

Aus der Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie der Universität Würzburg

Direktor: Universitäts-Professor Dr. med. Hubert Kübler

# MicroRNA-221 sensitiviert Prostatakarzinomzellen gegenüber TRAIL durch Inhibition von SOCS-3 und PIK3R1

**Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Vorgelegt von

**Christoph Behrmann**

geb. 16.08.1989 in Heilbronn

Würzburg, Juni 2019



Mitglieder des Betreuungskomitees:

Erstes Mitglied:                      Universitäts-Professor Dr. med. Hubert Kübler

Zweites Mitglied:                     Universitäts-Professor Dr. med Ralf C. Bargou

Drittes Mitglied:                     Dr. Burkhard Kneitz

Dekan:

Universitäts-Professor. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 27.01.2020

Referent:                                Universitäts-Professor Dr. med. Hubert Kübler

Korreferent:                            Universitäts-Professor Dr. med Ralf C. Bargou

Berichterstatteerin:                    Universitäts-Professor Dr. med Alma Zerneck-Madsen

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Epidemiologische und klinische Herausforderung des Prostatakarzinoms .....	1
1.2	Das Zytokin TRAIL und seine mögliche Bedeutung für das PCa .....	2
1.2.1	Der TRAIL-Signalweg.....	2
1.2.2	TRAIL und seine mögliche Rolle in der Tumorthherapie.....	3
1.2.3	Resistenzmechanismen im TRAIL-Signalweg .....	4
1.3	Micro-RNAs und ihre zelluläre Funktion .....	6
1.3.1	Die Synthese und Funktion von miRs.....	6
1.3.2	Micro-RNAs und ihre Rolle in der Tumorgenese.....	7
1.3.3	Die miR-221 im PCa und anderen Karzinomen .....	8
1.3.4	Die mögliche Rolle der micro-RNA-221 für den TRAIL-Signalweg .....	8
2	Forschungsfrage .....	10
3	Material und Methoden.....	11
3.1	Material .....	11
3.1.1	Zellkulturen .....	11
3.1.1.1	Zelllinien .....	11
3.1.1.2	Zellkulturmedien .....	12
3.1.2	Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	13
3.1.3	Chemikalien .....	14
3.2	Methoden .....	17
3.2.1	Sterilisation.....	17
3.2.2	Kultivierung und Passage der Zelllinien .....	17
3.2.3	Transiente Transfektion der Zellen mit microRNA.....	17
3.2.4	Behandlung mit TRAIL und Festlegung einer effektiven TRAIL-Konzentration .	19
3.2.5	Isolierung und Aufbereitung von RNA .....	20

3.2.6	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der RNA .....	21
3.2.7	Feststellung der Zellvitalität via MTS-Assay .....	21
3.2.8	Versuche mit Biolumineszenz .....	22
3.2.9	Quantifizierung der Apoptose .....	23
3.2.10	Dual-Luciferase Reporter Assay .....	24
3.2.10.1	Funktionsprinzip .....	24
3.2.10.2	Erstellung von Reporterplasmiden .....	25
3.2.10.3	Mini und Midiprep .....	26
3.2.10.4	Transiente Kotransfektion mit miRNA und Reportergen .....	26
3.2.10.5	Luciferase Assay und Vermessung .....	26
3.2.11	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	27
3.2.11.1	Funktionsprinzip .....	27
3.2.11.2	Reverse Transkription .....	28
3.2.11.3	Quantitative RT-PCR .....	29
3.2.11.4	Oligonukleotidprimer .....	30
3.2.11.5	qRT-PCR Ansätze .....	31
3.2.12	Datenverarbeitung und Statistik .....	32
3.2.12.1	Datenverarbeitung der MTS-Vitalitäts-Assays .....	32
3.2.12.2	Datenverarbeitung der Luciferase-Assays .....	32
3.2.12.3	Datenverarbeitung der qRT-PCR .....	32
3.2.12.4	Statistik .....	33
4	Ergebnisse .....	34
4.1	Die Wirkung von TRAIL auf Prostatazelllinien .....	34
4.1.1	Apoptoseinduktion durch TRAIL in PCa-Zellen .....	36
4.2	MiR-221 als Modulator des TRAIL-Signals in PCa-Zellen .....	36
4.2.1	Die Transfektionseffizienz von pre-miR-221 transfizierten PCa-Zellen .....	36

4.2.2	Wirkung von TRAIL in miR-221 überexprimierenden PCa-Zellen .....	38
4.2.3	Apoptoseinduktion durch TRAIL in miR-221-überexprimierenden PCa-Zellen	41
4.3	Mechanismen der miR-221 vermittelten Sensitivierung gegenüber TRAIL.....	42
4.3.1	Die miR-221-SOCS3-Achse als mögliche Ursache der miR-221 vermittelten TRAIL-Sensitivierung.....	42
4.3.2	Induktion einer TRAIL-supportiven Signatur durch miR-221 über Regulation des IFN-Signals.....	45
4.4	PIK3R1 als TRAIL-relevante Zielgene der miR-221 .....	47
4.4.1	Identifikation von PIK3R1 als potentiell Zielgen der miR-221 .....	47
4.4.2	miR-221 reguliert die Expression von PIK3R1 über direkte Bindung.....	48
4.4.3	Wirkung von TRAIL in PIK3R1-unterexprimierenden PCa-Zellen.....	49
5	Diskussion.....	53
5.1	miR-221 wirkt antiproliferativ in androgenunabhängig wachsenden PCa-Zellen ....	53
5.2	miR-221 bewirkt Hyperproliferation in Androgen-abhängigen RWPE-Zellen.....	53
5.3	miR-221 sensitiviert PCa-Zellen gegenüber TRAIL .....	54
5.4	miR-221 als Tumorsuppressor im PCa.....	56
5.5	Bedeutsamkeit des TRAIL-Signalwegs in der Tumorthherapie .....	57
5.6	Molekulare Mechanismen der TRAIL-Sensitivierung von PCa-Zellen .....	58
5.6.1	Einfluss einer miR-221-vermittelten SOCS-3-Inhibitor auf das TRAIL-Signal ....	58
5.6.2	Beeinflussung des TRAIL-Signals durch miR-221-vermittelte IFN-Aktivierung..	60
5.6.3	PIK3R1 als TRAIL-relevantes Zielgen der miR-221.....	61
5.6.4	Die onkogene Teilfunktion von PIK3R1 im PCa.....	62
5.7	Ausblick.....	65
6	Zusammenfassung.....	68
7	Literaturverzeichnis.....	71
8	Abbildungsverzeichnis.....	81
9	Danksagung .....	82

10	Lebenslauf .....	83
----	------------------	----

### 1 Einleitung

#### 1.1 Epidemiologische und klinische Herausforderung des Prostatakarzinoms

Obwohl das Prostatakarzinom (folgend PCa) in Deutschland als häufigstes Malignom des Mannes gilt, steht es bei den Krebs-assoziierten Todesfällen beim Mann seit Mitte der 1980er-Jahre nur an dritter Stelle (1). Dieser Widerspruch kann durch die große Heterogenität des PCas erklärt werden. So reicht die Bandbreite von langsam wachsenden Tumoren mit geringer Letalität bis hin zu hoch aggressiven Karzinomen, die selbst bei radikaler Therapie nicht mehr kurativ behandelt werden können. Durch die Einführung der PCa-Diagnostik mittels Prostata-Spezifischem Antigen (PSA) Ende der 80er Jahre kam es zu einem starken Anstieg der Neudiagnosen (2-4). So sind es momentan ca. 58.000 Neudiagnosen in Deutschland pro Jahr (5). Allerdings stieg die PCa-assoziierte Sterblichkeit keineswegs in gleichem Maße wie die Anzahl der Diagnosen. Es kam also nicht nur zu der erhofften früheren Entdeckung des PCa, sondern auch zur Therapie von eigentlich indolenten Karzinomen, die ohne Diagnose vermutlich nie symptomatisch geworden wären (6). Als Konsequenz der resultierenden Übertherapie (7) steht man vor der Notwendigkeit, Verfahren zu etablieren, die eine bessere Einschätzung der Prognose ermöglichen. Hierfür teilt man das PCa anhand des Gleason-Scores, der TNM-Klassifikation und des PSA-Wertes schon seit einiger Zeit in die Risikogruppen niedrig-, intermediär- und Hoch-Risiko PCa ein, um eine adäquate Therapieplanung zu ermöglichen (8). Allerdings herrscht auch innerhalb der Gruppe des Hoch-Risiko-PCas selbst eine erhebliche Heterogenität. So gibt es unter Patienten mit Hoch-Risiko Tumoren einen Anteil an Patienten mit ausgesprochen guter Langzeitprognose. Auf der anderen Seite versterben manche Patienten der gleichen Risikogruppe trotz radikaler und konsequenter Therapie sehr rasch an ihrem Tumorleiden (9). Diese zwei Untergruppen im Vorfeld zu differenzieren ist bisher kaum möglich, denn ausgerechnet im Falle des Hoch-Risiko-PCas mangelt es an zuverlässigen Markern, die ein Abschätzen der Prognose ermöglichen (10)

Daher sind neben den vorhandenen Markern weitere Risikomarker notwendig, die eine genauere Einteilung des PCas und eine höhere Aussagekraft über die Prognose ermöglichen.

### 1.2 Das Zytokin TRAIL und seine mögliche Bedeutung für das PCa

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den mutmaßlichen Einfluss der mikroRNA-221 auf das TRAIL-Signal in PCa-Zellen zu untersuchen. Um ein Verständnis der Fragestellung zu ermöglichen, soll zunächst eine Auseinandersetzung mit dem Zytokin TRAIL und seinen grundlegenden Eigenschaften erfolgen.

TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) ist ein Zytokin der TNF (tumor necrosis factor)-Superfamilie. Kodiert wird TRAIL durch das Gen TNFSF-10 (tumor necrosis factor superfamily-10) auf dem Chromosom 3q26 (11). TRAIL spielt vor allem bei der physiologischen Autophagozytose (12), der Regulation der adaptierten Immunantwort, dem Schutz vor Autoimmunerkrankungen und bei der antineoplastischen Immunantwort eine wichtige Rolle (13).

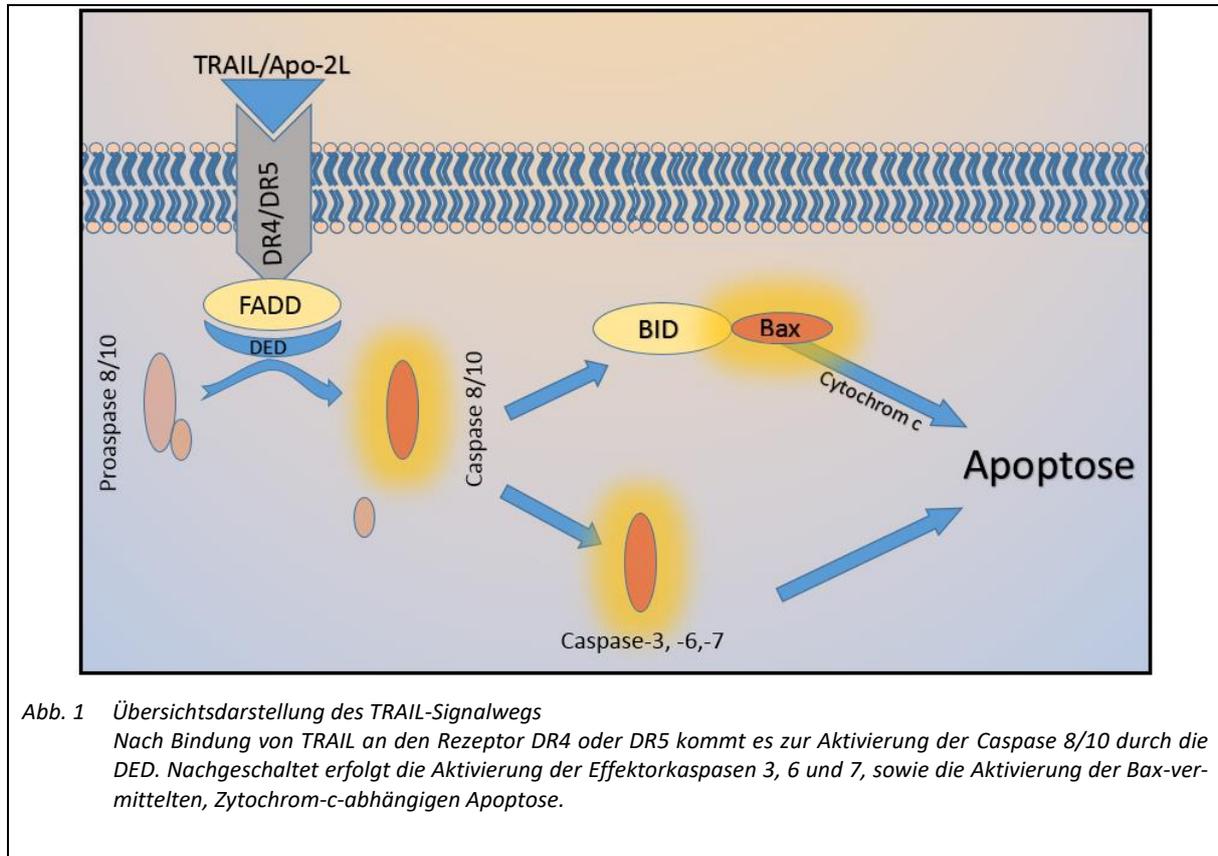
#### 1.2.1 Der TRAIL-Signalweg

TRAIL kann membrangebunden vorliegen, oder als freier Ligand sezerniert werden. Im zweitgenannten Fall ist TRAIL somit ein Ligand an seinen spezifischen Rezeptoren (14, 15). Der nach einer Rezeptorbindung aktivierte Signalweg ist schematisch in Abb. 1 dargestellt und wird im Folgenden näher beschrieben. Die beiden TRAIL-Rezeptoren death receptor 4 (DR4 oder auch TRAIL-R1) und death receptor 5 (DR5 oder auch TRAIL-R2) aktivieren hierbei über einen nachgeschalteten Signalweg die Apoptose (16, 17). Im Gegensatz dazu binden die beiden Rezeptoren Decoy receptor 1 (DcR1, auch TRAIL-R2, TRID oder LIT) (16) oder Decoy receptor 2 (DcR2, auch TRAIL-R4 oder TRUNDD) ihren Liganden TRAIL, ohne die Apoptose in Gang zu setzen (18-21) (nicht in Abb. 1 dargestellt).

Im Falle einer Bindung an einen der proapoptotischen Rezeptoren DR4/5 ist bekannt, dass es zur intrazellulären Rekrutierung des Adapterproteins FADD (FAS-associated protein with death domain) kommt. Die death effector domain (DED) dieses Proteins aktiviert daraufhin Prokaspase 8 oder Prokaspase 10. Der nun gebildete Komplex aus DR4/5, FADD und Prokaspase wird als DISC (death-inducing signalling complex) bezeichnet und vermittelt die weitere Initialisierung der Apoptose. Dies geschieht durch die Aktivierung der Effektor-kaspasen 3, 6 und 7 sowie der Caspase 8-vermittelte Aktivierung von BID (BH3 interacting domain death agonist). BID wiederum bindet und inaktiviert daraufhin Bcl-2 und gibt somit die BAX-

## Einleitung

vermittelte intrinsische, Zytochrom-c-gesteuerte Apoptosekaskade frei (22-24). Somit werden Zellen, die DR4/DR5 exprimieren, bei Anwesenheit von Trail effektiv apoptotisch eliminiert.



### 1.2.2 TRAIL und seine mögliche Rolle in der Tumorthherapie

Seit der Behandlung von Tumorerkrankungen ist man stetig auf der Suche nach neuen Medikamenten. Dabei war und ist stets das Ziel, wirksame Substanzen zu finden, die so viele Krebszellen wie möglich eliminieren, dabei aber nur minimale Nebenwirkungen entfalten. Eine Kombination, die bis heute äußerst schwierig zu erreichen ist (25). Voraussetzung für dieses Wirkprofil wäre eine Substanz, die auf Krebszellen wirkt, gesunde Zellen aber nicht schädigt. Möglicherweise vereint TRAIL gerade diese Eigenschaften und unterscheidet sich damit signifikant von anderen Vertretern der TNF-Superfamilie. So ist die Idee, Zytokine der TNF-Superfamilie zur Tumorbekämpfung einzusetzen, nicht neu. Allerdings waren die Nebenwirkungen vorheriger Versuche meist so gravierend, dass man bald von einem therapeutischen Nutzen absah (26, 27).

## Einleitung

TRAIL könnte hierbei eine Ausnahme bilden. Im Gegensatz zu anderen Zytokinen der TNF-Superfamilie beschränkt sich die Expression von TRAIL nicht nur auf Zellen des Immunsystems, sondern wird in einer Vielzahl von Gewebearten exprimiert. Eine Eigenschaft, die viele andere Zytokine der TNF-Familie vermissen lassen (28), die aber im Hinblick auf eine Antitumortherapie essentiell erscheint. Neben dem lymphatischen System ist diese Expression besonders hoch in Milz, Lunge und Prostata (11). Zusätzlich zu dieser im Vergleich zu anderen Vertretern der TNF-Superfamilie breiten Expressionsverteilung des Liganden TRAIL ließ sich auch eine stabile Expression der TRAIL-Rezeptoren in vielen Geweben und Tumorentitäten zeigen (29, 30). Gerade die Expression bis hin zur Überexpression der TRAIL-Rezeptoren DR4/5 in einer Vielzahl von Tumoren veranlasst immer wieder zur Hoffnung auf einen Angriffspunkt in der Krebstherapie (29).

Neben diesen Voraussetzungen besitzt TRAIL die herausragende Eigenschaft, Tumorzellen zu eliminieren, ohne dabei gesunde Zellen zu schädigen. Diese Eigenheit konnte mehrfach gezeigt werden und begründet neben der breiten Expression TRAILs und seiner Rezeptoren die besondere Rolle, die TRAIL in der Krebstherapie spielen könnte (11, 15, 31-33).

### 1.2.3 Resistenzmechanismen im TRAIL-Signalweg

Trotz seiner vielversprechenden Eigenschaften als tumorspezifischer Apoptoseinduktor haben sich Resistenzen von Tumorzellen gegenüber TRAIL als großes Problem für dessen therapeutische Anwendung herausgestellt (34, 35). Eine schematische Übersicht der Resistenz-vermittelnden Alterationen ist in Abb. 2 dargestellt. Prinzipiell können Resistenzen durch Alterationen im gesamten Signalweg auftreten (36). So führen z.B. Punktmutationen im DR4/5 (37, 38) oder eine Überexpression der decoy-Rezeptoren DcR1/2 (39) zu einer gestörten Signaltransduktion. Ebenso hat eine Störung der DISC-Komplexierung eine erhöhte TRAIL-Resistenz zur Folge. Diese kann beispielsweise bei herabgesetzter Aktivität von FADD (40) oder Caspase 8 (41, 42) auftreten. Auch kann die Überexpression von antiapoptotischen Regulatoren des Signalwegs, wie z.B. cFLIP (FLICE-like inhibitory protein), Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) und XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein) die TRAIL-Empfindlichkeit mindern (43-45). Die oben beschriebenen Alterationen führen über Störungen im TRAIL-Signalweg selbst zu Resistenzen. Daneben ist jedoch auch eine Resistenzentstehung durch Alterationen in anderen

## Einleitung

Signalwegen möglich, die entweder eine gemeinsame Endstrecke mit dem TRAIL-Signalweg haben oder aber darauf Einfluss nehmen.

In diesem Zusammenhang soll die PI-3-Kinase (folgend als PI3K bezeichnet) mit ihrem nachgeschalteten Signalweg Erwähnung finden, da sie in vorliegender Arbeit eine wichtige Rolle spielen wird. So wird z.B. eine TRAIL-Resistenz in Prostatakarzinomzellen der Zelllinie LNCaP beschrieben, die über eine verstärkte Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs dem apoptotischen Signal nach TRAIL-Gabe entgehen (46, 47). Die gesteigerte Aktivität der PI3K führt über den folglich erhöhten Spiegel an aktivem Akt zu einer Inhibierung des proapoptotischen Faktors BID und hemmt damit die Endstrecke des TRAIL-Signals (s. Abb. 2). Neben diesem Mechanismus wird an anderer Stelle von einer Inhibierung der DISC-Polymerisation (48, 49) oder einer Aktivierung des Caspase-8-Inhibitors cFLIP durch die PI3K berichtet(50). Tatsächlich konnte im PCa eine ungebremste Aktivität des PI3K/Akt-Signalwegs mit einer TRAIL-Resistenz in Verbindung gebracht werden (47) und eine erhöhte Akt-Aktivität mit einer TRAIL-Resistenz in PCa-Zellen korreliert werden(51).

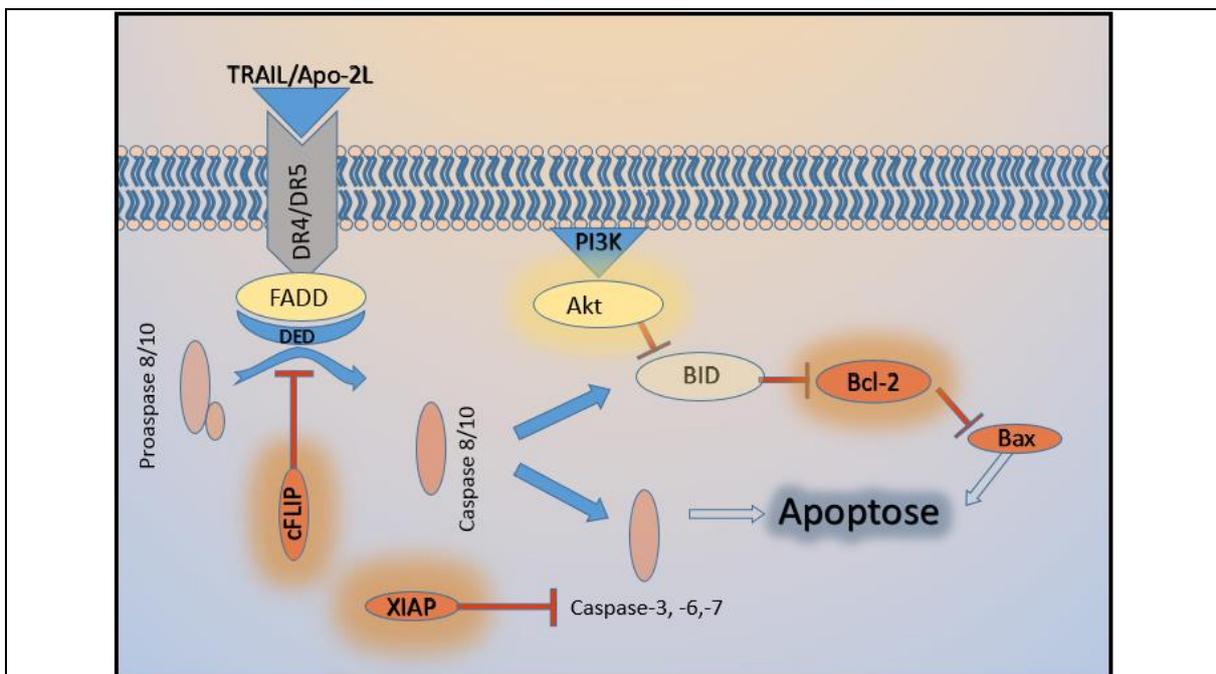


Abb. 2 Übersichtsdarstellung TRAIL-Resistenzen  
Dargestellt ist der TRAIL-Signalweg (s. 1.2.1) sowie einige beispielhafte Resistenzmediatoren. Resistenzvermittelnde Mediatoren sind rot hinterlegt dargestellt. cFLIP führt über eine Inhibition der Kaspasenaktivierung zu einer frühen Blockade des TRAIL-Signals. XIAP bewirkt eine spätere Kaspaseninhibition auf Ebene der Effektorcaspasen 3, 6 und 7. Ebenfalls schematisch dargestellt ist der resistenzvermittelnde Einfluss des PI3K/Akt-Signalweges. Hierbei kommt es vor allem über eine Akt-vermittelte (gelb hinterlegt) BID-Inhibierung zu einer Blockade der BAX-vermittelten Apoptose

### 1.3 Micro-RNAs und ihre zelluläre Funktion

Die Regulation von intrazellulären Signalwegen im Hinblick auf onkogene beziehungsweise tumorsuppressive Alterationen ist seit Jahren im Blick vieler Forschungsgruppen. Allerdings lag der Fokus hierbei lange der Regulation auf Proteinebene. Innerhalb der letzten Jahre hat in diesem Zusammenhang jedoch die Rolle nicht-kodierender RNA-Moleküle zunehmend Beachtung gefunden. So sind es vor allem die RNA-Moleküle der micro-RNA-Familie (folgend miRs), die in den Fokus vieler Forschungsgruppen gerückt sind.

Der Zusammenhang zur vorliegenden Arbeit ergibt sich aus Vorarbeiten der Forschungsgruppe der urologischen Forschungsabteilung des Universitätsklinikums Würzburg (52). Dieser gelang es, eine Korrelation zwischen der miR-221-Expression und der Überlebensprognose von Patienten mit Hoch-Risiko-PCa nachzuweisen. Daneben ergaben sich Vermutungen auf einen Zusammenhang zwischen dem Expressionslevel der miR-221 und der Sensitivität des TRAIL-Signales (s.1.3.4).

Um das Verständnis dieser Zusammenhänge zu ermöglichen, soll im Folgenden näher auf miRs und ihre Funktionsweise eingegangen werden.

#### 1.3.1 Die Synthese und Funktion von miRs

miRs sind evolutionär konservierte, kleine, nicht-kodierende RNA-Moleküle. Sie erfüllen die Funktion von posttranskriptionellen Regulatoren, indem sie spezifisch an den 3'UTR (untranslatierten Bereich) einer- oder verschiedener mRNAs binden und damit deren Translation hemmen (53). Die Gensequenzen der micro-RNAs finden sich in intergenetischen Zonen oder Introns und werden damit bei der Transkription ihres Wirtsgenes mittranskribiert. Die RNA-Polymerase II synthetisiert so die entsprechenden RNA-Fragmente und versieht sie mit einer 5'Methylkappe sowie einem 3'Poly-A-Schwanz(53, 54). Die so entstandenen RNA-Fragmente sind mit ca. 70 Nukleotiden noch länger als die reife micro-RNA und werden als pri-miR bezeichnet. Die im Zellkern lokalisierte RNase III *Drosha* schneidet die pri-miR zur pre-miR und ermöglicht damit den Transport der pre-miR aus dem Zellkern (55). Dies geschieht über das nukleäre Transportprotein *karyopherin exportin 5* (Exp5) sowie den Ran-GTP-Komplex (56-58). Die nun im Zytoplasma lokalisierte pre-miR besteht aus einem RNA-Doppelstrang mit einer Schleifenförmigen Verbindung. Diese Schleife wird von der zytoplasmatischen RNase III Dicer

entfernt, übrig bleibt eine doppelsträngige micro-RNA mit der endgültigen Länge von ca. 22 Nucleotiden (59). Die aktive und reife micro-RNA ist somit bereits vorhanden, aber noch von ihrem komplementären Strang blockiert. Der „RNA-induced silencing complex“ (RISC) katalysiert die Abspaltung des komplementären Stranges und ermöglicht letztendlich die regulatorische Funktion der reifen micro-RNA durch Binden der 3'UTR ihres Zielgenes (60-63). miRs wirken hierbei zwar nicht auf DNA-Ebene, verhindern aber durch die inhibierte Translation des Zielproteins eine vollständige Expression eines Zielgenes. miRs sind hierbei nicht spezifisch für nur eine mRNA, sondern über eine Schleifenbildung ihres RNA-Stranges in der Lage, verschiedene komplementäre Sequenzen zu bilden. Somit können miRs mehrere Zielgene binden. Man spricht aufgrund dieser variablen Bindungsfähigkeit zu verschiedenen mRNAs über komplementäre miR-Abschnitte bei gleichzeitig durch Schleifenbildung ausgeschalteten miR-Bereichen auch vom „Imperfect Match“ (64).

### 1.3.2 Micro-RNAs und ihre Rolle in der Tumorgenese

Es ist unstrittig, dass die genetische Alteration in Onkogenen oder Tumor-Suppressor-Genen eine entscheidende Rolle in der Entstehung von Krebs spielt. Wohingegen diese Alterationen zu einer Funktionsänderung bestimmter Proteine führen, ist mit den miRs als posttranskriptionelle Regulatoren eine weitere Ebene bekannt, auf der Alterationen zu Malignomen führen können (65, 66). Die ersten Ergebnisse, welche die Bedeutung von miRs bei der Entstehung von Krebs belegten, erbrachten *Calin et al [2002]*. Sie entdeckten die Rolle der miR-15 und miR-16 als Tumorsuppressor in der Chronisch Lymphatischen Leukämie (CLL) (67). Zahlreiche weitere Studien bekräftigten die Funktion von miRs als Tumorsuppressoren, so. z.B. die miR let-7, aus deren Herabregulation eine Überexpression der proto-Onkogene RAS, HMGA2 (68-71), IMP-1 (72) und MYC (73) resultiert. Genauso wie somit tumorsuppressiv-wirkende miRs bekannt sind, konnten auch onkogen-wirkende miRs („Onkomirs“) detektiert werden. So z.B. die miR-21, die in vielen hämatopoetischen und soliden Tumoren heraufreguliert ist (74-76). Ihre Wirkung als Onkogen entfaltet die miR-21 über die spezifische Inhibition von Tumorsuppressoren wie z.B. PTEN (77).

### 1.3.3 Die miR-221 im PCa und anderen Karzinomen

Aus der Datenlage wird deutlich, dass miRs eine entscheidende Bedeutung bei der Entstehung von Krebs innehaben. Wohingegen die oben genannten Beispiele den onkogen- oder aber tumorsuppressiv-wirksamen miRs zugeordnet werden konnten, ist mit der miR-221 ein Vertreter gefunden, der sich dieser klaren Einteilung entzieht. Zahlreiche Quellen beschreiben die miR-221 als Onkogen. So wird die miR-221 mit einer Steigerung von Proliferation und Invasivität im Osteosarkom, Magenkarzinom und Glioblastom (78-80) in Zusammenhang gebracht. Ebenso mit der epithelio-mesenchymalen Transition im Mamma-Karzinom(81). Zum Teil wurde diese onkogene Rolle mit einer Resistenzbildung gegenüber TRAIL begründet (82, 83), womit die miR-221 als weiterer TRAIL-Resistenz-vermittelnder Faktor erscheint.

Gegensätzlich dazu konnte der miR-221 sowohl im Prostata-Ca als auch im Bronchialkarzinom die Rolle eines Tumorsuppressors zugeordnet werden (84, 85). Damit ist gezeigt, dass sie je nach Tumorentität sowohl tumorsuppressiv als auch onkogen wirken kann. Für das PCa konnte nachgewiesen werden, dass die miR-221 nicht nur als in-vitro tumorsuppressiv, sondern auch als prognostisch relevant ist. Hieraus begründet sich ein Forschungsbedarf, um die Rolle der miR-221 im PCa besser zu verstehen.

### 1.3.4 Die mögliche Rolle der micro-RNA-221 für den TRAIL-Signalweg

Nicht nur die Bedeutung der miR-221 für das PCa ist bisher ungenügend geklärt. Auch ein möglicher Einfluss der miR-221 auf die TRAIL-Sensitivität von PCa- Zellen ist bisher kaum untersucht. Dass dieser Zusammenhang jedoch bestehen könnte, wird aus der Betrachtung der folgenden Ergebnisse deutlich.

So ist bekannt, dass miR-221 in der Lage ist, das zelluläre Interferon (IFN)-Signal zu steigern. Dies geschieht über die miR-221 vermittelte Herabregulation der IFN-Inhibitoren SOCS-3 (Suppressor of cytokine signaling 3) und IRF-2 (Interferon regulatory Factor 2) (52, 86). Gleichzeitig konnten Microarray Analysen veröffentlichter Vorarbeiten zeigen, dass die miR-221-vermittelte IFN-Aktivierung zu einer Verstärkung des TRAIL-Signalweges führen kann (87). Hierbei führt die Überexpression von STAT-1 infolge der IFN-Aktivierung zu einer Überexpression der Interferon-induzierten Gene XAF-1 (XIAP-associated factor) und TNFSF-10, welches für das Protein TRAIL kodiert. Die Überexpression beider Gene führt zu einer Verstärkung des TRAIL-

## Einleitung

Signals (88, 89) (näheres s. 5.6.2). Durch die Herabregulation von SOCS-3 und IRF-2 kommt es also einerseits zur Aktivierung des IFN-Signals, andererseits ist SOCS-3 als Inhibitor des TRAIL-Signalweg beschrieben (90). Die Interaktion von miR-221 und SOCS-3 mit folgender Aktivierung des zellulären IFN-Signals wird in vorliegender Arbeit als miR-221/SOCS-3-Achse zusammengefasst, schematisch ist der Mechanismus in Abb. 3 dargestellt.

