

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

**der Universität Würzburg**

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

Untersuchungen zur Funktion und Expression von miR-200b im  
Prostatakarzinom unter besonderer Beachtung von miR-200b als  
Prognosemarker bei Hochrisiko-Erkrankten und des Enzyms SOAT1 als  
Zielstruktur von miR-200b

**Inauguraldissertation**

**zur Erlangung der Doktorwürde der**

**Medizinischen Fakultät**

**der**

**Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von**

**Sophia Finkl**

**aus Augsburg**

**Würzburg, 2021**



Referent bzw. Referentin:

Univ.-Prof. Dr. med. Hubert Kübler

Korreferent bzw. Korreferentin:

Dekan:

Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung:

Die Promovendin ist Ärztin.

# Inhalt

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Prostatakarzinom .....	1
1.1.1	Epidemiologie .....	1
1.1.2	Diagnostik des Prostatakarzinoms .....	2
1.1.3	Stadieneinteilung.....	3
1.1.4	Therapie des Prostatakarzinoms.....	3
1.2	Allgemeine Zellvorgänge der Karzinogenese .....	5
1.3	Die Funktion des Enzyms SOAT1 in der Zelle und im Prostatakarzinom.....	6
1.4	Das Therapeutikum Mitotane: Entwicklung, Struktur, klinischer Einsatz und mögliche Wirkmechanismen.....	8
1.5	Spezifische SOAT1-Inhibitoren: Entwicklung und Wirkung.....	9
1.6	Rolle und Ablauf von Autophagie in Tumoren und der Zusammenhang mit miR-200b.....	9
1.7	MikroRNAs in der menschlichen Zelle.....	11
1.7.1	Biosynthese und Wirkmechanismus von mikroRNAs .....	12
1.7.2	MikroRNA und deren Bedeutung in malignen Tumoren.....	13
1.7.3	Die Bedeutung von miRNAs im Prostatakarzinom.....	14
1.7.4	mikroRNAs - Einsatz als Medikamente .....	15
1.8	MiR-200b und ihre Bedeutung in zellbiologischen Vorgängen.....	18
1.8.1	MiR-200b und mögliche zelluläre Zielstrukturen.....	18
1.8.2	MiR-200b die Bedeutung im Prostatakarzinom .....	19
1.9	Zielsetzung.....	21
<b>2</b>	<b>Material und Methoden:.....</b>	<b>22</b>
2.1	Material .....	22
2.1.1	Zellkultur .....	22
2.1.1.1	Prostatazelllinien .....	22
2.1.1.2	Zellkulturmedien.....	23
2.1.2	Chemikalien und Biochemikalien.....	23
2.1.2.1	Zellkulturreagenzien .....	23
2.1.2.2	Chemikalien für molekularbiologische Experimente .....	24
2.1.2.3	Primer für qRT-PCR und Antikörper .....	25
2.1.2.4	Plasmide für die Transfektion .....	26
2.1.2.5	Antikörper für Western Blot Experimente .....	26
2.1.3	Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	27
2.1.4	Software.....	29
2.2	Stichprobe und Kollektiv .....	29
2.2.1	Prostatakarzinom-Nativmaterial .....	29
2.3	Zellkultur von prostataspezifischen Zellen .....	32

2.4	Transfektion .....	32
2.5	MTS-Proliferations-Assay.....	33
2.6	RNA Isolierung.....	34
2.7	MRNA- und miRNA- Bestimmung mit qRT PCR:.....	35
2.7.1	Reverse Transkription .....	36
2.7.2	Quantitative PCR .....	36
2.8	Proteinisolation .....	37
2.9	Western Blot .....	37
2.10	Statistik .....	39
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>40</b>
3.1	Expression von miR-200b in Prostatakarzinom Nativmaterial.....	40
3.1.1	Expression von miR-200b in Abhängigkeit von klinischen Endpunkten im Prostatakarzinom.....	43
3.2	Funktion von miR-200b in Prostatakarzinomzelllinien <i>in vitro</i> .....	49
3.2.1	Proliferationsinhibition durch miR-200b in Prostatazellen .....	50
3.2.2	SOAT1 als Zielgen von miR-200b .....	52
3.2.2.1	Abnahme der SOAT1-mRNA in LNCaP-Zellen durch miR-200b .....	52
3.2.2.2	MiR-200b führt zu einer geringeren Proteinkonzentration von SOAT1 .....	53
3.2.3	MiR-200b hat keinen signifikanten Einfluss auf die mRNA des Enzyms SREBP1 .....	54
3.2.4	MiR-200b bewirkt eine Veränderung der Autophagie .....	55
3.3	Wirkungen von Mitotane und den spezifischen SOAT1-Inhibitoren auf Prostatakarzinomzellen .....	56
3.3.1	Proliferationsinhibition durch Mitotane.....	56
3.3.2	Synergistische inhibierende Effekte auf Prostatazellen durch Mitotane und miR-200b .....	58
3.3.3	Proliferationsinhibition durch PD132301-2.....	60
3.3.4	Synergistische inhibierende Effekte auf Prostatakarzinomzellen durch PD132301-2 und miR-200b.....	61
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>64</b>
4.1	MiR-200b als Tumorsuppressor .....	64
4.1.1	Herabregulierte miR-200b-Expression im Prostatakarzinom .....	65
4.1.2	Proliferationsinhibition durch miR-200b in Prostatazellen .....	67
4.1.3	Reduktion von LC3A/B durch miR-200b als Hinweis auf reduzierte Autophagie.....	69
4.2	Zielstrukturen von miR-200b in Prostatakarzinomzellen .....	70
4.2.1	SOAT1 als Zielstruktur von miR-200b .....	71
4.3	Das Enzym SOAT1 als Therapieziel im Prostatakarzinom .....	75
4.3.1	Proliferationsinhibition von Prostatakarzinomzellen durch SOAT1-Inhibitoren .....	75

4.3.2	Synergistische Effekte durch miR-200b und Mitotane oder PD132301-2 im Prostatakarzinom.....	76
4.4	MiR-200b als prognostischer Marker im Prostatakarzinom.....	78
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>80</b>
<b>6</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>82</b>

## **Appendix**

- I. Supplement**
- II. Abkürzungsverzeichnis**
- III. Abbildungsverzeichnis**
- IV. Tabellenverzeichnis**
- V. Danksagung**
- VI. Lebenslauf**

# 1 Einleitung

## 1.1 Prostatakarzinom

### 1.1.1 Epidemiologie

1853 wurde zum ersten Mal ein Prostatakarzinom von John Adams, Chirurg des Krankenhauses The London Hospital, beschrieben. Damals notierte er, dass dieses Befinden

„a very rare disease“ (eine sehr seltene Erkrankung)

sei ((1), S. 393). Eineinhalb Jahrhunderte später postulierte Collin Hughes 2005:

„The prevalence of prostate cancer is so high that it could be considered as a normal age related phenomenon“ (Die Prävalenz des Prostatakarzinoms ist so hoch, dass es als normales altersbedingtes Phänomen betrachtet werden könnte) ((2), S. 673).

In diesen 152 Jahren hat sich also viel getan und von einer sehr seltenen Erkrankung kann zurecht angesichts aktueller epidemiologischer Daten keineswegs die Rede sein.

So ist das Prostatakarzinom in Deutschland zum häufigsten Karzinom des Mannes geworden und macht mit einer Neuerkrankungsrate von knapp 60 000 im Jahr 2016 fast ein Viertel aller Krebsneudiagnosen beim Mann aus. Knapp ein Viertel der Betroffenen (24,6%, 14 417) verstarben. (3)

Grund für den Anstieg der Häufigkeit der Neudiagnose ist unter anderem die frühere Diagnose von Prostatakarzinomen durch Screening-Untersuchungen wie die digitale rektale Untersuchung (DRU) und der PSA -Test (Prostata spezifisches Antigen). Nach Veröffentlichungen 2013 bezüglich Schaden und Nutzen von Screening-Untersuchungen, werden diese nun differenzierter eingesetzt (4–10), so dass bereits seit 2003 der Verlauf der Inzidenz insgesamt stabil, bzw. bei über 75-jährigen sogar rückläufig ist. (3)

Dennoch ist das Prostatakarzinom nach wie vor eine der häufigsten malignen Tumorerkrankungen der heutigen Zeit, da sich aufgrund des demografischen

Wandels die absolute Zahl der Neuerkrankungen seit den 70er Jahren verfünffacht hat. (3, 11)

Ein weiterer epidemiologischer Aspekt zeigte sich in dem Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. Demnach war die RS5 (relative survival over 5 years, relative Fünfjahres-Überlebensrate) im Stadium II-III über 100%, im Stadium IV sank sie stark ab auf 52%. Aber auch im Stadium IV ist die Prognose uneinheitlich. So ist die RS5 bei Erkrankten mit T4-Tumoren und/oder Lymphknotenbefall, aber ohne Fernmetastasen mit 90% deutlich höher als bei Erkrankten mit Fernmetastasen (etwa 30%). (3)

Ziel dieser Arbeit war es demnach unter anderem ein Diagnostikum zu finden, welches eine bessere prognostische Aussagekraft hat als die bisher bekannten und verwendeten diagnostischen Mittel. Somit könnten Erkrankte mit einer schlechteren Prognose gezielter erkannt und behandelt werden und Erkrankte mit einer besseren Prognose nicht übertherapiert werden.

### **1.1.2 Diagnostik des Prostatakarzinoms**

Meist wird das Prostatakarzinom nicht durch Symptome und darauffolgende Untersuchungen diagnostiziert, sondern durch Früherkennungsuntersuchungen, welche ab dem 45. Lebensjahr empfohlen werden.

Zu diesen gehören die DRU und die Bestimmung des PSA-Wertes. Falls Risikofaktoren bestehen, kann ergänzend ein transrektaler Ultraschall durchgeführt werden. (12–14)

Das Screening für das Prostatakarzinom ist jedoch nach wie vor Gegenstand aktueller wissenschaftlicher Diskussionen (8). So gibt es Studien, die einen klinischen Nutzen von Früherkennungsmaßnahmen im Sinne einer Mortalitäts-senkung nachweisen konnten (15, 16), andere dagegen, die keinen Nutzen bezüglich der Senkung der Mortalität zeigten (10, 17–19). Zudem kann das Screening zu Überdiagnosen, Übertherapien und dadurch auch zur Einschränkung der Lebensqualität führen (3, 8).

Zur Diagnosesicherung bei erhöhtem PSA ( $\geq 4$  ng/ml) oder auffälliger DRU werden anschließend Biopsien entnommen (20).

Doch auch der Gleason-Score bietet keine zufriedenstellende Aussage über das prognostische Verhalten des Karzinoms. So können Erkrankte mit einem Gleason-Score  $\geq 4+3$  einen klinisch relativ harmlosen Verlauf aufweisen, wohingegen Prostatakarzinome mit einem Gleason-Score  $\leq 4+3$  aggressiv verlaufen können. (21)

Demnach ist es wichtig, Parameter zu finden, die das Prostatakarzinom besser identifizieren, die Prognose besser abbilden und Übertherapien verhindern. Dadurch kann den Betroffenen die Angst vor nicht-interventionellen Therapieoptionen genommen werden und auf diese Weise für eine bessere Lebensqualität und für eine Kostenersparnis durch Reduktion unnötiger Therapien gesorgt werden.

### **1.1.3 Stadieneinteilung**

Die Einteilung des Prostatakarzinoms erfolgt in der Regel nach der Klassifikation der „Union Internationale Contre le Cancer“ (UICC). Dabei werden das fortgeschrittene bzw. metastasierte Prostatakarzinom und das lokal begrenzte unterschieden. Das lokal begrenzte Prostatakarzinom wird weiter im Hinblick der Entwicklung eines Rezidivs in drei Risikogruppen eingeteilt (22, 23):

- Niedriges Risiko (low risk): PSA  $\leq 10$  ng/ml und Gleason-Score  $\leq 6$  und cT-Kategorie 1c, 2a nach TNM-Klassifikation (tumor, node, metastasis) (Tabelle zur TNM-Klassifikation im Supplement).
- Intermediäres Risiko (intermediate risk): PSA  $> 10$  ng/ml - 20 ng/ml oder Gleason-Score 7 oder cT-Kategorie 2b.
- Hohes Risiko (high risk): PSA  $> 20$  ng/ml oder Gleason-Score  $\geq 8$  oder cT-Kategorie  $\geq 2c$

### **1.1.4 Therapie des Prostatakarzinoms**

Die therapeutischen Optionen beim Prostatakarzinom sind zahlreich und richten sich nach klinischen Kriterien sowie nach Wünschen der Betroffenen.

Zur Therapie des lokal wachsenden Prostatakarzinoms stehen aktive Überwachung (active surveillance), lokale Therapien (radikale Prostatektomie,



perkutane Strahlentherapie, High-Dose/ Low-Dose Brachytherapie) und langfristige Beobachtung (watchful waiting) zur Verfügung.

Aktive Überwachung ist für Betroffene mit niedrigem Risiko und Tumornachweis in  $\leq 2$  Stenzen bei Entnahme von 10-12 Stenzen oder  $\leq 50\%$  Tumornachweis pro Stanze der leitliniengerechte Therapieansatz. Erkrankte mit intermediärem oder hohem Risiko oder bei denen  $> 2$  Stenzen betroffen sind oder  $> 50\%$  einer Stanze Karzinominfiltrate aufweist, werden lokal kurativ therapiert. Bei Erkrankten, die eine mutmaßliche Lebenserwartung von unter zehn Jahren haben, kann die langfristige Beobachtung als mögliche Alternative zu kurativen Behandlungen diskutiert werden.

Bei metastasierten hormonsensitiven Karzinomen besteht die Möglichkeit der Androgendeprivation (i. d. R. medikamentöser Hormonentzug).

Bei metastasierten, androgenunabhängigen oder kastrationsresistenten Karzinomen besteht keine Heilungschance mehr, lediglich palliative Therapieoptionen in Form von Antihormon-, Chemo- und Radionuklidtherapie sowie knochenmodifizierende Substanzen.

Betroffene mit nicht-metastasiertem, kastrationsresistentem Prostatakarzinom (nmCRPC) und einem hohen Risiko für Metastasierung wird zusätzlich eine Immuntherapie empfohlen.

Trotz der eben erläuterten Therapieoptionen insbesondere der Prostatakarzinome mit niedrigem Risiko wurde die nicht interventionelle Therapieoption „active surveillance“ laut Jahresbericht der zertifizierten Prostatakrebszentren 2020 nur von 31,74% aller Betroffenen mit lokal begrenzten Tumoren cT1/T2 mit niedrigem Risiko gewählt (24).

Demnach haben 68,26% der Erkrankten mit geringem Risiko interventionelle Therapieformen gewählt. Die Tatsache, dass knapp die Hälfte aller über 50-jährigen Männer und sogar knapp 80% aller über 80-jährigen Männer histologisch gesichertes Prostatakarzinomgewebe aufweisen, ohne unter einer Einschränkung der Lebensqualität zu leiden, zeigt die Übertherapie insbesondere in niedrigen Tumorstadien. (4)

Der Grund für die geringere Wahl nicht-interventioneller Therapieoptionen der Erkrankten liegt in der, von den Erkrankten empfundenen, größeren Unsicherheit

im Vergleich zu definitiven Therapieformen wie der radikalen Prostatektomie oder der Strahlentherapie (24, 25).

Könnte man die Karzinome in ihrer Prognose zu Beginn bereits besser einschätzen, wäre den Erkrankten diese Unsicherheit genommen oder man könnte die Diagnose eines Prostatakarzinoms im klassischen Sinn ergänzen und bereits bei Diagnosestellung molekulare Marker einbeziehen.

## **1.2 Allgemeine Zellvorgänge der Karzinogenese**

Was macht nun normales Gewebe zu invasiv wachsendem, aggressivem, tumorösem Gewebe? Welche Eigenschaften muss es aufweisen, welche Schritte müssen passieren?

Die Biologie maligner Tumoren ist ein komplexes System aus Zellen mit unterschiedlichen Eigenschaften, welche sich gegenseitig ergänzen und sich dazu befähigen, physiologischen Kontrollmechanismen zu entgehen. Zunächst müssen die Zellen durch Mutationen, Schäden an der DNA (Desoxyribonukleinsäure) und epigenetische Modifikationen so verändert werden, dass Onkogene aktiviert, Tumorsuppressoren gehemmt und Mutatorgene inaktiviert werden, um schließlich sogenannte „Hallmarks of Cancer“ zu erreichen (26). Onkogene sind Gene, welche bei einer verstärkten Aktivierung zu einer erhöhten Proliferation der Zelle führen. Tumorsuppressoren haben eine gegensätzliche Wirkung zu Onkogenen, sie sind also proliferationshemmend. Mutatorgene stellen Gene dar, welche die Mutationsrate generell erhöhen.

Nach Hanahan & Weinberg 2000 (27) gibt es sechs Kernmerkmale, welche zur Tumorentstehung beitragen. Demnach muss es den Tumorzellen erstens gelingen, Proliferationssignale aufrecht zu erhalten, zweitens Zellzyklusinhibitoren zu umgehen, drittens die Fähigkeit zur Invasion und Metastasierung zu entwickeln, viertens replikative Immortalität zu erreichen, fünftens die Nährstoffversorgung durch Angiogenese zu erhalten und sechstens den Zelltod zu umgehen. Im Jahr 2011 erweiterten die Autoren ihre Theorie der Kernmerkmale durch zwei tumorfördernde Merkmale: genomische Instabilität und tumorbegünstigende Entzündung. Zudem ergänzten sie die sechs Kernmerkmale um

zwei weitere: Tumorzellen müssen der Immunabwehr entgehen und den Metabolismus an die gesteigerte Proliferation und Aktivität der Zellen anpassen. (26) Für die hier vorliegende Arbeit ist vor allem der letzte Punkt von Bedeutung. So gab es bereits viele Studien, welche den Glukose-Stoffwechsel und dessen Veränderungen bei Karzinomen betrachteten, aber auch der Fettstoffwechsel ist Gegenstand aktueller Forschung (28). Tumorzellen benötigen viel Energie, welche sie nicht nur über den Glukosestoffwechsel, sondern auch über den Fettstoffwechsel gewinnen. Somit ist dieser ein entscheidender Energielieferant der Tumorphiliferation und als mögliches Therapieziel interessant. Den Fettstoffwechsel beeinflussende Medikamente wie Statine zeigten zudem hemmende Effekte in Bezug auf das Tumorzuchstum (29–31).

Auch beim Prostatakazzinom gibt es Hinweise darauf, dass der Fettstoffwechsel in der Pathogenese eine Rolle spielt und es im Rahmen der Karzinogenese zu Veränderungen kommt (32–39). Des Weiteren zeigen PET-basierte (Positronen-Emissions-Tomographie-basierte) radiologische Untersuchungen von Prostatakazzinomgewebe mit cholin- und acetatbasierten Markern eine Anreicherung der Marker, so dass man auf eine verstärkte Fettspeicherung im Vergleich zu nicht-malignem Gewebe schließen kann (33).

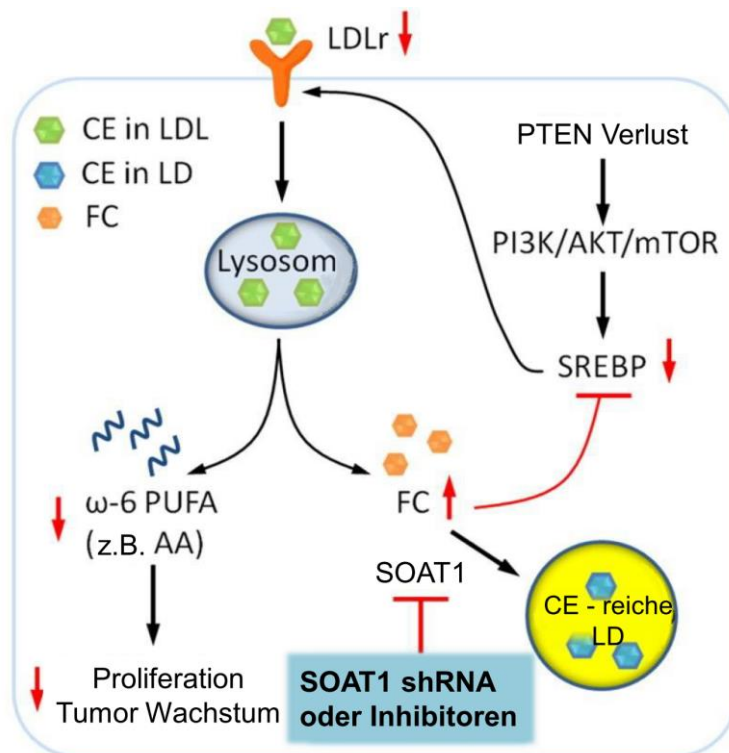
### **1.3 Die Funktion des Enzyms SOAT1 in der Zelle und im Prostatakazzinom**

Wie in 1.2 erläutert ist der Fettstoffwechsel ein wichtiger Prozess in der Pathogenese des Prostatakazzinoms. In diesen Stoffwechselwegen ist SOAT1 (sterol-o-acyltransferase) ein entscheidendes Enzym.

Funktionell verestert SOAT1 freies Cholesterin, damit es in LDs (Lipid Droplets) gespeichert werden kann und somit nicht toxisch für die Zelle ist. Durch diese Veresterung ist der Anteil von freiem Cholesterin niedriger. Das wiederum aktiviert den PI3K (Phosphoinositid-3-Kinase) / Akt (entspricht der Proteinkinase B, PKB) / mTOR (mechanistic Target of Rapamycin) Signalweg, es kommt zu einer vermehrten LDL-Rezeptor (Low Density Lipoprotein) Produktion durch SREBP1 (sterol regulatory element-binding protein) und in Folge zur Fett- und

Cholesterinaufnahme, insbesondere auch der Aufnahme von  $\omega$ -6 ungesättigten Fettsäuren. (40)

Durch SOAT1-Aktivität besteht für die Zelle somit die Möglichkeit, viel Fett aufzunehmen, ohne durch die Toxizität von zu viel freiem Cholesterin zu Schaden zu kommen und den oben beschriebenen Signalweg aufrecht zu erhalten (vgl. Abb. 1), insbesondere bei verstärkter Aktivierung dieses Signalwegs durch PTEN Verlust. Zudem besteht die Möglichkeit, auf den erhöhten Umsatz an Fetten und Cholesterin flexibel reagieren zu können, da die Zellen über eine Speicher-möglichkeit, die sogenannten LDs verfügen. Man könnte also sagen, LDs sind die Fett-Cholesterin Vorratskeller der Zelle. (40)



**Abb. 1: Molekulare Signalwege rund um Cholesterin und die Rolle von SOAT1.**

Die roten Pfeile stellen die Auswirkungen einer Hemmung von SOAT1 dar. CE (Cholesterin-ester), FC (freies Cholesterin),  $\omega$ -6 PUFA ( $\omega$ -6 polyunsaturated fatty acid,  $\omega$ -6 ungesättigte Fettsäuren), AA (Arachidonic acid, Arachidonsäure), SOAT1 (sterol-o-acyltransferase 1)

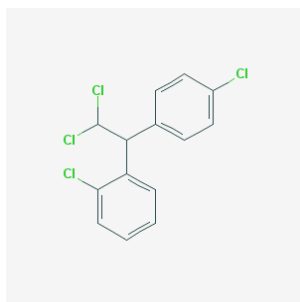
Quelle: Modifiziert nach Yue, Shuhua et al. "Cholesteryl ester accumulation induced by PTEN loss and PI3K/AKT activation underlies human prostate cancer aggressiveness." Cell metabolism vol. 19,3 (2014): 393-406. doi:10.1016/j.cmet.2014.01.019. Copyright 2020 by Elsevier (Lizenznummer 4824700046211)

Zusätzlich ist die Konzentration von SOAT1 bei aggressiveren Prostatakarzinomen erhöht und man kann anhand der Menge im Prostatakarzinomgewebe Aussagen hinsichtlich der Prognose machen (41).

SOAT1 scheint demnach als mögliches therapeutisches Ziel und möglicherweise auch als Diagnostikum vielversprechend (42, 43).

#### 1.4 Das Therapeutikum Mitotane: Entwicklung, Struktur, klinischer Einsatz und mögliche Wirkmechanismen

Mitotane ist ein Medikament, welches 1949 erstmals von Nelson und Woodard beschrieben wurde (44). Sie beobachteten, dass das Derivat des Insektizids Dichlordiphenyldichlorethan (DDD) bei Hunden zur Verkümmern der Nebenniere führte. (44, 45)



**Abb. 2: Strukturformel Mitotane (o,p'-DDD (Dichlordiphenyldichlorethan))**

Quelle: National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Data-base; CID=4211, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Mitotane> (Copyright on May 9, 2020 CAMEO Chemicals)

Knapp 70 Jahre später wird Mitotane (o,p'-DDD siehe Abb. 2) bei inoperablen Nebennierenrindencarcinomen (NNC) eingesetzt (46). Die Wirkung beruht auf antihormoneller und antitumorale Aktivität (47). Mitotane weist jedoch eine Vielzahl an Nebenwirkungen auf und hat ein kleines therapeutisches Fenster. Zudem ist Mitotane ein starker Induktor von Cytochrom P450 3A4 (48). Um deshalb neuere spezifischere Medikamente entwickeln zu können, haben Sbera et al. (49) mögliche Zielstrukturen von Mitotane untersucht. Dabei interessierte sie vor allem die Auswirkungen auf den Cholesterinstoffwechsel und auf die Hormonproduktion. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass SOAT1 eines der Schlüsselenzyme im Wirkmechanismus von Mitotane darstellt und somit Angriffspunkt für neue Therapeutika sein könnte. (49)

### **1.5 Spezifische SOAT1-Inhibitoren: Entwicklung und Wirkung**

Ein spezifischer SOAT1-Inhibitor wurde 1990 für die Therapie von Hypercholesterinämie und Arteriosklerose von Parke-Davis entwickelt (50). In dieser Zeit wurde viel an SOAT1-Inhibitoren geforscht, PD132301-2 (N-phenyl-N'-(1-phenylcycloalkyl) urea; ATR101) erwies sich jedoch als der Potenteste (51). La Pensee et al. (52) verwendeten in Studien PD132301-2 für NNC-Zellen. Dabei zeigte sich, dass die Behandlung der Nebennierenrinden-Zelllinie NCI-H295 zu Caspase-abhängiger Apoptose führte. Des Weiteren kam es bei der Behandlung mit PD132301-2 zum Anstieg von freiem Cholesterin und zu Stress am endoplasmatischen Retikulum. (52)

Die Rolle von SOAT1 bei der Speicherung und dem Metabolismus von Cholesterin machte dieses Enzym auch für das Prostatakarzinom interessant. So könnten spezifische Inhibitoren auch dort zu therapeutischem Erfolg führen.

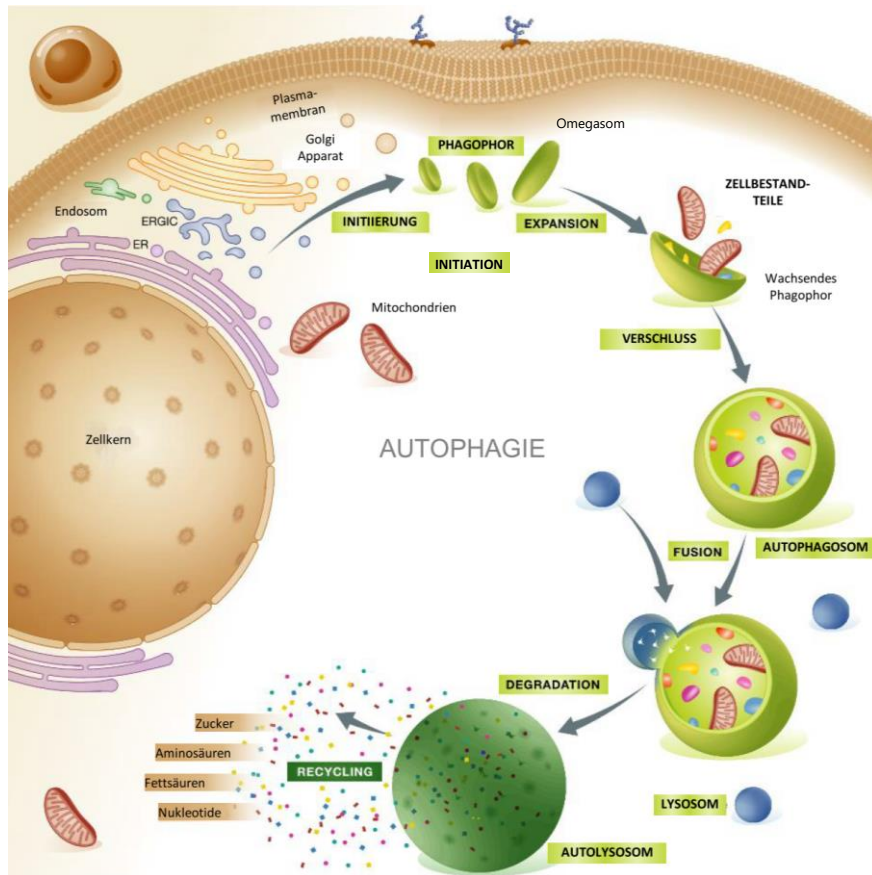
### **1.6 Rolle und Ablauf von Autophagie in Tumoren und der Zusammenhang mit miR-200b**

Autophagie - aus dem lateinischen „Selbstverdauung“ - ist ein zellulärer Prozess, auf den alle Zellen angewiesen sind, um alte, unbrauchbare Stoffwechselprodukte und Zellorganelle zu entsorgen oder zu recyceln. Zudem weist Autophagie antivirale und antibakterielle Eigenschaften auf. Autophagie ist ein Prozess, welcher bei vielen Erkrankungen eine Rolle zu spielen scheint, z.B. Diabetes, Kardiomyopathien, neurodegenerative Erkrankungen, Morbus Crohn oder Krebs. (53–61)

Auch für diese Arbeit, in welcher die tumorsuppressive Eigenschaft von miR-200b analysiert wird, ist die Autophagie-Aktivität ein hilfreicher Hinweis auf die Reaktion der Karzinomzellen auf miR-200b. Daneben könnte miR-200b auch einzelne Prozesse von Autophagie direkt beeinflussen.

Doch wie genau funktioniert Autophagie und in welchem Zusammenhang steht sie mit Krebs? Es gibt drei Formen von Autophagie: Makroautophagie, Mikroautophagie und Chaperon-verknüpfte Autophagie. Makroautophagie ist die prominenteste und die am besten untersuchte Form, sodass sich im Folgenden stets auf Makroautophagie bezogen wird. (62)

Beim Ablauf werden verschiedene Phasen durchlaufen, wie in Abb. 3 dargestellt.



**Abb. 3: Überblick über den Ablauf von Autophagie (nähere Erläuterungen im Fließtext Absatz 1.6).**

Quelle: Modifiziert nach Galluzzi L, Pietrocola F, Bravo-San Pedro JM, Amaravadi RK, Baehrecke EH, Cecconi F et al. Autophagy in malignant transformation and cancer progression. EMBO J 2015; 34(7):856–80. doi: 10.15252/emj.201490784. . Copyright 2020 by John Wiley and Sons (Lizenznummer 4824700718318)

In der Initiierung erfolgt die Bildung eines Omegasoms am endoplasmatischen Retikulum. Auslöser kann beispielsweise eine Malnutrition sein. Daraufhin wird das Omegasom über das Phagophor (auch Isolationsmembran genannt) und unter Aufnahme von Zellbestandteilen zum Autophagosom umgewandelt. (63–65)

Dieses weist auf seiner cytosolischen und auf seiner luminalen Seite Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 II (LC3 II) auf (64). Das Autophagosom fusioniert nun mit einem Lysosom zum Autolysosom. Wenn sich der Zyklus auf Stufe des Autolysosoms befindet, wird LC3 II auf der cytosolischen Seite wieder in die frei im Cytosol vorliegende LC3 I-Form umgewandelt, auf der luminalen

Seite wird es degradiert (66, 67). Nach der Verdauung der Inhalte des Autolysosoms wandelt sich dieses in das Protolysosom um und wird schließlich unter Akkumulation von Hydrolasen zu einem neuen Lysosom (68–70).

LC3 ist an der Initiierung (71), Reifung und Fusion (72–74) des Autophagosoms, bzw. Autolysosoms, sowie indirekt am intrazellulären Transport des Autophagosoms für seine Fusion mit dem Lysosom beteiligt (75). LC3 ist eine wichtige Struktur dieses Ablaufs und kann als ein Maßstab der Autophagie-Aktivität gewertet werden (76).

Doch wie verändert sich nun Autophagie im Rahmen von Krebserkrankungen bzw. in welchem Ausmaß benötigen Krebszellen Autophagie?

So komplex Autophagie ist, so kompliziert ist auch die Regulation im Tumor. Autophagie wirkt in frühen Tumorstadien eher als Tumorsuppressor, in späteren als Onkogen (77). Lane et al. (78) geben einen guten Überblick über diesen komplexen Zellvorgang. Tumorzellen weisen eine höhere basale Autophagie-Aktivität auf und das Überleben der stark proliferierenden Zellen ist von der Autophagie abhängig (79–82). Krebszellen haben aufgrund ihres erhöhten Stoffwechsels einen vermehrten Anfall von zellulären Bestandteilen, der beseitigt werden muss. Zum anderen herrscht in Tumoren häufig eine nährstoffarme, hypoxische Umgebung, so dass es für die Zellen zum Überleben äußerst effektiv ist, wenn sie ihre Ressourcen wiederverwenden können. (62, 77, 83)

Des Weiteren zeigten Schweiger et al. (84), dass durch Autophagie der Zelle mehr nutzbares Cholesterin und Triglyceride zur Verfügung standen. Außerdem konnten sie zeigen, dass Lipophagie (eine spezielle Form der Autophagie) durch freie Fette und Cholesterin unterdrückt wird (84).

Besonders interessant ist für diese Arbeit allerdings der Nutzen von Autophagie für Krebszellen im Hinblick auf verstärkte Stoffwechselaktivitäten und die onkogenen Eigenschaften von Autophagie.

