfektion unterschiedlicher siRNAs mit den Zellen der PC-3-Linie der höchste Knockdown auf mRNA-Ebene erzielt werden. Die siRNAs gegen Survivin, E2F1, HIF1 $\alpha$ , HIF2 $\alpha$ , STAT3 und SRF erzielten mit einer Konzentration von 25 nM eine verminderte Genexpression von 10 % bis 60 %. Ein Knockdown um 46 % bis 81 % wurde mit 100 nM dieser

siRNA-Konzentration erreicht. Lediglich die Transfektion mit siRNA gegen PSA-1 und -2 zeigte keinen signifikanten Effekt auf die Genexpression. Den größten Knockdown bei beiden Konzentrationen erzeugte die siRNA gegen HIF2 $\alpha$ . Die Transfektion mit SCR-siRNA steigerte die Expression nicht signifikant.



**Abbildung 30: Potenz der siRNAs mit 25 nM in PC-3 Zellen**

Dargestellt ist der Einfluss von 25 nM konzentrierter siRNAs auf die mRNA Expression in PC-3 Zellen in absteigender Reihenfolge von links nach rechts.

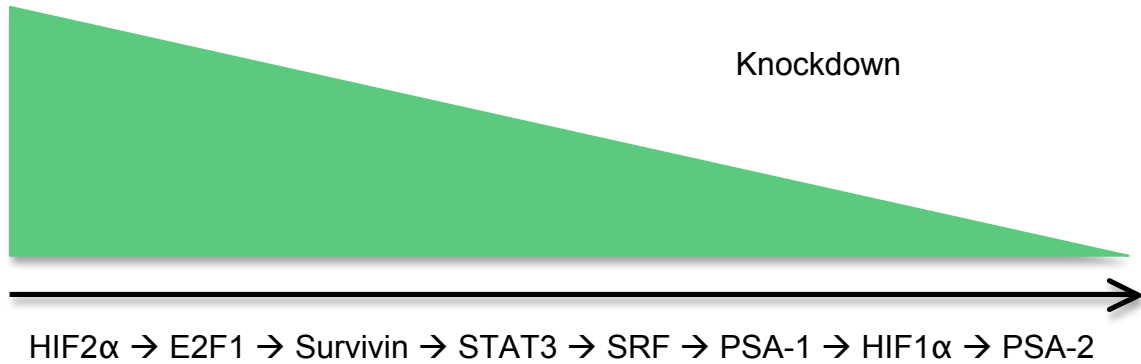


**Abbildung 31: Potenz der siRNAs mit 100 nM in PC-3 Zellen**

Dargestellt ist der Einfluss von 100 nM konzentrierter siRNAs auf die mRNA Expression in PC-3 Zellen in absteigender Reihenfolge von links nach rechts.

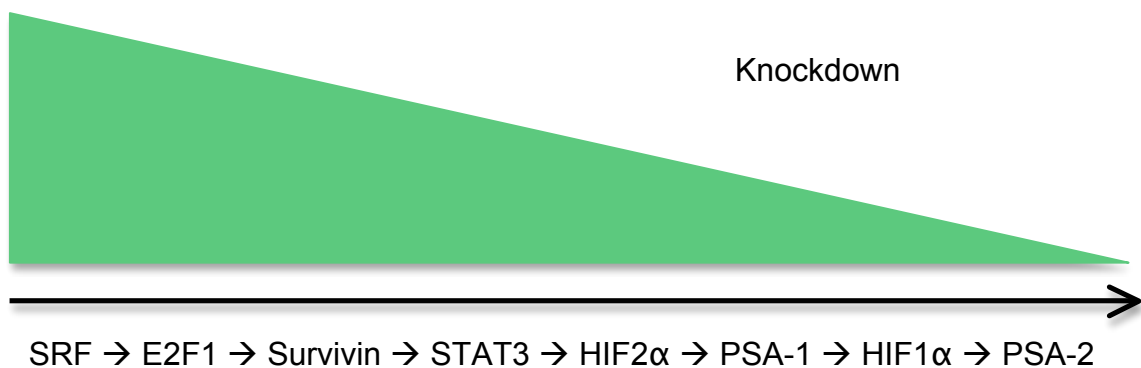
Die Auswertung der Genexpression machte deutlich, dass die siRNAs auch einen deutlichen Knockdown bei der Zelllinie DU-145 zeigen. Während die Transfektion mit siRNAs gegen Survivin, E2F1, HIF2 $\alpha$ , STAT3, SRF und PSA-1 bei einer Konzentration von 25 nM eine reduzierte Genexpression von 7 % bis 54 % bewirkte, konnten die HIF1 $\alpha$ - und PSA-2-siRNAs keine Veränderung erreichen. 100 nM konzentrierte siRNA verminderte die Expression der genannten Gene um 47 % bis 72 %. HIF1 $\alpha$ -siRNA zeigte auch bei 100 nM keinen signifikante Reduktion, PSA-2-siRNA bewirkte eine nicht signifikante Steigerung der Expression um 14 %. Aber auch die SCR-siRNA steigerte mit einer Konzentration von 25 nM die PSA-2-Expression um 13 %. Bei den siRNAs gegen HIF2 $\alpha$  und STAT3 wurden zwischen den einzelnen Konzentrationen nur minimale Unterschiede gefunden, was daran liegen könnte, dass eine Sättigung der siRNAs im Zytosol der Zellen bereits bei 25 nM erreicht sein könnte. Ähnliche Ergebnisse konnten auch bei der Studie von Nolte et al. gezeigt werden, die nach Transfektion mit Lipofectamine2000 im Vergleich zu der Transfektion mit 10 nM keine weitere Veränderung der Genexpression erreichen konnten.<sup>141</sup> Den größten, signifikanten Effekt zeigte bei 25 nM die siRNA gegen HIF2 $\alpha$  mit einer Reduktion auf 46 % und bei 100 nM die siRNA gegen SRF mit einer Reduktion auf 28 % im Vergleich zur Kontrolle. Off-target Effekte der SCR-siRNA mit über 20 % veränderter Expression waren auch hier nicht zu finden. Nach Transfektion mit SCR-siRNA war keine signifikant veränderte Expression von STAT3 zu verzeichnen.





**Abbildung 32: Potenz der siRNAs mit 25 nM in DU-145 Zellen**

Dargestellt ist der Einfluss von 25 nM konzentrierter siRNAs auf die mRNA Expression in DU-145 Zellen in absteigender Reihenfolge von links nach rechts.

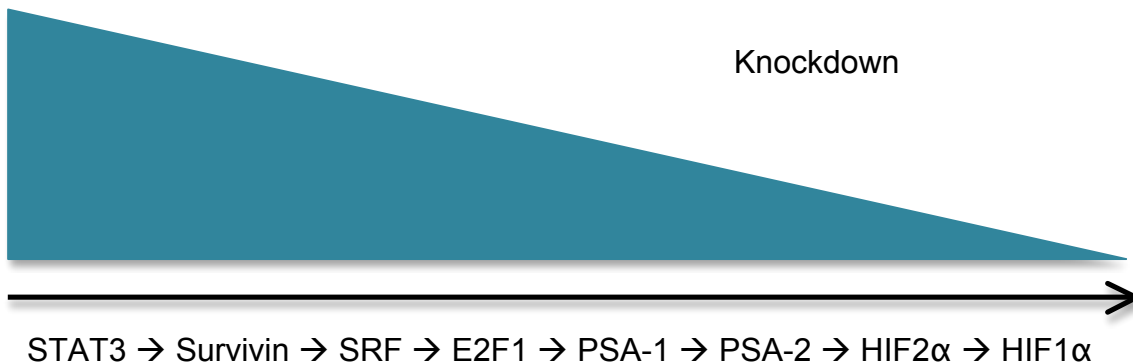


**Abbildung 33: Potenz der siRNAs mit 100 nM in DU-145 Zellen**

Dargestellt ist der Einfluss von 100 nM konzentrierter siRNAs auf die mRNA Expression in DU-145 Zellen in absteigender Reihenfolge von links nach rechts.

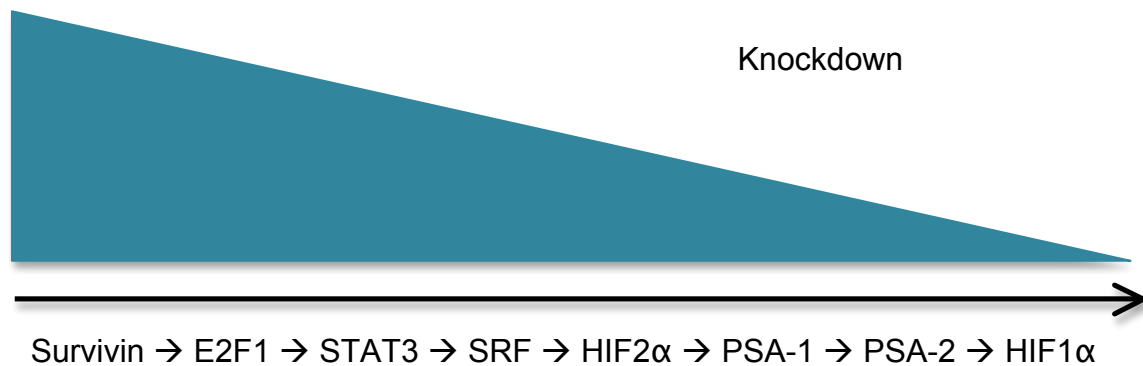
Die Transfektion mit funktionellen siRNAs hatte bei der LnCAP Zelllinie im Vergleich zu DU-145 oder PC-3 den geringsten Effekt auf die Genexpression. Ein Grund dafür, könnte möglicherweise die erschwerte Transfektion von Suspensionszellen im Vergleich zu adhärenenten Zellen, wie PC-3 und DU-145, im Allgemeinen sein.<sup>142</sup> Um die Transfektionseffizienz zu erhöhen, wurden schon einige Methoden, wie die Beschichtung der Kulturplatten mit Kollagen, erprobt.

