

Aus der Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie  
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Direktor: Univ.-Professor Dr. med. Hubertus Riedmiller

microRNA-221 und ihr Einfluss auf Zytokin-vermittelte Signalwege  
im Hochrisiko-Karzinom der Prostata

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von  
Markus Karl Ludwig Krebs  
aus Schöllkrippen

Würzburg, Juni 2016



Referent: Univ.-Professor Dr. med. Hubertus Riedmiller

Korreferent: Univ.-Professor Dr. med. Volker Kunzmann

Dekan: Univ.-Professor Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Juni 2016

Der Promovend ist Arzt.

Meinen Eltern gewidmet.

## INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG .....	1
1.1	Epidemiologie des Prostatakarzinoms .....	1
1.2	Beeinflussung der Genexpression durch microRNA.....	2
1.2.1	Rolle von miRNA in Tumorentstehung und –progression.....	3
1.2.2	Rolle von miRNA im PCa.....	4
2	FRAGESTELLUNG .....	6
3	MATERIAL UND METHODEN .....	7
3.1	Probenmaterial .....	7
3.1.1	PCa-Zelllinien.....	7
3.1.1.1	Zellkultur.....	7
3.1.1.2	RNA- und Protein-Isolation .....	8
3.1.2	PCa-Nativmaterial .....	9
3.2	Untersuchungsmethoden.....	9
3.2.1	Mikroskopische Aufnahmen.....	9
3.2.2	Proliferationstests .....	10
3.2.3	Bioinformatische Analyseverfahren .....	10
3.2.3.1	Microarray-Experiment.....	11
3.2.3.2	Untersuchung der miR-221-beeinflussten Genexpression.....	12
3.2.3.3	Vorhersage von miR-221-Zielgenen.....	13
3.2.4	mRNA- und miRNA-Bestimmung mittels Real time-PCR.....	13
3.2.4.1	Reverse Transkription .....	14
3.2.4.2	Real time-PCR.....	14
3.2.5	Western Blot.....	16
3.2.6	Software und Statistik.....	19
4	ERGEBNISSE .....	20
4.1	miR-221-Gehalt der PCa-Zelllinien.....	20

4.2	Mikroskopische Aufnahmen.....	21
4.3	Proliferation von PCa-Zellen nach pre-miR-221-Transfektion .....	21
4.4	Microarray-Untersuchung miR-221-regulierter Zellfunktionen.....	23
4.4.1	Statistische Auswertung der Genexpression.....	24
4.4.2	Bioinformatische Zuordnung regulierter Signalwege .....	27
4.4.2.1	Interferome-Datenbank .....	28
4.4.2.2	DAVID Functional Annotation-Analyse .....	28
4.4.2.3	Ingenuity Systems-Analyse.....	29
4.5	Validierung identifizierter Signalwege.....	30
4.5.1	Real time-PCR.....	31
4.5.2	Western Blot.....	32
4.5.3	Proliferationstests .....	32
4.6	Validierung möglicher Zielgene von miR-221 .....	34
4.6.1	Real time-PCR.....	36
4.6.2	Western Blot.....	37
4.7	Expression von miR-221 und ihrer Zielgene in Nativmaterial.....	37
5	DISKUSSION .....	40
5.1	miR-221 hemmt Wachstum von Androgen-unabhängigen PCa-Zellen .....	42
5.2	miR-221 aktiviert zelluläres STAT1-Signal .....	42
5.2.1	Interferon-induzierte Gene und ihre Rolle in Neoplasien .....	43
5.2.2	miR-221 und ihre Rolle im Rahmen von Virusinfektionen .....	45
5.2.3	Regulation von Interferon-Signalen durch miR-221 .....	46
5.2.4	Interferon-Signal als Erklärungsansatz für divergente LNCaP-Reaktion	47
5.2.5	miR-221 als mögliche Determinante viraler PCa-Impfstrategien .....	47
5.3	miR-221 reguliert IRF2 und SOCS3 in vitro.....	50
5.3.1	IRF2 im Rahmen von Immunabwehr und Onkogenese .....	50
5.3.2	SOCS3 als Regulator von STAT1-/STAT3-Signalwegen .....	51

5.4	Expression von IRF2 und SOCS3 in PCa-Proben .....	53
5.5	Modell zur Rolle von miR-221 im PCa .....	53
6	ZUSAMMENFASSUNG .....	56
7	LITERATURVERZEICHNIS .....	...
8	DANKSAGUNG .....	...
9	LEBENS LAUF .....	...

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Epidemiologie des Prostatakarzinoms

*”Prostate cancer is not a monolithic cancer but a spectrum of disease. The screening, detection, and treatment we provide must focus on cancers that matter, and future clinical trials must do so as well.” [1]*

Die besondere Herausforderung des Prostatakarzinoms (PCa) liegt für den Kliniker nicht in dessen Häufigkeit, sondern vor allem in dessen Heterogenität. So stieg in Europa die Rate der neu-diagnostizierten PCa-Fälle zwischen 1995 und 2012 um mehr als 180 Prozent – von 145.000 auf 416.000 Fälle [2, 3]. Im Gegensatz zur stark gestiegenen Inzidenz veränderte sich die Zahl der PCa-assoziierten Sterbefälle in deutlich geringerem Ausmaß und wuchs von 75.000 im Jahr 1996 auf 92.000 im Jahr 2012 [2, 3]. Verantwortlich für die Zunahme der Neuerkrankungen ist der breite Einsatz der PSA-Wert-Bestimmung zur Früherkennung [3]. Eine europaweit durchgeführte Studie zum Nutzen des PSA-Screenings kam zu dem Schluss, dass die Kontrollmaßnahmen zwar die PCa-Mortalität im betrachteten Kollektiv um etwa ein Fünftel senken konnte. Jedoch mussten bei einer durchschnittlichen Nachbetrachtung von 9 Jahren rechnerisch etwa 1400 Männer zusätzlich einer PSA-Untersuchung unterzogen werden und knapp 50 dabei gefundene PCa-Fälle behandelt werden, um einen PCa-assoziierten Todesfall zu verhindern [4]. Auch wenn längere Nachbetrachtungszeiträume (11 sowie 13 Jahre) derselben Studie diese Zahlen etwas verringerten [5, 6], ändert dies nichts an der drohenden Überdiagnostik von PCa-Fällen.

Der gestiegene Anteil früher PCa-Stadien, die nunmehr mit Hilfe des PSA-Screenings gefunden werden [7], hinterlässt seine Spuren auch in weiteren Untersuchungen: Die SPCG-4-Studie zeigte an einem Kollektiv vor Einführung der PSA-Diagnostik für lokal begrenzte PCa-Fälle noch die Vorteilhaftigkeit der Radikalen Prostatektomie verglichen mit einem Watchful waiting-Ansatz [8]. Es scheint bezeichnend, dass diese Überlegenheit im Rahmen der PIVOT-Studie an einem Patienten-Kollektiv der PSA-Ära nicht mehr nachvollzogen werden kann [9].

Vor diesem Hintergrund ist in Fachkreisen eine teils hitzige Diskussion um die Sinnhaftigkeit der PSA-Wert-Bestimmung entbrannt [10-12]. Ihren vorläufigen Höhepunkt erreichte diese Debatte mit der Entscheidung der U. S. Preventive Services Task Force im Mai 2012 [13-15]: Das US-amerikanische Gremium, dem Praktiker aus vielen Bereichen der Gesundheitsversorgung angehören, riet erstmals vom PSA-Screening als allgemeine Vorsorge-Maßnahme ab.

