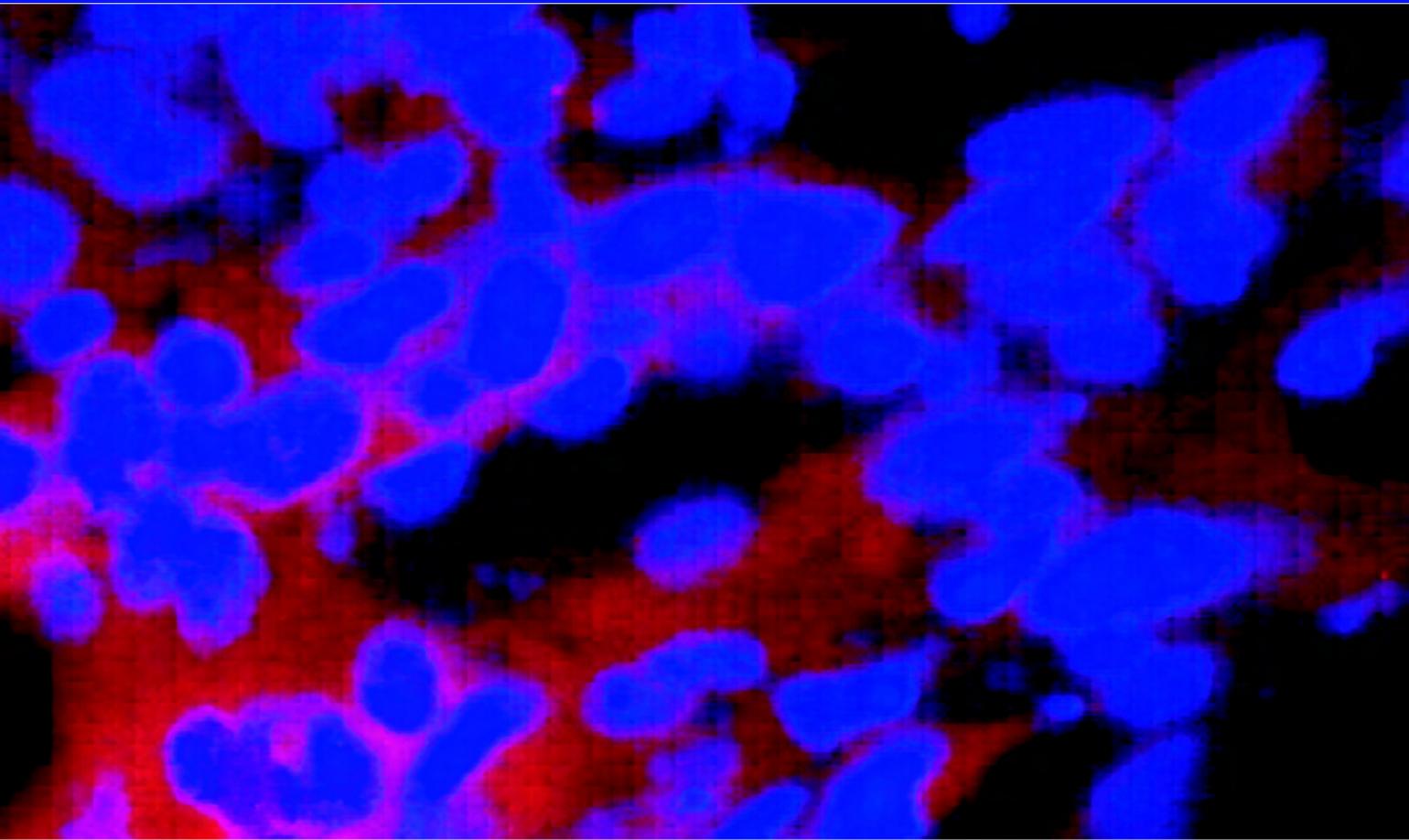


**IN VIVO siRNA-TRANSFEKTION DER LUNGE
UND DES BRONCHIALKARZINOMS
ZUR ANALYSE DER HYPOXIE-INDUZIERBAREN
FAKTOREN IN DER TUMORPROGRESSION**

FLORENTINE KAMLAH



INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2007

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2007

© 2007 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. med. vet. M. Reinacher

und

aus dem Zentrum für Innere Medizin

Medizinischen Klinik und Poliklinik II

des Universitätsklinikums der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Priv.- Doz. Dr. rer. nat. J. Hänze

**In vivo siRNA-Transfektion
der Lunge und des Bronchialkarzinoms
zur Analyse der Hypoxie-induzierbaren Faktoren
in der Tumorprogression**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Florentine Kamlah

Tierärztin aus Würzburg (Bayern)

Gießen 2007

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Manfred Reinacher

Gutachter: Prof. Dr. Manfred Reinacher
PD Dr. Jörg Hänze

Tag der Disputation: 26. Juni 2007

meinen Eltern
in Liebe und Dankbarkeit
und
Freloux

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|--|------|
| ABBILDUNGSVERZEICHNIS | VI |
| TABELLENVERZEICHNIS | VIII |
| ABKÜRZUNGEN | IX |
| VORWORT | 1 |
| 1. EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG | 3 |
| 2. LITERATURÜBERSICHT | 7 |
| 2.1. RNA Interferenz (RNAi) | 7 |
| 2.1.1. Inhibition von Genen | 7 |
| 2.1.2. Mechanismus der RNA Interferenz (RNAi) | 10 |
| 2.1.3. Vergleich der verschiedenen Methoden zur gezielten Genausschaltung | 11 |
| 2.1.4. Methoden der siRNA-Generierung | 13 |
| 2.1.5. Anwendung der siRNA in Säugetierzellen | 14 |
| 2.1.6. Zelluläre Aufnahme von siRNA | 15 |
| 2.1.6.1. Mechanische Methoden | 15 |
| 2.1.6.2. Physikalische Methoden | 16 |
| 2.1.6.3. Chemische Methoden | 16 |
| 2.1.6.4. Biologische Methoden | 20 |
| 2.2. Bronchialkarzinom | 22 |
| 2.2.1. Ursachen für die Entstehung, Charakteristika des Bronchialkarzinoms | 22 |
| 2.2.2. Klassifikation des Bronchialkarzinoms | 26 |
| 2.2.3. Therapiemöglichkeiten des Bronchialkarzinoms | 29 |
| 2.2.3.1. Stadium I und II | 29 |
| 2.2.3.2. Stadium III | 30 |
| 2.2.3.3. Stadium IV | 31 |
| 2.2.3.4. Neue Therapieformen | 31 |
| 2.3. Tumorhypoxie und Hypoxie-induzierbaren Faktoren | 33 |

| | |
|---|----|
| 3. MATERIAL UND METHODEN | 40 |
| 3.1. Tiermodelle | 40 |
| 3.1.1. Versuchstiere und die Haltungsbedingungen | 40 |
| 3.1.2. Anästhesie | 41 |
| 3.1.3. Intubation | 42 |
| 3.1.4. Bau und Implantation des Rechtsherzkatheters | 44 |
| 3.1.5. Subkutane Applikation von Tumorzellen | 47 |
| 3.1.6. Intraperitoneale Transfektion | 47 |
| 3.1.7. Bronchoalveoläre Lavage | 47 |
| 3.1.8. Organentnahme und Tötung | 48 |
| 3.2. Transfektion | 49 |
| 3.2.1. Material | 49 |
| 3.2.1.1. siRNA | 49 |
| 3.2.1.2. Transfektionsreagenzien | 50 |
| 3.2.1.3. Weitere Lösungen | 50 |
| 3.2.2. Methoden | 50 |
| 3.2.2.1. Auswahl und Aufbereitung der siRNAs | 50 |
| 3.2.2.2. Herstellung der Transfektionsmischungen | 51 |
| 3.2.2.3. Transfektionsprotokolle | 54 |
| 3.2.2.3.1. Versuche mit BLOCK-iT™-siRNA | 54 |
| 3.2.2.3.2. Versuche mit siRNA-Cy3 | 54 |
| 3.2.2.3.3. Versuche mit siRNA gegen die Hypoxie-induzierbaren Faktoren (HIF-1 α und HIF-2 α) | 55 |
| 3.3. Zellkultur | 56 |
| 3.3.1. Verwendete Tumorzelllinien | 56 |
| 3.3.2. Verwendete Materialien | 56 |
| 3.3.3. Zellkulturmedien | 57 |
| 3.3.4. Auftauen und Kultivierung der Zellen | 57 |
| 3.3.5. Zellvorbereitung für die <i>in vivo</i> Experimente | 58 |
| 3.3.6. Einfrieren und Langzeitlagerung der Zellen | 59 |
| 3.4. Histologie | 60 |
| 3.4.1. Anfertigung von Gefrierschnitten | 60 |

| | |
|---|----|
| 3.4.2. Färbungen | 60 |
| 3.4.2.1. Nachweis der Transfektion mit fluoreszenzmarkierter siRNA | 60 |
| 3.4.2.2. Immunfluoreszenz | 61 |
| 3.4.2.2.1. Nachweis der Angiogenese - CD 31 | 61 |
| 3.4.2.2.2. Nachweis der Proliferation - Ki 67 | 62 |
| 3.4.2.2.3. Nachweis der Apoptose - Caspase-3 | 63 |
| 3.4.2.2. Hämatoxylin-Eosin-Färbung | 64 |
| 3.4.3. Mikroskopische Auswertung | 65 |
| 3.5. Durchflusszytometrie | 66 |
| 3.6. Real Time PCR | 68 |
| 3.6.1. RNA-Gewinnung und -Isolation | 68 |
| 3.6.2. RNA-Messung mit Hilfe von Nano Drop | 69 |
| 3.6.3. DNase-Verdau und cDNA-Herstellung | 69 |
| 3.6.4. Real Time PCR | 70 |
| 3.7. Statistische Auswertung | 71 |
| 4. ERGEBNISSE | 72 |
| 4.1. Übersicht | 72 |
| 4.2. Etablierung von <i>in vivo</i> Transfektionsverfahren der Lunge und des Bronchialkarzinoms mittels der siRNA-Technik | 74 |
| 4.2.1. siRNA-Transfektion der Lunge | 74 |
| 4.2.1.1. Lungentransfektion mit der grün fluoreszenzmarkierten siRNA | 75 |
| 4.2.1.2. Lungentransfektion mit rot fluoreszenzmarkierter siRNA | 78 |
| 4.2.2. siRNA-Transfektion des Lewis-Lung-Karzinoms (LLC-Modell) | 87 |
| 4.2.2.1. Transfektion des LLC-Modells über den implantierten Rechtsherzkatheter | 88 |
| 4.2.2.2. Intratracheale Transfektion des LLC-Modells | 91 |
| 4.2.3. siRNA-Transfektion des humanen Adenokarzinoms am subkutanen Xenograftmodell der Maus (A549-Modell) | 92 |
| 4.2.3.1. Transfektion des A549-Tumors mit der rot fluoreszenzmarkierten siRNA | 93 |
| 4.2.3.2. Transfektion des humanen Adenokarzinoms am subkutanen Xenograftmodell der Maus mit siRNA-HIF-2 α | 96 |

| | |
|--|-----|
| 4.3. Untersuchung der Bedeutung von HIF-1 α und HIF-2 α für die Tumorprogression des humanen Adenokarzinoms am subkutanen Xenograftmodell der Maus durch Einsatz der siRNA-Technik | 97 |
| 4.3.1. Wachstumsverhalten der subkutanen A549-Tumoren nach Suppression von HIF-1 α und HIF-2 α mittels der siRNA-Technik | 97 |
| 4.3.2. Überprüfung der spezifischen Inhibition von HIF-1 α und HIF-2 α mittels Real Time PCR | 99 |
| 4.3.3. Histologische Auswertung der Angiogenese der subkutanen A549-Tumoren | 100 |
| 4.3.4. Histologische Auswertung der Proliferation der subkutanen A549-Tumoren | 100 |
| 4.3.5. Histologische Auswertung der Apoptose der subkutanen A549-Tumoren | 100 |
| | |
| 5. DISKUSSION | 104 |
| | |
| 5.1. Darstellung der <i>in vivo</i> siRNA-Transfektionsverfahren der Lunge und des Bronchialkarzinoms | 106 |
| 5.1.1. Wahl der siRNA-Transfektionsmethoden und -Transfektionsreagenzien | 106 |
| 5.1.2. Transfektion mittels der grün fluoreszenzmarkierten siRNA (BLOCK-iT™) | 108 |
| 5.1.3. Intratracheale Applikation von siRNA | 109 |
| 5.1.4. Intravenöse Applikation von siRNA über den implantierten Rechtsherzkatheter | 110 |
| 5.1.5. siRNA-Transfektionsverfahren für das subkutane A549-Modell | 111 |
| | |
| 5.2. Einfluss von HIF-1 α und HIF-2 α auf die Tumorprogression im humanen Adenokarzinom (A549-Modell) | 113 |
| 5.2.1. Inhibition von HIF-2 α mittels der siRNA hemmt das Tumorstadium im Gegensatz zur Inhibition von HIF-1 α | 113 |
| 5.2.2. Inhibition von HIF-2 α bewirkt Suppression von Angiogenese sowie Proliferation und führt zur Steigerung der Apoptose im subkutanen A549-Tumor | 114 |
| | |
| 5.3. Ausblick auf die Bedeutung von HIF-2 α als Zielgen für die Tumorthherapie und der RNA Interferenz als potentes Instrument zur spezifischen Inhibition von Genen | 119 |
| | |
| 6. ZUSAMMENFASSUNG | 121 |
| | |
| 7. SUMMARY | 123 |
| | |
| 8. LITERATURVERZEICHNIS | 125 |

| | |
|--|-----|
| Inhaltsverzeichnis | V |
| ANHANG | 148 |
| Materialien und Bezugsquellen | 148 |
| Verwendete siRNAs und Primer | 155 |
| Rohdaten: Real Time PCR zu 4.2.3.2. | 156 |
| Rohdaten: Wachstumskurve 4.3.1. | 157 |
| Rohdaten: Real Time PCR zu 4.3.2. | 158 |
| Rohdaten zu 4.3.3. Angiogenese der A549-Tumoren: | 159 |
| Rohdaten zu 4.3.4. Proliferation der A549-Tumoren: | 161 |
| Rohdaten zu 4.3.5. Apoptose der A549-Tumoren: | 165 |
| ERKLÄRUNG | 169 |
| DANKSAGUNG | 170 |
| EIGENE KONGRESSBEITRÄGE | 171 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: Übersicht der verschiedenen Methoden zur posttranskriptionellen Stilllegung von mRNA (Brus, 2004) | 7 |
| Abbildung 2: Modell RNAi in Säugetierzellen (modifiziert nach McManus und Sharp, 2002) | 11 |
| Abbildung 3: Protonenschwammtheorie (Brus, 2004) | 19 |
| Abbildung 4: Entwicklung des Bronchialkarzinoms (Hirsch et al., 2001) | 25 |
| Abbildung 5: Mechanismus und Reaktionen von HIF-1 Aktivität in Tumorzellen | 35 |
| Abbildung 6: HIF-Isoformen modifiziert nach Fedele (Fedele et al., 2002) | 36 |
| Abbildung 7: Verwendete Mauslinien | 40 |
| Abbildung 8: Zustand kurz vor dem Eröffnen der Vena jugularis | 45 |
| Abbildung 9: Der eingebundene Katheter und die Aspiration von Blut (rechts) | 46 |
| Abbildung 10: Transfektion der gesunden Lunge | 75 |
| Abbildung 11: Transfektion der gesunden Lunge über den implantierten Rechtsherzkatheter mit der BLOCK-iT TM -siRNA und Lipofectamine TM 2000 | 76 |
| Abbildung 12: Transfektion der gesunden Lunge über intratracheale Applikation der BLOCK-iT TM -siRNA und Lipofectamine TM 2000 | 77 |
| Abbildung 13: Transfektion der gesunden Lunge über den implantierten Rechtsherzkatheter mit siRNA-Cy3 und Lipofectamine TM 2000 | 78 |
| Abbildung 14: Untersuchung der Organe nach Transfektion mit siRNA-Cy3 und Lipofectamine TM 2000 über den implantierten Rechtsherzkatheter | 80 |
| Abbildung 15: Transfektion der gesunden Lunge über den implantierten Rechtsherzkatheter mit siRNA-Cy3 und in vivo jetPEI TM | 82 |
| Abbildung 16: Untersuchung der Organe nach Transfektion mit siRNA-Cy3 und in vivo jetPEI TM über den implantierten Rechtsherzkatheter | 83 |
| Abbildung 17: Transfektion der gesunden Lunge über intratracheale Applikation der siRNA-Cy3 und Lipofectamine TM 2000 | 84 |
| Abbildung 18: Durchflusszytometrie aus der bronchoalveolären Lavage gewonnener Zellen nach Transfektion der gesunden Lunge über intratracheale Applikation der siRNA-Cy3 mit Lipofectamine TM 2000 | 85 |
| Abbildung 19: Untersuchung der Organe nach Transfektion mit siRNA-Cy3 und Lipofectamine TM 2000 nach intratrachealer Applikation | 86 |
| Abbildung 20: Transfektion des LLC-Modells | 87 |

| | |
|---|-----|
| Abbildung 21: Transfektion des Lewis-Lung-Karzinoms der Lunge über den implantierten Rechtsherzkatheter mit siRNA-Cy3 und Lipofectamine™ 2000 | 89 |
| Abbildung 22: Transfektion des Lewis-Lung-Karzinoms der Lunge über den implantierten Rechtsherzkatheter mit siRNA-Cy3 und in vivo jetPEI™ | 90 |
| Abbildung 23: Transfektion Lewis-Lung-Karzinoms der Lunge nach intratrachealer Applikation von siRNA-Cy3 und Lipofectamine™ 2000 | 91 |
| Abbildung 24: Transfektion des subkutanen A549-Modells | 93 |
| Abbildung 25: Transfektion des subkutanen A549-Tumors mit siRNA-Cy3 | 94 |
| Abbildung 26: Untersuchung der Organe nach intraperitonealer Transfektion mit siRNA-Cy3 und in vivo jetPEI™ | 95 |
| Abbildung 27: Expression von HIF-1 α mRNA und HIF-2 α mRNA nach intraperitonealer Transfektion von siRNA-HIF-2 α und in vivo jetPEI™ im subkutanen A549-Tumor | 96 |
| Abbildung 28: Wachstumskurven und Bilder der Tumoren | 98 |
| Abbildung 29: Expression von HIF-1 α mRNA und HIF-2 α mRNA nach intraperitonealer Transfektion von siRNA-HIF-1 α und siRNA-HIF-2 α mit in vivo jetPEI™ im subkutanen A549-Tumor | 99 |
| Abbildung 30: Angiogenese | 101 |
| Abbildung 31: Proliferation | 102 |
| Abbildung 32: Apoptose | 103 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 1: TNM-Klassifikation | 28 |
| Tabelle 2: Tabelle der weiteren verwendeten siRNAs | 49 |
| Tabelle 3: Übersicht der einzelnen Transfektionsmischungen | 53 |
| Tabelle 4: Verwendete Primer | 71 |

Abkürzungen

| | |
|----------------|---|
| AAV | Adeno-assoziierte Viren |
| ARNT | Hypoxie-induzierbarer Faktor-1 beta |
| as | antisense |
| ATP | Adenosintri-phosphat |
| bp | base pair |
| bzw. | beziehungsweise |
| ca. | cirka |
| DNase | Desoxyribonuklease |
| DNS/DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dsRNA | doppelsträngige RNA |
| ECOG | ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) Performance Status |
| EGFR | epidermal growth factor receptor |
| FIH-1 | factor inhibiting HIF-1 |
| Gy | Gray |
| h | Stunde |
| HIF | Hypoxie-induzierbare Faktoren |
| HIF-1 α | Hypoxie-induzierbarer Faktor-1 alpha |
| HIF-1 β | Hypoxie-induzierbarer Faktor-1 beta |
| HIF-2 α | Hypoxie-induzierbarer Faktor-2 alpha |
| HIV-1 | Humanes Immundefizienz-Virus 1 |
| HRE | Hypoxie-responsive Element |
| IFN- γ | Interferon-gamma |
| min | Minuten |

| | |
|----------------|----------------------------------|
| miRNA | microRNA |
| mRNA | messenger RNA |
| N/P-Verhältnis | Stickstoff/Phosphat-Verhältnis |
| NSCLC | non small cell lung cancer |
| p53 | Tumor-Suppressor-Protein 53 |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| PEI | Polyethylenimin |
| pre-mRNA | pre messenger RNA |
| pVHL | von-Hippel-Lindau-Protein |
| RHK | Rechtsherzkatheter |
| RISC | RNA-induced silencing complex |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNAi | RNA Interferenz |
| RNase | Ribonuklease |
| rpm | rounds per minute |
| RT | Raumtemperatur |
| SCID | severe combined immunodeficiency |
| SCLC | small cell lung cancer |
| sec | Sekunden |
| shRNA | short hairpin RNA |
| siRNA | small interfering RNA |
| TLR | Toll-like receptor |
| TNM | Tumor Node Metastases |
| T-Zellen | T-Lymphozyten |
| UTR | 3`untranslatierte Region |

| | |
|-------|------------------------------------|
| v. a. | vor allem |
| VEGF | vascular endothelial growth factor |
| z. B. | zum Beispiel |

Vorwort

Der experimentelle Teil der vorliegenden Dissertation wurde im Zeitraum vom Mai 2004 bis Juli 2006 im Zentrum für Innere Medizin, Medizinische Klinik und Poliklinik II (Leiter Prof. Dr. med. W. Seeger) und Medizinische Klinik V (Leiter Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. F. Grimminger), Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt.

Die Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. rer. nat. J. Hänze und Herrn PD Dr. med. F. Rose angefertigt. Betreut wurde sie durch Herrn PD Dr. rer. nat. J. Hänze und Herrn PD Dr. med. F. Rose.

Auf veterinärmedizinischer Seite wurde diese Arbeit durch Herrn Prof. Dr. med. vet. M. Reinacher betreut.

Die vorliegende Arbeit ist dem Gebiet der Onkologie der Lunge und des Gentransfers zuzuordnen.

Im ersten Teil dieser Arbeit werden *in vivo* Modelle zur siRNA-Transfektion der Lunge und des Bronchialkarzinoms etabliert.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wird der Einfluss von den Hypoxie-induzierbaren Faktoren (HIF-1 α und HIF-2 α) auf das humane Adenokarzinom am subkutanen Xenograftmodell der Maus (A549-Modell) mittels Suppression von HIF-1 α und HIF-2 α durch die siRNA untersucht.

Über diese Arbeit hinaus wurden die hier etablierten siRNA-Transfektionsverfahren für weitere Untersuchungen angewendet.

So wurde das LLC-Modell nach Suppression von HIF-1 α und HIF-2 α mittels der siRNA weiter analysiert, z. B. durch Färbung eines Zielgens (Glukose-1 Rezeptor).

Die Wirkung von Cisplatin wurde *in vitro* und *in vivo* durch Suppression von HIF-2 α mittels der siRNA verbessert.

Die Bestrahlungstherapie wurde in Kombination von siRNA-HIF-1 α und siRNA-HIF-2 α *in vitro* und *in vivo* analysiert.

Zudem wurde das *in vivo* A549-Modell benutzt um den Energiestoffwechsel im Tumor näher zu untersuchen. Hierbei wurde die Rolle von PDK-1 (3-phosphoinositid-abhängige-Proteinkinase-1) durch Suppression mittels der siRNA im Hinblick auf die Tumorprogression, der Angiogenese, Proliferation und Apoptose analysiert (vergleichend dazu siehe Seite 171, eigene Kongressbeiträge).

1. Einleitung und Zielsetzung

Es werden verschiedene Techniken zur spezifischen Geninhibition eingesetzt, um Gene zu charakterisieren und ihre Funktion zu analysieren (Dorsett und Tuschl, 2004).

Ende der neunziger Jahre wurde erstmals ein neues, potentes Inhibitionsverfahren, die so genannte *RNA Interferenz (RNAi)*, beschrieben (Fire et al., 1998).

RNAi wird über die *small interfering RNA (siRNA)* vermittelt. Bei der siRNA handelt es sich um eine aus 21 Basen bestehende, doppelsträngige Ribonukleinsäure, die intrazellulär unter Bildung eines *RNA-induced silencing complex (RISC)* sequenzspezifisch den mRNA-Abbau induziert (Fire et al., 1998).

Nach dem Nachweis der RNAi in humanen Zellen und der Etablierung der RNAi als Technik zur gezielten Stilllegung von humanen Genen *in vitro* folgten wenig später erste Berichte von der Anwendung der RNAi im Maus-Modell (Lewis et al., 2002; McCaffrey et al., 2002).

Die Aufnahme von siRNA in die Zelle passiert nicht spontan und kann durch verschiedene Transfektionstechniken begünstigt werden. Von Nukleinsäuren abgeleitete Oligonukleotide sind negativ geladene Moleküle, die nicht durch hydrophobe Membranen hindurch diffundieren können. Um es exogen zugegebener, synthetisch hergestellter siRNA zu ermöglichen die Zellmembran zu überwinden, sind eine Reihe von Transfektionsagentien entwickelt worden (Seksek und Bolard, 2004).

Umfassende Überblicke über den derzeitigen Stand der RNAi-Forschung und -Anwendung werden in folgenden Übersichtsartikeln gegeben (Aigner, 2006; Dorsett und Tuschl, 2004; Mittal, 2004).

RNAi könnte auch Anwendung in der humanen Gentherapie, vor allem der Krebstherapie, finden.

Das Bronchialkarzinom ist einer der häufigsten bösartigen Tumoren des Menschen mit einer ungünstigen Prognose und einer mittleren Lebenserwartung nach Diagnosestellung von

1 bis 2 Jahren. Etablierte Therapieverfahren bewirken bislang keine wesentliche Verbesserung.

Tumorzellen sind genetisch verändert und zeigen eine gesteigerte Proliferation und eine reduzierte Apoptoserate. Hypoxische Areale scheinen die Therapieresistenz von Tumoren zu erhöhen. Durch die Hypoxie wird die Angiogenese des Tumors gefördert. Außerdem kommt es durch genetische Veränderungen der Tumorzellen zu einer weiteren Herabsetzung der Apoptoserate. Insgesamt wird die Tumorprogression gesteigert und die Überlebenschancen der Patienten sinkt (Vaupel, 2004).

Die Hypoxie-induzierbaren Faktoren (HIF-1 α und HIF-2 α) werden in Hypoxie aktiviert und steuern über das Hypoxie-responsive Element (HRE) ca. 100 bekannte Zielgene der Angiogenese, Apoptose, des Metabolismus, der Invasion und Metastasierung von Tumoren (Semenza, 2003). Neue Therapieformen, die in den Mechanismus der Angiogenese eingreifen, stellen viel versprechende Verbesserungen zur konservativen Therapie des Bronchialkarzinoms dar (Shepherd et al., 2005; Tyagi, 2005).

Als Angriffspunkt zur Therapie des Bronchialkarzinoms stellen die Hypoxie-induzierbaren Faktoren einen interessanten Ansatz dar.

In dieser Arbeit wurden zwei Ziele verfolgt:

1) Etablierung von *in vivo* Transfektionsverfahren der Lunge und des Bronchialkarzinoms mittels der siRNA-Technik

- Entwicklung eines Verfahrens zur effizienten Transfektion mittels siRNA der Lunge und des Bronchialkarzinoms *in vivo*.
- Einsatz von chemischen Transfektionsreagenzien Lipofectamine™ 2000 und *in vivo* jetPEI™ zur Transfektion der fluoreszenzmarkierten siRNA über verschiedene Zugangswege der Lunge und histologische Analyse der Transfektion und möglichen Nebeneffekten.
- Überprüfung der entwickelten Verfahren zur Anwendung im erzeugten Bronchialkarzinom der Lunge am Lewis-Lung-Karzinom-Modell (LLC-Modell) der Maus mit histologischer Analyse.
- Etablierung eines Transfektionsverfahren zur Anwendung im humanen Adenokarzinom am subkutanen Xenograftmodell der Maus (A549-Modell).
- Überprüfung der Effizienz der Tumortransfektion am A549-Modell mittels Real Time PCR nach Inhibition von HIF-2 α mittels der siRNA.

2) Untersuchung der Bedeutung von HIF für die Tumorprogression im humanen Adenokarzinom am subkutanen Xenograftmodell der Maus durch Einsatz der siRNA-Technik

- Untersuchung des Einflusses von HIF-1 α und HIF-2 α auf das Tumorwachstum im humanen Adenokarzinom am subkutanen Xenograftmodell der Maus mittels der siRNA-Technik.
- Analyse der Transfektionseffizienz mittels Real Time PCR der transfizierten Tumoren.

- Histologische Analyse der Angiogenese, Proliferation und Apoptose der subkutanen Tumoren nach spezifischer Ausschaltung von HIF-1 α und HIF-2 α mittels der siRNA-Technik.

2. Literaturübersicht

2.1. RNA Interferenz (RNAi)

2.1.1. Inhibition von Genen

Es werden verschiedene Techniken zur gezielten Inhibition von Genen angewendet, um Gene zu analysieren und um ihre Funktion charakterisieren zu können (Abb. 1).

Neben rekombinanten Techniken zur Eliminierung von Genen sind zur Ausschaltung von Genen die *Antisense-Oligonukleotid-Technik* und die *Ribozyme* bekannt. Seit Ende der neunziger Jahre wurde erstmals ein weiteres, sehr potentes Inhibitionsverfahren, die so genannte *RNA Interferenz*, beschrieben.

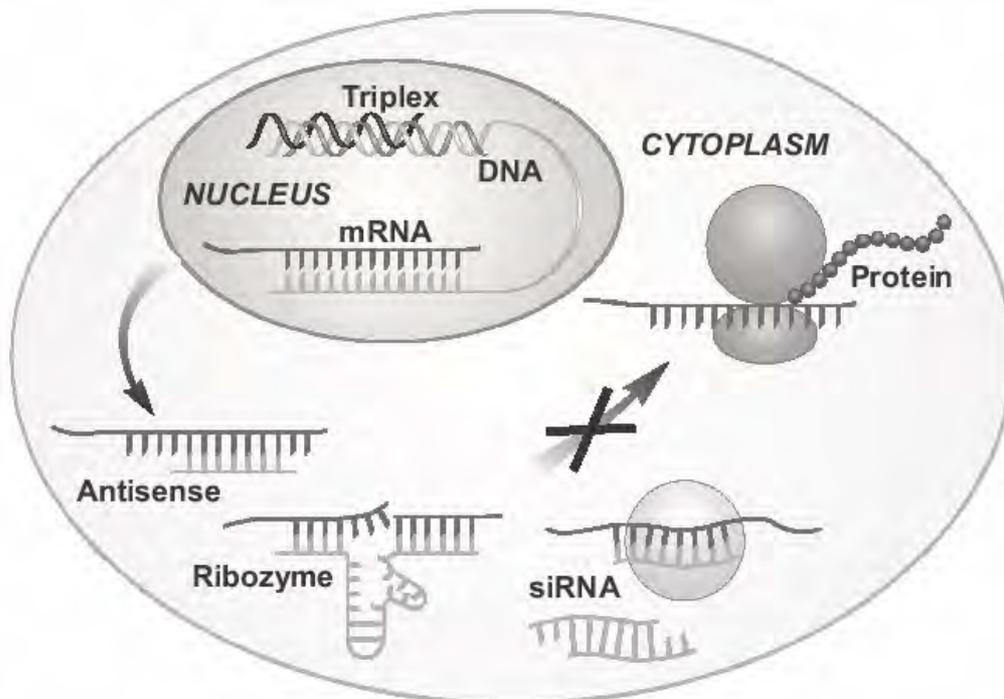


Abbildung 1: Übersicht der verschiedenen Methoden zur posttranskriptionellen Stilllegung von mRNA (Brus, 2004)

Im Zellkern wird die DNA zur Transkription abgelesen und die mRNA gebildet, diese gelangt in das Zytoplasma und kodiert Proteine. Es ist möglich, die mRNA mit verschiedenen Methoden mittels der Antisense-Oligonukleotid-Technik, der Ribozyme und der small interfering RNA (siRNA) sequenzspezifisch abzubauen. Dadurch kann die mRNA nicht mehr durch die Ribosome abgelesen werden und somit ist die Translation zum Protein inhibiert.

Bei der *Antisense-Oligonukleotid-Methode* wird eine zur mRNA-Sequenz komplementäre etwa 20 Nukleotide lange RNA (= anti-sense RNA) in die Zelle eingebracht, die sequenzspezifisch an die mRNA bzw. an die pre-mRNA bindet. Bei Bindung an die mRNA kann erstens mit Hilfe der RNase H die mRNA abgebaut, zweitens durch sterische Inhibition die Translation verhindert und drittens bei Bindung an die pre-mRNA der Splicing-Prozess zur mRNA inhibiert werden (Gleave und Monia, 2005).

Bei den *Ribozymen* handelt es sich um einsträngige RNA-Moleküle mit spezifischer Sekundärstruktur. Sie hybridisieren an die mRNA und degradieren die Ziel-mRNA. Durch ihre katalytische Aktivität sind sie in der Lage, die Phosphodiesterbindung in der RNA zu spalten. Es sind verschiedene Klassen von Ribozymen entdeckt worden. Die am meisten untersuchte Ribozym-Klasse sind die Hammerhead-Ribozyme. Der Name steht für die Sekundärstruktur, welche bei Hybridisierung mit der mRNA entsteht. Der Abbau ist von divalenten Ionen abhängig, z. B. Magnesium. Die Hammerhead-Ribozyme sind kurz genug um chemisch synthetisiert zu werden oder auch in Vektoren transkribiert zu werden (Cech et al., 1981; Kruger et al., 1982).

RNA Interferenz (RNAi) wird durch Transfektion einer doppelsträngigen RNA (dsRNA) ausgelöst und ist ein sehr potenter Mechanismus zur sequenzspezifischen Stilllegung von Genen - posttranskriptionale Gensuppression. Das Phänomen wurde zuerst von Fire, Mello und Kollegen im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* identifiziert. Sie beobachteten, dass die Injektion von dsRNA in Würmer spezifisch und effizient die Expression eines Gens inhibierte, das eine passende Sequenz enthielt (Fire et al., 1998). Die Aufklärung dieses Sachverhaltes vermochte auch frühere entsprechende Beobachtungen in Pflanzen zu erklären (Jorgensen, 1990).

Zahlreiche Arbeitsgruppen waren im Folgenden daran beteiligt, den Mechanismus der RNAi aufzuklären. Eine aktuelle Übersicht über Details findet sich bei Meister und Tuschl (2004) sowie bei Tuschl und Borkhardt (2002). Seit ihrer Entdeckung wird die RNAi im

Forschungslabor routinemäßig zur gezielten Inaktivierung von Genen verwendet. Dennoch war die experimentelle Nutzung dieser Methode bei Säugerzellen zunächst nicht möglich, da lange dsRNA (>30 bp) im Zytoplasma von Säugerzellen verschiedene antivirale Signalwege aktivieren, die zum Absterben der Zelle führen (Stark et al., 1998). Thomas Tuschls Arbeitsgruppe fand jedoch heraus, dass diese Abwehrreaktion durch die direkte Transfektion synthetischer 21 nt langer *small interfering RNAs (siRNAs)* umgangen wird (Abb. 2) und so eine hoch selektive und sequenzspezifische Gen-Inaktivierung erzielt werden kann (Elbashir et al., 2001). Nach dem Nachweis der RNAi in humanen Zellen und der Etablierung der RNAi als Technik zur gezielten Stilllegung von humanen Genen *in vitro* folgten wenig später auch *in vivo* Anwendungen.

SiRNAs gleichen so genannten *microRNAs (miRNAs)*, die natürlicherweise in Pflanzen, Viren, Insekten (*Drosophila melanogaster*) (Lagos-Quintana et al., 2001) und Würmern (*C. elegans*) (Lee und Ambros, 2001), aber auch im Säuger (Lagos-Quintana et al., 2003; Lagos-Quintana et al., 2002) vorkommen und die Genexpression in Zellen (Bartel, 2004; Carrington und Ambros, 2003) regulieren. Die reife miRNA ist eine einzelsträngige 21-22 Nukleotide große RNA, welche im Zytoplasma aus 70 Nukleotide großen „Haarnadel-förmigen“ Vorläufern herausgeschnitten wird (Lee et al., 2002b).

Die reife miRNA geht in einen Proteinkomplex (miRNP) über, welcher mit den Ribosomen assoziiert ist und die Translation der mRNA inhibiert, wenn die enthaltene Sequenz teilweise komplementär zur miRNA in ihrer 3`untranslatierten Region (UTR) ist (Kim et al., 2004; Nelson et al., 2004; Olsen und Ambros, 1999; Seggerson et al., 2002; Wightman et al., 1993).

Die miRNA kann, wenn eine komplementäre Sequenz vorhanden ist, wie die siRNA agieren und kann mehrere mRNA-Moleküle abbauen (Hutvagner und Zamore, 2002).

2.1.2. Mechanismus der RNA Interferenz (RNAi)

Die RNAi wird über die *small interfering RNA (siRNA)* vermittelt. Längere dsRNA wird durch das Protein *Dicer*, eine Endonuklease des RNase III-Typs, in 19-meren RNA-Duplexen zerschnitten, die an den 3'-Enden symmetrische Überhänge von zwei Nukleotiden enthalten. Diese kurzen dsRNAs werden als siRNAs bezeichnet (Abb. 2).

Eine anschließende Phosphorylierung der 5'-Enden der siRNA-Duplex führt zu deren Aufnahme in den proteinhaltigen *RNA-induced silencing complex (RISC)* (Hammond et al., 2000). Die Bindung der siRNA an die Ziel-mRNA wird über RISC vermittelt. Dabei bestimmt die relative Stabilität der Enden des siRNA-Duplexes, welcher Strang („guide“-Strang) an die mRNA bindet (Leuschner et al., 2006; Matranga et al., 2005; Rand et al., 2005; Tomari et al., 2004). Die genaue Zusammensetzung des RISC ist noch nicht abschließend geklärt. Es sind verschiedene Formen in der Literatur beschrieben worden. In jedem Falle sind aber Proteine der Argonaut-Familie oder ihre Homologe Bestandteile des Komplexes. Der gebundene „guide“-Strang programmiert RISC spezifisch mit einer RNA zu interagieren, die eine komplementäre Sequenz aufweist. Das entsprechende Molekül wird gebunden und die mRNA wird nach dem 10. gebundenen Nukleotid des 5'-Endes des Leitstranges der siRNA gespalten (Yuan et al., 2006). Neuere Forschungen haben Hinweise darauf geliefert, dass eine konservierte RNase H-artige Domäne im Protein Ago-2 die Endonuklease-Aktivität sein dürfte, die den Spaltungsschritt ausführt (Song et al., 2003b). Die beschädigte Ziel-mRNA wird anschließend durch zelluläre Nukleasen abgebaut, während der beladene RISC weitere Spaltungsreaktionen durchführen kann (Abb. 2) (Tomari und Zamore, 2005).

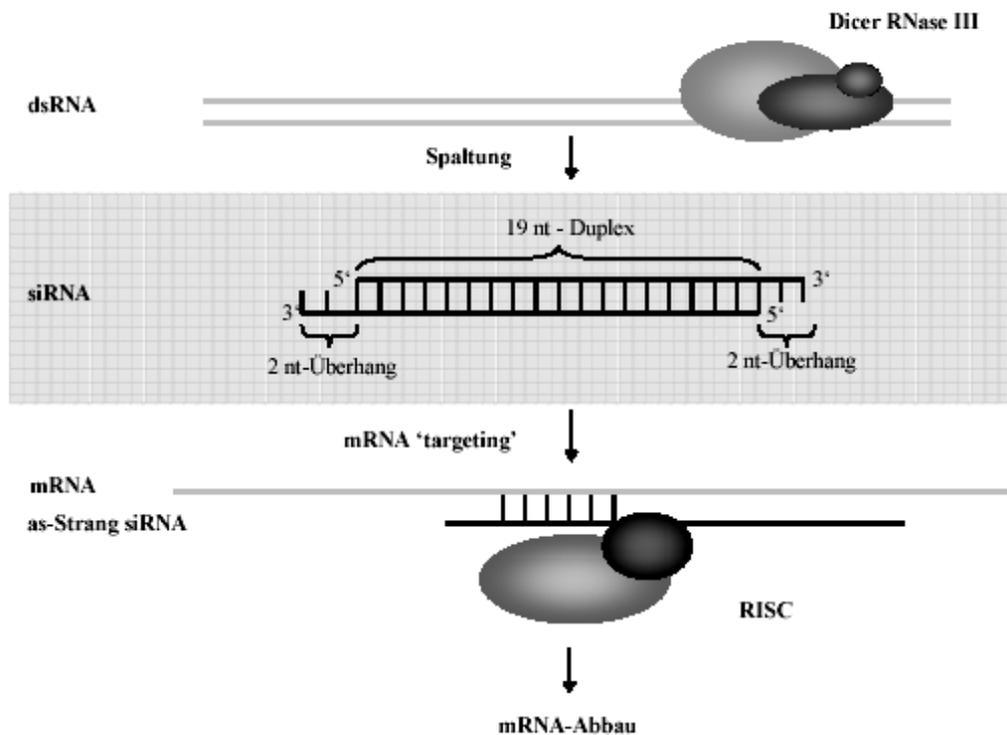


Abbildung 2: Modell RNAi in Säugerzellen (modifiziert nach McManus und Sharp, 2002)

Die RNAi wird über die small interfering RNA (siRNA) vermittelt. Längere dsRNA wird durch das Protein Dicer, eine Endonuklease des RNase III-Typs, in 19-mere RNA-Duplexe zerschnitten, die an den 3'-Enden symmetrische Überhänge von zwei Nucleotiden enthalten. Diese kurzen dsRNAs werden als siRNAs bezeichnet. Die siRNA wird vom RNA-induced silencing complex (RISC) gebunden. In ihm löst sich ein Strang der siRNA. Hierdurch wird RISC aktiviert. Der gebundene Antisense-Strang (as), auch genannt „guide“-Strang der siRNA, bindet nun sequenzspezifisch an die mRNA. Die mRNA wird gespalten und von Endonukleasen abgebaut.

2.1.3. Vergleich der verschiedenen Methoden zur gezielten Genausschaltung

Verschiedene Arbeitsgruppen haben die Ergebnisse der Genausschaltung mit Antisense-Oligonukleotid-Technik, Ribozyme und RNAi in der Gewebekultur verglichen (Bertrand et al., 2002; Grunweller et al., 2003; Hemmings-Mieszczyk et al., 2003; Kretschmer-Kazemi Far und Sczakiel, 2003; Miyagishi et al., 2003; Vickers et al., 2003).

Der Vergleich dieser Studien ist schwierig, da die Effizienz der Genausschaltung abhängig ist von der Konzentration des Reagenz zur Genausschaltung, der Transfektionstechnik, dem Zelltyp, dem Zielgen, chemischen Modifikationen und dem Zeitpunkt, an dem die Transfektion gestoppt wird und die Daten analysiert werden. Keine dieser Studien hat bisher alle Parameter so angeglichen, dass der direkte Vergleich möglich ist.

Verschiedene siRNA-Sequenzen, die gegen eine Ziel-mRNA gerichtet sind, weisen unterschiedliche Inhibitionseffizienzen auf. Dies erschwert den Vergleich zu den anderen Inhibitionsverfahren auf mRNA-Ebene weiter (Harborth et al., 2003).

Zwei Studien heben die Antisense-Moleküle als potenter als die siRNA hervor (Liu et al., 2004; Vickers et al., 2003). Alle sonstigen Studien haben gezeigt, dass die siRNA potenter und länger wirksam ist als die Antisense-Moleküle. Es ist erwiesen, dass die effektive Konzentration der Inhibition (IC 50) von siRNA 100 bis 1000 mal niedriger und damit potenter ist als die Antisense-Moleküle gegen dasselbe Zielgen (Grunweller et al., 2003; Kretschmer-Kazemi Far und Sczakiel, 2003; Miyagishi et al., 2003). Auch der Vergleich zwischen Ribozyme/DNAzyme und siRNA zeigte, dass die siRNA effektiver Gene inhibiert (Lee et al., 2002a; Yokota et al., 2004).

Alle drei genannten Methoden zur Genausschaltung haben mögliche nicht spezifische Effekte auf die Genexpression. Antisense-Moleküle, vor allem wenn sie Phosphorothioat-modifiziert sind, können toxisch sein, da sie an endogene Proteine binden (Lebedeva und Stein, 2001). Antisense-Moleküle und Ribozyme müssen, um effizient zu wirken, in hohen Konzentrationen eingesetzt werden, was das Problem der Toxizität verstärkt.

Antisense-Moleküle mit dem Cytidin- und Guanidin-Phosphat-Motiv induzieren Interferonbildung und lösen durch Bindung an die „Toll-like receptors“ (TLRs) auch andere Immunantworten aus (Hafner et al., 2001; Rothenfusser et al., 2003).

Diese Problematik ist der Grund dafür, dass gerade potent inhibierende Antisense-Moleküle für *in vivo* und klinische Anwendungen nicht zum Einsatz geeignet sind (Dove, 2002; Lai et al., 2003).

Neue Studien zeigen, dass Menschen und Mäuse TLRs exprimieren, wenn Uridin/Guanidin- und Uridin-reiche einzelsträngige RNA in die Zellen gelangt (Diebold et al., 2004; Heil et al., 2004). Dies führt zur Ausschüttung von Interferon- γ und anderen Zytokinen. Wenn chemische modifizierte siRNAs oder Ribozyme *in vivo* verabreicht werden, können sie TLRs Sequenz-unabhängig aktivieren. Dieser potente Nebeneffekt kann möglicherweise bei der Therapie von Virusinfektionen und der Krebsbehandlung günstig sein.

Die siRNA hat zusammengefasst gegenüber den anderen genannten Methoden den Vorteil, dass sie in niedrigen Konzentrationen wirksam ist, dass sie sehr spezifisch inhibiert und sehr schnell in den RISC-Komplex aufgenommen wird und damit die Bindung an andere Proteine kaum möglich ist (Chi et al., 2003; Jackson et al., 2003; Semizarov et al., 2003).

2.1.4. Methoden der siRNA-Generierung

SiRNAs können sowohl exogen als so genannte synthetische siRNA zugegeben werden als auch innerhalb der Zelle von Vektoren exprimiert werden (Mittal, 2004). In den meisten Fällen werden siRNAs dazu von Polymerase III-Promotoren des U6- oder H1-Typs transkribiert (Tuschl, 2002). Diese Promotoren werden in allen Zelltypen aktiviert und steuern gewöhnlich die Synthese kleiner nukleolärer RNAs (U6) oder des RNA-Anteils der RNase P (H1). Die beiden Stränge der siRNA-Helix können von zwei distinkten Promotoren aus transkribiert werden, oder es wird zunächst ein durchgehendes selbst-komplementäres RNA-Molekül hergestellt, das als *short hairpin RNA (shRNA)* bezeichnet wird. Nach der Transkription nimmt das shRNA-Molekül eine Haarnadelkonformation an, indem es interne Basenpaarungen ausbildet. Im Zytoplasma wird diese *stem-loop-Struktur* vom Dicer weiterverarbeitet, sodass eine reife siRNA entsteht. Mithilfe derartiger Plasmidvektoren

konnten stabil transfizierte Zellen selektiert werden, die noch zwei Monate nach der Transfektion effizientes „Gensilencing“ zeigen (Brummelkamp et al., 2002).

Der Vorteil der stabilen Expression liegt gegenüber der transienten darin, dass eine transiente Expression nach wenigen Tagen erneuert werden muss, wohingegen eine stabile Expression lange andauern kann.

Außerdem können diese Vektoren in verschiedene Zellen z. B. auch in Viren eingebaut werden (siehe 2.1.6.4) und so ist es möglich, sonst nicht transfizierbare Zellen zu transfizieren.

Als Nachteil der Transfektion der siRNA über Vektoren sind hohe Interferon-Antworten durch die hohe Expression der shRNA zu werten (Dorsett und Tuschl, 2004).

2.1.5. Anwendung der siRNA in Säugetierzellen

Die RNAi hat sich schnell zu einer Methode entwickelt, um die Funktion unbekannter Gene zu untersuchen (Hannon und Rossi, 2004). Es wurden für eine stetig steigende Anzahl von Genen funktionstüchtige siRNAs entwickelt (Silva et al., 2004). Außerdem stehen umfangreiche siRNA-Expressionsbibliotheken zur Verfügung, die gegen 10.000 bzw. 80.000 menschliche Gene gerichtet sind. Mit Hilfe dieser Bibliotheken wurden zunächst bekannte Gene mit Relevanz für den Proteinabbau im Proteasom identifiziert bzw. neue Komponenten im p53 Signalweg gefunden (Berns et al., 2004; Paddison et al., 2004). Solche Expressionsbibliotheken werden zunehmend auch in der pharmazeutischen Forschung eingesetzt (Clayton, 2004). Nach dem Nachweis der RNAi in humanen Zellen und der Etablierung der RNAi als Technik zur gezielten Stilllegung von humanen Genen *in vitro* folgten wenig später erste Berichte von der Anwendung der RNAi im Maus-Modell (Lewis et al., 2002; McCaffrey et al., 2002). Durch Übertragung sequenzhomologer siRNA über eine hydrodynamische Injektion in die Schwanzvene von Mäusen konnte die Expression von Reportergenen gehemmt werden (Lewis et al., 2002).

2003 gelang es Song et al. erstmals, durch Infusion (intravenös) von siRNAs in eine Maus, eine Erkrankung zu bekämpfen. Mäuse, die mit siRNA gegen den Fas-Todesrezeptor behandelt wurden, konnten nach experimentell induzierter „Akuter Leberschädigung“ („acute liver failure“ (ALF)) ihre Leberfunktion wiedererlangen (Song et al., 2003a).

Diese Ergebnisse wecken die Hoffnung, dass die RNAi auch Anwendung in der humanen Gentherapie finden könnte. Außerdem wurden Transgene, die siRNAs codieren, erfolgreich in Keimbahnzellen von Mäusen und Ratten eingebracht (Carmell et al., 2003). Durch diese Technik ist die äußerst arbeitsaufwendige und anspruchsvolle Herstellung transgener Tiere immens vereinfacht worden. Umfassende Überblicke über den derzeitigen Stand der RNAi-Forschung und -Anwendung werden in folgenden Übersichtsartikeln gegeben (Aigner, 2006; Dorsett und Tuschl, 2004; Mittal, 2004).

2.1.6. Zelluläre Aufnahme von siRNA

Die Aufnahme von siRNA durch die Zellmembran der Zelle gehört zu den größten Hindernissen, die für eine effiziente Anwendung überwunden werden müssen. Alle beschriebenen Klassen von Oligonukleotiden sind negativ geladene Moleküle, die nicht durch hydrophobe Membranen hindurch diffundieren können. Es sind verschiedene mechanische, physikalische, chemische und biologische Methoden beschrieben worden, die die zelluläre Aufnahme der siRNA begünstigen.

2.1.6.1. Mechanische Methoden

Die mechanischen Methoden des Gentransfers haben für die therapeutisch-medizinische Anwendung keine Bedeutung, weshalb diese Methoden hier nur kurz erwähnt werden. Die mechanischen Methoden finden Anwendung insbesondere in mechanisch-biologischen

Untersuchungen zur Genfunktion und Expression. Die Zerstörung der Integrität der Zelle ist mit der medizinisch-therapeutischen Anwendung nicht vereinbar. Weit verbreitet sind die mechanischen Methoden des Gentransfers bei der Transfektion von Pflanzenzellen (Beetham et al., 1999; Zhu et al., 1999).

2.1.6.2. Physikalische Methoden

Die Injektion von nackter DNA führt v. a. in der Muskelzelle zu einer ausgeprägten Expression des injizierten Gens (Wolff et al., 1990). Die Genexpression in Muskelzellen wird in klinischen Studien für DNA-Impfstoffe untersucht (Yankauckas et al., 1993). Weiterhin ist durch Injektion von nackter DNA eine Genexpression in Herzmuskelzellen und Leberzellen nachweisbar (Ardehali et al., 1995).

Ein weiteres physikalisches Verfahren, welches zur Transfektion von Zellen benutzt wird, ist die so genannte Elektroporation. Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes wird die Zellmembran permeabel und somit kann die siRNA effizient aufgenommen werden (Herweijer und Wolff, 2003).