Eine neue Möglichkeit besteht darin, die Kulturplatten mit Hühnereiweiß zu beschichten, was dazu führt, dass die Suspensionszellen auf dem Boden der Platte gehalten werden und der Transfektionskomplex auf diese Weise besser in die Zelle gelangen kann.<sup>143</sup> Diese Vorgehensweise bietet eine Option, um zu untersuchen, ob die in unseren Versuchen erreichte signifikante Reduktion der Genexpression noch weiter reduziert werden kann. Die beste siRNA, die siRNA gegen STAT3, zeigte einen Knockdown von 39 %, die schlechteste siRNA die noch einen Einfluss auf die Genexpression hatte, die siRNA gegen HIF2 $\alpha$ , einen Knockdown von 4 %. Die Transfektion von 100 nM dieser siRNAs erzielte eine Reduktion der Genexpression um 16 % bis 57 %. Die siRNA gegen HIF1 $\alpha$  zeigte bei beiden Konzentrationen keine Wirkung. Bei der Transfektion von 25 nM und 100 nM der siRNA gegen STAT3 liegt die Genexpression gleichbleibend bei 61 % im Vergleich zur Kontrolle. Die siRNAs gegen STAT3 und Survivin zeigte den größten Effekt bei einer Konzentration von 25 nM. Die Genexpression reduzierte sich um knapp 40 %. Survivin-siRNA erreichte mit 100 nM eine 57 % signifikante Verminderung. Die Expression der zu untersuchenden Gene war durch die Transfektion der SCR-siRNA nicht signifikant beeinträchtigt.



**Abbildung 34: Potenz der siRNAs mit 25 nM in LnCAP Zellen**

Dargestellt ist der Einfluss von 25 nM konzentrierter siRNAs auf die mRNA Expression in LnCAP Zellen in absteigender Reihenfolge von links nach rechts.



**Abbildung 35: Potenz der siRNAs mit 100 nM in LnCAP Zellen**

Dargestellt ist der Einfluss von 100 nM konzentrierter siRNAs auf die mRNA Expression in LnCAP Zellen in absteigender Reihenfolge von links nach rechts.

## 5.2 Die Auswirkung der siRNAs auf die Zellzahl

Um eine Aussage über die Wirkung der transfizierten siRNAs auf die Zellzahl machen zu können, wurde die lebenden Zellen 72 Stunden nach erfolgter Transfektion mit 50 nM konzentrierter siRNA mit dem CASY® cell counter system gezählt. Die Zellen wurden mit den siRNAs gegen Survivin, E2F1, HIF1 $\alpha$ , HIF2 $\alpha$ , STAT3, SRF, PSA-1 und PSA-2 zunächst einzeln und dann in Kombination im Verhältnis 1:1 mit 25 nM der siRNA 1 und 25 nM der siRNA 2 transfiziert, um den additiven Effekt zu untersuchen.

Die Zellzahlen der PC-3-Zelllinie nach Transfektion mit verschiedenen siRNAs nahmen im Vergleich zur Kontrolle deutlich und signifikant ab. Eine Halbierung der Zellzahl konnte mit den siRNAs gegen Survivin sowie HIF1 $\alpha$  erreicht werden. Eine Reduktion auf 52 % bis 58 % erzielte die Transfektion mit E2F1-, HIF2 $\alpha$ -, STAT3- und SRF-siRNA. Die siRNAs gegen PSA-1 und PSA-2 reduzierten die Zellzahl signifikant um 38 % bzw. 33 %. Einen größeren Einfluss auf die Vermehrung der Zellen zeigten die siRNA-Kombinationen. Am häufigsten wurde die Zellzahl im Vergleich zu der unbehandelten Zellen um knapp 50 % bis 60 %, also über die Hälfte reduziert. Lediglich die Kombinationen E2F1/HIF1 $\alpha$ ,

STAT3/SRF hatten mit noch 57 % bzw. 58 % verbliebenen Zellen eine Halbierung nicht erreichen können. Die besten Resultate konnten nach Transfektion der siRNA-Kombinationen gegen Survivin mit E2F1 oder PSA-1, PSA-1 außerdem mit HIF1 $\alpha$  oder SRF, E2F1 auch noch mit HIF2 $\alpha$ , sowie HIF2 $\alpha$  mit PSA-2 gemessen werden. Diese siRNAs reduzierten die Zellzahl signifikant um 61 % bis 76 %, wobei E2F1/HIF2 $\alpha$  das beste Ergebnis erzielen konnte. Durch die gleichzeitige Beeinflussung zweier Gene mittels siRNA, konnte die Wirkung der RNA-Interferenz auf die Zellzahl im Vergleich zur einfachen Transfektion nochmal verstärkt werden. Die Reduktion der Zellzahl konnte mit siRNAs gegen PSA-2/HIF2 $\alpha$  um 45 % mehr gesenkt werden, als nur mit PSA-2 alleine. HIF1 $\alpha$ /PSA-1-siRNA erreichten sogar 55 % mehr als nur HIF1 $\alpha$ -siRNA. Die anderen Ergebnisse zeigten ebenfalls bis zu 20 % zusätzliche Reduktion der Zellzahl im Vergleich zur alleinigen Anwendung und zur Kontrolle.

Die Zellzahl der DU-145-Zelllinie nahm im Vergleich zur Kontrolle nach Transfektion mit jeder der genannten siRNAs ab. HIF2 $\alpha$  und PSA-2 reduzierten die Zellzahl um 7 % und 16 %, HIF1 $\alpha$ , STAT3, SRF, PSA-1 um knapp 30 %. Etwas mehr als eine Halbierung der Zellzahl wurde durch siRNAs gegen Survivin und E2F1 erreicht. Die Auswertungen der mit siRNA-Kombinationen transfizierten Zellen zeigten ebenfalls eine signifikante Reduktion der Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle. Eine Verringerung der Zellzahl um 23 % bis 30 % erreichten die Kombinationen aus Survivin/HIF1 $\alpha$  bzw. SRF, E2F1/PSA-1 und PSA-2, HIF2 $\alpha$  gemeinsam mit STAT3, SRF, PSA-1 oder PSA-2, sowie SRF/PSA-2. Den größten Effekt von 57 % auf die Zellzahl zeigte die siRNA gegen Survivin zusammen mit E2F1. Alle bisher nicht genannten Kombinationen reduzierten die Vermehrung der Zellen um 30 % bis maximal 42 %. Die gemeinsame Anwendung zweier siRNAs hatte bei der DU-145-Zelllinie im Vergleich zur einfachen Transfektion nur bei einigen Kombinationen einen verbesserten Effekt. Der Mix aus Survivin und E2F1 zeigten die besten Resultate, dabei konnten jedoch bei alleiniger Transfektion schon eine 53%ige Verminderung der Zellzahl erreichen, 4 % weniger als sie zusammen erreichten. Einen größere additive Wirkung wurde

bei HIF1 $\alpha$ -siRNA und PSA-2-siRNA sichtbar, die in Kombination mit anderen siRNAs eine weitere 30%ige bzw. 20%ige Zellzahlreduktion erreichen konnten.

Die Zellzahlen der LnCAP-Zelllinie nahmen im Vergleich zur Kontrolle nach Transfektion mit jeder der genannten siRNAs signifikant ab. Die Untersuchung des Effekts der Transfektion auf die Zellzahl zeigte, wie auch bei der Genexpression, mit der LnCAP-Zelllinie die geringsten Effekte. Abnahmen der Zellzahlen von 20 % bis 30 % konnten nach der Transfektion mit siRNAs gegen HIF1 $\alpha$ , HIF2 $\alpha$ , STAT3, SRF, PSA-1 und PSA-2 gemessen werden. Eine Reduktion der Zellzahl um 39 % konnte durch Survivin-siRNA erreicht werden, 46 % durch E2F1-siRNA. Die Transfektion der siRNA-Kombinationen zeigten auch hier eine signifikante Reduktion der Zellzahl, im Vergleich zu den nichttransfizierten Zellen. Die gleichzeitige Nutzung zweier siRNAs erzielten, bei der LnCAP-Zelllinie zumeist eine verminderte Zellzahl um 30 % bis 40 %. Eine geringere Zellzahl um 23 % bis 29 % erzielten die Kombination der siRNAs gegen HIF2 $\alpha$  mit E2F1 oder SRF, SRF außerdem mit PSA-1 und PSA-2 und PSA-1 mit HIF1 $\alpha$ . Das geringste, gemeinsame Resultat brachten die HIF1 $\alpha$ /SRF-siRNAs mit 16 % signifikanter Minderung der Zellzahl. Die besten Ergebnisse von 42 % und 49 % konnten die Kombinationen aus Survivin-/E2F1- und Survivin-/HIF1 $\alpha$ -siRNA erreichen. Im Vergleich zur alleinigen Anwendung der siRNAs hatte die Transfektion der Kombinationen eine deutlich größere Wirkung auf die Zellzahl und erreichte eine weitere Reduktion um maximal 20 %.

### **5.3 Klinische Relevanz**

Trotz intensiver Forschung zur Bekämpfung von Tumorerkrankungen ist Krebs eine der häufigsten Todesursachen. Die Therapie fortgeschrittener Karzinome ist mit den Standardmethoden bisher eher eingeschränkt erfolgreich. Die Multimorbidität vieler Patienten spielt dabei ebenfalls eine Rolle. Seit der Entdeckung der RNA-Interferenz im Jahr 1990 hat sie einen wichtigen Stellenwert in der Grundlagenforschung erhalten und inzwischen sogar Einzug in die

klinische Anwendung genommen. Präklinische Untersuchungen haben die Effizienz, Spezifität, Sicherheit und antitumorale Aktivität unterschiedlicher siRNAs bereits belegt.<sup>144</sup> Durch Transfektion von Prostatakarzinomzellen mit verschiedenen siRNAs untersuchten wir deren Effekt auf die Genexpression und Zellzahl, um eine Aussage darüber machen zu können, ob die RNA-Interferenz auch eine neue, adjuvante Therapieoption für die häufige Tumorerkrankung der Vorsteherdrüse sein könnte.

Das prostataspezifische Antigen ist eine androgenabhängige Serinprotease, die heute als weit verbreiteter Biomarker zur Feststellung von Veränderungen der Prostata, wie dem Prostatakarzinom, dient. PSA dient auch zur Verlaufskontrolle von bereits therapierten Tumoren der Vorsteherdrüse. Die pathophysiologische Rolle des PSA konnte bisher nicht genau erklärt werden. Allerdings wurde nachgewiesen, dass in hormonrefraktären Prostatakarzinomen PSA an der Tumorprogression beteiligt ist. Durch eine Reduktion der PSA-Expression konnte in einer Studie eine erhöhte Apoptoserate und eine verminderten Zellproliferation erzielt werden. Die Entwicklung kleiner Moleküle oder siRNAs, die die Genexpression von PSA inhibieren, wird als mögliche Therapieoption des Prostatakarzinoms angeraten.<sup>145</sup> Der Versuch durch Transfektion mit zwei unterschiedlichen siRNAs gegen die beiden Transkriptionsvarianten PSA-1 und PSA-2 eine Reduktion der Genexpression und der Zellzahl zu erzielen, brachte mäßige Erfolge. Die Expression von PSA-1 führte bei einer Konzentration von 100 nM zu einer maximalen Verminderung von 36 %. Ähnliche Resultate fanden sich bei der Auswertung der Zellzahlen wieder. Die Transfektion von PSA-2-siRNA führte zu keiner Veränderung hinsichtlich der Expression. Die Zellzahl konnte um höchstens ein Drittel reduziert werden. Die Vermutung von Niu et al., dass ein Knockdown von PSA durch siRNA eine andere Möglichkeit sein könnte, Prostatakrebs zu therapieren<sup>146</sup>, konnte mit der in unseren Versuchen genutzten siRNAs gegen PSA-1 und PSA-2 nicht bestätigt werden.

