

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

Inaugural-Dissertation
Therapeutische small interfering RNA zur
Wachstumsreduktion von Hautkrebs

zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Pfeuffer, geb. Ivcenkova, Natalia

2021

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter Privatdozentin Dr. A. Nolte-Karayel

2. Berichterstatter: Professorin Dr. L. Quintanilla Martinez de Fend

Tag der Disputation: 06.07.2021

Inhaltsverzeichnis

1 Ziel der Arbeit	1
2 Einleitung	2
2.1 Haut	2
2.2 Hautkrebs	3
2.2.1 Malignes Melanom.....	3
2.2.2 Plattenepithelkarzinom.....	4
2.3 Entstehung von Hautkrebs	4
2.4 Konservative Behandlungsmethoden der Hauttumoren.....	5
2.4.1 Malignes Melanom.....	5
2.4.2 Plattenepithelkarzinom.....	6
2.5 RNAinterferenz	6
2.5.1 RNA-Interferenz Ablauf	7
2.5.2 Zielproteine für die siRNA basierte Therapie.....	8
2.5.2.1 RAC-gamma serine/threonine-protein-kinase (AKT3).....	8
2.5.2.2 B-Rapidly growing fibrosarcoma (BRAF).....	9
2.5.2.3 Transcription factor E2F1 (E2F1).....	10
2.5.2.4 Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3).....	11
2.5.2.5 Hypoxie-induzierter Faktor (HIF1 und HIF2)	11
2.5.2.6 Protease-activated receptor-1 (PAR-1)	13
2.5.2.7 Serum response factor (SRF)	14
2.5.2.8 Survivin	16
2.6 Alternative Behandlungsmethode auf siRNA Basis	17
2.7 Transfektionsverfahren.....	18
3 Material und Methoden	20
3.1 Material	20
3.1.1 Zelllinien	20
3.1.2 siRNA.....	22
3.1.3 Primer.....	23
3.1.4 Chemikalien und Reagenzien.....	24
3.1.5 Geräte	25
3.1.6 Verbrauchsmaterialien	26
3.2 Methoden.....	27
3.2.1 Kultivierung der Zellen	27
3.2.1.1 Kultivierung und Passagierung der Hautkrebszellen	27
3.2.1.2 Zellzählung.....	29
3.2.1.3 Kryokonservierung und Auftauen.....	30
3.2.1.4 Anzucht auf 12-Well-Platten.....	30
3.2.2 Transfektion Zellkultur mit siRNA	30
3.2.3 mRNA Isolierung	32
3.2.4 Konzentrationsmessung der mRNA und Umschreibung der mRNA in cDNA	32
3.2.4.1 Konzentrationsbestimmung der Gesamt-mRNA	32
3.2.4.2 Umschreibung der mRNA in cDNA	33
3.2.5 qRT-PCR (Quantitative Real-time PCR)	34
3.2.6 CASY-Analyse.....	35
4 Ergebnisse	37
4.1 Ergebnisse der Genexpression auf der mRNA-Ebene	38
4.1.1 Zelllinie A431	38

Abbildung 1: Relative Expression der Zelllinie A431, 24 Stunden nach der Transfektion mit 25 und 100 nM Akt3-siRNA und SCR-siRNA.	38
Abbildung 2: Relative Expression der Zelllinie A431, 24 Stunden nach der Transfektion mit 25 und 100 nM BRAF-siRNA und SCR-siRNA.	39
Abbildung 3: Relative Expression der Zelllinie A431, 24 Stunden nach der Transfektion mit 25 und 100 nM E2F1-siRNA und SCR-siRNA.	40
Abbildung 4: Relative Expression der Zelllinie A431, 24 Stunden nach der Transfektion mit 25 und 100 nM HIF1-siRNA und SCR-siRNA.	41
Abbildung 5: Relative Expression der Zelllinie A431, 24 Stunden nach der Transfektion mit 25 und 100 nM HIF2-siRNA und SCR-siRNA.	42
Abbildung 6: Relative Expression der Zelllinie A431, 24 Stunden nach der Transfektion mit 25 und 100 nM PAR-1-siRNA und SCR-siRNA.	43
Abbildung 7: Relative Expression der Zelllinie A431, 24 Stunden nach der Transfektion mit 25 und 100 nM SRF-siRNA und SCR-siRNA.	44
Abbildung 8: Relative Expression der Zelllinie A431, 24 Stunden nach der Transfektion mit 25 und 100 nM STAT3-siRNA und SCR-siRNA.	45
Abbildung 9: Relative Expression der Zelllinie A431, 24 Stunden nach der Transfektion mit 25 und 100 nM Survivin-siRNA und SCR-siRNA.	46
4.1.2 Zelllinie A375	47
Abbildung 10: Relative Expression der Zelllinie A375 24 Stunden nach der Transfektion mit 25 und 100 nM Akt3 -siRNA und SCR-siRNA.	47
Abbildung 11: Relative Expression der Zelllinie A375 24 Stunden nach der Transfektion mit 25 und 100 nM BRAF-siRNA und SCR-siRNA.	48
Abbildung 12: Relative Expression der Zelllinie A375 24 Stunden nach der Transfektion mit 25 und 100 nM E2F1-siRNA und SCR-siRNA.	49
Abbildung 13: Relative Expression der Zelllinie A375 24 Stunden nach der Transfektion mit 25 und 100 nM HIF1-siRNA und SCR-siRNA.	50
Abbildung 14: Relative Expression der Zelllinie A375 24 Stunden nach der Transfektion mit 25 und 100 nM HIF2-siRNA und SCR-siRNA.	51
Abbildung 15: Relative Expression der Zelllinie A375 24 Stunden nach der Transfektion mit 25 und 100 nM PAR-1-siRNA und SCR-siRNA.	52
Abbildung 16: Relative Expression der Zelllinie A375 24 Stunden nach der Transfektion mit 25 und 100 nM SRF-siRNA und SCR-siRNA.	53
Abbildung 17: Relative Expression der Zelllinie A375 24 Stunden nach der Transfektion mit 25 und 100 nM STAT3-siRNA und SCR-siRNA.	54
Abbildung 18: Relative Expression der Zelllinie A375 24 Stunden nach der Transfektion mit 25 und 100 nM Survivin-siRNA und SCR-siRNA	55
4.1.3 Zelllinie SKMEL 28	56
Abbildung 19: Relative Expression der Zelllinie SKMEL28 24 Stunden nach der Transfektion mit 25 und 100 nM Akt3-siRNA und SCR-siRNA.	56
Abbildung 20: Relative Expression der Zelllinie SKLM28 24 Stunden nach der Transfektion mit 25 und 100 nM BRAF- und SCR-siRNA.	57
Abbildung 22: Relative Expression der Zelllinie SKLM28 24 Stunden nach der Transfektion mit 25 und 100 nM HIF1-siRNA und SCR-siRNA.	59
Abbildung 24: Relative Expression der Zelllinie SKLM28 24 Stunden nach der Transfektion mit 25 und 100 nM PAR-1-siRNA und SCR-siRNA.	61
Abbildung 25: Relative Expression der Zelllinie SKLM28 24 Stunden nach der Transfektion mit 25 und 100 nM SRF-siRNA und SCR-siRNA.	62
Abbildung 26: Relative Expression der Zelllinie SKLM28 24 Stunden nach der Transfektion mit 25 und 100 nM STAT3-siRNA und SCR-siRNA.	63

5.4.3 Akt3	92
5.4.4 BRAF	93
5.4.5 HIFs	93
5.4.6 E2F1	94
5.4.7 PAR-1	96
5.4.8 Survivin	96
6 Zusammenfassung	98
Literaturverzeichnis	99
Abkürzungsverzeichnis	107
Lebenslauf	108

Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

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

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

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

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

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

Sigmaringen, den 10.10.2020

N. Pfeuffer

1 Ziel der Arbeit

Die Bevölkerung wird immer älter und die (Lebens)Zeitspanne, innerhalb der onkogene Faktoren auf den Körper des Menschen einwirken, nimmt zu. Daraus kann man schliessen, dass es zukünftig mehr Hauttumoren geben wird.

Das Robert Koch Institut weist daraufhin, dass die Inzidenz beim malignem Melanom in Deutschland seit 1970 um mehr als das fünffache zugenommen hat (RKI Zentrum Krebsregisterdaten, www.krebsdaten.de Melanom, (Zugriff 07.06.2020)).

Die heute zur Verfügung stehenden Therapiemethoden, die bei Hauttumoren, insbesondere bei denen, die bereits metastasieren, zur Anwendung kommen, sind oft mit Nebenwirkungen oder einhergehender Beeinträchtigung der Lebensqualität verbunden.

Verantwortlich für die Tumorentstehung sind oft Mutationen in den Signalwegen wie der RAS/RAF/MEK/ERK-Patway (Chang F. et alii, Molecular Targets for Therapy - Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention, doi.org/10.1038/sj.leu.2402945, (Abruf 07.06.2020)).

In den letzten Jahren gab es viele Neuerungen in der Forschung auf genetischer Ebene. Durch die Forschung in diesem Bereich entstanden Medikamente, die auf extrazelluläre und (in letzter Zeit zunehmend) intrazelluläre Signalübertragung - wirken. Sie werden Signaltransduktionsinhibitoren genannt (Signaltransduktionsinhibitoren als neue Option. Orthop. Rheuma 16, 58 (2013). doi.org/10.1007/s15002-013-0457-x (Abruf 07.06.2020)).

Mit der siRNA-Interferenz ergibt sich die Möglichkeit, in diese Signalwege einzugreifen, indem man die Genexpression für ein bestimmtes Gen stummschaltet.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen, ob die Anwendung von bestimmten siRNAs die anvisierte mRNA-Quantität von untersuchten Haut-Krebszellen verringert und diese Verminderung das Wachstums der Hautkrebszellen beeinflussen bzw. vermindern kann.

Dabei wurden im Rahmen dieser Arbeit die Hautkrebszelllinien A431, A375, SKMEL 28 und eine immortalisierte Keranozyten-Zelllinie HaCaT mit siRNAs gegen Akt3, BRAF, PAR-1, SRF, HIF1, HIF2, E2F1, STAT3 und Survivin, sowie einer nicht funktionellen SCR-siRNA als Kontrolle transfiziert.

Danach wurde die relative Transkriptmenge der mRNA mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) und die Auswirkung auf die Zellzahl mit dem CASY® cell counter System untersucht.

Auf Grund dieses Screenings der verschiedenen siRNAs an verschiedenen Zelllinien wäre es möglich, eine effektive Therapie durch einen gezielten Einsatz passender siRNAs für den entsprechenden Zelltyp zu gewährleisten.

2 Einleitung

2.1 Haut

Die Haut - lateinisch pellis - ist ein Organ, das aus mehreren Gewebeschichten besteht. Sie stellt die erste Kontakt- und Schutzgrenze des Organismus des Menschen (und der Wirbeltiere) zur Umwelt dar. Ihre Größe beträgt +2 qm beim erwachsenen Menschen.

Die Haut schützt Gewebe und Organe gegen äußere Angriffe. Sie hat hohe Resistenzfähigkeit gegenüber den meisten Infektionen. Daneben isoliert sie die innere Umgebung des Körpers zur Außenwelt und hilft, Wasserverlust zu vermeiden. Für äußere Flüssigkeiten ist sie teilweise durchlässig (semipermeabel).

Durch die Präsenz von Melanozyten hat sie eine Schutzfunktion gegen - insbesondere ultraviolette - Strahlen.

In der Haut befinden sich Nerven. Mit ihrer Hilfe kann der Mensch seine Umwelt erkunden, z. B. beim Tasten, der Wahrnehmung von Druck, der Temperaturen und von Schmerz.

Die Haut besteht aus drei verschiedenen Schichten, Epidermis, Dermis und Subcutis.

Die **Epidermis** ist ein mehrschichtiges, verhorntes Plattenepithel.

Sie besteht aus fünf Schichten (von basal nach apikal): Stratum basale, Stratum spinosum, Stratum granulosum, Stratum iucidum und Stratum corneum.

Die **Dermis** (Cornium, Lederhaut) ist ein Bindegewebe, das unter der Epidermis liegt und diese versorgt. Die Dermis liegt unter der Epidermis. Sie versorgt die Epidermis.

Strukturell ist sie ein Bindegewebe (eine Masse heterogener Zellen zum Zweck der Unterstützung von Organen, deren Verbindung und Austausch von Informationen und deren Unterscheidung voneinander). Sie besteht aus Zellen und Fasern, die in einer Matrix eingebettet sind. Die Hauptzellen sind Fibroblasten.

Diese Fibroblasten synthetisieren die extrazelluläre Matrix. In großer Zahl finden sich Histozyten, Mastzellen und Lymphozyten. In geringerer Zahl treten Melanozyten in Erscheinung.

In der Dermis gibt es außerdem Blutgefäße, Schweißdrüsen, Haarfollikel und sensorische Mechanorezeptoren.

Die Dermis gliedert sich in das Stratum papillare (20 Prozent) und das Stratum reticulare (80 Prozent).

Eine durch Proteine geschaffene Verbindung der basalen Keratinozyten mit den Basallamina und Kollagenfasern verankert im Bereich der Hemidesmosomen die Epidermis an die Dermis (Ulfig Norbert Histologie Seite 202).

Die **Subkutis** (Hypodermis, Unterhaut), die mit der Cutis verbunden ist, besteht aus lockerem Fettgewebe, welches von Bindegewebszügen durchgezogen wird. Dadurch kann die Kutis gegen die darunter liegenden Strukturen verschoben werden. Das Fettgewebe dient als Wärmeisolator, Energiespeicher und - an bestimmten Körperregionen - als Druckpolster.

Die Bindegewebsfasern der Subkutis sind (ebenso wie die der Dermis) in eine Grundsubstanz eingebunden. Diese enthält Hyaluronan und Proteoglykane, Makromoleküle mit Wasser bindenden Eigenschaften. Sie sind der Wasserspeicher der Haut (Lüllmann-Rauch Histologie Seite 534)

2.2 Hautkrebs

Unter dem engeren Begriff Hautkrebs werden bösartige (maligne) Neubildungen zusammengefasst, die aus unterschiedlichen Zelltypen der Haut entstehen (RKI, Gesundheitsberichterstattung des Bundes Heft 22 Hautkrebs Seite 7).

Im allgemeinen Sprachgebrauch bezeichnet Krebs eine Krankheit, die von einem Tumor (lat. tumor: Schwellung) verursacht wird.

Dabei bedeutet "Tumor" eine Neubildung oder Neoplasie (lat. neoplasia) von Körpergewebe durch dereguliertes Zellwachstum. Ein Tumor kann gutartig (lat. benignus) oder bösartig (lat. malignus) sein (Wagener Müller Molekulare Onkologie Seite 1).

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) definiert Krebs als „jede Neubildung in Form eines spontanen, autonomen und irreversiblen Überschusswachstums von körpereigenem Gewebe" (Wagener Müller Molekulare Onkologie Seite 1).

Eine weitere Definition spricht von einer "Neubildung, deren Wachstum und Differenzierung sich der Steuerung durch den übergeordneten Organismus weitgehend entzieht" (Schwenzer-Ehrenfeld, Zahn-Mund-Kiefer-Heilkunde Seite 57).

Nachfolgend werden die beiden Arten von Hautkrebs, die den Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit zugrundegelegt haben, dargestellt. Es handelt sich um das **Melanom** sowie das **Plattenepithelkarzinom**.

2.2.1 Malignes Melanom

Das maligne Melanom (von griechisch melas=schwarz), auch als „schwarzer Hautkrebs“ bezeichnet, ist die gefürchtetste Form von Hautkrebs und sorgt für die meisten Todesfälle durch Hautkrebs. Er ist stark coloriert bis komplett schwarz. Bei seiner Entstehung entarten Melanozyten, die das Hautpigment Melanin bilden. Melanome können rasch größer werden und dann auch Metastasen in Lymphknoten und inneren Organen bilden. Dabei lösen sich Zellen vom eigentlichen Tumor ab und

wandern mit der Lymphe oder mit dem Blut. Sie siedeln sich an anderen Körperteilen an und vermehren sich dort. Beim malignen Melanom besteht die Besonderheit, dass der Körper auf diese Zellen nicht oder nur schwach reagiert. Deshalb schreitet die Metastasierung beim Melanom rasch fort.

Der Krebs zeichnet sich durch die hohe Aggressivität und die Fähigkeit aus, Metastasen zu verschiedenen entfernten Standorten zu bilden (<https://altogen.com/product/sk-mel-28-transfection-reagent-melanoma-cells-htb72/> (Zugriff 29.05.2020)). Unter den Hautkrankheiten mit tödlichem Verlauf steht das maligne Melanom an erster Stelle. Neuerkrankungen nehmen zu (www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Melanom/melanom_node.html (Zugriff 05.02.2020)).

2.2.2 Plattenepithelkarzinom

Entstehungsursache ist vor allem starke und dauerhafte UV-Einwirkung, speziell bei hellhäutigen Menschen. Begünstigt wird die Entstehung des Plattenepithelkarzinoms durch sogenannte "aktinische Keratosen", auch "Präkanzerosen" genannt.

Unter Präkanzerose versteht man eine keratotische Veränderung auf der Haut, verursacht durch Lichtschädigung, Arsenexposition, Röntgentherapie oder auch Exposition von teerhaltigen Produkten. Charakteristisch ist eine raue, warzenähnliche, teilweise geschuppte Oberfläche. *"2013 starben 30 Männer und 14 Frauen an nichtmelanotischen Hauttumoren. Die Mortalitätsrate liegt für Männer bei 0,8/100.000 und für Frauen bei 0,2/100.000 und ist damit extrem niedrig"* (https://www.krebsregister-rlp.de/fileadmin/user_upload/dokumente/krebsarten/C44.-pdf - Abruf 19.07.2020)

2.3 Entstehung von Hautkrebs

Allgemein wird die von der Sonne ausgehende ultraviolette Strahlung als **der** Auslöser von kutanen Tumoren betrachtet. Diese Strahlung bewirkt direkt DNA-Schäden oder begünstigt deren Initiatoren wie Entzündungen und/oder die Unterdrückung bzw. Schwächung des Immunsystems. Neben der Verursachung von Hautkrebs durch ultraviolette Strahlung gelten Narben, chronische Hautgeschwüre, Viren als Verursacher ebenso wie eine erbliche Prädisposition.

Der Entstehung von Hautkrebs liegt immer eine Veränderung (Mutation) der Gene zugrunde, die die Verantwortung für einen unversehrten Gewebeverband tragen. Derartige Veränderungen, z.B. Störungen im Zusammenhang der Reparatur der DNA (besonders beim Xeroderma pigmentosum) sind die Ursache für ein unkontrolliertes Wachstum der Zellen. Etwa fünf bis zehn Prozent aller malignen Melanome haben einen familiären Ursprung (Garbe Claus et alii, Dermatologische Onkologie, Seite 247).

Die Ursache für die Entstehung von Krebs kann erblich angelegt (erbliches Tumorsyndrom) sein. Etwa 5-12 % aller Melanome sind familiär (Garbe et alii, Management des Melanoms, Seite 4). Diese Menschen haben bereits in jungen Lebensjahren ein beachtlich erhöhtes Risiko, an Krebs zu erkranken. Rotblonde Menschen tragen erhöhtes Risiko, einen durch UV-Strahlen induzierten Hauttumor zu erwerben (Lüllmann-Rauch, Histologie, Thieme Verlag 3. Auflage 2009 Seite 532).

Die Gene, die davon betroffen sind, spielen eine wesentliche Rolle bei der Kontrolle des Zellzyklus oder der Beseitigung von Schäden der DNA.

Zurückzuführen ist das gestiegene Krebsrisiko auf eine Veränderung der Erbanlagen (Gene). Man spricht in einem solchen Fall von einer "monogen erblichen Erkrankung". Bei erblichen Tumorerkrankungen liegt meist eine „Keimbahnmutation“ vor. Das bedeutet, dass bereits potentiell in jeder Zelle Krebsentstehung initiiert ist. Solche Menschen erkranken meist in jungen Jahren an Krebs.

Krebs entsteht allerdings erst dann, wenn bei der Zytokinese **weitere Veränderungen** hinzukommen, die die Entstehung von Krebs begünstigen (Rahner Nils und Steinke Verena, Deutsches Ärzteblatt 2008 105_41_ 706-13 DOI 10.3238 .arztebl.2008.0706.pdf (Abruf 29.05.2020)).

Narben und chronische Hautgeschwüre gelten ebenfalls als potentielle Auslöser von Hautkrebs, vor allem, wenn die Haut durch radioaktive Strahlung vorgeschädigt ist (Garbe et alii, Tumoren der Haut, Seite 5).

2.4 Konservative Behandlungsmethoden der Hauttumoren

Standardmethode bei allen Arten des Hautkrebses ist die Operation. Alternativ und/oder ergänzend werden weitere Therapien angewendet wie Strahlentherapie (Bestrahlung), Chemotherapie, Photodynamische Therapie oder Immuntherapie.

2.4.1 Malignes Melanom

In erster Linie steht die Entfernung des malignen Melanoms durch Operation bei Lokalanästhesie und folgender lokaler Lappenplastik.

Dies gilt sowohl für den Primärtumor als auch für Hautmetastasen. Behandlungsziel ist immer die operativ erzielte Tumorfreiheit, die in Einzelfällen zu einem langzeitigen Überleben oder gar Heilung geführt haben soll.

Alleinige Strahlentherapie, Thermoradiotherapie sowie „adjuvante Chemotherapie“ spielen bei der Behandlung des malignen Melanoms praktisch keine Bedeutung. Sie scheinen lediglich als Mittel der „effektiven Palliation“ bei inoperablen Hautmetastasen, Knochenmetastasen und Hirnmetastasen Geltung zu haben.

Eine „*adjuvante Immuntherapie mit Interferon*“ soll nach Garbe „*eine signifikante Verlängerung der rezidiv freien Überlebenszeit*“ zur Folge haben können (Garbe et alii, Interdisziplinäre Leitlinien zur Diagnostik und Therapie von Hauttumoren Seite 35).

Bei dünnen Melanomen (Dicke des Tumors <0.8 mm) und frühzeitiger Diagnose und Behandlung bestehen gute Heilungsaussichten. Dies gilt vor allem dann, wenn die basale Membran zwischen Dermis und Epidermis noch unverletzt ist (sog. „in situ Melanome“).

2.4.2 Plattenepithelkarzinom

Beim Plattenepithelkarzinom, auch Spinaliom genannt, gilt als die erste Therapie die operative Entfernung des befallenen Gewebes.

Allerdings sind oft die unteren Hautschichten betroffen bis in die Knorpel, die Skelettmuskulatur und/oder Knochen. In diesem Fall führt die Entfernung des tumorbefallenen Gewebes häufig zu erheblichen rekonstruktiven Maßnahmen.

Bei umfangreichem Befall oder bei Schwierigkeiten bei der Entfernung des Tumorgewebes wird Strahlentherapie in Kombination mit Chemo- und/oder Immuntherapie empfohlen. Wenn die Metastasen bereits fern vom Ursprungsort liegen, wird eine sehr ungünstige Prognose gestellt. Lediglich im Sinn einer palliativen Massnahme wird dann die Verringerung befallenen Gewebes angezeigt sein.

Insbesondere bei ausgedehnten Tumoren sei eine multimodale Therapie angezeigt, d. h. eine Kombinationstherapie von Strahlentherapie, Chemo-/Immuntherapie sowie chirurgische Interventionen (Garbe et alii, Interdisziplinäre Leitlinien zur Diagnostik und Therapie von Hauttumoren Seite 13ff).

Nach einer Pressemitteilung des Universitätsklinikums Tübingen vom 21.7.2008 seien beim Plattenepithelkarzinom der Haut (auch Spinaliom genannt) "*mit einer operativen Frühtherapie praktisch 100 Prozent aller weißen Hautkrebse auf Dauer heilbar.*" (idw-online.de/de/news271491 Stand 23.09.2019). Es sei eine Rezidivrate beim Plattenepithelkarzinom auf rund 2 Prozent, beim Basalzellkarzinom auf 1 Prozent erreicht worden.

2.5 RNAinterferenz

Die RNA-Interferenz (RNAi) ist eine Methode zur zielgerichteten Unterdrückung bestimmter Gene.

Bei der RNA Interferenz bewirken doppelsträngige RNA-Moleküle eine Abschaltung oder Minderung der Genexpression durch den Abbau von mRNA.

Das ist ein natürlicher Abwehrmechanismus der Zelle, der die Pflanzen gegen virale Angriffe schützt.

Eukariotische Zellen haben diesen Mechanismus zur Kontrolle ihrer Genexpression entwickelt, die durch microRNA zustande kommt. Dabei werden zielgerecht mRNA-Moleküle neutralisiert.

Der Eingriffspunkt während der Genexpression liegt zwischen Transkription und Translation.

Das bedeutet, dass das Transkriptionsprodukt mRNA nicht sein Ziel, nämlich die Information zur Herstellung eines bestimmten Proteins in den Ribosomen, erreicht. Die Translation findet nicht statt, das Gen ist stumm geschaltet.

Die erste Ausschaltung der Genexpression wurde in pflanzlichen Zellen in den 90er-Jahren des vergangenen Jahrhunderts durch Zufall entdeckt. Eigentlich wollte man die Blütenfärbung von Petunien verstärken. Dabei zeigte sich als Ergebnis, dass die Blütenfarbe bis hin zu einer weißen Blütenfarbe an Intensität verlor (Napoli C. et alii, Introduction of a chalcone synthase ...). Damals wusste man noch nicht, dass der Grund für das Herunterfahren der genetischen Expression in der RNA-Interferenz liegt.

Im Jahr 1998 veröffentlichten die Wissenschaftler Andrew Fire und Craig C. Mello ihre Arbeit über die RNA-Interferenz bei dem Nematoden-Wurm *Caenorhabditis elegans*. (Fire A. et alii, Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*, Nature. DOI: 10.1038/35888 (Zugriff 12.10.2019)) Diese Arbeit brachte ihnen schließlich im Jahr 2006 den Nobelpreis für Physiologie/Medizin ein.

2.5.1 RNA-Interferenz Ablauf

SiRNAs sind doppelsträngige RNAs, die aus 21-25 Nukleotiden bestehen. Sie werden aus dsRNA gebildet, die durch RNA-Polymerase III synthetisiert wird. DsRNAs können aus Tausenden von Basenpaaren bestehen.

Man unterscheidet zwischen exogener dsRNA (entsteht als Folge einer viralen Infektion) und endogener dsRNA.

Der Weg zur siRNA-Interferenz beginnt mit der Spaltung der dsRNA mit Hilfe der Endonuklease, die Dicer genannt wird. Dabei entstehen Abschnitte mit 21-25 Nukleotiden.

Ein Strang der siRNA - der sogenannte Leitstrang - wird dann an Argonaute-Protein (AGO2) gebunden. Dieses AGO2 bildet das Zentrum des sogenannten RNA-induzierten Abschaltungskomplexes (RISC). In der Zeit, in der der Leitstrang gebunden wird, wird der andere Strang durch das Argonaute-Protein gespalten und abgestossen.

So kann der verbleibende siRNA-Strang mit passender Zielsequenz von mRNA binden und sie zerschneiden. Zerkleinerte RNA wird abgestossen. Die entstandenen kleineren mRNA-Fragmente sind sehr instabil und werden durch intrazelluläre Nukleasen abgebaut.

Damit wird die Genexpression bestimmter Proteine heruntergefahren oder komplett inaktiviert (Graw Genetik Seiten 300ff).

2.5.2 Zielproteine für die siRNA basierte Therapie

2.5.2.1 RAC-gamma serine/threonine-protein-kinase (AKT3)

Akt ist eine Serin-Therosinkinase, die auch Proteinkinase B(PKB) genannt wird. Sie entfaltet ihre Wirkung durch einen intrazellulären Signalweg durch Anlagerung an PI3K. Durch diese Bindung gelangt sie in das Zellinnere.

Akt phosphoryliert dann viele andere Proteine, diese führen zu Wachstum und zum Überleben der Zelle (Alberts et alii., Molecular Biology of The Cell Loseblatt Stand 2017 (Stand 17.01.2018).

Die Gruppe der Akt-Gene umfasst die drei Mitglieder Akt1, Akt2 und Akt3.

Die Proteinkinase Akt ist an verschiedenen Signalwegen beteiligt.

Ohne Wachstumsfaktoren geht eine gesunde Zelle nach kurzer Zeit durch Apoptose unter. Wachstumsfaktoren sichern das Überleben der Zelle und verhindern die Apoptose vor allem durch direkte und indirekte Aktivierung des Akt-Signalwegs.

Die durch Akt vermittelte Phosphorylierung des Proteins BAD sowie anderer Proteine der Bcl-2-Familie führt zur Dissoziation des Bcl- 2/ Bel-X-Komplexes, was zum Verlust der apoptoseaktivierenden Funktion von BAD führt. Akt phosphoryliert auch Transkriptionsfaktoren der FOXO-Gruppe.

In der normalen Zelle aktivieren FOXO-Proteine die Transkription zellzyklus-hemmender Gene und hemmen die Transkription zellzyklusaktivierender Gene.

Die Akt-vermittelte Phosphorylierung der FOXO-Proteine führt zu deren Export aus dem Zellkern. Damit wird der hemmende Einfluss der FOXO-Proteine auf den Zellzyklus aufgehoben, und Zellzyklus und Zellteilung werden indirekt aktiviert.

Akt aktiviert auch die IKK (IkB-Kinase), die dann IkB (Inhibitor of nuclear Factor-kB) phosphoryliert. Dann kommt es zu einem proteasomalen Abbau von IkB, was zur einer Konzentration des Transkriptionsfaktors NF-kB (Nuclearfactor-kB) im Zellkern führt.

Hier kann NF-kB die Transkription proliferationsfördernder und apoptosehemmender Gene aktivieren.

Tatsächlich ist NF-kB in verschiedenen Zellen für die Transformation durch den PI3K/AKT-Signalweg erforderlich.

Wenn die nukleäre Lokalisation von NF-kB in bestimmten Tumorzellen durch spezifische Peptidantagonisten gegen eine nukleäre Lokalisationssequenz verhindert wird, kommt es zur Apoptose.

Akt kann auch das Proto-Onkoprotein Mdm2 (Murine double Minute 2) phosphorylieren, was dann zur hemmenden Wirkung auf p53 führt (Wagener Müller, Molekulare Onkologie Entstehung, Progression, Seite 239f).

Akt wird häufig und bei einer Vielzahl von Krebsarten beim Menschen aktiviert. Es ist bekannt, dass Akt Resistenzen gegen herkömmliche Krebstherapien hervorruft.

Deshalb gibt es erhebliche Gründe, den Akt-Weg für die Entdeckung neuer Arzneimittel zu verfolgen (Altomare Deborah et alii, Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer - Oncogene (2005) 24, 7455-7464 Nature Publishing Group).

2.5.2.2 B-Rapidly growing fibrosarcoma (BRAF)

BRAF ist ein Protein. Es gehört zur Serin-Tyrosinkinase-Familie und ist ein Produkt der RAF-Gene. Zur dieser Familie gehören noch die beiden Kinasen BRAF und RAF1.

BRAF ist beteiligt an der Aktivierung des tumorrelevanten MAPK- Signalwegs, der die Zellteilung und ihre Differenzierung beeinflusst.

BRAF wird durch die Src-Kinase phosphoryliert. Dadurch wird es aktiv und phosphoryliert und aktiviert seinerseits die Kinasen MEK 1 und MEK 2. Diese wiederum aktivieren die Kinasen ERK 1 und 2.

Die ERK1/2 - Aktivierung führt zur Phosphorylierung und Aktivierung von zahlreichen Transkriptionsfaktoren. Diese binden dann an spezifische Sequenzmotive der DNA und aktivieren die Transkription von Zielgenen (Wagener/Müller, Molekulare Onkologie Seite 234 und 228-229).

Am häufigsten tritt in diesem Gen die V600E-Mutation auf. Sie wurde auch bei verschiedenen anderen Krebsarten identifiziert, darunter Non-Hodgkin-Lymphom, Darmkrebs, Schilddrüsenkarzinom, nicht-kleinzelligem Karzinom, Lungenkarzinom, Haarzellenleukämie und Adenokarzinom der Lunge (Wan PT et alii. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogene mutations of B-RAF) sowie (H-T Arkenau et alii, Targeting BRAF for patients with melanoma Minireview British Journal of Cancer (2011) 104(3), Seite 392).

Zwei BRAF Inhibitoren, welche das mutierte BRAF hemmen und in der Monotherapie des metastasierten Melanoms verwendet werden, sind Vemurafenib und Dabrafenib.

Durch diese Substanzen lassen sich bei BRAF-mutierten Patienten Ansprechraten von 50 bis 60 Prozent erzielen.

Das mittlere Überleben wird in den bisher vorliegenden Studien auf bis zu 20 Monate verlängert.

Der Therapieerfolg ist jedoch häufig nicht von Dauer. Nach durchschnittlich sieben Monaten kommt es zu einem erneuten Wachstum der Metastasen (Ralf Gutzmer in Deutsches Ärzteblatt Heft 45 2014 Seite 24).

Danach (2018 von der EU zugelassen) folgte Braftovi, ein von der Firma Pierre Fabre Medicament vertriebenes Arzneimittel. Es ermöglicht die Behandlung von Melanomen in einem Stadium, in dem der Krebs nicht mehr operabel ist. Braftovi wird nicht allein, sondern i. V. m. anderen Medikamenten, z. B. Binimetinib (Mektovi) appliziert.

Die alleinige Patientengruppe besteht aus Personen, bei denen in den Krebszellen eine Veränderung in dem BRAF-V600- aufgetreten ist.

Wirkstoff ist Encorafenib, der als Proteinkinaseinhibitor BRAF hemmt (www.ema.europa.eu/en/documents/overview/braftovi-epar-medicine-overview_de.pdf (Stand 09.10.2019)).