## **1.7 MikroRNAs in der menschlichen Zelle**

MikroRNAs (miRNAs) machen 1% des menschlichen Genoms aus, beeinflussen 60% aller protein-codierenden Gene, sind in der Regulation von fast allen



zellulären Prozessen involviert und sind nur ~21 Nukleotide lang – folglich vielversprechende Moleküle aktueller Forschung. (85–88)

### **1.7.1 Biosynthese und Wirkmechanismus von mikroRNAs**

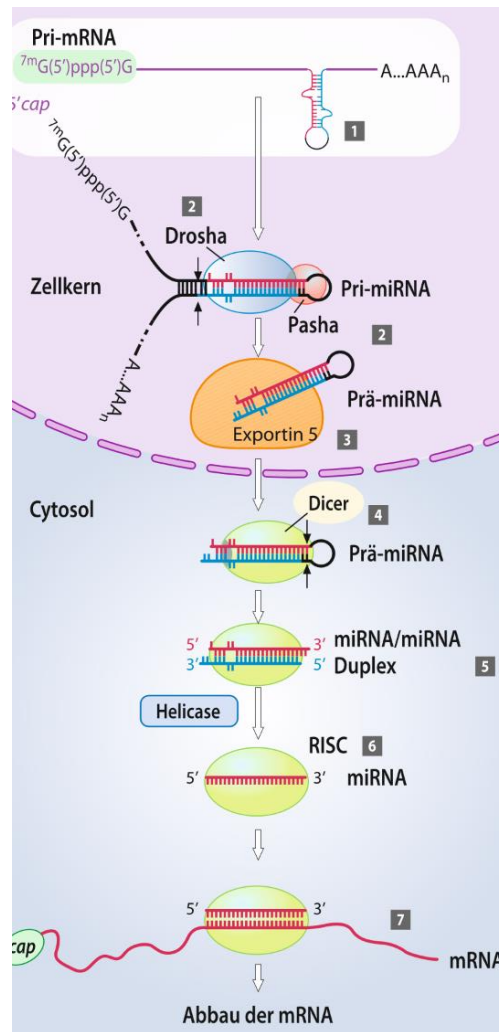
Wie in Abb. 4 dargestellt, besteht die Biosynthese von miRNA aus einer Kaskade von Einzelvorgängen, welche komplex zusammenwirken und reguliert sind.

Zunächst transkribiert die RNA Polymerase II eine pri-miRNA (89–91). Anschließend wird diese pri-miRNA im Zellkern von den Enzymen Drosha (eine RNase) und DGCR8 (DiGeorge Syndrom critical Region 8) prozessiert, so dass eine typische haarnadelartige pre-miRNA entsteht (90–92). Diese wird mithilfe von Exportin 5 in das Zytoplasma exportiert, wo das Enzym DICER1 (eine RNase III) die Haarnadelschleife abtrennt (92).

Die nun entstandene miRNA ist doppelsträngig und ~21 Nukleotide lang (92). In dieser Form bindet sie an ein Argonaute-Protein, das Effektor Protein des RISC (RNA-induced silencing complex) (92–94). Dort wird der Doppelstrang getrennt und ein Strang ausgewählt. Diese ausgereifte miRNA bindet nun im Rahmen des RISC an spezifische mRNA-Stränge und kann dadurch zu mRNA-Degradation, -Destabilisierung oder zu Hemmung der Translation führen. (91)

Eine miRNA kann dabei eine Vielzahl verschiedener mRNAs regulieren und eine mRNA kann durch mehrere verschiedene miRNAs reguliert werden (85).

Die miRNA selbst kann im Laufe ihrer Biogenese beeinflusst werden, indem beispielsweise Drosha oder DICER1 und damit auch die zugehörige miRNA herabreguliert wird (95).



**Abb. 4: Biosynthese der miRNA (Einzelheiten s. Text)**

Quelle: Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie; 9., vollständig überarbeitete Auflage; S.599. Copyright 2020 by Springer Nature (Lizenznummer 4852021323364)

### 1.7.2 MikroRNA und deren Bedeutung in malignen Tumoren

MiRNAs spielen eine wichtige Rolle bei der Tumorentstehung. Sie können direkt oder indirekt über die Beeinflussung wichtiger Stoffwechselwege, z.B. PI3K/Akt/mTOR als Onkogene oder als Tumorsuppressoren wirken (95–98). Es zeigte sich, dass sie damit wichtige Auswirkungen auf die Tumorprogression haben, da sie unter anderem EMT (Epitheliale-Mesenchymale Transition), Metastasierung, Angiogenese und das Mikro-Milieu des Tumors beeinflussen (95). Damit und mit der Vielfalt an Regulationsmöglichkeiten (siehe 1.7.1) qualifizieren sich miRNAs insbesondere auch als Zielstruktur von Medikamenten,

da mit der Regulierung eines Moleküls mehrere weitere Zielmoleküle beeinflusst werden können (85, 95).

Ein weiterer interessanter therapeutischer Ansatz ist die Sensitivierung Chemotherapie-resistenter Karzinome. So haben Studien gezeigt, dass miRNAs, z.B. miR-200b, miR-451 und/oder let7 Zellen für Chemotherapie sensibilisieren können, insbesondere wenn man Chemotherapie in Kombination mit miRNAs einsetzt. Dabei ergänzen sich die Wirkmechanismen gegenseitig, so dass ein höherer Effekt erzielt werden oder Resistenzen umgangen werden können. (95) Darüber hinaus können miRNAs in Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden und könnten somit auch als diagnostische/prognostische Parameter genutzt werden. Von besonderer Bedeutung und besonderem Nutzen ist dabei ihre große biochemische Stabilität in Körperflüssigkeiten, Serum und frischem oder mit Formalin fixiertem Gewebe. Eine Idee ist, mithilfe von miRNAs eine Art spezifisches Muster, zu etablieren, vergleichbar mit einem individuellen Fingerabdruck für jedes Karzinom, welcher Aufschluss über die Aggressivität des Tumors geben kann. Somit könnte die Therapie individuell angepasst werden. (99)

### **1.7.3 Die Bedeutung von miRNAs im Prostatakarzinom**

Wie in 1.1 bereits erläutert, fehlt es beim Prostatakarzinom an guten diagnostischen Parametern und an therapeutischen Möglichkeiten für das fortgeschrittene Prostatakarzinom.

MiRNAs sind auch beim Prostatakarzinom an der Tumorgenese, der Zelltransformation, der Entstehung von Metastasen und der Entwicklung von Medikamentenresistenzen beteiligt (99, 100). Zahlreiche Signalwege wurden bereits erforscht, zum Beispiel die Hemmung der Caspase 7-assoziierten Apoptose durch miR-106a oder die Interaktion von miR-497 und dem ERK-Signalweg (extracellular signal-regulated kinase), wodurch miR-497 die Zellproliferation hemmt (101, 102). Inzwischen gibt es Hinweise darauf, dass bestimmte miRNAs, beispielsweise miR-20a, miR-21, miR-145 und miR-221 im Blutplasma nachweisbar sind und demnach diagnostisch genutzt werden könnten (103). Zusätzlich berichten mehrere Studien einen Zusammenhang

zwischen Prognose des Prostatakarzinoms und Regulierung bestimmter miRNAs im zellulären Prostatakarzinomgewebe der Stanzbiopsien (104–108). Derzeit sind bereits mehr als 50 miRNAs bekannt, welche an der Pathogenese des Prostatakarzinoms mitwirken (101). Einige der bekanntesten Onkogene des Prostatakarzinoms sind miR-21, miR-32, miR-222, miR-181, miR-18a und miR-429. Wichtige Tumorsuppressor-Gene sind miR-221, miR-145, Let7a/c, miR-34a, miR-205, sowie die miR-200 Familie (100, 109–111).

#### **1.7.4 mikroRNAs - Einsatz als Medikamente**

MiRNAs sind also nicht nur für die Grundlagenforschung zum besseren Verstehen zellulärer Vorgänge und zur Diagnostik von entscheidender Bedeutung, sondern auch als potenzielle Medikamente interessante Strukturen.

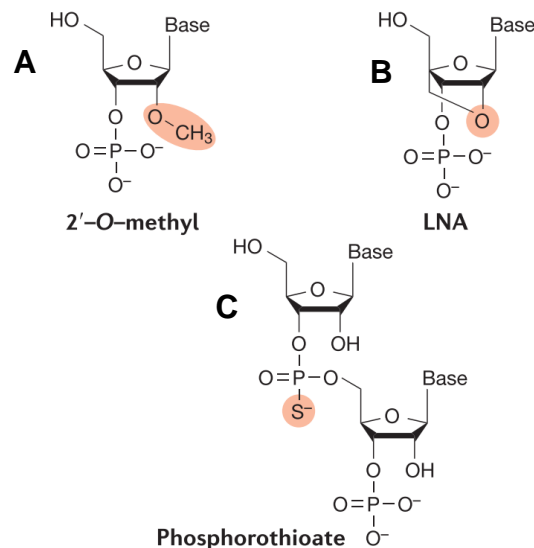
Derzeit befinden sich bereits einige miRNA-basierte Medikamente in Phase II Studien (112). Man verwendet entweder miRNA mimics oder anti-miRNAs (anti-miRs), welche den spezifischen miRNA-Gehalt erhöhen bzw. erniedrigen (113).

MiRNA mimics sind synthetisch hergestellte, doppelsträngige, kleine RNA Moleküle. Sie weisen die gleiche Struktur wie die entsprechende körpereigene miRNA auf und können somit deren zellulären Gehalt erhöhen (113).

Anti-miRs hingegen sind einsträngig und komplementär zur Ziel-miRNA. Dadurch binden sie an diese und blockieren ihre Wirkung oder führen zur Degradation (113).

Ein Problem beim klinischen Einsatz von miRNAs ist der Angriff von RNAsen im Serum oder die Verdauung im Endosom der Zellen. Um diesem Problem zu entgehen wurden verschiedene Techniken etabliert. (113)

Eine Möglichkeit besteht darin, die Oligonukleotide oder das RNA-Gerüst durch sogenannte locked nucleic acids (LNAs), durch Methylierungen oder durch Hinzufügen phosphorothioat-ähnlichen Gruppen zu schützen (vgl. Abb. 5) (114–116).



**Abb. 5: Verschiedene chemische Modifikationen der miRNAs, um die Stabilität zu erhöhen: Methylierungen (A), LNAs (locked nucleic acids) (B) und phosphorothioat-ähnlichen Gruppen (C)**

Quelle: Modifiziert nach Rupaimoole R, Slack FJ. Mikro-RNA therapeutics: Towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2017; 16(3):203–22. doi: 10.1038/nrd.2016.246. Copyright 2020 by Springer Nature (Lizenznummer 4824701289624)

Mit diesen Methoden entsteht jedoch auch eine neue Herausforderung. Um effektiv wirken zu können, muss die miRNA im RISC binden und dort spezifisch eine mRNA hemmen (siehe 1.7.1) oder fest an ihre Ziel-miRNA binden können. Die beschriebenen chemischen Modifikationen können dies jedoch negativ beeinflussen.

Ein weiterer Ansatz besteht darin, die miRNA mithilfe von verschiedenen Transportsystemen geschützt zu ihrem Ziel zu bringen (vgl. Abb. 6).

So kann man bspw. mit Fetten eine Art Biolayer oder Endosom konstruieren, in dessen Innerem sich die miRNA befindet. Auf diesem Prinzip basieren die Neutral lipid emulsions (NLEs) und die DOPC (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine). Bei ersteren verwendet man verschiedene Fette, bei DOPCs nur 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine. Das Problem von NLE ist,

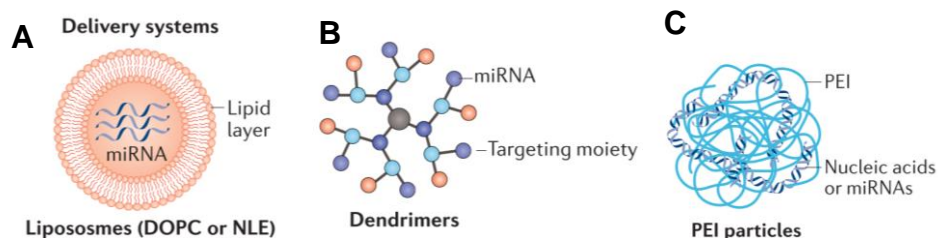
dass der Transport nicht zielgerichtet ist. Dafür ist die Toxizität geringer, wobei DOPCs bereits in präklinischen Studien getestet wurden.

Ein weiterer Ansatz sind Gerüste aus Polyetylenimin, innerhalb derer die miRNAs vernetzt sind. Durch diese Zusammensetzung der Polyetylenimine entsteht ein positiv geladenes Konstrukt, welches an der negativ geladenen Zelloberfläche bindet und in die Zelle aufgenommen werden kann. Auch das wird derzeit in präklinischen Studien getestet.

Man kann miRNAs auch mithilfe von sogenannten Dendrimern verpacken. Dabei werden Nucleinsäuren mit Polyamidoaminen oder Polypropylenimin verbunden. Diese sind zwar sehr effektiv, weisen aber aufgrund ihrer sehr starken positiven Ladung auch eine hohe Toxizität auf.

Eine andere Möglichkeit bieten EnGeneIC Delivery Vehicle nanocells. Das sind von Bakterien gebildete 400nm große Partikel, mit deren Hilfe miRNA gezielt transportiert werden kann, da man ihre Oberfläche zusätzlich mit Antikörpern versehen kann.

Eines der beliebtesten Mittel ist Polyethylenglycol an das die Nucleinsäuren mithilfe von Disulfidbrücken gebunden sind.



**Abb. 6: Transportsysteme für miRNAs**

Quelle: Modifiziert nach Rupaimoole R, Slack FJ. Mikro-RNA therapeutics: Towards a new era for the management of cancer and other diseases. Nat Rev Drug Discov 2017; 16(3):203–22. doi: 10.1038/nrd.2016.246. Copyright 2020 by Springer Nature (Lizenznummer 4824701289624)

Im Mausmodell wurden miRNAs bereits erfolgreich bei Hepatitis, Herzerkrankungen, diabetesassoziierter Nierenfibrose und Sklerodermie eingesetzt. Die klinischen Studien befinden sich derzeit bereits in Phase I bzw. II. (113)

## **1.8 MiR-200b und ihre Bedeutung in zellbiologischen Vorgängen**

Die miR-200b ist Teil der miR-200 Familie, welche auch noch miR-200a, miR-200c, miR-141 und miR-429 beinhaltet. Sie finden sich in zwei Clustern auf Chromosom 1p36.33 (miR-200b-200a-429) und auf Chromosom 12p13.31 (miR-200c und -141). Man kann die miR-200 Familie allerdings nicht nur anhand ihrer Lokalisation, sondern auch anhand ihrer Seedsequenzen in zwei funktionelle Gruppen einteilen: miR-200b-200c-429 und miR-200a-141. (117–119)

Der suppressive Einfluss der miR200-Familie auf Zelltransformation, Tumorphiliferation, Migration, Invasion, Metastasen, Apoptose, die Entwicklung von Chemotherapie-Resistenzen und EMT wurde bereits untersucht. Forschungsergebnisse der letzten Jahre zeigen den Einfluss von miR-200b auf Brust-, Lungen-, Magen-, Endometriums-, Blasen-, Haut-, Gehirn-, Leber-, Nasopharynx-, Eierstock-, Pankreas-, Nieren-, Schilddrüsen- und Prostatakarzinom, sowie auf kolorektale Karzinome. (120, 121)

### **1.8.1 MiR-200b und mögliche zelluläre Zielstrukturen**

Sucht man auf TargetScan, Stand 2020, nach Zielgenen von miR-200b, so kommt man auf 3225 mögliche Zielgene (122). TargetScan ist ein Webserver zur Vorhersage möglicher Zielgene von miRNAs mithilfe der Analyse der jeweiligen Seedsequenz der miRNA und mithilfe möglicher Ziel-mRNA.

Einige der gefundenen Zielgenen wurden in weiteren Studien als tatsächliche Zielstrukturen definiert. So zeigte sich, dass miR-200b beim kolorektalen Adenokarzinom die Resistenz gegenüber Oxaliplatin durch Beeinflussung von TUBB3 (Tubulin Beta 3 Class III) abschwächt (123). Ein weiteres Beispiel zeigt sich bei Forschung am Wilms-Tumor. MiR-200b moduliert hier über die Regulierung von IKK- $\beta$  (Inhibitor of kappa-B kinase subunit beta) den NF- $\kappa$ B-Signalweg (nuclear factor-kappa B-Signalweg) (124). Dieser Signalweg zeigt sich bei malignen Tumoren häufig fehlreguliert und trägt zur Progression maligner Tumoren bei (125, 126).

Ein weiteres Enzym, welches sich auf Targetscan zeigte, war SOAT1 (122). SOAT1 ist als weitere neue Zielstruktur von miR-200b interessant, da es auch Zusammenhänge zwischen Autophagie, Fett- und Cholesterinstoffwechsel und

miR-200b (vgl. 1.5 und 1.6) gibt. Zudem scheint SOAT1 in Karzinomzellen onkogen zu wirken, womit wiederum ein Teil der tumorsuppressiven Eigenschaft von miR-200b erklärt werden könnte (127).

### **1.8.2 MiR-200b die Bedeutung im Prostatakarzinom**

Auch im Prostatakarzinom scheint miR-200b eine wichtige Rolle zu spielen. Besonders gut erforscht ist inzwischen die Funktion von miR-200b bei EMT, einem Kernprozess zur Metastasierungsfähigkeit von Tumorzellen (128). So ist sie Teil des doppelten Feedback-Loops mit den Transkriptionsfaktoren E-Cadherin und Zinc finger E-box-binding (ZEB1/2), wodurch miR-200b EMT inhibiert und somit die Metastasierungsfähigkeit von Karzinomzellen verringert (129).

E-Cadherin ist ein transmembranes Glykoprotein, welches der Zelle eine Zell-Zell-Interaktion ermöglicht. Dadurch bleibt sie höher differenziert und zeigt eine geringere Metastasierungswahrscheinlichkeit und eine geringere EMT. ZEB1 und ZEB2 wiederum unterdrücken E-Cadherin. Die mRNAs dieser beiden Proteine werden von miR-200b auf der Ebene der Translation gehemmt. Die Folge ist eine erhöhte Expression von E-Cadherin und somit eine geringere EMT und Metastasierung. (129)

Zusätzlich zeigten Yu et al. (128), dass BMI-1 (B cell-specific Moloney murine leukemia virus integration site) eine Zielstruktur von miR-200b sein kann. BMI-1 ist ein Onkogen und spielt eine Rolle in Zellproliferation, EMT sowie Chemotherapieresistenzen in verschiedenen Karzinomen. (130–132)

Ein anderer interessanter Wirkmechanismus der tumorsuppressiven Eigenschaften von miR-200b im Prostatakarzinom beruht auf der direkten Regulation von PRKAR2B (protein kinase cAMP-dependent type II regulatory subunit beta), und damit auf einer Inhibition von Tumorwachstum und auf einer Erhöhung der zellulären Apoptose (133). PRKAR2B ist der Regulator-Teil der aus vier Anteilen bestehenden PKA (Proteinkinase A). PKA ist ein entscheidendes Enzym des PKA-Signalwegs, welcher einige der wichtigsten Prozesse des Prostatakarzinoms beeinflusst (unter anderem Proliferation, Progression und Differenzierung) (134).



Ansonsten jedoch bleibt der genaue Wirkmechanismus der Proliferationshemmung von miR-200b im Prostatakarzinom nach wie vor unklar (128, 129, 135). Deswegen ist es wichtig, weitere Zielstrukturen von miR-200b zu erforschen, um damit, zusätzlich zum Verständnis zellulärer Vorgänge, therapeutische und diagnostische Ideen entwickeln zu können.

## 1.9 Zielsetzung

So vielfältig die Prognose des Prostatakarzinoms ist, so vielfältig ist auch seine histologische, pathologische und molekulare Komplexität. Sowohl die Variabilität in der Prognose als auch die therapeutische Konsequenz ist mannigfaltig. In diesem Zusammenhang ist es umso wichtiger, Parameter zu finden, welche helfen, die Prognose besser einzuordnen, Therapien zu spezifizieren und Erklärungsansätze für den Pathomechanismus bei der Entstehung des Prostatakarzinoms zu finden.

MiRNAs, als postreplikativ arbeitende Regulatoren der Genexpression, stellen dafür eine gute Möglichkeit dar. Insbesondere miR-200b spielt eine Rolle bei der Tumorpheriferation, Migration, Invasion und Metastasierung verschiedener maligner Tumoren und wirkt in den meisten Fällen als Tumorsuppressor. Zudem gibt es Hinweise, dass miR-200b eine Bedeutung in der Regulation des Fettstoffwechsels zu besitzen scheint. Welche Rolle miR-200b in der Entstehung und Progression des Prostatakarzinoms spielt, ist zurzeit noch nicht eindeutig beantwortet. Ziel der hier vorgestellten Arbeit war demnach,

- die Expression von miR-200b im Nativmaterial zweier unabhängiger Prostatakarzinom-Kollektive herauszustellen und die Assoziation zwischen der miR-200b Expression mit klinischen Daten in einem Hochrisiko-Prostatakarzinom Kollektiv zu analysieren,
- herauszufinden, ob miR-200b *in vitro* eine Auswirkung auf die Proliferation und auf die Autophagie von Prostatakarzinom-Zellen hat,
- SOAT1 als mögliches Zielgen von miR-200b zu etablieren,
- die Sensitivität von Prostatakarzinom-Zellen gegenüber spezifischen SOAT1-Inhibitoren in Abhängigkeit zu der Expression von miR-200b zu untersuchen.

Dafür wurden Prostatakarzinom-Zelllinien mittels Zellversuchen und verschiedener Assays (Proliferationstests, transiente Transfektionen in Zellkulturen, Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Western Blot-Untersuchungen) getestet. Des Weiteren wurden Expressionsassays in Nativmaterial der Prostatakarzinom-Kollektive durchgeführt.

## **2 Material und Methoden:**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Zellkultur**

##### **2.1.1.1 Prostatazelllinien**

Es wurden die Zelllinien CRL1740 (nachfolgend LNCaP (Lymph Node Carcinoma of the Prostate)), CRL 1435 (nachfolgend PC3 (Prostate Cancer 3)) und CRL11609 (nachfolgend RWPE (prostate epithelial transformed by HPV)) von der American Tissue Culture Collection (ATCC) verwendet, die allesamt Prostatagewebe entstammten.

- LNCaP: Ein männlicher 50 Jahre alter Kaukasier war der Spender für den LNCaP-Klon. Die Zellen entstammen einer Nadelpunktion einer supraklavikulären Lymphknotenmetastase. Sie wachsen adhärent, als einzelne Zellen und nur leicht miteinander als Cluster verbunden. Auf Stimulation mit 5-Alpha-Dihydrotestosteron reagieren sie mit Wachstum und mit Produktion von Saurer Phosphatase. Eine Verdopplungszeit betrug etwa 34 Stunden.
- PC3: Die Zellen entstammen einer Knochenmetastase eines 62 Jahre alten Kaukasiers mit Grad IV Adenokarzinom. Sie wachsen adhärent, weisen eine niedrige saure Phosphatase- und Testosteron-5-alpha-Reduktase-Aktivität auf und zeigen eine Verdopplungszeit von ca. 30 Stunden.
- RWPE: Der RWPE-Klon geht von gesundem Prostatagewebe aus der peripheren Zone eines 54jährigen Kaukasiers hervor. Er wurde nur mit HPV 18 (humane papilloma virus) transfiziert, sodass die adhärent wachsende Zelllinie RWPE entstand.

### 2.1.1.2 Zellkulturmedien

PC3 und LNCaP:

RPMI-1640-Medium der Firma Merck Millipore war der Hauptbestandteil des Kulturmediums von PC3 und LNCaP. Zusätzlich wurde 5ml Natriumpyruvat, ein Medium mit nicht-essenziellen Aminosäuren (MEM NEAA) und 5ml HEPES-Puffer hinzugefügt und vor Gebrauch zusätzlich 50ml 10% fetales Kälberserum (FBS). Zum Schutz vor bakteriellen Verunreinigungen wurde in manchen Fällen noch 50ml einer Lösung von Penicillin und Streptomycin hinzugefügt.

RWPE:

Für die RWPE-Zellen eignete sich 100ml keratinozytenfreies Serum (KSFM) der Firma Thermo Fisher Scientific Inc als Basis, welches mit 520µl BPE (boviner Hypophysenextrakt) und 13,08µl rekombinatem EGF versetzt war.

Um für optimale Bedingungen zu sorgen, wurden stets alle Medien vor Gebrauch auf dem Wasserbad erwärmt und bei Raumtemperatur verwendet.

## 2.1.2 Chemikalien und Biochemikalien

### 2.1.2.1 Zellkulturreagenzien

Zellkulturreagensz	Hersteller
RPMI 1640 Medium 500ml	Merck Millipore, Deutschland
Keratinocyte-SFM 500ml	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
OPTI-MEM® I 1x 100ml	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Trypsin-EDTA (0,25%)	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Penicillin-Streptomycin 1%, 100x, 5ml	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Sodium Pyruvate 100mM	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 (epidermal growth factor) Recombinant Human Protein Solution	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Fetal Bovine Serum (10%)	Merck Millipore, Deutschland

PBS (Phosphate buffered saline) Dulbecco 500ml	Merck Millipore, Deutschland
HEPES-Buffer 100ml (1M)	Merck Millipore, Deutschland
Trypan Blue Solution (0,4%)	Sigma-Aldrich, USA

### 2.1.2.2 Chemikalien für molekularbiologische Experimente

Produkt	Hersteller
1,1-Dimethylbiguanid-hydrochlorid 97% Stocklösung	Sigma-Aldrich, USA
Alamar Blue®	AdB Serotec, UK
Escherichia coli 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 200ml	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
miScript SYBR® Green PCR Master Mix	Qiagen, Deutschland
miScript SYBR® Green RT-PCR Reagents Kit	Qiagen, Deutschland
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 ≥ 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
CelLytic™ M Cell Lysis Reagent	Sigma-Aldrich, USA
Caspase Glo 3/7 Kit	Sigma-Aldrich, USA
Aqua ad iniectionabilia	Braun, Deutschland

### 2.1.2.3 Primer für qRT-PCR und Antikörper

Bezeichnung	Sequenz	Fluoreszenzmarkierung	Hersteller
β-Actin	5'- cct ggc acc cag cac aat - 3'	5' SYBR® Green 1	Biomers, Deutschland
RNU6B	5' cgc aag gat gac acg caa att cgt gaa gcg ttc cat att ttt 3'	FAM	Thermo Fisher Scientific Inc., USA

hsa-miR-200b	5' uaa uac ugc cug gua aug aug 3'	FAM	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
SOAT1	Sonden-Primer-Mix Hs00162077_m1	FAM	Life Technologies, USA
SREBP1	5' - act tct gga ggc atc gca agc - 3'	FAM	BioRad California, USA

#### 2.1.2.4 Plasmide für die Transfektion

Codierte miRNA	Lieferant
miR200b	Life Technologies, Carlsbad, Calif., USA
Pre miR Kontrolle	Life Technologies, Carlsbad, Calif., USA

#### 2.1.2.5 Antikörper für Western Blot Experimente

Bezeichnung	Typ/ Herkunft	Konzentration	Hersteller
SOAT1	Kaninchen, polyklonaler Antikörper, erwartete Bande bei 47 kDa	1:200	abcam (ab39327), Cambridge, UK
ERK-2	Maus monoklonales IgG2b $\kappa$ , erwartete Bande bei 42 kDa	1:4000	Ambion, USA
LC3A/B I/II	Kaninchen Monoklonaler AK #4108, erwartete Bande 14 und 16 kDa	1:2000	Cell Signalling Deutschland
Meerrettich - Peroxidase gekoppelter 2. Antikörper	Maus (P0260) Schwein (P0399)	1:2000 (SOAT1) 1:100 (LC3A/B I/II) 1:10000 (ERK-2)	Dako, Glostrup/Dän emark GE Healthcare

### 2.1.3 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Gerät	Modell(e)	Hersteller
Autoklav	3850 EL	Systec, Deutschland
Brutschrank	CB 210 WTB	Binder, Deutschland
Elektrophoresekammer	Mini-PROTEAN® 3 Cell Mini Trans-Blot® Cell Power Pac 300	Bio-Rad, USA Bio-Rad, USA Bio-Rad, USA
Filmkassette	Amersham Hypercassette™ Autoradiography Cassettes 18x24cm	GE Healthcare, UK
Folienschweißgerät	FS 3602 „Folio“	Severin, Deutschland
Küvetten	UltraVette 70 - 850 µl	Roth, Deutschland
Magnetrührer	Combimag RCH	IKA, Deutschland
Mikroskop	Diavert	Leitz, Deutschland
Monochromator	Multiskan MS	Labsystems, USA
Nitrocellulosemembran	Protran® Amersham® 0,45 µm	GE Healthcare
Pipetten	Transferpette®	Brand, Deutschland
Reaktionsgefäße	CELLSTAR® Tubes 15/50 ml Eppendorf Tubes steril 1,5 ml Eppendorf Tubes steril 2 ml Eppendorf Tubes steril 5 ml	Sarstedt, Deutschland Eppendorf, Deutschland
Schüttler	IKA® Vortex 3 Vortex 7- 2020 Hybriturn plate shaker 002041 B1 Polymax 1040	Sigma-Aldrich, USA neolab, Deutschland Hybritech, USA Heidolph, Deutschland
Sicherheitswerkbank	06 12	Prettl, Deutschland



Spektralphotometer	SmartSpec™ Plus NanoDrop 2000c	Bio-Rad, USA Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Thermocycler	Primus 96 plus Rotor- Gene Q GeneAmp® PCR System 9700	MWG Biotech, Deutschland Qiagen, Niederlande Applied Biosystems, USA
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf, Deutschland
Waage	SAC51 200g x 0,01g	A. Hartenstein, Deutschland
Wasserbad	EcoTemp TW12	Julabo, Deutschland
Zellkultur	Fuchs-Rosenthal- Kammer CELLSTAR® Cell Culture Flasks (75 cm <sup>2</sup> ) CELLSTAR® Cell Culture Flasks (25 cm <sup>2</sup> ) CELLSTAR Pipetten 5/10/25 ml Nunc™ MicroWell Plates 6/12/96-Well 96-Well White Microplate Accu-Jet® Pro	Brand, Deutschland Sigma-Aldrich, USA greiner bio-one, Deutschland greiner bio-one, Deutschland greiner bio-one, Deutschland Brand, Deutschland
Zentrifuge	Biofuge primo Megafuge 16 R Centrifuge Mini Centrifuge MCF- 2360 Centrifuge 5415D	Heraeus Instruments, Deutschland Thermo Fisher Scientific, USA LMS, Deutschland Eppendorf, Deutschland

## 2.1.4 Software

Software
Access Software for Multiskan
Apache OpenOffice™
Citavi 5.7.1.0
Magellan™ für Spektralphotometer
Microsoft Excel für Windows 2016
Microsoft Word für Windows 2016
Nanodrop 2000c
Rotor-Gene Q

## 2.2 Stichprobe und Kollektiv

### 2.2.1 Prostatakarzinom-Nativmaterial

Das erste Kollektiv entstammte der Tumorbank der Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie der Universität Würzburg (n=59 Tumorproben mit korrespondierendem Normalgewebe), welches im Rahmen einer radikalen Prostatektomie gewonnen wurde. Dieses wird im Folgenden als Kollektiv 1 bezeichnet. Da dieses Gewebe nur Kryo-konserviert und nativ eingebettet wurde, waren weitere Versuche im Vergleich zu dem in Paraffin eingebetteten Gewebe von Kollektiv 2 (siehe unten) möglich. Frau Dr. med. Maria Schubert (Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie der Universität Würzburg) und Herr Prof. Dr. med. Philipp Ströbel (Institut für Pathologie der Universitätsmedizin Göttingen) waren für die Sammlung verantwortlich und Frau Barbara Dexler isolierte mit Hilfe des RNAlater®-Systems (QIAGEN, Hilden/Deutschland) nach Hersteller-Empfehlungen RNA aus dem vorher Kryo-konservierten Material.

Zu diesem Kollektiv lagen außer der Diagnose des Prostatakarzinoms keine weiteren klinischen Daten vor. Es ist somit von seinen klinischen Eigenschaften ein rein zufällig zusammengesetztes Kollektiv. So kann nicht von einem

Hochrisiko-Kollektiv gesprochen werden und Kollektiv 1 und 2 sind nicht uneingeschränkt zu vergleichen.

Zusätzlich zu Kollektiv 1 wurde noch ein Hochrisiko-Kollektiv analysiert. Die Proben für diese Untersuchungen (n=132) stammten von Erkrankten mit einem Hochrisiko-Prostatakarzinom (PSA >20 ng/ml und/oder klinisches T3/4 Stadium und/oder bioptisch gesichertem Gleason-Score 8-10) ab. Zwischen 1994-2002 unterzog sich diese Gruppe einer radikalen Prostatektomie im städtischen Klinikum Karlsruhe und wurden in die European Multicenter Prostate Cancer Clinical and Translational Research Group database (EMPaCT) aufgenommen. Alle Erkrankte erhielten präoperativ ein Staging mit DRU, CT (Computer Tomographie) Abdomen und Knochenszintigrafie. Lymphknotenpositive Erkrankungen waren kein Ausschlusskriterium. Das klinische Stadium wurde mithilfe des TNM System 2002 definiert, Prostatabiopsien wurden unter transrektalem Ultraschall gewonnen und Blutentnahmen für den PSA Test wurden vor der digital-rektalen Untersuchung oder vor dem digitalen Ultraschall durchgeführt. Niemand aus diesem Kollektiv erhielt eine neoadjuvante Hormon-, Strahlen- oder Chemotherapie. Die Festlegung des TNM-Stadiums und des Gleason-Scores erfolgte von zwei Pathologen (P.Ströbel und E. Lerut). Follow-up Untersuchungen erfolgten nach der Operation alle drei Monate für die ersten zwei Jahre, alle sechs Monate für die folgenden drei Jahre und danach jährlich. Klinischer Progress (KP) der Erkrankung wurde definiert als histologisch bewiesenes lokales Rezidiv oder als eine mit CT oder Knochenszintigrafie entdeckte Fernmetastase. Die Todesursache wurde durch eine ärztliche Bescheinigung und/oder einen Totenschein verifiziert, krebsassoziierter Tod (KAT) wurde definiert als Tod aufgrund von Prostatakarzinom. Das Gesamtüberleben bezog sich auf die Zeit von der radikalen Prostatektomie bis zum Tod jeglicher Ursache. Karzinomspezifisches Überleben (cancer-specific survival, CSS) wurde als die Zeit von der radikalen Prostatektomie bis zum Tod aufgrund des Karzinoms oder Komplikationen dieser Erkrankung definiert. Die Proben waren paraffingebettet. Für die RNA Extraktion und die quantitative real-time PCR wurden Regionen mit >90% Karzinomgewebe verwendet.