Der Serum response factor gehört zu den Transkriptionsfaktoren der

MADS-Box-Familie. SRF wurde an über 50 Promotorregionen von Genen, die an der Zellproliferation, -differenzierung und Apoptose beteiligt sind identifiziert. Daher ist es nicht verwunderlich, dass auch der SRF eine Rolle in der Entwicklung verschiedener Tumore spielt und Ziel neuer Therapiemöglichkeiten sein könnte. Durch Inhibition der SRF-Expression konnte die Proliferation und Invasion der Krebszellen von Magen- und Plattenepithelkarzinom der Speiseröhre reduziert werden.<sup>147,148</sup> Auch wurde ein Einfluss von androgen-sensitivem SRF auf Gene, die die Wanderung der Prostatakrebszellen regulieren, festgestellt.<sup>149</sup> Ein Knockdown der Genexpression, wie es in unseren Versuchen gezeigt wurde, stellt einen guten Ansatz für die Nutzung der siRNA gegen SRF zur Therapie von Krebserkrankungen dar. Bei der DU-145-Zelllinie wurde sogar eine Reduktion der Expression um 72 % gemessen. Die Zellzahl wurde durch SRF-siRNA hingegen nicht so stark beeinflusst und erreichte Werte zwischen 73 % und 57 % verbleibenden Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Lediglich die Transfektion der siRNA-Kombinationen mit SRF-siRNA konnten die Zellzahl um über die Hälfte bei der PC-3-Zelllinie verringern. Die erreichte, geringfügig verringerte Expression von SRF scheint bei den Prostatakarzinomzellen keinen essentiellen Einfluss auf die Zellzahl zu haben.

Der Transkriptionsfaktor STAT3 kann sowohl als Onkogen, als auch als Tumorsuppressor wirken. Er ist bei 70 % der Krebserkrankungen dauerhaft exprimiert und aktiviert die Transkription von Genen die antiapoptotisch, zellproliferativ und angiogenetisch wirken. Die Forschung an Inhibitoren für STAT3 ist daher sehr wichtig. Die bisherigen Publikationen zeigten einige Therapieansätze, die auch schon *in vivo* ihre Wirksamkeit zeigten, wie Antisense-Strategien, Tyrosinkinase-Inhibitoren, Decoy Phosphopeptide, Decoy Duplex Oligonukleotide und G-quartet Oligodeoxynukleotide.<sup>150</sup> Auch konnte nachgewiesen werden, dass selbst wenn eine Hemmung von STAT3 keinen Zelltod induzieren konnte, die Therapieresistenz von Tumoren gegenüber anderen Medikamenten, wie Doxorubicin und EGFR-Inhibitoren, verringert wurde.<sup>151</sup> Bei der Untersuchung des Verhaltens von STAT3 in

Prostatakarzinomen konnte festgestellt werden, dass die Bildung von Metastasen begünstigt werden.<sup>152</sup> Durch Hemmung der STAT3 Aktivierung konnte das Zellwachstum und das Potential zur Invasion bereits reduziert werden.<sup>153</sup> Auch die Transfektion mit siRNA gegen STAT3 in unseren Versuchen zeigte, dass durch eine verminderte Genexpression die Zellzahl ebenfalls reduziert wird. Es konnten Ergebnisse von einer 30%igen bis zu einer 47%igen Reduktion der Expression auf mRNA-Ebene, sowie der Zellzahl erreicht werden. In Kombination mit siRNAs gegen Survivin, E2F1, HIF1 $\alpha$  oder SRF wurde eine Reduktion der Zellzahl bis 55 % erreicht. Da STAT3 nicht nur die Zellzahl sondern auch die Wirksamkeit einiger Therapieansätze beeinflusst lohnt es sich, die siRNA gegen den Transkriptionsfaktor also auch für die Prostatakarzinomtherapie näher zu analysieren.

Die Hypoxie-induzierten Transkriptionsfaktoren regulieren die Sauerstoffversorgung der Zelle. Durch Sauerstoffmangel aktivieren sie die Expression von Wachstumsfaktoren, wie VEGF, die in Tumorzellen eine hypoxie-induzierte Neoangiogenese ermöglichen. Erhöhte HIF-Werte wurden in vielen Tumoren, wie unter anderem in Hals- und Kopftumoren<sup>154</sup>, Gehirn-, Brusttumoren sowie in Ovarial-,<sup>155</sup> Prostata und Nierenzellkarzinomen gemessen. Sie stehen meist mit einer schlechten Prognose bei herkömmlichen Therapieansätzen in Zusammenhang.<sup>156</sup> Eine Hemmung der Expression von HIF könnte ein wichtiger Schritt zur Bekämpfung unterschiedlicher Krebserkrankungen sein und ist daher Bestandteil einiger Forschungen. Bisher konnten schon mehrere Inhibitoren für HIF gefunden werden, die allerdings eine geringe Spezifität aufweisen.<sup>157</sup> Eine erfolgreiche verminderte Zellproliferation durch einen Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitor wurde bei Kolonkarzinomzellen *in vitro* erzielt.<sup>158</sup> Da auch in Prostatakarzinomzellen eine erhöhte Expression von hypoxie-induzierten Faktoren gemessen wurde<sup>159</sup>, untersuchten wir die Wirkung der siRNA gegen HIF1 $\alpha$  und HIF2 $\alpha$  auf die Genexpression und Zellzahl. Hier wurden deutliche Unterschiede zwischen den Zelllinien sichtbar. Die Genexpression von HIF1 $\alpha$  in Zellen der PC-3-Linie konnte, ebenso wie die Zellzahl, um 50 % vermindert



werden, während sich bei LnCAP und DU-145 keine Veränderung der Expression und eine maximale Reduktion der Zellvermehrung um 20 % zeigten. HIF2 $\alpha$ -siRNA konnte bei der PC-3-Zelllinie die Genexpression um 81 % reduzieren. DU-145 und LnCAP verzeichneten eine Abnahme um 47 % bzw. 26 %. Die Zellzahl konnte bei allen drei Zelllinien mindestens um ein Drittel reduziert werden. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Suppression von HIF besonders bei der PC-3-Zelllinie eine Option bieten könnte das Wachstum von Prostatakarzinomzellen zu inhibieren und auch das Fortschreiten der Erkrankung aufzuhalten.

Eine wichtige Rolle des Transkriptionsfaktors E2F1, ist die Kontrolle des Zellzyklus und die Entscheidung über Progression oder Apoptose bei vorhandenen DNA-Schäden. Einen therapeutischen Effekt zeigte das Protein bereits bei der Behandlung des Pankreaskarzinoms. Durch die Kombination mit dem Chemotherapeutikum Gemcitabin, konnte trotz fehlendem p53 eine deutliche Apoptoseinduktion erreicht werden.<sup>160</sup> Allerdings wurde auch eine erhöhte E2F1-Expression bei einigen, meist höhergradigen oder metastasierten Krebserkrankungen festgestellt und mit Chemoresistenzen<sup>161</sup> in Zusammenhang gebracht. Durch Mutationen oder erhöhte Expression einiger Cofaktoren wie Retinoblastom (Rb), p53<sup>162</sup> und Microcephalin wird die Aktivität des Transkriptionsfaktors deutlich beeinflusst. Das gezielte Gen-Silencing bei Erkrankungen oder Therapien, durch die E2F1 eher eine prometastatische Funktion als eine proapoptotische einnimmt, kann den Therapieerfolg erhöhen.<sup>163</sup> Die Fähigkeit der siRNA die Genexpression von E2F1 auf mRNA-Ebene um beinahe zwei Drittel zu reduzieren, zeigt eine signifikante Wirkung auf die Anzahl der Prostatakrebszellen. Die Zellzahl konnte durch Transfektion mit siRNA gegen E2F1 beinahe halbiert werden und in Kombination sogar um 68 % verringert werden. Diese Ergebnisse machen deutlich, dass das Gen-Silencing von E2F1 eine weitere mögliche Option zur Behandlung des Prostatakarzinoms sein könnte. Besondere Anwendung könnte die siRNA bei der Therapie des metastasierten, hormonrefraktären Karzinoms sein. Hier konnte nachgewiesen

werden, dass E2F1 die Transkription des Androgenrezeptors hemmt, die Hormontherapie daher keinen Effekt haben kann, und E2F1 somit zur Progression der Erkrankung beiträgt.<sup>164</sup>

Survivin wird hauptsächlich in Krebszellen exprimiert und hat eine Bedeutung bei der Protektion, Apoptoseinhibition und Zyklusregulation einer Zelle. Survivin-Überexpression bei Patienten mit Tumorerkrankungen geht häufig einher mit einem Nichtansprechen von Chemo- und Radiotherapie sowie einer schlechten Prognose. Es wird daher als Biomarker und auch als Ziel neuer Therapieansätze diskutiert.<sup>165</sup> Es gibt bereits klinische Studien zur Behandlung einiger Krebserkrankungen, wie Melanome,<sup>166</sup> nicht kleinzellige Bronchialkarzinome (NSLC),<sup>167</sup> Lymphome<sup>168</sup> und auch das Prostatakarzinom<sup>169</sup>, die die Suppression von Survivin mit dem Bacillus YM155 und dessen Auswirkung *in vivo* testen. Aber auch andere kleine Moleküle, wie die siRNAs, können die Fähigkeit haben, die Genexpression von Survivin zu inhibieren. Eine Kombination von Zytostatika und dem Gen-Silencing von Survivin, zeigte bereits ein deutlich erhöhtes Ansprechen der Therapie bei NSLC,<sup>170</sup> akuter lymphatischer Leukämien,<sup>171</sup> Ovarial-,<sup>172</sup> Blasen-,<sup>173</sup> und kolorektalen Karzinomen.<sup>174</sup> Die Tatsache, dass eine signifikant erhöhte Expression des Apoptose-hemmenden Proteins Survivin in Prostatakarzinomzellen gefunden wurde<sup>175</sup> und durch die Transfektion der siRNA in unseren Versuchen eine Reduktion der Expression von bis zu zwei Dritteln erreichen konnte, sowie eine Reduktion der Zellzahl um bis zu 64 %, zeigt, dass die siRNA gegen Survivin ebenfalls eine erfolgsversprechende Therapiemöglichkeit des Prostatakarzinoms darstellen könnte.