2.5.2.3 Transcription factor E2F1 (E2F1)

E2F1 ist ein Transkriptionsfaktorprotein, das zur E2F-Familie gehört. Diese Familie beinhaltet sieben Mitglieder, nämlich E2F1, E2F2, E2F3, E2F4, E2F5, E2F6 und E2F7 (Manicum Theasha et alii, Prognostic values of E2F mRNA expression in human gastric cancer in Bioscience Reports (2018) 38 BSR20181264 (Abruf 30.05.2020)).

E2F-Proteine sind für die Überschreitung des Restriktionspunkts und den Eintritt der Zelle in die S-Phase von entscheidender Bedeutung.

Diese Proteine entfalten ihre Wirkung durch die Einlagerung sogenannter DP-Proteine (DP 1 und 2) an transkriptionell aktive Heterodimeren.

E2F1-3 bindet Sequenzen der Bindungstasche des Rb-Proteins in seiner hypophosphorylierten Form.

Durch die Bindung hemmt Rb die Transkriptionsaktivierung durch E2F. Solange Rb aktiv ist, ist E2F also inaktiv. Die DNA kann nicht repliziert werden. In seiner freien Form aktiviert E2F1 die Transkription von Genen, deren Produkte für den Eintritt in die S-Phase und die Replikation der DNA benötigt werden.

Die zentrale Bedeutung von E2F1 für den Eintritt in die S-Phase wird durch Experimente belegt, in denen E2F1 entweder überexprimiert, oder die Wirkung von E2F-Transkriptionsfaktoren blockiert wurde (Wagener Müller, Molekulare Onkologie Entstehung, Progression, klinische Aspekte 2010, Thieme 3. Auflage 2010).

Bei den meisten Krebsarten des Menschen werden die E2F-Transkriptionsfaktoren über verschiedene molekulare Mechanismen, die die Rb-Familie inaktivieren, verändert und dereguliert.

Die E2F1-Expression bedeutet eine schlechte Prognose bei malignen Erkrankungen (Manicum Theasha et alii, Prognostic values of E2F mRNA expression in human gastric cancer Bioscience Reports (2018) 38 BSR20181264); siehe auch (Nevins, JR. (2001) The RbE2F pathway and cancer. Hum. Mol. Genet. 10, 699–703 (Abruf 30.05.2020)).

2.5.2.4 Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)

Bei STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transkription) handelt es sich ebenfalls um einen Transkriptionsfaktor. Er gehört zu der Familie der "latent cytoplasmatischen" Transkriptionsfaktoren. Er vermittelt die Reaktionsfähigkeit von Zellen auf verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren wie Interferone (IFNs), Interleukin 2 (IL-2), Interleukin 6 (IL-6), Interleukin 10 (IL-10), Interleukin 12 (IL-12), Erythropoietin (EPO) und Granulocyte-Colony-stimulating Factor (G-CSF).

Durch die Aktivierung des Zytokinrezeptors beginnt der JAK/STAT-Signalweg. Zuerst phosphorylieren sich Tyrosinkinasen JAK1 und JAK2 gegenseitig und den Rezeptor, und dann bindet das Protein STAT3 mit seinen SH2-Domänen an diesen Tyrosinresten. Dadurch wird STAT3 phosphoryliert.

Durch die Phosphorylierung wird das Protein dimerisiert und wandert in den Zellkern wo es Einfluss auf das Wachstum und Überleben der Zelle nimmt (Wagener Müller, Molekulare Onkologie).

Bei einer Vielzahl von Tumoren ist die Aktivität von STAT3 dereguliert. Bei Kopf- und Halstumoren sowie nicht kleinzelligen Lungentumoren sind mutierte EGFRs für die dauerhafte Phosphorylierung von STAT3 verantwortlich.

Bei vielen Melanomarten wird STAT3 dauerhaft von Srs phosphoryliert (Li-fang Gao et alii., Inhibition of STAT3 expression by siRNA suppresses growth and induces apoptosis in laryngeal cancer cells, <https://www.nature.com/articles/aps200558> (Abruf 30.05.2020)) siehe auch Makowiecki Christina et alii. New Basic Approach to Treat Non-Small Cell Lung Cancer Based on RNA-interference, DOI: 10.1111/1759-7714.12065 (Abruf 30.05.2020).

Daraus folgt, dass STAT3 ein Targeting für die wirksame Strategie in der Behandlung derjenigen Hauttumoren darzustellen in der Lage ist, die durch diese Mutationen gekennzeichnet sind.

2.5.2.5 Hypoxie-induzierter Faktor (HIF1 und HIF2)

HIFs sind Transkriptionsfaktoren, welche die Expression von Genen auf einen hypoxischen Stimulus hin regulieren (Semenza GL, Targeting HIF-1 for cancer therapy, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13130303/> DOI: 10.1038/nrc1187) (Abruf 31.05.2020).

Beim Auftreten einer Hypoxie wirken systemische und intrazelluläre Veränderungen zusammen, um eine hypoxische Schädigung zu minimieren und eine ausreichende Sauerstoffversorgung wiederherstellen.

HIF wurde durch seine Wirkung als Transkriptionsaktivator von Erythropoitin entdeckt. Unter seiner Kontrolle befinden sich alle intrazellulären hypoxischen Reaktionen im gesamten Körper (Thomas G Smith et alii, The human side of hypoxia-inducible factor, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2408651>) (Abruf 31.05.2020).

HIFs gehören zur den basischen Helix-Loop-Helix-Transkriptionsfaktoren (bHLH). Sie binden an spezifische Sequenzen in Promotoren der Zielgene.

Die Transkriptionsfaktoren bestehen aus einer gemeinsamen β -Einheit, die mit jeweils einer von drei α -Einheiten dimerisiert. Es sind 3 Isoformen bekannt: HIF-1 α , HIF-2 α und HIF-3 α .

Die Stabilität der α -Untereinheit reguliert die Aktivität von HIFs. Jeder HIF-1 α und HIF-2 α Faktor hat seine spezifischen Gene als Wirkungsort, aber zur Stimulation von diesen Genen kommt es nur durch die gemeinsame Wirkung von HIF-1 α und HIF-2 α Faktoren. Bei einem niedrigen Sauerstoffgehalt nimmt die Aktivität der HIF-1 α und HIF-2 α ständig zu. Sobald der Sauerstoffgehalt im Gewebe sich erhöht, werden diese Transfektionsfaktoren sehr schnell abgebaut.

Die Veränderung des Sauerstoffgehalt im Gewebe wird von den Dioxygenasen wahrgenommen und weiter auf HIF-1 α geleitet.

Zu den metabolischen Enzymen, die den Abbau und die Inaktivierung der HIF-1 α -Untereinheiten kontrollieren, zählen Enzyme, die Prolylhydroxylasedomänen (PHDs) besitzen und die Asparaginhydroxylase. Die PHD-Prolylhydroxylase hydroxylieren zwei Prolinreste der HIF-1- α -Untereinheiten. In diesem Zustand sind HIFs nicht aktiv, und werden vom Hippel-Lindau-Tumor-Suppressor-Protein abgebaut.

Mutationen in diesem Abschnitt, bei denen es nicht zur Hydroxylierung von Prolinresten vom HIF kommt, führen in bestimmten Organen zu multiplen, hoch vaskularisierten Tumoren wie z.B. Phäochromozytom oder Hämangioblastom.

Die andere Dioxygenase, die die Aktivität von HIF hemmt, ist die Asparaginyhydroxygenase. Sie wird auch "HIF-1-inhibierender Factor" (Factor inhibiting HIF-1 α , FIH) genannt. Dieses Enzym hydroxyliert einen Asparaginrest in der C-terminalen Transaktivierungsdomäne von HIF-1 α .

Auch andere Wege, z. B. Wachstumsfaktoren regulieren HIF-1- α , unabhängig von der Sauerstoffspannung im Gewebe.

Die Wachstumsfaktoren führen zur Aktivierung der HIF-1- α , sodass die Tochterzellen, die bei der Zellteilung entstehen, vor Sauerstoffmangel geschützt werden.

In den Tumoren ohne funktionelles VHL ist HIF-1 α erhöht, was zur Aktivierung des Hypoxie-Antwort-Elements (HREs) führt. Dieses befindet sich an der regulatorischen Sequenz von Genen, deren Produkte an verschiedenen sauerstoffarmen Funktionen beteiligt sind (Wagener Müller, Molekulare Onkologie Entstehung ... Seite 317ff).

Aus dieser Sicht spielen diese Gene eine bedeutende Rolle beim Tumorwachstum.

2.5.2.6 Protease-activated receptor-1 (PAR-1)

PAR (man unterscheidet 4 verschiedene Arten) ist ein Protease-aktivierter Rezeptor. Er gehört zur Unterfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und vermittelt damit die zellulären Wirkungen von Proteasen.

PAR wurde im 1991 als funktioneller Thrombinrezeptor entdeckt (Rasmussen Ulla B. et alii, DNA cloning and expression of a hamster α -thrombin receptor coupled Ca^{2+} mobilization, und erst nach Entdeckung weiterer PAR Mitglieder als "PAR-1" benannt.

Die Protease-aktivierten Rezeptoren werden von vielen Zelltypen exprimiert, Thrombozyten, Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Neuronen, Astrozyten, Immunzellen, Mastzellen, krebssassoziierten Fibroblasten und Epithelzellen.

Hauptsächlich werden PARs in Endothelzellen exprimiert, und in der Regulation des Gefäßtonus beteiligt.

In den glatten Muskelzellen vermitteln PARs die Kontraktion, Migration, Proliferation, Hypertrophie und Produktion der extrazellulären Matrix (Hirano Katsuya, The Roles of Proteinase-Activated Receptors in the Vascular Physiology and Pathophysiology).

Am meisten untersucht ist die Unterfamilie PAR-1.

PAR-1 besteht aus 415 Aminosäuren sowie fünf funktionellen Domänen: Einem extrazellulären N-Terminal, einer extrazellulären Schleife sowie 7 hydrophoben transmembranen Domänen, einer intrazellulären Schleife und einem intrazellulären C-Terminal.

PAR-1 wird irreversibel aktiviert durch Thrombin, den Gewebefaktor (TF), den endothelialen Protein C-Rezeptor (EPCR) sowie MMPs.

Nachgewiesenermaßen ist PAR-1 nicht nur an normalen biologischen Funktionen, sondern auch an der Tumorentstehung beteiligt (Xuan Liu et alii Protease-activated receptor-1 (PAR-1): a promising molecular target for cancer, *Oncotarget*, 2017, 8, (No. 63), pp: 107334-107345, 107334).

PAR-1 fördert die Proliferation, Invasion und Metastasierung bei Melanomen. Bei zielgerichteter Verwendung von siRNA gegen PAR-1 lässt sich eine Hemmung des Wachstums beim Melanomen feststellen (Zigler M, et alii, PAR-1 and thrombin: the ties that bind the microenvironment to melanoma metastasis. *Cancer Res.* 2011;71:6561–6 - <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-1432>), siehe auch

Villares Gabriel J. et alii, Targeting Melanoma Growth and Metastasis with Systemic Delivery of Liposomal Incorporated PAR-1 siRNA doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2397 (Abruf 31.05."020).

Wegen seiner Eigenschaften hat PAR-1 einen Platz in der Krebsforschung. Durch das Verständnis seiner Funktion bei malignen Krebserkrankungen eignet sich PAR-1 als therapeutisch verwendbares Angriffsziel bei entsprechenden Tumoren.

2.5.2.7 Serum response factor (SRF)

Serum Response Factor (SRF) ist ein Transkriptionsfaktor und ein Mitglied der MADS-Box-Proteine.

Es wird seit seiner Entdeckung im Jahr 1988 beforscht (Nordheim Alfred, SRF, ein multi-talentierte Transkriptionsfaktor, BIOSpektrum 504-10 Jahrgang, S. 666-667).

Die MADS-Box besteht aus 56 Aminosäuren und bildet eine hochkonservierte DNA-Bindungsdomäne.

Mehrere Mitglieder der MADS-Box bilden Dimere und haben zwei funktionelle Regionen.

Der N-terminale Teil ist für die DNA-Bindungsspezifität und der C-terminale Teil für die Dimerisierung verantwortlich (Shore Paul, The MADS-box family of transcription factors).

Die DNA Bindungsstellen der MADS-Box-Proteine bestehen aus folgender Nukleotidreihenfolge: CC(A/T)₆GG, die CARG-Box genannt wird. Diese CARG-Box kann theoretisch mit ihren 10-Basenpaaren bis 1216 Permutationen (Umstellungen) bilden (Joseph M Miano et alii, Serum Response (Factor: Master Regulator of the Actin Cytoskeleton and Contractile Apparatus, doi: 10.1152/ajpcell.00386.2006) - Abruf 31.05.2020).

Davon wurden mehr als 200 SRF- Zielgene mit der Hilfe der Chromatin-Immunpräzipitation mit Anti-SRF-Antisera identifiziert (Cooper Sara J., Serum Response Factor Binding Sites Differ in Three Human Cell Types, doi: 10.1101/gr.5875007 (Abruf 31.05.2020)).

SRF bindet an der Promotorregion des Zielgens an der CARG-Box und reguliert damit deren transkriptionelle Aktivität (Nordheim Alfred, SRF, ein multi-talentierte Transkriptionsfaktor S. 666-667 (Abruf 31.05.2020)).

Dabei nehmen die MADS-Box-Proteine andere spezifische Transkriptionsfaktoren als Unterstützung. Diese werden "Cofaktoren" genannt (Shore Paul, The MADS-box family of transcription factors).

Die verschiedenen Klassen von SRF-Zielgenen werden durch bestimmte Cofaktoren zur signalspezifischen Regulation gesteuert.

Zur Klasse-I-Zielgene gehören Gene, die Proteine für frühere Zellfunktionen sowie der schnellen Transkriptionsaktivierung von Genen, die für am Übergang G0/G1 beteiligte Proteine codieren.

Diese SRF-Zielgene werden von TCF-Cofactoren wie: Elk1, SAP1 und SAP2 Proteinen unterstützt (Halene Stephanie et alii, Serum response factor is an essential transcription factor in megakaryocytic maturation).- siehe auch Eric N. Olson & Alfred Nordheim, Linking actin dynamics and gene transcription to drive cellular motile functions, <https://doi.org/10.1038/nrm2890> (Abruf 31.05.2020).

Die Klasse-II-Zielgene werden durch SRF in Verbindung mit Myocardin oder anderen MRTF-Cofaktoren reguliert.

Diese Gene codieren für Proteine, die an muskelspezifischen und kontraktilen Funktionen, der Dynamik und Beweglichkeit von Aktinmikrofilamenten und miRNA-Aktivitäten beteiligt sind (Eric N. Olson & Alfred Nordheim, Linking actin dynamics and gene transcription to drive cellular motile functions Seiten 353-365, <https://doi.org/10.1038/nrm2890> (Abruf 31.05.2020)).

Mit den megakaryoblastischen Leukämie-1 (Mkl1) und megakaryoblastischen Leukämie 2 (Mkl2) Proteinen, die zur Miokardin-Proteinfamilie gehören, beeinflusst SRF die Hämatopoese (Halene Stephanie et alii, Serum response factor is an essential transcription factor in megakaryocytic maturation).

In den embryonalen Stammzellen reguliert SRF die Ausbildung des Aktin-Zytoskeletts und die mesodermale Differenzierung. In der Embriogenese während der Gastrulation ist SRF für die Wanderung von mesodermalen Vorläuferzellen und die Zell-Zell-Wechselwirkung und die Bildung von Fokalkontakten und Zellausläufern sehr wichtig (Schratt Gerhard).

SRF ist an der Apoptose, dem Zellwachstum, der Differenzierung und der Zellzyklusregulation beteiligt (Halene Stephanie et alii, Serum response factor is an essential transcription factor in megakaryocytic maturation).

Bei dem Wachstum und der Metastasierung von Tumoren spielt die Adhäsion und Migration von den Zellen eine Rolle, bei der SRF beteiligt sein könnte

2.5.2.8 Survivin

Survivin ist ein Protein, das zur Familie der Apoptose-Hemmer (IAP) gehört. Strukturell besteht es aus einer BIR-Domäne (Baculovirus-IAP-Repeat), die an der 70-Aminosäure Zink-Fingerfalte liegt und eine helikale "Coiled-Coil domain" am verlängertem COOH -Terminus hat (Altieri Dario C., Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer, *Oncogene* 2003; volume 22, pages 8581-8589 (<https://www.nature.com/articles/1207113> (Zugriff 14.10.2019))).

Während des Zellzyklus wird Survivin in der G2-M -Phase hochexprimiert und in der G1-Phase nimmt seine Konzentration schnell ab (Praveen Kumar Jaiswal et alii, Survivin: A molecular biomarker in cancer, *Indian J Med Res.* 2015 Apr; 141(4): 389–397 (doi: 10.4103/0971-5916.159250 - Zugriff 06.06.2020)).

Bei der Embryonalentwicklung ist das Protein für die richtige Zellkernteilung und damit die vollständige Weitergabe der Chromosomen an den Tochterzellen verantwortlich.

Im gesunden Gewebe von Erwachsenen ist das Protein nicht nachweisbar (Ambrosini G. et alii, A Novel Anti-Apoptosis Gene, Survivin, Expressed in Cancer and Lymphoma, PMID: 9256286 DOI: 10.1038/nm0897-917 (Zugriff 06.06.2020)).

Allerdings kommt Survivin in den adulten Zellen, die seine proliferierenden Eigenschaften erhalten haben, vor allem in T- Lymphozyten, hämatopoetischen Zellen, polymorphkernigen Neutrophilen und vaskulären Endotelzellen vor.

Survivin soll auch an der Proliferation und dem Überleben der vorgenannten Zellen beteiligt sein (Seiji Fukuda, Louis M Pelus, Survivin, a Cancer Target With an Emerging Role in Normal Adult Tissues, PMID: 16731740 DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-05-0375 (Zugriff 06.06.2020)).

Seine Wirkung entfaltet Survivin durch die Inhibierung der Caspaseaktivität, was darauf zu einer negativen Reaktion der Apoptose, also des programmierten Zelltodes führt (Walker T. et alii (Zugriff 06.06.2020)).

Dabei werden Mitglieder der Caspase-Cystein-Protease-Familie wie die Caspasen 3, 7 und 9 gehemmt; (Tamm Ingo et alii, IAP-Family Protein Survivin Inhibits Caspase Activity and Apoptosis Induced by Fas (CD95), Bax, Caspases, and Anticancer Drugs (<https://cancerres.aacrjournals.org/content/canres/58/23/5315.full.pdf> (Zugriff erfolgt am 06.06.2020)).

Viele Studien berichten über eine Überexpression von Survivin bei malignen Tumoren, bei Lungen-, Dickdarm-, Bauchspeicheldrüsen-, Prostata- und Brustkrebs sowie in 50% der hochgradigen Non-Hodgkin-Lymphome (Ambrosini G. et alii, A Novel Anti-Apoptosis Gene, Survivin, Expressed in Cancer and Lymphoma, (PMID: 9256286 DOI: 10.1038/nm0897-917 - Zugriff 06.06.2020)) sowie Leukämie (Mori Ako et alii, Expression of the Antiapoptosis Gene Survivin in Human Leukemia, (PMID: 11939262 DOI: 10.1007/BF02982021)) und malignes Melanom (Nasr Michel R., Comparison of pHH3, Ki-67, and Survivin Immunoreactivity in Benign

and Malignant Melanocytic Lesions, PMID: 18360113 DOI: 10.1097/DAD.0b013e3181624054 (Zugriff 06.06.2020)).

Die Arbeit von Fan Y und Chen J. hat bestätigt, dass Survivin auch bei Gebärmutterkrebs überexprimiert und eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und Metastasierung spielt, was lange umstritten war (Yibing Fana and Juan Chenb, Clinicopathological significance of survivin expression in patients with cervical cancer: A systematic meta-analysis, (PMID: 28051906 doi: 10.1080/21655979-2016.1252879 (Zugriff 06.06.2020)).

2.6 Alternative Behandlungsmethode auf siRNA Basis

Die aktuell verwendeten Behandlungsmethoden (Operationen, Strahlen- sowie Chemotherapien und ihre Kombinationen) zeigen nicht zufriedenstellende Ergebnisse.

Vor allem bei stattgefundenener Metastasierung sind Heilungserfolge - wenn überhaupt - weit hinter den Erwartungen.

Ausserdem sind die auftretenden Nebenwirkungen während der Behandlung für die betroffenen Menschen sehr belastend.

Weil die Tumoren meist erst ab der sechsten Lebensdekade in Erscheinung treten, kommt erschwerend hinzu, dass der alternde Körper mehr Zeit braucht, um sich nach einer konservativen Behandlung zu erholen. Hinzu kommt die Gefahr des Auftretens von Begleiterkrankungen und damit einhergehend einer Polymedikation.

Alternative Behandlungsmethoden könnten Medikamente auf der Basis von siRNA-Interferenz darstellen.

Durch Untersuchung der DNA und RNA in einer Tumorprobe auf einen bestimmten Biomarker scheint es möglich, eine zielgerechte Therapie auf der Basis eines Medikaments einer oder mehrerer spezifischer small-interfering-RNAs einzuleiten.

Eine Schwierigkeit bei der Anwendung einer siRNA-Therapie ist jedoch das Einbringen der siRNA in die Zelle. Dazu werden sogenannte Vehikel benötigt, die dies ermöglichen.

2.7 Transfektionsverfahren

Das Einbringen fremder Desoxyribonukleinsäure (DNA) oder Ribonukleinsäure (RNA) in lebende eukaryotische Zellen wird als Transfektion bezeichnet.

Bei der Verwendung von DNA und mRNA werden erwünschte Proteine produziert. Bei der Verwendung von small interfering RNA (siRNA) und kurzer, hoch konservierter, nichtcodierender RNA (microRNA) wird die Bildung eines bestimmten Proteins inhibiert.

Man unterscheidet zwischen transienter und stabiler Transfektion.

Bei der transienten Transfektion wird die DNA nicht in das Wirtsgenom integriert, sie geht somit bei der Zellteilung verloren. Bei der stabilen Transfektion wird die DNA ins Genom integriert. Damit bleibt sie bei der Zellteilung erhalten

Bei der Transfektion müssen die verwendeten Biomoleküle durch die Zellmembran aufgenommen werden sowie im Zytoplasma stabil bleiben.

Desoxyribonukleinsäure (DNA), Ribonukleinsäure (RNA) oder Oligonukleotide sind gegen endogene und exogene Enzymen sehr labil. Sie haben eine Vielzahl anionischer Ladungen. Diese sind durch ein Phosphat-Rückgrat entstanden. Dadurch können diese drei vorgenannten Biomoleküle durch die ebenfalls negativ geladene Zellmembran von der Zelle nicht oder nur in kleinen Mengen aufgenommen werden. Diese Herausforderung führte zur Entwicklung verschiedener Transfektionsverfahren.

Heutzutage unterscheidet man zwischen physikalischen, chemischen und biologischen Verfahren

Die Effektivität des Verfahrens hängt von verschiedenen Faktoren ab. Dazu gehören die Zytotoxizität des ausgewählten Mittels, die Grösse, Reinheit und Konzentration der DNA/RNA oder des Oligonukleotides, die Medienkomponenten (Serum, Antibioticum) und der Zustand der Zelle.

Die physikalischen siRNA-Einschleusungsverfahren werden durch Mikroinjektion und Elektroporation, Sonoporation und Magnetofektion durchgeführt.

Bei der Mikroinjektion wird die DNA/RNA-Lösung unter Zuhilfenahme eines Mikroinjektors durch Druckluft in das Zellinnere injiziert.

Diese Methode ist sehr anspruchsvoll. Jede Zelle muss einzeln behandelt werden, was gleichermaßen Zeit wie Erfahrung verlangt (Capecchi M R., High Efficiency Transformation by Direct Microinjection of DNA Into Cultured Mammalian Cells, PMID: 6256082 DOI: 10.1016/0092-8674(80)90358-x (Abruf 31.05.2020)).

Die Elektroporation erzielt auf physikalischem Weg die Schwächung der Zellmembran durch ein elektrisches Feld.

In der Zellmembran entstehen temporäre Poren, durch welche Moleküle in das Innere der Zelle gelangen (Emilia Sokolowska and Agnieszka Urszula Blachnio-Zabielska, A

Critical Review of Electroporation as A Plasmid Delivery System in Mouse Skeletal Muscle, DOI: 10.3390/ijms20112776) (Abruf 31.05.2020)).

Das Prinzip der Magnetofektion besteht in der Beladung magnetischer Nanopartikel mit DNA/RNA und dem Transport in das Zellinnere unter Wirkung eines magnetischen Feldes (Plank Christian et alii, The Magnetofection Method: Using Magnetic Force to Enhance Gene Delivery, DOI: 10.1515/BC.2003.082 - Abruf 31.05.2020).

Bei der Sonoporation wird durch Ultraschall die Zellmembran für kurze Zeit perforiert. Dadurch wird sie für die Aufnahme durchlässig (Song Yizhi et alii, Ultrasound-mediated DNA transfer for bacteria, doi.org/10.1093/nar/gkm710) (Abruf 31.05.2020)).

Bei den chemischen Verfahren wird die DNA/RNA entweder mit einer Substanz komplexiert, oder die Substanzen (siehe nachfolgend) gehen eine Verbindung mit der DNA/RNA ein. Dadurch wird die negative Ladung DNA/RNA verringert, was die Aufnahme durch die negativ geladene Zellmembran erleichtert.

Zu diesen Substanzen gehören Kationische Lipide, Polymere und Calciumphosphat.

Kationische Lipide bilden unter Wechselwirkung im Wasser mit DNA/RNA vesikuläre Strukturen, die Liposome genannt werden.

Ein Vertreter dieser Gruppe ist Lipofectamin (Dalby Brian et alii, Advanced Transfection With Lipofectamine 2000 Reagent: Primary Neurons, siRNA, and High-Throughput Applications, DOI: 10.1016/j.ymeth.2003.11.023 - Abruf 31.05.2020).

Weitere Substanzen sind Polymere wie Polyethylenimin (PEI).

Diese gehen eine Komplexbildung mit DNA/RNA ein (Boussif O. et alii, A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine, doi.org/10.1073/pnas.92.16.7297 - Abruf 06.06.2020).

Schließlich sind Calciumphosphat-Nanopartikel weitere DNA/RNA-Träger. Diese Partikel bestehen aus mehreren Schalen. Jede Schale stellt Calciumphosphat oder DNA/RNA her.

Den Kern der Schale bildet Calciumphosphat. Dieses ist umgeben mit DNA (CaP/DNA) oder CaP/RNA (einschalig).

Es wird bei weiterer Zugabe von Calciumphosphat (CaP/DNA/CaP)/ (CaP/RNA/CaP) zweischalig, und bei weiterer Funktionalisierung (CaP/DNA/CaP/DNA)/ (CaP/RNA/CaP/RNA) dreischalig (Epple M., Application of calcium phosphate nanoparticles in biomedicine J, DOI: 10.1039/B910885H) - Abruf 31.05.2020).

Die biologischen Verfahren nutzen einen natürlichen Prozess, nämlich die Fähigkeit von Viren zur Infektion von Zellen. Es wird ein Teil des Virusgenoms durch eine Fremd-DNA ersetzt, danach "viraler Vektor" benannt.

Für die Herstellung dieser Vektoren werden Adenoviren, Herpes Simplex Viruses oder Retroviren benutzt.

Dieses Verfahren ist sehr effektiv, allerdings sind Nachteile bekannt durch eine mögliche Verursachung/Auslösung von Immunogenität (Immunantwort), Mutagenität (Ausbildung von Mutationen) oder Karzinogenität (Krebserzeugung).

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Zelllinien

Es wurden folgende Zelllinien verwendet:

Zelllinie	Hersteller	Medium
HaCaT (immortalisierte Keratinozyten)	LGC Standards Deutschland GC	DMEM-high glucose
SKMEL 28 (Melanom)	Hautklinik Labor REG(ALT)	RPMI 1640
A431 (Plattenepithelkarzinom)	LGC Standards Deutschland	DMEM-high glucose
A375 (Melanom)	LGC Standards Deutschland	RPMI 1640

A431(ATCC® CRL-1555™)

Die A431-Zelllinie wurde aus einem epidermoidem Karzinom der Vulva einer 85-jährigen Patientin isoliert ([archive.is/20130210155435/ www.copewithcytokines.de/cope.cgi?key=A431](http://archive.is/20130210155435/www.copewithcytokines.de/cope.cgi?key=A431) (Zugriff 29.01.2020), sowie www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-1555.aspx?geo_country=de (Zugriff 06.06.2020)).

Die Zelllinie hat von Natur aus kein Tumorsuppressorprotein und kein Transkriptionsfaktor-p53-Protein. Sie ist sehr empfindlich gegen mitogenische Stimuli ([de.wikipedia.org/wiki/A431_\(Zelllinie\)](http://de.wikipedia.org/wiki/A431_(Zelllinie)) (Zugriff 06.06.2020)).

A375

Die A375-Zelllinie stammt von einem primären Hautmelanom einer 54-jährigen Frau. Die Zelllinie weist eine Epithelmorphologie auf.

Das Melanom entstand auf Grund von Mutationen in BRAF- und CDKN2-Genen auf der sonnengeschädigten Haut (AVRAM Stefana et alii, Standardization of A375 human melanoma models on chicken embryo chorioallantoic membrane and Balb/c nude mice, ONCOLOGY REPORTS 38: 89-99, 2017 - Zugriff 06.=6.2020)).

HaCaT

Die HaCaT-Zelllinie entstammt aus histologisch gesunden männlichen Hautproben, die der Peripherie eines Melanoms nach der zweiten Exzision entnommen wurde.

Die Bezeichnung **HaCaT** ist eine Abkürzung für " Human adult low Calcium high Temperature keratinocytes".

HaCaT stammt ab von menschlichen adulten Hautkeranozyten, die unter niedrigen Ca²⁺ Bedingungen und erhöhten Temperaturen kultiviert wurden (Boukamp P. et alii)

SKMEL 28 (ATCC HTB-72)

SKMEL 28 gehört zu einer Reihe von Melanomzelllinien, die aus von Patienten stammenden Tumorproben hergestellt wurden. Die Zellen wiesen eine polygonale Zellmorphologie auf (www.mskcc.org/research-advantage/support/technology/-tangiblematerial/human-melanoma-cell-line-sk-mel-28 (Zugriff 29.01.2020)).

Der Hersteller (Altogen Biosystems) beschreibt die Kultur wie folgt: Die SKMEL-28-Zelllinie wurde aus der Haut eines 51-jährigen männlichen Patienten mit malignem Melanom hergestellt.

SKMel-28-Zellen weisen eine polygonale Zellmorphologie auf, und dies ist nur eine von vielen Melanomzelllinien (auch SKMEL genannt). Die modale Chromosomenzahl von 90 kommt in fast 50% der Zellen vor.

Das Hypotetraploide SKMEL-28 exprimiert auch das Wildtyp-N-Ras-Gen (altogen.com/product/sk-mel-28-transfection-reagent-melanoma-cells-htb72/, Zugriff 29.01.20).

