

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

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Hubert Kübler

**Induktion der microRNA-205-Expression in Prostatakarzinomzellen durch
Metformin über einen p53-abhängigen Mechanismus**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Florian Peter Kurz

aus Würzburg

Würzburg, September 2020

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Hubert Kübler

Korreferent: Prof. Dr. Andreas Rosenwald

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 26.01.2021

Der Promovend ist Arzt.

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG	1
1.1 Das Prostatakarzinom	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Das PCa und Diabetes mellitus	1
1.2 Metformin und seine Rolle in der Zellbiologie.....	2
1.2.1 Indirekte Effekte von Metformin auf die Tumorphiliferation.....	3
1.2.2 Direkte Effekte von Metformin auf die Tumorphiliferation.....	3
1.3 Die Rolle von p53 im Prostatakarzinom	4
1.4 Regulation der Genexpression durch microRNAs.....	5
1.4.1 Allgemeines.....	5
1.4.2 MicroRNA-205 im PCa	6
2 FRAGESTELLUNG.....	8
3 MATERIAL UND METHODEN	9
3.1 Material.....	9
3.1.1 Zellkultur.....	9
3.1.1.1 Tumorzelllinien.....	9
3.1.1.2 Zellkulturmedien.....	10
3.1.2 Auflistung von Chemikalien und Biochemikalien	10
3.1.2.1 Zellkulturreagenzien	10
3.1.2.2 Chemikalien für molekularbiologische Experimente	11
3.1.2.3 Primer für qRT-PCR und Antikörper	14
3.1.3 Auflistung von Geräten und Verbrauchsmaterialien.....	14
3.1.4 Auflistung von Software	17
3.2 Methoden	17
3.2.1 Sterilisation.....	17
3.2.2 Kultivierung von Tumorzelllinien.....	17
3.2.3 Transiente Transfektion und Metformingabe.....	18
3.2.3.1 Transiente Transfektion der Tumorzelllinien mit microRNA-205.....	18
3.2.3.2 Transiente Transfektion der Tumorzelllinien mit siRNAp53.....	18
3.2.3.3 Metforminbehandlung der Tumorzelllinien	19
3.2.3.4 Zellernte	19
3.2.4 RNA-Isolierung und Aufreinigung	19
3.2.5 Quantitäts- und Reinheitskontrolle der RNA	20
3.2.6 Vitalitätsversuche mit MTS-Assay	20
3.2.7 Expressionsanalysen mittels qRT-PCR.....	21
3.2.7.1 Reverse Transkription.....	21
3.2.7.2 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)	21
3.2.7.3 Ansätze	22
3.2.8 Dual-Luciferase Reporter Assay	23
3.2.8.1 Prinzip.....	23

3.2.8.2 Konstruktion von Reporter-Plasmiden	24
3.2.8.3 Transformation von kompetenten Zellen.....	26
3.2.8.4 Mini- und Midipräparation von Plasmiden.....	26
3.2.8.5 Identifikation durch Restriktionsverdau	27
3.2.8.6 Transfektion	27
3.2.8.7 Pobenaufarbeitung und Luciferase-Assay	27
3.2.9 Datenverarbeitung und Statistik	28
3.2.9.1 Datenverarbeitung des Proliferationsassays (MTS-Test)	28
3.2.9.2 Datenverarbeitung der qRT-PCR-Daten.....	28
3.2.9.3 Datenverarbeitung der Dual-Luciferase-Assay-Daten	29
3.2.9.4 Statistik	29
4 ERGEBNISSE	30
4.1 Antineoplastische Funktionen von Metformin in PCa-Zelllinien	30
4.1.1 Proliferationsinhibierung verschiedener PCa-Zelllinien durch Metformin.....	30
4.1.2 Metforminvermittelte Apoptoseinduktion in PCa-Zelllinien	32
4.1.3 Beeinflussung der Migration durch Metformin in PCa-Zellen	34
4.2 Molekulare Mechanismen der Metforminwirkung	35
4.2.1 Expression von microRNA-205 nach Metforminbehandlung.....	35
4.2.2 Transfektionseffizienz nach transients Transfektion von pre-miR-205	36
4.2.3 Proliferation von PCa-Zelllinien nach pre-miR-205-Transfektion	37
4.2.4 Sensitivierung gegenüber Metformin nach transients miR-205-Transfektion	38
4.2.5 MicroRNA-205-Induktion durch Metformin in PCa-Zelllinien	39
4.3 Einfluss von p53 auf die metforminvermittelte Proliferationsinhibierung in PCa-Zelllinien	40
4.3.1 Transfektionseffizienz nach transients siRNA(p53) - Transfektion	41
4.3.2 Induktion von p53 durch Metformin	42
4.3.3 Einfluss von p53 auf die Aktivierung von miR-205	43
4.3.4 Einfluss von p53 auf die Proliferation von LNCaP-Zellen nach Metforminbehandlung.....	44
4.4 EMT-Transformation von PCa-Zellen unter Einfluss von miR-205	45
4.5 P53 als Transkriptionsfaktor des microRNA-205-Promotors	46
4.5.1 HPR1-Promotorklonierung	46
4.5.2 MiR-205-Promotoraktivierung durch Metformin	47
5 DISKUSSION	49
5.1 Zelluläre Wirkungen von Metformin im Prostatakarzinom	49
5.1.1 Metformin-vermittelte Proliferationsinhibierung in PCa-Zellen	50
5.1.2 Die Rolle des Androgensignals für die Metforminwirkung im PCa	52
5.1.3 Apoptoseinduktion durch Metformin in PCa-Zellen	53
5.2 Molekulare Mechanismen der Metforminwirkung im PCa	55
5.2.1 Die Rolle von p53 in der Vermittlung der Wirkung von Metformin	55
5.2.2 MicroRNAs als Vermittler der Metforminwirkung im PCa	56
5.2.3 MicroRNA-205-Expression in Abhängigkeit von p53	58
5.2.4 p53 als Transkriptionsfaktor der microRNA-205	59
5.3 MicroRNA-205 als Effektor der Metforminwirkung im Prostatakarzinom.....	60
5.3.1 Zellproliferation nach microRNA-205-Reexpression	61
5.3.2 Zellmigration nach microRNA-205-Reexpression	63

5.3.3 Metforminvermittelte Beeinflussung der EMT-Transformation durch microRNA-205	65
5.3.4 Metformin als Therapeutikum im PCa.....	68

6 ZUSAMMENFASSUNG	70
--------------------------------	-----------

7 LITERATURVERZEICHNIS.....	72
------------------------------------	-----------

DANKSAGUNG

LEBENS LAUF

1 EINLEITUNG

1.1 Das Prostatakarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Das Prostatakarzinom (nachfolgend als PCa abgekürzt) stellt die häufigste urologische Tumorerkrankung der männlichen Bevölkerung in Deutschland dar und weist mit jährlich 11,900 verstorbenen Patienten hinter dem Bronchial- und dem kolorektalen Karzinom die dritthöchste Mortalität auf.^{1,2} Es ist eine Erkrankung des älteren Mannes, da 60 % aller Diagnosen Patienten im Alter von 65 Jahren oder älter betreffen³. Dennoch wurde durch die routinemäßige Einführung der serologischen Bestimmung des Tumormarkers PSA (Prostata-spezifisches Antigen) das Diagnosealter nach vorn verlegt. Zusammen mit der DRU (digital-rektale Untersuchung), der transrektalen Sonographie und dem bioptisch gewonnenen Gleason-Score erfolgt eine Einteilung in die Risikogruppen „low risk“, „intermediate risk“ und „high risk“. Im Gegensatz zu anderen Tumorentitäten zeichnet sich das PCa durch eine große Heterogenität aus. Definitionsgemäß richtet sich die Einstufung als Hochrisikopatient nach der Höhe des Gleason-Scores (8-10) und des PSA-Wertes (> 20 ng/ml) bei lokal über die fibröse Pseudokapsel der Prostata hinaus fortgeschrittenem Karzinom.⁴ Während bei dieser Konstellation der Schwerpunkt auf einer kurativen Therapie liegt, kann bei bestimmten low-risk-Patienten eine aktive Überwachung als Behandlungsstrategie ausreichend sein.^{5,6}

Das Konzept der *active surveillance* soll einer Übertherapie von Patienten mit PCa entgegenwirken, verlangt jedoch eine möglichst zuverlässige Tumorklassifikation, die sich nicht ausschließlich auf den PSA-Wert stützt. Forschungsarbeiten zu Metformin, einem Antidiabetikum aus der Klasse der Biguanide, könnten dazu beitragen, die Therapieentscheidung beim Prostatakarzinom zu vereinfachen und neue Behandlungsmöglichkeiten aufzuzeigen.

1.1.2 Das PCa und Diabetes mellitus

Turner et al. führten 2011 eine Fall-Kontroll-Studie in Großbritannien durch, um eine Assoziation zwischen PCa und Diabetes mellitus zu begründen. Es ergab sich, dass Studienteilnehmer, die zugleich an Diabetes mellitus litten, seltener ein durch PSA-

Bestimmung detektiertes Prostatakarzinom aufwiesen (odds ratio = 0.78; 95% Konfidenzintervall: 0.61-0.99).⁷ Zudem legt die jüngste Metaanalyse von Gandini et al. offen, dass Diabetiker, die mit dem Biguanid Metformin behandelt wurden, eine geringere Inzidenz maligner Tumore zeigen.⁸ Eine abschließende molekularbiologische Erklärung des antineoplastischen Effekts von Metformin konnte bis zum heutigen Zeitpunkt nicht gefunden werden.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit soll nun sein, die Rolle des Metformins bei der Reduzierung des Risikos für die Entwicklung eines Prostatakarzinoms genauer zu beleuchten, insbesondere im Hinblick auf das Zusammenspiel mit der karzinomassoziierten microRNA-205. Im folgenden Abschnitt wird ein Überblick über den aktuellen Stand der Wirkungsweise von Metformin und der Rolle der microRNAs in unterschiedlichen Tumorentitäten unter besonderer Berücksichtigung des Prostatakarzinoms gegeben.

1.2 Metformin und seine Rolle in der Zellbiologie

Im Therapiemanagement des insulinunabhängigen Diabetes mellitus spielt Metformin neben der Empfehlung zu vermehrter körperlicher Betätigung die Schlüsselrolle bei der Glucosehomöostase.⁹ Aufgrund weltweit 415 Millionen diagnostizierter Erkrankter mit steigender Tendenz gehört das Medikament mit 120 Millionen Verschreibungen zu den jährlich meistverordneten Arzneimitteln in Deutschland.^{10, 11}

Der Zusammenhang zwischen antidiabetischen und antineoplastischen Effekten wurde in epidemiologischen Studien, in denen Typ 2-Diabetiker unter Metformintherapie mit einer Kontrollgruppe verglichen wurden, vermutet und in einer Metaanalyse von Yu H et al. aufgearbeitet. Mit Metformin ließ sich über alle eingeschlossenen Studien eine statistisch signifikante Risikoreduktion für das Auftreten eines PCa von 9,8 % erreichen.¹² Zudem scheint das Antidiabetikum auch Einfluss auf die Prognose eines bereits entstandenen Prostatakarzinoms zu nehmen. Patienten mit gleichzeitigem Auftreten von Diabetes mellitus Typ 2 und eines Prostatakarzinoms entwickelten signifikant weniger Rezidive und Metastasen, die Mortalität sank signifikant um 13 %.¹³ Auf Grundlage dieser Ergebnisse entsteht ein wachsendes Interesse, den molekularen Wirkmechanismus von Metformin zu untersuchen und seine antineoplastischen Effekte in verschiedenen Tumorentitäten zu verstehen.

1.2.1 Indirekte Effekte von Metformin auf die Tumorpheriferation

Der Einfluss von Metformin sowohl auf die Regulierung des Glucosestoffwechsels als auch auf die Tumorzellproliferation kann in direkte und indirekte Komponenten aufgeteilt werden.¹⁴ Im Wesentlichen bedeutet die indirekte Wirkung eine Erhöhung der Insulinsensitivität durch vermehrte Glucoseaufnahme in das periphere Muskel- und Fettgewebe, mediiert durch eine höhere Affinität des Insulinrezeptors für Insulin.¹⁵ Metformin initiiert letztlich die Korrektur der Hyperinsulinämie, die als Wachstumsfaktor der Proliferation von Tumorzellen förderlich ist, indem Insulin durch Bindung an den Insulinrezeptor und IGF-1-R (insulin-like growth factor-1-receptor) Proliferationseffekte über die Aktivierung von PI-3-Kinase und der mitogenaktivierten Proteinkinase (MAPK) vermittelt.^{16, 17}

Des Weiteren bedeutet schon die alleinige Reduktion des Blutglucosespiegels durch Metformin, dass Tumorzellen in Anlehnung an den Warburg-Effekt eine ihrer Hauptenergieressourcen verlieren und in ihrer Proliferation gehemmt werden.¹⁸

1.2.2 Direkte Effekte von Metformin auf die Tumorpheriferation

Sein bekanntester hypoglykämischer Effekt besteht in der Senkung der hepatischen Gluconeogenese ausgehend von L-Lactat durch Hemmung von Komplex I der mitochondrialen Atmungskette.¹⁹⁻²¹ Dieser Erklärungsansatz für die antidiabetische Wirkung erscheint durch die beobachtete Häufung von Laktatazidosen in der oralen Therapie schlüssig.^{22, 23} Die Folge der moderaten Inhibition der ATP-verbrauchenden Zellatmung in Hepatozyten ist eine Anreicherung von AMP, welches allosterisch die AMP-abhängige Kinase (AMPK) aktiviert, einen Hauptregulator des Fett- und Glucosestoffwechsels.¹⁹ Allgemein erfolgt die Verschiebung hin zu einer katabolen Stoffwechsellaage, um ATP zu regenerieren.

Die Induktion von AMPK stellt den Metabolismus der Zelle um und reguliert energieverbrauchende Prozesse wie Protein- und DNA-Synthese herunter.

Neben ihrer Rolle in der Energiehomöostase tritt das Enzym AMPK auch als Regulator der Zellproliferation in Erscheinung, indem es durch die Aktivierung des Tumorsuppressorskomplexes Hamartin (TSC1)/Tuberin (TSC2) dessen inhibitorische Bindung an das Enzym mTOR (mechanistisches Target of Rapamycin) ermöglicht.²⁴

Somit verliert mTOR seine phosphorylierende Funktion auf die 6S-Kinasen S6K1 und S6K2, was eine verminderte Proteinbiosynthese und Zellproliferation zur Folge hat.²⁵

Ebenfalls ist bekannt, dass eine weitere AGC-Kinase namens Proteinkinase B (AKT) in den mTOR-Signalweg eingreift und die Zellproliferation beeinflusst. Die Inhibition sowohl von AKT als auch der aktiven Form p-AKT durch Metformin könnten entscheidende Teile seines antiproliferativen Effekts erklären.²⁶⁻²⁸

1.3 Die Rolle von p53 im Prostatakarzinom

Mutationen, die zur Aktivierung des AKT-Signalwegs führen, stellen für viele Tumorentitäten eine häufig genutzte Möglichkeit zur unkontrollierten Zellproliferation dar. Die Aktivierung von AKT erlaubt unter anderem über eine verstärkte Ubiquitinierung und Degradation von p53 die Umgehung des programmierten Zelltodes.²⁹

Das p53-Gen spielt über die vorübergehende Arretierung des Zellzyklus durch Induktion von p21 sowie gegebenenfalls die Einleitung der Apoptose eine entscheidende Rolle in der Proliferationskontrolle der Zelle. Folgerichtig weisen Tumorzellen außer der Aktivierung des p53-reprimierenden AKT-Signalwegs häufig einen direkten Funktionsverlust des p53-Proteins durch Genmutationen auf. Auch in einigen Prostatakarzinomzelllinien finden sich p53-Mutationen. So zeigen sich PC3-Zellen aus einer manifesten Knochenmetastase p53-defizient, wohingegen LNCaP-Zellen aus dem Stadium einer Lymphknotenmetastase noch das wildtypische p53-Protein exprimieren. PC-3-Zellen, mit einem weiter fortgeschrittenen Metastasierungspotential als LNCaP-Zellen, fehlt dadurch ein wichtiger Kontrollmechanismus der Zellproliferation, in welchen auch Metformin beispielsweise über die Inhibition von AKT (**siehe 1.2.2**) eingreifen kann.

Der unterschiedliche p53-Status beider Zelllinien hilft in der vorliegenden Dissertation dabei, weitere, möglicherweise direkte Interaktionen von Metformin und p53 als Transkriptionsfaktor zu untersuchen und das Verständnis der antineoplastischen Wirkung von Metformin weiter zu verfeinern. Um diesem Ziel nachzugehen,

beschäftigt sich unsere Arbeitsgruppe umfangreich mit der Bedeutung von microRNAs im Prostatakarzinom.

1.4 Regulation der Genexpression durch microRNAs

Forschungsarbeiten konnten in Pankreaskarzinom- und Magenkarzinomzellen nachweisen, dass Metformin dosisabhängig zu einer Reexpression verschiedener microRNAs führt.^{30, 31} Sowohl in vitro als auch in vivo induziert das Biguanid in den Tumorzellen eine signifikante Erhöhung der Expression tumorsuppressiver microRNAs. In Prostatakarzinomzelllinien sind die Zusammenhänge in der Expression von microRNAs und Metformin noch nicht hinreichend genau untersucht.

1.4.1 Allgemeines

Die Entdeckung der microRNAs geht zurück auf Untersuchungen zur Entwicklungsbiologie des Modellorganismus *Caenorhabditis elegans*.³² Mutationen in den Genen *lin-4* und *let-7*, den beiden ersten Mitgliedern der microRNA-Familie, verursachen Störungen in der zeitlichen Larvenentwicklung durch einen neuartigen Mechanismus der Genregulation.^{33, 34} Die betreffenden Genabschnitte codieren nicht für ein Protein, sondern für eine nicht-codierende RNA mit einer Länge von 22 bzw. 21 Nukleotiden, die auf posttranskriptioneller Ebene die Expression ihrer Gentargets negativ kontrollieren.³⁵ Dazu beginnt die Bildung der microRNA-Moleküle im Zellkern mit der Transkription von sogenannter pri-miRNA durch die RNA-Polymerase II.³⁵ Diese wird mittels einer Endonuklease namens Drosha zu einem 60-70 Nukleotide langen pre-miRNA-Molekülen gespalten, charakterisiert durch die RNA-typische Haarnadelstruktur.³⁶ Nach dem Export der pre-miRNA ins Zytoplasma katalysiert eine weitere Endonuklease namens Dicer die Spaltung zwischen ungepaarter Schleife und der doppelsträngigen RNA, bestehend aus miRNA und deren Komplementärstrang.

Bis zu diesem Schritt der Prozessierung unterscheiden sich microRNAs und sogenannte siRNAs (small inhibiting RNA), welche aus einer größeren doppelsträngigen RNA abgespalten werden. Der darauffolgende Mechanismus der RNA-Interferenz kann jedoch für beide Formen ähnlich formuliert werden. Im Mittelpunkt der Reaktion steht ein Ribonukleoproteinkomplex namens RISC (RNA-induced silencing complex), der aus Argonautenproteinen besteht, welche nach hochspezifischer Auswahl einen Strang

der Doppelstrang-microRNA als sogenannten „Leitstrang“ aufnehmen.³⁷ Dieser dient zur Identifikation der komplementären mRNA. Die Interferenz des RISC mit der zu regulierenden mRNA kann auf zwei verschiedene Arten ablaufen: in Gegenwart eines Argonautenproteins mit Endonukleaseaktivität und bei hochgradiger Komplementarität zwischen microRNA und Ziel-mRNA über die Spaltung der Ziel-mRNA oder über die Inhibierung der mRNA-Translation.³⁸ Über diese Mechanismen der Genregulation spielen microRNAs in Abhängigkeit ihres Targetgens insbesondere bei der zellulären Tumortransformation eine entscheidende Rolle.

1.4.2 MicroRNA-205 im PCa

Moderne Methoden der DNA-Sequenzierung ermöglichen bis zum heutigen Zeitpunkt die Bestimmung zahlreicher weiterer Gensequenzen, die mit einer potentiellen microRNA in Verbindung gebracht werden. So konnten allein im menschlichen Genom bisher 1881 precursor-microRNAs katalogisiert werden, die zu 2588 reifen microRNAs prozessiert werden können.^{39, 40}

Unter ihnen steht microRNA-205 in Zusammenhang mit der Kanzerogenese des PCa. Sie wird dort als Tumorsuppressor eingestuft, da sie in untersuchten PCa-Zelllinien eine erniedrigte Genexpression im Vergleich zu benignen Zelllinien aufweist.^{41, 42} Entsprechend dieser Beobachtung wurde für den Promotorbereich von microRNA-205 im Genom der WPE1-NB26-Zelllinie des invasiven PCa eine durch Hypermethylierung verursachte Inaktivierung nachgewiesen, wodurch die Herabregulation molekularbiologisch erklärt werden kann.⁴³

Mittels experimenteller Befunde und computergestützter Vorhersagen wurden mehrere Zielgene für die Interferenz mit microRNA-205 gefunden, die auf unterschiedliche Weise der Tumorentwicklung im PCa entgegenwirken. Gene wie C-SRC und seine downstream-Targets im FAK/ERK1/2-Signalweg, die in die Regulation der Zellproliferation involviert sind, weisen eine zur microRNA-205 komplementäre 3'-UTR-Region auf, die sie als ihre direkten Zielgene prädisponiert.⁴⁴

Ebenso beeinflusst microRNA-205 einen entscheidenden Schritt im PCa-Metastasierungsprozess, indem sie beispielsweise über die Inhibition des Transkriptionsfaktors ZEB1 den Übergang von ortsständigem Epithelgewebe zu mesenchymalem Gewebe (EMT: *epithelial to mesenchymal transition*) erschwert und sogar umgekehrt (MET: mesenchymal to epithelial transition).⁴⁵⁻⁴⁷ Die Folge ist eine erschwerte Loslösung der betreffenden Tumorzelle aus ihrem Zellverband und somit eine erniedrigte Metastasierungstendenz.

2 FRAGESTELLUNG

Die Entdeckung der Genregulation durch microRNAs markiert einen wichtigen Schritt in der Erforschung der Kanzerogenese vieler Tumorentitäten. In Vorarbeiten wurde insbesondere microRNA-205 mit der Entstehung des PCa, des häufigsten Karzinoms des Mannes, in Zusammenhang gebracht. Auch wenn sie als kleine, nicht-codierende RNA besonders geeignet für einen potentiellen klinischen Biomarker zur Tumorklassifikation scheint, ist anhand ihres Expressionsmusters keine Prognose des Krankheitsverlaufs im PCa-Hochrisikopatienten möglich. In ihrer Rolle als posttranskriptioneller Regulator ist die microRNA-205 an vielen Proliferations- und Differenzierungsprozessen in der Zelle beteiligt. Dadurch ist für microRNA-205 ebenso ein therapeutischer Ansatz im PCa denkbar wie für das Biguanid Metformin, dessen proliferationsinhibierender Einfluss auf Tumorzellen in vielen Studien belegt wurde. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine molekularbiologische Korrelation zwischen microRNA-205 und Metformin hinsichtlich ihrer Effekte auf die Tumorproliferation und Progression des PCa herzustellen und das Verständnis für den unvollständig geklärten antineoplastischen Wirkmechanismus von Metformin zu erweitern.

Folgende Versuche werden angeführt:

Versuchsteil 1)

Einflussnahme von Metformin auf die Proliferation von PCa-Zelllinien

Untersuchungen zur Apoptoseinduktion durch Metformin

Untersuchungen zur Migrationsinhibierung durch Metformin

Versuchsteil 2)

Einflussnahme von microRNA-205 auf die Proliferation von PCa-Zelllinien

Untersuchungen zur Sensitivierung von miR-205-transfizierten PCa-Zelllinien gegenüber Metformin

Versuchsteil 3)

microRNA-205-Induktion durch Metformin

p53-Induktion durch Metformin

p53-abhängige microRNA-205-Promotoraktivierung durch Metformin

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Zellkultur

3.1.1.1 Tumorzelllinien

Die Zelllinien CRL1740 (nachfolgend „LNCaP“), CRL 1435 (nachfolgend „PC3“) und CRL 11609 (nachfolgend „RWPE-1“) wurden von der *American Tissue Culture Collection* (ATCC) bezogen.

I) LNCaP

Der LNCaP-Klon stammt aus der Nadelpunktion eines linksseitigen supraklavikulären Lymphknotens (LNCaP: *Left-Node Carcinoma of the Prostate*). Der Patient war ein 50-jähriger Mann aus Kaukasien. Die Zelllinie zeigt ein clusterartiges Wachstumsmuster und adhärirt nur schwach an Oberflächen. Das Protein p53 ist in der Zelllinie wildtypisch exprimiert.

Um LNCaP-Zellen gegenüber Androgenen zu insensitivieren, wurden sie in immundefizienten Mäusen gezüchtet und vier Wochen nach deren chirurgischer Kastration geerntet. Eine erneute Selektion in kastrierten Mäusen ergab die Zelllinie C4-2.⁴⁸

II) PC3

Die PC3-Linie wurde aus einer Knochenmetastase eines Adenokarzinoms der Prostata eines 62-jährigen männlichen Kaukasiers gewonnen. Die Zelllinie zeigt ein regelhaftes Wachstum bei einer Verdopplungszeit von 30 Stunden. Die Zelllinie weist ein p53-Defizit auf.

III) RWPE

Es handelt sich hierbei um Epithelzellen aus der peripheren Zone einer histologisch unauffälligen Prostata, die durch Transfektion einer Gensequenz von HPV-18 immortalisiert wurden. Die Proteine p53 sowie PTEN werden in der Zelllinie exprimiert.

3.1.1.2 Zellkulturmedien

I) LNCaP, C4-2 und PC3

Das Medium sowohl für LNCaP-Zellen, C4-2-Zellen als auch PC3-Zellen enthält als Grundlage *RPMI-1640-Medium* der Firma Merck Millipore, welchem jeweils 5 ml Natriumpyruvat, ein Medium mit nicht-essentiellen Aminosäuren (MEM NEAA) und 5 ml HEPES-Puffer zugegeben wird. Vor Gebrauch werden 50 ml 10% fetales Kälberserum (FBS) beigemischt. Gegebenenfalls werden dem Ansatz zum Schutz vor bakteriellen Verunreinigungen 50 ml einer Lösung von Penicillin und Streptomycin hinzugefügt.

II) RWPE-1

Das Medium für die RWPE-1-Zelllinie basiert auf 100 ml keratinozytenfreiem Serum (K-SFM) der Firma Thermo Fisher Scientific Inc., welches mit 520 µl BPE (boviner Hypophysenextrakt) und 13,08 µl rekombinatem EGF versetzt wird.