Überraschenderweise hat sich herausgestellt, dass Oligonukleotide *in vivo* häufig auch ohne Transfektionsreagenzien, also ohne chemische Verfahren, effizient aufgenommen werden. Im Tierversuch führt zum Beispiel die Methode der Hochdruck-Schwanzveneninjektion (*high pressure tail vein injection*) ohne den Zusatz von Transportvehikeln zu einer erheblichen Anreicherung des Oligonukleotids insbesondere in der Leber (Lewis et al., 2002).

2.1.6.3. Chemische Methoden

Um exogen zugegebenen Oligonukleotiden zu ermöglichen, die Zellmembran zu überwinden, sind eine Reihe von Transfektionsagentien entwickelt worden (Seksek und Bolard, 2004). Zumeist handelt es sich dabei um Lipide mit positiv geladenen Kopfgruppen, die sich zu Liposomen zusammenlagern, an die das Oligonukleotid assoziieren kann. Die Aufnahme

erfolgt dann über endozytotische Stoffwechselwege. Sie ist im Allgemeinen in Standardzelllinien sehr effizient. *In vivo* wirken Liposomen allerdings toxisch und immunstimulierend. Außerdem werden sie zügig aus der Blutzirkulation entfernt. Für Anwendungen *in vivo* sind daher andere makromolekulare Transportsysteme vorgeschlagen worden, unter anderem hochverzweigte Kohlenhydrate, die als Dendrimere bezeichnet werden, und biologisch abbaubare Polymerstrukturen wie Polylactide (Hughes et al., 2001). Um eine spezifische Aufnahme systemisch gegebener Oligonukleotide in bestimmte Zelltypen zu erreichen, können die Nukleinsäuremoleküle auch an Antikörper oder Liganden gekoppelt werden, die von zelltypspezifischen Rezeptoren erkannt werden (Hudson et al., 1999).

Schonendere Applikationswege für die systemische Gabe werden zu Zeit entwickelt. Ein fortgeschrittenes Beispiel ist die erfolgreiche intravenöse Injektion einer chemisch stabilisierten siRNA, die an Cholesterin gekoppelt ist. Dieses Konstrukt hat stark verbesserte pharmakokinetische Eigenschaften und reduzierte die Konzentration von endogenem Apolipoprotein-B im Plasma von Mäusen (Soutschek et al., 2004).

Exogen zugegebene Agenzien haben eine begrenzte Lebensdauer. Durch nukleolytischen Abbau und Verdünnung aufgrund von Zellteilung verlieren sie zügig ihre Wirksamkeit. Deswegen werden Ribozyme und siRNAs wie oben beschrieben häufig endogen von Vektoren aus exprimiert. Um Wachstumsvor- oder -nachteile von Zellen auszugleichen, die konstitutiv ein Ribozym oder eine siRNA exprimieren, finden auch Tetracyclin-induzierbare oder *cre-lox*-regulierte Transgene Anwendung (Bowden und Riegel, 2004; Mittal, 2004).

In dieser Arbeit werden zur *in vivo* Transfektion als Transfektionsagentien Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) und das so genannte *in vivo* jetPEI™ (Biomol) verwendet.

Sie zählen zu den Klassen (kationische Liposomen und kationische Polymere) der bislang erfolgreichsten nichtviralen Gentransfersysteme. Sie weisen unter physiologischen

Bedingungen eine positive Ladung auf und binden so über elektrostatische Anziehungskräfte an die negativ geladenen Oligonukleotide.

Lipofectamine™ 2000 ist ein kationisches Lipid, welches mit der siRNA Komplexe bildet, die endozytotisch in die Zelle aufgenommen werden. Dabei sind die positiven Kopfgruppen vorteilhaft, da sich der Komplex leicht an die negativ geladene Zellmembran anlagern kann. Lipofectamine™ 2000, dessen Vorgänger Lipofectin von Caplen et al. erfolgreich zur Transfektion von siRNA eingesetzt wurde (Caplen et al., 2001), wird zudem *in vitro* in unserer Arbeitsgruppe erfolgreich eingesetzt (Hanze et al., 2003).

In vivo jetPEI™ ist ein lineares Polyethylenimin (PEI). Polyethylenimine sind lineare oder verzweigte Polymere, welche in verschiedenen molekularen Gewichten von <1 kDa bis 1000 kDa erhältlich sind. Sie besitzen an jeder dritten Position eine protonenhaltige Aminogruppe und haben eine hohe kationische Ladungsdichte, welche es ermöglicht, eine nicht konvalente elektrostatische Bindung mit einem Oligonukleotid einzugehen (Boussif et al., 1995; Brus, 2004). Diese kleinen kolloidalen Partikel werden aufgrund ihrer positiven Ladung gut durch Endozytose in die Zelle aufgenommen.

Im Zytoplasma mit physiologischen pH-Werten von 7,3 wirkt PEI wie ein Protonenschwamm (Abb. 3) und zieht Wasserstoffionen in das Endosom. Dadurch wird der pH-Wert im Endosom erniedrigt und es kommt zu einem passiven Einstrom von Chloriden und Wasser, sodass das Endosom anschwillt, platzt und der Komplex im Zytoplasma freigesetzt wird.

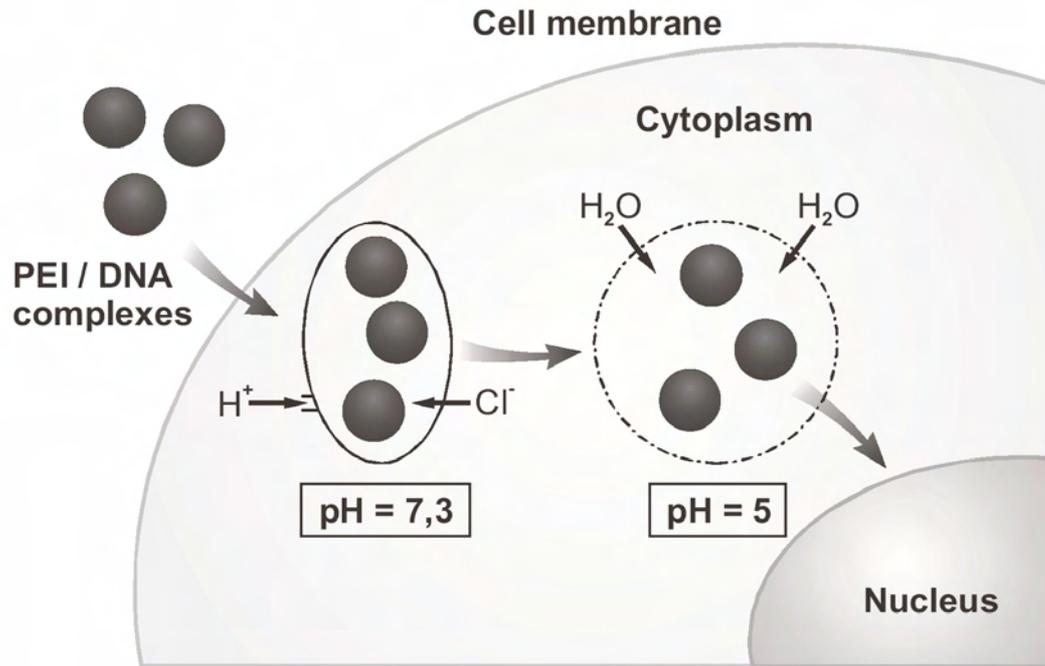


Abbildung 3: Protonenschwammtheorie (Brus, 2004)

Die DNA/PEI- bzw. siRNA/PEI-Komplexe werden endozytotisch von der Zelle aufgenommen. Im Zytoplasma mit physiologischen pH-Werten von 7,3 wirkt PEI wie ein Protonenschwamm und zieht Wasserstoffionen in das Endosom, dadurch wird der pH-Wert im Endosom erniedrigt und es kommt zu einem passiven Einstrom von Chloriden und Wasser, sodass das Endosom anschwillt, platzt und der Komplex im Zytoplasma freigesetzt wird.

Auf Basis dieses Mechanismus wird PEI als Transfektionsagens in verschiedenen Zelllinien und *in vivo* eingesetzt (Kichler, 2004; Wagner et al., 2004).

Generell ist PEI mit niedrigem molekularem Gewicht <25 kDa und von verzweigter Struktur besser als PEI mit hohem molekularem Gewicht und linearer Struktur zum Gentransfer geeignet. Ein hohes molekulares Gewicht führt zu einer erhöhten Zelltoxizität (Fischer et al., 2003).

Neben dem Grad der Verzweigung und dem molekularem Gewicht spielt das Stickstoff/Phosphat-Verhältnis (N/P-Verhältnis) eine wichtige Rolle für Transfektionseffizienz und Zelltoxizität.

Das N/P-Verhältnis beschreibt das Verhältnis der Stickstoffatome des PEIs zu den Phosphaten der Oligonukleotide im Komplex und bestimmt die Menge von PEI, welche für die Komplexierung unabhängig vom Molekulargewicht benötigt wird.

Eine positive Aufladung des Komplexes, welche aus einem hohen N/P-Verhältnis resultiert, hemmt ihre Aggregation infolge elektrostatischer Abstoßung und erhöht sowohl ihre Löslichkeit in wässrigen Lösungen als auch ihre Interaktion mit der negativ geladenen Zellmembran und letztlich die zelluläre Aufnahme (Oh et al., 2002). Wir verwenden in allen Versuchen mit PEI ein N/P-Verhältnis von 10 resultierend aus den Daten von Urban-Klein (Urban-Klein et al., 2005).

Die Arbeitsgruppe von Urban-Klein (Urban-Klein et al., 2005) hat festgestellt, dass siRNA und PEI stabile, gleichgroße Komplexe bilden, welche die siRNA vollständig umfassen und dass diese Komplexe groß genug sind, um von den Zellen endozytotisch aufgenommen zu werden. Außerdem ist die siRNA im PEI-Komplex gegen nukleolytischen Abbau und Serumnukleasen geschützt.

2.1.6.4. Biologische Methoden

Ein effizienter Gentransfer wird erreicht, wenn virale Vektoren verwendet werden. Dabei werden die siRNAs über in das Virus eingebaute Vektoren produziert. Viren dringen sehr effektiv durch Infektion der Zellen ein. *Oncoviren* und *Lentiviren* sind Subklassen der Familie der *Retroviren*, die als Gentransporter verwendet werden können (Brummelkamp et al., 2002). Sie integrieren ihr Genom an mehr oder weniger zufälligen Stellen des Zell-Genoms. So bleibt die Expression des Transgens auch in Tochterzellen erhalten.

Lentivirale Transduktion von menschlichen T-Zellen mit einer siRNA gegen den Corezeptor CCR5 führte zum Beispiel zu einer Inhibition von HIV-1 in Zellkultur (Qin et al., 2003). In der klassischen Genthherapie sind retrovirale Systeme in zahlreichen klinischen Studien für die Einbringung von Transgenen verwendet worden. Da sich das fremde Gen zufällig in das

zelluläre Genom integriert, besteht die Gefahr einer Insertions-Mutagenese. So haben drei Kinder, die an einer klinischen Studie zur Therapie der angeborenen Immunschwächekrankheit SCID mit retroviralem Gentransfer teilnahmen, leukämieartige Symptome entwickelt. Eines der Kinder ist inzwischen verstorben (Check, 2005).

Adenovirale Vektoren transduzieren Zellen mit sehr hoher Effizienz. Sie integrieren ihr genetisches Material nicht in das zelluläre Genom. Das Transgen bleibt vielmehr in episomaler Form im Zellkern erhalten. Die Methode ist daher hauptsächlich für nicht-teilende Zellen anwendbar. Ein erheblicher Nachteil von adenoviralen Vektoren ist ihre hohe Immunogenität. Ein Patient in einer klinischen Studie starb, nachdem er eine massive inflammatorische Antwort auf die Gabe eines adenoviralen Vektors entwickelt hatte.

Rekombinante *Adeno-assoziierte Viren (AAV)* stellen eine interessante Alternative zu den beschriebenen viralen Vektoren dar. Sie sind nicht pathogen oder immunogen und transduzieren viele verschiedene Zelltypen mit hoher Effizienz. Rekombinante AAV inserieren ihr Genom an einer definierten Stelle im menschlichen Chromosom 19. Unkontrollierte zufällige Insertionen an anderen Stellen sind sehr unwahrscheinlich. AAV-Vektoren mit Transgenen für shRNAs sind insbesondere erfolgreich eingesetzt worden, um die Replikation von HIV-1 und Dengue Virus in Zellkultur zu inhibieren (Han et al., 2004; Zhang et al., 2004). Eine zusammenfassende Übersicht über virale Vektorsysteme findet sich bei Thomas und Mitarbeitern (Thomas et al., 2003).

2.2. Bronchialkarzinom

2.2.1. Ursachen für die Entstehung, Charakteristika des Bronchialkarzinoms

Das Bronchialkarzinom ist einer der häufigsten bösartigen Tumoren des Menschen mit einer ungünstigen Prognose und einer mittleren Lebenserwartung nach Diagnosestellung von 1 bis 2 Jahren. Etablierte Therapieverfahren bewirken bislang keine wesentliche Verbesserung.

Das Bronchialkarzinom wird durch eine im Detail nicht verstandene veränderte Genexpression ausgelöst und entwickelt im Verlauf der Therapie Resistenzmechanismen für Strahlen- und Chemotherapie.

Wesentliche Charakteristika des Bronchialkarzinoms sind:

- Fast ausschließliche Induktion durch Umweltfaktoren (z. B. Asbest, Inhalationsrauchen). Dabei führt Nikotinabusus zu einem persistierenden genetischen DNA-Schaden.
- Ausgeprägte Neigung zur Metastasierung in den gesamten Organismus (das kleinzellige Bronchialkarzinom wird als primär systemische Erkrankung angesehen.).
- Schnelle Resistenzentwicklung des Tumorgewebes gegenüber Chemotherapeutika und Bestrahlung.
- Maskierung der Tumorzellen und Vermeidung des Zugriffes durch das spezifische Immunsystem aufgrund fehlender körperfremder Erkennungsmerkmale.

Die Erkrankungsinzidenz des Bronchialkarzinoms liegt in Deutschland bei etwa 50/100.000 Einwohnern pro Jahr. Der Anteil an nicht-kleinzelligen Karzinomen („non small cell lung cancer“, NSCLC) ist dabei ca. 75% abhängig vom untersuchten Patientenkollektiv, von der Art der Datenerhebung - Autopsie, Resektate oder Biopsien - und vom Untersucher.

Sie stellen histologisch eine heterogene Gruppe dar, deren Hauptvertreter Plattenepithelkarzinome, Adenokarzinome und großzellige Karzinome sind. Davon abgegrenzt werden die restlichen 20-25% der Fälle, bei denen ein SCLC histologisch diagnostiziert wird. Ein Fünftel der SCLCs werden als Mischtumoren bezeichnet, da sie

zusätzlich Merkmale nicht-kleinzelliger Bronchialkarzinomtypen aufweisen (Zochbauer et al., 1994).

Das Verhältnis von Männern zu Frauen beträgt etwa 3-6 zu 1, wobei sich dieses Verhältnis durch den schnelleren Erkrankungsanstieg bei Frauen in den letzten Jahren für die Zukunft noch zu deren Ungunsten verschieben dürfte. Den wichtigsten ätiologischen Faktor für die Entstehung eines Bronchialkarzinoms stellt das inhalative Zigarettenrauchen dar (Bartecchi et al., 1994). Das relative Erkrankungsrisiko im Vergleich zum Nichtraucher erhöht sich wenigstens um 15-35% (Jahn et al., 1990; Jedrychowski et al., 1992; Osann, 1991; Wichmann et al., 1990). Aber auch andere Faktoren wie Vererbung, Immunschwäche, Dosen und Eindringtiefe der Kanzerogene und damit die verbundenen Zellschäden sowie DNA-Schäden spielen eine Rolle (Abdel-Rahman et al., 1998; Amos et al., 1999; Lam et al., 1999). Die Kanzerogen-bedingten Schäden sind kumulativ (Lam et al., 1999; Rojas et al., 2004). Auch das Passivrauchen oder das Inhalieren anderer kanzerogener Dämpfe stellen ein höheres Krebsrisiko für Nichtraucher als bisher angenommen dar (Schwartz et al., 1999).

Das Krebserkrankungsrisiko steigt zusätzlich durch andere Erkrankungen wie Übergewicht, Infektionen und anderen entzündlichen Prozessen (Jung et al., 2000; Steenland und Stayner, 1997). Zahlreiche Studien belegen den Zusammenhang von Lungenkrebs und Cholesterinerhöhung oder viralen bzw. bakteriellen Infektionen wie z. B. *Chlamydia pneumoniae* (Littman et al., 2004; Nyberg et al., 1998).

Die pathologische Sicht der Entstehung ist durch eine Serie von morphologischen und strukturellen Veränderungen durch Kanzerogene gekennzeichnet. Diese Kanzerogene führen dabei zu DNA-Schäden und zu Mutationen im Lungenepithel (Roland und Rudd, 1998). Die mutierten Epithelzellen haben Vorteile in der Proliferation und so kommt es zu einer Expansion dieser Zellen im Epithel. Damit sind erste präneoplastische Läsionen entstanden. Kommt es nun zu weiteren Mutationen werden aus den Läsionen bösartige, invasiv wachsende Tumoren (Hirsch et al., 2001).

Mutationen, die zur Tumorentstehung führen, bedingen meistens Gene, die für das Zellwachstum und die -Differenzierung verantwortlich sind. Die Aktivierung von Proto-Onkogenen und Regression von Tumor-Suppressorgen sind die ersten Schritte zur Entstehung des Tumors (Liotta et al., 1991). Proto-Onkogene sind für die Regulation des Zellwachstums, des Zellzyklus, der Apoptose und der Zelldifferenzierung wichtig. Mutationen dieser Proto-Onkogene führen öfters zu Lungentumoren (Bouck, 1990). Man hat festgestellt, dass die Überexpression von Onkogenen wie etwa *K-ras* und *c-Myc* für die Entstehung des Lungentumors bedeutend sind (Lorenz et al., 1994; Prins et al., 1993; Rodenhuis und Slebos, 1990).

Nicht nur die Überexpression von Onkogenen ist bedeutend für die Tumorentwicklung auch der Funktionsverlust von Genen. In den meisten Fällen der Lungentumoren ist die Expression des Tumor-Suppressor-Gens *p53* herabgesetzt oder es ist inaktiv (Halevy et al., 1990; Hollstein et al., 1991).

Die Veränderungen in diesen Genen führen zu strukturellen Veränderungen im Bronchialepithel, sodass die normale Sauerstoffversorgung der Zellen und der Luftweg gestört sind. In den meisten Fällen wächst der Tumor vom Epithel zum Bronchiallumen und führt damit zur Obstruktion der Bronchien. Diese Obstruktion kann dann zum Kollaps des Luftweges führen, wobei oft distal der Obstruktion und des Tumors eine Lungeninfektion entsteht.

Vor den klinisch offenkundigen Lungenkarzinomen tritt eine Reihe morphologisch distinkter präneoplastischer Veränderungen des Bronchialepithels auf, welche die Schritte von der Hyperplasie, der Metaplasie, der Dysplasie und dem Karzinom in situ umfassen (Abb. 4).

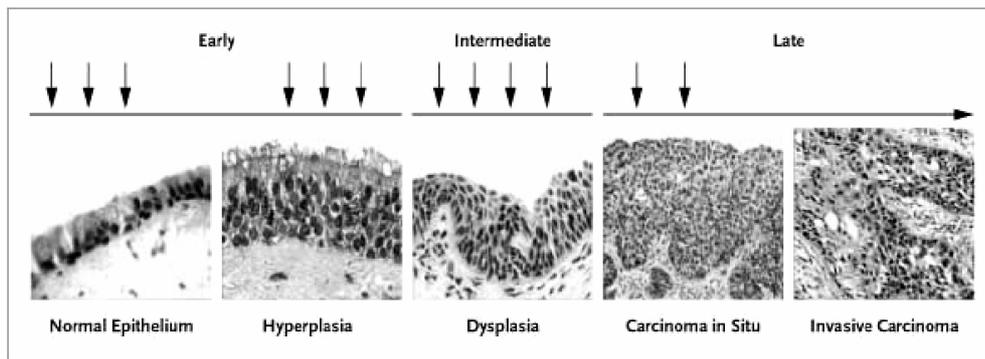


Abbildung 4: Entwicklung des Bronchialkarzinoms (Hirsch et al., 2001)

Das Bronchialkarzinom entwickelt sich vom normalen Lungenepithel ausgehend über eine Hyperplasie, Dysplasie bis zu einem Karzinom in situ, welches sich im späten Stadium zu einem invasiv wachsenden Karzinom entwickelt.

2.2.2. Klassifikation des Bronchialkarzinoms

Die Klassifikation der Lungentumoren richtet sich nach ihrem histologischen Aussehen und dem Gewebeansprung der im Epithel, lymphatischen Gewebe, Mesothel oder Mischgewebe liegen kann (Brambilla et al., 2001; Franklin, 2000).

Tumoren des Mischgewebes werden nach dem im Tumor dominantesten Zelltyp benannt.

Bronchialkarzinome werden in *small* und *non-small cell lung cancer* eingeteilt (Beadsmoore und Sreaton, 2003). *Small cell lung cancer (SCLC)* kommen zu ca. 20% vor. Diese wachsen sehr schnell von größeren Bronchien aus.

Non-small cell lung cancer (NSCLC) kommen zu ca. 75-80% vor und werden in drei Unterklassen eingeteilt:

Plattenepithelkarzinome stellen den häufigsten Lungentumor dar (ca. 35–40%).

Vom Karzinom in situ bis zum invasiven Karzinom vergehen Jahre. Dieser Typ des Bronchialkarzinoms entwickelt sich meist als exophytisch wachsender Tumor in großen Bronchien mit Obstruktion des Bronchiallumens. Atelektasen oder poststenotische Pneumonien sind häufige Komplikationen. Der Tumor tendiert durch die Bronchuswand hindurchzuwachsen und breitet sich vorwiegend zentripetal aus. Aufgrund der Invasion von Blutgefäßen und Lymphkanälen finden sich typischerweise Metastasen in den regionalen Lymphknoten. Die Ausdifferenzierung der Plattenepithelkarzinome ist sehr unterschiedlich.

Adenokarzinome: Das Adenokarzinom der Lunge bildet sich eher als peripherer parenchymaler Tumor aus. Es bleibt bis es sehr groß ist über lange Zeit asymptomatisch. Adenokarzinome werden oft durch Routinethoraxaufnahmen entdeckt. Das Adenokarzinom wird nach den verschiedenen Wachstumsmustern in tubuläre, azinäre, papilläre, bronchioloalveoläre und solide Karzinome eingeteilt. Sie zeigen meist ein herdförmiges Wachstumsmuster. Der bronchioloalveoläre Typ wächst in der Regel diffus mit einer tapetenartigen Überkleidung der Alveolarsepten. Nur beim Adenokarzinom dominieren in der

Geschlechtsverteilung die Frauen (Verhältnis: Männer zu Frauen 1:6), bei den anderen Bronchialkarzinomen überwiegen die Männer (Verhältnis: Männer zu Frauen ca. 4–6:1).

Großzellige Lungenkarzinome: Großzellige anaplastische Karzinome sind im Gegensatz zu den Plattenepithel- bzw. Adenokarzinomen ohne morphologische Charakteristik. Sie bilden große maligne Zellen mit fehlendem Zytoplasma. Großzellige anaplastische Karzinome entwickeln sich häufig in der Lungenperipherie. Es wird vermutet, dass es sich um aplastische Adenokarzinome bzw. aplastische Plattenepithelkarzinome handeln könnte.

Die anderen Typen von Lungentumoren (ca. 5%) gehen von unterschiedlichen Zelltypen aus (Beasley et al., 2005).

Die Klassifikation der Lungentumoren ist sehr wichtig für die Therapie und die Prognose der Patienten.

Des Weiteren ist für die Therapieplanung die genaue Kenntnis der Tumorausbreitung von Bedeutung. Die Prognose eines Patientens mit einem Bronchialkarzinom ist streng mit der Größe des Tumors und der erfolgten Metastasierung assoziiert. Aus diesem Grund werden Bronchialkarzinomen nach der TNM- respektive UICC-Klassifikation (Union International Centre Cancer) eingeteilt.

Die Stadieneinteilung (Tabelle 1) richtet sich nach klinischen Untersuchungsbefunden und bezieht sich auf die Tumorgröße und des infiltrativen Wachstums, der Mitbeteiligung der Lymphknoten und der Fernmetastasierung (Beahrs, 1991; Gospodarowicz et al., 2004; Sobin, 2003). Diese TNM-Klassifikation teilt in die Stadien 0-IV ein und führt dazu, dass Befunde weltweit vergleichbar sind (Beadsmoore und Screatton, 2003; Mountain, 1997).

| Staging of Lung Cancer.* | | | | | | |
|-----------------------------------|-------|-------|------------|--|---------------|------|
| Stage | Tumor | Node | Metastasis | General Description | Survival Rate | |
| | | | | | 1 Yr | 5 Yr |
| Non-small-cell lung cancer | | | | | | |
| Local | | | | | | |
| IA | T1 | N0 | M0 | T1 tumor: ≤ 3 cm, surrounded by lung or pleura; no tumor more proximal than lobe bronchus | 94 | 67 |
| IB | T2 | N0 | M0 | T2 tumor: > 3 cm, involving main bronchus ≥ 2 cm distal to carina, invading pleura; atelectasis or pneumonitis extending to hilum but not entire lung | 87 | 57 |
| IIA | T1 | N1 | M0 | N1: involvement of ipsilateral peribronchial or hilar nodes and intrapulmonary nodes by direct extension | 89 | 55 |
| Locally advanced | | | | | | |
| IIB | T2 | N1 | M0 | T3 tumor: invasion of chest wall, diaphragm, mediastinal pleura, pericardium, main bronchus < 2 cm distal to carina; atelectasis or pneumonitis of entire lung | 73 | 39 |
| | T3 | N0 | M0 | | | |
| IIIA | T1 | N2 | M0 | N2: involvement of ipsilateral mediastinal or subcarinal nodes | 64 | 23 |
| | T2 | N2 | M0 | | | |
| | T3 | N1 | M0 | | | |
| | T3 | N2 | M0 | | | |
| IIIB | Any T | N3 | M0 | N3: involvement of contralateral (lung) nodes or any supraclavicular node | 32 | 3 |
| Advanced | | | | | | |
| IIIB | T4 | Any N | M0 | T4 tumor: invasion of mediastinum, heart, great vessels, trachea, esophagus, vertebral body, carina; separate tumor nodules; malignant pleural effusion | 37 | 7 |
| IV | Any T | Any N | M1 | Distant metastasis | 20 | 1 |
| Small-cell lung cancer | | | | | | |
| Limited disease | | | | Evidence of tumor confined to ipsilateral hemithorax; can be encompassed by a single radiation port | | |
| Extensive disease | | | | All other diseases, including metastatic disease | | |

* Data are adapted from Mountain and Dresler.⁷ The staging system was developed by the American Joint Commission on Cancer. T denotes tumor, N node, and M metastasis.

Tabelle 1: TNM-Klassifikation

entwickelt von dem „American Joint Committee on Lung Cancer“ (Mountain, 1997)

2.2.3. Therapiemöglichkeiten des Bronchialkarzinoms

Die Therapie des Bronchialkarzinoms richtet sich nach der gewebetypischen Klassifikation (kleinzellige oder nicht-kleinzellige Karzinome) und der Ausbreitung des Tumors, die durch das Tumorstadium angegeben wird. Generell gibt es auch beim Bronchialkarzinom die drei klassischen Tumorthérapien: Strahlen- und Chemotherapie sowie die Chirurgie. Häufig werden verschiedene Verfahren miteinander kombiniert. Im Folgenden wird nur auf die Therapie des nicht-kleinzelligen Karzinoms eingegangen.

2.2.3.1. Stadium I und II

Die Chirurgie ist eine der Hauptbehandlungsmethoden für 25-30% der Patienten mit NSCLC (Stadien I, II, und eine kleine Gruppe von Patienten mit dem Stadium IIIA), welche einen operablen Tumor haben (Shah und Goldstraw, 1995; Wada et al., 1996). Basis für eine kurative Behandlung ist die Resektion des Primärtumors mit umfassender mediastinaler Lymphadenektomie (Pearson, 1999; Tanaka et al., 2000).

Für das Stadium I werden so 5-Jahres-Überlebensraten von 60-70% und für das Stadium II von 40-60% erreicht. Im Fall der funktionellen Inoperabilität oder Ablehnung der Operation durch den Patienten ist die hochdosierte Strahlentherapie (60-70 Gy) etablierter Behandlungsstandard.

Bei einem Rezidiv nach potentiell kurativer Resektion finden sich dann meist auch Fernmetastasen. Drei große randomisierte Studien zeigen nach kompletter Tumorresektion im Stadium IB-IIB eine signifikante Verlängerung der Überlebensrate durch eine adjuvante, platinbasierte Kombinationschemotherapie (Arriagada et al., 2004; Douillard et al., 2006; Strauss, 2005).

2.2.3.2. Stadium III

Mit 25-30% der Patienten im Stadium III umfasst diese Gruppe unterschiedliche Tumorausprägungen. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei 9% nach einem Tumoreinbruch in das mediastinale Fettgewebe, ebenso wie bei mediastinoskopisch nachgewiesenem N2-Status trotz kompletter Tumorresektion. Deshalb spricht man hier, selbst bei technischer Durchführbarkeit, von „prognostisch inoperablen“ Tumoren. Dem gegenüber werden bei negativer, präoperativer Mediastinoskopie und einem erst postoperativ histologisch nachgewiesenem N2-Status 5-Jahres-Überlebensraten von 20-30% erreicht. Für die Gesamtheit der Patienten in den Stadien IIIA und IIIB werden mit konventionellen Therapieelementen (Operation und Strahlentherapie) 5-Jahres-Überlebensraten von durchschnittlich 13% bzw. 5% erreicht. Der limitierende Faktor für diese Patienten ist das Auftreten von Fernmetastasen in 70-80% der Fälle. Drei randomisierte Studien mit annähernd 1.000 Patienten zeigen für inoperable Patienten mit gutem Allgemeinzustand im Stadium III, dass die Sequenz aus Chemo- und Bestrahlungstherapie signifikant günstigere Überlebensraten als die alleinige Bestrahlungstherapie erbringt (Auperin et al., 2006; Kelsey et al., 2006; Pfister et al., 2004).

Seit einiger Zeit wurde deutlich, dass im Vergleich zum sequentiellen Therapieansatz mit einer Chemotherapie (im Abstand von drei bis vier Wochen normal dosiert) simultan zur Bestrahlungstherapie eine weitere Verbesserung der 5-Jahres-Überlebensrate von 8-10% auf 14-16% erreicht werden kann. Allerdings ist mit einem deutlich höheren Maß an Hämatotoxizität wie auch nicht-hämatologischen Toxizitäten zu rechnen (Cox et al., 2003). Eine allgemeine Empfehlung zur Durchführung dieser Behandlung wird derzeit noch nicht gegeben (Cox et al., 2003).

Durch die präoperative, neoadjuvante Chemotherapie scheinen technisch operable Patienten im Stadium IIIA zu profitieren.

2.2.3.3. Stadium IV

Im Vergleich zur bestmöglichen palliativen Behandlung führen cisplatinhaltige, zytostatische Kombinationen in diesem Tumorstadium (40-50 % der Fälle) zu einer in Metaanalysen dargestellten signifikanten Verlängerung der medianen Überlebenszeit von sechs auf acht Monate. So profitieren 20-30% der Patienten mit medianen Überlebenszeiten von 12-14 Monaten. Außerdem geben 60% der Behandelten eine Besserung von Beschwerden wie Schmerzen, Reizhusten oder Hämoptysen an. Für einen zytostatischen Behandlungsversuch mit einer cisplatinhaltigen Kombination sind folgende Punkte entscheidend, tumorassoziierte Beschwerden oder ein Erkrankungsprozess in einem eng definierten Zeitraum (3 Monate) und ein guter Allgemeinzustand (ECOG 0-1) (Blackhall et al., 2005). Patienten, die älter sind als 70 Jahre und solche mit ungünstigem Allgemeinzustand (ECOG 2) profitieren von einer nicht-platinhaltigen Monochemotherapie (Cheong et al., 2006).

Bei bronchialokkludierendem Tumorwachstum haben sowohl die kleinvolumige, palliativ intendierte externe Strahlentherapie, die intraluminale Brachytherapie wie auch Laser- und Stentbehandlung ihre Bedeutung. Eine symptomatische bzw. palliative Strahlentherapie kann bei schmerzhaften und/oder frakturgefährdeten Skelettmetastasen, Hirn- und Hautmetastasen, oberer venöser Einfluss-Stauung, einer Plexusinfiltration oder extramuraler Kompression des Ösophagus indiziert sein.

2.2.3.4. Neue Therapieformen

Der mäßige Erfolg der klassischen Chemotherapeutika führte die Forschung dazu, neue zielgerichtete Therapeutika zu entwickeln, welche auf die molekulare Entstehung von Lungentumoren gerichtet sind.

Erlotinib inhibiert als neue Substanz die Tyrosinkinase des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors *EGFR* (*epidermal growth factor receptor*). Der EGFR findet sich unter anderem in sehr großer Ausbreitung und Anzahl auf Zellen des nicht-kleinzelligen

Bronchialkarzinoms. Wird er aktiviert, hält er die Zellen am Leben, indem er die Zellproliferation und die Angiogenese des Tumors fördert. Erlotinib besetzt hoch selektiv und reversibel die ATP-Bindungsstelle der intrazellulären Tyrosinkinase-Domäne des EGF-Rezeptors, hemmt dadurch die Phosphorylierung und antagonisiert so die Signaltransduktion. Die Blockade des Rezeptors trifft den Tumor folglich gleich auf mehreren Ebenen. Proliferation und Angiogenese werden gehemmt, die Apoptose gefördert und die Empfindlichkeit der Tumorzellen gegenüber Strahlen- und Chemotherapie erhöht (Shepherd et al., 2005). Seit September 2005 ist Erlotinib in Deutschland zur Behandlung von Patienten mit lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem NSCLC zugelassen (z. B. Tarceva®).

Ein weiterer neuer Wirkstoff ist Bevacizumab, welcher ein monoklonaler Antikörper gegen den Wachstumsfaktor *VEGF* (*vascular endothelial growth factor*) ist. Bevacizumab gehört damit zu einer Gruppe neuer Medikamente, die als Angiogenese-Inhibitoren zusammengefasst werden. Der Wirkstoff bindet an den Wachstumsfaktor und verhindert dessen Andocken an VEGF-Rezeptoren auf der Oberfläche von Endothelzellen benachbarter Blutgefäße. Dadurch wird die Gefäßneubildung blockiert und bereits entwickelte Gefäße bilden sich zurück, somit stoppt das Tumorwachstum.

Seit Januar 2005 ist Bevacizumab in Deutschland für Patienten mit fortgeschrittenem Dickdarm- oder Enddarmkrebs zugelassen (z. B. Avastin®). Es wird kombiniert mit 5-Fluorouracil/Folinsäure mit oder ohne Irinotecan. Durch die Therapieerfolge wird der Antikörper bei vielen anderen Indikationen getestet, unter anderem bei NSCLC.

In einer amerikanischen Studie konnte Bevacizumab als Zusatz zu einer Platin-basierten Chemotherapie beim fortgeschrittenen nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom das Ein-Jahres-Überleben von 44 auf 52 Prozent steigern (Tyagi, 2005).

2.3. Tumorhypoxie und Hypoxie-induzierbaren Faktoren

Die Tumoroxygenierung von soliden Tumoren ist im Vergleich zum normalen Gewebe zumeist schlechter. Der mittlere Sauerstoffpartialdruck ist deutlich niedriger und der Anteil an hypoxischen und anoxischen Arealen ist in Tumoren deutlich höher als im Normalgewebe, in dem sich unter Ruhebedingungen kaum Hypoxie nachweisen lässt.

In humanen Tumoren sind in 50-60% der Fälle hypoxische Regionen zu finden (Vaupel, 2004; Vaupel und Mayer, 2005). So müssen wachsende Tumoren ab einem Durchmesser von 1 mm ein eigenes Blutgefäßsystem zur Blutversorgung bilden. Dabei verschaffen sie sich den Zugang zum Blutfluß. Dies erfolgt entweder durch Einbau eines vorherrschenden bestehenden Hauptblutgefäßes oder durch Bildung neuer Mikrogefäße durch den Einfluss von verschiedenen Angiogenese-Faktoren (Folkman, 1990; Vaupel et al., 1989). Dabei unterscheiden sich diese neu gebildeten Gefäße deutlich von neu gebildeten Gefäßen im normalen Gewebe. Es gibt eine Reihe von strukturellen und funktionellen Veränderungen: Dilatationen, fehlende Endothelzellen oder inkomplette Basalmembranen, erhöhte Permeabilität, irreguläre und gewundene Architektur, arteriovenöse Shunts, blind endende Gefäße und das Fehlen von kontraktilen Wandfasern sowie pharmakologischen/physiologischen Rezeptoren (Vaupel et al., 1989). Diese Abnormalitäten führen zu einem irregulären und „chaotischen“ Blutfluß mit verminderter Sauerstoffversorgung (Nährstoffversorgung) der Tumorzellen und somit entstehen hypoxische bzw. anoxische Areale. Die Sauerstoffversorgung des Tumors verschlechtert sich mit zunehmender Diffusionsentfernung, die bei einer Distanz der Tumorzelle von $>70 \mu\text{m}$ zum nächsten Blutgefäß auftritt (Brown, 2000; Vaupel et al., 2002; Vaupel et al., 1989). Zusätzlich kann die Tumoroxygenierung durch eine Tumor-bedingte- oder Therapie-induzierte Anämie verschlechtert werden. Die Tumorhypoxie wird vor allem als ein therapeutisches Problem für die Bestrahlungs- und Chemotherapie angesehen. Jetzt weiß man, dass die Hypoxie im Tumor ein wichtiger Faktor für die Proliferation und für die Malignität

des Tumors darstellt (Hockel und Vaupel, 2001; Vaupel und Harrison, 2004). Hypoxie erzeugt in den Tumorzellen eine genetische Instabilität, welche durch Selektionsprozesse zu Veränderungen im Zellverhalten, z. B. Zellzyklusstillstand, Differenzierung, Apoptose und Nekrose führt (Durand, 1991; Giaccia, 1996; Haroon et al., 2000; Moulder und Rockwell, 1987; Riva et al., 1998). Unter Hypoxie werden die genetisch veränderten Tumorzellen selektiert, sodass diese sich erfolgreich an den Sauerstoff- und Nährstoffmangel anpassen. Hypoxie stimuliert die Angiogenese, Glykolyse, Hemmung der Apoptose und Hochregulation von Wachstumsfaktoren (z. B. platelet-derived growth factor-B [PDGF-B], transforming growth factor beta [TGF- β], insulin-like growth factor-2 [IGF-2], epidermal growth factor [EGF]) und anderen Proteinen, die die Tumordinvasivität beeinflussen (z. B. urokinase-type plasminogen activator). Systemische Reaktion auf die Tumorphypoxie ist die Erhöhung des Hämoglobingehaltes im Blut durch Aktivierung von Erythropoetin, Transferrin und Transferrinrezeptoren, sodass die Sauerstoffbindungskapazität im Blut steigt (Hockel und Vaupel, 2001; Krishnamachary et al., 2003). Zusätzlich kommt es durch die Hypoxie zu einer Abregulation von Adhäsionsmolekülen. Dadurch wird das Ablösen von Tumorzellen aus dem Zellverband erleichtert (Czekay et al., 2003; Koong et al., 2000).

Viele dieser Hypoxie-induzierten Gene sind HIF-1 α und HIF-2 α reguliert (Abb. 5) (Wang und Semenza, 1993).

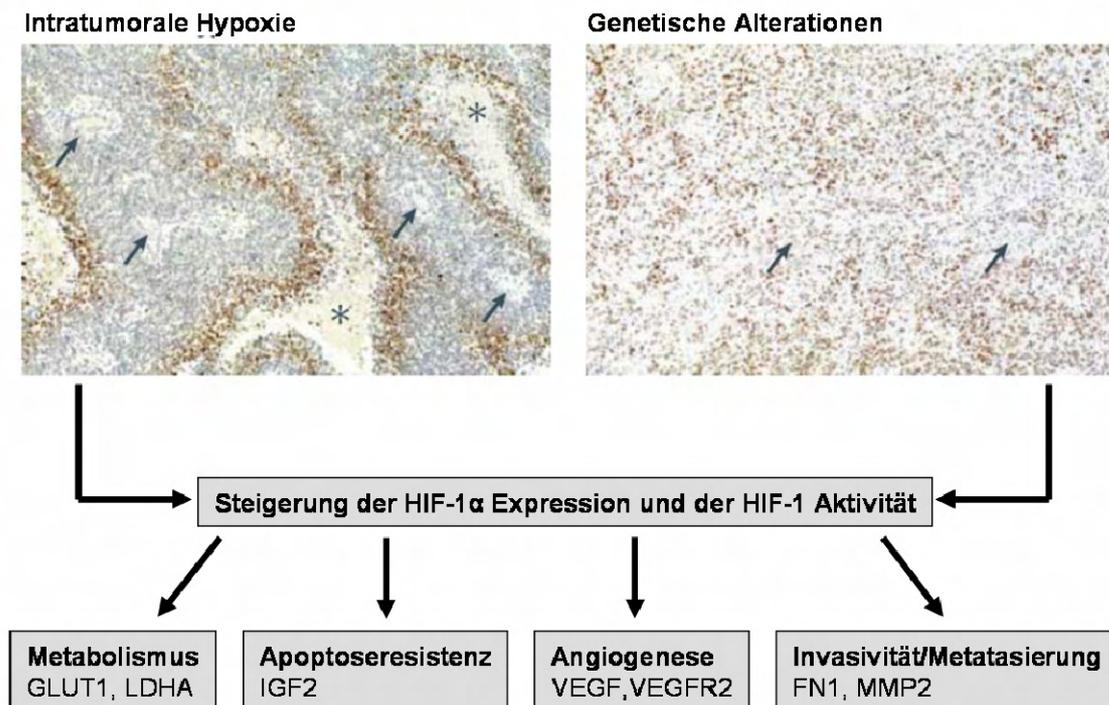


Abbildung 5: Mechanismus und Reaktionen von HIF-1 Aktivität in Tumorzellen

(modifiziert nach Semenza, 2003)

Die Abbildung zeigt die immunhistochemische Analyse der Expression von HIF-1 α Protein (braune Färbung) aus zwei verschiedenen Oropharyngealtumoren. Links erkennt man positive Signale für HIF-1 α insbesondere in der Nähe von nekrotischen Tumorbereichen (Sternchen) und entfernt von Blutgefäßen (Pfeile). In der Biopsie rechts wird HIF-1 α auch in nicht nekrotischen Bereichen in der Nähe von Blutgefäßen exprimiert. Dies deutet darauf hin, dass HIF-1 α nicht nur in sauerstoffabhängiger Weise induziert wird, sondern auch von genetischen Veränderungen der Tumorzellen abhängt. Die Expression von HIF-1 α führt zur Aktivierung HIF-gesteuerter Zielgene, die den Metabolismus (z. B. GLUT-1 [glucose transporter 1], LDHA [lactate dehydrogenase A]) die Apoptoseresistenz (z. B. IGF2 [insulin-like growth-factor 2]), die Angiogenese (z. B. VEGF [vascular endothelial growth factor], VEGFR2 [VEGF receptor 2]) und die Invasivität und Metastasierung (z. B. FN1 [fibronectin 1], MMP2 [matix metalloproteinase 2]) des Tumors beeinflussen.

Diese Transkriptionsfaktoren sind Heterodimere bestehend aus 1 oder 2 alpha-Untereinheiten (HIF-1 α oder HIF-2 α) und der ubiquitär vorhandenen beta-Untereinheit (HIF-1 β) (Abb. 6). Die Aktivierung von beiden Transkriptionsfaktoren ist durch Proteinstabilisierung und Transaktivierung der alpha-Untereinheiten gesteuert (Jiang et al., 1996; Salceda und Caro, 1997).

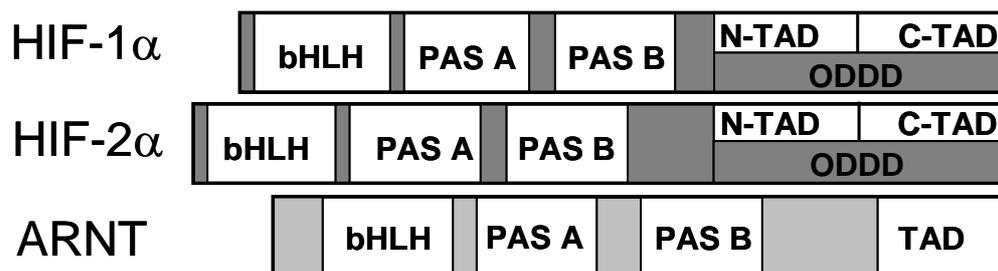


Abbildung 6: HIF-Isoformen modifiziert nach Fedele (Fedele et al., 2002)

Darstellung der HIF-Isoformen: HIF-1 α und HIF-2 α und die ubiquitär vorhandene β -Untereinheit HIF-1 β (ARNT). Abkürzungen: bHLH, basic helix-loop-helix; PAS, Per-Arnt-Sim; C-TAD, carboxy-terminal transactivation domain; N-TAD, amino-terminal transactivation domain; ODDD, oxygen-dependent degradation domain.

Die Regulation von HIF-1 α wurde sehr genau untersucht und entspricht weitgehend der von HIF-2 α . In Normoxie wird HIF-1 α unmittelbar degradiert. Dabei kommt es zur enzymatischen Hydroxylierung zweier Prolinreste innerhalb einer wichtigen funktionellen Domäne von HIF-1 α . Diese Modifikation führt zur Bindung an das von-Hippel-Lindau-Protein (pVHL) und damit letztlich zur Ubiquitinierung und zum proteosomalen Abbau von HIF-1 α (Bruick und McKnight, 2001; Jaakkola et al., 2001). Dagegen ist unter Hypoxie dieser Reaktionsweg gehemmt und HIF-1 α wird vermehrt gebildet. Darüber hinaus wird die carboxyterminale Transaktivierungsdomäne (C-TAD) der HIF- α -Untereinheit sauerstoffabhängig hydroxyliert. Hierbei handelt es sich allerdings um eine Modifikation von

Asparaginresten (Asn803 bei HIF-1 α , Asn851 bei HIF-2 α) durch den „factor inhibiting HIF-1“ (FIH-1). Die Asparagylhydroxlierung ist für die Regulation der transkriptionellen Aktivität von HIF-1 α verantwortlich (Lando et al., 2002). Danach lokalisieren sich HIF-1 α und HIF-2 α an den Zellkern, dort binden sie an HIF-1 β und aktivieren ihre Zielgene durch Bindung an das Hypoxie-responsive Element (HRE). Mehr als 100 HIF-HRE-abhängige Zielgene sind identifiziert, darunter Proteine für den Energiestoffwechsel (Semenza et al., 1994), Zellproliferation, Apoptose (Carmeliet et al., 1998), Hämatopoese (Lacombe und Mayeux, 1999) und Angiogenese (Liu et al., 1995; Rose et al., 2002).

Außerdem ist eine direkte Interaktion von HIF mit bestimmten Zielproteinen (z. B. p53) relevant (Schmid et al., 2004). Beispielsweise induziert HIF die Expression von Genen, die angiogene Wachstumsfaktoren (z. B. VEGF) und glykolytische Enzyme kodieren, die einen Shift zur anaeroben Glykolyse bewirken (Carmeliet et al., 1998). Dieser Mechanismus spielt bei der Tumorprogression eine bedeutsame Rolle, da proliferierende Tumorzellen einen hohen Metabolismus aufweisen, dem eine mangelnde Gefäßversorgung gegenübersteht. Durch erhöhte Expression glykolytischer Enzyme wird ein Shift zur anaeroben Glykolyse bewirkt und durch Sekretion angiogener Faktoren die Gefäßbildung induziert. Diese begünstigt neben der Sicherung des Energiebedarfes die Entstehung von Metastasen, einem Prozess an dem auch HIF-abhängige invasive Faktoren beteiligt sind. Außerdem hat HIF Einfluss auf Zellzyklus und Apoptose und modifiziert somit direkt das Tumorstadium. So wurde an verschiedenen Tumorzellen HIF-abhängig ein hypoxisch induzierter Wachstumsarrest und eine Induktion der Apoptose beobachtet (Hanze et al., 2003; Savai et al., 2005).

Ein Aspekt, der im Detail nicht verstanden ist, ist die differentielle Rolle der HIF-Subtypen bei adaptiven Prozessen in Hypoxie. Die Expression von HIF-1 α ist in Hypoxie ubiquitär, während die von HIF-2 α heterogener erscheint und ursprünglich erhöht in Lunge und Endothelzellen gefunden wurde (Ema et al., 1997; Flamme et al., 1997; Warnecke et al., 2004). Die hypoxische Stabilisierung beider Subtypen in Abhängigkeit von den erwähnten

Hydroxylasen erscheint für beide Faktoren ähnlich. Jedoch ist ein prinzipieller Unterschied ihrer Regulation durch nicht-hypoxische Stimuli auf genregulatorischer Ebene oder Translationsebene wahrscheinlich. Jüngste Arbeiten zeigen, dass neben gemeinsamen auch spezifische HIF-1- und HIF-2-abhängige Zielgene existieren (Coulet et al., 2003; Elvert et al., 2003). Diese Befunde lassen vermuten, dass HIF-1 und HIF-2 eine unterschiedliche Rolle bei der Tumorprogression haben, die in jüngeren Studien nachgewiesen wurde. An einem renalen Karzinom-Zellmodell zeigte sich zum einen, dass HIF-1 α und HIF-2 α sich gegenseitig negativ regulatorisch beeinflussen. Zum anderen konnte nachgewiesen werden, dass prokanzerogene Gene wie Cyclin D1 oder TGF- α -induzierte EGF- und VEGF-Expression spezifisch durch HIF-2 α induziert werden, während das proapoptotische Gen BNip3 positiv durch HIF-1 α und negativ durch HIF-2 α reguliert wird (Raval et al., 2005).

Kürzlich erschienene Untersuchungen heben die bedeutende Rolle von HIF-2 α für die Expression von Cyclin D1, transforming growth factor alpha, vascular endothelial growth factor, Glucose transporter-1, urokinase-type plasminogen activator receptor, plasminogen activator inhibitor-1 (Carroll und Ashcroft, 2006; Raval et al., 2005), vascular endothelial growth factor receptor-2 (Elvert et al., 2003) und endothelial nitric oxide synthase (Coulet et al., 2003) hervor.

Immunhistochemische Analysen mit monoklonalen Antikörpern zur HIF-Proteinexpression in Tumoren konnten zeigen, dass der Transkriptionsfaktor HIF-1 α in nahezu allen Tumoren aktiv und in zahlreichen humanen Tumoren überexprimiert ist (Semenza, 2003). Signifikante Assoziationen zwischen HIF-1-Überexpression und Patienten-Mortalität liegen für Tumoren des Gehirns (Oligodendrogliom), der Brust, der Zervix, des Oropharynx, des Ovars und des Uterus (endometrial) vor.

Im Gegensatz dazu bestehen Assoziationen zwischen HIF-Überexpression und verminderter Mortalität bei Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren und mit NSCLCs (Beasley et al., 2002; Semenza, 2003; Volm und Koomagi, 2000), obwohl andere Studien diese Ergebnisse nicht

reproduzieren konnten (Giatromanolaki et al., 2001; Koukourakis et al., 2002). Beispiel für veränderte Zellreaktionen durch Interaktionen von HIF ist eine Studie über Ovarialtumoren, in der HIF-Überexpression allein mit einer erhöhten Apoptose korrelierte und mit einem verbesserten Patientenüberleben assoziiert war. Allerdings waren in Ovarialtumoren, in denen neben HIF auch p53 überexprimiert war (mutiertes p53 hat eine verlängerte Halbwertszeit), die Apoptoselevel niedrig assoziiert mit einem verminderten Patientenüberleben (Semenza, 2003). In Patienten mit Ösophagustumoren in einem frühen Stadium war die Kombination einer HIF-1-Überexpression und einer BCL2-Überexpression assoziiert mit einer verminderten Ansprechbarkeit einer photodynamischen Therapie (Semenza, 2003). Daher ist der Effekt einer HIF-1-Überexpression abhängig vom Tumortyp und der An- und Abwesenheit pro- und antiapoptotischer Faktoren. So konnte in präklinischen Studien eine Suppression des Tumorwachstums durch HIF-1-Inhibition nachgewiesen werden (Kung et al., 2000), während ihre Aktivierung eine Beschleunigung des Tumorwachstums induzierte (Ravi et al., 2000).