3.1.2 siRNA

siRNA	Sequenz Sense/Antisense	Hersteller
siRNA	Die Sequenz wird von der Firma nicht herausgegeben. Es wird jedoch versichert, dass es keine Homologie für bekannte Säugetiergene gibt.	Quiagen, Hilden, Deutschland
Akt3	5'-GUAACAUCUGAGAGAGAUUA-3' / 5'-UAUCUGUCUCAGAUGUUAC-3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
BRAF	5'-GUUGACACAGGAACAUAUA-3' / 5'-UAUAUGUCCUGUGUCAAC-3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
E2F1	5'-GACGUGUCAGGACCUUCGU-3' / 5'-ACGAAGGUCCUGACACGUC-3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
HIF1	5'-AGAGGUGGAUAUGUGUGGG-3' / 5'-CCCACACAUAUCCACCUCU-3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
HIF2	5'-AGAUUCCUCGUUAUUGUUG-3' / 5'-CAACAAUAACGAGGAAUCU-3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
PAR-1	5'-ACAACUUCCUGCAUUCAUC-3' / 5'-GAUGAAUGCAGGAAGUUGU-3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
SRF	5'-GAUGGAGUUCAUCGACAAC-3' / 5'-GUUGUCGAUGAACUCCAUCUU-3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
STAT3	5'-GCCUCUCUGCAGAAUCAA-3' / 5'-UUGAAUUCUGCAGAGAGGC-3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
Survivin	5'-GGACCACCGCAUCUCUACA-3' / 5'-UGUAGAGAUGCGGUGGUCC-3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland

Verwendete siRNAs bei der Transfektion

3.1.3 Primer

Bezeichnung	Sequenz Sense/Antisense	Hersteller
Akt3	5' TTTTCTCTATTATTTGGGCTGAGTC 3' / 5' GGGTTTGGATTCTCTGCTGC 3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
BRAF	5' TTCCGGAGGAGGTGTGGAAT 3' / 5' GTGGATTATGCTCCACCA 3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
E2F1	5' ACCATCAGTACCTGGCCGAGAGC 3' / 5' ATAGCGTGACTTCTCCCCCGGG 3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
GAPDH	5' TCAACAGCACACCCACTCC 3' / 5' TGAGGTCCACCACCTGTTG 3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
HIF1	5' GCAGAATGCTCAGAGAAAGCGAA 3' / 5' GCTGCATGATCGTCTGGCTGCT 3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
HIF2	5' TGTCAGGCATGGCAAGCCGG 3' / 5' GCACGGGCACGTTACCTCA 3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
PAR-1	5' CGCAGGCCAGAATCAAAAGA 3' / 5' TCATTGGGGTTCCTGAGAAGAA 3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
SCR	Die Sequenz wird von der Firma nicht heraus gegeben. Es wird jedoch versichert, dass es keine Homologie für bekannte Säugetiergene gibt.	Quiagen, Hilden, Deutschland
SRF	5' CGCTACACGACCTTCAGCAA 3' / 5' TGTCAGCGTGGACAGCTCATA 3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
STAT3	5' CGGAGAAACAGTTGGGACCCCT 3' / 5' GAGCTGCTCCAGGTACCGTGT 3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
Survivin	5' CCTTCTTGGAGGGCTGCGCC 3' / 5' TGGGGTCGTCCTCTGGCTCC 3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland

Verwendete Primer bei qRT-PCR

3.1.4 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien und Reagenzien	Hersteller (BRD falls nicht anders benannt)
Ambion® DEPC- treated water, Nuklease frei	Thermo- Fisher Scientific GmbH, Schwerte
CASYton®	Roche Innovartis AG, Bielefeld
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck KGaA, Darmstadt
2 Merctaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ethanol absolut	AppliChem GmbH, Darmstadt
Dulbecco's PBS (1x), ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺	Thermo- Fisher Scientific GmbH, Schwerte
FCS (fetales Kälberserum)	Thermo- Fisher Scientific GmbH, Schwerte
DMEM-high glucose	Thermo- Fisher Scientific GmbH, Schwerte
PRMI 1640	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Interferin®	Polyplus-transfection®, Illkirch, Frankreich
L-Glutamin	Thermo- Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Penicillin (10,000U/ml)/Streptomycin (10,000 µg/ml)	Thermo- Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Amphotericin B	PromoCell GmbH, Steinheim
Gentamycin	PromoCell GmbH, Steinheim
Trypsin-EDTA 0,05%	Thermo- Fisher Scientific GmbH, Schwerte.
Rnase Zap®	Thermo- Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Aurum Total RNA Mini Kit	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
iScript™ cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
SYBR®Green	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA

Verwendete Chemikalien und Reagenzien

3.1.5 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Laminar-Flow-Sicherheitswerkbank BDK Klasse 2 (Sterilwerkbank) Absaugpumpe	BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl, Deutschland KNF Neuberger GmbH, Freiburg
Pipettierhilfe	Workstation von PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Vortex UZUSIO VTX-3000L	LMS Corp., Tokio, Japan
CASY® Cellcounter	Schärfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland
Brutschrank Heraeus® 6000	Thermo- Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Gefrierschrank -20°C	Liebherr, Kirchdorf, Deutschland
Gefrierschrank -80°C	Thermo- Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Kühlschrank Liebherr Premium	Liebherr, Kirchdorf, Deutschland
CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Mastercycler ® Gradiend	Eppendorf AG, Hamburg, Deutsch- land
PCR-Platten Zentrifuge PerfectSpin P	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
PCR-Plattenschweißgerät	ABgene von Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Wasserbad GFL 1083	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
Zentrifuge "Varifuge 3.2 RS"	Heraeus Sepatech, Hanau, Deutschland
Zentrifuge 5415R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Inc., New York, USA
Tischautoklav Systec DX-23	Systec GmbH, Linden, Deutschland
Inverses Mikroskop Axiovert 135	Zeiss, Jena, Deutschland

Verwendete Geräte

3.1.6 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Falcon 15 ml	BD Bioscience, San Jose, USA
Falcon 50 ml	BD Bioscience, San Jose, USA
0,2 ml Eppendorf Tube® safe-lock PCR clean DNA lowBind	Eppendorf AG, Hamburg, BRD
0,5 ml Eppendorf Tube® safe-lock PCR clean DNA lowBind	Eppendorf AG, Hamburg, BRD
1,5 ml Eppendorf Tube® safe-lock PCR clean DNA lowBind	Eppendorf AG, Hamburg, BRD
12-Well-Platte	Corning Inc., New York, USA
Twin.tec PCR Plate 96	Eppendorf AG, Hamburg, BRD
Messküvette für Photometer UVette®	Eppendorf AG, Hamburg, BRD
Pipettenspitzen Dualfilter 10 µl (PCR clean, steril)	Eppendorf AG, Hamburg, BRD
Pipettenspitzen Dualfilter 20 µl (PCR clean, steril)	Eppendorf AG, Hamburg, BRD
Pipettenspitzen Dualfilter 100 µl (PCR clean, steril)	Eppendorf AG, Hamburg, BRD
Pipettenspitzen Dualfilter 1000 µl (PCR clean, steril)	Eppendorf AG, Hamburg, BRD
Pipette steril Falcon® 5 ml	BD Bioscience, San Jose, USA
Pipette steril Falcon® 10 ml	BD Bioscience, San Jose, USA
Pipette steril Falcon® 25 ml	BD Bioscience, San Jose, USA
Pasteur Pipetten	Brand GmbH, Wertheim BRD
Zellkulturflasche 150 cm ²	Corning Inc., New York, USA
Zellkulturflasche 75 cm ²	Corning Inc., New York, USA

Verbrauchsmaterialien

3.2 Methoden

In der Folge werden die bei den im Einzelnen noch darzustellenden Arbeitsschritten verwendeten Materialien sowie die Bearbeitungsweisen dargestellt

Die Arbeiten erfolgten innerhalb einer Sterilwerkbank.

Es wurden Schutzhandschuhe (Einweghandschuhe) und Schutzkleidung getragen.

Arbeiten mit den Zelllinien und weitere molekularbiologische Arbeiten erfolgten in sterilen Gefäßen und mit sterilen Lösungen.

Die verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien wurden - soweit es sich nicht um Einmalartikel handelte - vor den Versuchen und danach mit 70%igem Ethanol desinfiziert.

Bei der RNA Isolierung erfolgte eine zusätzliche Reinigung des Arbeitsplatzes mit RNaseZap. Die Arbeiten erfolgten bei Raumtemperatur (soweit nicht explizit Temperaturangaben erfolgt sind).

3.2.1 Kultivierung der Zellen

3.2.1.1 Kultivierung und Passagierung der Hautkrebszellen

Alle verwendeten Zelllinien wurden bei 37°C mit 5% CO₂ in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre kultiviert.

Für die 3 Zelllinien A431, SKMEL 28 und HaCat wurde das Medium DMEM-High Glucose verwendet.

Für die Zelllinie A375 wurde das Medium RPMI verwendet

Beide Medien enthielten die Zusätze 50 ml FCS Endkonzentration 10%, 5 ml Pen/Strep Endkonzentration 100 U Pen/100 µg Strep und 5 ml 200 nM L- Glutamin (Endkonzentration).

Diese Zusätze wurden kurz vor der Verwendung zu den Medien hinzugefügt.

Der Mediumswechsel wurde zweimal wöchentlich in einem Abstand von 3 beziehungsweise 4 Tagen durchgeführt.

Die Zellen wurden regelmäßig einer mikroskopischen Kontrolle unterzogen.

Erfolgte das Wachstum zu 80% konfluent, wurden die adhärennten Zellen passagiert.

Das Nährmedium wurde zunächst abgesaugt.

Danach wurden die Zellen mit 6 ml DPBS gewaschen.

Daraufhin wurde 6 ml Trypsin- EDTA 0,05% hinzugegeben.

Nach kurzer Inkubationszeit von 5 Minuten wurden die Zellen nach nochmaliger Unterstützung durch zusätzliches leichtes Klopfen am Boden der Zellkulturflasche von dieser gelöst.

Die Ablösung der Zellen wurde mikroskopisch durch Beurteilung der Abrundung und Vereinzelung der Zellen geprüft.

Bei der Zellkultur HaCat hat eine zweimalige Gabe von Trypsin-EDTA 0,05% stattgefunden, weil die Zellen sich nach der ersten Gabe von Trypsin nicht abgelöst hatten.

Es wurde die erste Portion Trypsin-EDTA abgesaugt.

Danach wurden 6 ml frisches Trypsin hinzugefügt.

Die Fläschchen wurden nochmals für drei Minuten in den Brutschrank gestellt.

Zur Neutralisation des Trypsins wurde in die Zellkulturflasche 6 ml Medium hinzugegeben.

Die Suspension wurde mit der Pipette in ein 15 ml Falcon Röhrchen übertragen.

Das Falcon Röhrchen wurde bei 300 x g zentrifugiert.

Der Überstand wurde mit Sorgfalt abgesaugt, und das Zellpellet wurde in 1 ml Medium resuspendiert.

Die Zellsuspension wurde wie folgt passagiert:

Bei der Verwendung von 2 Zellkulturflaschen wurden 500 µl,
bei der Verwendung von 5 Zellkulturflaschen wurden 200 µl und
bei der Verwendung von 10 Zellkulturflaschen wurden 100 µl passagiert.

Soweit erforderlich, wurden die Zellen zur Anzucht mit einer definierten Zellzahl auf 12 Weltplatten ausgesät.

Dafür wurde zuerst die Zellzahl in der Zellsuspension mit Hilfe der CASY Analyse bestimmt.

3.2.1.2 Zellzählung

Für die Anzucht auf 12-Well-Platten und für die Konservierung von Zellen wurde eine definierte Zelldichte benötigt.

Diese wurde mit Hilfe eines Zellzählers CASY® bestimmt.

Die CASY Technologie basiert auf der Lebensfähigkeit der Zellen und deren Verhalten im elektrischen Feld.

Aus dem Zustand der Plasmamembran einer Zelle lässt sich die Vitalität der Zelle beurteilen.

Lebende Zellen haben intakte, tote Zellen unterbrochene Membranen.

Die Feststellung, ob eine Zelle tot ist oder nicht, wird so durchgeführt, dass die Zellen in einem Elektrolyt eine Kapillare in einem elektrischen Feld durchlaufen. Dabei wird ein Impuls erzeugt, dessen Größe abhängig von der Größe und Leitfähigkeit der Zellen ist. Lebende Zellen erzeugen ein höheres Signal als tote Zellen, weil die lebende Zelle eine isolierende Plasmamembran hat.

Bei der Analyse des Zustandes der Zelle kommt es ausserdem auf die Größe der Zellen an.

Die Zellen wurden - wie im Kapitel (Kultivierung und Passagierung der Hautkrebszellen) dargestellt - abgelöst und zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt, und das Zellpellet wurde in 1 ml Medium resuspendiert.

In ein CASY®-Cup wurden 5 ml CASY® Ton vorgelegt, es wurden 50 µl der Zellsuspension dazu pipettiert und noch 5 ml CASY® Ton dazu gegeben.

CASY® Ton ist eine isotonische Flüssigkeit.

Die Messung erfolgte mit den folgenden Einstellungen:

- Kapillare 150 Mikrom
- Probenvolumen 400 Mikroliter
- x-Achse 50 Mikrom
- Zyklen 3
- Verdünnung 1:200
- Evaluationscursor 11,25 Mikrom - 50 Mikrom
- Normalisierungscursor 7,5 Mikrom - 50 Mikrom.

3.2.1.3 Kryokonservierung und Auftauen

Die Zellen wurden - wie bereits beschrieben - abgelöst, zentrifugiert und gezählt.

Zum Zweck der Konservierung wurde zunächst 1 ml Medium zur Resuspension von >2 Millionen Zellen mit 50 µl DMSO zum Zweck des Gefrierschutzes versetzt.

Die Zellen wurden in sterile Kryoröhrchen verbracht und bei -80 Grad in einem Tiefkühlschrank gelagert.

Nach Ablauf von 24 Stunden wurden die Röhrchen entnommen und in Flüssigstickstoff gelagert. Die in den Röhrchen befindlichen Zellen wurden in einem 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut, und die aufgetaute Zellsuspension sofort in ein 15ml Falconröhrchen, welches vorher mit 6 ml Medium befüllt wurde, überführt. Danach wurde bei 300 x g für die Dauer von fünf Minuten zentrifugiert.

Daraufhin wurde der DMSO-haltige Überstand abgesaugt. Es folgte eine Resuspension der Zellen in 1 ml frischem Medium.

Die Zellen wurden in eine mit 26 ml Medium gefüllte Zellkulturflasche überführt und schließlich im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂ gelagert.

3.2.1.4 Anzucht auf 12-Well-Platten

Wie oben beschrieben, wurden die Zellen abgelöst, zentrifugiert und gezählt. Die für die Transfektion und Auswertung benötigte Zellzahl wurde festgelegt. Für die Zellzahlbestimmung mit CASY und die Durchführung der qRT - PCR wurden 100.000 Zellen pro Well in einer 12-Well Platte benötigt.

Die 12-ell-Platten wurden beschriftet und in jeden Well 1 ml Medium gegeben. Die benötigte Menge der Zellsuspension wurde in die Mitte des Well einpipetiert. Die Platte wurde leicht geschwenkt und in den Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ zum Zweck der Kultivierung hineingestellt.

3.2.2 Transfektion Zellkultur mit siRNA

Um die Wirksamkeit verschiedener siRNAs auf die A431, A375, SKMEL 28 und HaCaT Zelllinien zu untersuchen, wurden die Zellen mit den siRNAs Akt3, BRAF, E2F1, HIF1, HIF2, PAR -1, SRF, STAT3, Survivin transfiziert.

Die Zellen wurden einen Tag vorher, wie oben beschrieben, auf 12-Well-Platten ausgesät.

Für jeden Versuch wurden die Zellen zur Kontrolle ohne siRNA und mit SCR-siRNA (scrambled) ausgesät.

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 Ansätze wurden in Doppelansätzen (qRT-PCR) oder Quadruplikaten (CASY) angesetzt.

Die für die Transfektion benötigte Menge siRNA wurde in Basalmedium gelöst, Interferin hinzugegeben und die Lösung "gevortext" (Vortex UZUSIO VTX-3000L).

Anschließend wurde die Lösung 20 Minuten lang bei Raumtemperatur zur Bildung von Transfektionskomplexen inkubiert.

Das Medium der angezuchteten Zeilen wurde abgesaugt und die Zellen mit 1 ml DPBS gewaschen.

In jedes Well wurden 300 µl des Transfektionskomplexes pipettiert. Die Zellen wurden 2 Stunden im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert.

Danach wurden die Transfektionskomplexe abgesaugt und durch 1 ml frisches Medium ersetzt.

	A	B	C	D
1	siRNA	siRNA-µl	Interferin/µl	Basalmed-µl
2				
3	25nM	0.8	2.34	636.0
4	50nM	3.2	7.00	1270.0
5	100nM	3.2	3.50	633.4

Darstellung der Menge der Transfektionsreagenzien pro Wells einer 12 - Wells- Platte

3.2.3 mRNA Isolierung

Zur Bestimmung der Transkriptmenge 24 Stunden nach der Transfektion wurde die Gesamt-RNA aus den Zellen isoliert.

Diese Isolierung erfolgte mit Hilfe des Aurums Total RNA Mini Kit und wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

Zuerst wurde aus der 12-Well-Platte mit den am Vortag transfizierten Zellen das Medium abgesaugt. Dann wurden die Zellen mit 0,5 ml DPBS gewaschen.

Zu den Zellen wurde in jeden Well abweichend von den Herstellerangaben 175 µl Lysepuffer auf- und abpipettiert und anschließend 175 µl 70% Ethanol dazugegeben.

Der Lysepuffer enthielt Mercaptoethanol und Guanidiniumisothiozyanat (GTC) zwecks vollständiger Lyse der Zellen und gleichzeitiger RNase-Inaktivierung. Das Ethanol half bei der Bindung an die Membran der RNA-Säulen.

Der weitere Verlauf folgte dem Protokoll des Herstellers.

Um die mRNA von Verunreinigungen wie Zellresten, Salzen und Proteinen zu befreien, wurden noch einige Waschgänge und Zentrifugationsschritte durchgeführt.

Zum Herauslösen der mRNA aus der Säule wurden abweichend von den Herstellerangaben 60 µl Elutionslösung benutzt.

Für die weitere Arbeit wurde isolierte mRNA sofort auf Eis gelegt oder bei -80 °C eingefroren.

3.2.4 Konzentrationsmessung der mRNA und Umschreibung der mRNA in cDNA

3.2.4.1 Konzentrationsbestimmung der Gesamt-mRNA

Die Konzentrationsbestimmung der Gesamt-mRNA wurde mit Hilfe der Spektralphotometrie durchgeführt.

Dazu wurden 5 µl der zuvor isolierten Gesamt-mRNA in eine Küvette gegeben, in der sich 45 µl mit DEPC-behandeltem Wasser befanden.

Es wurde darauf geachtet, dass die Pipettenspitze immer mittig bis zum Boden der Küvette eingeführt wurde, um die Bildung von Lufteinschlüssen zu vermeiden.

Eine mit 50 µl DEPC - Wasser gefüllte Küvette diente als Leerprobe.

Die Messung erfolgte durch ein BioPhotometer bei 260 nm, was dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren entspricht, und bei 280 nm, was einem Absorptionsmaximum von Proteinen entspricht.

Die Quantität der Absorption bei den Wellenlängen 260 nm zu 280 nm gibt die Reinheit einer Nukleinsäure wieder.

Werte zwischen 1,8-2 lassen auf reine mRNA schließen, Werte darunter auf Proteinverunreinigungen, Werte darüber auf Ethanolverunreinigungen, siehe www.eppendorf.com/product-media/doc/de/59828/Eppendorf_Detection_Application-Note_279_BioPhotometer-D30_Detection-contamination-DNA-protein-samples-photometric-measurements.pdf (Zugriff 06.06.2020). Ein spezifischer Multiplikationsfaktor für DNA/RNA OD260 entsprach dabei 40 µg/ml RNA.

Die benötigte Nukleinsäurekonzentration wurde mit folgenden Formeln berechnet:

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. $\text{RNA}_{\text{Protein}} \text{ µg/ml} = x \cdot \text{Verdünnungsfaktor}$

Um den cDNA-Ansatz zu erstellen, wurde 15 µl RNA-Lösung mit 200 ng RNA verwendet.

3.2.4.2 Umschreibung der mRNA in cDNA

Die isolierte zelluläre Gesamt-RNA wurde mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Dies erfolgte mit dem iScript cDNA Synthesis Kit.

Anhand der oben dargestellten Formeln wurde berechnet, wie viel RNA zu nehmen ist, damit die Probe 200 ng Gesamt-RNA erhält.

In ein 0,5 ml Eppendorfgesäß wurde zuerst die berechnete Menge PCR-Wasser und danach mRNA pipettiert. Sodann wurde ein Ansatz aus 4 µl 5-fach Reaktionspuffer und 1 µl reverse Transkriptase zugegeben. Anschließend wurde der fertige Gesamt-RNA Ansatz gevortext und in einem Eppendorf-Mastercyclergradient in cDNA umgeschrieben.

Es wurde das Reaktionsprotokoll des Herstellers verwendet bei Inkubationszeiten wie folgt:

- 5 Minuten bei 25 °C
- 30 Minuten bei 42 °C
- 5 Minuten bei 85 °C
- Abkühlung bis 4°C

Anschließend wurden die Proben bei -80°C gelagert.

3.2.5 qRT-PCR (Quantitative Real-time PCR)

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Genexpression der Zellen nach der Transfektion mit Hilfe der qRT-PCR Methode untersucht.

In der Molekularbiologie wird die Echtzeit-PCR (auch quantitative PCR, Real-time PCR, qPCR, qRT-PCR genannt) im Laborverfahren zur gleichzeitigen Amplifikation und zum Messen der Menge eines gegebenen DNA-Moleküls verwendet.

Das Echtzeit-PCR-Verfahren umfasst den gleichzeitigen Nachweis und die quantitative Bestimmung spezifischer DNA-Sequenzen in einer Probe (Heather D. et alii., 2008 Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis, PMID: 18474036 DOI: 10.2144/000112776 (Zugriff 06.06.2020))

Das Verfahren verwendet die allgemeinen Prinzipien der PCR.

Der Hauptunterschied zur Nur-PCR besteht darin, dass die Menge der amplifizierten DNA nach jedem Amplifikationszyklus in Echtzeit gemessen wird.

Für die quantitative Bestimmung der DNA wurden zwei Verfahren verwendet, nämlich

1. Fluoreszierende Farbstoffe, die sich in die zweisträngige DNA einlagern und
2. modifizierte Oligonukleotide (DNA-Sonden), die fluoreszieren, nachdem sie sich komplementär mit den Abschnitten der DNA hybridisiert haben.

Oft wird qRT-PCR kombiniert mit RT-PCR (reverse Transkription), um kleine Mengen von mRNA zu messen.

Das ermöglicht die Analyse der Genexpression in der Zelle oder im Gewebe (Nolan Tania et alii, Quantification of mRNA using real-time RT-PCR, DOI <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.236>, (Zugriff 06.06.2020)).

Von den vorstehend beschriebenen beiden Verfahren wurde das erste Verfahren gewählt.

Als Fluoreszenzfarbstoff wurde SYRR Green verwendet. SYRR Green gehört zu den asymmetrischen Cyanin-Farbstoffen.

Durch seine Anlagerung an die amplifizierte DNA in den Proben kommt es zu einem DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplex, der durch blaues Licht angeregt wird.

Die Intensität wird dann durch das qRT-PCR Gerät gemessen. Dabei ist die entstandene Fluoreszenz proportional direkt zur Menge der amplifizierten DNA.

Durch den Zuwachs der DNA-Menge und dadurch die Erhöhung der Fluoreszenz wird ein Schwellenwert erreicht, bei dem erhöhte Fluoreszenz auftritt.

Danach kommt es zu keiner exponentiellen Erhöhung.

Dieser letzte Zyklus wird durch den Ct-Wert beschrieben. Dieser Ct-Wert misst immer den Anfang der exponentiellen Phase.

Zum Zweck des quantitativen Vergleichs der Unterschiede in den Proben benötigt man eine interne Kontrolle, ein sogenanntes Haushaltsgen. Dabei handelt es sich um ein Gen, welches in jeder Zelle von Lebewesen vorkommt. Es wird immer gleich exprimiert.

Für unsere Untersuchung haben wir die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), ein Enzym der Glycolyse, als interne Kontrolle verwendet

Die qRT-PCR wurde mit einem Ansatzvolumen von 15 µl durchgeführt.

Zunächst wurde die cDNA im Verhältnis 1:25 mit nukleasefreiem Wasser verdünnt. Für die Verdünnung der cDNA-Kontrollproben mit 25 nM SCR-siRNA und 50 nM SCR-siRNA und ohne siRNA wurden jeweils 192 µl PCR-Wasser und 8 µl cDNA genommen. Für die Verdünnung anderer cDNAs wurden jeweils 96 µl PCR-Wasser und 4 µl cDNA genommen.

Für die Untersuchung der Genexpression wurden spezifische Primer der zu untersuchenden Gene verwendet. Aus jedem Primer wurde zum entsprechenden Gen ein Primermix hergestellt. Ein Primermix enthält 800 µl PCR-Wasser, 15 µl Sense und 15 µl Antisense des Primers.

Danach wurde für jede cDNA ein Hauptmix erstellt, der aus Primermix und SYBR Green im Verhältnis 1:3 hergestellt wurde. Dann wurde eine neue Mischung in dreifacher Menge pro Gen aus 36 µl Hauptmix und 18 µl verdünnter cDNA erstellt.

Von dieser Mischung wurden 15 µl in drei Wells (96-Well-PCR-Platten) von jeder Mischung einpipetiert.

Die Platte wurde mit hitzebeständiger Folie verschlossen, zentrifugiert und in einen BioRad iCycler zwecks Durchführung der qRT-PCR gestellt.

Die Auswertung der erzielten Daten erfolgte dann mit Hilfe des CFX-Manager der Firma Bio-Rad.

Die Kontrollprobe, die aus unbehandelten Zellen bestand, wurde auf 1 gesetzt, und die Werte der transfizierten Proben im Vergleich dazu berechnet.

3.2.6 CASY-Analyse

Um die Wirkung der Transfektion mit siRNA auf des Zellwachstums von A375, A431, SKMEL 28 und HaCat festzustellen, wurde nach dreitägiger Inkubationszeit die Zellzahl nach der Transfektion mit 50 nM siRNAs im CASY-Zellzähler-System bestimmt.

Der Ablauf der Messungen erfolgte entsprechend den Einstellungen, wie es im Kapitel 3.2.1.2 Zellzählung beschrieben ist.

Für die Auswertung wurde nur die Zahl der lebenden Zellen pro ml verwendet. Pro Versuch erfolgte für jede transfizierte siRNA und die Kontrollen eine Vierfachbestimmung der Zellzahl.

Die Kontrollen bestanden aus nicht transfizierten und mit SCR-siRNA transfizierten Zellen.

Die Zahl nicht transfizierter Zellen wurde auf 100% gesetzt.

Der Versuch für die CASY Analyse mit der A431 Zelllinie und der SKMEL28 Zelllinie wurde dreimal (n=3), und der Versuch für die A375 Zelllinie und die HaCat Zelllinie wurde viermal (n=4) in 4-fachen Parallelversuchen durchgeführt.

Der Versuch für die qRT-PCR Analyse mit den A431 und A375 und SKMEL28 Zelllinien wurde dreimal (n=3), und der Versuch für die HaCaT Zelllinie wurde viermal (n=4) in Duplikaten durchgeführt.

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe des Kalkulationsprogramms MS-Excel und des Programms GraphPad Prism 5.1 der Firma GraphPad Software, La Jolla, USA durchgeführt.

Die qRT-PCR Auswertung erfolgte mit Hilfe des CFX-Manager der Firma Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA, USA

Die Ergebnisse sind als Mittelwert +/- Standardabweichungen (SD) dargestellt.

Zur Ermittlung signifikanter Unterschiede wurde eine ANOVA mit dem Posttest Bonferroni angewendet. Als Signifikanzniveau wurde $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,005$ (**), $p \leq 0,0001$ (***) festgelegt.

4 Ergebnisse

Für die Untersuchung des siRNA vermittelten Knockdowns wurde die Genexpression mittels qRT-PCR untersucht.

Der Einfluss der Transfektion und Einfluss des Knockdown auf die Zellviabilität wurde mittels CASY Zellzählanalyse untersucht.

Zur Untersuchung der Genexpression wurden alle Zelllinien mit 25 nM und 100 nM siRNAs transfiziert. Die Gesamt-mRNA wurde 24 Stunden nach der Transfektion isoliert.

Nach der Konzentrationsmessung wurde die mRNA in cDNA umgeschrieben. Danach wurde eine qRT-PCR durchgeführt, um die relative Expression jedes einzelnen Genes zu ermitteln.

Für die CASY Zellzählanalyse wurden die Zellen mit 50 nM siRNAs transfiziert.

Die Zellzählung wurde 3 Tage nach der Transfektion mit der CASY Analyse durchgeführt (genauer Ablauf siehe 3.2.1 Kultivierung der Zellen).

Jeder Versuch hatte eine Kontrollprobe beinhaltet. Die Kontrollprobe beinhaltete Zellen der jeweils entsprechenden Zelllinie. Bei dieser Kontrollprobe wurden die Zellen nicht transfiziert. Ansonsten erfolgte die gleiche Behandlung.

Darüber hinaus gab es einen Kontrollansatz mit SCR-siRNA, welcher keine spezifischen Knockdown-Effekte hervorrufen sollte.

Änderungen der Genexpression und Zellzahl in diesem Kontrollansatz könnten ein Hinweis auf toxische Effekte durch die Transfektion sein.

Der Versuch für die Zelllinien A375, A431 und SKMEL wurde dreimal, und für die HaCaT Zelllinie viermal wiederholt.

Der Versuch für die qRT-PCR wurde in Duplikaten, und für die CASY Analyse in Quadruplikaten gemacht.

4.1 Ergebnisse der Genexpression auf der mRNA-Ebene

4.1.1 Zelllinie A431

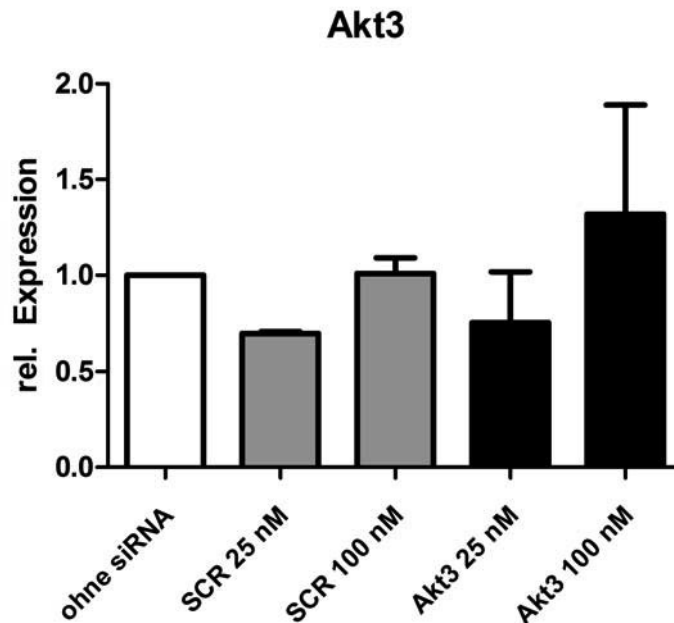


Abbildung 1: Relative Expression der Zelllinie A431, 24 Stunden nach der Transfektion mit 25 und 100 nM Akt3-siRNA und SCR-siRNA.

Die x-Achse zeigt die verschiedenen siRNAs und deren unterschiedliche Konzentration in den Proben. Die y-Achse zeigt die relative Expression der mRNA im Verhältnis zu nicht transfizierten Zellen deren relative Expression auf 1 gesetzt wird. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm SD von $n = 3$.

Es zeigte sich eine leichte Verringerung der relativen Expression beim Einsatz von 25 nM Akt3-siRNA (20%), dieser Effekt zeigt sich allerdings auch bei der 25 nM SCR-siRNA im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen.

Der Einsatz von 100 nM SCR-siRNA zeigte keinen Einfluss auf die relative Expression.

Beim Einsatz von 100 nM Akt3-siRNA zeigte sich eine Steigerung der relativen Expression um 29 %. (s. Abb.X)

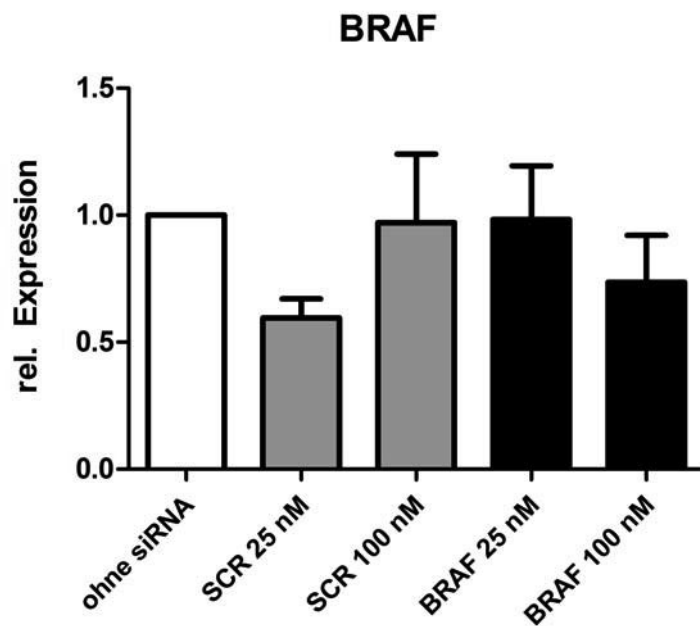


Abbildung 2: Relative Expression der Zelllinie A431, 24 Stunden nach der Transfektion mit 25 und 100 nM BRAF-siRNA und SCR-siRNA.

Die x-Achse zeigt die verschiedenen siRNAs und deren unterschiedliche Konzentration in den Proben. Die y-Achse zeigt die relative Expression der mRNA im Verhältnis zu nicht transfizierten Zellen deren relative Expression auf 1 gesetzt wird. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm SD von $n = 3$.

Aus der Auswertung der relativen Expression in den Proben geht hervor, dass der Einsatz von 100 nM SCR- und 25 nM BRAF-siRNAs keinen Einfluss auf die Genexpression hatte.

Es zeigte sich eine Reduktion der relativen Expression beim Einsatz von 100 nM BRAF-siRNA (20%) jedoch auch bei 25 nM SCR-siRNA (35%) im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen.

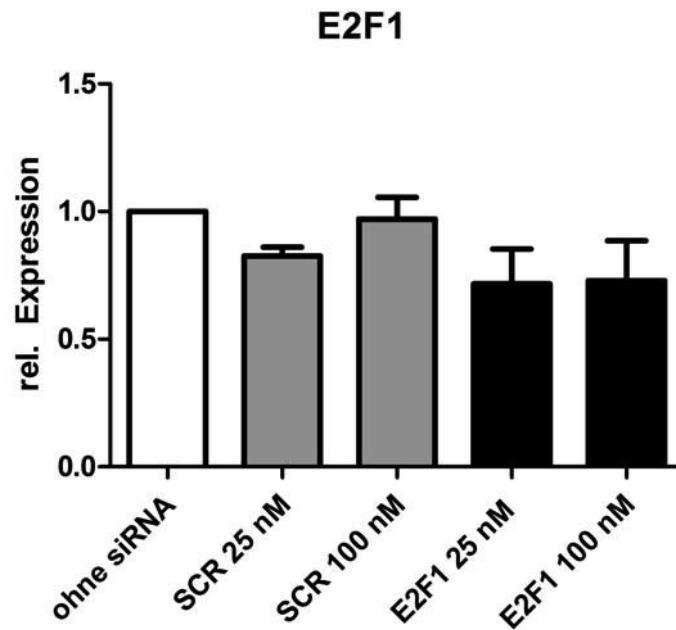


Abbildung 3: Relative Expression der Zelllinie A431, 24 Stunden nach der Transfektion mit 25 und 100 nM E2F1-siRNA und SCR-siRNA.

Die x-Achse zeigt die verschiedenen siRNAs und deren unterschiedliche Konzentration in den Proben. Die y-Achse zeigt die relative Expression der mRNA im Verhältnis zu nicht transfizierten Zellen, deren relative Expression auf 1 gesetzt wird. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm SD von $n = 3$.