Alle Zellkulturmedien und Reagenzien wurden vor Gebrauch im Wasserbad erwärmt und anschließend bei Raumtemperatur benutzt.

3.1.2 Auflistung von Chemikalien und Biochemikalien

3.1.2.1 Zellkulturreagenzien

Zellkulturreagenz	Hersteller
RPMI 1640 Medium 500 ml	Merck Millipore, Deutschland
Keratinocyte-SFM 500 ml	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
OPTI-MEM® I 1x 100 ml	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Trypsin-EDTA (0,25 %)	Thermo Fisher Scientific Inc., USA

Penicillin-Streptomycin 1%, 100x, 5 ml	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Sodium Pyruvate 100 mM	Merck Millipore, USA
MEM Non essential amino acids 100 x	Merck Millipore, USA
GlutaMAX™ I 100x	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
BPE – Bovine Pituitary Extract	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
EGF Recombinant Human Protein Solution	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Fetal Bovine Serum (10%)	Merck Millipore, Deutschland
PBS Dulbecco 500 ml	Merck Millipore, Deutschland
HEPES-Buffer 100 ml (1M)	Merck Millipore, Deutschland
Trypan Blue Solution (0,4%)	Sigma-Aldrich, USA

3.1.2.2 Chemikalien für molekularbiologische Experimente

Produkt	Hersteller
1,1-Dimethylbiguanidhydrochlorid 97% Stocklösung	Sigma-Aldrich, USA
Alamar Blue®	AdB Serotec, UK
<i>Escherichia coli</i> XL-Blue 01	Agilent, USA
phRL-TK - Vektor	Ambion, USA
Ampicillin	AppliChem, Deutschland

Lipofectamine® 2000 Reagent 1mg/ml	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
TRIzol® Reagent 200 ml	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
miScript SYBR® Green PCR Master Mix	Qiagen, USA
miScript SYBR® Green RT-PCR Reagents Kit	Qiagen, USA
TaqMan® microRNA Reverse Transcription Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
TaqMan® Universal PCR Master Mix	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
PhosphoSafe™ Extraction Reagent	Merck Millipore, Deutschland
Roti®-Quant 5x-Konzentrat	Roth, Deutschland
Calbiochem® Sodium n-Dodecyl Sulfate	Merck Millipore, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Merck Millipore, Deutschland
Mini-Protean TGX Gels 12%	Bio-Rad Laboratories, USA
Bromphenolblau	PanReac AppliChem, Spanien
peqGOLD Proteinmarker V	Peqlab, Deutschland
Trizma® Pre-set crystals Laufpuffer	Sigma-Aldrich, USA
TWEEN® 20	Sigma-Aldrich, USA
Phosphate Buffered Saline 10x concentrate	Sigma-Aldrich, USA
Methanol	Sigma-Aldrich, USA

Trichlormethan Roth > 99%	Sigma-Aldrich, USA
2-Propanol	Sigma-Aldrich, USA
Ethanol absolute \geq 99,8 %	Sigma-Aldrich, USA
Magermilchpulver	PanReac AppliChem, Spanien
ECL Prime Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare, UK
Amersham Hyperfilm™ ECL	GE Healthcare, UK
Glycerin, 87 %	Merck Millipore, Deutschland
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, USA
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, USA
Carestream® Kodak® autoradiography GBX fixer	Sigma-Aldrich, USA
Carestream® Kodak® autoradiography GBX developer	Sigma-Aldrich, USA
Cell Titer 96 ® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay	Promega, USA
Dual-Luciferase® Reporter Assay System	Promega, USA
CellLytic™ M Cell Lysis Reagent	Sigma-Aldrich, USA
Caspase Glo 3/7 Kit	Sigma-Aldrich, USA
Aqua ad iniectabilia	Braun, Deutschland

3.1.2.3 Primer für qRT-PCR und Antikörper

Bezeichnung	Sequenz	Fluoreszenzmarkierung	Hersteller
β-Actin	for 5'- cct ggc acc cag cac aat -3' rev 5'- ggc gat cca cac gga ct -3'	5' SYBR® Green 1	Biomers
RNU6B	CGCAAGGATGACACGC AAATTCGTGAAGCGTTC CATATTTTT	FAM	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
hsa-miR-205	UCCUUCAUCCACCGG AGUCUG		Thermo Fisher Scientific Inc., USA

3.1.3 Auflistung von Geräten und Verbrauchsmaterialien

Gerät	Modell(e)	Hersteller
Autoklav	3850 EL	Systec, D
Brutschrank	CB 210	WTB Binder, D
Elektrophoresekammer	Mini-PROTEAN® 3 Cell	Bio-Rad, USA
	Mini Trans-Blot® Cell	Bio-Rad, USA
	Power Pac 300	Bio-Rad, USA

Filmkassette	Amersham Hypercassette™ Autoradiography Cassettes 18x24 cm	GE Healthcare, UK
Folienschweißgerät	FS 3602 „Folio“	Severin, D
Küvetten	UltraVette 70 - 850 µl	Roth, D
Magnetrührer	Combimag RCH	IKA, D
Mikroskop	Diavert	Leitz, D
Monochromator	Multiskan MS	Labsystems, USA
Nitrocellulosemembran	Protran® Amersham® 0,45 µm	GE Healthcare
Pipetten	Transferpette®	Brand, D
Reaktionsgefäße	CELLSTAR® Tubes 15/50 ml Eppendorf Tubes steril 1,5 ml Eppendorf Tubes steril 2 ml Eppendorf Tubes steril 5 ml	Sarstedt, D Eppendorf, D
Schüttler	IKA® Vortex 3 Vortex 7-2020 Hybriturn plate shaker 002041 B1 Polymax 1040	Sigma-Aldrich, USA neolab, D Hybritech, USA Heidolph, Deutschland
Sicherheitswerkbank	06 12	Prettl, Deutschland
Spektralphotometer	SmartSpec™ Plus	Bio-Rad, USA

	NanoDrop 2000c	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Thermocycler	Primus 96 plus Rotor-Gene Q GeneAmp® PCR System 9700	MWG Biotech, D Qiagen, Niederlande Applied Biosystems, USA
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf, D
Waage	SAC51 200g x 0,01g	A. Hartenstein, D
Wasserbad	EcoTemp TW12	Julabo, D
Zellkultur	Fuchs-Rosenthal-Kammer CELLSTAR® Cell Culture F. CELLSTAR Pipetten 5-25 ml Nunc™ MicroWell Plates 96-Well White Microplate Accu-Jet® Pro	Brand, D Sigma-Aldrich, USA greiner bio-one, D greiner bio-one, D greiner bio-one, D Brand, D
Zentrifuge	Biofuge primo Megafuge 16 R Centrifuge Mini Centrifuge MCF-2360 Centrifuge 5415D	Heraeus Instruments, D Thermo Fisher Scientific LMS, D Eppendorf, D

3.1.4 Auflistung von Software

Software
Access Software for Multiskan
Apache OpenOffice™
EndNote X9
Magellan™ für Spektralphotometer
Microsoft Excel 2016
Microsoft Word 2016
Nanodrop 2000c
Rotor-Gene Q

3.2 Methoden

3.2.1 Sterilisation

Einmalartikel für die Zellpräparation sowie die verwendeten Zellkulturen wurden steril verpackt gekauft. Hitzebeständige Glas- und Plastikmaterialien sowie Lösungen wurden durch 25-minütiges Autoklavieren bei 120°C sterilisiert.

3.2.2 Kultivierung von Tumorzelllinien

Die Tumorzellen wurden in 75 cm² Kulturflaschen bei 37°C, 6% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank kultiviert. Die Zellaussaat erfolgte in einer Dichte von 20.000 - 30.000 Zellen/cm². Jeweils zu Beginn und Ende der Arbeitswoche erfolgte die Ablösung und Passage der Zellen. Nach Absaugen des Mediums und Spülen mit 5 ml PBS wurden die Tumorzellen mit 2 ml Trypsin (0,05%) 5 min bei 37°C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in 5 ml des jeweils geeigneten Mediums aufgenommen, in ein 15 ml Falconröhrchen überführt und 5 min bei 4°C und 2000 rpm zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Zellen in frischem Medium resuspendiert und die

Zellzahl in der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmt. Dazu wurden 10 μ l Zellsuspension mit 90 μ l Trypanblau gefärbt, mikroskopisch ausgezählt und in Anzahl Zellen/ml hochgerechnet.

Die Zelllinien wurden so regelmäßig passagiert und nach etwa 30 Passagen verworfen.

3.2.3 Transiente Transfektion und Metformingabe

3.2.3.1 Transiente Transfektion der Tumorzelllinien mit microRNA-205

Die Transfektion von microRNA-205 mit kationischen Lipiden wurde mit precursor-microRNA durchgeführt. Hierbei wurde mit Lipofectamin 2000 der Firma Thermo Fisher Scientific Inc. gearbeitet, um das anionische Genmaterial mittels Lipofektion in die Tumorzellen zu transferieren. Im Folgenden wird die Transfektion für ein 6-Well-Format beschrieben.

Einen Tag vor der Transfektion wurden die Zellen ausplattiert, sodass sie zum Zeitpunkt der Transfektion zu ca. 70 - 80 % konfluent waren. Zur Präparation der microRNA-Lipofectamin- 2000-Komplexe wurden 2 nmol micro-RNA in 1000 μ l serumfreien Opti-MEM-Medium gelöst. Parallel wurden in 2000 μ l Opti-MEM-Medium 20 μ l Lipofectamin 2000 eingebracht. Beide Ansätze wurden 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 1000 μ l Lipofectaminansatz mit dem miR-205-Ansatz zusammengeführt. Nach weiteren 20 Minuten bei Raumtemperatur wurden jeweils 500 μ l miR-205-Ansatz bzw. 250 μ l Lipofectamin-Ansatz in die jeweiligen Wells pipettiert, sodass eine gleiche Konzentration von Lipofectamin in allen Proben gewährleistet werden konnte.

3.2.3.2 Transiente Transfektion der Tumorzelllinien mit siRNAp53

Die Transfektion mit einer gegen p53 gerichteten siRNA wird beispielhaft für den 12-Well-Ansatz des Dual-Luciferase-Assays beschrieben. Als Vorbereitung auf die Transfektion wurden in 1,8 ml Opti-MEM-Medium 1,8 μ l Lipofectamin 2000 gelöst und 5 Minuten inkubiert. Gleichzeitig erfolgte die Inkubation von 18 μ l des HPR1-Vektors und 9 μ l Renilla-GFP-Luciferase in 1800 μ l Opti-MEM-Medium. Anschließend wurde der Transfektionsansatz in zwei gleiche Hälften geteilt und 36 μ l siRNA zur Kotransfektion in einen Teil hinzugefügt. Beide Teile wurden mit jeweils 900 μ l Lipofectamin-Lösung für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Abschließend wurden 100 µl der jeweiligen Lösung in jedes Well pipettiert.

3.2.3.3 Metforminbehandlung der Tumorzelllinien

24 Stunden nach der Transfektion wurden die Tumorzellen mit Metformin behandelt. Für jedes Well mit 2 ml Ausgangsvolumen wurde 1 ml Zellkulturmedium mit Metformin aus der Stocklösung der Konzentration 1 mmol/L versetzt. Unter Berücksichtigung des Verdünnungseffekts wurde die Metforminkonzentration dreifach höher angesetzt, um die adäquate Endkonzentration im Well zu erreichen.

3.2.3.4 Zellernte

Die Ernte der transfizierten und mit Metformin behandelten Tumorzellen in 6-Well-Platten erfolgte zwei Tage post transfectionem. Nach Absaugen des Mediumüberstandes wurde der Zellrasen mit 2 ml PBS gewaschen und mit 1 ml Trypsin (0,05 %) 5 Minuten im Brutschrank inkubiert. Die Ablösungsreaktion der Zellen wurde mit 2 ml Medium unterbrochen. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Falconröhrchen überführt und bei 4 °C und 2000 rpm zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellsediment erneut in 1 ml PBS resuspendiert und bei 4 °C und 2000 rpm 10 Minuten lang zentrifugiert.

3.2.4 RNA-Isolierung und Aufreinigung

Die Isolierung der RNA aus dem Frischmaterial erfolgte in fünf Schritten. Hierbei wurde auf eine RNase-freie Arbeitsumgebung (Wischdesinfektion der Arbeitsflächen mit RNase-Inhibitor- Lösungen, RNase-freie Handschuhe) und RNase-freie Medien und Reaktionsgefäße durch UV-Bestrahlung unter der Sterilbank geachtet.

Homogenisation: Dem in 3.2.3.4 beschriebenen Zellsediment wird 1ml TRIzol® der Firma Thermo Fisher Scientific Inc. zugesetzt und 5 Minuten inkubiert.

Phasentrennung: Nach Zugabe von 200 µl Chloroform werden die Proben 15 Sekunden lang mit einem Vortexmischer geschüttelt, nochmals 2-3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 15 Minuten bei 12.000 g und 2-8°C zentrifugiert.

Präzipitation: Nach Abnahme des RNA-haltigen Überstandes wird dieser mit 500 µl

Isopropanol gemischt und 20 Minuten bei -20°C untergebracht. Auf die erneute Vortexmischung folgt die Pelletierung der Proben durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 12.000 g und $2-8^{\circ}\text{C}$.

Waschschritt: Nach Entfernen des Überstandes wird das RNA-Pellet in 1ml Ethanol (75 %) gewaschen und erneut zentrifugiert (7.500 g; 5 Minuten; $2-8^{\circ}\text{C}$).

Auflösung: Nach schrittweisem Abpipettieren des gesamten Überstandes wird das Pellet in 50 μl RNase-freiem Wasser gelöst und zur völligen Resuspension bei 56°C für 10 Minuten inkubiert.

3.2.5 Quantitäts- und Reinheitskontrolle der RNA

Die Konzentrationsbestimmung der isolierten RNA erfolgt im Spektralphotometer, indem 2 μl unverdünnte Probe auf die Messoberfläche pipettiert werden. Als Nullabgleich wird RNase-freies Wasser verwendet. Der Reinheitsgrad der Proben wird abgeschätzt aus dem Quotienten der Extinktionswerte bei 260 nm und 280 nm, welcher zwischen 1,9 und 2,0 liegen sollte.

3.2.6 Vitalitätsversuche mit MTS-Assay

Mittels des „*Cell Titer 96 AQueous One Solution Assays*“ der Firma Promega, das auf Basis des Salzes Tetrazolium (Methyltetrazoliumsulfat) arbeitet, wird im Monochromator bei 490 nm die Anzahl vitaler Zellen als Korrelation zum Farbumschlag des Redoxfarbstoffes Formazan drei, sechs und sieben Tage post transfectionem gemessen. Das Cell Titer 96 Assay Reagenz wird zunächst in pH 7-gepufferter PBS-Lösung im Verhältnis 1:11 verdünnt. Gleichzeitig werden die 96-Well-Platten mit den transfizierten Zellen aufbereitet: Das Medium wird aus allen Vertiefungen abgesaugt und einmal mit PBS gespült. Anschließend werden pro Vertiefung 100 μl der verdünnten Assay-Lösung eingebracht. Die so präparierten Platten werden drei Stunden im Brutschrank gelagert und anschließend mit dem Programm *Ascent Software for Multiskan* gemessen.

3.2.7 Expressionsanalysen mittels qRT-PCR

3.2.7.1 Reverse Transkription

Entgegen des natürlichen Informationstransfers von DNA zu RNA musste die isolierte RNA zuerst in einem Zwischenschritt in complementary DNA (cDNA) umgeschrieben werden (reverse Transkription). Die Transkription von mRNA zu cDNA wurde mit Hilfe von zwei verschiedenen Reverse-Transkriptions-Systemen durchgeführt

Ein Prinzip beinhaltet die zufällige, komplette Amplifikation des RNA-Gehalts der Zelle mittels Random Primern. Hierfür wurde das „*Im-Prom-II Reverse Transcription System*“ nach einem modifizierten Protokoll des Herstellers Promega verwendet. Die gezielte Detektion eines Gens erfolgte anschließend in der qRT-PCR-Reaktion durch SYBR®-GREEN-Anregung.

Für die reverse Transkription ausschließlich der Genabschnitte von miR-205 wurden die micro-RNA-Assay-Kits von Applied Biosystems mit speziellen Primern verwendet. Für den Promega-Ansatz wurde die vorliegende RNA auf 1µg/ml verdünnt und mit DEPC-H₂O auf 11,6 µl aufgefüllt. Für den microRNA-Assay-Ansatz wurde die RNA auf 10ng/ml verdünnt. Die Ansätze für die in einem sterilen Eppendorfgesäß stattfindende Transkriptionsreaktion erfolgten wie vom Hersteller empfohlen.

3.2.7.2 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Die semiquantitative Amplifikation der untersuchten cDNA-Abschnitte erfolgt mit der Polymerasekettenreaktion. Diese Methode ermöglicht die in-vitro-Vervielfältigung von Nucleinsäuren und verläuft in drei sich zyklisch wiederholenden Phasen:

I Denaturierung: Durch kurzzeitiges Erhitzen über die DNA-Schmelztemperatur (92°C-98°C) hinaus wird die DNA-Doppelhelix in Einzelstränge aufgetrennt.

II Annealing: Während des anschließenden raschen Abkühlens (50°C-65°C) binden zwei synthetische Oligonucleotide (Primer) an ihre komplementären Sequenzen der DNA-Einzelstränge, welche die zu amplifizierende Region flankieren.

III Elongation: Bei 72°C werden die beiden DNA-Einzelstränge durch die Taq-DNA-Polymerase in Richtung auf die Zielsequenz durch Anlagerung der im Reaktionsansatz vorhandenen Nukleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) zu Doppelsträngen komplettiert. Um eine exponentielle Zunahme der amplifizierten DNA zu erhalten, werden die drei Phasen der PCR mehrfach nacheinander durchlaufen. Unter optimalen Bedingungen verdoppelt sich dabei mit jedem durchlaufenen Zyklus die Anzahl der synthetisierten DNA-Moleküle.

Primerabhängig werden 30-35 Zyklen durchlaufen.

Zusätzlich ist es durch die sogenannte quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) möglich, die Zunahme der vervielfältigten DNA in Echtzeit und somit die relative Menge an Nukleinsäuren in einer Zelle zu messen.

Die Quantifizierung erfolgt durch Messung der Fluoreszenzzunahme eines Farbstoffs (in der vorliegenden Arbeit SYBR®-Green und FAM), dessen positive Ladung mit der negativ geladenen DNA interkaliert. Die so mit jedem Zyklus der qRT-PCR zunehmende Fluoreszenz korreliert mit der quantitativen Zunahme der amplifizierten DNA. Als Maß für die Quantifizierung werden die sogenannten Ct-Werte (cycle threshold) bestimmt. Diese entsprechen der Anzahl der Zyklen, die notwendig sind, um ein festgelegtes Fluoreszenzniveau zu erreichen. Für die Interpretation der Daten ist also entscheidend, dass der gemessene Ct-Wert indirekt proportional zur eingesetzten cDNA-Menge ist. Diese Methode erlaubt einen indirekten Rückschluss auf das Expressionsmaß bestimmter Gene. Um die relativen Genexpressionslevel zwischen verschiedenen Proben vergleichbar zu machen, müssen eventuell vorhandene cDNA-Konzentrationsunterschiede der Proben durch Normalisierung ausgeglichen werden. Dies gelingt mithilfe sogenannter „*Housekeeping-Gene*“, die idealerweise ubiquitär in jeder Zelle in gleichbleibender Stärke exprimiert werden. In dieser Arbeit wurden zu diesem Zweck β -Actin für SYBR® Green- und RNU6B für TaqMan-Anwendungen verwendet.

3.2.7.3 Ansätze

Falls Primer in Kits mitgeliefert werden, ist die Sequenz nur dem Hersteller bekannt und kann auf der jeweiligen Website eingesehen werden. Folgende Primer werden in

der SYBR®-Green-Anregung verwendet: p53, pAKT, AKT, β -Actin, jeweils in einer 1:10-Verdünnung mit PBS.

Im Folgenden werden die Standardansätze zu den quantitativen *real-time*-PCR-Versuchen beschrieben (modifiziert nach Applied Biosystems, Beiblatt 2008).

(I) Standardansatz für Reaktion I (als Doppelansatz):

Amplifikationsschema für (I) im qRT-PCR Cyclor (Opticon 2), programmiert mit zugehörigem Opticon Monitor 2 Programm: - 95°C für 15 Minuten (Initiations-Denaturierung) - 94°C für 15 Sekunden (Denaturierung).

- 60°C für 1 Minute (*Annealing* / Elongation, sog. „two-step-PCR“) - Platten-Scan - Wiederholung in 40 Zyklen (Anschließend keine Schmelzkurvenanalyse).

(II) Standardansatz für Reaktion II (als Doppelansatz):

Amplifikationsschema und Schmelzkurvenanalyse für (II) im qRT-PCR Cyclor (Opticon 2), programmiert mit zugehörigem Opticon Monitor 2 Programm: - 95°C für 15 Minuten (Initiations-Denaturierung) - 94°C für 15 Sekunden (Denaturierung) - 55°C für 30 Sekunden (*Annealing*) - 72°C für 30 Sekunden (Elongation) - Platten-Scan - Wiederholung in 40 Zyklen.

3.2.8 Dual-Luciferase Reporter Assay

3.2.8.1 Prinzip

Genetische Reporter-Assays werden in der Zellphysiologie standardmäßig eingesetzt, um Genexpression zu studieren. Duale Reporter, wie sie in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, erhöhen die Genauigkeit der Experimente, indem zwei Reporterenzyme in einem System gleichzeitig exprimiert und gemessen werden. Typischerweise ist der eine „experimentelle“ Reporter mit dem zu messenden Effekt der spezifischen Bedingungen der Experimente verbunden, während die Aktivität des anderen sogenannten Kontrollreporters eine interne Kontrolle mit solider Grundaktivität

darstellt. Eine zum Kontrollreporter durchgeführte Normalisierung minimiert die experimentelle Variabilität in den Experimenten. Mit Hilfe dieser Methode wurde eine verlässliche Auswertung der experimentellen Daten durch Reduzierung externer Einflüsse ermöglicht.

3.2.8.2 Konstruktion von Reporter-Plasmiden

Für die Versuche wurde der pGL3-Luciferase-Promotor-Vektor der Firma Promega verwendet. Es konnte in Vorarbeiten gezeigt werden, dass Metformin eine Rolle in der Aktivierung der HPR-Promotorregion von microRNA-205 spielt. HPR bezeichnet die Abkürzung für „highly likely predicted region“ und stellt jenen Abschnitt im Gen „LOC642587“ auf Chromosom 1 dar, der als potentielle Promotorregion für den Genlocus der microRNA-205 identifiziert wurde. HPR kann nochmals eingeteilt werden in zwei Bereiche HPR1 und HPR2. Unter Mitarbeit von Kathrin Borschert vom Theodor-Boveri-Instituts für Biowissenschaften in Würzburg konnte gezeigt werden, dass nur HPR1 im Dual Luciferase Assay nach Transfektion in den Basisvektor pGL3 eine relevante Promotoraktivität aufweist. Die anschließenden Experimente basieren diesbezüglich ausschließlich auf der Klonierung von HPR1. Ebenso wurden bereits p53-Bindungsstellen in der microRNA-205-Promotorsequenz gefunden und mittels Affinitätselktrophorese verifiziert.

Ein 26 bp langes HPR1-Fragment wurde mittels PCR mit denjenigen Primern amplifiziert, die die Restriktionsstellen *NheI* und *XhoI* des pGL3-Basisvektors (Promega) flankieren. Die erhaltenen Gensequenzen enthalten somit die Gensequenz von HPR1 sowie an den Enden die Überhänge von *Nhe I* und *Xho I*. Diese ermöglichen die Insertion in den pGL3-Basisvektor. P53 wurde in einem Stück kloniert.

Primer-Bezeichnung	Gensequenz
HPR1-Sequenz	NheI for 5'- AGGCTAGCCAGTCCCCGGCACCCCAGGCTGCTC- 3' XhoI rev 5' - AGCTCGAGGGGTGAGCAAGAGGGACTCAGCCCA- 3'
p53	NheI for 5'- AGGCTAGCCCGTGCATGTGCTTGGCTCTAGACCC- 3' XhoI rev 5' - AGCTCGAGCAGAGGGTGGGGATGCATGTCAACC- 3'

Tabelle: Darstellung der Primersequenzen für HPR-1 und p53

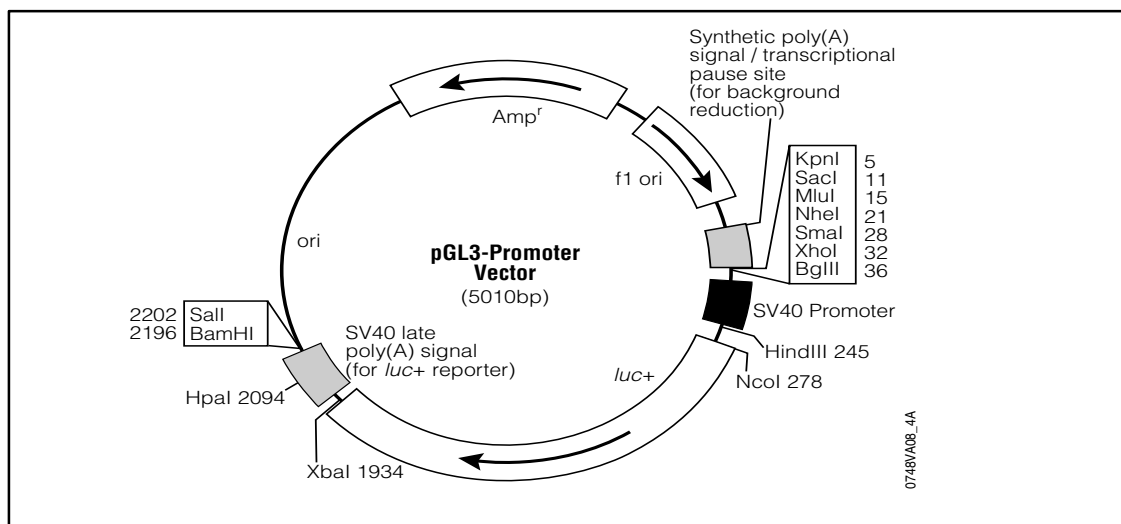


Bild: Dargestellt ist der pGL3-Promoter-Vektor, in dessen Xho I- und Nhe I-cloning-sites die oben genannten Gensequenzen kloniert wurden (Quelle: technical manual TM033, revised 6/15, Promega).