Neue Studien zeigen, dass HIF-2 α durch Regulation der Proliferation und des angiogenetischen Potentials des Tumors eine essentielle Rolle in nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen (NSCLC), insbesondere in Adenokarzinomen der Lunge spielt (Giatromanolaki et al., 2001; Hanze et al., 2003). Für NSCLC konnte eine gemeinsame Überexpression von HIF-1 und HIF-2 gezeigt werden, wobei die HIF-2-Expression im Verhältnis zur schlechten Prognose stand.

Abgesehen von Hypoxie wird HIF-2 auch durch die Rezeptor-vermittelte Signaltransduktion des Wachstumsfaktors EGF aktiviert, dessen Inhibition zu einer Suppression von HIF-2 führen kann (Smith et al., 2005). Darüber hinaus sind für HIF-2 α spezifische Zielgene wie der VEGF-Rezeptor-2 (KDR) bekannt, sowie die spezifische Aktivierung der TGF- α /EGF-Rezeptor Signaltransduktion, die nicht über HIF-1 α induziert werden (Smith et al., 2005).

3. Material und Methoden

3.1. Tiermodelle

3.1.1. Versuchstiere und die Haltungsbedingungen

Als Versuchstiere standen zwei verschiedene Mauslinien zur Verfügung.

Zum einen wurden sechs Wochen alte, männliche Mäuse der Inzuchtlinie C57BL/6N mit einem Gewicht von 20-23 g verwendet.

Zum anderen wurden sechs Wochen alte, männliche CD-1 Nude Mäuse mit einem Gewicht von 24-26 g für das „Xenograftmodell“ verwendet. Ursprung dieser Mauslinie ist die CD-1 Maus. Durch eine Serie von Kreuzungen wurde das Nude-Gen auf diese Mäuse übertragen. Das mutante Allel des nude-Locus wird autosomal und rezessiv vererbt. Homozygote Tiere (CD-1 Nude Mäuse) sind haarlos und besitzen keinen Thymus. Daher fehlen die thymusabhängigen T-Lymphozyten und die dadurch vermittelten Immunreaktionen, sodass humane Tumorzelllinien nicht abgestoßen werden. Alle Tiere wurden über Charles River, Deutschland GmbH, Sulzfeld bezogen (Abb. 7).



Abbildung 7: Verwendete Mauslinien

links CD1 nu/nu, rechts C57BL/6N

Die tierschutzgerechte Haltung erfolgte in transparenten, mit Einstreu (Altromin Tiereinstreu-Granulat, Altromin GmbH + Co. KG, Lage-Lippe) versehenen Polycarbonatkäfigen

(Makrolon, TypII L; Charles River Deutschland GmbH, Sulzfeld) unter spezifisch-pathogen-freien Bedingungen.

Die Tiere wurden bei einer Raumtemperatur von 20-22 °C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50% und einem 12-Stunden-Tag-Nacht-Rhythmus gehalten.

Die Gruppengröße pro Käfig betrug mit Versuchsbeginn nicht mehr als sechs Tiere, während Tiere mit einem Rechtsherzkatheter einzeln gehalten werden mussten.

Den Mäusen stand Futter (Ssniff R/M-H, Alleinfuttermittel für Ratten und Mäuse-Haltung, Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) und Wasser ad libidum zur Verfügung.

Der gesamte Käfig mit Wasser, Futter, Einstreu und die Behausung wurde im Falle der CD-1 Nude Mäuse vorher autoklaviert.

Täglich wurden der allgemeine Gesundheitszustand und die Versorgung der Tiere mit Futter und Wasser überprüft.

Die Versuche wurden mit der Genehmigung der lokalen Tierschutzkommission (Projektnummer GI20/1049/2004) durchgeführt.

3.1.2. Anästhesie

Zur Intubation, Implantation des Rechtsherzkatheters und für die Organentnahme wurden die Tiere in Narkose gelegt.

Hierfür wurden in eine 1 ml Spritze (Injekt-F Luer 1 ml, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) 0,2 ml Ketamin (Ketavet 100 mg/ml, Pharmacia GmbH, Erlangen), 0,2 ml Xylazin (Rompun 2 %, Bayer Vital GmbH, Leverkusen) und 0,4 ml physiologische Kochsalzlösung (Isotonische Natriumchlorid-Lösung Delta Select, Delta Select, Pfullingen) aufgezo-gen, gemischt und mittels einer sterilen Kanüle (26G 1/2“ BD Microlance™ 3, Becton Dickson S. A., Drogheda, Ireland) intraperitoneal 60-90 µl je nach Versuchsvorhaben injiziert.

Damit während der Narkose die Augen der Tiere nicht austrockneten, wurde Augensalbe (Bepanthen Augensalbe, Bayer Vital GmbH, Leverkusen) verabreicht. Um Unterkühlung während der Anästhesie zu verhindern erfolgte die Lagerung der Tiere auf einer Wärmematte (ThermoLux®-Wärmeunterlage, Witte und Sutor GmbH, Murrhardt).

3.1.3. Intubation

Die Tiere wurden zum einen für die Applikation von siRNA, zum anderen für die Applikation von Tumorzellen (1 Mio. Zellen in 100 µl NaCl) intubiert.

Hierfür wurde folgende Apparatur aufgebaut:

In einem Ständer wurde eine 60 ml Spritze (Ecoject Plus, Perfusionsspritze, Dispomed Witt oHG, Gelnhausen) mit einer abgeplatteten Kanüle (20G 1½, BD Microlance™ 3, Becton Dickson S. A., Drogheda, Ireland) befestigt und unter das Operationsmikroskop (Stereolupe Leica MS 5, Leica Microsystems, Bensheim) gestellt, die Operationslampe (Schott KI 200, Fiber Optics, SCHOTT AG, Mainz) wurde vorjustiert.

Neben diesem Arbeitsbereich wurden das Beatmungsgerät (MiniVent Type 845, Hugo Sachs Elektronik Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten) und die Wärmematte aufgebaut.

Das Beatmungsgerät wurde auf ein Atemzugvolumen von 200 µl und auf 150 Atemzüge pro Minute eingestellt, welche den physiologischen Werten der Maus entspricht.

Die Tuben wurden vorbereitet, indem aus einer Braunüle (Vasocan Braunüle 20G, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) nur der normalerweise in der Vene liegende Teil verwendet wurde.

Zusätzlich wurden Klebeband, Anästhetikum, Augensalbe, Pinzetten, Applikationsflüssigkeit in einer 1 ml Spritze mit einer in den Tubus passenden Kanüle (24G 1“, BD Microlance™ 3, Becton Dickson S. A., Drogheda, Ireland) sowie eine mit Raumluft gefüllte 1 ml Spritze zu Recht gelegt.

War das Tier ausreichend sediert, wurde es an den oberen Schneidezähnen mit der dorsalen Seite zu dem Intubierenden aufgehängt, sodass die Hinterbeine gerade den Tisch berührten. Die Maus wurde zusätzlich mit Klebeband an Schwanz und Tisch fixiert. Mit der Operationslampe wurde der Halsbereich fokussiert. Mit einer geraden Pinzette in der rechten Hand wurde die Zunge gegriffen und nach links herausgezogen. Sofort wurde mit einer gebogenen Pinzette in der linken Hand der Unterkiefer mit Zunge übernommen. Der Tubus wurde nun mit der geraden Pinzette der rechten Hand aufgenommen und unter Sichtkontrolle an den Stimmritzen vorbei in die Trachea vorgeschoben. Das Tier wurde nun an das Beatmungsgerät angeschlossen, dadurch konnte der richtige Sitz in der Trachea kontrolliert werden.

Das Tier wurde vom Beatmungsgerät abgehängt, die Spritze mit der zu applizierenden Flüssigkeit (max. 100 μ l) wurde in den Tubus vorsichtig eingeführt und appliziert. Die Spritze wurde von der Kanüle entfernt und die mit 200 μ l Raumluft gefüllte Spritze wurde angeschlossen und zügig Luft appliziert. Anschließend wurde die intubierte Maus wieder an das Beatmungsgerät angeschlossen und für ca. eine Minute wurden die Atemzüge auf 200 Züge pro Minute erhöht.

Nach etwa fünf Minuten wurde die Maus vom Beatmungsgerät abgehängt, nach etwa 10 Sekunden, durch den CO₂-Anstieg im Blut begannen sie wieder mit einer gleichmäßigen Atmung, sodass nach weiteren Minuten auf der Wärmematte und beginnender Wachheit die Tiere extubiert wurden.

3.1.4. Bau und Implantation des Rechtsherzkatheters

Der Katheter bestand aus einem 6 cm langen Schlauch (Tube silicone platinum, Länge 5 m, Dimension 0,5 x 2,1 mm, Fisher Bioblock Scientific, Schwerte) und als Spitze wurden 1,3 cm der Katheterspritze (Katheter F. Certofix-Mono, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) verwendet. Diese Spitze wurde ca. 0,5 cm in den Schlauch geschoben und mit Klebstoff (Kö-Kleber, universeller Gummikleber, Kömmerling chem. Fabrik GmbH & Co, Pirmasens) fixiert.

Nach dem Trocknen wurde der Katheter zur Desinfektion einen Tag in 70% Ethanol (Ethanol 70% vergällt mit Ethylmethylketon, Otto Fischar GmbH & Co KG, Saarbrücken) gelegt.

Vor Beginn der Operation wurde der Arbeitsplatz an der Stereolupe mit allen notwendigen Materialien für diesen Eingriff vorbereitet, unter anderem wurde der Katheter mit physiologischer Kochsalzlösung gespült und das vordere Drittel des Katheters zu einer Schleife gelegt und mit sterilem Faden (Ethicon Mersilene 1, Polyester, Johnson & Johnson, Brüssel, Belgien) fixiert. Außerdem wurden zum späteren Verschließen autoklavierter Draht (Baumarkt, Durchmesser 0,4 mm) mittels eines Seitenschneiders (Baumarkt) in 0,5 cm große Stücke geschnitten.

Die narkotisierte Maus wurde mit einem Skalpell (Einmalskalpelle, Feather pfm, Köln) an der linken Seite des Nackens und an der linken Halsseite rasiert und desinfiziert (Braunoderm, B. Braun Melsungen AG, Melsungen). Sie wurde in Rückenlage unter dem Mikroskop mit Klebeband an den Beinen und Schwanz fixiert.

Es folgte ein ca. 2 cm langer Hautschnitt (Schere, Fine Science Tools GmbH, Heidelberg) der linken ventralen Halsseite, die Vena jugularis wurde stumpf auf derselben Länge frei präpariert. Die Vene wurde kranial mit einem sterilen Faden (Ethicon Ethibond Excel 5-0, Polyester beschichtete Fäden ohne Nadel, Johnson & Johnson, Brüssel, Belgien) ligiert. Kaudal wurde um die Vene aus diesem Faden eine Schlinge zum späteren Einbinden des

Katheters vorgelegt. Die linke Fixierung der Maus wurde gelöst, sodass die Maus auf den Bauch gedreht werden konnte, an der vorbereiteten Hautstelle im Nacken wurde ein 0,6 cm langer Schnitt gesetzt. Mittels einer gebogenen Pinzette (Fine Science Tools GmbH, Heidelberg) wurde die Haut von hier bis zum Ventralschnitt getunnelt und der Katheter am hinteren Ende auf die Pinzette gesteckt und rückwärts Richtung Nackenschnitt gezogen. Auf den Katheter wurde nun eine mit Kochsalzlösung gefüllte 1 ml Spritze mit 20G Kanüle gesteckt und der Katheter wurde luftblasenfrei gespült. Die Maus konnte jetzt wieder in Rückenlage fixiert werden.

Die beiden Fadenenden der vorgelegten Schlinge wurden mit zwei Nadelhaltern (Fine Science Tools GmbH, Heidelberg) fixiert. So konnte der Katheter einhändig eingebunden werden (siehe Abbildung 8).



Abbildung 8: Zustand kurz vor dem Eröffnen der Vena jugularis

Die Vena jugularis ist freipräpariert, kranial ligiert, kaudal ist die Ligatur zum Einbinden des Katheters vorgelegt und an den Enden befinden sich jeweils ein Nadelhalter zum einhändigen ligieren. Der Katheter ist entsprechend vorgelegt.

Mit der linken Hand wurde die Vene mit einer kleinen anatomischen Pinzette kranial vorsichtig unter Spannung, mit in der rechten Hand befindlicher Schere (Fine Science Tools GmbH, Heidelberg) im unteren Drittel im 30° Winkel ein kleiner Schnitt in die Vene vorgenommen. Durch diese Öffnung wurde der Katheter auf eine Länge von 4 mm in die

Vene geschoben und mittels der vorgelegten Schlinge fixiert. Zur Sicherheit wurde eine zweite Ligatur gelegt.



Abbildung 9: Der eingebundene Katheter und die Aspiration von Blut (rechts)

Zustand nach dem Einbinden des Katheters und die vorsichtige Aspiration von Blut, zur Kontrolle des richtigen Sitzes des Katheters.

Nun wurde kontrolliert, ob der Katheter richtig lag, indem etwas physiologische Kochsalzlösung appliziert und anschließend aspiriert wurde. Befand sich Blut im Katheter war der Sitz des Katheters korrekt und es konnten 50 µl Kochsalzlösung appliziert werden (Abb. 9). Die Fadenenden der Ligaturen wurden gekürzt und Unterhaut und Haut wurden sowohl ventral als auch dorsal mit Einzelheften (Ethicon Prolene 6-0, monofil mit atraumatischer Nadel, Johnson & Johnson, Brüssel, Belgien) adaptiert. Der Katheter wurde mit dem Nadelhalter abgeklemmt, die mit Kochsalzlösung gefüllte Spritze konnte entfernt werden und der Katheter wurde mit dem vorbereiteten Draht verschlossen. Der Nadelhalter wurde entfernt und der Katheter wurde zusätzlich mit einer Ligatur auf dem Rücken der Maus fixiert. Die Maus bekam zum Flüssigkeitsausgleich 1 ml 5% Glukoselösung (Glukose 10 Braun, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, 1:1 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt) subkutan injiziert und wurde zur Narkoseüberwachung auf die Wärmematte gelegt. Mit Erreichen des Bewusstseins wurden die Tiere in Einzelkäfige gelegt. Außerdem wurde

ihnen bis zur Applikation des Transfektionsgemisches eine Rekonvaleszenzzeit von mindestens zwei Tagen gegeben.

3.1.5. Subkutane Applikation von Tumorzellen

Dem fixierten Tier wurden 5 Mio. Zellen in 200 µl physiologischer Kochsalzlösung subkutan mittels einer 26G ½“ Kanüle in die rechte oder linke Flanke appliziert.

Sowie der Tumor makroskopisch sichtbar war, wurde der Tumor dreimal wöchentlich mittels digitaler Schieblehre (Modellnr. CD-15 CP, Mitutoyo, U. K. Ltd., England) vermessen. Dafür wurden die Tiere fixiert und die Länge und die Breite des Tumors in Millimetern bestimmt.

Die Tumorgöße wurde nach folgender Formel errechnet:

$$V[mm^3] = \frac{w^2 \times l}{2}$$

l: Länge

w: Breite

Außerdem wurde vor jeder Tumormessung das Körpergewicht bestimmt (Waage, Sauter RP 3000, August Sauter GmbH, Albstadt-Ebingen).

3.1.6. Intraperitoneale Transfektion

Für diese Transfektion wurden den fixierten Tieren max. 200 µl des Transfektionsmixes intraperitoneal appliziert.

3.1.7. Bronchoalveoläre Lavage

Die euthanasierte Maus wurde auf dem Rücken fixiert. Danach wurde ein ca. 2 cm langer Schnitt in der Medianen der ventralen Halsseite vorgenommen und die beiden subkutan

liegenden Speicheldrüsen in der Mitte stumpf abpräpariert. Nun wurde der Muskulus trachealis, der die Trachea bedeckt, durchtrennt, sodass die Trachea sichtbar vorlag. Durch einen Schnitt zwischen zwei Knorpelspannen wurde ein Katheter (Vasocan Braunüle 20G, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) in die Trachea eingeführt und eingebunden.

Die Lunge wurde mit einem eiskalten Gemisch aus PBS-Lösung und 2 mM EDTA (EDTA, Versen, Biochrom AG, Berlin) gespült. Zuerst wurde ein Volumen von 400 µl eingebracht, um die Lunge vorzudehnen und vorsichtig aspiriert. Danach wurde mit 500 µl wiederholt gespült, bis ein 5 ml Röhrchen gefüllt war.

3.1.8. Organentnahme und Tötung

Mit Versuchende wurden die Tiere in tiefer Narkose auf dem Rücken liegend fixiert. Es wurde wie oben beschrieben ein Katheter in die Trachea eingebunden. Anschließend wurden die Bauchhöhle und der Thorax eröffnet. Um eine aussagekräftige Histologie der einzelnen Organe zu erhalten, mussten die Tiere mit physiologischer Kochsalzlösung perfundiert werden. Dazu wurden die linke Herzkammer eröffnet und die Aorta ligiert. Die Kochsalzlösung wurde in den rechten Ventrikel infundiert, wobei die Tiere infolge eines Kreislaufstillstandes starben. Über den Katheter wurde 1 ml warme Tissue Tek-Lösung (Tissue Tek O. C. T. Compound, Sakura, Tokyo, Japan; 1:1 mit Leitungswasser verdünnt) in die Lunge appliziert und die Trachea abgebunden. Die Bauchorgane (Leber, Milz und Nieren), die einzeln fixierten Lungenlappen sowie ein Stück Skelettmuskulatur und das Gehirn wurden entnommen, in mit Tissue Tek gefüllte Einbettgefäße (Tissue Tek Cryomold Intermediate, Sakura, Tokyo, Japan) gelegt und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren.

Für die Real Time PCR wurden die Organe und die subkutanen Tumoren in sterile und RNase-freie 2 ml Cups (Safe-lock Tubes, farblos, 2,0 ml, Eppendorf, Hamburg) eingefroren.

Zur Langzeitlagerung wurden die Organe bei -80 °C tiefgefroren.

3.2. Transfektion

3.2.1. Material

3.2.1.1. siRNA

Als siRNA wurde BLOCK-iTTM Fluorescent Oligo; 75 μ l (1 mM); Invitrogen, Karlsruhe (FITC (fluorescein isothiocyanate)-markierte, doppelsträngige RNA, welche sich im Kern anreichert) verwendet. Hier wird in der Anleitung von Invitrogen nicht die Sequenz genannt. Es soll eine randomisierte Sequenz, sowohl gegen Maus als auch gegen Human sein. Alle weiteren verwendeten siRNA-Sequenzen sind in Tabelle 2 aufgelistet. In Tabelle 2 wird eine randomisierte Sequenz gegen Maus und Human als siRNA-ran bezeichnet, welche als Kontrolle eingesetzt wurde. Das FITC-Signal muss mit einer Wellenlänge von 488 nm, das Cy3-Signal muss mit einer Wellenlänge von 532 nm angeregt werden. Dazu wurden im Fluoreszenzmikroskop mit bestimmten Filtern gearbeitet (siehe 3.4.3.).

Tabelle 2: Tabelle der weiteren verwendeten siRNAs

| Bezeichnung laut Hersteller | Sequenzen der siRNA |
|-------------------------------|----------------------------|
| Cy3-siRNA forward | ucaccgucaucaccacau (dtdt) |
| Cy3-siRNA-reverse | augguggugaugacgguga (dtdt) |
| HIF-2 α -siRNA-forward | gucagccaccuggaagguc (dtdt) |
| HIF-2 α -siRNA-reverse | gaccuuccagguggcugac (dtdt) |
| HIF-1 α -siRNA-forward | ugugaguucgcaucuugau (dtdt) |
| HIF-1 α -siRNA-reverse | aucaaugcggaacucaca (dtdt) |
| siRNA-ran-forward | uacaccguuagcagacacc (dtdt) |
| siRNA-ran-reverse | ggugucugcuaacggugua (dtdt) |

3.2.1.2. Transfektionsreagenzien

- Lipofectamine™ 2000, Invitrogen, Karlsruhe
- in vivo jetPEI™, cationic polymer transfection reagent, BIOMOL GmbH, Hamburg

3.2.1.3. Weitere Lösungen

- Opti-MEM® I Reduced Serum Medium, Invitrogen, Karlsruhe
- Aqua ad injectabilia, Baxter Deutschland GmbH, Unter-Schleißheim
- Glukose 10 Braun, B. Braun Melsungen AG, Melsungen
- Isotonische Natriumchlorid-Lösung Delta Select, Delta Select, Pfullingen

3.2.2. Methoden

3.2.2.1. Auswahl und Aufbereitung der siRNAs

Für HIF-1 α (GenBank Accession No. U22431) wurde mit Hilfe der HUSAR Software (Heidelberg Unix Sequence Analyse) und dem *Find Pattern* Programm ein siRNA-Motiv nach der AA-N₁₉-Regel (Elbashir et al., 2001) selektiert. Die inhibitorische Wirkung dieses siRNA-Motivs wurde in einer vorausgehenden Arbeit unserer Arbeitsgruppe beschrieben (Hanze et al., 2003). Die siRNA-Sequenz für HIF-2 α (GenBank AccessionNo. NM_001430) wurde einer Publikation entnommen (Sowter et al., 2003), in der ebenfalls die inhibitorische Wirkung auf HIF-2 α gezeigt wurde. Als Kontrolle wurde eine *random* siRNA-Sequenz (siRNA-ran) ausgewählt, die nach Überprüfung gegen die Human- und Maus-Datenbank keine Sequenzübereinstimmung gegen bekannte Sequenzen zeigte. Für den Nachweis der siRNA in Gewebsschnitten durch Fluoreszenzmikroskopie wurde eine fluoreszenzmarkierte siRNA verwendet (siRNA-Cy3). Die benutzten siRNA-Sequenzen sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Es wurden jeweils der *forward* und *reverse* Strang mit zwei Desoxy-Thymidin-Überhängen am 3' Ende synthetisiert (Biomers, Ulm, Deutschland). Die *forward* und *reverse* Stränge wurden in einer Endkonzentration von 40 μ M *annealed*. Dafür wurden

sie zunächst im *Annealing*-Puffer (20 mM K-Acetat, 6 mM HEPES-KOH, pH 7.4 und 0,4 mM Mg-Acetat) bei 95 °C für 1 min denaturiert und anschließend für 1 h bei 37 °C inkubiert.

3.2.2.2. Herstellung der Transfektionsmischungen

Alle Arbeiten zur Herstellung der Transfektionsmischungen wurden unter der Sterilbank (Laminar air flow, Typ BSB 4A, Flow Laboratories GmbH, Meckenheim) durchgeführt. Es wurde streng RNase-frei gearbeitet. Im Falle der fluoreszenzmarkierten siRNA wurde lichtgeschützt gearbeitet.

a) Herstellung der Transfektionsmischung unter Verwendung des Transfektionsreagenz Lipofectamine™ 2000:

Bei der Herstellung des Transfektionsmixes wurde sich an den Herstellerangaben von Invitrogen orientiert. Dabei wurde ein Verhältnis von BLOCK-iT™ zu Lipofectamine™ 2000 (in µl) von 1:0,25 gewählt. Bei Verwendung von siRNA-Cy3 und siRNA-ran wurde ein Verhältnis von siRNA zu Lipofectamine™ 2000 (in µl) von 1:1,8 gewählt. Die siRNA wurde in Opti-MEM® gemischt, in einem zweiten Cup wurde Lipofectamine™ 2000 mit Opti-MEM® gemischt. Anschließend wurde das Lipofectaminegemisch für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde das Lipofectaminegemisch in das Cup mit der siRNA überführt und 20 Minuten zur Inkubation auf den Rüttler (IKA-VIBRAX-VXR elektronik, Jauke/Kunkel Labortechnik, Staufen) gestellt. Danach wurde diese Mischung steril zur *in vivo* Applikation in eine 1 ml Spritze gefüllt.

b) Herstellung der Transfektionsmischung unter Verwendung des Transfektionsreagenz *in vivo* jetPEI™:

Die siRNA wurde so in Glukose 10% gemischt, dass die siRNA in diesem Cup in 5% Glukoselösung vorlag. In einem zweiten Cup wurde das *in vivo* jetPEI™ erst auf die gewünschte Konzentration mit Aqua injectabile verdünnt und mit dem gleichen Volumen

Glukose 10% vermischt, sodass in diesem Cup auch eine 5% Glukoselösung vorlag. Nun wurde das jeweilige Cup kurz gevortext. Anschließend wurde die PEI-Lösung in das Cup mit der siRNA überführt, vorsichtig gemischt und 15 Minuten zur Inkubation auf den Rüttler gestellt. Danach wurde diese Mischung in eine 1 ml Spritze steril zur *in vivo* Applikation gefüllt. Bei allen Versuchen mit *in vivo* jetPEI™ wurde das N/P-Verhältnis von 10 gewählt (siehe 2.1.6.3).

Tabelle 3: Übersicht der einzelnen Transfektionsmischungen

a) Transfektionsmischungen mit Lipofectamine™ 2000

| Lösung | BLOCK-iT™ | | siRNA-Cy3 / Lipofectamine™ 2000 |
|---|------------------------|--------------------|------------------------------------|
| | niedrige Konzentration | hohe Konzentration | |
| Lipofectamine™ 2000 (µl) | 12 | 36 | 36 |
| Physiologische Kochsalzlösung (0.9 %) (µl) | 60 | 60 | 95 |
| Opti-MEM® (µl) | 50 | 36 | 14 |
| BLOCK-iT™ (1mM) (µl) | 6 | 18 | - |
| siRNA (40µM) (µl) | - | - | 50 |
| Endkonzentration (µM) | 40 | 120 | 10 |
| Volumen (µl) | 128 | 150 | 195 |
| µg siRNA/Tier | 60 | 225 | 25 |

b) Transfektionsmischungen mit in vivo jetPEI™

| Lösung | siRNA-Cy3/ in vivo jetPEI™ | |
|-------------------------------|-------------------------------|--------------------|
| | niedrige Konzentration | hohe Konzentration |
| Glukose 10 % (µl) | 98 | 100 |
| in vivo jetPEI™ (300 mM) (µl) | 1,3 | 6,5 |
| Aqua injectable (µl) | 50,7 | 68,5 |
| siRNA (µl) | 50 (40 µM) | 25 (400 µM) |
| Endkonzentration (µM) | 10 | 120 |
| Volumen (µl) | 200 | 200 |
| µg siRNA/Tier | 25 | 125 |

3.2.2.3. Transfektionsprotokolle

Für alle *in vivo* Transfektionsversuche wurden pro Transfektionsansatz mindestens 5 Tiere pro Gruppe (n=5) gewählt. Die exakte Zusammensetzung der Transfektionsmischungen ist in Tabelle 3 zusammengefasst dargestellt.

3.2.2.3.1. Versuche mit BLOCK-iT™-siRNA

Mit der grün fluoreszierenden siRNA, welche kerngängig ist, wurden gesunde Tiere sowohl über den implantierten Rechtsherzkatheter als auch intratracheal transfiziert. Als Transfektionsreagenz wurde ausschließlich Lipofectamine™ 2000 benutzt.

Die BLOCK-iT™-siRNA wurde in Dosen von 60 µg/Tier und 225 µg/Tier eingesetzt.

Die Versuche wurden nach 24, 42 und 96 Stunden beendet und histologisch aufgearbeitet. Als Kontrolle wurde den Tieren anstelle der fluoreszierenden siRNA eine nicht-fluoreszenzmarkierte, randomisierte siRNA (siRNA-ran) verabreicht.

3.2.2.3.2. Versuche mit siRNA-Cy3

a) Gesunde Lunge:

Mit der rot fluoreszierenden siRNA wurden gesunde Tiere sowohl über den implantierten Rechtsherzkatheter als auch intratracheal transfiziert. Als Transfektionsreagenz wurden Lipofectamine™ 2000 und *in vivo* jetPEI™ benutzt. Die siRNA wurde in einer Dosis von 25 µg/Tier, im Falle des Transfektionsreagenzes *in vivo* jetPEI™ wurde auch eine Dosis von 125 µg/Tier eingesetzt. Die Versuche wurden nach 42 Stunden beendet.

b) LLC-Modell:

Zehn Tage nach Applikation der Tumorzellen wurden die Tiere mit der siRNA-Cy3 sowohl über den implantierten Rechtsherzkatheter als auch intratracheal transfiziert. Als Transfektionsreagenz wurden Lipofectamine™ 2000 und *in vivo* jetPEI™ benutzt. Die

siRNA wurde in einer Dosis von 25 µg/Tier eingesetzt. Die Versuche wurden nach 42 Stunden beendet.

c) Subkutanes Tumormodell:

Mit dem Erreichen eines Tumolvolumens von etwa 100-150 mm³ wurden die Tiere intraperitoneal mit der siRNA-Cy3 in einer Dosis von 25 µg/Tier und 125 µg/Tier und in vivo jetPEI™ transfiziert. Diese Versuche wurden ebenfalls nach 42 Stunden beendet. Als Kontrolle wurde in allen Versuchsansätzen die gleiche Kontroll-siRNA (siRNA-ran) wie oben beschrieben verwendet. Alle Versuche wurden histologisch aufgearbeitet.

Dabei wurden der subkutane Tumor, die Lunge, das Gehirn, die Leber, die Milz, die Nieren und ein Stück der Skelettmuskulatur untersucht.

3.2.2.3.3. Versuche mit siRNA gegen die Hypoxie-induzierbaren Faktoren (HIF-1α und HIF-2α)

a) Hierbei wurden Tiere mit subkutanem A549-Tumor (siehe 3.3.1) mit einem Tumolvolumen von 150 mm³ zweimal intraperitoneal im Abstand von 48 Stunden mit siRNA gegen HIF-2α und als Kontrolle mit siRNA-ran transfiziert. Als Transfektionsreagenz wurde in vivo jetPEI™ benutzt. Die Dosis der siRNAs betrug 25 µg/Tier. Diese Versuche wurden 48 Stunden nach der letzten Applikation beendet und die Tumoren wurden biochemisch (Real Time PCR) aufgearbeitet.

b) Hierbei wurden Tiere des subkutanen Tumormodells mit einem Tumolvolumen von 100 mm³ zehnmal intraperitoneal zweimal die Woche mit funktioneller siRNA (siRNA-HIF-1α und siRNA-HIF-2α) und als Kontrolle mit siRNA-ran transfiziert.

Als Transfektionsreagenz wurde in vivo jetPEI™ benutzt. Die Einzeldosis der siRNAs betrug 25 µg/Tier. Diese Versuche wurden 72 Stunden nach der letzten Applikation beendet und die Tumoren wurden biochemisch und histologisch aufgearbeitet.

3.3. Zellkultur

3.3.1. Verwendete Tumorzelllinien

Es wurden zwei Tumorzelllinien verwendet. Für das Lungentumormodell (LLC-Modell) wurden Lewis-Lung-Carzinoma-Zellen (LLC, ATCC-Nr.: CRL-1642) benutzt, die aus einer Karzinom-Zelllinie der Mauslunge stammen. Des Weiteren wurden humane alveolar-epitheliale Adenokarzinomzellen (A549, „non-small cell lung cancer“ NSCLC, ATCC-Nr.: CCL-185) für das subkutane A549-Modell genutzt.

3.3.2. Verwendete Materialien

Zellkulturschalen:

100 mm, Greiner Bio-One, Nürtingen

T75, Greiner Bio-One, Nürtingen

Pipetten:

Pasteurpipetten, Nunc, Wiesbaden

5 ml, 10 ml, 50 ml, BD Falcon, Becton Dickinson Labware, Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA

Röhrchen:

15 ml, 50 ml Falcons, BD Falcon, Becton Dickinson Labware, Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA

Filter:

Spritzenaufsatz, Millex[®] GP, 0,22 µm Filter, Millipore Carrigtwohill, Co. Cork, Ireland

Bottle-top Filter, Gewinde 33 mm und 45 mm, 0,22 µm, 150 ml, Millipore Carrigtwohill, Co. Cork, Ireland

Elektrische Pipettierhilfe, Pipettus, IBS Integra Biosciences, Chur, Schweiz

3.3.3. Zellkulturmedien

LLC-Kulturmedium:

93% bzw. 94% RPMI (RPMI 1640, Pan GmbH, Nürnberg),

5% FCS (fetales Kälberserum, hitzeinaktiviert für 30 Minuten bei 56 °C, steril filtriert, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich),

1% L-Glutamin (Gibco, Karlsruhe), falls nicht enthalten im RPMI,

1% Gentamycin/Penicillin G (lyophilisiert, steril, Gibco, Karlsruhe)

A549-Kulturmedium:

86% DMEM-F12 (DMEM : F-12 (1:1) 500 ml, -L-Glutamin, Gibco, Karlsruhe)

10% FCS (fetales Kälberserum, hitzeinaktiviert für 30 Minuten bei 56 °C, steril filtriert, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich),

1% L-Glutamin (Gibco, Karlsruhe),

1% Gentamycin/Penicillin G (lyophilisiert, steril, Gibco, Karlsruhe),

1% Vitamin (MEM Vitamin solution, Gibco, Karlsruhe),

1% nicht essentielle Aminosäuren (MEM NON-essential Amino Acids, Gibco, Karlsruhe)

3.3.4. Auftauen und Kultivierung der Zellen

Die zur Langzeitaufbewahrung in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen wurden zur Kultivierung aufgetaut. Dazu wurde das mit den Zellen gefüllte Kryoröhrchen (Greiner Bio-One, Nürtingen) in einen 37 °C warmen Wasserbad (Köttermann-Labortechnik, Uetze-Hänigsen) aufgetaut. Unter der Sterilbank (Laminar air flow, Typ BSB 4A, Flow Laboratories GmbH, Meckenheim) wurden die Zellen in mit erwärmtem Kulturmedium gefüllten Zellkulturschalen überführt. Anschließend wurden die Zellen in einen Brutschrank (IR 1500 Automatic CO₂ Incubator, Flow Laboratories GmbH, Meckenheim) bei 37 °C und einem CO₂-Gehalt von 5% und einer 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Nach 24 Stunden wurde das

Medium gewechselt, um evtl. vorhandenes DMSO (Dimethyl sulfoxide minimum 99,5 % GC, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) zu entfernen. Um optimales Zellwachstum und -vitalität zu gewährleisten, wurden die Zellen dreimal pro Woche gesplittet. Das heißt, das alte Kulturmedium wurde abgesaugt und die adhärennten Zellen wurden mit ihrem jeweiligen Grundmedium zweimal gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit Trypsin (Trypsin-EDTA-Lösung, Gibco, Karlsruhe) abgelöst und in ein mit 1 ml FCS (fetales Kälberserum) gefülltes 50 ml Röhrchen überführt. Die restlichen auf der Platte befindlichen Zellen wurden mit dem Grundmedium abgelöst und ebenfalls in dasselbe Röhrchen überführt. Diese Zellsuspension wurde für 5 min bei 1200 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert (Hettich Rotanta/RP, Kühlenzentrifuge mit Schwingbecherrotor, Tuttlingen). Nach dem Absaugen des Überstandes wurden die Zellen mit 10 ml Kulturmedium resuspendiert und in einer Dichte von 1 Mio. Zellen erneut auf Zellkulturschalen ausgesät. Die gleichmäßige Verteilung wurde mikroskopisch (Olympus Mikroskop, Gerätetyp JMT-2, Inverses Forschungsmikroskop, Olympus Deutschland GmbH, Hamburg) kontrolliert.

3.3.5. Zellvorbereitung für die *in vivo* Experimente

Zur Applikation von Tumorzellen in die Tiere wurden die Zellen wie oben beschrieben von den Zellkulturschalen gelöst, zentrifugiert und in 10 ml Kulturmedium resuspendiert. Anschließend wurde die Gesamtzellzahl mittels einer Neubauerzählkammer (Haemocytometer, Neubauer-Kammer, Optik-Labor, Friedrichshofen; Deckgläser für das Haemocytometer, optisch plan geschliffen, 20 x 26 mm, Menzel GmbH & Co KG; Braunschweig) ermittelt.

Für den subkutanen Tumor wurden 5 Millionen Zellen in 200 µl steriler Kochsalzlösung, für den Lungentumor wurden 1 Millionen Zellen in 100 µl steriler Kochsalzlösung benötigt.

Das entsprechende Volumen der Zellsuspension, welches verwendet werden sollte, wurde in ein neues Röhrchen überführt, erneut zentrifugiert und das Zellpellet mit der zu

applizierenden Menge physiologischer Kochsalzlösung resuspendiert. Diese Suspension wurde steril in eine 1 ml Spritze aufgezogen und wie oben beschrieben appliziert. Die restlichen Zellen aus dem Kulturmedium wurden erneut zur Kultivierung ausgesät.

3.3.6. Einfrieren und Langzeitlagerung der Zellen

Wurden die Zellen für längere Zeit nicht benötigt, wurden die Zellen zur Langzeitlagerung eingefroren. Hierfür wurden zwei Einfriermedien hergestellt.

Medium-1 bestand aus 9 ml Kulturmedium und 1 ml 0,2 M Hepes (Hepes, Gewebekulturpuffer, N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulphonsäure, Roth GmbH, Karlsruhe).

Medium-2 bestand aus 5 ml Medium-1 und 0,5 ml DMSO. Beide Medien wurden steril hergestellt und vor dem Verwenden auf Eis gekühlt. Die einzufrierenden Zellen wurden wie oben beschrieben von ihrer Schale gelöst und zentrifugiert, der Überstand wurde abgesaugt. Auf das Zellpellet wurde 500 µl des Medium-1 gegeben und für ca. eine Minute auf Eis gestellt. Nun wurde resuspendiert und die Zellsuspension wurde in das beschriftete Kryoröhrchen überführt. Dieses wurde für 5 Minuten auf Eis gekühlt. Anschließend wurden 500 µl vom Medium-2 dazu gegeben und erneut auf Eis gestellt. Das Kryoröhrchen wurde verschlossen und für 2-3 Stunden in -20 °C, über Nacht in -80 °C gestellt und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

3.4. Histologie

3.4.1. Anfertigung von Gefrierschnitten

Die in Tissue Tek eingebetteten Organe wurden zur Temperaturanpassung ca. eine Stunde vor dem Schneiden in den -20 °C kalten Kryostat (Leica CM1850 UV-Kryostat, Leica Microsysteme Vertrieb GmbH, Bensheim) gelegt. Vor Beginn des Arbeitens wurde ein neues Messer (Mikrotom Messer, S-35, Feather, PFM Produkte für die Medizin AG, Köln) in den Messerhalter eingesetzt. Nach dem Anschneiden des Blockes wurden $5\text{ }\mu\text{m}$ dicke Schnitte angefertigt. Im Falle der Tumorknoten wurden jeweils Folgeschnitte auf zwei Objektträger (Super Frost[®] Plus Objektträger, $25 \times 75 \times 1\text{ mm}$, R. Langenbrinck, Labor- und Medizintechnik, Teningen) verbracht und entsprechend mit Bleistift gekennzeichnet, um einen Schnitt für die H&E-Färbung und den Folgeschnitt für die Fluoreszenzmikroskopie zu verwenden. Nach dem Antrocknen der Gefrierschnitte auf dem Objektträger wurden die Schnitte bei -20 °C bis zur Färbung gelagert.

3.4.2. Färbungen

3.4.2.1. Nachweis der Transfektion mit fluoreszenzmarkierter siRNA

Um neben dem Fluoreszenzsignal der siRNA die histologischen Strukturen der Gewebe besser zu sehen, wurden die Gefrierschnitte mit einer Kernfärbung gefärbt.

Die Schnitte wurden in eine mit $0,5\text{ cm}$ destilliertem Wasser befüllte schwarze Färbekammer gelegt und mit -20 °C kalter Methanol/Aceton-Lösung (1:1) (Methanol, Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz und Aceton, Merck KGaA, Darmstadt) für 10 Minuten fixiert. Anschließend wurden die Schnitte mit einfacher PBS-Lösung gründlich gewaschen.
Herstellung 500 ml 1-facher PBS-Lösung: 50 ml 10-facher PBS-Lösung + 450 ml Aqua tridestillata (Wasseraufbereitungsanlage, Milli-Q Water Purification System, Millipore, Eschborn).

Herstellung 1 Liter 10-facher PBS-Lösung: 80 g NaCl (Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe) + 2 g KCl + 11,5 g Na₂HPO₄ x 2H₂O + 2 g KH₂PO₄ (Merck KGaA, Darmstadt) + 900 ml Aqua dest. mischen und mit Aqua dest. auf 1 Liter auffüllen. Mit Hilfe des pH-Meters (digitales pH-Meter, Firma Schott AG, Mainz) den pH-Wert auf 7,5 einstellen.

Die Schnitte wurden dann mit 1 µM Dapi-Lösung (D9564 DAPI, dilactate; 4',6-Diamidino-2-phenylindole, dilactate; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) für 5-10 Minuten gefärbt. Nach einem weiteren Waschvorgang mit einfacher PBS-Lösung wurden die Schnitte mit drei Tropfen Fluorescent Mounting Medium (Dako Cytomation GmbH, Hamburg) beschichtet und mit einem Deckgläschen (24 x 50 mm, R. Langenbrinck, Labor- und Medizintechnik, Teningen) eingedeckt. Die Schnitte wurden zum Trocknen lichtgeschützt bei Raumtemperatur in eine Präparatematte gelegt und später bei 4 °C gelagert.

3.4.2.2. Immunfluoreszenz

3.4.2.2.1. Nachweis der Angiogenese - CD 31

Die Schnitte wurden ebenfalls in eine mit 0,5 cm destilliertem Wasser befüllte schwarze Färbekammer gelegt und mit -20 °C kalter Methanol/Aceton-Lösung (1:1) für 10 Minuten fixiert. Die Schnitte wurden mit einfacher PBS-Lösung, welche zusätzlich 0,1% BSA (Bovines Serum Albumin, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) und 0,2% Triton (Triton X-100, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) enthielt, gründlich gewaschen. Anschließend wurden die unspezifischen Bindungen mit einfacher PBS-Lösung und 3% BSA für 60 min abgeblockt.

Nach dem Abkippen der Lösung wurde der primäre Antikörper (Rat-anti-mouse CD 31, PECAM-1, 1:100, 1 ml (15,625 µg/µl), Becton Dickinson Labware, Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf den Schnitten inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte dreimal mit der PBS-Lösung gründlich gewaschen.

Dann wurde der sekundäre Antikörper (Alexa Fluor 488, goat-anti-rat IgG (H+L), 2 mg/ml, 1:1000, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) für eine Stunde bei RT auf den Schnitten inkubiert.

Nach einer Stunde wurde die Lösung abgekippt, die Schnitte kurz mit PBS-Lösung gewaschen und dann mit 1 μ M Dapi-Lösung (D9564 DAPI, dilactate; 4',6-Diamidino-2-phenylindole, dilactate; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) für 5 Minuten gefärbt. Nach einem weiteren Waschvorgang mit PBS-Lösung wurden die Schnitte mit drei Tropfen Fluorescent Mounting Medium beschichtet und mit einem Deckgläschen eingedeckt. Die Schnitte wurden zum Trocknen lichtgeschützt bei Raumtemperatur in eine Präparatematte gelegt und später bei 4 °C gelagert.

3.4.2.2.2. Nachweis der Proliferation - Ki 67

Die Schnitte wurden ebenfalls in eine mit 0,5 cm destilliertem Wasser befüllten schwarze Färbekammer gelegt und mit -20 °C kalter Methanol/Aceton-Lösung (1:1) für 10 Minuten fixiert. Die Schnitte wurden mit einfacher PBS-Lösung, welche zusätzlich 0,1% BSA (Bovines Serum Albumin, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) und 0,2% Triton (Triton X-100, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) enthielt gründlich gewaschen. Anschließend wurden die unspezifischen Bindungen mit einfacher PBS-Lösung und 3% BSA für 60 min abgeblockt.

Nach dem Abkippen der Lösung wurde der primäre Antikörper (Rab-anti-human Ki 67, 1:100, Rabbit polyclonal to Ki 67-Proliferationsmarker (ab 833), Abcam Ltd.332 Cambridge Science Park, Cambridge, CB4 0FW, UK) für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf den Schnitten inkubiert. Die Schnitte wurden dreimal mit der PBS-Lösung gründlich gewaschen.

Dann wurde der sekundäre Antikörper (Alexa Fluor 488, goat-anti-rabbit IgG (H+L), 2 mg/ml, 1:1000, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) für 1 h bei RT auf den Schnitten inkubiert.

Nach einer Stunde wurde die Lösung abgekippt, die Schnitte kurz mit PBS-Lösung gewaschen und dann mit 1 μ M Dapi-Lösung (D9564 DAPI, dilactate; 4',6-Diamidino-2-phenyindole, dilactate; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) für 5 Minuten gefärbt. Nach einem weiteren Waschvorgang mit PBS-Lösung wurden die Schnitte mit drei Tropfen Fluorescent Mounting Medium beschichtet und mit einem Deckgläschen eingedeckt. Die Schnitte wurden zum Trocknen lichtgeschützt bei Raumtemperatur in eine Präparatematte gelegt und später bei 4 °C gelagert.

3.4.2.2.3. Nachweis der Apoptose - Caspase-3

Die Schnitte wurden ebenfalls in eine mit 0,5 cm destilliertem Wasser befüllte schwarze Färbekammer gelegt und mit -20 °C kalter Methanol/Aceton-Lösung (1:1) für 10 Minuten fixiert. Die Schnitte wurden mit einfacher PBS-Lösung, welche zusätzlich 0,1% BSA (Bovines Serum Albumin, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) und 0,2% Triton (Triton X-100, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) enthielt, gründlich gewaschen. Anschließend wurden die unspezifischen Bindungen mit einfacher PBS-Lösung und 3% BSA für 60 min abgeblockt.

Nach dem Abkippen der Lösung wurde der primäre Antikörper (Rab-anti-human Caspase-3, 1:100, Anti-ACTIVE Caspase-3 pAb Promega Corporation, Madison, WI 53711, 5399, USA) für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf den Schnitten inkubiert. Die Schnitte wurden dreimal mit der PBS-Lösung gründlich gewaschen.

Dann wurde der sekundäre Antikörper (Alexa Fluor 488, goat-anti-rab IgG (H+L), 2 mg/ml, 1:1000, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) für 1 h bei RT auf den Schnitten inkubiert. Nach einer Stunde wurde die Lösung abgekippt, die Schnitte kurz mit PBS-Lösung gewaschen und dann mit 1 μ M Dapi-Lösung (D9564 DAPI, dilactate; 4',6-Diamidino-2-phenyindole, dilactate; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) für 5 Minuten gefärbt. Nach einem weiteren Waschvorgang mit PBS-Lösung wurden die Schnitte mit drei Tropfen

Fluorescent Mounting Medium beschichtet und mit einem Deckgläschen eingedeckt. Die Schnitte wurden zum Trocknen lichtgeschützt bei Raumtemperatur in eine Präparatematte gelegt und später bei 4 °C gelagert.

3.4.2.2. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung basiert auf der Oxidation von Hämatoxylin zu dem blauen Farbstoff Hämatein. Dieser bildet mit Aluminiumionen positiv geladene Komplexe, die ihrerseits mit basophilen Strukturen interagieren, wie zum Beispiel den negativ geladenen Phosphatgruppen der DNS im Zellkern. Azidophile Zell- und Gewebestrukturen wie das Zytoplasma oder Interzellulärsubstanzen werden durch das Eosin rot gefärbt.

Die aufgetauten Schnitte wurden zwei Minuten in der Hämatoxylinlösung (Haemalaun, sauer nach Mayer, Waldek GmbH & CoKG, Münster) inkubiert, anschließend wurden die Schnitte entnommen und in ein Färbegestell (Färbegestell für 10 Objektträger, Glaskasten mit Deckel, Glaswerk Wertheim, Wertheim) unter fließendem Leitungswasser für ca. 5 Minuten zum „Bläuen“ gestellt. Die abgetropften Schnitte wurden für 20 Sekunden in Eosinlösung (Eosin Yellowish solution, Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz) gefärbt.

Dann wurden sie kurz mit Aqua dest. deion. (aus der Wasseraufbereitungsanlage) gespült. Sie wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70% (Ethanol 70% vergällt mit Ethylmethylketon, Otto Fischar GmbH & Co KG, Saarbrücken), 96% (Ethanol 96% vergällt mit Ethylmethylketon, Otto Fischar GmbH & Co KG, Saarbrücken) und 99,6% (Ethanol 99,6%, Ethylalkohol, Sorte 522, Schmidt Dillenburg, Dillenburg)) solange gespült bis keine Schlieren mehr sichtbar waren. Nach einem Bad in Xylol (Xylol (Isomere) > 98%, reinst, Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe) wurden sie mit Pertex (Pertex, Schnelleindeckmittel für histologische und zytologische Präparate, medite GmbH, Burgdorf) eingedeckt. Nach dem liegenden Trocknen wurden die Schnitte bei Raumtemperatur gelagert.

3.4.3. Mikroskopische Auswertung

Die mikroskopische Auswertung erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop (Leica DMLA Q550/W, Leica Microsysteme Vertrieb GmbH, Bensheim) mit einer angeschlossenen Digitalkamera (DC 300 FX, Leica Microsysteme Vertrieb GmbH, Bensheim) und mit dem Computer vernetzten Bildbearbeitungsprogramm Q-Win (Leica Microsysteme Vertrieb GmbH, Bensheim). Das System arbeitet mit einem Blau- (A, Wellenlänge: 380-420 nm), Grün- (I3, Wellenlänge: 420-515 nm) und Rotfilter (N2.1, Wellenlänge: 500-590 nm) der Firma Leica Microsysteme Vertrieb GmbH, Bensheim. Nach Einstellung der Belichtungszeit und Belichtungsstärke mit Hilfe der Kontrolle wurden die Schnitte bei verschiedenen Vergrößerungen mikroskopiert, fotografiert und gespeichert. Derselbe Ausschnitt wurde im Blaufilter betrachtet, fotografiert und gespeichert. Anschließend wurden die Bilder übereinander gelegt und gespeichert. Diese Methode wurde benutzt, um festzustellen, welche Zellen fluoreszenzpositiv waren. Die H&E gefärbten Schnitte wurden in der Durchlichtmikroskopie auf das Vorhandensein von Tumoren im jeweiligen Lungenschnitt untersucht, um anschließend den entsprechenden Fluoreszenzschnitt mit vorhandenem Tumor auf gelungene Transfektion hin zu untersuchen.

Zur Untersuchung der Angiogenese, Proliferation und Apoptose wurden vom jeweiligen Schnitt mit Hilfe des Dapi-Signals fünf Bilder mit dem 20er Objektiv sowohl im Grünfilter, als auch im Blaufilter mit Ausnahme des Randbereiches fotografiert. Im Falle der Apoptose und Proliferation wurden die grün positiven Signale detektiert und zum jeweiligen Dapi-Signal in Beziehung gesetzt. Bei der Angiogenese wurden signalpositive Gefäße, welche vom Durchmesser kleiner als 100 μm waren, ausgezählt.

3.5. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Analyse von Einzelzellen auf der Grundlage ihrer Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften. Während des Messvorgangs werden die Zellen durch Unterdruck stark beschleunigt, sodass sie beim Eintreten in die Messkammer vereinzelt am Messpunkt fokussiert werden. Durch die gleichzeitige Messung des Vorwärts- und Seitwärtsstreulichtes kann die relative Größe und die Binnenstruktur (Granularität des Zytoplasmas, Größe des Zellkerns, usw.) der Einzelzellen bestimmt werden. Dabei korrelieren sowohl Größe als auch Binnenstruktur direkt mit der Lichtintensität. Diese Methode wurde für die Analyse der in der bronchoalveolären Lavage gewonnenen Zellen genutzt, um nach Detektion der Makrophagen festzustellen, wie viele davon fluoreszenzpositiv waren.

Die aus der bronchoalveolären Lavage gewonnenen Zellen wurden für 10 min bei 1200 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Danach wurde das Zellpellet vorsichtig mit PBS-Lösung (enthielt 1% BSA) gewaschen. Anschließend wurden sie in 500 µl PBS-Lösung resuspendiert. Aus der bronchoalveolären Lavage von gesunden Mäusen erhält man hauptsächlich Makrophagen und einige Lymphozyten, die in ihrer Größe sehr unterschiedlich sind, sodass man sie gut in der Durchflusszytometrie unterscheiden kann (Maus et al., 2002). Aus einer bronchoalveolären Lavage gewinnt man in etwa 300.000 bis 750.000 Makrophagen pro Maus. Für die Durchflusszytometrie wurde das Gerät FACS canto (FACS canto, BD Biosciences, Becton Dickinson GmbH, Franklin Lakes, NJ, USA) verwendet, welches die Zellen mit dem Argon-Ionen-Laser mit Licht einer Wellenlänge von 488 nm anregt und Licht verschiedener Wellenlängen emittiert.