Somit galt für die folgende Arbeit die Annahme, dass die miR-221-vermittelte Inhibierung von SOCS-3 und IRF-2 über das Bindeglied des JAK-STAT-Signalwegs indirekt zur Induktion einer TRAIL-supportiven Signatur in miR-221-überexprimierenden Zellen führen könnte. Zumindest in Bezug auf das PCa widerspräche dies der Darstellung, dass es sich bei der miR-221 um einen TRAIL-Resistenz-vermittelnden Faktor handelt. Eine Aufgabe der vorliegenden Arbeit bestand somit im Nachweis einer miR-221-vermittelten, TRAIL-supportiven Signatur über die zelluläre IFN-Achse / den JAK-STAT-Signalweg.

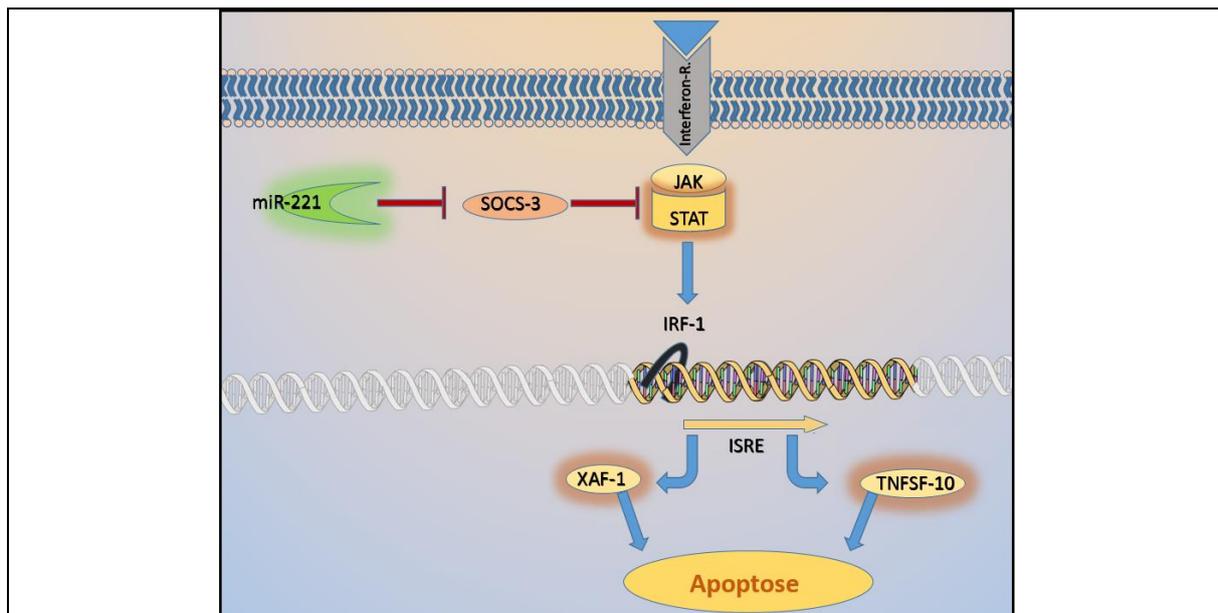


Abb. 3 Aktivierung des zellulären IFN-Signals durch miR-221 mit nachgeschalteter Kaskade  
Rot hinterlegt sind die im folgenden Versuch untersuchten Strukturen STAT-1(STAT), XAF-1 und TNFSF-10. IRF-1 bezeichnet den Transkriptionsfaktor „Interferon regulatory factor-1“, mit ISRE („Interferon-sensitiv response element“) ist der Interferon-sensible Genabschnitt gekennzeichnet. Die Abbildung dient der Veranschaulichung, die Signalketten sind nicht komplett dargestellt.

## 2 Forschungsfrage

Vorergebnisse hatten miR-221 als Tumor-Suppressor im PCa beschrieben. Aufgrund des ebenfalls gezeigten Einflusses der miR-221 auf den IFN-Signalweg bestand die Theorie, dass miR-221 einen Einfluss auf die TRAIL-Sensitivierung im PCa Zellen ausüben könnte. Somit sollten folgende Fragen in der vorliegenden Arbeit beantwortet werden:

- Ist miR-221 in der Lage, das TRAIL-Signal in PCa-Zellen verstärkend oder inhibierend zu beeinflussen?

Im Fall einer Regulation schlossen sich weitere Frage an:

- Geschieht dies im Gegensatz zu bisherigen Beobachtungen in anderen Tumorentitäten im PCa im Sinne einer TRAIL-Sensitivierung?
- Über welche molekularen Mechanismen und über welche Zielgene der miR-221 kann ein solcher Einfluss erklärt werden?

Um diese Fragen zu klären, sollte zunächst die biologische Funktion von TRAIL sowie miR-221 *in vitro* analysiert werden. Hierbei sollen Vitalitäts- und Apoptose-Tests Verwendung finden. In Folge sollten zelluläre Mechanismen hinter den beobachteten Wirkungen aufgedeckt werden. Dazu waren Expressionsanalysen mittels qRT-PCR geplant, ferner auch computergestützte Recherchen und Luciferase-Reporter-Assays zur Bestätigung von miR-221 Bindungsstellen an möglichen Target Genen. Um letztlich zu überprüfen, ob die Modulation der untersuchten Signalwege tatsächlich die erwartete Wirkung auf Proliferation und Zellvitalität entfaltet, sollte der Einfluss möglicher miR-221 Target Gene auf das Trail Signal untersucht werden.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

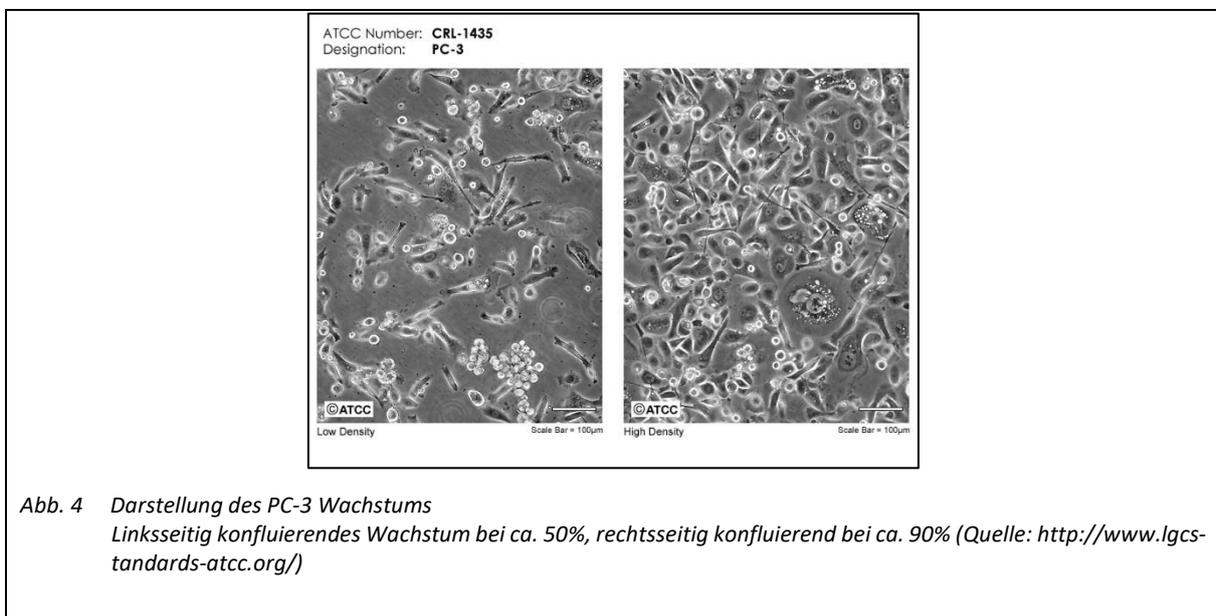
##### 3.1.1 Zellkulturen

##### 3.1.1.1 Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien CRL-1435™, (nachfolgend PC-3), HTB-81™ (nachfolgend DU-145) und CRL-11609™ (nachfolgend RWPE) wurden allesamt von der *American Tissue Culture Collection* (ATCC®) bezogen. Bei der Zelllinie PC-3 und DU-145 handelt es sich um Zellen des Prostatakarzinoms, bei der RWPE-Linie um immortalisierte Prostataepithelzellen.

PC-3-Zelllinie:

Die PC-3-Zelllinie wurde aus der Knochenmetastase eines Grad IV Prostata Adenokarzinoms gewonnen. Der damalige Patient war ein 62-jähriger, männlicher Weißer. Die Zellen sind mit 62 Chromosomen nahezu triploid und wachsen Androgen-unabhängig.



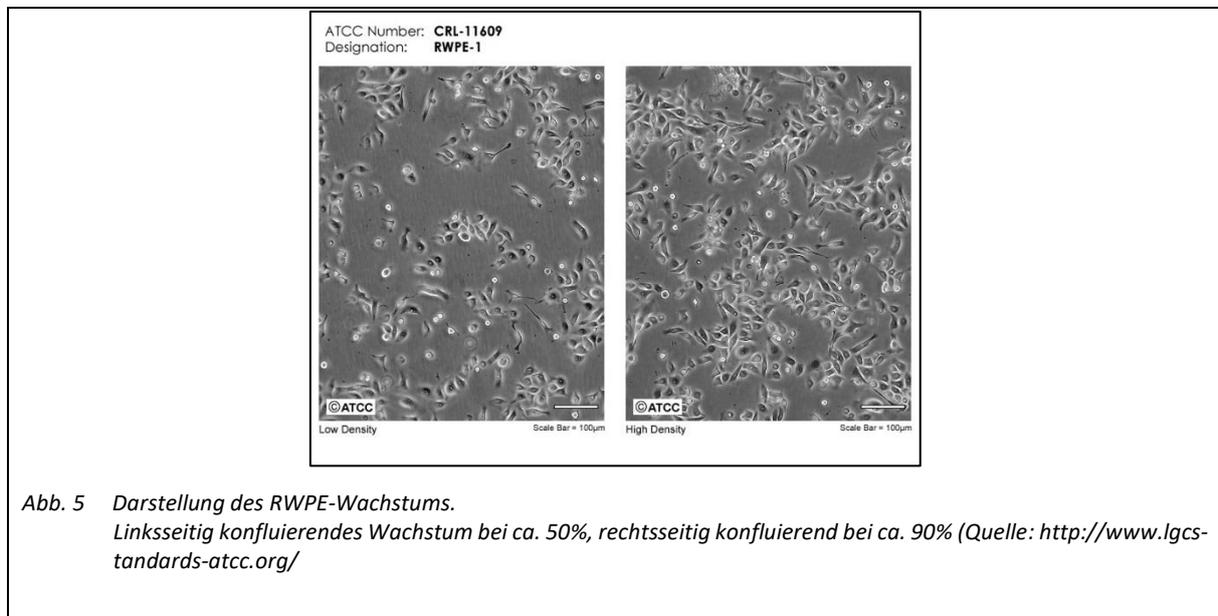
## Material und Methoden

DU-145-Zelllinie:

Die DU-145 Zelllinie wurde aus der Hirnmetastase eines Prostatakarzinoms bei einem 69-jährigen, männlichen Weißen gewonnen. Die Zellen exprimieren kein PSA und wachsen Androgen-unabhängig.

RWPE-Zelllinie:

Die Zellen der RWPE-Linie wurden als normale Epithelzellen aus der peripheren Zone einer Prostata isoliert. Spender war ein 54-jähriger Weißer. Die Zellen wurden durch eine Transfektion mit dem Humanen Papilloma Virus 18 (HPV-18) immortalisiert und wachsen Androgen-abhängig. In vorliegender Arbeit dienen sie als Stellvertreter gesunder Prostataepithelzellen als Kontrollzellen für die vorliegenden Versuche.



### 3.1.1.2 Zellkulturmedien

Jede der Zelllinien wurde in einem eigenen Medium kultiviert:

Zelllinie	Medium	Hersteller
PC-3	RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640	Merck Millipore (Deutschland)
DU-145	DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) High Glucose	DAA (Österreich)

## Material und Methoden

RWPE	K-SFM (Keratinocyte Serum Free Medium)	Life Technologies (USA)
------	--	-------------------------

Vor Gebrauch wurden den Medien RPMI und DMEM zusätzlich folgende Supplemente zugesetzt: 5 ml 1%igem Natrium Pyruvat, 5 ml 1%igem L-Glutamin, 5ml 1%igem HEPES sowie 5ml NEA. Dem DMEM-Medium wurde zusätzlich dazu 100 ml 20%iges fetales Kälberserum (FBS) zugegeben. Dem RPMI-Medium wurden 50 ml 10%iges FBS sowie 5 ml 1%iges NEAA hinzugefügt.

Das K-SFM-Medium wurde vor Gebrauch mit BPE (Bovine Pituitary Extract) und EGF (Epidermal Groth Factor) versetzt. Alle Medien wurden vor Gebrauch auf 37°C erwärmt.

### 3.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Verwendungszweck	Gerät	Bezeichnung/Modell	Bezugsquelle/Hersteller
Zellkultur	Accujet	Accu-Jet Pro	Brand (Deutschland)
	Autoclav	3850 EL	Systec (Deutschland)
	CO <sub>2</sub> - Brutschrank	CB150	WTB-Binder (Deutschland)
	Falcon Reagenzröhrchen	15ml und 50 ml	Cellstar (USA)
	Kühlschrank		Liebherr (Schweiz)
	Mikroskop	Diavert	Leitz (Deutschland)
	Pipetten 1-50 ml	CELLSTAR™	Sigma-Aldrich (USA)
	Sterile Glaspipetten	2-25ml	Cellstar (USA)
	Sterile Werkbank	LFR VK 06.12	Prettl (Deutschland)
	Wasserbad	Eco Temp TW12	Julabo (Deutschland)
	Zellkulturflaschen	250ml	Cellstar (USA)
	Zentrifuge	Megfuge 16R	Thermofisher (USA)
	96-Well-Platten	Nunc™ MicroWell™ Plates	Thermo Fischer Scientific (USA)
RNA-Gewinnung	Sterile Werkbank	LFR VK 06 12	Prettl (Deutschland)
	Zentrifuge	Biofuge primo	Heraeus (Deutschland)
	Küvetten	Ultravette 70-850µl	Roth (Deutschland)

## Material und Methoden

Verwendungszweck	Gerät	Bezeichnung/Modell	Bezugsquelle/Hersteller
	Laborabzug	2-453 DAHD	Köttermann (Deutschland)
	Reagenzgefäße	1,5- und 2 ml	Eppendorf (Deutschland)
	RNA-Messgerät	Nanodrop2000	Thermo Scientific (USA)
	6-Well-Platten	Nunclon™ Delta Surface	Thermo Fisher Scientific (USA)
MTS-Test	Monochromator	MultiSKAN ms	Labsystems (USA)
Apoptose-Assay	Microplate-Reader	GENios Pro	Tecan (Schweiz)
Luciferase-Assay	Microplate-Reader	GENios Pro	Tecan (Schweiz)
	12-Well-Platten	Falcon™ Tissue Culture Plate	Fisher Scientific (USA)
	weiße 96-Well Platten		Greiner Bio-One (Österreich)
RT-PCR	Thermocycler	Priums96	MWG Biotech (USA)
	RT-Cycler	Rotor-Gene Q	Qiagen (Niederlande)

### 3.1.3 Chemikalien

Verwendungszweck	Produkt/Chemikalie	Bezugsquelle/Hersteller
Zellkultur	Sodium Pyruvat (1%)	Merck Millipore (Deutschland)
	GlutaMAX™	Life Technologies (USA)
	HEPES (1%)	Merck Millipore (Deutschland)
	FBS (fetales Kälberserum)	Merck Millipore (Deutschland)
	BPE (Bovine Pituitary Extract)	Gipco (Life Technologies)
	EGF (Epidermal Groth Factor)	Gipco (Life Technologies)

## Material und Methoden

<b>Verwendungs- zweck</b>	<b>Produkt/Chemikalie</b>	<b>Bezugsquelle/Hersteller</b>
	MEM NEAA (Non-Essential Amino Acids)	Merck Millipore (Deutschland)
	Trypsin-EDTA	Life Technologies (USA)
	RPMI 1640	Merck Millipore (Deutschland)
	DMEM High Glucose	PAA (Österreich)
	Keratinocyte-SFM	Life Technologies (USA)
	Trypan-Blau 0,4%	Sigma-Aldrich (USA)
	PBS Dulbecco (Phosphate buffered saline)	Merck Millipore (Deutschland)
Transfektion	OPTI-MEM®	Thermo Fisher Scientific (USA)
	Lipofectamin® 2000	Life Technologies (USA)
	pre-miR-221/ miR-221-siRNA	Thermo Fisher Scientific (USA)
	SOCS-3-siRNA	Quiagen (Niederlande)
	pre-miR-Kontrolle/ Kontroll-siRNA	Applied Biosystems (USA)
	PI3K-siRNA	Quiagen (Niederlande)
TRAIL- Behandlung	BSA	Merck Millipore (Deutschland)
	TRAIL	PeproTech (USA)
MTS-Test	Dulbecco's PBS	Merck Millipore (Deutschland)
	CellTiter96 One Solution Cell Proliferation Assay (MTS)	Promega (USA)
Apoptose- Assay	Caspase3/7 Glo Buffer	Promega (USA)
	Caspase 3/7 Substrate	Promega (USA)
Luciferase- Assay	Passive Lysis Buffer	Promega (USA)
	LAR II (Luciferase Assay Reagent II)	Promega (USA)

## Material und Methoden

Verwendungs- zweck	Produkt/Chemikalie	Bezugsquelle/Hersteller	
	pMIR-REPORT™-Vektor	Life Technologies (USA)	
	Stop and Glo	Promega (USA)	
	HindIII-Restriktionsenzym	New England Biolabs (USA)	
	SpeI-Restriktionsenzym	New England Biolabs (USA)	
	HiSpeed Plasmid Midi Kit	Quiagen (Niederlande)	
RNA- Isolierung	TRIzol®	Invitrogen (USA)	
	Chloroform	Roth (Deutschland)	
	Isopropanol	Sigma Aldrich (USA)	
	Ethanol	Sigma Aldrich (USA)	
	Nukleasefreies, DEPC-behandeltes Wasser	Roth (Deutschland)	
Protein- Isolierung	Phosphosafe-Puffer	Sigma Aldrich (USA)	
	Rotiquant	Roth (Deutschland)	
Primer	Name	Sequenz	
	β-Aktin	for 5'- cct ggc acc cag cac aat -3' rev 5'- ggc gat cca cac gga ct -3'	biomers.net (Deutschland)
	TNFSF-10	Als QuantiTect® Primer Assay geliefert	Qiagen (Niederlande)
	STAT-1		
	XAF-1		
	PIK3R1		
	RNU-6B	Als Taqman™ MicroRNA Assay geliefert	Applied Biosystems (USA)
miR-221	for 5'-gta tgt gag aat tac ttg caa gc -3' rev 5' -cca ctg gtt tat acct cc tgg -3'	Applied Biosystems (USA)	
qRT-PCR	SYBR® Green qPCR Master Mix	Agilent Technologies (USA)	
	TaqMan®-UNC	Applied Biosystems (USA)	
	TaqMan® MicroRNA Reverse Transcriptions Kit	Life Technologies (USA)	

### 3.2 Methoden

#### 3.2.1 Sterilisation

Besonders die in der Zellkultur verwendeten Materialien und Lösungen mussten vor Gebrauch sterilisiert werden, wenn sie nicht bereits steril bezogen wurden. Hierzu wurden die Glas- und Kunststoffartikel für 25min bei 120°C autoklaviert.

#### 3.2.2 Kultivierung und Passage der Zelllinien

Die Zelllinien wurden in ihrem jeweiligen Medium in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen kultiviert. Dies bedeutete die Einsaat von ca. 13.000 bis 14.000 Zellen pro cm<sup>2</sup> und folgend die Kultivierung bei einer Temperatur von 37°C, einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 6% und einer Luftfeuchtigkeit von 95%. Ab einem konfluenten Wachstum von ca. 80% wurden die Zellen subkultiviert, dies war ca. alle 3 bis 4 Tage nötig. Zur Subkultivierung wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gespült und schließlich zur Lyse der Adhärenz Trypsin zugegeben. Nach 5 min im Brutschrank wurde die Lysierung mit dem jeweiligen Medium abgestoppt, die Zellen in 15ml Falcon-Zentrifugationsröhrchen übernommen und bei 12.000U/min für 5 min zentrifugiert. Dieses Verfahren wurde regelmäßig durchgeführt und die Zellen nach ca. 30 Passagen verworfen.

#### 3.2.3 Transiente Transfektion der Zellen mit microRNA

Zur Transfektion der Zellen wurden precursor (pre) beziehungsweise Small-interfering (si) miR verwendet und über Lipofectamin 2000-Partikel in die Zellen transfiziert. Zur Kontrolle wurden Zellen nach gleichem Schema ebenfalls mit precursor-Kontroll-miR (pre-miR-Ktr) beziehungsweise mit Kontroll-siRNA (Ktr-siRNA) transfiziert. Dies war nötig, um einen eventuellen Einfluss der Transfektion selbst, sowie einer Belastung mit fremd-RNA auf die untersuchten Zelllinien auszuschließen. Einen Tag vor der Transfektion wurden die Zellen eingesät - entweder in 6-Well-Platten so im Falle der RNA- und Proteinisolierung - oder in 96-Well-Platten im Falle der MTS- und Apoptosetests. Für die Transfektion mit precursor-microRNA und Reporter Gen wurden 12-Well-Platten verwendet. Am Tag der Transfektion befanden sich die Zellen in ca. 80%igem, konfluenten Wachstum. Zur Herstellung der Lipofectamin-miR-Partikel wurden zunächst 2 Ansätze erstellt. Einen mit miR gelöst in serumfreiem Opti-MEM-

## Material und Methoden

Transfektionsmedium und einen mit den noch ungeladenen Lipofectamin-Partikeln, ebenfalls gelöst in Opti-MEM. Sowohl der miR-Ansatz, als auch der Lipofectamin-Ansatz wurden erstellt und für 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze zusammengeführt und bei Raumtemperatur für 20min inkubiert. Vor der Zugabe des Ansatzes wurde das alte Zellmedium entfernt. Im Folgenden wird näher auf die einzelnen Schemata eingegangen:

### I) **Transfektion der 96-Well Platten für MTS- und Apoptose-Assay**

Einsaht im 96-Well Format erfolgte mit 100µl Medium in nachfolgender Zellkonzentration pro Well. Die Transfektion erfolgte 24h nach der Einsaat der Zellen.

Zelllinie	Zellkonzentration (Zellen/ml)
PC-3	$2 \times 10^4$
DU-145	$1 \times 10^4$
RWPE	$1,5 \times 10^4$

Für jedes Well wurden 12,5pmol miR in 25µl Opti-MEM gelöst. Für den Lipofectamin-Ansatz wurden 0,125µl Lipofectamin2000 in 25µl Opti-MEM gelöst. Nach dem Zusammenführen und Inkubieren der Ansätze wurden für jedes Well weitere 50µl Zellmedium zugegeben, so dass letztendlich 100µl Lipofectamin-miR-Ansatz für jedes Well zur Verfügung stand. Am Tag nach der Transfektion wurden noch einmal 100µl frisches Zellmedium zugegeben, die Konzentration der miR betrug nun also 62,5pmol/ml

### II) **Transfektion der 6-Well Platten für Protein- und RNA-Gewinnung**

Einsaht im 6-Well Format erfolgte mit 1000µl Medium in nachfolgender Zellkonzentration pro Well. Die Transfektion erfolgte 24h nach Einsaat.

Zelllinie	Zellkonzentration (Zellen/ml)
PC-3	$3 \times 10^4$
DU-145	$2 \times 10^4$
RWPE	$1,5 \times 10^4$

Für jedes Well wurden 125pmol miR in 250µl Opti-MEM gelöst. Für den Lipofectamin-Ansatz wurden 1,25µl Lipofectamin2000 in 250µl Opti-MEM gelöst. Nach dem Zusammenführen und Inkubieren der Ansätze wurden für jedes Well weitere 500µl Zellmedium zugegeben, so dass letztendlich 1000µl Lipofectamin-miR-Ansatz für jedes Well zur Verfügung stand. Am Tag nach der Transfektion wurden noch einmal 1000µl frisches Zellmedium zugegeben, die Konzentration der miR betrug nun also 62,5pmol/ml und entsprach damit der Konzentration, die bei der Transfektion der 96-Well-Platten erreicht wurde.

### III) **Transfektion der 12-Well Platten für das Dual-Luciferase® Reporter Assay-System**

Einsaht im 12-Well Format erfolgte mit  $5 \times 10^4$  PC-3-Zellen/ml in 2 ml Medium pro Well. Die Transfektion erfolgte 24h nach Einsaat.

Im Falle der Transfektion mit Reportergen wurde eine Kotransfektion vorgenommen. Hierbei kam zusätzlich zur Transfektion mit micro-RNA die Transfektion mit Reporter-DNA zum Einsatz. So wurden folgende Ansätze erstellt: Zum einen wurden pro Well 10µl (= 50pmol) micro-RNA, zusammen mit 1µl (400ng) Reporter-Gen und 0,18µl Renilla-Luciferase-Gen, in 90µl Opti-MEM-Transfektionsmedium angesetzt. Der zweite Ansatz enthielt mit 1µl Lipofectamin in 100µl Optimem die ungeladenen Lipofectamin-Partikel. Nach

## Material und Methoden

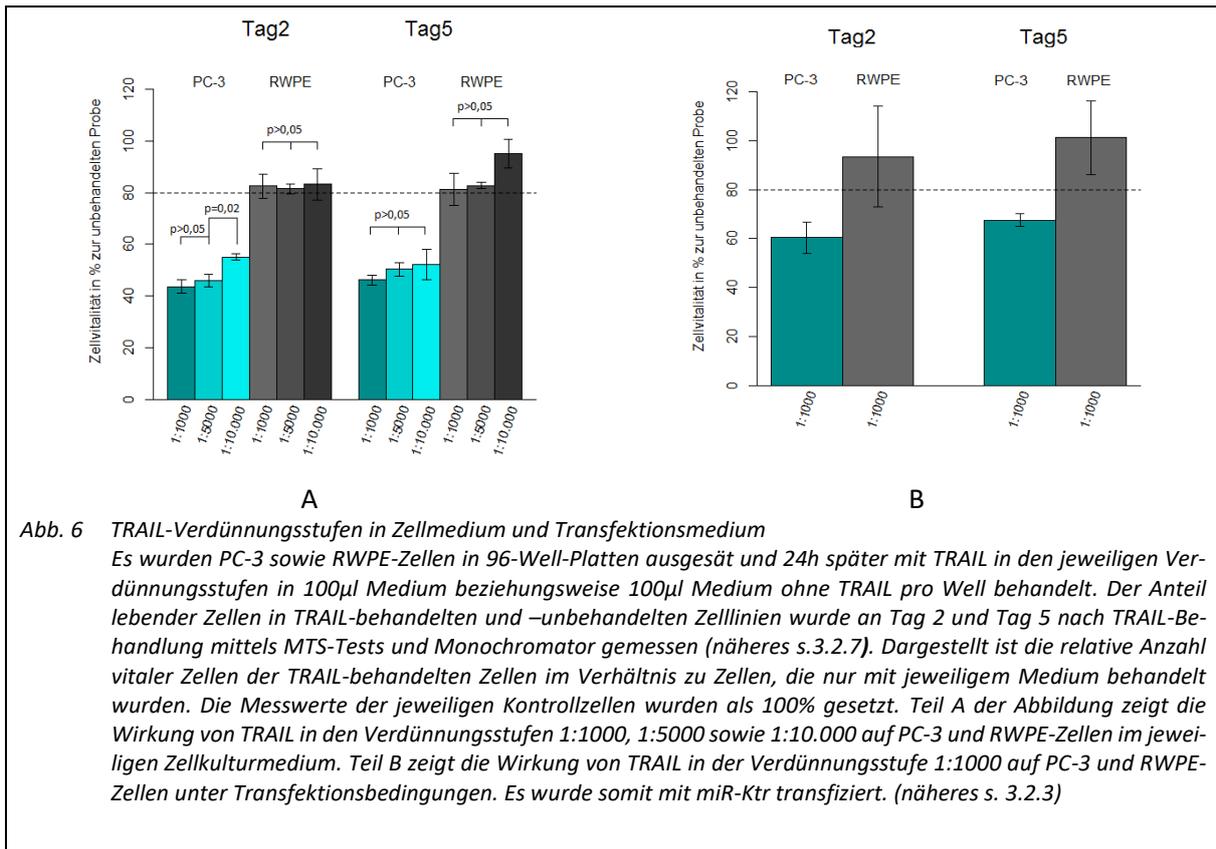
Zusammenführen und Inkubieren der Ansätze standen also ca. 200µl (201,18µl) pro Well zur Verfügung. Durch die Zugabe von 800ml antibiotikafreiem Medium pro Well konnte die Transfektion also mit 1000µl Transfektionslösung pro Well vorgenommen werden. Nach Zugabe von 1000µl frischem Zellmedium pro Well am Folgetag lag die Konzentration der miR bei 25pmol/ml und die Konzentration der Reporter-DNA bei 200ng/ml.

### 3.2.4 Behandlung mit TRAIL und Festlegung einer effektiven TRAIL-Konzentration

Das Zytokin TRAIL wurde von der Firma PeproTech™ als Feststoff bezogen und wie folgt zur weiteren Verwendung angesetzt. 50µg des Feststoffes wurden in 100µl destilliertem Wasser mit 0,1%igem BSA gelöst und in 20µl-Portionen bei -20°C eingefroren. 48h nach Einsaat erfolgte die TRAIL Zugabe. Je nach Versuch wurden hierzu in der Literatur übliche Verdünnungsstufen von 100ng/ml beziehungsweise 500ng/ml gewählt (17, 91).

Versuch	Verdünnungsstufe	Endkonzentration TRAIL
transiente Transfektion mit miR	1:5000	$50\mu\text{g}/100\mu\text{l} * 1/5000 = 0,1\mu\text{g}/\text{ml} =$ <b>100ng/ml</b>
Apoptose-Assay	1:1000	$50\mu\text{g}/100\mu\text{l} * 1/1000 = 0,5\mu\text{g}/\text{ml} =$ <b>500ng/ml</b>
RNA-Extraktion	1:1000	$50\mu\text{g}/100\mu\text{l} * 1/1000 = 0,5\mu\text{g}/\text{ml} =$ <b>500ng/ml</b>

Die Zugabe in jeweiliger Verdünnungsstufe erfolgte in 100µl entsprechendem Zellmedium pro Well bei Versuchen in 96-Well-Platten und in 1000µl Medium bei Versuchen in 6- und 12-Well-Platten. Die jeweiligen Kontrollzellen erhielten zeitgleich die entsprechende Menge an Zellmedium sowie PBS destilliertem Wasser ohne TRAIL-Zusatz.



**Abb. 6** TRAIL-Verdünnungsstufen in Zellmedium und Transfektionsmedium  
 Es wurden PC-3 sowie RWPE-Zellen in 96-Well-Platten ausgesät und 24h später mit TRAIL in den jeweiligen Verdünnungsstufen in 100µl Medium beziehungsweise 100µl Medium ohne TRAIL pro Well behandelt. Der Anteil lebender Zellen in TRAIL-behandelten und –unbehandelten Zelllinien wurde an Tag 2 und Tag 5 nach TRAIL-Behandlung mittels MTS-Tests und Monochromator gemessen (näheres s.3.2.7). Dargestellt ist die relative Anzahl vitaler Zellen der TRAIL-behandelten Zellen im Verhältnis zu Zellen, die nur mit jeweiligem Medium behandelt wurden. Die Messwerte der jeweiligen Kontrollzellen wurden als 100% gesetzt. Teil A der Abbildung zeigt die Wirkung von TRAIL in den Verdünnungsstufen 1:1000, 1:5000 sowie 1:10.000 auf PC-3 und RWPE-Zellen im jeweiligen Zellkulturmedium. Teil B zeigt die Wirkung von TRAIL in der Verdünnungsstufe 1:1000 auf PC-3 und RWPE-Zellen unter Transfektionsbedingungen. Es wurde somit mit miR-Ktr transfiziert. (näheres s. 3.2.3)

Abb. 6 zeigt die relative vitale Zellmenge TRAIL-behandelter PC-3- sowie RWPE-Zellen. Es wurden die in der Literatur sowie in der Forschungsgruppe üblichen Verdünnungsstufen von 1:1000 und 1:5000 sowie eine weitere Verdünnungsstufe von 1:10.000 gewählt (s. Abb. 6). Es war weder in PC-3-, noch in RWPE-Zellen ein signifikanter Unterschied zwischen den Verdünnungsstufen 1:1000 sowie 1:5000 feststellbar. RWPE-Zellen reagierten auf alle Verdünnungsstufen mit einer konstanten Reduktion der vitalen Zellmenge auf über 80%. Dies gilt sowohl in K-SFM-Kulturmedium, als auch in Opti-Mem Transfektionsmedium und mit miR-Ktr-Lipofektaminpartikeln. In PC-3-Zellen trat durch TRAIL-Behandlung sowohl in Zellkultur -als auch in Transfektionsmedium mit miR-Ktr-Transfektion eine Reduktion der vitalen Zellmenge auf unter 80% auf. Es wurde so eine TRAIL-Konzentration als effektive Konzentration festgesetzt, die eine PCa-Zellmenge auf unter 80% reduziert, die RWPE-Zellmenge jedoch nicht auf unter 80% senken kann.