Es zeigte sich eine leichte Unterdrückung der relativen Expression beim Einsatz von 25 nM E2F1- (25%) und 100 nM E2F1-siRNA (25%) zu nicht transfizierten Zellen.

Jedoch führt auch die Transfektion mit 25 nM SCR-siRNA zu einer Verringerung der E2F1 Expression.

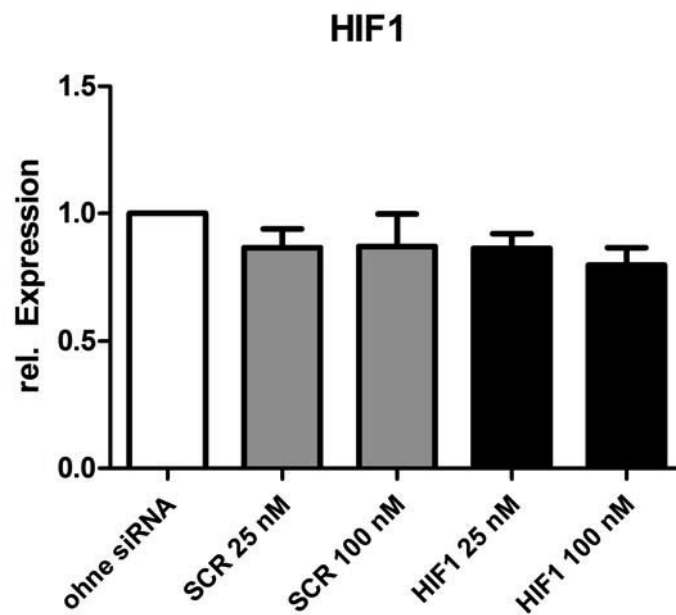


Abbildung 4: Relative Expression der Zelllinie A431, 24 Stunden nach der Transfektion mit 25 und 100 nM HIF1-siRNA und SCR-siRNA.

Die x-Achse zeigt die verschiedenen siRNAs und deren unterschiedliche Konzentration in den Proben. Die y-Achse zeigt die relative Expression der mRNA im Verhältnis zu nicht transfizierten Zellen, deren relative Expression auf 1 gesetzt wird. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm SD von $n = 3$.

Es war keine signifikant verminderte Genexpression bei Transfektion von SCR-siRNA sowie funktioneller siRNAs gegen HIF1 zu beobachten. Beim Einsatz der SCR-siRNA reduzierte die relative Expression der mRNA von HIF1 um 12 % bei 25 nM und 100 nM.

Der Einsatz funktioneller siRNA gegen HIF1 reduzierte die relative Expression der mRNA von HIF1 um 12 % bei 25 nM und um 25 % bei 100 nM.

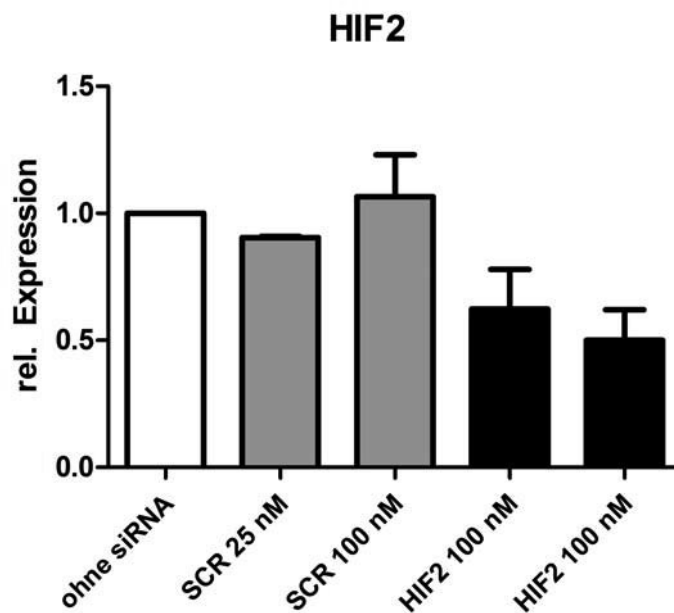


Abbildung 5: Relative Expression der Zelllinie A431, 24 Stunden nach der Transfektion mit 25 und 100 nM HIF2-siRNA und SCR-siRNA.

Die x-Achse zeigt die verschiedenen siRNAs und deren unterschiedliche Konzentration in den Proben. Die y-Achse zeigt die relative Expression der mRNA im Verhältnis zu nicht transfizierten Zellen, deren relative Expression auf 1 gesetzt wird. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm SD von $n = 3$.

Bei der Auswertung der relativen Expression mRNA von HIF2 ist zu sehen, dass die Anwendung 100 nM HIF2-siRNA zu einer deutlichen Reduktion (48%) und 25 nM ebenfalls zur (30%) Reduktion der Genexpression führte.

Die Transfektion mit 25 nM SCR-siRNAs zeigte dagegen eine leichten Reduktion (8%) der relativen Expression.

Die Transfektion von 100 nM SCR-siRNA zeigte eine leichte Erhöhung (7%) der relativen Expression.

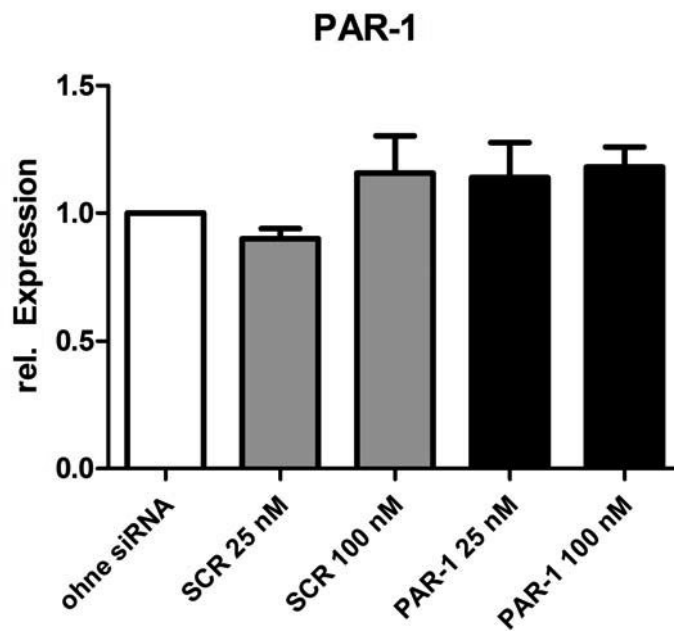


Abbildung 6: Relative Expression der Zelllinie A431, 24 Stunden nach der Transfektion mit 25 und 100 nM PAR-1-siRNA und SCR-siRNA.

Die x-Achse zeigt die verschiedenen siRNAs und deren unterschiedliche Konzentration in den Proben. Die y-Achse zeigt die relative Expression der mRNA im Verhältnis zu nicht transfizierten Zellen, deren relative Expression auf 1 gesetzt wird. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm SD von $n = 3$.

Eine Verringerung der relativen Expression konnte bei der Auswertung der siRNA gegen PAR-1 in keinem der Ansätze ermittelt werden. Im Gegenteil, die funktionelle siRNA gegen PAR-1 erzielte eine Steigerung der relativen Expression von mRNA bei 25 nM um 15%, bei 100 nM um 19%, und die nicht funktionelle 100 nM SCR-siRNA um 17%.

Die 25 nM SCR-siRNA ergab eine minimale Reduktion der Genexpression um 10%.

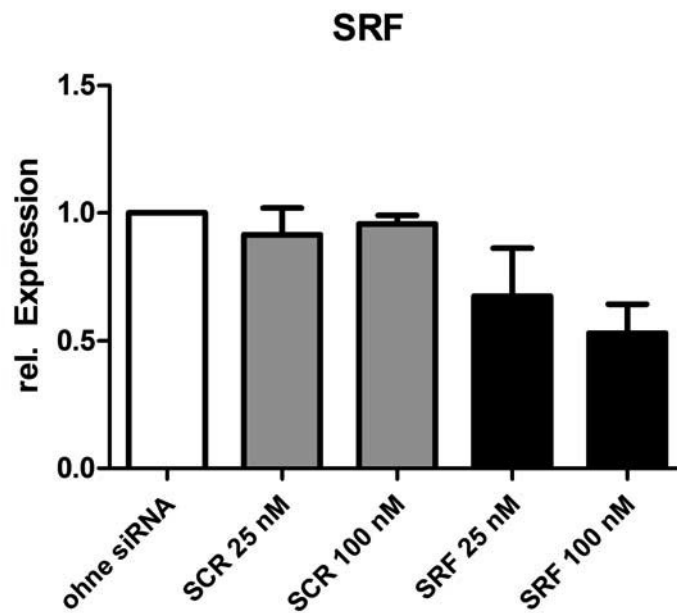


Abbildung 7: Relative Expression der Zelllinie A431, 24 Stunden nach der Transfektion mit 25 und 100 nM SRF-siRNA und SCR-siRNA.

Die x-Achse zeigt die verschiedenen siRNAs und deren unterschiedliche Konzentration in den Proben. Die y-Achse zeigt die relative Expression der mRNA im Verhältnis zu nicht transfizierten Zellen, deren relative Expression auf 1 gesetzt wird. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm SD von $n = 3$.

Die Auswertung der Wirksamkeit der siRNA gegen SRF ergab eine Verringerung der Genexpression um 43% bei 100 nM und 33% bei 25 nM.

Die SCR- siRNA beeinflusste die Genexpression mit einer geringen Senkung bei 25 nM um 10% und bei 100 nM um 5%.

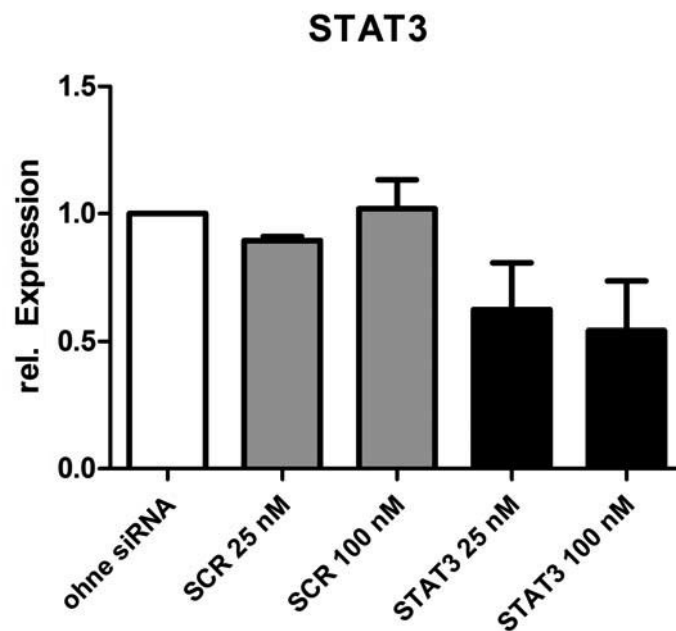


Abbildung 8: Relative Expression der Zelllinie A431, 24 Stunden nach der Transfektion mit 25 und 100 nM STAT3-siRNA und SCR-siRNA.

Die x-Achse zeigt die verschiedenen siRNAs und deren unterschiedliche Konzentration in den Proben. Die y-Achse zeigt die relative Expression der mRNA im Verhältnis zu nicht transfizierten Zellen, deren relative Expression auf 1 gesetzt wird. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm SD von $n = 3$.

Die Untersuchung der Auswirkung von funktioneller siRNA gegen STAT3 zeigte einen Knockdown der relativen Expression der mRNA, dabei lag der Knockdown für 25nM STAT3-siRNA bei 35% und 100 nM STAT3-siRNA bei 45% verglichen mit transfizierten Zellen.

Beim Einsatz von 25nM SCR-siRNA zeigt sich eine geringe Verringerung der relativen Expression um 10%.

Beim Einsatz von 100nM SCR- siRNA zeigt sich keine Veränderung der relativen Expression.

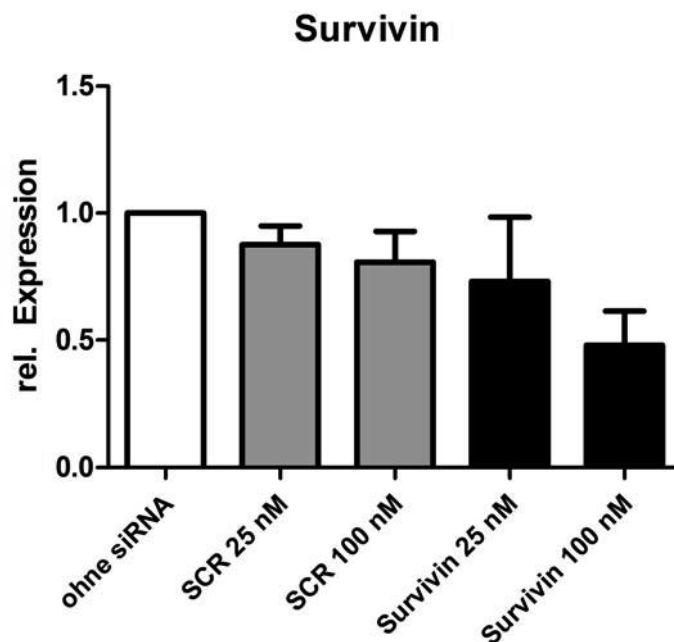


Abbildung 9: Relative Expression der Zelllinie A431, 24 Stunden nach der Transfektion mit 25 und 100 nM Survivin-siRNA und SCR-siRNA.

Die x-Achse zeigt die verschiedenen siRNAs und deren unterschiedliche Konzentration in den Proben. Die y-Achse zeigt die relative Expression der mRNA im Verhältnis zu nicht transfizierten Zellen, deren relative Expression auf 1 gesetzt wird. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm SD von $n = 3$.

Bei der Auswertung ergab sich eine deutliche Reduktion der relativen Expression der mRNA nach 100 nM Survivin-siRNA Transfektion von 50% verglichen mit nicht transfizierten Zellen, und bei 25 nM eine Reduktion um 30%.

Die nicht funktionelle SCR-siRNA zeigte eine geringe Reduktion der Survivin-Expression. Diese lag bei 15 % für 25 nM und 25% für 100 nM SCR-siRNA.

4.1.2 Zelllinie A375

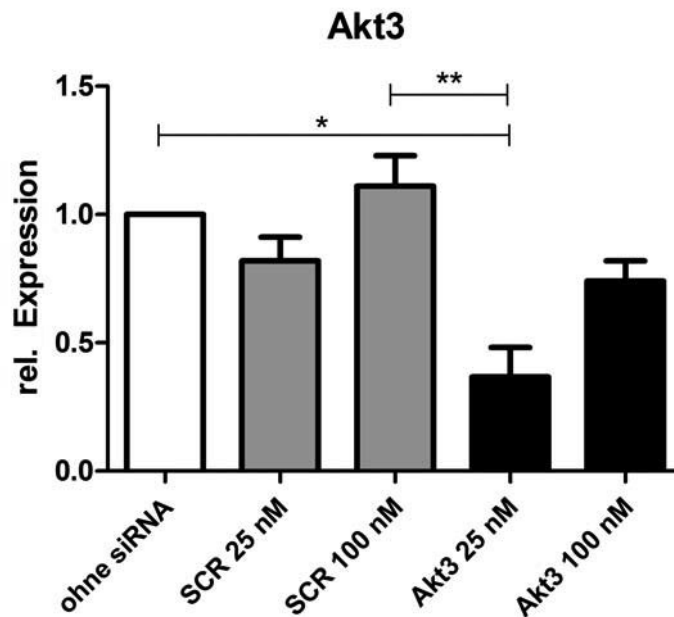


Abbildung 10: Relative Expression der Zelllinie A375 24 Stunden nach der Transfektion mit 25 und 100 nM Akt3 -siRNA und SCR-siRNA.

Die x-Achse zeigt die verschiedenen siRNAs und deren unterschiedliche Konzentration in den Proben. Die y-Achse zeigt die relative Expression der mRNA im Verhältnis zu nicht transfizierten Zellen, deren relative Expression auf 1 gesetzt wird. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm SD von $n = 3$. Die statistische Signifikanz auf einem Niveau von $p^* \leq 0,05$ mit einem Stern, bei $p^* \leq 0,005$ mit zwei Sternen.

Eine signifikante Reduktion (70%) der relativen Expression der mRNA von Akt3 gegenüber nicht transfizierten und 100 nM SCR-siRNA transfizierten Zellen wurde durch 25 nM Akt3-siRNA erzielt.

Die 25 nM SCR - und 100 nM Akt3-siRNAs führten zu einer nicht signifikanten Reduktion der relativen Expression der mRNA von Akt3 um 20% und 25 %.

Beim Einsatz von 100 nM SCR-siRNA zeigte sich eine geringe Steigerung der relativen Expression um 13%.

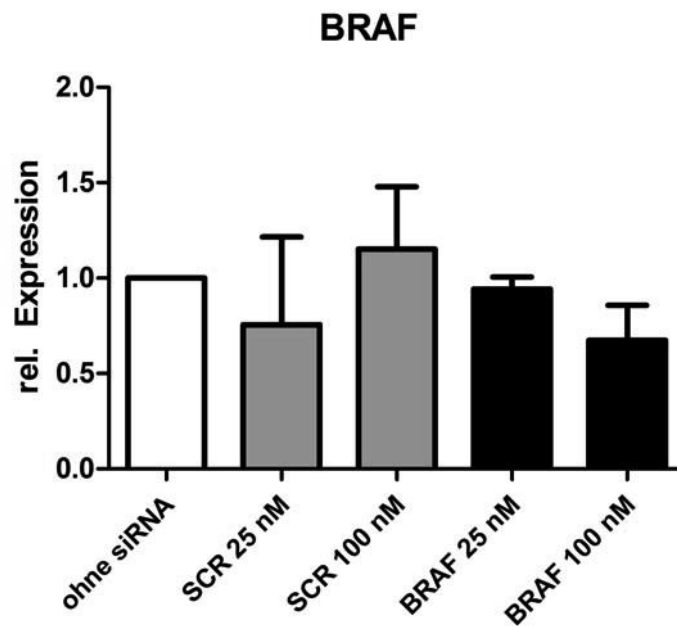


Abbildung 11: Relative Expression der Zelllinie A375 24 Stunden nach der Transfektion mit 25 und 100 nM BRAF-siRNA und SCR-siRNA.

Die x-Achse zeigt die verschiedenen siRNAs und deren unterschiedliche Konzentration in den Proben. Die y-Achse zeigt die relative Expression der mRNA im Verhältnis zu nicht transfizierten Zellen deren rel. Expression auf 1 gesetzt wird. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm SD von $n = 3$.

Es konnte eine verminderte, nicht signifikante relative Expression bei der Auswertung der siRNA gegen BRAF gemessen werden. Diese betrug 9 % bei 25 nM BRAF-siRNA und 28% bei 100 nM BRAF-siRNA.

Die SCR-siRNA führte zu einer verminderten relativen Expression bei 25 nM um 25 %.

Beim Einsatz von 100 nM SCR-siRNA zeigte sich eine Vergrößerung in der relativen Expression um 20 %.

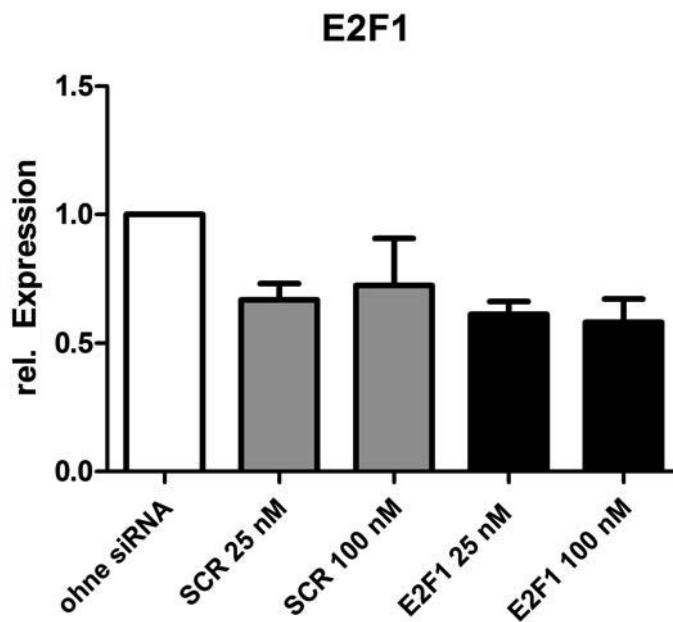


Abbildung 12: Relative Expression der Zelllinie A375 24 Stunden nach der Transfektion mit 25 und 100 nM E2F1-siRNA und SCR-siRNA.

Die x-Achse zeigt die verschiedenen siRNAs und deren unterschiedliche Konzentration in den Proben.

Die y-Achse zeigt die relative Expression der mRNA im Verhältnis zu nicht transfizierten Zellen, deren relative Expression auf 1 gesetzt wird. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm SD von $n = 3$.

Bei der Auswertung der relativen Expression der mRNA von E2F1 zeigte sich eine deutliche Unterdrückung der relativen Expression beim Einsatz von 25 nM und 100 nM E2F1-siRNAs um 38 % und 40 % zu nicht transfizierten Zellen.

Nicht funktionelle SCR-siRNA führte ebenfalls zur Verminderung der relativen Expression der mRNA bei 25 nM um 30 % und bei 100 nM um 23 %.

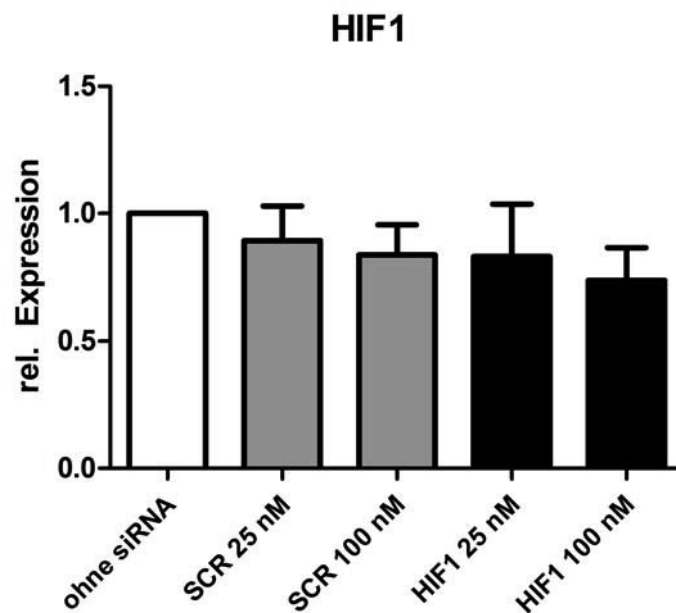


Abbildung 13: Relative Expression der Zelllinie A375 24 Stunden nach der Transfektion mit 25 und 100 nM HIF1-siRNA und SCR-siRNA.

Die x-Achse zeigt die verschiedenen siRNAs und deren unterschiedliche Konzentration in den Proben. Die y-Achse zeigt die relative Expression der mRNA im Verhältnis zu nicht transfizierten Zellen, deren relative Expression auf 1 gesetzt wird. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm SD von $n = 3$.

Die Auswertung des Effekts der funktionellen siRNA gegen HIF1 und nicht funktionelle SCR-siRNA ergab eine leichte Unterdrückung der relativen Expression der mRNA von HIF1 wie folgt:

Bei 25 nM SCR-siRNA um 13 % und bei 100 nM um 18 %, bei 25 nM HIF1-siRNA um 18 % und bei 100 nM um 30 %.

Die Unterdrückung der relativen Expression der mRNA in dieser Zelllinie ist bei beiden verwendeten siRNAs und verschiedenen Konzentrationen nicht statistisch signifikant.

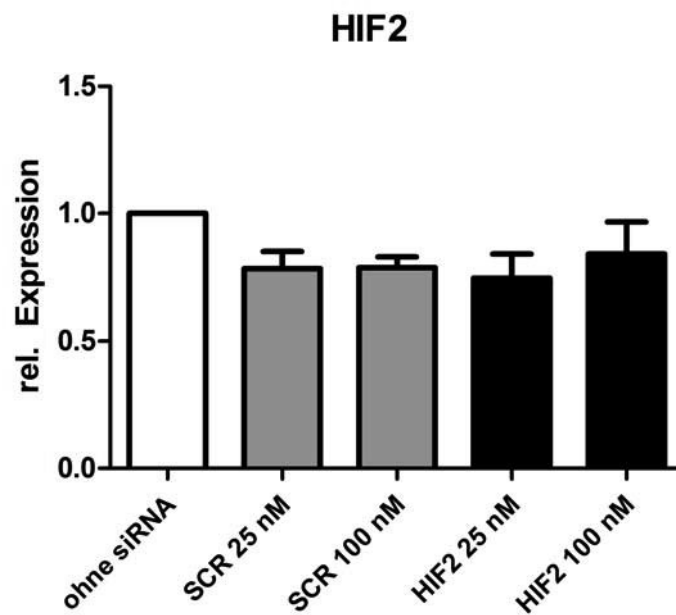


Abbildung 14: Relative Expression der Zelllinie A375 24 Stunden nach der Transfektion mit 25 und 100 nM HIF2-siRNA und SCR-siRNA.

Die x-Achse zeigt die verschiedenen siRNAs und deren unterschiedliche Konzentration in den Proben. Die y-Achse zeigt die relative Expression der mRNA im Verhältnis zu nicht transfizierten Zellen, deren relative Expression auf 1 gesetzt wird. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm SD von $n = 3$.

Die Untersuchung die Wirksamkeit der Transfektion mit SCR- und HIF2-siRNAs auf die relative Expression der mRNA von HIF2 ergab eine Reduktion der relativen Expression der mRNA.

Der Einsatz von 25 nM und 100 nM SCR-siRNA reduzierte die HIF2 Produktion um 22 %, bei HIF2-siRNA 25 nM um 25 %, und bei 100 nM um 19 %.

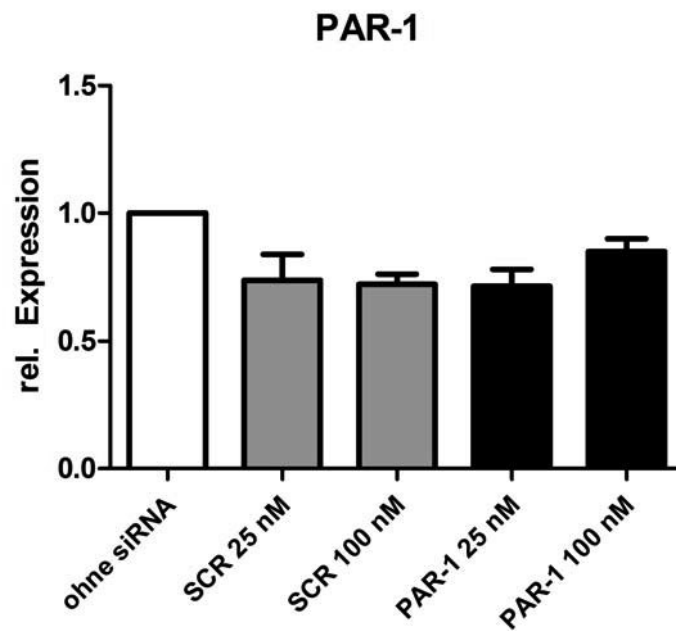


Abbildung 15: Relative Expression der Zelllinie A375 24 Stunden nach der Transfektion mit 25 und 100 nM PAR-1-siRNA und SCR-siRNA.

Die x-Achse zeigt die verschiedenen siRNAs und deren unterschiedliche Konzentration in den Proben. Die y-Achse zeigt die relative Expression der mRNA im Verhältnis zu nicht transfizierten Zellen, deren relative Expression auf 1 gesetzt wird. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm SD von $n = 3$.

Eine nicht signifikant verminderte relative Expression der mRNA von PAR -1 wurde festgestellt bei der Transfektion mit der SCR-siRNA bei 25 nM um 26 %, bei 100 nM um 27 %, der PAR-1-siRNA bei 25 nM um 27 %, und bei 100 nM um 22 %.

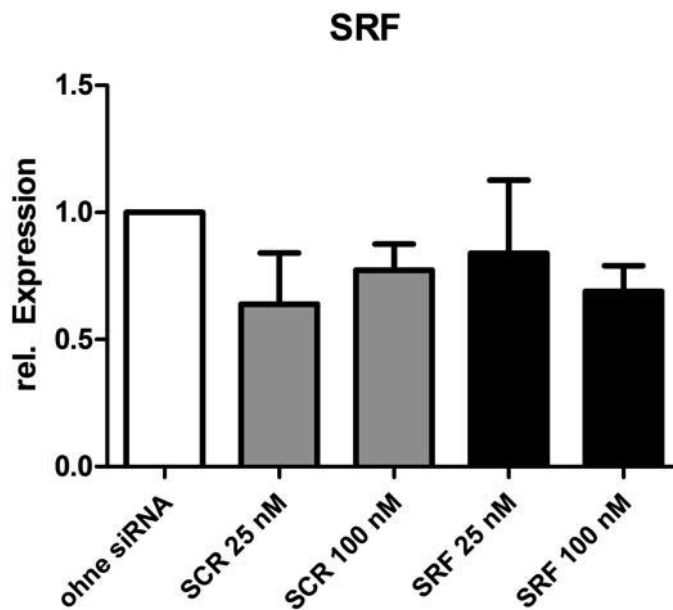


Abbildung 16: Relative Expression der Zelllinie A375 24 Stunden nach der Transfektion mit 25 und 100 nM SRF-siRNA und SCR-siRNA.

Die x-Achse zeigt die verschiedenen siRNAs und deren unterschiedliche Konzentration in den Proben. Die y-Achse zeigt die relative Expression der mRNA im Verhältnis zu nicht transfizierten Zellen, deren relative Expression auf 1 gesetzt wird. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm SD von $n = 3$.

Aus der Auswertung der Wirksamkeit funktioneller siRNA gegen SRF und nicht funktioneller SCR-siRNA zeigte sich eine nicht signifikante Reduktion der relativen Expression der mRNA von SRF.

Bei funktioneller siRNA gegen SRF betrug sie bei 25 nM 19 %, bei 100 nM 30 %, bei nicht funktioneller SCR-siRNA 26 % bei 25 nM und 35 % bei 100 nM.

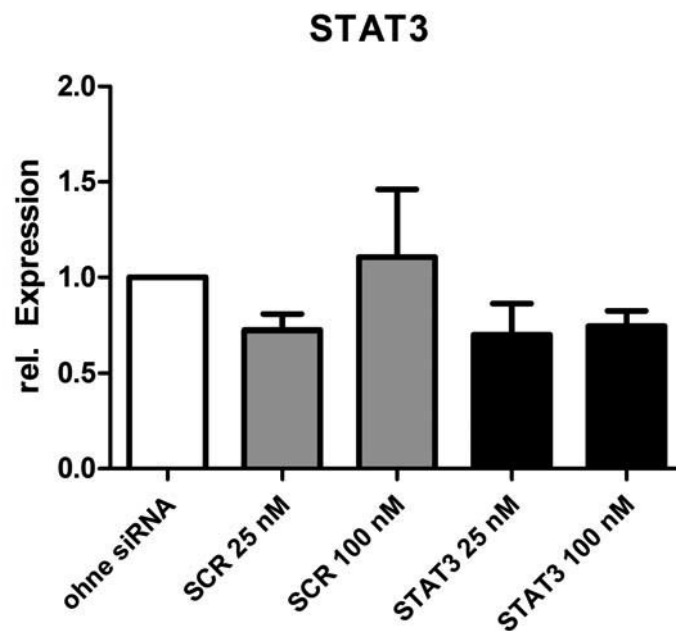


Abbildung 17: Relative Expression der Zelllinie A375 24 Stunden nach der Transfektion mit 25 und 100 nM STAT3-siRNA und SCR-siRNA.

Die x-Achse zeigt die verschiedenen siRNAs und deren unterschiedliche Konzentration in den Proben. Die y-Achse zeigt die relative Expression der mRNA im Verhältnis zu nicht transfizierten Zellen, deren rel. Expression auf 1 gesetzt wird. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm SD von $n = 3$.

Bei der Auswertung der relativen Expression der mRNA von STAT3 ist zu sehen, dass eine nicht signifikante Verminderung der Genexpression auf mRNA Ebene von STAT3 bei der Anwendung von 25 nM SCR-siRNA und der funktionellen siRNA gegen STAT3 stattgefunden hat.

Bei 25 nM SCR -siRNA beträgt die Verminderung um 27 %, bei funktioneller 25 nM siRNA gegen STAT3 um 30 % und bei 100 nM um 26 %.

Die Anwendung von 100 nM SCR-siRNA führte zu einer geringen Erhöhung in der relativen Expression.

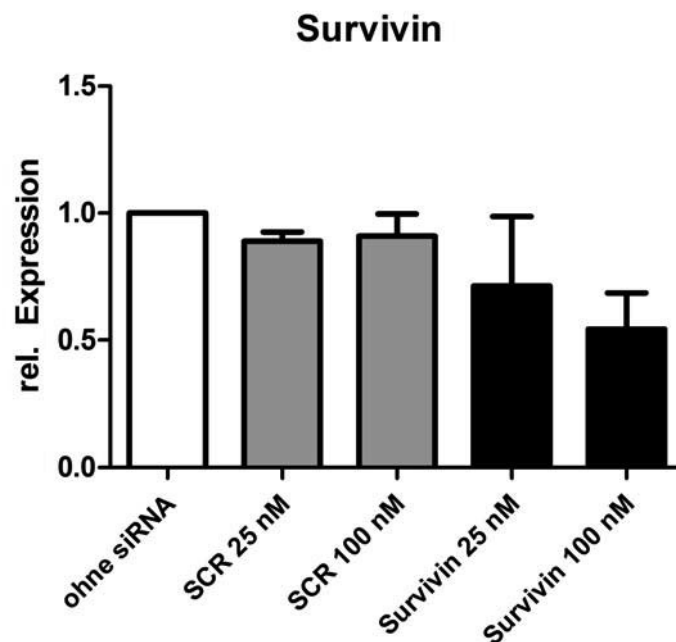


Abbildung 18: Relative Expression der Zelllinie A375 24 Stunden nach der Transfektion mit 25 und 100 nM Survivin-siRNA und SCR-siRNA .