Die Studie wurde von der Ethikkommission genehmigt (Nr. 59/04 und B322201214832). Als Vergleichsgruppe diente das Gewebe von Metastasen dieses Kollektivs (n=24), als Kontrollgruppe Gewebe mit benigner Prostatahyperplasie (n=9). Im Folgenden wird dieses Kollektiv als Kollektiv 2 bezeichnet.

**Tabelle 1: Charakterisierung Kollektiv 2**

Merkmals	Kollektiv	
Anzahl der ausgewerteten Karzinome	n=132	
Anzahl der ausgewerteten BPH	n=9	
Anzahl der ausgewerteten Metastasen	n=24	
Gewebeeinbettung	Paraffin	
Alter bei Operation (Jahre)	47-81 (Ø66)	
Follow-Up-Zeit (Jahre)	Ø 6,85 (0,08–12,83)	
Verstorben (Nicht Prostatakarzinom-spezifisch)	11	
Verstorben (Prostatakarzinom-spezifisch)	8	
Gleason Score	3+3=6	n=3 (2,3%)
	3+4=7a	n=36 (27,3%)
	4+3=7b	n=3 (2,3%)
	4+4=8	n=48 (36,4%)
	4+5=9/5+5=10	n=42 (31,8%)
Tumor-Stadium (pT-Stadium)	pT2	n=14 (10,6%)
	pT3a	n=40(30,3%)
	pT3b	n=56(42,4%)
	pT4	n=22(16,7%)
Lymphknotenstatus	pN0	n=79(59,8%)
	pN1	n=53(40,2%)
PSA-Wert präoperativ (ng)	20-160 (Ø48)	
PSA-Progress	JA	n=33(25%)
	NEIN	n=99(75%)
Zeitpunkt PSA-Progress (Monate)	3-54 (Ø24)	

Klinischer Progress			JA	n=13(9,8%)
			NEIN	n=119(90,2%)
Zeitpunkt (Monate)	klinischer	Progress	3-89 (Ø25)	

### 2.3 Zellkultur von prostataspezifischen Zellen

Alle Ziellinien wurden in einem Brutschrank bei konstanten 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% in 250ml Kulturflaschen gehalten.

Zum Ernten der Zellen wurde das Medium abgesaugt und zum Lösen 2ml Trypsin in jede Kulturflasche pipettiert, welches ca. 5 Minuten einwirkte. Zum Beenden der Reaktion wurde 5ml spezifisches Zellmedium (ohne Penicillin und Streptomycin im Falle der LNCaP- und PC3-Zellen) zugegeben. Die in Medium und Trypsin gelösten Zellen wurden in 15ml Falcon-Röhrchen umgefüllt und zentrifugiert, sodass sich die Zellen als Pellet absetzten. Das Medium-Trypsin-Gemisch wurde abgesaugt und je nach Pelletgröße mit frischem zell-spezifischen Medium aufgefüllt.

Schließlich wurde von dieser Zellsuspension 10µl zu 90µl Trypsinblau pipettiert und davon wiederum ca. 10µl auf die Zählplatte. Die Zellen wurden daraufhin mithilfe des Mikroskops gezählt und schließlich die Anzahl der Zellen pro ml nach folgender Rechnung berechnet: X=gezählte Zellen Y= Anzahl Zellen/ml

$Y = X : 4$  (auf der Zählplatte werden vier Felder gezählt) \* 10 (wegen der 1:10 Verdünnung mit Trypsinblau) \* 10.000 (wegen der Zählplatte).

### 2.4 Transfektion

Um bei den Testzelllinien den Spiegel an spezifischer miRNA zu regulieren wurde zunächst Lipofectamine® 2000 Reagent 1mg/ml (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) benutzt, um damit die Zellen für die Transfektion vorzubereiten. Im darauffolgenden Schritt wurde das Ambion® Pre-miRTM miRNA-Precursor-System laut Herstellerangaben verwendet. Die Zellen wurden ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert, um sie am nächsten Tag zu transfizieren. Dafür wurde zunächst überschüssiges Medium abgesaugt und auf den OPTI-MEM- und Lipofectamin-Ansatz (1:200) gegeben. Für die Transfektion mit premiRvana-200b wurde ebenfalls mit OPTI-MEM und der jeweiligen PremiRNA im Verhältnis

1:50 pipettiert. Danach wurde mit spezifischem Medium aufgefüllt. Der Erfolg der Transfektion wurde mittels PCR auf den Gehalt an miRNA in Kontroll- und Testzellen überprüft.

## 2.5 MTS-Proliferations-Assay

Der MTS Cell Proliferation Assay wurde mit drei verschiedenen Zellreihen durchgeführt: LNCaP, PC3 und RWPE. Das Prinzip des MTS-Proliferations-Assay beruht auf der Fähigkeit vitaler Zellen, Tertrazolin-Salze in Formazan zu reduzieren. Dadurch entsteht ein Farbumschlag, welcher mithilfe eines Photometers messbar ist. Bei dem verwendeten CellTiter 96®-Assay von Promega (Madison/USA), wurde Phenazinmethosulfat (PMS) als Elektronenkopplungsreagenz direkt zusammen mit dem MTS-Reagenz [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt] zu den Zellen gegeben. Das MTS-Reagenz reagierte zum gelblich gefärbten Formazan. Formazan ist im Kulturmedium löslich und hat sein Absorptionsmaximum bei 490-500nm. Bei Testung der Absorption bei 492nm lässt sich auf die Anzahl vitaler Zellen schließen, da nur vitale Zellen zu dieser Reaktion fähig sind.

Die Zellen wurden in 96-Well Platten gezogen; LNCaP  $1 \times 10^5$  Zellen/ml; PC3  $1 \times 10^4$  Zellen/ml und RWPE  $1,5 \times 10^4$ . Pro Well wurde 100µl Zell-Medium-Suspension pipettiert und über Nacht inkubiert, um am nächsten Tag zu transfizieren. Die Zellen wurden daraufhin wieder 24h im Zellschrank bebrütet. Am darauffolgenden Tag wurde mit 100µl Zellmedium aufgefüllt, welches mit verschiedenen Konzentrationen von Mitotane oder spezifischen SOAT1-Inhibitoren (PD 132301-2) versehen war (beispielhaft dargestellt in Abb. 7). Die verwendeten Konzentrationen unterschieden sich je nach Sensitivität der Zellen:

- LNCaP: 1:1000 (Mitotane 40µM, PD 132301-2 1,0µM), 1:2000 (Mitotane 20µM, PD 132301-2 0,5µM), 1:4000 (Mitotane 10µM, PD 132301-2 0,25µM);
- PC3: 1:200 (Mitotane 200µM, PD 132301-2 5,0µM), 1:500 (Mitotane 80µM, PD 132301-2 2,0µM) und 1:1000 (Mitotane 40µM, PD 132301-2 1,0µM);

- RWPE: 1:2000 (Mitotane 20µM, PD 132301-2 0,5µM), 1:4000 (Mitotane 10µM, PD 132301-2 0,25µM), 1:8000 (Mitotane 5µM, PD 132301-2 0,125µM).

Am Tag 4, 7 und 8 nach Transfektion wurde ein MTS-Test durchgeführt. Dafür wurde das MTS-Reagenz in einer Verdünnung von 1:11 mit PBS verwendet und 100µl pro Well auf die Zellen pipettiert. Nach 3-4h im Brutschrank konnte die Absorption der Platten bei 492nm durch einen Monochromator Labsystems MultiSKAN MS (Artisan®, Champaign/USA) gemessen werden.

Alle Versuche wurden in Triplets angelegt, durchgeführt und ausgewertet.

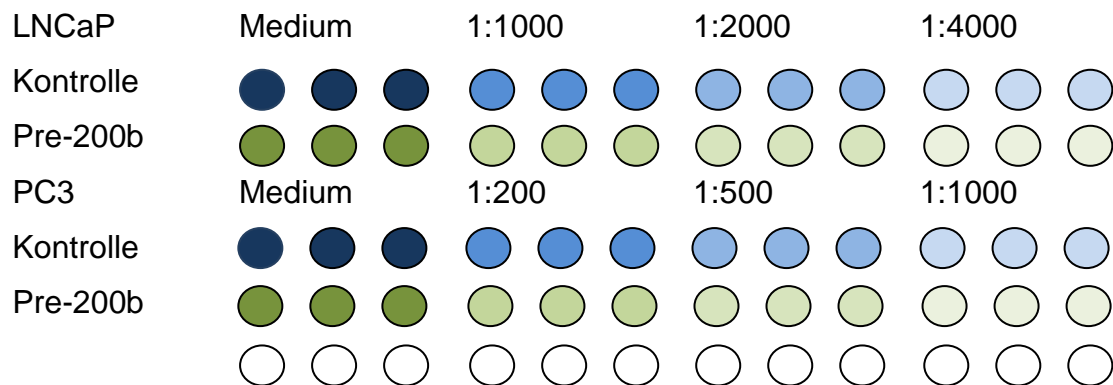


Abb. 7: Schema eines MTS Proliferation Assays:

Beispielhafte Anordnung mit abnehmenden Inhibitor-Konzentrationen und zell-spezifischer Unterschiede je nach Sensitivität

Quelle: Eigene Abbildung

## 2.6 RNA Isolierung

Für die RNA Isolierung wurden die Zellen in 50ml Flaschen gezogen und je nach Versuch transfiziert und/oder mit Inhibitor behandelt. Daraufhin wurden die Zellen trypsiniert, mit PBS gewaschen und das Gemisch zum Entfernen des Mediums zentrifugiert. Nun befanden sich die Zellen als Pellet in einem Flacon-Röhrchen, in welches 1ml Trizol pro 50-100mg Probe gegeben wurde. Diese wurde 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nun konnte die Probe entweder bei -20°C eingefroren oder direkt mit der RNA Isolation fortgefahren werden. Dafür wurde 0,2ml Chloroform (pro ml Trizol) hinzugegeben, 2-3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 15 Minuten bei 12 000g zentrifugiert. Die Flüssigkeit

enthielt die RNA und wurde abpipettiert, das Pellet verworfen. Die Flüssigkeit wurde mit 0,5ml Propanol (pro ml Trizol) gemischt und 20 min bei -20°C inkubiert. Nach der folgenden Zentrifugation von 10 min bei 12 000g setzte sich die RNA gelartig ab. Der Überstand wurde entfernt und das RNA-Pellet in 1ml 75%-Ethanol (pro 1ml Trizol) gemischt, um die RNA zu resuspendieren und um sie anschließend 5 Min bei 7500g und 4 °C zu zentrifugieren. Das RNA Pellet wurde schließlich ganz getrocknet und danach in 50µl RNAsefreiem Wasser gelöst und bei 55-60°C für 10 Minuten im Thermomixer zur vollständigen Resuspension inkubiert. Nun konnte die RNA bei -20 °C eingefroren oder für weitere Tests verwendet werden.

## **2.7 mRNA- und miRNA- Bestimmung mit qRT PCR:**

Um RNA mittels realTime PCR (polymerase chain reaction) nachweisen zu können muss sie zunächst in cDNA (complementary/komplementäre DNA) umgeschrieben werden. Diese kann nun im nächsten Schritt amplifiziert werden so dass man sie nachweisen kann. Ein Zyklus dieser Amplifizierung besteht aus drei Schritten:

**Im ersten Schritt, der Denaturierung** kommt es durch Erhitzen des Testansatzes auf 95°C zur Denaturierung und Auftrennung der Doppelhelix-Struktur der DNA in Einzelstränge. Dadurch können sich im

**zweiten Schritt, dem Annealing**, die synthetischen Oligonukleotide (Primer), welche den zu amplifizierenden Genabschnitt flankieren, anlagern. Dafür muss der Ansatz wieder auf 50-65°C abkühlen.

**Im letzten Schritt, der Elongation**, verlängert die Taq-DNA-Polymerase bei ihrem Temperaturoptimum von 72°C den Einzelstrang nun in 3'-Richtung zu einem neuen Doppelstrang.

Diese drei Phasen werden mehrfach wiederholt, so dass es zu einer exponentiellen Zunahme des gewünschten Genabschnittes kommt. Es sind im Schnitt ca. 30-40 Zyklen nötig, um genügend DNA zu erhalten.

Bei der verwendeten quantitativen PCR wurde die Amplifikation mittels Fluoreszenz nach jedem Zyklus gemessen.



### **2.7.1 Reverse Transkription**

Für die Umwandlung von miRNA in cDNA wurde das TaqMan® MiRNA Reverse Transcription Kit von Applied Biosystems (Carlsbad/USA) verwendet. Dabei wurden bereits in diesem Schritt spezifische Primer benutzt, so dass nur bestimmte miRNAs umgeschrieben wurden.

Für die Umwandlung von mRNA wurde das ImProm-IITM Reverse Transcription System von Promega (Madison/USA) verwendet, bei dem die gesamte RNA mittels eines unspezifischen Primers in cDNA umgewandelt wird und erst im nächsten Schritt eine Spezifizierung mit qPCR und SYBR-GREEN stattfindet.

Hier wurde jeweils nach Herstellerangaben vorgegangen und für die Amplifikation der Primus 96 Plus-Cycler von MWG-Biotech (Ebersberg/Deutschland) verwendet.

### **2.7.2 Quantitative PCR**

Um die Amplifikation der cDNA messen zu können, wurde für mRNA SYBR-GREEN und für miRNA FAM verwendet, welche mit der DNA interkalierten und somit Fluoreszenz-Signale abgaben, die mit jedem Zyklus stärker wurden. Als Maß diente dabei der Ct (cycle threshold). Das Prinzip beruht darauf, dass je nach Ausgangs-cDNA unterschiedlich viele Zyklen benötigt werden, um ein bestimmtes Niveau an Fluoreszenz detektieren zu können. Ist viel cDNA vorhanden ist dieser Wert nach weniger Zyklen erreicht, ist wenig cDNA vorhanden sind mehr Zyklen nötig. Der Ct Wert ist also indirekt proportional zum cDNA Gehalt.

Da verschiedene Zellen unterschiedliche Genexpressionslevel aufweisen können wird ein Maß zum Normalisieren benötigt, so dass unabhängig vom generellen Expressionslevel Rückschlüsse auf die Expression einer spezifischen mRNA bzw. miRNA geschlossen werden können. Hierfür wurde  $\beta$ -Aktin für die mRNA und RNU6B für die miRNA, sogenannte housekeeping RNAs verwendet, welche in jeder Zelle etwa gleich stark exprimiert sind.

## 2.8 Proteinisolation

Zunächst wurden die Proteine mittels PhosphoSafe™ Extraction Reagent nach Herstellerangaben isoliert und mittels Spektralphotometer SmartSpec™ Plus NanoDrop 2000c die enthaltene Proteinmenge vermessen.

## 2.9 Western Blot

Die Western Blot Analysen dienen zur Untersuchung des Proteingehalts der Testzellen nach unterschiedlichen Transfektionen. Das Prinzip beruht darauf, dass die Proteine zunächst anhand ihrer Masse im elektrischen Feld aufgetrennt werden und im darauffolgenden Schritt mittels spezifischer Antikörper einzelne Proteine sichtbar gemacht werden.

Dafür wurden 23µl pro Geltasche in ein vom Hersteller fertiges Agarose-Gel pipettiert. Das Gemisch bestand aus 15µg Protein, 6µl Ladebuffer und wurde mit PBS aufgefüllt.

Der Ladebuffer bestand aus

- 7,74g Trizma®, pH 7 (Sigma-Aldrich, St. Louis/USA),
- 6g SDS (sodium dodecyl sulfate) (Calbiochem, La Jolla/USA),
- 30ml Glycerin 87% (Merck, Darmstadt/Deutschland),
- 15ml β-Mercaptoethanol (Gibco, Paisley/UK),
- 1 Spatelspitze Bromphenolblau (Merck, Darmstadt/Deutschland),
- destilliertem Wasser, mit dem bis 1000ml aufgefüllt wurde.

Der Ladebuffer wurde mit dem restlichen Proteinansatzgemisch 10 min auf 98°C erhitzt.

Der Ladebuffer hat die Aufgabe, die Proteine zu entfalten und negativ zu laden. Dafür enthält er unter anderem SDS und β-Mercaptoethanol, welche Disulfidbrücken löst. SDS ist so stark negativ geladen, dass es die Eigenladung der Proteine überdeckt und somit die Proteine im elektrischen Feld allein anhand ihrer Masse wandern lässt. Um aus dem zellulären Proteingemisch anschließend spezifische Proteine sichtbar machen zu können, wurden zunächst die Proteine anhand ihrer Masse in einem Agarose Gel (Mini-PROTEAN® TGXTM-Gele von BIO-RAD, Hercules/USA, Dichte 12%) aufgetrennt.

Die genaue Zusammensetzung des Laufpuffers:

- 30,3g Trizma®, pH 7 (Sigma-Aldrich, St. Louis/USA),
- 88 Glycin (AppliChem, Darmstadt/Deutschland),
- 10g SDS (Calbiochem, La Jolla/USA) und
- destilliertes Wasser, mit dem bis 1000ml aufgefüllt wurde.

In jeder Gel-Tasche befand sich gleich viel Protein aus den verschiedenen Proben und in einer weiteren Tasche ein Protein-Marker. Die gesamte Reaktionskammer wurde mit einem Laufpufferansatz gefüllt und an Strom (300V) angeschlossen. Die Proteine trennten sich nun auf, indem sie von der Kathode zur Anode wanderten. Je nach Proteingröße dauerte die Auftrennung 20-40 min. Im darauffolgenden Schritt wurden die so aufgetrennten Proteine vom Gel auf eine Nitrocellulosemembran (Protran® Amersham® 0,45µM) durch eine senkrecht zum Gel angelegte elektrische Spannung (150V, 18 min) übertragen. Der dafür verwendete Blotting-Puffer enthielt

- 30,3g Trizma®, pH 7 (Sigma-Aldrich, St. Louis/USA),
- 188g Glycin (AppliChem, Darmstadt/Deutschland),
- 100ml Methanol (Sigma-Aldrich, St. Louis/USA) und
- destilliertes Wasser, mit dem bis 1000ml aufgefüllt wurde.

Damit die Proteine wieder ihre natürliche Konformation annehmen können, ist es wichtig, das SDS zu entfernen. Dies wurde durch mehrmaliges Waschen erreicht. In Vorbereitung des nächsten Schritts wurde die Membran mit 5%iger Magermilch gegen unspezifische Antikörper-Bindungen geblockt. Die Membran wurde über Nacht mit dem primären Antikörper gegen das zu detektierende Protein (vgl. 2.1.2.4) inkubiert. Der Antikörper band an die Proteine, die das von ihm erkannte Antigen aufwiesen. Nun wurde wieder gewaschen und die Membran mit einem sekundären Antikörper, der an den Fc-Teil des primären Antikörpers band, inkubiert. Bei diesem Antikörper handelte es sich um einen polyklonalen Kaninchen-Antikörper gegen Maus-Immunglobuline (P0260, Dako, Glostrup/Dänemark) sowie um einen polyklonalen Schweine-Antikörper gegen Kaninchen (P0399, Dako, Glostrup/Dänemark). Beide wurden abhängig vom gesuchten Protein in Verdünnungen zwischen 1:1000 und 1:10000 angesetzt. Der sekundäre Antikörper war zusätzlich an Meerrettich-Peroxidase (Horseradish Peroxidase, HRP) gekoppelt. Als Mittel zur Detektion des HRP-

Signals auf Röntgenfilmen diente das ECLTM Prime Western Blotting-Reagenz (GE Healthcare, Buckinghamshire/UK), das nach Herstellerangaben angewandt wurde.

## **2.10 Statistik**

Zur Textverarbeitung und Datenverarbeitung der MTS-Test Daten wurde das Office Paket 2016, Version 2103 (Word, Power Point und Excel) verwendet. Als Signifikanzniveau wurde  $p < 0,05$  festgelegt. Die Daten für die Analyse des Hochrisiko-Prostatakarzinom-Kollektivs wurden in Zusammenarbeit mit dem interdisziplinären Zentrum für klinische Forschung (Labor für Microarray-Anwendungen, Leitung: Dr. S. Kneitz, Mitarbeit: Dr. C. J. Scholz) der Universität Würzburg bearbeitet. Hierbei wurden Kaplan-Meier-Kurven mit dichomatisierten Parametern anhand eines optimalen Schwellenwerts errechnet. Für kontinuierliche Parameter (miR-200b Expression) wurden diese mittels des bioconductor package for survival in R erstellt. Mit den Daten zur miR-200b Expression und der verschiedenen klinischen Daten wurden uni- und multivariate Cox-Regressionsmodelle auf Zusammenhänge mit der Zeit bis zum KP, BCP und KAT untersucht. Um die Teststärke zu bestimmen, wurde das Paket powerSurvEpi in R verwendet. Die Ergebnisse wurden anschließend auf den p-Wert überprüft, wobei das Signifikanzniveau mit  $\alpha=5\%$  festgelegt wurde.

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 „\*\*\*“.

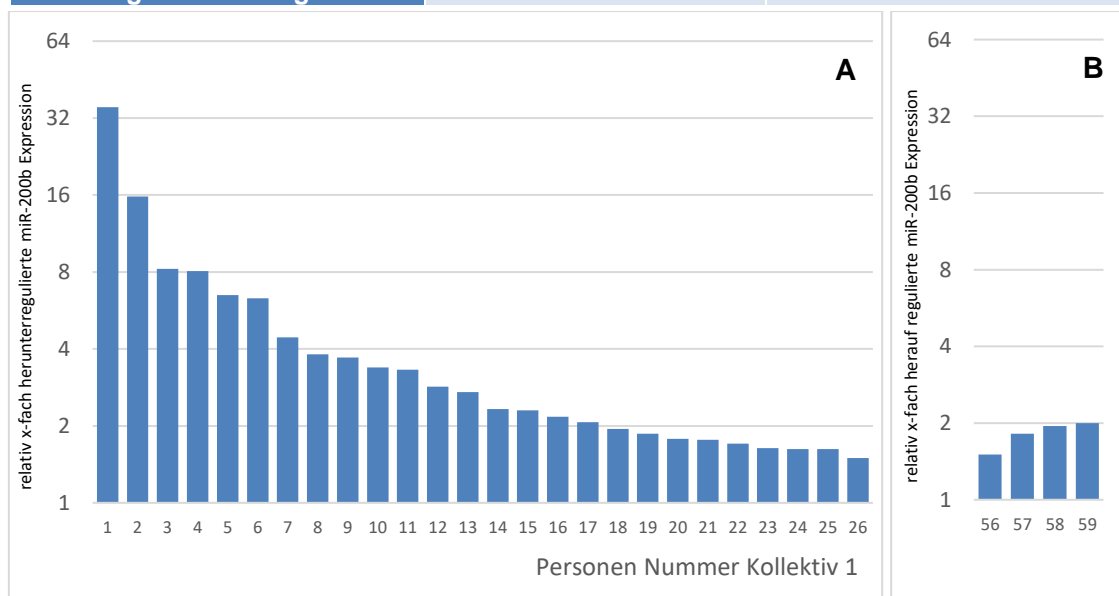
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Expression von miR-200b in Prostatakarzinom Nativmaterial

Zunächst wurde in dieser Arbeit untersucht, inwieweit miR-200b im Prostatakarzinom exprimiert ist und ob ein Unterschied der Expression zu nicht malignen Kontrollen beobachtet werden kann. Hierzu wurde mittels  $\Delta\text{Ct}$ -Werten aus den qRT-PCR-Analysen die Expression von miR-200b berechnet. Zunächst wurde die Expression von miR-200b im Prostatakarzinom mit der Expression von miR-200b in nicht malignem, tumor-assoziierten Gewebe aus derselben Prostata unter Verwendung eines Prostatakarzinom-Kollektivs 1 (Kollektiv 1) untersucht. Eigenschaften und Spezifizierung des Kollektiv 1 sind in 2.2 aufgeführt.

**Tabelle 2: Expressionsunterschiede von miR-200b in Kollektiv 1 im gepaarten Testmodell**

	Anzahl der Fälle	% am gesamten Kollektiv
Anzahl gesamt	n=59	100%
Unterepression	n=26	44%
Überexpression	n=4	7%
Keine signifikante Regulation	n=29	49%



**Abb. 8: Herauf- / Herabregulierte Expression von miR-200b in Kollektiv 1.**

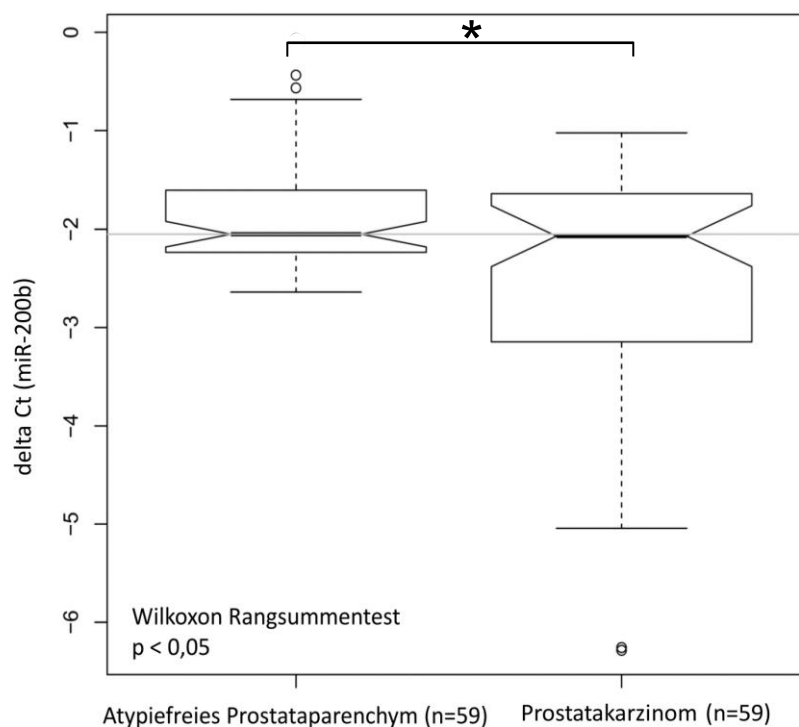
**A+B:** Jeder Balken stellt in logarithmischer Skalierung die signifikante, um x-fach veränderte miR-200b-Expression des Karzinomgewebes im Vergleich zur entsprechenden, atypiefreien Prostata derselben Person dar. Nicht signifikant unterschiedliche Testpaare (Nummer 27-55) sind nicht dargestellt. Ab einer um 1,5-fach veränderten Expression galt der Expressionsunterschied in dem Testmodell als signifikant. Die Balken von Nummer 1-26 (A) zeigen eine herabregulierte, Nummer 56-59 (B) eine heraufregulierte miR-200b-Expression im Karzinomgewebe.

Eine 1,5-fach veränderte Expression der jeweiligen Testpaare (Tumorgewebe vs. nicht malignem-tumorassozierten Gewebe) wurde als herauf- bzw. herab-regulierte miR-200b Expression gewertet. Somit zeigte sich in 44% der Testpaare eine erniedrigte miR-200b-Expression und in 7% eine erhöhte Expression im jeweils korrespondierenden Karzinomgewebe (vgl.

Tabelle 2 und Abb. 8).

Ein Wilcoxon-Rangsummentest bestätigte eine statistisch signifikante, geringere Expression von miR-200b im Prostatakarzinom-Gewebe ( $p < 0,05$ ) (vgl. Abb. 9).

Alle dargestellten statistischen Analysen in diesem Absatz wurden in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Kneitz durchgeführt.

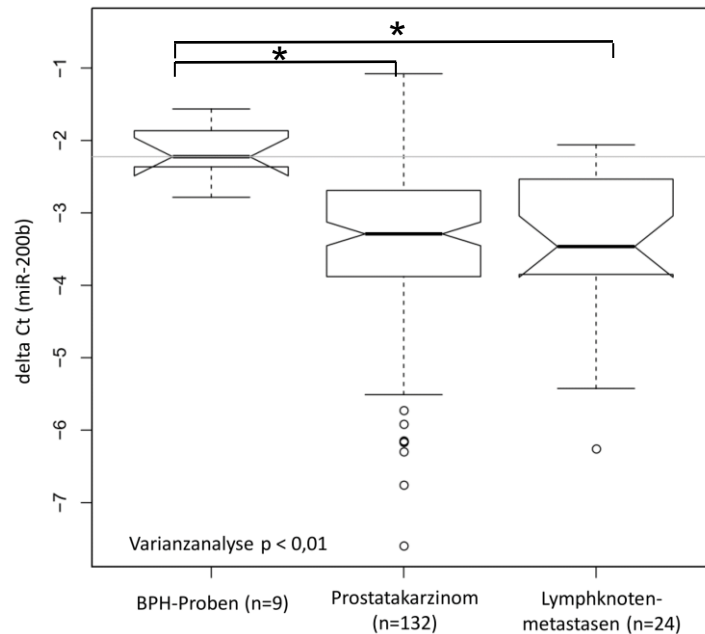


**Abb. 9: Regulation der miR-200b Expression in Kollektiv 1**

Relative miR-200b-Expression des Prostatakarzinom-Kollektivs 1 (n=59 Tumorproben mit korrespondierendem Normalgewebe). Verglichen wurde in einem Rangsummentest die relative miR-200b-Expression in Form von  $\Delta$ Ct-Werten aus den qRT-PCR-Messungen. Man erkennt eine Herabregulierung von miR-200b in Tumorgewebe im paarweisen Vergleich zur Kontrolle (atypiefreies Gewebe derselben Prostata) (Wilcoxon Rangsummentest;  $p < 0,05$ ). In den Boxen der Box-Plots ist jeweils der Median sowie das obere und untere Quartil dargestellt. Zusätzlich zeigen die Antennen den maximalen 1,5-fachen Interquartilsabstand.

Um Aussagen bezüglich der Korrelation zwischen klinischem Verlauf und miR-200b-Expression machen zu können, wurde ein weiteres Kollektiv (Kollektiv 2) untersucht, für welches ausführliche Verlaufsdaten vorhanden sind. Dieses Kollektiv weist ausschließlich Hochrisiko-Prostatakarzinome (PSA >20 ng/ml oder Gleason-Score  $\geq 8$  oder cT2c, vgl. auch 1.1.3) auf. Kollektiv 1 im Gegensatz war keiner Vorselektion unterzogen und beinhaltet eine zufällige Auswahl von Prostatakarzinom-Erkrankten und demzufolge unterschiedliche Risiko-Stadien. Des Weiteren war das Material von Kollektiv 2 aus Paraffin-Gewebe gewonnen. Kollektiv 1 dagegen war kryo-konserviert.

Zunächst bestätigte sich die geringere Expression von miR-200b in den Kontrollen (hier BPH (benigne Prostatahyperplasie)). Beim Vergleich der Expressionsmediane in Karzinomen (n= 132), Lymphknotenmetastasen-Gewebe (n=24) und BPH (n=9) im Kollektiv 2 mittels einer einfaktorielle ANOVA zeigte sich ein Unterschied der Expression von miR-200b ( $F(2, 162) = 4,87, p < 0,01$ ) in den drei Gruppen. Anschließend durchgeführte Bonferroni-korrigierte Tests ergaben einen signifikanten Unterschied zwischen Karzinom und BPH ( $p < 0,05$ ) sowie zwischen Metastasen und BPH ( $p < 0,05$ ), jedoch keinen Unterschied zwischen Tumor und Metastasen ( $p = 0,807$ ). Im Vergleich der Mittelwerte ergab sich eine 1,17-fach geringere miR-200b-Expression im Karzinomgewebe. Das entspricht einer relativ 2,2-fach schwächeren Expression (vgl. Abb. 10).



**Abb. 10: Regulation der miR-200b-Expression im Hochrisiko-Kollektiv: Prostatakarzinom (n=132), Metastasen (n=24), BPH-Proben (n=9).**

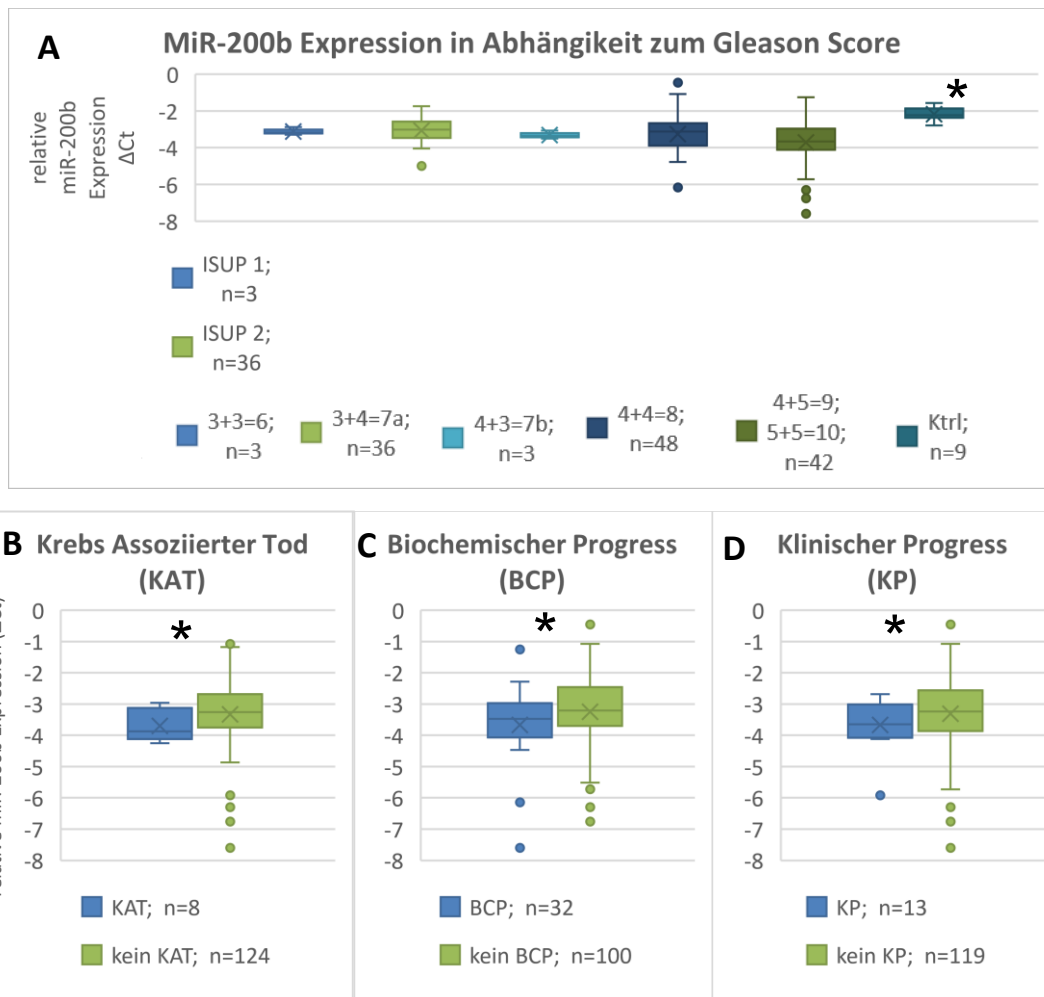
Verglichen wurde die relative miR-200b-Expression in Form von  $\Delta Ct$ -Werten aus den qRT-PCR-Messungen. Man erkennt einen Unterschied der miR-200b-Expression zwischen den drei Gruppen (einfaktorielle ANOVA,  $F(2, 162) = 4,87, p < 0,01$ ). In den Boxen des Box-Plots ist jeweils der Median sowie das obere und untere Quartil dargestellt. Zusätzlich zeigen die Antennen den maximalen 1,5-fachen Interquartilsabstand.