Zur Datenanalyse ist das Programm FACS DiVa (FACS DiVa Software, BD Biosciences, Becton Dickinson GmbH, Franklin Lakes, NJ, USA) angeschlossen. Dabei wurden zunächst über die Parameter Vor- und Seitwärtsstreulicht (forward scatter height und side scatter area) die Makrophagen elektronisch ausgewählt und mindestens 10.000 Signale aufgenommen.

Die Analyse der Makrophagenpopulationen wurde an der FACS-DiVA Software vorgenommen, dabei wurde die Makrophagenpopulation der Kontrollgruppe als Fluoreszenzhintergrund zur Analyse der siRNA-Cy3 behandelten Tieren gewählt. Nun konnte bestimmt werden, wie viele Makrophagen signalpositiv waren.

3.6. Real Time PCR

3.6.1. RNA-Gewinnung und -Isolation

Die in Cups bei -80 °C gelagerten Tumoren wurden im Kryostat bei -20 °C verarbeitet. Die gefrorenen Tumoren wurden auf einen Sockel mit einem Tropfen Tissue Tek fixiert und das Gewebe wurde in 5 µm große Schnitte geschnitten. Diese Schnitte wurden mittels einer sterilen Kanüle in zwei sterile und RNase-freie 1,5 ml Cups (Safe-lock Tubes, farblos, 1,5 ml, Eppendorf, Hamburg) überführt. Dieser Vorgang wurde solange wiederholt bis die Cups dreiviertel gefüllt waren, dies entsprach einem Gewicht von ca. 75 mg Gewebe pro Cup. Die Cups wurden einzeln aus dem Kryostat entnommen, auf Eis gestellt und es erfolgte unter dem Abzug (Captair[®] chemby erlab, Bio-Flow Technik Meckenheim, Meckenheim) die Zugabe von 1000 µl TriFast (peqGOLD TriFast[™], Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen). Das Cup wurde solange gevortext bis eine vollständige Lyse eingetreten war. Danach konnten die Proben zur Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert werden.

TriFast ist eine optimierte Guanidinisothiocyanat/Phenol-Methode für die gleichzeitige Extraktion von RNA, DNA und Proteinen.

Für die Phasentrennung wurden die auf Eis aufgetauten Proben 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen, um die Dissoziation der Nukleotidkomplexe zu gewährleisten. Nun wurden 200 µl Chloroform zugegeben und für 15 Sekunden kräftig geschüttelt. Die Lösung wurde milchig rot und für weitere 3-10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Proben wurden bei 12.000 rpm für 5 min (4 °C) zentrifugiert (Tischzentrifuge, Zentrifuge 5417R, Eppendorf, Hamburg).

Dies führte zur Trennung der Lösung in drei Phasen. Die obere klare Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Cup überführt. Die weitere Gewinnung der RNA erfolgte nach den Vorgaben des Herstellers von TriFast.

Zum Lösen der RNA wurden 20 µl RNase-freies Wasser verwendet.

3.6.2. RNA-Messung mit Hilfe von Nano Drop

Die gewonnene RNA wurde mit Hilfe des Gerätes Nano Drop (Nano Drop[®] ND-1000 Spectrophotometer, Produkte für Biotechnologie, Steinfurt) gemessen. Die Messung erfolgte nach Herstellerangaben, wobei zusätzlich die Reinheit der RNA mit Hilfe des Absorptionsquotient der Wellenlängen 260 bis 280 nm bestimmt wurde und nur Proben mit Werten zwischen 1,65-2,0 für die PCR verwendet wurden. Die Proben wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert.

3.6.3. DNase-Verdau und cDNA-Herstellung

Die Proben zur cDNA-Herstellung wurden auf Eis gekühlt und so verdünnt, dass in jeden Cup (PP-PCR-Gefäß nat., 0,2 ml, dünnwandig, Greiner Bio-One, Nürtingen) 2 µg Gesamt-RNA in 10 µl Aqua bidest. enthalten waren.

Nachdem den Proben jeweils 0,5 µl DNase I (5 U/µg RNA, DNase I, RNase-free, 10U/µl, 10.000 U, Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen) zugesetzt wurde, wurden sie im Thermocycler (Gene Amp PCR System 2400, Applied Biosystems, Forster City, CA, USA) für 37 °C für 30 min inkubiert, gefolgt von einem Schritt bei 75 °C für 5 min zur Inaktivierung der DNase und Denaturierung der RNA.

Anschließend wurden die Proben sofort auf Eis gestellt und jeweils 10 µl eines Masteransatzes dazu pipettiert. Der Masteransatz (M-MLV Reverse Transcriptase, Invitrogen, Karlsruhe) bestand aus 4 µl First Strand Buffer, 2 µl dNTP, 1 µl 0,1 M DTT (Stabilisator), 1 µl Primer (p(dn)₆), 1 µl MMLV RT (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase; isoliert aus E. coli) und 1 µl RNase Inhibitor (RNaseOUT[™] Recombinant Ribonuclease Inhibitor; 40 units/µl, Invitrogen, Karlsruhe).

Die RT-Reaktion wurde bei 39 °C für 60 min durchgeführt, gefolgt von einem Schritt bei 96 °C für 2 min zur Inaktivierung der DNase und Denaturierung der cDNA.

3.6.4. Real Time PCR

Für die Real Time PCR wurde die cDNA 1:10 mit RNase-freiem Wasser verdünnt.

Anschließend wurde der Reaktionsansatz vorbereitet. Dieser bestand aus 13 µl Mastermix (2x Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR Super Mix–UD6, Invitrogen, Karlsruhe), 0,5 µl Forward Primer (FP), 0,5 µl Reverse Primer (RP), 1 µl 50 mM MgCl₂ (im Masterkit mit enthalten, Invitrogen, Karlsruhe), 8,5 µl Wasser (im Masterkit mit enthalten, Invitrogen, Karlsruhe) und 1,5 µl cDNA. Insgesamt wurde pro Reaktionsansatz mit 25 µl gearbeitet.

Die Real Time PCR wurde mit dem Gerät ABI 7900 Sequence Detection System, Applied Biosystems, Forster City, CA, USA durchgeführt.

Es wurde folgendes Programm durchlaufen: 1x 50 °C für 2 min, 1x 95 °C für 6 min, 45x 95°C für 5 sec, 59 °C für 5 sec, 72 °C für 10 sec.

Die Spezifität des Produktes mit Hilfe der Schmelzkurve bestimmt. Die gewonnenen CT-Werte von HIF-1α mRNA bzw. HIF-2α mRNA wurde mit dem ubiquitär vorkommenden Porphobilinogendeaminase-Gens (PBGD-Gen, housekeeping gene) als Referenzgen in Beziehung gesetzt.

Dabei wurden mit Hilfe der CT-Werte die delta-CT-Werte (ΔCT-Werte) mit folgender Formel berechnet:

$$CT_A = \text{CT-Wert des reference gene}$$

$$CT_B = \text{CT-Wert des gene of interest}$$

$$\Delta CT = CT_A - CT_B$$

Alle verwendeten Primer wurden von der Firma MWG-Biotech AG, Ebersberg hergestellt und sind mit ihrer Sequenz, Annealing-Temperatur und ihrer Amplifikationslänge in der Tabelle 4 angegeben.

| Primer- bezeichnung | Primersequenz (5`-3`) | Annealing- temperatur | Amplikations- länge |
|--------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|
| hu Hif 1a_FP | caa gaa gcc cta acg tgt tat ctg | 59 °C | 105 bp |
| hu Hif 1a_RP | cgc ttc ctc tga gca ttc tgc | 59 °C | |
| hu Hif 2a_FP | atc agc ttc ctg cga aca ca | 59 °C | 123 bp |
| hu Hif 2a_RP | cca cgg caa tga aac cct c | 59 °C | |
| huku_PBGD_FP | ccc acg cga atc act ctc at | 60 °C | 79 bp |
| huku_PBGD_RP | tgt ctg gta acg gca atg cg | 60 °C | |

Tabelle 4: Verwendete Primer

3.7. Statistische Auswertung

Die gewonnen Daten wurden mit dem Tabellenkalkulationsprogramm EXCEL XP (Microsoft Windows, USA) erfasst und weiterverarbeitet. Die Verteilung der Messwerte wurde jeweils durch den Mittelwert, die Standardabweichung (SD) und den Standardfehler (SEM) beschrieben. Der Vergleich von Messgrößen zwischen verschiedenen Gruppen erfolgte durch den Zweistichproben t-Test unter der Annahme unterschiedlicher Varianzen. Wenn p kleiner gleich 0,05 war, wurden die Daten in den Abbildungen mit einem Stern gekennzeichnet, kleiner gleich 0,005 mit zwei Sternen.

4. Ergebnisse

Im ersten Teil werden die Ergebnisse zur Etablierung der *in vivo* Transfektion der Lunge und des Bronchialkarzinoms (LLC-Modell und A549-Modell) mittels der siRNA, im zweiten Teil wird die Bedeutung des Einflusses von HIF-1 α und HIF-2 α auf die Tumorprogression des humanen Adenokarzinoms am subkutanen Xenograftmodell der Maus (A549-Modell) durch den Einsatz der siRNA dargestellt.

4.1. Übersicht

Der Ergebnisteil ist folgendermaßen untergliedert:

- **Etablierung von *in vivo* Transfektionsverfahren der Lunge und des Bronchialkarzinoms mittels der siRNA-Technik**

Hierbei wurden fluoreszenzmarkierte, randomisierte siRNAs (BLOCK-iTTM und siRNA-Cy3) mit Hilfe der Transfektionsreagenzien LipofectamineTM 2000 und *in vivo* jetPEITM verwendet. Als Kontrolle wurde eine nichtfluoreszenzmarkierte, randomisierte siRNA (siRNA-ran) mit dem entsprechenden Transfektionsreagenz benutzt. Zur Transfektion der Lunge und des Lewis-Lung-Karzinoms (LLC-Modell) der Maus wurden verschiedene Zugangswege zur Lunge (intratracheal und intravenös über RHK) getestet. Außerdem wurden verschiedene Zeitpunkte nach der Transfektion und verschiedene Dosen der Transfektionsmische untersucht. Zusätzlich wurden die Organe Gehirn, Milz, Leber, Nieren und Skelettmuskulatur auf eine mögliche Transfektion hin analysiert. Die Analyse erfolgte anhand von histologischen Schnitten der Lunge und der übrigen Organe.

Zur Transfektion des humanen Adenokarzinoms im subkutanen Xenograftmodell der Maus (A549-Modell) wurde zunächst mit der fluoreszenzmarkierten siRNA (siRNA-Cy3) und dem Transfektionsreagenz *in vivo* jetPEITM das Modell charakterisiert. Als Kontrolle wurde erneut die randomisierte siRNA (siRNA-ran) mit dem entsprechenden Transfektionsreagenz benutzt. Die Transfektion wurde im

histologischen Schnitt analysiert. Zudem wurden die Organe Lunge, Gehirn, Milz, Leber, Nieren und Skelettmuskulatur auf eine mögliche Transfektion histologisch analysiert.

Im nächsten Schritt wurde die Transfektionseffizienz der subkutanen A549-Tumoren durch Ausschaltung von HIF-2 α mittels der siRNA in der Real Time PCR überprüft.

- **Untersuchung der Bedeutung von HIF für die Tumorprogression des humanen Adenokarzinoms am subkutanen Xenograftmodell der Maus durch Einsatz der siRNA-Technik**

Hierbei wurde das Tumorwachstum nach spezifischer Ausschaltung von HIF-1 α und HIF-2 α mittels der siRNA-Technik bestimmt, die Transfektionseffizienz der Inhibition von HIF-1 α und HIF-2 α in der Real Time PCR überprüft und die Tumoren histologisch im Hinblick auf ihre Angiogenese, Proliferation und Apoptose untersucht.

4.2. Etablierung von *in vivo* Transfektionsverfahren der Lunge und des Bronchialkarzinoms mittels der siRNA-Technik

4.2.1. siRNA-Transfektion der Lunge

Die Lunge (Abb. 10) wurde über zwei verschiedene Zugangswege transfiziert, intratrachealer Zugang und intravenöser Zugang über den implantierten Rechtsherzkatheter (RHK). Als siRNAs wurden fluoreszenzmarkierte siRNAs (BLOCK-iT™ und siRNA-Cy3) verwendet, welche sich direkt im histologischen Gefrierschnitt nachweisen lassen. Als Kontrolle wurde eine randomisierte siRNA (siRNA-ran) mit dem entsprechenden Transfektionsreagenz benutzt. Die grün fluoreszenzmarkierte siRNA (BLOCK-iT™) ist kerngängig. Als Transfektionsreagenzien standen als kationisches Lipid *Lipofectamine™ 2000* und als Polyethylenimin *in vivo jetPEI™* zur Verfügung. Um histologische Strukturen der Lunge darzustellen, wurde die Lunge mit einem Kernfarbstoff (DAPI) gefärbt. Es wurden verschiedene Transfektionszeiten und -dosen getestet. Um mögliche Nebeneffekte festzustellen, wurden die Organe Gehirn, Milz, Leber, Nieren und Skelettmuskulatur histologisch untersucht.

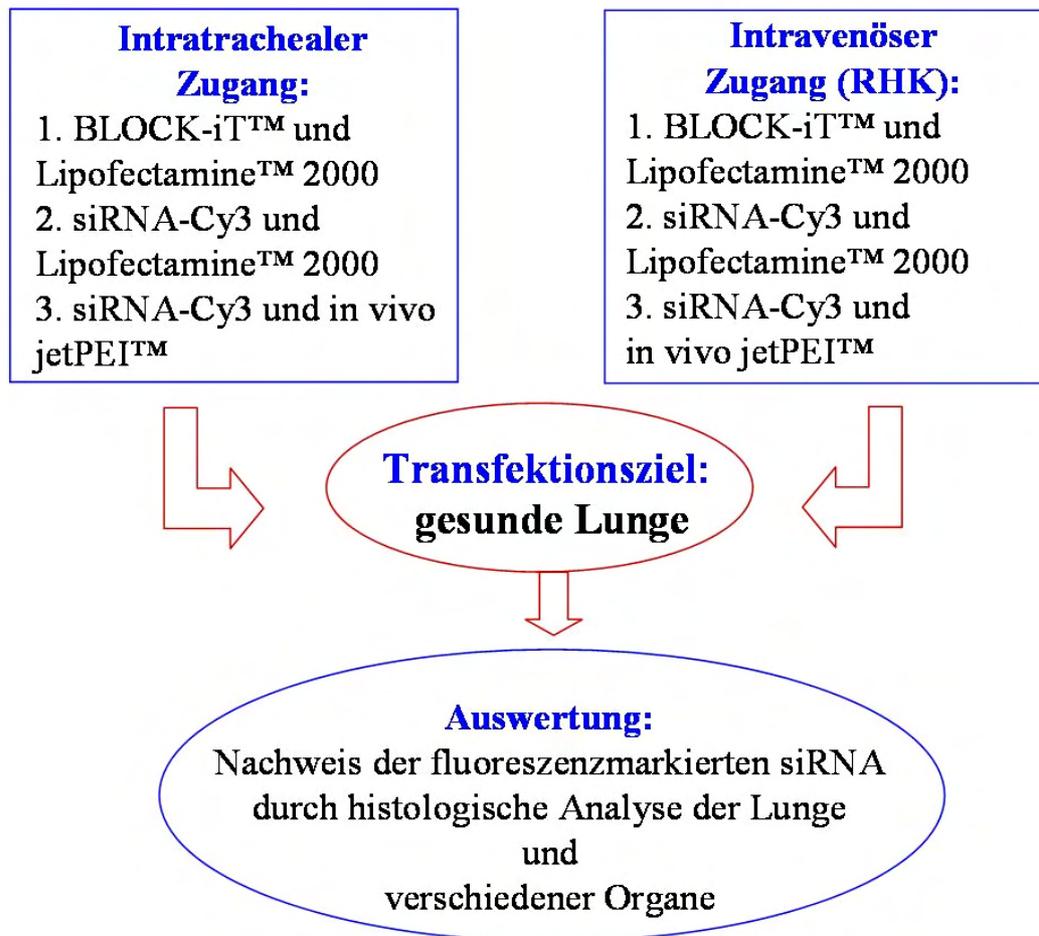


Abbildung 10: Transfektion der gesunden Lunge

Näheres dazu im Text.

4.2.1.1. Lungentransfektion mit der grün fluoreszenzmarkierten siRNA

Über den implantierten Rechtsherzkatheter verabreichte BLOCK-iT™-siRNA mit Lipofectamine™ 2000 waren, wie in der Abbildung 11 zu sehen, einzelne Zellen im Zellkern signalpositiv. Die BLOCK-iT™-siRNA war bis zu 96 h nach Transfektion nachweisbar. Eine Dosiserhöhung auf 225 µg/Tier dieser siRNA bedingte keine Transfektionseffizienzsteigerung. Auch hier waren im mikroskopischen Bild einzelne grüne Zellen zu sehen. Im Grünfilter sahen wir eine hohe Autofluoreszenz der großen Gefäße der Lunge. Die Lunge, welche mit siRNA-ran transfiziert wurde, war negativ, das heißt, hier war kein grünes Signal vorhanden.

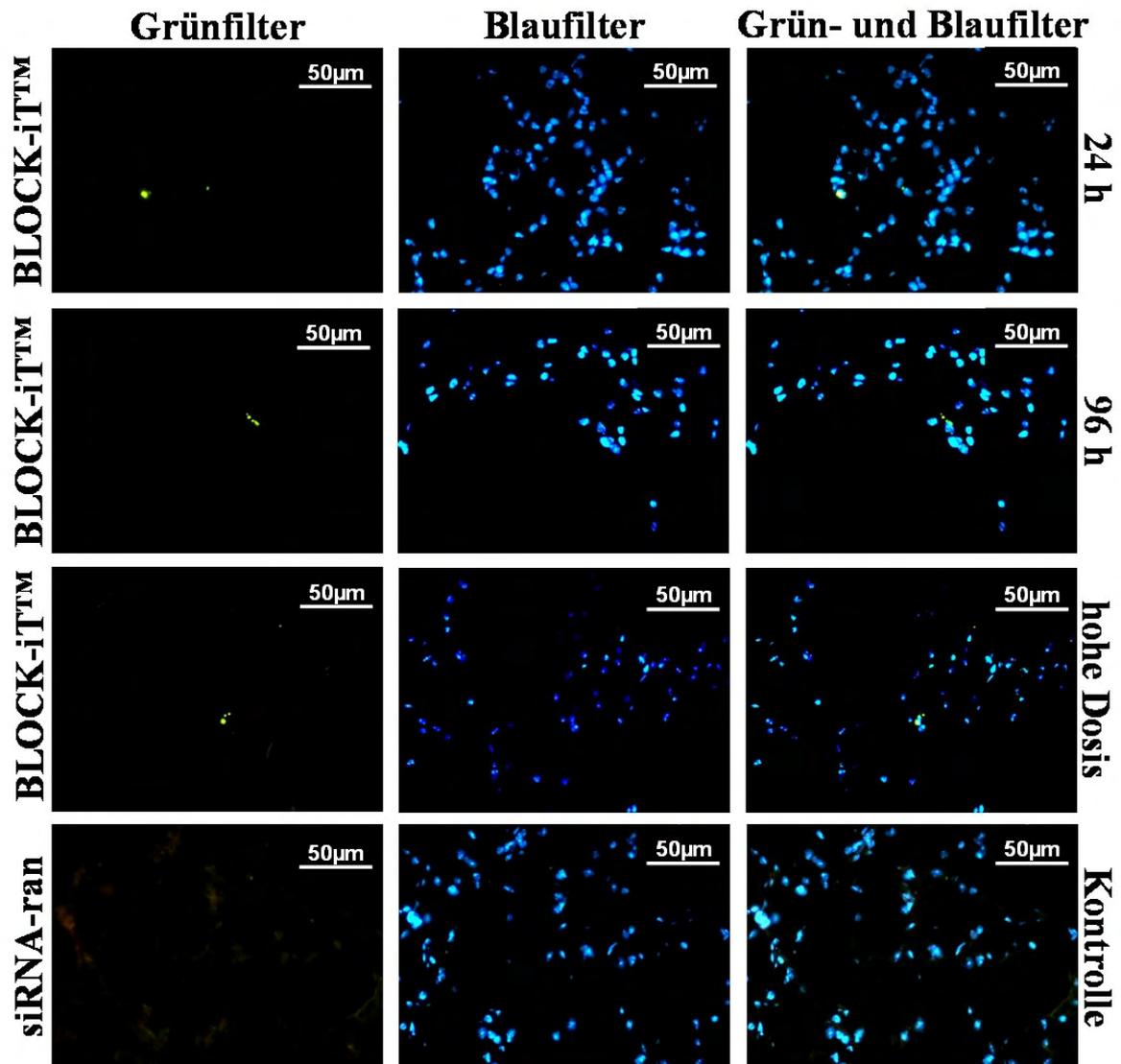


Abbildung 11: Transfektion der gesunden Lunge über den implantierten Rechtsherzkatheter mit der BLOCK-iT™-siRNA und Lipofectamine™ 2000

Von links nach rechts ist jeweils eine Aufnahme der Lunge im Grünfilter, im Blaufilter und mit den zwei Fluoreszenzen überlagert zu sehen ($n=5$). In der ersten Reihe wurde die Lunge nach 24 Stunden untersucht, eine einzelne Zelle ist positiv. In der zweiten Reihe wurde die Lunge nach 96 Stunden untersucht, einzelne Zellen sind positiv. In der ersten und zweiten Reihe wurde eine Dosis von 60 µg/Tier verwendet. In der dritten Reihe wurde die Lunge nach 42 Stunden und einer Dosis von 225 µg/Tier untersucht, eine einzelne Zelle ist positiv. In der vierten Reihe ist das typische Bild der mit siRNA-ran (Kontrolle) transfizierten Lunge zu sehen.

Nach intratrachealer Applikation der BLOCK-iT™-siRNA mit Lipofectamine™ 2000 war das grüne Signal in einigen Zellen zu sehen, welche sich in den Alveolen befanden. Diese Zellen waren von unregelmäßiger Struktur und nicht im Zellverband integriert. Das eigentliche Lungengewebe war nicht transfiziert. Eine Dosiserhöhung auf 225 µg/Tier ergab keine Änderungen der vorangegangenen Ergebnisse. Die Kontrolle war signalnegativ (Abb. 12).

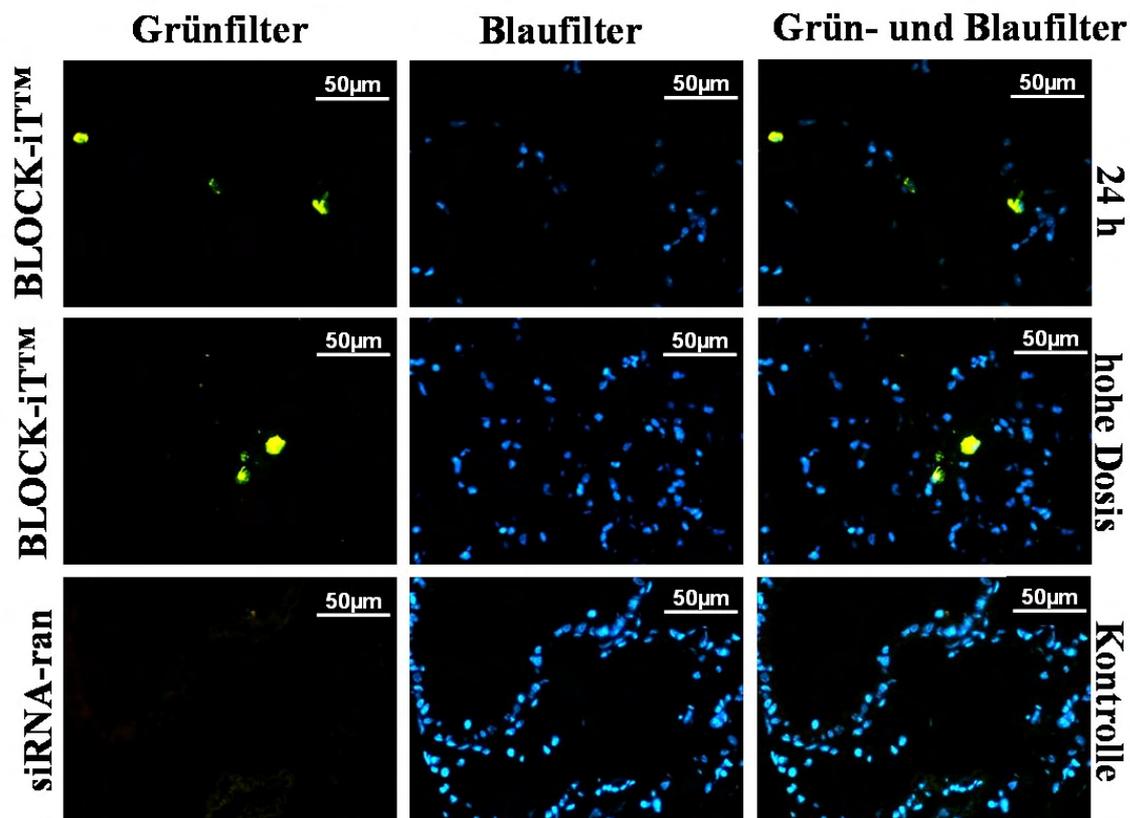


Abbildung 12: Transfektion der gesunden Lunge über intratracheale Applikation der BLOCK-iT™-siRNA und Lipofectamine™ 2000

Von links nach rechts ist jeweils eine Aufnahme der Lunge im Grünfilter, im Blaufilter und mit den zwei Fluoreszenzen überlagert zu sehen (n=5). In der ersten Reihe wurde die Lunge nach 24 Stunden bei einer Dosis von 60 µg/Tier untersucht, einige Zellen sind positiv. In der zweiten Reihe wurde die Lunge nach 24 Stunden und einer Dosiserhöhung auf 225 µg/Tier untersucht, einzelne Zellen sind positiv. In der dritten Reihe wurde die Lunge der Kontrolle untersucht, es sind keine positiven Signale sichtbar.

4.2.1.2. Lungentransfektion mit rot fluoreszenzmarkierter siRNA

Nach Transfektion von siRNA-Cy3 mit Lipofectamine™ 2000 über den implantierten Rechtsherzkatheter waren einige Bereiche der Lunge im Vergleich zur Kontrolle signalpositiv. Das positive Signal war in Zellen zu finden, welche im Zellverband auftraten und sich im Bereich der Alveolarsepten befanden, somit könnte es sich um Pneumozyten handeln. Außerdem war das positive Signal in der Wand der Bronchien und der Blutgefäße zu finden. In der Abbildung 13 sind die transfizierten Zellen mit deutlich rotem Signal im Zytoplasma zu sehen.

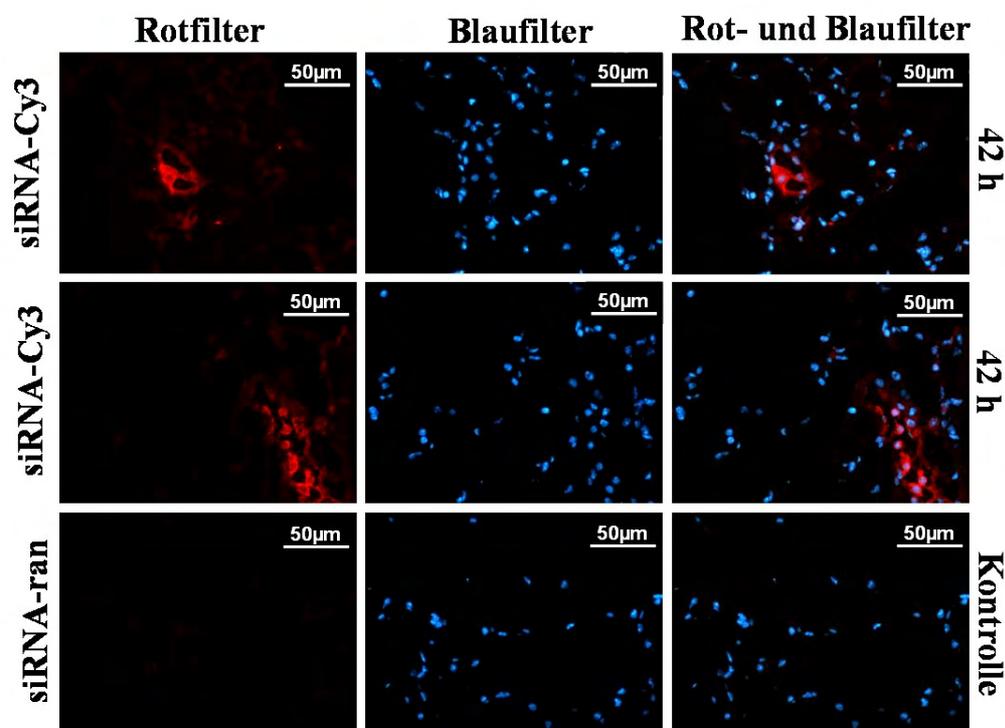


Abbildung 13: Transfektion der gesunden Lunge über den implantierten Rechtsherzkatheter mit siRNA-Cy3 und Lipofectamine™ 2000

Von links nach rechts ist jeweils eine Aufnahme der Lunge im Rotfilter, im Blaufilter und mit den zwei Fluoreszenzen überlagert zu sehen (n=5). In der ersten und zweiten Reihe wurde die Lunge nach 42 Stunden untersucht, einige Zellen sind positiv. Es wurde eine Dosis von 25 µg/Tier verwendet. In der dritten Reihe wurde die Lunge der Kontrolle untersucht, es sind keine positiven Signale sichtbar.

Gehirn, Milz, Leber, Nieren und Skelettmuskulatur waren nach Transfektion über den implantierten Rechtsherzkatheter mit siRNA-Cy3 mit Lipofectamine™ 2000 im Vergleich zur Kontrolle (siRNA-ran) signalnegativ und damit nicht transfiziert (Abb. 14). Die Organe wurden 42 Stunden nach der Transfektion und einer siRNA-Dosis von 25 µg/Tier analysiert.

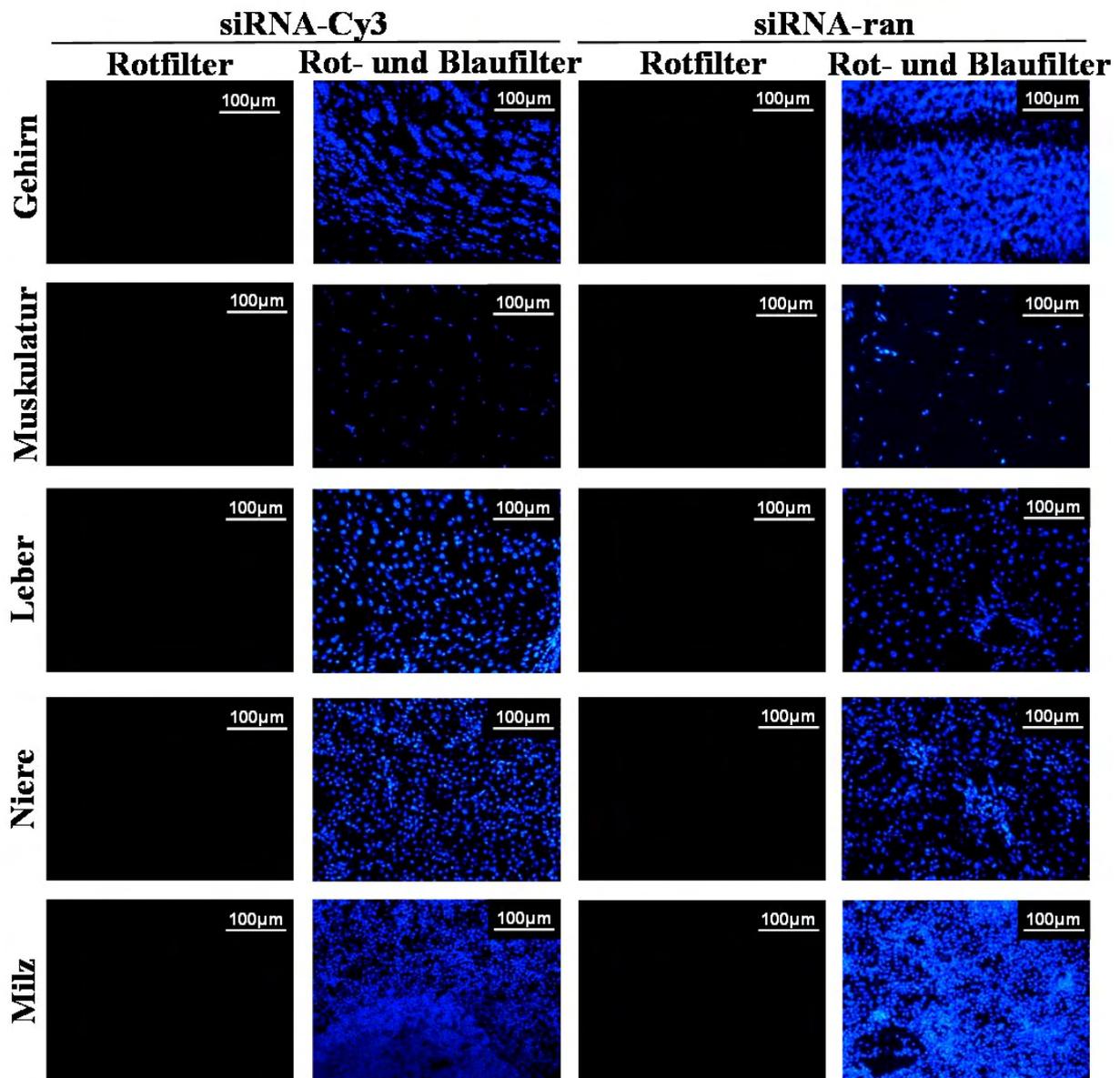


Abbildung 14: Untersuchung der Organe nach Transfektion mit siRNA-Cy3 und Lipofectamine™ 2000 über den implantierten Rechtsherzkatheter

Von links nach rechts: eine Aufnahme im Rotfilter und eine Aufnahme mit den zwei Fluoreszenzen überlagert des siRNA-Cy3 transfizierten Tieres, dann eine Aufnahme im Rotfilter und eine Aufnahme mit den zwei Fluoreszenzen überlagert der Kontrolle (n=5). In der ersten Reihe das Gehirn, kein positives Signal. In der zweiten Reihe die Skelettmuskulatur, kein positives Signal. In der dritten Reihe die Leber, kein positives Signal. In der vierten Reihe die Niere, kein positives Signal. In der fünften und letzten Reihe die Milz, kein positives Signal.

Nach Transfektion von siRNA-Cy3 mit *in vivo* jetPei™ über den implantierten Rechtsherzkatheter waren einige Bereiche der Lunge signalpositiv. In der Abbildung 15 ist das rote Signal in der Gefäß- und in der Bronchuswand zu sehen. Die Transfektionszeit betrug 42 Stunden und die siRNA-Dosis 25 µg/Tier. Nach dem Verabreichen einer um den Faktor 5 erhöhten Dosis war die Transfektionseffizienz gleich. Diese höhere Dosis wurde von den Tieren gut vertragen.

Die Transfektion von siRNA-Cy3 mit Lipofectamine™ 2000 im Vergleich zur Transfektion von siRNA-Cy3 mit *in vivo* jetPEI™ erschien bei gleicher Applikationsform über den implantierten Rechtsherzkatheter gleichwertig.

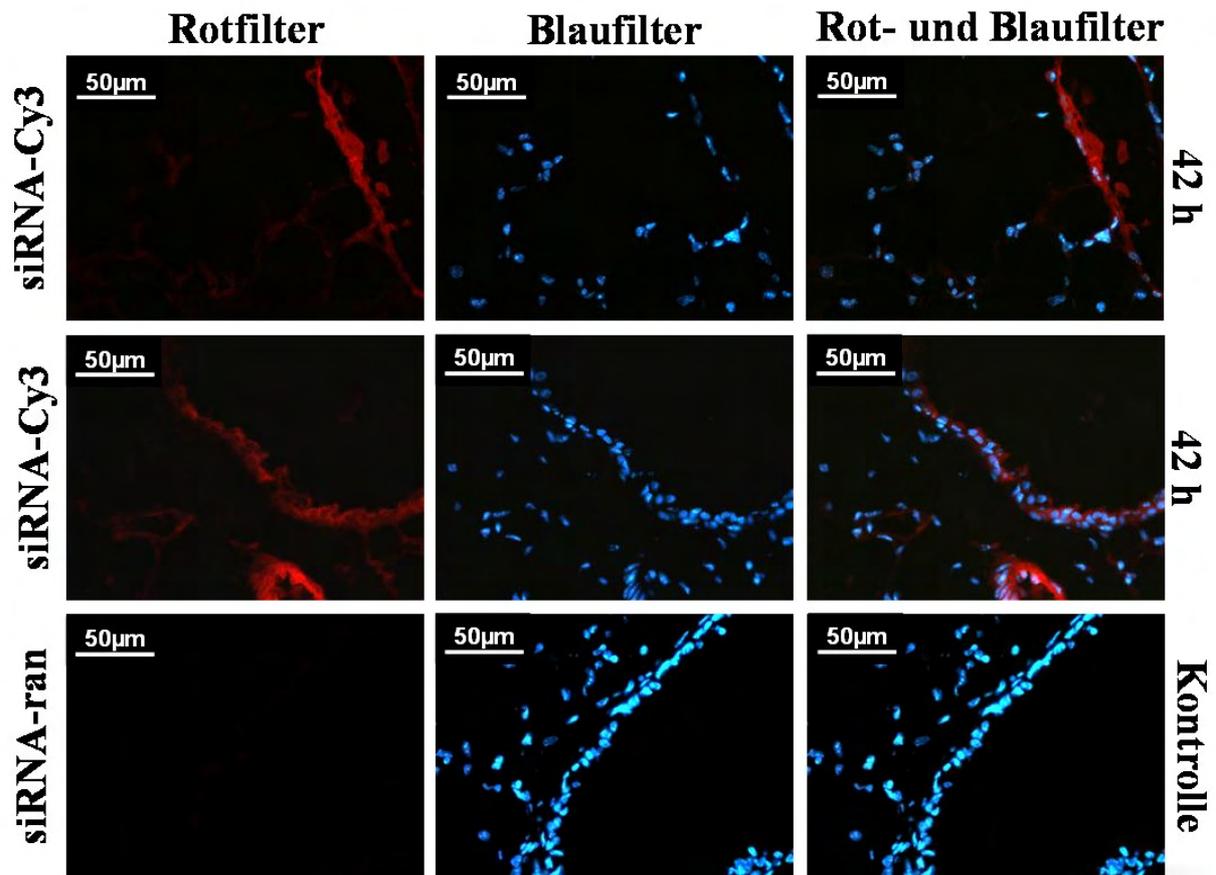


Abbildung 15: *Transfektion der gesunden Lunge über den implantierten Rechtsherzkatheter mit siRNA-Cy3 und in vivo jetPEI™*

Von links nach rechts ist jeweils eine Aufnahme der Lunge im Rotfilter, im Blaufilter und mit den zwei Fluoreszenzen überlagert zu sehen ($n=5$). In der ersten Reihe wurde die Lunge nach 42 Stunden untersucht, einige Zellen sind positiv. Es wurde eine Dosis von 25 µg/Tier verwendet. In der zweiten Reihe wurde die Lunge nach 42 Stunden untersucht; positive Signale in der Bronchus- und Gefäßwand. Hier wurde eine fünffach höhere Dosis verwendet. In der dritten Reihe wurde die Lunge der Kontrollgruppe untersucht. Es sind keine positiven Signale erkennbar.

Die weiteren untersuchten Organe nach Transfektion von siRNA-Cy3 mit in vivo jetPEI™ über den implantierten Rechtsherzkatheter waren ebenso wie die Kontrolle signalnegativ. Die Transfektionszeit betrug 42 Stunden und die siRNA-Dosis betrug 25 µg/Tier. Nur bei Verwendung der um den Faktor 5 erhöhten Dosis waren einige Zellen der Milz signalpositiv.

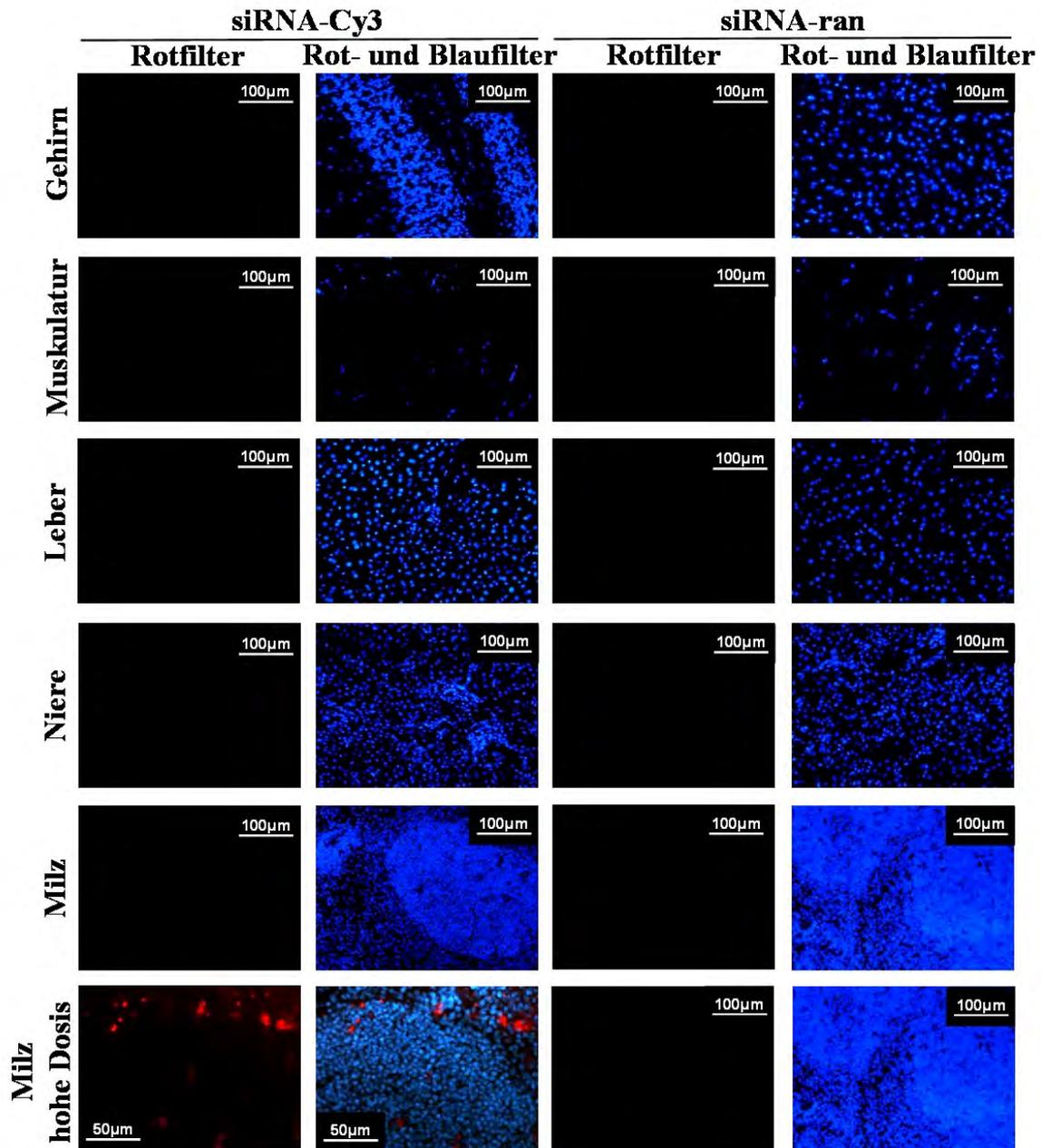


Abbildung 16: Untersuchung der Organe nach Transfektion mit siRNA-Cy3 und in vivo jetPEI™ über den implantierten Rechtsherzkatheter

Von links nach rechts: eine Aufnahme im Rotfilter und eine Aufnahme mit den zwei Fluoreszenzen überlagert des siRNA-Cy3 transfizierten Tieres, dann eine Aufnahme im Rotfilter und mit den zwei Fluoreszenzen überlagert der Kontrolle (n=5). In der ersten Reihe das Gehirn, kein positives Signal. In der zweiten Reihe die Skelettmuskulatur, kein positives Signal. In der dritten Reihe die Leber, kein positives Signal. In der vierten Reihe die Niere, kein positives Signal. In der fünften Reihe die Milz, kein positives Signal. In der sechsten und letzten Reihe die Milz, nach Transfektion mit der um den Faktor 5 erhöhten Dosis einige positive Zellen.

Nach intratrachealer Applikation von siRNA-Cy3 mit Lipofectamine™ 2000 und einer siRNA-Dosis von 25 µg/Tier fand man das rote Signal in Zellen, welche vor allem extrazellulär in den Alveolen zu finden waren. Die Kontrolle war signalnegativ (Abb. 17). Die Transfektionszeit lag bei 42 Stunden. Auf Grund dieses Ergebnisses wurde eine bronchoalveoläre Lavage durchgeführt, da die Vermutung vorlag, dass es sich bei den positiven Zellen um Makrophagen handeln könnte.

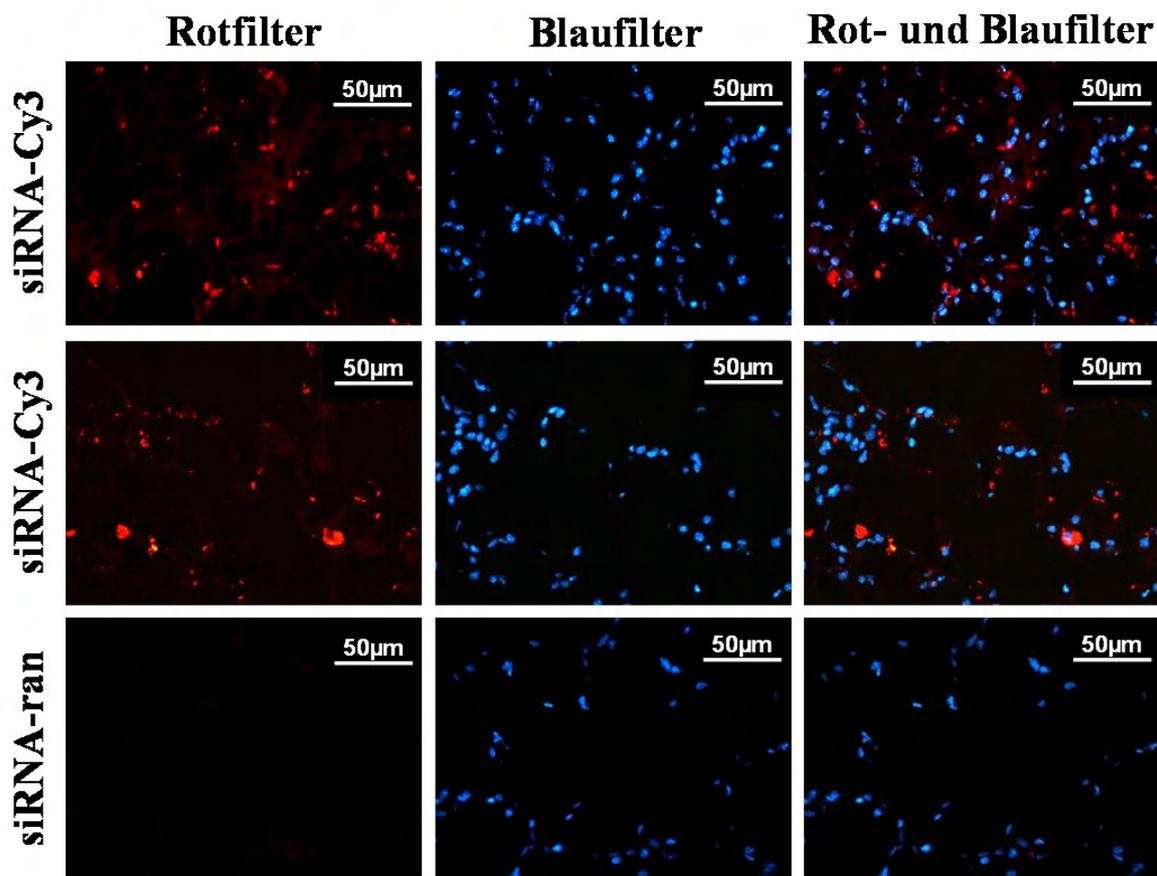


Abbildung 17: Transfektion der gesunden Lunge über intratracheale Applikation der siRNA-Cy3 und Lipofectamine™ 2000

Von links nach rechts ist jeweils eine Aufnahme der Lunge im Rotfilter, im Blaufilter und mit den zwei Fluoreszenzen überlagert zu sehen (n=5). In der ersten und zweiten Reihe wurde die Lunge nach 42 Stunden untersucht, einige Zellen sind positiv. Es wurde eine Dosis von 25 µg/Tier verwendet. In der dritten Reihe wurde die Lunge der Kontrolle untersucht, es sind keine positiven Signale erkennbar.

In der Durchflusszytometrie waren die aus der bronchoalveolären Lavage gewonnenen Zellen nach intratrachealer Applikation mit siRNA-Cy3 und Lipofectamine™ 2000 zu ca. 45% signalpositiv (Abb. 18). Die Analyse der Zellen in Hinblick auf ihre Größe und Binnenstruktur (Granularität des Zytoplasmas, Größe des Zellkerns, usw.) weist auf Makrophagen hin. Die Transfektionszeit betrug 42 Stunden und die siRNA-Dosis lag bei 25 µg/Tier.

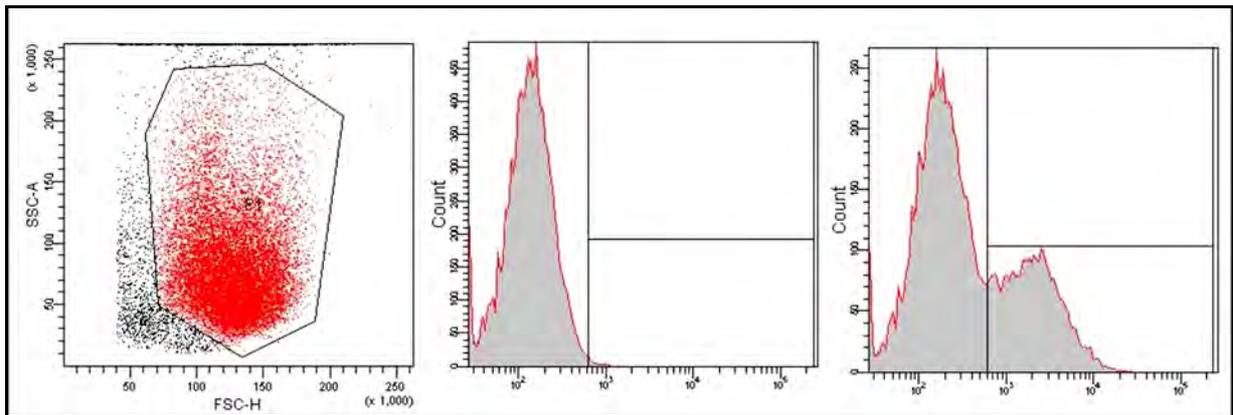


Abbildung 18: Durchflusszytometrie aus der bronchoalveolären Lavage gewonnener Zellen nach Transfektion der gesunden Lunge über intratracheale Applikation der siRNA-Cy3 mit Lipofectamine™ 2000

Rechts sieht man als Beispiel das Ergebnis nach Detektion der Größe (FSC-H, forward scatter height) und der Binnenstruktur (Granularität des Zytoplasmas, Größe des Zellkerns, usw.) (SSC-A, side scatter area) der gewonnenen Zellen und der Bestimmung der Makrophagen (rot markiert) als Zielzellpopulation zu weiteren Messungen rechts. Dabei wurde erst, wie in der Mitte zu sehen ist, die Zellpopulation der Kontrolle nach Zellzahl und Fluoreszenz untersucht, anschließend die Population des mit siRNA-Cy3 transfizierten Tieres untersucht (rechts). So ist zu bestimmen, dass ca. 45% der Gesamtmakrophagen (rechts) transfiziert waren.