### 3.2.5 Isolierung und Aufbereitung von RNA

Zur Gewinnung von RNA wurde im 6-Well-Format transfiziert. 48h nach Transfektion wurde das Zellmedium abgenommen und die Zellen mit PBS gespült. Um die Zellen zu lösen wurde 500µl Trypsin pro Well zugegeben und ca. 5min im Brutschrank inkubiert. Danach wurde die

## Material und Methoden

Lyse mit 1500µl Medium abgestoppt und die Zellen in 15ml Falcon-Zentrifugationsröhrchen für 5min bei 12.000 U/min zentrifugiert. Danach wurden die Zellen noch einmal in PBS gewaschen und ein weiteres Mal nach gleichem Schema zentrifugiert. Nach dem Absaugen von PBS folgte nun die eigentliche RNA-Gewinnung und Aufbereitung in mehreren Schritten.

- I) Homogenisierung der Proben**  
Zugabe von 1ml TRIzol®
- II) Phasentrennung**  
Inkubation bei Raumtemperatur für 5 min und anschließende Zugabe von 200µl Chloroform. Schütteln der Proben für 15sek und anschließend erneute Inkubation bei Raumtemperatur für 3 min mit folgender Zentrifugation bei 12.000 U/min, 4°C für 12 min.
- III) RNA Isolierung mit RNA Präzipitation**  
Überführen der wässrigen Phase in ein neues Reagenzröhrchen mit Zugabe von 0,5ml Isopropanol (100%). Inkubation bei RT für 10 min und anschließend Zentrifugation bei 12.000g U/min, 4°C für 10 min.
- IV) RNA Reinigung**  
Entfernen des Isopropanol-Überstandes durch abkippen, Zugabe von 1ml Ethanol (75%) und Resuspension durch kurzes Mischen. Anschließend Zentrifugation bei 7.500 U/min, 4°C für 5 min.
- V) RNA Resuspension**  
Entfernen des Ethanol-Überstandes durch Abkippen, trocknen der RNA für ca. 30 min. Anschließen erneutes Lösen in RNase freiem Wasser durch Erwärmen auf 55°C für 15 min. Anschließend konnte die gelöste RNA bei -20°C gelagert werden.

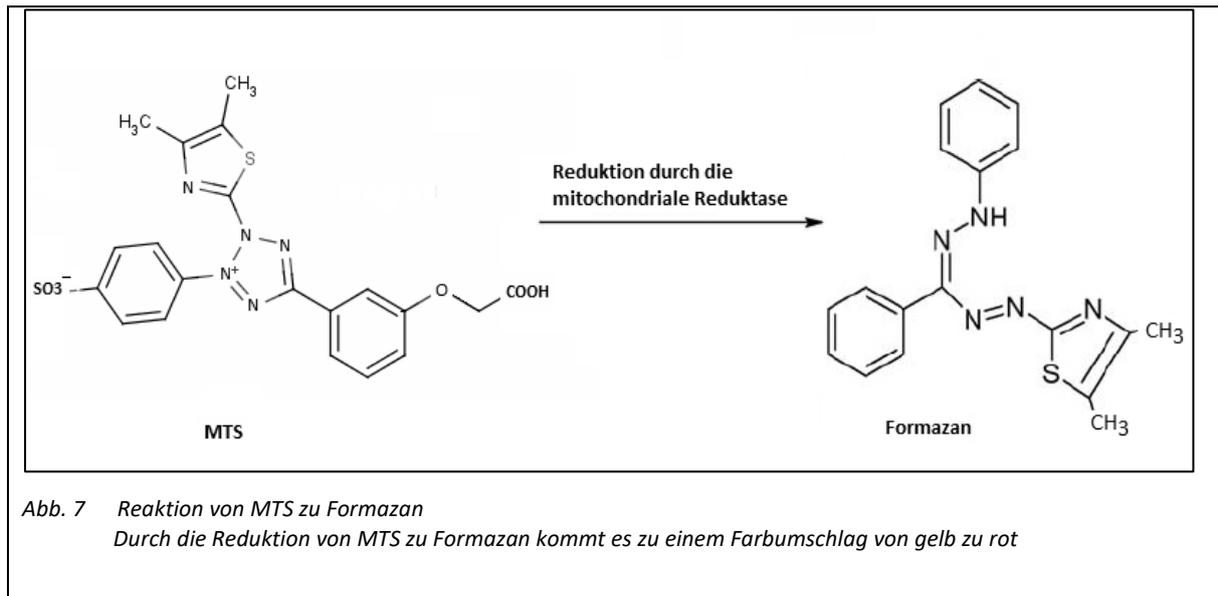
### 3.2.6 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der RNA

Zur Bestimmung von Konzentration und Reinheit wurden 2µl der RNA-Probe photometrisch vermessen. Hierbei kam das Photometer Nanodrop2000 der Firma Thermo Fisher Scientific zum Einsatz. Zur Reinheitsbestimmung wurde bei 260nm und 280nm gemessen und das Verhältnis beider Messwerte gebildet, welches bei ausreichendem RNA-Gehalt einen Wert von ca. 1,9-2,0 erreichen sollte.

### 3.2.7 Feststellung der Zellvitalität via MTS-Assay

Die Zelleinsaat erfolgte in 96-Well-Platten. Zur Detektion der Zellvitalität diente der CellTiter96® Cell Proliferation Assay (MTS) von Promega. Hierbei konnte die Anzahl vitaler Zellen als Korrelation zum Farbumschlag von gelb nach rot quantifiziert werden. Der Farbumschlag kam durch die Reduktion von MTS (Methyltetrazolinsulfat) zu Formazan zustande, die zugrunde liegende Reaktion ist in Abb. 7 gezeigt. Die Messung fand am 3., 5. und 6. Tag nach Transfektion statt. Zur Vorbereitung wurde zunächst die MTS-Reagenz mit PBS verdünnt

(1:11) und nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur auf die Zellen gegeben. Das Medium wurde komplett entfernt, anschließend wurden pro Vertiefung 100µl MTS-Reagenz zugegeben. Nach 3 h Inkubation im Brutschrank konnte der Farbumschlag bei 490nm am Monochromator gemessen werden. Die Digitalisierung der Messdaten erfolgte mit der „Ascent™ Softwear for multiscan“, danach wurden die Daten auf Excel übertragen und verarbeitet.



### 3.2.8 Versuche mit Biolumineszenz

In der Molekularbiologie können Luciferase-Systeme dazu dienen, intrazelluläre Vorgänge sichtbar zu machen. Bei Luciferasen handelt es sich um Enzyme, welche die Reaktion von Luciferinen mit Sauerstoff zu instabilen Dioxetanen oder Dioxetanonen katalysieren. Beim Zerfall jener Produkte kommt es zur quantifizierbaren Biolumineszenz. In der vorliegenden Arbeit fanden ein Dual-Luciferase Reporter Assay sowie ein Apoptose-Assay Verwendung. Im Falle des Apoptose-Assays liegt das Luciferase-Substrat als inaktives DEVD-Aminoluciferin vor. DEVD steht hier für die Aminosäuresequenz Asp-Glu-Val-Asp und somit für die Sequenz, die von der Caspase 3/7 gespalten wird. Erst nach Freisetzen von oxidierbarem Aminoluciferin durch die Kaspasen 3/7 erfolgt die eigentliche Lumineszenzreaktion, die Reaktion ist in Abb. 8 dargestellt. Die messbare Lumineszenz ist somit proportional zur Kaspaseaktivität.

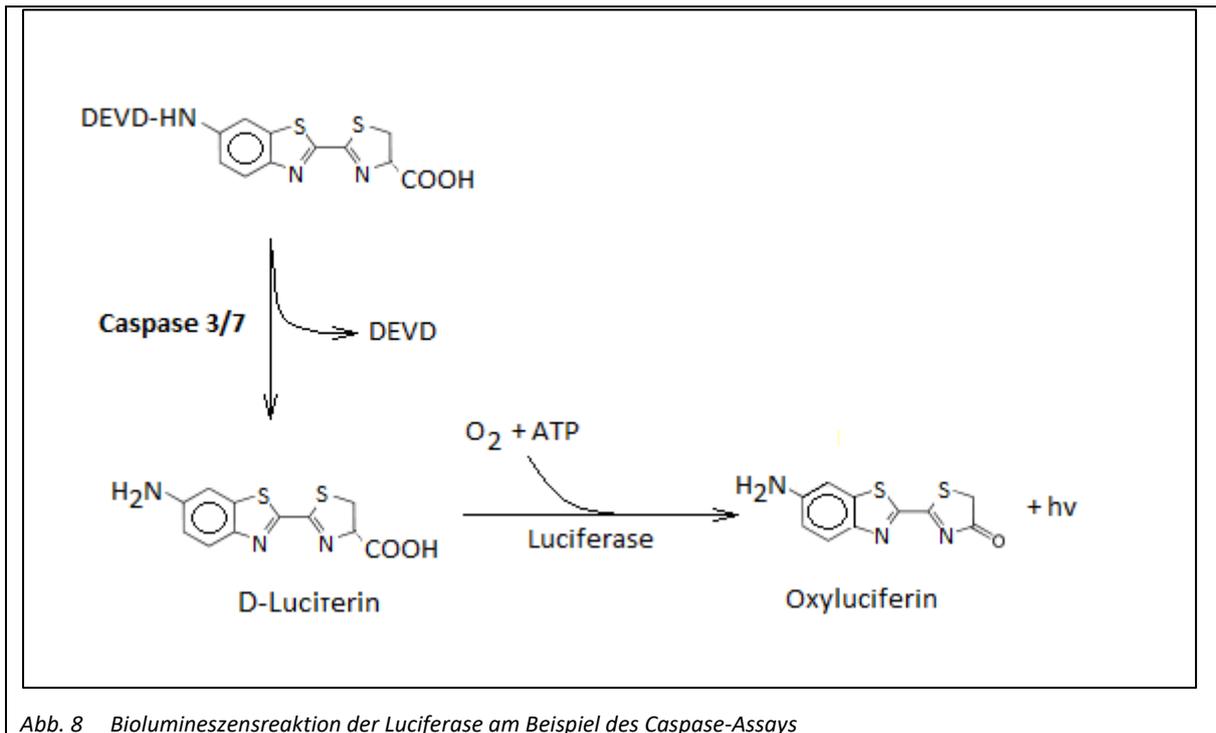


Abb. 8 Biolumineszenzreaktion der Luciferase am Beispiel des Caspase-Assays

Dual-Luciferase Reporter Assays stellen eine genaue und relativ störungsfreie Methode dar, weil zwei verschiedene Luciferase-Systeme in derselben Zelle exprimiert werden. Ein System ist vom Experiment abhängig, sein Leuchtsignal stellt so die zu messende Größe dar. Das andere System ist von äußeren Einflüssen unabhängig, sein Leuchtsignal dient zur Normalisierung. Die messbare Lumineszenz entsteht unter Sauerstoff- und ATP-Verbrauch bei der Umsetzung von Luciferin zu Benzothiazol unter Photonenemission.

### 3.2.9 Quantifizierung der Apoptose

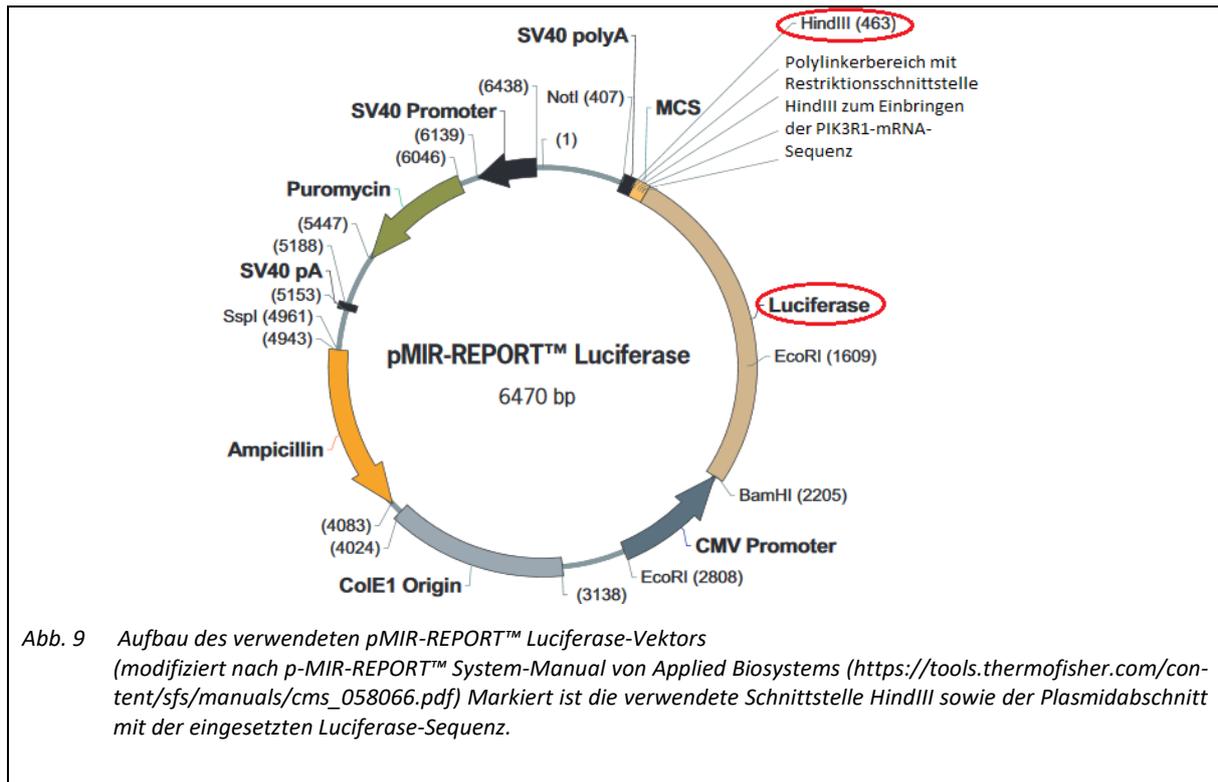
Für den Apoptosetest wurde im 96-Well-Format transfiziert, wobei hierzu keine transparenten, sondern weiße Platten Verwendung fanden. Die Überprüfung und Quantifizierung der in den Zellen ausgelösten Apoptose fand 24 h nach Transfektion mittels des Caspase-Glo® 3/7 Assays von Promega statt. In der Vorarbeit wurde der mitgelieferte Puffer (10ml) auf Raumtemperatur gebracht und zum Substrat gegeben. Anschließend wurden von jeder Vertiefung der Zellplatte 100µl Medium abgenommen und in Folge 100µl Caspase-Glo-Ansatz zugegeben. Nach 1h Inkubation im Brutschrank wurde die Lumineszenz im Microplattenreader mit integriertem Photomultiplier gemessen.

### 3.2.10 Dual-Luciferase Reporter Assay

#### 3.2.10.1 Funktionsprinzip

Der Dual-Luciferase Reporter Assay stellt ein etabliertes Reportersystem zur Untersuchung der Regulation und Expression eukaryotischer Gene dar. Bei dieser Methode wird mittels Transfektion über einen Vektor ein Reporter gen in die zu untersuchende Zelllinie eingebracht. In der vorliegenden Arbeit handelte es sich um das pMIR-REPORT™-Vektor-System (pGL4.80[*hRlucP*/Neo] Vektor) von Applied Biosystems. Der beschriebene Vektor enthält das Reporter gen des Leuchtkäfers *Phytinus pyralis* das für eine Firefly-Luciferase-kodiert. Das Luciferase-Reporterprotein katalysiert eine lichtemittierende Reaktion, deren Lichtabgabe pro definiertem Zeitintervall proportional zur exprimierten Luciferasemenge ist. Über künstlich geschaffene Genabschnitte mit mehreren aufeinander folgenden Restriktionsschnittstellen, sogenannte Polylinker, können mit Hilfe von Restriktionsenzymen potentielle miR-Bindungsstellen in das Luciferase-Gen eingebracht werden. Als Folge dessen kann untersucht werden, ob die Expression der Firefly-Luciferase durch die Bindung einer Kandidaten-miR an der potentiellen Bindungsstelle reguliert wird. Dabei verhindert die Bindung der miR an die eingebrachte Bindungsstelle die Expression des Reporterproteins. Zum Ausgleich möglicher experimenteller Schwankungen enthielt der verwendete Dual-Luciferase-Assay ein Kontroll-Reporter gen mit miR-unabhängiger Expression. Bei diesem der Normierung dienenden Reporter gen handelt es sich in der vorliegenden Arbeit um das Gen der Renilla-Luciferase der Korallenart *Renilla reniformis*.

## Material und Methoden



### 3.2.10.2 Erstellung von Reporterplasmiden

Sowohl die Klonierung als auch die Aufbereitung des fertigen Plasmid-Vektors wurde von Frau Katrin Borschert, Angestellte der Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie Würzburg, vorgenommen. Daher soll hier lediglich eine Übersicht über die erfolgten Arbeitsschritte gegeben werden. Zunächst erfolgte die Amplifikation des einzubringenden Genabschnitts, in diesem Fall die vermutete Bindungsstelle der miR-221 in der 3'UTR der PIK3R1-mRNA mittels PCR. Der verwendete Primer ermöglichte neben der Amplifikation auch das Einbringen der Hind III-Restriktionsstellen in die gewonnenen PCR-Fragmente. Dabei entstanden DNA-Fragmente mit einer Länge von 534 Basenpaaren. Die über die Primer eingebrachten Restriktionsstellen waren zur Klonierung der gewonnenen Sequenzen in den Polylinkerbereich des pMIR-Report-Vektor nötig (s. Abb. 9). Anschließend erfolgte mittels Restriktionsendonukleasen die Ligation der gewonnenen Sequenz mit dem pMIR-Report-Vektor, welcher nun als pGL4-3'UTR-PIK3R1 bezeichnet wurde. Es folgte die Aufnahme des generierten Vektors durch transformationskompetente E. coli. Danach folgte die Mini- beziehungsweise Midiprep selektierter und amplifizierter E. coli-Klone.

### 3.2.10.3 Mini und Midiprep

Die Gewinnung der Plasmid-DNA aus den transformierten E. coli erfolgte über das Midi- und Miniprep-Verfahren, welches hier aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht näher beschrieben wird. Die Miniprep diente hierbei der Gewinnung geringer Plasmidmengen zur gelelektrophoretischen Bestimmung der Plasmid-Fragmentlänge. Zusätzlich erfolgte die Überprüfung auf die gewünschte Gensequenz durch die Firma GATC in Konstanz, wodurch ein fehlerfreies und vollständiges Enthalten der gewünschten Sequenz bestätigt wurde. Nach Bestätigung der erzielten Basensequenz erfolgte die Gewinnung von Plasmid-DNA mittels Midiprep.

### 3.2.10.4 Transiente Kotransfektion mit miRNA und Reportergen

Einen Tag nach Einsaat erfolgte die Transfektion von PC-3-Zellen nach dem in Abschnitt 3.2.3 beschriebenen Protokoll. Dabei wurden die Zellen mit dem gewonnenen Reporterplasmid mit inseriertem PIK3R1-Genabschnitt (folgend pMIR Report PIK3R1) transfiziert. Zusätzlich wurde mit pre-miR-221 kotransfiziert. 24h nach der Transfektion wurde den Ansätzen 1ml Medium pro Well zugefügt.

### 3.2.10.5 Luciferase Assay und Vermessung

48h nach Transfektion erfolgte der Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter Assay von Promega nach modifiziertem Herstellerprotokoll. Zunächst erfolgte die Abnahme des Nährmediums und eine anschließende Spülung mit PBS. Nach Abnahme der Spüllösung PBS wurden pro Well 200µl Passive Lysis Buffer (PLB) zugegeben, die Platte wurde daraufhin für 15min bei Raumtemperatur leicht geschüttelt. Aus dem erhaltenen Lysat wurden je 20µl pro Well in eine weiße, nicht-transparente 96 Well-Platte überführt. Nach Zugabe von 80 µl Luciferase Assay Reagent II (LAR II) erfolgte die Messung der Aktivität der Firefly-Luciferase im Mikroplattenreader mit integriertem Photomultiplier von Tecan. Pro Well wurden 80µl zuvor hergestellter Stop and Glo-Lösung (Stop & Glo<sup>®</sup>-Substrat und Stop & Glo<sup>®</sup>-Puffer 1:50) zugegeben. Dies war nötig zum Stop der Firefly-Luciferase-Reaktion um im Folgenden die verbleibende Lumineszens der Renilla-Luciferase messen zu können. Diese Messung ermöglichte dann die Normierung der Firefly-Luciferase auf die Renilla-Luciferase zum Ausgleich experimenteller Schwankungen. Die vom Photomultiplier gemessenen Lichtimpulse wurden in relativen Lichteinheiten (RLU)

angegeben, mit denen sich ein Maß für die Luciferaseaktivität darstellen lässt. Die endgültige Auswertung erfolgte durch Übertragung und Verwertung der gewonnenen RLU auf Excel™.

### 3.2.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

#### 3.2.11.1 Funktionsprinzip

Die PCR ist eine Methode zur semiquantitativen in vitro-Vervielfältigung von Nukleinsäuren, in der vorliegenden Arbeit handelt es sich hierbei um cDNA. Die Amplifikation der cDNA mit Hilfe der DNA-Polymerase verläuft zyklisch in mehreren sich wiederholenden Phasen. Bei jedem Zyklus dienen die Endprodukte des jeweils vorherigen Zyklus als Ausgangsmaterial, derart lässt sich das zu untersuchende Material exponentiell vervielfachen.

- I) **Denaturierung**  
Durch Erhitzen der DNA auf 94-96°C werden die Doppelstränge aufgebrochen, sodass nur noch einzelsträngige DNA vorliegt
- II) **Annealing (Primerhybridisierung)**  
Durch Herunterkühlen auf 55-65°C wird das Anlagern der Primer an die komplementäre DNA-Sequenz ermöglicht. Hierbei dienen zwei synthetische Primer zur beidseitigen Begrenzung der zu amplifizierenden Sequenz, sodass nachher nur die gewünschten DNA-Abschnitte vervielfältigt werden.
- III) **Elongation**  
Bei einer Temperatur von 68-72°C beginnt nun die DNA-Polymerase, die markierten Bereiche mit freien Nukleotiden aufzufüllen. Sie beginnt hierbei immer am 3`-Ende des Primers und folgt dann dem kodierenden DNA-Strang.

Durch zyklisches Wiederholen der Phasen kann eine exponentielle Vervielfältigung der DNA erreicht werden. Unter Idealbedingungen sollte sich der Gehalt des untersuchten Abschnitts mit jedem Zyklus verdoppeln.

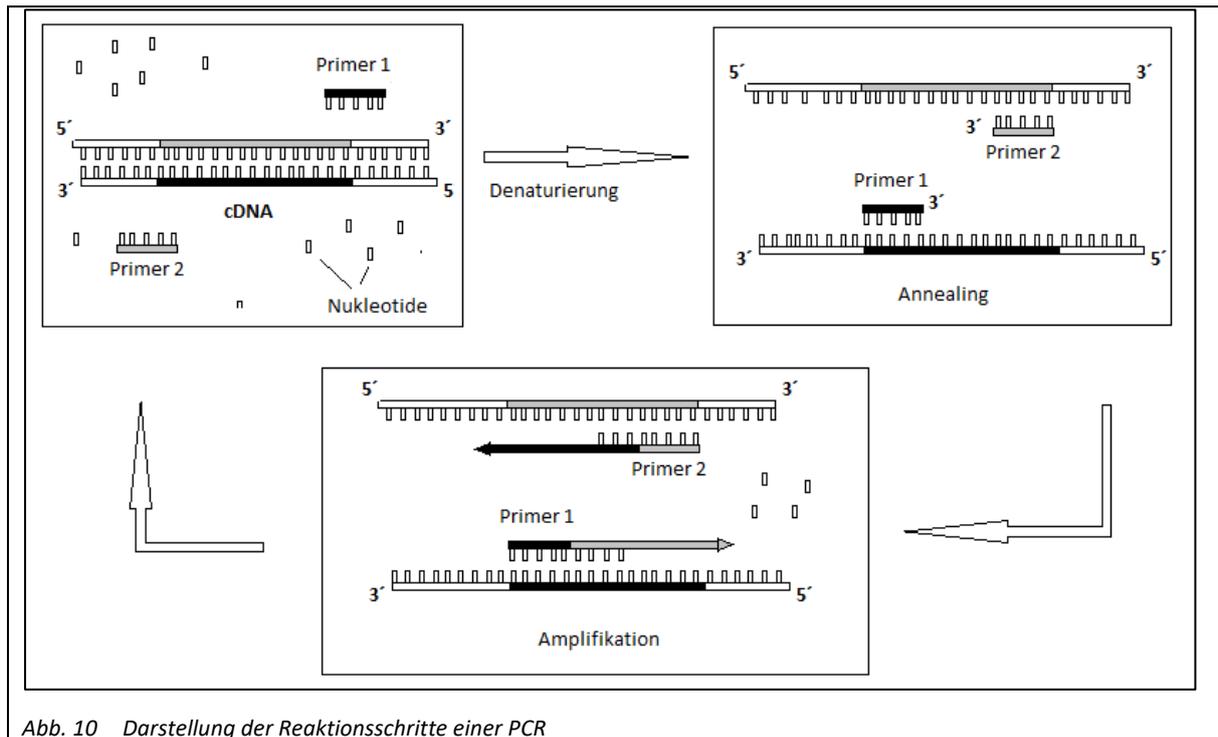


Abb. 10 Darstellung der Reaktionsschritte einer PCR

### 3.2.11.2 Reverse Transkription

Da die gewonnene RNA selbst nicht via PCR vervielfältigt werden kann, musste sie mittels der sogenannten Reversen Transkription (RT) in cDNA umgewandelt werden. Hierbei kamen zwei verschiedene Vorgehensweisen zum Einsatz, je nach zu untersuchender RNA. Handelte es sich um eine miR, die in cDNA überführt werden sollte, wurde mit spezifischen Primern gearbeitet, sollte mRNA umgeschrieben werden, wurden unspezifische Primer verwendet und der gesamte RNA-Gehalt der Zelle in cDNA überführt. Für die Reverse Transkription von miRs wurden die Taqman™ MicroRNA Assay-Kits für miR-221 und der RNU6B Kontroll-miR von Applied Biosystems verwendet. Zur Herstellung des zu transkribierenden RNA-Ansatzes wurde die RNA auf 10ng/ml verdünnt. In der folgenden PCR wurde dann die Expression der entsprechenden miR unter FAM-Anwendung quantifiziert. Im Falle der reversen Transkription der mRNA fand das „Im-Prom-II Reverse Transkription System“ von Promega Verwendung, die RNA wurde für die Transkription auf 1µg/ml verdünnt. Nach Umschreiben der mRNA nach dem modifizierten Protokoll von Promega erfolgte die Quantifizierung der cDNA-Expression unter Anwendung des SYBR-GREEN Farbstoffes. An dieser erfolgt Stelle eine kurze Erläuterung zu den verwendeten Farbstoffen:

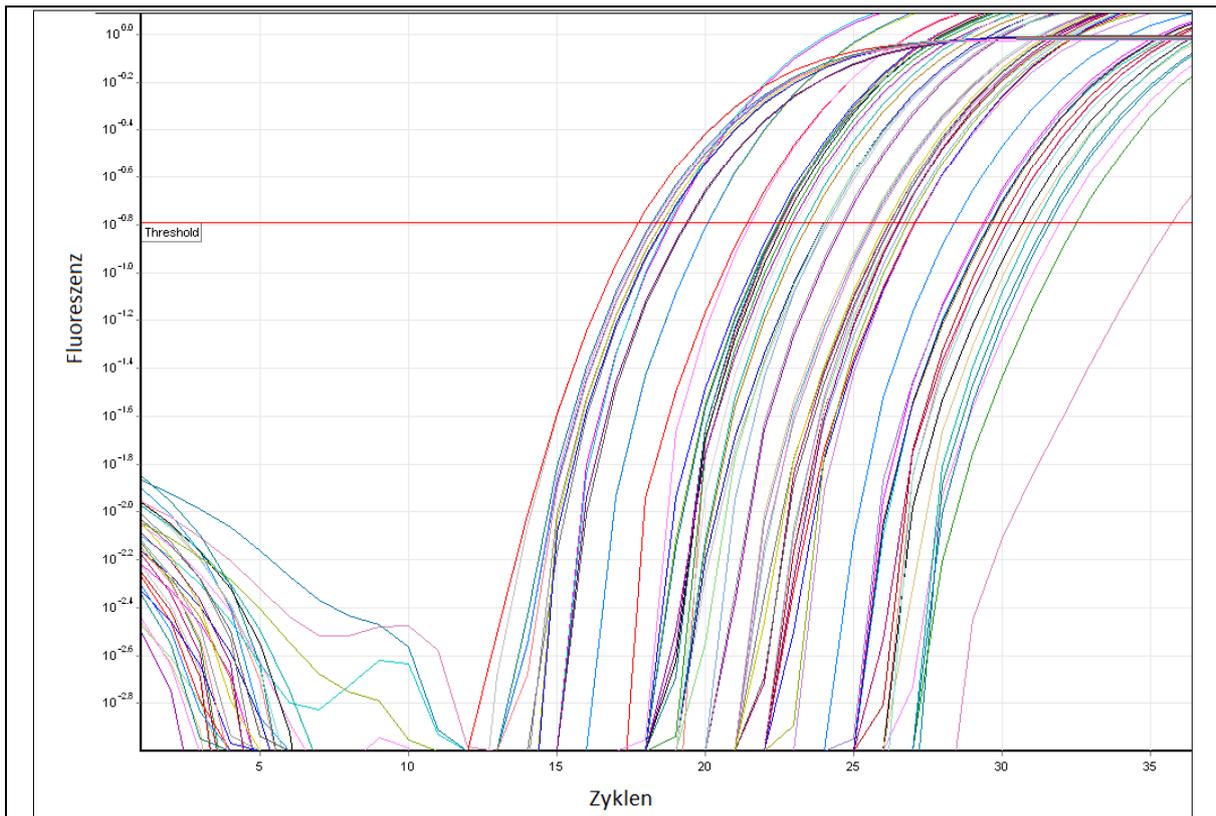
## Material und Methoden

- I) FAM: hierbei handelt es sich um ein Derivat von 6-Carboxyfluorescein. Er ist an das 5'-Ende der Taqmansonde gebunden, am 3'-Ende der Sonde befindet sich ein sogenannter Quencher-Farbstoff, der die Fluoreszenz des FAM-Farbstoffes auch bei dessen Anregung unterdrückt. Bei Sonden, die DNA gebunden haben, wird FAM durch die Taq-Polymerase abgelöst, ist somit frei und in der Lage, ein Fluoreszenzsignal zu vermitteln
- II) SYBR GREEN: es handelt sich um einen Cyanin-Farbstoff, der in der Lage ist, doppelsträngige DNA zu binden. Der entstandene DNA-Farbstoff-Komplex ist nun in der Lage, nach Anregung grünes Licht zu emittieren.

In beiden Fällen ist somit die Anzahl der zur Fluoreszenz befähigten Farbstoffe direkt von der DNA-Menge abhängig. Dadurch lässt sich die DNA-Menge über die gemessene Fluoreszenz quantifizieren.