Demnach lässt sich festhalten, dass die miR-200b-Expression in beiden Kollektiven signifikant reduziert war. Inwiefern eine Korrelation zwischen klinischem Verlauf und der Expression von miR-200b besteht, wird in 3.1.1 mithilfe der weiteren Auswertung von Kollektiv 2 erläutert.

### 3.1.1 Expression von miR-200b in Abhängigkeit von klinischen Endpunkten im Prostatakarzinom

Wie in Abschnitt 3.1 bereits erläutert, war miR-200b in beiden Kollektiven herabreguliert. Ob die Expression nun auch mit klinischen Parametern korreliert und ob sich anhand des Hochrisiko-Kollektivs (Kollektiv 2) retrospektiv Aussagen bezüglich des Progresses des Prostatakarzinoms treffen lassen, war das Ziel der folgenden Analysen. In einem ersten Schritt wurde die Expression von miR-200b bei klinischem oder biochemischem Progress oder krebsassoziiertem Tod sowie in Abhängigkeit von verschiedenen Gleason-Score Stadien verglichen (siehe Abb. 11).





**Abb. 11: miR-200b Expression in einem Hochrisiko-Prostatakarzinom-Kollektiv (n=132) in Abhängigkeit von verschiedenen klinischen Parametern.**

In A: Gleason Score; B: BCP (biochemischer Progress) (n=32); C: KAT (krebssassoziierter Tod) (n=8) und D: KP (klinischer Progress) (n=13). In den Boxen der Box-Plots ist jeweils der Median sowie das obere und untere Quartil dargestellt. Zusätzlich zeigen die Antennen den maximalen 1,5-fachen Interquartilsabstand und es sind die Ausreißer mitabgebildet, diese wurden jedoch von der Analyse ausgeschlossen.

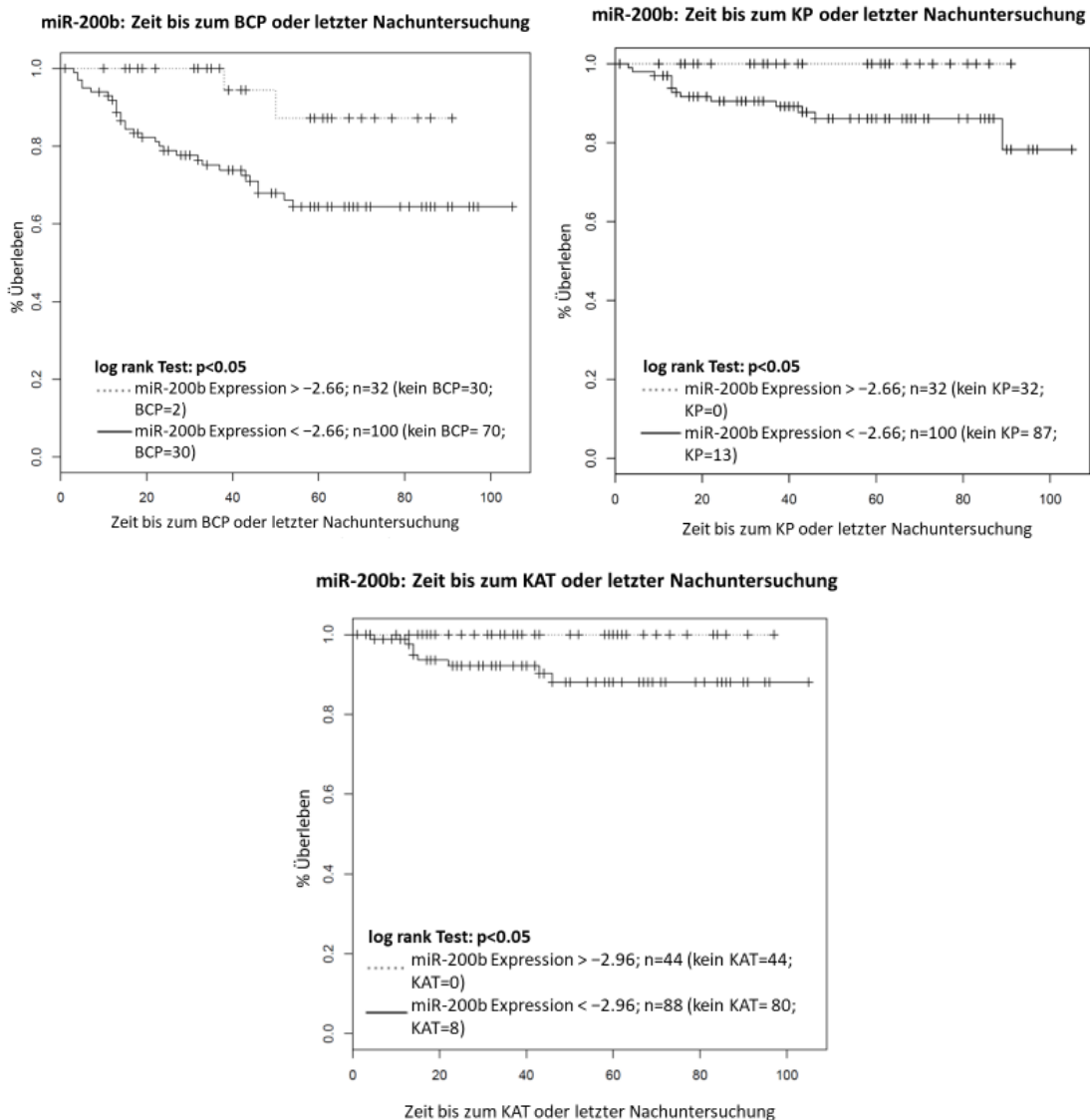
A: Unterschiedliche miR-200b-Expression in Abhängigkeit von verschiedenen Gleason Scores und Kontrolle (einfaktorielle ANOVA  $F(6,14) = 2,28, p < 0,05$ ). Bonferroni-korrigierte post hoc Tests zeigen einen signifikanten Unterschied jeden Scores zur Kontrolle, jedoch keinen Unterschied zwischen den einzelnen Gleason Scores.

B-D: Geringere miR-200b Expression bei KAT (Wilcoxon Rangsummentest;  $U=231, Z \approx -2,611, p < 0,05$ ) (B), Erkrankte mit einem BCP (Welch Test,  $t(66)=-2,32, p < 0,05$ ) (C) und mit einem KP (Welch Test,  $t(18)=-1,97, p < 0,05$ ) (D).

Wie in Abb. 11 zu sehen ist, sank die miR-200b Expression bei Erkrankten mit höherem Gleason-Score. Eine Varianzanalyse (einfaktorielle ANOVA;  $F(6,138) = 2,28, p < 0,05$ ) zeigte, dass sich die miR-200b-Expression signifikant für verschiedene Gleason Scores verglichen mit der Kontrollgruppe (BPH-Gewebe) unterschied. Bonferroni-korrigierte post Hoc Tests zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen den unterschiedlichen Stadien (vgl. Tabelle 7 im Supplement).

Weitere Vergleiche mit klinischen Parametern zeigten bei Erkrankten mit BCP eine 1,2-fach (Welch Test,  $t(66) = -2,32, p < 0,05$ ), bei Erkrankten mit KAT eine 1,46-fach (Wilcoxon Rangsummentest  $U=231, Z \approx -2,611, p < 0,05$ ) und bei Erkrankten mit einem KP (Welch Test,  $t(18) = 1,97, p < 0,05$ ) eine 1,3-fach niedrigere miR-200b-Expression als beim Kontrollgewebe ohne klinischen Progress (vgl. Abb. 11).

Um nun festzustellen, ob mithilfe der miR-200b-Expression Vorhersagen bezüglich des klinischen Verlaufs im Hochrisiko-Kollektiv gemacht werden können, wurden Cox-Regressionsmodell-Analysen durchgeführt. Dafür wurden ROC-Kurven für BCP, KP und für KAT generiert, um damit Grenzwerte der miR-200b-Expression bei  $< -2,66\Delta Ct$  (KP&BCP) bzw. bei miR-200b-Expression  $< -2,97\Delta Ct$  (KAT) festzulegen. Mithilfe dieser Grenzwerte konnte man das Kollektiv dichotomisieren und Kaplan-Meier Kurven erstellen (vgl. Abb. 12). Damit lässt sich bestätigen, dass Erkrankte, welche eine relative miR-200b Expression von  $< -2,66\Delta Ct$  aufwiesen signifikant häufiger einen BCP (log rank Test:  $p < 0,05$ ) und signifikant häufiger einen KP (log rank Test:  $p < 0,05$ ) zeigten. Bei einer Expression von miR-200b  $< -2,965\Delta Ct$  wiesen die Studienteilnehmenden signifikant häufiger einen KAT (log rank test:  $p < 0,05$ ) auf (vgl. Abb. 12).



**Abb. 12: Überlebensanalyse von Erkrankten mit einem Hochrisiko-Prostatakarzinom. Kaplan-Meier-Analyse des Hochrisiko-Kollektivs nach erfolgter Dichotomisierung durch ROC. Die Überlebenskurven wurden mit dem bioconductor package for survival in R generiert. Schwache miR-200b-Unterexpression war signifikant mit einem früheren Prostatakrebs-bedingtem Tod, einem klinischen Progress und einem biochemischen Progress des Karzinoms assoziiert (log rank  $p < 0,05$ ).**

Mithilfe der Dichotomisierung anhand der generierten Grenzwerte folgte eine uni- und multivariate Cox-Regressionsmodell-Analyse, wobei die miR-200b-Expression und andere klinische Parameter (Gleason-Score, PSA, Alter, pT-Stadium) mit der klinischen Progression des Prostatakarzinoms korreliert wurden.

Bei der univariaten Analyse zeigte sich hierbei, dass miR-200b signifikant ( $p < 0,05$ ) mit BCP korreliert. Gleiches galt für den Gleason-Score ( $p < 0,05$ ). Alter, PSA und pT-Stadium korrelierten nicht signifikant ( $p > 0,05$ ). Dieselben univariaten Analysen wurden auch für die Korrelation mit KP und KAT durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten ebenfalls für miR-200b Expression ( $p < 0,01$  KP;  $p < 0,05$  KAT) und Gleason-Score ( $p < 0,01$ ) eine signifikante Korrelation, nicht jedoch für PSA, Alter und pT-Stadium ( $p > 0,05$ ). Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

**Tabelle 3: Univariante Cox-Regressionsanalyse**

Univariate Cox-Regressionsanalyse für die Parameter miR-200b, Gleason-Score, Serum-PSA (Prostata-spezifisches Antigen) (ng/μl), Alter, pT-Stadium für BCP (biochemischen Progress), KP (Klinischer Progress) und KAT (krebsassoziiertes Tod). Dargestellt ist die jeweilige hazard ratio (HR), das Konfidenzintervall (CI) und der p-Wert des Likelihood-Quotienten-Tests für jeden korrespondierenden Parameter.

Variable + BCP	Univariate				
	n	HR	95% CI		p Wert (Likelihood Quotienten Test)
miR-200b	132, Events: 32	0,20	0,05	0,83	$p < 0,05$
Gleason-Score		1,51	1,06	2,14	$p < 0,05$
PSA		1,00	0,99	1,01	$p = 0,56$
Alter		0,98	0,93	1,03	$p = 0,34$
pT - Stadium		1,06	0,53	2,11	$p = 0,86$

Variable + KP	n	HR	95% CI		p Wert (Likelihood Quotienten Test)
	miR-200b	132, Events: 13	0,00	0	Inf
Gleason-Score		3,24	1,74	6,04	$p < 0,01$
PSA		1,01	0,99	1,02	$p = 0,46$
Alter		0,94	0,87	1,01	$p = 0,10$
pT - Stadium		0,82	0,29	2,34	$p = 0,71$

Variable + KAT	n	HR	95% CI		p Wert (Likelihood Quotienten Test)
	miR-200b	132, Events: 8	0,00	0	Inf
Gleason-Score		6,33	2,28	17,6	$p < 0,01$
PSA		1,02	1,00	1,03	$p = 0,11$
Alter		0,95	0,86	1,05	$p = 0,28$
pT - Stadium		0,32	0,08	1,20	$p = 0,10$

Um zu analysieren, ob miR-200b im Vergleich mit den gängigen Parametern als aussagekräftiger diagnostischer und prognostischer Wert Bestand hat, folgten

daraufhin multivariate Analysen. Dabei zeigte sich, dass BCP am besten mit der Kombination aus hohem Gleason-Score und niedriger miR-200b Expression korreliert ( $p < 0,01$  Likelihood Quotienten Test;  $p < 0,01$  Wald Test;  $p < 0,01$  Score log rank test). Für KP ergab die Analyse zusätzlich zur niedrigen miR-200b Expression als "best fitting model" den Gleason-Score und das Alter (vgl. Tabelle 4). Für KAT wiesen jedoch Gleason Score und pT-Stadium die höchste Korrelation auf, die miR-200b-Expression war demnach in der multivariaten Analyse nach den Akaike Informationskriterien nicht enthalten.

**Tabelle 4: Multivariates Modell für die aufgeführten Parameter in der Cox-Regression.**

Nach dem Akaike Informationskriterien (AIC) wurde das obenstehende Modell mit den Parametern miR-200b, Gleason, Serum-PSA (Prostata-spezifisches Antigen) (ng/μl), Alter, pT-Stadium für jeweils biochemischen Progress (BCP), klinischen Progress (KP) und krebsassoziiertem Tod (KAT) als „best-fitting-model“ ausgewählt. Die Tabelle zeigt außerdem die jeweilige hazard ratio (HR), das Konfidenzintervall (CI) und die p-Werte der jeweiligen statistischen Tests.

BCP	Multivariat, nach Akaikes Informationskriterium (AIC)			p Wert
	HR	95% CI		
miR-200b - Expression	0,21	0,05	0,88	
Gleason-Score	1,45	1,03	2,03	
Likelihood Quotienten Test				$p < 0,01$
Wald Test				$p < 0,01$
Score (logrank) Test				$p < 0,01$

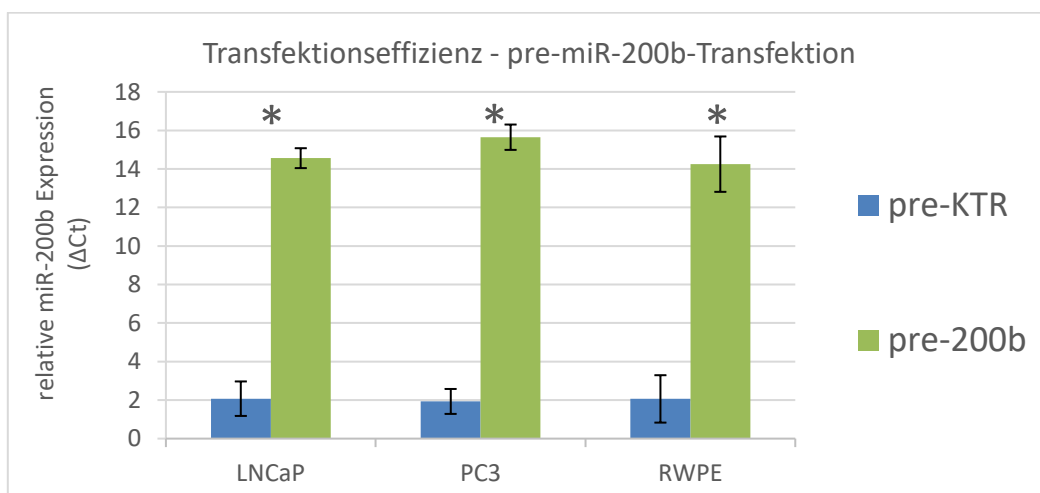
KP	Multivariat, nach Akaikes Informationskriterium (AIC)			p Wert
	HR	95% CI		
miR-200b - Expression	0,00	0,00	Inf	
Gleason-Score	2,83	1,60	4,99	
Alter	0,92	0,84	1,00	
Likelihood Quotienten Test				$p < 0,01$
Wald Test				$p < 0,01$
Score (logrank) Test				$p < 0,01$

KAT	Multivariat, nach Akaikes Informationskriterium (AIC)			p Wert
	HR	95% CI		
miR-200b - Expression				
Gleason-Score	7,59	2,50	22,99	
pT Stadium	0,24	0,06	1,00	
Likelihood Quotienten Test				$p < 0,01$
Wald Test				$p < 0,01$
Score (logrank) Test				$p < 0,01$

Dennoch kann man zusammenfassend festhalten, dass in dem verwendeten Hochrisiko-Prostatakarzinom-Kollektiv miR-200b ein unabhängiger Prognosemarker für das Hochrisiko-Prostatakarzinom mit ungünstigem Verlauf darstellt.

### 3.2 Funktion von miR-200b in Prostatakarzinomzelllinien *in vitro*

Nachdem eine Herabregulation von miR-200b im Prostatakarzinom festgestellt wurde, waren die molekularen Wirkmechanismen von miR-200b sowie die mögliche Funktion als Tumorsuppressor von Interesse. Um die zellbiologische und molekulare Funktion von miR-200b *in vitro* zu untersuchen, wurden PC3-, LNCaP- und RWPE-Zellen verwendet. Im ersten Schritt wurde transient mit pre-miR-200b transfiziert, um eine Überexpression von miR-200b zu bewirken. Für alle Experimente mit diesen transfizierten Zellen wurde der Erfolg der transienten Überexpression mittels qRT-PCR überprüft. Als Kontrolle wurden immer pre-miR-kontrolltransfizierte Zellen (pre-miR-200b vs. pre-miR Kontrolle) verwendet.



**Abb. 13: Transfektionseffizienz - pre-miR-200b-Transfektion**

Transfizierte Zellen zeigen eine höhere Expression von miR-200b als die Kontrollzellen. Gezeigt ist der Mittelwert der relativen miR-200b-Expression ( $\Delta\text{Ct}$ -Werte) in LNCaP-, PC3- und RWPE-Zellen mit und ohne pre-miR-200b-Transfektion aus Zellkulturversuchen. Es wurden qRT-PCR durchgeführt und gegen RNU6B normalisiert, sodass sich  $\Delta\text{Ct}$ -Werte ergaben. Die Fehlerbalken zeigen die jeweilige Standardabweichung.

Wie in Abb. 13 beispielhaft zu sehen ist, war die Expression in den Testzellen nach Transfektion reproduzierbar erhöht und bei allen drei Zelllinien um  $12,5\Delta\Delta\text{Ct}$  (LNCaP),  $13,7\Delta\Delta\text{Ct}$  (PC3) bzw.  $12,2\Delta\Delta\text{Ct}$  (RWPE) höher als in den Kontroll-transfizierten Zellen. Dieses Experiment zeigt zudem, dass zwischen den drei verschiedenen Zelllinien die Unterschiede in der endogenen miR-200b Expression nicht signifikant waren (einfaktorielle ANOVA;  $F(2,35) = 1,47$ ;  $p=0,24$ ).

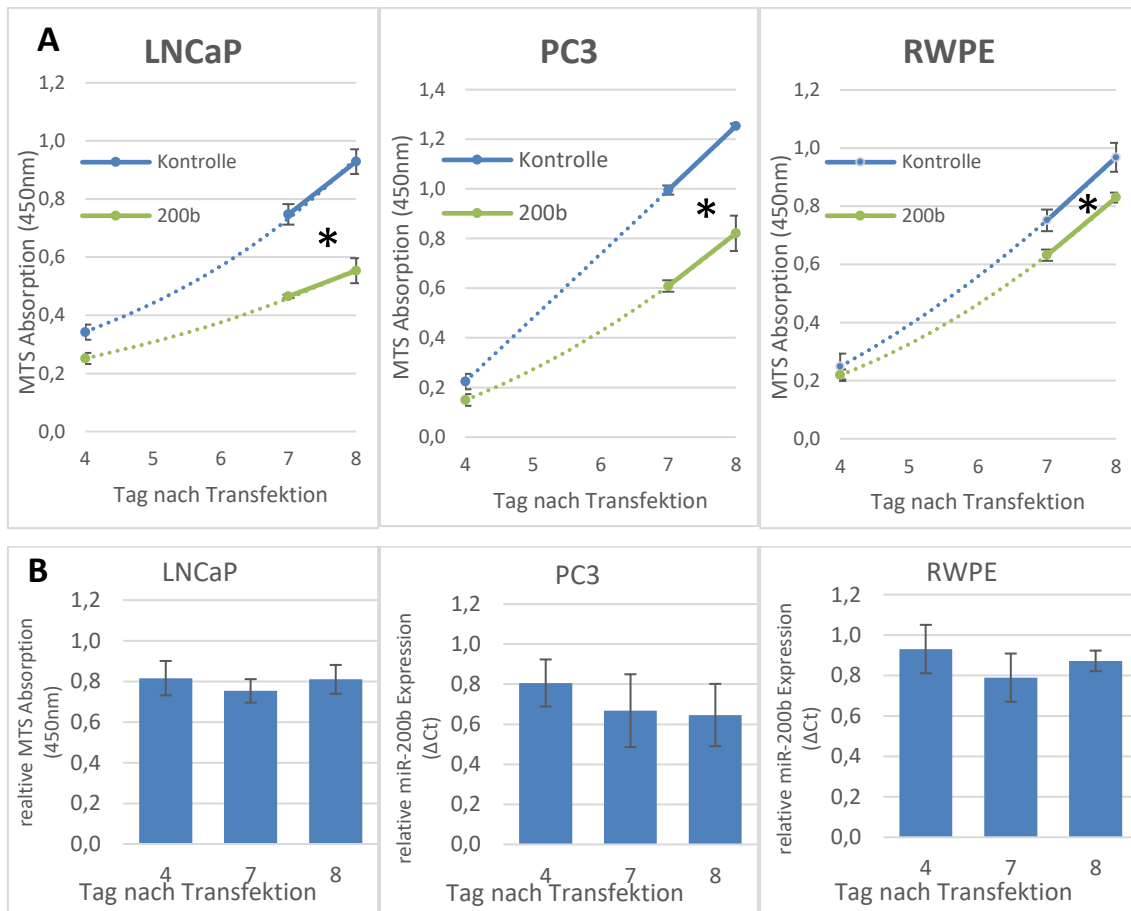
### 3.2.1 Proliferationsinhibition durch miR-200b in Prostatazellen

Um den Einfluss der transienten miR-200b Überexpression auf die Proliferation von Prostatakarzinomzellen zu messen, wurden MTS-Tests durchgeführt. Die in Abb. 14 dargestellten Ergebnisse stehen stellvertretend für mehrere durchgeführte MTS-Tests mit vergleichbaren Ergebnissen. Die dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen ergaben sich hierbei aus der Auswertung der Mittelwerte von den als Triplet angelegten Versuchen. Die Reduktion, der im MTS Test beobachteten Anzahl lebender Zellen, wird im Folgenden als Prozent zu den als 100% gesetzten Zellzahl der permanent wachsenden Kontrollen p.T. berechnet und somit als Inhibition der Proliferation interpretiert.

Insgesamt ist eine Steigerung der Proliferationskurven in allen Zelllinien zu beobachten. Es zeigte sich jedoch ein Unterschied der Steigung der Proliferationskurven zwischen den Zelllinien (vgl. Abb. 14), wobei PC3-Zellen erwartungsgemäß die höchste Proliferationsrate aufwiesen.

Nach Transfektion von PC3-, LNCaP- und RWPE-Zellen mit pre-miR-200b zeigte sich eine signifikant geringere Zellzahl im Vergleich zu nicht-transfizierten Kontrollzellen der jeweiligen Zelllinie an allen gemessenen Tagen nach der Transfektion und demzufolge eine flachere Proliferationskurve der mit pre-miR-200b transfizierten Zellen (Reduktion der Steigung der Proliferationskurven bei PC3-Zellen um den Faktor 0,092; bei LNCaP-Zellen um den Faktor 0,069 und bei RWPE-Zellen um den Faktor 0,028).

Somit konnte in allen drei verwendeten Zelllinien eine statistisch signifikante Proliferationsinhibition durch die Überexpression von miR-200b beobachtet werden. Die stärkste Hemmung der Proliferation war bei PC3-Zellen zu beobachten, bei einer relativen Reduktion zu den Kontrollen von 19% an Tag 4, 33% an Tag 7 und 35% an Tag 8. RWPE-Zellen ließen sich nicht so deutlich inhibieren (7% an Tag 4, 21% an Tag 7 und 13% an Tag 8). LNCaP-Zellen lagen dazwischen mit einer Reduktion von 18% an Tag 4; 25% an Tag 7 und 19% an Tag 8 (Student's t-Test  $p < 0,05$ ; statistische Angaben vgl. Tabelle 8 im Supplement).



**Abb. 14: Proliferationsinhibition durch miR-200b in LNCaP-, PC3-, RWPE-Zellen**

**A:** Gezeigt ist der Mittelwert der MTS-Reagenz-Absorption im Monochromator bei 450 nm im Proliferationsassay an Tag 4, Tag 7 und Tag 8 post transfectionem (p.T.) von drei unabhängigen Versuchen (n=3). Jeder Versuch an sich wurde als Triplet angelegt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Gepunktete Linien stellen Trendlinien dar. Alle in der Abbildung gezeigten Ergebnisse zeigen eine signifikant verringerte Proliferation nach Transfektion (Student's t-Test,  $p < 0,05$ ).

**B:** In B ist die relative Proliferation in Prozent zu der als 100% gesetzten Zellzahl der permanent wachsenden Kontrollen dargestellt. Jeder Balken stellt den Mittelwert von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten dar, wobei Ausreißer ausgeschlossen wurden. Die schwarzen Linien zeigen die Standardabweichung.

Somit lässt sich feststellen, dass eine miR-200b Überexpression in allen Zelllinien zu einer Inhibition der Proliferation führt, wobei in den beiden Tumorzelllinien PC3 und LNCaP, im Vergleich zu RWPE-Zellen eine stärkere Inhibition der Proliferation zu beobachten ist.



### 3.2.2 SOAT1 als Zielgen von miR-200b

Sbiera et al. (49) konnten eine Proliferationsinhibition von Nebennierenrindencarzinomen durch SOAT1-Inhibitoren zeigen. Unbekannt ist aber, ob auch im Prostatakarzinom der Einfluss von SOAT1 ähnliche Effekte bewirkt. Dies ist dahingehend von Interesse, dass SOAT1 ein wichtiges Enzym im Cholesterinstoffwechsel darstellt und die Biosynthese von Cholesterin im Prostatakarzinom ein häufig veränderter Stoffwechselweg ist (40).

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen miR-200b und dem Cholesterinstoffwechsel zu untersuchen, wurde analysiert, ob SOAT1 ein mögliches Zielgen von miR-200b sein könnte. Mittels Target Scan konnte man eine Übereinstimmung der Seed-Sequenz von SOAT1 und miR-200b finden (vgl. Abb. 15).

	Predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)
Position 967-973 of SOAT1 3' UTR	5' . . . UGAGUCUGUACCAUA-AGUAUUA . . .
hsa-miR-200b-3p	3' AGUAGUAAUGGUCCGUCAUAAU

**Abb. 15: Übereinstimmung der Seed-Sequenz von miR-200b und der Zielregion von SOAT1**

Quelle: [http://www.targetscan.org/cgi-bin/targetscan/vert\\_72/view\\_gene.cgi?rs=ENST00000367619.3&taxid=9606&members=miR-200bc-3p/429&showcnc=0&shownc=0&subset=1](http://www.targetscan.org/cgi-bin/targetscan/vert_72/view_gene.cgi?rs=ENST00000367619.3&taxid=9606&members=miR-200bc-3p/429&showcnc=0&shownc=0&subset=1). (Copyright 2020 Whitehead Institute for Biomedical Research)

Um zu bestätigen, dass SOAT1 eine molekulare Zielstruktur von miR-200b ist, wurden die folgenden zwei Analysen durchgeführt:

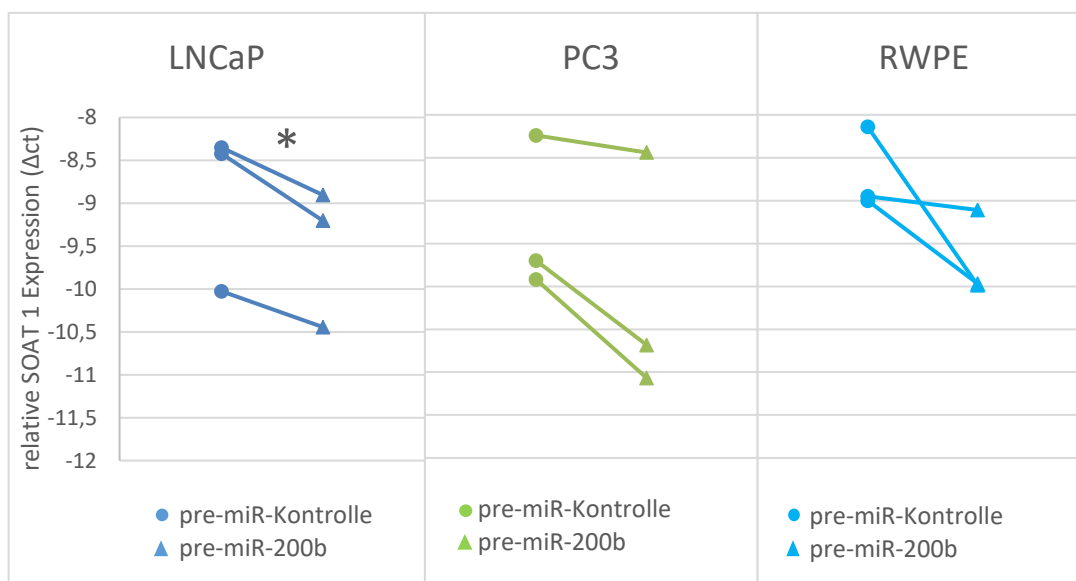
Mittels qRT-PCR-Analysen wurde die Beeinflussung der mRNA Expression von SOAT1 durch miR-200b untersucht. Im Anschluss wurde mittels Western Blot Assays die Beeinflussung des Proteingehalts von SOAT1 durch miR-200b unter der Verwendung von pre-miR-200b transfizierten Zelllinien untersucht.

#### 3.2.2.1 Abnahme der SOAT1-mRNA in LNCaP-Zellen durch miR-200b

Ziel der PCR-Analysen war herauszufinden, ob durch eine Transfektion mit pre-miR-200b eine Runterregulation der SOAT1-mRNA zu sehen war. Dafür wurden jeweils drei Zelllinien mit pre-miR-200b und die Kontrolle mit Kontroll-pre-miRNA transfiziert. Von diesen beiden Gruppen wurde die RNA isoliert und eine qRT-PCR durchgeführt. Zur Normalisierung der Ct Werte wurde  $\beta$ -Aktin benutzt, sodass letztendlich  $\Delta$ Ct Werte für den Vergleich benutzt wurden.

Insgesamt wurde dieser Testablauf dreimal durchgeführt (n=3). Für die Statistik wurde ein gepaarter, einseitiger T-Test verwendet.

MiR-200b regulierte SOAT1 in LNCaP-Zellen wie erwartet signifikant nach unten, bei PC3-Zellen ist ein Trend zu beobachten, RWPE-Zellen ließen sich durch miR-200b nicht signifikant regulieren ((LNCaP:  $t(2) = 2,92, p < 0,05$ ); (PC3:  $t(2) = 2,92, p = 0,06$ ); (RWPE:  $t(2) = 2,92, p = 0,09$ )). Demnach scheint miR-200b eine signifikant geringere Expression von SOAT1 in LNCaP-Zellen und keine signifikante Regulation in PC3- und RWPE-Zellen zu bewirken.



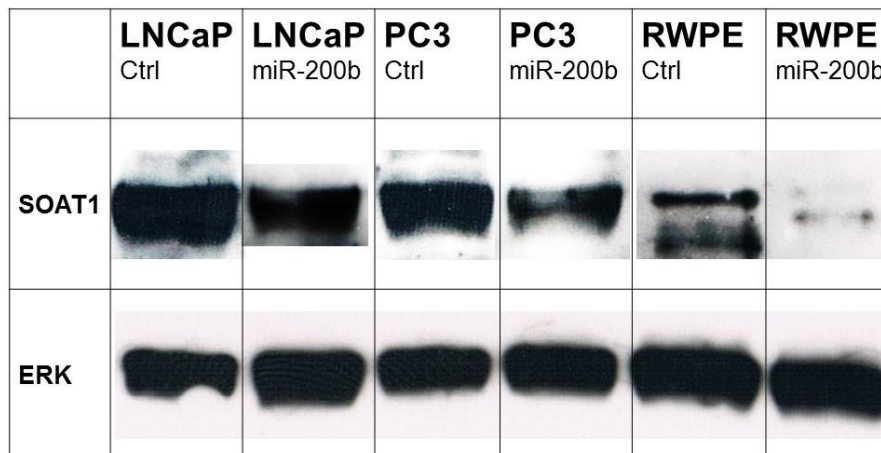
**Abb. 16: Signifikante Herabregulation der SOAT1-Expression in LNCaP-Zellen durch miR-200b**

Gezeigt ist der  $\Delta Ct$ -Wert der SOAT1-Expression von pre-miR kontrolltransfizierten vs. pre-miR-200b-transfizierten Zellen von je drei unabhängigen Zellkultur-Versuchen bei drei verschiedenen Zelllinien. Die Menge der SOAT1-mRNA der Zellen wurde per qRT-PCR gemessen. Zur Normalisierung wurde die housekeeping mRNA  $\beta$ -Aktin verwendet, sodass  $\Delta Ct$ -Werte entstanden.