Die erhaltenen Gensequenzen enthielten die 3'UTR der jeweiligen Gen-mRNAs. An den Enden der Gensequenz waren durch die PCR die Überhänge von Xho I und Nhe I eingesetzt worden, um die Sequenzen in die Vektoren klonieren zu können. Die Promotorsequenzen wurden in kommerziell erhältliche Plasmide nach

Herstellerprotokoll kloniert. Die Plasmide enthielten als Reportergen die Luciferase des nordamerikanischen Leuchtkäfers (*Photinus pyralis*) und zusätzlich ein Resistenzgen gegen Ampicillin.

Die Fragmente der vorausgesagten Zielgene von microRNA-205 (HPR1) und p53 wurden mittels PCR amplifiziert (Protokoll siehe unten). Hierbei wurden die in der Tabelle beschriebenen Primer verwendet, welche die Restriktionsstellen NheI und XhoI flankierten.

3.2.8.3 Transformation von kompetenten Zellen

Die kompetenten Zellen vom Typ E. coli-Stamm *XL blue-01* wurden auf Eis aufgetaut. Pro Ansatz wurden zu 100 µl Bakteriensuspension 1 bis 5 µl entsprechender Plasmid-DNA pipettiert. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad für 20 Sekunden. Nach erneut zwei Minuten auf Eis wurde 900 µl warmes LB-Medium (*Luria-Broth-Medium*) zugegeben und der Ansatz für eine Stunde bei 37°C im Bakterienschüttler inkubiert. Im Anschluss wurden 10 µl der Bakteriensuspension direkt auf eine Ampicillin-haltige Agarplatte ausplattiert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C über Nacht. Am nächsten Morgen wurde mit einer sterilen Impföse eine Kolonie aufgenommen und in 50 ml LB-Medium mit Ampicillin überführt. Der Ansatz wurde über Nacht bei 37°C im Bakterienschüttler inkubiert.

3.2.8.4 Mini- und Midipräparation von Plasmiden

Die Ernte der Bakterien erfolgte am nächsten Tag durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 6000 rpm und 4 °C. Die erhaltenen Pellets wurden entweder bei -20°C gelagert oder sofort aufgeschlossen. Mini- und Midipräparation unterschieden sich nur in der Menge der eingesetzten Bakterienkultur und der Menge der verwendeten Lösungen. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des *HiSpeed Plasmid Midi Isolation Kit* der Firma Qiagen nach Herstellerangaben. Dieses System basiert auf einer modifizierten alkalischen Zellyse, gefolgt von einer spezifischen DNA-Bindung an eine Anionen-Austauscher-Säule unter geeigneten Salz- und pH-Bedingungen. Anschließend erfolgte noch eine Konzentrationsbestimmung der vorliegenden Plasmidlösung am UV-Spektrometer.

3.2.8.5 Identifikation durch Restriktionsverdau

Zur Überprüfung, ob das Plasmid ein bestimmtes Insert enthielt, wurde das Plasmid mit einem oder zwei Restriktionsenzymen geschnitten. Der Restriktionsansatz wurde entsprechend den Angaben des Herstellers hergestellt. Nach elektrophoretischer Auftrennung der verdauten Plasmide in einem präparativen, ethidiumbromidhaltigen 0,8%-igen TAE-Agarosegel (Tris-Acetat-EDTA-Puffer-Agarosegel) erfolgte eine Beurteilung der erhaltenen Fragmentlängen unter UV-Licht gegenüber einem DNA-Standard definierter Größe. Zum Vergleich wurden die entsprechenden ursprünglichen DNA-Plasmide und Kontrollplasmide ebenso behandelt. Die entsprechende Bande im TAE-Agarosegel wurde ausgeschnitten und aufgereinigt (*MicroElute Gel Extraction Kit*).

3.2.8.6 Transfektion

Die Zelllinien LNCaP und PC3 wurden in Anzuchtplatten mit zwölf Vertiefungen ohne Antibiotikazugabe angezüchtet. In die Zellen wurden die in 3.2.8.2 beschriebenen Reporter- und Kontrollplasmide transfiziert; der Promoter-Vektor pGL3 wurde dabei in der Verdünnung 50ng/μl und der Kontrollvektor pRL-TK in 50ng/μl zugegeben.

3.2.8.7 Probenaufarbeitung und Luciferase-Assay

48 Stunden nach erfolgter Transfektion wurden die Zellen mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) gespült. Nach Entfernung des PBS wurden die Zellen mit 1 ml *Passive Lysis Buffer* (PLB) (Promega; in einer 1:5-Verdünnung mit *Ultra Pure Water*) pro Well versetzt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Für die Messung der Luciferase-Aktivität wurden 20 μl des Zelllysats in 100 μl vorgelegtes Luciferase-Assay-Reagenz gegeben und in direktem Anschluss im Luminometer Lumat LB 9507 für 10 Sekunden vermessen. Dabei kam das duale System des Assays zum Tragen. Das Luciferase-Enzym des Leuchtkäfers *Photinus pyralis* (*firefly luciferase*) ist ein monomeres Protein, das keiner posttranslationalen Prozessierung unterliegt. Die Luciferase katalysierte die Umsetzung von Luciferin in Gegenwart von Magnesium-Ionen und ATP zu Luciferyl-AMP, das in einem weiteren Schritt unter Freisetzung von Licht der Wellenlänge 562 nm oxidiert wurde. Das Reporterenzym mit der *Renilla*-Luciferase oxidierte Coelenteraten-Luciferin, wobei Licht der Wellenlänge 482 nm

emittiert wurde. Die Bestimmung der Aktivitäten der Reporterenzyme *Firefly*- und *Renilla*-Luciferase erfolgt anhand der Bildung lumineszierender Produkte, wobei die unterschiedliche Substratspezifität der beiden Enzyme die selektive Unterscheidung der Lumineszenzreaktionen ermöglicht. Die Normalisierung der *Firefly*-Luciferase-Aktivität auf die konstitutive *Renilla*-Luciferase-Aktivität diente dem Ausgleich experimenteller Schwankungen. Die Photonen wurden mit Hilfe eines Photomultipliers gezählt. Als Rohdaten entstanden so genannte relative Lichteinheiten (RLU = *relative light units*) in Excel-Tabellen, die aus den direkt gezählten Lichtimpulsen berechnet wurden.

3.2.9 Datenverarbeitung und Statistik

3.2.9.1 Datenverarbeitung des Proliferationsassays (MTS-Test)

Die Proliferationsassays wurden mittels eines Monochromators analysiert. Die vom Monochromator auf den Computer übertragenen Daten wurden in Excel importiert. Da in Triplikaten (drei gleiche Proben in drei Vertiefungen) transfiziert wurde, wurde von diesen Proben das arithmetische Mittel bestimmt, welches den Probenwert darstellte. Danach wurde der Quotient *Probenwert/Kontrollwert* gebildet, um in Prozent darzustellen, wie viele Zellen in der Probe vital waren.

3.2.9.2 Datenverarbeitung der qRT-PCR-Daten

Die während der qRT-PCR aufgezeichneten Rohdaten wurden nach der Amplifikation mit der Software „*Opticon Monitor 2*“ ausgewertet. Die erhaltenen Ct-Werte wurden in Excel importiert. Da für jede Probe zwei Reaktionsansätze in jedem Lauf vorbereitet wurden, konnte auf einen zweiten Lauf verzichtet werden, da für jede cDNA-Probe zwei Ct-Werte vorlagen. Die Weiterverarbeitung der Rohdaten beinhaltete die Bildung des arithmetischen Mittels der zwei Ct-Werte des Doppelansatzes sowie die Normalisierung der Expressionsdaten zu den jeweiligen Houskeeper-Genen β -Actin (SYBR® Green-Anregung) oder RNU6B (TaqMan).

Schließlich wurde mit der $\Delta\Delta$ Ct-Methode das x-fache Expressionsverhältnis bestimmt. Unter Annahme gleicher RNA-Ausgangsmengen und vollkommener Effizienz der qRT-PCR gilt für diese Berechnung die Formel

$$\text{Expressionsunterschied} = 2^{-[\Delta\text{Ct}(\text{Probe}) - \Delta\text{Ct}(\text{Kontrolle})]}$$

wobei sich der ΔCt -Wert aus der Differenz der Ct-Werte des Housekeeping-Gens und der Probe errechnet.

3.2.9.3 Datenverarbeitung der Dual-Luciferase-Assay-Daten

Die Rohdaten des Dual-Luciferase-Assays wurden in Excel-Tabellen generiert. Für jede Zelllinie und jede Kotransfektion wurden vier Messungen analysiert. Hierbei war in den Messungen schon der Quotient aus der Luminiszenz des Kontrollvektors und des eigentlichen Reporter-Vektors integriert. Von den vier Messungen wurde jeweils das arithmetische Mittel ermittelt und als eigentlicher Messwert verwendet.

3.2.9.4 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte hauptsächlich mit dem Statistikprogramm „R“. Die Mediane normalverteilter Daten wurden durch einen zweiseitigen ungepaarten t-Test verglichen. Die jeweils geltenden Umrechnungen der Ergebnisse der verschiedenen statistischen Methoden auf den gebräuchlichen p-Wert wurden im Anschluss an die Berechnungen durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde mit $\alpha = 5\%$ festgelegt. Alle signifikanten Assoziationen mit einem p-Wert von $0.01 \leq p < 0.05$ wurden mit einem „*“ gekennzeichnet, alle als hochsignifikant definierten Assoziationen ($p < 0.01$) mit „**“.

4 ERGEBNISSE

In der vorliegenden Arbeit werden Untersuchungen zur Wirkung des Antidiabetikums Metformin auf prostatische Tumorzelllinien durchgeführt und mit der Bedeutung von microRNA-205 und p53 im Tumorsuppressionsmechanismus in Zusammenhang gebracht.

4.1 Antineoplastische Funktionen von Metformin in PCa-Zelllinien

Aufbauend auf einer Basistherapie, die aus Gewichtsnormalisierung, Ernährungstherapie und Lifestyle-Schulung besteht, wird in den aktuellen Leitlinien zur Behandlung des insulinunabhängigen Diabetes mellitus eine Monotherapie mit Metformin empfohlen. Es ist bekannt, dass an Diabetes mellitus Typ 2 leidende Patienten unter Metformintherapie eine signifikante Reduktion der Malignominzidenz aufweisen. Dementsprechend konnte in PCa-Zellen und vielen anderen Tumorentitäten ein proliferationsinhibierender Effekt von Metformin gezeigt werden. Als Ausgangspunkt für die experimentellen Untersuchungen in dieser Arbeit soll die proliferationsinhibierende Wirkung des Biguanids an den drei PCa-Zelllinien PC3, LNCaP und deren androgeninsensitivem Klon C4-2 gezeigt und mit der Zelllinie RWPE-1, die von benignem Prostataepithel abstammt, verglichen werden.

4.1.1 Proliferationsinhibierung verschiedener PCa-Zelllinien durch Metformin

Mittels MTS-Test wurden für die PCa-Zelllinien LNCaP, C4-2 und PC3 sowie für die Zelllinie RWPE-1 Proliferationsexperimente nach Gabe verschiedener Dosen Metformin durchgeführt. Die Auswahl der verschiedenen PCa-Zelllinien basiert auf Unterschieden in ihrer Aggressivität, da es sich bei den PC3-Zellen um eine immortalisierte Knochenmetastase eines PCa handelt im Gegensatz zu den LNCaP-Zellen einer Lymphknotenmetastase.

Dazu wurde an Tag 5 nach Metforminbehandlung die im Monochromator gemessene Lumineszenz im Vergleich zur Mediumkontrolle als prozentualer Anteil proliferierender Zellen interpretiert. Als Mediumkontrolle dienen hierzu unbehandelte Zellen, die nur unter den jeweiligen Kulturbedingungen über den gesamten Zeitraum kontinuierlich proliferieren. LNCaP-Zellen wurden einer Metforminkonzentration von

bis zu 10 mmol/L ausgesetzt, was zu einer Abnahme der Proliferation um 84 % führt ($p \leq 0,01$). Auch die C4-2-Zelllinie, der androgeninsensitivierte Klon der LNCaP-Zelllinie, zeigt mit einer Zellreduktion von 79 % ($p \leq 0,01$) eine vergleichbar hohe Sensitivität gegenüber Metformin.

Für PC3-Zellen betrug die Reduktion bei einer Metforminkonzentration von 10 mmol/L 32 % ($p \leq 0,01$). RWPE-Zellen verringerten sich signifikant um 51% ($p \leq 0,01$).

In Abbildung 1 wurde der prozentuale Anteil proliferierender Zellen abhängig von der eingesetzten Metforminkonzentration in einem Punktdiagramm aufgetragen und mit einer Trendkurve korreliert. Durch Interpolation der Trendkurve wurde in den Zelllinien jene Metforminkonzentration ermittelt, die zu einer Proliferationsinhibierung um 50% führte und als IC_{50} -Wert ($IC = inhibiting\ concentration$) in das Diagramm eingetragen. Es ergab sich ein IC_{50} -Wert von 0,72 mmol/L Metformin für LNCaP-Zellen, 1,05 mmol/L Metformin für die androgeninsensitivierte LNCaP-Zelllinie C4-2, 2,8 mmol/L Metformin für RWPE-Zellen und 7,3 mmol/L Metformin für PC3-Zellen. Verglichen mit der Zelllinie RWPE-1 aus benignem Prostataepithel reagieren beide LNCaP-Zelllinien bereits in niedriger Metformindosierung mit einer Proliferationsinhibierung. PC3-Zellen tolerieren wesentlich höhere Metformin-konzentrationen als die anderen betrachteten Zelllinien.

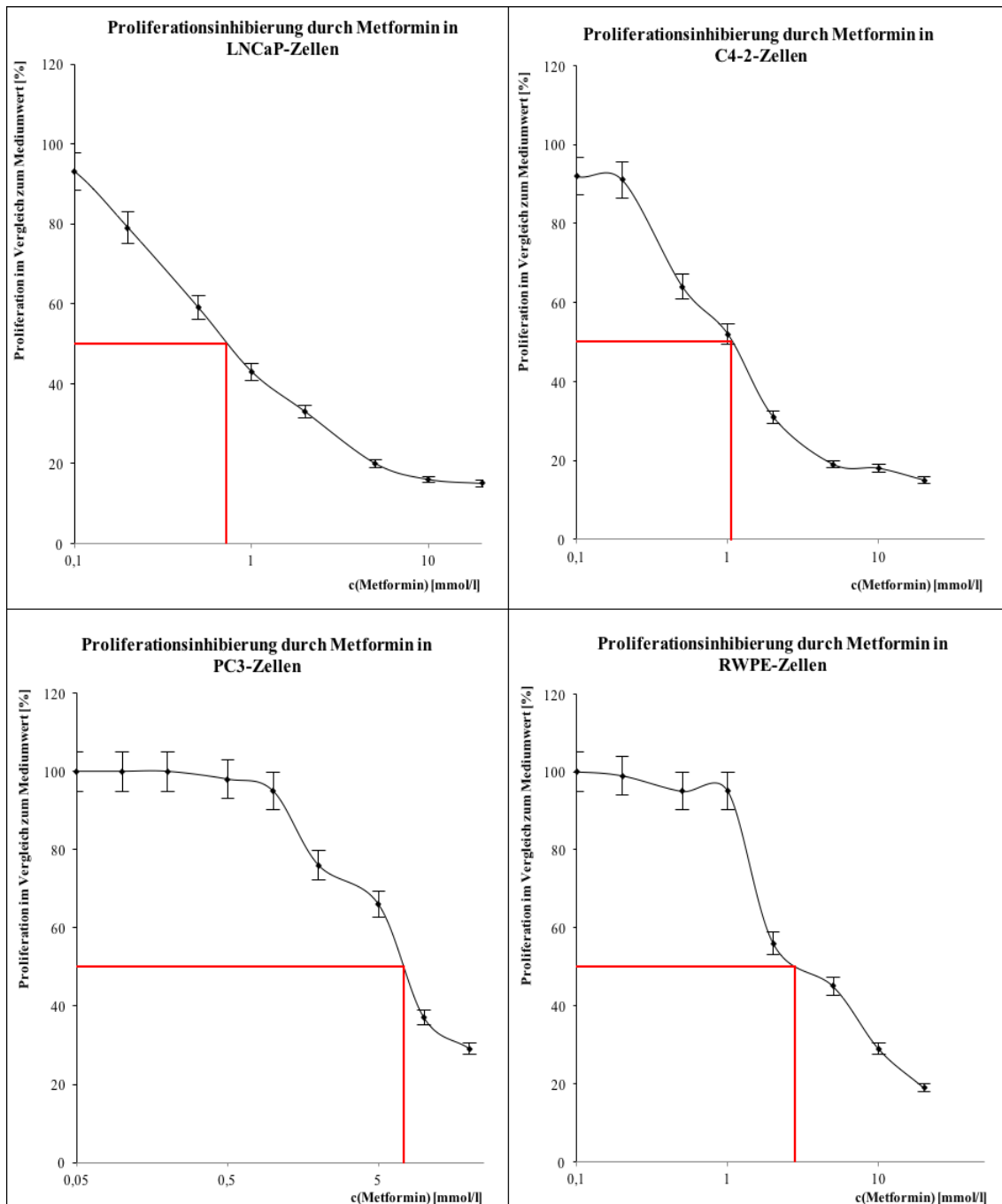


Abb. 1: Halblogarithmische Darstellung der Proliferation von vier PCa-Zelllinien nach Titration der Metforminkonzentration von 10 mmol/L bis 0,3125 mmol/L. Gemessen wurde die Extinktion nach Zugabe des MTS-Reagenz im Monochromator fünf Tage nach Metformingabe. Rot markiert wurde jeweils die Konzentration an Metformin, die zu einer Proliferationsinhibierung der Zellen um 50 % führte. Die abzulesende Konzentration wird als IC50-Wert der jeweiligen Zelllinie definiert.

4.1.2 Metforminvermittelte Apoptoseinduktion in PCa-Zelllinien

Um eine effektive Proliferationsinhibierung durch Metformin in allen untersuchten Zelllinien zu gewährleisten, wird unter Verwendung des IC50-Wertes die jeweils

entsprechende Metforminkonzentration eingesetzt. Auf dieser Grundlage werden die nachfolgenden Experimente in LNCaP-Zellen mit 1 mmol/l Metformin und in PC3-Zellen mit 10 mmol/l Metformin durchgeführt.

Um abzuklären, ob die Abnahme der Zellen nach Metforminbehandlung im Proliferationsassay durch die Induktion apoptotischer Signalkaskaden vermittelt wird, wurden die metforminbehandelten Zellen LNCaP und PC3 im Caspase-3/7-Glo-Assay in 96-Well-Platten ausgesät und 48 Stunden später mit Metformin der jeweiligen Konzentration behandelt. An Tag drei nach Metformingabe erfolgt die photometrische Messung der proapoptotischen Caspasen 3 und 7 als Äquivalenzwerte apoptotischer Vorgänge in der Zelle. In keiner der beiden Zelllinien kann eine signifikante Erhöhung der Caspaseaktivität beobachtet werden. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Induktion apoptotischer Signale durch Metformin keinen wesentlichen Einfluss auf die Zelllinien PC3 und LNCaP aufweist.

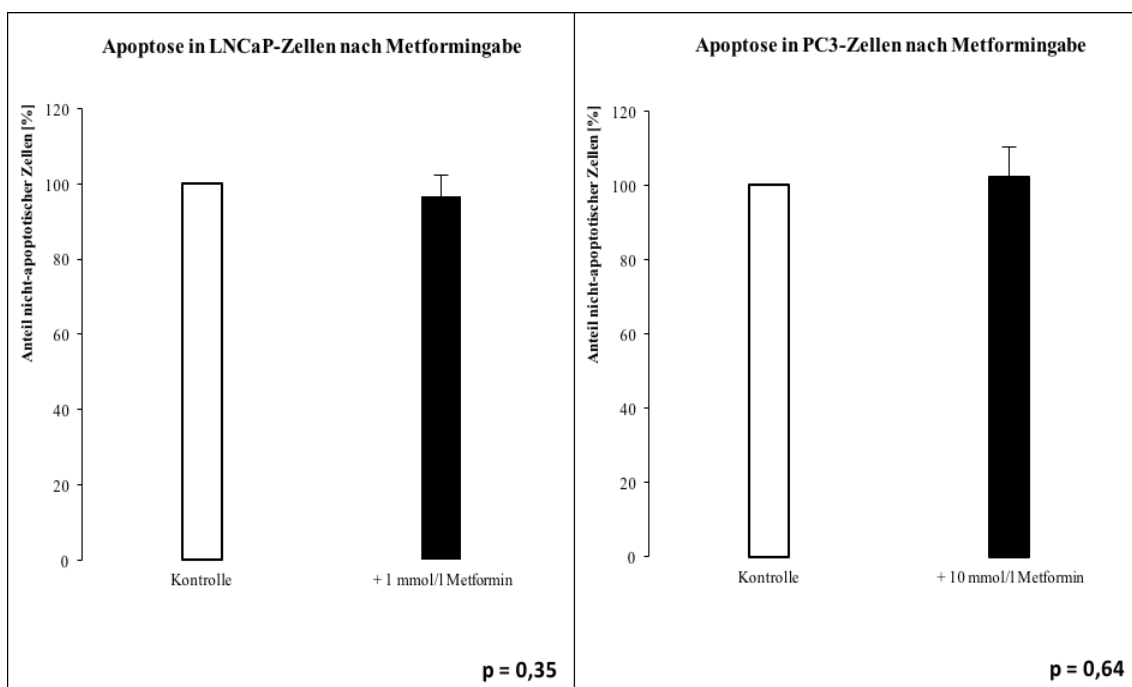


Abb. 2: Darstellung der Apoptoseinduktion in LNCaP- und PC3-Zellen nach Metforminbehandlung der Konzentrationen 1 bzw. 10 mmol/L. Aufgetragen ist der Anteil nicht-apoptotischer Zellen im Vergleich zur unbehandelten Mediumkontrolle, welche zu 100 % festgelegt wurde. Die Fehlerbalken spiegeln die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten wider, ein Signifikanzniveau $< 0,05$ wurde nicht erreicht.

4.1.3 Beeinflussung der Migration durch Metformin in PCa-Zellen

Neben der Einleitung des programmierten Zelltodes existieren noch zahlreiche weitere zellphysiologische Mechanismen, die antineoplastische Substanzen nutzen können, um das Wachstum und die Ausbreitung von Tumorgewebe zu reduzieren. Hierzu gehört die Verhinderung der Transformation von stationärem Epithel zu mesenchymalen Zellen, das in der Lage ist, seine Primärlokalisation zu verlassen und sich an anderer Stelle als Tumormetastase wieder anzusiedeln. Eine Beeinflussung dieser Migrationstendenz durch Metformin kann labortechnisch durch einen Migrationsassay untersucht werden. Dazu werden metforminunbehandelte Zellen auf eine zeldurchlässige Membran pipettiert und mit metforminbehandelten Zellen hinsichtlich ihrer Befähigung, innerhalb einer Inkubationszeit von 12 Stunden durch die permeable Membran zu migrieren, verglichen. Die in beiden Ansätzen hindurchgetretenen Zellen werden quantifiziert. Dies erlaubt eine Beurteilung des Einflusses von Metformin auf die Migration und somit die Metastasierungstendenz von LNCaP-Zellen. Wie in Abbildung 3 ersichtlich, führt eine Behandlung der Tumorzellen mit Metformin der Konzentration 1 mmol/L über die Zeitspanne von 48 Stunden zu einer signifikanten Reduktion migrationsbefähigter Zellen im Vergleich zur Mediumkontrolle (prozentuale Reduktion um 51 %, $p < 0.01$).

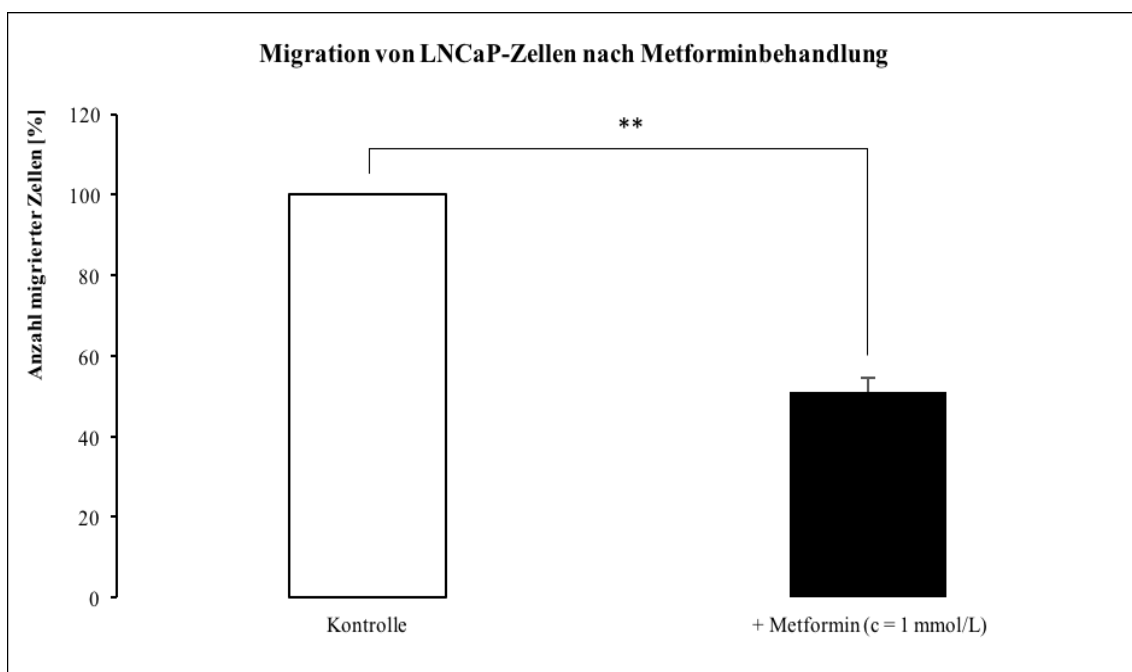


Abb. 3: Vergleich der Anzahl migrierter Zellen abhängig von der Behandlung mit Metformin der Konzentration 1 mmol/L. Das arithmetische Mittel der Zellen, die in der Mediumkontrolle die Membran im Migrationsassay passieren, wird zu 100 % festgesetzt und mit dem metforminbehandelten Ansatz verglichen. Die Signifikanz im student's t-Test wird mit ** ($p \leq 0.01$) dargestellt. Der Fehlerbalken spiegelt die Standardabweichung dreier unabhängiger Experimente wider.

4.2 Molekulare Mechanismen der Metforminwirkung

Metformin wirkt in PCa-Zelllinien sowohl über eine Proliferationsinhibierung als auch über eine Veränderung des Migrationsverhaltens tumorsuppressiv. Die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen sind ebenso wie der Zusammenhang mit der Wirkung von microRNAs auf die PCa-Zelllinien unklar. MicroRNAs können aufgrund ihrer RNA-Struktur negativ in die Genregulation der Zelle eingreifen und auf diesem Weg in vielen Tumorgeweben onkogene oder tumorsuppressive Wirkungen entfalten. Der Einfluss insbesondere tumorsuppressiver microRNAs ist auch im PCa bekannt, wo sie eine wichtige Rolle in der Tumorigenese spielen.