### 3.2.11.3 Quantitative RT-PCR

Die Quantifizierung der untersuchten cDNA wurde über die Messung des Fluoreszenzanstieges der jeweils verwendeten Farbstoffe erreicht: In beiden Fällen führte die Anlagerung (= *Interkalierung*) der positiv geladenen Farbstoffsonden an die negativ geladene DNA zu einer Fluoreszenzsteigerung, diese stieg somit proportional zum DNA-Gehalt der Probe an. Um die Quantifizierung in Form von Messwerten zu ermöglichen, wurden nun die Ct-Werte (Ct=*cycle threshold*) der einzelnen Proben bestimmt (s. Abb. 11). Der Ct-Wert gibt an, wie viele Zyklen und damit Verdoppelungen nötig waren, um ein festgelegtes Fluoreszenzniveau zu erreichen. Um eventuelle Konzentrationsunterschiede zwischen den einzelnen Proben zu detektieren und auszugleichen, wurden zusätzlich die Ct-Werte sogenannter House-keeper-Gene ermittelt. Diese dienten dann als Normierung, um die relativen Genexpressionsunterschiede der einzelnen Proben miteinander vergleichen zu können. Housekeeper-Gene werden im Idealfall in allen untersuchten Zellen in gleicher und stabiler Stärke exprimiert, sind also auch vom jeweiligen Experiment unabhängig. Hier handelte es sich um RNU6B für die FAM-Anwendung bei miR-Proben und  $\beta$ -Aktin für die SYBR-GREEN-Anwendung bei den mRNA-Proben. Der zu erreichende Fluoreszenz-Grenzwert (= *Threshold*) lag konstant bei 0,158 ( $10^{-0,8}$ ).



**Abb. 11** Darstellung der Ct-Wert Bestimmung

Auf der X-Achse sind die Anzahl der Zyklen dargestellt, auf der Y-Achse ist das Fluoreszenzniveau dargestellt. Der Ct-Wert beschreibt die notwendige Zykluszahl, die notwendig war, um ein durch einen festen Grenzwert (=Threshold) festgelegtes Fluoreszenzniveau zu erreichen. Je niedriger der Ct-Wert, desto höher die Ausgangskonzentration der DNA.

### 3.2.11.4 Oligonukleotidprimer

Um die Genexpression der jeweils gesuchten Zielgene spezifisch untersuchen zu können, kamen Oligonukleotidprimer zum Einsatz. Diese binden mit ihrem zur Sequenz des Zielgenes komplementärem Aufbau im Idealfall nur den gesuchten DNA-Abschnitt und ermöglichen somit dessen selektive Amplifikation. Es kamen folgende Primer zum Einsatz:

## Material und Methoden

	Zielgen	Sequenz – falls bekannt
SYBR-GREEN- Fluoreszenz- markierung	TNFSF 10	Als QuantiTect® Primer Assay geliefert
	PIK3R1	
	XAF1	
	STAT1	
	β-Aktin	for 5`-cct ggc acc cag cac att -3` rev 5`-ggc gat cca cac gga gta ct -3`
SOCS3	for 5`-acc aag ctt gcc cac agc cag gga agt g -3` rev 5`-aca act agt ctg tcc agc cca at acct g -3`	
FAM	miR-221	for 5`-gta tgt gag aat tac ttg caa gc -3` rev 5`-cca ctg gtt tat acct cc tgg -3`
	RNU6B	Als Taqman™ MicroRNA Assay geliefert

### 3.2.11.5 qRT-PCR Ansätze

Je nach verwendeter Fluoreszenzanregung kamen zwei verschiedene Ansätze zum Einsatz. In beiden Fällen wurde ein Doppelansatz erstellt, um über die spätere Doppelbestimmung eine höhere Messgenauigkeit zu erreichen.

#### I) Ansatz bei FAM-Verwendung

TaqMan Universal PCR Mastermix UNG	30µl
DEPC-H <sub>2</sub> O	17µl
20x Primer (Fluoreszenz-rot)	3µl
c-DNA-Probe	10µl
Mastermix Gesamtmenge	(30+17+3)µl=50µl

#### II) Ansatz bei SYBR-GREEN-Verwendung

Quantitect SYBR-GREEN	20µl
DEPC-H <sub>2</sub> O	12µl
10xPrimer	4µl
c-DNA-Probe	2µl
Mastermix Gesamtmenge	(20+12+4+2)µl=38µl

### 3.2.12 Datenverarbeitung und Statistik

#### 3.2.12.1 Datenverarbeitung der MTS-Vitalitäts-Assays

Mittels Monochromator wurde an Tag 2, 3 und 5 nach TRAIL-Behandlung und damit Tag 3, 4, und 6 nach Transfektion der Anteil vitaler Zellen bestimmt. Die ermittelten Daten wurden in Excel importiert und das arithmetische Mittel der gemessenen Triplikate gebildet. Dieser Mittelwert bildete den jeweiligen Probenwert. Durch die Berechnung  $\text{Probenwert}/\text{Kontrollwert} \cdot 100\%$  konnten die Ergebnisse als Prozentwerte dargestellt werden.

#### 3.2.12.2 Datenverarbeitung der Luciferase-Assays

Im Falle des Apoptose-Assays wurden mittels Microplattenreader für jeden Ansatz in 4 Einzelmessungen die Caspase3/7-Aktivität bestimmt. Die erhaltenen Werte wurden in Excel® übertragen und das arithmetische Mittel der Einzelwerte gebildet. Zur Angabe von Prozentwerten diente der Abgleich zu Zellen gleicher Zelllinie ohne jeweilige Behandlung.

Im Falle der Lumineszenz-Messung nach transienter Transfektion mit Reporterplasmiden wurde ähnlich verfahren. Für jeden Ansatz wurden in 4 Einzelmessungen die Lumineszenz der Firefly-Luciferase und folgend der Renilla-Luciferase gemessen und die Werte in Excel® übertragen. Nach der Normalisierung der Firefly- gegen die Renilla-Luciferase wurde das arithmetische Mittel der 4 Einzelmessungen gebildet und als letztendlicher Messwert verwendet. Die Messwerte von pre-miR-221 transfizierten Proben wurden zu denen pre-miR-Ktr transfizierter Proben ins Verhältnis gesetzt, um die Ergebnisse als Prozentwerte darzustellen. Das Experiment wurde nach gleichem Verfahren dreimal durchgeführt.

#### 3.2.12.3 Datenverarbeitung der qRT-PCR

Die Amplifikation erfolgte im Thermocycler Rotor-Gene Q von Qiagen. Über das Einsetzen einer Threshold-Geraden konnten die Ct-Werte bestimmt und zur weiteren Verarbeitung in Excel importiert werden. Über eine Doppelbestimmung gelang der Ausschluss von Probenpaaren mit einer Standardabweichung  $>0,5$  von der Weiterverarbeitung. Falls mit einer Standardabweichung  $<0,5$  zwei einwandfreie Ct-Werte vorlagen, erfolgte die Weiterverarbeitung über das arithmetische Mittel des Wertepaares. Anschließend konnte der Expressionsunterschied mithilfe der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode ermittelt werden. Bei dieser wird durch Subtraktion der Ct-

## Material und Methoden

Werte von Housekeeping-Gen und zu untersuchendem Zielgen der  $\Delta\text{Ct}$ -Wert gebildet. Durch erneute Subtraktion der  $\Delta\text{Ct}$ -Werte von Probe und Kontrolle kann der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert gebildet werden, der erstmalig Vergleiche zwischen zwei Proben erlaubt. Um den relativen Expressionsunterschied in Form einer Über- oder Unterexpression zu errechnen, wird dann die Formel  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  eingesetzt.

$$\begin{aligned}\Delta\text{Ct} &= \text{Ct Zielgen} - \text{Ct Housekeeping-Gen} \\ \Delta\Delta\text{Ct} &= \Delta\text{Ct Behandlung} - \Delta\text{Ct Kontrolle} \\ \text{relativer Expressionsunterschied} &= 2^{-\Delta\Delta\text{CT}}\end{aligned}$$

### 3.2.12.4 Statistik

Die Berechnung der statistischen Werte erfolgte mit Hilfe von Microsoft® Excel®. Zur Ermittlung der statistischen Signifikanz fand der zweiseitig ungepaarte Student's t-Test Verwendung. Das Signifikanzniveau wurde mit  $p < 0,05$  als signifikant und ab  $p < 0,005$  als hochsignifikant festgelegt. Die Kennzeichnung erfolgte in den Abbildungen mit „\*“ für signifikant und „\*\*“ für hochsignifikant.

### 4 Ergebnisse

Vorergebnisse der Arbeitsgruppe ließen vermuten, dass miR-221 indirekt oder direkt die Wirksamkeit von TRAIL auf PCa-Zellen regulieren könnte. Somit sollte die Wirkung von miR-221 auf die TRAIL-Sensitivität in verschiedenen PCa-Zelllinien sowie immortalisierten Prostata-Epithelzellen festgestellt werden. Um den vermuteten Einfluss klar definieren zu können, sollte zunächst die Wirkung des Zytokins TRAIL sowie der miR-221 auf Zellüberleben und -wachstum untersucht werden.

#### 4.1 Die Wirkung von TRAIL auf Prostatazelllinien

Vorarbeiten zeigten, dass sich die verwendeten PCa-Zelllinien in den gewählten Kultur- und Versuchsbedingungen über den Beobachtungszeitraum von 5 Tagen gleichmäßig teilten. Um die Wirkung von TRAIL auf die verschiedenen Zelllinien zu charakterisieren, wurden diese mit ansteigenden TRAIL Konzentrationen (s. 3.2.4) über einen Zeitraum von 5 Tagen behandelt. Es wurde so eine TRAIL-Konzentration von 100ng/µl für die weiteren Versuche festgesetzt, die PCa-Zellen signifikant reduzierte, die TRAIL-resistenten RWPE-Zellen jedoch nicht signifikant in der Zellzahl verringerte (siehe 3.2.4).

## Ergebnisse

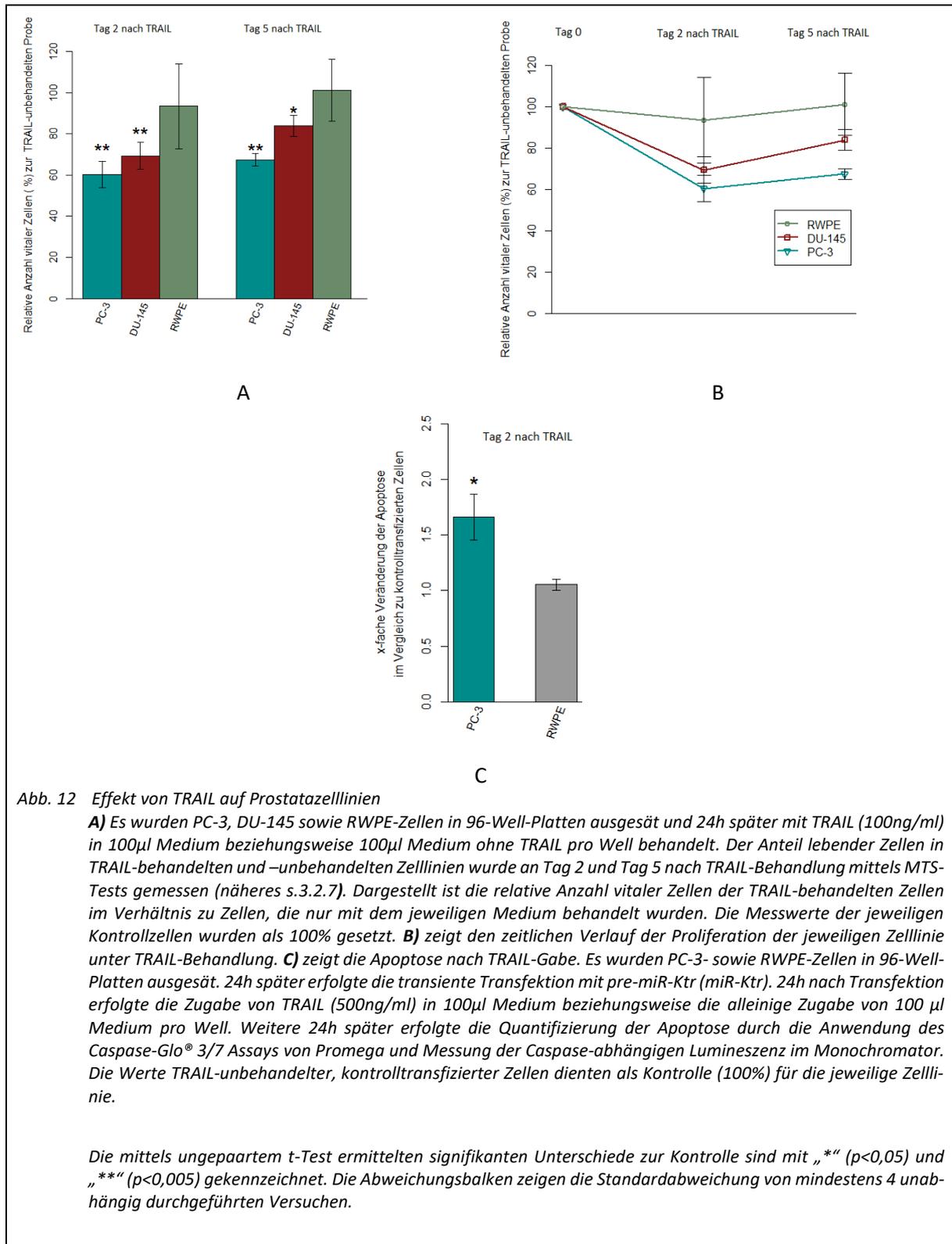


Abb. 12 zeigt die signifikante Reduktion vitaler PC-3- und DU-145-Zellen durch eine Behandlung mit 100ng/µl TRAIL. So sank der Anteil lebender Zellen an Tag 2 nach Behandlung bei PC-3-Zellen auf durchschnittlich 60% ( $p$ -Wert=0,002), bei DU-145-Zellen auf ca. 69% ( $p$ -

## Ergebnisse

Wert=0,004). An Tag 5 nach TRAIL-Behandlung verminderte sich der Anteil vitaler PCa-Zellen im Verhältnis zu unbehandelten Zellen auf 67% (PC-3, p-Wert=0,0003) beziehungsweise 84% (DU-145, p-Wert=0,011). RWPE-Zellen erwiesen sich, wie erwartet, als resistent gegenüber TRAIL in der gegebenen Konzentration. So wurde eine nicht signifikante Reduktion auf 93% (p-Wert=0,62) an Tag 2 nach TRAIL-Behandlung und nahezu kein Unterschied am Tag 5 nach TRAIL-Behandlung (101%, p-Wert=0,90) beobachtet.

### 4.1.1 Apoptoseinduktion durch TRAIL in PCa-Zellen

Die beobachtete Reduktion der Zellzahl in TRAIL-behandelten PCa-Zelllinien über den beobachteten Zeitraum kann als Folge einer reduzierten Proliferationsrate und/oder eines vermehrten Zellsterbens, z.B. im Rahmen einer Apoptoseinduktion, interpretiert werden. Dies kann durch den vorangegangenen Versuch nicht eindeutig unterschieden werden. Da die Induktion von Apoptose durch TRAIL in Karzinomzellen mehrfach beschrieben wurde (s. 1.2.1), sollte mittels eines Caspase 3/7-Assays (s. Abb. 12C) die Apoptoseinduktion in den Zellkulturmodellen überprüft werden. Die Versuche wurden mit PC-3-Zellen und RWPE-Zellen durchgeführt. Bei PC-3-Zellen wurde die Apoptoserate durch TRAIL signifikant auf das 1,7-fache erhöht (p-Wert=0,01). In RWPE-Zellen konnte keine signifikante Zunahme der Apoptoserate nach TRAIL-Gabe beobachtet werden (Faktor 1.05,  $p > 0,05$ ).

## 4.2 MiR-221 als Modulator des TRAIL-Signals in PCa-Zellen

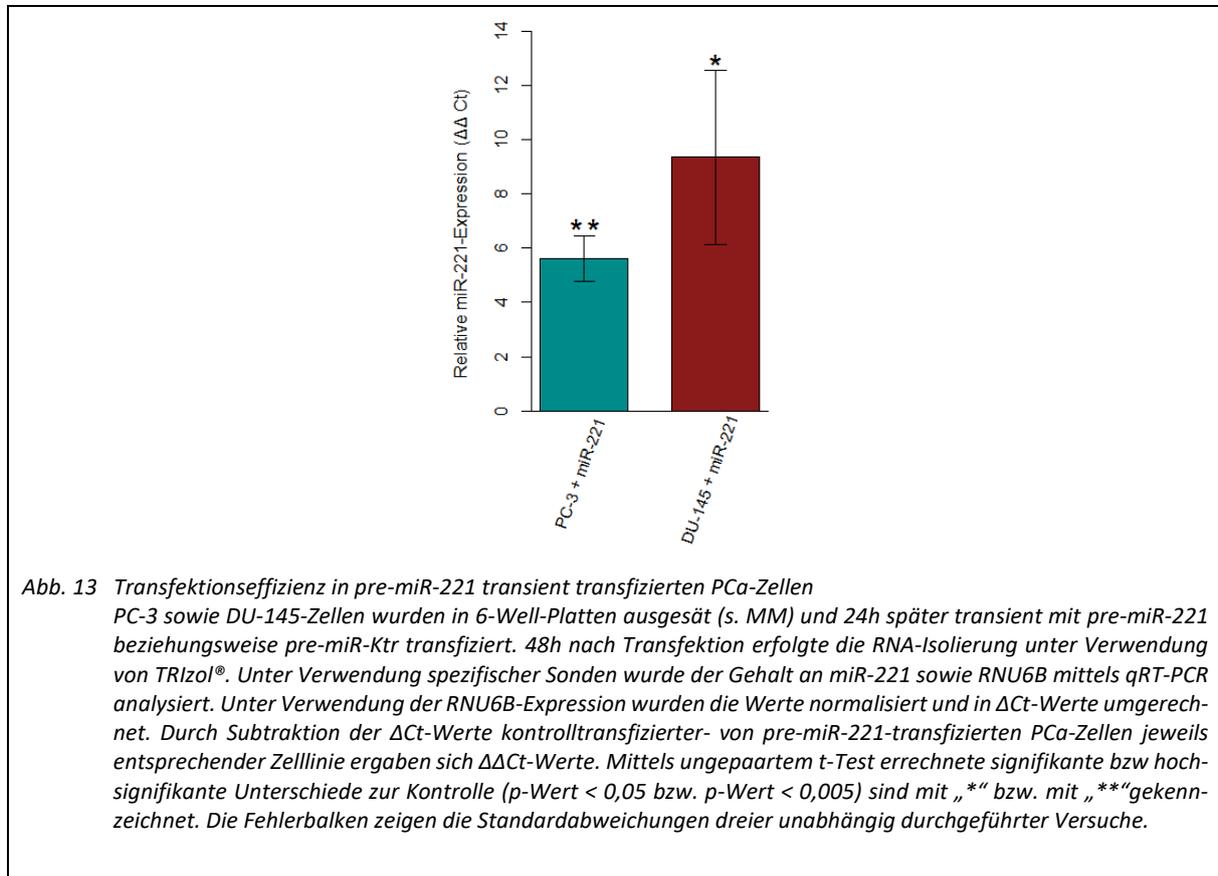
In Literatur und Vorarbeiten der Forschungsgruppe wurden konträre Effekte der miR-221 auf Proliferationsverhalten und Zellvitalität in verschiedenen Tumorzellen beschrieben (s. Abschnitt 1.3.3). Daher sollte der Effekt einer miR-221-Überexpression im PCa-Zellmodell untersucht werden. Da ein Einfluss der miR-221 auf das TRAIL-Signal vermutet wurde (s. 1.3.4) sollte diese Hypothese in miR-221 überexprimierenden Zellen überprüft werden.

### 4.2.1 Die Transfektionseffizienz von pre-miR-221 transfizierten PCa-Zellen

Um den vermuteten Einfluss der miR-221 auf das TRAIL-Signal untersuchen zu können, wurden transiente Transfektionen (TF) der Zelllinien PC-3 sowie DU-145 mit einer pre-miR-221 (siehe 3.2.3) durchgeführt. Bei einer erfolgreichen transienten Transfektion mit pre-miR-221 war eine signifikante Überexpression von miR-221 in den transfizierten Zelllinien zu erwarten.

## Ergebnisse

Dies sollte im Rahmen einer Transfektionskontrolle mittels qRT-PCR Experimenten überprüft werden. Es wurde die miR-221-Expression transient pre-miR-221-transfizierter PCa-Zellen mit der miR-221-Expression kontrolltransfizierter Proben der gleichen Zelllinie verglichen.



Es wurden PC-3- sowie DU-145-Zellen transient mit pre-miR-221 transfiziert. 48h nach Transfektion wurde die RNA der Zellen isoliert und mittels qRT-PCR die Expression der miR-221 analysiert. Die Erhöhung der erwarteten miR-221-Expression nach Transfektion zeigt Abb. 13. Bei PC-3-Zellen wurde die Überexpression von miR-221 im Vergleich zu Kontroll-transfizierten Zellen durch einen hoch signifikanten Anstieg der normierten Expressionswerte (ΔΔCt-Wert) um 5,61 ΔΔCt-Werte verdeutlicht (p-Wert<0,001). Bei DU-145-Zellen stieg die Expression im Vergleich zu pre-miR-Ktr-transfizierten Zellen um 9,4 ΔΔCt (p-Wert=0,02). Mittels  $2^{\Delta\Delta Ct}$ -Methode konnte aus den ΔΔCt-Werten die x-fache Überexpression an miR-221 errechnet werden. Sie ergab eine Überexpression der miR-221 um das circa 49-fache bei PC-3 und um mehr als das 600-fache bei pre-miR-221 transfizierten DU-145-Zellen. Mit Hilfe dieser Daten wurde nachgewiesen, dass die Transfektion mit pre-miR-221 zu einer robusten Überexpression in allen

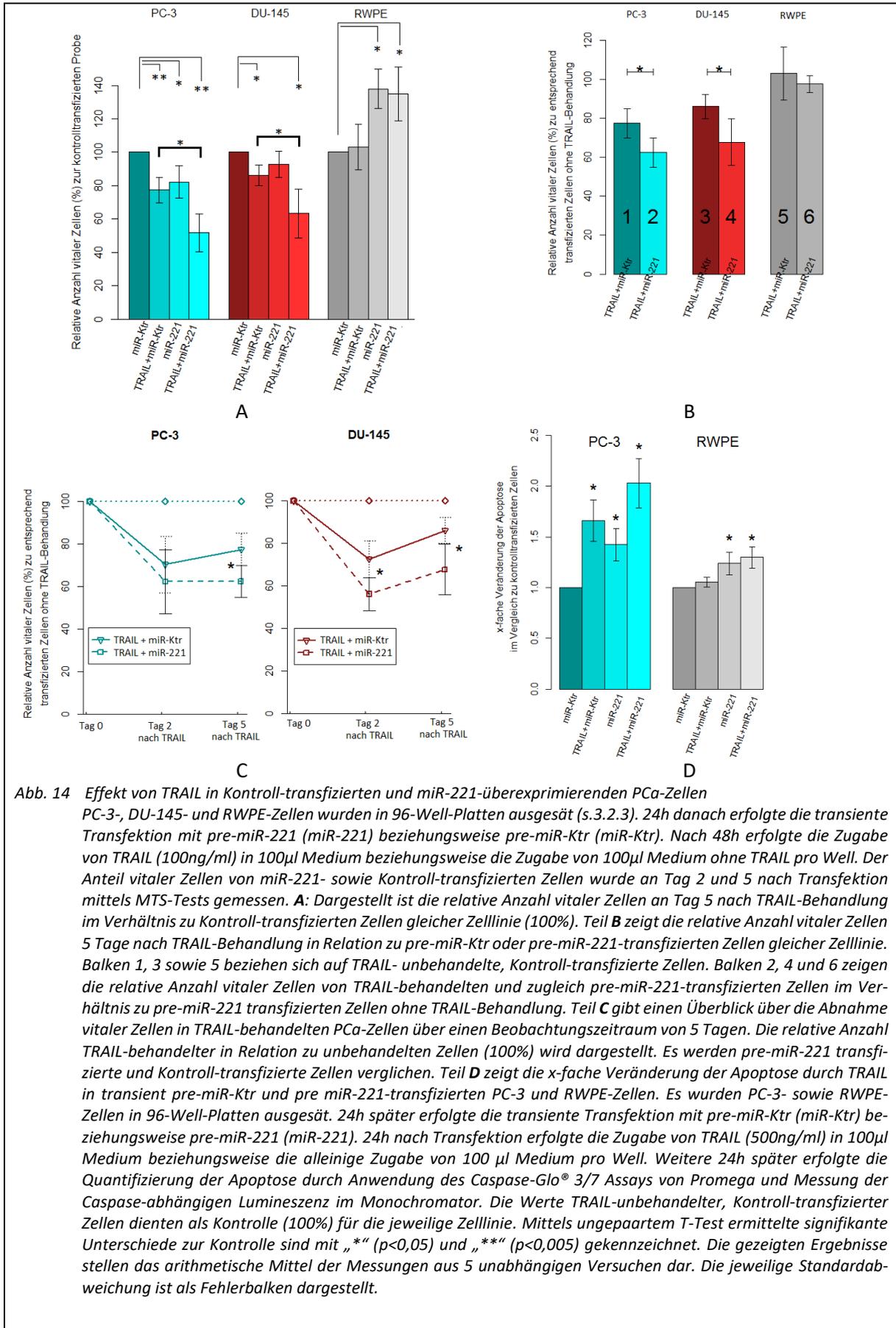
## Ergebnisse

vorgestellten Experimenten führt. Daher werden im Anschluss pre- miR-221 transfizierte Zellen als miR-221 überexprimierende Zellen bezeichnet.

### 4.2.2 Wirkung von TRAIL in miR-221 überexprimierenden PCa-Zellen

Für die Gabe von TRAIL (s. 4.1) konnte eine Apoptoseinduktion in PCa-Zellen gezeigt werden. In der weiteren Abfolge sollte nun der Einfluss der miR-221-Überexpression auf das Überleben von PCa-Zellen überprüft werden.

# Ergebnisse



**Abb. 14** Effekt von TRAIL in Kontroll-transfizierten und miR-221-überexprimierenden PCa-Zellen  
 PC-3-, DU-145- und RWPE-Zellen wurden in 96-Well-Platten ausgesät (s. 3.2.3). 24h danach erfolgte die transiente Transfektion mit pre-miR-221 (miR-221) beziehungsweise pre-miR-Ktr (miR-Ktr). Nach 48h erfolgte die Zugabe von TRAIL (100ng/ml) in 100µl Medium beziehungsweise die Zugabe von 100µl Medium ohne TRAIL pro Well. Der Anteil vitaler Zellen von miR-221- sowie Kontroll-transfizierten Zellen wurde an Tag 2 und 5 nach Transfektion mittels MTS-Tests gemessen. **A:** Dargestellt ist die relative Anzahl vitaler Zellen an Tag 5 nach TRAIL-Behandlung im Verhältnis zu Kontroll-transfizierten Zellen gleicher Zelllinie (100%). Teil **B** zeigt die relative Anzahl vitaler Zellen 5 Tage nach TRAIL-Behandlung in Relation zu pre-miR-Ktr oder pre-miR-221-transfizierten Zellen gleicher Zelllinie. Balken 1, 3 sowie 5 beziehen sich auf TRAIL- unbehandelte, Kontroll-transfizierte Zellen. Balken 2, 4 und 6 zeigen die relative Anzahl vitaler Zellen von TRAIL-behandelten und zugleich pre-miR-221-transfizierten Zellen im Verhältnis zu pre-miR-221 transfizierten Zellen ohne TRAIL-Behandlung. Teil **C** gibt einen Überblick über die Abnahme vitaler Zellen in TRAIL-behandelten PCa-Zellen über einen Beobachtungszeitraum von 5 Tagen. Die relative Anzahl TRAIL-behandelter in Relation zu unbehandelten Zellen (100%) wird dargestellt. Es werden pre-miR-221 transfizierte und Kontroll-transfizierte Zellen verglichen. Teil **D** zeigt die x-fache Veränderung der Apoptose durch TRAIL in transient pre-miR-Ktr und pre miR-221-transfizierten PC-3 und RWPE-Zellen. Es wurden PC-3- sowie RWPE-Zellen in 96-Well-Platten ausgesät. 24h später erfolgte die transiente Transfektion mit pre-miR-Ktr (miR-Ktr) beziehungsweise pre-miR-221 (miR-221). 24h nach Transfektion erfolgte die Zugabe von TRAIL (500ng/ml) in 100µl Medium beziehungsweise die alleinige Zugabe von 100 µl Medium pro Well. Weitere 24h später erfolgte die Quantifizierung der Apoptose durch Anwendung des Caspase-Glo® 3/7 Assays von Promega und Messung der Caspase-abhängigen Lumineszenz im Monochromator. Die Werte TRAIL-unbehandelter, Kontroll-transfizierter Zellen dienten als Kontrolle (100%) für die jeweilige Zelllinie. Mittels ungepaartem T-Test ermittelte signifikante Unterschiede zur Kontrolle sind mit „\*“ ( $p < 0,05$ ) und „\*\*\*“ ( $p < 0,005$ ) gekennzeichnet. Die gezeigten Ergebnisse stellen das arithmetische Mittel der Messungen aus 5 unabhängigen Versuchen dar. Die jeweilige Standardabweichung ist als Fehlerbalken dargestellt.

## Ergebnisse

Analog zu den in Abschnitt 4.1 gezeigten Ergebnissen bewirkte die Behandlung mit TRAIL über den Beobachtungszeitraum von 5 Tagen hinweg eine signifikante Reduktion vitaler Zellen in den beiden PCa-Zelllinien, nicht aber in RWPE-Zellen (Abb. 14A). In PC-3-Zellen zeigte sich eine hochsignifikante Reduktion vitaler Zellen auf 77% (p-Wert=0,004), bei DU-145-Zellen eine signifikante Reduktion auf 86% (p-Wert=0,01), RWPE-Zellen zeigten keine signifikante Reaktion (103%, p-Wert=0,73).

Die Überexpression von miR-221 zog in den beiden PCa Zelllinien eine Proliferationsinhibierung der Zellen nach sich (s. Abb. 14A). Vergleicht man miR-221 überexprimierende PC-3-Zellen mit kontroll-transfizierten Zellen, so kann man eine signifikante Reduktion der Zellzahl auf 82% erkennen (p-Wert=0,02). Bei DU-145-Zellen sank die Zahl vitaler Zellen auf 93%, RWPE-Zellen reagierten mit einem signifikanten Anstieg vitaler Zellen auf 138% (p-Wert=0,01). Somit zeigte sich in den untersuchten PCa-Zelllinien eine antiproliferative Wirkung durch miR-221-Überexpression. Konträr zu den Ergebnissen in PCa Zelllinien reagierten Zellen der RWPE-Linie mit einer deutlichen Hyperproliferation.

Anschließend galt es, die vermutete Modulation des TRAIL-Signals durch miR-221 zu überprüfen. Dazu wurden miR-221-überexprimierende PC-3-, DU-145- und RWPE-Zellen mit TRAIL behandelt (s. Abb. 14A). Wurden PCa-Zellen mit pre-miR-221 transient transfiziert und in Folge mit TRAIL behandelt, kam es zur stärksten Reduktion an vitalen Zellen, die in dieser Versuchsserie beobachtet werden konnte. Im Falle von PC-3-Zellen sank der Anteil lebender Zellen signifikant auf 52% (p-Wert=0,001). miR-221 überexprimierende DU-145-Zellen reagierten auf eine TRAIL-Gabe ebenfalls mit einem signifikanten Rückgang vitaler Zellen auf 63% (p-Wert=0,03). Somit konnte bei beiden untersuchten PCa-Zelllinien ein additiver Effekt auf die TRAIL-Wirkung in miR-221 überexprimierenden PCa Zellen beobachtet werden. RWPE-Zellen verhielten sich abweichend zu den beobachteten Effekten in PCa-Zellen. Trotz TRAIL-Behandlung blieb die relative Vitalität der miR-221 überexprimierenden RWPE-Zellen signifikant auf ca. 135% (p-Wert = 0,03) erhöht.