Die weiteren untersuchten Organe waren nach intratrachealer Applikation von siRNA-Cy3 mit Lipofectamine™ 2000 ebenso wie die Kontrolle signalnegativ (Abb. 19). Die Transfektionszeit betrug 42 Stunden und die siRNA-Dosis lag bei 25 µg/Tier.

Nach intratrachealer Applikation von siRNA-Cy3 mit in vivo jetPEI™ und einer Dosis von 25 µg/Tier starben alle Tiere kurz nach Applikation. Die Kontrolltiere verstarben ebenfalls.

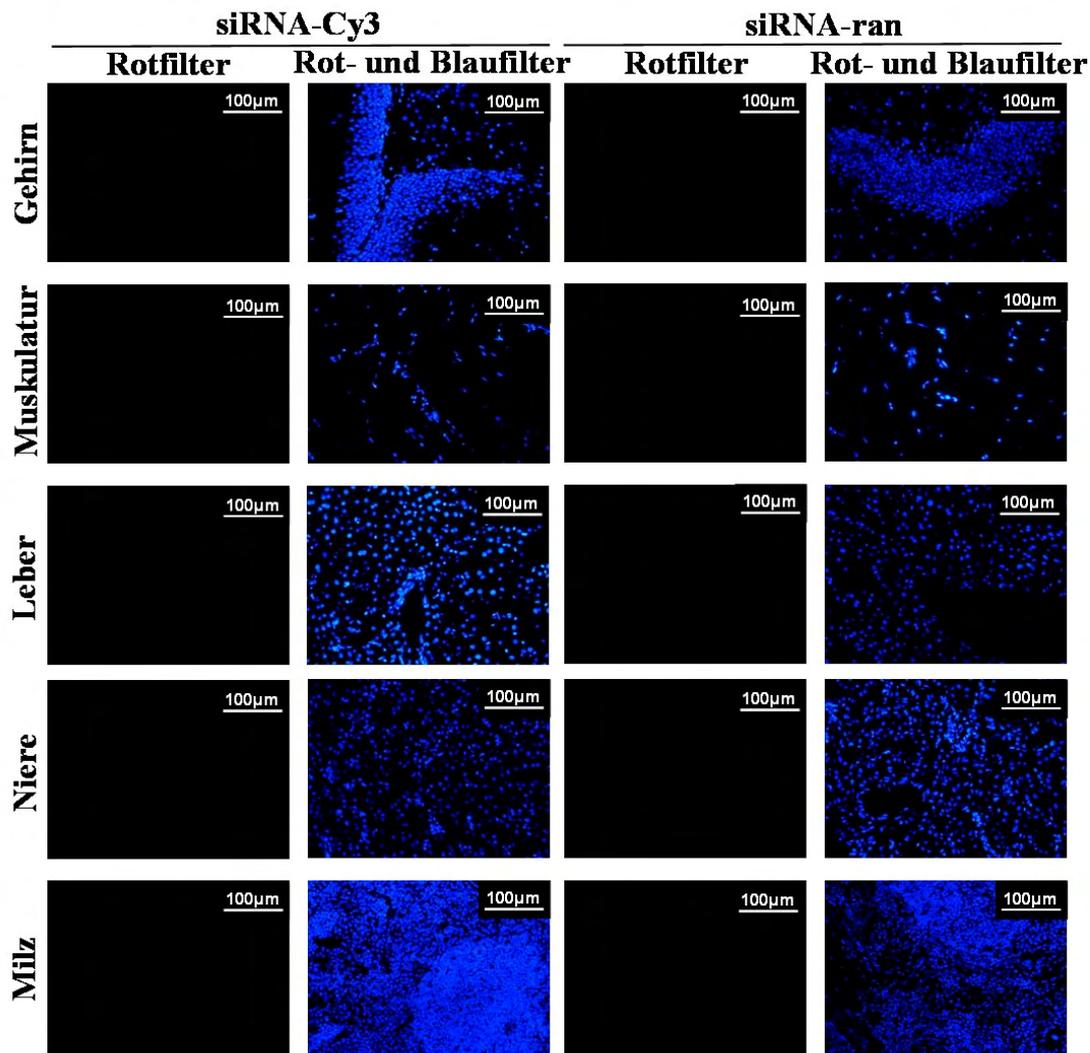


Abbildung 19: Untersuchung der Organe nach Transfektion mit siRNA-Cy3 und Lipofectamine™ 2000 nach intratrachealer Applikation

Von links nach rechts: eine Aufnahme im Rotfilter und eine Aufnahme mit den zwei Fluoreszenzen überlagert des siRNA-Cy3 transfizierten Tieres, dann eine Aufnahme im Rotfilter und mit den zwei Fluoreszenzen überlagert der Kontrolle (n=5). In der ersten Reihe das Gehirn, kein positives Signal. In der zweiten Reihe die Skelettmuskulatur, kein positives Signal. In der dritten Reihe die Leber, kein positives Signal. In der vierten Reihe die Niere, kein positives Signal. In der fünften und letzten Reihe die Milz, kein positives Signal.

4.2.2. siRNA-Transfektion des Lewis-Lung-Karzinoms (LLC-Modell)

Zehn Tage nach Erzeugung des Lewis-Lung-Karzinoms in der Lunge der Maus wurden die Mäuse sowohl über den intratrachealen Zugang, als auch über den venösen Zugang (RHK) mit der siRNA-Cy3 transfiziert. Die jeweilige Kontrollgruppe erhielt siRNA-ran mit dem jeweiligen Transfektionsreagenz. Die siRNA wurde in einer Dosis von 25 µg/Tier verabreicht.

Im Falle des intratrachealen Zugangs wurde auf das Transfektionsreagenz in vivo jetPEI™ aufgrund der vorangegangenen Ergebnisse verzichtet, da hier alle Tiere starben.

Die Lungen wurden 42 Stunden nach der Transfektion histologisch analysiert (Abb. 20).

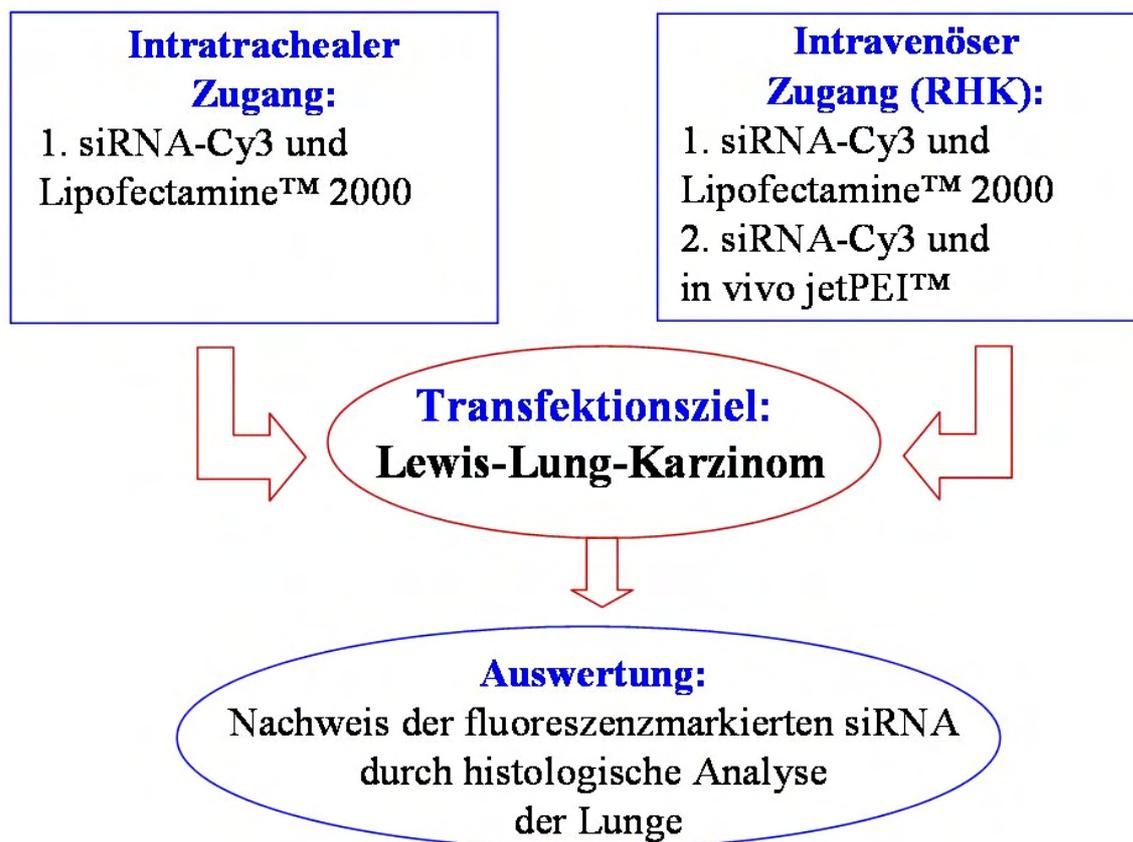


Abbildung 20: Transfektion des LLC-Modells

Näheres dazu im Text.

4.2.2.1. Transfektion des LLC-Modells über den implantierten Rechtsherzkatheter

Nach Transfektion von siRNA-Cy3 mit Lipofectamine™ 2000 über den implantierten Rechtsherzkatheter waren einige Bereiche der Lunge signalpositiv. Außerdem sah man eine Akkumulation des Signals im Lungentumor (Abb. 21).

Nach Transfektion von siRNA-Cy3 mit in vivo jetPEI™ über den implantierten Rechtsherzkatheter waren ebenfalls einige Bereiche der Lunge signalpositiv, außerdem sah man eine Akkumulation des Signals im Lungentumor. In der Abbildung 22 sieht man deutlich das transfizierte Gefäß und die umliegenden signalpositiven Tumorzellen.

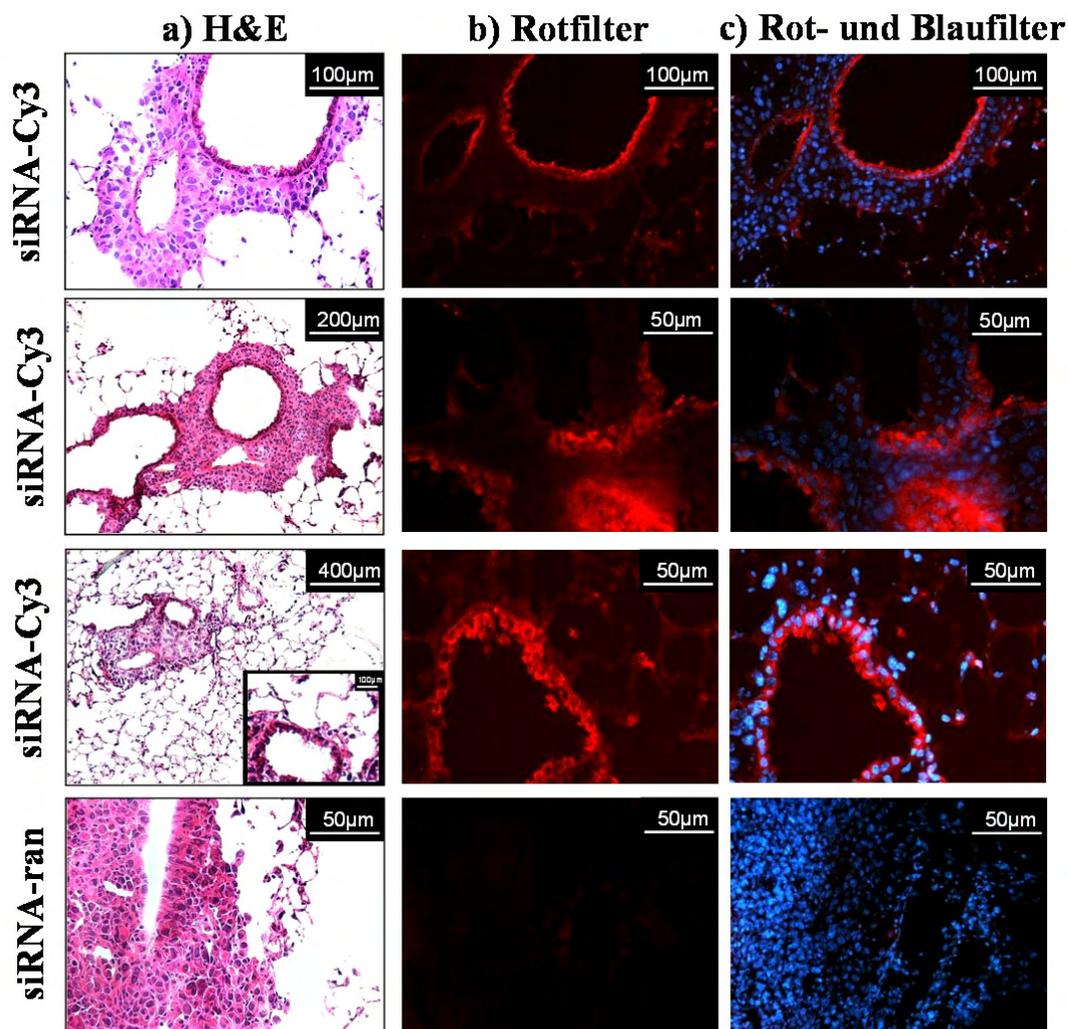


Abbildung 21: Transfektion des Lewis-Lung-Karzinoms der Lunge über den implantierten Rechtsherzkatheter mit siRNA-Cy3 und Lipofectamine™ 2000

Von links nach rechts ist jeweils eine Aufnahme des Lungentumors zu sehen: a) H&E-Aufnahme b) im Rotfilter, c) beide Fluoreszenzen überlagert (n=5). Es wurde eine Dosis von 25 µg/Tier verwendet und die Tiere wurden 42 Stunden nach Transfektion untersucht. In der ersten Reihe sind der Bronchus und das Gefäß im Tumor signalpositiv. In der zweiten Reihe ist links im H&E-Bild der Tumor und das umliegende normale Lungengewebe zu sehen, rechts davon ist neben den signalpositiven Bronchien auch das Tumorgewebe signalpositiv. In der dritten Reihe ist links im H&E-Bild erneut der Tumor und das umliegende Lungengewebe zu sehen, rechts davon sieht man den neben dem transfizierten Bronchus im normalen Lungengewebe, angrenzend an das Tumorgewebe einzelne transfizierte Zellen (vermutlich Pneumozyten). In der vierten und letzten Reihe ist der Kontrolltumor dargestellt, der Tumor ist signalnegativ.

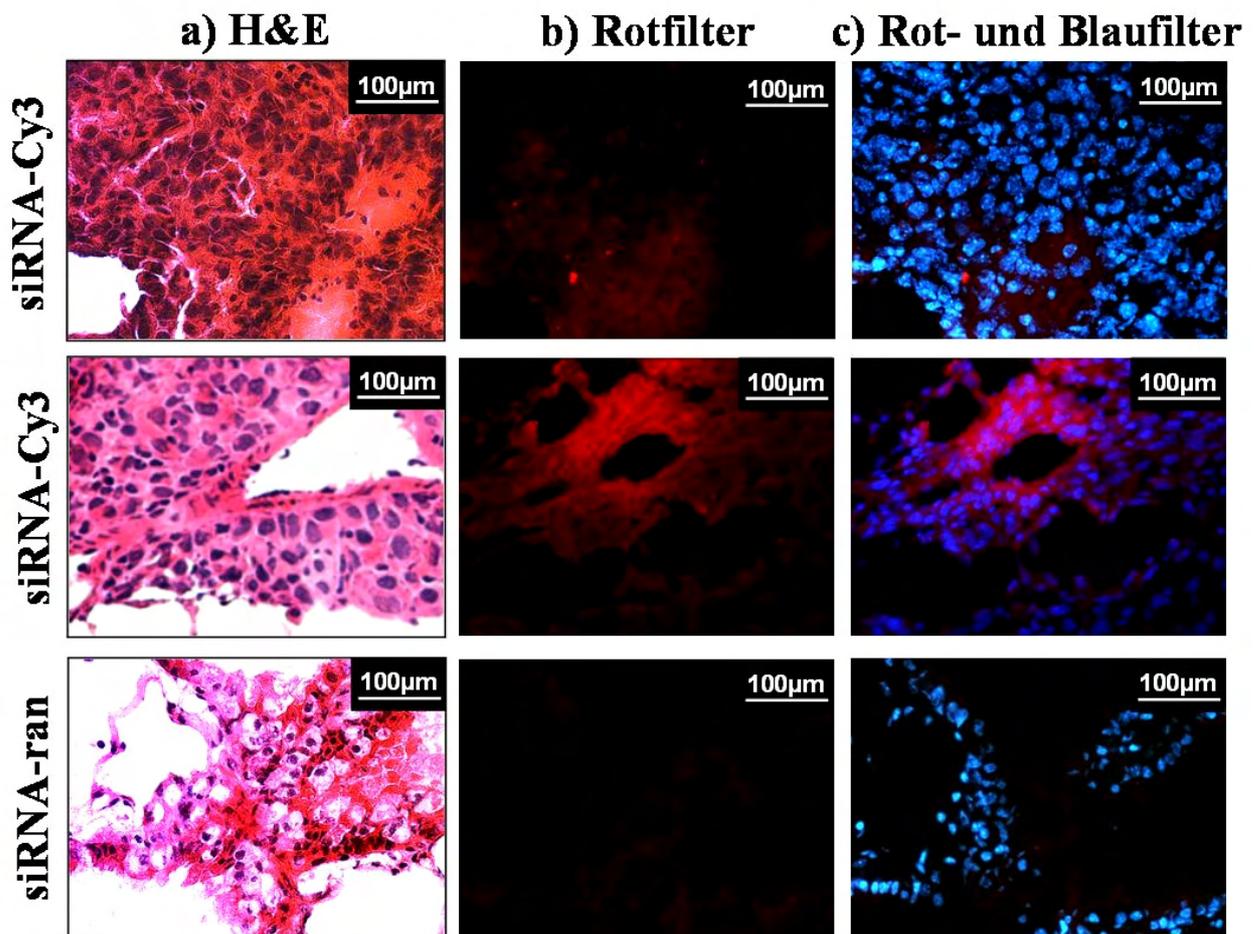


Abbildung 22: Transfektion des Lewis-Lung-Karzinoms der Lunge über den implantierten Rechtsherzkatheter mit siRNA-Cy3 und *in vivo* jetPEI™

Von links nach rechts ist jeweils eine Aufnahme des Lungentumors zu sehen: a) H&E-Aufnahme b) im Rotfilter, c) beide Fluoreszenzen überlagert ($n=5$). Es wurde eine Dosis von 25 µg/Tier verwendet und die Tiere wurden 42 Stunden nach Transfektion untersucht. In der ersten Reihe ist das Tumorgewebe signalpositiv. In der zweiten Reihe ist das Gefäß im Lungentumor und das umliegende Tumorgewebe signalpositiv. In der dritten und letzten Reihe ist der Kontrolltumor dargestellt, der Tumor ist signalnegativ.

4.2.2.2. Intratracheale Transfektion des LLC-Modells

Nach intratrachealer Applikation der siRNA-Cy3 mit Lipofectamine™ 2000 war der Lungentumor nicht transfiziert, nur einige Makrophagen der Lunge waren signalpositiv (Abb. 23).

Auf die Applikation von siRNA-Cy3 mit *in vivo* jetPEI™ wurde aufgrund der vorhergehenden Ergebnisse, dem Versterben der Tiere nach Applikation, verzichtet.

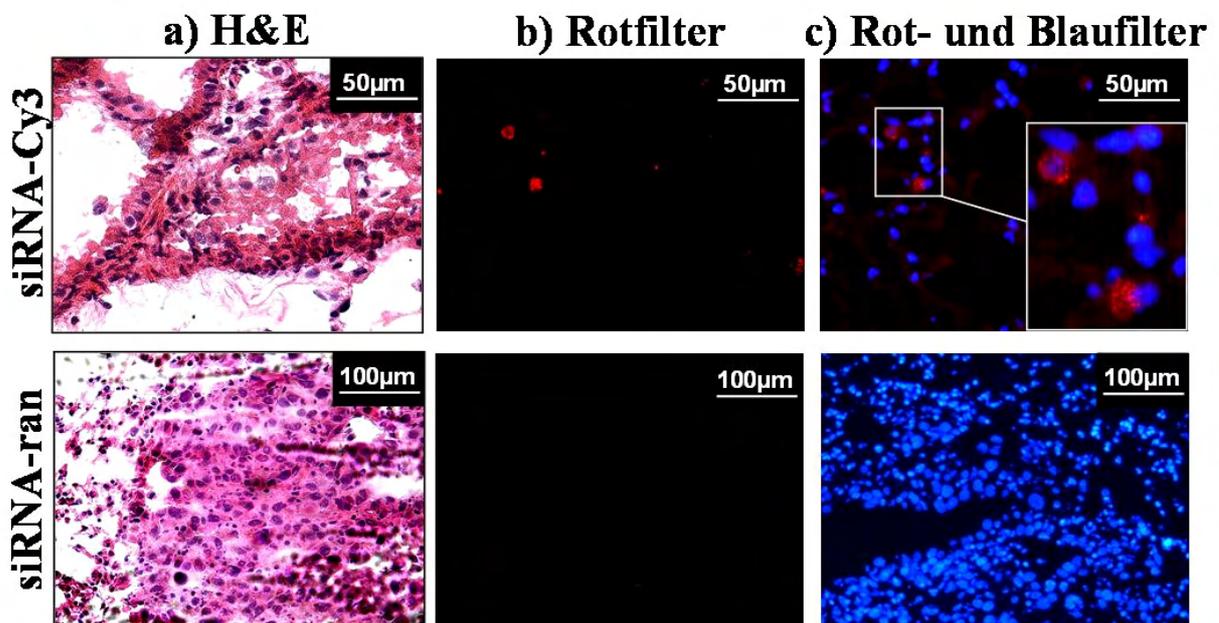


Abbildung 23: Transfektion Lewis-Lung-Karzinoms der Lunge nach intratrachealer Applikation von siRNA-Cy3 und Lipofectamine™ 2000

Von links nach rechts ist jeweils eine Aufnahme des Lungentumors zu sehen: a) H&E-Aufnahme b) im Rotfilter, c) beide Fluoreszenzen überlagert ($n=5$). Es wurde eine Dosis von 25 µg/Tier verwendet und die Tiere wurden 42 Stunden nach Transfektion untersucht. In der ersten Reihe sind nur einzelne Zellen signalpositiv. In der zweiten Reihe ist der Kontrolltumor dargestellt, der Tumor ist signalnegativ.

4.2.3. siRNA-Transfektion des humanen Adenokarzinoms am subkutanen Xenograftmodell der Maus (A549-Modell)

Nach dem Erreichen eines Tumolvolumens von 100 mm³ wurde zunächst mit der fluoreszenzmarkierten siRNA (siRNA-Cy3) und dem Transfektionsreagenz in vivo jetPEI™ das subkutane A549-Modell intraperitoneal transfiziert. Als Kontrolle wurde eine randomisierte siRNA (siRNA-ran) mit dem entsprechenden Transfektionsreagenz benutzt. Dabei wurden siRNA-Dosen von 25 µg/Tier und 125 µg/Tier getestet. Die Transfektion wurde nach 42 Stunden im histologischen Schnitt analysiert. Es wurden zusätzlich die Organe Lunge, Gehirn, Milz, Leber, Nieren und Skelettmuskulatur auf eine mögliche Transfektion hin histologisch analysiert.

Im nächsten Schritt wurde die Transfektionseffizienz der subkutanen A549-Tumoren durch Ausschaltung von HIF-2 α mittels der siRNA in der Real Time PCR überprüft (Abb. 24).

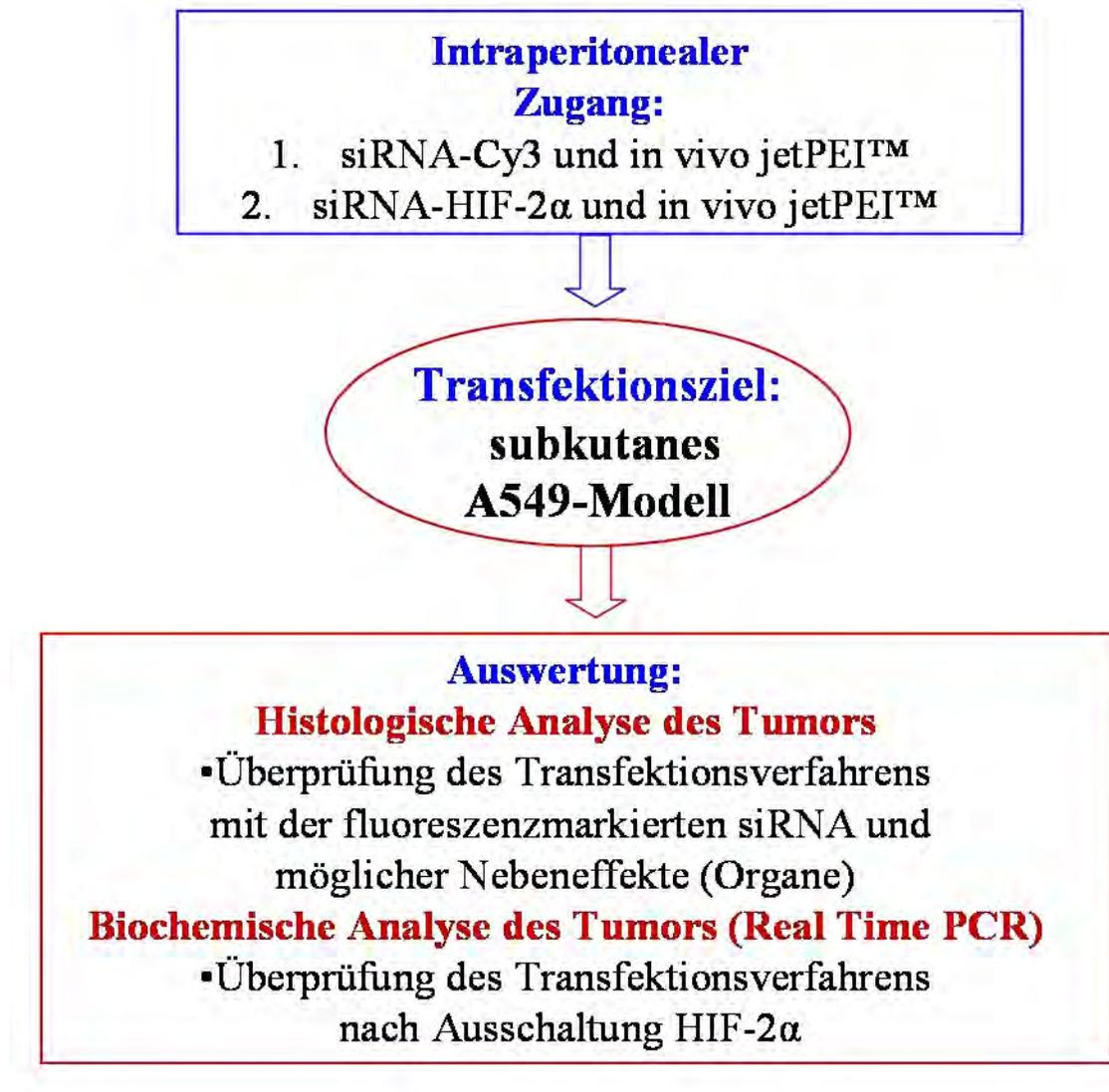


Abbildung 24: Transfektion des subkutanen A549-Modells

Näheres siehe Text.

4.2.3.1. Transfektion des A549-Tumors mit der rot fluoreszenzmarkierten siRNA

Nach intraperitonealer Applikation von siRNA-Cy3 mit in vivo jetPEI™ und einer siRNA-Dosis von 25 µg/Tier war der subkutane Tumor deutlich signalpositiv. Die Dosiserhöhung um den Faktor 5 ergab keine Steigerung der Transfektionseffizienz. Die Tumoren der Kontrollgruppe waren alle signalnegativ.

In der Abbildung 25 sind deutlich die rot fluoreszierenden Tumorzellen zu sehen.

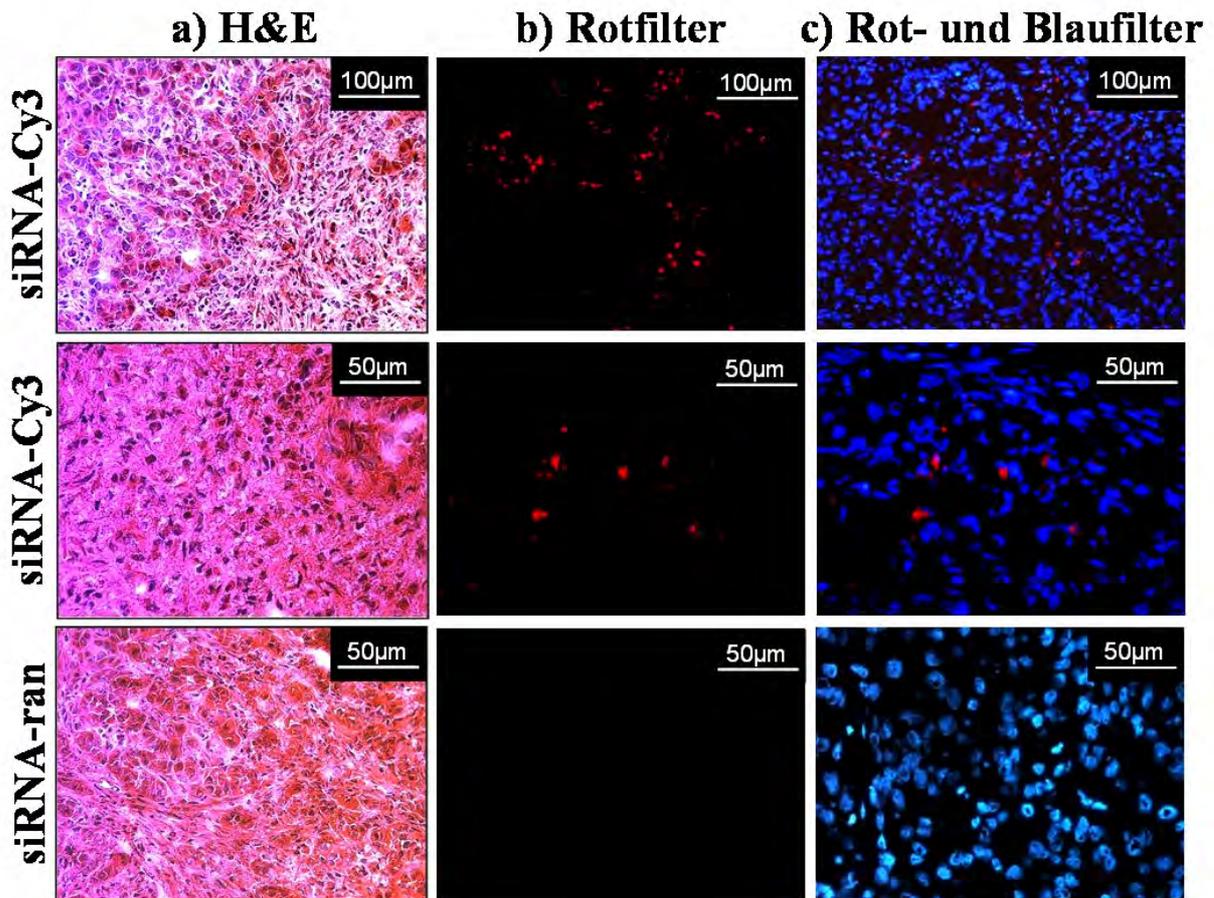


Abbildung 25: Transfektion des subkutanen A549-Tumors mit siRNA-Cy3

Von links nach rechts ist jeweils eine Aufnahme des A549-Tumors zu sehen ($n=5$): a) H&E-Aufnahme b) im Rotfilter, c) beide Fluoreszenzen überlagert. Es wurde eine Dosis von 25 µg/Tier verwendet und die Tiere wurden 42 Stunden nach Transfektion untersucht. In der ersten Reihe sind einige Tumorzellen signalpositiv. In der zweiten Reihe sind die transfizierten Tumorzellen erkennbar. In der dritten und letzten Reihe der Tumor der Kontrolle dargestellt; der Tumor ist signalnegativ.

Nach der intraperitonealen Applikation von siRNA-Cy3 mit in vivo jetPEI™ waren die untersuchten Organe 42 Stunden nach der Transfektion einschließlich der Lunge signalnegativ im Vergleich zur Kontrolle. Auch nach der um den Faktor 5 erhöhten Dosis (Abb. 26) waren die Organe signalnegativ.

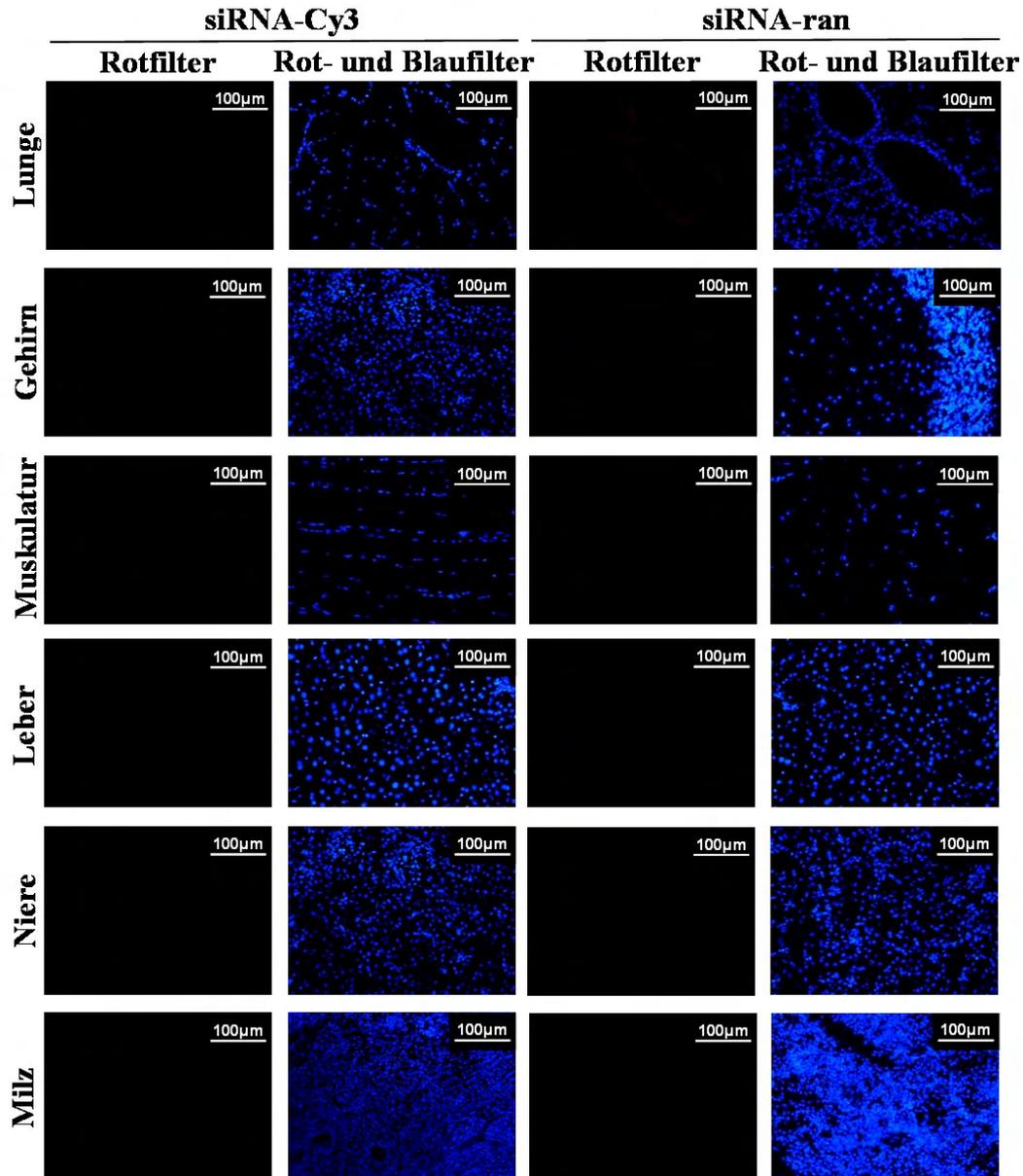


Abbildung 26: Untersuchung der Organe nach intraperitonealer Transfektion mit siRNA-Cy3 und in vivo jetPEI™

Von links nach rechts: eine Aufnahme im Rotfilter und eine Aufnahme mit den zwei Fluoreszenzen überlagert des siRNA-Cy3 transfizierten Tieres, dann eine Aufnahme im Rotfilter und mit den zwei Fluoreszenzen überlagert der Kontrolle (n=5). In der ersten Reihe die Lunge, kein positives Signal. In der zweiten Reihe das Gehirn, kein positives Signal. In der dritten Reihe die Skelettmuskulatur, kein positives Signal. In der vierten Reihe die Leber, kein positives Signal. In der fünften Reihe die Niere, kein positives Signal. In der sechsten und letzten Reihe die Milz, kein positives Signal.

4.2.3.2. Transfektion des humanen Adenokarzinoms am subkutanen Xenograftmodell der Maus mit siRNA-HIF-2 α

Zur Überprüfung des Transfektionsverfahrens des humanen Adenokarzinoms am subkutanen Xenograftmodell der Maus wurde eine Real Time PCR durchgeführt.

In der Real Time PCR aus den subkutanen Tumoren nach zweimaliger intraperitonealer Applikation von siRNA-HIF-2 α mit in vivo jetPEITM im Abstand von 48 h und einer siRNA-Dosis von 25 μ g/Tier wurde im Vergleich zur Kontrolle (siRNA-ran mit in vivo jetPEITM) eine deutliche Reduktion der HIF-2 α mRNA erreicht. Die HIF-1 α mRNA war nach Transfektion nicht reduziert (Abb. 27).

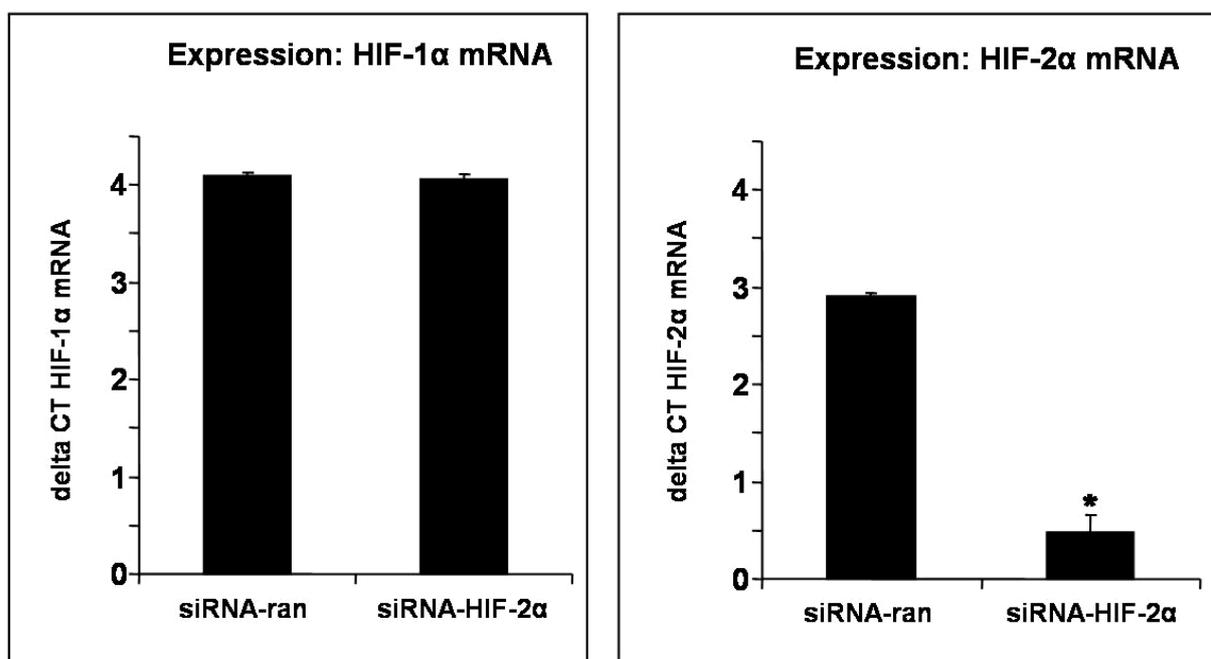


Abbildung 27: Expression von HIF-1 α mRNA und HIF-2 α mRNA nach intraperitonealer Transfektion von siRNA-HIF-2 α und in vivo jetPEITM im subkutanen A549-Tumor

Nach Transfektion von siRNA-HIF-2 α ist eine signifikante Reduktion ($p < 0,05$) der zugehörigen mRNA HIF-2 α im Vergleich zur Kontrolle erreicht. Die mRNA HIF-1 α ist nicht reduziert im Vergleich zur Kontrolle ($n=4$). Alle Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler dargestellt.

4.3. Untersuchung der Bedeutung von HIF-1 α und HIF-2 α für die Tumorprogression des humanen Adenokarzinoms am subkutanen Xenograftmodell der Maus durch Einsatz der siRNA-Technik

In diesem Abschnitt wird der Einfluss von HIF-1 α und HIF-2 α auf die Tumorprogression mit Hilfe des vorherig etablierten siRNA-Transfektionsverfahrens des humanen Adenokarzinoms am subkutanen Xenograftmodell der Maus (A549-Modell) dargestellt. Hier sollte vor allem das Wachstumsverhalten und die Histologie der Tumoren, nämlich Angiogenese, Proliferation und Apoptose im Tumor nach spezifischer Ausschaltung von HIF-1 α und HIF-2 α gezeigt werden.

4.3.1. Wachstumsverhalten der subkutanen A549-Tumoren nach Suppression von HIF-1 α und HIF-2 α mittels der siRNA-Technik

Den Tieren wurden mit dem Erreichen eines Tumolvolumens von 100 mm³ intraperitoneal siRNA gegen HIF-1 α , HIF-2 α und siRNA-ran als Kontrolle mit in vivo jetPEI™ über fünf Wochen zweimal wöchentlich verabreicht und das Tumorwachstum bestimmt.

In diesen Wachstumskurven (Abb. 28) kann man deutlich sehen, dass die Tumoren der siRNA-HIF-2 α -behandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe im Wachstum deutlich zurück blieben. Ab Tag 25 waren statistisch signifikante Unterschiede im Tumorwachstum im Vergleich zur Kontrolle zu sehen. Die Tumoren der siRNA-HIF-1 α -behandelten Gruppe wuchsen statistisch signifikant nicht weniger als die Tumoren der Kontrollgruppe.

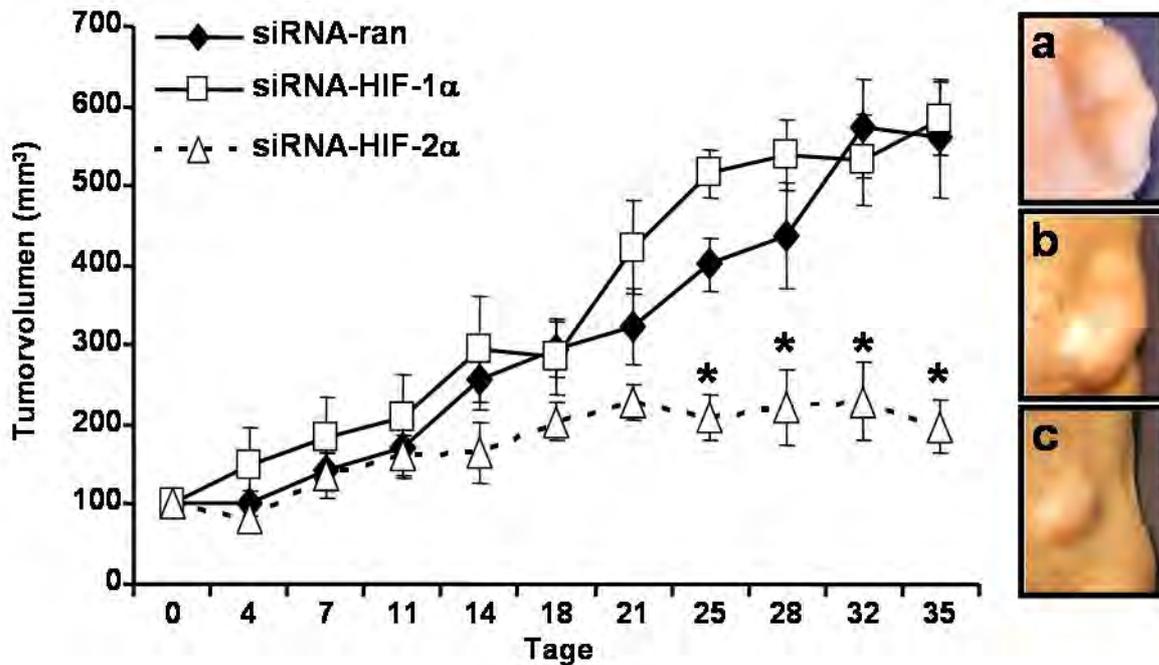


Abbildung 28: Wachstumskurven und Bilder der Tumoren

Hier sind die Wachstumskurven der mit siRNA gegen HIF-1 α - und HIF-2 α -behandelten Tiere über fünf Wochen der Behandlungsdauer abgebildet (n=5).

Die Kontrollgruppe erhielt eine Kontroll-siRNA (siRNA-ran). Tag 0 ist der Startpunkt der Behandlung, hier haben die Tumore im Mittel ein Wachstum von 100 mm³ erreicht. Jeder weitere Wert stellt das mittlere Tumorwachstum der jeweiligen Gruppe an einem weiteren Behandlungstag dar, am Tag 35 wurden die Tiere getötet. Die Bilder (rechts) der Tumoren wurden am Tag 35 aufgenommen. Hierbei wird ein repräsentatives Tier der jeweiligen Gruppe dargestellt:

a) Kontrolle b) siRNA-HIF-1 α c) siRNA-HIF-2 α

Ab Tag 25 ist das Wachstum der siRNA-HIF-2 α -behandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrolle statistisch signifikant reduziert ($p < 0,05$). Alle Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler dargestellt.

4.3.2. Überprüfung der spezifischen Inhibition von HIF-1 α und HIF-2 α mittels Real Time PCR

In der Real Time PCR aus den subkutanen A549-Tumoren, die über fünf Wochen transfiziert wurden (siehe unter 4.3.1.), sah man eine statistisch signifikante Reduktion der jeweils zugehörigen mRNA.

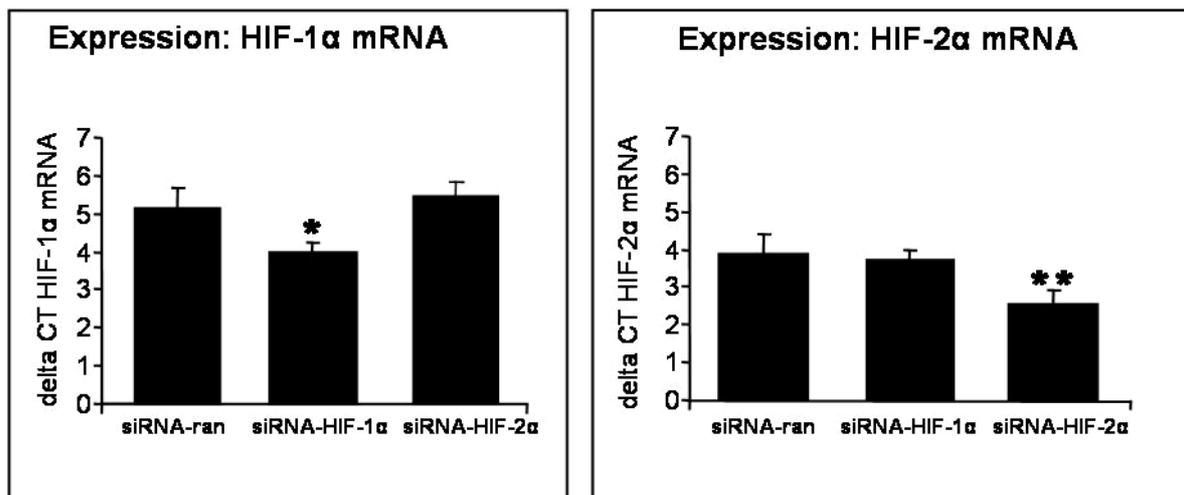


Abbildung 29: Expression von HIF-1 α mRNA und HIF-2 α mRNA nach intraperitonealer Transfektion von siRNA-HIF-1 α und siRNA-HIF-2 α mit *in vivo* jetPEI™ im subkutanen A549-Tumor

Nach Transfektion von siRNA-HIF-1 α ist eine statistisch signifikante Reduktion ($p < 0,05$) der zugehörigen mRNA HIF-1 α im Vergleich zur Kontrolle erreicht. Die mRNA HIF-2 α ist im Vergleich zur Kontrolle nach siRNA-HIF-1 α Transfektion nicht reduziert. Nach Transfektion von siRNA-HIF-2 α ist eine statistisch signifikante Reduktion ($p < 0,005$) der zugehörigen mRNA HIF-2 α im Vergleich zur Kontrolle erreicht. Die mRNA HIF-1 α ist im Vergleich zur Kontrolle nach siRNA-HIF-2 α Transfektion nicht reduziert ($n=5$). Alle Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler dargestellt.

4.3.3. Histologische Auswertung der Angiogenese der subkutanen A549-Tumoren

Die Tumoren aus den Wachstumskurven (siehe 4.3.1.) wurden histologisch aufgearbeitet. Dabei wurden nach Färbung mit CD 31 jeweils 5 Aufnahmen von jedem Tumor im Grünfilter gemacht und die Gefäße, die im Durchmesser kleiner als 100 μm waren, ausgezählt. Der Mittelwert der jeweils untersuchten Gruppen wurde errechnet. Dabei war die Anzahl der kleinen Gefäße (*microvessel density*) in den siRNA-HIF-2 α -behandelten Tumoren im Vergleich zur Kontrollgruppe statistisch signifikant reduziert, während bei der siRNA-HIF-1 α Gruppe kein statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe vorlag (Abb. 30).

4.3.4. Histologische Auswertung der Proliferation der subkutanen A549-Tumoren

Es wurden nach Färbung mit KI 67 jeweils 5 Aufnahmen von jedem Tumor im Grünfilter gemacht, die positiven Zellen detektiert und ins Verhältnis zu den Dapi-positiven Kernen gesetzt. Der Mittelwert der jeweils untersuchten Gruppe wurde errechnet. Dabei war die Proliferation sowohl in den siRNA-HIF-1 α -behandelten Tumoren als auch in den siRNA-HIF-2 α -behandelten Tumoren im Vergleich zur Kontrollgruppe statistisch signifikant reduziert (Abb. 31).

4.3.5. Histologische Auswertung der Apoptose der subkutanen A549-Tumoren

Nach Färbung mit Caspase-3 wurden jeweils 5 Aufnahmen von jedem Tumor im Grünfilter gemacht, die positiven Zellen detektiert und ins Verhältnis der Dapi-positiven Kernen gesetzt. Der Mittelwert der jeweils untersuchten Gruppe wurde errechnet. Dabei war die Apoptose in den siRNA-HIF-2 α -behandelten Tumoren im Vergleich zur Kontrollgruppe statistisch signifikant erhöht, während die siRNA-HIF-1 α -behandelten Tumoren keinen statistisch signifikanten Unterschied in der Apoptose zu der Kontrollgruppe zeigten (Abb. 32).