4.2.1 Expression von microRNA-205 nach Metforminbehandlung

Zur Identifikation einer im Kontext der molekularen Wirkungsweise von Metformin geeigneten microRNA wurde die Genexpression einer Auswahl im PCa tumorsuppressiv wirkender microRNAs in PCR-Experimenten untersucht. Bezüglich der microRNA-21, 221, let7b, 203 und 205 wurde analysiert, ob 48 Stunden nach der Metforminbehandlung mit 1 mmol/L von LNCaP-Zellen eine deutlich aberrante Expression im Vergleich zur Mediumkontrolle vorliegt. In Abbildung 4 wird ersichtlich, dass nur die microRNA-205 durch Metformin signifikant aktiviert wird (Erhöhung der relativen microRNA-Expression auf das Dreifache des Kontrollwertes, $p \leq 0.01$).

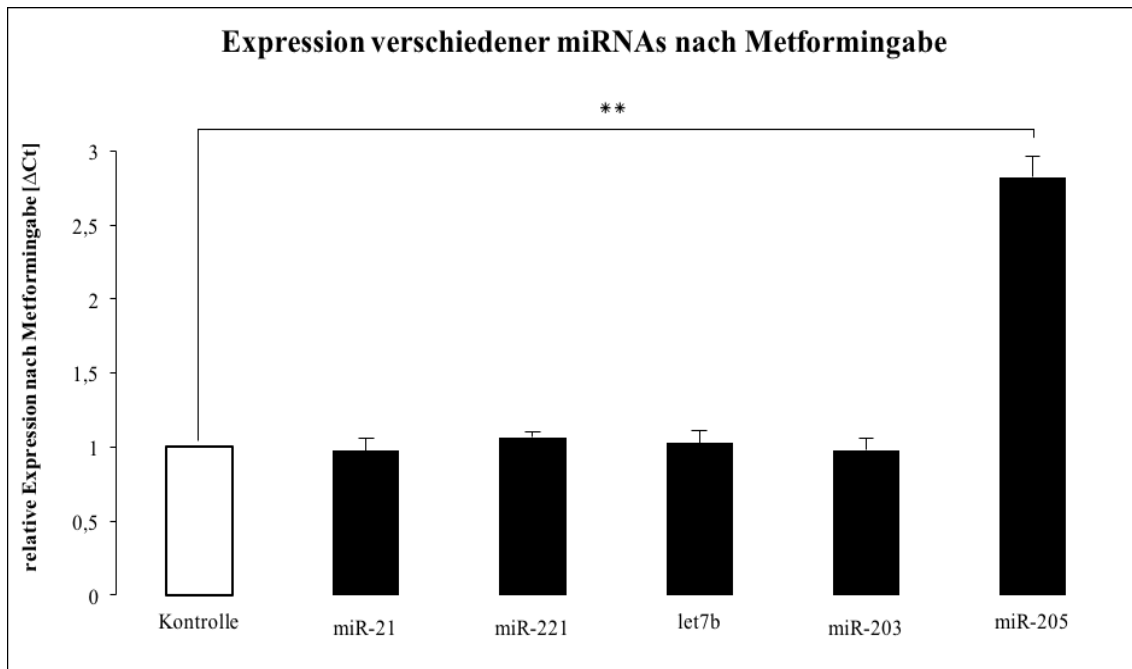


Abb. 4: Darstellung der Expression von fünf microRNAs nach Metforminbehandlung in RT-PCR-Experimenten. Als Referenzwert dient für alle microRNA-Expressionen eine jeweilige Kontrolle, die an unbehandelten Zellen gemessen wurde und mit der relativen Expression von 1 zusammengefasst für alle miRNAs in die Grafik eingeht. Die Gabe von Metformin hat auf vier microRNAs keine Auswirkung im Expressionsmuster, nur microRNA-205 wird signifikant stärker exprimiert. Die Signifikanz im student's t-Test ist mit ** ($p \leq 0.01$) dargestellt. Der Fehlerbalken stellt die Standardabweichung dreier unabhängiger Experimente dar.

4.2.2 Transfektionseffizienz nach transients Transfektion von pre-miR-205

Um die Funktion von microRNA-205 in der Proliferationsregulierung der zwei PCa-Zelllinien LNCaP und PC3 zu untersuchen, wurde sie mittels Transfektion von pre-miRNA-205 in beiden Zelllinien transient überexprimiert.

Zur Beurteilung der Transfektionseffizienz wurde in drei unabhängigen qRT-PCR-Experimenten die Expression von microRNA-205 in transfizierten Zellen gemessen und mit kontrolltransfizierten Zellen verglichen. Abbildung 5 zeigt folgende Beobachtungen: In beiden Zelllinien zeigen transfizierte Zellen eine signifikante Überexpression von microRNA-205. LNCaP-Zellen zeigen nach Normalisierung zum Ladekontrollgen RNU6B eine relative Expression von $\Delta Ct = 17,61$ (entspricht einer etwa 300-fachen Überexpression von microRNA-205 nach der $\Delta\Delta Ct$ -Methode im Vergleich zur Kontrolltransfektion, $p \leq 0,01$) die stärkste Überexpression, gefolgt von PC3-Zellen ($\Delta Ct = 11,07$; $\Delta\Delta Ct$: 120-fache Überexpression).

Die Transfektion war somit in beiden Zelllinien effizient und dient als verlässliche Grundlage für die sich anschließenden Proliferationsexperimente.

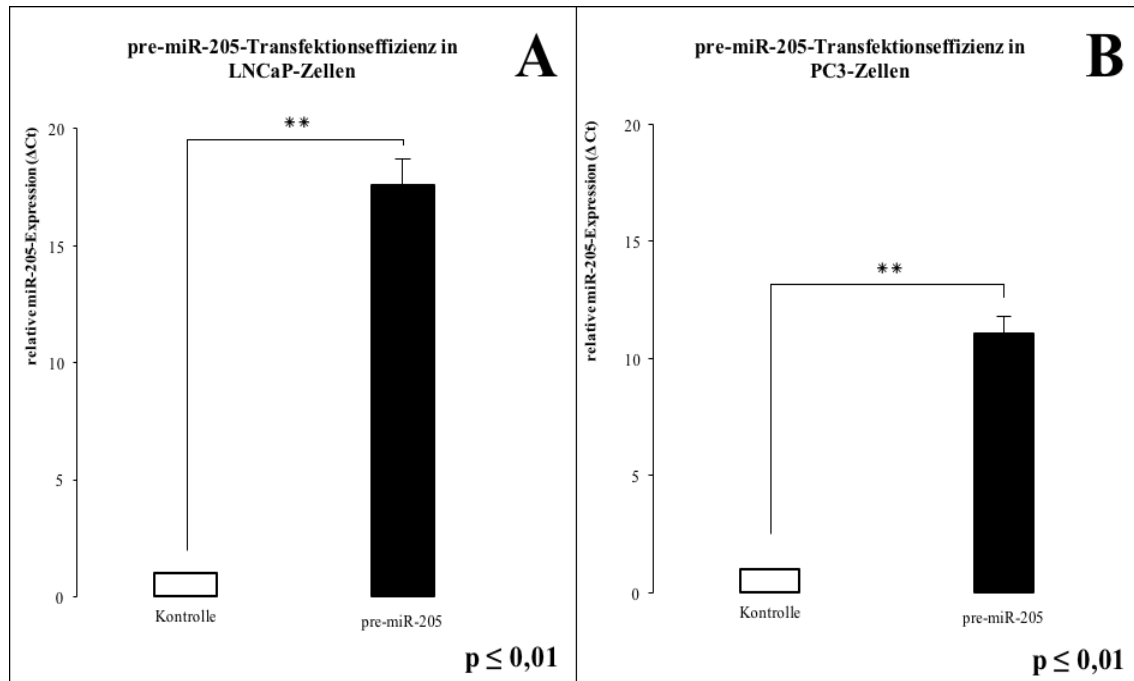


Abb. 5: Effizienz der miR-205-Transfektion in LNCaP-Zellen (A) und PC3-Zellen (B). In 3 unabhängigen qRT-PCR-Experimenten wurde nach Normalisierung zum Kontrollgen RNU6B die microRNA-205-Expression nach transienter Überexpression von miR-205 gemessen und mit einer pre-miR-Kontrolltransfektion, deren relative miR-205-Expression auf den Wert 1 festgesetzt wurde, verglichen. Signifikanzen im student's t-Test wurden mit ** ($p \leq 0,01$) dargestellt. Die Fehlerbalken setzen sich aus der Standardabweichung der drei untereinander unabhängigen Experimente zusammen.

4.2.3 Proliferation von PCa-Zelllinien nach pre-miR-205-Transfektion

Die PCa-Zelllinien LNCaP und PC3 wurden wie in 3.2.3.1 beschrieben mit precursor-miRNA-205 transfiziert. Anschließend wurde an Tag 5 post transfectionem die Menge proliferierender Zellen mittels MTS-Test bestimmt. Die Erhöhung der Expression der als im PCa tumorsuppressiv wirkenden microRNA-205 bewirkte in beiden Zelllinien eine signifikante Reduktion der Proliferation um 23% (LNCaP, $p \leq 0,01$) bzw. 46 % (PC3, $p \leq 0,05$) im Vergleich zur Kontrolltransfektion (siehe Abbildung 6).

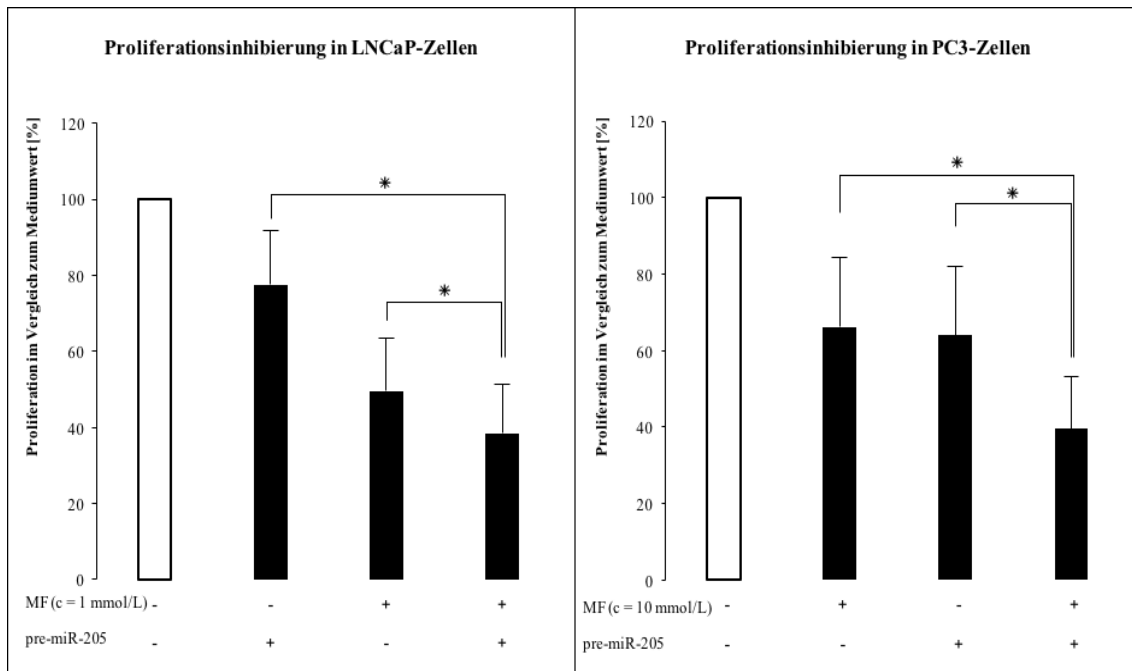


Abb. 6: Darstellung der Proliferation der PCa-Zelllinien LNCaP und PC3 6 Tage nach Metformingabe der jeweiligen Standardkonzentration und 7 Tage post transfectionem mit pre-miR-205. Für beide Substanzen ist der alleinige Effekt der Proliferationsinhibierung abgebildet, sowie der Effekt bei gleichzeitiger Gabe beider Tumorsuppressoren. Signifikanzen im student's t-Test wurden mit * ($p \leq 0.01$) dargestellt. Die Fehlerbalken setzen sich aus der Standardabweichung dreier untereinander unabhängiger Experimente zusammen.

4.2.4 Sensitivierung gegenüber Metformin nach transienter miR-205-Transfektion

Um zu untersuchen, ob eine Überexpression der microRNA-205 die Sensitivität von PCa-Zellen gegenüber Metformin verändert, wurden die beiden PCa-Zelllinien LNCaP und PC3 einen Tag nach der Transfektion mit pre-miR-205 zusätzlich mit Metformin der Konzentrationen 1 mmol/l (Standardkonzentration für LNCaP-Zellen) bzw. 10 mmol/l (Standardkonzentration für PC3-Zellen) behandelt.

Im Vergleich zur alleinigen Metformingabe der Konzentration 1 mmol/L wird die Proliferationsinhibierung von LNCaP-Zellen sechs Tage nach der Transfektion von pre-miRNA-205 im Sinne eines additiven Effekts der beiden tumorsuppressiven Wirkungen um 10 % verstärkt ($p \leq 0,01$). Die PC3-Zellen zeigen bei einer Metforminkonzentration von 10 mmol/L eine signifikante Wachstumsinhibierung um 36 % bei additiver transienter Transfektion von miR-205 ($p \leq 0,01$).

Wie in Abbildung 6 ersichtlich, lässt sich sowohl in LNCaP-Zellen als auch in PC3-Zellen ein additiver Effekt in der Wirkung von Metformin und pre-miR-205 beobachten. Eine durch die Transfektion von pre-miR-205 signifikant verstärkte

inhibitorische Wirkung von Metformin im Sinne einer Sensitivierung der Tumorzellen gegenüber Metformin lässt sich in keiner der beiden Zelllinien nachweisen.

4.2.5 MicroRNA-205-Induktion durch Metformin in PCa-Zelllinien

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Mechanismus der Proliferationsinhibierung durch Metformin und der Wirkung von microRNA-205 in PCa-Zellen aufzuzeigen, wurde in fünf unabhängigen qRT-PCR-Experimenten die Expression von microRNA-205 in den Zelllinien LNCaP und PC3 analysiert, nachdem diese 12, 24 und 48 Stunden lang mit Metformin in ihren jeweiligen Standardkonzentrationen (1 mmol/l bzw. 10 mmol/l) inkubiert wurden.

Die Beantwortung der Fragestellung, ob die microRNA-205-Expression durch Metformin über das Niveau der endogenen Expression hinaus erhöht werden kann, erfolgte in einer kinetischen Untersuchung. Im Abstand von 12, 24 und 48 Stunden nach der Metforminbehandlung wurde Zell-RNA isoliert und die microRNA-205-Expression analysiert.

Während in den PC3-Zellen zu keinem der drei Zeitpunkte eine signifikante Erhöhung der relativen microRNA-205-Expression beobachtet werden konnte, induzierte in den LNCaP-Zellen die 12-stündige Metforminbehandlung einen statistisch signifikanten Anstieg der Expression um 80 % ($p = 0,02$). Je länger die LNCaP-Zellen mit Metformin behandelt wurden, desto deutlicher illustrierte sich die Erhöhung der Expression bis zu einem Maximum von 180 % der Kontrolltransfektion, welches nach 48 Stunden erreicht wurde ($p \leq 0,01$, siehe Abbildung 7).

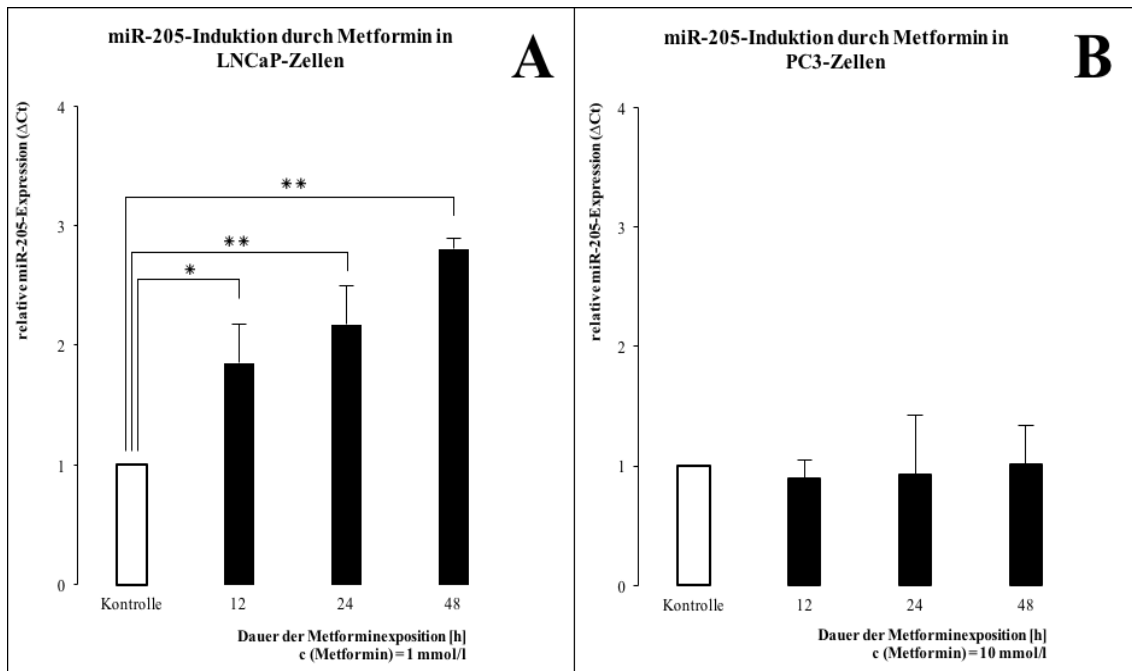


Abb. 7: Darstellung der miR-205-Expression in den PCa-Zelllinien LNCaP (A) und PC-3 (B) in Abhängigkeit der Dauer einer Metforminbehandlung. Die relative miR-205-Expression wurde in 3 voneinander unabhängigen qRT-PCR-Experimenten als ΔCt -Wert ermittelt, nachdem die Zellen 12, 24 und 48 Stunden lang Metformin der Konzentration 1 mmol/L bzw. 10 mmol/L ausgesetzt waren. Die relative miR-205-Expression der Kontrolle wurde auf den Wert 1 festgesetzt. Signifikanzen im student's t-Test wurden mit ** ($p \leq 0.01$) und * ($p \leq 0.05$) dargestellt. Die Fehlerbalken setzen sich aus der Standardabweichung der drei untereinander unabhängigen Experimente zusammen.

4.3 Einfluss von p53 auf die metforminvermittelte Proliferationsinhibierung in PCa-Zelllinien

Häufig findet sich bei maligne entarteten Zellen eine Mutation im Tumorsuppressorgen p53, welche die Expression eines funktionell intakten (wildtypischen) p53-Protein verhindert. Im Vergleich der beiden PCa-Zelllinien LNCaP und PC3 besteht ein wesentlicher Unterschied darin, dass LNCaP-Zellen das wildtypische Protein p53 aufweisen, wohingegen das Tumorsuppressorprotein in PC3-Zellen nicht in seiner Normalform exprimiert wird. Dieser Unterschied bietet einen Ansatz für die stärkere Proliferationsinhibierung durch Metformin in LNCaP-Zellen unter der Annahme, dass wildtypisches p53 in LNCaP-Zellen in seiner Eigenschaft als Transkriptionsfaktor in

der Signalkaskade von Metformin microRNA-205 hochreguliert und dadurch die antiproliferative Wirkung vermittelt.

Die folgenden Versuche untersuchen die Funktion von p53 an der metforminvermittelten Regulation der Expression von microRNA-205 und beschränken sich deshalb auf Experimente mit LNCaP-Zellen, deren microRNA-205-Expression im Gegensatz zu PC3-Zellen abhängig von Metformin reguliert wird (siehe Abbildung 8). Als Vergleich wird eine p53-spezifische siRNA transfiziert, die in LNCaP-Zellen die Expression von p53 herabregulieren soll. Eine Transfektion mit Kontroll-siRNA dient als Negativkontrolle.

4.3.1 Transfektionseffizienz nach transientser siRNA(p53) - Transfektion

Zur Bestätigung der erfolgreichen p53-Regulation durch die siRNA gegen p53 dienen drei unabhängige qRT-PCR-Messungen. Die transkriptionelle Expression von p53 im Vergleich zu kontrolltransfizierten LNCaP-Zellen sinkt um 35 %, $p \leq 0,01$, siehe Abbildung 8). Erwartungsgemäß hat die Transfektion der p53-spezifischen siRNA keinen Einfluss auf die p53-defizienten PC3-Zellen. Das Ergebnis ist exemplarisch in Figur B von Abbildung 8 gezeigt.

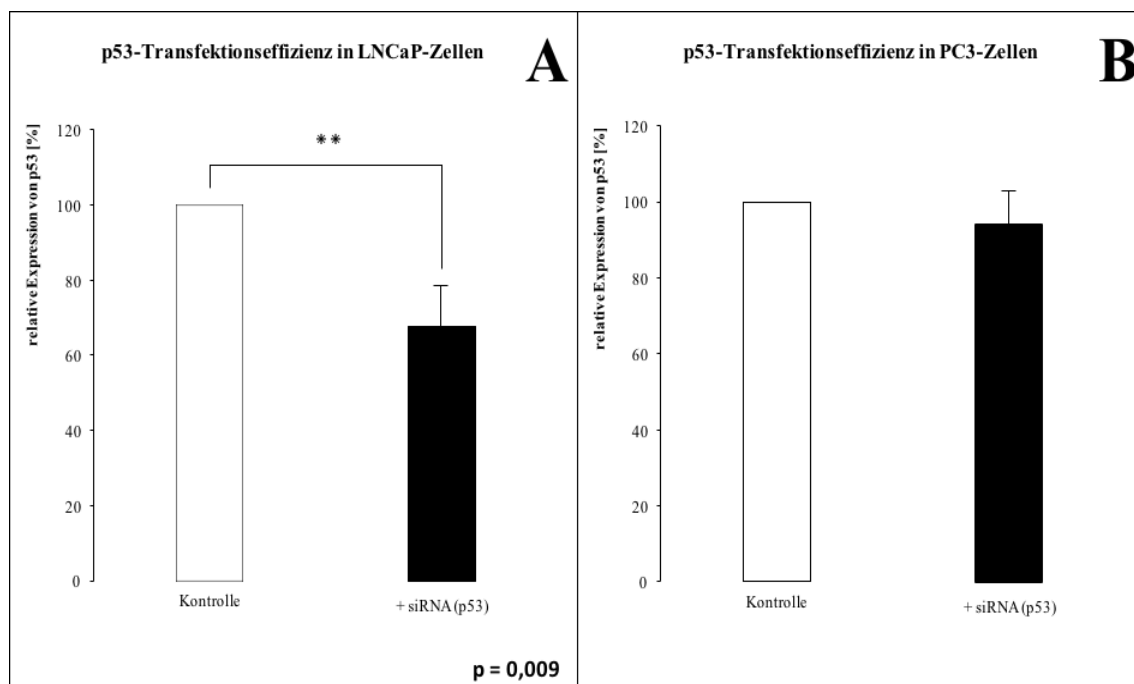


Abb. 8: Effizienz der p53-siRNA-Transfektion in LNCaP (Figur A) - und PC3-Zellen (Figur B). Die qRT-PCR-Daten für die relative p53-Expression (ΔCt) in kontrolltransfizierten LNCaP- und

PC3-Zellen wurde jeweils zu 100% festgesetzt. Gezeigt ist die dazu prozentuale p53-Expression in LNCaP- und PC3-Zellen nach p53-siRNA-Transfektion gemessen in 3 unabhängigen qRT-PCR-Experimenten. Signifikanzen im gepaarten student's t-Test wurden mit ** ($p \leq 0.01$) dargestellt. Die Fehlerbalken setzen sich aus der Standardabweichung dreier untereinander unabhängigen Experimente zusammen.

Durch die verwendete siRNA gegen p53 kann in LNCaP-Zellen die Expression von p53 signifikant erniedrigt werden. Die Ergebnisse dienen dazu, die Wirkung der siRNA zu bestätigen und somit eine verlässliche Interpretationsgrundlage für die nachfolgenden Experimente zu schaffen.

4.3.2 Induktion von p53 durch Metformin

Falls p53 eine Rolle in der metforminvermittelten Proliferationsinhibierung im PCa spielt, kann vermutet werden, dass Metformin verantwortlich ist für die Induktion und Aktivierung von p53. Nachdem eine effektive Herabregulierung von p53 durch die siRNA gezeigt werden konnte, soll zunächst untersucht werden, ob durch die Behandlung mit Metformin der Konzentration 1 mmol/L eine signifikante Expressionssteigerung von p53 erreicht wird. Dazu werden zwei Ansätze LNCaP-Zellen ausgesät, wovon einer mit Metformin der Konzentration 1 mmol/L über die Zeit von 48 Stunden inkubiert wird. Nach anschließender RNA-Isolierung wird die Expression von p53 mit der Mediumkontrolle verglichen und das Ergebnis der qRT-PCR-Messungen in Abbildung 9 dargestellt. Die erhaltenen Expressionswerte zeigen eine metformininduzierte Steigerung der p53-Expression um 26 % ($p < 0,05$).

Nach transients Herabregulation von p53 durch die spezifische siRNA ist eine erneute Hochregulation von p53 durch Metformin nicht mehr möglich.