### 3.2.2.2 MiR-200b führt zu einer geringeren Proteinkonzentration von SOAT1

Ob miR-200b (vgl. 3.2.2.1) den Proteingehalt von SOAT1 verändert, wurde mit Western Blot-Versuchen untersucht. Dabei zeigte sich in allen drei verwendeten Zelllinien eine sichtbare Reduktion der SOAT1-Proteinkonzentration, nachdem die Expression von miR-200b durch Transfektion mit pre-miR-200b erhöht wurde.

Die Ergebnisse sind in Abb. 17 zusammengefasst. In den Kontrollzellen war der SOAT1 Proteingehalt in LNCaP- und PC3-Zellen höher als in RWPE-Zellen. Die Reduktion der SOAT1-Konzentration nach miR-200b-Transfektion wurde in PC3-Zellen und in RWPE-Zellen am deutlichsten, während eine geringere, aber eindeutige Reduktion auch in LNCaP-Zellen zu beobachten war.

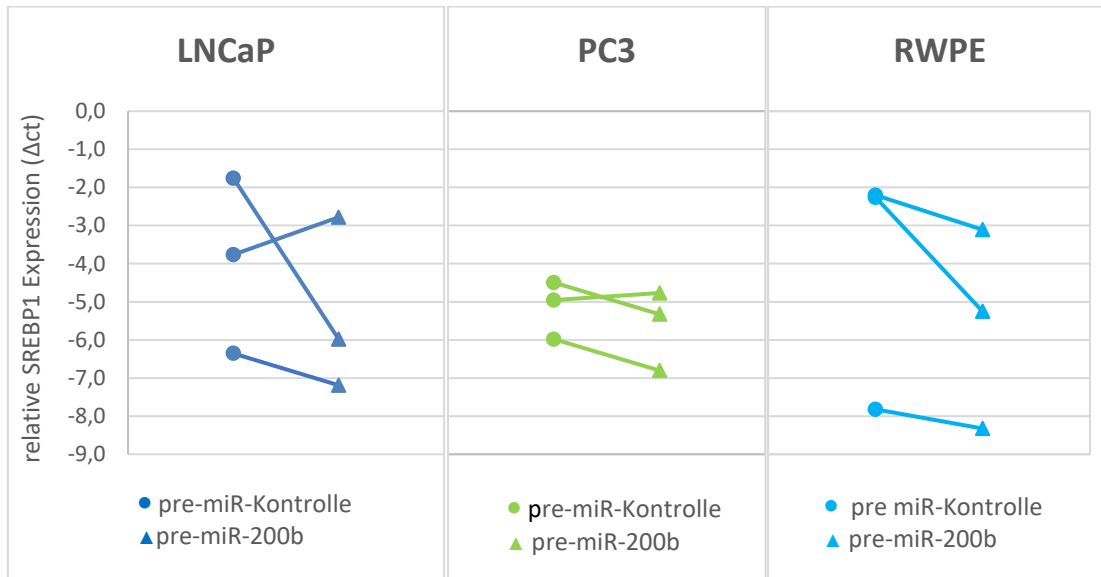


**Abb. 17: Reduktion der SOAT1 Proteinkonzentration durch miR-200b Transfektion.** Gezeigt ist die SOAT1 Protein Menge mittels Western Blot von Pre-miR Kontrollen vs. pre-miR-200b transfizierten Zellen. Als Ladekontrolle wurde zur Normalisierung das ERK-Protein analysiert. Beispielhaft ist ein Ergebnis von drei unabhängigen Zellkultur-Versuchen dargestellt. Die Bande des ERK Antikörpers war bei 42 kDa zu sehen, die Bande von SOAT1 bei 47 kDa.

### **3.2.3 MiR-200b hat keinen signifikanten Einfluss auf die mRNA des Enzyms SREBP1**

Yue et al. (40) beschreiben einen Kreislauf, welcher über die PI3K-Kaskade das Enzym SREBP1 aktiviert. Dieses wiederum führt zu verstärkter Zellproliferation und vermehrter Aufnahme von Fetten und Cholesterin. Der Zusammenhang zu miR-200b und SOAT1 besteht nun darin, dass durch die Aktivität von SOAT1 freies Cholesterin verestert werden kann und in LDs gespeichert wird. Diese wiederum aktivieren die PI3K Kaskade (vgl. Abb. 24). Dementsprechend könnte miR-200b auch über eine direkte oder indirekte Beeinflussung von SREBP1 zu einer Proliferationsinhibition führen. Dafür wurde die Expression von SREBP1 mithilfe PCR-Messungen bei mit pre-miR-200b transfizierten Zellen untersucht. Es zeigt sich keine signifikante Regulierung. Es ist jedoch in allem untersuchten

Zellen im Durchschnitt eine geringere Expression zu sehen ((LNCaP:  $t(4) = 0,73$ ,  $p=0,51$ ; PC3:  $t(4) = 0,66$ ,  $p=0,55$ ; RWPE:  $t(3) = 0,18$ ,  $p=0,86$ ) (siehe Abb. 18).



**Abb. 18: Keine signifikante Regulation der mRNA von SREBP1 durch miR-200b.**

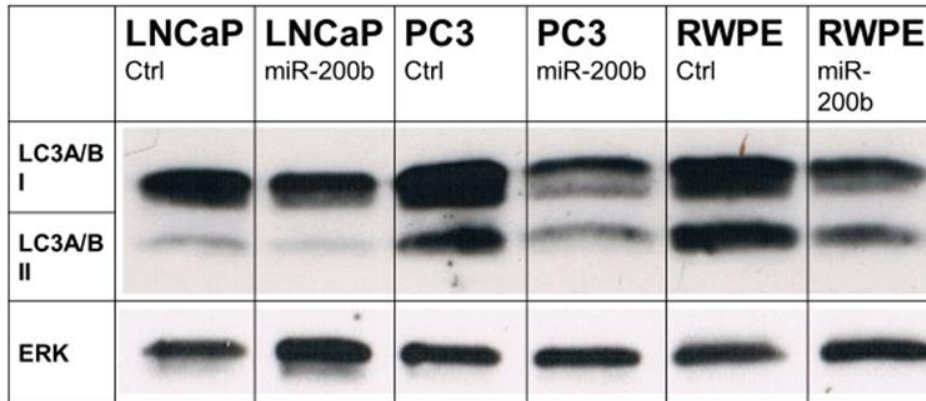
Gezeigt ist der  $\Delta$ Ct Wert der SREBP1-Expression von pre-miR kontrolltransfizierten vs. pre miR-200b-transfizierten Zellen von je drei unabhängigen Zellkultur Versuchen bei drei verschiedenen Zelllinien. Die Menge der SREBP1-mRNA der Zellen wurde per qRT-PCR gemessen. Zur Normalisierung wurde die housekeeping mRNA  $\beta$ -Aktin verwendet, sodass  $\Delta$ Ct-Werte entstanden.

### 3.2.4 MiR-200b bewirkt eine Veränderung der Autophagie

Autophagie ist ein zellulärer Prozess, welcher eine Reaktion der Zelle auf erhöhten molekularen Stress anzeigen kann. Beispielsweise konnten Schweiger et al. (84) eine Inhibition von Lipophagie und Autophagie durch freie Fettsäuren und freies Cholesterin zeigen. Somit kann Autophagie einen möglichen biologischen Effekt einer Dysregulation des Cholesterinstoffwechsels zeigen. Folglich könnte auch miR-200b eine Veränderung der Autophagie bewirken.

Zur Untersuchung wurde der Autophagosom/Autolysosom Marker LC3A/B verwendet. Mittels Western Blot-Untersuchungen wurde die Proteinkonzentration in LNCaP-, PC3- und RWPE-Zellen bestimmt, wobei miR-200b transfizierte Zellen mit nicht-transfizierten Zellen verglichen wurden (zur Effizienz der Transfektion vgl. 3.2). Die Ergebnisse der Western Blot-Experimente sind in Abb. 19 dargestellt. Es zeigte sich zum einen eine geringere Proteinkonzentration der

LC3A/B II-Isoform in den mit pre-miR-200b transfizierten Zellen, sowie ein etwas geringerer Übergang von der I- in die II-Isoform. Dies ist bei PC3- und RWPE-Zellen stärker ausgeprägt.



**Abb. 19: miR-200b bewirkt eine Veränderung der Autophagie**

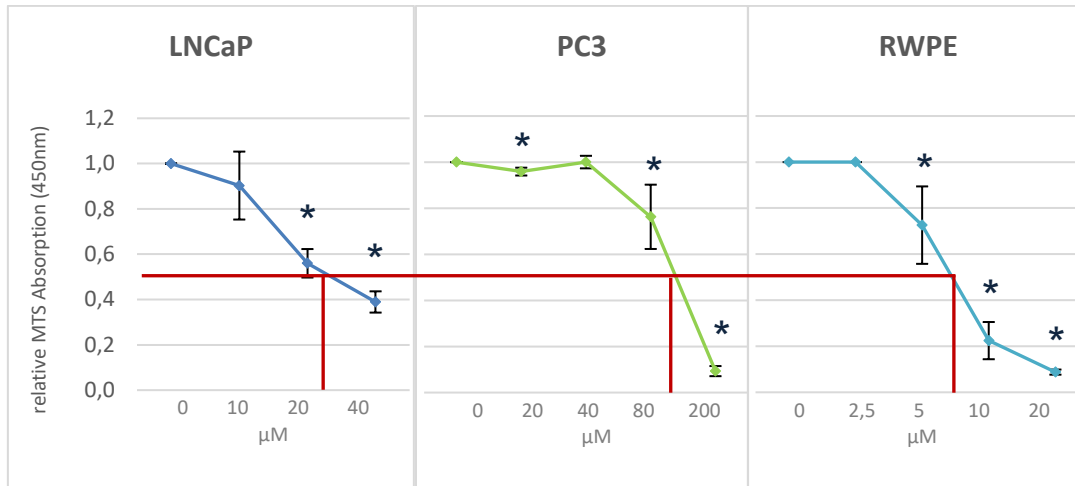
Gezeigt ist die LC3A/B I und II Protein-Menge mittels Western Blot der Pre-miR-Kontrolle vs. der pre-miR-200b-transfizierten Zellen. Als Ladekontrolle wurde zur Normalisierung das ERK-Protein verwendet. Beispielhaft ist ein Ergebnis von drei unabhängigen Zellkultur-Versuchen dargestellt. Die Bande des ERK Antikörpers war bei 42 kDa zu sehen, die Banden von LC3A/B I/II bei 14 und 16 kDa.

### 3.3 Wirkungen von Mitotane und den spezifischen SOAT1-Inhibitoren auf Prostatakarzinomzellen

#### 3.3.1 Proliferationsinhibition durch Mitotane

Mitotane wird derzeit für das Nebennierenrindenzinom eingesetzt, wobei der genaue Wirkmechanismus noch nicht endgültig geklärt ist. Einige Studien belegen SOAT1 als eine Zielstruktur von Mitotane. (49)

Interessant war nun, ob Mitotane auch auf Prostatazellen inhibierend wirkt und ob es Unterschiede in den verwendeten Zelllinien gibt. Dafür wurden LNCaP-, PC3- und RWPE-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von Mitotane (vgl. 2.5) behandelt und mittels MTS-Assays die Proliferation der Zellen über einen definierten Zeitraum untersucht. Als Kontrollzellen dienten stets lediglich mit Nährmedium gehaltene Zellen. Um einen Unterschied in der Proliferation der mit Mitotane behandelten Zellen und der Kontrollzellen zu bestimmen, wurde jeweils mittels MTS-Test die Zahl lebender Zellen ohne Mitotane-Behandlung als 100% gesetzt.



**Abb. 20: Proliferationsinhibition durch Mitotane in LNCaP-, PC3- und RWPE-Zellen**

Gezeigt ist der Mittelwert (n=3) der relativen Proliferation in Prozent zu der als 100% gesetzten MTS-Absorption der permanent wachsenden Kontrollen, beispielhaft an Tag 7 nach Beginn der Kultivierung (Tag 8 im Supplement dargestellt). Die Zellen wurden jeweils mit unterschiedlichen Konzentrationen von Mitotane behandelt und es wurde jeweils an Tag 4, 7 und 8 nach Beginn der Kultivierung ein MTS-Assay durchgeführt. Die Fehlerbalken setzen sich aus der Standardabweichung der drei durchgeführten, untereinander unabhängigen Experimente zusammen. Alle in der Abbildung gezeigten Ergebnisse mit einer signifikanten Reduktion (student's t-Test  $p < 0,05$ ) sind mit Sternchen gekennzeichnet. Zusätzlich zeigt die rote Linie die mittlere inhibitorische Konzentration, kurz  $IC_{50}$  von Mitotane an.

Aufgrund der unterschiedlichen Sensitivitäten der verschiedenen Zelllinien wurden jeweils unterschiedliche Mitotane-Konzentration eingesetzt. PC3-Zellen zeigten eine Proliferationsinhibition von 91% bei Behandlung mit 200µM Mitotane, 24% bei 80µM Mitotane und keine Reduktion bei 40µM am Tag 7 im Vergleich zu unbehandelten PC3-Zellen. Vergleichbare Ergebnisse ergaben sich für Tag 8 (vgl. Abb. 26 im Supplement). LNCaP-Zellen hingegen zeigten bei 40µM eine Inhibition ihrer Proliferation von 61%, bei 20µM 44% und bei 10µM 10% für Tag 7. Die relative MTS-Absorptionsreduktion der RWPE-Zellen lag an Tag 7 bei 20µM bereits deutlich höher bei 91%, steigt dann bei geringeren Konzentrationen jedoch stetig an: bei 10µM 78% und bei 5µM 27% (siehe Abb. 20).

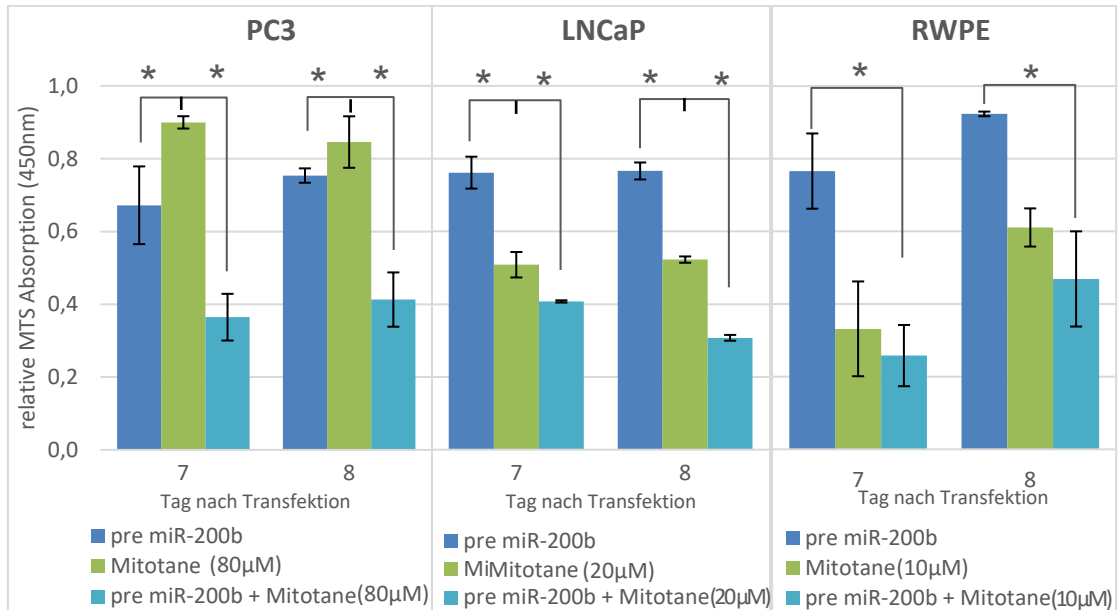
Diese Ergebnisse zeigten folglich, dass Mitotane in Prostatakarzinom-Zellen zu einer Proliferationsinhibition führte, die in den unterschiedlichen Zelllinien

verschieden ausgeprägt erschien. So zeigten PC3-Zellen eine  $IC_{50}$ , also die Mitotane-Konzentration, bei der die Proliferation um 50% reduziert war, von ca.  $60\mu\text{M}$ , LNCaP von  $25\mu\text{M}$  und bei RWPE nur  $8\mu\text{M}$ . PC3-Zellen und LNCaP-Zellen proliferierten bei einer Behandlung mit  $8\mu\text{M}$  weitgehend ungehemmt und waren somit resistenter gegenüber Mitotane als RWPE-Zellen. Somit waren die nicht malignen RWPE-Zellen am sensitivsten gegenüber Mitotane (Abb. 20).

Anhand dieser Unterschiede konnte man zudem eine Mitotane-Konzentration bestimmen, die für die folgenden Versuche benutzt wurde: die Konzentrationen, bei der die Proliferation der unterschiedlichen Zelllinien bereits signifikant verringert, aber noch keine vollständige Inhibition zu beobachten war.

### **3.3.2 Synergistische inhibierende Effekte auf Prostatazellen durch Mitotane und miR-200b**

Im nächsten Schritt galt es zu untersuchen, ob eine miR-200b-Expression die Reaktivität von Prostatakarzinom-Zellen gegenüber Mitotane modifizieren kann. Dafür wurden, wie bereits beschrieben, die Zellen transient mit miR-200b transfiziert und mit den ermittelten  $IC_{50}$  von Mitotane behandelt, die in den verschiedenen Zelllinien eine messbare Inhibition der Proliferation verursachten aber noch subletal wirkten. Die Proliferationsraten wurden analog zu den Versuchen von 3.3.1 mit einem MTS Assay analysiert und mit verschiedenen Kontrollzellen verglichen (vgl. Abb. 21).



**Abb. 21: Sensitivierung durch miR-200b bzw. Mitotane in PC3- und LNCaP-Zellen.**

Gezeigt ist der Mittelwert (n=3) der relativen Proliferation in Prozent der als 100% gesetzten Zellzahl der permanent wachsenden Kontrollen. Als Kontrolle dienten mit Kontroll-RNA transfizierte Zellen. Verglichen werden hier drei unterschiedlich behandelte Zellkulturen. Eine Versuchsreihe wurde nur mit pre-miR-200b transfiziert, eine nur mit Mitotane behandelt und die Dritte wurde sowohl transfiziert als auch mit Mitotane behandelt. Die Fehlerbalken setzen sich aus der Standardabweichung der drei durchgeführten, untereinander unabhängigen Experimente zusammen. Repräsentativ werden Messtag 7 und 8 Tage p. T. dargestellt. Im ungepaarten Student's t-Test signifikante Ergebnisse ( $p < 0,05$ ) sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet.

Wie Abb. 21 zeigt, konnte im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen eine signifikant verstärkte Inhibition der Proliferation durch Mitotane in miR-200b transfizierten und somit überexprimierenden PC3- und LNCaP-Zellen beobachtet werden. Auch im Vergleich zu transfizierten Zellen ohne Behandlung mit Mitotane konnte eine stärkere Inhibition in den transfizierten und behandelten Zellen beobachtet werden.

Mitotane bewirkte bei miR-200b transfizierten PC3-Zellen demnach an Tag 7 p.T. eine stärkere Inhibition (31% Inhibition im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen) als es dieselbe Mitotane-Konzentration in kontrolltransfizierten PC3-Zellen bewirkte (Tag 7 p.T.: 31%ig (80µM) bzw. 21%ig (40µM), Tag 8 p.T.: 34%ig bzw. 26%ig stärkere Inhibition). Ein ähnliches Ergebnis konnte in



LNCaP-Zellen beobachtet werden (Tag 7 p.T.: 10%ig (20 $\mu$ M) bzw. 29%ig (10 $\mu$ M), Tag 8 p.T.: 21%ig 39%ig stärkere Inhibition).

Da die miR-200b transfizierten, aber nicht mit Mitotane behandelten Zellen weniger stark inhibiert waren als die transfizierten Zellen, kann von einem synergistischen Effekt von Mitotane und dem Expressionslevel von miR-200b gesprochen werden. Diesen Effekt zeigten die nicht malignen RWPE-Zellen nicht in vergleichbarer Weise. So verursachte die Mitotane-Behandlung im Vergleich zwischen miR-200b transfizierten und untransfizierten RWPE-Zellen keinen signifikanten Unterschied (Tag 7 und Tag 8 p.T. bei 10 $\mu$ M bzw. 5 $\mu$ M keine stärkere Inhibition,  $p > 0,05$ ).

Zusammenfassend zeigten diese Experimente, dass eine Überexpression von miR-200b in PC3-Zellen und LNCaP-Zellen eine Sensitivierung gegenüber Mitotane verursachte, während die nicht-malignen RWPE-Zellen durch Überexpression von miR-200b keinen Unterschied in ihrer Sensitivität gegenüber Mitotane aufwiesen.

### **3.3.3 Proliferationsinhibition durch PD132301-2**

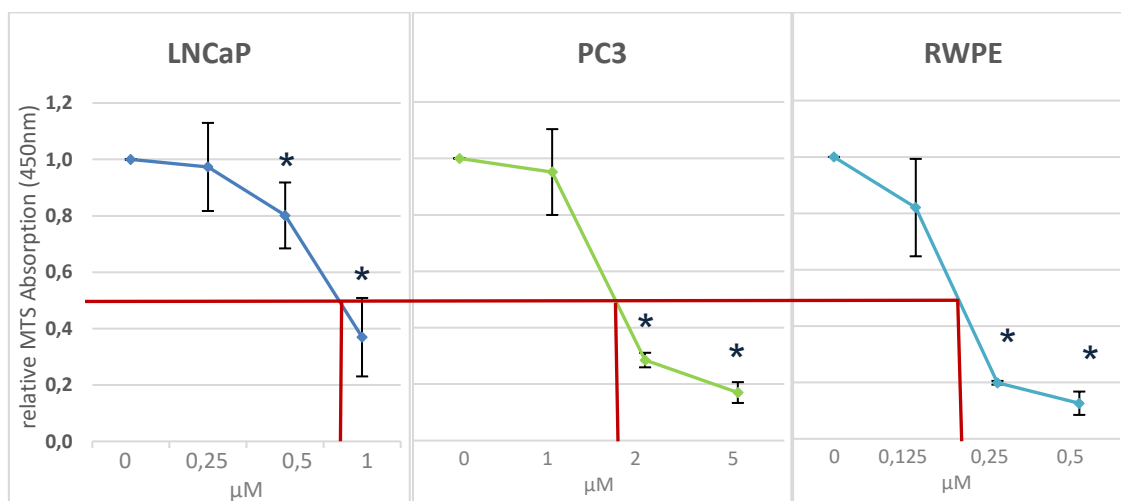
Mitotane ist ein unspezifischer SOAT1-Inhibitor und hat zahlreiche weitere Wirkmechanismen. Deswegen wurde zusätzlich für die folgenden Experimente der spezifischere Inhibitor PD132301-2 verwendet. Dafür wurde analog zu den Versuchen mit Mitotane vorgegangen (vgl. 2.5 und 3.3.1).

PC3-Zellen zeigten eine Proliferationsinhibition von 83% bei Behandlung mit 5 $\mu$ M, 71% bei 2 $\mu$ M und 5% bei 1 $\mu$ M an Tag 7 nach Transfektion. LNCaP-Zellen hingegen zeigten bei 1 $\mu$ M eine Inhibition ihrer Proliferation von 63%, bei 0,5 $\mu$ M 20% und bei 0,25 $\mu$ M 3% an Tag 7. Die Reduktion durch PD132301-2 war bei den RWPE-Zellen an Tag 7 nach Transfektion bei 0,5 $\mu$ M deutlich stärker mit, 87%, schwächte sich dann bei geringeren Konzentrationen jedoch wieder ab: bei 0,25 $\mu$ M 80% und bei 0,125 $\mu$ M 18%.

Demnach zeigten die Zellen auch für PD132301-2 verschiedene Sensitivitäten (siehe Abb. 22). PC3-Zellen zeigten eine  $IC_{50}$  von ca. 2 $\mu$ M, LNCaP von ca. 1 $\mu$ M und bei RWPE nur ca. 0,25 $\mu$ M. Auffällig war wieder die geringere Sensitivität der beiden Prostatakarzinom-Zelllinien PC3 und LNCaP, während die nicht malignen

RWPE-Zellen bereits bei sehr geringen Konzentrationen des SOAT1-Inhibitors beeinträchtigt waren. Vergleichbare Ergebnisse ergaben sich für Tag 8 (siehe Abb. 27 im Supplement).

Insgesamt zeigten die Zellen bei PD132301-2 eine geringere Wirkungsbreite und höhere Sensitivität als bei Mitotane, und wie bei Mitotane eine eindeutige und statistisch signifikante Proliferationsinhibition (Student's t-test  $p < 0,05$ ).

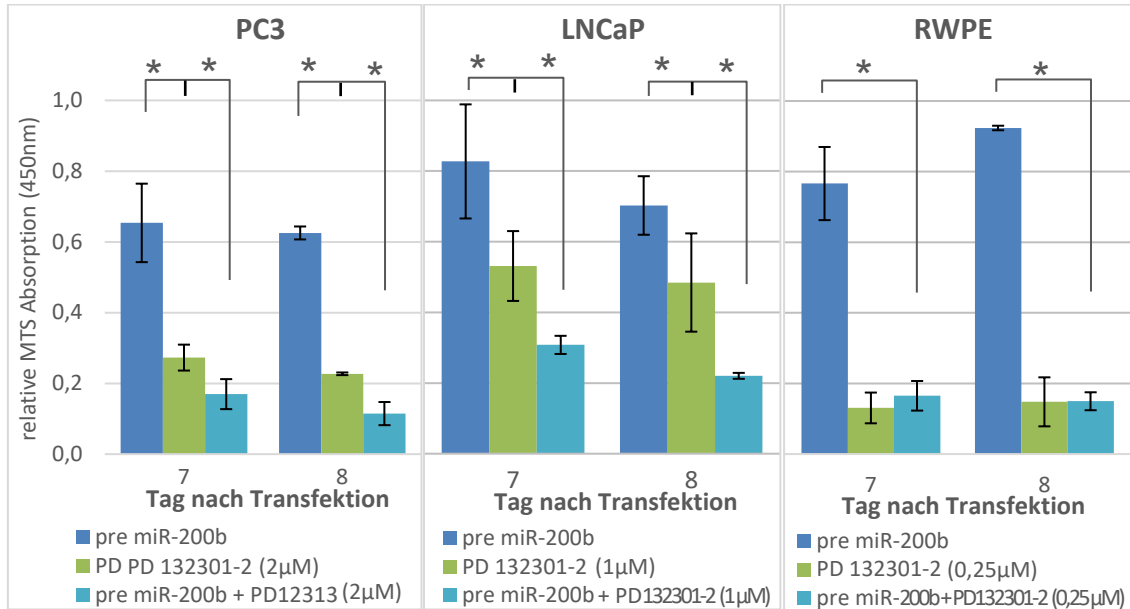


**Abb. 22: Proliferationsinhibition durch PD132301-2 in LNCaP-, PC3- und RWPE-Zellen**  
 Gezeigt ist der Mittelwert ( $n=3$ ) der relativen Proliferation in Prozent zu der als 100% gesetzten MTS-Absorption der permanent wachsenden Kontrollen an Tag 7 p.T. Die Zellen wurden jeweils mit unterschiedlichen Konzentrationen von PD132301-2 behandelt und es wurde jeweils an Tag 7 p.T. ein MTS-Assay durchgeführt. Die Fehlerbalken setzen sich aus der Standardabweichung der drei durchgeführten, untereinander unabhängigen Experimente zusammen. Alle in der Abbildung gezeigten Ergebnisse mit einer signifikanten Reduktion (Student's t-Test  $p < 0,05$ ) sind mit Sternchen gekennzeichnet. Zusätzlich zeigt die rote Linie die mittlere inhibitorische Konzentration, kurz  $IC_{50}$  von PD132301-2 an.

### 3.3.4 Synergistische inhibierende Effekte auf Prostatakarzinomzellen durch PD132301-2 und miR-200b

Im nächsten Schritt wurde auch hier überprüft, ob die miR-200b-Expression die Sensitivität von PD132301-2 von Prostatakarzinom-Zellen modifizieren kann. Die Proliferationsraten wurden analog zu den Versuchen mit Mitotane (vgl. 2.5, 3.3.1 und 3.3.2) mittels einem MTS Assay analysiert und mit verschiedenen

Kontrollzellen verglichen und durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 23 zusammengefasst.



**Abb. 23: Sensitivierung durch miR-200b in Prostatakarzinomzelllinien für PD132301-2.** Gezeigt ist der Mittelwert (n=3) der relativen Proliferation in Prozent zu der als 100% gesetzten Zellzahl der permanent wachsenden Kontrollen. Als Kontrolle dienten mit Kontroll-RNA transfizierte Zellen. Verglichen werden hier drei unterschiedlich behandelte Zellkulturen. Eine Versuchsreihe wurde nur mit pre-miR-200b transfiziert, eine nur mit PD132301-2 behandelt und die dritte wurde sowohl transfiziert als auch mit PD132301-2 behandelt. Die Fehlerbalken setzen sich aus der Standardabweichung der drei durchgeführten, untereinander unabhängigen Experimente zusammen. Repräsentativ wird Tag 7 oder 8 p.T. dargestellt. Im ungepaarten Student's t-Test signifikante Ergebnisse ( $p < 0,05$ ) sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet.

Wie Abb. 23 zeigt, konnte eine signifikant verstärkte Inhibition der Proliferation durch PD132301-2 in miR-200b transfizierten und somit überexprimierenden PC3- und LNCaP-Zellen beobachtet werden. Für die Experimente wurden PD132301-2-Konzentrationen gewählt, die eine partielle Proliferationsinhibition in den verschiedenen Zelllinien verursacht hatte. PD132301-2 bewirkte bei miR-200b transfizierten PC3-Zellen demnach eine stärkere Inhibition (10% Inhibition im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen) als es dieselbe PD132301-2-Konzentration in kontrolltransfizierten PC3-Zellen bewirkte (10% (2µM) an Tag 7 p.T. bzw. 12% (2µM) an Tag 8 p.T.).

Vergleichbare Ergebnisse konnten in LNCaP-Zellen beobachtet werden. Hierbei zeigte sich eine stärkere Inhibition (22% Inhibition im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen) als es die identische PD132301-2-Konzentration in kontroll-transfizierten LNCaP-Zellen bewirkte (22% (1µM) an Tag 7 p.T. bzw. 26% (1µM) an Tag 8 p.T.).

Da, die durch eine miR-200b Überexpression verursachte Inhibition der Proliferation deutlich unter dem durch PD132301-2 verursachten Effekt liegt, kann von einem synergistischen Effekt von PD132301-2 und miR-200b ausgegangen werden.

Diesen Effekt zeigten die nicht-malignen RWPE-Zellen nicht in gleicher Weise. Zwar sind im Mittel auch RWPE-Zellen nach transienter Expression von miR-200b sensitiver gegenüber PD132301-2 verglichen zu untransfizierten Zellen, die Unterschiede sind aber nicht signifikant.

Zusammenfassend zeigen diese Experimente, dass eine Überexpression von miR-200b in PC3-Zellen und LNCaP-Zellen eine Sensitivierung gegenüber dem SOAT1-Inhibitor PD132301-2 verursacht, während die nicht-malignen RWPE-Zellen bereits eine starke Inhibition durch PD132301-2 zeigten, sodass kein zusätzlicher additiver Effekt zu beobachten war.

## 4 Diskussion

Meine Arbeitsgruppe beschäftigte sich bereits in früheren Studien mit der Analyse von miRNAs im Prostatakarzinom. Sie beschrieb beispielsweise die Funktion und die Nutzbarkeit von miR-221 und miR-205 als molekulare Marker für den Verlauf des Hochrisiko-Prostatakarzinoms (136, 137). In der vorliegenden Arbeit geht es um miR-200b. Ziel war es, die molekulare Funktion dieser mikroRNA weiter zu beschreiben und sie in ihrer Expression und Regulation in einem Hochrisiko-Prostatakarzinom-Kollektiv zu analysieren, um Zusammenhänge zwischen Verlauf und miR-200b-Expression im Prostatakarzinom herzustellen. Um die tumorsuppressiven Eigenschaften von miR-200b zu untersuchen und SOAT1 als mögliches Zielgen von miR-200b zu identifizieren, wurden *in vitro* Versuche an Prostatakarzinom-Zelllinien vorgenommen.

### 4.1 MiR-200b als Tumorsuppressor

Es gibt eine Vielzahl von Studien, die sich mit der Rolle, der Expression, den Zielgenen und der Regulation von miR-200b in verschiedenen malignen Tumoren beschäftigten. Tabelle 5 gibt einen Überblick über die verschiedenen Ergebnisse.

**Tabelle 5: miR-200b-Expression in Nativmaterial ausgewählter maligner Tumore, ↑ Überexpression; ↓ Unterexpression**

Tumorentität	miR-200b-Expression	Studie
Prostatakarzinom	↑	Janiak et al. (138), nicht signifikant
	↑	Hart et al. (139)
	↓	Yu et al. (128)
Gliom	↓	Liu et al. (140); Peng et al. (141)
	↓	Yang et al. (142)
Nasopharynxkarzinom	↓	Sun et al. (143)
Mammakarzinom	↓	Yao et al. (144)
Magenkarzinom	↓	Tang et al. (145)
Kolorektales Karzinom	↓	Paterson et al. (146)
Klarzelliges Nierenzellkarzinom	↓	Yoshino et al. (147)
		Saleeb et al. (148)

Nephroblastom	↓	Liu et al. (149)
Urothelkarzinom	↓	Köhler et al. (150)
Ovarialkarzinom	↑	Zuberi et al. (151)
Bronchialkarzinom	↓	Pacurari et al.(152)
Papilläres Schilddrüsenkarzinom	↓	Ramírez-Moya et al. (153) Zhou et al. (154)

Auffällig ist, dass die Mehrzahl der untersuchten Entitäten eine geringere Expression im Tumorgewebe verglichen mit der jeweiligen Kontrolle zeigten (vgl. Tabelle 5). Somit scheint miR-200b eine tumorsuppressive Rolle im Rahmen der Genese dieser Neoplasien einzunehmen.