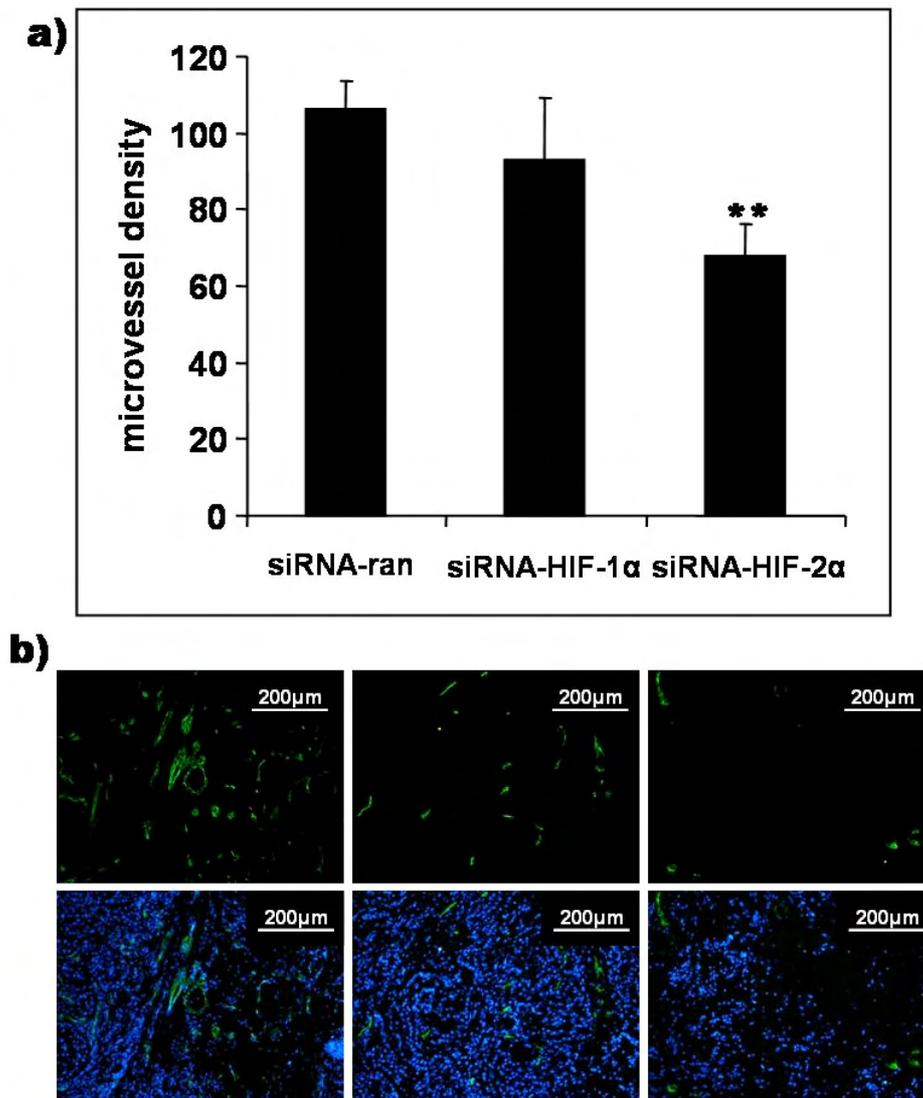


Abbildung 30: Angiogenese

a) Im Diagramm ist der Mittelwert der Anzahl der Gefäße, die kleiner als 100 μm waren, im subkutanen A549-Tumor nach Behandlung mit siRNA gegen HIF-1 α und HIF-2 α und gegen siRNA-ran (Kontrolle) dargestellt ($n=5$). Die Anzahl der Gefäße nach Ausschaltung von HIF-2 α nimmt im Vergleich zu den Tumoren der Kontrollgruppe statistisch signifikant ab ($p=0,003$). Alle Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler dargestellt.

b) repräsentative Aufnahmen im Grünfilter in der ersten Reihe und mit den zwei Fluoreszenzen überlagert in der zweiten Reihe, von links nach rechts: siRNA-ran, siRNA-HIF-1 α und siRNA-HIF-2 α .

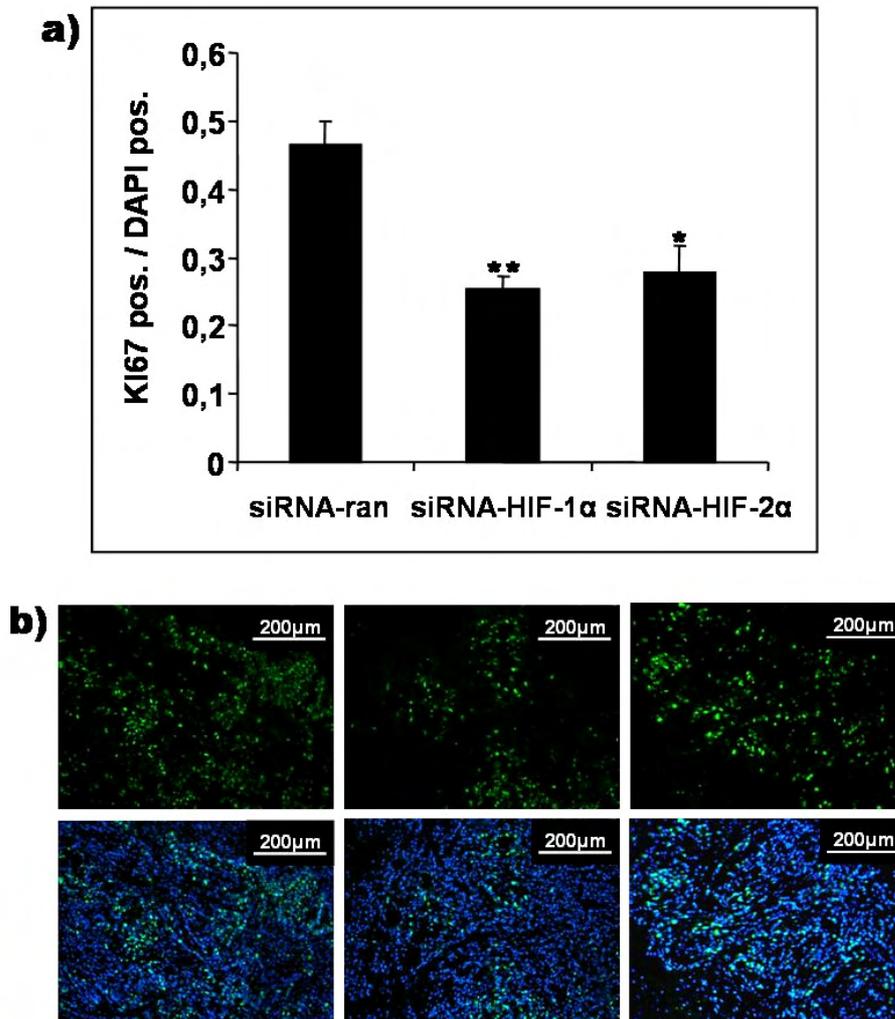


Abbildung 31: Proliferation

a) Im Diagramm ist der Mittelwert der Proliferation (KI 67-positive Zellen im Verhältnis zu den Dapi-positiven Kernen) im subkutanen A549-Tumor nach Behandlung mit siRNA gegen HIF-1 α und HIF-2 α und gegen siRNA-ran (Kontrolle) dargestellt (n=5). Die Proliferation nimmt sowohl unter Behandlung von siRNA-HIF-1 α (p= 0,002) als auch unter Behandlung von siRNA-HIF-2 α (p=0,008) im Vergleich zur Kontrollgruppe statistisch signifikant ab. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler dargestellt.

b) repräsentative Aufnahmen im Grünfilter in der ersten Reihe und mit den zwei Fluoreszenzen überlagert in der zweiten Reihe, von links nach rechts: siRNA-ran, siRNA-HIF-1 α und siRNA-HIF-2 α .

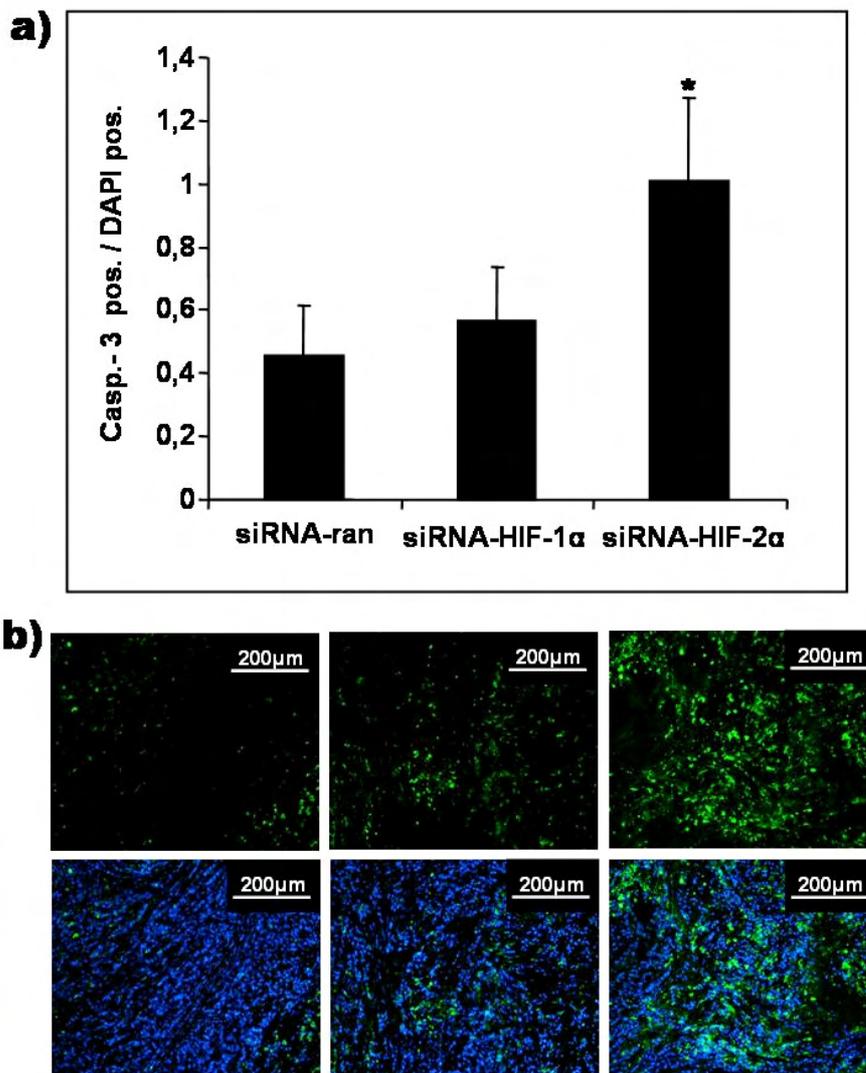


Abbildung 32: Apoptose

a) Im Diagramm ist der Mittelwert der Apoptose (Caspase-3-positive Zellen im Verhältnis zu den Dapi-positiven Kernen) im subkutanen A549-Tumor nach Behandlung mit siRNA gegen HIF-1 α und HIF-2 α und gegen siRNA-ran (Kontrolle) dargestellt (n=5). Die Apoptose nimmt unter Behandlung von siRNA-HIF-2 α im Vergleich zur Kontrollgruppe statistisch signifikant (p=0,05) zu. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler dargestellt.

b) repräsentative Aufnahmen im Grünfilter in der ersten Reihe und mit den zwei Fluoreszenzen überlagert in der zweiten Reihe, von links nach rechts: siRNA-ran, siRNA-HIF-1 α und siRNA-HIF-2 α .

5. Diskussion

Ziel des ersten Teils dieser Arbeit war es, geeignete chemische *in vivo* siRNA-Transfektionsverfahren für die Lunge und das Bronchialkarzinom (LLC-Modell, A549-Modell) zu etablieren.

Zudem wurde ein *in vivo* siRNA-Transfektionsverfahren für das humane Adenokarzinom am subkutanen Xenograftmodell der Maus (A549-Modell) entwickelt.

Ziel des zweiten Teils der Arbeit war es, das etablierte siRNA-Transfektionsverfahren am subkutanen A549-Modell anzuwenden, um die Bedeutung der Hypoxie-induzierbaren Faktoren (HIF-1 α und HIF-2 α) für das Tumorwachstum, sowie für Angiogenese, Proliferation und Apoptose nach Suppression von HIF-1 α und HIF-2 α zu untersuchen.

Zusammenfassend ließen sich im ersten Teil der Arbeit folgende Ergebnisse nachweisen:

Nach intratrachealer (i. t.) Transfektion der fluoreszenzmarkierten siRNA mit Lipofectamine™ 2000 war das eigentliche Lungengewebe nicht transfiziert, nur einige Zellen in den Alveolen waren positiv. Nach Analyse der in der bronchoalveolären Lavage mittels Durchflusszytometrie gewonnener Zellen zeigte sich, dass es sich um Makrophagen handelte und dass 45% der Makrophagen signalpositiv waren. Auch im LLC-Modell waren nur einige Makrophagen positiv. Bei Verwendung des Transfektionsreagens *in vivo* jetPEI™ überlebten die Tiere nach i. t. Applikation nicht. Somit ist festzuhalten, dass sich der i. t. Zugangsweg zur Transfektion der Lunge und des LLC-Modells nicht eignet.

Nach intravenöser Applikation (Rechtsherzkatheter (RHK)) der fluoreszenzmarkierten siRNA waren große Bereiche der Lunge (Gefäß-, Bronchuswand und Zellen in den Alveolarsepten) mit beiden Transfektionsreagenzien signalpositiv. Da die signalpositiven Zellen im Zellverband in den Alveolarsepten vorlagen, kann vermutet werden, dass es sich um Pneumozyten handelte. Ob alle Strukturen der Gefäße und der Bronchien signalpositiv waren, kann nicht mit Sicherheit belegt werden. Das positive Signal ließ sich zumindest in der

Gefäß- und Bronchuswand nachweisen. Während sich im Lungentumormodell (LLC-Modell) bei gleicher Applikationsform sogar eine Akkumulation des Signals vor allem in gefäßnahen Bereichen und in kleineren Tumoren zeigte. Eine Dosiserhöhung um den Faktor 5 der siRNA im Komplex mit *in vivo* jetPEI™ ergab keine Änderung der Transfektionseffizienz. Somit lässt sich festhalten, dass sich der intravenöse Zugangsweg zur Transfektion der Lunge und des LLC-Modells der Maus eignet, wobei der Zugang über den implantierten RHK entscheidend ist.

Das A549-Modell war mittels intraperitonealer (i. p.) Applikation der fluoreszenzmarkierten siRNA mit *in vivo* jetPEI™ mit einer guten Effizienz zu transfizieren. Alle anderen untersuchten Organe waren nicht transfiziert. Nur nach i. v. Applikation unter Verwendung des hohen PEI-Mixes waren einige Zellen der Milz positiv.

Die funktionelle siRNA-Transfektion der subkutanen A549-Tumoren wurde in der Real Time PCR überprüft. Es zeigte sich nach i. p. Applikation von siRNA-HIF-2 α mit *in vivo* jetPEI™ eine signifikante Reduktion der zugehörigen mRNA in den Tumoren im Vergleich zu den Kontrolltumoren.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden die subkutanen A549-Tumoren i. p. mit siRNA-HIF-1 α , siRNA-HIF-2 α und als Kontrolle mit siRNA-ran über 5 Wochen zweimal pro Woche transfiziert. Die siRNA-HIF-2 α -behandelten Tumoren zeigten im Verlauf ein statistisch signifikant reduziertes Wachstum im Vergleich zur Kontrolle. Die Inhibition von HIF-1 α mittels siRNA zeigte keine statistisch signifikante Änderung des Tumorwachstums im Vergleich zur Kontrolle.

In der Real Time PCR aus den transfizierten Tumoren ließ sich jeweils eine statistisch signifikante Reduktion der zugehörigen mRNA nach siRNA-Transfektion von siRNA-HIF-1 α und siRNA-HIF-2 α im Vergleich zu den Kontrolltumoren nachweisen.

Die histologische Analyse der siRNA-HIF-2 α -transfizierten Tumoren zeigte eine statistisch signifikante Reduktion der Angiogenese gemessen durch die Anzahl der Mikrogefäße

(microvessel density), sowie eine statistisch signifikante Hemmung der Proliferationsrate und einen statistisch signifikanten Anstieg der Apoptoserate im Vergleich zu den Kontrolltumoren.

Nach Inhibition von HIF-1 α mittels der siRNA änderte sich die Angiogenese nicht statistisch signifikant, die Apoptoserate erhöhte sich nicht statistisch signifikant, nur in der Proliferationsrate war eine statistisch signifikante Reduktion im Vergleich zur Kontrolle festzustellen.

5.1. Darstellung der *in vivo* siRNA-Transfektionsverfahren der Lunge und des Bronchialkarzinoms

5.1.1. Wahl der siRNA-Transfektionsmethoden und -Transfektionsreagenzien

Für die Transfektion der Lunge wurden zwei Applikationswege getestet, zum einen der intratracheale zum anderen der intravenöse. Dafür wurde ein Rechtsherzkatheter verwendet um einen möglichst nahen Zugang zur Lunge zu haben. Dieser Zugang ist auch beim Menschen anwendbar.

Um die Aufnahme der siRNA in die Zellen direkt im histologischen Schnitt darzustellen, wurden fluoreszenzmarkierte siRNAs verwendet. Die siRNA hat gegenüber anderen Methoden, wie der Antisense-Oligonukleotid-Technik und den Ribozymen den Vorteil, dass sie in niedrigen Konzentrationen wirksam ist, dass sie sehr spezifisch inhibiert und sehr schnell in den RISC-Komplex aufgenommen wird und damit Nebeneffekte wahrscheinlich nicht stark ausgeprägt sind (Chi et al., 2003; Jackson et al., 2003; Semizarov et al., 2003).

Die Aufnahme von siRNA in die Zelle passiert nicht spontan und kann durch verschiedene Transfektionstechniken begünstigt werden. Von Nukleinsäuren abgeleitete Oligonukleotide sind negativ geladene Moleküle, die nicht durch hydrophobe Membranen hindurch diffundieren können. Um es exogen zugegebener, synthetisch hergestellter siRNA zu ermöglichen, die Zellmembran zu überwinden, sind eine Reihe von Transfektionsagenzien

entwickelt worden (Seksek und Bolard, 2004). Durch diese Agenzien wird die siRNA gegen Serumnukleasen und nukleolytischen Abbau geschützt.

Als Transfektionsagenzien ist Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) und *in vivo* jetPEI™ (Biomol) verwendet worden.

Sie zählen zu den Klassen (kationische Liposome und kationische Polymere) der bislang erfolgreichsten nichtviralen Gentransfersysteme. Sie weisen unter physiologischen Bedingungen eine positive Ladung auf und binden so über elektrostatische Anziehungskräfte die negativ geladenen Oligonukleotide. Lipofectamine™ 2000 ist ein kationisches Lipid, welches mit der siRNA Komplexe bildet, die endozytotisch in die Zelle aufgenommen werden. Dabei sind die positiven Kopfgruppen vorteilhaft, da sich der Komplex leicht an die negativ geladene Zellmembran anlagern kann. Lipofectamine™ 2000, dessen Vorgänger Lipofectin von Caplen et al. erfolgreich zur Transfektion von siRNA eingesetzt wurde (Caplen et al., 2001), wird zudem *in vitro* in unserer Arbeitsgruppe erfolgreich eingesetzt (Hanze et al., 2003).

In vivo jetPEI™ ist ein lineares Polyethylenimin (PEI). Polyethylenimine sind lineare oder verzweigte Polymere, welche in verschiedenen molekularen Gewichten von <1 kDa bis 1000 kDa erhältlich sind. Sie besitzen an jeder dritten Position eine protonenhaltige Aminogruppe und haben eine hohe kationische Ladungsdichte, welche es ermöglicht, eine nicht konvalente elektrostatische Bindung mit einem Oligonukleotid einzugehen (Boussif et al., 1995; Brus, 2004). Diese kleinen kolloidalen Partikel werden aufgrund ihrer positiven Ladung gut durch Endozytose in die Zelle aufgenommen.

Auf Basis des Mechanismus, PEI wirkt wie ein Protonenschwamm, wird PEI als Transfektionsagens erfolgreich in verschiedenen Zelllinien und *in vivo* eingesetzt (Kichler, 2004; Wagner et al., 2004).

Die Arbeitsgruppe von Urban-Klein (Urban-Klein et al., 2005) hat festgestellt, dass siRNA mit PEI stabile, gleichgroße Komplexe bilden, welche die siRNA vollständig umfassen und

dass diese Komplexe groß genug sind, um von den Zellen endozytotisch aufgenommen zu werden. Der Vorteil in den chemischen Transfektionsagentien liegt darin, dass die siRNA in niedrigen Dosen effizient wirken kann und damit mögliche Nebeneffekte vermieden werden (Aigner, 2006).

Einige Arbeitsgruppen (Heidel et al., 2004; Lomas-Neira et al., 2005; Song et al., 2003a) verwenden *in vivo* erfolgreich nackte siRNA, das heißt ohne bestimmte Transfektionsreagenzien, zur Transfektion von verschiedenen Organen. Nachteile sind dabei zum einen die Notwendigkeit der Verwendung von großen Volumina z. B. in Kombination mit hohen Drücken (high pressure) bei der Applikation (Heidel et al., 2004; Song et al., 2003a). Zum anderen wird häufig dabei eine hohe Dosis der siRNA eingesetzt (Lomas-Neira et al., 2005), wobei die Gefahr von unerwünschten Nebeneffekten ansteigt.

Das alles sind Gründe für die Wahl der hier verwendeten Transfektionsagentien. Außerdem zeigen unsere Daten, dass hier schon eine niedrige siRNA-Dosis (25 µg/Tier) zur effizienten Transfektion führt.

5.1.2. Transfektion mittels der grün fluoreszenzmarkierten siRNA (BLOCK-iT™)

In den ersten Versuchen wurde eine siRNA verwendet, welche grün markiert war und laut Hersteller kerngängig ist. Dies hatte den Vorteil, mittels einer Kernfärbung direkt die siRNA-Aufnahme in den Zellkern zu sehen. Mit dieser Methode wurden intravenös über den implantierten Rechtsherzkatheter einige Zellen transfiziert. Intratracheal war das Signal in Zellen, welche sich in den Alveolen befanden, nachweisbar. Die Transfektionseffizienz war sehr schlecht und ließ sich durch Dosiserhöhung nicht steigern. Damit war die BLOCK-iT™-siRNA für die *in vivo* Anwendung nicht geeignet. Auch die hohe Autofluoreszenz der elastischen Fasern in den Lungengefäßen im Grünbereich erschwerte das Auffinden von Zellkernen mit grüner Fluoreszenz. Die Transfektion der BLOCK-iT™-siRNA war bis zu 96 Stunden nachweisbar. Aufgrund der schlechten Transfektionseffizienz mittels der

BLOCK-iT™-siRNA wurde auf eine rot fluoreszenzmarkierte (Cy3), randomisierte siRNA gewechselt, welche sich, wie alle siRNAs, im Zytoplasma nach Transfektion anreichert.

5.1.3. Intratracheale Applikation von siRNA

Es zeigte sich, dass nach intratrachealer Transfektion von Cy3-markierter siRNA mit Lipofectamine™ 2000, dass das eigentliche Lungengewebe nicht transfiziert war. Nur Zellen in den Alveolen waren fluoreszenzpositiv.

In der Durchflusszytometrie aus der bronchoalveolären Lavage gewonnener Zellen war zu sehen, dass es sich um Makrophagen handelte und dass etwa 40% der Gesamtmakrophagen signalpositiv waren.

Bei Verwendung von siRNA-Cy3 mit in vivo jetPEI™ überlebten die Tiere nach unserem Protokoll nicht. Ursache ist vermutlich die Toxizität des PEI-Mixes (Urban-Klein et al., 2005).

Im Unterschied zu unseren Ergebnissen gibt es Studien von 2005 der Arbeitsgruppe Lomas-Neira, welche die Lunge intratracheal effizient transfizierten. Dabei verwendeten sie nackte siRNA und benutzten zudem keinen Tubus zu Instillation der siRNA (Lomas-Neira et al., 2005; Perl et al., 2005). Eventuell spielt die Applikation von nackter siRNA und die Dosis der siRNA, sie war hier um den Faktor 3 erhöht, eine Rolle für diese Ergebnisse.

Auch das mit Hilfe von LLC-Zellen erzeugte Bronchialkarzinom ließ sich mit unserem Verfahren nicht transfizieren, wobei durch das infiltrative Wachstum des Tumors über das Bronchialepithel dieses durchlässiger sein könnte. Dennoch waren auch hier nur einige Makrophagen positiv. Ob die Makrophagen funktionell transfiziert waren oder diese die siRNA nur phagozytiert haben, wurde in dieser Fragestellung nicht weiter verfolgt. Alle übrigen untersuchten Organe waren nicht transfiziert.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass der intratracheale Zugang zur siRNA-Transfektion der Lunge und des LLC-Modells mittels der hier verwendeten Transfektionsreagenzien nicht geeignet war.

5.1.4. Intravenöse Applikation von siRNA über den implantierten Rechtsherzkatheter

Über den venösen Zugangsweg mittels des implantierten Rechtsherzkatheters waren alle Lungenbereiche, wie Bronchus- und Gefäßwand und Zellen in den Alveolarsepten, sowohl im Komplex mit Lipofectamine™ 2000 als auch mit in vivo jetPEI™ zu erreichen. Da die signalpositiven Zellen im Zellverband in den Alveolarsepten vorlagen, kann vermutet werden, dass es sich um Pneumozyten handelte. Ob alle Strukturen der Gefäße und der Bronchien signalpositiv waren, kann nicht mit Sicherheit belegt werden. Das positive Signal ließ sich zumindest in der Gefäß- und Bronchuswand nachweisen. Während sich im Lungentumormodell (LLC-Modell) bei gleicher Applikationsform sogar eine Akkumulation des Signals vor allem in gefäßnahen Bereichen und in kleineren Tumoren zeigte.

Hierfür kann als Grund die besondere Struktur der Tumorgefäße angesehen werden (Vaupel et al., 1989). Im Gegensatz zur Gefäßneubildung (z. B. bei der Wundheilung) bildet sich bei der Tumor-Angiogenese keine vollständige Gefäßwand aus. Sie bleibt stärker permeabel.

Die Transfektionseffizienz war auch nach Dosiserhöhung um den Faktor 5 mit in vivo jetPEI™ nicht verbessert. Eine Erhöhung der siRNA-Konzentration im Falle des Lipofectamine™ 2000-Mixes war nicht möglich, da das geeignete Mischungsverhältnis zwischen siRNA und Lipofectamine™ 2000 ansonsten nicht eingehalten werden konnte.

Die anderen untersuchten Organe Gehirn, Leber, Milz, Niere und Skelettmuskulatur waren nicht transfiziert. Nur bei Verwendung des erhöhten PEI-Mixes waren einige Zellen der Milz Cy3 positiv. Eventuell handelte es sich um Blutzellen wie z. B. Monozyten. Auf eine nähere Untersuchung wurde verzichtet, da es für unsere Fragestellung nicht von Bedeutung war.

Zusammenfassend zeigte sich, dass sich der intravenöse Zugang über den implantierten Rechtsherzkatheter für die siRNA-Transfektion der Lunge und des LLC-Modells mittels der hier verwendeten Transfektionsreagenzien eignete.

Der Vergleich zu anderen Arbeiten ist schwierig, da die meisten Arbeiten bei der intravenösen Applikation die Schwanzvene verwenden. Hierbei wurde vor allem die Leber effizient transfiziert (Song et al., 2003a), wobei sehr hohe Dosen von siRNA verwendet wurden.

Sioud und Sorensen sahen nach Transfektion mit FITC-markierter siRNA komplexiert mit Liposomen über die Schwanzvene vor allem das FITC-Signal in der Niere und der Milz (Sioud und Sorensen, 2003).

Die Arbeitsgruppe von Ge transfizierte die Lunge mit Hilfe eines PEI-Komplexes und verwendete dabei einen retroorbitalen venösen Zugang (Ge et al., 2004). Dabei diskutierten sie, dass die Lunge aufgrund ihres Kapillarfilters der Lungenstrombahn, in denen die Komplexe möglicherweise länger verweilen, leichter intravenös transfiziert wird als andere Organe. Außerdem heben sie hervor, dass die Lunge eines der am stärksten durchbluteten Organe des Körpers ist.

Dies alles mögen Gründe für die erfolgreiche Transfektion unseres Modells sein, wobei die Wahl der Vena jugularis als venöser Zugang für den Rechtsherzkatheter entscheidend ist.

5.1.5. siRNA-Transfektionsverfahren für das subkutane A549-Modell

Da das Tumorwachstum im LLC-Modell nicht engmaschig untersucht werden kann und es volumencomputertomographischer Aufnahmen bedarf, um Einflüsse der Therapie zu untersuchen, wurde zusätzlich vor allem für die Untersuchung des Einflusses von HIF ein subkutanes Tumormodell verwendet. Hierfür wurden wegen des klinischen Hintergrunds humane A549-Zellen benutzt. Die intraperitoneale Verabreichung der siRNA für das subkutane Tumormodell erfolgte in Anlehnung an eine Arbeit von Urban-Klein (Urban-Klein et al., 2005).

Dieses Verfahren wurde ebenfalls mit der siRNA–Cy3 charakterisiert, wobei wir eine gute Transfektionseffizienz im Tumorgewebe nachweisen konnten. Die übrigen untersuchten Organe waren nach 42 Stunden nicht transfiziert. Urban-Klein (Urban-Klein et al., 2005) sah nach intraperitonealer Applikation von radioaktivmarkierter siRNA komplexiert mit PEI nach 30 min die intakte siRNA in Skelettmuskulatur, Leber, Niere und im subkutanen Tumor sowie nach 4 Stunden in Lunge, Skelettmuskulatur, Leber und subkutanem Tumor. Ob nach 42 Stunden in ihrem Modell noch intakte siRNA nachweisbar war, ist nicht bekannt. Dabei hebt Urban-Klein den intraperitonealen Zugang zur Transfektion des Tumors als einen sehr einfachen und reproduzierbaren Weg besonders hervor. Hierbei verweilt der Mix für mehrere Stunden im Peritoneum.

In anderen Studien (Takei et al., 2004) injizierten die Autoren die siRNA erfolgreich direkt in den Tumor, wobei fraglich ist, ob auf diesem Weg jeder Tumor der Gruppe vergleichbar injiziert wird. Außerdem werden sicherlich Gewebeschäden durch die Nadel gesetzt. Hierbei ist nicht klar, in wieweit es dadurch möglich ist, Ablösungen von Tumorzellen in die Blutbahn zu erzeugen und somit die Gefahr der Metastasierung zu steigern.

Um den Einfluss von HIF auf die Tumorprogression zu untersuchen, wurde zunächst das siRNA-Transfektionsverfahren für das subkutane A549-Modell in der Real Time PCR überprüft.

Nach zweimaliger intraperitonealer Applikation von siRNA-HIF-2 α mit in vivo jetPEI™ im Abstand von 48 Stunden konnte aus den subkutanen A549-Tumoren im Vergleich zu den Kontrolltumoren eine 80% Inhibition der zugehörigen mRNA HIF-2 α nachgewiesen werden. Damit war das siRNA-Transfektionsverfahren für das subkutane A549-Modell zur Untersuchung des Einflusses von HIF-1 α und HIF-2 α auf das Tumorverhalten etabliert.

5.2. Einfluss von HIF-1 α und HIF-2 α auf die Tumorprogression im humanen Adenokarzinom (A549-Modell)

Die Hypoxie-induzierbaren Faktoren (HIF-1 α und HIF-2 α) spielen eine wichtige Rolle im Tumor (Semenza, 2003; Semenza et al., 2001). Unter physiologischen Sauerstoffverhältnissen wird HIF-1 α und HIF-2 α unmittelbar degradiert (Bruick und McKnight, 2001; Jaakkola et al., 2001). Unter Hypoxie wird der Degradierungsweg gehemmt und HIF-1 α sowie HIF-2 α werden stabilisiert (Lando et al., 2002). Danach wandern HIF-1 α und HIF-2 α in den Zellkern, dort dimerisieren sie mit HIF-1 β (ARNT) und aktivieren ihre Zielgene durch Bindung an das HRE (Hypoxie-responsive Element). Mehr als 100 HIF-HRE-abhängige Zielgene sind identifiziert, darunter Proteine für Energiestoffwechsel (Semenza et al., 1994), Zellproliferation, Apoptose (Carmeliet et al., 1998), Hämatopoese (Lacombe und Mayeux, 1999) und Angiogenese (Liu et al., 1995; Rose et al., 2002).

Hypoxische Areale sind in den meisten Tumoren zu finden (Vaupel et al., 2004). Sie sind durch den im wachsenden Tumor irregulären und „chaotischen“ Blutfluss bedingt (Vaupel et al., 1989).

Somit stellen die Hypoxie-induzierbaren Faktoren einen interessanten Ansatzpunkt für die Tumorthherapie dar.

5.2.1. Inhibition von HIF-2 α mittels der siRNA hemmt das Tumorwachstum im Gegensatz zur Inhibition von HIF-1 α

Die Korrelation zwischen HIF-1 α -Überexpression gegenüber dem Überleben von Krebspatienten ist unterschiedlich. So kann Überexpression von HIF-1 α das Überleben sowohl steigern als auch senken (Semenza, 2003). Die Auswirkung von HIF-1 α auf den Tumor ist abhängig von der Expressionsrate und anderen Variablen, wie zum Beispiel p53 oder von-Hippel-Lindau-Protein (Birner et al., 2001).

Im NSCLC war HIF-1 α -Überexpression in Untersuchungen von Volm korreliert mit erhöhter Tumorapoptose und einem Überleben der Patienten (Volm und Koomagi, 2000).

In der hier vorgelegten Untersuchung wurde das Tumorwachstum am A549-Modell untersucht. Nach Transfektion mit siRNA-HIF-2 α über 5 Wochen war das Tumorwachstum ($197 \pm 33 \text{ mm}^3 \text{ SEM}$, Tag 35) im Vergleich zur Kontrollgruppe ($560 \pm 75 \text{ mm}^3 \text{ SEM}$, Tag 35) deutlich reduziert, während nach Ausschaltung von HIF-1 α kein Unterschied im Tumorwachstum festzustellen war.

In der Real Time PCR der untersuchten Tumoren zeigte sich eine deutliche Reduktion der zugehörigen mRNA und bewies damit die gezielte Ausschaltung von HIF-1 α und HIF-2 α .

Im Kontrast dazu steht die Arbeit von Acker (Acker et al., 2005), der nach HIF-2 α -Überexpression in Glioblastom-Tumoren ein reduziertes Tumorwachstum und auch ein reduziertes Tumorwachstum nach HIF-1 α -Überexpression sah. Um unsere Daten betreffend des Tumorwachstums zu erklären, wurden die Tumore histologisch bezüglich Angiogenese, Proliferation und Apoptose analysiert (siehe 5.2.2.).

5.2.2. Inhibition von HIF-2 α bewirkt Suppression von Angiogenese sowie Proliferation und führt zur Steigerung der Apoptose im subkutanen A549-Tumor

In der Angiogenese war nach Transfektion von siRNA-HIF-2 α eine deutliche Reduktion der Gefäßbildung, vor allem der „microvessel density“, also der Dichte der kleinen, neu gebildeten Gefäße zu sehen, während sich nach Transfektion von siRNA-HIF-1 α keine statistisch signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe zeigten.

Acker (Acker et al., 2005) sah nach HIF-2 α -Überexpression auch eine verstärkte Angiogenese und in mit HIF-2 α defizienten embryonalen Stammzellen erzeugten Tumoren eine reduzierte Angiogenese. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen wurde diese verstärkte Angiogenese auch unter Überexpression von HIF-1 α beobachtet. Er kam dabei zum Schluss, dass HIF-2 α für die Tumolvaskularisierung verantwortlich ist und führt dabei VEGF als HIF-2 α

abhängiges Zielgen auf. VEGF wurde in verschiedenen Arbeiten als HIF-abhängiges Zielgen beschrieben. So zeigten Tumoren, welchen HIF-1 α oder das HRE im VEGF Promoter fehlen, eine reduzierte Vaskularisierung (Carmeliet et al., 1998; Ryan et al., 1998; Tsuzuki et al., 2000). HIF-1 α hat demnach einen Einfluss auf die Angiogenese, dennoch scheint dieser nicht so stark zu sein.

In der Arbeit von Giatromanolaki (Giatromanolaki et al., 2001) wird deutlich, dass in Tumoren (NSCLCs) eine hohe Expression von HIF-1 α und HIF-2 α mit einer hohen Expression von VEGF korreliert. Insbesondere fand er in Tumoren mit erhöhter Expression von HIF-2 α auch eine erhöhte Expression von VEGF und dessen Rezeptor (VEGFR2), welche die Angiogenese und die „microvessel density“ induzieren. In Tumoren, in denen nur eine hohe Expression von HIF-1 α zu finden war, war die VEGF-Expression deutlich schwächer und die Expression von VEGFR2 nicht nachweisbar. Es wird daher vermutet, dass insbesondere HIF-2 α für die Tumorangioese in NSCLCs entscheidend ist (Giatromanolaki et al., 2001).

Diese Beobachtung steht mit unseren Daten im Einklang, dass durch Inhibition von HIF-2 α die Angiogenese in den A549-Tumoren reduziert wurde. Außerdem zeigten A549-Zellen *in vitro* eine gesteigerte Expression von VEGF in Hypoxie. Nach Suppression von HIF-2 α durch siRNA ist diese Expression von VEGF deutlich inhibiert (Eul et al., 2007).

Die zelluläre Proliferationsrate in den Tumoren war nach Ausschaltung von sowohl HIF-1 α als auch HIF-2 α mittels siRNA im Vergleich zur Kontrollgruppe statistisch signifikant erniedrigt. Dennoch war das Tumorwachstum nur nach Behandlung mit siRNA-HIF-2 α signifikant reduziert. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass Tumorprogression ein komplexerer Vorgang als die Zellproliferation ist und Prozesse wie Apoptose und Vaskularisierung mit einschließt. Dafür spricht, dass insbesondere unter Behandlung mit siRNA-HIF-2 α die Apoptoserate gesteigert und die Angiogenese erniedrigt waren. Für die Abnahme des Proliferationsmarkers (KI 67) unter siRNA-HIF-1 α Behandlung kann auch die

Regulation des Energiemetabolismus eine Rolle spielen. Eine Aktivierung der Glykolyse wird primär von HIF-1 und nicht von HIF-2 gesteuert (Hu et al., 2003). Hier wurde gezeigt, dass eine gesteigerte Glykolyseaktivität mit erhöhter Proliferation in Verbindung steht. Speziell Tumorzellen zeigen eine hohe aerobe Glykolyseaktivität und Laktatbildung (Warburg-Effekt) (Semenza, 2003). Insgesamt ist die zelluläre Proliferationsrate sowohl bei Ausschaltung von HIF-1 α als auch bei Ausschaltung von HIF-2 α reduziert.

Zhong sah in verschiedenen Tumoren, dass eine Überexpression von HIF-1 α mit einer Erhöhung der Proliferationsrate von Tumorzellen einherging und begründete dies mit der verstärkten Expression von Glukosetransportern und Glykolyseenzymen (Zhong et al., 1999).

Die Apoptoserate nahm bei Ausschaltung von HIF-2 α durch siRNA statistisch signifikant zu, während siRNA-HIF-1 α keinen statistisch signifikanten Effekt auf die Apoptoserate im Vergleich zur Apoptoserate der Kontrolltumoren hatte.

Generell wird durch Hypoxie die Apoptoserate erhöht, dennoch führt chronische Hypoxie, welche oft in Tumoren vorherrscht, zu genetischen Veränderungen in den Tumorzellen, sodass die Apoptoserate abnimmt und damit die Tumorprogression zunimmt (Vaupel, 2004).

In unseren Kontrolltumoren war die Apoptoserate niedrig. Dies entspricht dem allgemeinen Verständnis der im Tumor vorhandenen chronischen Hypoxie. Nach Transfektion von siRNA-HIF-1 α war die Apoptoserate vergleichbar erniedrigt. Dieses Ergebnis war im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht statistisch signifikant.

Nach Ausschaltung von HIF-2 α mittels der siRNA war die Apoptoserate im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht. Das bedeutet, dass HIF-2 α einen entscheidenden Einfluss auf die Apoptose hat. Zusätzlich kann die gesenkte Angiogenese in diesen Tumoren zur gesteigerten Apoptoserate geführt haben.

Im Gegensatz zu unserem Ergebnis sah Acker (Acker et al., 2005) nach Überexpression von HIF-2 α eine gesteigerte Apoptoserate. Dies zeigte er auch nach einer Überexpression von

HIF-1 α . Nach Ausschaltung von HIF-1 α und HIF-2 α wies er eine erniedrigte Apoptoserate der Tumorzellen nach.

In anderen Arbeiten (Volm und Koomagi, 2000), in denen NSCLCs aus Patienten auf HIF untersucht wurden, stellte man fest, dass eine Expression von HIF-1 α eine gesteigerte Apoptoserate mit sich führt und dass diese Patienten im Vergleich zu Patienten mit HIF-1 α -negativen Karzinomen länger überlebten. Das entspricht den von uns ermittelten Daten.

Es ist bekannt, dass in vielen nicht malignen Zelltypen HIF-1 α und HIF-2 α für das Überleben und die Ausdifferenzierung von den Tumorzellen benötigt werden (Compernelle et al., 2002; Compernelle et al., 2003; Iyer et al., 1998; Peng et al., 2000; Ryan et al., 1998; Scortegagna et al., 2003; Tian et al., 1998).

Außerdem ist bekannt, dass *in vitro* Aktivierung von HIF zu einem Wachstumsstopp oder Zelltod von primären Zellkulturen führen kann (Biju et al., 2004; Schipani et al., 2001). HIF übt eine proapoptische Aktivität durch Stabilisierung von p53 über einen Bnip3/Nix-abhängigen Mechanismus oder durch Veränderungen der Expression von Bcl-2 und Caspase aus (Greijer und van der Wall, 2004).

Diese verschiedenen Reaktionen von HIF scheinen für die Zellen notwendig zu sein, um optimal auf Hypoxie zu reagieren. Einerseits sichert die HIF-aktivierte Angiogenese den Zellen Vorteile im Wachstum unter Hypoxie, andererseits führt der durch HIF-induzierte Wachstumsstopp zum Überleben der Zellen, wenn die Sauerstoffzufuhr limitiert ist (Koshiji und Huang, 2004).

Dies beweist auch, warum in HIF-1 α -defizienten Hepatomen trotz einer verstärkten Zellproliferation das Tumorstadium aufgrund einer erhöhten Apoptoserate zurück blieb (Leek et al., 2005). Es scheint, dass Tumorzellen diese „Stopp-and-go“ Strategie für ein maximales Wachstum und Überleben anwenden. Doch wie hypoxische Zellen die unterschiedliche HIF-Aktivität steuern ist nicht abschließend untersucht.

Diese differenten Ergebnisse zeigen, dass die Auswirkungen HIF-gesteuerter Reaktionswege sicherlich auch von genetischen Veränderungen in den Tumorzellen und dem umgebenden Milieu abhängig sind und dass je nachdem wie viele Mutationen in den Tumorzellen entstanden sind, auch unterschiedliche Reaktionen auf die HIF-Expression zustande kommen können.

So analysierte Acker (Acker et al., 2005) speziell selektierte Klone von Tumorzellen, welche stabil HIF-2 α oder HIF-1 α überexprimieren. Insbesondere die HIF-2 α überexprimierenden Zellen zeigten eine verminderte Tumorprogression, im Unterschied zu unserer Untersuchung und im Unterschied der Arbeit von Volm und Mitarbeitern (Volm und Koomagi, 2000). Acker schließt aus seinen Ergebnissen, dass besondere Vorsicht bei der Ausschaltung von HIF-2 α geboten ist, da sich individuelle Tumorklone bestimmter Patienten unterscheiden. Somit könnte HIF-2 α -Ausschaltung nicht eine Tumorsuppression, sondern eine Tumorprogression bewirken.

Aus der histologischen Analyse der hier gezeigten Tumoren lässt sich schließen, dass vor allem die Angiogenese und die Apoptose entscheidende Faktoren für das Tumorwachstum sind. Insbesondere scheint HIF-2 α vor allem für gesteigerte Angiogenese und Suppression der Apoptoserate im Tumor mit verantwortlich zu sein. Eine Hemmung dieses Transkriptionsfaktors durch siRNA scheint deshalb bei der Tumorbekämpfung hilfreich zu sein.

5.3. Ausblick auf die Bedeutung von HIF-2 α als Zielgen für die Tumorthherapie und der RNA Interferenz als potentes Instrument zur spezifischen Inhibition von Genen

Diese Arbeit zeigt, dass HIF eine bedeutende Rolle in der Tumorprogression des humanen Adenokarzinoms hat.

Hypoxie ist der aktivierende Stimulus für HIF im Tumor. So ist die Hypoxie verantwortlich für die Resistenz gegenüber der Bestrahlungs- und Chemotherapie von Tumoren.

Hypoxie induziert über HIF Angiogenese-Faktoren, wie zum Beispiel VEGF, welche zur gesteigerten Angiogenese im Tumor beitragen.

Außerdem führt chronische Hypoxie durch den Selektionsdruck in den Tumoren zu genetischen Veränderungen der Tumorzellen, sodass diese resistent gegenüber der Hypoxie-induzierten Apoptose werden. Oft findet man p53-Mutationen in diesen Zellen (Graeber et al., 1996), sodass zusammengefasst die Hypoxie und damit HIF entscheidend zum Prozess der Tumorprogression beitragen.

Diese Arbeit zeigt, dass die Ausschaltung von HIF-2 α mittels siRNA das Tumorstadium im A549-Tumor ($197 \pm 33 \text{ mm}^3 \text{ SEM}$; Tag 35) im Vergleich zur Kontrolle ($560 \pm 75 \text{ mm}^3 \text{ SEM}$; Tag 35) durch Inhibition der Angiogenese und Induktion der Apoptose hemmt.

Damit ist die große Bedeutung von HIF-2 α in der Tumorprogression im humanen Adenokarzinom der Lunge dargestellt.

Es ist weiter zu untersuchen, in wieweit andere genetische Veränderungen in den Tumorzellen diese Effekte von HIF-2 α beeinflussen.

Die siRNA als Technik zur gezielten Ausschaltung von Genen ist eine neue Errungenschaft der Forschung und es bleibt abzuwarten, in wieweit sie beim Menschen therapeutisch eingesetzt werden kann.

Um mögliche Nebeneffekte und Immunstimulationen (Interferonaktivierung) zu verhindern, sind noch eine Reihe von Untersuchungen notwendig, bevor der Einsatz der siRNA-Technik sicher am Menschen etabliert werden kann.

Um die Transfektion im LLC-Modell näher zu untersuchen, müssen Methoden zur Wachstumskontrolle wie volumencomputertomographischer Untersuchungen folgen.

All diese Bemühungen lassen einen bezüglich der Therapieverbesserung des Bronchialkarzinoms optimistisch in die Zukunft blicken.

6. Zusammenfassung

Die Arbeit befasste sich mit der Etablierung der *in vivo* siRNA-Transfektion der Lunge und von zwei Lungentumormodellen in der Maus. Ein Lungentumormodell wurde durch die intratracheale Instillation von Lewis-Lung-Karzinomzellen der Maus etabliert (LLC-Modell). Als weiteres Lungentumormodell wurde das subkutane Xenograftmodell durch die subkutane Injektion von humanen Adenokarzinomzellen verwendet (A549-Modell). Bei diesem Modell konnte die Tumorprogression durch direkte Messung des Tumolvolumens einfach verfolgt werden. Es diente insbesondere dazu, durch die Inhibition der Hypoxie-induzierbaren Faktoren (HIF-1 α und HIF-2 α) deren Rolle für die Tumorprogression zu analysieren. Nach intratrachealer Verabreichung fluoreszenzmarkierter siRNA mit Lipofectamine™ 2000 an der gesunden Maus war das Lungengewebe nicht transfiziert. Nur luftgefüllte Bereiche der Alveolen und einige Makrophagen (identifiziert durch Durchflusszytometrie) zeigten positive Signale der fluoreszenzmarkierten siRNA. Im LLC-Modell waren nur einige Makrophagen nach intratrachealer siRNA Verabreichung positiv, während das Tumorgewebe negativ war. Bei Verwendung eines weiteren Transfektionsreagenz (*in vivo* jetPEI™) überlebten die Tiere nach intratrachealer Applikation nicht. Somit erwies sich die intratracheale Verabreichung der siRNA mit den genannten Transfektionsagentien als ungeeignet für die Lunge und das LLC-Modell. Nach intravenöser Verabreichung fluoreszenzmarkierter siRNA über einen Rechtsherzkatheter war die Lunge mit Lipofectamine™ 2000 und *in vivo* jetPEI™ zu transfizieren. Insbesondere zeigten sich positive Signale in der Gefäß- und Bronchuswand und in Zellen der Alveolarsepten. Auch im LLC-Modell zeigten sich bei dieser Form der Verabreichung positive Signale der fluoreszenzmarkierten siRNA. Vor allem gefäßnahe Tumorbereiche und kleine Tumoren zeigten starke Signale. Eine fünffache Dosiserhöhung der siRNA komplexiert mit *in vivo* jetPEI™ ergab keine weitere Steigerung der Transfektionseffizienz. Die intravenöse Verabreichung der siRNA über einen Rechtsherzkatheter erwies sich somit als geeignet zur Transfektion der Lunge und des

Tumorgewebes im LLC-Modell. Die intraperitoneale Verabreichung von siRNA mit *in vivo* jetPEI™ im A549-Modell zeigte starke Signale der fluoreszenzmarkierten siRNA im Tumorgewebe, während andere untersuchte Organe bei dieser Verabreichungsform nicht transfiziert waren. Dieses Verfahren wurde eingesetzt, um HIF-1 α und HIF-2 α zu inhibieren. HIF-1 α und HIF-2 α konnte im Tumor durch geeignete siRNA (si-HIF-1 α und si-HIF-2 α) inhibiert werden. Die Suppression von HIF-1 α und HIF-2 α wurde auf mRNA-Ebene durch Real Time RT-PCR von RNA aus Tumorextrakten nachgewiesen. Es zeigte sich jeweils eine signifikante Reduktion der HIF-1 α oder HIF-2 α mRNA im Vergleich zu den mit siRNA-ran- (Kontrolle) behandelten Tumoren. Der Effekt von siRNA-HIF-1 α und siRNA-HIF-2 α auf die Tumorprogression wurde außerdem über einen Zeitraum von fünf Wochen im Vergleich zu siRNA-ran-behandelten Tieren untersucht, hierbei wurden die siRNAs zweimal wöchentlich verabreicht. Die siRNA-HIF-2 α -behandelten Tumoren zeigten ein signifikant reduziertes Wachstum im Vergleich zur Kontrolle, während siRNA-HIF-1 α keine signifikante Änderung des Tumorwachstums aufwies. Die Tumoren wurden histologisch weitergehend charakterisiert. Bei den siRNA-HIF-2 α -behandelten Tumoren zeigte sich eine signifikante Reduktion der Angiogenese gemessen durch die Anzahl der Mikrogefäße, sowie eine signifikante Hemmung der zellulären Proliferationsrate, während die Apoptoserate im Vergleich zur Kontrolle signifikant gesteigert war. Bei den siRNA-HIF-1 α -behandelten Tumoren zeigte sich keine signifikante Änderung der Angiogenese und Apoptoserate, während die zelluläre Proliferationsrate signifikant reduziert war. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Transfektion synthetischer siRNA *in vivo* möglich ist, und insbesondere die Lunge über den Rechtsherzkatheter für siRNA erreichbar ist. Des Weiteren zeigte diese Arbeit, dass die siRNA-Technik, *in vivo* eingesetzt, Untersuchungen zur Genfunktion bei der Tumorprogression zulässt. Insbesondere wurde gezeigt, dass HIF-2 α eine entscheidende Rolle in der Progression und Angiogenese von Adenokarzinomen der Lunge spielt und somit ein viel versprechendes Ziel für therapeutische Ansätze bietet.

7. Summary

In this study *in vivo* siRNA transfection procedures for the lung and for two lung tumour mouse models were analyzed and established. One lung tumour model was initiated by intratracheal instillation of lewis-lung-carcinoma cells of mouse (LLC-model). The other xenograft lung tumour model was initiated by subcutaneous injection of human adenocarcinoma cells (A549-model). This model which allowed direct measurement of the tumour size was applied for analysis of the role of the hypoxia-inducible factors (HIF-1 α and HIF-2 α) in tumour progression.

After intratracheal administration of fluorescence labelled siRNA complexed with Lipofectamine™ 2000 to the healthy mouse, no transfection of the lung tissue was observed. Only airfilled areas of the alveoli and some macrophages (identification by flow cytometry) displayed positive signals. Also, in the LLC-model only some macrophages were positive after intratracheal siRNA administration, whereas the tumour tissue showed no staining of fluorescence labelled siRNA. Employing *in vivo* jetPEI™ as a further transfection agent, the mice did not survive after its intratracheal application in complex with siRNA. Thus, intratracheal administration of siRNA with the two transfection agents appeared not to be appropriate for the lung and the LLC-model.