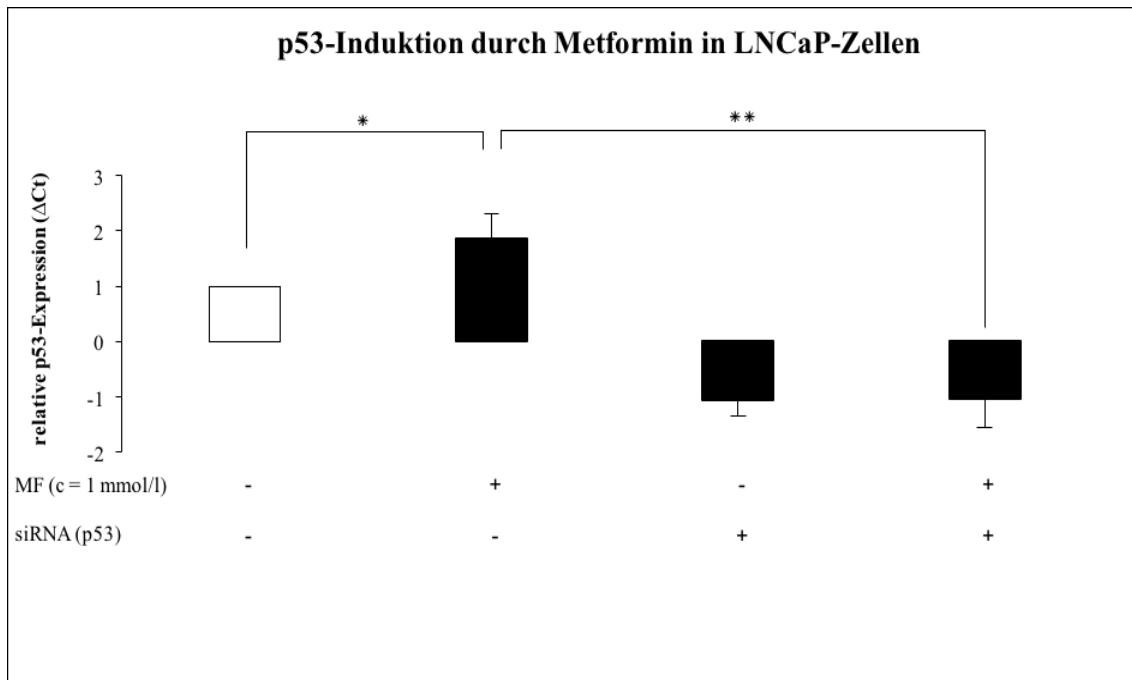


Abb. 9: Darstellung der relativen p53-Expression in LNCaP-Zellen. Gezeigt ist die Veränderung der p53-Expression in Abhängigkeit der endogenen p53-Expression in LNCaP-Zellen nach Gabe von Metformin der Dosis 1 mmol/L sowie nach zusätzlicher siRNA-Transfektion. Signifikanzen im student' s t-Test werden mit ** ($p \leq 0.01$) und * ($p \leq 0.05$) dargestellt. Die Fehlerbalken setzen sich aus der Standardabweichung dreier untereinander unabhängiger qRT-PCR-Experimente zusammen.

4.3.3 Einfluss von p53 auf die Aktivierung von miR-205

Aus diesen Beobachtungen könnte sich ableiten, dass die metforminvermittelte Induktion von microRNA-205 durch p53 beeinflusst wird und p53 im Sinne einer Transkriptionsregulation die Expression von microRNA-205 in LNCaP-Zellen erhöht. Folglich vergleicht das nächste Experiment p53-wildtypische LNCaP-Zellen mit transient siRNA-p53 transfizierten LNCaP-Zellen, die beide zwei Tage nach Transfektion mit Metformin behandelt werden. Gemessen wird die Expression von microRNA-205 in beiden Ansätzen. Durch die transiente Herabregulation von p53 in den LNCaP-Zellen soll aufgezeigt werden, ob die durch Metformin hervorgerufene Expressionserhöhung von microRNA-205 (siehe Kapitel 4.2.4) in Abhängigkeit von p53 erfolgt. Aus dem Experiment kann folgende Beobachtung gewonnen werden: eine Erhöhung der Expression von microRNA-205 durch die Gabe von 1 mmol/L Metformin wird in Gegenwart der siRNA-p53 unterdrückt. Die relative microRNA-205-Expression

erniedrigt sich um 60,2 % ($p \leq 0,01$) und fällt damit etwa auf die ursprüngliche microRNA-205-Expression in LNCaP-Zellen ab (siehe Abbildung 10).

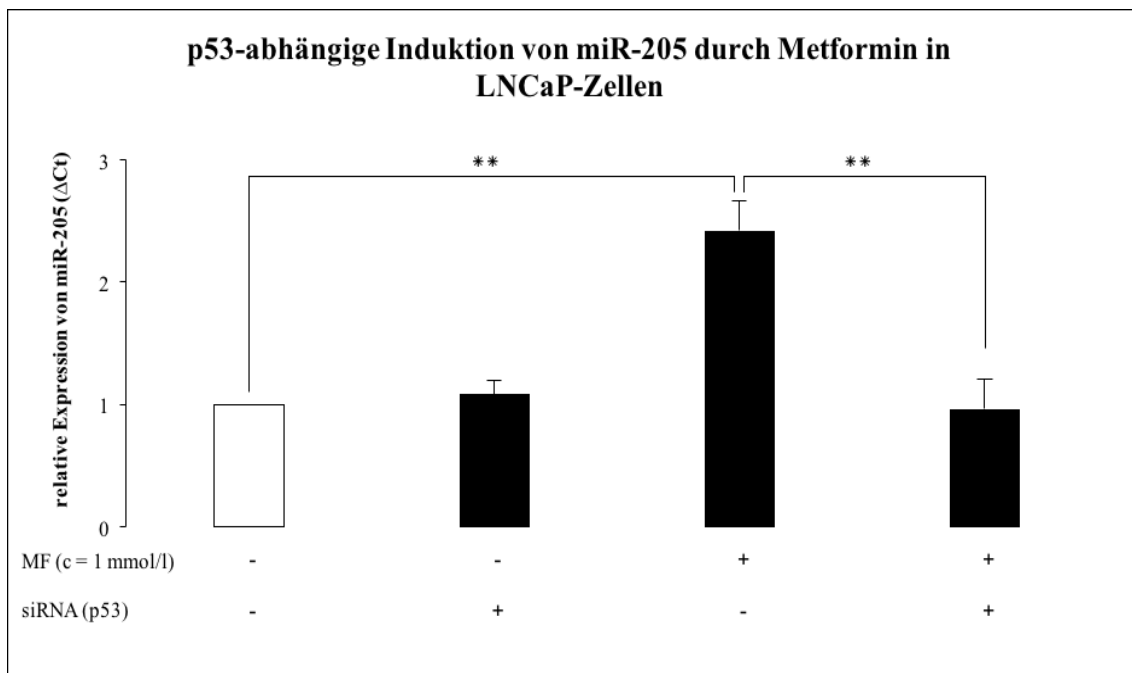


Abb. 10: Darstellung der relativen microRNA-205-Expression. Der Mediumkontrollwert dient als Vergleich zur microRNA-205-Expression nach Gabe von 1 mmol/L Metformin (siehe Kapitel 4.2.5). Die microRNA-205-Expression nach zusätzlicher Transfektion von siRNA gegen p53 ist in Balken 4 dargestellt. Signifikanzen im student's t-Test wurden mit ** ($p \leq 0.01$) dargestellt. Die Fehlerbalken setzen sich aus der Standardabweichung dreier untereinander unabhängigen qRT-PCR-Experimente zusammen.

4.3.4 Einfluss von p53 auf die Proliferation von LNCaP-Zellen nach Metforminbehandlung

Die Ergebnisse zur p53-vermittelten Proliferationsinhibierung durch Metformin werden im Folgenden am Zellmodell überprüft. Falls das Modell zur Proliferationsinhibierung in LNCaP-Zellen zutrifft und Metformin über eine Induktion und Aktivierung von p53 die Expression von microRNA-205 in den Zellen erhöht, müssen LNCaP-Zellen, die eine Herabregulation von p53 erfahren haben, eine erhöhte Resistenz gegenüber Metformin aufweisen.

Abbildung 11 zeigt, dass durch die Herabregulation von p53 der proliferationsinhibierende Einfluss von Metformin in LNCaP-Zellen abgeschwächt wird. So wachsen nach Gabe von 1 mmol/L Metformin p53-defiziente Zellen im Vergleich zu kontrolltransfizierten Zellen signifikant besser (27 %, $p \leq 0,05$).

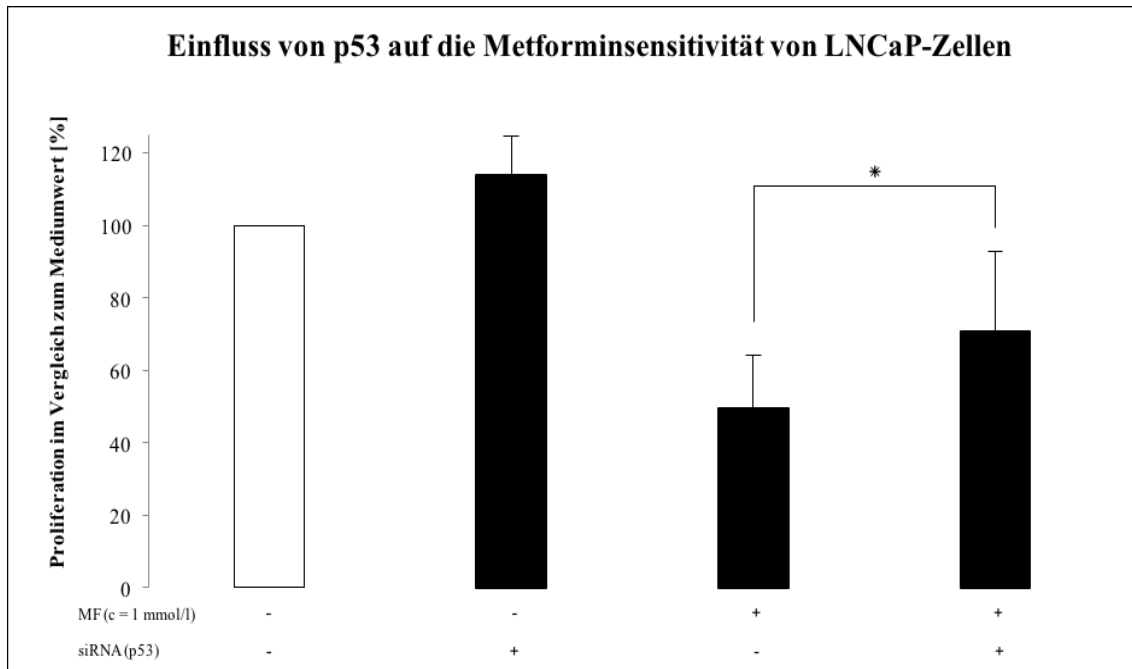


Abb. 11: Darstellung der prozentualen Proliferation von LNCaP-Zellen nach Metformingabe abhängig von der Transfektion von p53-siRNA. Gemessen wurde die Extinktion nach Zugabe des MTS-Reagenz im Monochromator fünf Tage nach der Metforminbehandlung. Die Signifikanz im student's t-Test wird mit * ($p \leq 0.05$) angegeben. Die Fehlerbalken setzen sich aus der Standardabweichung der drei untereinander unabhängigen Experimente zusammen.

4.4 EMT-Transformation von PCa-Zellen unter Einfluss von miR-205

Der Migrationsassay aus 4.1.3 wird durch die Transfektion von pre-miR-205 erweitert. Der Anteil migrierter LNCaP-Zellen erniedrigt sich signifikant um 26 %, nachdem die Expression von microRNA-205 transient angehoben wurde ($p < 0.01$, siehe Abbildung 12). Eine zusätzliche Behandlung der LNCaP-Zellen mit Metformin der Konzentration 1 mmol/L erniedrigt die Menge der LNCaP-Zellen, die innerhalb der Inkubationszeit von 12 Stunden die Migrationsmembran passieren, zusätzlich um 47,25 % ($p < 0.01$), was dem Ergebnis des Migrationsassays aus 4.1.3 entspricht. Beide Tumorsuppressoren addieren sich dementsprechend in ihrer Wirkung, das Migrationspotenzial von LNCaP-Zellen herabzusetzen.

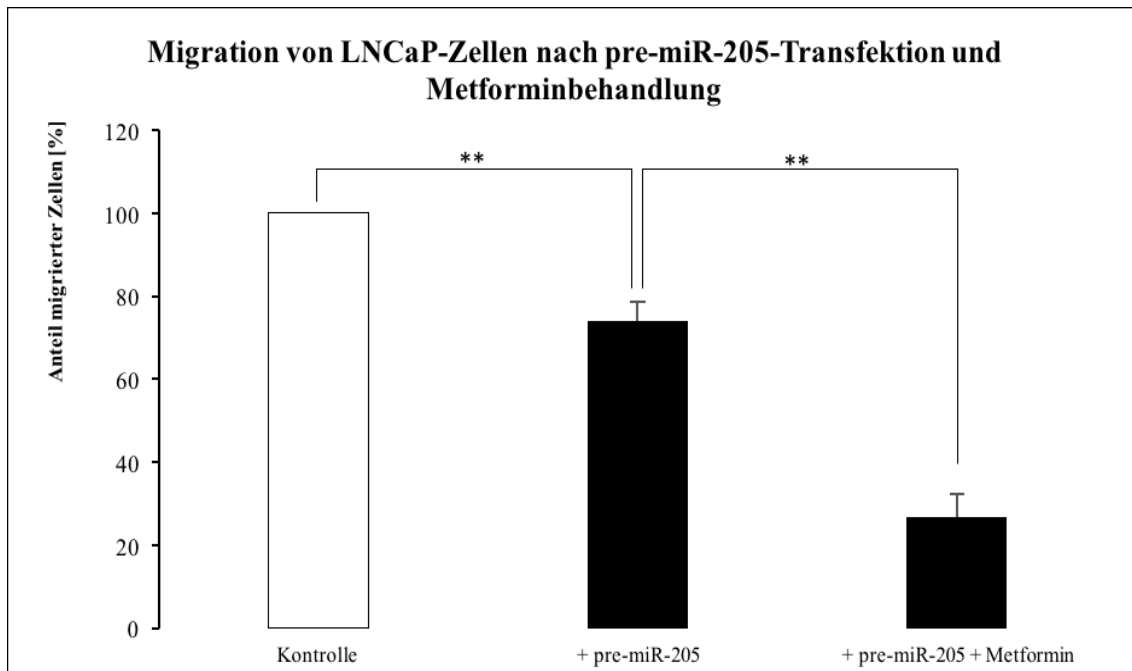


Abb. 12: Darstellung der prozentualen Migration von LNCaP-Zellen nach Transfektion von miR-205 und Metformingabe ($c = 1 \text{ mmol/L}$). Es wurde der jeweilige Anteil Tumorzellen ausgezählt, der eine Migrationsmembran innerhalb von 12 Stunden passierte. Als Vergleich dienen kontrolltransfizierte LNCaP-Zellen. Signifikanzen im student's t-Test werden mit ** ($p < 0.01$) angegeben. Die Fehlerbalken setzen sich aus der Standardabweichung der drei untereinander unabhängigen Experimente zusammen.

4.5 P53 als Transkriptionsfaktor des microRNA-205-Promotors

Es konnte in Vorarbeiten gezeigt werden, dass Metformin eine Rolle in der Aktivierung der HPR-Promotorregion von microRNA-205 spielt. HPR bezeichnet die Abkürzung für „highly likely predicted region“ und stellt jenen Abschnitt im Gen „LOC642587“ auf Chromosom 1 dar, der als potentielle Promotorregion für den Genlocus der microRNA-205 identifiziert wurde. Ebenso wurden bereits p53-Bindungsstellen in der microRNA-205-Promotorsequenz gefunden und mittels Affinitätsselektrophorese verifiziert.

4.5.1 HPR1-Promotorklonierung

HPR kann nochmals eingeteilt werden in zwei Bereiche HPR1 und HPR2. Unter Mitarbeit von Kathrin Borschert vom Theodor-Boveri-Instituts für Biowissenschaften in Würzburg konnte gezeigt werden, dass nur HPR1 im Dual Luciferase Assay nach

Transfektion in den Basisvektor pGL3 eine relevante Promotoraktivität aufweist. Die anschließenden Experimente basieren diesbezüglich ausschließlich auf der Klonierung von HPR1. Ein 26 bp langes HPR1-Fragment wurde mittels PCR mit denjenigen Primern amplifiziert, die die Restriktionsstellen *Nhe* I und *Xho* I des pGL3-Basisvektors (Promega) flankieren. Die erhaltenen Gensequenzen enthalten somit die Gensequenz von HPR1 sowie an den Enden die Überhänge von *Nhe* I und *Xho* I. Diese ermöglichen die Insertion in den pGL3-Basisvektor, der neben dem Luciferase-Gen des nordamerikanischen Leuchtkäfers *Photinus pyralis* auch ein Ampicillin-Resistenzgen zur Selektion der erfolgreich transformierten *E. coli*-Bakterien enthält. Das vermehrte DNA-Produkt wird isoliert und gemeinsam mit der im pRL-TK-Vektor (Ambion) enthaltenen Kontrollluciferase *Renilla* in LNCaP-Zellen transfiziert. Eine Normalisierung gegen *Renilla* gewährleistet eine verlässliche Auswertung der im Monochromator gemessenen Luciferase-Aktivität (siehe Kapitel 3.2.8).

4.5.2 MiR-205-Promotoraktivierung durch Metformin

Dual Luciferase Assays zielen darauf ab, unter Verwendung des Reportergensystems Luciferin die Aktivierung einer zuvor transfizierten Promotorsequenz sichtbar zu machen. In diesem Ansatz wurde der zuvor klonierte HPR1-Bereich in den promotorlosen Vektor pGL3 integriert, welcher das für den Versuch entscheidende Luciferase-Gen enthält. Diese Koppelung bewirkt bei Aktivierung des microRNA-205-Promotors HPR1 die Produktion von Luciferase. Dadurch wird dem Testsystem zugegebenes Luciferin zu Oxyluciferin decarboxyliert. Diese Reaktion wird von einer Chemolumineszenz begleitet, die im Monochromator detektiert wird. Durch die Normalisierung mittels der parallel gemessenen *Renilla*-Luciferase-Aktivität ergibt sich in Abbildung 13 die relative Luciferaseaktivität jedes Ansatzes als Maß für die Aktivierung des microRNA-205-Promotors.

Nach der Transfektion des pGL3-Vektors in LNCaP-Zellen wird ein Zellansatz mit Metformin der Konzentration 1 mmol/L behandelt und nach 48 Stunden die relative Luciferase-Aktivität in beiden Ansätzen verglichen. Die Gabe des Biguanids erhöht signifikant die Luciferaseaktivität im Dual Luciferase Assay um durchschnittlich das 3,1-fache ($p \leq 0,01$). Somit kann auf eine Aktivierung des microRNA-205-Promotors durch Metformin geschlossen werden.

Im nächsten Schritt wird die relative Luciferase-Aktivität in metforminbehandelten LNCaP-Zellen in Abhängigkeit einer zusätzlichen Herabregulation von p53 untersucht. Dazu wird die bereits in Kapitel 4.3.1 eingeführte siRNA transfiziert und transient die p53-Expression in den LNCaP-Zellen reduziert. Die durch Metformin induzierte Erhöhung der relativen Luciferase-Aktivität kann in p53-depletierten Zellen nicht mehr in gleichem Maße beobachtet werden. Die Promotoraktivierung wird auf 49% herabgesetzt ($p \leq 0,01$). Eine Synopse der Luciferasetests ist in Abbildung 13 dargestellt.

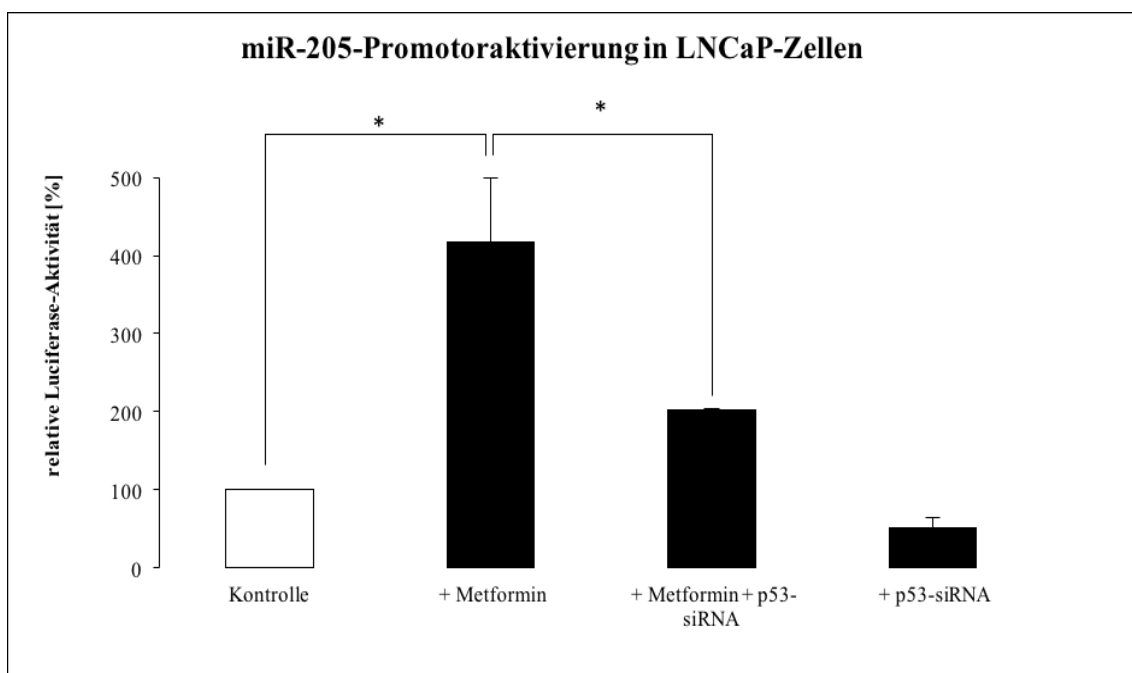


Abb. 13: Darstellung der relativen Luciferase-Aktivität im Dual Luciferase Assay in LNCaP-Zellen. Ausgehend vom Mediumkontrollwert ist die relative Luciferase-Aktivität nach der Gabe von 1 mmol/l Metformin (Balken 2) sowie der zusätzlichen Transfektion mit siRNA gegen p53 (Balken 3) angegeben. Balken 4 steht für die ausschließliche Transfektion mit siRNA gegen p53. Signifikanzen im student's t-Test wurden mit * ($p \leq 0.05$) dargestellt. Die Fehlerbalken setzen sich aus den Standardabweichungen dreier untereinander unabhängiger Luciferase-Experimente zusammen.

5 DISKUSSION

Das Prostatakarzinom (PCa) gilt als das häufigste Malignom und zugleich als eine der häufigsten Krebstodesursachen des älteren Mannes in Deutschland.¹ Neben den Therapiesäulen der radikalen Prostatektomie sowie der Strahlen- und Hormontherapie wird zunehmend auch das Biguanid Metformin als mögliches antineoplastisches Pharmakon diskutiert.⁴⁹⁻⁵² Es wird als First-Line-Medikament zur Behandlung des insulinunabhängigen Diabetes mellitus eingesetzt, wobei seine antihyperglykämische Wirkung hauptsächlich auf der Unterdrückung der hepatischen Glukoseproduktion sowie der Steigerung der Insulinsensitivität im peripheren Muskel- und Fettgewebe beruht.⁵³

Auch wenn seit einigen Jahren vermehrt Hinweise auf seine mögliche Rolle in der Tumorthherapie, im Speziellen des Prostatakarzinoms, existieren, bleibt der genaue Wirkungsmechanismus unklar. Dies motivierte uns zu Nachforschungen, die die beobachteten Effekte von Metformin im Prostatakarzinom auf molekularer Ebene erklären könnten.

5.1 Zelluläre Wirkungen von Metformin im Prostatakarzinom

Es sind verschiedene Möglichkeiten denkbar, wie Metformin das Tumorstadium beeinflussen kann. Zum einen kann Metformin die Tumorzelle direkt im Sinne eines zytotoxischen Effekts schädigen. Vermittelt wird die Zellreduktion hierbei z.B. durch die Induktion apoptotischer Signalkaskaden oder sie ist Resultat autophagischer Prozesse, die in der Zelle nach Metforminexposition aktiviert werden. Um einen zytostatischen Effekt handelt es sich, wenn Metformin die Proliferation verhindert, indem es störend in die Zellteilung eingreift und diese hemmt oder zum Stillstand bringt. Eine Zusammenfassung über die Vielzahl an wissenschaftlichen Arbeiten und Kenntnissen, die zu diesem Thema mittlerweile vorliegen, geben Whitburn et al. in einem Übersichtsartikel.⁵⁴ Darin wird deutlich, dass die pleiotropen Wirkungen von Metformin in ihrer Gesamtheit schwer zu erfassen sind, weshalb sich die vorliegende Arbeit vor allem auf die antiproliferativen Eigenschaften von Metformin konzentriert und untersucht, inwiefern verschiedene Prostatakarzinomzelllinien auf Metformin reagieren.

5.1.1 Metformin-vermittelte Proliferationsinhibierung in PCa-Zellen

Der Einfluss von Metformin auf die Proliferation von Tumorzellen kann labortechnisch auf unterschiedliche Art und Weise untersucht werden. Für die Analyse der Zellproliferation mittels MTS-Tests wurden drei verschiedene Prostatazelllinien verwendet, die sich in ihrem Malignitätsgrad unterscheiden. So stammen LNCaP-Zellen aus einer Lymphknotenmetastase eines Adenokarzinoms der Prostata und repräsentieren im Vergleich zu der PC-3 Zelllinie ein frühes Stadium der Metastasierung. Ein deutlich höheres malignes Potenzial wird den PC-3-Zellen zugeschrieben, die aus einer manifesten Knochenmetastase abstammen und im Gegensatz zu LNCaP-Zellen Androgen-unabhängig wachsen⁵⁵. Als nicht-maligne Vergleichszelllinie dienen die viral transformierten, epithelialen RWPE-1-Zellen.

Nach der Aussaat und Inkubation der drei Zelllinien erfolgte die Zugabe von Metformin. Der anschließend mittels MTS-Test gemessene Lumineszenzwert korreliert mit dem Anteil vitaler Zellen und lässt so eine Berechnung der Proliferation der verschiedenen Zellen in Kultur zu.

Am stärksten zeigte sich ein antiproliferativer Effekt in den LNCaP-Zellen, deren Anteil lebender Zellen bei einer Metforminkonzentration von 10 mmol/l um 84 % im Vergleich zur unbehandelten Zelle abnahm, wohingegen PC3-Zellen bei gleichen Versuchsbedingungen nur eine Reduktion um 32 % aufwiesen (jeweils $p \leq 0,01$). Benigne RWPE-1-Zellen nehmen mit einer Abnahme von 51 % ($p \leq 0,01$) eine Mittelstellung ein. Zusätzlich zur Erkenntnis, dass Metformin in allen Prostatakarzinomzellen zu einer Zellreduktion und einer Inhibition der Proliferation führt, zeigen sich somit Unterschiede in der Metforminsensitivität. Die vergleichsweise niedrigmalignen LNCaP-Zellen reagieren auf Metformingabe mit einer starken Abnahme der Zellzahl, während die höher malignen PC-3-Zellen gegenüber LNCaP-Zellen aber auch RWPE-1-Zellen geringere Proliferationsraten aufweisen und somit resistenter gegen Metformin erscheinen.