#### 4.1.1 Herabregulierte miR-200b-Expression im Prostatakarzinom

Um miR-200b als Tumorsuppressor bezeichnen zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst die Regulation der Expression von miR-200b im Prostatakarzinom untersucht. Dabei zeigte sich eine signifikante Herabregulation von miR-200b in zwei unabhängigen Prostatakarzinom-Kollektiven (Charakterisierung dieser unter 2.2 aufgeführt) und die Ergebnisse früherer Studien konnten bestätigt werden (vgl. Tabelle 5).

##### Kollektiv 1:

Die miR-200b-Expression im unselektionierten Prostatakarzinom-Kollektiv war im gewebesassoziierten Vergleich herabreguliert.

Damit bestätigte sich das Ergebnis von Yu et al. (128). Der Versuchsaufbau in einer von Janiak et al. (138) publizierten Studie ist mit der hier durchgeführten Analyse vergleichbar, doch wird von einer Überexpression von miR-200b im Karzinom berichtet, wobei der Vergleich statistisch nicht signifikant war. Zudem wurde im Vergleich zu der vorliegenden Arbeit eine geringe Fallzahl von 27 Karzinomen und 8 BPH untersucht.

Auch Hart et al. (139) berichteten von einer Überexpression von miR-200b im Vergleich mit tumorassoziiertem Gewebe. Die Autoren differenzierten zudem pT2 (n=10), pT3 (n=7) und pN1 (n=3) Karzinome und eine unabhängige Kohorte von n=40, mit dem Ziel, eine Assoziation der miR-200b-Expression mit der

Aggressivität der Karzinome darzustellen. Sie konnten zeigen, dass es bis zum Stadium pT3 zu einem Anstieg der Expression kommt und bei Lymphknoten-metastasierten Karzinomen zu einem Abfall (139). Auch hier wurde in den einzelnen Gruppen nur eine sehr geringe Fallzahl untersucht, mit jedoch signifikanten Ergebnissen. Den von ihnen berichteten Abfall der Expression in Prostatakarzinomen mit Lymphknotenmetastasen (N1) konnten sie in ihrem Ergebnis mit den größeren Fallzahlen (n=40) nicht mehr beweisen. Die Autoren diskutieren selbst, dass man die Regulation von miR-200b weiter in größeren Kollektiven validiert werden sollte.

Insgesamt gibt es demnach Hinweise in der Literatur, dass die Expression von miR-200b in Zusammenhang mit der Prognose des Prostatakarzinom steht und je nach Aggressivität des Karzinoms unterschiedlich reguliert ist.

Um die Herabregulation der miR-200b im Prostatakarzinom zu bestätigen, wurde in der vorliegenden Arbeit zusätzlich zu dem bereits beschriebenen unselektionierten Kollektiv 1 die miR-200b-Expression in einem weiteren Prostatakarzinom-Kollektiv analysiert.

### **Kollektiv 2:**

Dieses Kollektiv ist ein selektioniertes Hochrisiko-Kollektiv mit langjährigen Follow-up-Daten, die die Analyse der Bedeutung von miR-200b als Verlaufsmarker ermöglichen. Auch bei diesem Kollektiv zeigte sich eine eindeutige Herabregulation von miR-200b. Weitere Tests ergaben zudem eine geringere miR-200b-Expression bei höherem Gleason Score, klinischem oder biochemischem Progress und bei krebsassoziiertem Tod.

Vergleichbare Analysen in einem Hochrisiko-Kollektiv sind bisher noch nicht durchgeführt worden. Auch ein Vergleich mit der oben erwähnten Studie von Hart et al. (139) ist nur sehr eingeschränkt möglich, da diese mit assoziiertem Kontrollgewebe durchgeführt wurde, in der vorliegenden Arbeit jedoch in Kollektiv 2 nicht-gewebsassoziierte BPH-Proben benutzt wurden.

Da dieses Kollektiv auch Proben von metastasierten Lymphknoten einiger Erkrankten beinhaltete, war es möglich die Expression von miR-200b zwischen Lymphknoten-Metastasen-Gewebe und den Primärtumoren zu vergleichen.

Obwohl sich eine Assoziation der Expression mit den klinischen Parametern klinischer Progress, biochemischer Progress und Gleason Score darstellte, war kein statistisch signifikanter Unterschied der Expression von miR-200b zwischen Prostatakarzinom-Gewebe und Lymphknoten-Metastasen-Gewebe feststellbar. Im Hinblick auf diese Analyse muss eine Limitierung des verwendeten Kollektivs 2 erwähnt werden. In diesem Hoch-Risiko Kollektiv wurde keine standardisierte Lymphknoten-Biopsie vorgenommen, sodass der Anteil Lymphknoten-metastasierter-Prostatakarzinome im Kollektiv 2 nicht festgestellt werden konnte. Daher könnte das Ergebnis durch einen hohen Anteil an bereits metastasierten Karzinomen in diesem Hoch-Risiko Kollektiv erklärbar sein. Demzufolge sollten weitere Studien insbesondere den Zusammenhang zwischen miR-200b-Expression in Metastasen und im Prostatakarzinom konkretisieren. Um die Unterschiede in den verschiedenen Studien zu interpretieren, muss zudem beachtet werden, mit welchem Gewebe jeweils die Expression verglichen wird. So wurde in der hier vorliegenden Arbeit Karzinom-Gewebe der Lymphknotenmetastase mit BPH-Gewebe verglichen, andere Studien verglichen Prostatakarzinom-Gewebe der Prostata von prinzipiell metastasierten Karzinomen mit BPH-Gewebe oder gewebsassoziiertes, atypiefreier Prostata (139, 149, 152).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse aus den beiden Prostatakarzinom-Kollektiven, dass Prostatakarzinome eine niedrigere Expression von miR-200b aufweisen und dass jene mit einer schlechteren Prognose und einem höheren Risiko für Progress die miR-200b-Expression progressiv herabregulieren. MiR-200b nimmt daher wohl eine tumor-suppressive Funktion im Prostatakarzinom ein.

Die Ergebnisse von Kollektiv 2 hinsichtlich der prognostischen Bedeutung von miR-200b im Prostatakarzinom werden nochmals getrennt in 4.4 diskutiert.

#### **4.1.2 Proliferationsinhibition durch miR-200b in Prostatazellen**

Nach der Analyse zur Expression von miR-200b in zwei unabhängigen Kollektiven, ging es im nächsten Schritt um die molekulare Funktion von miR-



200b mit der Frage, ob in Prostatakarzinomzellen eine Hochregulation von miR-200b eine Proliferationsinhibition bewirkt.

Dafür wurden *in vitro* Proliferationsassays mit drei verschiedenen Prostatakarzinomzelllinien (LNCaP, PC3, RWPE) durchgeführt.

Es zeigte sich erwartungsgemäß sowohl in den untransfizierten Kontroll-Zellen als auch in den transfizierten Zellen ein konstantes Wachstum, angezeigt durch eine Zunahme der Zellen im Vergleich zum jeweilig vorherigen Messtag. Eine miR-200b Überexpression verursachte in allen drei Zelllinien eine signifikant geringere Anzahl an vitalen Zellen an Tag 4,7 & 8 nach Transfektion im Vergleich zu den Kontrollen.

Somit bewirkt miR-200b eine Proliferationsinhibition in allen untersuchten Zelllinien.

Eine ergänzende Untersuchung, die das angewandte Testverfahren nicht abbildet, ist die Analyse des apoptotischen Zelltodes. Eine Aussage hinsichtlich des apoptotischen Verhaltens der mit miR-200b behandelten Zellen wäre dahingehend von Interesse, da es Hinweise gibt, dass miR-200b zumindest im Gliom und Brustkrebs eine wichtige Rolle im Zusammenhang mit Apoptose spielt (140, 141, 144).

Die Frage, ob die beobachtete Zellabnahme in miR-200b überexprimierenden Prostatakarzinom Zellen zumindest teilweise auf eine verstärkte Induktion apoptotischer Signalwege zurückzuführen ist, kann somit zurzeit nicht eindeutig beantwortet werden.

Eine Proliferationsinhibition durch miR-200b im Prostatakarzinom berichten auch weitere Studien (128, 129, 133, 155). Diese zeigen beispielsweise darüber hinaus den Einfluss auf EMT und die Beeinflussung der Angiogenese (129). Zudem bewirkt miR-200b auch bei weiteren malignen Neoplasien, wie beispielsweise beim Gliom (141), beim Mammakarzinom (144), beim Magenkarzinom (145) oder beim papillären Schilddrüsenkarzinom (154) eine Proliferationsinhibition.

Diese Beobachtungen und die hier vorliegenden Ergebnisse bestätigen die Rolle von miR-200b als Tumorsuppressor. Zum einen weist Prostatakarzinom-Gewebe eine Herabregulierung von miR-200b im Nativmaterial auf (vgl. 4.1), zum anderen

bewirkt miR-200b bei Hochregulation in der Zellkultur eine Proliferationsinhibition.

#### **4.1.3 Reduktion von LC3A/B durch miR-200b als Hinweis auf reduzierte Autophagie**

Als zusätzliche tumorsuppressive Funktion wurde die Induktion von Autophagie in miR-200b transfizierten Zellen analysiert. Dafür wurde die Veränderung von LC3A/B in drei Prostatakarzinomzelllinien nach Transfektion mit miR-200b untersucht, da die Expression dieses Proteins einen Hinweis auf die Regulation von Autophagie gibt (62).

Es zeigte sich eine deutliche Abnahme beider Isoformen LC3A/B I und II bei mit miR-200b transfizierten Zellen, wobei auch der Übergang von der I- in die II-Isoform verringert scheint, zumindest bei PC3-, evtl. auch bei LNCaP-Zellen.

LC3A/B-II ist ein Marker für Autophagosomen und Autolysosomen, wobei LC3A/B-I die zytosolische Form von LC3A/B-II darstellt. Da beide erniedrigt sind, ist anzunehmen, dass insgesamt weniger Autophagie induziert bzw. gebraucht wurde. Ein geringerer Übergang von I in II bedeutet, dass mehr zytosolisches LC3A/B vorliegt und demnach die Autophagie reduziert wurde.

Generell ist anzunehmen, dass eine geringere oder inhibierte Autophagie für Karzinomzellen ungünstig ist, vor allem im Hinblick auf zellulären Stress in Form von Chemotherapie oder im Tumor vorherrschenden nährstoffarmen, hypoxischen Bedingungen (62, 77, 83, 156, 157). So weisen Tumorzellen eine erhöhte basale Autophagie auf (79–82).

Interessant im Hinblick auf das Prostatakarzinom sind die Ergebnisse, die Schweiger et al. (84) zeigten: sie beschrieben eine Inhibition von Lipophagie und Autophagie durch freie Fettsäuren und durch freies Cholesterin. Man könnte also davon ausgehen, dass die suppressiven Eigenschaften von miR-200b über eine Erhöhung von freiem Cholesterin und freien Fetten durch Hemmung von SOAT1 zu einer Inhibition von Autophagie führen.

Zur Bestätigung der Ergebnisse im Hinblick auf miR-200b gibt es Hinweise, dass im Lungenkrebs und im Brustkrebs miR-200b Autophagie reduzierte (158, 159).

Wie in der Einleitung (vgl. 1.6) beschrieben, ist Autophagie jedoch ein komplexer Prozess. Bei der Interpretation von LC3A/B Proteinkonzentrationen sollte deswegen beachtet werden, dass von einer einzigen Western-Blot-Analyse nicht darauf geschlossen werden kann, dass Zellen im Gesamten einen geringeren Autophagiefluss aufweisen. Die Daten dieser Arbeit kann man nur dahingehend interpretieren, dass zu dem untersuchten Zeitpunkt mit Transfektion von miR-200b weniger LC3A/B I/II vorhanden war als ohne Transfektion. Das kann aufgrund einer Verstärkung des Flusses und einem erhöhten Umsatz von LC3A/B II der Fall sein oder aber aufgrund einer inhibierten oder herabregulierten Autophagie.

Auf Grundlage der weiteren Ergebnisse und der Rolle von miR-200b als Tumorsuppressor ist es durchaus naheliegend, dass der gesamte Autophagiefluss in den Zellen reduziert war. Um dies allerdings zu bestätigen, sind weitere Untersuchungen nötig, zum Beispiel eine elektronenmikroskopische Untersuchung oder eine Tandem mRFP/mCherry-GFP Fluoreszenzmikroskopie, bei welcher verschiedene Schritte der Autophagie einzeln nachverfolgt werden können (53).

Was es auch noch weiter zu analysieren gilt, ist die Frage, ob miR-200b LC3A/B direkt hemmt und somit LC3A/B eine Zielstruktur von miR-200b darstellt, oder ob miR-200b indirekt Einfluss nimmt.

#### **4.2 Zielstrukturen von miR-200b in Prostatakarzinomzellen**

In der unter 4.1 aufgeführten Tabelle ist auffällig, dass miR-200b in vielen verschiedenen Tumorentitäten differentiell exprimiert ist und die meisten Tumorentitäten epitheloide Zellen sind, z.B. Blasenkarzinom, Mammakarzinom, Nasopharynxkarzinom, Bronchialkarzinom und nicht zuletzt Prostatakarzinom. Zusätzlich dazu konnten Mitchell et al. (160) zeigen, dass Stromazellen der Prostata deutlich weniger miR-200b als Prostataepithelzellen exprimieren.

Das könnte ein Hinweis sein, dass miR-200b vor allem bei epitheloiden Karzinomen eine entscheidende Rolle spielt, da diese miR-200b stärker exprimieren und durch eine Suppression Vorteile ziehen könnten. Insbesondere da miR-200b über ZEB1 und ZEB2 (129) ein Regulator von EMT ist, also von

einem Prozess, bei welchem eine Transformation von einer epithelial differenzierten Zelle zu einer mesenchymal differenzierteren Zelle stattfindet (117, 161). Dies ist ein entscheidender Schritt zur Metastasierung (117, 129, 161). Aber auch beim Glioblastom (ein nicht-epitheloides Karzinom) zeigt miR-200b über andere Wirkmechanismen als über die Inhibition von EMT eine Proliferationshemmung und tumorsuppressive Eigenschaften (140, 141). MiR-200b führt hier zu einer Hemmung von RAB21, RAB23, RAB18 und RAB3B. Die RAB-Proteine führen zu einem schnellerem Fortschreiten und zu einer schlechteren Prognose des Glioblastoms (140). Zudem hemmt miR-200b das Onkogen „cAMP responsive element-binding protein 1“ (CREB1) (141). Demnach gibt es weitere Wirkmechanismen von miR-200b, welche nicht mit EMT im Zusammenhang stehen.

Die Ergebnisse zur Autophagie legen einen möglichen Zusammenhang mit dem Fett-/Cholesterinstoffwechsel nahe. Bei der Suche nach möglichen Zielgenen von miR-200b über TargetScan ergab sich ein in diesen Zusammenhang relevantes Gen, das Enzym SOAT1.

Zusätzlich wurde in meiner Arbeitsgruppe eine direkte Interaktion von miR-200b mit definierten Sequenzen im 3'-untranslatierten Bereich (=3'UTR) von SOAT1 mithilfe eines Luciferase Assays nachgewiesen.

#### **4.2.1 SOAT1 als Zielstruktur von miR-200b**

Um SOAT1 molekular als neues Zielgen von miR-200b zu definieren, wurde die Expression von SOAT1 in miR-200b überexprimierenden Prostatakarzinom-Zellen auf RNA- und Protein-Ebene untersucht.

Bei einer Überexpression von miR-200b ist die mRNA von SOAT1 in LNCaP-Zellen verringert und es kommt in LNCaP-, PC3- und RWPE-Zellen zu einer Verringerung der Proteinkonzentration.

Demnach scheint SOAT1 ein Target von miR-200b zu sein, da die Expression von SOAT1 auf posttranskriptioneller Ebene durch miR-200b reguliert wird.

Eine Hemmung von SOAT1 durch miR-200b kann verschiedene Aspekte der tumorsuppressiven Wirkung von miR-200b erklären (162). Um den Wirkungsmechanismus rund um SOAT1 und miR-200b zu veranschaulichen, wird im

Folgendem nochmal auf die Wirkungen von SOAT1 allgemein, jedoch insbesondere auch auf die differentiell regulierte Aktivität im Prostatakarzinom eingegangen.

SOAT1 ist ein Schlüsselenzym für die Veresterung von Cholesterin. Um die Fett-Löslichkeit des Cholesterins zu erhöhen, spielt die Veresterung von Cholesterin eine wichtige Rolle. Verestert ist Cholesterin relativ hydrophob und kann im hydrophoben Inneren von „Lipid Droplets“ (LDs) gespeichert oder für den Transport im Blut auch an Lipoproteine gebunden werden (89). Passend dazu zeigte die Forschungsgruppe Yue et al. (162), dass im Prostatakarzinom, aber auch in Prostatakarzinom-Metastasen-Zellen (Lebermetastasen, Lymphknotenmetastasen, ossäre Metastasen, Lungenmetastasen, Nebennierenmetastasen, und Weichgewebismetastasen) viele LDs voll mit Cholesterinestern zu finden waren. Die Autoren beschreiben in einem Modell einen im Prostatakarzinom entstehenden Kreislauf. In dieser Arbeit ist dieser Kreislauf durch miR-200b als Inhibitor von SOAT1 und durch die Ergebnisse hinsichtlich Autophagie ergänzt worden. Durch Herabregulierung von miR-200b ist die Expression von SOAT1 erhöht und es wird mehr Cholesterin verestert und in LDs im Zytosol der Zelle gespeichert. Infolgedessen kann mehr Cholesterin und damit auch mehr essenzielle Fette aufgenommen werden und es fällt weniger toxisches, freies Cholesterin im Zytosol der Zelle an. Zudem führen die cholesterinreichen LDs zu einer Aktivierung der onkogenen PI3K-Signalkaskade, was wiederum eine Proliferationsförderung (vgl. auch Abb. 24) zur Folge hat. Zusätzlich kann in Hochrisikokarzinomen mit typischem PTEN Verlust die PI3K-Signalkaskade unter Umgehung des dadurch anfallenden freien Cholesterins aktiv gehalten werden, da das freie Cholesterin durch die Aktivität von SOAT1 verestert wird. Somit nimmt SOAT1 im Prostatakarzinom eine onkogene Funktion ein.



Synthase 2) und OLR1 (Oxidized Low-density Lipoprotein Rezeptor 1) im Gastrointestinaltrakt konnten auch Ruiz-Rosos et al. (163) zeigen. In dieser Studie ist allerdings keine direkte Interaktion zwischen miR-200b und SOAT1 bewiesen worden. Sie zeigten jedoch, dass SOAT1 ein von miRNAs reguliertes Enzym des Fettstoffwechsels darstellt, und identifizierten verschiedene miRNAs, welche in Zusammenhang mit eben diesem stehen könnten (miR-31-5p, miR-99b-5p, miR-200a-5p, miR-200b-5p und miR-425-5p) (163).

Dass SOAT1 ein Onkogen ist, wird zudem durch die, in weiteren Studien gezeigte Überexpression von SOAT1 im Prostatakarzinom, aber auch durch die Überexpression von SOAT1 im Ovarialkarzinom, Mammakarzinom, Lungenkarzinom, hepatozellulären Karzinom und Pankreaskarzinom (41, 82, 164–167) unterstützt. Außerdem zeigt SOAT1 eine proliferationsfördernde Wirkung im Prostatakarzinom, aber auch in anderen Karzinomen (36, 40, 162, 164, 167, 168).

Um die Bedeutung der von miR-200b vermittelten SOAT1 Regulation für die Entstehung von malignen Neoplasien weiter zu untersuchen, sind Untersuchungen in weiterführenden Experimenten nötig. So könnte beispielsweise durch Analyse der Veränderung weiterer durch SOAT1 beeinflussten Strukturen (freies Cholesterin, PI3K-Signalweg, PTEN) die Auswirkung von miR-200b und den Zusammenhang zu SOAT1 untersuchen.

Interessant wäre auch die Analyse der SOAT1-Expression in primären Tumorpräparaten aus einem möglichst umfangreichen Prostatakarzinom-Kollektiv. Mit Hilfe dieser Analyse könnte man eine Korrelation der Expression von miR-200b und SOAT1 durchführen und zudem eine mögliche Rolle von SOAT1 als Verlaufsparemeter darstellen.

Zudem wären weiterführende Analysen von SREBP1 sinnvoll. In der hier vorliegenden Arbeit ist keine signifikante Regulation von SREBP1 durch miR-200b nachgewiesen worden, es zeigte sich jedoch bei einzelnen qRT-PCR Zellversuchen eine verringerte Expression von SREBP1 nach Überexpression von miR-200b. Insbesondere im Hinblick auf das oben beschriebene Modell könnten zukünftige Analysen die Rolle von SREBP1 weiter einordnen und die Zusammenhänge im Detail klären.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass SOAT1 eine Zielstruktur von miR-200b ist, dass die tumorsuppressive Funktion von miR-200b zumindest teilweise über die Hemmung des Onkogens SOAT1 erklärbar ist, und dass eine Herabregulierung von miR-200b insbesondere in Hochrisikokarzinomen mit PTEN Verlust einen entscheidenden Proliferationsfaktor darstellt.

### **4.3 Das Enzym SOAT1 als Therapieziel im Prostatakarzinom**

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass SOAT1 eine Zielstruktur von miR-200b darstellt und dass miR-200b ein Tumorsuppressor im Prostatakarzinom ist. Da die Inhibition des Enzyms SOAT1 bereits durch die Entwicklung von spezifischen Inhibitoren für die Therapie verschiedener Erkrankungen (Hypercholesterinämie, Arteriosklerose) etabliert ist, stellte sich die Frage, inwieweit eine Regulation der SOAT1-Aktivität auch für die Behandlung von Prostatakarzinom-Erkrankten von Bedeutung sein könnte. Um dieser Frage nachzugehen, wurden Prostatakarzinom-Zelllinien mit zwei unterschiedlichen SOAT1-Inhibitoren behandelt.

#### **4.3.1 Proliferationsinhibition von Prostatakarzinomzellen durch SOAT1-Inhibitoren**

Zunächst wurde überprüft, ob es bei Behandlung mit SOAT1-Inhibitoren *in vitro* zu einer Proliferationsinhibition kommt. Es wurden zwei Prostatakarzinom-Zelllinien (LNCaP und PC3) und die nicht-maligne Prostatazelllinie RWPE verwendet, um einen Vergleich zwischen *in vitro* kultivierten Karzinomzellen und einer nicht-malignen, aber transformierten Prostata-Zelllinie darstellen zu können.

LNCaP-, PC3- und RWPE-Zellen zeigten in den MTS-Assays eine signifikante Proliferationsinhibition bei Behandlung mit Mitotane und PD132301-2.

Allerdings waren die Zelllinien in ihrer Sensitivität für Mitotane und für PD132301-2 unterschiedlich. Die höchste Sensitivität zeigten die nichtmalignen RWPE-Zellen. Am wenigsten sensitiv auf die SOAT1-Inhibition erwies sich die aggressivste PC3-Zelllinie - jene Zellen, welche laut einer Studie von Yue et al. (162) ein sehr hohes Cholesterinester-Level aufwiesen. Nun könnte man mutmaßen, dass höhere Cholesterinester-Level auch eine höhere Aktivität und



Konzentration von SOAT1 benötigen und damit eine höhere Menge an Inhibitor von Nöten ist. Zudem ist interessant, dass sich PC3-Zellen durch miR-200b vergleichsweise am stärksten inhibieren ließen. Das könnte bedeuten, dass diese Zellen stärker auf eine Herabregulation von miR-200b angewiesen sind, mutmaßlich um den hohen Bedarf an, bzw. das verstärkte Anfallen von Cholesterin oder weiteren Fetten decken zu können und diesen Bedarf mittels einer verstärkten Aktivität von SOAT1 auf einem hohen Niveau halten zu können. Auf der anderen Seite berichten Krycer et al. (169) bei PC3-Zellen eine erhöhte basale SREBP2 Aktivität, wodurch die Zellen eine geringere Empfindlichkeit gegenüber verringertem Cholesterin haben. Dies könnte also ebenfalls die geringe Sensibilität von PC3-Zellen gegenüber SOAT1-Inhibition erklären.

Die hohe Sensitivität der RWPE-Zellen ist jedoch als kritisch zu beurteilen, falls SOAT1-Inhibitoren als Therapeutika in der Therapie des Prostatakarzinoms benutzt werden sollten. Weder Mitotane noch PD132301-2 eignen sich demnach als Therapeutikum, wenn bei der gleichen Konzentration von Inhibitor nicht-maligne Zellen bereits eine Hemmung ihrer Proliferation zeigen, während diese Konzentration bei Prostatazelllinien (PC3 und LNCaP) noch keinen Effekt bewirkt.

Diese Daten weisen daher auf eine hohe Resistenz der Prostatakarzinom-Zellen gegenüber den Effekten der Inhibitoren hin. Es ist jedoch auch zu beachten, dass RWPE-Zellen im Modell keine Karzinomzellen darstellen, dennoch aber für die Zellkultur transformierte Zellen sind.

Insgesamt lässt sich festhalten, dass durch die SOAT1-Hemmung, mittels unterschiedlicher Konzentrationen der eingesetzten Inhibitoren, eine Proliferationsinhibition in allen drei Zelllinien zu beobachten ist.

#### **4.3.2 Synergistische Effekte durch miR-200b und Mitotane oder PD132301-2 im Prostatakarzinom**

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich bereits, dass SOAT1 ein Target von miR-200b ist und miR-200b die Expression von SOAT1 reguliert. Unter der Prämisse, dass eine Korrelation zwischen der Expression von SOAT1 und der Sensitivität für SOAT1-Inhibitoren vorhanden ist, könnte die Expression von

miR-200b in Zellen ebenfalls einen Einfluss auf die Sensitivität gegenüber SOAT1-Inhibitoren ausüben.

Demnach könnte durch Überexpression von miR-200b eine Sensibilisierung für SOAT1-Inhibitoren erreicht werden, da in diesen Zellen eine hohe Expression von SOAT1 vorhanden sein sollte. Das zu untersuchen, war das Ziel der durchgeführten MTS-Assays.

Die Karzinom-Zelllinien LNCaP und PC3 ließen sich durch miR-200b für PD132301-2 und Mitotane sensibilisieren, während sich die nicht-malignen RWPE-Zellen durch miR-200b weder für Mitotane noch für PD132301-2 sensibilisieren ließen.

Damit bestätigt sich zum einen SOAT1 als Zielstruktur von miR-200b. Zum anderem könnten aggressivere Karzinome mit einer niedrigen miR-200b-Expression mithilfe von miR-200b für den Einsatz von spezifischeren SOAT1-Inhibitoren sensibilisiert werden, insbesondere da sich bei den nicht-malignen RWPE-Zellen keine Sensibilisierung nachweisen ließ.

Bei PC3-Zellen ist eine stärkere Inhibition durch miR-200b als durch Mitotane zu beobachten, womit Mitotane das synergistische Agens zu miR-200b wäre. Insgesamt muss hinsichtlich der Experimente mit Mitotane jedoch beachtet werden, dass Mitotane ein unspezifischer Inhibitor ist und neben einer Inhibition von SOAT1 zusätzliche Effekte von Mitotane möglich und wahrscheinlich sind. Zudem ließen sich PC3-Zellen wiederum durch den spezifischen SOAT1-Inhibitor PD132301-2 stärker als durch miR-200b inhibieren. Somit könnten die Ergebnisse bezüglich der Mitotane-Wirkung in PC3-Zellen auch durch zusätzliche, SOAT1-unabhängige Wirkungen erklärbar sein. Diese Möglichkeit sollte in weiteren Studien aufgearbeitet und geklärt werden.

Bei der Interpretation der vorliegenden Ergebnisse sollte beachtet werden, dass die Ergebnisse der Versuche mit PD132301-2 hohe Standardabweichungen aufweisen. Dieser Umstand limitiert die Verlässlichkeit der Ergebnisse und deren Interpretation. Deswegen bedarf es zusätzlicher Experimente, welche die synergistischen Effekte bzgl. PD132301-2 validieren und ergänzen.

Insgesamt lässt sich dennoch festhalten, dass miR-200b Prostatakarzinomzellen *in vitro* für spezifische und unspezifische SOAT1-Inhibitoren sensibilisiert.

#### **4.4 MiR-200b als prognostischer Marker im Prostatakarzinom**

Wie in der vorliegenden Arbeit und auch in anderen Studien gezeigt spielt miR-200b als Tumorsuppressor eine wichtige Rolle in der Genese von Karzinomen, insbesondere auch im Prostatakarzinom.

Diese Tumorentität ist eine der häufigsten malignen Neoplasien im Mann, doch in ihrer Dignität sehr unterschiedlich (170). Das fordert von der klinischen Diagnostik Parameter, welche den Verlauf gut abbilden können, um daran die Therapie optimal anpassen zu können. Daher werden neuartige und klinisch robuste Prognose-Marker benötigt. Einer der möglichen Gründe warum solche Marker nur sehr schwer zu detektieren sind, liegt an den geringen Fallzahlen von Erkrankten mit aggressiven Karzinomen in den vorhandenen bzw. benutzten Prostatakarzinom-Kollektiven.

Für die vorliegende Arbeit wurden daher die Analysen an einem bereits für andere Publikationen verwendeten Hochrisiko-Prostatakarzinom Kollektiv mit einer hohen Anzahl von aggressiv verlaufenden Karzinomen durchgeführt, um retrospektiv auf die Vorhersagbarkeit von biochemischem Progress, klinischem Progress und krebssassoziiertem Tod durch die miR-200b-Expression schließen zu können (171–174). Das Ziel war, erste Hinweise zu liefern, ob miR-200b als molekularer, prognostischer Marker dienen kann, um in Zukunft prospektive Aussagen treffen zu können.

Zunächst zeigte sich, dass miR-200b bei Erkrankten mit klinischem Progress, biochemischem Progress und krebssassoziiertem Tod signifikant niedriger exprimiert war als bei Erkrankten, die diesen Verlauf nicht aufwiesen. Die anschließend durchgeführte multivariate Analyse zeigte, dass mithilfe von miR-200b in Kombination mit dem Gleason-Score ein biochemischer Progress besser vorherzusagen war als mithilfe der Einzelwerte (miR-200b, Gleason-score, PSA, Alter, pT-Stadium) oder einer Kombination aller im Modell verwendeten Testparameter.

Somit zeigte sich in diesem Hochrisiko-Prostatakarzinom Kollektiv die miR-200b-Expression als ein gutes Mittel, um prognostisch relevante Entwicklungen abbilden zu können, da prognostisch schlechter verlaufende Karzinome mit großer Wahrscheinlichkeit eine niedrigere Expression aufweisen.

Dass miR-200b als prognostischer Parameter für verschiedene Tumorentitäten geeignet sein könnte, wurde bereits von verschiedenen Studien zu verschiedenen Karzinomen (Magenkarzinom (145), Ovarialkarzinom (175), Mammarkarzinom (144)) berichtet.

Die hier vorliegenden und andere, bereits publizierte Daten hinsichtlich der Expression im Prostatakarzinom selbst zeigen meist ebenfalls eine Herabregulation von miR-200b (101, 128, 155, 176), wobei zu beachten ist, in welchem Stadium sich das Karzinom befindet.

Katz et al. (176) beispielsweise beschreiben insgesamt eine Überexpression von miR-200b in ihrem Kollektiv, welches aber zu 43% aus pT2 Stadien bestand. Weiterhin zeigen sie, dass es im Stadium pT3 oder bei einem GS  $\geq 8$  zu einer Unterexpression kommt. Einige Studien untersuchten auch eine Korrelation zu klinischen Parametern, jedoch gab es bislang keine Studie, welche eine multivariate Analyse einschloss.

Umso interessanter sind demnach die vorgestellten Ergebnisse, welche jedoch zur Bestätigung nochmals mithilfe eines zweiten, unabhängigen Kollektivs validiert werden sollten.

Eine weitere Perspektive wäre die Überlegung, ob auch prospektiv die Prognose anhand der miR-200b-Expression vorausgesagt werden kann, da im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit nur retrospektive Testmodelle durchgeführt wurden. Eine solche Studie würde letztlich darstellen können, inwieweit miR-200b als prognostischer Marker in der klinischen Anwendung geeignet sein könnte.

## 5 Zusammenfassung

Eine der größten Herausforderungen für die Behandlung des Prostatakarzinoms ist dessen Heterogenität. Es fehlen klinisch stabile Biomarker, die das individuelle Risiko einer Progression bestimmen können. Ein wichtiger Schritt für die Etablierung spezifischer Diagnostika, Prognostika und Therapeutika ist ein gutes Verständnis der Molekularpathologie und der Pathogenese des Prostatakarzinoms. Ziel dieser Arbeit war es die Funktion von miR-200b als potenziellen prognostischen Biomarker für das Prostatakarzinom zu analysieren, die molekulare Funktion von miR-200b zu ermitteln und miR-200b als Tumorsuppressor des Prostatakarzinoms zu untersuchen.

Um die Expression von miR-200b in Prostatakarzinom Nativmaterial zu überprüfen wurden Expressionsanalysen in zwei unabhängigen Kollektiven durchgeführt. Dabei zeigte sich in beiden Prostatakarzinomkollektiven eine signifikante Herabregulierung von miR-200b, sodass miR-200b eine tumorsuppressive Funktion im PCa einzunehmen scheint.

In dem verwendeten Hochrisiko-Kollektiv erwies sich miR 200b zudem in uni- und multivariaten Analysen in einem retrospektiven Versuchsansatz als geeigneter Marker zur Abschätzung der Prognose des Prostatakarzinoms.

Mittels *in vitro* Experimenten konnten tumorsuppressive Funktionen von miR-200b bestätigt werden, da miR-200b-überexprimierende Prostatakarzinom-Zelllinien eine geringere Proliferation und eine geringere Autophagie zeigten.

Zusätzlich konnte auf funktioneller Ebene, SOAT1 als Zielgen von miR-200b definiert werden. Somit wurde ein neuartiger molekularer Wirkmechanismus von miR-200b nachgewiesen, der zumindest teilweise die tumorsuppressive Funktion von miR-200b im PCa erklären kann.

Die funktionelle Bedeutung der miR-200b vermittelten Regulation der SOAT1 Expression konnte in weiteren Experimenten bestätigt werden, indem eine Sensitivierung gegenüber der antiproliferativen Wirkung von SOAT1 Inhibitoren in miR-200b überexprimierenden Prostatakarzinom-Zellen beobachtet werden konnte.