Dass TRAIL nicht nur additiv zu einer pre-miR-221-Transfektion, sondern sogar stärker in miR-221-überexprimierenden PCa-Zellen im Verhältnis zu Kontroll-transfizierten PCa-Zellen wirkt, zeigt Teil B der Abb. 14. Dargestellt ist die Reduktion der vitalen Zellmenge durch TRAIL-Gabe in Relation zu entsprechend transfizierten Zelllinien ohne TRAIL-Behandlung (100%). So dienten entweder pre-miR-Ktr-transfizierte (Abb. 14B, Balken 1, 3 und 5) oder pre-miR-221

## Ergebnisse

transfizierte Zellen (Abb. 14B, Balken 2, 4 und 6) ohne TRAIL-Behandlung als Vergleichsprobe. In PC-3-Zellen zeigte sich durch TRAIL-Behandlung ein signifikanter Abfall vitaler Zellen von 77% in pre-miR-Ktr-transfizierten Zellen auf 62% in pre-miR-221-transfizierten PC-3-Zellen ( $p$ -Wert=0,02). Dies entspricht einer Verstärkung der TRAIL-Wirkung um ca. 20% durch pre-miR-221-Transfektion. Bei DU-145-Zellen ist Ähnliches zu beobachten. Im Vergleich zu entsprechend transfizierten DU-145-Zellen ohne TRAIL-Behandlung sinkt der Anteil vitaler Zellen nach TRAIL-Behandlung signifikant von 86% in Ktr-transfizierten auf 68% in pre-miR-221-Transfizierten Zellen ( $p$ -Wert=0,03). Auch bei DU-145-Zellen bewirkt eine vorangehende Transfektion mit pre-miR-221 eine Verstärkung der TRAIL-Wirkung um ca. 20%. In RWPE-Zellen zeigte sich keine signifikante Reaktion auf die TRAIL-Behandlung. So führte weder die Gabe von TRAIL zu Kontroll-transfizierten Zellen (103%) noch die Gabe von TRAIL nach Transfektion mit pre-miR-221 (98%) zu einer signifikanten Veränderung der Zellvitalität. Daraus lässt sich nicht nur eine additive Wirkung von miR-221-Überexpression und TRAIL-Gabe, sondern auch eine Sensitivierung gegenüber TRAIL durch miR-221-Überexpression in PCa-Zellen ableiten. Diese Modulation zeigt sich in Form einer vergleichbaren Sensitivierung beider verwendeter PCa-Zelllinien gegenüber TRAIL-Gabe durch miR-221-Überexpression.

### 4.2.3 Apoptoseinduktion durch TRAIL in miR-221-überexpremierenden PCa-Zellen

Analog zu den in 4.1 geschilderten Überlegungen stand die Frage im Raum, ob der Rückgang vitaler Zellen auf eine Apoptoseinduktion zurückzuführen war. Deshalb wurde untersucht, welche Auswirkungen TRAIL in miR-221 überexpremierenden PCa auf die Induktion des apoptotischen Signalwegs besitzt. Die gewonnenen Ergebnisse sind in Teil D der Abb. 14 gezeigt. Es lassen sich signifikante Unterschiede bezüglich der in den Zellen ausgelösten Apoptose nachweisen, je nach Behandlung und Zelllinie. PCa-Tumorzellen der PC-3-Linie reagierten mit einer signifikanten Erhöhung der Caspase 3/7-Aktivität auf die Zugabe von TRAIL (beschrieben in 4.1) beziehungsweise einer Transfektion mit pre-miR-221. Die Transfektion mit pre-miR-221 erhöhte die Apoptose in PC-3-Zellen signifikant auf das 1,4-fache des Ausgangswertes ( $p$ -Wert=0,02). Eine gesteigerte Apoptose-Induktion zeigte sich in PC-3-Zellen, die mit pre-miR-221 transfiziert und 24h später mit TRAIL behandelt wurden. Hier stieg die Caspase 3/7-Aktivität auf das Doppelte (Faktor=2.0,  $p$ -Wert=0,005). Bei RWPE-Zellen konnte keine signifikante Zunahme der Apoptose nach TRAIL-Gabe beobachtet werden. (s. 4.1). Die

## Ergebnisse

alleinige Transfektion mit pre-miR-221 erhöhte die gemessene Apoptose um den Faktor 1,2 ( $p$ -Wert=0,01). Eine Zugabe von TRAIL nach vorheriger Transfektion mit pre-miR-221 erhöhte die Apoptose im Vergleich zu lediglich pre-miR-221-transfizierten RWPE-Zellen ohne TRAIL-Behandlung nicht signifikant (Faktor 1,3,  $p$ -Wert=0,15). Der in den MTS-Tests sichtbare Effekt einer miR-221-Überexpression mit gefolgter TRAIL-Behandlung in PCa-Zellen war auch in den Caspase3/7-Messungen nachvollziehbar. Die beobachtete Sensitivierung gegenüber Trail in miR-221 überexprimierenden PCa Ziellinien korrespondiert mit einer erhöhten Apoptose-Induktion

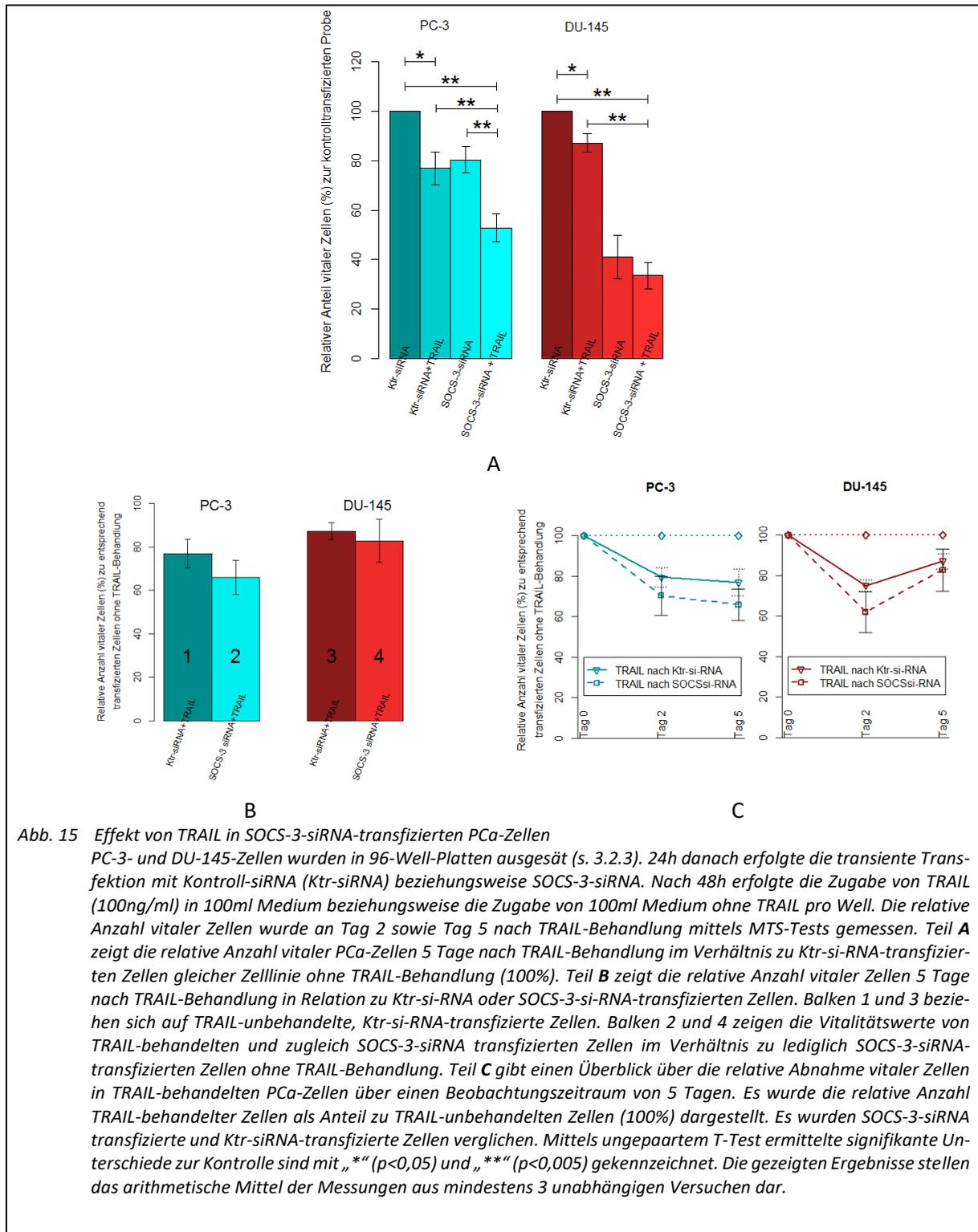
### 4.3 Mechanismen der mir-221 vermittelten Sensitivierung gegenüber TRAIL

Im vorangegangenen Ergebnisteil konnte dargestellt werden, dass miR-221 die Funktion von TRAIL in PCa Zellen verstärkt. In den weiteren Experimenten sollte nun auf funktionaler Ebene untersucht werden, durch welche molekularen Veränderungen eine miR-221 vermittelte Sensitivierung gegenüber dem TRAIL Signalweg verursacht werden könnte. Da miRs eine posttranskriptionelle Inhibierung der Expression von spezifischen Zielgenen vermitteln (s. 1.3.1), konzentrieren sich die nächsten Experimente auf die Definition miR-221 – regulierter Zielgene, die einen Einfluss auf den TRAIL-Signalweg besitzen.

#### 4.3.1 Die miR-221-SOCS3-Achse als mögliche Ursache der miR-221 vermittelten TRAIL-Sensitivierung

Wie erwähnt (s. 1.3.4), wurde SOCS-3 als ein Zielgen der miR-221 beschrieben. Zusätzlich ist ein inhibitorischer Einfluss von SOCS-3 auf den TRAIL-Signalweg bekannt (s.1.3.4, (90)). Aufgrund dieser Vorkenntnisse sollte untersucht werden, ob miR-221 über die Inhibierung von SOCS-3 eine Verstärkung des TRAIL-Signals vermittelt. Um dies zu verifizieren, wurden PC-3 sowie DU-145-Zellen mit SOCS-3-siRNA transfiziert und überprüft, ob eine SOCS-3 Herabregulation eine Modulation der TRAIL-Wirkung auf PCa-Zellen nach sich zieht. In diesem Fall ließe sich indirekt beweisen, dass die gezeigte Modulation des TRAIL-Signals durch miR-221 zumindest teilweise mit einer Regulation von SOCS-3 erklärt werden kann.

## Ergebnisse



Zur Überprüfung der Transfektionseffizienz wurden im Vorfeld PC-3- sowie DU-145-Zellen mit einer bereits etablierten und in Vorarbeiten ausgetesteten SOCS-3-siRNA transient transfiziert. Daraufhin wurde die SOCS-3-Expression mittels qRT-PCR überprüft. Es ergab sich eine signifikante und effektive Herabregulation von SOCS-3 durch transiente Transfektion mit

## Ergebnisse

SOCS-3-siRNA. Diese Daten wurden in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe beschrieben (87) und wurden in nicht gezeigten Versuchen bestätigt.

Abb. 15 zeigt die Modulation der Wachstumsinhibierung durch TRAIL in SOCS-3-herabregulierenden PCa-Zellen. Analog zu den in Abb. 12 dargestellten Ergebnissen bewirkte die alleinige Behandlung von PCa-Zellen mit TRAIL eine Reduktion an vitalen Zellen (Abb. 15A). Bei PC-3-Zellen sank der Anteil vitaler Zellen signifikant auf 76,9% (p-Wert=0,01), bei DU-145-Zellen auf 87,2% (p-Wert=0,04).

Auch eine Herabregulation von SOCS-3 führt in PCa-Zellen zu einem geringeren Anteil vitaler Zellen (Abb. 15A). So fiel die relative Zellvitalität in PC-3-Zellen nach Transfektion mit SOCS-3-siRNA signifikant auf 80,4% (p-Wert < 0,01). In DU-145-Zellen bewirkte die SOCS-3-siRNA-Transfektion einen signifikanten Rückgang vitaler Zellen auf ca. 41% (p-Wert=0,01).

Die stärkste Reduktion an vitalen Zellen trat in SOCS-3 siRNA-transfizierten Zellen auf, die mit TRAIL behandelt wurden. Der Anteil vitaler PC-3-Zellen wurde hier hochsignifikant auf 52,9% reduziert (p-Wert<0,001). Die TRAIL-Behandlung von DU-145-Zellen nach Transfektion mit oben genannter siRNA bewirkte ebenfalls einen hochsignifikanten Rückgang vitaler Zellen auf 33,5% (p-Wert=0,003). Damit zeigte sich in beiden PCa-Zellen ein additiver Effekt von SOCS-3-Herabregulation und anschließender TRAIL-Gabe, analog zu einer Transfektion mit pre-miR-221 und anschließender TRAIL-Behandlung (vgl. Abb. 14).

Abb. 15 B zeigt somit, dass auch durch eine SOCS-3-Herabregulation eine TRAIL-Sensitivierung in PCa-Zellen erreicht werden kann. Analog zu dem in Abb. 14B gezeigten Versuch wurden hier PCa-Zellen mit TRAIL-behandelt und mit entsprechend transfizierten Zellen gleicher Zelllinie abgeglichen. Hierbei dienten entweder TRAIL-unbehandelte Zellen mit vorheriger Transfektion mit Ktr-siRNA (Abb. 15B, Balken 1 und 3) oder vorheriger Transfektion mit SOCS-3-siRNA (Abb. 15B, Balken 2 und 4) als Probe. In PC-3-Zellen zeigte sich ein Abfall vitaler Zellen von 77% auf 66% (p-Wert=0,1) nach TRAIL-Gabe bei direktem Vergleich von Ktr-siRNA-transfizierten mit SOCS-3-siRNA-transfizierten PC-3-Zellen. In DU-145-Zellen ist ähnliches zu beobachten: Im Vergleich zu Ktr-siRNA-transfizierten Zellen sinkt der Anteil vitaler Zellen in SOCS-3-siRNA-transfizierten DU-145-Zellen nach TRAIL-Gabe von 87% auf 83%. Der additive Effekt einer TRAIL-Gabe nach SOCS-3-Herabregulation konnte zumindest für PC-3-Zellen signifikant gezeigt werden. Auch die erwartete Sensitivierung im Sinne einer verstärkten TRAIL-Wirkung in SOCS-3-herabregulierten Zellen im Vergleich zu Ktr-siRNA-transfizierten Zellen konnte in

## Ergebnisse

beiden PCa-Zelllinien beobachtet werden, war allerdings statistisch nicht signifikant. Dennoch untermauert die hier aufgezeigte Bedeutung von SOCS-3 für das TRAIL-Signal die Annahme, dass die Herabregulation von SOCS-3 zu einer Modulation des TRAIL-Signals in miR-221-überexprimierenden PCa-Zellen führt.

### 4.3.2 Induktion einer TRAIL-supportiven Signatur durch miR-221 über Regulation des IFN-Signals

Die bisherigen Ergebnisse lassen vermuten, dass der Einfluss von miR-221 auf die TRAIL-Sensitivität zumindest teilweise durch eine Herabregulation der SOCS-3 Expression vermittelt wird.

Zusätzlich zu einer TRAIL-Inhibierung reguliert SOCS3 den Interferon Signalweg negativ (52, 92, 93). Im Umkehrschluss führt die Inhibierung von SOCS-3 durch miR-221 zu einer Stärkung des JAK-STAT-vermittelten IFN-Signals (s. 1.3.4). Damit führt eine miR-221-Überexpression zu einer Überexpression von STAT-1 (52) und mutmaßlich auch der angeschlossenen, IFN-abhängigen Gene. Einerseits sollte dies in Folge nachgewiesen werden. Gleichzeitig sollten hierbei IFN-abhängige Gene identifiziert werden, die einen Einfluss auf den TRAIL-Signalweg besitzen und gleichzeitig durch miR-221 indirekt reguliert werden könnten. Als Kandidaten für solche Gene wurden in Vorexperimenten XAF-1 sowie TNFSF-10 identifiziert. TNFSF-10 stellt hierbei das Gen für TRAIL selbst dar.

Um die bereits beschriebene Aktivierung des JAK-STAT-Signalwegs durch miR-221 auch im Rahmen dieser Arbeit zu evaluieren, wurde die Expression des IFN-gekoppelten Transkriptionsfaktors STAT-1 mitanalysiert.

## Ergebnisse

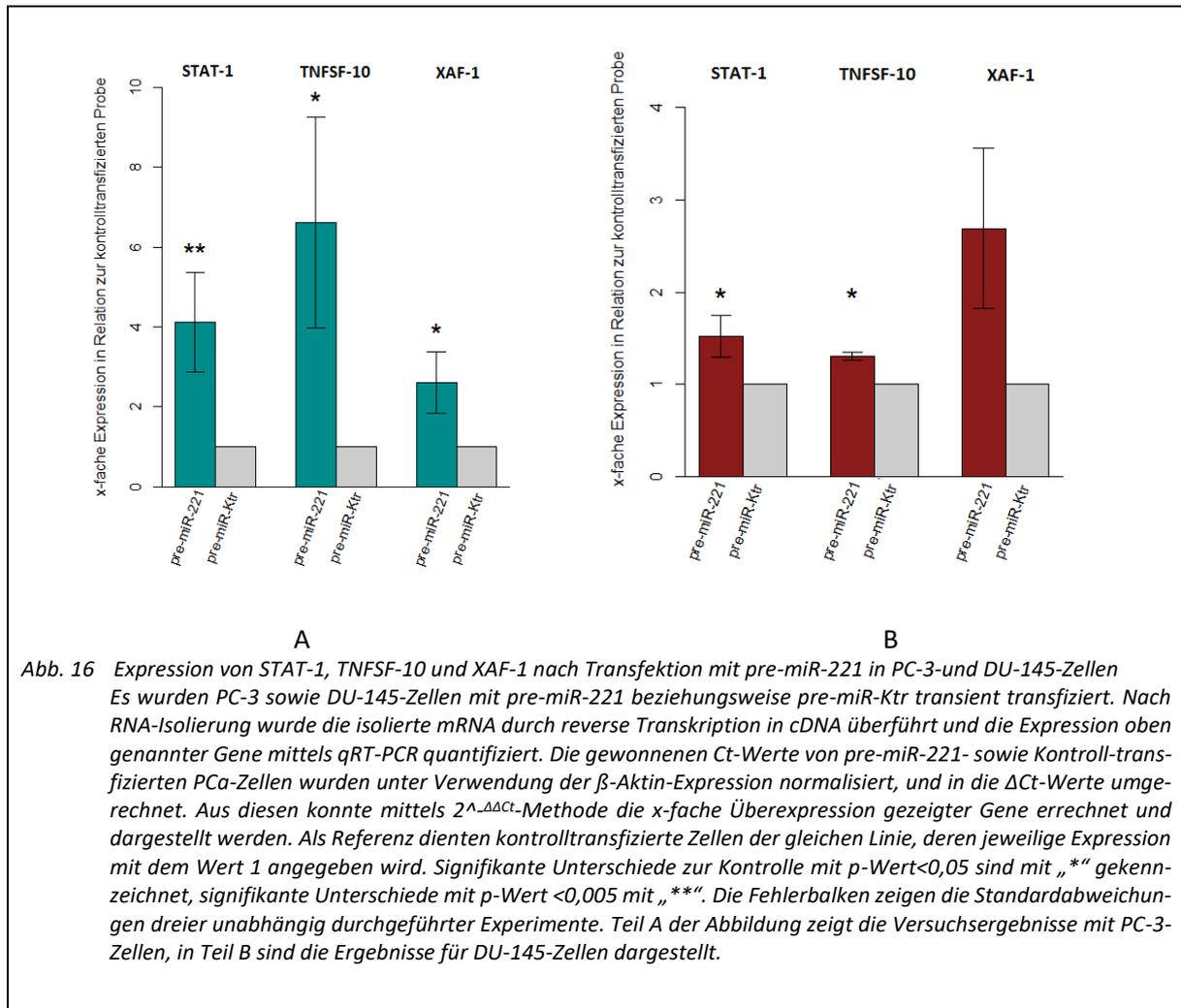


Abb. 16 fasst die Experimente zusammen und zeigt die Expressionsanalyse von STAT-1, TNFSF-10 und XAF-1 in pre-miR-221 überexprimierenden PCa-Zellen.

Sowohl in PC-3 (Abb. 16 A) als auch in DU-145-Zellen (Abb. 16 B) konnte eine miR-221 vermittelte Überexpression aller drei Gene beobachtet werden. Die Überexpression von STAT-1 belief sich in PC-3-Zellen hochsignifikant auf das 4,1-fache (p-Wert=0,0049), in DU-145-Zellen signifikant auf das 1,5-fache (p-Wert 0,03). TNFSF-10 zeigte sich in PC-3-Zellen signifikant auf das 6,6-fache (p-Wert 0,04) und in DU-145-Zellen auf das 1,3-fache (p-Wert 0,02) überexprimiert.

In PC-3-Zellen stieg die Expression von XAF1 signifikant auf das 2,6-fache (p-Wert=0,04), in DU-145-Zellen auf das 2,7-fache im Vergleich zu Kontroll-transfizierten DU-145-Zellen (p-Wert = 0,051). In beiden Zelllinien konnte die miR-221-vermittelte Überexpression von STAT-1, XAF-1 und TRAIL nachgewiesen werden. Durch die Überexpression von STAT-1 in beiden PCa-Zellen

## Ergebnisse

ist die miR-221-vermittelte Interferonaktivierung nachvollziehbar. Das Zusammenspiel aus miR-221-Überexpression und resultierender Herabregulation von SOCS-3 mit folgender Aktivierung des JAK-STAT-Signalwegs und Induktion von XAF-1 und TNFSF-10 liefert eine mögliche Erklärung für die miR-221-vermittelte Sensitivierung gegenüber TRAIL.

### 4.4 PIK3R1 als TRAIL-relevante Zielgene der miR-221

Da miRs in der Regel eine Vielzahl von verschiedenen Zielgenen regulieren können (s. 1.3.1), sollte untersucht werden, ob miR-221 weitere Zielgene mit einer möglichen Wirkung auf den TRAIL-Signalweg reguliert. Daher wurden mit Hilfe von webbasierten Suchprogrammen potentielle miR-221 Zielgene gesucht, die zusätzlich eine potentielle Wirkung auf den TRAIL-Signalweg besitzen könnten.

#### 4.4.1 Identifikation von PIK3R1 als potentielles Zielgen der miR-221

Zur Identifikation möglicher TRAIL-relevanter Zielgene der miR-221 wurde auf die Vorhersage der webbasierten Suchprogramme targetscan.org sowie microRNA.org zurückgegriffen. Diese Webseiten errechnen anhand von komplementären Sequenzen in der 3'UTR einer mRNA und der gesuchten miR die Bindungswahrscheinlichkeit der beiden RNA-Stränge. Je größer die komplementären Bereiche, desto wahrscheinlicher die mögliche Bindung. Aus der Liste vieler möglicher Zielgene der miR-221 konnte mittels Literaturabgleich die PIK3R1 als hypothetisches Zielgen mit Bedeutung für das TRAIL-Signal identifiziert werden. So zeigten verschiedene Studien, dass der PI3K abhängige Signalweg Einfluss auf die TRAIL-Resistenzen besitzen kann (s. 1.2.2). Abb. 17 zeigt die komplementären Sequenzen zwischen miR-221 und der 3'UTR der PI3K-Untereinheit PIK3R1 beginnend ab Base 506 (ab 5'-Ende).

```
3' cuUUGGGU-CGU-CUGUUACAUCGa 5' hsa-miR-221
   ||| | | | ||: |||||
506:5' guAACAAAUGAACGAU-AUGUAGCa 3' PIK3R1
```

Abb. 17 Komplementäre Sequenzen zwischen miR-221 und PIK3R1

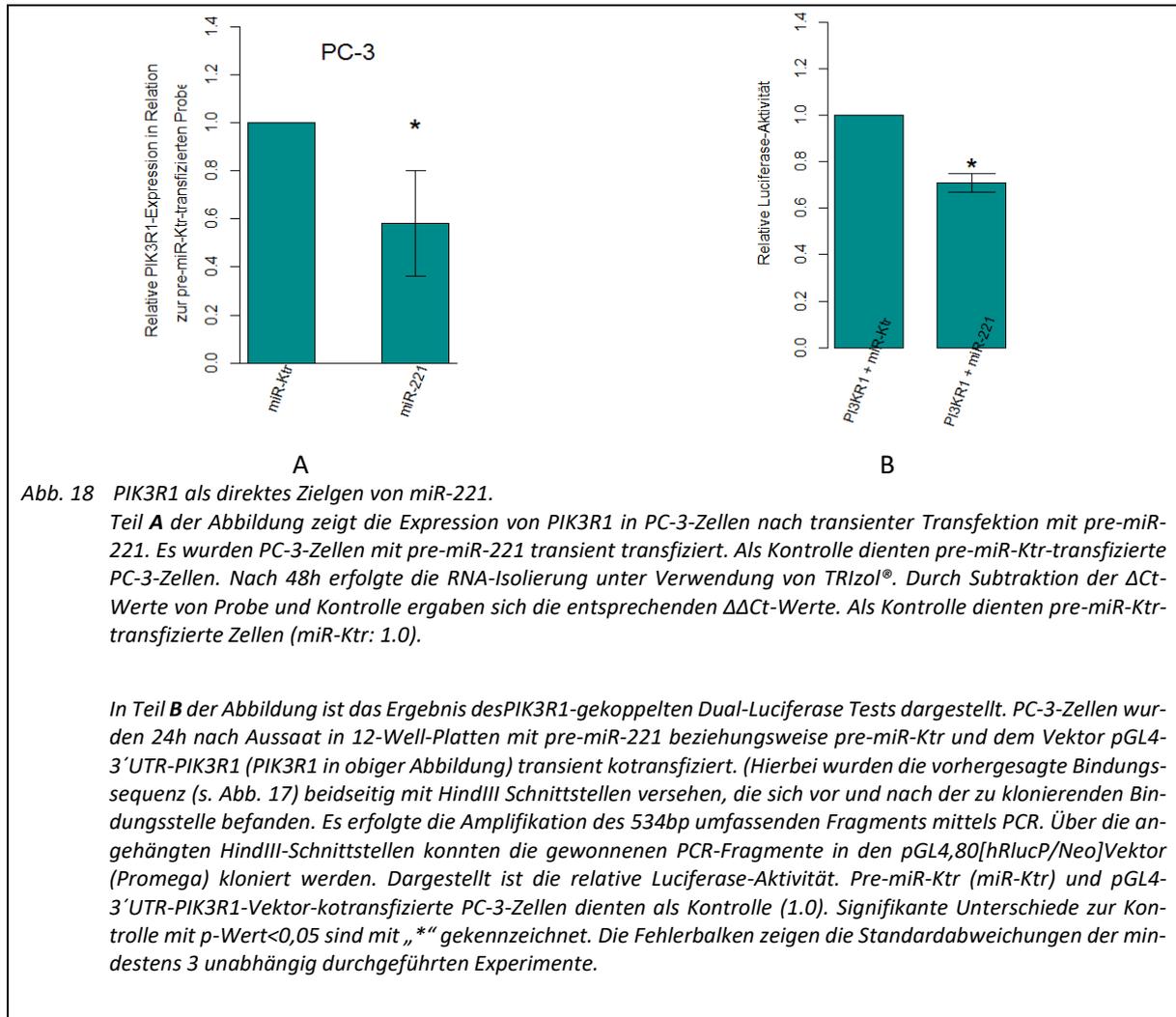
Zu sehen ist die auf microRNA.org prädizierte Bindungsstelle von miR-221 in der 3'untranslatierenden Region (UTR) der PIK3R1 mRNA. Es ist eine Bindungsstelle beginnend ab Base 506 (ab 5'-Ende) der 3'UTR vorhergesagt. Veränderte Abbildung nach microRNA.org:

<http://www.microrna.org/microrna/getMrna.do?gene=5295&utr=6352&organism=9606#>

## Ergebnisse

### 4.4.2 miR-221 reguliert die Expression von PIK3R1 über direkte Bindung

Um die in silico postulierte Vorhersage einer Bindung von miR-221 an die 3'UTR von PIK3R1 nachzuweisen, sollte zuerst die PIK3R1-Expression in miR-221 überexprimierenden PC-3-Zellen untersucht werden.



Hierbei wurde erwartet, dass durch Überexpression der miR-221 die Expression des postulierten Zielgens PIK3R1 inhibiert und somit reduziert wird. Abb. 18A zeigt die mittels qRT-PCR quantifizierte PIK3R1-Expression nach vorangegangener Transfektion mit pre-miR-221. PC-3-Zellen reagierten auf die Transfektion mit pre-miR-221 mit einem signifikanten Abfall der PIK3R1-Expression auf 63,5% (p-Wert = 0,029) in Relation zu Kontroll-transfizierten (miR-Ktr)

## Ergebnisse

Zellen. Somit konnte die Inhibierung der PIK3R1-Expression durch miR-221 in PCa Zellen auf mRNA Ebene bestätigt werden.

Folgend sollte überprüft werden, ob die beobachtete Regulation der PIK3R1 über eine direkte Bindung der miR-221 an die 3'UTR des PIK3R1-Zielgens vermittelt war. Die Bindung der miR-221 an die 3'UTR der PIK3R1 sollte mittels dem unter 3.2.10 beschriebenen „Luciferase Test“ nachgewiesen werden.

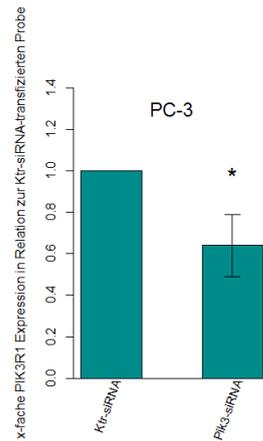
Abb. 18B zeigt die Auswirkung einer miR-221-Transfektion auf das Firefly-Luciferase-Signal in pGL4-3'UTR-PIK3R1-Vektor kotransfizierten PC-3-Zellen (s.3.2.10.4). Der Vektor mit enthaltenem pGL4-Reporter gen kodiert für das Luciferase System mit einer zur Normalisierung dienenden Renilla Luciferase und einer PIK3R1-3'UTR-gekoppelten Firefly-Luciferase. Das so normierte Firefly-Luciferase-Signal konnte damit als Anhalt für die Expression der im Vektor enthaltenen PIK3R1-3'UTR genommen werden. Durch miR-221-Transfektion sank das Luciferase-Signal in pGL4-3'UTR-PIK3R1-Vektor kotransfizierten PC-3-Zellen. Zum Abgleich dienten hierbei miR-Ktr/ pGL4-3'UTR-PIK3R1-Vektor kotransfizierte PC-3-Zellen. In Relation hierzu sank die Luciferase-Aktivität in pre-miR-221-kotransfizierten Zellen auf 58% (p-Wert=0,01). Durch den Abfall des Leuchtsignals konnte gezeigt werden, dass die miR-221 in der Lage ist, an die vorhergesagte Bindungsstelle in der 3'UTR des PIK3R1-Gens zu binden. Damit konnte die direkte Inhibition der Expression von PIK3R1 durch miR-221 verifiziert werden.

### 4.4.3 Wirkung von TRAIL in PIK3R1-unterexprimierenden PCa-Zellen

Im vorangegangenen Abschnitt konnte PIK3R1 als Zielgen von miR-221 nachgewiesen werden. Um einen möglichen Einfluss von PIK3R1 auf die TRAIL-Sensitivität in PCa-Zellen zu überprüfen, wurde PIK3R1 in diesen Zellen siRNA-vermittelt herabreguliert.

Zunächst wurde die Effizienz und Wirkung der PIK3R1 siRNA überprüft. Hierzu wurde mittels qRT-PCR die PIK3R1-Expression nach transients Transfektion mit PIK3R1-siRNA ermittelt.