Zur Lösung des epidemiologischen Dilemmas sind neue Biomarker notwendig, welche aus der großen Masse aller PCa-Fälle gerade die aggressiven Karzinome herausfiltern, welche einer sofortigen Therapie bedürfen [1, 7]. Ein entscheidender Schritt zur Findung solcher Marker sind Tumorbanks, die über PCa-Fälle mit einem hohen Progressionsrisiko verfügen. Besonders geeignet scheinen hierfür Hochrisiko-PCa-Kollektive. Um hierzu gezählt zu werden, muss ein PCa mindestens eines der folgenden Kriterien erfüllen: einen PSA-Wert von mehr als 20 ng/ml, einen Gleason-Score von mindestens 8 bzw. ein T3- oder T4-Stadium der Tumorausdehnung [16]. Patienten mit einem Hochrisiko-PCa entwickeln nach radikaler Prostatektomie mit einer Wahrscheinlichkeit von bis zu 70 % ein biochemisches Rezidiv und in bis zu 30 % der Fälle kommt es zu einer fortschreitenden Metastasierung und nachfolgend zum PCa-assoziierten Tod [17]. Die dezidierte Analyse von Hochrisiko-Karzinomen birgt somit die Möglichkeit, Biomarker-Kandidaten auf ihr prognostisches Potential im Hinblick auf das Tumor-spezifische Überleben zu überprüfen.

## **1.2 Beeinflussung der Genexpression durch microRNA**

Im Jahre 1993 entdeckten Forscher bei der Untersuchung des Wurmgenoms von *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), dass das Gen *lin-4* nicht für ein zugehöriges Protein kodiert. Stattdessen bindet *lin-4*, dem eine entscheidende Rolle in der Entwicklung von *C. elegans* zukommt, an die 3'-untranslatierte Region (3'UTR) der mRNA eines weiteren Gens [18]. Die Wissenschaftler fanden außerdem heraus, dass die nicht-kodierende RNA von *lin-4* durch die Bindung an die 3'UTR von *lin-14* die Translation dieses Gens verhinderte [19, 20]. Die erstmalige Beschreibung dieser direkten RNA-RNA-Interaktion legte den Grundstein für die Entdeckung der posttranskriptionellen Regulation durch microRNA (miRNA) in Pflanzen und Säugetieren [21]. In der Folge konnten auch im menschlichen Genom hunderte Vertreter der



miRNA-Familie identifiziert werden, welche die Expression auf dem post-transkriptionellen Wege – ohne eine vorige Protein-Bildung – regulieren. Zu Beginn des miRNA-Entstehungsprozesses wird eine pri-miRNA genannte Vorstufe gebildet, aus der mit Hilfe des Enzyms Drosha die sogenannte pre-miRNA entsteht. Dieser unmittelbare miRNA-Vorläufer besteht aus etwa 70 Nukleotiden und verlässt den Zellkern. Im Zytoplasma wird mit Hilfe des Proteins Dicer, einer RNase, die etwa 22 Nukleotide lange miRNA gebildet. Diese und weitere Proteine bilden den RNA-induced silencing complex (RISC), die eigentliche funktionelle Grundeinheit der RNA-Interferenz [22]. Obgleich die weiteren Mechanismen, mit deren Hilfe miRNA die Genexpression beeinflusst, keineswegs abschließend geklärt sind [23, 24], gelten folgende beiden Mechanismen zur miRNA-mRNA-Interaktion am ehesten als etabliert [25]: Im Falle einer langstreckigen Komplementarität bindet die miRNA direkt an die betreffende Nukleotid-Sequenz. Der so entstandene Doppelstrang steht für die weitere Translation nicht mehr zur Verfügung und wird schließlich abgebaut. Der zweite, ungleich variabelere, Mechanismus verlangt keine lückenlos übereinstimmende Sequenz. Nicht zum mRNA-Strang passende Folgen der miRNA bilden Schleifen aus. Auf diese Weise können sich weitere, erneut komplementäre Sequenzen derselben miRNA ebenfalls an den mRNA-Strang anlagern. Gerade dieser sogenannte *imperfect match* begründet die Fülle möglicher Ziel-Gene und damit die Bedeutung von miRNA als post-transkriptioneller Genregulator.

### **1.2.1 Rolle von miRNA in Tumorentstehung und –progression**

Bereits kurze Zeit nach der Entdeckung von nicht-kodierender RNA begannen Forscher, ihre Funktion in Neoplasien näher zu untersuchen. Geweckt wurde das Interesse vor allem durch Beobachtungen, dass zahlreiche Vertreter der miRNA-Familie im menschlichen Genom an Stellen kodiert sind, welche für die Entstehung von Tumoren verantwortlich gemacht werden [26]. In der Folgezeit wurden für viele Malignome charakteristische miRNA-Signaturen gefunden [27, 28]. Entsprechend ihrer abweichenden Expression im Tumor werden miRNA – analog zu mRNA und ihren zugehörigen Proteinen – in Tumorsuppressoren und Onkogene eingeteilt [29]. Im Rahmen der miRNA-Diagnostik gelang jedoch häufig nicht nur die Identifikation einzelner über- bzw. vermindert exprimierter Kandidaten. Vielmehr zeigte sich, dass die

gefundenen Profile unterschiedliche Stufen der Tumorprogression kennzeichnen und mit Funktionen wie Angiogenese, Epithelio-Mesenchymaler Transition (EMT) und Metastasierung verbunden sind [30, 31]. Eben diese Stadien-spezifische Expression begründet das prognostische Potential von miRNA, das für viele Malignome bereits gezeigt werden konnte [32, 33].

### **1.2.2 Rolle von miRNA im PCa**

Auch im PCa existieren charakteristische miRNA-Signaturen, die als Biomarker in Frage kommen [34]. Vertretern wie miR-205 und der miR-200-Familie, welche im Tumorgewebe der Prostata in geringerem Ausmaß enthalten sind, werden dabei schützende Eigenschaften zugeschrieben. Hierzu zählen die Bewahrung der epithelialen Organisation der Zellen (ergo: die Verhinderung von EMT) [35-37] und die Sensitivierung gegenüber Chemotherapeutika [38-40].

Zu den onkogen wirksamen miRNA hingegen, sogenannten OncomiR [41], wird miR-21 gezählt. Für diese miRNA konnte bereits in mehreren Tumorentitäten eine Prognose-relevante Überexpression gezeigt werden, z. B. im Glioblastom [42], Mamma- [43], Magen- [44] und klarzelligem Nierenzellkarzinom [45, 46]. Im PCa scheint die onkogene Rolle von miR-21 und ihr Einfluss auf den Krankheitsverlauf [47] unter anderem auf der Regulation von RECK zu beruhen [48]. Das Membranprotein inhibiert Matrix-Metalloproteinasen, welche durch die Formung der Extrazellulär-Matrix eine große Rolle in Invasion und Angiogenese spielen [49, 50]. Daneben wird der anti-apoptotische Einfluss von miR-21 auf die verminderte Expression des Zielmoleküls PDCD4 zurückgeführt [51, 52].