Mit diesen Ergebnissen konnte ein Model entwickelt werden, welches einen möglichen Erklärungsansatz der Bedeutung, der von miR-200b vermittelten SOAT1 Regulation für den Fettstoffwechsel des Prostatakarzinoms liefern könnte.

Die in dieser Arbeit aufgezeigten Hinweise der molekularen Funktion von miR-200b im Prostatakarzinom könnten dazu beitragen den dysregulierten Fettstoffwechsel im Prostatakarzinomzellen besser zu verstehen und in Zukunft womöglich therapeutisch nutzen zu können.

Die prognostische Aussagekraft von miR-200b als molekularer Marker für das Prostatakarzinom ist vielversprechend und könnte zukünftig eine sinnvolle molekularpathologische Ergänzung der bisher verwendeten, klinischen Marker (bspw. PSA; Gleason Score) sein. Weitere Forschung muss Aufschluss darüber geben, ob miR-200b als klinisch verlässlicher, prognostischer Marker fungieren kann, um eine individualisierte Behandlung von Prostatakarzinom-Patienten zukünftig optimieren zu können.

## 6 Literatur

1. Adams J. The case of scirrhus of the prostate gland with corresponding affliction of the lymphatic glands in the lumbar region and in the pelvis. *Lancet* 1853; 1853:1:393.
2. Hughes C, Murphy A, Martin C, Sheils O, O'Leary J. Molecular pathology of prostate cancer. *J Clin Pathol* 2005; 58(7):673–84. doi: 10.1136/jcp.2002.003954.
3. Robert Koch-Institut. Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016.
4. Sakr WA, Grignon DJ, Haas GP, Heilbrun LK, Pontes JE, Crissman JD. Age and racial distribution of prostatic intraepithelial neoplasia. *European urology* 1996; 30(2):138–44.
5. Qaseem A, Barry MJ, Denberg TD, Owens DK, Shekelle P. Screening for prostate cancer: A guidance statement from the Clinical Guidelines Committee of the American College of Physicians. *Ann Intern Med* 2013; 158(10):761–9. doi: 10.7326/0003-4819-158-10-201305210-00633.
6. Moyer VA. Screening for prostate cancer: U.S. Preventive Services Task Force recommendation statement. *Ann Intern Med* 2012; 157(2):120–34. doi: 10.7326/0003-4819-157-2-201207170-00459.
7. Hu JC, Nguyen P, Mao J, Halpern J, Shoag J, Wright JD et al. Increase in Prostate Cancer Distant Metastases at Diagnosis in the United States. *JAMA Oncol* 2017; 3(5):705–7. doi: 10.1001/jamaoncol.2016.5465.
8. Krebsinformationsdienst, Krebsforschungszentrum D. PSA-Test und Früherkennung von Prostatakrebs: Krebsinformationsdienst, Deutsches Krebsforschungszentrum [Stand: 06.02.2018]. Verfügbar unter: <https://www.krebsinformationsdienst.de/tumorarten/prostatakrebs/psa-test-frueherkennung.php#interessierte>.
9. Arsov C, Becker N, Hadaschik BA, Hohenfellner M, Herkommer K, Gschwend JE et al. Prospective randomized evaluation of risk-adapted

prostate-specific antigen screening in young men: The PROBASE trial. *Eur Urol* 2013; 64(6):873–5. doi: 10.1016/j.eururo.2013.05.022.

10. Andriole GL, Crawford ED, Grubb RL, Buys SS, Chia D, Church TR et al. Prostate cancer screening in the randomized Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Trial: Mortality results after 13 years of follow-up. *J Natl Cancer Inst* 2012; 104(2):125–32. doi: 10.1093/jnci/djr500.
11. Allemani C, Matsuda T, Di Carlo V, Harewood R, Matz M, Nikšić M et al. Global surveillance of trends in cancer survival 2000–14 (CONCORD-3): Analysis of individual records for 37 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries. *The Lancet* 2018. doi: 10.1016/S0140-6736(17)33326-3.
12. Michel MS, Thüroff JW, Janetschek G. *Die Urologie*; 2016. (Springer Reference Medizin).
13. Bell KJL, Del Mar C, Wright G, Dickinson J, Glasziou P. Prevalence of incidental prostate cancer: A systematic review of autopsy studies. *Int J Cancer* 2015; 137(7):1749–57. doi: 10.1002/ijc.29538.
14. N. Mottet. Guidelines on prostate cancer 2014:S. 124-37.
15. Schröder FH, Hugosson J, Roobol MJ, Tammela TLJ, Zappa M, Nelen V et al. Screening and prostate cancer mortality: Results of the European Randomised Study of Screening for Prostate Cancer (ERSPC) at 13 years of follow-up. *The Lancet* 2014; 384(9959):2027–35. doi: 10.1016/S0140-6736(14)60525-0.
16. Stattin P, Carlsson S, Holmström B, Vickers A, Hugosson J, Lilja H et al. Prostate cancer mortality in areas with high and low prostate cancer incidence. *J Natl Cancer Inst* 2014; 106(3):dju007. doi: 10.1093/jnci/dju007.
17. Sandblom G, Varenhorst E, Rosell J, Löfman O, Carlsson P. Randomised prostate cancer screening trial: 20 year follow-up. *BMJ* 2011; 342:d1539.
18. Pinsky PF, Prorok PC, Yu K, Kramer BS, Black A, Gohagan JK et al. Extended mortality results for prostate cancer screening in the PLCO trial



- with median follow-up of 15 years. *Cancer* 2017; 123(4):592–9. doi: 10.1002/cncr.30474.
19. Ilic D, Neuberger MM, Djulbegovic M, Dahm P. Screening for prostate cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2013; (1):CD004720. doi: 10.1002/14651858.CD004720.pub3.
20. Federmann J. S3-Leitlinie Prostatakarzinom.
21. Huber F, Montani M, Sulser T, Jaggi R, Wild P, Moch H et al. Comprehensive validation of published immunohistochemical prognostic biomarkers of prostate cancer -what has gone wrong? A blueprint for the way forward in biomarker studies. *Br J Cancer* 2015; 112(1):140–8. doi: 10.1038/bjc.2014.588.
22. D'Amico AV. Biochemical Outcome After Radical Prostatectomy, External Beam Radiation Therapy, or Interstitial Radiation Therapy for Clinically Localized Prostate Cancer. *JAMA* 1998; 280(11):969. doi: 10.1001/jama.280.11.969.
23. Thompson I, Thrasher JB, Aus G, Burnett AL, Canby-Hagino ED, Cookson MS et al. Guideline for the management of clinically localized prostate cancer: 2007 update. *The Journal of Urology* 2007; 177(6):2106–31. doi: 10.1016/j.juro.2007.03.003.
24. OnkoZert. pz\_jahresbericht-2017-A1\_170427. Verfügbar unter: [https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674\(00\)81683-9?\\_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867400816839%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674(00)81683-9?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867400816839%3Fshowall%3Dtrue).
25. Ravi P, Karakiewicz PI, Roghmann F, Gandaglia G, Choueiri TK, Menon M et al. Mental health outcomes in elderly men with prostate cancer. *Urol Oncol* 2014; 32(8):1333–40. doi: 10.1016/j.urolonc.2014.05.005.
26. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 2011; 144(5):646–74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
27. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell* 2000; 100(1):57–70. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81683-9.

28. Currie E, Schulze A, Zechner R, Walther TC, Farese RV. Cellular fatty acid metabolism and cancer. *Cell Metab* 2013; 18(2):153–61. doi: 10.1016/j.cmet.2013.05.017.
29. Cruz PMR, Mo H, McConathy WJ, Sabnis N, Lacko AG. The role of cholesterol metabolism and cholesterol transport in carcinogenesis: A review of scientific findings, relevant to future cancer therapeutics. *Front Pharmacol* 2013; 4:1–7. doi: 10.3389/fphar.2013.00119.
30. Craveiro NS, Silva Lopes B, Tomás L, Fraga Almeida S, Palma H, Afreixo V et al. L-TRUST: Long-term risk of cancer in patients under statins therapy. A systematic review and meta-analysis. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 2019; 28(11):1431–9. doi: 10.1002/pds.4895.
31. Yang J, Wang L, Jia R. Role of de novo cholesterol synthesis enzymes in cancer. *J Cancer* 2020; 11(7):1761–7. doi: 10.7150/jca.38598.
32. Zadra G, Photopoulos C, Loda M. The fat side of prostate cancer. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1831(10):1518–32. doi: 10.1016/j.bbali.2013.03.010.
33. Schuster DM, Nanni C, Fanti S. PET Tracers Beyond FDG in Prostate Cancer. *Semin Nucl Med* 2016; 46(6):507–21. doi: 10.1053/j.semnuclmed.2016.07.005.
34. Poulouse N, Amoroso F, Steele RE, Singh R, Ong CW, Mills IG. Genetics of lipid metabolism in prostate cancer. *Nat Genet* 2018. doi: 10.1038/s41588-017-0037-0.
35. Migita T, Ruiz S, Fornari A, Fiorentino M, Priolo C, Zadra G et al. Fatty acid synthase: A metabolic enzyme and candidate oncogene in prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 2009; 101(7):519–32. doi: 10.1093/jnci/djp030.
36. Peck B, Schulze A. Cholesteryl esters: Fueling the fury of prostate cancer. *Cell Metab* 2014; 19(3):350–2. doi: 10.1016/j.cmet.2014.02.012.
37. Dang Q, Chen Y-A, Hsieh J-T. The dysfunctional lipids in prostate cancer. *Am J Clin Exp Urol* 2019; 7(4):273–80.

38. Narita S, Nara T, Sato H, Koizumi A, Huang M, Inoue T et al. Research Evidence on High-Fat Diet-Induced Prostate Cancer Development and Progression. *Journal of Clinical Medicine* 2019; 8(5). doi: 10.3390/jcm8050597.
39. Stoykova GE, Schlaepfer IR. Lipid Metabolism and Endocrine Resistance in Prostate Cancer, and New Opportunities for Therapy. *Int J Mol Sci* 2019; 20(11). doi: 10.3390/ijms20112626.
40. Yue S, Li J, Lee S-Y, Lee HJ, Shao T, Song B et al. Cholesteryl ester accumulation induced by PTEN loss and PI3K/AKT activation underlies human prostate cancer aggressiveness. *Cell Metab* 2014; 19(3):393–406. doi: 10.1016/j.cmet.2014.01.019.
41. Saraon P, Trudel D, Kron K, Dmitromanolakis A, Trachtenberg J, Bapat B et al. Evaluation and prognostic significance of ACAT1 as a marker of prostate cancer progression. *Prostate* 2014; 74(4):372–80. Verfügbar unter: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/pros.22758>.
42. Goudarzi A. The recent insights into the function of ACAT1: A possible anti-cancer therapeutic target. *Life Sci* 2019; 232:116592. doi: 10.1016/j.lfs.2019.116592.
43. Zabielska J, Sledzinski T, Stelmanska E. Acyl-Coenzyme A: Cholesterol Acyltransferase Inhibition in Cancer Treatment. *Anticancer Res* 2019; 39(7):3385–94. doi: 10.21873/anticancer.13482.
44. Nelson Aa, Woodard G. Severe adrenal cortical atrophy (cytotoxic) and hepatic damage produced in dogs by feeding 2,2-bis(parachlorophenyl)-1,1-dichloroethane (DDD or TDE). *Arch Pathol (Chic)* 1949; 48(5):387–94.
45. Delbert M, Bergenstal, Roy Hertz, Mortimer B, Lipsett, Richard H, Moy. Chemotherapy Of Adrenocortical Cancer With o,p'DDD. *Ann Intern Med* 1960; 53(4):672. doi: 10.7326/0003-4819-53-4-672.
46. loreke. 088-008l\_S2k\_Operative-Therapie\_Nebennierentumoren\_2019-07 [Stand: 22.03.2020]. Verfügbar unter:

[https://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/088-008l\\_S2k\\_Operative-Therapie\\_Nebennierentumoren\\_2019-07.pdf](https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/088-008l_S2k_Operative-Therapie_Nebennierentumoren_2019-07.pdf).

47. Terzolo M, Ardito A, Zaggia B, Laino F, Germano A, Francia S de et al. Management of adjuvant mitotane therapy following resection of adrenal cancer. *Endocrine* 2012; 42(3):521–5. doi: 10.1007/s12020-012-9719-7.
48. Terzolo M, Zaggia B, Allasino B, Francia S de. Practical treatment using mitotane for adrenocortical carcinoma. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2014; 21(3):159–65. doi: 10.1097/MED.000000000000056.
49. Sbiera S, Leich E, Liebisch G, Sbiera I, Schirbel A, Wiemer L et al. Mitotane Inhibits Sterol-O-Acyl Transferase 1 Triggering Lipid-Mediated Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis in Adrenocortical Carcinoma Cells. *Endocrinology* 2015; 156(11):3895–908. doi: 10.1210/en.2015-1367.
50. Bharat K. Trivedi, Terri Stoeber Purchase, Ann Holmes, Corinne E. Augelli-Szafran, Arnold D. Essenburg, Katherine L. Hamelshle et al. Inhibitors of Acyl-CoA:Cholesterol Acyltransferase (ACAT). 7. Development of a Series of Substituted N-Phenyl-N'-[(1-phenylcyclopentyl)methyl]ureas with Enhanced Hypocholesterolemic Activity.
51. Sliskovic DR, White AD. Therapeutic potential of ACAT inhibitors as lipid lowering and anti-atherosclerotic agents. *Trends in Pharmacological Sciences* 1991; 12:194–9. doi: 10.1016/0165-6147(91)90546-5.
52. LaPensee CR, Mann JE, Rainey WE, Crudo V, Hunt SW, Hammer GD. ATR-101, a Selective and Potent Inhibitor of Acyl-CoA Acyltransferase 1, Induces Apoptosis in H295R Adrenocortical Cells and in the Adrenal Cortex of Dogs. *Endocrinology* 2016; 157(5):1775–88. doi: 10.1210/en.2015-2052.
53. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo Arozena A et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* 2016; 12(1):1–222. doi: 10.1080/15548627.2015.1100356.

54. Harris H, Rubinsztein DC. Control of autophagy as a therapy for neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol* 2011; 8(2):108–17. doi: 10.1038/nrneurol.2011.200.
55. Nixon RA, Yang D-S. Autophagy and neuronal cell death in neurological disorders. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012; 4(10). doi: 10.1101/cshperspect.a008839.
56. Gonzalez CD, Lee M-S, Marchetti P, Pietropaolo M, Towns R, Vaccaro MI et al. The emerging role of autophagy in the pathophysiology of diabetes mellitus: Taylor & Francis; 2011 [Stand: 30.08.2018]. Verfügbar unter: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/auto.7.1.13044>.
57. Levine B, Mizushima N, Virgin HW. Autophagy in immunity and inflammation. *Nature* 2011; 469(7330):323–35. doi: 10.1038/nature09782.
58. Rioux JD, Xavier RJ, Taylor KD, Silverberg MS, Goyette P, Huett A et al. Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nat Genet* 2007; 39(5):596–604. doi: 10.1038/ng2032.
59. Eskelinen E-L, Saftig P. Autophagy: A lysosomal degradation pathway with a central role in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1793(4):664–73. doi: 10.1016/j.bbamcr.2008.07.014.
60. Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 2008; 132(1):27–42. doi: 10.1016/j.cell.2007.12.018.
61. Levine B, Yoshimori T, Deretic V, Hrsg. *Autophagy in Infection and Immunity*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2009.
62. Galluzzi L, Pietrocola F, Bravo-San Pedro JM, Amaravadi RK, Baehrecke EH, Cecconi F et al. Autophagy in malignant transformation and cancer progression. *EMBO J* 2015; 34(7):856–80. doi: 10.15252/emboj.201490784.
63. Mizushima N. Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *Journal of Cell Science* 2003; 116(9):1679–88. doi: 10.1242/jcs.00381.

64. Mizushima N, Yamamoto A, Hatano M, Kobayashi Y, Kabeya Y, Suzuki K et al. Dissection of Autophagosome Formation Using Apg5-Deficient Mouse Embryonic Stem Cells. *J Cell Biol* 2001; 152(4):657–68. doi: 10.1083/jcb.152.4.657.
65. Itakura E, Mizushima N. Characterization of autophagosome formation site by a hierarchical analysis of mammalian Atg proteins. *Autophagy* 2014; 6(6):764–76. doi: 10.4161/auto.6.6.12709.
66. Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 and Autophagy. *Methods Mol Biol* 2008; 445:77–88. doi: 10.1007/978-1-59745-157-4\_4.
67. Tanida I, Wakabayashi M, Kanematsu T, Minematsu-Ikeguchi N, Sou Y, Hirata M et al. Lysosomal Turnover of GABARAP-Phospholipid Conjugate is Activated During Differentiation of C2C12 Cells to Myotubes without Inactivation of the mTor Kinase-Signaling Pathway. *Autophagy* 2006; 2(4):264–71. doi: 10.4161/auto.2871.
68. Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36(12):2503–18. doi: 10.1016/j.biocel.2004.05.009.
69. Yang Z, Klionsky DJ. An Overview of the Molecular Mechanism of Autophagy. In: Levine B, Yoshimori T, Deretic V, Hrsg. *Autophagy in Infection and Immunity*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2009. S. 1–32.
70. Nakatogawa H, Suzuki K, Kamada Y, Ohsumi Y. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: Lessons from yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; 10(7):458–67. doi: 10.1038/nrm2708.
71. Huang R, Xu Y, Wan W, Shou X, Qian J, You Z et al. Deacetylation of nuclear LC3 drives autophagy initiation under starvation. *Mol Cell* 2015; 57(3):456–66. doi: 10.1016/j.molcel.2014.12.013.
72. Weidberg H, Shvets E, Shpilka T, Shimron F, Shinder V, Elazar Z. LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in

- autophagosome biogenesis. *EMBO J* 2010; 29(11):1792–802. doi: 10.1038/emboj.2010.74.
73. McEwan DG, Popovic D, Gubas A, Terawaki S, Suzuki H, Stadel D et al. PLEKHM1 regulates autophagosome-lysosome fusion through HOPS complex and LC3/GABARAP proteins. *Mol Cell* 2015; 57(1):39–54. doi: 10.1016/j.molcel.2014.11.006.
74. Fujita N, Hayashi-Nishino M, Fukumoto H, Omori H, Yamamoto A, Noda T et al. An Atg4B mutant hampers the lipidation of LC3 paralogues and causes defects in autophagosome closure. *Mol Biol Cell* 2008; 19(11):4651–9. doi: 10.1091/mbc.e08-03-0312.
75. Pankiv S, Alemu EA, Brech A, Bruun J-A, Lamark T, Overvatn A et al. FYCO1 is a Rab7 effector that binds to LC3 and PI3P to mediate microtubule plus end-directed vesicle transport. *J Cell Biol* 2010; 188(2):253–69. doi: 10.1083/jcb.200907015.
76. Yu L, McPhee CK, Zheng L, Mardones GA, Rong Y, Peng J et al. Termination of autophagy and reformation of lysosomes regulated by mTOR. *Nature* 2010; 465(7300):942–6. doi: 10.1038/nature09076.
77. Viry E, Noman MZ, Arakelian T, Lequeux A, Chouaib S, Berchem G et al. Hijacker of the Antitumor Immune Response: Autophagy Is Showing Its Worst Facet. *Front Oncol* 2016; 6:246. doi: 10.3389/fonc.2016.00246.
78. Lane JD, Agostinis P. Editorial: Self-Eating on Demand: Autophagy in Cancer and Cancer Therapy. *Front Oncol* 2017; 7:302. doi: 10.3389/fonc.2017.00302.
79. Guo JY, White E. Autophagy, Metabolism, and Cancer. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2016; 81:73–8. doi: 10.1101/sqb.2016.81.030981.
80. Degenhardt K, Chen G, Lindsten T, White E. BAX and BAK mediate p53-independent suppression of tumorigenesis. *Cancer Cell* 2002; 2(3):193–203. doi: 10.1016/S1535-6108(02)00126-5.

81. Guo JY, Chen H-Y, Mathew R, Fan J, Strohecker AM, Karsli-Uzunbas G et al. Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis. *Genes Dev* 2011; 25(5):460–70. doi: 10.1101/gad.2016311.
82. Yang S, Wang X, Contino G, Liesa M, Sahin E, Ying H et al. Pancreatic cancers require autophagy for tumor growth. *Genes Dev* 2011; 25(7):717–29. doi: 10.1101/gad.2016111.
83. Kroemer G, Mariño G, Levine B. Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell* 2010; 40(2):280–93. doi: 10.1016/j.molcel.2010.09.023.
84. Schweiger M, Zechner R. Breaking the Barrier--Chaperone-Mediated Autophagy of Perilipins Regulates the Lipolytic Degradation of Fat. *Cell Metab* 2015; 22(1):60–1. doi: 10.1016/j.cmet.2015.06.017.
85. Friedman RC, Farh KK-H, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 2009; 19(1):92–105. doi: 10.1101/gr.082701.108.
86. Bartel DP. MicroRNAs. *Cell* 2004; 116(2):281–97. doi: 10.1016/S0092-8674(04)00045-5.
87. Ruvkun G, Wightman B, Ha I. The 20 years it took to recognize the importance of tiny RNAs. *Cell* 2004; 116:S93-S98. doi: 10.1016/S0092-8674(04)00034-0.
88. Wu L, Belasco JG. Let me count the ways: Mechanisms of gene regulation by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell* 2008; 29(1):1–7. doi: 10.1016/j.molcel.2007.12.010.
89. Heinrich PC, Müller M, Graeve L, Löffler G, Hrsg. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. 9., vollst. überarb. Aufl. Berlin: Springer; 2014. (Springer-Lehrbuch). Verfügbar unter: <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-17972-3>.
90. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014; 15(8):509–24. doi: 10.1038/nrm3838.



91. Ameres SL, Zamore PD. Diversifying microRNA sequence and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013; 14(8):475–88. doi: 10.1038/nrm3611.
92. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: MicroRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol* 2009; 11(3):228–34. doi: 10.1038/ncb0309-228.
93. Kawamata T, Seitz H, Tomari Y. Structural determinants of miRNAs for RISC loading and slicer-independent unwinding. *Nat Struct Mol Biol* 2009; 16(9):953–60. doi: 10.1038/nsmb.1630.
94. Kwak PB, Tomari Y. The N domain of Argonaute drives duplex unwinding during RISC assembly. *Nat Struct Mol Biol* 2012; 19(2):145–51. doi: 10.1038/nsmb.2232.
95. Rupaimoole R, Slack FJ. MicroRNA therapeutics: Towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2017; 16(3):203–22. doi: 10.1038/nrd.2016.246.
96. Rupaimoole R, Calin GA, Lopez-Berestein G, Sood AK. miRNA Deregulation in Cancer Cells and the Tumor Microenvironment. *Cancer Discov* 2016; 6(3):235–46. doi: 10.1158/2159-8290.CD-15-0893.
97. Lin S, Gregory RI. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nat Rev Cancer* 2015; 15(6):321–33. doi: 10.1038/nrc3932.
98. Iorio MV, Croce CM. MicroRNA dysregulation in cancer: Diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO Mol Med* 2012; 4(3):143–59. doi: 10.1002/emmm.201100209.
99. Vanacore D, Boccellino M, Rossetti S, Cavaliere C, D'Aniello C, Di Franco R et al. Micrnas in prostate cancer: An overview. *Oncotarget* 2017; 8(30):50240–51. doi: 10.18632/oncotarget.16933.
100. Aghdam AM, Amiri A, Salarinia R, Masoudifar A, Ghasemi F, Mirzaei H. MicroRNAs as Diagnostic, Prognostic, and Therapeutic Biomarkers in Prostate Cancer; 2019 [Stand: 22.03.2020]. Verfügbar unter: <https://sci-hub.tw/10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.2019025273>.

101. Kanwal R, Plaga AR, Liu X, Shukla GC, Gupta S. MicroRNAs in prostate cancer: Functional role as biomarkers. *Cancer Lett* 2017; 407:9–20. doi: 10.1016/j.canlet.2017.08.011.
102. Kojima S, Goto Y, Naya Y. The roles of microRNAs in the progression of castration-resistant prostate cancer. *J Hum Genet* 2017; 62(1):25–31. doi: 10.1038/jhg.2016.69.
103. Bertoli G, Cava C, Castiglioni I. MicroRNAs as Biomarkers for Diagnosis, Prognosis and Theranostics in Prostate Cancer. *Int J Mol Sci* 2016; 17(3):421. doi: 10.3390/ijms17030421.
104. Melbø-Jørgensen C, Ness N, Andersen S, Valkov A, Dønnem T, Al-Saad S et al. Stromal expression of MiR-21 predicts biochemical failure in prostate cancer patients with Gleason score 6. *PLoS ONE* 2014; 9(11):e113039. doi: 10.1371/journal.pone.0113039.
105. Li T, Li R-S, Li Y-H, Zhong S, Chen Y-Y, Zhang C-M et al. miR-21 as an independent biochemical recurrence predictor and potential therapeutic target for prostate cancer. *The Journal of Urology* 2012; 187(4):1466–72. doi: 10.1016/j.juro.2011.11.082.
106. Leite KRM, Reis ST, Viana N, Morais DR, Moura CM, Silva IA et al. Controlling RECK miR21 Promotes Tumor Cell Invasion and Is Related to Biochemical Recurrence in Prostate Cancer. *J Cancer* 2015; 6(3):292–301. doi: 10.7150/jca.11038.
107. Larne O, Martens-Uzunova E, Hagman Z, Edsjö A, Lippolis G, den Berg MSV et al. miQ--a novel microRNA based diagnostic and prognostic tool for prostate cancer. *Int J Cancer* 2013; 132(12):2867–75. doi: 10.1002/ijc.27973.
108. Hafliðadóttir BS, Larne O, Martin M, Persson M, Edsjö A, Bjartell A et al. Upregulation of miR-96 enhances cellular proliferation of prostate cancer cells through FOXO1. *PLoS ONE* 2013; 8(8):e72400. doi: 10.1371/journal.pone.0072400.

109. Khanmi K, Ignacimuthu S, Paulraj MG. MicroRNA in prostate cancer. *Clin Chim Acta* 2015; 451(Pt B):154–60. Verfügbar unter: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009898115004313>.
110. Sharma N, Baruah MM. The microRNA signatures: aberrantly expressed miRNAs in prostate cancer. *Clin Transl Oncol* 2019; 21(2):126–44. Verfügbar unter: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12094-018-1910-8>.
111. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(4):259–69. Verfügbar unter: <https://www.nature.com/articles/nrc1840>.
112. Janssen HLA, Reesink HW, Lawitz EJ, Zeuzem S, Rodriguez-Torres M, Patel K et al. Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *N Engl J Med* 2013; 368(18):1685–94. doi: 10.1056/NEJMoa1209026.
113. Rupaimoole R, Slack FJ. MicroRNA therapeutics: Towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2017; 16(3):203–22. doi: 10.1038/nrd.2016.246.
114. Esau C, Davis S, Murray SF, Yu XX, Pandey SK, Pear M et al. miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell Metab* 2006; 3(2):87–98. doi: 10.1016/j.cmet.2006.01.005.
115. van Rooij E, Purcell AL, Levin AA. Developing microRNA therapeutics. *Circ Res* 2012; 110(3):496–507. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.247916.
116. Richard S. Geary, Tanya A. Watanabe, LoAnne Truong, Sue Freier, Elena A. Lesnik, Namir B. Sioufi, Henri Sasmor, Muthiah Manoharan and Arthur A. Levin. Pharmacokinetic Properties of 2'-O-(2-Methoxyethyl)-Modified Oligonucleotide Analogs in Rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2001; (296 (3)):890–7.
117. O'Brien SJ, Carter JV, Burton JF, Oxford BG, Schmidt MN, Hallion JC et al. The role of the miR-200 Family in Epithelial-Mesenchymal Transition in Colorectal Cancer: A Systematic Review. *Int J Cancer* 2018. doi: 10.1002/ijc.31282.

118. Balzano F, Cruciani S, Basoli V, Santaniello S, Facchin F, Ventura C et al. MiR200 and miR302: Two Big Families Influencing Stem Cell Behavior. *Molecules* 2018; 23(2). doi: 10.3390/molecules23020282.
119. Huret J-L, Ahmad M, Arsaban M, Bernheim A, Cigna J, Desangles F et al. Atlas of genetics and cytogenetics in oncology and haematology in 2013. *Nucleic Acids Res* 2013; 41(Database issue):D920-4. doi: 10.1093/nar/gks1082.
120. Feng X, Wang Z, Fillmore R, Xi Y. MiR-200, a new star miRNA in human cancer. *Cancer Lett* 2014; 344(2):166–73. doi: 10.1016/j.canlet.2013.11.004.
121. Humphries B, Yang C. The microRNA-200 family: Small molecules with novel roles in cancer development, progression and therapy. *Oncotarget* 2015; 6(9):6472–98. doi: 10.18632/oncotarget.3052.
122. TargetsCanHuman 7.1: predicted miRNA targets of miR-200ab-5p [Stand: 20.02.2020]. Verfügbar unter: [http://www.targetscan.org/cgi-bin/targetscan/vert\\_71/targetscan.cgi?species=Human&mir\\_vnc=miR-200ab-5p](http://www.targetscan.org/cgi-bin/targetscan/vert_71/targetscan.cgi?species=Human&mir_vnc=miR-200ab-5p).
123. Wu Y-Z, Lin H-Y, Zhang Y, Chen W-F. miR-200b-3p mitigates oxaliplatin resistance via targeting TUBB3 in colorectal cancer. *The Journal of Gene Medicine* 2020:e3178. Verfügbar unter: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/jgm.3178>.
124. Liu P, Chen S, Huang Y, Xu S, Song H, Zhang W et al. LINC00667 promotes Wilms' tumor metastasis and stemness by sponging miR-200b/c/429 family to regulate IKK- $\beta$ . *Cell Biology International* 2020. Verfügbar unter: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/cbin.11334>.
125. Vlahopoulos SA. Aberrant control of NF- $\kappa$ B in cancer permits transcriptional and phenotypic plasticity, to curtail dependence on host tissue: molecular mode. *Cancer Biol Med* 2017; 14(3):254–70. doi: 10.20892/j.issn.2095-3941.2017.0029.

126. Vlahopoulos SA, Cen O, Hengen N, Agan J, Moschovi M, Critselis E et al. Dynamic aberrant NF- $\kappa$ B spurs tumorigenesis: a new model encompassing the microenvironment. *Cytokine Growth Factor Rev* 2015; 26(4):389–403. doi: 10.1016/j.cytogfr.2015.06.001.
127. Martinez-Outschoorn UE, Lin Z, Whitaker-Menezes D, Howell A, Sotgia F, Lisanti MP. Ketone body utilization drives tumor growth and metastasis. *Cell Cycle* 2012; 11(21):3964–71. doi: 10.4161/cc.22137.
128. Yu J, Lu Y, Di Cui, Li E, Zhu Y, Zhao Y et al. miR-200b suppresses cell proliferation, migration and enhances chemosensitivity in prostate cancer by regulating Bmi-1. *Oncol Rep* 2014; 31(2):910–8. doi: 10.3892/or.2013.2897.
129. Williams LV, Veliceasa D, Vinokour E, Volpert OV. miR-200b inhibits prostate cancer EMT, growth and metastasis. *PLoS ONE* 2013; 8(12):e83991. doi: 10.1371/journal.pone.0083991.
130. Siddique HR, Saleem M. Role of BMI1, a stem cell factor, in cancer recurrence and chemoresistance: preclinical and clinical evidences. *Stem Cells* 2012; 30(3):372–8. doi: 10.1002/stem.1035.
131. Kang MK, Kim RH, Kim SJ, Yip FK, Shin K-H, Dimri GP et al. Elevated Bmi-1 expression is associated with dysplastic cell transformation during oral carcinogenesis and is required for cancer cell replication and survival. *Br J Cancer* 2007; 96(1):126–33. doi: 10.1038/sj.bjc.6603529.
132. Dong P, Kaneuchi M, Watari H, Hamada J, Sudo S, Ju J et al. MicroRNA-194 inhibits epithelial to mesenchymal transition of endometrial cancer cells by targeting oncogene BMI-1. *Mol Cancer* 2011; 10:99. doi: 10.1186/1476-4598-10-99.
133. Xia L, Han Q, Chi C, Zhu Y, Pan J, Dong B et al. Transcriptional regulation of PRKAR2B by miR-200b-3p/200c-3p and XBP1 in human prostate cancer. *Biomed Pharmacother* 2020; 124:109863. Verfügbar unter: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332220300536>.
134. Sarwar M, Sandberg S, Abrahamsson P-A, Persson JL. Protein kinase A (PKA) pathway is functionally linked to androgen receptor (AR) in the

progression of prostate cancer. *Urol Oncol* 2014; 32(1):25.e1-12. Verfügbar unter:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1078143912003158>.

135. Souza MFd, Kuasne H, Barros-Filho MdC, Cilião HL, Marchi FA, Fuganti PE et al. Circulating mRNAs and miRNAs as candidate markers for the diagnosis and prognosis of prostate cancer. *PLoS ONE* 2017; 12(9):e0184094. doi: 10.1371/journal.pone.0184094.
136. Vergho DC, Kneitz S, Kalogirou C, Burger M, Krebs M, Rosenwald A et al. Impact of miR-21, miR-126 and miR-221 as prognostic factors of clear cell renal cell carcinoma with tumor thrombus of the inferior vena cava. *PLoS ONE* 2014; 9(10):e109877. doi: 10.1371/journal.pone.0109877.
137. Kneitz B, Krebs M, Kalogirou C, Schubert M, Joniau S, van Poppel H et al. Survival in patients with high-risk prostate cancer is predicted by miR-221, which regulates proliferation, apoptosis, and invasion of prostate cancer cells by inhibiting IRF2 and SOCS3. *Cancer Res* 2014; 74(9):2591–603. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-1606.
138. Janiak M, Paskal W, Rak B, Garbicz F, Jarema R, Sikora K et al. TIMP4 expression is regulated by miR-200b-3p in prostate cancer cells. *APMIS* 2017; 125(2):101–5. doi: 10.1111/apm.12638.
139. Hart M, Nolte E, Wach S, Szczyrba J, Taubert H, Rau TT et al. Comparative microRNA profiling of prostate carcinomas with increasing tumor stage by deep sequencing. *Mol Cancer Res* 2014; 12(2):250–63. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-13-0230.
140. Liu Q, Tang H, Liu X, Liao Y, Li H, Zhao Z et al. miR-200b as a prognostic factor targets multiple members of RAB family in glioma. *Med Oncol* 2014; 31(3):859. doi: 10.1007/s12032-014-0859-x.
141. Peng B, Hu S, Jun Q, Luo D, Zhang X, Zhao H et al. MicroRNA-200b targets CREB1 and suppresses cell growth in human malignant glioma. *Mol Cell Biochem* 2013; 379(1-2):51–8. Verfügbar unter: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11010-013-1626-6>.