## Ergebnisse

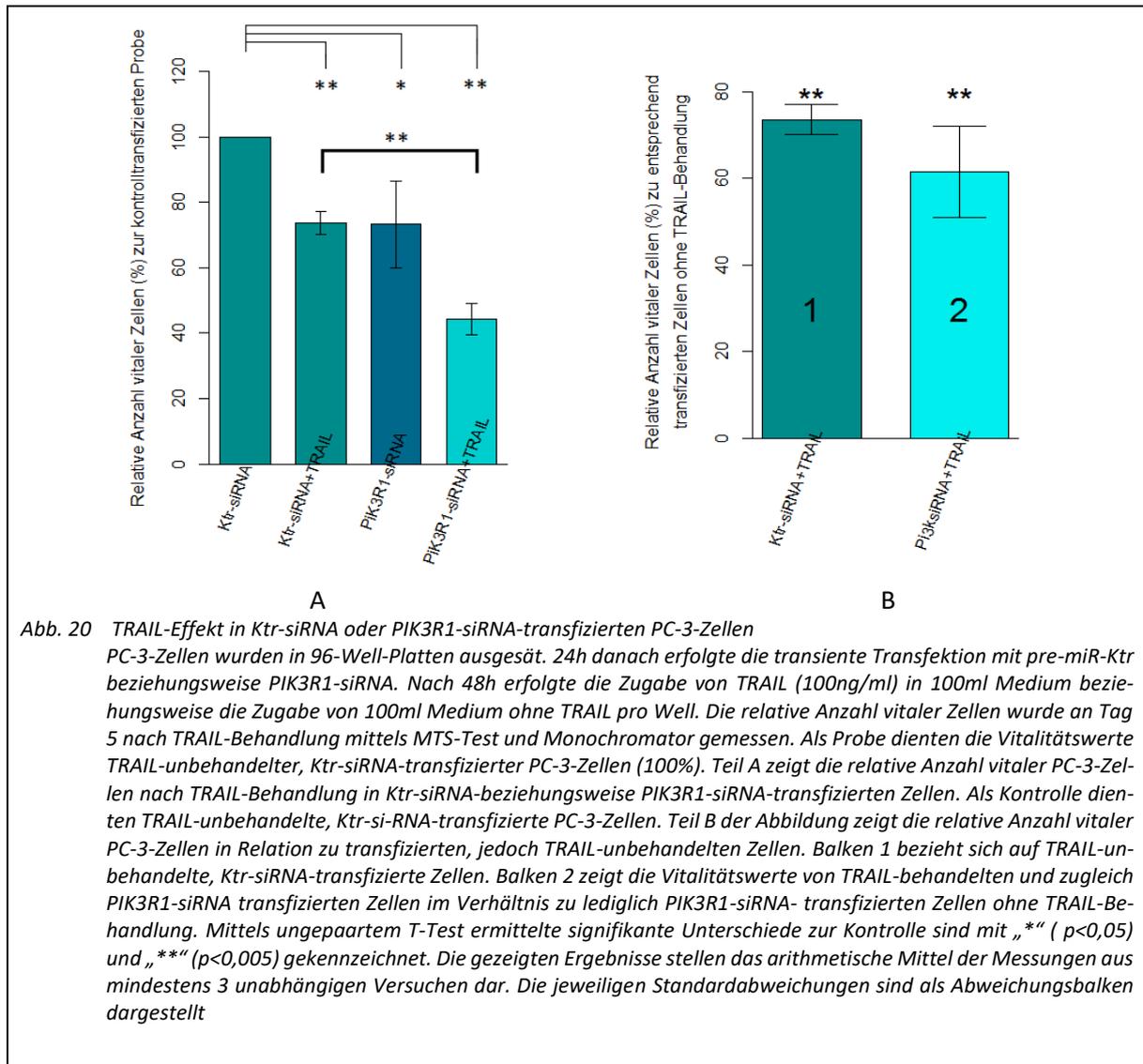


**Abb. 19** Expressionsanalyse von PIK3R1 in PC-3-Zellen nach transienter Transfektion mit PIK3R1-siRNA  
Es wurden PC-3-Zellen mit PIK3R1-siRNA transient transfiziert. Als Kontrolle dienten Ktr-siRNA-transfizierte PC-3-Zellen. Nach 48h erfolgte die RNA-Isolierung unter Verwendung von TRIzol®. In Folge wurde die RNA durch reverse Transkription in cDNA überführt und die Expression von PIK3R1 mittels qRT-PCR quantifiziert. Die mittels qRT-PCR-Analyse gewonnenen Ct-Werte von Proben- sowie Kontrollzellen wurden unter Verwendung der ermittelten  $\beta$ -Aktin-Expression normalisiert, damit ergaben sich die  $\Delta$ Ct-Werte. Durch Subtraktion der  $\Delta$ Ct-Werte von Probe und Kontrolle ergaben sich die entsprechenden  $\Delta\Delta$ Ct-Werte. Aus diesen konnte mittels  $2^{-\Delta\Delta$ Ct-Methode die x-fache Expression von PIK3R1 errechnet und dargestellt werden. Es dienten Ktr-si-RNA-transfizierte Zellen als Abgleich (1.0). Signifikante Unterschiede zur Kontrolle mit  $p$ -Wert  $< 0,05$  sind mit „\*“ gekennzeichnet. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen der 5 unabhängig durchgeführten Experimente

Abb. 19 zeigt die mittels qRT-PCR quantifizierte PIK3R1-Expression nach transienter Transfektion mit PIK3R1-siRNA. PC-3-Zellen reagierten auf die Transfektion mit PIK3R1-siRNA mit einer signifikanten Herabregulation von PI3R1 auf durchschnittlich 65% ( $p$ -Wert = 0,006).

Nun sollte mittels MTS-Tests überprüft werden, ob eine siRNA-vermittelte Inhibierung von PIK3R1 das Zellwachstum und den TRAIL-Signalweg in PCa-Zellen modulieren kann.

## Ergebnisse



Zunächst soll auf Teil A der Abb. 20 eingegangen werden. Die Transfektion von PC-3-Zellen mit PIK3R1-siRNA führte zu einer signifikanten Reduktion an vitalen Zellen auf 73% ( $p$ -Wert=0,02). Damit konnte die vitale Zellmenge durch Herabregulation von PIK3R1 in vergleichbarem Maße verringert werden wie durch TRAIL-Gabe.

Die Behandlung mit TRAIL senkte erwartungsgemäß und vergleichbar zu den in Abb. 12 dargestellten Ergebnissen die relative Proliferation von Ktr-si-RNA-transfizierten PC-3-Zellen hochsignifikant auf 74% ( $p$ -Wert<0,005).

Tatsächlich war auch eine Modulation des TRAIL-Signals durch PIK3R1-Herabregulation nachweisbar. So konnte eine verstärkte Reduktion vitaler Zellen durch eine TRAIL-Gabe nach

## Ergebnisse

vorangegangener Transfektion mit PIK3R1 siRNA erreicht werden. Hierdurch ließ sich der Anteil vitaler Zellen hochsignifikant auf 44,3% senken ( $p$ -Wert $<0,005$ ).

Teil B der Abbildung verdeutlicht die Sensitivierung von PC-3-Zellen gegenüber TRAIL durch eine vorangegangene Transfektion mit PIK3 siRNA. Ktr-siRNA-transfizierte Zellen reagierten auf TRAIL-Gabe in Relation zu entsprechend transfizierten, aber TRAIL-unbehandelten Zellen mit einem hochsignifikanten Rückgang an vitalen Zellen auf 74% (Balken 1,  $p$ -Wert $<0,005$ ). Wurden PIK3R1-siRNA transfizierte Zellen mit TRAIL behandelt, sank der Anteil vitaler Zellen hochsignifikant auf 62% ( $p$ -Wert $<0,005$ ). Damit konnte eine Sensitivierung gegenüber TRAIL in PIK3R1-siRNA transfizierten PC-3-Zellen im Vergleich zu kontrolltransfizierten PC-3-Zellen beobachtet werden.

## 5 Diskussion

### 5.1 miR-221 wirkt antiproliferativ in androgenunabhängig wachsenden PCa-Zellen

Anlass zur vorliegenden Arbeit gab die Annahme, dass es sich bei der miR-221 um einen Tumorsuppressor im PCa handelt und sie in der Lage ist, das TRAIL-Signal zu beeinflussen (siehe 1.3.4).

Die durch Vorarbeiten der Forschungsgruppe bereits begründete Vermutung, dass es sich bei der miR-221 im PCa um einen Tumorsuppressor handelt (52) und nicht wie in anderen Tumorentitäten um ein Onkogen (1.3.3), konnte in miR-221 überexprimierenden PCa-Zellen bestätigt werden. So führte die alleinige Transfektion mit miR-221 zu einer signifikanten Reduktion vitaler Zellen in den androgenunabhängig wachsenden PCa Ziellinien PC-3- und DU-145 (s.4.2.2). Gegensätzlich hierzu führte miR-221 in den Androgen-abhängigen Prostata-Epithelzellen der RWPE-Linie zu einer Hyperproliferation. Eine mögliche Erklärung mit besonderem Hinblick auf die Androgenabhängigkeit dieser Zelllinie wird im Folgenden gegeben.

### 5.2 miR-221 bewirkt Hyperproliferation in Androgen-abhängigen RWPE-Zellen

Die verwendeten RWPE-Zellen reagierten auf miR-221-Transfektion nicht mit einem Vitalitätsabfall, sondern mit einer signifikanten Hyperproliferation.

Eine mögliche Erklärung könnte im androgenabhängigen Wachstum von RWPE Zellen liegen. In Vorarbeiten war es der Forschungsgruppe gelungen, PMEPA-1 (Prostate Transmembrane Protein, Androgen Induced 1) als Zielstruktur der miR-221 zu etablieren. Da zusätzlich bekannt ist, dass PMEPA1 in der Lage ist, das Androgensignal in androgenabhängigen Zellen zu inhibieren (94, 95), wäre es denkbar, dass die miR-221 vermittelte PMEPA1-Herabregulation zu einer Stärkung des androgenabhängigen Wachstumssignales führt. In androgenabhängigen RWPE-Zellen wäre dadurch eine Zunahme vitaler Zellen plausibel. In androgenunabhängigen Zellen hingegen sollte dieser Effekt keinen Einfluss auf die Zellvitalität haben, sodass dort der vitalitätssenkende Effekt der miR-221 nicht durch das androgenabhängige Wachstumssignal überlagert wird. Dieser Zusammenhang könnte eine Erklärung für eine onkogene Wirkung der miR-

221 in Androgen-abhängigen RWPE-Zellen bei gleichzeitig tumorsuppressiver Wirkung in Androgen-unabhängigen PCa-Zellen sein. Diese Vermutung legt wiederum nahe, dass das molekulare Mikromilieu in den verschiedenen PCa Zelllinien die miR-221 Funktionen moduliert.

### 5.3 miR-221 sensitiviert PCa-Zellen gegenüber TRAIL

Zur Untersuchung der vermuteten Wechselwirkung zwischen miR-221 und dem TRAIL-Signal galt es zunächst, die Wirkung von TRAIL auf die verwendeten PCa-Zellen zu verstehen.

So ließ sich die in der Literatur beschriebene Sensitivität von Tumorzellen gegenüber TRAIL (11, 15, 32, 35) im Zellkulturmodell dieser Arbeit abbilden. Die Gabe von TRAIL führte in den untersuchten PCa-Zelllinien zu einer signifikanten Reduktion an vitalen Zellen, nicht aber in RWPE-Zellen (s. Abb. 14A).

Neben der tumorsuppressiven Rolle der miR-221 im PCa konnte auch die Hypothese über den Einfluss der miR-221 auf das TRAIL-Signal bestätigt werden. So wirkte TRAIL in miR-221-überexprimierenden Zellen signifikant stärker als in der kontrolltransfizierten Probe (s. Abb. 14B). Zwar bewirkten sowohl die alleinige TRAIL-Gabe, als auch die alleinige transiente Transfektion mit pre-miR-221 eine Reduktion an vitalen PCa-Zellen, eine bloße Addition zweier voneinander unabhängiger Effekte war aber bei der beobachteten Sensitivierung auszuschließen

Mit diesem Ergebnis kann erstmalig in verschiedenen PCa-Zelllinien eine Sensitivierung des TRAIL-Signals durch miR-221 beschrieben werden. Diese Ergebnisse widersprechen vorangegangenen Veröffentlichungen, welche miR-221 eher in den Zusammenhang mit TRAIL-Resistenzen brachten (82, 83). Dagegen fügt sich eine TRAIL-Sensitivierung durch miR-221 in das durch unsere Forschungsgruppe beschriebene Bild einer tumorsuppressiven miR-221 im PCa.

Bei den Vitalitätsmessungen mittels MTS-Tests bestand die Annahme, dass die reduzierte Vitalität der untersuchten Prostata-Zelllinien auf eine TRAIL-vermittelte Apoptoseinduktion zurückzuführen sei. Die durchgeführten Apoptose-Tests erhärteten diese Annahme. Hierbei zeigten sich sowohl bei alleiniger TRAIL-Gabe (Abb. 12C) als auch bei miR-221 Transfektion mit und ohne folgender TRAIL-Behandlung erhöhte Apoptosewerte (Abb. 14D)

Die additive Wirkung von miR-221-Transfektion und TRAIL-Behandlung war durch den Caspase3/7-Assay zwar nachweisbar, eine Modulation der induzierten Apoptose durch miR-221-Transfektion ließ sich aber nicht signifikant nachweisen (s. Abb. 14D). Eine mögliche

## Diskussion

Erklärung hierfür kann durch das nähere Betrachten der jeweils verwendeten Labormethoden gegeben werden. Im Gegensatz zum MTS-Assay wird nicht etwa die Menge an vitalen Zellen gemessen. Sondern es wird die Aktivität der Caspase 3/7 aktuell in Apoptose befindlicher Zellen erfasst. Somit wird nicht, wie im Falle des MTS-Assays, ein punktueller Ist-Zustand, sondern ein dynamischer Prozess abgebildet. Zellen, welche die Apoptose bereits vollzogen haben, können nicht erfasst werden. Allerdings lässt sich zusammentragen, dass die Apoptoseinduktion in der Zellgruppe am höchsten ist, in der auch die Reduktion an vitalen Zellen am deutlichsten ausfällt. Somit ist davon auszugehen, dass die herabgesetzte Zellvitalität auf eine Apoptoseinduktion zurückzuführen ist. Abb. 21 veranschaulicht diese Argumentation. Die Werte der Reduktion an vitalen Zellen sind neben die Werte der erhöhten Apoptose (entnommen aus Abb. 14) gestellt. So stehen sich bei lediglich kontrolltransfizierten Zellen ohne TRAIL-Behandlung eine auf 1 normierte Apoptoserate und eine Vitalität von 100% gegenüber. TRAIL-Behandlung senkt die Vitalität auf 77%, analog dazu steigt die Apoptose auf das 1,6-Fache. Eine Transfektion mit pre-miR-221 reduziert den Anteil vitaler Zellen auf 82% und erhöht die Apoptose auf das 1,4-Fache. PC-3-Zellen, die zunächst transfiziert und 24h später mit TRAIL behandelt wurden, reagierten mit einem Rückgang an vitalen Zellen auf ca. 50%, passend dazu stieg die Apoptose auf das Doppelte des Ausgangswertes. Abb. 14D ist zu entnehmen, dass auch bei RWPE-Zellen eine leicht erhöhte Apoptose vor allem im Zusammenhang mit der Transfektion mit pre-miR-221 festzustellen ist (nicht in Abb. 21 veranschaulicht). Da miR-221 überexprimierende RWPE Zellen eine Hyperproliferation zeigen, ist eine gleichzeitige Induktion apoptotischer Signale schwer zu verstehen. Möglicher Weise kann dieser paradox erscheinende Effekt durch die Versuchsbedingungen erklärt werden. So wird der Apoptose-Assay in 96-Well-Platten und mit nur einmaliger Gabe von Nährmedium durchgeführt. Eine deutliche Hyperproliferation wie im Falle der RWPE-Zellen führt mutmaßlich zu einer Überwucherung der Plattenböden und einem Nährstoffmangel mit nachfolgend verschlechterten Überlebensbedingungen.

## Diskussion

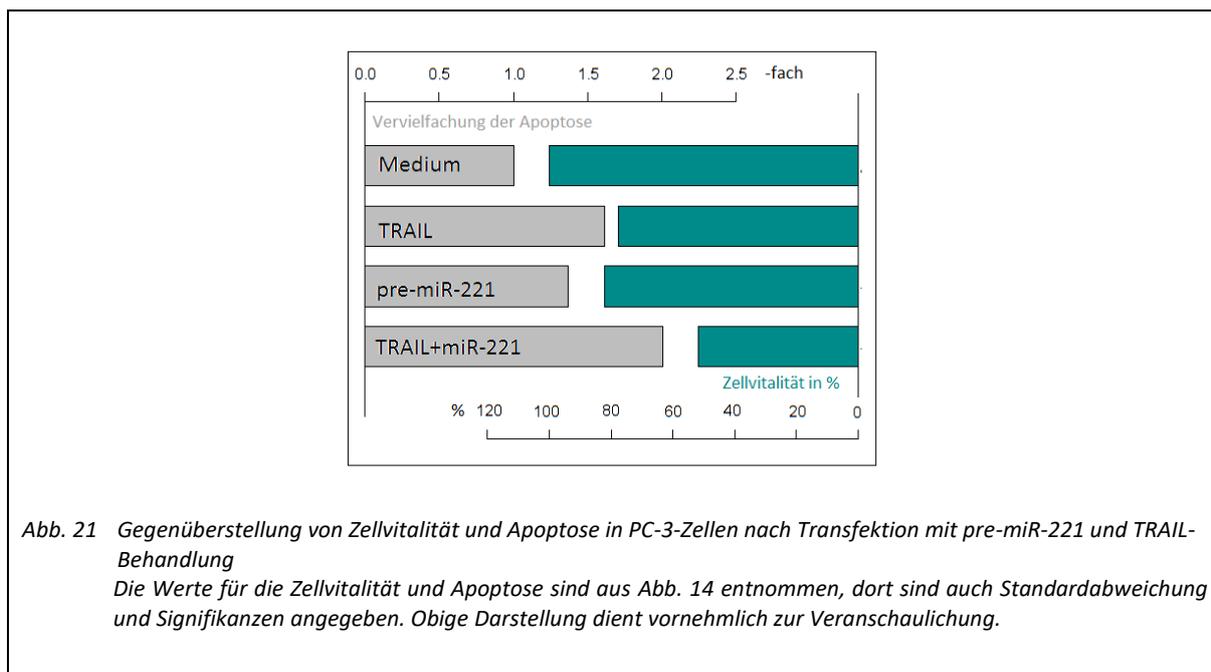


Abb. 21 Gegenüberstellung von Zellvitalität und Apoptose in PC-3-Zellen nach Transfektion mit pre-miR-221 und TRAIL-Behandlung  
Die Werte für die Zellvitalität und Apoptose sind aus Abb. 14 entnommen, dort sind auch Standardabweichung und Signifikanzen angegeben. Obige Darstellung dient vornehmlich zur Veranschaulichung.

Somit konnte in dieser Arbeit eine miR-221 vermittelte Sensitivierung gegen ein aktiviertes TRAIL Signal in PCa Zellen beschrieben werden wodurch die tumorsuppressive Rolle der miR-221 im PCa *in vitro* weiter untermauert werden konnte.

### 5.4 miR-221 als Tumorsuppressor im PCa

Sowohl die bestätigte, antiproliferative Rolle der miR-221 in PC-3- und DU-145-Zellen, als auch die gezeigte Sensitivierung gegenüber dem TRAIL-Signal legen nahe, dass es sich bei der miR-221 tatsächlich um einen Tumorsuppressor im PCa handelt - eine Schlussfolgerung, die vielen vorangegangenen Annahmen widerspricht.

So wurde die miR-221 in anderen Tumorentitäten als resistenzvermittelnder Faktor gegenüber TRAIL identifiziert. Diese Ergebnisse bezogen sich meist auf Neoplasien der Brust, Leber oder Lunge (82, 83). Zusätzlich konnte in zahlreichen Tumoren eine Überexpression der miR-221 festgestellt (96, 97) und in einigen Fällen auch mit einem ungünstigen Krankheitsverlauf assoziiert werden. Im Besonderen für das Mamma-Karzinom (81) sowie für das kolorektale-Karzinom (98) konnte dieser Zusammenhang bestätigt werden. Die beobachtete Rolle bei der Vermittlung von TRAIL-Resistenzen sowie die häufige Überexpression der miR-221 in zahlreichen Tumoren ließ die miR-221 als Onkogen erscheinen. Da zusätzlich und entgegen der Vorergebnisse unserer Forschungsgruppe von anderen Forschungsgruppen über eine Hyperproliferation miR-221-überexprimierender PCa-Zellen berichtet wurde (99, 100), bestand

bisher die Vermutung, dass es sich bei der miR-221 auch im PCa um ein Onkogen handeln müsse (101, 102).

Die Ergebnisse dieser Arbeit sowie die unserer Forschungsgruppe und weiterer unabhängiger Autoren widersprechen diesen Annahmen. Zum einen konnte eine antiproliferative und TRAIL-sensitivierende Rolle der miR-221 im PCa nachgewiesen werden. Der sensitivierende Einfluss auf den eindeutig tumorsuppressiven TRAIL-Signalweg stützt bereits die Rolle der miR-221 als Tumorsuppressor im PCa. Zum anderen wurde mittlerweile das Ergebnis unserer Forschungsgruppe, welches die miR-221 im PCa als herabreguliert darstellten konnte, auch von weiteren Forschungsgruppen bestätigt (84, 103-105). Sowohl die mehrfach gezeigte Herabregulation von miR-221, als auch die inverse Korrelation zwischen miR-221 und Prognose (84) stellen deutliche Argumente für eine tumorsuppressive Rolle der miR-221 dar. Damit kann die Rolle der miR-221 im PCa als Onkogen nicht pauschal gehalten werden - eine Einschätzung die von weiteren Forschungsgruppen geteilt wird (104, 105). Zudem wurde mit dem NSCLC eine weitere Tumorentität beschrieben, in der miR-221 herabreguliert ist und ähnlich wie im PCa eine tumorsuppressive Rolle einnimmt (85, 106). Im Kontext mit den Ergebnissen dieser Arbeit kann festgestellt werden, dass miR-221 in verschiedenen Tumorentitäten unterschiedliche Funktionen ausübt und in Abhängigkeit des jeweiligen Zelltyps tumorsuppressiv wie auch onkogen wirken kann. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass das molekulare Mikro-Milieu der unterschiedlichen Zelltypen ein entscheidender Faktor für die Wirkung von miR-221 darstellt.

### 5.5 Bedeutsamkeit des TRAIL-Signalwegs in der Tumorthherapie

Die miR-221 erweist sich nicht nur als Tumorsuppressor im PCa, sondern im Gegensatz zu den geschilderten Vormeinungen auch als sensitivierend gegenüber dem TRAIL-Signalweg. Somit besteht die Verbindung von miR-221 zu einem Signalweg, der große Hoffnung auf therapeutische Möglichkeiten in der Krebstherapie geweckt hat.

Tatsächlich erfolgt in präklinischen und klinischen Studien die Erprobung einiger Substanzen, die den tumorspezifischen Wirkmechanismus von TRAIL nutzen. Bei diesen Substanzen können monoklonalen Antikörper (mAb) oder rekombinantes, humanes TRAIL (rh-TRAIL) (107, 108) unterschieden werden. Trotz zunächst vielversprechender Ergebnisse in vorklinischen Modellen konnte in klinischen Studien bisher kein relevanter Therapieerfolg erzielt werden

(109). Dieses scheinbare Versagen TRAILs als Therapeutikum wurde einerseits vor allem mit einer unzureichenden intrinsischen Aktivität der Substanzen am TRAIL-Rezeptor selbst, andererseits mit der ausgeprägten Resistenzentwicklung von Tumorzellen gegenüber TRAIL (s.1.2.3) begründet. Um diesen Problemen zu entgehen, versucht man nun, entweder die beiden TRAIL-wirksamen Substanzklassen der mAbs und des rh-TRAIL zu kombinieren (110) oder eine TRAIL-Re-Sensitivierung von Tumorzellen herbeizuführen. Um letzteres zu erreichen, greift man auf die Kombination einer TRAIL-basierten Therapie mit einem weiteren Tumortheraeutikum zurück (111). Unter einer Vielzahl an möglichen kombinatorischen Therapie-Ansätzen scheint sich vor allem eine Kombination aus TRAIL und dem Proteasomen-Inhibitor Bortezomib als vielversprechend zu erweisen (112, 113).

Der bisherige Misserfolg einer TRAIL-Monotherapie wurde insbesondere auf die TRAIL-Resistenzen von Tumorzellen zurückgeführt. Zusätzlich mangelt es an prädiktiven Biomarkern, die ein Ansprechen eines Tumors auf eine TRAIL-basierte Therapie vorhersagen können. (114) Die vorgelegten in vitro Daten zeigen, dass die Expression von miR-221 einen Effekt auf die Sensitivität gegenüber einer Trail Behandlung besitzt. Die miR-221 könnte helfen, TRAIL-resistente Tumorzellen im Vorhinein zu identifizieren und einen prädiktiven Marker darstellen. Vielleicht wäre damit eine prädiktive Selektion von Kandidaten für eine TRAIL-Therapie möglich, indem für den individuellen Patienten der miR-221-Status des Tumors aus histologischen Proben bestimmt wird.

### 5.6 Molekulare Mechanismen der TRAIL-Sensitivierung von PCa-Zellen

Vorangehend konnten zwei Effekte der miR-221 auf androgenunabhängige PCa-Zellen beschrieben werden: miR-221 wirkte antiproliferativ und führte zu einer TRAIL-Sensitivierung. Diese Ergebnisse leiten zu der Frage, ob und wenn ja, welche molekulare Verbindung zwischen der miR-221 und dem TRAIL-Signalweg besteht.

#### 5.6.1 Einfluss einer miR-221-vermittelten SOCS-3-Inhibition auf das TRAIL-Signal

Da miRs zur Inhibition multipler Zielgene fähig sind, richtete sich die Aufmerksamkeit zunächst auf bekannte Zielgene der miR-221 mit Einfluss auf das TRAIL-Signal.

## Diskussion

Hierbei zeigte sich SOCS-3 als vielversprechendes Zielgen der miR-221, um eine molekulare Verbindung zum TRAIL-Signal zu erklären. Dass es sich bei SOCS-3 um ein Zielgen der miR-221 handelt, wurde bereits von unserer sowie von weiteren Forschungsgruppen beschrieben (86, 87). Da SOCS-3 eine inhibitorische Wirkung auf das TRAIL-Signal (90) sowie auf das Interferon-Signal zugesprochen (92, 93) wird, könnte eine miR-221 vermittelte Inhibition von SOCS-3 indirekt zu einer TRAIL-Sensitivierung führen (s.1.3.4).

Somit bestand mit dem Zielgen SOCS-3 eine mögliche molekulare Verbindung zwischen miR-221 und dem TRAIL-Signal.

Um zu bestätigen, dass die beobachtete TRAIL-Sensitivierung durch miR-221-Überexpression zumindest anteilig auf eine Inhibition von SOCS-3 zurückzuführen war, sollte eine TRAIL-Sensitivierung durch siRNA-vermittelte SOCS-3 Inhibition nachgewiesen werden.

Die Inhibition von SOCS-3 führte zu einem Rückgang an vitalen PC-3 und DU-145-Zellen (s. Abb. 15). Unter Aktivierung des TRAIL Signals führte die SOCS-3-Inhibition mittels siRNA, wie schon die vorherbeschriebene Transfektion mit pre-miR-221, zu einer additiven Reduktion der Zellvitalität. Daneben war auch die vermutete Modulation des TRAIL-Signals in SOCS-3-siRNA-transfizierten Zellen nachweisbar. So wirkten TRAIL und eine Transfektion mit SOCS-3-siRNA nicht nur nebeneinander, sondern TRAIL wirkte in SOCS-3-siRNA-transfizierten PCa-Zellen effizienter als in kontrolltransfizierten Zellen. Die Ergebnisse untermauern die Annahme, dass in PCa Zellen die beobachtete Sensitivierung gegenüber TRAIL durch miR-221-Überexpression – zumindest teilweise - durch eine Inhibierung von SOCS-3 vermittelt wird.

Hierbei waren zwei Mechanismen als Erklärung denkbar: Zum einen inhibiert SOCS-3 das TRAIL-Signal direkt durch die Bindung an den TRAIL-Rezeptor DR-4, zum anderen bewirkt es eine indirekte Inhibition durch die Schwächung des Interferon-Signals (90). Bei Reduktion dieser hemmenden Wirkung lässt sich in beiden Fällen eine Zunahme des TRAIL-Signals erklären.

Dass die beschriebene TRAIL-Sensitivierung über die SOCS-3-Inhibition auch in vivo relevant ist, legen die bereits erwähnten Vorergebnisse der Forschungsgruppe nahe. So konnte nicht nur die miR-221 als prognostisch günstiger Faktor identifiziert werden, sondern auch eine inverse Korrelation zwischen miR-221-Herabregulation und SOCS-3-Heraufregulation im high-risk-PCa beschrieben werden (52). Ein prognostisch günstiger, höherer Spiegel an miR-221 korrelierte hierbei mit einem erniedrigten Spiegel an SOCS-3. Möglicherweise ist oben

beschriebene Sensitivierung des TRAIL-Signals durch miR-221-abhängige SOCS-3-Inhibition für den Zusammenhang aus hohem Spiegel der miR-221, erniedrigtem Spiegel von SOCS-3 und einer günstigeren Prognose mit begründend.

### 5.6.2 Beeinflussung des TRAIL-Signals durch miR-221-vermittelte IFN-Aktivierung

Eine Inhibition von SOCS-3 führte zu einer TRAIL-Sensitivierung. Damit zeigte sich SOCS-3 als relevantes Zielgen der miR-221 im Hinblick auf eine TRAIL-Sensitivierung in PCa-Zellen.

Zusätzlich wird über die miR-221-vermittelte SOCS-3-Inhibition eine Interferonaktivierung erklärt (s. 1.3.4). Da das IFN-Signal über verschiedene Signal-Transmitter weitergeleitet und moduliert wird, sollten solche im Hinblick auf einen möglichen Einfluss auf das TRAIL-Signal betrachtet werden. So wäre ein indirekter Einfluss der miR-221 auf das TRAIL-Signal über die Signalschleife aus SOCS-3-Inhibition mit konsekutiver IFN-Aktivierung und infolge Aktivierung weiterer Transmitter des INF Signalwegs möglich. Als solche TRAIL-relevante Mediatoren, die durch das INF Signal induziert werden, konnten v.a. die Faktoren XAF-1 sowie das TRAIL-Gen TNFSF-10 (s.1.3.4) identifiziert werden.

Die Aktivierung des IFN-Signals wurde mittels der bereits bekannten Heraufregulation von STAT-1 durch miR-221 Überexpression nachgewiesen (s. 4.3.2). Auch die Heraufregulation von XAF-1 und TNFSF-10 konnte in miR-221 überexprimierenden PCa-Zelllinien gezeigt werden und kann eine weitere Erklärung für die beobachtete Modulation des TRAIL-Signals liefern.

Besonders XAF-1 ist hierbei als TRAIL-Mediator interessant. So ist bekannt, dass XAF-1-Aktivierung über den IFN-Signalweg die TRAIL-induzierte Apoptose verstärken kann (88). Dies kann damit erklärt werden, dass XAF-1 in der Lage ist, das antiapoptotische Protein XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein) zu antagonisieren (115, 116). Ferner ist bekannt, dass XIAP als Protein aus der Familie der IAPs (Inhibitor of apoptosis proteins) das Ausmaß der TRAIL-vermittelten Apoptose in Tumorzellen maßgeblich verringern kann (117). Damit wird mit Heraufregulation von XAF-1 ein relevantes Bindeglied zwischen miR-221-Überexpression und erhöhter TRAIL-Sensitivität in PCa-Zellen beschrieben.

Auch in anderen Tumorentitäten ist die Möglichkeit einer TRAIL-Entriegelung über XIAP-Antagonismus bekannt. So wird von einer Sensitivierung von Melanom- beziehungsweise

Pankreaskarzinomzellen gegenüber TRAIL durch eine Antagonisierung von XIAP (118, 119) berichtet. Aus diesem Grund wird auch dem Wert von XAF-1-Inhibitoren für zukünftige Tumor-Therapien eine immer größere Bedeutung beigemessen (120). Und tatsächlich befinden sich bereits mehrere IAP-Inhibitoren im Rahmen von Phase I- beziehungsweise Phase II-Studien in der klinischen Erprobung (121).

Die miR-221-vermittelte Überexpression von XAF-1 liefert eine plausible Erklärung für eine TRAIL-supportive Signatur in miR-221-überexprimierenden PCa-Zellen. Neben dieser Entriegelung des TRAIL-Signals zeigte sich auch TRAIL selbst verstärkt exprimiert. Dies war an der Überexpression seines Genes TNFSF-10 sichtbar. Das war insofern zu erwarten, als dass TNFSF-10 als IFN-stimuliertes Gen (ISG) bekannt ist (88, 89). Somit erhöht die miR-221-Überexpression durch Verstärkung des IFN-Signalwegs den Spiegel an endogenem TRAIL, gleichzeitig bewirkt sie durch Heraufregulation von XAF-1 eine Sensitivierung für die TRAIL-induzierte Apoptose.

Diese Ergebnisse bieten eine mögliche Erklärung, wie durch miR-221 eine TRAIL-supportive Signatur generiert wird: Die Aktivierung des IFN-Signals bedingt eine Heraufregulation von XAF-1 sowie TNFSF-10. XAF-1 führt zu einer Inhibierung von XIAP, was wiederum eine Entriegelung der Apoptosekaskade bewirkt. Nebenbei führt die Überexpression von TNFSF-10 zu einer zusätzlichen Apoptoseinduktion nach Aktivierung des TRAIL Signals.

### 5.6.3 PIK3R1 als TRAIL-relevantes Zielgen der miR-221

Bei der Suche nach noch nicht untersuchten miR-221-Zielgenen rückte ein weiteres, für das TRAIL-Signal relevantes Gen in den Fokus. Aufgrund der Vorhersage durch [targets.org](http://targets.org) konnte die durch das PIK3R1-Gen kodierte p85-Untereinheit der PI3-Kinase (PI3K) als mögliches Zielgen mit einer potentiellen Bindungsstelle für miR-221 ermittelt werden (4.4.1).