Eine bisher noch unzureichend geklärte Rolle im Gefüge von über- und unterexprimierten miRNA im PCa nimmt miR-221 ein: Diese gilt in vielen Entitäten – etwa im Pankreas- [53], Magen- [54] und Kolonkarzinom [55] – aufgrund ihrer Überexpression als Onkogen. In scheinbarer Übereinstimmung hierzu erschienen auch für das PCa mehrere Untersuchungen, welche auf Basis von Zellkultur-Studien eine entsprechende Rolle von miR-221 fordern. So wurde gezeigt, dass miR-221 in Androgen-abhängigen LNCaP-Zellen die Expression des Zellzyklus-Regulators p27 verringert [56, 57]. Auch die bereits in anderen Tumorentitäten gezeigte Regulation des

PI3K-Inhibitors PTEN [58-60] erscheint relevant, da der Verlust bzw. die Mutation dieses Gens einen neuralgischen Punkt in der PCa-Progression darstellt [61, 62].

In scharfem Kontrast zur einmütigen Onkogen-Forderung dieser Arbeiten stehen die Ergebnisse in PCa-Nativmaterial: So zeigen unter anderem Spahn et al., dass miR-221 im PCa gegenüber korrespondierendem Normalgewebe signifikant vermindert exprimiert wird [63]. Auch die kürzlich erschienene Meta-Analyse bisheriger Nativmaterial-Untersuchungen kommt für das PCa zu diesem Schluss [64]. Trotz der Eindeutigkeit dieses Ergebnisses existieren bisher – neben der miR-221-vermittelten Regulation der Tyrosinkinase c-KIT [63, 65] – kaum funktionelle Erklärungsansätze, die eine tumorsuppressive Rolle von miR-221 stützen könnten. Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag hierzu leisten.

## 2 FRAGESTELLUNG

Auf Basis der Erkenntnisse zur Expression und der möglichen prognostischen Aussagekraft einer Herabregulation von miR-221 im Hochrisiko-PCa soll mit Hilfe der folgenden Experimente ermittelt werden,

- ob und in welchem Ausmaß miR-221 das Proliferationsverhalten von PCa-Zellen beeinflusst,
- wie sich das genomweite mRNA-Expressionsprofil durch die Erhöhung des zellulären miR-221-Spiegels verändert,
- welche Signalwege und zellulären Funktionen durch die Erhöhung des miR-221-Spiegels beeinflusst werden, und
- welche miR-221-Zielgene in PCa-Zellen für das veränderte Proliferations-, Expressionsverhalten und vor allem modulierte Signalwege mitverantwortlich sind.

Hierfür soll auf zellbiologische und molekularbiologische Methoden wie transiente Transfektionen in Zellkulturen, Proliferationstests, Microarray-Experimente, Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Western Blot-Untersuchungen zurückgegriffen werden. Daneben kommen – zur Identifizierung möglicher spezifischer Zielgene sowie miR-221-modulierter Signalwege – bioinformatische Verfahren wie die Computergestützte Auswertung der gewonnenen Microarray-Daten zum Einsatz. Um die Bedeutung der miR-221-Expression im PCa weiter zu untermauern, sollen die *in vitro* gefundenen Zielgene auf ihre mögliche Regulation durch miR-221 in Nativmaterial eines PCa-Kollektivs untersucht werden. Dies erfolgt durch die Analyse der Expression von miR-221 und ihrer Zielgene in Tumor- sowie dem korrespondierenden Normalgewebe dieses Kollektivs. Abschließend erfolgt die Korrelationsanalyse der Expressionsdaten, um die Relevanz der experimentell gezeigten miR-221-Regulation für die Verhältnisse *in vivo* auszuloten und die mögliche tumorsuppressive Funktion von miR-221 im PCa eingehender darzustellen.

## **3 MATERIAL UND METHODEN**

### **3.1 Probenmaterial**

Die im Folgenden gezeigten Experimente wurden mit Hilfe von Zellkultur-Modellen durchgeführt. Daneben wurden Rückschlüsse auf die Verhältnisse in vivo mittels Expressionsanalysen an Tumor- sowie korrespondierendem Normalgewebe von PCa-Patienten gezogen.

#### **3.1.1 PCa-Zelllinien**

Die Auswirkungen der Erhöhung des zellulären miR-221-Gehaltes auf PCa-Zellen wurden in drei Zelllinien untersucht. Hierbei handelte es sich um LNCaP- [66], DU145- [67, 68] und PC3-Zellen [69]. LNCaP-Zellen sind Androgen-abhängig und entstammen einer Lymphknoten-Metastase. DU145- und PC3-Zellen repräsentieren das Kastrations-resistente PCa und wurden ursprünglich aus einer Hirn- bzw. Knochenmetastase gewonnen. Alle Zellen wurden von American Type Culture Collection (ATCC, Manassas/USA) bezogen und den Empfehlungen von ATCC entsprechend behandelt.

##### **3.1.1.1 Zellkultur**

Die adhärent wachsenden Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C, 6 % CO<sub>2</sub>-Gehalt der Luft und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Bei ca. 80 % Bewuchs der Kulturflaschen erfolgte die Passagierung. Für die Experimente wurden die Zellen in 6 Well- (RNA- und Proteingewinnung) bzw. 96 Well-Platten (Proliferationstests) ausgesät und weiter behandelt. Folgende Reagenzien kamen im Rahmen der Kultivierung, Passagierung und Transfektion der Zellen zum Einsatz (in alphabetischer Reihenfolge):

- DMEM High Glucose Medium (PAA, Pasching/Österreich),
- Dulbecco´s PBS (PAA, Pasching/Österreich),
- Fetales Kälberserum – FCS 10 % (PAA, Pasching/Österreich),

- HEPES (PAA, Pasching/Österreich),
- Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad/USA),
- MEM Non-Essential Amino Acids Solution (Gibco, Paisley/UK),
- Natriumpyruvat (Gibco, Paisley/UK),
- OPTI-MEM (Gibco, Paisley/UK),
- Trypan-Blau 0,4 % (Sigma-Aldrich, St. Louis/USA),
- Trypsin 0,05 % (Invitrogen, Carlsbad/USA).

Das Grundmedium war DMEM, dem FCS 10 % sowie HEPES, MEM Non-Essential Amino Acids Solution und Natriumpyruvat zugesetzt wurden. Im Falle einer Konfluenz von etwa 80 % wurden die Zellen mit Trypsin zunächst von der Oberfläche gelöst (3 bis 5 Minuten Einwirkzeit), im Anschluss die Zellsuspension in einem Falcon-Röhrchen zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Zell-Pellet erneut in DMEM aufgelöst. Anschließend folgte das Auszählen mit Hilfe von Trypan-Blau und einer Neubauer-Zählkammer (Brand, Wertheim/Deutschland).

Als Hilfsmittel zur transienten Transfektion der PCa-Zellen wurde das Lipofectamine 2000-System (Invitrogen, Carlsbad/USA) gemäß Herstellerangaben benutzt. Zur Modulation der zellulären miR-221-Spiegel diente das Ambion<sup>®</sup> Pre-miR<sup>™</sup> miRNA Precursor-System (pre-miR-221, anti-miR-221 sowie Pre-miR<sup>™</sup> negative control – im Weiteren pre-miR-Kontrolle bzw. Kontroll-Transfektion genannt).