After intravenous injection of fluorescence labelled siRNA by right heart catheter, the lung was transfectable employing both Lipofectamine™ 2000 and *in vivo* jetPEI™ as transfection agents. Particularly, positive signals were observed in vessels, bronchi, and in cells from the alveolar septum. Also, in the LLC-model positive signals of fluorescence labelled siRNA were observed using this administration way. Particularly, tumour areas adjacent to vessels and small tumours displayed strong signals. A fivefold increase of the siRNA in complex with *in vivo* jetPEI™ did not further increase signal intensity. Intravenous injection of siRNA by right heart catheter thus represented a successful technique for siRNA transfection of lung and tumour tissue in the LLC-model.

Intraperitoneal injection of siRNA with *in vivo* jetPEI™ in the A549 model demonstrated strong signals of the fluorescence labelled siRNA in the tumour tissue whereas other studied organs appeared to be non transfected. This route was applied for the inhibition of HIF-1 α and HIF-2 α in the A549-model. Both, HIF-1 α and HIF-2 α could indeed be suppressed by the specific siRNA sequences. Suppression of HIF-1 α and HIF-2 α were proven on mRNA level by realtime RT-PCR from RNA extracts of the tumour tissues, which revealed significant reduction of HIF-1 α and HIF-2 α in comparison to siRNA-ran treated control tumours. Additionally, the effect of siRNA-HIF-1 α and siRNA-HIF-2 α on tumour progression was studied over a time period of five weeks. The siRNAs targeting HIF-1 α , or HIF-2 α or the siRNA control were injected twice per week. Interestingly, tumours treated by siRNA-HIF-2 α demonstrated a significant reduced tumour growth when compared to control, whereas siRNA-HIF-1 α showed no significant alteration of tumour growth. The tumours were further characterized histologically. In siRNA-HIF-2 α treated tumours a significant reduction of angiogenesis as measured by counting of microvessels was observed. Also, a significant inhibition of proliferation was noticed whereas apoptosis was significantly enhanced when compared to the control group. In siRNA-HIF-1 α treated tumours no change of angiogenesis and apoptosis was observed, whereas proliferation was significantly reduced.

Taken together, it could be shown that transfection of synthetic siRNA *in vivo* is possible and particularly the lung is accessible by right heart catheter. Furthermore this study demonstrated that siRNA applied *in vivo* allows studies about the gene function with respect to tumour growth. Particularly, it was shown that HIF-2 α plays a critical role in progression and angiogenesis of adenocarcinomas of the lung and provides a promising approach or therapeutic intervention.

8. Literaturverzeichnis

- Abdel-Rahman, S.Z., El-Zein, R.A., Zwischenberger, J.B., Au, W.W., 1998, Association of the NAT1*10 genotype with increased chromosome aberrations and higher lung cancer risk in cigarette smokers. *Mutat Res* 398, 43-54.
- Acker, T., Diez-Juan, A., Aragonés, J., Tjwa, M., Brusselmans, K., Moons, L., Fukumura, D., Moreno-Murciano, M.P., Herbert, J.M., Burger, A., Riedel, J., Elvert, G., Flamme, I., Maxwell, P.H., Collen, D., Dewerchin, M., Jain, R.K., Plate, K.H., Carmeliet, P., 2005, Genetic evidence for a tumor suppressor role of HIF-2alpha. *Cancer Cell* 8, 131-141.
- Aigner, A., 2006, Gene silencing through RNA interference (RNAi) in vivo: strategies based on the direct application of siRNAs. *J Biotechnol* 124, 12-25.
- Amos, C.I., Xu, W., Spitz, M.R., 1999, Is there a genetic basis for lung cancer susceptibility? *Recent Results Cancer Res* 151, 3-12.
- Ardehali, A., Fyfe, A., Laks, H., Drinkwater, D.C., Jr., Qiao, J.H., Lysis, A.J., 1995, Direct gene transfer into donor hearts at the time of harvest. *J Thorac Cardiovasc Surg* 109, 716-719; discussion 719-720.
- Arriagada, R., Bergman, B., Dunant, A., Le Chevalier, T., Pignon, J.P., Vansteenkiste, J., 2004, Cisplatin-based adjuvant chemotherapy in patients with completely resected non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 350, 351-360.
- Auperin, A., Le Pechoux, C., Pignon, J.P., Koning, C., Jeremic, B., Clamon, G., Einhorn, L., Ball, D., Trovo, M.G., Groen, H.J., Bonner, J.A., Le Chevalier, T., Arriagada, R., 2006, Concomitant radio-chemotherapy based on platinum compounds in patients with locally advanced non-small cell lung cancer (NSCLC): a meta-analysis of individual data from 1764 patients. *Ann Oncol* 17, 473-483.
- Bartecchi, C.E., MacKenzie, T.D., Schrier, R.W., 1994, The human costs of tobacco use (1). *N Engl J Med* 330, 907-912.

- Bartel, D.P., 2004, MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281-297.
- Beadsmoore, C.J., Screaton, N.J., 2003, Classification, staging and prognosis of lung cancer. *Eur J Radiol* 45, 8-17.
- Beahrs, O.H., 1991, Staging of cancer. *CA Cancer J Clin* 41, 121-125.
- Beasley, M.B., Brambilla, E., Travis, W.D., 2005, The 2004 World Health Organization classification of lung tumors. *Semin Roentgenol* 40, 90-97.
- Beasley, N.J., Leek, R., Alam, M., Turley, H., Cox, G.J., Gatter, K., Millard, P., Fuggle, S., Harris, A.L., 2002, Hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in head and neck cancer: relationship to tumor biology and treatment outcome in surgically resected patients. *Cancer Res* 62, 2493-2497.
- Beetham, P.R., Kipp, P.B., Sawycky, X.L., Arntzen, C.J., May, G.D., 1999, A tool for functional plant genomics: chimeric RNA/DNA oligonucleotides cause in vivo gene-specific mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 8774-8778.
- Berns, K., Hijmans, E.M., Mullenders, J., Brummelkamp, T.R., Velds, A., Heimerikx, M., Kerkhoven, R.M., Madiredjo, M., Nijkamp, W., Weigelt, B., Agami, R., Ge, W., Cavet, G., Linsley, P.S., Beijersbergen, R.L., Bernards, R., 2004, A large-scale RNAi screen in human cells identifies new components of the p53 pathway. *Nature* 428, 431-437.
- Bertrand, J.R., Pottier, M., Vekris, A., Opolon, P., Maksimenko, A., Malvy, C., 2002, Comparison of antisense oligonucleotides and siRNAs in cell culture and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 296, 1000-1004.
- Biju, M.P., Neumann, A.K., Bensinger, S.J., Johnson, R.S., Turka, L.A., Haase, V.H., 2004, Vhlh gene deletion induces Hif-1-mediated cell death in thymocytes. *Mol Cell Biol* 24, 9038-9047.

- Birner, P., Schindl, M., Obermair, A., Breitenecker, G., Oberhuber, G., 2001, Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in epithelial ovarian tumors: its impact on prognosis and on response to chemotherapy. *Clin Cancer Res* 7, 1661-1668.
- Blackhall, F.H., Bhosle, J., Thatcher, N., 2005, Chemotherapy for advanced non-small cell lung cancer patients with performance status 2. *Curr Opin Oncol* 17, 135-139.
- Bouck, N., 1990, Tumor angiogenesis: the role of oncogenes and tumor suppressor genes. *Cancer Cells* 2, 179-185.
- Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M.A., Mergny, M.D., Scherman, D., Demeneix, B., Behr, J.P., 1995, A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 7297-7301.
- Bowden, E.T., Riegel, A.T., 2004, Tetracycline-regulated expression of hammerhead ribozymes in vivo. *Methods Mol Biol* 252, 179-194.
- Brambilla, E., Travis, W.D., Colby, T.V., Corrin, B., Shimosato, Y., 2001, The new World Health Organization classification of lung tumours. *Eur Respir J* 18, 1059-1068.
- Brown, J.M., 2000, Exploiting the hypoxic cancer cell: mechanisms and therapeutic strategies. *Mol Med Today* 6, 157-162.
- Bruick, R.K., McKnight, S.L., 2001, A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* 294, 1337-1340.
- Brummelkamp, T.R., Bernards, R., Agami, R., 2002, Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference. *Cancer Cell* 2, 243-247.
- Brus, C., 2004, PHYSICOCHEMICAL AND BIOLOGICAL PROPERTIES OF POLYETHYLENIMINE BASED DELIVERY SYSTEMS FOR OLIGONUCLEOTIDES AND RIBOZYMES, 1. Auflage Edition. Cuvillier Verlag Göttingen, 154 p.

- Caplen, N.J., Parrish, S., Imani, F., Fire, A., Morgan, R.A., 2001, Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 9742-9747.
- Carmeliet, P., Dor, Y., Herbert, J.M., Fukumura, D., Brusselmans, K., Dewerchin, M., Neeman, M., Bono, F., Abramovitch, R., Maxwell, P., Koch, C.J., Ratcliffe, P., Moons, L., Jain, R.K., Collen, D., Keshert, E., 1998, Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* 394, 485-490.
- Carmell, M.A., Zhang, L., Conklin, D.S., Hannon, G.J., Rosenquist, T.A., 2003, Germline transmission of RNAi in mice. *Nat Struct Biol* 10, 91-92.
- Carrington, J.C., Ambros, V., 2003, Role of microRNAs in plant and animal development. *Science* 301, 336-338.
- Carroll, V.A., Ashcroft, M., 2006, Role of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha versus HIF-2alpha in the regulation of HIF target genes in response to hypoxia, insulin-like growth factor-I, or loss of von Hippel-Lindau function: implications for targeting the HIF pathway. *Cancer Res* 66, 6264-6270.
- Cech, T.R., Zaug, A.J., Grabowski, P.J., 1981, In vitro splicing of the ribosomal RNA precursor of Tetrahymena: involvement of a guanosine nucleotide in the excision of the intervening sequence. *Cell* 27, 487-496.
- Check, E., 2005, Gene therapy put on hold as third child develops cancer. *Nature* 433, 561.
- Cheong, K.A., Chrystal, K., Harper, P.G., 2006, Management of the elderly patient with advanced non-small cell lung cancer. *Int J Clin Pract* 60, 340-343.
- Chi, J.T., Chang, H.Y., Wang, N.N., Chang, D.S., Dunphy, N., Brown, P.O., 2003, Genomewide view of gene silencing by small interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 6343-6346.
- Clayton, J., 2004, RNA interference: the silent treatment. *Nature* 431, 599-605.

- Compernelle, V., Brusselmans, K., Acker, T., Hoet, P., Tjwa, M., Beck, H., Plaisance, S., Dor, Y., Keshet, E., Lupu, F., Nemery, B., Dewerchin, M., Van Veldhoven, P., Plate, K., Moons, L., Collen, D., Carmeliet, P., 2002, Loss of HIF-2 α and inhibition of VEGF impair fetal lung maturation, whereas treatment with VEGF prevents fatal respiratory distress in premature mice. *Nat Med* 8, 702-710.
- Compernelle, V., Brusselmans, K., Franco, D., Moorman, A., Dewerchin, M., Collen, D., Carmeliet, P., 2003, Cardia bifida, defective heart development and abnormal neural crest migration in embryos lacking hypoxia-inducible factor-1 α . *Cardiovasc Res* 60, 569-579.
- Coulet, F., Nadaud, S., Agrapart, M., Soubrier, F., 2003, Identification of hypoxia-response element in the human endothelial nitric-oxide synthase gene promoter. *J Biol Chem* 278, 46230-46240.
- Cox, J.D., Le Chevalier, T., Arriagada, R., Choy, H., Curran, W.J., Fukuoka, M., Harper, P., Komaki, R., Le Pechoux, C., Lievens, Y., Rami-Porta, R., Ready, N., Sause, W., Stuschke, M., Thatcher, N., 2003, Management of unresectable non-small cell carcinoma of the lung (NSCLC). *Lung Cancer* 42 Suppl 1, S15-16.
- Czekay, R.P., Aertgeerts, K., Curriden, S.A., Loskutoff, D.J., 2003, Plasminogen activator inhibitor-1 detaches cells from extracellular matrices by inactivating integrins. *J Cell Biol* 160, 781-791.
- Diebold, S.S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S., Reis e Sousa, C., 2004, Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 303, 1529-1531.
- Dorsett, Y., Tuschl, T., 2004, siRNAs: applications in functional genomics and potential as therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 3, 318-329.
- Douillard, J.Y., Rosell, R., De Lena, M., Carpagnano, F., Ramlau, R., Gonzales-Larriba, J.L., Grodzki, T., Pereira, J.R., Le Groumellec, A., Lorusso, V., Clary, C., Torres, A.J., Dahabreh, J., Souquet, P.J., Astudillo, J., Fournel, P., Artal-Cortes, A., Jassem, J., Koubkova, L., His, P., Riggi, M., Hurteloup, P., 2006, Adjuvant vinorelbine plus

- cisplatin versus observation in patients with completely resected stage IB-IIIa non-small-cell lung cancer (Adjuvant Navelbine International Trialist Association [ANITA]): a randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 7, 719-727.
- Dove, A., 2002, Antisense and sensibility. *Nat Biotechnol* 20, 121-124.
- Durand, R.E., 1991, Keynote address: the influence of microenvironmental factors on the activity of radiation and drugs. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 20, 253-258.
- Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., Tuschl, T., 2001, Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-498.
- Elvert, G., Kappel, A., Heidenreich, R., Englmeier, U., Lanz, S., Acker, T., Rauter, M., Plate, K., Sieweke, M., Breier, G., Flamme, I., 2003, Cooperative interaction of hypoxia-inducible factor-2 α (HIF-2 α) and Ets-1 in the transcriptional activation of vascular endothelial growth factor receptor-2 (Flk-1). *J Biol Chem* 278, 7520-7530.
- Ema, M., Taya, S., Yokotani, N., Sogawa, K., Matsuda, Y., Fujii-Kuriyama, Y., 1997, A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1 α regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 4273-4278.
- Eul, B., Kamlah, F., Lang, N., Riedmaier, O., Kwapiszewska, G., Dahlem, G., Seeger, W., Grimminger, F., Hänze, J., Rose, F., 2007. Hypoxia-inducible-factor 2 (HIF-2) mediates tumor progression and angiogenesis in a human non-small cell lung cancer xenograft model. In: AEK-Kongress, Frankfurt.
- Fedele, A.O., Whitelaw, M.L., Peet, D.J., 2002, Regulation of gene expression by the hypoxia-inducible factors. *Mol Interv* 2, 229-243.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C., 1998, Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811.

- Fischer, D., Li, Y., Ahlemeyer, B., Krieglstein, J., Kissel, T., 2003, In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials* 24, 1121-1131.
- Flamme, I., Frohlich, T., von Reutern, M., Kappel, A., Damert, A., Risau, W., 1997, HRF, a putative basic helix-loop-helix-PAS-domain transcription factor is closely related to hypoxia-inducible factor-1 alpha and developmentally expressed in blood vessels. *Mech Dev* 63, 51-60.
- Folkman, J., 1990, What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 82, 4-6.
- Franklin, W.A., 2000, Diagnosis of lung cancer: pathology of invasive and preinvasive neoplasia. *Chest* 117, 80S-89S.
- Ge, Q., Filip, L., Bai, A., Nguyen, T., Eisen, H.N., Chen, J., 2004, Inhibition of influenza virus production in virus-infected mice by RNA interference. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 8676-8681.
- Giaccia, A.J., 1996, Hypoxic Stress Proteins: Survival of the Fittest. *Semin Radiat Oncol* 6, 46-58.
- Giatromanolaki, A., Koukourakis, M.I., Sivridis, E., Turley, H., Talks, K., Pezzella, F., Gatter, K.C., Harris, A.L., 2001, Relation of hypoxia inducible factor 1 alpha and 2 alpha in operable non-small cell lung cancer to angiogenic/molecular profile of tumours and survival. *Br J Cancer* 85, 881-890.
- Gleave, M.E., Monia, B.P., 2005, Antisense therapy for cancer. *Nat Rev Cancer* 5, 468-479.
- Gospodarowicz, M.K., Miller, D., Groome, P.A., Greene, F.L., Logan, P.A., Sobin, L.H., 2004, The process for continuous improvement of the TNM classification. *Cancer* 100, 1-5.
- Graeber, T.G., Osmanian, C., Jacks, T., Housman, D.E., Koch, C.J., Lowe, S.W., Giaccia, A.J., 1996, Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature* 379, 88-91.

- Greijer, A.E., van der Wall, E., 2004, The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis. *J Clin Pathol* 57, 1009-1014.
- Grunweller, A., Wyszko, E., Bieber, B., Jahnel, R., Erdmann, V.A., Kurreck, J., 2003, Comparison of different antisense strategies in mammalian cells using locked nucleic acids, 2'-O-methyl RNA, phosphorothioates and small interfering RNA. *Nucleic Acids Res* 31, 3185-3193.
- Hafner, M., Zawatzky, R., Hirtreiter, C., Buurman, W.A., Echtenacher, B., Hehlhans, T., Mannel, D.N., 2001, Antimetastatic effect of CpG DNA mediated by type I IFN. *Cancer Res* 61, 5523-5528.
- Halevy, O., Michalovitz, D., Oren, M., 1990, Different tumor-derived p53 mutants exhibit distinct biological activities. *Science* 250, 113-116.
- Hammond, S.M., Bernstein, E., Beach, D., Hannon, G.J., 2000, An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404, 293-296.
- Han, W., Wind-Rotolo, M., Kirkman, R.L., Morrow, C.D., 2004, Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by siRNA targeted to the highly conserved primer binding site. *Virology* 330, 221-232.
- Hannon, G.J., Rossi, J.J., 2004, Unlocking the potential of the human genome with RNA interference. *Nature* 431, 371-378.
- Hanze, J., Eul, B.G., Savai, R., Krick, S., Goyal, P., Grimminger, F., Seeger, W., Rose, F., 2003, RNA interference for HIF-1 α inhibits its downstream signalling and affects cellular proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 312, 571-577.
- Harborth, J., Elbashir, S.M., Vandeburgh, K., Manninga, H., Scaringe, S.A., Weber, K., Tuschl, T., 2003, Sequence, chemical, and structural variation of small interfering RNAs and short hairpin RNAs and the effect on mammalian gene silencing. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 13, 83-105.
- Haroon, Z.A., Raleigh, J.A., Greenberg, C.S., Dewhirst, M.W., 2000, Early wound healing exhibits cytokine surge without evidence of hypoxia. *Ann Surg* 231, 137-147.

- Heidel, J.D., Hu, S., Liu, X.F., Triche, T.J., Davis, M.E., 2004, Lack of interferon response in animals to naked siRNAs. *Nat Biotechnol* 22, 1579-1582.
- Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H., Bauer, S., 2004, Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 303, 1526-1529.
- Hemmings-Mieszczak, M., Dorn, G., Natt, F.J., Hall, J., Wishart, W.L., 2003, Independent combinatorial effect of antisense oligonucleotides and RNAi-mediated specific inhibition of the recombinant rat P2X3 receptor. *Nucleic Acids Res* 31, 2117-2126.
- Herweijer, H., Wolff, J.A., 2003, Progress and prospects: naked DNA gene transfer and therapy. *Gene Ther* 10, 453-458.
- Hirsch, F.R., Franklin, W.A., Gazdar, A.F., Bunn, P.A., Jr., 2001, Early detection of lung cancer: clinical perspectives of recent advances in biology and radiology. *Clin Cancer Res* 7, 5-22.
- Hockel, M., Vaupel, P., 2001, Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst* 93, 266-276.
- Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B., Harris, C.C., 1991, p53 mutations in human cancers. *Science* 253, 49-53.
- Hu, C.J., Wang, L.Y., Chodosh, L.A., Keith, B., Simon, M.C., 2003, Differential roles of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in hypoxic gene regulation. *Mol Cell Biol* 23, 9361-9374.
- Hudson, A.J., Normand, N., Ackroyd, J., Akhtar, S., 1999, Cellular delivery of hammerhead ribozymes conjugated to a transferrin receptor antibody. *Int J Pharm* 182, 49-58.
- Hughes, M.D., Hussain, M., Nawaz, Q., Sayyed, P., Akhtar, S., 2001, The cellular delivery of antisense oligonucleotides and ribozymes. *Drug Discov Today* 6, 303-315.
- Hutvagner, G., Zamore, P.D., 2002, A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* 297, 2056-2060.

- Iyer, N.V., Kotch, L.E., Agani, F., Leung, S.W., Laughner, E., Wenger, R.H., Gassmann, M., Gearhart, J.D., Lawler, A.M., Yu, A.Y., Semenza, G.L., 1998, Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev* 12, 149-162.
- Jaakkola, P., Mole, D.R., Tian, Y.M., Wilson, M.I., Gielbert, J., Gaskell, S.J., Kriegsheim, A., Hebestreit, H.F., Mukherji, M., Schofield, C.J., Maxwell, P.H., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J., 2001, Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 292, 468-472.
- Jackson, A.L., Bartz, S.R., Schelter, J., Kobayashi, S.V., Burchard, J., Mao, M., Li, B., Cavet, G., Linsley, P.S., 2003, Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol* 21, 635-637.
- Jahn, I., Jockel, K.H., Ahrens, W., Drescher, K., Muller, K.M., Witzko, K.H., 1990, Epidemiologische Resultate des Lungenkrebs bei Frauen. *Pneumologie* 44, 14-23.
- Jedrychowski, W., Becher, H., Wahrendorf, J., Basa-Cierpialek, Z., Gomola, K., 1992, Effect of tobacco smoking on various histological types of lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 118, 276-282.
- Jiang, B.H., Rue, E., Wang, G.L., Roe, R., Semenza, G.L., 1996, Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 271, 17771-17778.
- Jorgensen, R., 1990, Altered gene expression in plants due to trans interactions between homologous genes. *Trends Biotechnol* 8, 340-344.
- Jung, M., Davis, W.P., Taatjes, D.J., Churg, A., Mossman, B.T., 2000, Asbestos and cigarette smoke cause increased DNA strand breaks and necrosis in bronchiolar epithelial cells in vivo. *Free Radic Biol Med* 28, 1295-1299.
- Kelsey, C.R., Werner-Wasik, M., Marks, L.B., 2006, Stage III lung cancer: two or three modalities? The continued role of thoracic radiotherapy. *Oncology (Williston Park)* 20, 1210-1219; discussion 1219, 1223, 1225.

- Kichler, A., 2004, Gene transfer with modified polyethylenimines. *J Gene Med* 6 Suppl 1, S3-10.
- Kim, J., Krichevsky, A., Grad, Y., Hayes, G.D., Kosik, K.S., Church, G.M., Ruvkun, G., 2004, Identification of many microRNAs that copurify with polyribosomes in mammalian neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 360-365.
- Koong, A.C., Denko, N.C., Hudson, K.M., Schindler, C., Swiersz, L., Koch, C., Evans, S., Ibrahim, H., Le, Q.T., Terris, D.J., Giaccia, A.J., 2000, Candidate genes for the hypoxic tumor phenotype. *Cancer Res* 60, 883-887.
- Koshiji, M., Huang, L.E., 2004, Dynamic balancing of the dual nature of HIF-1alpha for cell survival. *Cell Cycle* 3, 853-854.
- Koukourakis, M.I., Giatromanolaki, A., Sivridis, E., Simopoulos, C., Turley, H., Talks, K., Gatter, K.C., Harris, A.L., 2002, Hypoxia-inducible factor (HIF1A and HIF2A), angiogenesis, and chemoradiotherapy outcome of squamous cell head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 53, 1192-1202.
- Kretschmer-Kazemi Far, R., Sczakiel, G., 2003, The activity of siRNA in mammalian cells is related to structural target accessibility: a comparison with antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Res* 31, 4417-4424.
- Krishnamachary, B., Berg-Dixon, S., Kelly, B., Agani, F., Feldser, D., Ferreira, G., Iyer, N., LaRusch, J., Pak, B., Taghavi, P., Semenza, G.L., 2003, Regulation of colon carcinoma cell invasion by hypoxia-inducible factor 1. *Cancer Res* 63, 1138-1143.
- Kruger, K., Grabowski, P.J., Zaug, A.J., Sands, J., Gottschling, D.E., Cech, T.R., 1982, Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of *Tetrahymena*. *Cell* 31, 147-157.
- Kung, A.L., Wang, S., Klco, J.M., Kaelin, W.G., Livingston, D.M., 2000, Suppression of tumor growth through disruption of hypoxia-inducible transcription. *Nat Med* 6, 1335-1340.

- Lacombe, C., Mayeux, P., 1999, The molecular biology of erythropoietin. *Nephrol Dial Transplant* 14 Suppl 2, 22-28.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., Tuschl, T., 2001, Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 294, 853-858.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Meyer, J., Borkhardt, A., Tuschl, T., 2003, New microRNAs from mouse and human. *Rna* 9, 175-179.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W., Tuschl, T., 2002, Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol* 12, 735-739.
- Lai, J.C., Benimetskaya, L., Santella, R.M., Wang, Q., Miller, P.S., Stein, C.A., 2003, G3139 (oblimersen) may inhibit prostate cancer cell growth in a partially bis-CpG-dependent non-antisense manner. *Mol Cancer Ther* 2, 1031-1043.
- Lam, S., leRiche, J.C., Zheng, Y., Coldman, A., MacAulay, C., Hawk, E., Kelloff, G., Gazdar, A.F., 1999, Sex-related differences in bronchial epithelial changes associated with tobacco smoking. *J Natl Cancer Inst* 91, 691-696.
- Lando, D., Peet, D.J., Whelan, D.A., Gorman, J.J., Whitelaw, M.L., 2002, Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science* 295, 858-861.
- Lebedeva, I., Stein, C.A., 2001, Antisense oligonucleotides: promise and reality. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41, 403-419.
- Lee, N.S., Dohjima, T., Bauer, G., Li, H., Li, M.J., Ehsani, A., Salvaterra, P., Rossi, J., 2002a, Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells. *Nat Biotechnol* 20, 500-505.
- Lee, R.C., Ambros, V., 2001, An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294, 862-864.
- Lee, Y., Jeon, K., Lee, J.T., Kim, S., Kim, V.N., 2002b, MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *Embo J* 21, 4663-4670.

- Leek, R.D., Stratford, I., Harris, A.L., 2005, The role of hypoxia-inducible factor-1 in three-dimensional tumor growth, apoptosis, and regulation by the insulin-signaling pathway. *Cancer Res* 65, 4147-4152.
- Leuschner, P.J., Ameres, S.L., Kueng, S., Martinez, J., 2006, Cleavage of the siRNA passenger strand during RISC assembly in human cells. *EMBO Rep* 7, 314-320.
- Lewis, D.L., Hagstrom, J.E., Loomis, A.G., Wolff, J.A., Herweijer, H., 2002, Efficient delivery of siRNA for inhibition of gene expression in postnatal mice. *Nat Genet* 32, 107-108.
- Liotta, L.A., Steeg, P.S., Stetler-Stevenson, W.G., 1991, Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 64, 327-336.
- Littman, A.J., White, E., Jackson, L.A., Thornquist, M.D., Gaydos, C.A., Goodman, G.E., Vaughan, T.L., 2004, Chlamydia pneumoniae infection and risk of lung cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13, 1624-1630.
- Liu, Y., Braasch, D.A., Nulf, C.J., Corey, D.R., 2004, Efficient and isoform-selective inhibition of cellular gene expression by peptide nucleic acids. *Biochemistry* 43, 1921-1927.
- Liu, Y., Cox, S.R., Morita, T., Kourembanas, S., 1995, Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer. *Circ Res* 77, 638-643.
- Lomas-Neira, J.L., Chung, C.S., Wesche, D.E., Perl, M., Ayala, A., 2005, In vivo gene silencing (with siRNA) of pulmonary expression of MIP-2 versus KC results in divergent effects on hemorrhage-induced, neutrophil-mediated septic acute lung injury. *J Leukoc Biol* 77, 846-853.
- Lorenz, J., Friedberg, T., Paulus, R., Oesch, F., Ferlinz, R., 1994, Oncogene overexpression in non-small-cell lung cancer tissue: prevalence and clinicopathological significance. *Clin Investig* 72, 156-163.

- Matranga, C., Tomari, Y., Shin, C., Bartel, D.P., Zamore, P.D., 2005, Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell* 123, 607-620.
- Maus, U., Huwe, J., Ermert, L., Ermert, M., Seeger, W., Lohmeyer, J., 2002, Molecular pathways of monocyte emigration into the alveolar air space of intact mice. *Am J Respir Crit Care Med* 165, 95-100.
- McCaffrey, A.P., Meuse, L., Pham, T.T., Conklin, D.S., Hannon, G.J., Kay, M.A., 2002, RNA interference in adult mice. *Nature* 418, 38-39.
- McManus, M.T., Sharp, P.A., 2002, Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat Rev Genet* 3, 737-747.
- Meister, G., Tuschl, T., 2004, Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 431, 343-349.
- Mittal, V., 2004, Improving the efficiency of RNA interference in mammals. *Nat Rev Genet* 5, 355-365.
- Miyagishi, M., Hayashi, M., Taira, K., 2003, Comparison of the suppressive effects of antisense oligonucleotides and siRNAs directed against the same targets in mammalian cells. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 13, 1-7.
- Moulder, J.E., Rockwell, S., 1987, Tumor hypoxia: its impact on cancer therapy. *Cancer Metastasis Rev* 5, 313-341.
- Mountain, C.F., 1997, Revisions in the International System for Staging Lung Cancer. *Chest* 111, 1710-1717.
- Nelson, P.T., Hatzigeorgiou, A.G., Mourelatos, Z., 2004, miRNP:mRNA association in polyribosomes in a human neuronal cell line. *Rna* 10, 387-394.
- Nyberg, F., Agrenius, V., Svartengren, K., Svensson, C., Pershagen, G., 1998, Dietary factors and risk of lung cancer in never-smokers. *Int J Cancer* 78, 430-436.

- Oh, Y.K., Suh, D., Kim, J.M., Choi, H.G., Shin, K., Ko, J.J., 2002, Polyethylenimine-mediated cellular uptake, nucleus trafficking and expression of cytokine plasmid DNA. *Gene Ther* 9, 1627-1632.
- Olsen, P.H., Ambros, V., 1999, The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Dev Biol* 216, 671-680.
- Osann, K.E., 1991, Lung cancer in women: the importance of smoking, family history of cancer, and medical history of respiratory disease. *Cancer Res* 51, 4893-4897.
- Paddison, P.J., Silva, J.M., Conklin, D.S., Schlabach, M., Li, M., Aruleba, S., Balijs, V., O'Shaughnessy, A., Gnoj, L., Scobie, K., Chang, K., Westbrook, T., Cleary, M., Sachidanandam, R., McCombie, W.R., Elledge, S.J., Hannon, G.J., 2004, A resource for large-scale RNA-interference-based screens in mammals. *Nature* 428, 427-431.
- Pearson, F.G., 1999, Non-small cell lung cancer: role of surgery for stages I-III. *Chest* 116, 500S-503S.
- Peng, J., Zhang, L., Drysdale, L., Fong, G.H., 2000, The transcription factor EPAS-1/hypoxia-inducible factor 2alpha plays an important role in vascular remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 8386-8391.
- Perl, M., Chung, C.S., Lomas-Neira, J., Rachel, T.M., Biffi, W.L., Cioffi, W.G., Ayala, A., 2005, Silencing of Fas, but not caspase-8, in lung epithelial cells ameliorates pulmonary apoptosis, inflammation, and neutrophil influx after hemorrhagic shock and sepsis. *Am J Pathol* 167, 1545-1559.
- Pfister, D.G., Johnson, D.H., Azzoli, C.G., Sause, W., Smith, T.J., Baker, S., Jr., Olak, J., Stover, D., Strawn, J.R., Turrisi, A.T., Somerfield, M.R., 2004, American Society of Clinical Oncology treatment of unresectable non-small-cell lung cancer guideline: update 2003. *J Clin Oncol* 22, 330-353.

- Prins, J., De Vries, E.G., Mulder, N.H., 1993, The myc family of oncogenes and their presence and importance in small-cell lung carcinoma and other tumour types. *Anticancer Res* 13, 1373-1385.
- Qin, X.F., An, D.S., Chen, I.S., Baltimore, D., 2003, Inhibiting HIV-1 infection in human T cells by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA against CCR5. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 183-188.
- Rand, T.A., Petersen, S., Du, F., Wang, X., 2005, Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell* 123, 621-629.
- Raval, R.R., Lau, K.W., Tran, M.G., Sowter, H.M., Mandriota, S.J., Li, J.L., Pugh, C.W., Maxwell, P.H., Harris, A.L., Ratcliffe, P.J., 2005, Contrasting properties of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in von Hippel-Lindau-associated renal cell carcinoma. *Mol Cell Biol* 25, 5675-5686.
- Ravi, R., Mookerjee, B., Bhujwala, Z.M., Sutter, C.H., Artemov, D., Zeng, Q., Dillehay, L.E., Madan, A., Semenza, G.L., Bedi, A., 2000, Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Genes Dev* 14, 34-44.
- Riva, C., Chauvin, C., Pison, C., Leverve, X., 1998, Cellular physiology and molecular events in hypoxia-induced apoptosis. *Anticancer Res* 18, 4729-4736.
- Rodenhuis, S., Slebos, R.J., 1990, The ras oncogenes in human lung cancer. *Am Rev Respir Dis* 142, S27-30.
- Rojas, M., Marie, B., Vignaud, J.M., Martinet, N., Siat, J., Grosdidier, G., Cascorbi, I., Alexandrov, K., 2004, High DNA damage by benzo[a]pyrene 7,8-diol-9,10-epoxide in bronchial epithelial cells from patients with lung cancer: comparison with lung parenchyma. *Cancer Lett* 207, 157-163.
- Roland, M., Rudd, R.M., 1998, Genetics and pulmonary medicine. 7. Somatic mutations in the development of lung cancer. *Thorax* 53, 979-983.
- Rose, F., Grimminger, F., Appel, J., Heller, M., Pies, V., Weissmann, N., Fink, L., Schmidt, S., Krick, S., Camenisch, G., Gassmann, M., Seeger, W., Hanze, J., 2002, Hypoxic

- pulmonary artery fibroblasts trigger proliferation of vascular smooth muscle cells: role of hypoxia-inducible transcription factors. *Faseb J* 16, 1660-1661.
- Rothenfusser, S., Tuma, E., Wagner, M., Endres, S., Hartmann, G., 2003, Recent advances in immunostimulatory CpG oligonucleotides. *Curr Opin Mol Ther* 5, 98-106.
- Ryan, H.E., Lo, J., Johnson, R.S., 1998, HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *Embo J* 17, 3005-3015.
- Salceda, S., Caro, J., 1997, Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem* 272, 22642-22647.
- Savai, R., Schermuly, R.T., Voswinckel, R., Renigunta, A., Reichmann, B., Eul, B., Grimminger, F., Seeger, W., Rose, F., Hanze, J., 2005, HIF-1alpha attenuates tumor growth in spite of augmented vascularization in an A549 adenocarcinoma mouse model. *Int J Oncol* 27, 393-400.
- Schipani, E., Ryan, H.E., Didrickson, S., Kobayashi, T., Knight, M., Johnson, R.S., 2001, Hypoxia in cartilage: HIF-1alpha is essential for chondrocyte growth arrest and survival. *Genes Dev* 15, 2865-2876.
- Schmid, T., Zhou, J., Brune, B., 2004, HIF-1 and p53: communication of transcription factors under hypoxia. *J Cell Mol Med* 8, 423-431.
- Schwartz, A.G., Rothrock, M., Yang, P., Swanson, G.M., 1999, Increased cancer risk among relatives of nonsmoking lung cancer cases. *Genet Epidemiol* 17, 1-15.
- Scortegagna, M., Ding, K., Oktay, Y., Gaur, A., Thurmond, F., Yan, L.J., Marck, B.T., Matsumoto, A.M., Shelton, J.M., Richardson, J.A., Bennett, M.J., Garcia, J.A., 2003, Multiple organ pathology, metabolic abnormalities and impaired homeostasis of reactive oxygen species in *Epas1*^{-/-} mice. *Nat Genet* 35, 331-340.
- Seggerson, K., Tang, L., Moss, E.G., 2002, Two genetic circuits repress the *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene *lin-28* after translation initiation. *Dev Biol* 243, 215-225.

- Seksek, O., Bolard, J., 2004, Delivery agents for oligonucleotides. *Methods Mol Biol* 252, 545-568.
- Semenza, G.L., 2003, Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3, 721-732.
- Semenza, G.L., Artemov, D., Bedi, A., Bhujwalla, Z., Chiles, K., Feldser, D., Laughner, E., Ravi, R., Simons, J., Taghavi, P., Zhong, H., 2001, 'The metabolism of tumours': 70 years later. *Novartis Found Symp* 240, 251-260; discussion 260-254.
- Semenza, G.L., Roth, P.H., Fang, H.M., Wang, G.L., 1994, Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 269, 23757-23763.
- Semizarov, D., Frost, L., Sarthy, A., Kroeger, P., Halbert, D.N., Fesik, S.W., 2003, Specificity of short interfering RNA determined through gene expression signatures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 6347-6352.
- Shah, S.S., Goldstraw, P., 1995, Combined pulmonary and thoracic wall resection for stage III lung cancer. *Thorax* 50, 782-784.
- Shepherd, F.A., Rodrigues Pereira, J., Ciuleanu, T., Tan, E.H., Hirsh, V., Thongprasert, S., Campos, D., Maoleekoonpiroj, S., Smylie, M., Martins, R., van Kooten, M., Dediu, M., Findlay, B., Tu, D., Johnston, D., Bezjak, A., Clark, G., Santabarbara, P., Seymour, L., 2005, Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 353, 123-132.
- Silva, J., Chang, K., Hannon, G.J., Rivas, F.V., 2004, RNA-interference-based functional genomics in mammalian cells: reverse genetics coming of age. *Oncogene* 23, 8401-8409.
- Sioud, M., Sorensen, D.R., 2003, Cationic liposome-mediated delivery of siRNAs in adult mice. *Biochem Biophys Res Commun* 312, 1220-1225.
- Smith, K., Gunaratnam, L., Morley, M., Franovic, A., Mekhail, K., Lee, S., 2005, Silencing of epidermal growth factor receptor suppresses hypoxia-inducible factor-2-driven VHL-/- renal cancer. *Cancer Res* 65, 5221-5230.

- Sobin, L.H., 2003, TNM, sixth edition: new developments in general concepts and rules. *Semin Surg Oncol* 21, 19-22.
- Song, E., Lee, S.K., Wang, J., Ince, N., Ouyang, N., Min, J., Chen, J., Shankar, P., Lieberman, J., 2003a, RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nat Med* 9, 347-351.
- Song, J.J., Liu, J., Tolia, N.H., Schneiderman, J., Smith, S.K., Martienssen, R.A., Hannon, G.J., Joshua-Tor, L., 2003b, The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. *Nat Struct Biol* 10, 1026-1032.
- Soutschek, J., Akinc, A., Bramlage, B., Charisse, K., Constien, R., Donoghue, M., Elbashir, S., Geick, A., Hadwiger, P., Harborth, J., John, M., Kesavan, V., Lavine, G., Pandey, R.K., Racie, T., Rajeev, K.G., Rohl, I., Toudjarska, I., Wang, G., Wuschko, S., Bumcrot, D., Koteliansky, V., Limmer, S., Manoharan, M., Vornlocher, H.P., 2004, Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature* 432, 173-178.
- Sowter, H.M., Raval, R.R., Moore, J.W., Ratcliffe, P.J., Harris, A.L., 2003, Predominant role of hypoxia-inducible transcription factor (Hif)-1alpha versus Hif-2alpha in regulation of the transcriptional response to hypoxia. *Cancer Res* 63, 6130-6134.
- Stark, G.R., Kerr, I.M., Williams, B.R., Silverman, R.H., Schreiber, R.D., 1998, How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* 67, 227-264.
- Steenland, K., Stayner, L., 1997, Silica, asbestos, man-made mineral fibers, and cancer. *Cancer Causes Control* 8, 491-503.
- Strauss, G.M., 2005, Adjuvant chemotherapy of lung cancer: methodologic issues and therapeutic advances. *Hematol Oncol Clin North Am* 19, 263-281, vi.
- Takei, Y., Kadomatsu, K., Yuzawa, Y., Matsuo, S., Muramatsu, T., 2004, A small interfering RNA targeting vascular endothelial growth factor as cancer therapeutics. *Cancer Res* 64, 3365-3370.

- Tanaka, F., Yanagihara, K., Otake, Y., Miyahara, R., Kawano, Y., Nakagawa, T., Shoji, T., Wada, H., 2000, Surgery for non-small cell lung cancer: postoperative survival based on the revised tumor-node-metastasis classification and its time trend. *Eur J Cardiothorac Surg* 18, 147-155.
- Thomas, C.E., Ehrhardt, A., Kay, M.A., 2003, Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet* 4, 346-358.
- Tian, H., Hammer, R.E., Matsumoto, A.M., Russell, D.W., McKnight, S.L., 1998, The hypoxia-responsive transcription factor EPAS1 is essential for catecholamine homeostasis and protection against heart failure during embryonic development. *Genes Dev* 12, 3320-3324.
- Tomari, Y., Matranga, C., Haley, B., Martinez, N., Zamore, P.D., 2004, A protein sensor for siRNA asymmetry. *Science* 306, 1377-1380.
- Tomari, Y., Zamore, P.D., 2005, Perspective: machines for RNAi. *Genes Dev* 19, 517-529.
- Tsuzuki, Y., Fukumura, D., Oosthuyse, B., Koike, C., Carmeliet, P., Jain, R.K., 2000, Vascular endothelial growth factor (VEGF) modulation by targeting hypoxia-inducible factor-1 α --> hypoxia response element--> VEGF cascade differentially regulates vascular response and growth rate in tumors. *Cancer Res* 60, 6248-6252.
- Tuschl, T., 2002, Expanding small RNA interference. *Nat Biotechnol* 20, 446-448.
- Tuschl, T., Borkhardt, A., 2002, Small interfering RNAs: a revolutionary tool for the analysis of gene function and gene therapy. *Mol Interv* 2, 158-167.
- Tyagi, P., 2005, Bevacizumab, when added to paclitaxel/carboplatin, prolongs survival in previously untreated patients with advanced non-small-cell lung cancer: preliminary results from the ECOG 4599 trial. *Clin Lung Cancer* 6, 276-278.
- Urban-Klein, B., Werth, S., Abuharbeid, S., Czubyko, F., Aigner, A., 2005, RNAi-mediated gene-targeting through systemic application of polyethylenimine (PEI)-complexed siRNA in vivo. *Gene Ther* 12, 461-466.

- Vaupel, P., 2004, The role of hypoxia-induced factors in tumor progression. *Oncologist* 9 Suppl 5, 10-17.
- Vaupel, P., Briest, S., Hockel, M., 2002, Hypoxia in breast cancer: pathogenesis, characterization and biological/therapeutic implications. *Wien Med Wochenschr* 152, 334-342.
- Vaupel, P., Harrison, L., 2004, Tumor hypoxia: causative factors, compensatory mechanisms, and cellular response. *Oncologist* 9 Suppl 5, 4-9.
- Vaupel, P., Kallinowski, F., Okunieff, P., 1989, Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Res* 49, 6449-6465.
- Vaupel, P., Mayer, A., 2005, Hypoxia and anemia: effects on tumor biology and treatment resistance. *Transfus Clin Biol* 12, 5-10.
- Vaupel, P., Mayer, A., Hockel, M., 2004, Tumor hypoxia and malignant progression. *Methods Enzymol* 381, 335-354.
- Vickers, T.A., Koo, S., Bennett, C.F., Crooke, S.T., Dean, N.M., Baker, B.F., 2003, Efficient reduction of target RNAs by small interfering RNA and RNase H-dependent antisense agents. A comparative analysis. *J Biol Chem* 278, 7108-7118.
- Volm, M., Koomagi, R., 2000, Hypoxia-inducible factor (HIF-1) and its relationship to apoptosis and proliferation in lung cancer. *Anticancer Res* 20, 1527-1533.
- Wada, H., Tanaka, F., Yanagihara, K., Ariyasu, T., Fukuse, T., Yokomise, H., Inui, K., Mizuno, H., Ike, O., Hitomi, S., 1996, Time trends and survival after operations for primary lung cancer from 1976 through 1990. *J Thorac Cardiovasc Surg* 112, 349-355.
- Wagner, E., Kircheis, R., Walker, G.F., 2004, Targeted nucleic acid delivery into tumors: new avenues for cancer therapy. *Biomed Pharmacother* 58, 152-161.
- Wang, G.L., Semenza, G.L., 1993, General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 4304-4308.

- Warnecke, C., Zaborowska, Z., Kurreck, J., Erdmann, V.A., Frei, U., Wiesener, M., Eckardt, K.U., 2004, Differentiating the functional role of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha (EPAS-1) by the use of RNA interference: erythropoietin is a HIF-2alpha target gene in Hep3B and Kelly cells. *Faseb J* 18, 1462-1464.
- Wichmann, H.E., Molik, B., Jockel, K.H., Jahn, I., Muller, K.M., 1990, [Results of the histology of bronchial carcinoma form an epidemiological study in North Rhine-Westphalia and northern Germany]. *Pneumologie* 44, 1251-1258.
- Wightman, B., Ha, I., Ruvkun, G., 1993, Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75, 855-862.
- Wolff, J.A., Malone, R.W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A., Felgner, P.L., 1990, Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 247, 1465-1468.
- Yankauckas, M.A., Morrow, J.E., Parker, S.E., Abai, A., Rhodes, G.H., Dwarki, V.J., Gromkowski, S.H., 1993, Long-term anti-nucleoprotein cellular and humoral immunity is induced by intramuscular injection of plasmid DNA containing NP gene. *DNA Cell Biol* 12, 771-776.
- Yokota, T., Miyagishi, M., Hino, T., Matsumura, R., Tasinato, A., Urushitani, M., Rao, R.V., Takahashi, R., Bredesen, D.E., Taira, K., Mizusawa, H., 2004, siRNA-based inhibition specific for mutant SOD1 with single nucleotide alternation in familial ALS, compared with ribozyme and DNA enzyme. *Biochem Biophys Res Commun* 314, 283-291.
- Yuan, Y.R., Pei, Y., Chen, H.Y., Tuschl, T., Patel, D.J., 2006, A potential protein-RNA recognition event along the RISC-loading pathway from the structure of a. aeolicus argonaute with externally bound siRNA. *Structure* 14, 1557-1565.
- Zhang, W., Singam, R., Hellermann, G., Kong, X., Juan, H.S., Lockey, R.F., Wu, S.J., Porter, K., Mohapatra, S.S., 2004, Attenuation of dengue virus infection by adeno-associated virus-mediated siRNA delivery. *Genet Vaccines Ther* 2, 8.

Zhong, H., De Marzo, A.M., Laughner, E., Lim, M., Hilton, D.A., Zagzag, D., Buechler, P., Isaacs, W.B., Semenza, G.L., Simons, J.W., 1999, Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases. *Cancer Res* 59, 5830-5835.

Zhu, T., Peterson, D.J., Tagliani, L., St Clair, G., Baszczynski, C.L., Bowen, B., 1999, Targeted manipulation of maize genes in vivo using chimeric RNA/DNA oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 8768-8773.

Zochbauer, S., Krajnik, G., Huber, H., 1994, Bronchialkrebs- Entwicklung, Diagnose, Therapie, Prognose. *Wien Klin Wochenschr* 106, 431-447.