Eine Relevanz der PIK3R1 für das TRAIL-Signal wurde vermutet, da Aberrationen im PIK3R1-Gen (122) sowie dem PI3K-Signalweg (123, 124) eine onkogene Rolle im PCa und vielen anderen Tumoren zugesprochen werden. Diese onkogene Funktion spiegelt sich auch in der Beobachtung wieder, dass der PI3K/Akt-Signalweg mit einer TRAIL-Resistenz im PCa wie auch in anderen Tumoren in Verbindung gebracht werden kann (125). Vor allem die Akt-vermittelte Inhibierung von BID mit folgendem Wegfall der Hemmung von Bcl-2 wird hierfür verantwortlich gemacht (51). Durch die Überaktivität von Bcl-2 kommt es zur Hemmung der Bax-

## Diskussion

vermittelten Apoptose (s. Modell in Abb. 22). Im Umkehrschluss dazu kann durch PI3K/Akt-Inhibierung die TRAIL-vermittelte Apoptose sensitiviert werden (126-128). Somit wurde die Arbeitshypothese entwickelt, dass eine miR-221-vermittelte Inhibierung der PIK3R1-Expression zur Modulation des TRAIL-Signals beitragen könnte.

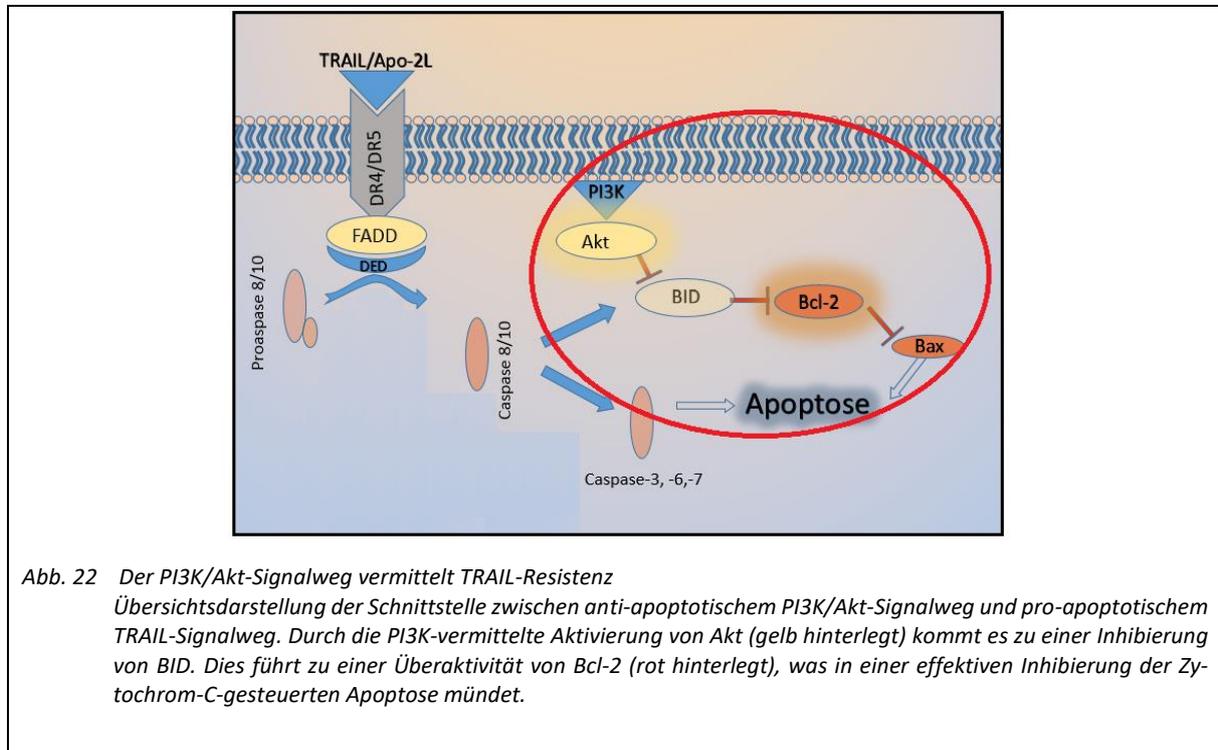


Abb. 22 Der PI3K/Akt-Signalweg vermittelt TRAIL-Resistenz

Übersichtsdarstellung der Schnittstelle zwischen anti-apoptotischem PI3K/Akt-Signalweg und pro-apoptotischem TRAIL-Signalweg. Durch die PI3K-vermittelte Aktivierung von Akt (gelb hinterlegt) kommt es zu einer Inhibierung von BID. Dies führt zu einer Überaktivität von Bcl-2 (rot hinterlegt), was in einer effektiven Inhibierung der Zytochrom-C-gesteuerten Apoptose mündet.

Um PIK3R1 als Zielgen der miR-221 zu evaluieren, wurden Luciferase-Reporter-Assays durchgeführt, welche PIK3R1 als direktes miR-221 Zielgen in PCa-Zellen bestätigten. Expressionsanalysen von PIK3R1 in miR-221-überexprimierenden PC-3-Zellen zeigten eine signifikante Herabregulation der PI3K-Untereinheit (s. Abb. 18). Dadurch konnte erstmals gezeigt werden, dass die miR-221 tatsächlich in der Lage ist, an die 3' UTR der PIK3R1 mRNA zu binden und die Translation zu hemmen. Ob in der Folge eine verringerte Proteinsynthese der PIK3R1 in miR-221-überexprimierenden Zellen stattfindet, ist wahrscheinlich, muss aber noch auf Proteinebene mittels Western Blot in weiterführenden Experimenten verifiziert werden.

### 5.6.4 Die onkogene Teilfunktion von PIK3R1 im PCa

Als neues Zielgen der miR-221 konnte PIK3R1 nachgewiesen werden. Nun galt es, die bisher vermutete onkogene Teilfunktion der PIK3R1 im PCa zu begründen. Diese onkogene Teilfunktion war bereits gefordert worden, zum einen aufgrund der häufig als onkogen beschriebenen

## Diskussion

Funktion des PI3K/Akt-Signalweges, zum anderen aufgrund der beobachteten Sensitivierung von Colon-Karzinomzellen gegenüber TRAIL nach PIK3R1-Inhibierung (129). Tatsächlich ließ sich durch eine Inhibierung von PIK3R1 mittels siRNA ein signifikanter Abfall der Vitalität in PC-3-Zellen nachweisen (Abb. 20A), was die vermutete onkogene Teilfunktion der PIK3R1 in unserem PCa Zell-Modell bestätigte.

Allerdings stehen dieser Annahme einige Studien mit kontroversen Ergebnissen gegenüber, die im Folgenden diskutiert werden sollen. So zeigte sich PIK3R1 in Genexpressionsanalysen (130) bisher im kastrations-Resistenten-PCa und PCa-Metastasen herabreguliert (131, 132), was- im Widerspruch zu unseren Ergebnissen- eher eine tumorsuppressive Rolle von PIK3R1 im PCa vermuten lässt. Die Rolle der PIK3R1 erscheint jedoch nicht nur im PCa und im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit kontrovers.

Das Gen PIK3R1 kodiert für die Untereinheit p85 der PI3K. Die p85-Untereinheit bildet hierbei nicht den katalytisch aktiven Teil der PI3K, sondern hat eine regulatorische Funktion inne (133-135). Die Kinaseaktivität der PI3K wird hierbei durch eine zweite Untereinheit, p110, vermittelt.

Die Funktion der PIK3R1 als regulatorische Untereinheit wird mit einer Stabilisierung und gleichzeitigen Inhibierung der Kinaseaktivität der katalytischen p110-Untereinheit beschrieben (133-135). Damit hält sie die PI3K in einem stabilen, aber inaktiven Zustand. Diese bekannte PI3K-Inhibition durch PIK3R1 lässt ebenfalls die Annahme zu, dass es sich bei der PIK3R1-Untereinheit um einen Tumorsuppressor handelt. Eine tumorsuppressive Funktion von PIK3R1 als regulatorische Untereinheit der PI3K würde aber kontrovers zu der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen tumorsuppressiven Rolle von miR-221 sowie der beobachteten Wachstumsinhibierung von PCa-Zellen nach PIK3R1-Inhibierung stehen. Eine mögliche Erklärung dieses kontroversen Aspekts ist in folgenden Untersuchungen zu finden.

In verschiedenen Studien wird von aberranten Mutationen der beiden Untereinheiten PIK3R1 und p110 in soliden Tumoren berichtet (136, 137). Hierbei bewirken Mutationen der p110- oder PIK3R1-Untereinheit, dass die stabilisierende Eigenschaft von PIK3R1 bestehen bleibt, die Inhibition der Kinaseaktivität jedoch ausbleibt (138-141). Damit nimmt die PIK3R1 statt einer tumorsuppressiven eine eher onkogene Rolle ein.

## Diskussion

Tatsächlich konnte diese onkogene Teilfunktion in mehreren soliden Tumoren nachgewiesen werden. So wird dies für das Ovarial- und Colon-Ca (142) aber auch für das NSCLC berichtet. Eine klinische Relevanz einer microRNA-vermittelten Inhibition von PIK3R1 konnten Yang und Kollegen zeigen. Deren Versuche ergaben, dass sich über miR-503-vermittelte Inhibierung der PIK3R1 die Tumorprogression von Zellen des NSCLC senken ließ (143). Und auch an Tumorzellen des Glioblastoma Multiforme ließ sich eine Reduktion von Proliferation, Migration und Invasivität nach PIK3R1-Inhibierung erreichen (144). Im Falle des Hepatozellulären Karzinoms (HCC) lassen sich zusätzlich einige Analogien zu den beschriebenen Verhältnissen im PCa erkennen. Wie auch im PCa erscheint im HCC mit der miR-486 häufig eine miR herabreguliert, die die PIK3R1 als Zielgen hat. Wie in der vorliegenden Arbeit ließ sich auch in Tumorzelllinien des HCC eine Reduktion an vitalen Tumorzellen nach PIK3R1-Inhibierung erreichen(145). PIK3R1 scheint in verschiedenen Tumorentitäten eine onkogene Rolle einzunehmen. Letztendlich konnte auch im PCa eine PIK3R1-Hyperexpression mit einem aggressiven Krankheitsverlauf in Verbindung gebracht werden (122). Es bleiben Argumente sowohl für eine onkogene als auch für eine tumorsuppressive Rolle der PIK3R1 bestehen. Im Rahmen dieser Arbeit ließ sich durch die Wachstumsinhibierung von PCa-Zellen nach PIK3R1-Inhibierung jedoch eine onkogene Teilfunktion zeigen.

Um weitere Klarheit in Bezug auf die Rolle der miR-221 vermittelten PIK3R1 Regulation im PCa zu erhalten, sollte in weiterführenden Versuchen eine mögliche inverse Korrelation der miR-221 und PIK3R1 untersucht werden.

Durch miR-221-vermittelte Inhibition von PIK3R1 ist im Rahmen dieser Arbeit von einer Schwächung des PI3K-Akt-Signales auszugehen. Infolgedessen wird durch das somit verringerte, Akt-gekoppelte Wachstumssignal eine Reduktion von vitalen PCa-Zellen verständlich. Es bestand aber die Vermutung, dass die miR-221-vermittelte Inhibition von PIK3R1 über oben geschilderten Mechanismus nicht nur zu einem Rückgang an vitalen Zellen, sondern auch zu einer TRAIL-Sensitivierung führte. Das begründete sich darin, dass der PI3K-Signalweg mehrfach als eine Ursache für TRAIL-Resistenzen beschrieben wurde (146, 147), (s.1.2.3).

Tatsächlich zeigte sich ein additiver Effekt bei PIK3R1-Inhibition und folgender TRAIL-Gabe. Darüber hinaus war eine TRAIL-Sensitivierung in PIK3R1-siRNA-transfizierten PC-3-Zellen nachweisbar (s. Abb. 20). Somit konnte erstmals eine Modulation des TRAIL-Signals in PCa-Zellen durch PIK3R1-Inhibition nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass miR-221 in

PCa Zellen die Sensitivität gegenüber TRAIL sowohl durch die Regulation von SOCS3 wie auch von PIK3R1 beeinflussen kann.

Der Effekt, dass eine onkogen wirkende PIK3R1 Einfluss auf das TRAIL-Signal nimmt, scheint nicht auf das PCa begrenzt zu sein. So konnte eine andere Forschungsgruppe zeigen, dass auch im kolorektalen Karzinom eine TRAIL-Sensitivierung durch PI3K-Inhibition möglich ist (129).

Zusammenfassend bestätigen diese Ergebnisse einerseits die onkogene Teilfunktion der PIK3R1 in den untersuchten PCa-Zellen, andererseits wird eine weitere tumorsuppressive Funktion der miR-221 im PCa sichtbar.

Mit dem in dieser Arbeit beschriebenen Einfluss der miR-221 auf den PI3K-Akt-Signalweg beeinflusst die miR-221 ein zentrales, zelluläres Schaltelement - nicht nur im Hinblick auf Zellüberleben und Tumorprogression. Somit könnte der inhibitorische Einfluss der miR-221 auf die PIK3R1 eine breite Wirkung auch auf eine Vielzahl von anderen Signalwegen nach sich ziehen. Die abschließende Rolle der PIK3R1 wird mit weiterem erheblichen Forschungsaufwand zu klären sein. Dieser kann aber gerechtfertigt sein, da eine Verknüpfung des PIK3/AKT Signalwegs mit dem TRAIL-Signalweg die Hoffnung auf eine klinische Relevanz beinhaltet. So wäre z.B. ausgehend von den präsentierten Ergebnissen eine Kombination aus TRAIL und einem PI3K-Inhibitor als potentielle Therapieoption für das PCa denkbar.

### 5.7 Ausblick

Mit seiner Spezifität gegenüber Tumorzellen bei gleichzeitiger Unempfindlichkeit gesunder Zellen ist TRAIL eine vielversprechende Substanz für die moderne Krebstherapie. Allerdings erschweren die zahlreichen Resistenzmechanismen die klinische Anwendung erheblich (109). Trotzdem ruhen große Hoffnungen auf der Entwicklung TRAIL-basierter Therapeutika. So besteht die Hoffnung, durch eine sogenannte „Double Hit-Therapie“ eine Resensitivierung TRAIL-resistenter Tumorzellen erreichen zu können. Hierbei soll über ein Zweittherapeutikum die TRAIL-Sensitivität der Tumorzellen erhöht werden.

Allerdings bedingt die große Heterogenität der TRAIL-Empfindlichkeit von Tumorzellen auch eine große Bandbreite an zu erwartendem Ansprechen auf eine TRAIL-basierte Therapie. Bisher ist es kaum möglich, dieses Therapieansprechen im Vorhinein abzuschätzen (114). Es werden daher zunehmend prädiktive Biomarker gefordert, die eine Einschätzung ermöglichen,

welche Patienten besonders von einer Kombinationstherapie aus TRAIL und zusätzlichem Therapeutikum profitieren könnten - beziehungsweise nicht darauf ansprechen (111). Mit einem solchen Biomarker wäre ein weiterer Schritt Richtung personalisierte Medizin getan.

Neben der prognostischen Vorhersagekraft der miR-221 im Hochrisikokarzinom der Prostata geben die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit erste Hinweise darauf, dass miR-221 auch als prädiktiver Marker für eine TRAIL-Therapie im PCa eine Möglichkeit darstellt.

So konnte in vorliegender Arbeit durch Überexpression der miR-221 eine Sensitivierung von PCa-Zellen gegenüber TRAIL nachgewiesen werden. Im Umkehrschluss ist denkbar, dass die Herabregulation der miR-221 in den meisten PCas die Therapierbarkeit mit TRAIL negativ beeinflusst und obsolet werden lässt. Es ließe sich aber auch gegensätzlich argumentieren, dass in genau solchen Fällen der Versuch einer TRAIL-Resensitivierung notwendig bzw. vielversprechend wäre.

Eine solche Resensitivierung TRAIL-resistenter Tumorzellen kann durch eine Kombinationstherapie aus TRAIL und einem sensitivierendem Kotherapeutikum erreicht werden. Die im Rahmen der Arbeit erzielten Ergebnisse geben Hinweise, wie ein solches Kotherapeutikum wirken könnte. Hierbei scheint insbesondere der gezielte Angriff an resistenzvermittelnden Faktoren eine Möglichkeit darzustellen. Im Zuge dieser Arbeit konnten der XIAP-Inhibitor XAF-1 und die PI3K als potentielle Angriffspunkte identifiziert werden. Sowohl XIAP-Inhibitoren als auch PI3K-Inhibitoren befinden sich bereits in der Untersuchung auf ihre therapeutische Anwendbarkeit (121, 148). Tatsächlich zeigte sich die Kombination von IAP-Inhibitoren und TRAIL als vielversprechende Kombination zur Wachstumsinhibition von Karzinomzellen(149-151). Auch die Inhibition des PI3K/Akt-Signalwegs scheint hoffnungsvoll. So konnte in LNCaP- aber auch in Pankreas-Karzinomzellen durch PI3K-Inhibition eine TRAIL-Resensitivierung erreicht werden (126). Die vorliegenden Daten lassen vermuten, dass in miR-221-herabregulierten Tumorzellen eine Entriegelung von XIAP und eine mutierte PIK3R1 ein relevantes Wachstumssignal in den Tumorzellen darstellen. Solche Zellen sind möglicherweise besonders empfindlich gegenüber dem Entzug dieser Faktoren und somit gegenüber einer Kombinationstherapie. PCa-Zellen mit niedriger miR-221-Expression, die durch eine SOCS3- bzw. PIK3R1-Überexpression gekennzeichnet sind, könnten empfindlich gegenüber einer Kombinationstherapie von IAP- bzw. PI3K- Inhibitoren und TRAIL sein. Somit liefert die vorgelegte Arbeit erste Hinweise auf einen therapeutischen bzw. diagnostischen Nutzen eines miR-221/SOCS3/PIK3R1-

## Diskussion

Expressions-Screening von PCa-Gewebe. Ob eine solche Charakterisierung von Tumoren prädiktiv für die genannten Therapieoptionen ist, muss in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden.

### 6 Zusammenfassung

Mikro-RNAs (miRs) spielen als post-transkriptionelle Regulatoren der Genexpression eine wichtige Rolle in der Entwicklung und Progression des Prostatakarzinoms (PCa), wie auch vieler anderer Tumorentitäten. Im PCa wurde die miR-221 als eine der am stärksten und häufigsten herabregulierten miRs beschrieben und konnte durch Vorarbeiten als prognostischer Marker für das hoch-risiko-PCa identifiziert werden. Zugleich konnten der miR-221 tumorsuppressive Funktionen in PCa-Zellen zugewiesen werden. Sie reguliert die Proliferation und das Überleben von PCa-Zellen indem sie die Expression verschiedener onkogen wirkender Zielgene, u.a. SOCS3 oder IRF1, überwacht. Durch Hemmung von SOCS-3, einem Inhibitor des Interferon-vermittelten JAK-STAT-Signalweges, war ein aktivierender Einfluss auf den IFN-abhängigen und tumorsuppressiven TRAIL-Signalweg denkbar. Allerdings wirkt miR-221 je nach vorhandener molekularer Mikroumgebung und Zellart sehr unterschiedlich. Aufgrund dieser pleiotropen Funktionsweise kann miR-221 im Gegensatz zum PCa eine onkogene Funktion in verschiedenen anderen Tumorentitäten übernehmen. Diese onkogene Rolle wurde hierbei unter anderem mit einer TRAIL-Resistenz in miR-221 überexprimierenden Tumorzellen erklärt. Unter dem Aspekt der tumorsuppressiven Funktion von miR-221 im PCa stand somit die Frage im Zentrum meiner Promotionsarbeit, welchen Einfluss miR-221 auf des TRAIL-Signal in PCa Zellen besitzt.

Im Rahmen der in der Arbeit dargestellten in vitro Versuchen an verschiedener PCa-Zelllinien wurde eine Sensitivierung gegenüber TRAIL in miR-221-überexprimierenden PCa-Zellen festgestellt. Um mögliche molekulare Funktionsweisen zu untersuchen, wurde anschließend der Einfluss bereits bekannter miR-221-Zielgene auf das Trail-Signal untersucht. So sollte geklärt werden, ob die beobachtete miR-221-vermittelte Sensitivierung gegenüber TRAIL auf eine Inhibition von SOCS-3 und konsekutiver IFN-Aktivierung zurückgeführt werden kann. Tatsächlich ließ sich durch siRNA-vermittelte Inhibierung von SOCS-3 eine TRAIL-Sensitivierung in PCa Zellen nachweisen. Auch eine miR-221-vermittelte Aktivierung des Interferonsignalweges mit Induktion einer TRAIL-supportiven Gensignatur konnte mittels PCR-Analysen beobachtet werden. Diese Signatur zeigte sich in einer miR-221-verursachten Überexpression von TNFSF-10 sowie XAF-1. TNFSF-10 stellt hierbei das für TRAIL kodierende Gen dar, wobei XAF-1 einen proapoptischen Faktor in der TRAIL-induzierten Apoptose-Kaskade darstellt. Somit konnte

## Zusammenfassung

die Wirkung der miR-221-vermittelten TRAIL-Sensitivierung in PCa Zellen zumindest teilweise auf molekularer Ebene beschrieben werden.

Da einzelne miRs in der Regel ein ganzes Bündel verschiedener Gene in ihrer Expression kontrollieren können, sollte weiterführend untersucht werden, ob noch weitere relevante Zielgene definiert werden können, die den beobachteten miR-221 Effekt auf das TRAIL-Signal in PCa-Zellen mit-verursachen könnten. Als ein Solches wurde die regulatorische Untereinheit PIK3R1 der PI3K als ein mögliches Target bioinformatisch *in silico* vorhergesagt. Mittels Luciferase-Assay und PCR-Analyse konnte PIK3R1 als Zielgen der miR-221 bestätigt werden. Auch die vermutete Beteiligung einer PIK3R1-Inhibition an einer miR-221-vermittelten TRAIL-Sensitivierung wurde im PCa-Zellmodell verifiziert.

Die Ergebnisse der Arbeit sind im folgenden Modell (Abb. 23) veranschaulicht und zusammengefasst. Es soll die miR-221-abhängige Modulation des TRAIL-Signales über SOCS3 und PIK3R1 in PCa Zellen im Kontext mit bereits vorhandenen Daten aus der Literatur beschreiben.

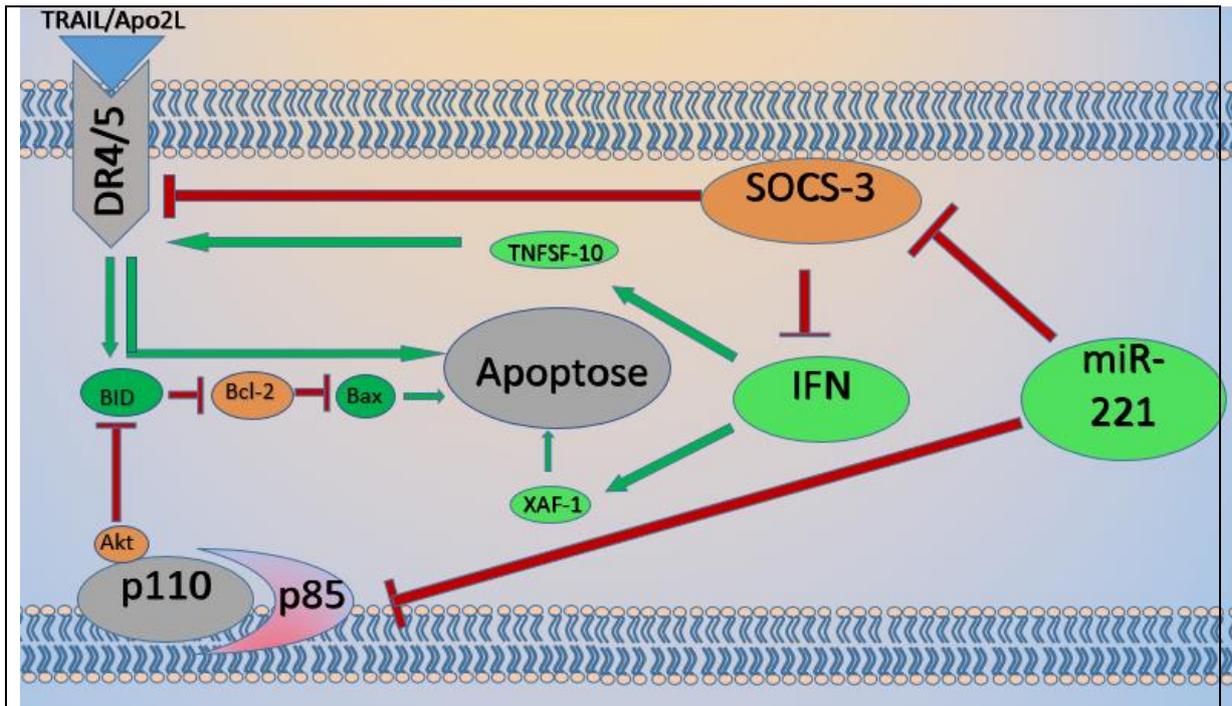


Abb. 23 Übersichtsdarstellung der Wirkung von miR-221 auf das TRAIL Signal in PCa-Zellen  
 MiR-221 führt durch Inhibierung seiner Zielgene PIK3R1 (p85) sowie SOCS-3 zur Modulation des TRAIL Signalwegs. Da SOCS-3 eine direkt inhibitorische Wirkung auf die TRAIL-Rezeptoren DR4/5 ausübt, führt dieser Effekt zur Entriegelung des TRAIL-Signals. Zusätzlich verursacht die abgeschwächte Inhibierung des Interferensignals (IFN) eine vermehrte Expression von TNFSF-10 sowie des proapoptischen Proteins XAF-1. Für beide Gene ist eine Interaktion mit dem TRAIL Signalweg in Tumorzellen beschrieben. Die miR-221 vermittelte Inhibierung von PIK3R1 bewirkt ebenso eine Sensitivierung gegenüber dem TRAIL-Signal. Die hierfür verantwortlichen Mechanismen werden durch die vorliegende Arbeit nicht abschließend geklärt. Es ist jedoch über eine Akt-vermittelte Inhibierung von BID eine Interaktion mit dem TRAIL Signalweg beschrieben. BID als Effektor des TRAIL-Signales wiederum bewirkt eine Inhibition von Bcl-2, einem Inhibitor des proapoptischen Proteins Bax. Abschließend bliebe nach Abnahme der Aktivität von Akt also eine gesteigerte Aktivität von Bax mit Apoptoseinduktion bestehen. Eine grüne Einfärbung verdeutlicht eine proapoptotische Wirkung im geschilderten Signalkreislauf, eine rote Einfärbung verdeutlicht eine anti-apoptotische Komponente

Mit Hilfe der beschriebenen Ergebnisse konnte die tumorsuppressive Rolle der miR-221 im PCa - im Gegensatz zur onkogenen Wirkung von miR-221 in anderen Tumoren - weiter gefestigt werden und das Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen wurde vertieft.

Zusätzlich besteht mit dem erstmals beschriebenen Einfluss von miR-221 auf das TRAIL-Signal in PCa eine Verbindung von miR-221 zu einem Therapie-relevanten Zytokin. Hierdurch begründet sich die Hoffnung, dass die Bedeutung von miR-221 als prädiktiven Marker hinsichtlich einer TRAIL-basierten Therapie in weiterführenden translationalen Versuchsansätzen bestätigt werden kann. In einem solchen Fall wäre ein weiterer Schritt in Richtung personalisierte Medizin getan.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Kraywinkel K, Lehnert M, Semjonow A, Hense HW. [Epidemiology of prostate cancer: recent results from the Epidemiological Cancer Register of the District of Munster (Germany)]. *Der Urologe Ausg A*. 2008;47(7):853-9.
2. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2009;59(4):225-49.
3. Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 1998. *CA: a cancer journal for clinicians*. 1998;48(1):6-29.
4. Muir CS, Nectoux J, Staszewski J. The epidemiology of prostatic cancer. Geographical distribution and time-trends. *Acta oncologica (Stockholm, Sweden)*. 1991;30(2):133-40.
5. Batzler WU, Giersiepen K, Hentschel S, Husmann G, Kaatsch P, Katalinic A, et al. Krebs in Deutschland 2003-2004 Häufigkeiten und Trends. published on edoc: 2009-10-19T16:05:00Z  
access: 2015-10-06T09:59:41Z: Robert Koch-Institut; 2008.
6. Sardana G, Dowell B, Diamandis EP. Emerging biomarkers for the diagnosis and prognosis of prostate cancer. *Clinical chemistry*. 2008;54(12):1951-60.
7. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2010;127(12):2893-917.
8. Walsh PC. Combination of prostate-specific antigen, clinical stage, and Gleason score to predict pathological stage of localized prostate cancer: a multi-institutional update. *The Journal of urology*. 1997;158(4):1618-9.
9. Joniau S, Briganti A, Gontero P, Gandaglia G, Tosco L, Fieuws S, et al. Stratification of high-risk prostate cancer into prognostic categories: a European multi-institutional study. *European urology*. 2015;67(1):157-64.
10. Merrill RM, Weed DL, Feuer EJ. The lifetime risk of developing prostate cancer in white and black men. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 1997;6(10):763-8.
11. Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity*. 1995;3(6):673-82.
12. Mills KR, Reginato M, Debnath J, Queenan B, Brugge JS. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is required for induction of autophagy during lumen formation in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(10):3438-43.
13. Schaefer U, Voloshanenko O, Willen D, Walczak H. TRAIL: a multifunctional cytokine. *Front Biosci [Internet]*. 2007 2007; 12:[3813-24 pp.]. Available from: <http://europepmc.org/abstract/MED/17485341>  
<https://doi.org/10.2741/2354>.
14. Schneider P, Tschopp J. Apoptosis induced by death receptors. *Pharmaceutica acta Helvetiae*. 2000;74(2-3):281-6.

15. Pitti RM, Marsters SA, Ruppert S, Donahue CJ, Moore A, Ashkenazi A. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(22):12687-90.
16. Sheridan JP, Marsters SA, Pitti RM, Gurney A, Skubatch M, Baldwin D, et al. Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science (New York, NY)*. 1997;277(5327):818-21.
17. Walczak H, Degli-Esposti MA, Johnson RS, Smolak PJ, Waugh JY, Boiani N, et al. TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *Embo j*. 1997;16(17):5386-97.
18. Degli-Esposti MA, Dougall WC, Smolak PJ, Waugh JY, Smith CA, Goodwin RG. The Novel Receptor TRAIL-R4 Induces NF- $\kappa$ B and Protects against TRAIL-Mediated Apoptosis, yet Retains an Incomplete Death Domain. *Immunity*. 1997;7(6):813-20.
19. Merino D, Lalaoui N, Morizot A, Schneider P, Solary E, Micheau O. Differential inhibition of TRAIL-mediated DR5-DISC formation by decoy receptors 1 and 2. *Molecular and cellular biology*. 2006;26(19):7046-55.
20. Pan G, Ni J, Wei YF, Yu G, Gentz R, Dixit VM. An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science (New York, NY)*. 1997;277(5327):815-8.
21. Pan G, Ni J, Yu G, Wei YF, Dixit VM. TRUNDD, a new member of the TRAIL receptor family that antagonizes TRAIL signalling. *FEBS letters*. 1998;424(1-2):41-5.
22. Ashkenazi A. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(6):420-30.
23. Falschlehner C, Emmerich CH, Gerlach B, Walczak H. TRAIL signalling: decisions between life and death. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2007;39(7-8):1462-75.
24. Johnstone RW, Frew AJ, Smyth MJ. The TRAIL apoptotic pathway in cancer onset, progression and therapy. *Nat Rev Cancer*. 2008;8(10):782-98.
25. Miller AB, Hoogstraten B, Staquet M, Winkler A. Reporting results of cancer treatment. *Cancer*. 1981;47(1):207-14.
26. Havell EA, Fiers W, North RJ. The antitumor function of tumor necrosis factor (TNF), I. Therapeutic action of TNF against an established murine sarcoma is indirect, immunologically dependent, and limited by severe toxicity. *The Journal of Experimental Medicine*. 1988;167(3):1067-85.
27. Nagane M, Huang HJS, Cavenee WK. The potential of TRAIL for cancer chemotherapy. *Apoptosis*. 2001;6(3):191-7.
28. Monleon I, Martinez-Lorenzo MJ, Monteagudo L, Lasierra P, Taules M, Iturralde M, et al. Differential secretion of Fas ligand- or APO2 ligand/TNF-related apoptosis-inducing ligand-carrying microvesicles during activation-induced death of human T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2001;167(12):6736-44.
29. Daniels RA, Turley H, Kimberley FC, Liu XS, Mongkolsapaya J, Ch'En P, et al. Expression of TRAIL and TRAIL receptors in normal and malignant tissues. *Cell research*. 2005;15(6):430-8.
30. Marsters SA, Pitti RA, Sheridan JP, Ashkenazi A. Control of apoptosis signaling by Apo2 ligand. *Recent Prog Horm Res*. 1999;54:225-34.
31. Ashkenazi A, Pai RC, Fong S, Leung S, Lawrence DA, Marsters SA, et al. Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *The Journal of clinical investigation*. 1999;104(2):155-62.
32. Rieger J, Naumann U, Glaser T, Ashkenazi A, Weller M. APO2 ligand: a novel lethal weapon against malignant glioma? *FEBS letters*. 1998;427(1):124-8.