Zur Überprüfung des Einflusses der Transfektion auf die Interferon-Sensitivität der Karzinomzellen wurde an Tag 1 nach der transienten Transfektion (p. T.) rekombinantes Interferon  $\gamma$  von Cell Signaling Technology (Danvers/USA) zugesetzt. Die Endkonzentration betrug für jedes Experiment 10 ng/ml.

### **3.1.1.2 RNA- und Protein-Isolation**

Die Gewinnung von RNA aus Zellkultur-Experimenten erfolgte mit Hilfe des TRIzol<sup>®</sup>-Reagens (Invitrogen, Carlsbad/USA) gemäß den Empfehlungen des Herstellers – unter Verwendung von Chloroform, Isopropanol und 75%-Ethanol (allesamt Roth,

Karlsruhe/Deutschland). Zur Konservierung der Proteine kam PhosphoSafe™ Extraction Reagent von Merck Millipore (Billerica/USA) Protokoll-gemäß zum Einsatz.

Sowohl die gewonnenen RNA- als auch die Proteinproben wurden mit dem Spektrometer SmartSpec™ (BIO-RAD) vermessen. Im Anschluss wurden die Proben bis zur Durchführung der weiteren Experimente eingefroren.

### **3.1.2 PCa-Nativmaterial**

Die korrespondierenden Normalgewebs- und Tumorproben (n=59) entstammten PCa-Patienten, deren Prostatagewebe – nach einer radikalen Prostatektomie – in der Tumorbank der Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie der Universität Würzburg erfasst und gesammelt wurde. Die Etablierung dieser Sammlung war zuvor durch Frau Dr. med. Maria Schubert (Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie der Universität Würzburg) und Univ.-Prof. Dr. med. Philipp Ströbel (Institut für Pathologie der Universitätsmedizin Göttingen) erfolgt. Für sämtliche Proben lag eine schriftliche Einverständniserklärung der Patienten vor, welche die Gewinnung und Untersuchung von PCa-Proben zu Forschungszwecken erlaubte. Die Isolation von RNA aus dem vorher Kryo-konservierten Material erfolgte durch Frau Barbara Dexler mit Hilfe des RNAlater®-Systems (QIAGEN, Hilden/Deutschland), das nach Hersteller-Empfehlungen eingesetzt wurde. Die Vermessung und weitere Untersuchung der RNA erfolgte entsprechend der bereits beschriebenen Vorgehensweise mit Zellkultur-Material.

## **3.2 Untersuchungsmethoden**

### **3.2.1 Mikroskopische Aufnahmen**

Die Zellen wurden mit Hilfe des inversen Mikroskops IX51 von Olympus (Hamburg/Deutschland) fotografiert. Das Gerät wurde von der Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand-, Plastische und Wiederherstellungschirurgie (Direktor: Univ.-Prof. Dr.

R. Meffert) zur Verfügung gestellt. Untersuchungen und die Dokumentation der Bilder erfolgten in 10- und 20-facher Vergrößerung.

### **3.2.2 Proliferationstests**

Grundlage des verwendeten Tests (MTS-Test) ist die Fähigkeit lebender Zellen, Tetrazolin-Salze zu reduzieren. Hieraus entstehen Formazan-Verbindungen, die einen photometrisch messbaren Farbumschlag der Lösung verursachen [70]. Da proliferierende Zellen ein deutlich höheres Reduktionspotential besitzen als nicht-proliferierende, trifft der Test auch eine Aussage über das Ausmaß der Zellproliferation. Der CellTiter 96<sup>®</sup>-Assay von Promega (Madison/USA) führt in Gegenwart von Phenazinmethosulfat (PMS) zur Bildung einer wasserunlöslichen Formazan-Verbindung mit einer maximalen Absorption zwischen 490 und 500 nm Wellenlänge [71]. Zur Messung wurden zunächst die Zellen auf 96-Well-Platten ausgesät und nach dem oben beschriebenen Verfahren transfiziert und gegebenenfalls weiter behandelt (Interferon  $\gamma$  an Tag 1 p. T.). Zu den Beobachtungszeitpunkten (2 Tage, 3 und 6 Tage p. T.) wurde das Medium aus den Wells abgesaugt und diese erneut mit 100  $\mu$ l des nach Hersteller-Empfehlungen angesetzten Reaktionsmediums befüllt. Nach Verstreichen der dreistündigen Reaktionszeit maß der Monochromator Labsystems MultiSKAN MS (Artisan<sup>®</sup>, Champaign/USA) die Absorption bei einer Wellenlänge von 492 nm. Die Messergebnisse von drei identisch behandelten Wells wurden als Mittelwert für die weiteren Berechnungen verwandt.

### **3.2.3 Bioinformatische Analyseverfahren**

Zur weitergehenden Untersuchung der miR-221-beeinflussten Signalwege wurde auf Computer-gestützte Analysen zurückgegriffen. Hierfür wurde zunächst eine Microarray-Untersuchung durchgeführt.



### 3.2.3.1 Microarray-Experiment

Das Verfahren erlaubt eine Erfassung der gesamten mRNA-Expression der untersuchten Zellen. Möglich wird dies durch Genchips, welche für jedes zu untersuchende Gen die korrespondierende Nukleotid-Sonde auf ihrer Oberfläche tragen (vgl. Abbildung 1 A). Nun inkubiert man diesen Nukleotid-Rasen mit RNA-Molekülen, an denen sich Biotin-Reste befinden (in Teilabbildung B schematisch als gelbe Kugeln dargestellt). Im Falle der Komplementarität bindet die RNA an die passende Sonde, das Biotin-vermittelte Signal wird auf diese Weise an einer spezifischen Stelle des Chips fixiert (vgl. Teilabbildung C). Das Auslesen der Signale erlaubt – bei vorbekannter Position jeder Nukleotidsonde auf dem Chip – den Rückschluss auf die Ausgangs-RNA in der Probe.