Die x-Achse zeigt die verschiedenen siRNAs und deren unterschiedliche Konzentration in den Proben. Die y-Achse zeigt die relative Expression der mRNA im Verhältnis zu nicht transfizierten Zellen, deren relative Expression auf 1 gesetzt wird. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm SD von $n = 3$.

Der Einsatz der nicht funktionellen SCR-siRNA ergab eine geringe nicht signifikante Unterdrückung der relativen Expression der mRNA von Survivin bei 25 nM um 12 % und 100 nM um 11 % und der funktionellen siRNA gegen Survivin eine deutliche Unterdrückung der relativen Expression mRNA von Survivin bei 25 nM um 30 % und bei 100 nM um 45 %.

4.1.3 Zelllinie SKMEL 28

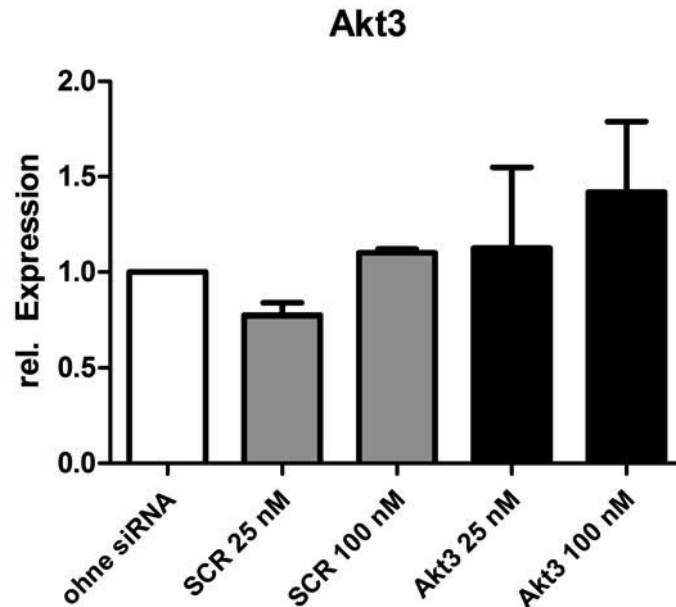


Abbildung 19: Relative Expression der Zelllinie SKMEL28 24 Stunden nach der Transfektion mit 25 und 100 nM Akt3-siRNA und SCR-siRNA.

Die x-Achse zeigt die verschiedenen siRNAs und deren unterschiedliche Konzentration in den Proben. Die y-Achse zeigt die relative Expression der mRNA im Verhältnis zu nicht transfizierten Zellen, deren relative Expression auf 1 gesetzt wird. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm SD von $n = 3$.

Die Untersuchung der Wirksamkeit der siRNA gegen Akt3 zeigt, dass die funktionelle siRNA gegen Akt3 die relative Expression der mRNA von Akt3 erhöhte, bei 25 nM um 10 % und bei 100 nM um 40 %.

Bei nicht funktioneller 100 nM SCR-siRNA hat eine Erhöhung der relativen Expression der mRNA um 9 % und bei 25 nM eine nicht signifikante Verminderung um 25 % stattgefunden.

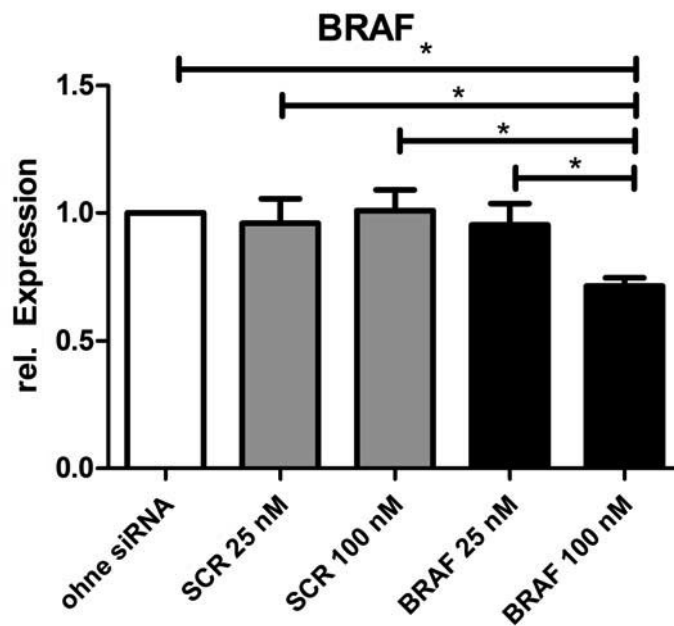


Abbildung 20: Relative Expression der Zelllinie SKLM28 24 Stunden nach der Transfektion mit 25 und 100 nM BRAF- und SCR-siRNA.

Die x-Achse zeigt die verschiedenen siRNAs und deren unterschiedliche Konzentration in den Proben. Die y-Achse zeigt die relative Expression der mRNA im Verhältnis zu nicht transfizierten Zellen, deren relative Expression auf 1 gesetzt wird. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm SD von $n = 3$. Die statistische Signifikanz auf einem Niveau von $p^* \leq 0,05$ mit einem Stern gekennzeichnet.

Bei der Auswertung der relativen Expression der mRNA von BRAF zeigte sich bei der Anwendung von 100 nM BRAF-siRNA eine signifikante Reduktion der Genexpression der mRNA von BRAF um 30 % zu nicht transfizierten Zellen. Auch im Vergleich zu 25 und 100 nM SCR-siRNAs, und zu 25 nM BRAF-siRNA erzielte 100 nM BRAF-siRNA die höchste Reduktion der relative Expression der mRNA von BRAF.

Die 25 nM BRAF- siRNA zeigte eine geringe Reduktion um 5 %.

Eine veränderte relative Expression der mRNA von BRAF durch Einsatz von 100 nM SCR-siRNA wurde nicht beobachtet, der Einsatz von 25 nM führte zur lediglich 5 % igen Reduktion der Genexpression der mRNA von BRAF.

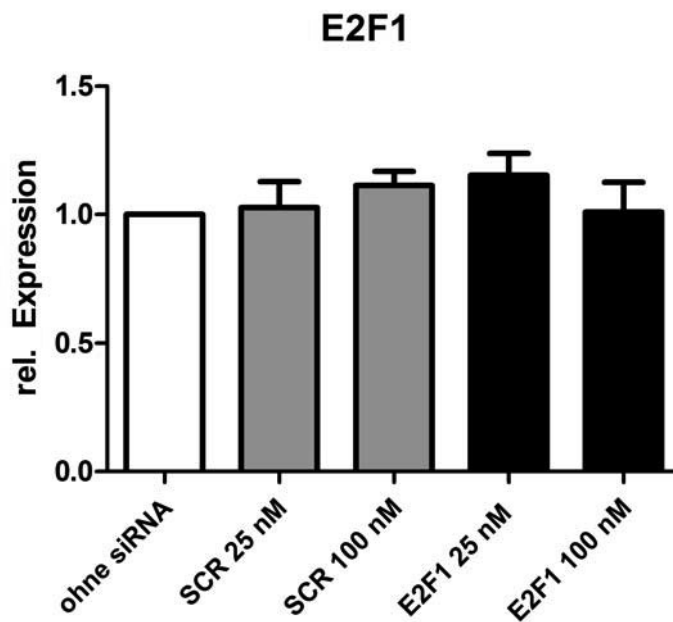


Abbildung 21: Relative Expression der Zelllinie SKLM28 24 Stunden nach der Transfektion mit 25 und 100 nM E2F1-siRNA und SCR-siRNA.

Die x-Achse zeigt die verschiedenen siRNAs und deren unterschiedliche Konzentration in den Proben. Die y-Achse zeigt die relative Expression der mRNA im Verhältnis zu nicht transfizierten Zellen, deren relative Expression auf 1 gesetzt wird. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm SD von $n = 3$.

Bei der Untersuchung der Genexpression der mRNA von E2F1 konnte keine signifikante Veränderung festgestellt.

Nicht funktionelle SCR-siRNA und 25 nM E2F1-siRNA führten zu einer geringen, nicht signifikanten Erhöhung der Genexpression bei 25 nM SCR-siRNA um 2 %, bei 100 nM um 10 % und um 15 % bei 25 nM E2F1.

Die 100 nM E2F1-siRNA ergab keine Veränderung der Genexpression der mRNA von E2F1.

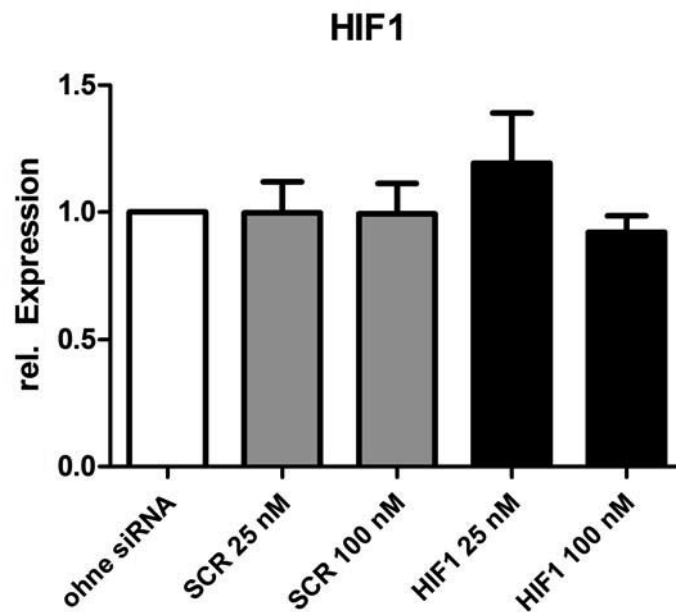


Abbildung 22: Relative Expression der Zelllinie SKLM28 24 Stunden nach der Transfektion mit 25 und 100 nM HIF1-siRNA und SCR-siRNA.

Die x-Achse zeigt die verschiedenen siRNAs und deren unterschiedliche Konzentration in den Proben. Die y-Achse zeigt die relative Expression der mRNA im Verhältnis zu nicht transfizierten Zellen, deren relative Expression auf 1 gesetzt wird. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm SD von $n = 3$.

Bei der Auswertung der relativen Expression der mRNA von HIF1 ist zu sehen, dass es keine Änderung der Genexpression auf mRNA Ebene von HIF1 bei der Anwendung von 25 nM und 100 nM SCR-siRNA gab.

Die 100 nM HIF1-siRNA ergab eine minimale Unterdrückung der Genexpression der mRNA von HIF1 um 13 % und 25 nM HIF1-siRNA ergab eine geringe Erhöhung in der relativen Expression mRNA von HIF1 um 20 %.

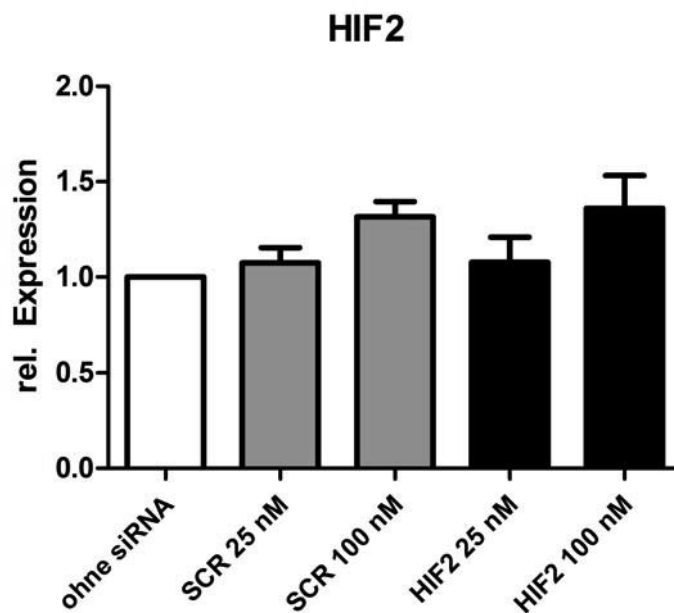


Abbildung 23: Relative Expression der Zelllinie SKLM28 24 Stunden nach der Transfektion mit 25 und 100 nM HIF2-siRNA und SCR-siRNA.

Die x-Achse zeigt die verschiedenen siRNAs und deren unterschiedliche Konzentration in den Proben. Die y-Achse zeigt die relative Expression der mRNA im Verhältnis zu nicht transfizierten Zellen, deren relative Expression auf 1 gesetzt wird. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm SD von $n = 3$.

Die Auswertung des Effekts der funktionellen siRNA gegen HIF2 und nicht funktioneller SCR-siRNA ergab in allen Ansätzen eine Steigerung der relativen Expression der mRNA von HIF2 bei 25 nM SCR- und HIF2-siRNAs um 10 %, bei 100 nM SCR-siRNA um 24 % und bei 100 nM HIF2 um 26 %.

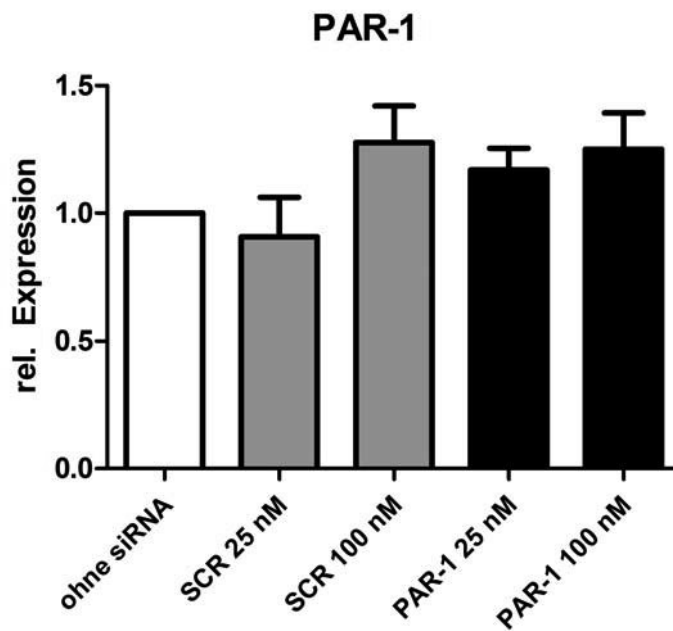


Abbildung 24: Relative Expression der Zelllinie SKLM28 24 Stunden nach der Transfektion mit 25 und 100 nM PAR-1-siRNA und SCR-siRNA.

Die x-Achse zeigt die verschiedenen siRNAs und deren unterschiedliche Konzentration in den Proben. Die y-Achse zeigt die relative Expression der mRNA im Verhältnis zu nicht transfizierten Zellen, deren relative Expression auf 1 gesetzt. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm SD von $n = 3$.

Eine Unterdrückung der relativen Expression konnte bei der Auswertung der siRNA gegen PAR-1 nicht gemessen werden. Lediglich die 25 nM SCR-siRNA ergab eine minimale Reduktion der Genexpression um 12%.

Die funktionelle siRNA gegen PAR-1 erzielte eine Steigerung der relativen Expression von PAR-1 mRNA bei 25 nM um 20 %, bei 100 nM um 25 % und bei nicht funktioneller 100 nM SCR-siRNA um 26 %.

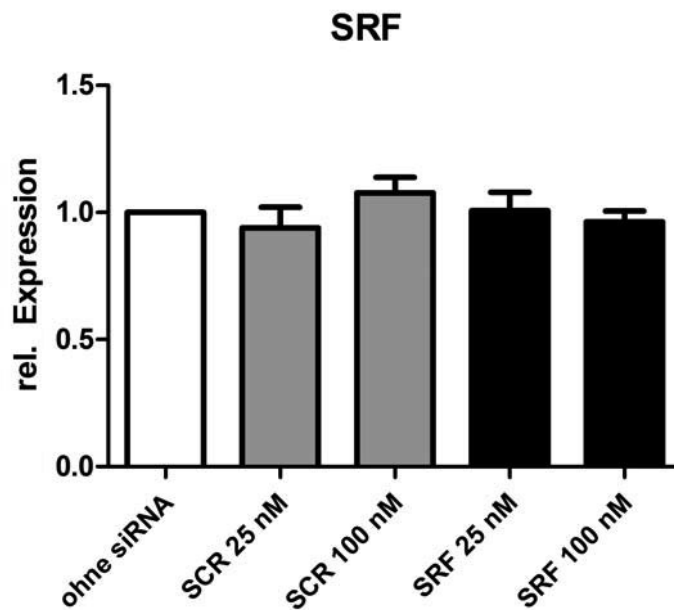


Abbildung 25: Relative Expression der Zelllinie SKLM28 24 Stunden nach der Transfektion mit 25 und 100 nM SRF-siRNA und SCR-siRNA.

Die x-Achse zeigt die verschiedenen siRNAs und deren unterschiedliche Konzentration in den Proben. Die y-Achse zeigt die relative Expression der mRNA im Verhältnis zu nicht transfizierten Zellen, deren relative Expression auf 1 gesetzt. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm SD von $n = 3$.

Eine signifikant verminderte relative Expression konnte bei der Auswertung von SRF nach siRNA Transfektion nicht gemessen werden.

Die SCR-siRNA führte zu einer verminderten relativen Expression bei 25 nM um 9 % und SRF-siRNA bei 100 nM um 5 %.

Beim Einsatz von 100 nM SCR-siRNA zeigte sich eine Vergrößerung in der relativen Expression um 9 %.

Die 25 nM SRF-siRNA ergab keine Änderung der relativen Expression der mRNA von SRF.

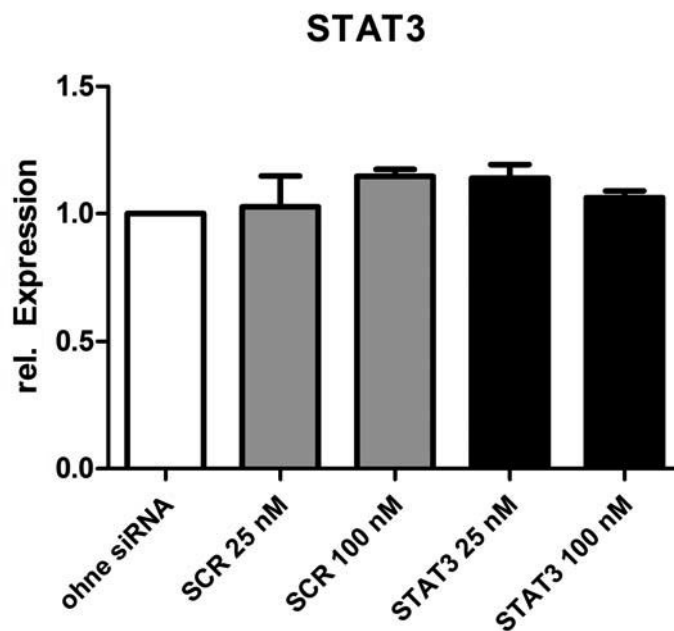


Abbildung 26: Relative Expression der Zelllinie SKLM28 24 Stunden nach der Transfektion mit 25 und 100 nM STAT3-siRNA und SCR-siRNA.

Die x-Achse zeigt die verschiedenen siRNAs und deren unterschiedliche Konzentration in den Proben. Die y-Achse zeigt die relative Expression der mRNA im Verhältnis zu nicht transfizierten Zellen, deren relative Expression auf 1 gesetzt wird. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm SD von $n = 3$.

Bei der Untersuchung der Genexpression der mRNA von STAT3 konnte keine signifikante Veränderung festgestellt werden.

Die nicht funktionelle 100 nM SCR-siRNA sowie die funktionellen 25 nM und 100 nM STAT3-siRNAs führten zu einer geringen Erhöhung der Genexpression bei 100 nM SCR-siRNA um 13 %, bei 25 nM STAT3- siRNA um 13 % und um 3 % bei 100 nM.

Die 25 nM SCR-siRNA ergab keine Veränderung der Genexpression der mRNA von STAT3.

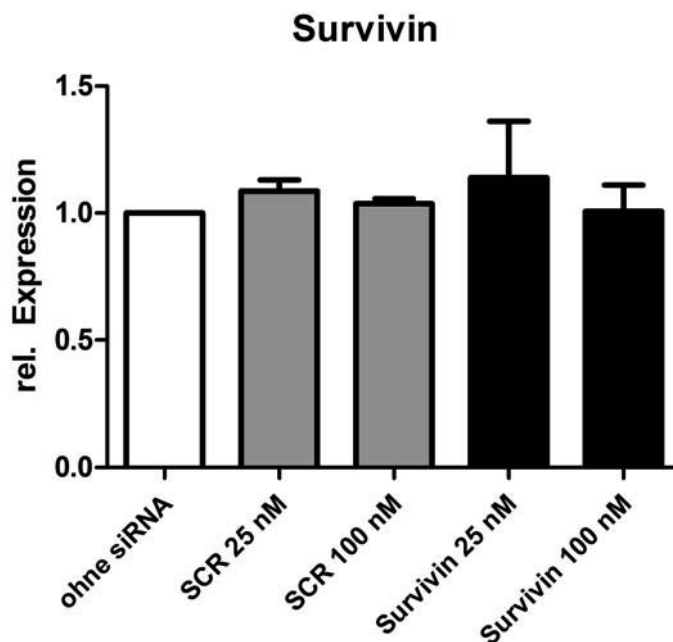


Abbildung 27: Relative Expression der Zelllinie SKLM28 24 Stunden nach der Transfektion mit 25 und 100 nM Survivin-siRNA und SCR-siRNA.

Die x-Achse zeigt die verschiedenen siRNAs und deren unterschiedliche Konzentration in den Proben. Die y-Achse zeigt die relative Expression der mRNA im Verhältnis zu nicht transfizierten Zellen, deren relative Expression auf 1 gesetzt wird. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm SD von $n = 3$.

Bei der Auswertung der relativen Expression der mRNA von Survivin ist zu sehen, dass eine Erhöhung der Genexpression auf mRNA Ebene von Survivin bei der Anwendung von nicht funktioneller SCR-siRNA, und der funktionellen siRNA gegen Survivin in der Konzentration von 25 nM stattgefunden hat und zwar bei 25 nM SCR-siRNA um 8 %, bei 100 nM um 3 % und bei funktioneller 25 nM siRNA gegen Survivin um 15 %.

Die Anwendung von 100 nM Survivin-siRNA führte zu keiner Änderung der relativen Expression der mRNA von Survivin.

4.1.4 Zelllinie HaCaT

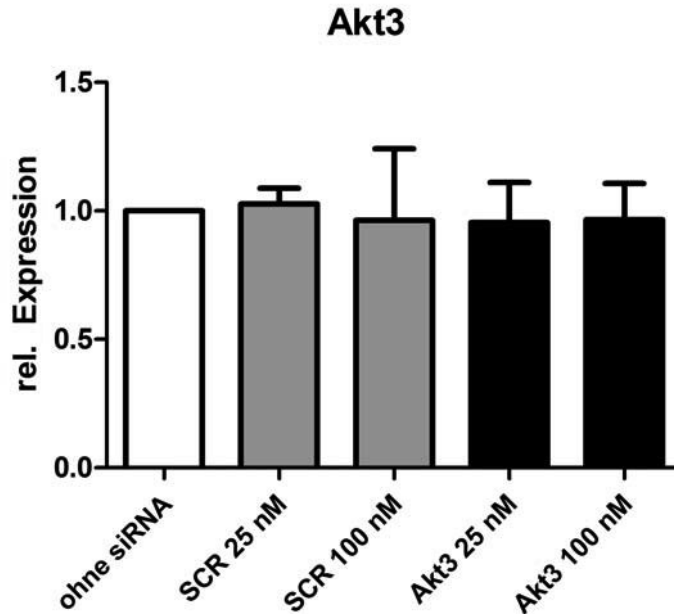


Abbildung 28: Relative Expression der Zelllinie HaCaT 24 Stunden nach der Transfektion mit 25 und 100 nM Akt3-siRNA und SCR-siRNA.

Die x-Achse zeigt die verschiedenen siRNAs und deren unterschiedliche Konzentration in den Proben. Die y-Achse zeigt die relative Expression der mRNA im Verhältnis zu nicht transfizierten Zellen, deren relative Expression auf 1 gesetzt wird. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm SD von $n = 4$.

Bei der Untersuchung der Genexpression der mRNA von Akt3 konnte so gut wie keine Veränderung festgestellt werden.

Die nicht funktionelle 100 nM SCR-siRNA und die beiden Konzentrationen von funktioneller siRNA gegen Akt3 führten zu einer minimalen Verringerung der Genexpression um 5 %.

Die nicht funktionelle 25 nM SCR-siRNA führte zu minimaler Erhöhung der Genexpression um 2 %.

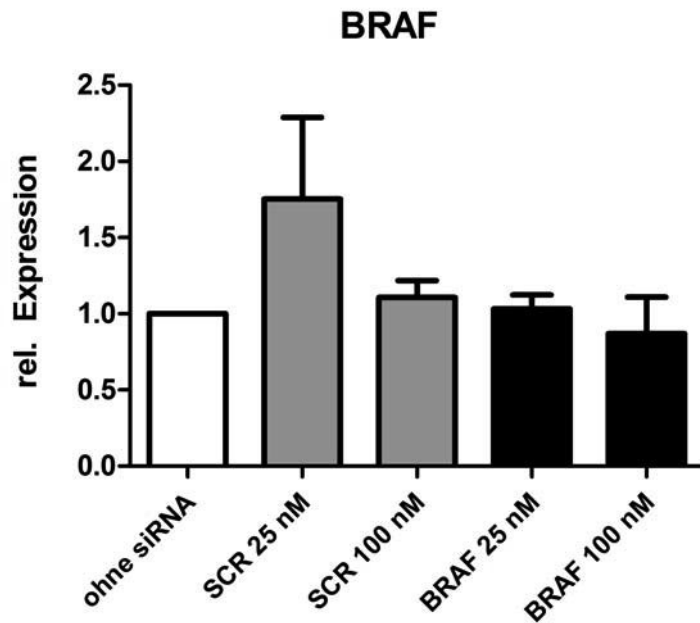


Abbildung 29: Relative Expression der Zelllinie HaCaT 24 Stunden nach der Transfektion mit 25 und 100 nM BRAF-siRNA und SCR-siRNA.

Die x-Achse zeigt die verschiedenen siRNAs und deren unterschiedliche Konzentration in den Proben. Die y-Achse zeigt die relative Expression der mRNA im Verhältnis zu nicht transfizierten Zellen, deren relative Expression auf 1 gesetzt wird. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm SD von $n = 4$.

Eine signifikanter Knockdown der relativen Expression konnte bei der Auswertung der siRNA gegen BRAF nicht gemessen werden. Die 25 nM SCR-siRNA ergab eine nicht signifikante Steigerung der Genexpression um 73 %, um 11 % bei 100 nM und bei 25 nM BRAF-siRNA um 3 %.

Die 100 nM BRAF-siRNA zeigte eine Unterdrückung der Genexpression um 10 %.

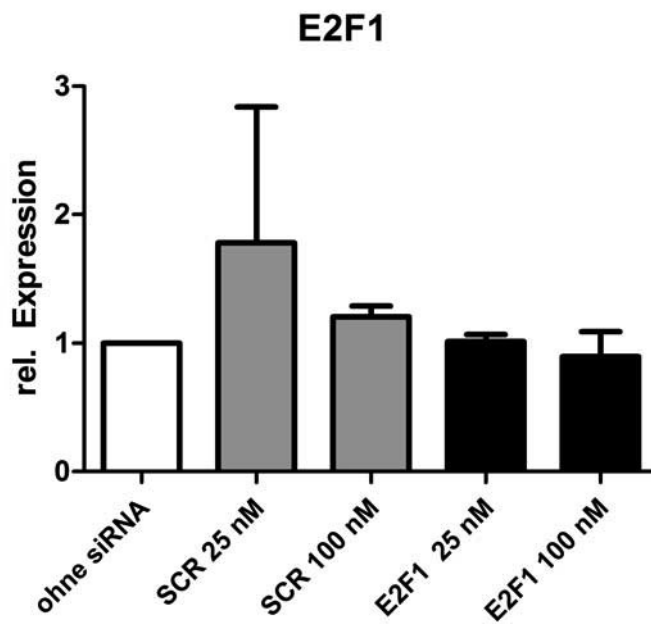


Abbildung 30: Relative Expression der Zelllinie HaCaT 24 Stunden nach der Transfektion mit 25 und 100 nM E2F1-siRNA und SCR-siRNA.

Die x-Achse zeigt die verschiedenen siRNAs und deren unterschiedliche Konzentration in den Proben. Die y-Achse zeigt die relative Expression der mRNA im Verhältnis zu nicht transfizierten Zellen, deren relative Expression auf 1 gesetzt wird. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm SD von $n = 4$.

Bei der Auswertung der relativen Expression mRNA von E2F1 ist zu sehen, dass eine nicht signifikante Vergrößerung der Genexpression auf mRNA Ebene von E2F1 bei der Anwendung von nicht funktioneller SCR-siRNA bei 25 nM um 74 % und 100 nM um 13 % stattgefunden hat.

Die funktionelle siRNA gegen E2F1 führte zur Verminderung der Genexpression der mRNA von E2F1 bei 25 nM um 1 % und 100 nM um 10 %.

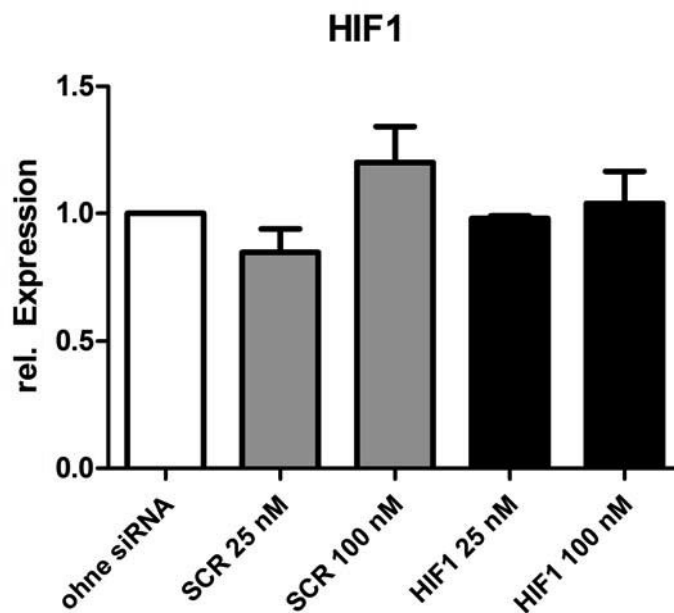


Abbildung 31: Relative Expression der Zelllinie HaCaT 24 Stunden nach der Transfektion mit 25 und 100 nM HIF1-siRNA und SCR-siRNA.

Die x-Achse zeigt die verschiedenen siRNAs und deren unterschiedliche Konzentration in den Proben. Die y-Achse zeigt die relative Expression der mRNA im Verhältnis zu nicht transfizierten Zellen, deren relative Expression auf 1 gesetzt wird. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm SD von $n = 4$.

Die Auswertung der Effekte der funktionellen siRNA gegen HIF1 und nicht funktionellen SCR-siRNA ergab eine leichte Verringerung der relativen Expression der mRNA von HIF1 bei 25 nM SCR-siRNA um 18 % und bei 25 nM HIF1-siRNA um 1 %.

Die 100 nM SCR -siRNA ergab eine Erhöhung der relativen Expression der mRNA von HIF1 um 44 %. Bei 100 nM HIF1 -siRNA zeigte sich eine Erhöhung um 3 %.

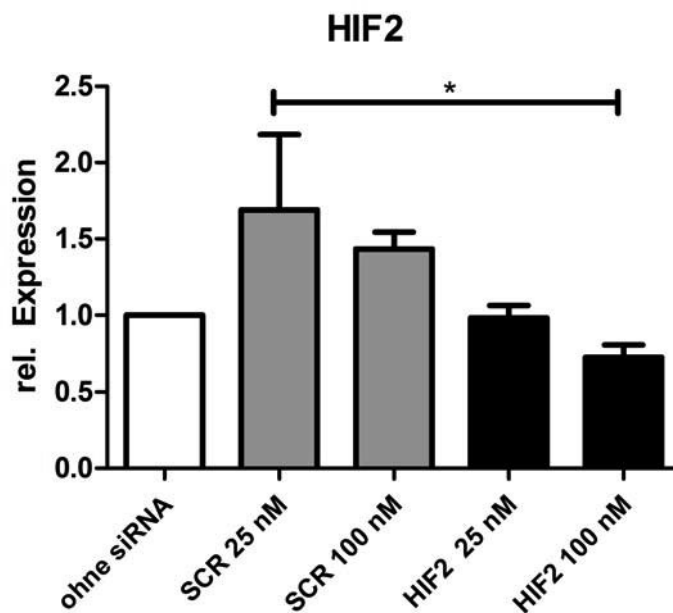


Abbildung 32: Relative Expression der Zelllinie HaCaT 24 Stunden nach der Transfektion mit 25 und 100 nM HIF2-siRNA und SCR-siRNA.

Die x-Achse zeigt die verschiedenen siRNAs und deren unterschiedliche Konzentration in den Proben. Die y-Achse zeigt die relative Expression der mRNA im Verhältnis zu nicht transfizierten Zellen, deren relative Expression auf 1 gesetzt wird. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm SD von $n = 4$.

Die statistische Signifikanz auf einem Niveau von $p^* \leq 0,05$ mit einem Stern gekennzeichnet.