Um die Proliferationsraten zu bestimmen und zu vergleichen, wurden die MTS-Werte über den Zeitraum von fünf Tagen (z.B. Tag drei und Tag sieben nach Aussaat) analysiert. Ein möglicher zytotoxischer Effekt kann mittels MTS-Assay zu Beginn des Experiments untersucht werden, indem die MTS-Ergebnisse nach drei Tagen verglichen

werden. Hier zeigt sich in Metformin-behandelten PC3-Zellen im Vergleich zur Mediumkontrolle keine signifikante Reduktion der Zellzahl. Daher wird von uns vermutet, dass ein zytotoxischer Effekt von Metformin in den verwendeten Konzentrationen vernachlässigt werden kann.

Als wichtiger Surrogatmarker der Zellproliferation in anderen Studien dient das Protein Ki-67. Das entsprechende Gen wird ausschließlich in den aktiven Phasen des Zellzyklus exprimiert, wodurch es geeignet ist, die Wachstumsfraktion einer bestimmten Zellpopulation abzubilden.⁵⁶ In immunhistochemischen Assays an Tumorgewebe wird Ki-67 im PCa und Endometriumkarzinom nach Metformin-Monotherapie signifikant herabreguliert.^{28, 57} Dies bestätigt unsere Beobachtung, dass Metformin eine antiproliferative Wirkung auf PCa-Zellen besitzt.

Um die Unterschiede in der Metforminsensitivität der unterschiedlichen PCa-Zellen genauer zu untersuchen, wurde eine Dosis-Wirkungs-Beziehung erstellt, die den Anteil vitaler Zellen fünf Tage nach Metformingabe in Abhängigkeit der Metformindosis darstellt. Nach Titration der Metforminkonzentrationen in MTS-Experimenten erfolgt eine Proliferationsinhibierung in LNCaP-Zellen um 50 % (halbmaximale inhibitorische Konzentration) bei der Gabe von 0,72 mmol/l Metformin, wohingegen die halbmaximale Proliferationsinhibierung bei PC3-Zellen erst bei einer Konzentration von 27,4 mmol/l Metformin auftritt.

Um in den Zelllinien messbare Metformineffekte zu induzieren, wurde fortan in den Experimenten für LNCaP-Zellen die Metforminkonzentration 1 mmol/l gewählt während für PC-3-Zellen die Ausgangskonzentration von 10 mmol/l bestehen bleibt.

Bemerkenswert ist die Tatsache, dass sich LNCaP-Zellen sensitiver auf die Gabe von Metformin erweisen als benigne RWPE-1-Zellen (LC50-Wert: 0,72 mmol/l vs. 4,76 mmol/l). Aus dem gewählten Zellmodell kann sich erschließen, dass der beobachteten unterschiedlichen Sensitivität gegenüber Metformin ein tumorzelleigener Mechanismus zugrunde liegt, der in den nicht-maligne transformierten Prostatazellen nicht in gleicher Weise angesteuert wird. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass eine Metformin-basierte Tumorthherapie die Proliferation der Tumorzellen des Prostatakarzinoms *in vivo* hemmen könnte, ohne das Wachstum des epithelialen Drüsengewebes zu beeinträchtigen.

Zudem kann die beobachtete erhöhte Resistenz von PC3-Zellen so interpretiert werden, dass es zwischen verschiedenen Progressionsstufen des Prostatakarzinoms Unterschiede in der Metforminsensitivität geben könnte. Dies lässt die Vermutung zu, dass die Wirkung von Metformin im Verlauf des Tumorprogresses des Prostatakarzinoms abnimmt und somit eine Metformintherapie vor allem für wenig progressive Formen zu Beginn der Erkrankung sinnvoll erscheint. Diese Vermutung wird durch die Arbeit von Liu et al. unterstützt, die die größte Wirkung von Metformin in der Inhibition der Tumorprogression beginnend bei leichtgradiger prostatischer intraepithelialer Neoplasie (low-grade PIN) über high-grade PIN bis hin zum initialen Übergang in ein invasives Adenocarcinom beschreiben.⁵⁸

5.1.2 Die Rolle des Androgensignals für die Metforminwirkung im PCa

Für die unterschiedliche Metforminsensitivität der untersuchten Prostatakarzinomzelllinien kommen verschiedene Signaltransduktionsketten der Tumorzelle in Betracht, über die Metformin möglicherweise seine Wirkung entfaltet. Grundsätzlich existieren AMPK-abhängige Signalwege der Proteinbiosynthese und des Fettsäurestoffwechsels, eine Inhibition des für zellproliferative Vorgänge wichtigen mTOR/AKT-Signalwegs oder eine Hemmung des im Prostatakarzinom üblicherweise aktivierten Androgensignals. Aufgrund der Beobachtung, dass die androgenunabhängig wachsende PC3-Zelllinie eine erhöhte Resistenz gegenüber Metformin aufweist, wollten wir die Rolle des Androgensignals für die Metforminwirkung weiter untersuchen. Zudem ist bekannt, dass das Wachstum primärer Prostatakarzinome in der Regel stark androgenabhängig ist und daher eine Modulation der Metforminwirkung durch den Status des Androgensignals erwirkt wird.⁵⁹

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Zelllinien verglichen, die sich in Hinblick auf den Androgenrezeptorstatus unterscheiden. Die hormoninsensitiven PC3-Zellen sind signifikant resistenter gegenüber Metformin als die hormonsensitive LNCaP-Zelllinie. Da sich beide Zelllinien in ihrer Sensitivität gegenüber Metformin unterscheiden, liegt die Vermutung nahe, dass das Androgen-Signal eine wichtige Rolle in der Metforminwirkung besitzen könnte. Um die Auswirkungen des Androgensignals auf die Proliferationsinhibition exakter zu untersuchen, wurden die Proliferationsassays mit C4-2 Zellen, einer androgenrefraktären LNCaP-Variante durchgeführt. In dieser C4-2-

Zellreihe ruft Metformin eine den LNCaP-Zellen vergleichbare Proliferationsinhibierung hervor (LC50-Wert: 1,9 mmol/l). Dieses Ergebnis legt nahe, dass das Androgensignal entgegen unserer Vermutung keine entscheidende Rolle für die beobachtete Wirkung von Metformin in PCa-Zellen besitzt.

Wang et al. zeigten allerdings, dass ein entscheidender Teil der antineoplastischen Wirkung von Metformin auf der Herabregulation des Androgenrezeptors (AR) beruht.⁶⁰ Colquhoun et al. verglichen den Effekt von Metformin auf AR-positive und AR-negative Prostatakarzinomzellen und stellten fest, dass die Zellreduktion nach Metforminbehandlung bei AR-positiven Zellen vornehmlich auf Proliferationsinhibierung beruht, wohingegen in AR-negativen Zellen eine Apoptoseinduktion im Vordergrund steht.⁶¹ Beide Arbeiten stehen anscheinend somit in Widerspruch zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Womöglich ist nicht die konkrete Expression des Androgenrezeptors für die Wirkung von Metformin entscheidend, sondern die Weiterleitung des androgenen Signals. In unserem Modell könnte sich hierdurch erklären, weshalb die androgeninsensitivierten C4-2-Zellen im Vergleich zu unveränderten LNCaP-Zellen keinen Unterschied in der Metforminsensitivität zeigen, unabhängig von der Expression des Androgenrezeptors. Eine abschließende Erklärung, inwiefern das Androgensignal die Metforminwirkung reguliert, steht jedoch nicht im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit und wurde daher nicht abschließend untersucht.

Die Ergebnisse im verwendeten Zellmodell zeigen allerdings, dass die Sensitivität gegenüber Metformin nicht primär durch einen Einfluss des Androgenrezeptorsignals erklärt werden kann. Die unterschiedlichen Sensitivitäten gegenüber Metformin scheinen somit im PCa auch über alternative Signaltransduktionsketten kontrolliert zu werden.

5.1.3 Apoptoseinduktion durch Metformin in PCa-Zellen

Um zu untersuchen, mit welchen molekularen Mechanismen die Inhibierung der Proliferation verknüpft ist, sollte eine mögliche Induktion der Apoptose analysiert werden. Unter Berücksichtigung des Mitochondriums als seine vornehmliche Zielstruktur liegt es nahe, mutmaßliche apoptotische Effekte von Metformin an der veränderten Expression pro- und antiapoptotischer Faktoren im Zytosol festzumachen.

Zhen-Yuan Gao et al. beobachteten in den menschlichen Brustkrebszelllinien MDA-MB-231 und MDA-MB-435 eine signifikante Erhöhung des BAX/BCL-2-Quotienten nach Metforminbehandlung als Ausdruck der Apoptoseinduktion.⁶² Das daraufhin freigesetzte Cytochrom c formiert sich mit dem apoptotic-protease-activating-factor-1 (Apaf-1) zum Apoptosomkomplex und proteolysiert die Pro-Caspase-9 und im weiteren Verlauf die Pro-Caspasen 3 und 7, welche als Proteasen für die Initiierung der Apoptose sowohl in Tumorzellen als auch in benignen Zellen verantwortlich sind.⁶³ Auf Veränderungen in dieser Apoptosekaskade basieren die experimentellen Untersuchungen zur Apoptoseinduktion durch Metformin in der vorliegenden Arbeit.

Die Caspasen 3 und 7 gehören zu den sogenannten humanen Effektor-Caspasen, die maßgeblich an der Ausführung der Apoptose in menschlichen Zellen beteiligt sind. Dennoch erhebt dieses Experiment keinen Anspruch auf eine vollständige Evaluation der metforminabhängigen Apoptose in PCa-Zelllinien, da innerhalb der Apoptosekaskade eine Vielzahl von Enzymen Einfluss nimmt, die durch den Test nicht erfasst werden. So wird im vorliegenden Testverfahren eine gemeinsame Endstrecke verschiedener Apoptose auslösender Signalkaskaden betrachtet. So ist die Apoptoseinduktion nicht ausschließlich Caspase-3-abhängig, sondern kann auch über Ligandenbindung an Rezeptoren der TNF-Familie (z. B. TRAIL (tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand) in Gang gesetzt werden. Für diesen Weg ist überdies bekannt, dass Metformin im Kolonkarzinom die Apoptoseinduktion verstärken kann.⁶⁴ Unlängst wird der oben genannten AMP-aktivierten Kinase (AMPK) eine Rolle in apoptoseregulierenden Prozessen zugeschrieben, ohne die Signaltransduktionskette genau zu kennen.⁶⁵ Metformin könnte demnach über die Aktivierung von AMPK entscheidend an der Apoptoseinduktion in PCa-Zelllinien mitwirken.⁵⁷ Pennanen et. al. untersuchten die apoptotische Wirkung von Metformin anhand Zellfärbungen mit Annexin und konnten eine Apoptoseinduktion durch Metformin in LNCaP-Zellen feststellen.⁶⁶

Um im benutzten Zellmodell die Bedeutung der Apoptose zu analysieren, wurden die Tumorzelllinien LNCaP und PC3 in 96-Well-Platten ausgesät und mit Metformin der Konzentrationen 1 bzw. 10 mmol/l behandelt. Nach Metformingabe wurde die Aktivität der Caspasen 3 und 7 im Caspase-Glo[®] 3/7-Assay gemessen. In der vorliegenden Arbeit kann ein Einfluss von Metformin in den beschriebenen Konzentrationen auf die

Apoptose in PCa-Zelllinien nicht beobachtet werden. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der Arbeit von Ben Sahra et al., der in seiner Arbeit ebenso keine signifikant erhöhte Apoptoserate in LNCaP-Zellen bei Gabe von Metformin in vergleichbarer Konzentration nachweisen konnte.⁶⁷

Obwohl die Ergebnisse in der Literatur insgesamt kein klares Bild zur Bedeutung der Apoptose für die antiproliferative Wirkung von Metformin in PCa-Zellen ergeben, konnte im verwendeten in vitro-Modell dargestellt werden, dass sich der antiproliferative Effekt von Metformin nicht wesentlich auf die Induktion von Apoptose zurückführen lässt.

In der Literatur finden sich Untersuchungen zu anderen möglichen zellulären Wirkungsweisen von Metformin auf PCa-Zelllinien. Beispielsweise gilt Metformin als Inhibitor autophagischer Prozesse, die auch in Tumorzellen über die Eliminierung toxischer Substanzen zu Zellhomöostase und Zellüberleben beitragen.⁶⁸ Ob diese Prozesse eine wesentliche Rolle für die antiproliferative Funktion von Metformin in PCa-Zellen besitzt, sollte in weiterführenden Versuchen untersucht werden.

5.2 Molekulare Mechanismen der Metforminwirkung im PCa

Unsere Analysen der zellbiologischen Funktion von Metformin in Prostatakarzinomzellen zeigen zusammenfassend, dass Metformin einen antiproliferativen Effekt ausübt, der in den verschiedenen PCa-Zelllinien unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Ziel ist es nun, die beobachteten Unterschiede in der Metforminsensitivität der einzelnen Zelllinien molekularbiologisch zu untersuchen.

5.2.1 Die Rolle von p53 in der Vermittlung der Wirkung von Metformin

Die molekulare Wirkung von Metformin ist eng verknüpft mit der Phosphorylierung von AMPK, die in aktiviertem Zustand eine wichtige Rolle in der Proliferationsinhibierung im Prostatakarzinom spielt.⁵⁷ Eine entscheidende Funktion der aktivierten AMPK im Zusammenhang mit der Proliferationsinhibierung im Prostatakarzinom ist die Phosphorylierung von p53.⁶⁹ Die Aktivierung von p53 stellt einen wichtigen Schritt der AMPK-vermittelten Arretierung des Zellzyklus und somit der Zellproliferation dar. Eine Signalkaskade, die im Prostatakarzinom zur

metforminvermittelten Proliferationsinhibierung führt, könnte demnach über die Phosphorylierung von AMPK und die konsekutive Aktivierung von wildtypischem p53 führen. Die unterschiedliche Metforminsensitivität von LNCaP- und PC3-Zellen korreliert interessanterweise mit dem p53-Status der Tumorzelllinien, da LNCaP-Zellen im Gegensatz zu p53-mutierten PC3-Zellen noch p53-wildtypisch sind. Diese Beobachtung im Kontext mit der bekannten AMPK-vermittelten Signalkaskade durch Metformin führt uns zu der Vermutung, dass p53 für die beschriebenen Unterschiede in der Sensitivität gegenüber Metformin eine wichtige Rolle spielt.

Wir haben versucht, uns dieser These weiter zu nähern, indem wir zunächst die p53-Expression in Abhängigkeit von Metformin untersuchten. Die Gabe von 1 mmol/L Metformin bewirkte in LNCaP-Zellen eine signifikante Erhöhung der p53-Expression um 26%. Unterstützt wird dieses Ergebnis durch Arbeiten von Ben Sahra et al., die ebenfalls in LNCaP-Zellen nach Metforminbehandlung eine moderate Erhöhung der p53-Expression nachweisen konnten.⁶⁷ Zudem implizieren die Arbeiten von Zhang et al. indirekt einen Zusammenhang zwischen Metformin und p53 im Prostatakarzinom, indem sie eine Potenzierung der Inhibition der oxidativen Phosphorylierung durch Metformin nach Gabe von p53-Stabilisatoren aufzeigen konnten.⁷⁰

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass der Tumorsuppressor p53 eine wesentliche Rolle in der metforminvermittelten molekularen Signalkaskade in PCa-Zellen spielen könnte. Dies motivierte uns, dieser Vermutung weiter nachzugehen.

5.2.2 MicroRNAs als Vermittler der Metforminwirkung im PCa

Bisher wenig verstanden ist, wie ein durch Metformin induziertes Signal molekular weitergeleitet wird. Aufbauend auf der beschriebenen Bedeutung von p53 in diesem Zusammenhang könnte eine p53-abhängige Regulation von microRNAs gesehen werden. Es ist in der Literatur sowohl für Metformin als auch p53 bekannt, dass sie die Expression verschiedener microRNAs verändern können.^{71,72}

MicroRNAs sind nichtcodierende, wenige Basenpaare lange Ribonukleinsäuren, die eine wichtige Funktion insbesondere in der posttranskriptionellen Stilllegung von Genen spielen, und somit je nach Zielstruktur tumorsuppressive oder onkogene Wirkungen entfalten.³²

Bao et al. gelangten durch Forschungsarbeiten zum Pankreaskarzinom zu der Erkenntnis, dass Metformin dosisabhängig zu einer Expression verschiedener microRNAs führt.³⁰ Ebenso konnten in Magenkarzinomzellen zahlreiche microRNAs identifiziert werden, die mit der antineoplastischen Wirkung von Metformin assoziiert werden. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* induziert das Biguanid in diesen Tumorzellen eine gegenüber der Kontrolle signifikant höhere Expression tumorsuppressiver microRNAs.³¹

Zusammenfassend könnte die Funktion von Metformin auf Tumorzellen mit Veränderungen des microRNA-Expressionslevels in Verbindung zu stehen.

Für die vorliegende Dissertation wird die Arbeitshypothese entworfen, dass die Expression proliferationsbeeinflussender microRNAs im Prostatakarzinom über Metformin in einer p53-vermittelten Art und Weise reguliert wird.

Zur Identifikation einer metforminregulierten microRNA wurden qRT-PCR-Experimente mit einer Auswahl verschiedener microRNAs durchgeführt, die allesamt in der Entstehung des Prostatakarzinoms eine Rolle spielen (miR-21, miR-221, let7b, miR-203, miR-205).^{73, 74} Es wurden LNCaP-Zellen mit Metformin der Konzentration 1 mmol/l behandelt.

Die Expressionsanalyse ergab, dass einzig die microRNA-205 eine signifikante Erhöhung der Expression nach Metformingabe aufweist. Im Gegensatz dazu hat die Metformingabe auf das Expressionsmuster der anderen untersuchten microRNAs in den gezeigten Versuchen keinen signifikanten Einfluss. Im Speziellen ist dieses Ergebnis für microRNA-221 nicht unerwartet, da in der Literatur bekannt ist, dass microRNA-221 endogen in LNCaP- und PC3-Zellen des Prostatakarzinoms bereits hoch exprimiert wird und über Metformin eine weitere Expressionserhöhung nicht zu erwarten ist.⁷⁵ Ebenso gilt im Kontext der Prostatakarzinom-entstehung microRNA-21 als onkogener Faktor, da deren Expressionslevel im Prostatakarzinom regelhaft erhöht ist und auf diese Weise Wachstum und Überleben der Tumorzellen befördert.⁷⁶

Um dieses Ergebnis zu verifizieren, wurde die Expression von microRNA-205 in einer kinetischen Analyse untersucht.

p53-wildtypische LNCaP-Zellen wurden mit Metformin in den Konzentrationen 1 bzw. 10 mmol/l versetzt und jeweils 12, 24 und 48 Stunden lang inkubiert. Die größte Erhöhung der microRNA-205-Expression wird nach 48 Stunden Metforminbehandlung

in den LNCaP-Zellen erreicht und beträgt 180 % des Mediumkontrollwertes. Auch bei kürzerer Dauer der Metforminbehandlung kann eine signifikante Expressionserhöhung beobachtet werden.

Um den Einfluss von p53 auf die Induktion der microRNA-205 zu untersuchen, wurden identische Analysen mit p53-defizienten PC3-Zellen durchgeführt. Interessanterweise wird microRNA-205 in PC3-Zellen zu keinem untersuchten Zeitpunkt des Experiments induziert. Zusammenfassend kann man aus diesen Experimenten schließen, dass die microRNA-205 eine wichtige Rolle in der metformininduzierten Signalkaskade spielt und dass ein funktional aktives p53 für die metformininduzierte microRNA-205-Expression notwendig ist.

Die beobachtete Metforminresistenz von PC3-Zellen könnte somit u.a. darin begründet sein, dass in PC3-Zellen durch die Metformingabe keine p53-vermittelte Expressionserhöhung des Tumorsuppressors microRNA-205 erzielt werden kann.

5.2.3 MicroRNA-205-Expression in Abhängigkeit von p53

Im nächsten Schritt sollte daher in LNCaP-Zellen das p53-Protein herabreguliert und unter diesen Bedingungen die microRNA-205-Expression nach Metformingabe erneut untersucht werden. Hierzu wurde eine p53-spezifische „small interfering RNA“, im weiteren Verlauf als p53-siRNA bezeichnet, eingesetzt, die nach transienter Transfektion in LNCaP-Zellen gezielt die p53-Genexpression um etwa 35 % unterdrückt.

Sowohl kontrolltransfizierte als auch p53-siRNA-transfizierte LNCaP-Zellen wurden mit Metformin behandelt und nach RNA-Isolierung mittels qRT-PCR auf ihren microRNA-205-Expressionsstatus untersucht. In den transient p53-herabregulierten LNCaP-Zellen führte die Metformingabe nicht mehr zu einer relevanten microRNA-205-Überexpression (Reduktion der Expression um 60,2 % im Vergleich zur alleinigen Metformingabe, $p \leq 0,01$).

Der Versuch zeigt, dass in PCa-Zellen, in denen p53 herunterreguliert wurde, nur noch eine reduzierte Expression von microRNA-205 stattfindet, wodurch die Bedeutung von p53 für die metforminvermittelte Induktion von microRNA-205 bestätigt wird.

5.2.4 p53 als Transkriptionsfaktor der microRNA-205

Unsere Arbeiten zeigen, dass Metformin via p53 die Expression von microRNA-205 induziert. Um die molekularen Mechanismen zu verstehen, wie p53 als Transkriptionsfaktor eine direkte Regulation der Expression von microRNA-205 ausübt, dient eine wichtige Vorarbeit von Bhatnagar et al. In dieser Studie wurde eine potentielle Promotor-Region von microRNA-205 identifiziert.⁴³ Eine dort beschriebene sogenannte CpG-Insel lässt die Lokalisation des microRNA-205-Promotors vermuten (im Folgenden als HPR für „highly likely predicted region“ genannt) und liefert gleichzeitig eine molekularbiologische Erklärung für die Herabregulation der microRNA-205 im Tumorgewebe als Folge einer CpG-Hypermethylierung.⁴³

Interessanterweise wurden p53-Bindungsstellen im microRNA-205-Promotor postuliert.⁷⁷ Mittels *electrophoretic mobility shift assay* (EMSA) wurde zudem gezeigt, dass die Bindung von rekombinantem p53-Protein an einen Nukleotidprimer mit der Aminosäuresequenz des Promotors erfolgt.⁴³

Zusammenfassend legt diese Studie nahe, dass p53 in seiner Eigenschaft als Transkriptionsfaktor in der Lage ist, tatsächlich an die microRNA-205-Promotorregion zu binden und die microRNA-205-Expression zu regulieren. Im Kontext mit den in der Arbeit beschriebene Daten lassen diese Beobachtungen vermuten, dass Metformin über p53 die Expression von microRNA-205 regulieren könnte.

Um nachzuprüfen, ob Metformin tatsächlich p53-vermittelt den microRNA-205-Promotor aktiviert, wurde die potentielle Promotorregion in einen Luciferasevektor kloniert, um die Funktion dieser Region in einem Dual Luciferase Assay analysieren zu können. Nach Metformingabe erhöht sich erwartungsgemäß die relative Luciferaseaktivität signifikant, entsprechend einer Aktivierung des microRNA-205-Promotors durch Metformin. Transfiziert man in diese Zellen noch p53-siRNA, wird die metforminvermittelte Aktivierung der Promotorregion signifikant reduziert. Metformin kann demnach den Promotor effizient nur in Anwesenheit von p53 aktivieren. Dadurch konnten wir die Bedeutung von p53 als Aktivator der Transkription von microRNA-205 durch Metformin nachweisen.

Unser Ergebnis wird durch Daten aus der Literatur unterstützt. Piovan et al. zeigten für das triple-negative Mammakarzinom, dass die dort tumorsuppressive microRNA-205 direkt über p53 induziert werden kann.⁷⁷

5.3 MicroRNA-205 als Effektor der Metforminwirkung im Prostatakarzinom

In Prostatakarzinomzelllinien zeigt sich microRNA-205 herabreguliert und wird deswegen in dieser Entität als Tumorsuppressor klassifiziert. Aus unseren Arbeiten wissen wir, dass Metformin über einen p53-abhängigen Signalweg in der Lage ist, die Expression von microRNA-205 zu erhöhen.

Im Folgenden soll daher auf die Bedeutung von microRNA-205 für die Entstehung und Progression des Prostatakarzinoms eingegangen werden.

MicroRNA-205 entfaltet ihre Wirkung durch posttranskriptionelle Inhibition der Expression ihrer Zielgene. Damit microRNA-205 als Mediator der Metforminwirkung im Prostatakarzinom in Betracht kommen kann, muss eine Reexpression von microRNA-205 zu einer Herabregulation von Genen führen, die in der Tumorigenese eine Rolle spielen und eine onkogene Wirkung im Prostatakarzinom entfalten. Wang et al. identifizierten z. B. das Protoonkogen SRC als direktes Target von microRNA-205, infolge dessen unter anderem der FAK/Src-Signalweg und die damit verbundene Aktivierung von Akt inhibiert wurden.^{44, 78}

Weitere Targets, die direkt von microRNA-205 reguliert werden und in der Tumorentstehung und Progression im PCa eine Rolle spielen, wurden von Hagman et al.⁷⁹ beschrieben: CREB3 in der MAPK/ERK-Signaltransduktion und Proteine im IL-6-Signalweg, die als Vermittler der Tumorentzündung im Mikromilieu des Prostatakarzinoms von Bedeutung sind.⁸⁰

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte eine hochkonservierte microRNA-205-Bindungsstelle in der 3'UTR von HER3-mRNA gefunden werden. Außerdem wurde bestätigt, dass microRNA-205 in PCa-Zellen HER-3 signifikant herabreguliert. Ein mutmaßlicher tumorsuppressiver Signalweg sieht hier wie folgt aus: microRNA-205 verhindert die Aktivierung von HER-3 durch den HER3/HER2-Komplex. Dadurch wird die Kopplung an die Phosphoinositid-3-Kinase (PI-3-Kinase) durch die p85-Untereinheit der selbigen herabgesetzt. Die katalytische p110-Untereinheit der PI-3-

Kinase verliert ihre aktivierende Wirkung auf AKT, was zur Proliferationsinhibition der Tumorzelle führt.⁸¹

Des Weiteren wurde auch das Zinkfingerproteins ZEB1, welches in der PCa-Metastasierung eine Rolle spielt, als potentiell microRNA-205-Zielgen postuliert und experimentell bestätigt.^{82, 83}

In Prostatakarzinomzelllinien konnten über computerassistierte Analysen zu Bindungssequenzen eine Anzahl weiterer Gene identifiziert und teilweise anschließend verifiziert werden, die über ihre jeweiligen Signalwege der tumorsuppressiven Wirkung von microRNA-205 gegenüberstehen.^{44, 84}

Entscheidend für meine Fragestellung ist insbesondere, ob die zellbiologischen Effekte, die microRNA-205 über die Regulation ihrer Targets ausübt, die beobachtete Wirkung von Metformin erklären können.