ANHANG

Materialien und Bezugsquellen

| Bezeichnung | Firma |
|--|---|
| Tiere | |
| C57BL/6N Maus | Charles River, Deutschland GmbH, Sulzfeld |
| CD-1 Nude Maus | Charles River, Deutschland GmbH, Sulzfeld |
| Material für Tierhaltung | |
| Alleinfuttermittel für Ratten und Mäuse-Haltung, Ssniff R/M-H | Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest |
| Altromin Tiereinstreu-Granulat | Altromin GmbH + Co. KG, Lage-Lippe |
| Polycarbonatkäfig Makrolon, TypII L | Charles River Deutschland GmbH, Sulzfeld |
| Verbrauchsmaterialien für Tierversuche | |
| Blumendraht | Baumarkt |
| Ecoject Plus, Perfusionsspritze | Dispomed Witt oHG, Gelnhausen |
| EDTA | Biochrom AG, Berlin |
| Einmalskalpelle | Feather pfm, Köln |
| Faden (Ethicon Ethibond Excel 5-0, Polyester beschichtete Fäden ohne Nadel) | Johnson & Johnson, Brüssel, Belgien |
| Faden (Ethicon Mersilene 1, Polyester) | Johnson & Johnson, Brüssel, Belgien |
| Faden (Ethicon Prolene 6-0, monofil mit atraumatischer Nadel) | Johnson & Johnson, Brüssel, Belgien |
| Injekt-F Luer 1 ml | B. Braun Melsungen AG, Melsungen |
| Kanüle (20G 1½, BD Microlance TM 3) | Becton Dickson S. A., Drogheda, Ireland |
| Kanüle (24G 1“, BD Microlance TM 3) | Becton Dickson S. A., Drogheda, Ireland |
| Kanüle (26G 1/2“ BD Microlance TM 3) | Becton Dickson S. A., Drogheda, Ireland |
| Katheterspritze (Katheter F. Certofix-Mono) | B. Braun Melsungen AG, Melsungen |

Fortsetzung**Bezeichnung**

Schlauch (Tube silicone platinum, Länge 5 m,
Dimension 0,5 x 2,1 mm)
Vasocan Braunüle 20G

Firma

Fisher Bioblock Scientific, Schwerte
B. Braun Melsungen AG, Melsungen

Injektionslösungen für die Tierversuche

Glukose 10 Braun
Isotonische Natriumchlorid-Lösung Delta Select
Ketamin (Ketavet 100 mg/ml)
Xylazin (Rompun 2 %)

B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Delta Select, Pfullingen
Pharmacia GmbH, Erlangen
Bayer Vital GmbH, Leverkusen

Sonstiges für die Tierversuche

Bepanthen Augensalbe
Braunoderm
Kö-Kleber, universeller Gummikleber
Seitenschneider

Bayer Vital GmbH, Leverkusen
B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Kömmerling chem. Fabrik GmbH & Co,
Pirmasens
Baumarkt

Geräte für die Tierversuche

digitale Schieblehre (Modellnr. CD-15 CP)
Operationslampe (Schott Kl 200)
Operationsmikroskop (Stereolupe Leica MS 5)
ThermoLux[®]-Wärmeunterlage
Beatmungsgerät (MiniVent Type 845)
Waage, Sauter RP 3000

Mitutoyo, U. K. Ltd., England
Fiber Optics, SCHOTT AG, Mainz
Leica Microsystems, Bensheim
Witte und Sutor GmbH, Murrhardt
Hugo Sachs Elektronik Harvard Apparatus
GmbH, March-Hugstetten
August Sauter GmbH, Albstadt-Ebingen

Instrumente für Tierversuche

kleine Schere
Nadelhalter
Pinzette gebogen
Pinzette gerade

Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Fine Science Tools GmbH, Heidelberg

Fortsetzung**Bezeichnung**

Schere

Firma

Fine Science Tools GmbH, Heidelberg

Lösungen zur Transfektion

Aqua ad injectabilia

Baxter Deutschland GmbH, Unter-
Schleißheim

Glukose 10 Braun

B. Braun Melsungen AG, Melsungen

in vivo-jetPEI™, cationic polymer transfection
reagent

BIOMOL GmbH, Hamburg

Isotonische Natriumchlorid-Lösung Delta Select

Delta Select, Pfullingen

Lipofectamine™ 2000

Invitrogen, Karlsruhe

Opti-MEM® I Reduced Serum Medium

Invitrogen, Karlsruhe

Geräte für Transfektion und Zellkultur

Brutschrank (IR 1500 Automatic CO2 Incubator)

Flow Laboratories GmbH, Meckenheim

Deckgläser für das Haemacytometer, optisch plan
geschliffen, 20 x 26 mm

Menzel GmbH & Co KG; Braunschweig

Elektrische Pipettierhilfe, Pipettus

IBS Integra Biosciences, Chur, Schweiz

Haemacytometer, Neubauer-Kammer

Optik-Labor, Friedrichshofen

Hettrich Rotanta/RP, Kühlenzentrifuge mit
Schwingbecherrotor

Hettrich Rotanta, Tuttlingen

Olympus Mikroskop, Gerätetyp JMT-2, Inverses
Forschungsmikroskop

Olympus Deutschland GmbH, Hamburg

Rüttler (IKA-VIBRAX-VXR electronic)

Jauke/Kunkel Labortechnik, Staufen

Sterilbank (Laminar air flow, Typ BSB 4A)

Flow Laboratories GmbH, Meckenheim

Wasserbad

Köttermann-Labortechnik, Uetze-Hänigsen

Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur

15 ml, 50 ml Falcons

BD Falcon, Becton Dickinson Labware,
Becton Dickinson and Company, Franklin
Lakes, NJ, USA

Fortsetzung**Bezeichnung**

Bottle-top Filter, Gewinde 33 mm und 45 mm,
0,22 µm, 150 ml
Kryoröhrchen
Pasteurpipetten
Pipetten 5 ml, 10 ml, 50 ml

Spritzenaufsatz, Millex[®] GP, 0,22 µm Filter
Zellkulturschale 100 mm
Zellkulturschale T75

Firma

Millipore Carrigwohill, Co. Cork, Ireland
Greiner Bio-One, Nürtingen
Nunc, Wiesbaden
BD Falcon, Becton Dickinson Labware,
Becton Dickinson and Company, Franklin
Lakes, NJ, USA
Millipore Carrigwohill, Co. Cork, Ireland
Greiner Bio-One, Nürtingen
Greiner Bio-One, Nürtingen

Medien und Zusätze für die Zellkultur

DMEM:F-12 (1:1) 500 ml, -L-Glutamin
DMSO (Dimethyl sulfoxide minimum 99,5 %
GC)
fetales Kälberserum
Gentamycin/Penicillin G
Hepes, Gewebekulturpuffer, N-2-
Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulphonsäure
L-Glutamin
MEM NON-essential Amino Acids
MEM Vitamin solution
RMPI 1640
Trypsin-EDTA-Lösung

Gibco, Karlsruhe
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
PAA Laboratories GmbH, Pasching,
Österreich
Gibco, Karlsruhe
Roth GmbH, Karlsruhe
Gibco, Karlsruhe
Gibco, Karlsruhe
Gibco, Karlsruhe
Pan GmbH, Nürnberg
Gibco, Karlsruhe

FACS-Analyse

FACS canto
FACS DiVa Software

BD Biosciences, Becton Dickinson GmbH,
Franklin Lakes, NJ, USA
BD Biosciences, Becton Dickinson GmbH,
Franklin Lakes, NJ, USA

Fortsetzung**Bezeichnung****Firma****Geräte für die Histologie**

Bildbearbeitungsprogramm Q-Win

Leica Microsysteme Vertrieb GmbH,
Bensheim

digitales pH-Meter

SCHOTT AG, Mainz

Digitalkamera DC 300 FX

Leica Microsysteme Vertrieb GmbH,
Bensheim

Filter A, Wellenlänge: 380-420 nm

Leica Microsysteme Vertrieb GmbH,
Bensheim

Filter I3, Wellenlänge: 420-515 nm

Leica Microsysteme Vertrieb GmbH,
Bensheim

Filter N2.1, Wellenlänge: 500-590 nm

Leica Microsysteme Vertrieb GmbH,
Bensheim

Fluoreszenzmikroskop Leica DMLA Q550/W

Leica Microsysteme Vertrieb GmbH,
Bensheim

Leica CM1850 UV-Kryostat

Leica Microsysteme Vertrieb GmbH,
Bensheim

Wasseraufbereitungsanlage

Milli-Q Water Purification System,
Millipore, Eschborn**Verbrauchsmaterial für die Histologie**

Deckgläschen 24 x 50 mm

R. Langenbrinck, Labor- und
Medizintechnik, TeningenEinbettgefäße (Tissue Tek Cryomold
Intermediate)

Sakura, Tokyo, Japan

Färbegestell für 10 Objektträger, Glaskasten mit
Deckel

Glaswerk Wertheim, Wertheim

Mikrotom Messer, S-35

Feather, PFM Produkte für die Medizin AG,
KölnSuper Frost[®] Plus Objektträger, 25 x 75 x 1 mmR. Langenbrinck, Labor- und
Medizintechnik, Teningen

Tissue Tek O. C. T. Compound

Sakura, Tokyo, Japan

Fortsetzung**Bezeichnung****Firma****Chemikalien und Lösungen für Histologie**

Aceton

Merck KGaA, Darmstadt

Bovines Serum Albumin

PAA Laboratories GmbH, Pasching,
ÖsterreichD9564 DAPI, dilactate; 4',6-Diamidino-2-
phenylindole, dilactate

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Eosin Yellowish solution

Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz

Ethanol 70% vergällt mit Ethylmethylketon

Otto Fischar GmbH & Co KG, Saarbrücken

Ethanol 96% vergällt mit Ethylmethylketon

Otto Fischar GmbH & Co KG, Saarbrücken

Ethanol 99,6%, Ethylalkohol, Sorte 522

Schmidt Dillenburg, Dillenburg

Fluorescent Mounting Medium

Dako Cytomation GmbH, Hamburg

Haemalaun, sauer nach Mayer

Waldek GmbH & CoKG, Münster

KCl

Merck KGaA, Darmstadt

KH₂PO₄

Merck KGaA, Darmstadt

Methanol

Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz

Na₂HPO₄ x 2H₂O

Merck KGaA, Darmstadt

NaCl

Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe

Pertex, Schnelleindeckmittel für histologische
und zytologische Präparate

medite GmbH, Burgdorf

Triton X-100

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Xylol (Isomere) > 98%, reinst

Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe

Antikörper für die Histologie**Primäre Antikörper**

Rab-anti-human Caspase-3, Anti-ACTIVE

Promega Corporation, Madison, WI 53711,
5399, USA)

Caspase-3 pAb

Rab-anti-human Ki 67, Rabbit polyclonal to Ki
67-Proliferationsmarker (ab 833)Abcam Ltd.332 Cambridge Science Park,
Cambridge, CB4 0FW, UKRat-anti-mouse CD31, PECAM-1, 1 ml (15,625
µg/µl)Becton Dickinson Labware, Becton
Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ,
USA

Fortsetzung**Bezeichnung****Firma****Sekundäre Antikörper**

| | |
|--|---------------------------------------|
| Alexa Fluor 488, goat-anti-rabbit IgG (H+L), 2 mg/ml | Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA |
| Alexa Fluor 488, goat-anti-rat IgG (H+L), 2 mg/ml | Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA |

Geräte für biochemische Auswertungen

| | |
|--|--|
| ABI 7900 Sequence Detection System | Applied Biosystems, Forster City, CA, USA |
| Abzug (Captair [®] chemby erlab)) | Bio-Flow Technik Meckenheim, Meckenheim |
| Nano Drop [®] ND-1000 Spectrophotometer | Produkte für Biotechnologie, Steinfurt |
| Thermocycler (Gene Amp PCR System 2400) | Applied Biosystems, Forster City, CA 94404, USA |
| Tischzentrifuge, Zentrifuge 5417R | Eppendorf, Hamburg |

Verbrauchsmaterialien für die Biochemie

| | |
|---------------------------------------|----------------------------|
| PP-PCR-Gefäß nat., 0,2 ml, dünnwandig | Greiner Bio-One, Nürtingen |
| Safe-lock Tubes, farblos, 1,5 ml | Eppendorf, Hamburg |
| Safe-lock Tubes, farblos, 2,0 ml | Eppendorf, Hamburg |

Lösungen für die Biochemie

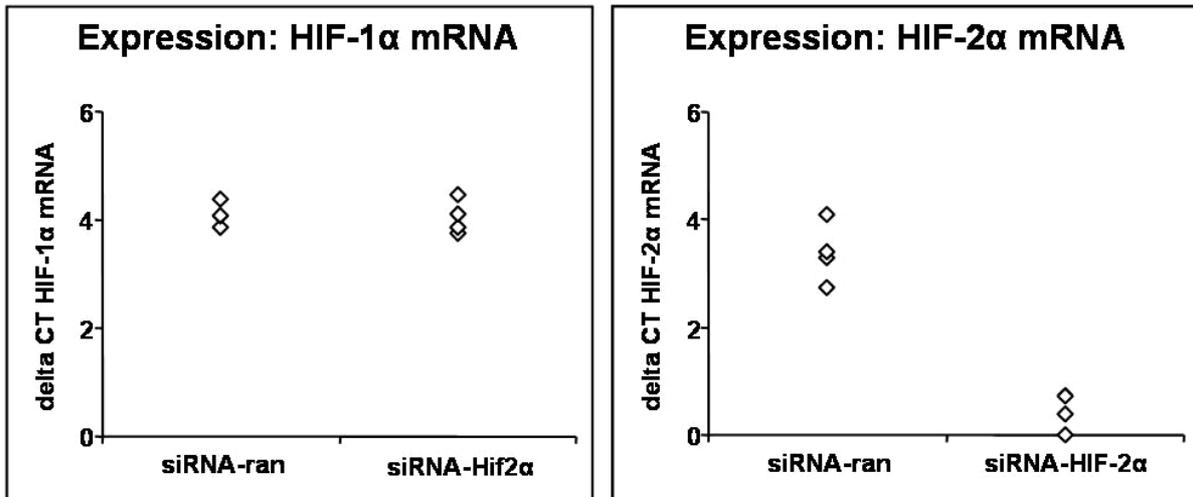
| | |
|---|--|
| DNase I, RNase-free, 10 U/μl, 10.000 U | Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen |
| M-MLV Reverse Transcriptase | Invitrogen, Karlsruhe |
| peqGOLD TriFast [™] | Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen |
| Platinum [®] SYBR [®] Green qPCR Super Mix – UD6 | Invitrogen, Karlsruhe |
| RNaseOUT [™] Recombinant Ribonuclease Inhibitor; 40 units/μl | Invitrogen, Karlsruhe |

Verwendete siRNAs und Primer

| siRNA-Bezeichnung | Sequenz (5` - 3`) | Hersteller |
|--|----------------------------|-----------------------|
| BLOCK-iT TM Fluorescent Oligo; 75 µl (1 mM) | | Invitrogen, Karlsruhe |
| Cy3-siRNA forward | ucaccgucauccaccacau (dtdt) | Biomers, Ulm |
| Cy3-siRNA-reverse | augguggugaugacgguga (dtdt) | Biomers, Ulm |
| HIF-1α-siRNA-forward | ugugaguucgcaucuugau (dtdt) | Biomers, Ulm |
| HIF-1α-siRNA-reverse | aucaaugcggaacucaca (dtdt) | Biomers, Ulm |
| HIF-2α-siRNA-forward | gucagccaccuggaagguc (dtdt) | Biomers, Ulm |
| HIF-2α-siRNA-reverse | gaccuuccagguggcugac (dtdt) | Biomers, Ulm |
| siRNA-ran-forward | uacaccguuagcagacacc (dtdt) | Biomers, Ulm |
| siRNA-ran-reverse | ggugucugcuaacggugua (dtdt) | Biomers, Ulm |

| Primer-Bezeichnung | Primersequenz (5` - 3`) | Hersteller |
|---------------------------|---------------------------------|---------------------------|
| hu Hif 1a_FP | caa gaa gcc cta acg tgt tat ctg | MWG-Biotech AG, Ebersberg |
| hu Hif 1a_RP | cgc ttc ctc tga gca ttc tgc | MWG-Biotech AG, Ebersberg |
| hu Hif 2a_FP | atc agc ttc ctg cga aca ca | MWG-Biotech AG, Ebersberg |
| hu Hif 2a_RP | cca cgg caa tga aac cct c | MWG-Biotech AG, Ebersberg |
| huku_PBGD_FP | ccc acg cga atc act ctc at | MWG-Biotech AG, Ebersberg |
| huku_PBGD_RP | tgt ctg gta acg gca atg cg | MWG-Biotech AG, Ebersberg |

Rohdaten: Real Time PCR zu 4.2.3.2.



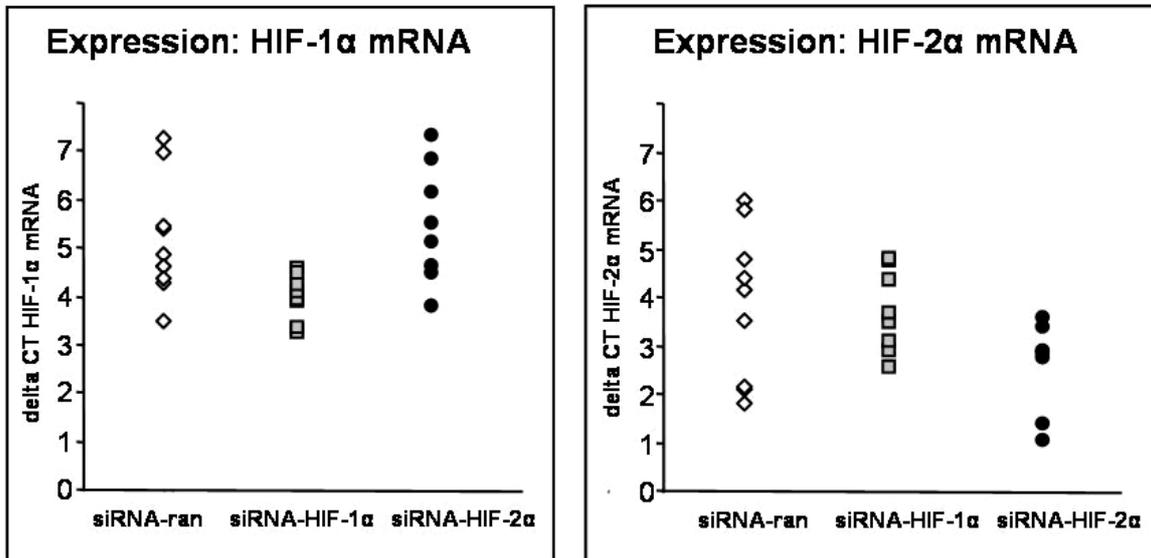
Rohdaten: Wachstumskurve 4.3.1.

| siRNA-ran | | | | | | | | |
|------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|--------------|
| Tage | Maus 1 | Maus 2 | Maus 3 | Maus 4 | Maus 5 | MW | SD | SEM |
| 0 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 0,00 | 0,00 |
| 4 | 161,79 | 114,66 | 76,62 | 80,12 | 78,27 | 102,29 | 36,81 | 16,46 |
| 7 | 198,38 | 162,67 | 170,91 | 114,40 | 63,53 | 141,98 | 53,29 | 23,83 |
| 11 | 278,78 | 181,12 | 200,91 | 155,19 | 40,94 | 171,39 | 86,28 | 38,59 |
| 14 | 348,90 | 243,37 | 330,55 | 232,43 | 134,34 | 257,92 | 86,15 | 38,53 |
| 18 | 409,78 | 229,06 | 322,01 | 230,78 | 281,23 | 294,57 | 75,11 | 33,59 |
| 21 | 446,29 | 231,03 | 381,71 | 358,50 | 198,96 | 323,30 | 104,59 | 46,77 |
| 25 | 446,49 | 311,00 | 384,00 | 503,11 | 360,47 | 401,01 | 75,04 | 33,56 |
| 28 | 686,47 | 284,64 | 437,67 | 398,13 | 383,01 | 437,98 | 149,89 | 67,03 |
| 32 | 721,34 | 402,81 | 609,97 | 673,10 | 457,72 | 572,99 | 137,52 | 61,50 |
| 35 | 727,63 | 415,28 | 725,85 | 556,54 | 373,37 | 559,73 | 166,88 | 74,63 |

| siRNA-HIF-1α | | | | | | | | |
|---------------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|----------------|---------------|---------------|---------------|
| Tage | Maus 6 | Maus 7 | Maus 8 | Maus 9 | Maus 10 | MW | SD | SEM |
| 0 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 0,00 | 0,00 |
| 4 | 122,26 | 136,78 | 330,60 | 43,98 | 112,00 | 149,12 | 107,52 | 48,08 |
| 7 | 164,15 | 137,44 | 377,13 | 84,31 | 157,78 | 184,16 | 112,35 | 50,24 |
| 11 | 138,74 | 200,49 | 417,61 | 175,87 | 112,74 | 209,09 | 121,34 | 54,26 |
| 14 | 192,27 | 253,94 | 517,64 | 371,10 | 137,56 | 294,50 | 151,97 | 67,96 |
| 18 | 158,28 | 261,47 | 435,96 | 343,10 | 223,05 | 284,37 | 107,95 | 48,28 |
| 21 | 322,42 | 380,03 | 524,35 | 406,60 | 252,32 | 377,15 | 101,39 | 45,35 |
| 25 | 257,69 | 382,86 | 552,33 | 762,74 | 426,06 | 476,34 | 191,62 | 85,70 |
| 28 | 277,04 | 295,43 | 636,07 | 638,94 | 428,80 | 455,26 | 176,38 | 78,88 |
| 32 | 320,18 | 443,65 | 660,83 | 442,36 | 622,03 | 497,81 | 141,04 | 63,07 |
| 35 | 358,76 | 458,58 | 1521,80 | 510,63 | 657,73 | 701,50 | 471,09 | 210,68 |

| siRNA-HIF-2α | | | | | | | | |
|---------------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|---------------|---------------|--------------|
| Tage | Maus 11 | Maus 12 | Maus 13 | Maus 14 | Maus 15 | MW | SD | SEM |
| 0 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 0,00 | 0,00 |
| 4 | 105,31 | 100,43 | 121,29 | 32,84 | 58,87 | 83,75 | 36,61 | 16,37 |
| 7 | 193,14 | 205,05 | 140,50 | 69,49 | 76,20 | 136,88 | 63,34 | 28,33 |
| 11 | 131,73 | 128,95 | 149,30 | 137,34 | 262,12 | 161,89 | 56,57 | 25,30 |
| 14 | 153,32 | 135,26 | 155,74 | 76,80 | 304,67 | 165,16 | 84,25 | 37,68 |
| 18 | 189,12 | 245,83 | 211,71 | 122,90 | 248,55 | 203,62 | 51,46 | 23,01 |
| 21 | 269,96 | 203,99 | 252,16 | 152,87 | 256,72 | 227,14 | 48,44 | 21,66 |
| 25 | 210,05 | 141,18 | 291,50 | 153,31 | 244,42 | 208,09 | 62,77 | 28,07 |
| 28 | 142,92 | 205,26 | 263,28 | 116,16 | 381,60 | 221,84 | 105,96 | 47,39 |
| 32 | 228,71 | 146,55 | 267,21 | 108,39 | 396,64 | 229,50 | 112,81 | 50,45 |
| 35 | 156,09 | 143,54 | 250,18 | 134,11 | 300,33 | 196,85 | 74,15 | 33,16 |

Rohdaten: Real Time PCR zu 4.3.2.



Rohdaten zu 4.3.3. Angiogenese der A549-Tumoren:

1. Einzelwerte zur Angiogenese der siRNA transfizierten Tumoren

Tumor 1-5: siRNA-ran

Tumor 6-10: siRNA-HIF-1 α

Tumor 11-15: siRNA-HIF-2 α

| | | | | | | | | |
|-----------|----|-------|-----------|----|-------|-----------|----|-------|
| Tumor-Nr. | | CD 31 | Tumor-Nr. | | CD 31 | Tumor-Nr. | | CD 31 |
| 1 | | 171 | 6 | | 128 | 11 | | 78 |
| 1 | | 117 | 6 | | 242 | 11 | | 83 |
| 1 | | 133 | 6 | | 131 | 11 | | 99 |
| 1 | | 112 | 6 | | 115 | 11 | | 93 |
| 1 | | 110 | 6 | | 148 | 11 | | 74 |
| 1 | MW | 128,6 | 6 | MW | 152,8 | 11 | MW | 85,4 |
| Tumor-Nr. | | CD 31 | Tumor-Nr. | | CD 31 | Tumor-Nr. | | CD 31 |
| 2 | | 162 | 7 | | 128 | 12 | | 101 |
| 2 | | 108 | 7 | | 75 | 12 | | 80 |
| 2 | | 99 | 7 | | 113 | 12 | | 110 |
| 2 | | 91 | 7 | | 92 | 12 | | 98 |
| 2 | | 95 | 7 | | 82 | 12 | | 62 |
| 2 | MW | 111 | 7 | MW | 98 | 12 | MW | 90,2 |
| Tumor-Nr. | | CD 31 | Tumor-Nr. | | CD 31 | Tumor-Nr. | | CD 31 |
| 3 | | 86 | 8 | | 133 | 13 | | 93 |
| 3 | | 135 | 8 | | 59 | 13 | | 94 |
| 3 | | 83 | 8 | | 43 | 13 | | 52 |
| 3 | | 78 | 8 | | 59 | 13 | | 35 |
| 3 | | 76 | 8 | | 77 | 13 | | 44 |
| 3 | MW | 91,6 | 8 | MW | 74,2 | 13 | MW | 63,6 |
| Tumor-Nr. | | CD 31 | Tumor-Nr. | | CD 31 | Tumor-Nr. | | CD 31 |
| 4 | | 128 | 9 | | 60 | 14 | | 79 |
| 4 | | 84 | 9 | | 44 | 14 | | 92 |
| 4 | | 111 | 9 | | 68 | 14 | | 71 |
| 4 | | 120 | 9 | | 78 | 14 | | 53 |
| 4 | | 115 | 9 | | 66 | 14 | | 60 |
| 4 | MW | 111,6 | 9 | MW | 63,2 | 14 | MW | 71 |
| Tumor-Nr. | | CD 31 | Tumor-Nr. | | CD 31 | Tumor-Nr. | | CD 31 |
| 5 | | 96 | 10 | | 71 | 15 | | 53 |
| 5 | | 103 | 10 | | 84 | 15 | | 55 |
| 5 | | 81 | 10 | | 161 | 15 | | 77 |
| 5 | | 82 | 10 | | 41 | 15 | | 71 |
| 5 | | 85 | 10 | | 27 | 15 | | 45 |
| 5 | MW | 89,4 | 10 | MW | 76,8 | 15 | MW | 60,2 |

2. Berechnung der Mittelwerte, Standardabweichung und Standardfehler der Angiogenese

| Angiogenese (CD 31) | |
|----------------------|--------|
| siRNA-ran | |
| Tumor | CD 31 |
| 1 | 128,60 |
| 2 | 111,00 |
| 3 | 91,60 |
| 4 | 111,60 |
| 5 | 89,40 |
| MW | 106,44 |
| SD | 16,19 |
| SEM | 7,24 |
| siRNA-HIF-1 α | |
| Tumor | CD 31 |
| 6 | 152,80 |
| 7 | 98,00 |
| 8 | 74,20 |
| 9 | 63,20 |
| 10 | 76,80 |
| MW | 93,00 |
| SD | 35,72 |
| SEM | 15,98 |
| siRNA-HIF-2 α | |
| Tumor | CD 31 |
| 11 | 85,40 |
| 12 | 90,20 |
| 13 | 63,60 |
| 14 | 71,00 |
| 15 | 60,20 |
| MW | 68,01 |
| SD | 19,95 |
| SEM | 8,14 |

Rohdaten zu 4.3.4. Proliferation der A549-Tumoren:

1. Einzelwerte zur Proliferation der siRNA-ran transfizierten Tumoren

| Tumor-Nr. | | Dapi | KI 67 | Relation |
|-----------|----|----------|----------|------------|
| 1 | | 183482 | 52110 | 0,28400606 |
| 1 | | 139088 | 40679 | 0,29246952 |
| 1 | | 189834 | 39057 | 0,20574291 |
| 1 | | 109305 | 53010 | 0,48497324 |
| 1 | | 72095 | 64569 | 0,89560996 |
| 1 | MW | 138760,8 | 49885 | 0,35950355 |
| Tumor-Nr. | | Dapi | KI 67 | Relation |
| 2 | | 162694 | 79482 | 0,48853676 |
| 2 | | 159297 | 48467 | 0,30425557 |
| 2 | | 121422 | 43076 | 0,35476273 |
| 2 | | 102654 | 46337 | 0,45139011 |
| 2 | | 142335 | 67830 | 0,4765518 |
| 2 | MW | 137680,4 | 57038,4 | 0,41428119 |
| Tumor-Nr. | | Dapi | KI 67 | Relation |
| 3 | | 279212 | 161816 | 0,57954529 |
| 3 | | 268322 | 55514 | 0,20689321 |
| 3 | | 280786 | 93286 | 0,33223166 |
| 3 | | 218687 | 158058 | 0,72275901 |
| 3 | | 227617 | 135109 | 0,59358044 |
| 3 | MW | 254924,8 | 120756,6 | 0,47369499 |
| Tumor-Nr. | | Dapi | KI 67 | Relation |
| 4 | | 174599 | 103117 | 0,5905933 |
| 4 | | 201946 | 125723 | 0,62255752 |
| 4 | | 158355 | 71723 | 0,45292539 |
| 4 | | 148336 | 58056 | 0,39138173 |
| 4 | | 236585 | 159905 | 0,67588816 |
| 4 | MW | 183964,2 | 103704,8 | 0,56372272 |
| Tumor-Nr. | | Dapi | KI 67 | Relation |
| 5 | | 226017 | 114585 | 0,50697514 |
| 5 | | 132937 | 53859 | 0,4051468 |
| 5 | | 176392 | 95360 | 0,54061409 |
| 5 | | 193462 | 104340 | 0,53933072 |
| 5 | | 185342 | 98275 | 0,530236 |
| 5 | MW | 182830 | 93283,8 | 0,51022152 |

2. Einzelwerte zur Proliferation der siRNA-HIF-1 α transfizierten Tumoren

| Tumor-Nr. | | Dapi | KI 67 | Relation |
|-----------|----|----------|---------|------------|
| 6 | | 193630 | 40057 | 0,20687393 |
| 6 | | 159637 | 37149 | 0,23270921 |
| 6 | | 178235 | 33225 | 0,1864112 |
| 6 | | 177524 | 32262 | 0,18173317 |
| 6 | | 138932 | 18189 | 0,13092016 |
| 6 | MW | 169591,6 | 32176,4 | 0,18972874 |
| Tumor-Nr. | | Dapi | KI 67 | Relation |
| 7 | | 78993 | 41607 | 0,52671756 |
| 7 | | 106826 | 15257 | 0,14282104 |
| 7 | | 114019 | 20212 | 0,1772687 |
| 7 | | 74630 | 19912 | 0,26680959 |
| 7 | | 39614 | 12610 | 0,31832181 |
| 7 | MW | 82816,4 | 21919,6 | 0,26467704 |
| Tumor-Nr. | | Dapi | KI 67 | Relation |
| 8 | | 186455 | 43548 | 0,23355769 |
| 8 | | 172182 | 45796 | 0,26597438 |
| 8 | | 165210 | 41112 | 0,24884692 |
| 8 | | 148936 | 33116 | 0,22235054 |
| 8 | | 164287 | 56654 | 0,34484774 |
| 8 | MW | 167414 | 44045,2 | 0,2630915 |
| Tumor-Nr. | | Dapi | KI 67 | Relation |
| 9 | | 212428 | 56591 | 0,26640085 |
| 9 | | 203423 | 62714 | 0,30829356 |
| 9 | | 123037 | 40678 | 0,33061599 |
| 9 | | 128025 | 43140 | 0,33696544 |
| 9 | | 161238 | 49279 | 0,30562895 |
| 9 | MW | 165630,2 | 50480,4 | 0,30477775 |
| Tumor-Nr. | | Dapi | KI 67 | Relation |
| 10 | | 178483 | 64290 | 0,36020237 |
| 10 | | 231265 | 24240 | 0,10481482 |
| 10 | | 186579 | 51528 | 0,27617256 |
| 10 | | 147919 | 15818 | 0,1069369 |
| 10 | | 187315 | 79237 | 0,42301471 |
| 10 | MW | 186312,2 | 47022,6 | 0,25238605 |

3. Einzelwerte zur Proliferation der siRNA-HIF-2 α transfizierten Tumoren

| Tumor-Nr. | | Dapi | KI 67 | Relation |
|-----------|----|----------|---------|------------|
| 11 | | 152498 | 41035 | 0,2690855 |
| 11 | | 191357 | 80146 | 0,41882973 |
| 11 | | 239929 | 102478 | 0,42711802 |
| 11 | | 183989 | 62677 | 0,34065623 |
| 11 | | 233264 | 81823 | 0,35077423 |
| 11 | MW | 200207,4 | 73631,8 | 0,36777761 |
| Tumor-Nr. | | Dapi | KI 67 | Relation |
| 12 | | 95336 | 26026 | 0,27299236 |
| 12 | | 72003 | 19337 | 0,26855825 |
| 12 | | 139962 | 19030 | 0,13596548 |
| 12 | | 181544 | 20916 | 0,11521174 |
| 12 | | 169160 | 3450 | 0,02039489 |
| 12 | MW | 131601 | 17751,8 | 0,13489107 |
| Tumor-Nr. | | Dapi | KI 67 | Relation |
| 13 | | 200600 | 80826 | 0,40292124 |
| 13 | | 184858 | 71741 | 0,38808707 |
| 13 | | 154143 | 29889 | 0,19390436 |
| 13 | | 139279 | 31164 | 0,22375232 |
| 13 | | 185508 | 67369 | 0,36315954 |
| 13 | MW | 172877,6 | 56197,8 | 0,32507277 |
| Tumor-Nr. | | Dapi | KI 67 | Relation |
| 14 | | 152346 | 38240 | 0,25100757 |
| 14 | | 161209 | 45201 | 0,28038757 |
| 14 | | 171755 | 65634 | 0,38213735 |
| 14 | | 186536 | 40776 | 0,21859587 |
| 14 | | 204599 | 38685 | 0,18907717 |
| 14 | MW | 175289 | 45707,2 | 0,26075338 |
| Tumor-Nr. | | Dapi | KI 67 | Relation |
| 15 | | 238646 | 82520 | 0,34578413 |
| 15 | | 216097 | 65302 | 0,30218837 |
| 15 | | 215908 | 66130 | 0,30628786 |
| 15 | | 303685 | 66347 | 0,21847309 |
| 15 | | 217940 | 75984 | 0,34864642 |
| 15 | MW | 238455,2 | 71256,6 | 0,29882594 |

4. Berechnung der Mittelwerte, Standardabweichung und Standardfehler der Proliferation

| Proliferation (KI 67) | | | |
|-----------------------|-----------|-----------|----------|
| siRNA-ran | | | |
| Tumor | Dapi | KI 67 | Relation |
| 1 | 138760,80 | 49885,00 | 0,36 |
| 2 | 137680,40 | 57038,40 | 0,41 |
| 3 | 254924,80 | 120756,60 | 0,47 |
| 4 | 183964,20 | 103704,80 | 0,56 |
| 5 | 182830,00 | 93283,80 | 0,51 |
| MW | 179632,04 | 84933,72 | 0,46 |
| SD | 47771,31 | 30462,75 | 0,08 |
| SEM | 21363,98 | 13623,36 | 0,04 |
| siRNA-HIF-1 α | | | |
| Tumor | Dapi | KI 67 | Relation |
| 6 | 169591,60 | 32176,40 | 0,19 |
| 7 | 82816,40 | 21919,60 | 0,26 |
| 8 | 167414,00 | 44045,20 | 0,26 |
| 9 | 165630,20 | 50480,40 | 0,30 |
| 10 | 186312,20 | 47022,60 | 0,25 |
| MW | 154352,88 | 39128,84 | 0,25 |
| SD | 40831,53 | 11830,41 | 0,04 |
| SEM | 18260,42 | 5290,72 | 0,02 |
| siRNA-HIF-2 α | | | |
| Tumor | Dapi | KI 67 | Relation |
| 11 | 200207,40 | 73631,80 | 0,37 |
| 12 | 131601,00 | 17751,80 | 0,13 |
| 13 | 172877,60 | 56197,80 | 0,33 |
| 14 | 175289,00 | 45707,20 | 0,26 |
| 15 | 238455,20 | 71256,60 | 0,30 |
| MW | 183686,04 | 52909,04 | 0,28 |
| SD | 39283,59 | 22719,92 | 0,09 |
| SEM | 17568,15 | 10160,66 | 0,04 |

Rohdaten zu 4.3.5. Apoptose der A549-Tumoren:

1. Einzelwerte zur Apoptose der siRNA-ran transfizierten Tumoren

| Tumor-Nr. | | Dapi | Caspase-3 | Relation |
|-----------|----|----------|-----------|------------|
| 1 | | 145996 | 14134 | 0,09681087 |
| 1 | | 96318 | 12133 | 0,12596815 |
| 1 | | 114021 | 9046 | 0,07933626 |
| 1 | | 114019 | 9064 | 0,07949552 |
| 1 | | 114122 | 12046 | 0,10555371 |
| 1 | MW | 116895,2 | 11284,6 | 0,09653604 |
| Tumor-Nr. | | Dapi | Caspase-3 | Relation |
| 2 | | 101613 | 20143 | 0,19823251 |
| 2 | | 101188 | 10651 | 0,10525952 |
| 2 | | 86858 | 6898 | 0,07941698 |
| 2 | | 107932 | 7069 | 0,06549494 |
| 2 | | 175270 | 26402 | 0,15063616 |
| 2 | MW | 114572,2 | 14232,6 | 0,12422385 |
| Tumor-Nr. | | Dapi | Caspase-3 | Relation |
| 3 | | 150173 | 96574 | 0,64308498 |
| 3 | | 140537 | 63599 | 0,45254275 |
| 3 | | 116013 | 35968 | 0,31003422 |
| 3 | | 130861 | 44863 | 0,34282941 |
| 3 | | 82994 | 31429 | 0,37869003 |
| 3 | MW | 124115,6 | 54486,6 | 0,4389988 |
| Tumor-Nr. | | Dapi | Caspase-3 | Relation |
| 4 | | 139122 | 138996 | 0,99909432 |
| 4 | | 72245 | 67269 | 0,93112326 |
| 4 | | 72264 | 67236 | 0,93042179 |
| 4 | | 74392 | 91637 | 1,23181256 |
| 4 | | 175072 | 73895 | 0,42208349 |
| 4 | MW | 106619 | 87806,6 | 0,8235549 |
| Tumor-Nr. | | Dapi | Caspase-3 | Relation |
| 5 | | 80899 | 72090 | 0,89111114 |
| 5 | | 106978 | 98312 | 0,91899269 |
| 5 | | 47555 | 42122 | 0,88575334 |
| 5 | | 75392 | 72856 | 0,96636248 |
| 5 | | 118753 | 68740 | 0,57884853 |
| 5 | MW | 85915,4 | 70824 | 0,82434581 |

2. Einzelwerte zur Apoptose der siRNA-HIF-1 α transfizierten Tumoren

| Tumor-Nr. | | Dapi | Caspase-3 | Relation |
|-----------|----|----------|-----------|------------|
| 6 | | 99494 | 29437 | 0,29586709 |
| 6 | | 132689 | 22437 | 0,16909465 |
| 6 | | 220999 | 30460 | 0,13782868 |
| 6 | | 143882 | 30276 | 0,21042243 |
| 6 | | 174321 | 39177 | 0,22474056 |
| 6 | MW | 154277 | 30357,4 | 0,19677204 |
| Tumor-Nr. | | Dapi | Caspase-3 | Relation |
| 7 | | 84338 | 9004 | 0,10676089 |
| 7 | | 162441 | 6944 | 0,04274783 |
| 7 | | 102223 | 2166 | 0,02118897 |
| 7 | | 124421 | 2442 | 0,01962691 |
| 7 | | 81451 | 1826 | 0,02241839 |
| 7 | MW | 110974,8 | 4476,4 | 0,04033709 |
| Tumor-Nr. | | Dapi | Caspase-3 | Relation |
| 8 | | 60285 | 59374 | 0,98488845 |
| 8 | | 43926 | 37638 | 0,85685016 |
| 8 | | 71557 | 65723 | 0,91847059 |
| 8 | | 39313 | 38274 | 0,97357108 |
| 8 | | 19703 | 22754 | 1,15484952 |
| 8 | MW | 46956,8 | 44752,6 | 0,95305898 |
| Tumor-Nr. | | Dapi | Caspase-3 | Relation |
| 9 | | 132654 | 65593 | 0,49446681 |
| 9 | | 118765 | 49726 | 0,41869238 |
| 9 | | 124255 | 49418 | 0,39771438 |
| 9 | | 108466 | 38753 | 0,35728247 |
| 9 | | 116978 | 43285 | 0,37002684 |
| 9 | MW | 120223,6 | 49355 | 0,41052672 |
| Tumor-Nr. | | Dapi | Caspase-3 | Relation |
| 10 | | 78449 | 114522 | 1,4598274 |
| 10 | | 75573 | 98886 | 1,30848319 |
| 10 | | 206551 | 116637 | 0,56468862 |
| 10 | | 67030 | 41883 | 0,62483962 |
| 10 | | 148391 | 37327 | 0,25154491 |
| 10 | MW | 115198,8 | 81851 | 0,71051955 |

3. Einzelwerte zur Apoptose der siRNA-HIF-2 α transfizierten Tumoren

| Tumor-Nr. | | Dapi | Caspase-3 | Relation |
|-----------|----|----------|-----------|------------|
| 11 | | 32086 | 22914 | 0,71414324 |
| 11 | | 77177 | 32571 | 0,42202988 |
| 11 | | 53253 | 10325 | 0,19388579 |
| 11 | | 39474 | 36773 | 0,93157521 |
| 11 | | 86763 | 63707 | 0,73426461 |
| 11 | MW | 57750,6 | 33258 | 0,57589012 |
| Tumor-Nr. | | Dapi | Caspase-3 | Relation |
| 12 | | 74293 | 37810 | 0,50893085 |
| 12 | | 71224 | 35445 | 0,49765528 |
| 12 | | 76838 | 24279 | 0,31597647 |
| 12 | | 75838 | 21279 | 0,28058493 |
| 12 | | 99355 | 40728 | 0,40992401 |
| 12 | MW | 79509,6 | 31908,2 | 0,40131255 |
| Tumor-Nr. | | Dapi | Caspase-3 | Relation |
| 13 | | 114104 | 102478 | 0,8981105 |
| 13 | | 52494 | 102299 | 1,9487751 |
| 13 | | 24901 | 84587 | 3,39693185 |
| 13 | | 172423 | 96049 | 0,55705445 |
| 13 | | 25439 | 78354 | 3,0800739 |
| 13 | MW | 77872,2 | 92753,4 | 1,19109772 |
| Tumor-Nr. | | Dapi | Caspase-3 | Relation |
| 14 | | 39745 | 121917 | 3,06748019 |
| 14 | | 87760 | 156994 | 1,78890155 |
| 14 | | 92552 | 162555 | 1,75636399 |
| 14 | | 68223 | 110690 | 1,62247336 |
| 14 | | 58107 | 111920 | 1,92610185 |
| 14 | MW | 69277,4 | 132815,2 | 1,91715047 |
| Tumor-Nr. | | Dapi | Caspase-3 | Relation |
| 15 | | 90961 | 121774 | 1,33874957 |
| 15 | | 211429 | 203241 | 0,96127305 |
| 15 | | 212429 | 203241 | 0,9567479 |
| 15 | | 67630 | 37865 | 0,55988467 |
| 15 | | 77094 | 51919 | 0,67345059 |
| 15 | MW | 131908,6 | 123608 | 0,93707309 |

4. Berechnung der Mittelwerte, Standardabweichung und Standardfehler der Apoptose

| Apoptose (Caspase-3) | | | |
|----------------------|-----------|-----------|----------|
| siRNA-ran | | | |
| Tumor | Dapi | Caspase-3 | Relation |
| 1 | 116895,20 | 11284,60 | 0,10 |
| 2 | 114572,20 | 14232,60 | 0,12 |
| 3 | 124115,60 | 54486,60 | 0,44 |
| 4 | 115207,75 | 92949,25 | 0,81 |
| 5 | 85915,40 | 70824,00 | 0,82 |
| MW | 111341,23 | 48755,41 | 0,46 |
| SD | 14713,03 | 35597,93 | 0,35 |
| SEM | 6579,87 | 15919,88 | 0,16 |
| siRNA-HIF-1 α | | | |
| Tumor | Dapi | Caspase-3 | Relation |
| 6 | 154277,00 | 30360,00 | 0,20 |
| 7 | 110974,80 | 4476,40 | 0,04 |
| 8 | 46956,80 | 44752,60 | 0,95 |
| 9 | 120223,60 | 49355,00 | 0,41 |
| 10 | 115198,80 | 81851,00 | 0,71 |
| MW | 109526,20 | 42159,00 | 0,46 |
| SD | 38943,15 | 28254,02 | 0,37 |
| SEM | 17415,91 | 12635,58 | 0,17 |
| siRNA-HIF-2 α | | | |
| Tumor | Dapi | Caspase-3 | Relation |
| 11 | 57750,60 | 33258,00 | 0,58 |
| 12 | 79509,60 | 31908,20 | 0,40 |
| 13 | 77872,20 | 92753,40 | 1,19 |
| 14 | 69277,40 | 132815,20 | 1,92 |
| 15 | 111778,50 | 103699,75 | 0,93 |
| MW | 79237,66 | 78886,91 | 1,00 |
| SD | 20135,45 | 44735,93 | 0,60 |
| SEM | 9004,85 | 20006,52 | 0,27 |

Erklärung

"Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe.

Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten."

Gießen, 27. Juni 2007
Ort, Datum

gez. Florentine Kamlah
Unterschrift

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Werner Seeger, Herrn Prof. Dr. Dr. Friedrich Grimminger, Herrn PD Dr. Jörg Hänze und Herrn PD Dr. Frank Rose für die Überlassung des interessanten Themas, der Bereitstellung der umfangreichen Laboreinrichtung und die kompetente fachliche Betreuung.

Herrn Prof. Dr. Werner Seeger danke ich für das Stipendium, die die Anfertigung der Arbeit erst möglich machte.

Herrn Prof. Dr. Manfred Reinacher danke ich sehr für seine kompetente Unterstützung und Vertretung der Dissertation auf veterinärmedizinischer Seite.

Bei Herrn PD Dr. Jörg Hänze und Herrn Bastian Eul bedanke ich mich für ihre kompetente und engagierte Betreuung. Sie haben mir den Spaß an der Forschung gelehrt und mir immer bei Fragen oder Problemen zur Seite gestanden.

Frau Dr. Grazyna Kwapiszewska der Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. Ludger Fink danke ich für die exzellente Zusammenarbeit bei der Durchführung der Real Time PCR. Herrn Dr.

Leigh M. Marsh der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Jürgen Lohmeyer danke ich für die exzellente Zusammenarbeit bei der Durchführung der Durchflusszytometrie. Für die

praktische Einarbeitung im Labor danke ich Frau Christiane Hild, Frau Gabriele Dahlem,

Frau Annette Tschuschner, Frau Jessica Lange, Frau Juliane Ott, Frau Dr. Katrin Ahlbrecht.

Außerdem danke ich dem gesamten Team unserer Arbeitsgruppe und der Zellkultur für viele fröhliche Stunden im Laboralltag und die gute Zusammenarbeit. All meinen Freunden danke

ich für die Unterstützung, während der gesamten Zeit. Ein besonderes Dankeschön an Steffen

Grund, Dr. Stephan Kraus und Andrea Pose für die Durchsicht der Arbeit. Mein Dank gilt

auch meinen lieben Geschwistern, Tilman, Franca, Klara, Veit und Liza, die mich immer

unterstützen und bei Laune halten. Zu guter Letzt danke ich meinen Eltern, die mich immer

besonders unterstützt haben und immer für mich da sind. Danke!

Eigene Kongressbeiträge

4/05 DGIM-Wiesbaden: B. Eul, S. Krick, F. Kamlah, J. Kern, W. Seeger, J. Hänze und F. Rose

Die Hypoxie-induzierten Faktoren (HIF) bestimmen die Rolle der pulmonalarteriellen Fibroblasten im Hypoxie-induzierten vaskulären Remodeling (Posterpräsentation)

3/06 DGP-Nürnberg: F. Kamlah, B. Eul, L. Marsh, G. Kwapiszewska, W. Seeger, F. Grimminger, J. Hänze und F. Rose

siRNA Transfektion der Lunge und des Bronchialkarzinoms im Mausmodell (Posterpräsentation und freier Vortrag)

4/06 DGIM-Wiesbaden: F. Kamlah, B. Eul, L. Marsh, G. Kwapiszewska, W. Seeger, F. Grimminger, J. Hänze und F. Rose

siRNA Transfektion der Lunge und des Bronchialkarzinoms im Mausmodell (Posterpräsentation)

4/06 DGIM-Wiesbaden: B. Eul, F. Kamlah, O. Riedmaier, T. Dold, F. Grimminger, R. Engenhardt-Cabillic, W. Seeger, J. Hänze und F. Rose

HIF-2 beeinflusst die Wirkung von Cisplatin in Adenokarzinoma (A549) Zellen in vitro (Postervortrag)

5/06 DEGRO-Dresden: O. Riedmaier, B. Eul, F. Kamlah, S. Grund, R. Engenhardt-Cabillic, F. Grimminger, J. Hänze und F. Rose

Entwicklung therapeutischer Ansätze durch Modulation Hypoxie-abhängiger Signalkaskaden - Implikationen für die Strahlentherapie? (Posterpräsentation)

2/07 AEK-Frankfurt: B. Eul, F. Kamlah, N. Lang, O. Riedmaier, G. Kwapiszewska, G. Dahlem, W. Seeger, F. Grimminger, J. Hänze und F. Rose

Hypoxia-inducible-factor 2 α (HIF-2 α) mediates tumor progression and angiogenesis in a human non-small cell lung cancer xenograft model (Posterpräsentation und Vortrag)

2/07 AEK-Frankfurt: B. Eul, O. Riedmaier, S. Grund, F. Kamlah, R. Engenhardt-Cabillic, F. Grimminger, J. Hänze und F. Rose

Hypoxia-inducible-factors (HIF-1 α and HIF-2 α) affect radiation resistance in the human lung adenocarcinoma cell line A549 (Posterpräsentation)

2/07 AEK-Frankfurt: B. Eul, G. Kwapiszewska, T. Dold, G. Dahlem, L. M. Marsh, O. Riedmaier, F. Kamlah, W. Seeger, F. Grimminger, J. Hänze und F. Rose.

Hypoxia-inducible-factor 2 alpha mediates cisplatin resistance in the lung adenocarcinoma cell line A549 (Posterpräsentation)

3/07 DGP-Mannheim: F. Kamlah, N. Lang, O. Riedmaier, G. Kwapiszewska, W. Seeger, F. Grimminger, F. Rose, J. Hänze und B. Eul

Inhibition von HIF-2 α durch RNA Interferenz supprimiert die Tumorprogression am subkutanen Adenokarzinom (A549) Modell durch Beeinflussung von Proliferation, Apoptose und Angiogenese (freier Vortrag)

3/07 DGP-Mannheim: B. Eul, F. Kamlah, G. Kwapiszewska, T. Dold, G. Dahlem, L. M. Marsh, W. Seeger, F. Grimminger, J. Hänze und F. Rose.

Der Hypoxie-induzierbare-Faktor 2 alpha in der Chemotherapieresistenz von Adenokarzinomzellen der Lunge (freier Vortrag)

3/07 DGP-Mannheim: S. Shafiei Tabar, S. Li, V. Malec, F. Kamlah, N. Weissmann, W. Seeger, F. Grimminger, F. Rose, J. Hänze und B. Eul

NOX4 Expression beeinflusst das vaskuläre Remodelling unter Hypoxie in primären humanen pulmonalarteriellen Fibroblasten (Posterpräsentation)

4/07 DGIM-Wiesbaden: N. Lang, F. Kamlah, O. Riedmaier, G. Kwapiszewska, W. Seeger, F. Grimminger, F. Rose, J. Hänze und B. Eul

Inhibition von HIF-2 α durch RNA Interferenz supprimiert die Tumorprogression am subkutanen Adenokarzinom (A549) Modell durch Beeinflussung von Proliferation, Apoptose und Angiogenese (Posterpräsentation)

4/07 DGIM-Wiesbaden: T. Dold, B. Eul, F. Kamlah, G. Kwapiszewska, G. Dahlem, L. M. Marsh, W. Seeger, F. Grimminger, J. Hänze und F. Rose.

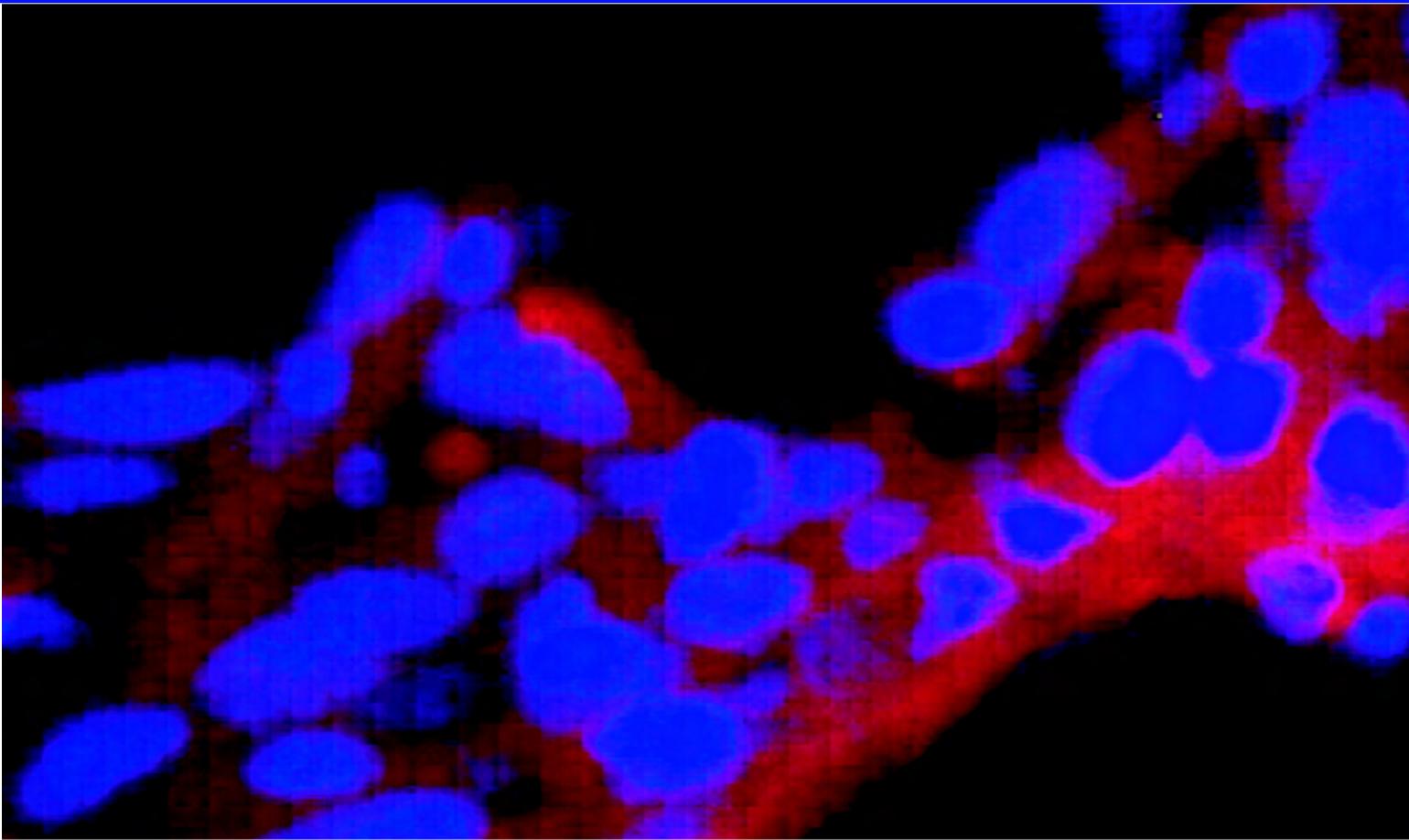
Der Hypoxie-induzierbare-Faktor 2 alpha in der Chemotherapieresistenz von Adenokarzinomzellen der Lunge (Posterpräsentation)

4/07 DGIM-Wiesbaden: O. Riedmaier, S. Grund, F. Kamlah, R. Engenhardt-Cabillic, F. Grimminger, J. Hänze, F. Rose und B. Eul

Die Rolle der Hypoxie-induzierbaren-Faktoren in der Strahlentherapieresistenz von Adenokarzinomzellen der Lunge (Posterpräsentation)

4/07 DGIM-Wiesbaden: S. Shafiei Tabar, S. Li, V. Malec, F. Kamlah, N. Weissmann, W. Seeger, F. Grimminger, F. Rose, J. Hänze und B. Eul

NOX4 Expression beeinflusst das vaskuläre Remodelling unter Hypoxie in primären humanen pulmonalarteriellen Fibroblasten (Posterpräsentation)



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5169-6



9 783835 195169 3