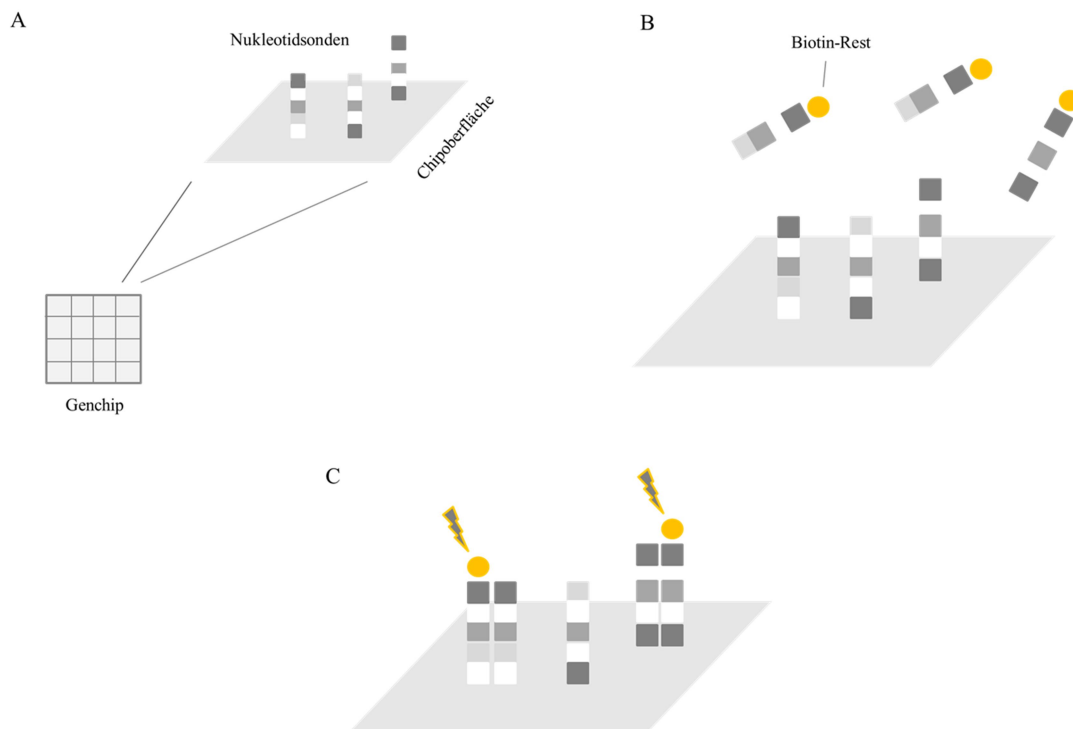


Abbildung 1: Prinzip des Microarray-Chips - auf der Oberfläche fixierte Gensonden mit spezifischen Nukleotid-Sequenzen (A) dienen als Anlagerungsstellen (B) für Biotin-markierte RNA-Moleküle. Das Computer-gestützte Auslesen der Biotinsignale und der Abgleich mit der bekannten Position der spezifischen Gensonden auf dem Chip (C) erlaubt den Rückschluss auf die Genexpression der Proben.

Die Durchführung der beiden voneinander unabhängigen Microarray-Experimente und die statistische Auswertung der Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit der Microarray Core Unit des Interdisziplinären Zentrums für Klinische Forschung (IZKF) der Universität Würzburg. Eingesetzt wurde der GeneChip<sup>®</sup> von Affymetrix (Santa Clara/USA), der nach Herstellerprotokoll für den 3'IVT Express Kit eingesetzt wurde.

### **3.2.3.2 Untersuchung der miR-221-beeinflussten Genexpression**

Die im Rahmen der Microarray-Analyse gewonnenen Expressionsdaten wurden mit Hilfe von drei Programmen auf besonders regulierte Zellsignale hin untersucht:

- Interferome-Database ([www.interferome.org](http://www.interferome.org))
- DAVID Functional Annotation ([david.abcc.ncifcrf.gov](http://david.abcc.ncifcrf.gov))
- Ingenuity Systems ([www.ingenuity.com](http://www.ingenuity.com)).

Die Interferome-Datenbank beruht auf einer Metaanalyse von 28 unabhängigen Microarray-/Proteom-Analysen, welche jeweils die Genantwort auf eine Interferon-Behandlung abbilden [72]. Hierbei wurden sowohl Experimente mit Typ I-Interferon (mit den Hauptvertretern Interferon  $\alpha$  und  $\beta$ ) als auch Typ II- (entspricht Interferon  $\gamma$ ) und Typ III-Interferon (entspricht Interferon  $\lambda$ ) eingeschlossen. Insgesamt konnten somit 1996 menschliche Gene identifiziert werden, die auf Interferon-Behandlung mit einer mindestens 1,5-fachen Über- bzw. Unterexpression reagieren. Die Eingabemaske ermöglicht die Analyse von bis zu 100 Genen im Ensembl ID-Format. Die DAVID Functional Annotation-Analyse hingegen erlaubt das direkte Einlesen von Affymetrix-Genlisten aus Microarray-Experimenten. Der DAVID-Algorithmus verzichtet dabei auf die Information, ob ein spezifisches Gen vermehrt oder vermindert exprimiert wird. Aus dem Abgleich der verändert exprimierten Gene mit der bekannten Grundgesamtheit – dem GeneChip<sup>®</sup> von Affymetrix (Santa Clara/USA) – schließt das Programm mit Hilfe des exakten Tests nach Fisher auf signifikant beeinflusste Zellfunktionen [73, 74]. Als weitere Untersuchungs-Methode wurde eine Ingenuity Systems Pathway-Analyse

angeschlossen. Diese Anwendung erlaubt nicht nur die Identifikation modulierter Signalwege mit Hilfe der eingespeisten Expressionsdaten, vor allem bietet das Programm die Möglichkeit zur Illustration der betroffenen zellulären Signale.

### 3.2.3.3 Vorhersage von miR-221-Zielgenen

Zur Suche nach komplementären Sequenzen von miR-221 und ausgewählten mRNA-Kandidaten wurden folgende bioinformatische Such-Algorithmen benutzt:

- microRNA.org [75] ([www.microrna.org](http://www.microrna.org)),
- miRDB [76, 77] ([www.mirdb.org](http://www.mirdb.org)),
- PicTar [78] ([www.pictar.org](http://www.pictar.org)),
- TargetScan [79, 80] ([www.targetscan.org](http://www.targetscan.org)).

Alle aufgeführten Datenbanken sind im Internet frei zugänglich und erlauben sowohl die MicroRNA-spezifische als auch die Zielgen-spezifische Abfrage der prognostizierten Bindungsstellen.

### 3.2.4 mRNA- und miRNA-Bestimmung mittels Real time-PCR

Das Verfahren der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) führt zur exponentiellen Vervielfältigung bereits geringer Mengen cDNA [81-83]. Ermöglicht wird dies durch gezielte Temperaturänderungen in einer Nukleotid-angereicherten Lösung. Notwendig für den technologischen Durchbruch dieser Technologie war zudem eine ausgesprochen Hitze-stabile Polymerase (Taq-Polymerase – benannt nach dem Bakterium *Thermus aquaticus*). Drei Schritte sind zur Vervielfältigung notwendig: Zunächst führt ein Anstieg der Temperatur auf etwa 95°C zur Trennung der komplementären DNA-Stränge (Phase der *Denaturierung*). Die Absenkung der Temperatur auf Werte um 60°C führt zur Anlagerung spezifischer Primer an die DNA-Einzelstränge (Phase der *Hybridisierung*). Die Primer dienen als Startpunkt für die bei circa 72°C ablaufende Polymerisierung der gewünschten DNA-Sequenz mit Hilfe der Taq-Polymerase

(*Polymerisierungs-Phase*). Unter geeigneten Bedingungen führt ein aus den drei Phasen bestehender Zyklus somit zur Verdopplung der gewünschten cDNA-Sequenz. Die Kombination der PCR-Methode mit den Verfahren der Reversen Transkription (Umschreibung der mRNA auf cDNA) und der Real time-PCR erlaubt einen Rückschluss auf die Ausgangs-Menge der zellulären mRNA. Nach ähnlichem Prinzip kann auch die Ausgangsmenge einer gesuchten miRNA ermittelt werden.