5.3.1 Zellproliferation nach microRNA-205-Reexpression

Falls microRNA-205 ein entscheidender Faktor in der metforminvermittelten Proliferationsinhibition in Prostatakarzinomzelllinien darstellt, sollte eine Überexpression von microRNA-205 analog zur Metforminwirkung zu einer Proliferationsinhibition führen.

Ob microRNA-205 Einfluss auf das Wachstum von PCa-Zelllinien besitzt, wird allerdings kontrovers diskutiert. Gandellini et al. konnten in ihrer Arbeit keine signifikante Inhibition der Zellproliferation von Prostatakarzinomzellen finden, in denen transient die Expression von microRNA-205 erhöht wurde.⁸⁵

Wang et al. hingegen publizierten verschiedene Untersuchungen zur Rolle von microRNA-205 in den PCa-Zelllinien PC-3 und DU-145 und konnten als Ausdruck der Proliferationsinhibition eine Abnahme der immunhistochemischen Ki67-Expression nach transienter Transfektion von microRNA-205 in beiden Zelllinien feststellen.⁴⁴

In Vorarbeiten unserer Forschungsgruppe erhöhten Kalogirou et al. in LNCaP- sowie PC3-Zellen die Expression der herabregulierten microRNA-205 mittels einer geeigneten pre-miR-205 und beobachteten eine signifikante Proliferationsinhibition in LNCaP- und PC3-Zellen.⁴²

Diese proliferationsinhibierende Wirkung der microRNA-205-Regulation konnte durch die vorliegende Arbeit in LNCaP- und PC3-Zellen bestätigt werden. Es wurden

Proliferationsassays für beide Zelllinien durchgeführt, nachdem eine geeignete pre-miR-205 transient in die Zellen transfiziert wurde. Eine Verminderung der Zellproliferation um 23% in LNCaP-Zellen bzw. 46 % in PC-3-Zellen wurde in MTS-Experimenten gemessen. Zellbiologisch beobachten wir nach transients Überexpression von microRNA-205 in Prostatakarzinomzelllinien eine signifikante Proliferationsinhibition sowohl in LNCaP-Zellen als auch in PC3-Zellen.

Die abgeschwächte Wirkung von Metformin in PC3-Zellen scheint sich demnach nicht dadurch zu begründen, dass für microRNA-205 ein grundsätzlich anderer Wirkmechanismus existiert als in LNCaP-Zellen. Vielmehr ist Metformin in PC3-Zellen nicht mehr in der Lage, die Expression von microRNA-205 in dem Maße zu erhöhen, dass ein vergleichbarer proliferationsinhibierender Effekt auftritt wie in LNCaP-Zellen. Dieser offenbart sich erst, wenn durch Überexpression von microRNA-205 die gemeinsame Endstrecke der antiproliferativen Wirkung von Metformin in beiden Zelllinien aktiviert wird.

Eine Erklärung der antiproliferativen Wirkung von Metformin über die Funktion der regulierten microRNA-205 ist zudem naheliegend, da viele molekulare Targets von microRNA-205 in Signalwege eingebunden sind, die die Tumorzellproliferation im Prostatakarzinom vorantreiben, wie beispielsweise das oben erwähnte Protoonkogen SRC im FAK/Src-Signalweg sowie Proteine des MAPK/ERK-Signalwegs.

Falls das postulierte Modell zur Proliferationsinhibition in LNCaP-Zellen zutrifft und Metformin über eine Aktivierung von p53 die Expression von microRNA-205 in den Zellen erhöht, müssen LNCaP-Zellen, die eine Herabregulation von p53 erfahren haben, eine erhöhte Resistenz gegenüber Metformin aufweisen. In der Tat ließ sich durch Transfektion von p53-siRNA die Metforminwirkung in LNCaP-Zellen abschwächen. Ohne p53 als wichtigen Vermittler der Metforminwirkung zeigen LNCaP-Zellen eine höhere Resistenz gegenüber Metformin, die in einer höheren Proliferationsrate im Vergleich zu LNCaP-Zellen nach ausschließlicher Metforminbehandlung resultiert.

5.3.2 Zellmigration nach microRNA-205-Reexpression

Neben der Proliferationsinhibierung hat Metformin auch eine wichtige Funktion im Metastasierungspotenzial des Prostatakarzinoms.⁸⁶ Durchgeführt wurde ein Migrationsassay, wobei nach Metformingabe signifikant weniger LNCaP-Zellen in der Lage waren zu migrieren. Der Versuch wurde mit microRNA-205-überexprimierenden LNCaP-Zellen wiederholt. Die alleinige Überexpression von microRNA-205 in LNCaP-Zellen verringerte signifikant die Anzahl migrierter Zellen um 26 %, wohingegen ein überadditiver, proliferationsinhibierender Effekt bei gleichzeitiger Gabe von pre-miR-205 und Metformin nicht beobachtet werden konnte.

Als Modellversuch für die Metastasierung von Tumorzellen könnte dies bedeuten, dass Metformin nicht nur die initiale Karzinogenese inhibiert, sondern über microRNA-205 auch in der Lage ist, Tumormetastasierung negativ zu beeinflussen. Aus dem vereinfachten Zellmodell könnte sich ableiten, dass besonders im metastasierten Stadium der Tumorerkrankung eine Behandlung mit Metformin vorteilhaft wäre.

Diese Beobachtung wird unterstützt, da bekannt ist, dass microRNA-205 ZEB1 negativ reguliert. ZEB1 ist ein Zinkfingerprotein, das in Prostatakarzinomzellen unter anderem die Transformation epithelial differenzierter Tumorzellen zu mesenchymalen, aus dem Epithelverband gelösten Tumorzellen fördert und dadurch die Metastasierungstendenz von Prostatakarzinomzellen begünstigt.⁸⁷ Forschungsarbeiten von Gandellini und Tucci et al. bestätigen den Einfluss von microRNA-205 auf die Expression von ZEB1 und die Migration von PCa-Zelllinien.^{85, 88}

Interessanterweise konnte für den antimetastatischen Effekt von Metformin ebenfalls eine molekulare Erklärung gefunden werden. In Glioblastom- und Brustkrebszelllinien wurde die Herabregulation von ZEB1 durch Metformin über die mTOR-Signaltransduktion nachgewiesen.^{89, 90} Chen et al. beobachteten zudem in Glioblastom-Zelllinien eine Herabregulation von microRNA-205, die mit einer inversen Erhöhung von ZEB1 korrelierte.⁹¹ Es liegt somit die Vermutung nahe, dass die Herabregulation von ZEB1 durch Metformin über microRNA-205 vermittelt wird.

Auf molekularer Ebene entsteht in der Synopse der hier beschriebenen Ergebnisse und der bereits bekannten Erkenntnisse ein möglicher Ansatz zur Erklärung der antiproliferativen Wirkweise von Metformin in PCa-Zellen:

Die Blockade des Komplexes I der Atmungskette im Mitochondrium der Zelle führt zum Anstieg des AMP/ATP-Quotienten. AMP in erhöhter Konzentration im Zytosol wirkt über eine Aktivierung der AMP-abhängigen Kinase inhibitorisch auf mTOR, was zu einer Aktivierung von p53 in der Zelle führt.⁹² Darüber hinaus wird im p53-Molekül direkt durch AMPK die Aminogruppe am Serinmolekül 15 phosphoryliert und somit p53 aktiviert.⁹³ p53 bindet an den microRNA-205-Promotor und erhöht dessen Ablesefrequenz. Die sich daraus ergebende Über- bzw. Reexpression von microRNA-205 tritt schließlich als Effektor der Proliferationsinhibierung durch Metformin in Erscheinung, die in unseren MTS-Assays zellbiologisch zum Ausdruck kommt.

Abbildung 14 gibt einen Überblick über mögliche Signalwege, die auf molekularer Ebene die antiproliferativen und antimetastatischen Wirkungen von Metformin unter Einbezug von microRNA-205 erklären können:

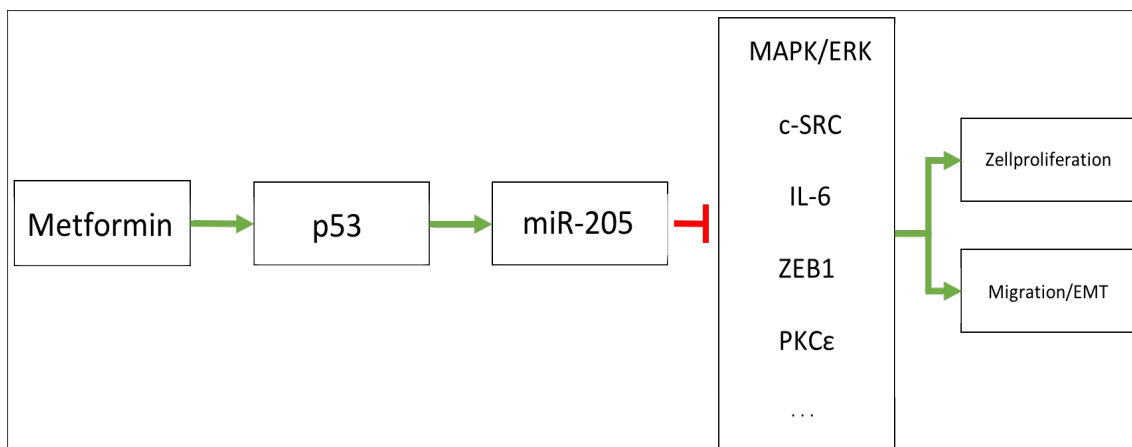


Abb. 14: Darstellung eines möglichen Signalwegs ausgehend von Metformin, der die Zellproliferation und Tumorprogression von Prostatakarzinomzellen beeinflussen kann. Im Mittelpunkt steht die p53-abhängige microRNA-205-Aktivierung. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wird auf die Darstellung einer metforminabhängigen AMPK-Phosphorylierung mit nachfolgender p53-Aktivierung sowie eine metforminabhängige AKT-Hemmung mit nachfolgender mTOR-Inhibition und Hemmung der Zellproliferation verzichtet.

Über die microRNA-205-Aktivierung ist eine Erklärung der inhibitorischen Wirkung von Metformin auf die Metastasierung von PCa-Zellen möglich. Im Folgenden werden

die molekularen Grundzüge der Metastasierung versucht, in unser Zellmodell der Metforminwirkung im PCa einzubetten.

5.3.3 Metforminvermittelte Beeinflussung der EMT-Transformation durch microRNA-205

„When a plant goes to seed, its seeds are carried in all directions; but they can only live and grow if they fall on congenial soil.“ (Paget S., 1989)⁹⁴

Dieses Erklärungsmodell für die Metastasierung von Primärtumoren in Sekundärlokalisationen fasst wichtige Prozesse zusammen, die vom soliden Tumorgewebe effizient ausgeführt werden müssen, um sich erfolgreich in anderen Organen zu etablieren.^{95, 96} Die Rekrutierung von Blutgefäßen ist dabei essentiell für das Tumorwachstum und bietet eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für den Tumor, sich dem Blutgefäßsystem anzuschließen.⁹⁷ Im weiteren Verlauf der Tumorprogression erfolgt eine aktive Invasion der Extrazellulärmatrix durch den Verlust an Zelladhäsionsmolekülen.⁹⁸ Nach dem mechanischen Transport durch das Blut- oder Lymphgefäßsystem des Organismus sind die translozierten Tumorzellen je nach Organotropismus auf proliferationsfördernde Signale ihres Zielgewebes angewiesen, um dort (Mikro)metastasen im Sinne eines Sekundärtumors zu etablieren.⁹⁹

MicroRNA-205 scheint bevorzugt am Beginn der Metastasierung eine wichtige Rolle zu spielen. Der für die Invasivität und metastatische Potenz entscheidende Wachstumsfaktor VEGF-A induziert Angiogenese über die Bindung an seinen Tyrosinkinaserzeptor VEGFR und wurde bioinformatisch als direktes Zielgen der microRNA-205 identifiziert^{100, 101}. In Tumorzelllinien von Schilddrüsen- und Mammakarzinomen sowie im Osteosarkom führte die experimentelle Reexpression von microRNA-205 zu einer Suppression des Wachstumsfaktors VEGF-A und einer signifikanten Proliferationsinhibierung *in vitro*.^{47, 102, 103} MicroRNA-205 wurde aufgrund dieser Beobachtungen in allen drei Tumorgeweben als Tumorsuppressor eingestuft, ebenso wie im PCa, da in PC3-Zellen und DU-145-Zellen ein kohärenter Effekt auf die Expression von VEGF-A-mRNA als auch die Reduktion des biologisch aktiven Proteins zu erkennen war.¹⁰⁴

Eine verminderte Versorgung des soliden Primärtumors schränkt sowohl dessen Versorgung mit Nähr- und Baustoffen als auch den Anschluss an das Gefäßsystem des betroffenen Organismus und somit seine metastatische Potenz ein.

Große Evidenz für eine entscheidende Rolle der microRNA-205 ist auch beim nachfolgenden Schritt der Metastasierung gegeben, der zum Verlust der Zelladhäsion führt. Allgemein muss die Tumorzelle dafür eine reversible Transformation von Epithelzelle zu mesenchymaler Zelle vollziehen, die sogenannte epithelial-mesenchymale Transition (EMT). Epithelzellen zeichnen sich durch ihre Polarität mit apikalem und basolateralem Pol aus und sind sowohl gegenseitig über Desmosome und tight junctions als auch über Hemidesmosome mit der Basalmembran verankert. Im Gegensatz dazu betten sich Mesenchymzellen in die Extrazellulärmatrix ein und bilden kaum Zellkontakte zur Umgebung aus.¹⁰⁵ 1982 analysierten Greenburg und Hay erstmals die epitheliale Plastizität und die damit verbundenen Veränderungen im Phänotyp der Zelle.¹⁰⁶ Eine Schlüsselkomponente für die Vermittlung der Tight-Junctions-Zellkontakte stellt das Transmembranglykoprotein E-Cadherin dar, welches in den meisten epithelialen Geweben exprimiert wird und daher auch als Marker bei der Untersuchung der EMT herangezogen werden kann.¹⁰⁷ Der Verlust an E-Cadherin als Ausdruck der verminderten Zelladhäsion wird als fundamentales Ereignis im Verlauf der EMT betrachtet.¹⁰⁸ Hilfreich für das Verständnis, wie E-Cadherin herabreguliert werden kann, war die Entdeckung spezifischer Transkriptionsfaktoren wie SNAI1 oder SIP1, die in ihrer Eigenschaft als Zinkfingerprotein inhibitorisch mit dem E-Cadherin-Promotor interagieren.^{109, 110}

Gregory et al. stellten zudem in Reporterassays fest, dass die alleinige Aktivierung der beiden Zinkfingerproteine ZEB1 und ZEB2 zu einer Induktion der EMT in MDCK-Zellen des Nierenepithels führte.⁴⁶ Ermöglicht wurde die Hochregulation der beiden Transkriptionsfaktoren durch eine herabgesetzte Expression der microRNA-205, für die in beiden Genen 3'-UTR-Bindungsstellen gefunden wurden.⁴⁵ Dies entspricht der Wirkung von microRNA-205 auf ZEB1 und ZEB2 im PCa. In der Arbeit von Nam et al. wurde der Tumorsuppressor p63 als direktes Target der microRNA-301a identifiziert, dessen Inhibition die Expression von microRNA-205 herabregulierte. Infolgedessen werden ZEB1 und ZEB2 hochreguliert und können über eine Hemmung von E-Cadherin die microRNA-301a-assoziierte EMT in Gang bringen.¹¹¹

Nicht zuletzt wird der Bedeutung von E-Cadherin in der klinischen Prognose eine wachsende Rolle zugesprochen, da viele Studien einen Zusammenhang zwischen EMT-Markern und der Tumoraggressivität vermuten lassen.^{112, 113}

Die vorliegende Arbeit sieht ihren Schwerpunkt nicht in der weiterführenden Erforschung der Zusammenhänge zwischen Metformin, microRNA-205 und EMT, jedoch fügen sich unsere Untersuchungen zur Migrationspotenz von LNCaP-Zellen nach Metforminbehandlung in den aktuellen Stand der Forschung auf diesem Gebiet ein. Ein Migrationsassay dient dazu, die Anzahl migrierter LNCaP-Zellen nach der Gabe von 1 mmol/L Metformin im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe zu messen. Metformin verringert den Prozentsatz migrationsbefähigter Zellen signifikant um 51 %. Metformin ist über seinen Effektor microRNA-205 demnach nicht nur in der Lage, proliferationsinhibierend zu wirken, sondern greift über die oben genannten Targets von microRNA-205 auch in den Prozess der Migration und Metastasierung von Prostatakarzinomzellen ein.

Im Rahmen der antineoplastischen Therapie mit Metformin sollte daher nicht nur die Reduktion der Tumormasse im Mittelpunkt stehen, sondern auch eine prognostisch relevante antimetastatische Wirkung beachtet werden. Liang et al. beschäftigten sich dazu mit Tumorzellen des Malignen Melanoms, einem Hauttumor mit hoher Invasivität, an dem der E-Cadherin-assoziierte Übergang vom radialen, oberflächlichen zum vertikalen, metastatischen Wachstum effektiv studiert werden kann.^{114, 115} In Übereinstimmung mit den Forschungsergebnissen zu microRNA-205 konnte eine E-Cadherin-Induktion auch für Metformin nachgewiesen werden, die konsistent mit einer ebenfalls gezeigten Reduktion des Migrationsvermögens metforminbehandelter Zellen im Migrationsassay ist.¹¹⁶

In diesem Kontext steht die Studie von Jacob et al. über Metastasierungsraten im Mammakarzinom. Eingeschlossen wurden 4.953 an Diabetes mellitus Typ 2 erkrankte Frauen, die zu Beginn der Untersuchung an einem noch nicht metastasierten Mammakarzinom litten. 5 Jahre später konnte in dem mit Metformin therapierten Studienarm eine signifikant niedrigere Metastasierungsrate festgestellt werden.¹¹⁷

5.3.4 Metformin als Therapeutikum im PCa

Aktuell liegt eine Vielzahl an Untersuchungen vor, die Metformin *in vitro* eine eindeutige antiproliferative Wirkung in PCa-Zelllinien zuschreiben. Nun stellt sich die Frage, ob sich die Wirkung *in vivo* bestätigt und wie sich die gewonnenen Erkenntnisse im klinischen Alltag übertragen lassen.

Aufgrund der ethischen Problematik, ein Medikament mit potenziell lebensbedrohlichen Nebenwirkungen in Form der Laktatazidose bei begleitender Niereninsuffizienz zu verabreichen, waren erste Ergebnisse von Studien zu erwarten, die Diabetiker unter Metformin und anderen antidiabetischen Medikationen gegenüberstellten. Als primäre Endpunkte der Studie wurde ein Wiederanstieg des PSA-Wertes nach kurativem Therapieansatz (BCR - biochemical recurrence) oder der Tod des PCa-Patienten definiert. Diabetiker, die ein PCa entwickelten und zugleich unter Metformintherapie waren, zeigten sowohl im Vergleich zu Diabetikern, die nicht mit Metformin therapiert waren als auch im Vergleich zu Nichtdiabetikern eine signifikante Reduktion der BCR um 50%.¹¹⁸ Die Ergebnisse müssen aufgrund einer vergleichsweise geringen Datenlage vorsichtig interpretiert werden und größer angelegte Studien angeschlossen werden.

Das Ergebnis unserer Untersuchungen, dass Metformin p53-abhängig microRNA-205 induziert, lässt vermuten, dass Metformin in Tumoren mit großem Anteil an p53-mutiertem Zellmosaik eine deutlich abgeschwächte Wirkung entfaltet. Ohne p53 als Vermittler der microRNA-205-Reexpression verringert sich die Wirkung von Metformin zumindest durch Verlust des in dieser Arbeit postulierten Signalwegs. Unsere Arbeit könnte daher in Zukunft helfen, prognostische Aussagen über den Erfolg einer Metformintherapie zu treffen und damit sowohl gezielt zu therapieren, als auch unnötige Übertherapie zu vermeiden.

Überdies erscheint die Vermeidung einer antidiabetischen Metformintherapie bei Patienten mit zugleich bekanntem Prostatakarzinom sinnvoll, da zumindest bei Schwarzen Patienten ein Zusammenhang zwischen Metformintherapie und der konsekutiven Selektion aggressiver PCa-Varianten zu bestehen scheint.¹¹⁹ Khan et al. erkannten im Rahmen ihrer Studie, dass in der Schwarzen amerikanischen Bevölkerung eine Assoziation zwischen Metformintherapie und der initialen Diagnose eines

Hochrisikotumors besteht, bezogen auf die aktuellen Kriterien Gleason-Score (Wert \geq 8), Staging und PSA-Wert (> 20 ng/ml).

Bezogen auf unseren postulierten Signalweg erscheint es naheliegend, dass eine Metformin-Medikation p53-defiziente Karzinome mit höherer Metforminresistenz selektioniert. MicroRNA-205 kann in p53-defizienten Tumoren über Metformin nicht mehr induziert werden und verliert somit die Möglichkeit, die Proliferation und Progression des PCa therapeutisch zu beeinflussen. Als weiterführende therapeutische Option wäre es etwa gentherapeutisch denkbar, das Expressionslevel von tumorsuppressiven microRNAs wie microRNA-205 im Tumorgewebe des Patienten wieder zu erhöhen und so die Metformintherapie zu optimieren.

Auf dem Weg zu einer personalisierten Therapie des PCa könnte die Detektion des p53-Status in Kombination mit der Analyse der microRNA-205-Expression einen neuartigen Prädiktor für die Metformintherapie im Prostatakarzinom darstellen und so eine individuell optimierte Therapie ermöglichen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Das Biguanid Metformin besitzt in vielen Tumorentitäten eine wachstumshemmende Wirkung. Seine molekulare Wirkweise in Prostatakarzinomzellen ist jedoch bisher nicht vollständig verstanden. So ist unter anderem bekannt, dass Metformin regulatorisch in den Metabolismus von Tumorzellen eingreift. Dies erfolgt über eine Aktivierung des Enzyms AMP-Kinase, welche die Hemmung der Signaltransduktion über mTOR sowie eine direkte Phosphorylierung und damit Aktivierung von p53 zur Folge hat. Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die weiterführende Untersuchung der Hemmung der Tumorzellproliferation ausgehend von p53, um die antiproliferative Wirkung von Metformin im Prostatakarzinom besser zu erklären.

Als Grundlage für unsere Untersuchungen dienen Vorarbeiten zur Metforminsensitivität verschiedener Prostatakarzinomzelllinien. Bemerkenswert ist eine signifikant unterschiedliche Proliferationsinhibierung der beiden Zelllinien LNCaP und PC-3. Zur Objektivierung wurde diejenige Konzentration an Metformin bestimmt, die in den jeweiligen Zelllinien zu einer 50-prozentigen Abnahme der Proliferation im MTS-Assay führte. Es zeigte sich, dass PC-3-Zellen signifikant resistenter gegen die Gabe von Metformin sind als LNCaP-Zellen. Ein möglicher Erklärungsansatz für den Unterschied in der Sensitivität gegenüber Metformin begründet sich in der Tatsache, dass LNCaP-Zellen p53 in seiner wildtypischen Form exprimieren, während das Protein in PC-3-Zellen mutiert ist. Die oben genannte metforminabhängige Phosphorylierung von p53 über AMPK vermittelt demnach in p53-profizienten LNCaP-Zellen über eine bisher unbekannt Regulation eine proliferationsinhibierende Wirkung.

In Vorarbeiten hatten wir bereits eine Sensitivierung von LNCaP-Zellen durch die Überexpression der tumorsuppressiven microRNA-205 gegenüber Metformin beobachtet. Folglich untersuchten wir die Expression von microRNA-205 nach Metforminbehandlung und konnten eine Induktion der microRNA-205-Expression durch Metformin in LNCaP-Zellen beschreiben. Um nachzuweisen, ob die beobachtete metforminvermittelte Expressionsinduktion von microRNA-205 p53-abhängig erfolgt, wurde der potentielle microRNA-205-Promotor kloniert und *in silico* auf p53-Bindungsstellen untersucht. Da eine Vielzahl potentieller p53-Bindungsstellen im

microRNA-205-Promotor postuliert werden konnte, wurde mittels Reporter-Assay die metforminvermittelte Induktion des microRNA-205-Promotors untersucht.

Mit Hilfe dieses Reporter-Assays konnten wir zeigen, dass Metformin den microRNA-205-Promotor in LNCaP-Zellen (p53-WT), nicht aber in PC-3-Zellen (p53-defizient), effizient induziert. Nach siRNA-vermittelter Herabregulation von p53 in LNCaP-Zellen wurde die microRNA-205-Induktion ebenso aufgehoben.

Unsere Daten zeigen eine p53-abhängige Induktion der microRNA-205-Expression durch Metformin in Prostatakarzinomzellen. MicroRNA-205 konnte somit als Effektor der proliferationsinhibierenden Wirkung von Metformin im Prostatakarzinom identifiziert werden. Da bekannt ist, dass microRNA-205 im Prostatakarzinom tumorsuppressiv wirkt, können wir daher einen neuartigen Mechanismus der molekularen Metforminwirkung darstellen.