Die Auswertung der Wirksamkeit auf der Genexpression der mRNA von HIF2 nach der Transfektion mit SCR-siRNA zeigte eine Steigerung der relativen Expression beim Einsatz von 25 nM um 75 % und bei 100 nM um 45 %.

Der Einsatz vom 25 nM HIF2-siRNA führte zur keiner Veränderung der relativen Expression der mRNA von HIF2.

Die 100 nM HIF2-siRNA führte zu einer signifikanten Reduktion der relativen Expression der mRNA von HIF2 zu 25 nM SCR-siRNA und zu einer Verringerung von 29 % im Vergleich zur nicht transfizierten Kontrolle.

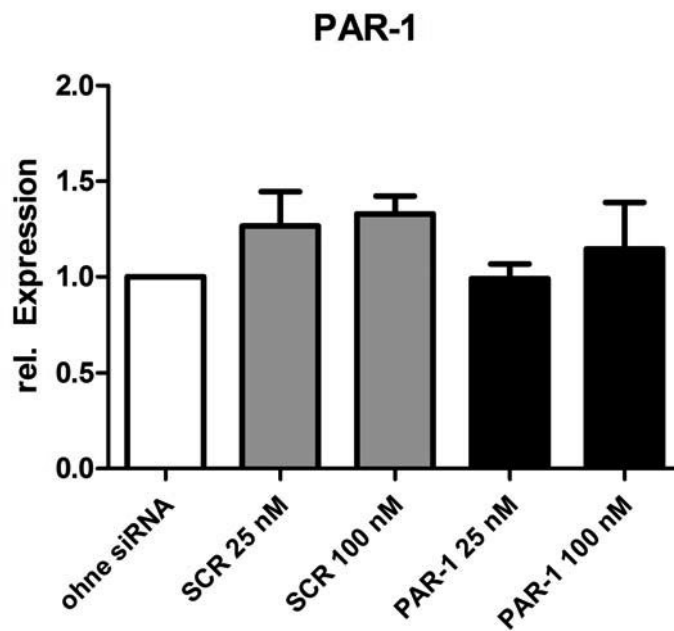


Abbildung 33: Relative Expression der Zelllinie HaCaT24 Stunden nach der Transfektion mit 25 und 100 nM PAR-1-siRNA und SCR-siRNA.

Die x-Achse zeigt die verschiedenen siRNAs und deren unterschiedliche Konzentration in den Proben. Die y-Achse zeigt die relative Expression der mRNA im Verhältnis zu nicht transfizierten Zellen, deren relative Expression auf 1 gesetzt wird. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm SD von $n = 4$.

Eine signifikante Unterdrückung der relativen Expression konnte bei der Auswertung der siRNA gegen PAR -1 nicht gemessen werden. Der Einsatz 25 nM PAR-1-siRNA ergab eine minimale, Reduktion der Genexpression um 1%.

Die nicht funktionelle SCR-siRNA erzielte eine Steigerung der relativen Expression der mRNA von PAR-1 bei 25 nM um 24 % und bei 100 nM um 27 % und die funktionelle 100 nM PAR-1-siRNA um 18 %.

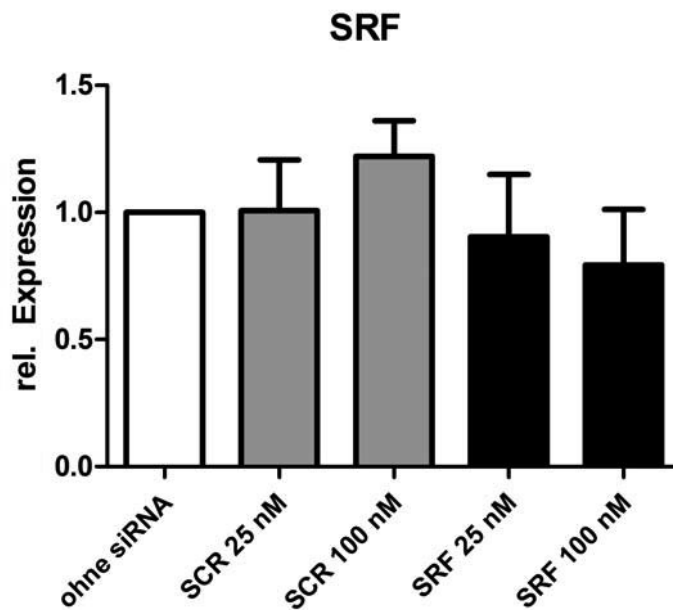


Abbildung 34: Relative Expression der Zelllinie HaCaT 24 Stunden nach der Transfektion mit 25 und 100 nM SRF-siRNA und SCR-siRNA.

Die x-Achse zeigt die verschiedenen siRNAs und deren unterschiedliche Konzentration in den Proben. Die y-Achse zeigt die relative Expression der mRNA im Verhältnis zu nicht transfizierten Zellen, deren relative Expression auf 1 gesetzt wird. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm SD von $n = 4$.

Die Anwendung funktioneller siRNA gegen SRF ergab in beiden Konzentrationen eine Reduktion der Genexpression der mRNA von SRF bei 25 nM um 12 % und bei 100 nM um 25 %.

Beim Einsatz von 100 nM SCR-siRNA zeigte sich eine Erhöhung in der Genexpression um 20 %. Die 25 nM SCR-siRNA ergab keine Veränderung in der Genexpression.

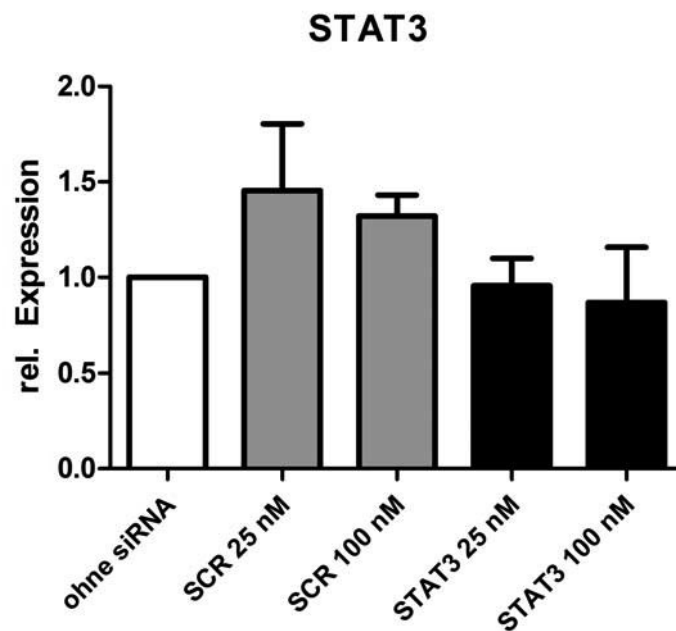


Abbildung 35: Relative Expression der Zelllinie HaCaT 24 Stunden nach der Transfektion mit 25 und 100 nM STAT3-siRNA und SCR-siRNA.

Die x-Achse zeigt die verschiedenen siRNAs und deren unterschiedliche Konzentration in den Proben. Die y-Achse zeigt die relative Expression der mRNA im Verhältnis zu nicht transfizierten Zellen, deren relative Expression auf 1 gesetzt wird. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm SD von $n = 4$.

Bei der Untersuchung der Genexpression der mRNA von STAT3 konnte keine signifikante Veränderung festgestellt werden.

Der Einsatz von nicht funktioneller SCR-siRNA führte zur Erhöhung der Genexpression bei 25 nM um 40 %, bei 100 nM um 27 %.

Der Einsatz von funktioneller siRNA gegen STAT3 führte zu einer Verminderung der Genexpression der mRNA gegen STAT3 bei 25 nM um 5 % und bei 100 nM um 20 %.

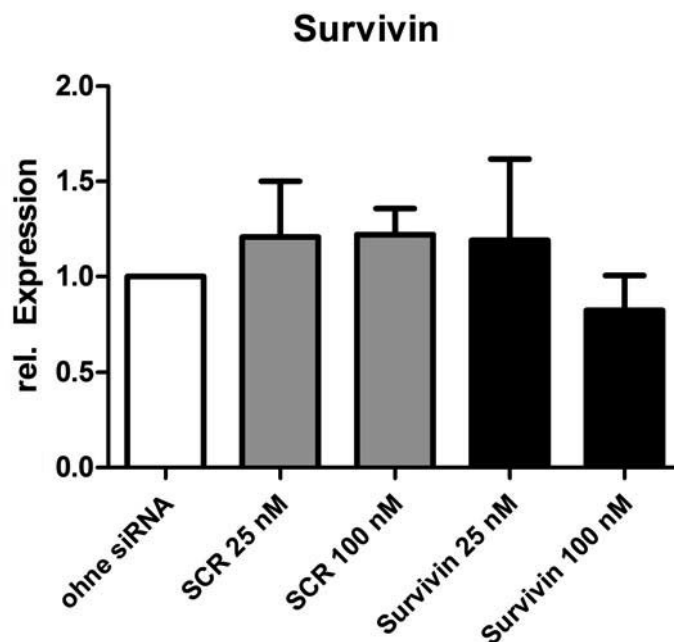


Abbildung 36: Relative Expression der Zelllinie HaCaT 24 Stunden nach der Transfektion mit 25 und 100 nM Survivin-siRNA und SCR-siRNA.

Die x-Achse zeigt die verschiedenen siRNAs und deren unterschiedliche Konzentration in den Proben. Die y-Achse zeigt die relative Expression der mRNA im Verhältnis zu nicht transfizierten Zellen, deren relative Expression auf 1 gesetzt wird. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm SD von $n = 4$.

Bei der Auswertung der relativen Expression der mRNA von Survivin ist zu sehen, dass eine Erhöhung der Genexpression auf mRNA Ebene von Survivin bei der Anwendung von nicht funktioneller SCR -siRNA und der funktionellen siRNA gegen Survivin in den Konzentrationen 25 nM, 100 nM bei nicht funktioneller siRNA um 20 %, bei funktioneller 25 nM siRNA gegen Survivin um 19 % stattgefunden hat.

Die Anwendung von 100 nM Survivin-siRNA führte zu einer Reduktion der Genexpression auf mRNA-Ebene von Survivin um 21 %.

4.1.5 Darstellung der siRNAs die einen signifikanten Knockdown oder einen annähernd signifikanten Knockdown erzielen.

A375	A431	SKMEL 28	HaCaT
<u>Akt3</u>	Survivin	<u>BRAF</u>	<u>HIF2</u>
Survivin	HIF2		
E2F1	STAT3		
HIF1	SRF		
SRF			
STAT3			

Tabellarische Darstellung der siRNAs, die einen signifikanten Knockdown oder einen annähernd signifikanten Knockdown erzielen.

Die unterstrichenen siRNAs haben einen signifikanten Knockdown erzielt. Die nicht unterstrichenen siRNAs haben lediglich einen annähernd signifikanten Knockdown erzielt.

Bei der Untersuchung des siRNA-vermittelten Knockdowns wurde die Expression der mRNA mittels qRT-PCR ermittelt. Dabei konnten bei der Zelllinie A431 keine signifikanten Knockdowns erzielt werden.

Die siRNA gegen Survivin, HIF2, STAT3 und SRF führten zu einer deutlichen Reduktion der relativen Expression bei 25 nM, entsprechend um 30%, 30%, 35% und 33% im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen, und bei 100 nM um 50 %, 48%, 45% und 43%.

Bei der Zelllinie A375 konnte ein signifikanter Knockdown gemessen werden, nämlich bei 25 nM Akt3-siRNA also 70%, und bei 100 nM eine Reduktion der relativen Expression um 25%.

Eine deutliche Reduktion der Genexpression erzielten siRNAs gegen Survivin, nämlich um 45% bei 100 nM, E2F1 um 40% bei 100 nM und 38% bei 25 nM, HIF1 um 30% bei 100 nM, SRF um 30% bei 100 nM, STAT3 um 30% bei 25 nM.

Bei der Transfektion der Zelllinie SKMEL28 mit 100 nM BRAF-siRNA wurde eine signifikante Reduktion der Genexpression um 30% erreicht im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen.

Auch im Vergleich zu 25 und 100 nM SCR-siRNAs, und zu 25 nM BRAF-siRNA ergab der 100 nM BRAF-siRNA eine Signifikanz der relativen Expression der mRNA von BRAF.

Bei der Zelllinie HaCaT hatte nur 25 nM HIF2-siRNA einen Einfluss auf die Genexpression mit 29%.

Es zeigte sich eine Signifikanz zu 25 nM SCR-siRNA, die selbst zu einer 75%-Steigerung der relativen Expression der mRNA führte.

Bei allen vier Zelllinien führte die nicht funktionelle SCR-siRNA in beiden Konzentrationen zu keinem signifikanten Einfluss auf die Genexpression der mRNA-Ebene.

4.2 Ergebnisse der Zellviabilität mittels CASY®

4.2.1 Zelllinie HaCaT

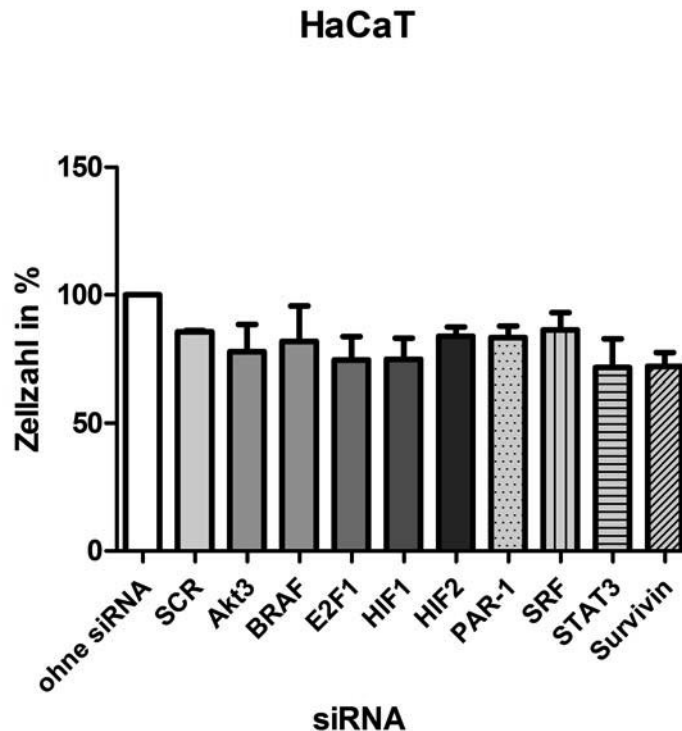


Abbildung 37: Darstellung der Zellzahl der Zelllinie HaCaT in % 3 Tage nach der Transfektion mit SCR-, Akt3-, BRAF-, E2F1-, HIF1-, HIF2-, PAR-1, SRF-, STAT3- und Survivin-siRNAs in 50 nM Konzentration.

Die x-Achse zeigt die verschiedenen siRNAs.

Die y-Achse zeigt die Zellzahl in % im Verhältnis zu nicht transfizierten Zellen.

Nicht transfizierte Zellen sind auf 100% gesetzt.

Die Balken zeigen den Mittelwert \pm SD von $n = 4$.

Wie aus obiger Abbildung zu sehen ist, führte die Transfektion der HaCaT Zelllinie mit der siRNA gegen Akt3-, BRAF-, E2F1-, HIF1-, HIF2-, PAR-1, SRF-, STAT3-, Survivin- und nicht funktioneller SCR-siRNAs zu keiner signifikanten Reduktion der Zellwachstums in den Transfektionsproben im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen.

Alle angewendeten siRNAs zeigten eine leichte Reduktion des Zellwachstums wie folgt: Akt3-siRNA um 22 %, BRAF-siRNA 18 %, E2F1-siRNA 26 %, HIF1-siRNA 25 %, HIF2-siRNA 16 %, PAR-1-siRNA 16 %, SRF-siRNA 14 %, STAT3-siRNA 29 %, Survivin -siRNA 28 %, SCR-siRNA 14 %.

4.2.2 Zelllinie A431

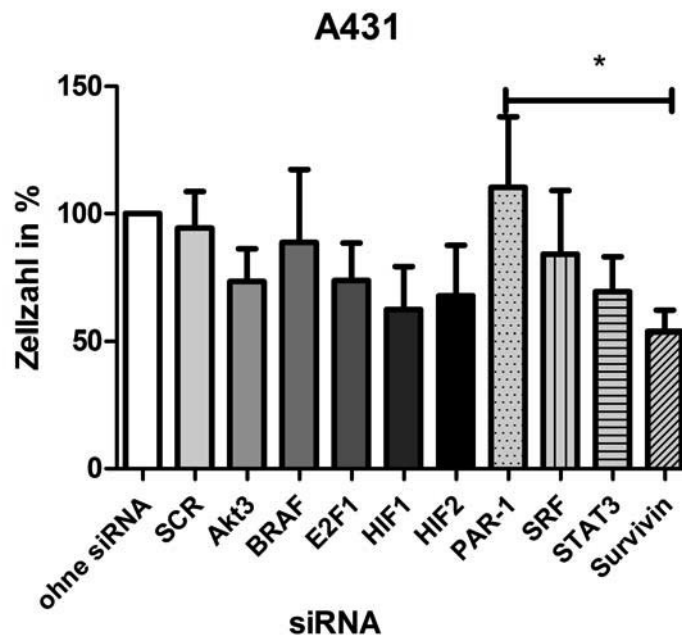


Abbildung 38: Die Darstellung zeigt die Zellzahl der Zelllinie A431 in % 3 Tage nach der Transfektion mit SCR-, Akt3-, BRAF-, E2F1-, HIF1-, HIF2-, PAR-1, SRF-, STAT3- und Survivin-siRNAs in 50 nM Konzentration.

Die x-Achse zeigt die verschiedenen siRNAs. Die y-Achse zeigt die Zellzahl in % im Verhältnis zu nicht transfizierten Zellen. Nicht transfizierte Zellen sind auf 100% gesetzt. Die Balken zeigten den Mittelwert \pm SD von $n = 3$. Die statistische Signifikanz auf einem Niveau von $p^* \leq 0,05$ ist mit einem Stern gekennzeichnet.

Die Auswertung der Zellzählung nach der Transfektion mit 50 nM funktioneller siRNA und nicht funktioneller siRNA, die mit dem CASY Cellcounter durchgeführte wurde, ergab eine Steigerung des Zellwachstums bei PAR-1-siRNA um 9 % und eine Reduktion des Zellwachstum bei BRAF-siRNA um 13 %, bei E2F1-siRNA um 23 %, bei Akt3-siRNA um 27 %, bei SRF-siRNA um 26 %, bei HIF2-siRNA und STAT3-siRNA um 35 % und bei HIF1-siRNA um 38 %. Der Einsatz von Survivin-siRNA zeigte die größte und statistisch signifikante Reduktion im Vergleich zu PAR-1-siRNA und eine Verringerung des Zellwachstums gegenüber untransfizierten Zellen um 47 %.

Diese Ergebnisse korrelieren mit den Ergebnissen der qRT-PCR, wo die Survivin-siRNA in der Lage war den höchsten Knockdown zu erzielen.

Die nicht funktionelle SCR-siRNA führte zu einer 5 %en Reduktion des Zellwachstum. Die HIF1- und HIF2-siRNAs zeigten ebenfalls eine Verringerung der Zellzahl, die mit den Ergebnissen der qRT-PCR korreliert.

4.2.3 Zelllinie SKMEL 28

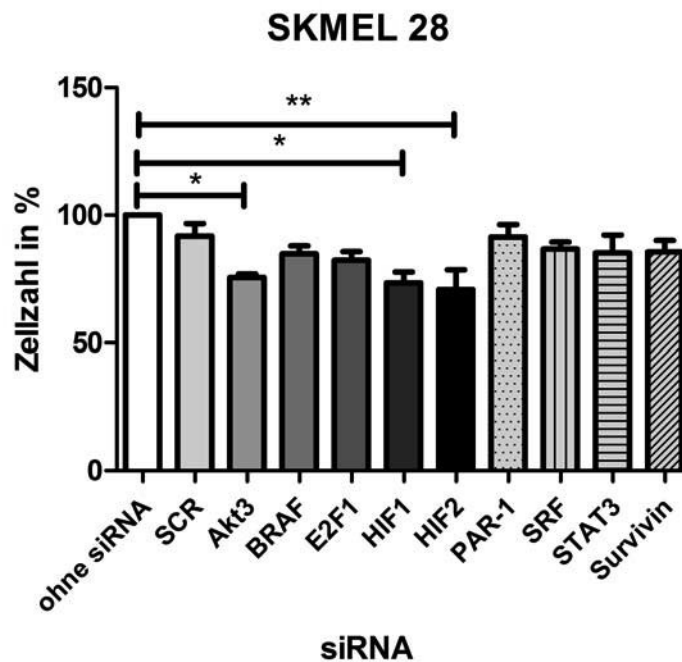


Abbildung 39: Die Darstellung zeigt die Zellzahl der Zelllinie SKMEL28 in % 3 Tage nach der Transfektion mit SCR-, Akt3 , BRAF-, E2F1-, HIF1-, HIF2-, PAR-1, SRF-, STAT3- und Survivin-siRNAs in 50 nM Konzentration.

Die x-Achse zeigt die verschiedenen siRNAs. Die y-Achse zeigt die Zellzahl in % im Verhältnis zu nicht transfizierten Zellen. Nicht transfizierte Zellen sind auf 100% gesetzt. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm SD von $n = 3$.

Die statistische Signifikanz auf einem Niveau von $p^* \leq 0,05$ ist mit einem Stern, bei $p^{**} \leq 0,005$ mit zwei Sternen gekennzeichnet.

Das Zellwachstum wurde nach der Anwendung funktioneller siRNA und nicht funktioneller siRNA unterdrückt.

Die Transfektion mit nicht funktioneller SCR-siRNA führte zu einer Unterdrückung des Zellwachstums um 8 %.

Die Anwendung der PAR-1 -, SRF-, Survivin-, STAT3-, BRAF- und E2F1-siRNAs ergab eine Abnahme des Zellwachstums um 9 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 % und 18 %. Darüber hinaus zeigte die Transfektion mit Akt3-, HIF1- und HIF2-siRNAs eine statistisch signifikante Reduktion des Zellwachstums im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen um 24 %, 27%, 29%.

4.2.4 Zelllinie A375

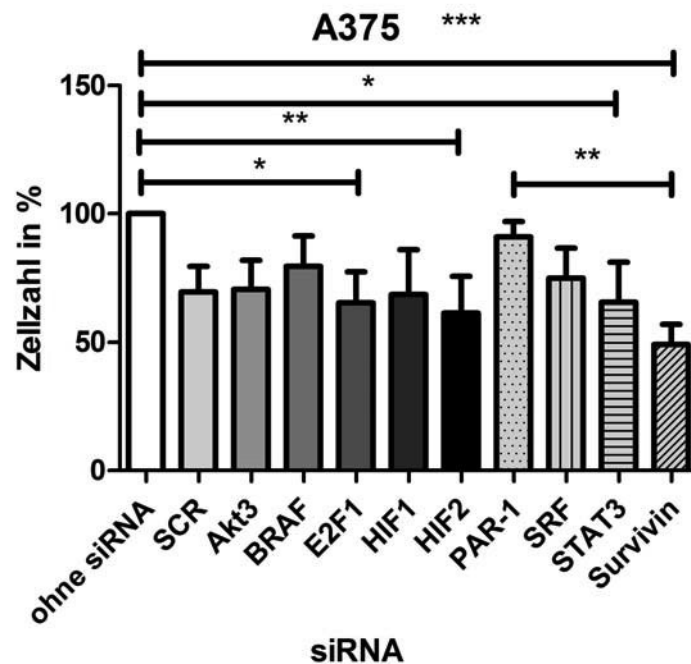


Abbildung 40: Die Darstellung zeigt die Zellzahl der Zelllinie A375 in % 3 Tage nach der Transfektion mit SCR-, Akt3-, BRAF-, E2F1-, HIF1-, HIF2-, PAR-1, SRF-, STAT3- und Survivin-siRNAs in 50 nM Konzentration.

Die x-Achse zeigt die verschiedenen siRNAs. Die y-Achse zeigt die Zellzahl in % im Verhältnis zu nicht transfizierten Zellen. Nicht transfizierte Zellen sind auf 100% gesetzt. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm SD von $n=3$. Die statistische Signifikanz auf einem Niveau von $p^* \leq 0,05$ ist mit einem Stern, bei $p^* \leq 0,005$ mit zwei Sternen und bei $p^* \leq 0,001$ mit drei Sternen gekennzeichnet.

Die Transfektion der Zelllinie A375 mit der 50 nM siRNAs führte zu einer Verminderung des Zellwachstums. Die Anwendung von SCR-siRNA führte zu 31 %, also einer nicht signifikanter Abnahme des Zellwachstums.

Die funktionelle PAR-1-, BRAF-, SRF-, Akt3- und HIF1-siRNAs führte zu einer nicht signifikanter Unterdrückung des Zellwachstums um 9 %, 22 %, 27 %, 31 % und 34 %.

Darüber hinaus zeigte die Transfektion mit STAT3-, E2F1-, HIF2- und Survivin-siRNAs eine statistisch signifikante Reduktion des Zellwachstums um 35 %, 36 %, 39 % und 51 % im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen.

Die Survivin-siRNA zeigte auch eine signifikante Unterdrückung des Zellwachstums im Vergleich zu PAR-1-siRNA.

4.2.5 Darstellung der siRNAs mit signifikantem annähernd signifikantem Knockdown

A375	A431	SKMLE 28	HaCaT
<u>Survivin 51%</u>	<u>Survivin 47%</u>	<u>HIF2 29%</u>	
<u>HIF2 39%</u>	HIF1 38%	<u>HIF1 27%</u>	
<u>E2F1 36%</u>	HIF2 35%	<u>Akt3 24%</u>	
<u>STAT3 35%</u>	STAT3 30%		
HIF1 34%			
Akt 31%			

Tabellarische Darstellung der siRNAs, die einen signifikanten Knockdown oder einen annähernd signifikanten Knockdown erzielt haben. Die unterstrichenen siRNAs haben einen signifikanten Knockdown erzielt. Die nicht unterstrichenen siRNAs haben lediglich einen annähernd signifikanten Knockdown erzielt.

Das höchste Auftreten von signifikanten Knockdowns wurde bei der Zelllinie A375 mittels CASY Zellzähler festgestellt.

Der Knockdown wurde bei der Anwendung von 50 nM Survivin-, HIF2-, E2F1- und STAT3-siRNAs bei Reduktion des Zellwachstums um 51%, 39%, 36% und 35% erreicht. Die HIF1- und Akt3-siRNAs reduzierten die Zellzahl um 34% und 31%. Damit haben sie einen annähernd signifikanten Knockdown erzielt.

Bei der Zelllinie A431 hat der Einsatz von Survivin-siRNA mit der Reduktion der Zellzahl um 47% im Vergleich zur PAR-1-siRNA einen signifikanten Knockdown gezeigt.

Die HIF1-, HIF2- und STAT3-siRNAs haben bei der Verringerung der Zellzahl um 38%, 35% und 30% einen annähernden Knockdown erreicht.

Die Anwendung von HIF2-, HIF1- und Akt3-siRNAs führte bei der Zelllinie SKMEL28 zu einem signifikanten Knockdown bei der Reduktion des Zellwachstums im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen um 29%, 27% und 24%.

In der Auswertung der Zellzahlen nach der Transfektion der Zelllinie HaCaT konnten signifikante oder annähernd signifikante Knockdowns nicht festgestellt werden.

Alle angewendeten siRNAs zeigten eine leichte Reduktion des Zellwachstums wie folgt: Akt3-siRNA um 22 %, BRAF-siRNA um 18 %, E2F1-siRNA um 26 %, HIF1-siRNA um 25 %, HIF2-siRNA um 16 %, HIF2-siRNA um 16%, SRF-siRNA um 14 %, STAT3-siRNA um 29 % und Survivin-siRNA um 28 %.

5 Diskussion

Die Zahl der bösartigen Hauterkrankungen wächst von Jahr zu Jahr. Die Behandlungsmethoden, die heute zur Therapie von großen und insbesondere metastasierenden Tumoren verwendet werden, sind oft mit Nebenwirkungen verbunden.

In dieser Arbeit wurde die Wirksamkeit der RNA-Interferenz auf verschiedene Hautkrebsarten untersucht.

Dazu wurden die Zelllinien A431, A375, SKML 28 und HaCaT mit funktionellen siRNAs gegen Akt3, BRAF, E2F1, HIF1, HIF2, PAR-1, SRF, STAT3 und Survivin in verschiedenen Konzentrationen transfiziert.

Dann wurde die Wirksamkeit der RNAi auf die Genexpression auf der mRNA Ebene mittels qRT-PCR, und auf die Zellzahl mittels CASY® cell counter system analysiert.

Zur Kontrolle standen unbehandelte Zellen entsprechender Zelllinien und Zellen, die mit nicht funktioneller SCR-siRNA transfiziert wurden, zur Verfügung.

Die SCR-siRNA wurde angesetzt als Kontrolle, um festzustellen, ob ein Knockdown durch entsprechende siRNA und damit durch der RNA-Interferenz stattgefunden hat, oder durch die Transfektion selbst hervorgerufen wurde.

Es sollte keine signifikante Veränderung der Genexpression durch nicht funktionelle SCR-siRNA stattfinden.

5.1 siRNA Stand der Forschung und Anwendung

Die Behandlungsverfahren am Hautkrebs, wie sie oben im 2. Kapitel beschrieben sind, sind in vielen Fällen erfolgreich im Sinne einer Änderung oder Heilung.

Sie haben jedoch oft Nachteile (eingeschränkte Behandlungsmöglichkeiten beim metastasierenden Tumor, Differenzierungsschwächen zwischen gesundem und befallenem Gewebe) sind vorhanden.

Deshalb sind neue Wege zu einer bereits bei der Entstehung der Erkrankung eingreifenden Therapie gesucht.

Diese Forschung zielt in erster Linie auf die Beeinflussung der Eigenschaften von Krebszellen auf molekularer Ebene.

Die gesuchten neuen Behandlungsmethoden werden "targeted therapies" genannt.

Zur Verhinderung der Entstehung von Krebs und Metastasenbildung wird auf genetischer Ebene intensiv geforscht.

Einer dieser Wege ist die Beeinflussung der Genexpression durch eine sogenannte siRNA Therapie.

Kleine siRNA-Moleküle bieten gute Therapiemöglichkeiten, indem sie als Arznei in einem sehr frühen Stadium der Erkrankung eingreifen.

Im Vergleich zu einer anderen Wirkstoffgruppe (sogenannte Antikörper), die in letzter Zeit vielversprechende Hoffnungen machen, wirken siRNA-Moleküle im Zellinneren, führen zu einem Abbau der komplementären mRNA, damit zu einer verminderten Expression , des an der Erkrankung beteiligten Proteins.

SiRNAs binden komplementär an der mRNA, was dann zu Spaltung der mRNA führt. Dadurch geht die Information für die Bildung eines bestimmten Proteins verloren. Das Gen wird stumm geschaltet. Auf diese Weise kann ganz gezielt beim Tumor, bei dem eine Überexpression eines bestimmten Genes vorliegt, diese Überexpression gestoppt werden.

Dafür muss eine molekulare Untersuchung einer Tumorbiopsie durchgeführt werden, um festzustellen, welche Veränderungen in der DNA vorliegen mit dem Ziel, spezifische Biomarker zu finden.

Nach der Festlegung eines Biomarkers für die entsprechende Krebsart lässt sich sagen, für welchen Patienten diese Therapie geeignet ist (media.bayer.com/baynews/-baynews.nsf/id/news-overview-category-search-en#/search (Zugriff 07.10.2019)).

Die Anwendung von RNA-basierten Medikamenten ist noch mit einigen Schwierigkeiten verbunden, insbesondere wird noch an Methoden zur Einbringung in den Zielort geforscht.

Viele Wirkstoffe auf Basis vom siRNA befinden sich in klinischer Erprobung in Phase III (Charkraborty C. et alii, Seiten 132-143).

In der EU ist ein erstes Medikament auf der Basis von siRNA zugelassen. Dieses zielt auf die Heilung einer neuroregenerativen Erbkrankheit ab.

Es handelt sich um "Patisiran (Onpattro® von Alnylam)", eine Medikament auf der Basis der RNA-Interferenz-(RNAi).

Es richtet sich auf der Behandlung der "hereditären Transthyretin-vermittelte Amyloidose", für die es bislang überhaupt keine Therapiemöglichkeit gibt. Der meist letalen Krankheitsverläufe liegt eine Genveränderung im Transthyretin (TTR)-Gen zugrunde.

Der Wirkstoff bindet an spezifische mRNA und bewirkt die Stilllegung dieses Gens mit der Folge der Stilllegung der Amyloidproteine.

Erfolge sind messbar bei bestehenden Nebenwirkungen, vgl. im einzelnen www.pharmazeutische-zeitung.de/2018-08/patisiran-eu-zulassung-fuer-erstes-rnai-medikament/ (Zugriff 06.06.2020).

5.2 Therapeutische Anwendungen und Herausforderungen

Eine Vielzahl vorklinischer und klinischer Studien und der erste zugelassene Wirkstoff (Patisiran) zeigen, dass es möglich ist, auf dem Wege der RNAi (RNA-Interferenz) über siRNA Gene gezielt auszuschalten.

Fragen über die Abgabe einer therapeutischen siRNA an das Zielgewebe und der Übertritt des Wirkstoffs in das Zellinnere ebenso wie Schwierigkeiten, die in Verbindung mit dem sogenannten "Off-Targeting" stehen, Probleme im Zusammenhang mit der angeborenen Immunantwort und geringe Serumstabilität sind noch nicht ganz beantwortet.

Es gilt, die bereits jetzt zur Verfügung stehenden Wege zu optimieren oder neue zu finden.