#### **3.2.4.1 Reverse Transkription**

Um den Gehalt an mRNA bzw. miRNA zu bestimmen, muss diese zunächst von der RNA-Ausgangsebene auf komplementäre DNA umgeschrieben werden. Dies erfolgte mit Hilfe zweier experimenteller Ansätze: Zur Umwandlung der zellulären mRNA wurde das ImProm-II<sup>TM</sup> Reverse Transcription System von Promega (Madison/USA) benutzt. Dies ermöglicht die Umschreibung der gesamten mRNA – eine Festlegung auf die interessierenden Genkandidaten muss erst im Rahmen der sich anschließenden Real time-PCR erfolgen. Für die miRNA-Bestimmung wurde das TaqMan<sup>®</sup> MicroRNA Reverse Transcription Kit von Applied Biosystems (Carlsbad/USA) gebraucht, das bereits auf der Basis miRNA-spezifischer Primer die jeweilige cDNA herstellt. Beide Ansätze wurden nach Herstellerangaben verwendet, zur Amplifikation diente der Primus 96 Plus-Cycler von MWG-Biotech (Ebersberg/Deutschland).

#### **3.2.4.2 Real time-PCR**

Zur semiquantitativen Erfassung der Ausgangsmengen an mRNA und miRNA wurden Real time-PCR-Untersuchungen durchgeführt. Diese benutzen die zuvor hergestellten cDNA-Sequenzen und vervielfältigen sie nach dem oben beschriebenen Prinzip Primer-spezifisch. Gleichzeitig wird auf Basis einer photometrischen Messung bestimmt, welche Mengen der interessierenden cDNA-Sequenzen in der untersuchten Lösung vorhanden sind. Hierzu werden etwa 30 bis 40 PCR-Zyklen durchlaufen – je früher die fragliche cDNA photometrisch gemessen werden kann, desto größer ist die Ausgangsmenge. Eine Verschiebung um einen PCR-Zyklus steht somit näherungsweise für eine Halbierung bzw. Verdoppelung der cDNA-Menge. Der Primer-spezifische Ct-

Wert ergibt sich – nach vorheriger Festlegung eines Absorptionsniveaus – aus der Zykluszahl, ab welcher die Primer-Produkte die geforderte Mess-Schwelle erreichen. Da es sich hierbei um eine kontinuierliche Messung handelt, muss der Ct-Wert nicht ganzzahlig sein. Um unterschiedliche Proben miteinander vergleichen zu können, werden die Primer-spezifischen Ct-Werte gewichtet bzw. normalisiert. Dies erfolgt durch die Subtraktion der Ct-Werte sogenannter Housekeeper-Gene, welche ubiquitär exprimiert werden und somit einen Rückschluss auf die eingesetzte Probenmenge erlauben.

Zur Bestimmung des mRNA-Gehaltes der untersuchten Proben wurden folgende, auf der SYBR Green-Technologie [84] beruhende, QuantiTect Primer verwendet (QIAGEN, Hilden/Deutschland) benutzt. Der Zytoskelett-Bestandteil Beta-Actin diente dabei als Housekeeper-Gen zur Normalisierung der Ergebnisse. Die spezifischen Nukleotid-Sequenzen werden vom Hersteller nicht veröffentlicht.

- IRF1 (QT00063917),
- IRF9 (QT00001113),
- STAT1 (QT00074123),
- IRF2 (QT00056455),
- SOCS3 (QT00244580),
- Beta-Actin (QT00095431).

Zur Bestimmung der miRNA-Expression wurde der miR-221-spezifische Primer von TaqMan<sup>®</sup> (Applied Biosystems, Carlsbad/USA) eingesetzt, zur Normalisierung der Ergebnisse diente die Expression des kleinen RNA-Moleküls RNU6B (ebenfalls TaqMan<sup>®</sup>-System).

Die abschließende Quantifizierung der Real time-PCR-Ergebnisse (vgl. Abschnitt 4.6.1) gelang mit Hilfe der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode. Hierbei werden die Ct-Werte zweier Experimente, die sich lediglich in einer Intervention unterscheiden, verglichen und voneinander subtrahiert. Da jeder PCR-Zyklus näherungsweise mit einer Verdopplung der Nukleotid-Stränge einhergeht, entspricht die Änderung um  $\Delta\Delta\text{Ct} = \pm 1$  einer

zweifachen Überexpression bzw. einer Halbierung der Ausgangsmenge – gemäß der Formel  $x = 2^{\Delta\Delta Ct}$ .

### 3.2.5 Western Blot

Zum Nachweis regulierter Proteine erfolgten Western Blot-Experimente [85, 86]. Hierzu wurden Proteine nach ihrer Isolation und Vermessung zunächst mit Hilfe einer SDS-PAGE aufgetrennt. Der Begriff beschreibt die elektrophoretische Aufspaltung eines Proteingemisches in einem Polyacrylamid-Gel abhängig von seiner molekularen Masse. Hierzu werden zunächst die Tertiär- und Sekundärstrukturen durch Erhitzen auf 98°C gelöst. Natrium-Dodecylsulfat (SDS), ein stark negativ geladenes Detergens, maskiert die Eigenladungen der Moleküle und ermöglicht eine Massen-abhängige Aufspaltung im Gel. Im namensgebenden Blotting-Verfahren werden die Proteine anschließend vom Gel auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Schließlich ermöglicht die Anlagerung von Primär-Antikörpern und deren Verknüpfung mit spezifischen Sekundär-Antikörpern eine Detektion des gesuchten Proteins auf der Membran. Für die vorliegende Arbeit wurden Mini-PROTEAN® TGX™-Gele von BIO-RAD (Hercules/USA) mit einer Dichte von 12% verwendet. 100 ml des benutzten Ladepuffers (in sechsfacher Konzentration) enthielten

- Trizma®, pH 7 (Sigma-Aldrich, St. Louis/USA): 7,74 g,
- SDS (Calbiochem, La Jolla/USA) 6 g,
- Glycerin 87% (Merck, Darmstadt/Deutschland) 30 ml,
- Beta-Mercapto-Ethanol (Gibco, Paisley/UK) 15 ml,
- Bromphenolblau (Merck, Darmstadt/Deutschland) 1 Spatelspitze,
- destilliertes Wasser ad 100 ml.

Nach dem Beladen der Geltaschen erfolgte die Elektrophorese bei 300 Volt. Je nach Größe des Proteins und der sich daraus ergebenden Lokalisation im Gel dauerte die Auftrennung 20 bis 40 Minuten. Der verwendete Laufpuffer setzte sich zusammen aus

- Trizma<sup>®</sup>, pH 7 (Sigma-Aldrich, St. Louis/USA): 30,3 g,
- Glycin (AppliChem, Darmstadt/Deutschland) 188g,
- SDS (Calbiochem, La Jolla/USA) 10g,
- destilliertem Wasser ad 1000 ml.

Zur Übertragung der Proteine vom Gel auf die Membran (15 Minuten bei 250 Volt) wurde eine Blot-Kammer der Firma BIO-RAD (Hercules/USA) benutzt. Der selbst angesetzte Blotting-Puffer enthielt

- Trizma<sup>®</sup>, pH 7 (Sigma-Aldrich, St. Louis/USA): 30,3 g,
- Glycin (AppliChem, Darmstadt/Deutschland) 188g,
- Methanol (Sigma-Aldrich, St. Louis/USA) 100 ml,
- destilliertes Wasser ad 1000 ml.