## 5.4 Fazit und Ausblick

Die Transfektion der acht siRNAs führte bei den drei Zelllinien zu einer Reduktion der Genexpression und Zellzahl im unterschiedlichen Maße. Dabei konnten, vor allem bei der PC-3-Zelllinie, gute Ergebnisse erzielt werden. Die siRNAs gegen Survivin, E2F1, HIF1 $\alpha$  und HIF2 $\alpha$  zeigten dabei den größten Erfolg. Aber auch DU-145 und LnCAP reagierten sichtbar auf einige siRNAs, insbesondere auf Survivin und E2F1. Die Kombination zweier siRNAs konnte ihre Wirkung noch einmal deutlich steigern und eine additive hohe Zellzahlreduktion erzielen. Die Wirkung der siRNAs auf die Prostatakarzinomzellen zeigt, dass RNA-basierte Therapie eine gute neue Alternative oder eine adjuvante Option zu den bisherigen Behandlungsmethoden sein könnte. Besonders für die Anwendung bei älteren oder inoperablen Patienten, bei fortgeschrittener oder therapieresistenter Tumorerkrankung, könnte der Einsatz eines mit siRNA beschichteten Stents oder Katheters eine gute, lebensqualitätssteigernde, symptomatische und gleichzeitig therapeutische Maßnahme bieten. Auf die große Menge an Subtypen der Prostatatumoren wird durch die RNA-Interferenz besonders eingegangen. Dem Wunsch des Patienten und des Arztes nach personalisierter Medizin, kann durch die Anwendung verschiedener siRNAs in unterschiedlichen Konzentrationen eher entsprochen werden. Dabei sollte dem Patienten nach Diagnosestellung eine Biopsie zur Charakterisierung des Tumors entnommen werden. Mit Hilfe einer Datenbank sollen dann ganz bestimmte potente siRNAs für diesen Tumortyp verwendet werden.

Bevor die siRNA als Therapeutikum zur Behandlung des Prostatakarzinoms beim Menschen angewendet werden kann, müssen noch weitere Untersuchungen folgen. Zunächst sollte untersucht werden, ob durch die Transfektion lediglich das Wachstum der Zellen gehemmt wird oder auch eine Apoptoseinduktion erfolgt. Dies kann durch unterschiedliche Methoden

erfolgen: qRT-PCR mit Markern für Apoptose, z.B. Untersuchung der Caspasen-Expression, BrdU-Assay für den Zellzyklus-Arrest (Proliferation) und dem Galaktosidaseassay für die Seneszenz. Da die Genexpression nur auf mRNA-Ebene kontrolliert wurde, sollte durch Western-Blots auch eine Reduktion der Proteine gezeigt werden. Zuletzt müssen die beschichteten Stents in Tiere implantiert werden, um zu zeigen, dass die siRNA spezifisch in den Krebszellen wirkt und das gesunde Gewebe nicht beeinträchtigt. Ob das Ansprechen der Prostatakarzinomzellen auf eine Chemotherapie oder Radiotherapie durch die Kombination mit siRNA verbessert wird, wie es schon bei anderen Tumorerkrankungen gezeigt wurde, sollte ebenfalls untersucht werden.

## Zusammenfassung

Das Prostatakarzinom ist die häufigste Krebserkrankung des Mannes. Für mehr als ein Drittel der Männer besteht das Risiko im Laufe ihres Lebens einen bösartigen Tumor in der Vorsteherdrüse zu entwickeln. Der größte Risikofaktor ist dabei das Alter und aufgrund der steigenden Lebenserwartung und der verbesserten Screening Methoden, wird der Anteil der Neuerkrankungen weiter zunehmen. Die heutigen therapeutischen Möglichkeiten mit dem Ziel einer Heilung, bestehen hauptsächlich aus der operativen Entfernung oder der Radiotherapie, häufig in Verbindung mit neo-/adjuvanter Hormontherapie. Beide können mit dauerhaften, lebensqualitätseinschränkenden Nebenwirkungen, wie Harn- und Stuhlinkontinenz oder erektiler Dysfunktion einhergehen. Außerdem bergen sie die allgemeinen Risiken einer Operation oder einer Bestrahlung. Diese unerwünschten Wirkungen machen es schwierig vor allem ältere, multimorbide Patienten ausreichend zu therapieren. Eine Chemotherapie findet in palliativen Situationen und bei Versagen der Hormontherapie Anwendung. Das übergeordnete Ziel dieser Arbeit ist es, einen Stent oder Katheter, der in einem kurzen Eingriff in die Urethra eingesetzt werden kann, mit spezifischer siRNA zu beschichten und über eine kontrollierte Freisetzung die Proliferation der Krebszellen zu beeinflussen. Damit ließe sich der symptomatische Effekt des Stents mit einem therapeutischen kombinieren. In dieser Arbeit wurden die Wirkungen der Transfektion von acht spezifischen siRNAs auf drei Prostatakarzinomzelllinien getestet. Die Zellen wurden zunächst unter Standardbedingungen angezüchtet und mit drei verschiedenen Konzentrationen (25 nM, 50 nM, 100 nM) der siRNAs gegen Survivin, E2F1, HIF1 $\alpha$ , HIF2 $\alpha$ , STAT3, SRF und PSA (Transkriptvariante 1 und 2) transfiziert. Die Transfektion von SCR-siRNA diente als Kontrolle. Die mRNA Expression wurde mittels quantitativer Real-Time PCR gemessen, die Beeinflussung der Zellzahl mit dem Casy Cellcounter System. Die Resultate unterschieden sich hinsichtlich der

Zelllinien und der transfizierten siRNAs. PSA-, STAT3- und SRF-siRNA zeigten nur einen geringen Einfluss auf die drei Zelllinien, während die Transfektion von Survivin, E2F1, HIF1 $\alpha$  und HIF2 $\alpha$  bei der PC-3 Zelllinie in einer signifikant reduzierten mRNA Expression, sowie einer deutlich verringerten Zellzahl resultierte. Die DU-145 Zellen und LnCAP Zellen reagierten ähnlich auf die siRNAs gegen Survivin und E2F1. Die Ergebnisse zeigten, dass eine RNA-basierte Therapie möglicherweise eine gute adjuvante Option zu den bisherigen Behandlungsmethoden des Prostatakarzinoms bieten könnte, vor allem bei älteren, inoperablen Patienten oder bei fortgeschrittener Tumorerkrankung. Auf die verschiedenen Subtypen der Prostatakarzinome könnte durch eine speziell auf den individuellen Tumor des Patienten ausgerichtete siRNA-Beschichtung eingegangen werden. Zudem ist die lokale Anwendung von siRNA sehr spezifisch und es sind daher weniger Nebenwirkungen zu erwarten.

## Literaturverzeichnis

<sup>1</sup>Schünke, M., Schulte, E., Schumacher, U., Voll, M., & Wesker, K. (2009). *Prometheus LernAtlas der Anatomie: innere Organe*. G. Thieme

<sup>2</sup>Böcker, W., Denk, H., Heitz, Ph. U., Moch, H. *Pathologie*. Elsevier, Urban & Fischer, 2008. S. 918-924

<sup>3</sup>Ali, M. M. and V. Vaidya (2007). "Vitamin D and cancer." *J Cancer Res Ther***3**(4): 225-230.

<sup>4</sup>Böcker, W., Denk, H., Heitz, Ph. U., Moch, H. *Pathologie*. Elsevier, Urban & Fischer, 2008. S. 921

<sup>5</sup>Berkow, S. E., N. D. Barnard, G. A. Saxe and T. Ankerberg-Nobis (2007). "Diet and survival after prostate cancer diagnosis." *Nutr Rev***65**(9): 391-403.

<sup>6</sup>Leitlinienprogramm Onkologie, Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinom, AWMF-Register-Nummer (043-022OL), Version 2.0, 1. Aktualisierung 2011, Langversion S. 20-23

<sup>7</sup>Nelson, W. G. (2007). "Prostate cancer prevention." *Curr Opin Urol***17**(3): 157-167.

<sup>8</sup>Böcker, W., Denk, H., Heitz, Ph. U., Moch, H. *Pathologie*. Elsevier, Urban & Fischer, 2008. S. 920

<sup>9</sup>van Bokhoven, A., M. Varella-Garcia, C. Korch, W. U. Johannes, E. E. Smith, H. L. Miller, S. K. Nordeen, G. J. Miller and M. S. Lucia (2003). "Molecular characterization of human prostate carcinoma cell lines." *Prostate***57**(3): 205-225.

<sup>10</sup>Steinberg, G. D., B. S. Carter, T. H. Beaty, B. Childs and P. C. Walsh (1990). "Family history and the risk of prostate cancer." *Ibid.* **17**(4): 337-347.

<sup>11</sup>Giovannucci, E., E. B. Rimm, G. A. Colditz, M. J. Stampfer, A. Ascherio, C. C. Chute and W. C. Willett (1993). "A prospective study of dietary fat and risk of prostate cancer." *J Natl Cancer Inst***85**(19): 1571-1579.

<sup>12</sup>Böcker, W., Denk, H., Heitz, Ph. U., Moch, H. *Pathologie*. Elsevier, Urban & Fischer, 2008. S. 921

<sup>13</sup>Giles, G. G., G. Severi, D. R. English, M. R. McCredie, R. Borland, P. Boyle and J. L. Hopper (2003). "Sexual factors and prostate cancer." *BJU Int***92**(3): 211-216.

<sup>14</sup>Khan, M. A. and A. W. Partin (2004). "Vasectomy and prostate cancer." *Rev Urol***6**(1): 46-47.

<sup>15</sup>Böcker, W., Denk, H., Heitz, Ph. U., Moch, H. *Pathologie*. Elsevier, Urban & Fischer, 2008. S. 922-923

<sup>16</sup>Apolo, A. B., N. Pandit-Taskar and M. J. Morris (2008). "Novel tracers and their development for the imaging of metastatic prostate cancer." *J Nucl Med***49**(12): 2031-2041.