Das Problem ist: Die Zellmembran ist negativ geladen, siRNA ist ebenfalls negativ geladen, es kommt also zu einem Abstosseffekt.

Als ein vielversprechender Weg wird die Anwendung von Nanopartikeln betrachtet, über welche siRNA transportiert, von der Zelle aufgenommen und anschließend freigesetzt werden kann.

Es gibt verschiedene Systeme, um siRNA biologisch verfügbar zu machen, u. a. PEGylierte (mit Polyethylenglycol konjugierte) Liposomen, Lipidoide und biologisch abbaubare Polymere.

Diese Stoffe bilden mit siRNA Vesikel.

Diese Vesikel, die einen Durchmesser zwischen 50 und 500nm haben, finden Verwendung bei der Lieferung von therapeutischer miRNAs und siRNAs.

Liposomen sind Vesikel in Kugelform. Sie enthalten eine oder mehrere Lipiddoppelschichten. Sie haben einen wässrigen Kern, in welchem sich therapeutische miRNA- und siRNA-Moleküle befinden können.

Durch Verwendung der Vesikel lässt sich erreichen, dass eine Filterung der Medikamente durch die Nieren nicht stattfindet.

Ausserdem wird die intrazelluläre Abgabe optimiert (Wang Ji et alii, *Delivery of siRNA Therapeutics: Barriers and Carriers*, doi: 10.1208/s12248-010-9210-4 (Zugriff 06.06.2020)).

Unter Lipoplexen versteht man ein Abgabesystem, in welchem kationische Lipide enthalten sind. Dies System baut auf Liposomen auf.

Mit diesem System ist es möglich, dass therapeutische miRNA- und siRNA-Moleküle, die negativ geladen sind, die Lipiddoppelschicht durchqueren können. Es findet ein Ausgleich der miRNA- und siRNA-Moleküle durch kationische Lipide statt.

Die Zusammensetzung von Liposomen und siRNA ergibt eine positive Nettoladung. Dadurch ist es den Liposomen ermöglicht, an anionische Moleküle der Zelloberfläche zu binden.

Das Gefüge dieser Lipidteilchen wird modifiziert, um die Fusion mit zytoplasmatischen, nuklearen und endosomalen Membranen zu fördern, um die endosomale Freisetzung innerhalb der Zelle zu unterstützen (Hong Cheol Am, *Functional Nanostructures for Effective Delivery of Small Interfering RNA Therapeutics, Theranostics*. 2014; 4(12): 1211–1232. Published online 2014 Sep 19. doi: 10.7150/thno.8491 (Zugriff 06.06.2020)).

Eine weite Schwierigkeit stellt das sogenannte "Off-Targeting" dar.

Darunter versteht man nicht erwünschte genetische Modifikationen, vor allem, dass ein unerwünschtes, weil anderweitig funktionelles Protein erreicht wird. (Chakraborty Chiranjib et alii, *Therapeutic miRNA and siRNA: Moving From Bench to Clinic as Next Generation Medicine*, PMID: PMC5496203 DOI: 0.1016/j.omtn.2017.06.005 (Zugriff 06.06.2020)).

Es konnte gezeigt werden, dass mit Interferin, einem kationischem Lipid, eine akzeptable Transfektionsrate erzielt werden und eine Verringerung der mRNA-Expression durch qRT-PCR gezeigt werden konnte.

5.3 Die Auswirkung der siRNAs auf die Genexpression und auf die Zellviabilität

5.3.1 HaCaT

Bei der Auswertung der Transfektionsergebnisse der Zelllinie HaCaT haben die funktionellen siRNAs im Vergleich zu allen anderen Zellen am wenigsten auf die Genexpression bewirkt.

Dies war zu erwarten.

Die HaCaT Zelllinie entstammt gesunder Haut

Im Hinblick auf Wachstum und Differenzierung verhalten sich HaCaT Zellen phänotypisch wie normale Keratinozyten in Vitro (Boukamp et alii Seite 761-771).

Aufgrund dessen konnte zumindest erhofft werden, dass die ausgewählten siRNAs geringen bis keinen Einfluss auf diese Zellen ausüben.

Es zeigte nur 100 nM HIF2 siRNA eine signifikante Unterdrückung der Genexpression im Vergleich zu 25 nM SCR -RNA sowie eine nicht signifikante Verringerung der Genexpression von 29% im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen.

Das Auftreten einer signifikanten Unterdrückung der Genexpression auf mRNA-Ebene von HIF2 ist dadurch zu erklären, dass die 25 nM SCR -siRNA selber zu einer 75% igen und bei 100 nM zu eine 45% igen Steigerung der Genexpression auf mRNA Ebene von HIF2 führte.

Diese Steigerung lag über 30 %.

Die Mittelwert-Standardabweichung fiel zu hoch aus, und auf die Zellzahl haben die HIF2 -siRNAs mit 16% keine erhebliche Wirkung gezeigt.

Das kann bedeuten, dass dieser Knockdown nicht durch den Mechanismus der RNA-Interferenz stattgefunden hat, sondern durch die Transfektion selbst.

Alle weiteren untersuchten siRNAs scheinen keinen spezifischen Effekt auf die Expression der untersuchten Gene zu haben.

Möglicherweise hatte die Survivin-siRNA mit 100 nM Konzentration noch Einfluss auf die Expression von Survivin,

Dieser Effekt war jedoch nicht signifikant, und die Auswirkung auf die Zellzahl ergab keine auch nur eine annähernde Signifikanz.

Die Transfektion der HaCaT Zellen mit verschiedenen siRNAs zeigte bei der Abnahme der Zellzahl von 14-29% keine signifikante Reduktion der Zellen.

Als Ergebnis dieser Arbeit ist davon auszugehen, dass die ausgewählten siRNAs - entsprechend der Erwartung - keine Wirkung auf die Genexpression und die Zellzahl der HaCaT Zelllinie erzielten,

Demzufolge wird man zum folgern haben, dass sie auch keinen Einfluss auf gesunde Zellen in Vivo ausüben.

Das lässt auf eine Therapie gegen Hautkrebs hoffen, bei der gesunde Zellen nicht in Mitleidenschaft gezogen werden.

Bei den bisherigen Behandlungsmethoden ist das leider nicht der Fall.

Auch gesunde Zellen werden durch die Behandlung negativ betroffen.

5.3.2 A431

Bei der Auswertung der Ergebnisse der Zelllinie A431 ergab sich, dass keine der getesteten siRNAs (in beiden Konzentrationen) zu einem signifikanten Knockdown auf mRNA-Ebene führten.

Trotz Fehlen eines signifikanten Knockdowns hat die Transfektion mit siRNA gegen Survivin, HIF2, STAT3 und SRF eine gegenüber SCR-siRNA höhere Reduktion der jeweiligen Genexpression vermittelt.

Dabei zeigte HIF2, STAT3 und SRF bei einer Konzentration von 25 nM um 30%, 35% und 33% und bei 100 nM sogar um 48%, 45% und 43% ige Reduktion der Genexpression, was ein vielversprechendes Ergebnis bezüglich des Knockdowns darstellt.

Diese siRNAs zeigten auch die beste Wirkung auf die Reduktion des Zellwachstums.

Die Transfektion mit HIF2 und STAT3-siRNA führte zu einer Verringerung der Zellzahl um 35%, was sich als annähernd signifikant darstellt.

Der Einsatz von Survivin-siRNA erzielte die größte und signifikanteste Reduktion der Zellzahl im Vergleich zu PAR-1-siRNA sowie eine Verringerung des Zellwachstums gegenüber untransfizierten Zellen um 47%.

Diese Ergebnisse korrelieren mit den Ergebnissen der qRT-PCR, wo die Survivin-siRNA in der Lage war, den höchsten Knockdown zu erzielen.

Das zeigt den Erfolg beim Knockdown, obwohl die Survivin-siRNA keine Signifikanz erzielt hat.

Die HIF1-siRNA reduzierte die Zellzahl um 38%, was eine annähernde Signifikanz darstellt.

Dazu zeigte die 100 nM Konzentration von Akt3-siRNA eine sehr große Standardabweichung.

Das Transkript taucht erst ab dem 34. PCR-Zyklus auf.

Das bedeutet, dass dieses Gen in der Zelllinie generell gering exprimiert ist.

Leider lag das Ergebnis der qRT-PCR bei der Anwendung einer 25 nM Konzentration um 12% und bei 100 nM um 25%.

Die beiden Konzentrationen von E2F1-siRNA verminderten die Expression auf mRNA-Ebene (25% -20%).

Auch dies zeigt die Verringerung der Zellzahl um 23%.

Die BRAF-siRNA verminderte die Genexpression in 100 nM Konzentration um 20% und die Zellzahl um 13%.

Lediglich die Transfektion mit 25 nM BRAF -siRNA zeigte keinen Effekt auf die Genexpression.

Akt3 100 nM und PAR-1 (beide Konzentrationen) bewirkten sogar eine nicht signifikante Steigerung der Genexpression um 25% und um 15% bis 19%.

Die funktionelle siRNA gegen PAR-1 ergab mit 9% eine Steigerung auch der Zellzahl.

Die 25 nM Konzentration Akt3 -siRNA im Vergleich zu 100 nM Konzentration ergab eine Reduktion der Genexpression.

Die nicht funktionelle siRNA wirkte ganz unterschiedlich auf die jeweilige Genexpression, und zwar nicht nur i. S. einer Reduktion, sondern auch mit einer Steigerung der relativen Expression.

Beide Effekte lagen nicht über 20% im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen. Sie sind damit nicht signifikant.

Nur 25 nM SCR -siRNA (um 25% und 35%) zeigte eine nicht signifikant veränderte Genexpression der mRNA von Akt3 und BRAF.

Das ist vermutlich die Erklärung für die Ergebnisse der Transfektion von Akt3 und BRAF.

Dies könnte auch die Ursache für eine derartige Wirkung der Transfektion mit funktioneller siRNA gegen Akt3 sein.

Dazu zeigte die 100 nM Konzentration von Akt3-siRNA eine sehr große Standardabweichung.

Das Transkript taucht erst ab dem 34. PCR-Zyklus auf, was bedeutet, dass dieses Gen in der Zelllinie nur gering exprimiert ist.

Dies könnte auch die Ursache für eine derartige Wirkung der Transfektion mit funktioneller siRNA gegen Akt3 sein.

Es zeigen sich im Fazit einige siRNAs als potent genug, die Zellzahl zu verringern, jedoch sind die Effekte nicht statistisch signifikant. Mit einer größeren Datenbasis könnte sicherlich aussagekräftigere Ergebnisse erzielt werden.

5.3.3 A375

In unserer Arbeit zeigte die Transfektion der Zelllinie A375 mit funktionellen siRNAs den größten Effekt auf die Zellviabilität und auf die Genexpression der mRNA-Ebene.

Alle untersuchten siRNAs führten in dieser Zelllinie zu einer deutlichen Reduktion der Zellzahl im Vergleich zur nicht transfizierten Kontrolle und zu den signifikantesten und annähernd signifikanten Knockdowns auf mRNA Ebene.

Die besten Ergebnisse erzielt die Survivin-siRNA mit einer signifikanten Reduktion der Zellzahl im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle und im Vergleich zu PAR-1 siRNA mit einer Unterdrückung der Zellviabilität um 51%.

Die qRT-PCR zeigte ebenfalls einer Verringerung der Survivin Expression um 30% bei 25nM und 45% bei 100nM Survivin-siRNA, die jedoch aufgrund einer hohen Standardabweichung in den 3 Versuchen nicht signifikant ausfiel.

Darüber hinaus erzielte die Transfektion mit STAT3-, E2F1-, HIF2- siRNA eine signifikante Reduktion des Zellwachstums um 35%, 36% und 39% im Vergleich zur untransfizierten Kontrolle. Diese siRNAs zeigten auch bei der qRT-PCR in beiden Konzentrationen eine Reduzierung der Genexpression auf entsprechender mRNA-Ebene.

Die STAT3- und E2F1-siRNAs zeigen bei fast gleichem Niveau bei (30%-40%), und HIF2-siRNA bei 25 nM um 25% und bei 100 nM um 19% ebenfalls eine Reduzierung der Genexpression auf entsprechender mRNA- Ebene.

Das ist annähernd signifikant, ebenso wie die Reduktion der Zellzahl um 34% als Ergebnis der Transfektion mit HIF1- siRNAs.

Diese Ergebnisse korrelieren teilweise mit den Ergebnissen der qRT-PCR, wo HIF1-siRNA mit 18% und 30% zu einer Unterdrückung der Genexpression führte.

Eine Reduktion um 31% erzielte die Transfektion mit Akt3- und HIF1- siRNAs, was sich auch recht signifikant zeigte

Und die Transfektion mit 25nM Akt3-siRNA führte mit 70% zu einem signifikanten Knockdown im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen und zu 100 nM SCR-siRNA, wogegen 100 nM konzentrierte siRNA nur eine 25%ige Reduktion der relativen Expression auf der mRNA Ebene von Akt3 erzielte. Dieser Knockdown scheint keinen signifikanten Einfluss auf die Zellzahl zu haben

Die Transfektion mit Akt3-siRNA erzielte eine Zellzahlverminderung um 31%, was sich als nur annähernd signifikant zeigte.

Die 100nM siRNAs gegen SRF erzielten eine Verringerung der Genexpression von bis 40 %, was für einen annähernd signifikanten Knockdown spricht. Die Zellzahlen wurden durch die SRF-siRNA um 27% verringert.

Alle weiteren untersuchten siRNAs mit entsprechenden Konzentrationen führten in dieser Zelllinie ebenfalls zur Reduktion der Genexpression und der Zellviabilität.

Es hat eine Reduktion stattgefunden, die allerdings keine besondere Bedeutung hat.

Die 25nM-konzentrierten siRNAs gegen BRAF und PAR-1 zeigten um 9%-27 %, und bei 100nM konzentrierten siRNAs gegen PAR-1 und BRAF um 22 % -28 % eine Verminderung der Genexpression.

Die Zellzahl wurde reduziert bei PAR-1- um 9% und bei BRAF um 22%.

Die Transfektion mit siRNAs gegen PAR-1 und BRAF erzielte eine Reduktion der Zellzahlen um 9% und 22%.

Die nicht funktionelle SCR-siRNA veränderte die Expression nicht signifikant.

5.3.4 SKMEL 28

Im Vergleich zu den Zelllinien A375 und A431 erzielte die Transfektion mit funktionellen siRNAs bei der SKMEL 28 Zelllinie keinen so hohen Effekt auf die Genexpression.

Auf die Reduktion der Zellviabilität zeigte sich eine bessere Wirkung.

Das beste Ergebnis erzielte siRNA gegen BRAF in 100 nM-Konzentration.

Bei dieser Konzentration konnte bei BRAF-siRNA im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen eine 30%ige Reduktion der relativen Expression der mRNA von BRAF gemessen werden, was sich auch als signifikanter Knockdown zeigte.

Auch im Vergleich zu beiden SCR-siRNA-Konzentrationen und zu 25 nM BRAF-siRNA erzielte 100 nM BRAF-siRNA die höchste und signifikanteste Reduktion der Genexpression.

Ein Einfluss von nicht funktioneller siRNA bei 100 nM konnte nicht gemessen werden.

Der Einsatz von 25 nM SCR-siRNA führte zu einer lediglich 5%igen Reduktion der Genexpression der mRNA von BRAF, ein Wert, der unter 20 % liegt.

Im Vergleich zu 100 nM BRAF-siRNA erzielte 25 nM siRNA gegen BRAF nur eine 5% ige Reduktion der Genexpression.

Damit ist die Auswirkung funktioneller siRNA gegen BRAF ein reines Ergebnis dieser Transfektion.

Leider korrelieren diese Ergebnisse nicht mit den Ergebnissen der Zellviabilität, wo die siRNAs gegen BRAF eine Reduktion der Zellzahlen nur um 16% erzielten.

Eine signifikante Reduktion der Zellzahlen im Vergleich zu der Kontrolle um 24% konnte durch Akt3-siRNA sowie um 27% und 29% durch HIF1- und HIF2-siRNAs erzielt werden.

Diese Ergebnisse korrelieren leider auch nicht mit den Ergebnissen qRT-PCR, wo diese siRNAs in beiden Konzentrationen und nur HIF1 -siRNA in 25 nM Konzentration zu einer Steigerung der Genexpression führten (10%, 20%, 9%).

Die 100 nM SRF- und HIF1-siRNAs führten zu einer lediglich kleinen Reduktion mit 5% und 13% der Genexpression.
Die SRF-siRNA zeigte eine Verringerung der Zellzahl.

Im Vergleich mit A431 und A375 Zelllinien konnte bei der SKLM28 Zelllinie häufig eine Steigerung der Genexpression auf der jeweiligen mRNA-Ebene gemessen werden.

Es ergaben sich folgende Steigerungen bei 25nM siRNAs gegen STAT3 (13%), E2F1 (15%), Survivin (15%) und PAR-1, ebenfalls (20%). und bei 100nM siRNA gegen STAT3 (3%), PAR-1 (25%).

Auf die Zellvariabilität im Gegensatz wirkten sie mit einer Verringerung der Zellzahlen bei PAR-1 (-9%), Survivin- (13%), STAT3- (15%) und E2F1 -siRNAs (18%).

Die SCR-siRNA erzielte in allen Konzentrationen keine signifikante Beeinflussung auf die Genexpression der jeweiligen mRNA-Ebene und Zellzahl.

5.4 Klinische Relevanz

5.4.1 STAT3

Bei der Mehrzahl maligner Tumore ist STAT3 aktiviert.

STAT3 steuert die den Krebs auslösende Übertragung von Signalen, die die Apoptose, den Zellzyklus und die Angiogenese steuern (Jing Naijie et alii; Targeting Stat3 in cancer Therapy, Anti-Cancer Drugs, doi: 10.1097/00001813-200507000-00002 (Zugriff 06.06.2020)).

STAT3 ist sowohl in Tumorzellen als auch im Gewebe überexprimiert.

Die Expression von STAT3 in den Tumorzellen kommt sehr früh zustande.

Diese frühe Auftreten wurde auch bei SCCHN (Plattenepithelkarzinom des Kopfes und Halses) nachgewiesen (Chai Edna Zhi Pei et alii, Targeting transcription factor STAT3 for cancer prevention and therapy, PMID: 26478441 DOI: 10.1016/j.pharmthera.2015.10.004 (Zugriff 06.06.2020)).

Nach der Transfektion der Krebszellen mit STAT3 -siRNA kam es zu einer deutlich sichtbaren Abnahme von STAT3 auf der mRNA- und Proteinebene, sowie zu einer signifikanten Reduktion des Zellwachstums.

Das deckt sich mit anderen Ergebnissen, (vgl. Makowiecki Christina et alii Seiten 112-120).

In unseren Versuchen zeigte die Transfektion mit funktioneller siRNA gegen STAT3 das gleiche Ergebnis, insbesondere in der Zelllinie A431, 375 und HaCat.

Durch die Verminderung der Genexpression nahm die Zellzahl ab.

Bei der A375-Zelllinie wurde die Zellzahl in den verbliebenen Zellen auf 65% verringert, was sich als signifikant erwies.

Die Genexpression der mRNA - Ebene verringerte sich um 30%. Das lässt sich als annähernd signifikant verstehen.

Bei der Zelllinie A431 zeigten alle Ergebnisse eine annähernde Signifikanz. Die Zahl der verbliebenen Zellen lag bei 70 %, die Genexpression wurde zwischen 35% bis 45% unterdrückt.

Die durchgeführte Transfektion der SKMEL28 Zelllinie mit STAT3-siRNA hat keine Beeinflussung gezeigt.

Bei der HaCaT Zelllinie wirkte die Transfektion in Form einer Verminderung zum einen der Zellzahl um 29%, zum anderen der Genexpression bei 100 nM Konzentration um 25%.

Diese Ergebnisse haben gezeigt, dass bei den Zelllinien A431 und A375 der Einsatz von STAT3-siRNA eine Möglichkeit darstellt, das Zellwachstum und vermutlich auch damit das Fortschreiten der Tumorerkrankungen zu inhibieren.

5.4.2 SRF

Das Transkriptionsfaktor-Protein Serum response factor (SRF) gehört zur hoch konservierten MADS-Box-Familie der Transkriptionsfaktoren.

SRF ist mit seiner funktionellen DNA-Bindungsstelle beteiligt an der Regulierung der "**immediate-early Gene**", nämlich der cytoskeletalen Strukturgene, der Muskel-spezifischen Gene, der Matrix-Strukturgene sowie der "Survival"-Gene (Nordheim Alfred, SRF, ein multi-talentierte Transkriptionsfaktor, BIOSpektrum 504-10 Jahrgang, S. 666-667).

Diese vielfältigen Auswirkungen macht SRF interessant für die Krebsforschung.

Das Blockieren des SRF-Transkriptionsfaktors könnte zur Verhinderung der Proliferation und Invasion im Plattenepithelkarzinom der Speiseröhre führen.(He Xi et alii, Serum response factor is overexpressed in esophageal squamous cell carcinoma and promotes Eca-109 cell proliferation and invasion, doi.org/10.3892/ol.2013.1120 Pages: 819-824 (Zugriff 07.06.2020)).

Die Transfektion mit SRF-siRNA führte in unseren Versuchen bei der A375 und A431 Zelllinie mit 30% zu einem annähernden Knockdown auf mRNA-Ebene

Die Zellzahl wurde hingegen nicht so stark beeinflusst. Sie reduzierte sich von ursprünglich 100% auf 73%.

Beim Einsatz von SRF-siRNA bei der Zelllinie SKML28 und HaCat ergab sich kein nennenswerter Einfluss auf die Zellzahl.

Gleiches gilt für die Beeinflussung der Genexpression.

5.4.3 Akt3

Akt 3 ist als Transkriptionsfaktor an der Zellproliferation, dem Überleben und der zur Verfügungstellung von Nährstoffen für die Zellen sowie außerdem an der Gewebeinvasion und der Angiogenese beteiligt (Deborah A Altomare & Joseph R Testa, Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer, *Oncogene* 24, 7455–7464 (2005). <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209085>, Zugriff 07.06.2020)).

Studien zeigten, dass Akt3 bei vielen menschlichen Tumoren überexprimiert und ausserdem für die Entstehung von Chemoresistenz bei konventionellen Therapien verantwortlich ist (Kim Young-Suk et alii, Synergistic Effect of Sulindac and Simvastatin on Apoptosis in Lung Cancer A549 Cells through AKT-Dependent Downregulation of Survivin, DOI: <https://doi.org/10.4143/crt.2013.194> (Zugriff 07.06.2020)).

Akt3 ist bei über 60% beim Malignen Melanom, beim Endometrialkarzinom und Prostatakarzinom überaktiv.

Damit stellt sich Akt3 als ein interessantes Forschungsziel in der Krebstherapie vor (Deborah A Altomare & Joseph R Testa, aaO. (Zugriff 07.06.2020)).

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Transfektion mit Akt3-siRNA bei der Ziellinie SKML28 mit 24 %iger Signifikanz eine Unterdrückung die Zellzahl bewirkte, obwohl die Genexpression sich um ca. 25% erhöht hatte.

Bei der Ziellinie A375 wurde eine signifikante Reduktion der Genexpression mit 70% im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen und zu SCR-siRNA erreicht.

Die Zellzahl wurde durch Akt3-siRNA vermindert auf 69% der verbliebenen Zellen im Vergleich zu Kontrolle.

Auf die A431 und HaCaT-Zelllinien hat Akt3 keinen Einfluss gehabt, was als positives Ergebnis anzusehen ist.

Bei der Zelllinie A375 und SKMEL28, die hier Melanome repräsentieren sollten, wird man die Auswirkungen von Akt3 weiter zu untersuchen haben.

Akt3 hat seine Wirkung auf diese Zelllinien entfaltet, indem es das Zellwachstum sowie die Genexpression unterdrückt hat.

5.4.4 BRAF

BRAF ist von besonderer Bedeutung, da es etwa zu 70% mehr im malignen Melanom aktiviert ist.

Dadurch ist der Signalübertragungsweg (MAP-Kinase-Signalweg) sehr oft ursächlich und grundlegend aktiv (Millington G. W. M., Mutations of the BRAF gene in human cancer, by Davies et al. (Nature 2002; 417: 949–54), doi.org/10.1111/ced.12015 (Zugriff 07.06.2020)).

Das Medikament Vemurafenib (Handelsname Zelboraf) ist ein BRAF-Kinaseinhibitor der bei einer Form von BRAFV600E eingesetzt wird (Berger Anja, Sensitivierung von Melanomzellen für die TRAIL-induzierte Apoptose mittels Kinaseinhibitoren aaO).

Das Medikament führt zu einer Unterbrechung der ERK-Signalkaskade und in der Folge zur Hemmung der Zellproliferation.

BRAF soll sich jedoch nach einiger Zeit resistent gegenüber Vemurafenib verhalten, wobei vermutet wird, dass dieser Umstand auf eine Reaktivierung des ERK-Signalwegs zurückzuführen sein könnte (Berger Anja aaO.).

In unserer Arbeit beeinflusste die Transfektion mit BRAF-siRNA nur die Genexpression auf mRNA Ebene erheblich (30%-ige Unterdrückung)

Die Zellzahl hat sich dabei nicht verändert.

Und dieser Effekt (Unterdrückung der Genexpression) trat nur bei der Zelllinie SKMEL28 auf.

5.4.5 HIFs

Die Sauerstoffversorgung den Zellen wird durch Hypoxyie-induzierte Transkriptionsfaktoren unter Kontrolle gehalten.

Tumore, die schnell wachsen, haben einen erhöhten Bedarf an Sauerstoff.

Es entstehen hypoxische Zentren, was in vielen Krebsarten zur Überexpression von HIF-Transkriptionsfaktoren führt (Hu Yaozhong et alii, Recent agents targeting HIF-1a for cancer therapy, <https://doi.org/10.1002/jcb.24390> (Zugriff 07.06.2020)).

Chemoresistenz in Tumorzellen wird oft durch einen hypoxischen Stimulus vermittelt (Makowiecki Christina et alii., New basic approach to treat non-small cell lung cancer based on RNA-interference Thoracic Cancer 5 (2014) 112–120, doi: 10.1111/1759-7714.12065, (Zugriff 07.06.2020)).

In unserer Arbeit zeigte die Transfektion gegen HIF1 und HIF2 ganz unterschiedliche Wirkungen auf das Zellwachstum sowie die Genexpression.

Dabei lagen die Werte der verbliebenen Zellen zwischen 70% und 73% im Vergleich zu Kontrolle.

Die Genexpression wurde dabei nicht wirklich beeinflusst.

Ohne Einfluss auf die Genexpression in der A375 Zelllinie wirkte HIF2-siRNA mit einer signifikanten Unterdrückung der Zellzahl.

Der Wert bei den verbliebenen Zellen ist auf 61% gesunken.

Die Transfektion mit HIF1-siRNA reduzierte die Zahl der verbliebenen Zellen um 66%, sowie die Genexpression auf 30% bei 100 nM Konzentration. Beides stellt sich als annähernd signifikant dar.

In der A431 Zelllinie erzielte HIF2 annähernd signifikante Ergebnisse in drei verschiedenen Konzentrationen

Der Wert der verbliebenen Zellen lag bei 65%, und die Genexpression wurde um 30% bei 25 nM und 48% bei 100nM unterdrückt.

Die HIF1-siRNA zeigte eine Verminderung der verbliebenen Zellen auf 68%, ohne einen Einfluss auf die Genexpression zu haben.

Bei der HaCaT-Zelllinie hat nur die Transfektion von HIF2 mit 100nM Konzentration eine Signifikanz auf der Genexpression auf der mRNA -Ebene im Vergleich zu 25 nM SRF-siRNA und eine Unterdrückung zu 29% im Vergleich zu untransfizierten Zellen bewirkt.

Diese Ergebnisse sprechen für eine erfolgreich scheinende Anwendung HIFs als Angriffspunkt für eine Therapie.

Bei der Zelllinie SKMEL28 wurde die Zellzahl signifikant vermindert.

5.4.6 E2F1

E2F1 ist an der Regulation des Zellzyklus beteiligt.

Das führt zu einer Kontrolle des Übergangs der S-Phase von der G1 Phase.

E2F1 ist an der Aktivierung von Apoptosis beteiligt.

Viele maligne Tumoren zeichnen sich durch eine hohe E2F1-Expression aus.

Die Rolle von E2F1 scheint sich also auch auf eine Steigerung der Migrationsfähigkeit zu erstrecken, die bei Tumorzellen möglicherweise eine Metastasierung begünstigen könnte.

Das lässt einen Zusammenhang zwischen der Metastasierung von Tumorzellen und E2F1 wahrscheinlich erscheinen.

Wenn E2F1 überexprimiert wird, scheint es seine Fähigkeit, eine Tumorbildung zu unterdrücken, zu verlieren.

Das bedeutet, dass die Überexpression von E2F1 eine Intensivierung des Tumorwachstums und die Ausbildung einer Zytostatikaresistenz zur Folge hat (Fenner Ferdinand aaO Seite 15-17).

In unseren Versuchen wirkte E2F1 auf die Zellzahl bei der Ziellinie A375 mit einer signifikanten Verminderung der verbliebenen Zellen auf 64% bei gleichzeitiger Verminderung der Genexpression um 38% und 40%.

Bei den anderen Zelllinien konnte E2F1-siRNA keinen erheblichen Einfluss zeigen.

5.4.7 PAR-1

In Zelllinien von Melanomen im Zustand hoher Metastasierung findet sich PAR-1 (Protease aktivierte Rezeptoren) in überexprimierter Form.

PAR-1 soll bei den Genen, die für Gefäßbildung, die Adhäsion und Invasion verantworten, die Hochregulierung dieser Gene einleiten und die Signalübertragung stimulieren.

Es sei möglich, durch die Verwendung von siRNA dauerhaft verstummen (silencing) zu lassen.

Das Wachstum des Tumors ebenso wie die Bildung von Metastasen soll signifikant abnehmen - (Villares Gabriel J. et alii, Targeting Melanoma Growth and Metastasis with Systemic Delivery of Liposome-Incorporated Protease-Activated Receptor-1 Small Interfering RNA, DOI: 10.1158/0008-5472, (Zugriff 07.06.2020)).

Dagegen zeigte in unserer Arbeit die Anwendung PAR-1-siRNA keinen nennenswerten Einfluss auf die Zellviabilität oder auf die Genexpression auf der mRNA-Ebene.

5.4.8 Survivin

Survivin hat Einfluss auf die Apoptose von Krebszellen.
In diese Richtung wird geforscht.

Daneben hat Survivin Einfluss auf den Schutz der Zelle und die Verhinderung des Zelltodes.

Ausserdem reguliert es den Zellzyklus vor allem beim sogenannten mitotischen Prozess.

Das begünstigt das Überleben von Krebszellen.

Eine hohe Präsenz von Survivin zeichnet verantwortlich für die Resistenz der Krebszellen gegen Chemotherapie und Strahlentherapie (Kanwar R K. et alii, Recent Advances in Anti-Survivin Treatments for Cancer, DOI 10.2174/09298671079097-9935, (Zugriff 07.06.2020)).

Die Transfektion mit Survivin-siRNA hat in unseren Versuchen keine erhebliche Wirkung auf HaCaT und SKME28 Zelllinien bewirkt.

Dagegen zeigte Survivin-siRNA bei der Zelllinie A375 doppelte Signifikanz, zum einen im Vergleich zu der untransfizierten Kontrolle und zum anderen im Vergleich zu PAR-1siRNA.

Dabei wurde die verbliebene Zellzahl auf 55% reduziert.

Bedeutend ist auch die Unterdrückung der Genexpression auf 45% durch Survivin.

Bei der Zelllinie A431 erwies sich die Anwendung von Survivin-siRNA als signifikant im Vergleich zu PAR-1-siRNA. Die Verminderung der verbliebenen Zellen lag bei 53%.

Die Genexpression wurde ebenfalls vermindert um 30% bei einer 25 nM Konzentration und um 50% bei einer 100nM Konzentration.

Die beiden letzteren Ergebnisse sprechen für eine erfolgversprechende Verwendung von Survivin -siRNA als Therapeutikum bei Hauttumoren.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die getesteten siRNAs und untersuchten Hautzelllinien unterschiedlich auf die Transfektion mit den siRNAs reagierten. Hierbei handelt es sich erstmals um den Nachweis des proof-of-principle, dass gesunde Zellen nur gering auf eine siRNA Therapie reagieren. Dass sich je nach Zelltyp potente und nicht potente siRNAs identifizieren lassen, und es damit möglich sein könnte Patienten in Zukunft eine individualisierten Therapie zu unterziehen.

Diese sähe dann wie folgt aus: Entnahme einer Biopsie des vom Krebs betroffenen Gewebes, Charakterisierung der Krebszellen in Hinblick auf die Expression bestimmter Biomarker und Therapie mit siRNAs zur Reduktion dieser Biomarker oder damit wünschenswerter korrespondierender stillzulegender Proteinexpressionen.

6 Zusammenfassung

Hautkrebs ist eine Erkrankung, die in den letzten Jahren immer häufiger in Erscheinung tritt.

Insbesondere die Auswirkungen des metastasierenden Hautkrebses sind für die Betroffenen schrecklich. Die zu erwartende Überlebenszeit ist kurz.

Die bisherigen Behandlungsmethoden (Operation, Strahlen- und Chemotherapie) zeigen unzureichende, im Stadium der Metastasenbildung meist überhaupt keine Erfolge. Außerdem sind die Nebenwirkungen, die die Behandlung begleiten, vor allem bei der Chemotherapie für die betroffenen Menschen sehr belastend.

Unsere Arbeit zielt daraufhin, andere Lösungen zu finden, die die Ausbreitung von Krebs im Körper verhindern oder zumindest verlangsamen können.