Nach mehreren Wasch-Schritten wurden die Membranen zunächst mit 5%iger Magermilchlösung geblockt und nach abermaligem Waschen mit den folgenden Primärantikörpern inkubiert:

Tabelle 1: Typ, Herkunft und Hersteller der in den Western Blot-Experimenten verwendeten Primärantikörper sowie die angewandten Konzentrationen.

Protein	Typ / Herkunft	Hersteller	Verdünnung
STAT1	Monoklonal Maus	Invitrogen, Carlsbad/USA (AHO0832)	1:1000
Phospho-STAT1 (pY <sup>701</sup> )	Polyklonal Kaninchen	Invitrogen, Carlsbad/USA (44-376G)	1:1000
IRF2	Polyklonal Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz/USA (sc-498)	1:200
SOCS3	Monoklonal Maus	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz/USA (sc-51699)	1:200
ERK2	Polyklonal Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz/USA (sc-154)	1:4000

Entsprechend der Herkunft der Primär-Antikörper wurden die Membranen mit einem Meerrettichperoxidase (HRP)-gekoppelten Zweit-Antikörper inkubiert. Dabei 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 1:2000 und 1:10000 angesetzt. Als Mittel zur Detektion des HRP-Signals auf Röntgenfilmen diente das ECL<sup>TM</sup> Prime Western Blotting-Reagens (GE Healthcare, Buckinghamshire/UK), das nach Herstellerangaben angewandt wurde.



### 3.2.6 Software und Statistik

Zur Analyse der Microarray-Experimente und der mit Hilfe der Tumorbank gewonnenen Expressions-Daten wurde auf die Programmiersprache R ([www.bioconductor.org](http://www.bioconductor.org)) zurückgegriffen. Die weiteren Berechnungen und die Erstellung der Abbildungen erfolgten mit Hilfe des Office 2010-Paketes (Word, Powerpoint, Excel) von Microsoft (Redmond/USA). Zur Ermittlung statistischer Signifikanzen wurde der zweiseitige, ungepaarte Student's t-Test benutzt. Als Signifikanzniveau wurde  $p < 0,05$  festgelegt, signifikante Ergebnisse wurden in den dargestellten Abbildungen mit einem Stern (\*) gekennzeichnet. Hochsignifikante Ergebnisse ( $p < 0,01$ ) erhielten als Kennzeichnung zwei Sterne (\*\*). Zur Korrelationsanalyse der mRNA- und miRNA-Expression in Tumor- sowie korrespondierendem Normalgewebe wurden die Korrelationskoeffizienten nach Pearson ( $r$ ) und nach Spearman ( $r_s$ ) berechnet. Während der erstgenannte von einer Normalverteilung der Einzelwerte ausgeht, misst der Spearman-Koeffizient das Verhalten zweier Variablen innerhalb eines ordinalen (Rang-)Gefüges.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 miR-221-Gehalt der PCa-Zelllinien

Abbildung 2 verdeutlicht den unterschiedlichen Gehalt an miR-221 in den untersuchten PCa-Zellen. Den niedrigsten miR-221-Spiegel wiesen die Androgen-abhängigen LNCaP-Zellen auf. Der Mittelwert ( $\mu$ ) aus drei voneinander unabhängigen Experimenten betrug 3,21  $\Delta$ Ct, die zugehörige Standardabweichung ( $\sigma$ ) 0,88  $\Delta$ Ct. Einen höheren miR-221-Gehalt zeigten die Androgen-unabhängigen DU145-Zellen und PC3-Zellen mit  $\mu = 6,24$  bzw. 7,0  $\Delta$ Ct und  $\sigma = 0,46$  bzw. 0,64  $\Delta$ Ct. Somit wiesen LNCaP-Zellen sowohl im Vergleich zu DU145-Zellen ( $p = 0,013$ ) als auch im Vergleich zu PC3-Zellen ( $p = 0,005$ ) einen signifikant geringeren miR-221-Gehalt auf. Der Unterschied zwischen der miR-221-Expression von DU145- und PC3-Zellen fiel dagegen nicht signifikant aus ( $p = 0,178$ ).

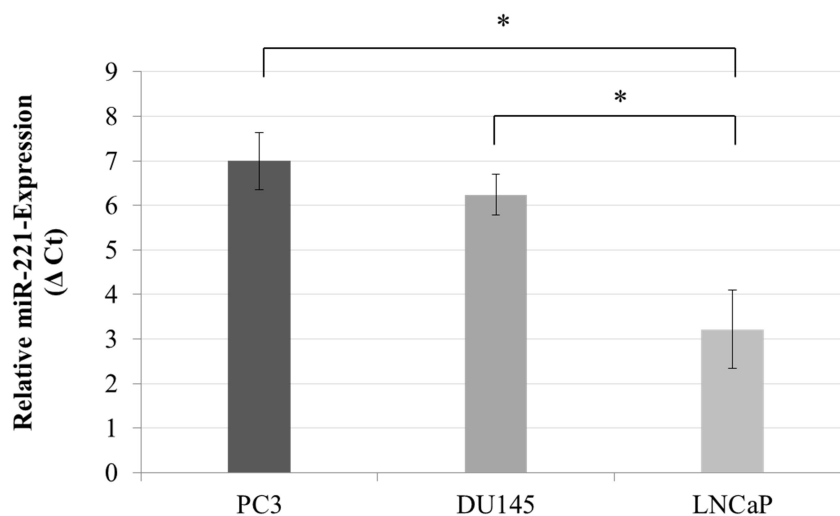


Abbildung 2: Androgen-abhängige LNCaP-Zellen enthalten signifikant weniger miR-221 als Androgen-unabhängige DU145- und PC3-Zellen. Dargestellt ist die relative miR-221-Expression (in  $\Delta$ Ct) der drei untersuchten PCa-Zelllinien. Im ungepaarten Student's t-Test signifikante Expressionsunterschiede ( $p < 0,05$ ) sind mit einem Stern (\*) versehen.

## 4.2 Mikroskopische Aufnahmen

Die folgenden Bilder (vgl. Abbildung 3) zeigen repräsentative Ausschnitte eines Zellkultur-Wells 2 Tage und 4 Tage p. T. Es fällt auf, dass pre-miR-221-transfizierte Proben sowohl zum Zeitpunkt 2 Tage p. T. (Teilabbildung A) als auch zum Zeitpunkt 4 Tage p. T. (Teilabbildung B) über deutlich weniger adhärenente Zellen verfügen als anti-miR-221-, pre-miR-Kontroll-transfizierte Proben sowie unbehandelte Zellen.