<sup>17</sup>Leitlinienprogramm Onkologie, Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinom, AWMF-Register-Nummer (043-022OL), Version 2.0, 1. Aktualisierung 2011, Langversion S. 31

<sup>18</sup>Krahn, M. D., J. E. Mahoney, M. H. Eckman, J. Trachtenberg, S. G. Pauker and A. S. Detsky (1994). "Screening for prostate cancer. A decision analytic view." *JAMA***272**(10): 773-780.

<sup>19</sup>Böcker, W., Denk, H., Heitz, Ph. U., Moch, H. *Pathologie*. Elsevier, Urban & Fischer, 2008. S. 920-921

<sup>20</sup>Helpap, B., Hartmann, A. &Wernert, N. (2011). „Anleitung zur pathologisch-anatomischen Diagnostik von Prostata Tumoren des Bundesverbandes Deutscher Pathologen e. V. und der deutschen Gesellschaft für Pathologie e. V.

<sup>21</sup>Helpap, B., Hartmann, A. &Wernert, N. (2011). „Anleitung zur pathologisch-anatomischen Diagnostik von Prostata Tumoren des Bundesverbandes Deutscher Pathologen e. V. und der deutschen Gesellschaft für Pathologie e. V.

<sup>22</sup>Leitlinienprogramm Onkologie, Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinom, AWMF-Register-Nummer (043-022OL), Version 2.0, 1. Aktualisierung 2011, Langversion S. 51 – S. 59

<sup>23</sup> <http://static.hifu-planet.com/media/uploads/pages/diagnostic-stades.jpg>  
abgerufen am 03.11.2014



<sup>24</sup>Böcker, W., Denk, H., Heitz, Ph. U., Moch, H. *Pathologie*. Elsevier, Urban & Fischer, 2008. S. 921-922

<sup>25</sup>Humphrey, P. A. (2004). "Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate." *Mod Pathol***17**(3): 292-306.

<sup>26</sup>J. U. Stolzenburg, I. Tuerk, E. N. Liatsikos (Hrsg.): *Laparoskopische und roboterassistierte Chirurgie in der Urologie*, Kapitel 3.11 und 3.12, Springer 2011, ISBN 3-642-10378-2, S. 292f

<sup>27</sup>J. Wolff, J. E. Altwein: *Prostatakarzinom – Grundlagen und Therapie*, Springer 2004, ISBN 3-540-20393-1, S. 12

<sup>28</sup>McCullough, A. (2008). "Penile change following radical prostatectomy: size, smooth muscle atrophy, and curve." *Curr Urol Rep***9**(6): 492-499.

<sup>29</sup>Savoie, M., S. S. Kim and M. S. Soloway (2003). "A prospective study measuring penile length in men treated with radical prostatectomy for prostate cancer." *J Urol***169**(4): 1462-1464.

<sup>30</sup>Leitlinienprogramm Onkologie, Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinom, AWMF-Register-Nummer (043-022OL), Version 2.0, 1. Aktualisierung 2011, Langversion S. 88-93

<sup>31</sup>Hoskin, P. J., A. M. Rojas, P. J. Ostler, R. Hughes, G. J. Lowe and L. Bryant (2013). "Quality of life after radical radiotherapy for prostate cancer: longitudinal study from a randomised trial of external beam radiotherapy alone or in combination with high dose rate brachytherapy." *Clin Oncol (R Coll Radiol)***25**(5): 321-327.

<sup>32</sup>Hoskin, P. J., K. Motohashi, P. Bownes, L. Bryant and P. Ostler (2007). "High dose rate brachytherapy in combination with external beam radiotherapy in the radical treatment of prostate cancer: initial results of a randomised phase three trial." *Radiother Oncol***84**(2): 114-120.

<sup>33</sup>Leitlinienprogramm Onkologie, Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinom, AWMF-Register-Nummer (043-022OL), Version 2.0, 1. Aktualisierung 2011, Langversion S. 93-107

<sup>34</sup>Leitlinienprogramm Onkologie, Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinom, AWMF-Register-Nummer (043-022OL), Version 2.0, 1. Aktualisierung 2011, Langversion S. 108-110

<sup>35</sup>Leitlinienprogramm Onkologie, Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinom, AWMF-Register-Nummer (043-022OL), Version 2.0, 1. Aktualisierung 2011, Langversion S. 143-148

<sup>36</sup>Berthold, D. R., G. R. Pond, F. Soban, R. de Wit, M. Eisenberger and I. F. Tannock (2008). "Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer: updated survival in the TAX 327 study." J Clin Oncol**26**(2): 242-245.

<sup>37</sup>Leitlinienprogramm Onkologie, Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinom, AWMF-Register-Nummer (043-022OL), Version 2.0, 1. Aktualisierung 2011, Langversion S. 198-201

<sup>38</sup>Saad, F., D. M. Gleason, R. Murray, S. Tchekmedyian, P. Venner, L. Lacombe, J. L. Chin, J. J. Vinholes, J. A. Goas, B. Chen and G. Zoledronic Acid Prostate Cancer Study (2002). "A randomized, placebo-controlled trial of zoledronic acid in patients with hormone-refractory metastatic prostate carcinoma." J Natl Cancer Inst**94**(19): 1458-1468.

<sup>39</sup>Leitlinienprogramm Onkologie, Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinom, AWMF-Register-Nummer (043-022OL), Version 2.0, 1. Aktualisierung 2011, Langversion S. 179

<sup>40</sup>Bangma, C. H., M. Bul, T. H. van der Kwast, T. Pickles, I. J. Korfage, C. M. Hoeks, E. W. Steyerberg, G. Jenster, M. W. Kattan, L. Bellardita, P. R. Carroll, L. J. Denis, C. Parker, M. J. Roobol, M. Emberton, L. H. Klotz, A. Rannikko, Y. Kakehi, J. A. Lane, F. H. Schroder, A. Semjonow, B. J. Trock and R. Valdagni (2013). "Active surveillance for low-risk prostate cancer." Crit Rev Oncol Hematol**85**(3): 295-302.

<sup>41</sup>Dall'Era, M. A., B. R. Konety, J. E. Cowan, K. Shinohara, F. Stauf, M. R. Cooperberg, M. V. Meng, C. J. Kane, N. Perez, V. A. Master and P. R. Carroll (2008). "Active surveillance for the management of prostate cancer in a contemporary cohort." Cancer**112**(12): 2664-2670.

- <sup>42</sup>Thompson, I., J. B. Thrasher, G. Aus, A. L. Burnett, E. D. Canby-Hagino, M. S. Cookson, A. V. D'Amico, R. R. Dmochowski, D. T. Eton, J. D. Forman, S. L. Goldenberg, J. Hernandez, C. S. Higano, S. R. Kraus, J. W. Moul, C. M. Tangen and A. U. A. P. C. C. G. U. Panel (2007). "Guideline for the management of clinically localized prostate cancer: 2007 update." *J Urol***177**(6): 2106-2131.
- <sup>43</sup>Leitlinienprogramm Onkologie, Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinom, AWMF-Register-Nummer (043-022OL), Version 2.0, 1. Aktualisierung 2011, Langversion S. 81
- <sup>44</sup>Napoli, C., C. Lemieux and R. Jorgensen (1990). "Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans." *Plant Cell***2**(4): 279-289.
- <sup>45</sup>Fire, A., S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver and C. C. Mello (1998). "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*." *Nature***391**(6669): 806-811.
- <sup>46</sup>Schwarz, D. S., G. Hutvagner, T. Du, Z. Xu, N. Aronin and P. D. Zamore (2003). "Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex." *Cell***115**(2): 199-208.
- <sup>47</sup>Siomi, H. and M. C. Siomi (2009). "On the road to reading the RNA-interference code." *Nature***457**(7228): 396-404.
- <sup>48</sup>[http://www.gopixpic.com/359/mechanismus-der-rna-interferenz/http:%7C%7Cwww\\*chemie\\*uni-hamburg\\*de%7Cbc%7Cgfx%7Cbc\\_lehre\\_praktika\\_RNAi\\*gif/](http://www.gopixpic.com/359/mechanismus-der-rna-interferenz/http:%7C%7Cwww*chemie*uni-hamburg*de%7Cbc%7Cgfx%7Cbc_lehre_praktika_RNAi*gif/) abgerufen am 03.11.2014
- <sup>49</sup>Naito, Y., T. Yamada, K. Ui-Tei, S. Morishita and K. Saigo (2004). "siDirect: highly effective, target-specific siRNA design software for mammalian RNA interference." *Nucleic Acids Res***32**(Web Server issue): W124-129.
- <sup>50</sup>Miller, V. M., H. Xia, G. L. Marrs, C. M. Gouvion, G. Lee, B. L. Davidson and H. L. Paulson (2003). "Allele-specific silencing of dominant disease genes." *Proc Natl Acad Sci U S A***100**(12): 7195-7200.
- <sup>51</sup>Jackson, A. L., S. R. Bartz, J. Schelter, S. V. Kobayashi, J. Burchard, M. Mao, B. Li, G. Cavet and P. S. Linsley (2003). "Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi." *Nat Biotechnol***21**(6): 635-637.

<sup>52</sup>Chalk, A. M. and E. L. Sonnhammer (2008). "siRNA specificity searching incorporating mismatch tolerance data." Bioinformatics**24**(10): 1316-1317.

<sup>53</sup>He, X., H. Xu, M. Zhao and S. Wang (2013). "Serum response factor is overexpressed in esophageal squamous cell carcinoma and promotes Eca-109 cell proliferation and invasion." Oncol Lett**5**(3): 819-824.

<sup>54</sup>Zhao, M., H. Xu, X. He, H. Hua, Y. Luo and L. Zuo (2013). "Expression of serum response factor in gastric carcinoma and its molecular mechanisms involved in the regulation of the invasion and migration of SGC-7901 cells." Cancer Biother Radiopharm**28**(2): 146-152.

<sup>55</sup>Chen, C. and Z. Yu (2009). "siRNA targeting HIF-1alpha induces apoptosis of pancreatic cancer cells through NF-kappaB-independent and -dependent pathways under hypoxic conditions." Anticancer Res**29**(4): 1367-1372.

<sup>56</sup>Liu, W. S., H. J. Yan, R. Y. Qin, R. Tian, M. Wang, J. X. Jiang, M. Shen and C. J. Shi (2009). "siRNA directed against survivin enhances pancreatic cancer cell gemcitabine chemosensitivity." Dig Dis Sci**54**(1): 89-96.

<sup>57</sup>Kessler, J., A. Hahnel, H. Wichmann, S. Rot, M. Kappler, M. Bache and D. Vordermark (2010). "HIF-1alpha inhibition by siRNA or chetomin in human malignant glioma cells: effects on hypoxic radioresistance and monitoring via CA9 expression." BMC Cancer**10**: 605.