33. Walczak H, Miller RE, Ariail K, Gliniak B, Griffith TS, Kubin M, et al. Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat Med.* 1999;5(2):157-63.
34. Limami Y, Pinon A, Riaz A, Simon A. TRAIL and targeting cancer cells: between promises and obstacles. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France).* 2015;61(6):33-8.
35. Nagane M, Huang HJ, Cavenee WK. The potential of TRAIL for cancer chemotherapy. *Apoptosis.* 2001;6(3):191-7.
36. Zhang L, Fang B. Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in cancer. *Cancer Gene Ther.* 2004;12(3):228-37.
37. Fisher MJ, Virmani AK, Wu L, Aplenc R, Harper JC, Powell SM, et al. Nucleotide substitution in the ectodomain of trail receptor DR4 is associated with lung cancer and head and neck cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2001;7(6):1688-97.
38. Shin MS, Kim HS, Lee SH, Park WS, Kim SY, Park JY, et al. Mutations of Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand Receptor 1 (TRAIL-R1) and Receptor 2 (TRAIL-R2) Genes in Metastatic Breast Cancers. *Cancer Research.* 2001;61(13):4942-6.
39. Bouralexis S, Findlay DM, Atkins GJ, Labrinidis A, Hay S, Evdokiou A. Progressive resistance of BTK-143 osteosarcoma cells to Apo2L//TRAIL-induced apoptosis is mediated by acquisition of DcR2//TRAIL-R4 expression: resensitisation with chemotherapy. *Br J Cancer.* 0000;89(1):206-14.
40. Bodmer J-L, Holler N, Reynard S, Vinciguerra P, Schneider P, Juo P, et al. TRAIL receptor-2 signals apoptosis through FADD and caspase-8. *Nat Cell Biol.* 2000;2(4):241-3.
41. Eggert A, Grotzer MA, Zuzak TJ, Wiewrodt BR, Ho R, Ikegaki N, et al. Resistance to Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand-induced Apoptosis in Neuroblastoma Cells Correlates with a Loss of Caspase-8 Expression. *Cancer Research.* 2001;61(4):1314-9.
42. Fulda S, Kufer MU, Meyer E, van Valen F, Dockhorn-Dworniczak B, Debatin KM. Sensitization for death receptor- or drug-induced apoptosis by re-expression of caspase-8 through demethylation or gene transfer. *Oncogene.* 2001;20(41):5865-77.
43. Fulda S, Meyer E, Debatin KM. Inhibition of TRAIL-induced apoptosis by Bcl-2 overexpression. *Oncogene.* 2002;21(15):2283-94.
44. Ng C-P, Bonavida B. X-linked Inhibitor of Apoptosis (XIAP) Blocks Apo2 Ligand/Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand-mediated Apoptosis of Prostate Cancer Cells in the Presence of Mitochondrial Activation: Sensitization by Overexpression of Second Mitochondria-derived Activator of Caspase/Direct IAP-binding Protein with Low pI (Smac/DIABLO) 1 Supported by Department of Defense/United States Army DAMD Grant 170210023 and in part by Tumor Immunology Training Grant NIH 5T32CA09120-22,23 (to C-P. N.). *Molecular Cancer Therapeutics.* 2002;1(12):1051-8.
45. Okano H, Shiraki K, Inoue H, Kawakita T, Yamanaka T, Deguchi M, et al. Cellular FLICE/caspase-8-inhibitory protein as a principal regulator of cell death and survival in human hepatocellular carcinoma. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology.* 2003;83(7):1033-43.
46. Chen X, Thakkar H, Tyan F, Gim S, Robinson H, Lee C, et al. Constitutively active Akt is an important regulator of TRAIL sensitivity in prostate cancer. *Oncogene.* 2001;20(42):6073-83.
47. Nesterov A, Lu X, Johnson M, Miller GJ, Ivashchenko Y, Kraft AS. Elevated Akt Activity Protects the Prostate Cancer Cell Line LNCaP from TRAIL-induced Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry.* 2001;276(14):10767-74.

48. Jones RG, Elford AR, Parsons MJ, Wu L, Krawczyk CM, Yeh WC, et al. CD28-dependent activation of protein kinase B/Akt blocks Fas-mediated apoptosis by preventing death-inducing signaling complex assembly. *J Exp Med*. 2002;196(3):335-48.
49. Poh TW, Huang S, Hirpara JL, Pervaiz S. LY303511 amplifies TRAIL-induced apoptosis in tumor cells by enhancing DR5 oligomerization, DISC assembly, and mitochondrial permeabilization. *Cell Death Differ*. 2007;14(10):1813-25.
50. Quintavalle C, Incoronato M, Puca L, Acunzo M, Zanca C, Romano G, et al. c-FLIPL enhances anti-apoptotic Akt functions by modulation of Gsk3beta activity. *Cell Death Differ*. 2010;17(12):1908-16.
51. Chen X, Thakkar H, Tyan F, Gim S, Robinson H, Lee C, et al. Constitutively active Akt is an important regulator of TRAIL sensitivity in prostate cancer. *Oncogene*. 2001;20(42):6073-83.
52. Kneitz B, Krebs M, Kalogirou C, Schubert M, Joniau S, van Poppel H, et al. Survival in patients with high-risk prostate cancer is predicted by miR-221, which regulates proliferation, apoptosis, and invasion of prostate cancer cells by inhibiting IRF2 and SOCS3. *Cancer Res*. 2014;74(9):2591-603.
53. Cho WC. OncomiRs: the discovery and progress of microRNAs in cancers. *Molecular cancer*. 2007;6:60.
54. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *Embo j*. 2004;23(20):4051-60.
55. Han J, Lee Y, Yeom KH, Kim YK, Jin H, Kim VN. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes & development*. 2004;18(24):3016-27.
56. Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science (New York, NY)*. 2004;303(5654):95-8.
57. Moore MS, Blobel G. The GTP-binding protein Ran/TC4 is required for protein import into the nucleus. *Nature*. 1993;365(6447):661-3.
58. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes & development*. 2003;17(24):3011-6.
59. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*. 2001;409(6818):363-6.
60. Filipowicz W, Jaskiewicz L, Kolb FA, Pillai RS. Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. *Current opinion in structural biology*. 2005;15(3):331-41.
61. Hammond SM. Dicing and slicing: the core machinery of the RNA interference pathway. *FEBS letters*. 2005;579(26):5822-9.
62. Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*. 2000;404(6775):293-6.
63. Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*. 2003;115(2):199-208.
64. Saxena S, Jonsson ZO, Dutta A. Small RNAs with imperfect match to endogenous mRNA repress translation. Implications for off-target activity of small inhibitory RNA in mammalian cells. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(45):44312-9.
65. Croce CM. Oncogenes and Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2008;358(5):502-11.
66. Meltzer PS. Cancer genomics: small RNAs with big impacts. *Nature*. 2005;435(7043):745-6.
67. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic

- leukemia. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2002;99(24):15524-9.
68. Lee YS, Dutta A. The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene. *Genes & development*. 2007;21(9):1025-30.
69. Mayr C, Hemann MT, Bartel DP. Disrupting the pairing between let-7 and Hmga2 enhances oncogenic transformation. *Science (New York, NY)*. 2007;315(5818):1576-9.
70. Park SM, Shell S, Radjabi AR, Schickel R, Feig C, Boyerinas B, et al. Let-7 prevents early cancer progression by suppressing expression of the embryonic gene HMGA2. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*. 2007;6(21):2585-90.
71. Peng Y, Laser J, Shi G, Mittal K, Melamed J, Lee P, et al. Antiproliferative effects by Let-7 repression of high-mobility group A2 in uterine leiomyoma. *Molecular cancer research : MCR*. 2008;6(4):663-73.
72. Boyerinas B, Park SM, Shomron N, Hedegaard MM, Vinther J, Andersen JS, et al. Identification of let-7-regulated oncofetal genes. *Cancer Res*. 2008;68(8):2587-91.
73. Sampson VB, Rong NH, Han J, Yang Q, Aris V, Soteropoulos P, et al. MicroRNA let-7a down-regulates MYC and reverts MYC-induced growth in Burkitt lymphoma cells. *Cancer Res*. 2007;67(20):9762-70.
74. Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, et al. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine*. 2005;353(17):1793-801.
75. Ciafre SA, Galardi S, Mangiola A, Ferracin M, Liu CG, Sabatino G, et al. Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. *Biochemical and biophysical research communications*. 2005;334(4):1351-8.
76. Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(7):2257-61.
77. Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, Ghoshal K, Jacob ST, Patel T. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology*. 2007;133(2):647-58.
78. Zhu J, Liu F, Wu Q, Liu X. miR-221 increases osteosarcoma cell proliferation, invasion and migration partly through the downregulation of PTEN. *International journal of molecular medicine*. 2015.
79. Liu W, Song N, Yao H, Zhao L, Liu H, Li G. miR-221 and miR-222 Simultaneously Target RECK and Regulate Growth and Invasion of Gastric Cancer Cells. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*. 2015;21:2718-25.
80. Xie Q, Yan Y, Huang Z, Zhong X, Huang L. MicroRNA-221 targeting PI3-K/Akt signaling axis induces cell proliferation and BCNU resistance in human glioblastoma. *Neuropathology : official journal of the Japanese Society of Neuropathology*. 2014;34(5):455-64.
81. Stinson S, Lackner MR, Adai AT, Yu N, Kim H-J, O'Brien C, et al. TRPS1 Targeting by miR-221/222 Promotes the Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Breast Cancer 2011 2011-06-14 00:00:00. ra41-ra p.
82. Garofalo M, Di Leva G, Romano G, Nuovo G, Suh SS, Ngankee A, et al. miR-221&222 regulate TRAIL resistance and enhance tumorigenicity through PTEN and TIMP3 downregulation. *Cancer cell*. 2009;16(6):498-509.
83. Wang H, Xu C, Kong X, Li X, Kong X, Wang Y, et al. Trail resistance induces epithelial-mesenchymal transition and enhances invasiveness by suppressing PTEN via miR-221 in breast cancer. *PloS one*. 2014;9(6):e99067.

84. Spahn M, Kneitz S, Scholz C-J, Stenger N, Rüdiger T, Ströbel P, et al. Expression of microRNA-221 is progressively reduced in aggressive prostate cancer and metastasis and predicts clinical recurrence. *International Journal of Cancer*. 2010;127(2):394-403.
85. Yamashita R, Sato M, Kakumu T, Hase T, Yogo N, Maruyama E, et al. Growth inhibitory effects of miR-221 and miR-222 in non-small cell lung cancer cells. *Cancer medicine*. 2015.
86. Xu G, Yang F, Ding CL, Wang J, Zhao P, Wang W, et al. MiR-221 accentuates IFNs anti-HCV effect by downregulating SOCS1 and SOCS3. *Virology*. 2014;462-463:343-50.
87. Kneitz B, Krebs M, Kalogirou C, Schubert M, Joniau S, van Poppel H, et al. Survival in Patients with High-Risk Prostate Cancer Is Predicted by miR-221, Which Regulates Proliferation, Apoptosis, and Invasion of Prostate Cancer Cells by Inhibiting IRF2 and SOCS3. *Cancer Research*. 2014;74(9):2591-603.
88. Chawla-Sarkar M, Lindner DJ, Liu YF, Williams BR, Sen GCC-S, 2003 #9}, Silverman RH, et al. Apoptosis and interferons: Role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis. *Apoptosis*. 2003;8(3):237-49.
89. Park S-Y, Seol J-W, Lee Y-J, Cho J-H, Kang H-S, Kim I-S, et al. IFN- $\gamma$  enhances TRAIL-induced apoptosis through IRF-1. *European Journal of Biochemistry*. 2004;271(21):4222-8.
90. Horndasch M, Culig Z. SOCS-3 antagonizes pro-apoptotic effects of TRAIL and resveratrol in prostate cancer cells. *The Prostate*. 2011;71(12):1357-66.
91. Kim K, Fisher MJ, Xu SQ, el-Deiry WS. Molecular determinants of response to TRAIL in killing of normal and cancer cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2000;6(2):335-46.
92. Kubo M, Hanada T, Yoshimura A. Suppressors of cytokine signaling and immunity. *Nature immunology*. 2003;4(12):1169-76.
93. Yasukawa H, Sasaki A, Yoshimura A. Negative regulation of cytokine signaling pathways. *Annual review of immunology*. 2000;18:143-64.
94. Li H, Xu LL, Masuda K, Raymundo E, McLeod DG, Dobi A, et al. A feedback loop between the androgen receptor and a NEDD4-binding protein, PMEPA1, in prostate cancer cells. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(43):28988-95.
95. Xu LL, Shi Y, Petrovics G, Sun C, Makarem M, Zhang W, et al. PMEPA1, an androgen-regulated NEDD4-binding protein, exhibits cell growth inhibitory function and decreased expression during prostate cancer progression. *Cancer Res*. 2003;63(15):4299-304.
96. He H, Jazdzewski K, Li W, Liyanarachchi S, Nagy R, Volinia S, et al. The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(52):19075-80.
97. Lee EJ, Gusev Y, Jiang J, Nuovo GJ, Lerner MR, Frankel WL, et al. Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer. *International Journal of Cancer*. 2007;120(5):1046-54.
98. Pu X-x, Huang G-l, Guo H-q, Guo C-c, Li H, Ye S, et al. Circulating miR-221 directly amplified from plasma is a potential diagnostic and prognostic marker of colorectal cancer and is correlated with p53 expression. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2010;25(10):1674-80.
99. Galardi S, Mercatelli N, Giorda E, Massalini S, Frajese GV, Ciafrè SA, et al. miR-221 and miR-222 Expression Affects the Proliferation Potential of Human Prostate Carcinoma Cell Lines by Targeting p27Kip1. *Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(32):23716-24.
100. Sun T, Wang X, He HH, Sweeney CJ, Liu SX, Brown M, et al. MiR-221 promotes the development of androgen independence in prostate cancer cells via downregulation of HECTD2 and RAB1A. *Oncogene*. 2014;33(21):2790-800.

101. Galardi S, Mercatelli N, Giorda E, Massalini S, Frajese GV, Ciafre SA, et al. miR-221 and miR-222 expression affects the proliferation potential of human prostate carcinoma cell lines by targeting p27Kip1. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(32):23716-24.
102. Mercatelli N, Coppola V, Bonci D, Miele F, Costantini A, Guadagnoli M, et al. The inhibition of the highly expressed miR-221 and miR-222 impairs the growth of prostate carcinoma xenografts in mice. *PloS one*. 2008;3(12):e4029.
103. Gu Y, Lei D, Qin X, Chen P, Zou YM, Hu Y. Integrated Analysis Reveals together miR-182, miR-200c and miR-221 Can Help in the Diagnosis of Prostate Cancer. *PloS one*. 2015;10(10):e0140862.
104. Kristensen H, Thomsen AR, Haldrup C, Dyrskjot L, Hoyer S, Borre M, et al. Novel diagnostic and prognostic classifiers for prostate cancer identified by genome-wide microRNA profiling. *Oncotarget*. 2016.
105. Leidinger P, Hart M, Backes C, Rheinheimer S, Keck B, Wullich B, et al. Differential blood-based diagnosis between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer: miRNA as source for biomarkers independent of PSA level, Gleason score, or TNM status. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2016.
106. Yu SL, Chen HY, Chang GC, Chen CY, Chen HW, Singh S, et al. MicroRNA signature predicts survival and relapse in lung cancer. *Cancer cell*. 2008;13(1):48-57.
107. Bellail AC, Qi L, Mulligan P, Chhabra V, Hao C. TRAIL agonists on clinical trials for cancer therapy: the promises and the challenges. *Reviews on recent clinical trials*. 2009;4(1):34-41.
108. Fulda S. Safety and tolerability of TRAIL receptor agonists in cancer treatment. *European journal of clinical pharmacology*. 2015.
109. Lemke J, von Karstedt S, Zinngrebe J, Walczak H. Getting TRAIL back on track for cancer therapy. *Cell Death Differ*. 2014;21(9):1350-64.
110. Graves JD, Kordich JJ, Huang TH, Piasecki J, Bush TL, Sullivan T, et al. Apo2L/TRAIL and the death receptor 5 agonist antibody AMG 655 cooperate to promote receptor clustering and antitumor activity. *Cancer cell*. 2014;26(2):177-89.
111. Trivedi R, Mishra DP. Trailing TRAIL Resistance: Novel Targets for TRAIL Sensitization in Cancer Cells. *Frontiers in oncology*. 2015;5:69.
112. de Wilt LH, Kroon J, Jansen G, de Jong S, Peters GJ, Kruyt FA. Bortezomib and TRAIL: a perfect match for apoptotic elimination of tumour cells? *Critical reviews in oncology/hematology*. 2013;85(3):363-72.
113. Koschny R, Boehm C, Sprick MR, Haas TL, Holland H, Xu LX, et al. Bortezomib sensitizes primary meningioma cells to TRAIL-induced apoptosis by enhancing formation of the death-inducing signaling complex. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2014;73(11):1034-46.
114. Ashkenazi A. Targeting the extrinsic apoptotic pathway in cancer: lessons learned and future directions. *The Journal of clinical investigation*. 2015;125(2):487-9.
115. Fong WG, Liston P, Rajcan-Separovic E, St Jean M, Craig C, Korneluk RG. Expression and genetic analysis of XIAP-associated factor 1 (XAF1) in cancer cell lines. *Genomics*. 2000;70(1):113-22.
116. Liston P, Fong WG, Kelly NL, Toji S, Miyazaki T, Conte D, et al. Identification of XAF1 as an antagonist of XIAP anti-Caspase activity. *Nat Cell Biol*. 2001;3(2):128-33.
117. Cummins JM, Kohli M, Rago C, Kinzler KW, Vogelstein B, Bunz F. X-Linked Inhibitor of Apoptosis Protein (XIAP) Is a Nonredundant Modulator of Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL)- Mediated Apoptosis in Human Cancer Cells. *Cancer Research*. 2004;64(9):3006-8.

118. Chawla-Sarkar M, Bae SI, Reu FJ, Jacobs BS, Lindner DJ, Borden EC. Downregulation of Bcl-2, FLIP or IAPs (XIAP and survivin) by siRNAs sensitizes resistant melanoma cells to Apo2L/TRAIL-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* 2004;11(8):915-23.
119. Vogler M, Walczak H, Stadel D, Haas TL, Genze F, Jovanovic M, et al. Targeting XIAP Bypasses Bcl-2–Mediated Resistance to TRAIL and Cooperates with TRAIL to Suppress Pancreatic Cancer Growth In vitro and In vivo. *Cancer Research.* 2008;68(19):7956-65.
120. Plenchette S, Cheung HH, Fong WG, LaCasse EC, Korneluk RG. The role of XAF1 in cancer. *Current opinion in investigational drugs (London, England : 2000).* 2007;8(6):469-76.
121. Fulda S. Molecular pathways: targeting inhibitor of apoptosis proteins in cancer--from molecular mechanism to therapeutic application. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2014;20(2):289-95.
122. Kwon EM, Salinas CA, Kolb S, Fu R, Feng Z, Stanford JL, et al. Genetic polymorphisms in inflammation pathway genes and prostate cancer risk. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology.* 2011;20(5):923-33.
123. Gao N, Zhang Z, Jiang B-H, Shi X. Role of PI3K/AKT/mTOR signaling in the cell cycle progression of human prostate cancer. *Biochemical and biophysical research communications.* 2003;310(4):1124-32.
124. Murillo H, Huang H, Schmidt LJ, Smith DI, Tindall DJ. Role of PI3K Signaling in Survival and Progression of LNCaP Prostate Cancer Cells to the Androgen Refractory State. *Endocrinology.* 2001;142(11):4795-805.
125. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(7):489-501.
126. Dao P, Smith N, Scott-Algara D, Garbay C, Herbeuval JP, Chen H. Restoration of TRAIL-induced apoptosis in resistant human pancreatic cancer cells by a novel FAK inhibitor, PH11. *Cancer letters.* 2015.
127. Pespeni MH, Hodnett M, Abayasiriwardana KS, Roux J, Howard M, Broaddus VC, et al. Sensitization of Mesothelioma Cells to Tumor Necrosis Factor–Related Apoptosis–Inducing Ligand–Induced Apoptosis by Heat Stress via the Inhibition of the 3-Phosphoinositide-Dependent Kinase 1/Akt Pathway. *Cancer Research.* 2007;67(6):2865-71.
128. Shrader M, Pino MS, Lashinger L, Bar-Eli M, Adam L, Dinney CPN, et al. Gefitinib Reverses TRAIL Resistance in Human Bladder Cancer Cell Lines via Inhibition of AKT-Mediated X-Linked Inhibitor of Apoptosis Protein Expression. *Cancer Research.* 2007;67(4):1430-5.
129. Rychahou PG, Murillo CA, Evers BM. Targeted RNA interference of PI3K pathway components sensitizes colon cancer cells to TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *Surgery.* 138(2):391-7.
130. Munkley J, Livermore KE, McClurg UL, Kalna G, Knight B, McCullagh P, et al. The PI3K regulatory subunit gene PIK3R1 is under direct control of androgens and repressed in prostate cancer cells. *Oncoscience.* 2015;2(9):755-64.
131. Robinson D, Van Allen Eliezer M, Wu Y-M, Schultz N, Lonigro Robert J, Mosquera J-M, et al. Integrative Clinical Genomics of Advanced Prostate Cancer. *Cell.* 2015;161(5):1215-28.
132. Taylor BS, Schultz N, Hieronymus H, Gopalan A, Xiao Y, Carver BS, et al. Integrative Genomic Profiling of Human Prostate Cancer. *Cancer cell.* 2010;18(1):11-22.
133. Inukai K, Funaki M, Ogihara T, Katagiri H, Kanda A, Anai M, et al. p85alpha gene generates three isoforms of regulatory subunit for phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-Kinase), p50alpha, p55alpha, and p85alpha, with different PI 3-kinase activity elevating responses to insulin. *The Journal of biological chemistry.* 1997;272(12):7873-82.

134. Kaliman P, Canicio J, Shepherd PR, Beeton CA, Testar X, Palacin M, et al. Insulin-like growth factors require phosphatidylinositol 3-kinase to signal myogenesis: dominant negative p85 expression blocks differentiation of L6E9 muscle cells. *Molecular endocrinology* (Baltimore, Md). 1998;12(1):66-77.
135. Ueki K, Algenstaedt P, Mauvais-Jarvis F, Kahn CR. Positive and negative regulation of phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling pathways by three different gene products of the p85alpha regulatory subunit. *Molecular and cellular biology*. 2000;20(21):8035-46.
136. Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S, et al. High Frequency of Mutations of the PIK3CA Gene in Human Cancers. *Science* (New York, NY). 2004;304(5670):554.
137. Yuan TL, Cantley LC. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene*. 0000;27(41):5497-510.
138. Hofmann BT, Jucker M. Activation of PI3K/Akt signaling by n-terminal SH2 domain mutants of the p85alpha regulatory subunit of PI3K is enhanced by deletion of its c-terminal SH2 domain. *Cellular signalling*. 2012;24(10):1950-4.
139. Jaiswal BS, Janakiraman V, Kljavin NM, Chaudhuri S, Stern HM, Wang W, et al. Somatic mutations in p85alpha promote tumorigenesis through class IA PI3K activation. *Cancer cell*. 2009;16(6):463-74.
140. Sun M, Hillmann P, Hofmann BT, Hart JR, Vogt PK. Cancer-derived mutations in the regulatory subunit p85alpha of phosphoinositide 3-kinase function through the catalytic subunit p110alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(35):15547-52.
141. Wu H, Shekar SC, Flinn RJ, El-Sibai M, Jaiswal BS, Sen KI, et al. Regulation of Class IA PI 3-kinases: C2 domain-iSH2 domain contacts inhibit p85/p110alpha and are disrupted in oncogenic p85 mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(48):20258-63.
142. Philp AJ, Campbell IG, Leet C, Vincan E, Rockman SP, Whitehead RH, et al. The phosphatidylinositol 3'-kinase p85alpha gene is an oncogene in human ovarian and colon tumors. *Cancer Res*. 2001;61(20):7426-9.
143. Yang Y, Liu L, Zhang Y, Guan H, Wu J, Zhu X, et al. MiR-503 targets PI3K p85 and IKK- $\beta$  and suppresses progression of non-small cell lung cancer. *International Journal of Cancer*. 2014;135(7):1531-42.
144. Weber GL, Parat M-O, Binder ZA, Gallia GL, Riggins GJ. Abrogation of PIK3CA or PIK3R1 reduces proliferation, migration, and invasion in glioblastoma multiforme cells. *Oncotarget*. 2011;2(11):833-49.
145. Huang X-P, Hou J, Shen X-Y, Huang C-Y, Zhang X-H, Xie Y-A, et al. MicroRNA-486-5p, which is downregulated in hepatocellular carcinoma, suppresses tumor growth by targeting PIK3R1. *FEBS Journal*. 2015;282(3):579-94.
146. Feng X, Jiang J, Shi S, Xie H, Zhou L, Zheng S. Knockdown of miR-25 increases the sensitivity of liver cancer stem cells to TRAIL-induced apoptosis via PTEN/PI3K/Akt/Bad signaling pathway. *International journal of oncology*. 2016;49(6):2600-10.
147. Wang S. The promise of cancer therapeutics targeting the TNF-related apoptosis-inducing ligand and TRAIL receptor pathway. *Oncogene*. 2008;27(48):6207-15.
148. Ndubaku C, Cohen F, Varfolomeev E, Vucic D. Targeting inhibitor of apoptosis proteins for therapeutic intervention. *Future medicinal chemistry*. 2009;1(8):1509-25.
149. Fakler M, Loeder S, Vogler M, Schneider K, Jeremias I, Debatin KM, et al. Small molecule XIAP inhibitors cooperate with TRAIL to induce apoptosis in childhood acute leukemia cells and overcome Bcl-2-mediated resistance. *Blood*. 2009;113(8):1710-22.

## Literaturverzeichnis

150. Stadel D, Mohr A, Ref C, MacFarlane M, Zhou S, Humphreys R, et al. TRAIL-induced apoptosis is preferentially mediated via TRAIL receptor 1 in pancreatic carcinoma cells and profoundly enhanced by XIAP inhibitors. *Clinical cancer research*. 2010;16(23):5734-49.
151. Vogler M, Walczak H, Stadel D, Haas TL, Genze F, Jovanovic M, et al. Small molecule XIAP inhibitors enhance TRAIL-induced apoptosis and antitumor activity in preclinical models of pancreatic carcinoma. *Cancer Res*. 2009;69(6):2425-34.

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Übersichtsdarstellung des TRAIL-Signalwegs.....	3
Abb. 2	Übersichtsdarstellung TRAIL-Resistenzen.....	5
Abb. 3	Aktivierung des zellulären IFN-Signals durch miR-221 mit nachgeschalteter Kaskade .....	9
Abb. 4	Darstellung des PC-3 Wachstums.....	11
Abb. 5	Darstellung des RWPE-Wachstums.....	12
Abb. 6	TRAIL-Verdünnungsstufen in Zellmedium und Transfektionsmedium.....	20
Abb. 7	Reaktion von MTS zu Formazan .....	22
Abb. 8	Biolumineszenzreaktion der Luciferase am Beispiel des Caspase-Assays .....	23
Abb. 9	Aufbau des verwendeten pMIR-REPORT™ Luciferase-Vektors .....	25
Abb. 10	Darstellung der Reaktionsschritte einer PCR.....	28
Abb. 11	Darstellung der Ct-Wert Bestimmung .....	30
Abb. 12	Effekt von TRAIL auf Prostatazelllinien .....	35
Abb. 13	Transfektionseffizienz in pre-miR-221 transient transfizierten PCa-Zellen.....	37
Abb. 14	Effekt von TRAIL in Kontroll-transfizierten und miR-221-überexprimierenden PCa- Zellen	39
Abb. 15	Effekt von TRAIL in SOCS-3-siRNA-transfizierten PCa-Zellen.....	43
Abb. 16	Expression von STAT-1, TNFSF-10 und XAF-1 nach Transfektion mit pre-miR-221 in PC-3-und DU-145-Zellen.....	46
Abb. 17	Komplementäre Sequenzen zwischen miR-221 und PIK3R1.....	47
Abb. 18	PIK3R1 als direktes Zielgen von miR-221.....	48
Abb. 19	Expressionsanalyse vonPIK3R1 in PC-3-Zellen nach transienter Transfektion mit PIK3R1-siRNA.....	50
Abb. 20	TRAIL-Effekt in Ktr-siRNA oder PIK3R1-siRNA-transfizierten PC-3-Zellen.....	51
Abb. 21	Gegenüberstellung von Zellvitalität und Apoptose in PC-3-Zellen nach Transfektion mit pre-miR-221 und TRAIL-Behandlung .....	56
Abb. 22	Der PI3K/Akt-Signalweg vermittelt TRAIL-Resistenz.....	62
Abb. 23	Übersichtsdarstellung der Wirkung von miR-221 auf das TRAIL Signal in PCa-Zellen .....	70

### 9 Danksagung

Wie alle großen und kleinen Projekte ist diese Arbeit nur durch tatkräftiges Zutun einiger Personen zustande gekommen. An dieser Stelle möchte ich Ihnen für die erfahrene Unterstützung danken.

In erster Linie möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Kübler bedanken, welcher ohne bürokratische Hürden und ohne Zögern die Betreuung meiner Arbeit von seinem Vorgänger übernommen hat und stets an der zügigen Vollendung der Arbeit mitgewirkt hat.

Genauso möchte ich meinem Zweitkorrektor Prof. Dr. Jakubietz danken, auch er hat sich ohne Umschweife und ohne Zögern zur Betreuung meiner Arbeit erklärt. Er wird mir nicht nur wegen seiner unkomplizierten Art in Erinnerung bleiben.

Besonderem Dank gebürt meinem allzeit ersten Ansprechpartner, Dr. Burkhard Kneitz. Ohne ihn wäre ein Zustandekommen dieser Arbeit völlig undenkbar gewesen. So hat er mich vom ersten Tag im Labor bis zum letzten Tag des Zusammenschreibens betreut, mir mit stoischer Geduld beim Versuchsaufbau, der Recherche sowie den frühen und späten Korrekturen beiseitegestanden und war zu keiner Zeit müde mir – wenn nötig – bei fehlendem Elan erneut Anschub zu geben.

Genauso möchte ich meinem zusätzlichen Betreuer, Dr. Krebs danken. Auch er war mir stets ein aufgeschlossener und geduldiger Begleiter bei der Verfassung dieser Arbeit, welcher mir zu jeder Zeit niederschwellig zur Seite stand.

Den MTAs der Forschungsgruppe Vera Schwartz, Barbara Dexler und Katrin Borschert danke für die geduldige und präzise Einarbeitung, sowie für die freundliche und wohlwollende Unterstützung während meiner gesamten Laborzeit. Ohne sie wäre die Zeit im Labor nur halb so lebenswert gewesen.

Zuletzt danke ich meiner Familie, zu der ich auch meine Freundin Lisa zähle. Ohne das unermüdliche Engagement meiner Eltern, die mich seit meiner Kindheit bestärkten, unterstützten und antrieben, wäre ich niemals dorthin gekommen, wo ich heute bin. Auch Lisa möchte ich in diesem Sinne danken, da sie mir durch ihre kompromisslos positive Art und ihren widerstandslosen Zuspruch das Entstehen dieser Arbeit erleichtert hat.

## Lebenslauf

### 10 Lebenslauf

Geburtsdatum	16.08.1989
Geburtsort	Heilbronn
Schulbildung	ab 2000 Friedrich-Schiller-Gymnasium, Pfullingen
Abschluss	Abitur 2009, Note: 1,5
Zivildienst	September 2009 bis Mai 2010 in der Herz-Thorax-Chirurgie am Universitätsklinikum Tübingen
Studium	Ab dem WS 10/11 Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg  <ol style="list-style-type: none"><li>1. Staatsexamen im August 2012</li><li>2. Staatsexamen im April 2016</li><li>3. Staatsexamen im November 2017</li></ol>
Berufliche Tätigkeit	April 2018: Anstellung als Assistenzarzt der Chirurgie in der Main-Klinik-Ochsenfurt

---