142. Yang X, Ni W, Lei K. miR-200b suppresses cell growth, migration and invasion by targeting Notch1 in nasopharyngeal carcinoma. *Cell Physiol Biochem* 2013; 32(5):1288–98. doi: 10.1159/000354527.
143. Sun L, Yao Y, Liu B, Lin Z, Lin L, Yang M et al. MiR-200b and miR-15b regulate chemotherapy-induced epithelial-mesenchymal transition in human tongue cancer cells by targeting BMI1. *Oncogene* 2012; 31(4):432–45. doi: 10.1038/onc.2011.263.
144. Yao Y, Hu J, Shen Z, Yao R, Liu S, Li Y et al. MiR-200b expression in breast cancer: A prognostic marker and act on cell proliferation and apoptosis by targeting Sp1. *J Cell Mol Med* 2015; 19(4):760–9. doi: 10.1111/jcmm.12432.
145. Tang H, Deng M, Tang Y, Xie X, Guo J, Kong Y et al. miR-200b and miR-200c as prognostic factors and mediators of gastric cancer cell progression. *Clin Cancer Res* 2013; 19(20):5602–12. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-1326.
146. Paterson EL, Kazenwadel J, Bert AG, Khew-Goodall Y, Ruzkiewicz A, Goodall GJ. Down-regulation of the miRNA-200 family at the invasive front of colorectal cancers with degraded basement membrane indicates EMT is involved in cancer progression. *Neoplasia* 2013; 15(2):180–91. doi: 10.1593/neo.121828.
147. Yoshino H, Enokida H, Itesako T, Tatarano S, Kinoshita T, Fuse M et al. Epithelial-mesenchymal transition-related microRNA-200s regulate molecular targets and pathways in renal cell carcinoma. *J Hum Genet* 2013; 58(8):508–16. doi: 10.1038/jhg.2013.31.
148. Saleeb R, Kim SS, Ding Q, Scorilas A, Lin S, Khella HW et al. The miR-200 family as prognostic markers in clear cell renal cell carcinoma. *Urol Oncol* 2019; 37(12):955–63. Verfügbar unter: [https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31635993/?from\\_term=200b%2A%26cancer&from\\_sort=date&from\\_page=3&from\\_pos=6](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31635993/?from_term=200b%2A%26cancer&from_sort=date&from_page=3&from_pos=6).

149. Liu P, Chen S, Huang Y, Xu S, Song H, Zhang W et al. LINC00667 promotes Wilms' tumor metastasis and stemness by sponging miR-200b/c/429 family to regulate IKK- $\beta$ . *Cell Biology International* 2020. Verfügbar unter: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/cbin.11334>.
150. Köhler CU, Bryk O, Meier S, Lang K, Rozynek P, Brüning T et al. Analyses in human urothelial cells identify methylation of miR-152, miR-200b and miR-10a genes as candidate bladder cancer biomarkers. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 438(1):48–53. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.07.021.
151. Zuberi M, Mir R, Das J, Ahmad I, Javid J, Yadav P et al. Erratum to: Expression of serum miR-200a, miR-200b and miR-200c as candidate biomarkers in epithelial ovarian cancer and their association with clinicopathological features. *Clin Transl Oncol* 2015; 17(10):840. doi: 10.1007/s12094-015-1355-2.
152. Pacurari M, Addison JB, Bondalapati N, Wan Y-W, Luo D, Qian Y et al. The microRNA-200 family targets multiple non-small cell lung cancer prognostic markers in H1299 cells and BEAS-2B cells. *Int J Oncol* 2013; 43(2):548–60. doi: 10.3892/ijo.2013.1963.
153. Ramírez-Moya J, Baker AR, Slack FJ, Santisteban P. ADAR1-mediated RNA editing is a novel oncogenic process in thyroid cancer and regulates miR-200 activity. *Oncogene* 2020:1–16. Verfügbar unter: <https://www.nature.com/articles/s41388-020-1248-x.pdf>.
154. Zhou B, Xu J, Chen Y, Gao S, Feng X, Lu X. miR-200b/c-RAP1B axis represses tumorigenesis and malignant progression of papillary thyroid carcinoma through inhibiting the NF- $\kappa$ B/Twist1 pathway. *Experimental Cell Research* 2020; 387(2):111785. Verfügbar unter: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014482719306706>.
155. He M, Liu Y, Deng X, Qi S, Sun X, Liu G et al. Down-regulation of miR-200b-3p by low p73 contributes to the androgen-independence of prostate cancer cells. *Prostate* 2013; 73(10):1048–56. doi: 10.1002/pros.22652.



156. Cristofani R, Montagnani Marelli M, Cicardi ME, Fontana F, Marzagalli M, Limonta P et al. Dual role of autophagy on docetaxel-sensitivity in prostate cancer cells. *Cell Death Dis* 2018; 9(9):889. doi: 10.1038/s41419-018-0866-5.
157. Wu Z, Chang P-C, Yang JC, Chu C-Y, Wang L-Y, Chen N-T et al. Autophagy Blockade Sensitizes Prostate Cancer Cells towards Src Family Kinase Inhibitors. *Genes Cancer* 2010; 1(1):40–9. doi: 10.1177/1947601909358324.
158. Pan B, Feng B, Chen Y, Huang G, Wang R, Chen L et al. MiR-200b regulates autophagy associated with chemoresistance in human lung adenocarcinoma. *Oncotarget* 2015; 6(32):32805–20. doi: 10.18632/oncotarget.5352.
159. Kim H, Kim Y, Jeoung D. DDX53 Promotes Cancer Stem Cell-Like Properties and Autophagy. *Mol Cells* 2017; 40(1):54–65. doi: 10.14348/molcells.2017.2258.
160. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105(30):10513–8. doi: 10.1073/pnas.0804549105.
161. Williams LV, Veliceasa D, Vinokour E, Volpert OV. miR-200b inhibits prostate cancer EMT, growth and metastasis. *PLoS ONE* 2013; 8(12):e83991. doi: 10.1371/journal.pone.0083991.
162. Yue S, Li J, Lee S-Y, Lee HJ, Shao T, Song B et al. Cholesteryl ester accumulation induced by PTEN loss and PI3K/AKT activation underlies human prostate cancer aggressiveness. *Cell Metab* 2014; 19(3):393–406. doi: 10.1016/j.cmet.2014.01.019.
163. Ruiz-Roso MB, Gil-Zamorano J, López de las Hazas, María Carmen, Tomé-Carneiro J, Crespo MC, Latasa MJ et al. Intestinal Lipid Metabolism Genes Regulated by miRNAs. *Front Genet* 2020; 11:707. doi: 10.3389/fgene.2020.00707.

164. Ayyagari VN, Wang X, Diaz-Sylvester PL, Groesch K, Brard L. Assessment of acyl-CoA cholesterol acyltransferase (ACAT-1) role in ovarian cancer progression-An in vitro study. PLoS ONE 2020; 15(1):e0228024. Verfügbar unter: [https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31978092/?from\\_term=Acat%2A&from\\_page=2&from\\_pos=7](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31978092/?from_term=Acat%2A&from_page=2&from_pos=7).
165. Llaverias G, Danilo C, Mercier I, Daumer K, Capozza F, Williams TM et al. Role of cholesterol in the development and progression of breast cancer. Am J Pathol 2011; 178(1):402–12. doi: 10.1016/j.ajpath.2010.11.005.
166. Jiang Y, Sun A, Zhao Y, Ying W, Sun H, Yang X et al. Proteomics identifies new therapeutic targets of early-stage hepatocellular carcinoma. Nature 2019; 567(7747):257–61. Verfügbar unter: <https://www.nature.com/articles/s41586-019-0987-8.pdf>.
167. Bi M, Qiao X, Zhang H, Wu H, Gao Z, Zhou H et al. Effect of inhibiting ACAT-1 expression on the growth and metastasis of Lewis lung carcinoma. Oncol Lett 2019; 18(2):1548–56. doi: 10.3892/ol.2019.10427.
168. Heir T, Falk RS, Røsbjerg TE, Sandvik L, Erikssen J, Tretli S. Cholesterol and prostate cancer risk: A long-term prospective cohort study. BMC Cancer 2016; 16:643. doi: 10.1186/s12885-016-2691-5.
169. Krycer JR, Kristiana I, Brown AJ. Cholesterol homeostasis in two commonly used human prostate cancer cell-lines, LNCaP and PC-3. PLoS ONE 2009; 4(12):e8496. doi: 10.1371/journal.pone.0008496.
170. Bell KJL, Del Mar C, Wright G, Dickinson J, Glasziou P. Prevalence of incidental prostate cancer: A systematic review of autopsy studies. Int J Cancer 2015; 137(7):1749–57. doi: 10.1002/ijc.29538.
171. Chys B, Devos G, Everaerts W, Albersen M, Moris L, Claessens F et al. Preoperative Risk-Stratification of High-Risk Prostate Cancer: A Multicenter Analysis. Front Oncol 2020; 10:246. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32211317/>.

172. Joniau S, Tosco L, Briganti A, Vanden Broeck T, Gontero P, Karnes RJ et al. Results of surgery for high-risk prostate cancer. *Current opinion in urology* 2013; 23(4):342–8. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23702565/>.
173. Joniau S, Briganti A, Gontero P, Gandaglia G, Tosco L, Fieuws S et al. Stratification of high-risk prostate cancer into prognostic categories: a European multi-institutional study. *Eur Urol* 2015; 67(1):157–64. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24486307/>.
174. Spahn M, Weiss C, Bader P, Ströbel P, Gerharz EW, Kneitz B et al. Long-term outcome of patients with high-risk prostate cancer following radical prostatectomy and stage-dependent adjuvant androgen deprivation. *Urologia internationalis* 2010; 84(2):164–73. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20215820/>.
175. Hu X, Macdonald DM, Huettner PC, Feng Z, El Naqa IM, Schwarz JK et al. A miR-200 microRNA cluster as prognostic marker in advanced ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2009; 114(3):457–64. doi: 10.1016/j.ygyno.2009.05.022.
176. Katz B, Reis ST, Viana NI, Morais DR, Moura CM, Dip N et al. Comprehensive study of gene and microRNA expression related to epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer. *PLoS ONE* 2014; 9(11):e113700. doi: 10.1371/journal.pone.0113700.
177. S1-Leitlinie\_Prostatakarzinom\_2017.

# Appendix

## I. Supplement

### I.1. Schema zur TNM-/pTNM-Klassifikation [UICC 2017], 7. Auflage

**Tabelle 6: TNM/pTNM Klassifikation des Prostatakarzinoms**

Quelle: S1- Leitlinie\_Prostatakarzinom\_2017.(177)

Primärtumor	TNM	pTNM
Primärtumor kann nicht beurteilt werden	TX	pTX
Kein Anhalt für Primärtumor	T0	pT0
Klinisch nicht erkennbarer Tumor, weder tastbar noch in bildgebenden Verfahren	T1	
Tumor zufälligen histologischen Befunds (Incidental carcinoma) in 5% oder weniger des resezierten Gewebes	T1a	
Tumor zufälligen histologischen Befunds (Incidental carcinoma) in mehr als 5% des resezierten Gewebes	T1b	
Tumor durch Nadelbiopsie diagnostiziert (z. B. wegen erhöhtem PSA)	T1c	
Tumor begrenzt auf Prostata	T2	pT2
Tumor befallt die Hälfte eines Lappens oder weniger	T2a	pT2a
Tumor befallt mehr als die Hälfte eines Lappens	T2b	pT2b
Tumor in beiden Lappen	T2c	pT2c
Tumor durchbricht die Prostatakapsel	T3	pT3
Extrakapsuläre Ausbreitung (einseitig oder beidseitig) eingeschlossen mikroskopischer Infiltration des Blasenhalses	T3a	pT3a
Tumor infiltriert Samenblasen	T3b	pT3b
Tumor ist fixiert oder infiltriert andere Strukturen als Samenblasen, z. B. Sphincter externus, Rektum und/oder Levatormuskel und/oder ist an Beckenwand fixiert	T4	pT4
<b>Regionäre Lymphknoten</b>		
Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden	NX	pNX
Keine regionären Lymphknotenmetastasen	N0	pN0
Regionäre Lymphknotenmetastasen	N1	pN1
<b>Fernmetastasen</b>		
Keine Fernmetastasen	M0	pM0
Fernmetastasen	M1	pM1
Metastasen nur in nicht regionären Lymphknoten	M1a	pM1a
Metastasen in Knochen	M1b	pM1b
Fernmetastasen in anderen Lokalisationen	M1c	pM1c

### I.2. Bonferroni-korrigierte Post Hoc Tests der miR-200b-Expression der unterschiedlichen Gleason-Scores

**Tabelle 7: Post hoc Test je nach Gleason Score oder Kontrolle verglichen mit der miR-200b-Expression**

	3+3 vgl. 3+4	3+3 vgl. 4+3	3+3 vgl. 4+4	3+3 vgl. 5+4/5+5	3+4 vgl. 4+3
Freiheitsgrade (df)	37,000	4,000	48,000	43,000	37,000
t-Statistik	-0,130	1,079	0,309	0,749	0,623
P(T<=t) zweiseitig	0,897	0,341	0,759	0,458	0,537
Kritischer t-Wert bei zweiseitigem t-Test	2,026	2,776	2,011	2,017	2,026

	3+4 vgl. 4+4	3+4 vgl. 5+4/5+5	4+3 vgl. 4+4	4+3 vgl. 5+4/5+5	4+4 vgl. 5+4/5+5
Freiheitsgrade (df)	81,000	76,000	48,000	43,000	87,000
t-Statistik	1,198	2,590	0,019	0,506	1,463
P(T<=t) zweiseitig	0,234	0,011	0,985	0,616	0,147
Kritischer t-Wert bei zweiseitigem t-Test	1,990	1,992	2,011	2,017	1,988
	3+3 vgl. Kontrolle	3+4 vgl. Kontrolle	4+3 vgl. Kontrolle	4+4 vgl. Kontrolle	5+4/5+5vgl. Kontrolle
Freiheitsgrade (df)	12,000	45,000	12,000	56,000	51,000
t-Statistik	-4,030	-4,096	-4,862	-3,196	-3,627
P(T<=t) zweiseitig	0,002	0,000	0,000	0,002	0,001
Kritischer t-Wert bei zweiseitigem t-Test	2,179	2,014	2,179	2,003	2,008

### I.3. Mann-Whitney Tabelle

n1 \ n2	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
2							0	0	0	0	1	1	1	1	1	2	2	2	2
3				0	1	1	2	2	3	3	4	4	5	5	6	6	7	7	8
4			0	1	2	3	4	4	5	6	7	8	9	10	11	11	12	13	14
5		0	1	2	3	5	6	7	8	9	11	12	13	14	15	17	18	19	20
6		1	2	3	5	6	8	10	11	13	14	16	17	19	21	22	24	25	27
7		1	3	5	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34
8	0	2	4	6	8	10	13	15	17	19	22	24	26	29	31	34	36	38	41
9	0	2	4	7	10	12	15	17	20	23	26	28	31	34	37	39	42	45	48
10	0	3	5	8	11	14	17	20	23	26	29	33	36	39	42	45	48	52	55
11	0	3	6	9	13	16	19	23	26	30	33	37	40	44	47	51	55	58	62
12	1	4	7	11	14	18	22	26	29	33	37	41	45	49	53	57	61	65	69
13	1	4	8	12	16	20	24	28	33	37	41	45	50	54	59	63	67	72	76
14	1	5	9	13	17	22	26	31	36	40	45	50	55	59	64	69	74	78	83
15	1	5	10	14	19	24	29	34	39	44	49	54	59	64	70	75	80	85	90
16	1	6	11	15	21	26	31	37	42	47	53	59	64	70	75	81	86	92	98
17	2	6	11	17	22	28	34	39	45	51	57	63	69	75	81	87	93	99	105
18	2	7	12	18	24	30	36	42	48	55	61	67	74	80	86	93	99	106	112
19	2	7	13	19	25	32	38	45	52	58	65	72	78	85	92	99	106	113	119
20	2	8	14	20	27	34	41	48	55	62	69	76	83	90	98	105	112	119	127
21	3	8	15	22	29	36	43	50	58	65	73	80	88	96	103	111	119	126	134
22	3	9	16	23	30	38	45	53	61	69	77	85	93	101	109	117	125	133	141
23	3	9	17	24	32	40	48	56	64	73	81	89	98	106	115	123	132	140	149
24	3	10	17	25	33	42	50	59	67	76	85	94	102	111	120	129	138	147	156
25	3	10	18	27	35	44	53	62	71	80	89	98	107	117	126	135	145	154	163
26	4	11	19	28	37	46	55	64	74	83	93	102	112	122	132	141	151	161	171
27	4	11	20	29	38	48	57	67	77	87	97	107	117	127	137	147	158	168	178
28	4	12	21	30	40	50	60	70	80	90	101	111	122	132	143	154	164	175	186
29	4	13	22	32	42	52	62	73	83	94	105	116	127	138	149	160	171	182	193
30	5	13	23	33	43	54	65	76	87	98	109	120	131	143	154	166	177	189	200
31	5	14	24	34	45	56	67	78	90	101	113	125	136	148	160	172	184	196	208
32	5	14	24	35	46	58	69	81	93	105	117	129	141	153	166	178	190	203	215
33	5	15	25	37	48	60	72	84	96	108	121	133	146	159	171	184	197	210	222
34	5	15	26	38	50	62	74	87	99	112	125	138	151	164	177	190	203	217	230
35	6	16	27	39	51	64	77	89	103	116	129	142	156	169	183	196	210	224	237
36	6	16	28	40	53	66	79	92	106	119	133	147	161	174	188	202	216	231	245
37	6	17	29	41	55	68	81	95	109	123	137	151	165	180	194	209	223	238	252
38	6	17	30	43	56	70	84	98	112	127	141	156	170	185	200	215	230	245	259
39	7	18	31	44	58	72	86	101	115	130	145	160	175	190	206	221	236	252	267
40	7	18	31	45	59	74	89	103	119	134	149	165	180	196	211	227	243	258	274

Abb. 25: Mann-Whitney Tabelle; kritische Werte; alpha < 0,05, zweiseitig

Quelle: <http://www.real-statistics.com/statistics-tables/mann-whitney-table/> Copyright 2020 by real statistics

#### I.4.Zweistichproben t-Test zur Proliferationsinhibition durch die Überexpression der miR-200b

Tabelle 8: Zweistichproben t-Test unter der Annahme gleicher Varianzen bei drei verschiedenen Zelllinien an den jeweiligen Testtagen.

Verglichen wurde immer die relative Reduktion der MTS-Absorption von mit pre miR-200b transfizierten Zellen mit pre Kontroll Transfizierten Zellen. Es zeigt sich eine statistisch signifikante Proliferationsinhibition durch die Überexpression der miR-200b ( $p < 0,01$ )

<b>LNCaP</b>	<b>Test an Tag 4</b>	<b>Test an Tag 7</b>	<b>Test an Tag 8</b>
Freiheitsgrade (df)	4	4	4
t-Statistik	7,10	19,44	15,44
P(T<=t) zweiseitig	0,00	0,00	0,00
Kritischer t-Wert bei zweiseitigem t-Test	2,78	2,78	2,78
<b>PC3</b>	<b>Test an Tag 4</b>	<b>Test an Tag 7</b>	<b>Test an Tag 8</b>
Freiheitsgrade (df)	4	4	4
t-Statistik	15,32	58,23	35,54
P(T<=t) zweiseitig	0,00	0,00	0,00
Kritischer t-Wert bei zweiseitigem t-Test	2,78	2,78	2,78
<b>RWPE</b>	<b>Test an Tag 4</b>	<b>Test an Tag 7</b>	<b>Test an Tag 8</b>
Freiheitsgrade (df)	4	4	4
t-Statistik	3,43	5,27	9,45
P(T<=t) zweiseitig	0,03	0,01	0,00
Kritischer t-Wert bei zweiseitigem t-Test	2,78	2,78	2,78

### I.5.Proliferationsinhibition durch Mitotane in LNCaP-, PC3- und RWPE- Zellen an Tag 8 p.T.

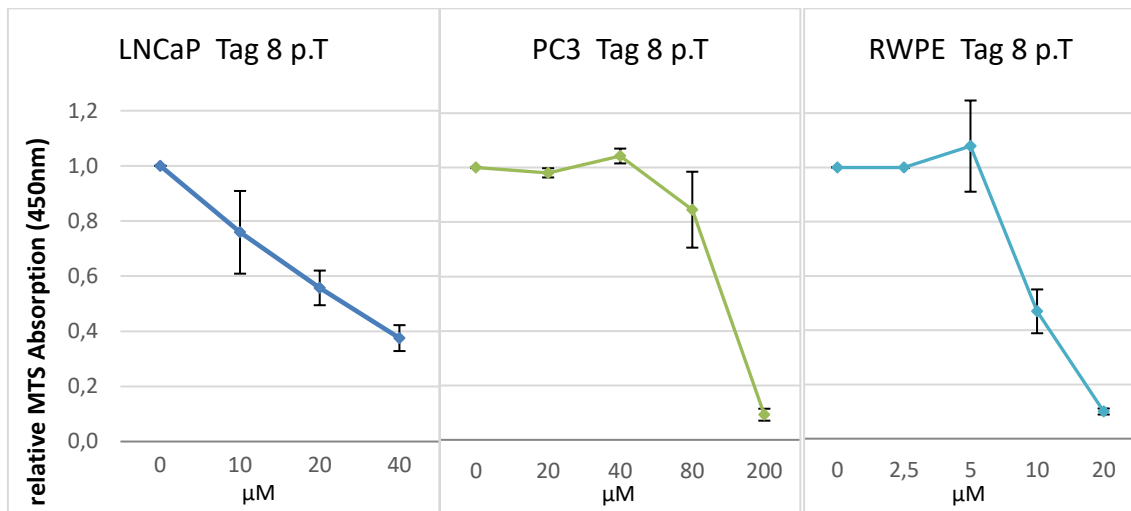


Abb. 26: Proliferationsinhibition durch Mitotane in LNCaP-, PC3- und RWPE-Zellen an Tag 8 p.T..

Gezeigt ist der Mittelwert (n=3) der relativen Proliferation in Prozent zu der als 100% gesetzten MTS-Absorption der permanent wachsenden Kontrollen, beispielhaft an Tag 8 nach Beginn der Kultivierung. Die Zellen wurden jeweils mit unterschiedlichen Konzentrationen von Mitotane behandelt und es wurde jeweils an Tag 4, 7 und 8 nach Beginn der Kultivierung ein MTS-Assay durchgeführt. Die Fehlerbalken setzen sich aus der Standardabweichung der drei durchgeführten, untereinander unabhängigen Experimente zusammen.

## I.6.Proliferationsinhibition durch PD132301-2 in LNCaP-, PC3- und RWPE-Zellen an Tag 8 p.T.

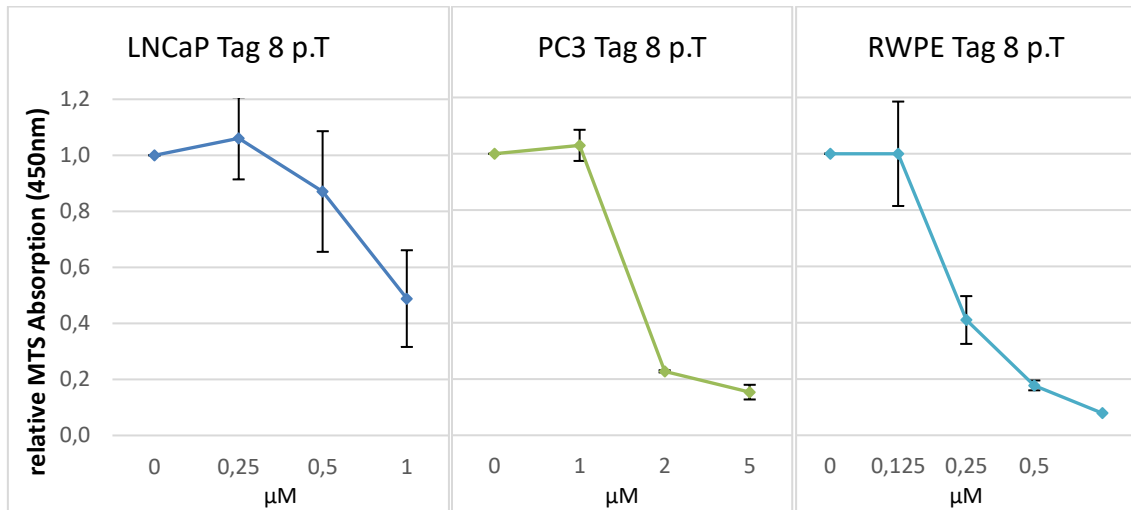


Abb. 27: Proliferationsinhibition durch PD 132301-2 in LNCaP-, PC3- und RWPE-Zellen an Tag 8 p.T..

Gezeigt ist der Mittelwert (n=3) der relativen Proliferation in Prozent zu der als 100% gesetzten MTS-Absorption der permanent wachsenden Kontrollen. Die Zellen wurden jeweils mit unterschiedlichen Konzentrationen von PD132301-2 behandelt und es wurde jeweils an Tag 4, 7 und 8 p.T. ein MTS-Assay durchgeführt. Die Fehlerbalken setzen sich aus der Standardabweichung der drei durchgeführten, untereinander unabhängigen Experimente zusammen.



## II. Abkürzungsverzeichnis

AIC	Akaike information criterion
Akt	AKR mouse strain thymoma, entspricht der Proteinkinase B (PKB)
ANOVA	analysis of variance (Varianzanalyse)
BCP	biochemischer Progress
BCR	biochemischer Progress
BMI-1	B cell-specific Moloney murine leukemia virus integration site
BPH	benigne Prostatahyperplasie
cDNA	complementary/komplementäre DNA
CI	Konfidenzintervall
CREB1	cAMP responsive element-binding protein 1
cT	<i>clinic</i> TNM, klinische TNM Klassifikation
Ct	cycle threshold
DDD	Dichlordiphenyldichlorethan
DGCR8	DiGeorge Syndrom critical Region 8
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOPC	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
DRU	Digital rektale Untersuchung
EGF	epidermal growth factor
EMT	Epitheliale-Mesenchymale Transition
ERK	extracellular signal-regulated kinase
HMGCS2	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Synthase 2
HR	hazard ratio
HRP-Signals	Horseradish Peroxidase Signal
IC <sub>50</sub>	mittlere inhibitorische Konzentration
IKK-β	Inhibitor of kappa-B kinase subunit beta
KAT	krebsassoziiertes Tod, krebsassoziiertes Tod
KP	klinischer Progress, Klinischer Progress
LC3	Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3
LD	Lipid Droplet
LDL	Low Density Lipoprotein
LNA	locked nucleic acids
LNCaP	Lymph Node Carcinoma of the Prostate
miRNA	mikroRNA, Ribonukleinsäure
miR-XXX	mikroRNA-XXX
mRNA	messenger RNA
mTOR	mechanistic Target of Rapamycin
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt
NF-κB-Signalweg	nuclear factor-kappa B- Signalweg
NLE	Neutral lipid emulsions
NNC	Nebennierenrindenkarzinom
OLR1	Oxidized Low-density Lipoprotein Rezeptor 1
PBS	Phosphate buffered saline
PC3	Prostate Cancer -3

PCR	polymerase chain reaction
PD132301-2	N-phenyl-N'-(1-phenylcycloalkyl) urea; ATR101
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PRKAR2B	protein kinase cAMP-dependent type II regulatory subunit beta
PSA	prostataspezifisches Antigen
pT	<i>post transfectionem (nach Transfektion)</i>
RISC	RNA-induced silencing Complex
RNA	Ribonukleinsäure
RS5	relative survival over 5 years
RT	Raumtemperatur
RWPE	prostate epithelial transformed by HPV
SDS	sodium dodecyl sulfate
SOAT	sterol-o-acyltransferase, früher ACAT1
SREBP 1	sterol regulatory element-binding protein
TNM	tumor, node, metastasis. Entspricht der Klassifikation nach UICC. Präfix 'c' steht für klinisch; Präfix 'p' für pathologische Diagnostik
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
ZEB	Zinc finger E-box-binding

### III. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Molekulare Signalwege rund um Cholesterin und die Rolle von SOAT1.....	7
Abb. 2:	Strukturformel Mitotane (o,p'-DDD (Dichlordiphenyldichlorethan)) .....	8
Abb. 3:	Überblick über den Ablauf von Autophagie .....	10
Abb. 4:	Biosynthese der miRNA.....	13
Abb. 5:	Verschiedene chemische Modifikationen der miRNAs, um die Stabilität zu erhöhen: .....	16
Abb. 6:	Transportsysteme für miRNAs .....	17
Abb. 7:	Schema eines MTS Proliferation Assays: .....	34
Abb. 8:	Herauf- / Herabregulierte Expression von miR-200b in Kollektiv 1. ....	40
Abb. 9:	Regulation der miR-200b Expression in Kollektiv 1 .....	41
Abb. 10:	Regulation der miR-200b-Expression im Hochrisiko-Kollektiv: Prostatakarzinom (n=132), Metastasen (n=24), BPH-Proben (n=9). ....	43
Abb. 11:	miR-200b Expression in einem Hochrisiko-Prostatakarzinom-Kollektiv (n=132) in Abhängigkeit von verschiedenen klinischen Parametern.....	44
Abb. 12:	Überlebensanalyse von Erkrankten mit einem Hochrisiko-Prostatakarzinom.....	46
Abb. 13:	Transfektionseffizienz - pre-miR-200b-Transfektion .....	49
Abb. 14:	Proliferationsinhibition durch miR-200b in LNCaP-, PC3-, RWPE-Zellen.....	51

Abb. 15: Übereinstimmung der Seed-Sequenz von miR-200b und der Zielregion von SOAT1.....	52
Abb. 16: Signifikante Herabregulation der SOAT1-Expression in LNCaP-Zellen durch miR-200b.....	53
Abb. 17: Reduktion der SOAT1 Proteinkonzentration durch miR-200b Transfektion.....	54
Abb. 18: Keine signifikante Regulation der mRNA von SREBP1 durch miR-200b.....	55
Abb. 19: miR-200b bewirkt eine Veränderung der Autophagie.....	56
Abb. 20: Proliferationsinhibition durch Mitotane in LNCaP-, PC3- und RWPE-Zellen.....	57
Abb. 21: Sensitivierung durch miR-200b bzw. Mitotane in PC3- und LNCaP-Zellen.....	59
Abb. 22: Proliferationsinhibition durch PD132301-2 in LNCaP-, PC3- und RWPE-Zellen.....	61
Abb. 23: Sensitivierung durch miR-200b in Prostatakarzinomzelllinien für PD132301-2.....	62
Abb. 24: Modell eines Regulationskreislaufs um SOAT1, miR-200b und Cholesterin im Prostatakarzinom.....	73
Abb. 25: Mann-Whitney Tabelle; kritische Werte; alpha < 0,05, zweiseitig.....	Supplement
Abb. 26: Proliferationsinhibition durch Mitotane in LNCaP-, PC3- und RWPE-Zellen an Tag 8 p.T.....	Supplement
Abb. 27: Proliferationsinhibition durch PD 132301-2 in LNCaP-, PC3- und RWPE-Zellen an Tag 8 p.T.....	Supplement

#### IV. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Charakterisierung Kollektiv 2.....	31
Tabelle 2: Expressionsunterschiede von miR-200b in Kollektiv 1 im gepaarten Testmodell.....	40
Tabelle 3: Univariate Cox-Regressionsanalyse.....	47
Tabelle 4: Multivariates Modell für die aufgeführten Parameter in der Cox-Regression.....	48
Tabelle 5: miR-200b-Expression in Nativmaterial ausgewählter maligner Tumore.....	64
Tabelle 6: TNM/pTNM Klassifikation des Prostatakarzinoms.....	Supplement
Tabelle 7: Post hoc Test je nach Gleason Score oder Kontrolle verglichen mit der miR-200b-Expression.....	Supplement
Tabelle 8: Zweistichproben t-Test unter der Annahme gleicher Varianzen bei drei verschiedenen Zelllinien an den jeweiligen Testtagen.....	Supplement

## **V. Danksagung**

Als ich mich für meine experimentelle Doktorarbeit beworben habe, war neben dem Thema das Team und die Betreuung ein wichtiger Aspekt der Entscheidungsfindung.

Mein Betreuer, Dr. Burkhard Kneitz versprach mit von Anfang an den Abschluss einer Arbeit, was sich schließlich auch mit der jetzt vorliegenden Arbeit bewahrheitet hat.

Doch auf diesem Weg hatte ich viel Unterstützung und Hilfe, wofür ich mich an dieser Stelle bedanken möchte.

Bedanken möchte ich mich an erster Stelle bei meinem Betreuer Dr. Burkhard Kneitz, welcher selbst nach längerem Zeitverlauf immer wieder mit angepackt hat und auch die aufwendige Arbeit des Korrekturlesens übernommen hat.

Ganz besonderer Dank gilt meiner Schwester, Dr. Theresa Finkl, welche mich immer wieder ermuntert hat, viel mühevollen Korrekturarbeit geleistet hat und zu jeder meiner Fragen eine hilfreiche Antwort wusste. Herzlichen Dank dafür.

Weiterer Dank gilt Prof. Dr. Kübler, Dr. Deschler-Baier und Dr. Markus Krebs, welche der Arbeit zu ihrem letzten Feinschliff verhalfen.

Wichtige statistische Unterstützung erhielt ich von Frau Dr. Susanne Kneitz, wofür ich sehr dankbar bin. Frau Barbara Dexler und Frau Vera Schwartz danke ich für die Einweisung und die technische Unterstützung in der Durchführung der Laborarbeit.

In all der Zeit waren meine Eltern eine wichtige Stütze. Auch während Durststrecken und Rückschlägen ermutigten sie mich und gaben mir die Kraft und den Mut nicht aufzugeben.

Unterstützung erhielt ich auch durch viele Freunde in Form von Zuspruch, vielen hilfreichen Diskussionen und die ein oder andere Abwechslungen in allzu stressigen Zeiten.