<sup>58</sup>Zhang, X., N. Li, Y. H. Wang, Y. Huang, N. Z. Xu and L. Y. Wu (2009). "[Effects of survivin siRNA on growth, apoptosis and chemosensitivity of ovarian cancer cells SKOV3/DDP]." Zhonghua Zhong Liu Za Zhi**31**(3): 174-177.

<sup>59</sup>Montazeri Aliabadi, H., B. Landry, P. Mahdipoor and H. Uludag (2011). "Induction of apoptosis by survivin silencing through siRNA delivery in a human breast cancer cell line." Mol Pharm**8**(5): 1821-1830.

<sup>60</sup>Kunigal, S., S. S. Lakka, P. K. Sodadasu, N. Estes and J. S. Rao (2009). "Stat3-siRNA induces Fas-mediated apoptosis in vitro and in vivo in breast cancer." Int J Oncol**34**(5): 1209-1220.

<sup>61</sup>Walker, T., A. Nolte, V. Steger, C. Makowiecki, M. Mustafi, G. Friedel, C. Schlensak and H. P. Wendel (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**(3): 628-633; discussion 633-624.

- <sup>62</sup> Stoleriu, Mircea Gabriel, et al. "A new strategy in the treatment of chemoresistant lung adenocarcinoma via specific siRNA transfection of SRF, E2F1, Survivin, HIF and STAT3." *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* (2014): ezu087.
- <sup>63</sup>Thompson, C. B. (1995). "Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease." *Science***267**(5203): 1456-1462.
- <sup>64</sup> Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2005). *Lehrbuch der molekularen Zellbiologie*. 3. Auflage S. 665-666
- <sup>65</sup>Bohm, I. and H. Schild (2003). "Apoptosis: the complex scenario for a silent cell death." *Mol Imaging Biol***5**(1): 2-14.
- <sup>66</sup>Guicciardi, M. E. and G. J. Gores (2009). "Life and death by death receptors." *FASEB J***23**(6): 1625-1637.
- <sup>67</sup>Cory, S. and J. M. Adams (2002). "The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch." *Nat Rev Cancer***2**(9): 647-656.
- <sup>68</sup>Loeffler, M. and G. Kroemer (2000). "The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita." *Exp Cell Res***256**(1): 19-26.
- <sup>69</sup>Dejean, L. M., S. Martinez-Caballero, S. Manon and K. W. Kinnally (2006). "Regulation of the mitochondrial apoptosis-induced channel, MAC, by BCL-2 family proteins." *Biochim Biophys Acta***1762**(2): 191-201.
- <sup>70</sup>Yuan, S. and C. W. Akey (2013). "Apoptosome structure, assembly, and procaspase activation." *Structure***21**(4): 501-515.
- <sup>71</sup>Fesik, S. W. and Y. Shi (2001). "Structural biology. Controlling the caspases." *Science***294**(5546): 1477-1478.
- <sup>72</sup>Shi, Y. (2000). "Survivin structure: crystal unclear." *Nat Struct Biol***7**(8): 620-623.
- <sup>73</sup>Verdecia, M. A., H. Huang, E. Dutil, D. A. Kaiser, T. Hunter and J. P. Noel *ibid.*"Structure of the human anti-apoptotic protein survivin reveals a dimeric arrangement." (7): 602-608.
- <sup>74</sup>Deveraux, Q. L. and J. C. Reed (1999). "IAP family proteins--suppressors of apoptosis." *Genes Dev***13**(3): 239-252.

- <sup>75</sup>Adida, C., P. L. Crotty, J. McGrath, D. Berrebi, J. Diebold and D. C. Altieri (1998). "Developmentally regulated expression of the novel cancer anti-apoptosis gene survivin in human and mouse differentiation." Am J Pathol**152**(1): 43-49.
- <sup>76</sup>Ambrosini, G., C. Adida and D. C. Altieri (1997). "A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma." Nat Med**3**(8): 917-921.
- <sup>77</sup>Wagner, M., K. Schmelz, B. Dorken and I. Tamm (2008). "Epigenetic and genetic analysis of the survivin promoter in acute myeloid leukemia." Leuk Res**32**(7): 1054-1060.
- <sup>78</sup>Sah, N. K., Z. Khan, G. J. Khan and P. S. Bisen (2006). "Structural, functional and therapeutic biology of survivin." Cancer Lett**244**(2): 164-171.
- <sup>79</sup>Kanwar, R. K., C. H. Cheung, J. Y. Chang and J. R. Kanwar (2010). "Recent advances in anti-survivin treatments for cancer." Curr Med Chem**17**(15): 1509-1515.
- <sup>80</sup>Wu, C. L., L. R. Zukerberg, C. Ngwu, E. Harlow and J. A. Lees (1995). "In vivo association of E2F and DP family proteins." Mol Cell Biol**15**(5): 2536-2546.
- <sup>81</sup>Slansky, J. E. and P. J. Farnham (1996). "Introduction to the E2F family: protein structure and gene regulation." Curr Top Microbiol Immunol**208**: 1-30.
- <sup>82</sup>Munger, K. and P. M. Howley (2002). "Human papillomavirus immortalization and transformation functions." Virus Res**89**(2): 213-228.
- <sup>83</sup>Blattner, C., A. Sparks and D. Lane (1999). "Transcription factor E2F-1 is upregulated in response to DNA damage in a manner analogous to that of p53." Mol Cell Biol**19**(5): 3704-3713.
- <sup>84</sup>Semenza, G. L. (2001). "Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology." Trends Mol Med**7**(8): 345-350.
- <sup>85</sup>Percy, M. J., P. W. Furlow, G. S. Lucas, X. Li, T. R. Lappin, M. F. McMullin and F. S. Lee (2008). "A gain-of-function mutation in the HIF2A gene in familial erythrocytosis." N Engl J Med**358**(2): 162-168.
- <sup>86</sup>Zhou, J., T. Schmid, S. Schnitzer and B. Brune (2006). "Tumor hypoxia and cancer progression." Cancer Lett**237**(1): 10-21.

- <sup>87</sup> Semenza, G. L. (2003). "Targeting HIF-1 for cancer therapy." Nat Rev Cancer**3**(10): 721-732.
- <sup>88</sup> Denko, N. C. (2008). "Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour." Ibid. **8**(9): 705-713.
- <sup>89</sup> Kappler, M., H. Taubert, J. Schubert, D. Vordermark and A. W. Eckert (2012). "The real face of HIF1alpha in the tumor process." Cell Cycle**11**(21): 3932-3936.
- <sup>90</sup> Harris, A. L. (2002). "Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth." Nat Rev Cancer**2**(1): 38-47.
- <sup>91</sup> Yoshimura, H., D. K. Dhar, H. Kohno, H. Kubota, T. Fujii, S. Ueda, S. Kinugasa, M. Tachibana and N. Nagasue (2004). "Prognostic impact of hypoxia-inducible factors 1alpha and 2alpha in colorectal cancer patients: correlation with tumor angiogenesis and cyclooxygenase-2 expression." Clin Cancer Res**10**(24): 8554-8560.
- <sup>92</sup> Zhong, Z., Z. Wen and J. E. Darnell, Jr. (1994). "Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6." Science**264**(5155): 95-98.
- <sup>93</sup> Alvarez, J. V., H. Greulich, W. R. Sellers, M. Meyerson and D. A. Frank (2006). "Signal transducer and activator of transcription 3 is required for the oncogenic effects of non-small-cell lung cancer-associated mutations of the epidermal growth factor receptor." Cancer Res**66**(6): 3162-3168.
- <sup>94</sup> Klampfer, L. (2006). "Signal transducers and activators of transcription (STATs): Novel targets of chemopreventive and chemotherapeutic drugs." Curr Cancer Drug Targets**6**(2): 107-121.
- <sup>95</sup> Yin, W., S. Cheepala, J. N. Roberts, K. Syson-Chan, J. DiGiovanni and J. L. Clifford (2006). "Active Stat3 is required for survival of human squamous cell carcinoma cells in serum-free conditions." Mol Cancer**5**: 15.
- <sup>96</sup> Kusaba, T., T. Nakayama, K. Yamazumi, Y. Yakata, A. Yoshizaki, K. Inoue, T. Nagayasu and I. Sekine (2006). "Activation of STAT3 is a marker of poor prognosis in human colorectal cancer." Oncol Rep**15**(6): 1445-1451.
- <sup>97</sup> de la Iglesia, N., G. Konopka, S. V. Puram, J. A. Chan, R. M. Bachoo, M. J. You, D. E. Levy, R. A. Depinho and A. Bonni (2008). "Identification of a PTEN-regulated STAT3 brain tumor suppressor pathway." Genes Dev**22**(4): 449-462.

<sup>98</sup>Ueda, T., N. Bruchovsky and M. D. Sadar (2002). "Activation of the androgen receptor N-terminal domain by interleukin-6 via MAPK and STAT3 signal transduction pathways." J Biol Chem**277**(9): 7076-7085.

<sup>99</sup>Lee, J., J. C. Kim, S. E. Lee, C. Quinley, H. Kim, S. Herdman, M. Corr and E. Raz (2012). "Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) protein suppresses adenoma-to-carcinoma transition in Apcmin/+ mice via regulation of Snail-1 (SNAIL) protein stability." Ibid. **287**(22): 18182-18189.

<sup>100</sup>Miano, J. M. (2010). "Role of serum response factor in the pathogenesis of disease." Lab Invest**90**(9): 1274-1284.

<sup>101</sup>Treisman, R. (1992). "The serum response element." Trends Biochem Sci**17**(10): 423-426.

<sup>102</sup>Chai, J. and A. S. Tarnawski (2002). "Serum response factor: discovery, biochemistry, biological roles and implications for tissue injury healing." J Physiol Pharmacol**53**(2): 147-157.

<sup>103</sup>Treisman, R. (1994). "Ternary complex factors: growth factor regulated transcriptional activators." Curr Opin Genet Dev**4**(1): 96-101.

<sup>104</sup>Arsenian, S., B. Weinhold, M. Oelgeschlager, U. Ruther and A. Nordheim (1998). "Serum response factor is essential for mesoderm formation during mouse embryogenesis." EMBO J**17**(21): 6289-6299.

<sup>105</sup>Sun, Q., G. Chen, J. W. Streb, X. Long, Y. Yang, C. J. Stoeckert, Jr. and J. M. Miano (2006). "Defining the mammalian CARome." Genome Res**16**(2): 197-207.

<sup>106</sup>Poser, S., S. Impey, K. Trinh, Z. Xia and D. R. Storm (2000). "SRF-dependent gene expression is required for PI3-kinase-regulated cell proliferation." EMBO J**19**(18): 4955-4966.