Diese Ergebnisse können helfen, die Metforminwirkung in der Behandlung des Prostatakarzinoms zu optimieren sowie das Ansprechen eines Prostatakarzinoms gegenüber Metformin über die Analyse des p53-Status zu prognostizieren.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Tao ZQ, Shi AM, Wang KX, Zhang WD. Epidemiology of prostate cancer: current status. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2015;19(5):805-812.
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer.* 2015;136(5):E359-386.
3. Bashir MN. Epidemiology of Prostate Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015;16(13):5137-5141.
4. Perera M, Krishnananthan N, Lindner U, Lawrentschuk N. An update on focal therapy for prostate cancer. *Nat Rev Urol.* 2016.
5. Ehdaie B. Active surveillance for prostate cancer: is it too active? *BJU Int.* 2016;118(3):343.
6. Hugosson J, Carlsson S, Aus G, Bergdahl S, Khatami A, Lodding P, Pihl CG, Stranne J, Holmberg E, Lilja H. Mortality results from the Goteborg randomised population-based prostate-cancer screening trial. *Lancet Oncol.* 2010;11(8):725-732.
7. Turner EL, Lane JA, Donovan JL, Davis MJ, Metcalfe C, Neal DE, Hamdy FC, Martin RM. Association of diabetes mellitus with prostate cancer: nested case-control study (Prostate testing for cancer and treatment study). *Int J Cancer.* 2011;128(2):440-446.
8. Gandini S, Puntoni M, Heckman-Stoddard BM, Dunn BK, Ford L, DeCensi A, Szabo E. Metformin and cancer risk and mortality: a systematic review and meta-analysis taking into account biases and confounders. *Cancer Prev Res (Phila).* 2014;7(9):867-885.
9. American Diabetes A. Standards of medical care in diabetes--2011. *Diabetes Care.* 2011;34 Suppl 1:S11-61.
10. Singh S, Usman K, Banerjee M. Pharmacogenetic studies update in type 2 diabetes mellitus. *World J Diabetes.* 2016;7(15):302-315.
11. Ben Sahra I, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF, Bost F. Metformin in cancer therapy: a new perspective for an old antidiabetic drug? *Mol Cancer Ther.* 2010;9(5):1092-1099.
12. Yu H, Yin L, Jiang X, Sun X, Wu J, Tian H, Gao X, He X. Effect of metformin on cancer risk and treatment outcome of prostate cancer: a meta-analysis of epidemiological observational studies. *PLoS One.* 2014;9(12):e116327.
13. Chong RW, Vasudevan V, Zuber J, Solomon SS. Metformin Has a Positive Therapeutic Effect on Prostate Cancer in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus. *Am J Med Sci.* 2016;351(4):416-419.
14. Foretz M, Guigas B, Bertrand L, Pollak M, Viollet B. Metformin: from mechanisms of action to therapies. *Cell Metab.* 2014;20(6):953-966.
15. Pollak M. Overcoming Drug Development Bottlenecks With Repurposing: Repurposing biguanides to target energy metabolism for cancer treatment. *Nat Med.* 2014;20(6):591-593.
16. Morales DR, Morris AD. Metformin in cancer treatment and prevention. *Annu Rev Med.* 2015;66:17-29.

17. Weinberg SE, Chandel NS. Targeting mitochondria metabolism for cancer therapy. *Nat Chem Biol.* 2015;11(1):9-15.
18. Gallagher EJ, LeRoith D. Diabetes, cancer, and metformin: connections of metabolism and cell proliferation. *Ann N Y Acad Sci.* 2011;1243:54-68.
19. Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ, Moller DE. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest.* 2001;108(8):1167-1174.
20. Owen MR, Doran E, Halestrap AP. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem J.* 2000;348 Pt 3:607-614.
21. El-Mir MY, Nogueira V, Fontaine E, Averet N, Rigoulet M, Leverve X. Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I. *J Biol Chem.* 2000;275(1):223-228.
22. Herrington WG, Levy JB. Metformin: effective and safe in renal disease? *Int Urol Nephrol.* 2008;40(2):411-417.
23. Salpeter SR, Greyber E, Pasternak GA, Salpeter EE. Risk of fatal and nonfatal lactic acidosis with metformin use in type 2 diabetes mellitus. *Cochrane Database Syst Rev.* 2010(4):CD002967.
24. Shaw RJ. LKB1 and AMP-activated protein kinase control of mTOR signalling and growth. *Acta Physiol (Oxf).* 2009;196(1):65-80.
25. Tavares MR, Pavan IC, Amaral CL, Meneguello L, Luchessi AD, Simabuco FM. The S6K protein family in health and disease. *Life Sci.* 2015;131:1-10.
26. Dowling RJ, Niraula S, Chang MC, Done SJ, Ennis M, McCready DR, Leong WL, Escallon JM, Reedijk M, Goodwin PJ, Stambolic V. Changes in insulin receptor signaling underlie neoadjuvant metformin administration in breast cancer: a prospective window of opportunity neoadjuvant study. *Breast Cancer Res.* 2015;17:32.
27. Xu H, Zhou Y, Liu YX, Ping J, Shou QY, Chen FM, Ruo R. Metformin improves hepatic IRS2/PI3K/Akt signaling in insulin resistant rats of NASH and cirrhosis. *J Endocrinol.* 2016.
28. Chae YK, Arya A, Malecek MK, Shin DS, Carneiro B, Chandra S, Kaplan J, Kalyan A, Altman JK, Plataniias L, Giles F. Repurposing metformin for cancer treatment: current clinical studies. *Oncotarget.* 2016.
29. Abraham AG, O'Neill E. PI3K/Akt-mediated regulation of p53 in cancer. *Biochem Soc Trans.* 2014;42(4):798-803.
30. Bao B, Wang Z, Ali S, Ahmad A, Azmi AS, Sarkar SH, Banerjee S, Kong D, Li Y, Thakur S, Sarkar FH. Metformin inhibits cell proliferation, migration and invasion by attenuating CSC function mediated by deregulating miRNAs in pancreatic cancer cells. *Cancer Prev Res (Phila).* 2012;5(3):355-364.
31. Kato K, Gong J, Iwama H, Kitanaka A, Tani J, Miyoshi H, Nomura K, Mimura S, Kobayashi M, Aritomo Y, Kobara H, Mori H, Himoto T, Okano K, Suzuki Y, Murao K, Masaki T. The antidiabetic drug metformin inhibits gastric cancer cell proliferation in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther.* 2012;11(3):549-560.
32. He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet.* 2004;5(7):522-531.

33. Chalfie M, Horvitz HR, Sulston JE. Mutations that lead to reiterations in the cell lineages of *C. elegans*. *Cell*. 1981;24(1):59-69.
34. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 2000;403(6772):901-906.
35. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116(2):281-297.
36. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75(5):843-854.
37. Martinez J, Patkaniowska A, Urlaub H, Luhrmann R, Tuschl T. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell*. 2002;110(5):563-574.
38. Doench JG, Petersen CP, Sharp PA. siRNAs can function as miRNAs. *Genes Dev*. 2003;17(4):438-442.
39. Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(Database issue):D68-73.
40. Sam Griffiths-Jones. miRBase: the microRNA database; 2014.
41. Porkka KP, Pfeiffer MJ, Waltering KK, Vessella RL, Tammela TL, Visakorpi T. MicroRNA expression profiling in prostate cancer. *Cancer Res*. 2007;67(13):6130-6135.
42. Kalogirou C, Spahn M, Krebs M, Joniau S, Lerut E, Burger M, Scholz CJ, Kneitz S, Riedmiller H, Kneitz B. MiR-205 is progressively down-regulated in lymph node metastasis but fails as a prognostic biomarker in high-risk prostate cancer. *Int J Mol Sci*. 2013;14(11):21414-21434.
43. Bhatnagar N, Li X, Padi SK, Zhang Q, Tang MS, Guo B. Downregulation of miR-205 and miR-31 confers resistance to chemotherapy-induced apoptosis in prostate cancer cells. *Cell Death Dis*. 2010;1:e105.
44. Wang N, Li Q, Feng NH, Cheng G, Guan ZL, Wang Y, Qin C, Yin CJ, Hua LX. miR-205 is frequently downregulated in prostate cancer and acts as a tumor suppressor by inhibiting tumor growth. *Asian J Androl*. 2013;15(6):735-741.
45. Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, Barry SC, Tsykin A, Farshid G, Vadas MA, Khew-Goodall Y, Goodall GJ. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat Cell Biol*. 2008;10(5):593-601.
46. Gregory PA, Bracken CP, Bert AG, Goodall GJ. MicroRNAs as regulators of epithelial-mesenchymal transition. *Cell Cycle*. 2008;7(20):3112-3118.
47. Wang L, Shan M, Liu Y, Yang F, Qi H, Zhou L, Qiu L, Li Y. miR-205 suppresses the proliferative and migratory capacity of human osteosarcoma Mg-63 cells by targeting VEGFA. *Onco Targets Ther*. 2015;8:2635-2642.
48. Wu HC, Hsieh JT, Gleave ME, Brown NM, Pathak S, Chung LW. Derivation of androgen-independent human LNCaP prostatic cancer cell sublines: role of bone stromal cells. *Int J Cancer*. 1994;57(3):406-412.

49. Anwar MA, Kheir WA, Eid S, Fares J, Liu X, Eid AH, Eid AA. Colorectal and Prostate Cancer Risk in Diabetes: Metformin, an Actor behind the Scene. *J Cancer*. 2014;5(9):736-744.
50. Belda-Iniesta C, Pernia O, Simo R. Metformin: a new option in cancer treatment. *Clin Transl Oncol*. 2011;13(6):363-367.
51. Ben Sahra I, Laurent K, Loubat A, Giorgetti-Peraldi S, Colosetti P, Auburger P, Tanti JF, Le Marchand-Brustel Y, Bost F. The antidiabetic drug metformin exerts an antitumoral effect in vitro and in vivo through a decrease of cyclin D1 level. *Oncogene*. 2008;27(25):3576-3586.
52. Sayyid RK, Fleshner NE. Potential role for metformin in urologic oncology. *Investig Clin Urol*. 2016;57(3):157-164.
53. Kirpichnikov D, McFarlane SI, Sowers JR. Metformin: an update. *Ann Intern Med*. 2002;137(1):25-33.
54. Whitburn J, Edwards CM, Sooriakumaran P. Metformin and Prostate Cancer: a New Role for an Old Drug. *Curr Urol Rep*. 2017;18(6):46.
55. Pulukuri SM, Gondi CS, Lakka SS, Jutla A, Estes N, Gujrati M, Rao JS. RNA interference-directed knockdown of urokinase plasminogen activator and urokinase plasminogen activator receptor inhibits prostate cancer cell invasion, survival, and tumorigenicity in vivo. *J Biol Chem*. 2005;280(43):36529-36540.
56. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*. 2000;182(3):311-322.
57. Tsutsumi Y, Nomiyama T, Kawanami T, Hamaguchi Y, Terawaki Y, Tanaka T, Murase K, Motonaga R, Tanabe M, Yanase T. Combined Treatment with Exendin-4 and Metformin Attenuates Prostate Cancer Growth. *PLoS One*. 2015;10(10):e0139709.
58. Liu Q, Tong D, Liu G, Gao J, Wang LA, Xu J, Yang X, Xie Q, Huang Y, Pang J, Wang L, He Y, Zhang D, Ma Q, Lan W, Jiang J. Metformin Inhibits Prostate Cancer Progression by Targeting Tumor-Associated Inflammatory Infiltration. *Clin Cancer Res*. 2018;24(22):5622-5634.
59. Chen Z, Song X, Li Q, Xie L, Guo T, Su T, Tang C, Chang X, Liang B, Huang D. Androgen Receptor-Activated Enhancers Simultaneously Regulate Oncogene TMPRSS2 and lncRNA PRCAT38 in Prostate Cancer. *Cells*. 2019;8(8).
60. Wang Y, Liu G, Tong D, Parmar H, Hasenmayer D, Yuan W, Zhang D, Jiang J. Metformin represses androgen-dependent and androgen-independent prostate cancers by targeting androgen receptor. *Prostate*. 2015;75(11):1187-1196.
61. Colquhoun AJ, Venier NA, Vandersluis AD, Besla R, Sugar LM, Kiss A, Fleshner NE, Pollak M, Klotz LH, Venkateswaran V. Metformin enhances the antiproliferative and apoptotic effect of bicalutamide in prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2012;15(4):346-352.
62. Gao ZY, Liu Z, Bi MH, Zhang JJ, Han ZQ, Han X, Wang HY, Sun GP, Liu H. Metformin induces apoptosis via a mitochondria-mediated pathway in human breast cancer cells. *Exp Ther Med*. 2016;11(5):1700-1706.
63. Circu ML, Aw TY. Glutathione and modulation of cell apoptosis. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1823(10):1767-1777.

64. Park SH, Lee DH, Kim JL, Kim BR, Na YJ, Jo MJ, Jeong YA, Lee SY, Lee SI, Lee YY, Oh SC. Metformin enhances TRAIL-induced apoptosis by Mcl-1 degradation via Mule in colorectal cancer cells. *Oncotarget*. 2016;7(37):59503-59518.
65. Villanueva-Paz M, Cotan D, Garrido-Maraver J, Oropesa-Avila M, de la Mata M, Delgado-Pavon A, de Lavera I, Alcocer-Gomez E, Alvarez-Cordoba M, Sanchez-Alcazar JA. AMPK Regulation of Cell Growth, Apoptosis, Autophagy, and Bioenergetics. *EXS*. 2016;107:45-71.
66. Pennanen P, Syvala H, Blauer M, Savinainen K, Ylikomi T, Tammela TLJ, Murtola TJ. The effects of metformin and simvastatin on the growth of LNCaP and RWPE-1 prostate epithelial cell lines. *Eur J Pharmacol*. 2016;788:160-167.
67. Ben Sahra I, Laurent K, Giuliano S, Larbret F, Ponzio G, Gounon P, Le Marchand-Brustel Y, Giorgetti-Peraldi S, Cormont M, Bertolotto C, Deckert M, Auberger P, Tanti JF, Bost F. Targeting cancer cell metabolism: the combination of metformin and 2-deoxyglucose induces p53-dependent apoptosis in prostate cancer cells. *Cancer Res*. 2010;70(6):2465-2475.
68. Farrow JM, Yang JC, Evans CP. Autophagy as a modulator and target in prostate cancer. *Nat Rev Urol*. 2014;11(9):508-516.
69. Jones RG, Plas DR, Kubek S, Buzzai M, Mu J, Xu Y, Birnbaum MJ, Thompson CB. AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. *Mol Cell*. 2005;18(3):283-293.
70. Chen L, Ahmad N, Liu X. Combining p53 stabilizers with metformin induces synergistic apoptosis through regulation of energy metabolism in castration-resistant prostate cancer. *Cell Cycle*. 2016;15(6):840-849.
71. Avci CB, Harman E, Dodurga Y, Susluer SY, Gunduz C. Therapeutic potential of an anti-diabetic drug, metformin: alteration of miRNA expression in prostate cancer cells. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013;14(2):765-768.
72. Suzuki HI, Yamagata K, Sugimoto K, Iwamoto T, Kato S, Miyazono K. Modulation of microRNA processing by p53. *Nature*. 2009;460(7254):529-533.
73. Kurul NO, Ates F, Yilmaz I, Narli G, Yesildal C, Senkul T. The association of let-7c, miR-21, miR-145, miR-182, and miR-221 with clinicopathologic parameters of prostate cancer in patients diagnosed with low-risk disease. *Prostate*. 2019;79(10):1125-1132.
74. Zhang LS, Ma HG, Sun FH, Zhao WC, Li G. MiR-203 inhibits the malignant behavior of prostate cancer cells by targeting RGS17. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2019;23(13):5667-5674.
75. Kiener M, Chen L, Krebs M, Grosjean J, Klima I, Kalogirou C, Riedmiller H, Kneitz B, Thalmann GN, Snaar-Jagalska E, Spahn M, Kruthof-de Julio M, Zoni E. miR-221-5p regulates proliferation and migration in human prostate cancer cells and reduces tumor growth in vivo. *BMC Cancer*. 2019;19(1):627.
76. Kumar B, Rosenberg AZ, Choi SM, Fox-Talbot K, De Marzo AM, Nonn L, Brennen WN, Marchionni L, Halushka MK, Lupold SE. Cell-type specific expression of oncogenic and tumor suppressive microRNAs in the human prostate and prostate cancer. *Sci Rep*. 2018;8(1):7189.

77. Piovan C, Palmieri D, Di Leva G, Braccioli L, Casalini P, Nuovo G, Tortoreto M, Sasso M, Plantamura I, Triulzi T, Taccioli C, Tagliabue E, Iorio MV, Croce CM. Oncosuppressive role of p53-induced miR-205 in triple negative breast cancer. *Mol Oncol.* 2012;6(4):458-472.
78. Bouchard V, Demers MJ, Thibodeau S, Laquerre V, Fujita N, Tsuruo T, Beaulieu JF, Gauthier R, Vezina A, Villeneuve L, Vachon PH. Fak/Src signaling in human intestinal epithelial cell survival and anoikis: differentiation state-specific uncoupling with the PI3-K/Akt-1 and MEK/Erk pathways. *J Cell Physiol.* 2007;212(3):717-728.
79. Hagman Z, Haflidadottir BS, Ceder JA, Larne O, Bjartell A, Lilja H, Edsjo A, Ceder Y. miR-205 negatively regulates the androgen receptor and is associated with adverse outcome of prostate cancer patients. *Br J Cancer.* 2013;108(8):1668-1676.
80. Yu SH, Maynard JP, Vaghasia AM, De Marzo AM, Drake CG, Sfanos KS. A role for paracrine interleukin-6 signaling in the tumor microenvironment in prostate tumor growth. *Prostate.* 2018.
81. Prigent SA, Gullick WJ. Identification of c-erbB-3 binding sites for phosphatidylinositol 3'-kinase and SHC using an EGF receptor/c-erbB-3 chimera. *EMBO J.* 1994;13(12):2831-2841.
82. Li L, Li S. miR-205-5p inhibits cell migration and invasion in prostatic carcinoma by targeting ZEB1. *Oncol Lett.* 2018;16(2):1715-1721.
83. Cha YJ, Lee JH, Han HH, Kim BG, Kang S, Choi YD, Cho NH. MicroRNA alteration and putative target genes in high-grade prostatic intraepithelial neoplasia and prostate cancer: STAT3 and ZEB1 are upregulated during prostate carcinogenesis. *Prostate.* 2016;76(10):937-947.
84. Majid S, Dar AA, Saini S, Yamamura S, Hirata H, Tanaka Y, Deng G, Dahiya R. MicroRNA-205-directed transcriptional activation of tumor suppressor genes in prostate cancer. *Cancer.* 2010;116(24):5637-5649.
85. Gandellini P, Folini M, Longoni N, Pennati M, Binda M, Colecchia M, Salvioni R, Supino R, Moretti R, Limonta P, Valdagni R, Daidone MG, Zaffaroni N. miR-205 Exerts tumor-suppressive functions in human prostate through down-regulation of protein kinase Cepsilon. *Cancer Res.* 2009;69(6):2287-2295.
86. Zhang J, Shen C, Wang L, Ma Q, Xia P, Qi M, Yang M, Han B. Metformin inhibits epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer cells: involvement of the tumor suppressor miR30a and its target gene SOX4. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;452(3):746-752.
87. Drake JM, Strohbahn G, Bair TB, Moreland JG, Henry MD. ZEB1 enhances transendothelial migration and represses the epithelial phenotype of prostate cancer cells. *Mol Biol Cell.* 2009;20(8):2207-2217.
88. Tucci P, Agostini M, Grespi F, Markert EK, Terrinoni A, Vousden KH, Muller PA, Dotsch V, Kehrlöesser S, Sayan BS, Giaccone G, Lowe SW, Takahashi N, Vandenabeele P, Knight RA, Levine AJ, Melino G. Loss of p63 and its microRNA-205 target results in enhanced cell migration and metastasis in prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(38):15312-15317.
89. Song Y, Chen Y, Li Y, Lyu X, Cui J, Cheng Y, Zhao L, Zhao G. Metformin inhibits TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition-like

- process and stem-like properties in GBM via AKT/mTOR/ZEB1 pathway. *Oncotarget*. 2018;9(6):7023-7035.
90. Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraros C, Cufi S, Del Barco S, Martin-Castillo B, Menendez JA. Metformin regulates breast cancer stem cell ontogeny by transcriptional regulation of the epithelial-mesenchymal transition (EMT) status. *Cell Cycle*. 2010;9(18):3807-3814.
 91. Chen W, Kong KK, Xu XK, Chen C, Li H, Wang FY, Peng XF, Zhang Z, Li P, Li JL, Li FC. Downregulation of miR205 is associated with glioblastoma cell migration, invasion, and the epithelial-mesenchymal transition, by targeting ZEB1 via the Akt/mTOR signaling pathway. *Int J Oncol*. 2018;52(2):485-495.
 92. Mazelin L, Panthu B, Nicot AS, Belotti E, Tintignac L, Teixeira G, Zhang Q, Risson V, Baas D, Delaune E, Derumeaux G, Taillandier D, Ohlmann T, Ovize M, Gangloff YG, Schaeffer L. mTOR inactivation in myocardium from infant mice rapidly leads to dilated cardiomyopathy due to translation defects and p53/JNK-mediated apoptosis. *J Mol Cell Cardiol*. 2016.
 93. Zhang XD, Qin ZH, Wang J. The role of p53 in cell metabolism. *Acta Pharmacol Sin*. 2010;31(9):1208-1212.
 94. Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev*. 1989;8(2):98-101.
 95. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(8):563-572.
 96. Woodhouse EC, Chuaqui RF, Liotta LA. General mechanisms of metastasis. *Cancer*. 1997;80(8 Suppl):1529-1537.
 97. Wyckoff JB, Jones JG, Condeelis JS, Segall JE. A critical step in metastasis: in vivo analysis of intravasation at the primary tumor. *Cancer Res*. 2000;60(9):2504-2511.
 98. Liotta LA. Tumor invasion and metastases--role of the extracellular matrix: Rhoads Memorial Award lecture. *Cancer Res*. 1986;46(1):1-7.
 99. Edward M, MacKie RM. Cell-cell and cell-extracellular matrix interactions during melanoma cell invasion and metastasis. *Melanoma Res*. 1993;3(4):227-234.
 100. Qi L, Robinson WA, Brady BM, Glode LM. Migration and invasion of human prostate cancer cells is related to expression of VEGF and its receptors. *Anticancer Res*. 2003;23(5A):3917-3922.
 101. Anai S, Sakamoto N, Sakai Y, Tanaka M, Porvasnik S, Urbanek C, Cao W, Goodison S, Rosser CJ. Dual targeting of Bcl-2 and VEGF: a potential strategy to improve therapy for prostate cancer. *Urol Oncol*. 2011;29(4):421-429.
 102. Salajegheh A, Vosgha H, Md Rahman A, Amin M, Smith RA, Lam AK. Modulatory role of miR-205 in angiogenesis and progression of thyroid cancer. *J Mol Endocrinol*. 2015;55(3):183-196.
 103. Wu H, Zhu S, Mo YY. Suppression of cell growth and invasion by miR-205 in breast cancer. *Cell Res*. 2009;19(4):439-448.
 104. Szczyrba J, Nolte E, Hart M, Doll C, Wach S, Taubert H, Keck B, Kremmer E, Stohr R, Hartmann A, Wieland W, Wullich B, Grasser FA. Identification of ZNF217, hnRNP-K, VEGF-A and IPO7 as targets for microRNAs that are downregulated in prostate carcinoma. *Int J Cancer*. 2013;132(4):775-784.

105. Tsai JH, Yang J. Epithelial-mesenchymal plasticity in carcinoma metastasis. *Genes Dev.* 2013;27(20):2192-2206.
106. Greenburg G, Hay ED. Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. *J Cell Biol.* 1982;95(1):333-339.
107. Iwatsuki M, Mimori K, Yokobori T, Ishi H, Beppu T, Nakamori S, Baba H, Mori M. Epithelial-mesenchymal transition in cancer development and its clinical significance. *Cancer Sci.* 2010;101(2):293-299.
108. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(6):442-454.
109. Comijn J, Berx G, Vermassen P, Verschueren K, van Grunsven L, Bruyneel E, Mareel M, Huylebroeck D, van Roy F. The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. *Mol Cell.* 2001;7(6):1267-1278.
110. Olmeda D, Jorda M, Peinado H, Fabra A, Cano A. Snail silencing effectively suppresses tumour growth and invasiveness. *Oncogene.* 2007;26(13):1862-1874.
111. Nam RK, Benatar T, Wallis CJ, Amemiya Y, Yang W, Garbens A, Naeim M, Sherman C, Sugar L, Seth A. MiR-301a regulates E-cadherin expression and is predictive of prostate cancer recurrence. *Prostate.* 2016;76(10):869-884.
112. Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, Savagner P, Gitelman I, Richardson A, Weinberg RA. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell.* 2004;117(7):927-939.
113. Sarrio D, Rodriguez-Pinilla SM, Hardisson D, Cano A, Moreno-Bueno G, Palacios J. Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype. *Cancer Res.* 2008;68(4):989-997.
114. Hsu MY, Meier FE, Nesbit M, Hsu JY, Van Belle P, Elder DE, Herlyn M. E-cadherin expression in melanoma cells restores keratinocyte-mediated growth control and down-regulates expression of invasion-related adhesion receptors. *Am J Pathol.* 2000;156(5):1515-1525.
115. Boyle GM. Therapy for metastatic melanoma: an overview and update. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2011;11(5):725-737.
116. Liang G, Ding M, Lu H, Cao NA, Niu Y, Gao Y, Lu J. Metformin upregulates E-cadherin and inhibits B16F10 cell motility, invasion and migration. *Oncol Lett.* 2015;10(3):1527-1532.
117. Jacob L, Kostev K, Rathmann W, Kalder M. Impact of metformin on metastases in patients with breast cancer and type 2 diabetes. *J Diabetes Complications.* 2016.
118. Tausky D, Preisser F, Karakiewicz PI, Tilki D, Lambert C, Bahary JP, Delouya G, Wistaff R, Laskine M, Nguyen PV, Durand M, Saad F. Impact of diabetes and metformin use on prostate cancer outcome of patients treated with radiation therapy: results from a large institutional database. *Can J Urol.* 2018;25(5):9509-9515.

- 119.** Khan S, Cai J, Nielsen ME, Troester MA, Mohler JL, Fontham ETH, Farnan L, Drake BF, Olshan AF, Bensen JT. The association of metformin use with prostate cancer aggressiveness among Black Americans and White Americans in a population-based study. *Cancer Causes Control*. 2018;29(11):1143-1150.

DANKSAGUNG

Die Dissertation wurde an der Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg angefertigt. Hiermit möchte ich allen danken, die am Zustandekommen dieser Arbeit beteiligt waren.

Mein erster Dank gilt meinem Doktorvater Univ.-Prof. Dr. med. Hubert Kübler, insbesondere für die Überlassung des Themas, die schnellen Korrekturen der vorgelegten Manuskripte und seine Verbesserungsvorschläge.

Ganz herzlicher Dank gilt meinem Betreuer, Dr. med. vet. Burkhard Kneitz, der vom ersten Tag im Labor an keine Mühen gescheut hat und mir mit ausführlichen, stets gut verständlichen Erläuterungen komplexer Zusammenhänge sowohl bei der Interpretation als auch bei der Niederschrift der experimentellen Ergebnisse jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

Ebenso möchte ich Dr. Charis Kalogirou meinen großen Dank bekunden, dass er mich über die gesamte Dissertation hinweg mit wichtigen thematischen Anregungen, schnellen Korrekturarbeiten und hervorragenden Ratschlägen unterstützt hat.

Weiterhin bin ich all denjenigen Menschen zu großem Dank verpflichtet, die nicht nur durch den reibungslosen Ablauf des experimentellen Geschehens und die technische Unterstützung einen wichtigen Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, sondern auch zwischenmenschlich dafür gesorgt haben, dass die Zeit im urologischen Forschungslabor ein äußerst angenehmer Teil meiner Dissertation wurde und mir immer in freudiger Erinnerung bleibt. Im Besonderen sind dies Frau Barbara Dexler, Frau Vera Schwartz, Frau Katrin Borschert und Frau Antje Beck.