Eine solche ist die wissenschaftliche Bearbeitung der Fragestellung, ob auf genetischer Ebene der Verlauf der Erkrankung durch das Stummschalten von bestimmten Genen beeinflusst werden kann. Zu diesem Zweck haben wir verschiedene Hautkrebszellen mit siRNA behandelt mit dem Ziel, auf Genebene die Progredienz von Prozessen, die zur Ausbreitung von Tumorzellen führen, abzuschalten (silencing).

Mit der siRNA-Interferenz ist es möglich, in Signalwege einzugreifen, indem man die Genexpression für ein bestimmtes Gen stummschaltet, die für ein Fortschreiten des Tumorwachstums verantwortlich sind. Durch Kenntnis der verantwortlichen Genexpressionen in einem Patiententumor kann eine genaue Auswahl von verschiedenen siRNAs für die Therapie eingesetzt werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen, ob die Anwendung von bestimmten siRNAs ein spezifisches Gen-Silencing vermittelt und dadurch das Wachstum der Hautkrebszellen beeinflussen kann.

Für die Untersuchung wurden die Melanom-Zelllinien A375, SKMEL28, die Plattenepithelzelllinie A431 und die HaCaT Zelllinie (immortalisierte Keranozyten) ausgewählt. Für die Transfektion haben wir solche siRNAs ausgewählt, die sich bei anderen Krebsarten als relevant in der Krebsforschung gezeigt haben, manche explizit bei Hautkrebstumoren. Es wurden die Zelllinien mit siRNAs gegen Akt3, BRAF, E2F1, HIF1, HIF2, PAR-1, SRF, STAT3 und Survivin in drei Konzentrationen transfiziert.

Dann wurde die Wirksamkeit der RNAi auf die Genexpression auf mRNA Ebene mittels qRT-PCR, und auf die Zellzahl mittels CASY® (Cell-counter-system) analysiert.

Dabei hat sich beim Einsatz der verschiedenen siRNAs Folgendes gezeigt:

Transfektion mit siRNA hat das Zellwachstum bzw. Unterdrückung der Genexpression wie folgt (signifikant (s) bzw. annähernd signifikant (as)) beeinflusst

siRNA	Zelllinie	Beeinflussung der Zellzahl	Beeinflussung der Genexpression
AKT3	SKMEL28	s	
AKT3	A375	as	
BRAF	SKMEL28		s
E2F1	A375	as	as
HIF1	SKMEL28	s	
HIF1	A375	s	
HIF1	A431	s	
HIF1	SKMEL28	s	
HIF2	A375	s	s
HIF2	A431	as	as
PAR-1			
SRF	A375		s
SRF	A431		s
STAT3	A375	s	s
STAT3	A431		as
Survivin	A375	s	as

Insgesamt lässt sich sagen, dass die Ergebnisse unterschiedlich ausgefallen sind, je nach Zelllinie und verwendeter siRNA.

Bei der A375 Zelllinie zeigte die Transfektion mit siRNAs den höchsten Einfluss, danach folgen SKML28 und A431

Die besten Auswirkungen haben Survivin-, STAT3-, HIF2- und E2F1-siRNAs gezeigt. Danach folgten Akt3-, HIF1-, BRAF- und SRF-siRNA. Die PAR-1-siRNA hatte keinen Einfluss auf die Zelllinien.

Daraus folgt, dass die auf siRNA basierenden Medikamente eine Alternative zu den bis heute verwendeten Behandlungsmethoden des Hautkrebses darstellen können. Dies gilt insbesondere bei metastasierenden und nicht operierbaren Formen des Hautkrebses,

Wenn der Tumor auf Chemotherapie nicht mehr anspricht, bietet sich der systemische Einsatz von siRNA an.

Gleichzeitige Anwendung von Chemotherapeutikas zur Verzögerung oder gar Ausschluss der Resistenz scheint indiziert.

Literaturverzeichnis

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K and Walter P, Molecular biology of the cell, Published by Garland Science, Taylor & Francis Group New York Loseblattsammlung Stand 2017
2. Altieri Dario C., Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer, *Oncogene* 2003; volume 22, pages 8581-8589, <https://www.nature.com/articles/1207113> (Zugriff 14.10.2019)
3. altogen.com/-/product/sk-mel-28-transfection-reagent-melanoma-cells-htb72/, Zugriff 29.01.20)
4. Altomare DA and Testa JR, Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer, *Oncogene* 2005; 24: 7455-7464 Nature Publishing Group. (<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209085> (Zugriff 11.10.2019))
5. Ambrosini G. et alii, A Novel Anti-Apoptosis Gene, Survivin, Expressed in Cancer and Lymphoma, PMID: 9256286 DOI: 10.1038/nm0897-917 (Zugriff 06.06.2020)
6. Angstenberger M, Analyse der in vivo-Funktion des Transkriptionsfaktors SRF in adulten Glattmuskelzellen der Maus, Tübingen, Univ., Diss., 2007 (<http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:bsz:21-opus-31478>)
7. [archive.is/20130210155435/ www.copewithcytokines.de/-/cope.cgi?key=A431](http://archive.is/20130210155435/www.copewithcytokines.de/-/cope.cgi?key=A431) (Zugriff 29.01.2020)
8. Arkenau HT, Kefford R and Long G, Targeting BRAF for patients with melanoma, *British Journal of Cancer* 2011 Feb 1; 104(3): 392-398. Published online 2010 Dec 7. doi: 10.1038/sj.bjc.6606030 (Zugriff 11.10.2019)
9. Armbrech M, Detektion von Kontaminationen in DNA und Protein-Proben durch photometrische Messungen, https://www.eppendorf.com/product-media/doc/de/59828/Eppendorf_Detection_Application-Note_279_BioPhotometer-D30_Detection-contamination-DNA-protein-samples-photometric-measurement_s.pdf (Zugriff 11.10.2019)
10. Aumüller G, Schmidt W, Aust G, Schmitz F, Doll A, Schulte E, Engele J, Spänel-Borowski K, Kirsch J, Wolff W, Mense S, Wurzinger L, Reiaig D, Zilch HG, Salvetter J, Duale Reihe Anatomie 2007, Thieme Verlag Stuttgart
11. Avram S, Coricovac DE, Pavel IZ, Pinzaru I, Ghiulai R, Baderca F, Soica C, Muntean D, Branisteanu DE, Spandidos DA, Tsatsakis AM, Dehelean CA, Standardization of A375 human melanoma models on chicken embryo chorioallantoic membrane and Balbc nude mice, *ncol Rep.* 2017 Jul;38(1):89-99. doi: 10.3892/or.2017.5658. Epub 2017 May 22. (Zugriff 11.11.2019)
12. AVRAM Stefana et alii, Standardization of A375 human melanoma models on chicken embryo chorioallantoic membrane and Balb/c nude mice, *ONCOLOGY REPORTS* 38: 89-99, 2017 (Zugriff 06.06.2020)
13. AWMF online, Leitlinie Basalzellkarzinom der Haut, https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/032-0211_S2k_Basalzellkarzinom-der-Haut_2018-09_01.pdf (Zugriff 25.01.2020)
14. Barckhausen C, Mechanismen der Resistenz und Sensitivierung von menschlichen malignen Melanomzellen gegenüber DNA-alkylierenden Zytostatika, Mainz, Univ., Diss., 2012. urn:nbn:de:hebis:77-31550 (Zugriff 11.10.2019)
15. Bayer AG Communications Digital Communications, Kleine Moleküle gegen Krebs - Forschung für neuartige Therapien, <https://www.research.bayer.de/de/krebsursachen-krebsforschung-neue-medikamente-chemotherapie.aspx> (Zugriff 13.10.2019)
16. Berg P, Singer M, Die Sprache der Gene (Dealing with Genes), 1993, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin und Oxford
17. Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A. und Fusenig NE, Normal Keratinization in a Spontaneously Immortalized Aneuploid Human Keratinocyte

- Cell Line, *J Cell Biol.* 1988; 106(3) 761-771. DOI: 10.1083/jcb.106.3.761 (Zugriff 12.10.2019)
18. Boussif O, Lezoualch F, Zanta MA , Mergny M D, Scherman D, Demeneix B and Behr JP, A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine, doi.org/10.1073/pnas.92.16.7297 (Zugriff 06.06.2020)
 19. Capecchi MR., High Efficiency Transformation by Direct Microinjection of DNA into Cultured Mammalian Cells, PMID: 6256082 DOI: 10.1016/0092-8674(80)90358-x (Zugriff 31.05.2020)
 20. Chai EZ, Shanmugam M, Arfuso F, Dharmarajan, Wang C, Kumar AP, Samy RP, Lim LH, Wang L, Goh BC, Ahn KS, Hui KM, Sethi G, Targeting transcription factor STAT3 for cancer prevention and therapy, PMID: 26478441 DOI: 10.1016/j.pharmthera.2015.10.004 (Zugriff 06.06.2020)
 21. Chakraborty C, Sharma AR, Sharma G, Doss GP and Lee SO, Therapeutic miRNA and siRNA: Moving from Bench to Clinic as Next Generation Medicine, *Mol Ther Nucleic Acids.* 2017 Sep 15;8:132-143. doi: 10.1016/j.omtn.2017.06.005. Epub 2017 Jun 12. (Zugriff 12.10.2019)
 22. Chalbatani GM, Dana H, Gharagouzloo E, Grijalvo S, Eritja R, Logsdon CD, Memari F, Miri SR, Rad MR and Marmari V, Small interfering RNAs (siRNAs) in cancer therapy: a nano-based approach, *International Journal of Nanomedicine* 2019; 14: 3111-3128 (DOI <https://doi.org/10.2147/IJN.S200253>) (Zugriff 12.10.2019)
 23. Chang F, Stelman LS, Lee JT, Shelton JG, Navolic PM, Blalock WL, Franklin RA, McCubrey JA, Molecular Targets for Therapy - Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention, doi.org/10.1038/sj.leu.2402945, (Zugriff 07.06.2020)
 24. Cooper SJ, Trinklein ND, Nguyen L, Myers M, Serum Response Factor Binding Sites Differ in Three Human Cell Types, doi: 10.1101/gr.5875007 (Zugriff 31.05.2020)
 25. Dalby Brian et alii, Advanced Transfection With Lipofectamine 2000 Reagent: Primary Neurons, siRNA, and High-Throughput Applications, DOI: 10.1016/j.ymeth.2003.11.023 (Zugriff 31.05.2020)
 26. Graness et alii Nachweise in de.wikipedia.org/wiki/A431_(Zelllinie) (Zugriff 06.06.2020)
 27. Deborah A Altomare & Joseph R Testa, Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer, *Oncogene* 24, 7455-7464 (2005). <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209085>, (Zugriff 07.06.2020)
 28. Emilia Sokolowska and Agnieszka Urszula Blachnio-Zabielska, A Critical Review of Electroporation as A Plasmid Delivery System in Mouse Skeletal Muscle, DOI: 10.3390/ijms20112776 (Zugriff 31.05.2020)
 29. Epple M, Ganesan K, Heumann R, Klesing J, Kovtun A, Neumann S and Sokolova V, Application of calcium phosphate nanoparticles in biomedicine, DOI: 10.1039/B910885H (Highlight) *J. Mater. Chem.*, 2010; 20: 18-23 (Zugriff 11.10.2019)
 30. Eric N. Olson & Alfred Nordheim, Linking actin dynamics and gene transcription to drive cellular motile functions, <https://doi.org/10.1038/nrm2890> (Zugriff 31.05.2020)
 31. Fenner F., Der Transkriptionsfaktor E2F1 in Peniskarzinomzellkulturen, Rostock, Univ., Diss.,2016 (<http://purl.uni-rostock.de/rosdok/id00001870>. urn:nbn:de:gbv:28-diss2017-0034-1 https://doi.org/10.18453/rosdok_id00001870) (Zugriff 12.10.2019)
 32. Fire A. et alii, Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*, *Nature.* DOI: 10.1038/35888 (Zugriff 12.10.2019)
 33. Garbe Claus et alii, *Dermatologische Onkologie*, Springer Verlag 2013
 34. Garbe Claus, *Interdisziplinäre Leitlinien zur Diagnostik und Therapie von Hauttumoren*, Georg Thieme Verlag Stuttgart 2005

35. Garbe Claus, Kaufmann R, Landthaler M, Szeimies RM, Hauschild A., Tumoren der Haut, Grundlagen, Diagnostik und Therapie in der dermatologischen Onkologie, Georg Thieme Verlag KG 2010
36. Garbe Claus, Management des Melanoms, Springer Medizin Verlag Heidelberg 2006
37. Graw Genetik, Springer-Verlag 6. Auflage 2015
38. Günther E., Grundriss der Genetik, Flacher Verlag Jena, 3 Auflage 1973
39. Gutzmer R., Malignes Melanom - Durchbruch in der Therapie, Dtsch Arztebl 2014; 111(45): 24-25.
(<https://www.aerzteblatt.de/treffer?mode=s&wo=&typ=256&aid=163355&autor=-Gutzmer%2C+R>) (Zugriff 12.10.2019)
40. Halene S, Gao Y, Hahn K, Massaro S, Italiano JE, Schulz V, Lin S, Kupfer G, Krause DS, Serum response factor is an essential transcription factor in megakaryocytic maturation, (<https://doi.org/10.1182/blood-2010-01-261743>)
41. Harder J., Synthese und Anwendung dendritischer siRNA-Strukturen, München, Univ., Diss., 2014 URN: urn:nbn:de:bvb:19-168635 (Zugriff 13.10.2019)
42. Hartmann G, Endres S., Therapeutische Oligonukleotide, <https://www.aerzteblatt.de/archiv/39499/Therapeutische-Oligonukleotide> (Zugriff 11.10.2019)
43. Haug D., Untersuchung von FOSL1 im humanen Melanom, Würzburg, Univ., Diss., 2014 urn:nbn:de:bvb:20-opus-91064 (Zugriff 13.10.2019)
44. He X, Xu H, ZHAO M and Wang S., Serum response factor is overexpressed in esophageal squamous cell carcinoma and promotes Eca-109 cell proliferation and invasion, *Oncol Lett.* 2013 Mar; 5(3): 819-824. Published online 2013 Jan 9. doi: 10.3892/ol.2013.1120 (Zugriff 13.10.2019)
45. He Xi et alii, Serum response factor is overexpressed in esophageal squamous cell carcinoma and promotes Eca-109 cell proliferation and invasion, doi.org/10.3892/ol.2013.1120 Pages: 819-824 (Zugriff 07.06.2020)
46. Heather D. et alii., 2008 Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis, PMID: 18474036 DOI: 10.2144/000112776 (Zugriff 06.06.2020)
47. Heinzerling L, Hartmann A, Hund M, Schuler G., Medikamentöse Tumorthherapie in der Dermatoonkologie, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014
48. Katsuya Hirano, The Roles of Proteinase-Activated Receptors in the Vascular Physiology and Pathophysiology, doi: 10.1161/01.ATV.0000251995.73307.2d. Epub 2006 Nov 9 (Zugriff 24.10.2020)
49. Hirsch-Kauffmann M, Schweiger M, Schweiger MR., Biologie und molekulare Medizin, Georg Thieme Verlag Stuttgart 7. Auflage 2009
50. Hong CA, Nam YS., Functional nanostructures for effective delivery of small interfering RNA therapeutics, *Theranostics.* 2014;4(12):1211-1232. Published 2014 Sep 19. doi:10.7150/thno.8491 (Zugriff 13.10.2019)
51. Horn F., Biochemie des Menschen, Georg Thieme Verlag Stuttgart 4. Auflage 2009
52. Altogen.com in <https://altogen.com/-/product/sk-mel-28-transfection-reagent-melanoma-cells-htb72/> (Zugriff 29.05.2020)
53. Krebsregister RLP in https://www.krebsregister-rlp.de/fileadmin/user_upload/dokumente/krebsarten/C44.-pdf (Zugriff 19.07.2020)
54. Hu Yaozhong et alii, Recent agents targeting HIF-1a for cancer therapy, <https://doi.org/10.1002/jcb.24390> (Zugriff 07.06.2020)
55. UKT in <https://idw-online.de/de/news271491> (Zugriff 23.09.2019)
56. Miano Joseph M et alii, Serum Response (Factor: Master Regulator of the Actin Cytoskeleton and Contractile Apparatus, doi: 10.1152/ajpcell.00386.2006) (Zugriff 31.05.2020)
57. Kanwar R K. et alii, Recent Advances in Anti-Survivin Treatments for Cancer, DOI 10.2174/09298671079097-9935 (Zugriff 07.06.2020)

58. Katsuya Hirano., The Roles of Proteinase-Activated Receptors in the Vascular Physiology and Pathophysiology, Arteriosclerosis , Thrombosis , and Vascular Biology. 2007; 27: 27-36
59. Kendall AC, Nicolaou A., Bioactive lipid mediators in skin inflammation and immunity, Prog Lipid Res. 2013 Jan;52(1):141-64. doi: 10.1016/j.plipres.2012.10.003. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23124022> (Zugriff 13.10.2019))
60. Kim YS, Seol CH, Jung JW, Oh SJ, Hwang KE, Kim HJ, Jeong ET, Kim HR., Synergistic Effect of Sulindac and Simvastatin on Apoptosis in Lung Cancer A549 Cells through AKT-Dependent Downregulation of Survivin, (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25520153> (Zugriff 13.10.2019))
61. Kim Young-Suk et alii, Synergistic Effect of Sulindac and Simvastatin on Apoptosis in Lung Cancer A549 Cells through AKT-Dependent Downregulation of Survivin, DOI: <https://doi.org/10.4143/crt.2013.194> (Zugriff 07.06.2020)
62. Knippers R, Sch.,fer K und Fanning E., Molekulare Genetik. 1985, Georg Thieme Verlag Stuttgart
63. Krämer O., RNAi-vermittelter knockdown zur Identifikation von Zielgenen für die Verbesserung von Produktionszelllinien, Bielefeld, Univ., Diss., 2012. urn:nbn:de:hbz:361-26324908 (Zugriff 13.10.2019)
64. Kreusch J und Rassner G., Auflichtmikroskopie pigmentierter Hauttumoren.1991, Thieme Verlag Stuttgart 1991
65. Kulozik AE, Hentze MW, Hagemeier C, Bartram CR., Molekulare Medizin Grundlagen - Pathomechanismen - Klinik 2000, Walter de Gruyter GmbH & Co.KG Berlin
66. Kumar Vinay et alii, Basis of Disease. 9. Auflage, 2015, Philadelphia
67. Lang F und Lang P., Basiswissen Physiologie. 2007, Springer Medizin Verlag Heidelberg 2007
68. LGC Technicals in www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-1555.aspx?geo_country=de (Zugriff 06.06.2020)
69. Lidsky Michael, Antoun Gamil, Speicher Paul, Adams Bartley, Turley Ryan, Augustine Christi, Tyler Douglas and Ali-Osman Francis, MAP kinase hyper-activation and enhanced NRAS expression drive acquired vemurafenib resistance in V600E BRAF melanoma cells, <http://www.jbc.org/content/early/2014/07/25/jbc.M113.532432.short#ref-list-1> (Stand 13.10.2019)
70. Li-fang Gao et alii., Inhibition of STAT3 expression by siRNA suppresses growth and induces apoptosis in laryngeal cancer cells, <https://www.nature.com/articles/aps200558> (Zugriff 30.05.2020)
71. Liu Xuan, Yu Jiahui, Song Shangjin, Yue Xiaoqiang, Li Qi., Protease-activated receptor-1 (PAR-1): a promising molecular target for cancer, Oncotarget 2017; 8:107334-107345.(<https://doi.org/10.18632/oncotarget.21015> (Zugriff 14.10.2019))
72. Lüllmann-Rauch R., Histologie, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 3. Auflage 2009
73. Makowiecki C, Nolte A, Sutaj B, Keller T, Avci-Adali M, Stoll H, Schlensak C, Wendel H P, Walker T., New basic approach to treat non-small cell lung cancer based on RNA-interference, Thorac Cancer. 2014 Mar; 5(2): 112-120. Published online 2014 Mar 3. doi: 10.1111/1759-7714.12065 (Zugriff 07.06.2020)
74. Manicum T, Ni F, Ye Y, Fan X, and Chen B-C., Prognostic values of E2F mRNA expression in human gastric cancer in Bioscience Reports (2018) 38 BSR20181264 (Zugriff 30.05.2020)
75. Memorial Sloan Kettering Cancer Center, SK-MEL-28- Human Melanoma Cell Line (ATCC HTB-72), <https://www.mskcc.org/research-advantage/support/technology/tangible-material/human-melanoma-cell-line-sk-mel-28> (Zugriff 14.10.2019)

76. Millington G. W. M., Mutations of the BRAF gene in human cancer, by Davies et al .(Nature 2002; 417: 949-54), doi.org/10.1111/ced.12015 (Zugriff 07.06.2020)
77. Moll I., Duale Reihe Dermatologie, Georg Thieme Verlag KG 6. Auflage 2008
78. Mori A, Wada H, Nishimura Y, Okamoto T, Takemoto Y, Kakishita E., Expression of the Antiapoptosis Gene Survivin in Human Leukemia, PMID: 11939262 DOI: 10.1007/BF02982021
79. Napoli Carolyn, Lemieux Christine, Jorgensen Richard., Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes *Ön trans*, The Plant Cell, Vol. 2, 279-289, April 1990 O 1990 American Society of Plant Physiologists. (http://www.plantcell.org/content/plantcell/2/4/279.full.pdf (Zugriff 13.10.2019))
80. Nasr Michel R., Comparison of pHH3, Ki-67, and Survivin Immunoreactivity in Benign and Malignant Melanocytic Lesions, PMID: 18360113 DOI: 10.1097/DAD.0b013e3181624054 (Zugriff 06.06.2020)
81. Nevins Joseph R., Der Rb / E2F-Signalweg und Krebs, Human Molecular Genetics , Band 10, Ausgabe 7, 1. April 2001, Seiten 699-703 (https://doi.org/10.1093/hmg/10.7.699)
82. Nolan T, Hands RE, Bustin SA., Quantification of mRNA using real-time RT-PCR, DOI https://doi.org/10.1038/nprot.2006.236 (Zugriff 06.06.2020)
83. Nordheim Alfred., SRF, ein multi-talentierte Transkriptionsfaktor, BIOSpektrum 5/2004 10. Jahrgang. https://www.biospektrum.de/blatt/d_bs_pdf&_id=934384 (Zugriff 13.10.2019)
84. Pencik J., STAT3-reguliertes ARF hemmt Metastasierung von Prostatakrebs, Pathologe 37, 173-174; 2016
85. Plank C, Schillinger U, Scherer F, Bergmann C, Remy JS, Krötz F, Anton M, Lausier J, Rosenecker J., The Magnetofection Method: Using Magnetic Force to Enhance Gene Delivery, DOI: 10.1515/BC.2003.082 (Zugriff 31.05.2020)
86. Plötz S, Hein R, Ring J., Häufige Hauttumoren in der Praxis, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York 2012
87. Posorski Nicole, Biologische und funktionale Charakterisierung von Tumoren im Gastrointestinaltrakt durch genomweite Genexpressions-Analyse und Identifizierung von potenziellen Tumormarkern, Jena, Univ., Diss., 2011 https://d-nb.info/1029982228/34 (Zugriff 14.10.2019)
88. Jaiswal PK, Goel Apul, Mittal RD., Survivin: A molecular biomarker in cancer, Indian J Med Res. 2015 Apr; 141(4): 389-397 doi: 10.4103/0971-5916.159250 - Zugriff 06.06.2020)
89. Rahner N, Steinke V., Hereditary Cancer Syndromes, Deutsches Ärzteblatt 2008 105_41_706-13. DOI: 10.3238/arztebl.2008.0706 (Zugriff 29.05.2020)
90. Ralf Gutzmer in Deutsches Ärzteblatt Heft 45 2014 Seite 24
91. Rasmussen UB, Vouret-Craviari V, Jallat S, Schlesinger Y, Pages G, Pavirani A, Lecocq JP, Pouyss, gur J, Van Obberghen-Schilling E., cDNA cloning and expression of a hamster alpha-thrombin receptor coupled to Ca²⁺ mobilization, FEBS Lett. 1991;288:123-8. https://doi.org/10.1016/0014-5793(91)81017-3. (Zugriff 14.10.2019)
92. RKI Zentrum Krebsregisterdaten, www.krebsdaten.de Melanom, (Zugriff 07.06.2020)
93. RKI, Gesundheitsberichterstattung des Bundes Heft 22 Hautkrebs, http://www.gbe-bund.de/pdf/HEFT22.pdf (Zugriff 29.05.2020)
94. Robert Koch Institut - Zentrum für Krebsregisterdaten.Krebs in Deutschland, https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/krebs_in_deutschland_inhalt.html (Zugriff 24.05.2020)
95. S1-Leitlinie Dermatofibrosarcoma protuberans 2018, https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/032-0261_S1_Dermatofibrosarcoma-protuberans-DFSP_2019-04_01.pdf (Zugriff 13.10.2019)

96. Schrott G., Der Transkriptionsfaktor SRF reguliert die Ausbildung des Aktin-Zytoskeletts und die mesodermale Differenzierung in embryonalen Stammzellen, *BIOspektrum*. 1(02):8. Jahrgang:66-67
https://www.biospektrum.de/blatt/d_bs_pdf&_id=932964 (Zugriff 12.10.2019)
97. Schwenzer N, Ehrenfeld M., *Zahn-Mund-Kiefer-Heilkunde*, Georg Thieme Verlag KG 2011
98. Seiji Fukuda, Louis M Pelus, Survivin, a Cancer Target With an Emerging Role in Normal Adult Tissues, PMID: 16731740 DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-05-0375 (Zugriff 06.06.2020)
99. Semenza GL, Targeting HIF-1 for cancer therapy,
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13130303/> DOI: 10.1038/nrc1187 (Zugriff 31.05.2020)
100. Shore P, Sharrocks AD., The MADS-box family of transcription factors, *Eur J Biochem*. 1995 Apr 1;229(1):1-13. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1995.tb20430.x (Zugriff 14.10.2019)
101. Signaltransduktionsinhibitoren als neue Option. *Orthop. Rheuma* 16, 58 (2013).
doi.org/10.1007/s15002-013-0457-x (Zugriff 07.06.2020)
102. Sokolowska E and Blachnio-Zabielska AU., A Critical Review of Electroporation as A Plasmid Delivery System in Mouse Skeletal Muscle, *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20(11), 2776;
<https://doi.org/10.3390/ijms20112776> (Zugriff 14.10.2019)
103. Song JI, Grandis JR., STAT signaling in head and neck cancer *Oncogene, Oncogene*. 2000 May 15;19(21):2489-95. DOI: 10.1038/sj.onc.1203483
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10851047> (Zugriff 14.10.2019))
104. Song Y, Hahn T, Thompson IP, Mason TJ, Preston GM, Li G, Panywnyk L, Huang WE., Ultrasound-mediated DNA transfer for bacteria, doi.org/10.1093/nar/gkm710 (Zugriff 31.05.2020)
105. Statistisches Bundesamt, Pressemitteilung vom 27. Juni 2017 - 214.17,
www.destatis.de/DE/Presse/Pressemitteilungen/2017/06/PD17_214_231pdf.pdf?__blob=publicationFile (Zugriff 28.05.2020)
106. Strategiepapier zur Umsetzung des Nationalen Krebsplans (NKP) auf dem Gebiet der Dermatologie., Nationale Versorgungskonferenz Hautkrebs (NVKH) e.V. Elbeklinikum Buxtehude Hautklinik,
https://nvkh.de/fileadmin/nvkh/downloads/Strategiepapier_der_NVKH.pdf (Zugriff 14.10.2019)
107. Tamm I, Wang Y, Sausville E, Scudiero DA, Vigna N, Ottersdorf T, and Reed JC., IAP-Family Protein Survivin Inhibits Caspase Activity and Apoptosis Induced by Fas (CD95), Bax, Caspases, and Anticancer Drugs,
<https://cancerres.aacrjournals.org/content/canres/58/23/5315.full.pdf> (Zugriff 06.06.2020)
108. Thomas G Smith, Peter A Robbins and Peter J Ratcliffe., The human side of hypoxia-inducible factor, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2408651> (Zugriff 31.05.2020)
109. Tumorregister München., Überleben ICD-10 C43: Malignes Melanom. 2018,
(https://www.tumorregister-muenchen.de/facts/surv/sC43__G-ICD-10-C43-Malignes-Melanom-Survival (Zugriff 15.10.2019))
110. Ugurel S, Kortmann RD, Mohr P, Mentzel T, Garbe C, Breuninger H, Bauer S und Grabbe S., <https://www.uniklinikum-leipzig.de/einrichtungen/strahlentherapie/forschung/publikationen> (Zugriff 13.10.2019)
111. Ulfing N., *Kurzlehrbuch Histologie: Kapitel 12: Haut*, Georg Thieme Verlag Stuttgart 3 Auflage 2011
112. Van Guilder HD, Vrana KE, Freeman WM., twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis, *Biotechniques*. 2008 Apr;44(5):619-26. doi: 10.2144/000112776 (Zugriff 13.10.2019)

113. Villares GJ, Zigler M, Wang H, Melnikova V, Wu H, Friedman R, Leslie M, Vivas-Mejia P, Lopez-Berestein G, Sood A, Bar-Eli M., Targeting Melanoma Growth and Metastasis with Systemic Delivery of Liposome-Incorporated Protease-Activated Receptor-1 Small Interfering RNA, *Cancer Res* 2008; 68: (21) (Zugriff 23.10.2020)
114. Wagener C und Müller O., *Molekulare Onkologie Entstehung, Progression, klinische Aspekte*, Georg Thieme Verlag KG Stuttgart 3 Auflage 2010
115. Walker T, Nolte A, Steger V, Makowiecki C, Mustai M, Friedel G, Schlensak C. and Wendel HP., Small interfering RNA-mediated suppression of serum response factor, E2-promotor binding factor and survivin in non-small cell lung cancer cell lines by non-viral transfection, *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*. 2013; 43: 628-634
116. Walter GL, *Immunsuppressive Therapie*, Georg Thieme Verlag 2006
117. Wan PTC, Garnett MJ, Roe SM, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good VM, Project CG, Jones CM, Marshall CJ, Springer CJ, Barford D, and Marais R., Mechanism of Activation of the RAF-ERK Signaling Pathway by Oncogenic Mutations of B-RAF, *Cell* 2004; Vol. 116: 855-867
118. Wang J, Lu Z, Wientjes MG and Au JL., Delivery of siRNA therapeutics: barriers and carriers, *AAPS J.* 2010 Dec;12(4):492-503. doi: 10.1208/s12248-010-9210-4. Epub 2010 Jun 11. (Zugriff 12.10.2019)
119. Winklmeier A., *Rolle der Transkription und Aktivität von MIA (Melanoma Inhibitory Activity) im malignen Melanom*, Regensburg, Univ., Diss., 2009. (<https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:bvb:355-opus-13019>) (Zugriff 15.10.2019))
120. Woods Robin, *Biochemical Genetics*, Gustav Fischer Verlag Stuttgart 1980
121. www.ema.europa.eu/en/documents/overview/braftovi-epar-medicine-overview_de.pdf (Zugriff 09.10.2019)
122. www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content-/Krebsarten/Melanom/melanom_node.html (Zugriff 05.02.2020)
123. www.mskcc.org/research-advantage/support/technology/-tangiblematerial/human-melanoma-cell-line-sk-mel-28 (Zugriff 29.01.2020)
124. Liu X, Yu J, Song S, Yue X, and Li Q., Protease-activated rezeptor-1 (PAR-1):a promising molekular target for cancer, *Oncotarget* 2017 8, (No. 63), pp: 107334-107345, 107334 (Zugriff 23.10.2020)
125. Yibing Fana and Juan Chenb, Clinicopathological significance of survivin expression in patients with cervical cancer: A systematic meta-analysis, PMID: 28051906 doi: 10.1080/21655979-2016.1252879 (Zugriff 06.06.2020)
126. Zager JS, Kudchadkar RR, Sondak VK., *Melanoma*, First Edition 2016 Oxford University Press
127. Ziegler M, Kamiya T, Brantley EC, Villares GJ, Bar-Eli M., PAR-1 and Thrombin: The Ties that Bind the Microenvironment to Melanoma Metastasis, *Cancer Res.* 2011 November 1; 71(21): 6561-6566 (Zugriff 23.10.2020)

Abkürzungsverzeichnis

aaO	am angegebenen Ort
Akt	Zelluläres Homolog des transformierenden viralen Onkogens v-Akt
BAD	Bcl-2 Antagonist of Cell Death
Bcl-2	B-Cell Lymphoma-2
Caspase	Cysteinyl-Aspartat Specific Protease
cDNA	Complementary DNA
DNA	Desoxyribonucleacid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	Dulbecco's Phosphat Buffered Saline
dsRNA	Double stranded RNA / doppelsträngige RNA
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor / epidermaler Wachstumsfaktor-Receptor
EPC	Endothelial protein C receptor
FCS	fetal calf serum / Fetales Kälberserum
FOX	Forkhead Box
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HIF	Hypoxie-Induzierte Factor
IκB	IκB-Kinase
MAPK	Microtubule associated Protein Kinase
MEK 1	MAP Kinase-ERK-Kinase 1
MEK 2	MAP Kinase-ERK-Kinase 2
MMP	Matrix- Metalloproteinase
mRNA	messenger RNA / Boten-Ribonukleinsäure
MRTF	myocardin-related transcription factor (Myokardin-verwandten Transkriptionsfaktors)
MW	Mittelwert
n=	Anzahl der Versuchsdurchläufe
NF-κB	Nuclearfactor-κB
p53	Bindungsprotein
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
qRT-PCR	real-time quantitative PCR / quantitative Echtzeit-PCR
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	ribonucleic acid / Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-interferenz
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SCR	scrambled
SD	standard deviation / Standardabweichung
siRNA	small interfering RNA / kleine eingreifende RNA
Src	Sarkoma
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TCF	Ternary Complex Factor
TF	tissue factor