<sup>107</sup>An

Miranti, C. K., D. D. Ginty, G. Huang, T. Chatila and M. E. Greenberg (1995). "Calcium activates serum response factor-dependent transcription by a Ras- and Elk-1-independent mechanism that involves a Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase." Mol Cell Biol**15**(7): 3672-3684.

<sup>108</sup>Liu, S. H., J. T. Ma, A. Y. Yueh, S. P. Lees-Miller, C. W. Anderson and S. Y. Ng (1993). "The carboxyl-terminal transactivation domain of human serum response factor contains DNA-activated protein kinase phosphorylation sites." J Biol Chem**268**(28): 21147-21154.



- <sup>109</sup>Zhang, X., G. Azhar, C. Huang, C. Cui, Y. Zhong, S. Huck and J. Y. Wei (2007). "Alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay regulate gene expression of serum response factor." *Gene***400**(1-2): 131-139.
- <sup>110</sup>Jonsson, M., S. Linse, B. Frohm, A. Lundwall and J. Malm (2005). "Semenogelins I and II bind zinc and regulate the activity of prostate-specific antigen." *Biochem J***387**(Pt 2): 447-453.
- <sup>111</sup>Collins, G. N., P. J. Martin, A. Wynn-Davies, P. J. Brooman and P. H. O'Reilly (1997). "The effect of digital rectal examination, flexible cystoscopy and prostatic biopsy on free and total prostate specific antigen, and the free-to-total prostate specific antigen ratio in clinical practice." *J Urol***157**(5): 1744-1747.
- <sup>112</sup>Herschman, J. D., D. S. Smith and W. J. Catalona (1997). "Effect of ejaculation on serum total and free prostate-specific antigen concentrations." *Urology***50**(2): 239-243.
- <sup>113</sup>Catalona, W. J., D. S. Smith and D. K. Ornstein (1997). "Prostate cancer detection in men with serum PSA concentrations of 2.6 to 4.0 ng/mL and benign prostate examination. Enhancement of specificity with free PSA measurements." *JAMA***277**(18): 1452-1455.
- <sup>114</sup>Gomella, L. G., X. S. Liu, E. J. Trabulsi, W. K. Kelly, R. Myers, T. Showalter, A. Dicker and R. Wender (2011). "Screening for prostate cancer: the current evidence and guidelines controversy." *Can J Urol***18**(5): 5875-5883.
- <sup>115</sup>Gao, X. and L. Huang (1995). "Cationic liposome-mediated gene transfer." *Gene Ther***2**(10): 710-722.
- <sup>116</sup>McNeil, S. E., A. Vangala, V. W. Bramwell, P. J. Hanson and Y. Perrie (2010). "Lipoplexes formulation and optimisation: in vitro transfection studies reveal no correlation with in vivo vaccination studies." *Curr Drug Deliv***7**(2): 175-187.
- <sup>117</sup>Felgner, J. H., R. Kumar, C. N. Sridhar, C. J. Wheeler, Y. J. Tsai, R. Border, P. Ramsey, M. Martin and P. L. Felgner (1994). "Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations." *J Biol Chem***269**(4): 2550-2561.
- <sup>118</sup>Lonez, C., M. Vandenbranden and J. M. Ruyschaert (2012). "Cationic lipids activate intracellular signaling pathways." *Adv Drug Deliv Rev***64**(15): 1749-1758.
- <sup>119</sup>Pulukuri, S. M., C. S. Gondji, S. S. Lakka, A. Jutla, N. Estes, M. Gujrati and J. S. Rao (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**(43): 36529-36540.

<sup>120</sup>Ghosh, A., X. Wang, E. Klein and W. D. Heston (2005). "Novel role of prostate-specific membrane antigen in suppressing prostate cancer invasiveness." Cancer Res**65**(3): 727-731.

<sup>121</sup>Stone, K. R., D. D. Mickey, H. Wunderli, G. H. Mickey and D. F. Paulson (1978). "Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145)." Int J Cancer**21**(3): 274-281.

<sup>122</sup>Horoszewicz, J. S., S. S. Leong, E. Kawinski, J. P. Karr, H. Rosenthal, T. M. Chu, E. A. Mirand and G. P. Murphy (1983). "LNCaP model of human prostatic carcinoma." Cancer Res**43**(4): 1809-1818.

<sup>123</sup>Lee, L. G., C. R. Connell and W. Bloch (1993). "Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes." Nucleic Acids Res**21**(16): 3761-3766.

<sup>124</sup>Higuchi, R., C. Fockler, G. Dollinger and R. Watson (1993). "Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions." Biotechnology (N Y)**11**(9): 1026-1030.

<sup>125</sup>Leitlinienprogramm Onkologie, Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinom, AWMF-Regisiter-Nummer (043-022OL), Version 2.0, 1. Aktualisierung 2011, Langversion S. 20

<sup>126</sup>Wilt, T. J., R. MacDonald, I. Rutks, T. A. Shamlivan, B. C. Taylor and R. L. Kane (2008). "Systematic review: comparative effectiveness and harms of treatments for clinically localized prostate cancer." Ann Intern Med**148**(6): 435-448.

<sup>127</sup>Vanderbrink, B. A., A. R. Rastinehad and G. H. Badlani (2007). "Prostatic stents for the treatment of benign prostatic hyperplasia." Curr Opin Urol**17**(1): 1-6.

<sup>128</sup>Perry, M. J., A. J. Roodhouse, A. B. Gidlow, T. G. Spicer and B. W. Ellis (2002). "Thermo-expandable intraprostatic stents in bladder outlet obstruction: an 8-year study." BJU Int**90**(3): 216-223.

<sup>129</sup>Rettig, G. R. and M. A. Behlke (2012). "Progress toward in vivo use of siRNAs-II." Mol Ther**20**(3): 483-512.

- <sup>130</sup>Kim, D. H., M. A. Behlke, S. D. Rose, M. S. Chang, S. Choi and J. J. Rossi (2005). "Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy." Nat Biotechnol**23**(2): 222-226.
- <sup>131</sup>Fytli, P., C. Tiemann, C. Wang, S. Schulz, S. Schaffer, M. P. Manns and H. Wedemeyer (2007). "Frequency of very low HCV viremia detected by a highly sensitive HCV-RNA assay." J Clin Virol**39**(4): 308-311.
- <sup>132</sup>Nolte, A., C. Raabe, T. Walker, P. Simon, G. Ziemer and H. P. Wendel (2009). "Optimized basic conditions are essential for successful siRNA transfection into primary endothelial cells." Oligonucleotides**19**(2): 141-150.
- <sup>133</sup>Burnett, J. C., J. J. Rossi and K. Tiemann (2011). "Current progress of siRNA/shRNA therapeutics in clinical trials." Biotechnol J**6**(9): 1130-1146.
- <sup>134</sup>Lares, M. R., J. J. Rossi and D. L. Ouellet (2010). "RNAi and small interfering RNAs in human disease therapeutic applications." Trends Biotechnol**28**(11): 570-579.
- <sup>135</sup>Rettig, G. R. and M. A. Behlke (2012). "Progress toward in vivo use of siRNAs-II." Mol Ther**20**(3): 483-512.
- <sup>136</sup>McFarland, T. J., Y. Zhang, B. Appukuttan and J. T. Stout (2004). "Gene therapy for proliferative ocular diseases." Expert Opin Biol Ther**4**(7): 1053-1058.
- <sup>137</sup>Bitko, V., A. Musiyenko, O. Shulyayeva and S. Barik (2005). "Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA." Nat Med**11**(1): 50-55.
- <sup>138</sup>Dykxhoorn, D. M. and J. Lieberman (2006). "Silencing viral infection." PLoS Med**3**(7): e242.
- <sup>139</sup>Raoul, C., S. D. Barker and P. Aebischer (2006). "Viral-based modelling and correction of neurodegenerative diseases by RNA interference." Gene Ther**13**(6): 487-495.
- <sup>140</sup>Pai, S. I., Y. Y. Lin, B. Macaes, A. Meneshian, C. F. Hung and T. C. Wu *ibid.* "Prospects of RNA interference therapy for cancer." 464-477.
- <sup>141</sup>Nolte, A., C. Raabe, T. Walker, P. Simon, G. Ziemer and H. P. Wendel (2009). "Optimized basic conditions are essential for successful siRNA transfection into primary endothelial cells." Oligonucleotides**19**(2): 141-150.

- <sup>142</sup>Keller, H., C. Yunxu, G. Marit, M. Pla, J. Reiffers, J. Theze and P. Froussard (1999). "Transgene expression, but not gene delivery, is improved by adhesion-assisted lipofection of hematopoietic cells." Gene Ther**6**(5): 931-938.
- <sup>143</sup>Basiouni, S., H. Fuhrmann and J. Schumann (2012). "High-efficiency transfection of suspension cell lines." Biotechniques**0**(0): 1-4.
- <sup>144</sup>Rao, D. D., Z. Wang, N. Senzer and J. Nemunaitis (2013). "RNA interference and personalized cancer therapy." Discov Med**15**(81): 101-110.
- <sup>145</sup>Niu, Y., S. Yeh, H. Miyamoto, G. Li, S. Altuwaijri, J. Yuan, R. Han, T. Ma, H. C. Kuo and C. Chang (2008). "Tissue prostate-specific antigen facilitates refractory prostate tumor progression via enhancing ARA70-regulated androgen receptor transactivation." Cancer Res**68**(17): 7110-7119.
- <sup>146</sup>Niu, Y., S. Yeh, H. Miyamoto, G. Li, S. Altuwaijri, J. Yuan, R. Han, T. Ma, H. C. Kuo and C. Chang (2008). "Tissue prostate-specific antigen facilitates refractory prostate tumor progression via enhancing ARA70-regulated androgen receptor transactivation." Cancer Res**68**(17): 7110-7119.
- <sup>147</sup>Zhao, M., H. Xu, X. He, H. Hua, Y. Luo and L. Zuo (2013). "Expression of serum response factor in gastric carcinoma and its molecular mechanisms involved in the regulation of the invasion and migration of SGC-7901 cells." Cancer Biother Radiopharm**28**(2): 146-152.
- <sup>148</sup>He, X., H. Xu, M. Zhao and S. Wang (2013). "Serum response factor is overexpressed in esophageal squamous cell carcinoma and promotes Eca-109 cell proliferation and invasion." Oncol Lett**5**(3): 819-824.
- <sup>149</sup>Verone, A. R., K. Duncan, A. Godoy, N. Yadav, A. Bakin, S. Koochekpour, J. P. Jin and H. V. Heemers (2013). "Androgen-responsive Serum Response Factor target genes regulate prostate cancer cell migration." Carcinogenesis**34**(8): 1737-1746.
- <sup>150</sup>Jing, N. and D. J. Tweardy (2005). "Targeting Stat3 in cancer therapy." Anticancer Drugs**16**(6): 601-607.
- <sup>151</sup>Fagard, Remi, et al. "STAT3 inhibitors for cancer therapy: Have all roads been explored?." JAK-STAT **2.1** (2013): 0-8.
- <sup>152</sup>Abdulghani, J., L. Gu, A. Dagvadorj, J. Lutz, B. Leiby, G. Bonuccelli, M. P. Lisanti, T. Zellweger, K. Alanen, T. Mirtti, T. Visakorpi, L. Bubendorf and M. T. Nevalainen (2008). "Stat3 promotes metastatic progression of prostate cancer." Am J Pathol**172**(6): 1717-1728.

- <sup>153</sup>Sun, M., C. Liu, N. Nadiminty, W. Lou, Y. Zhu, J. Yang, C. P. Evans, Q. Zhou and A. C. Gao (2012). "Inhibition of Stat3 activation by sanguinarine suppresses prostate cancer cell growth and invasion." *Prostate***72**(1): 82-89.
- <sup>154</sup>Mohamed, K. M., A. Le, H. Duong, Y. Wu, Q. Zhang and D. V. Messadi (2004). "Correlation between VEGF and HIF-1alpha expression in human oral squamous cell carcinoma." *Exp Mol Pathol***76**(2): 143-152.
- <sup>155</sup>Semenza, G. L. (2002). "HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics." *Trends Mol Med***8**(4 Suppl): S62-67.
- <sup>156</sup>Poon, E., A. L. Harris and M. Ashcroft (2009). "Targeting the hypoxia-inducible factor (HIF) pathway in cancer." *Expert Rev Mol Med***11**: e26.
- <sup>157</sup>Hu, Y., J. Liu and H. Huang (2013). "Recent agents targeting HIF-1alpha for cancer therapy." *J Cell Biochem***114**(3): 498-509.
- <sup>158</sup>Burkitt, K., S. Y. Chun, D. T. Dang and L. H. Dang (2009). "Targeting both HIF-1 and HIF-2 in human colon cancer cells improves tumor response to sunitinib treatment." *Mol Cancer Ther***8**(5): 1148-1156.
- <sup>159</sup>Kimbrow, K. S. and J. W. Simons (2006). "Hypoxia-inducible factor-1 in human breast and prostate cancer." *Endocr Relat Cancer***13**(3): 739-749.
- <sup>160</sup>Rodicker, F., T. Stiewe, S. Zimmermann and B. M. Putzer (2001). "Therapeutic efficacy of E2F1 in pancreatic cancer correlates with TP73 induction." *Cancer Res***61**(19): 7052-7055.
- <sup>161</sup>Bug, M. and M. Dobbstein (2011). "Anthracyclines induce the accumulation of mutant p53 through E2F1-dependent and -independent mechanisms." *Oncogene***30**(33): 3612-3624.
- <sup>162</sup>Wu, Z. and Q. Yu (2009). "E2F1-mediated apoptosis as a target of cancer therapy." *Curr Mol Pharmacol***2**(2): 149-160.
- <sup>163</sup>Engelmann, D. and B. M. Putzer (2012). "The dark side of E2F1: in transit beyond apoptosis." *Cancer Res***72**(3): 571-575.
- <sup>164</sup>Davis, J. N., K. J. Wojno, S. Daignault, M. D. Hofer, R. Kuefer, M. A. Rubin and M. L. Day (2006). "Elevated E2F1 inhibits transcription of the androgen receptor in metastatic hormone-resistant prostate cancer." *Ibid.* **66**(24): 11897-11906.

<sup>165</sup>Kanwar, R. K., C. H. Cheung, J. Y. Chang and J. R. Kanwar (2010). "Recent advances in anti-survivin treatments for cancer." Curr Med Chem**17**(15): 1509-1515.

<sup>166</sup>Lewis, K. D., W. Samlowski, J. Ward, J. Catlett, L. Cranmer, J. Kirkwood, D. Lawson, E. Whitman and R. Gonzalez (2011). "A multi-center phase II evaluation of the small molecule survivin suppressor YM155 in patients with unresectable stage III or IV melanoma." Invest New Drugs**29**(1): 161-166.

<sup>167</sup>Giaccone, G., P. Zatloukal, J. Roubec, K. Floor, J. Musil, M. Kuta, R. J. van Klaveren, S. Chaudhary, A. Gunther and S. Shamsili (2009). "Multicenter phase II trial of YM155, a small-molecule suppressor of survivin, in patients with advanced, refractory, non-small-cell lung cancer." J Clin Oncol**27**(27): 4481-4486.

<sup>168</sup>Kita, A., T. Nakahara, K. Yamanaka, K. Nakano, M. Nakata, M. Mori, N. Kaneko, H. Koutoku, N. Izumisawa and M. Sasamata (2011). "Antitumor effects of YM155, a novel survivin suppressant, against human aggressive non-Hodgkin lymphoma." Leuk Res**35**(6): 787-792.

<sup>169</sup>Nakahara, T., A. Kita, K. Yamanaka, M. Mori, N. Amino, M. Takeuchi, F. Tominaga, S. Hatakeyama, I. Kinoyama, A. Matsuhisa, M. Kudoh and M. Sasamata (2007). "YM155, a novel small-molecule survivin suppressant, induces regression of established human hormone-refractory prostate tumor xenografts." Cancer Res**67**(17): 8014-8021.

<sup>170</sup>Ganesh, S., A. K. Iyer, J. Weiler, D. V. Morrissey and M. M. Amiji (2013). "Combination of siRNA-directed Gene Silencing With Cisplatin Reverses Drug Resistance in Human Non-small Cell Lung Cancer." Mol Ther Nucleic Acids**2**: e110.

<sup>171</sup>Morrison, D. J., L. E. Hogan, G. Condos, T. Bhatla, N. Germino, N. P. Moskowitz, L. Lee, D. Bhojwani, T. M. Horton, I. Belitskaya-Levy, L. M. Greenberger, I. D. Horak, S. A. Grupp, D. T. Teachey, E. A. Raetz and W. L. Carroll (2012). "Endogenous knockdown of survivin improves chemotherapeutic response in ALL models." Leukemia**26**(2): 271-279.

<sup>172</sup>Zhang, X., N. Li, Y. H. Wang, Y. Huang, N. Z. Xu and L. Y. Wu (2009). "[Effects of survivin siRNA on growth, apoptosis and chemosensitivity of ovarian cancer cells SKOV3/DDP]." Zhonghua Zhong Liu Za Zhi**31**(3): 174-177.

<sup>173</sup>Wang, D., Wang, D., Jing, Y., Jing, Y., Ouyang, S., Ouyang, S., Liu, B., Liu, B., Zhu, T., Zhu, T., Niu, H., Niu, H., Tian, Y., & Tian, Y. (2013). Inhibitory effect

---

of valproic acid on bladder cancer in combination with chemotherapeutic agents in vitro and in vivo. *Oncology Letters*, 6(5), 1492-1498

<sup>174</sup>Chu, X., L. Chen, J. Wang, X. Guan, H. Geng, Q. Zhang and H. Song (2010). "SiRNA-mediated survivin inhibition enhances chemo- or radiosensitivity of colorectal cancer cells in tumor-bearing nude mice." *Hepatogastroenterology* **57**(104): 1445-1452.

<sup>175</sup>Khan, S., J. M. Jutzy, M. M. Valenzuela, D. Turay, J. R. Aspe, A. Ashok, S. Mirshahidi, D. Mercola, M. B. Lilly and N. R. Wall (2012). "Plasma-derived exosomal survivin, a plausible biomarker for early detection of prostate cancer." *PLoS One* **7**(10): e46737.





## **Erklärung zum Eigenanteil**

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

Sämtliche Versuche wurden, nach Einarbeitung durch Frau Dr. Andrea Nolte-Karayel, von mir eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich.

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

Tübingen, den 06.01.2015

Unterschrift: .....

## Veröffentlichung

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Katharina Pietschke, Tobias Walker, Stefanie Krajewski, Julia Kurz, Stefan Aufderklamm, Christian Schwentner, Christian Schlensak, Arnulf Stenzl, Hans P. Wendel und Andrea Nolte. **The Chance of Small interfering RNAs as Eligible Candidates for a Personalized Treatment of Prostate cancer.** *Current Pharmaceutical Biotechnology* 2014, Issue 13, Pages 1145 – 1154

# Danksagung

Zunächst danke ich Herrn Prof. Wendel für die interessante Themenstellung und für die Möglichkeit meine Dissertation im Klinischen Forschungslabor der Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie in Tübingen zu verfassen. Herrn Prof. Bedke danke ich für die Übernahme der Zweitkorrektur.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Andrea Nolte-Karayel. Jederzeit half sie mir geduldig mit ihrem außerordentlich sachkundigen, erfahrenen und wertvollen Wissen bei der Planung, Durchführung und Erstellung der vorliegenden Arbeit. Sie wurde nie müde mir jede Frage zu beantworten und ihre Hilfsbereitschaft anzubieten. Ohne ihre tatkräftige Unterstützung wäre meine Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen. Andrea, du bist die beste Betreuerin die man sich wünschen kann. Ich danke dir von Herzen!

Des Weiteren danke ich allen Mitarbeitern des Forschungslabors für die herzliche Aufnahme, die angenehme Atmosphäre und die stetige Hilfsbereitschaft. Ich habe viel gelernt und die Arbeit im Labor hat mir dank euch allen sehr viel Spaß gemacht.

Ebenfalls danken möchte ich Samuel Körner für die grenzenlose Geduld und amüsanten Stunden bei dem Versuch mir die Geheimnisse des Formatierens näher zu bringen. Ohne dich hätte ich meine Arbeit wahrscheinlich handschriftlich verfassen müssen. Auch bedanken möchte ich mich bei Ronny Röhrig für die großartige, unbezahlbare Unterstützung auf den letzten Metern.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern Heike und Bernd Pietschke, meinen Großeltern Rosemarie und Paul Spath und meiner Schwester Viktoria Pietschke. Sie haben mich bisher in jeder Phase meines Lebens bedingungslos unterstützt, an mich geglaubt und mir mit Geduld und Liebe zur Seite gestanden. Ohne euch wäre alles, was ich erreicht und erlebt habe, nicht möglich gewesen.