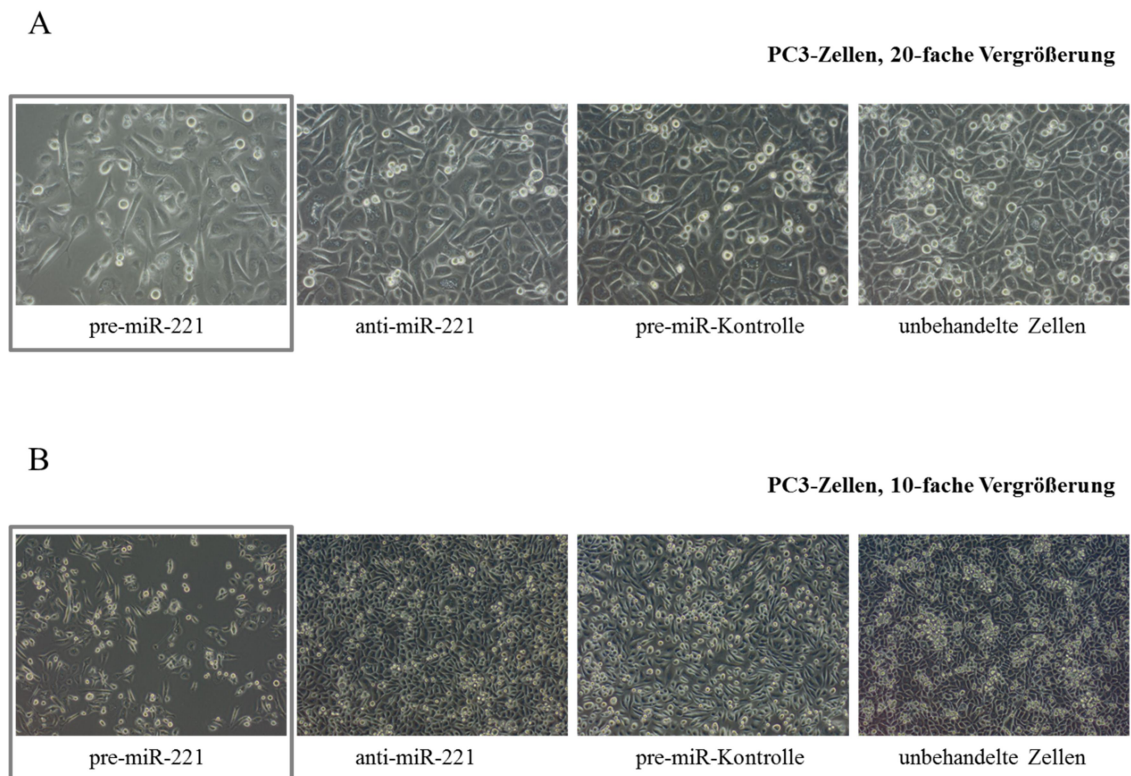


Abbildung 3: Die Transfektion mit pre-miR-221 führt in PC3-Zellen zur Zellverarmung. Mikroskopische Aufnahmen von unbehandelten PC3-Zellen sowie pre-miR-221-, anti-miR-221- und pre-miR-Kontroll-transfizierten Zellen. Die Aufnahmen erfolgten zum Zeitpunkt 2 Tage p. T. (Teilabbildung A) und 4 Tage p. T. (Teilabbildung B).

## 4.3 Proliferation von PCa-Zellen nach pre-miR-221-Transfektion

Um den Einfluss der pre-miR-221-Transfektion auf die Proliferation von PCa-Zellen zu messen, wurden im Folgenden MTS-Tests durchgeführt. Die in Abbildung 4 dargestellten Ergebnisse stehen als Einzelexperiment stellvertretend für mehrere

durchgeführte MTS-Tests mit vergleichbaren Ergebnissen. Die gemessenen Mittelwerte und Standardabweichungen ergaben sich hierbei aus der Auswertung von Tripelwerten für jeden Zeitpunkt.

In PC3- Zellen sorgte die Überexpression von miR-221 für eine Reduktion des Anteils vitaler Zellen auf 71% (Tag 3 p. T.) bzw. 26% (Tag 6 p. T.) des Referenzwertes. Somit erwies sich der Abfall der Proliferation sowohl an Tag 3 p. T. ( $p = 0,022$ ) als auch an Tag 6 p. T. ( $p = 0,029$ ) als signifikant. Die betrachteten DU145-Zellen reagierten in geringerem Ausmaß auf die pre-miR-221-Transfektion. Der Abfall des Anteils vitaler Zellen am Beobachtungstag 6 p. T. fiel mit 82% des Referenzwertes dennoch signifikant aus ( $p = 0,038$ ).

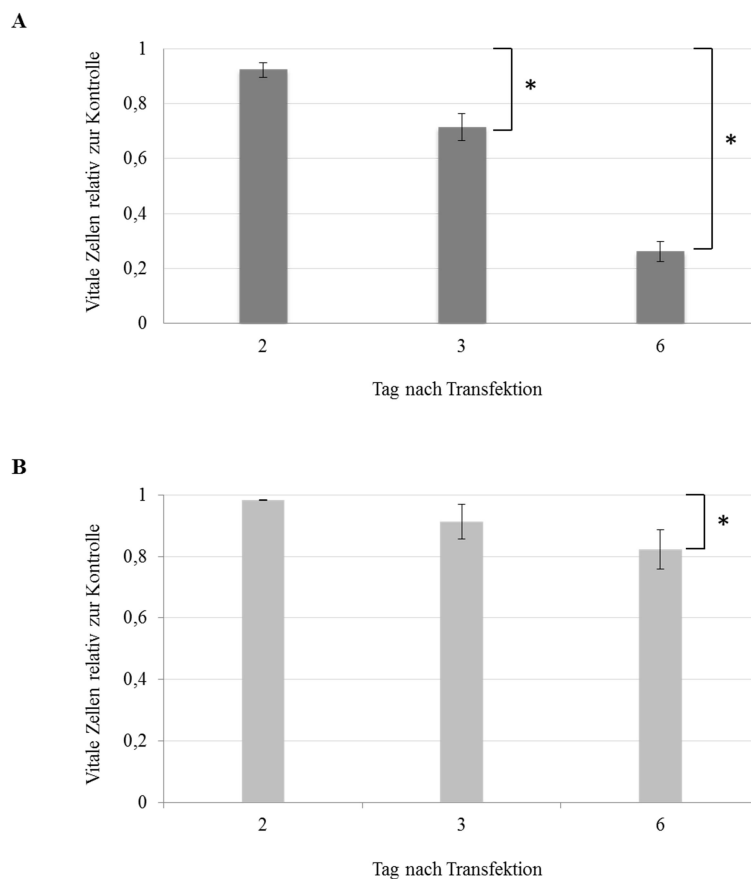


Abbildung 4: Die Überexpression von miR-221 senkt den relativen Anteil vitaler Zellen in PC3- (A) und DU145-Zellen (B). Ergebnisse der MTS-Tests als Anteil vitaler Zellen in pre-mir-221-transfizierten Proben im Vergleich zu Kontroll-Transfektionen. Bestimmung der zellulären Proliferation zu den Zeitpunkten 2 Tage, 3 Tage und 6 Tage p. T. Im ungepaarten Student's t-Test signifikante Ergebnisse ( $p < 0,05$ ) sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet.

#### 4.4 Microarray-Untersuchung miR-221-regulierter Zellfunktionen

Um den Einfluss von miR-221 auf die Genexpression von PCa-Zellen eingehender zu untersuchen, wurden Microarray-Experimente mit Hilfe von Affymetrix-Genchips (Affymetrix, Santa Clara, USA) durchgeführt. Hierfür erfolgte in zwei voneinander unabhängigen Durchgängen die Transfektion von PC3-Zellen sowohl mit pre-miR-221- als auch mit pre-miR-Kontroll-Reagens. Die RNA wurde 2 Tage p. T. gewonnen und für zwei – separat voneinander durchgeführte – Microarray-Untersuchungen verwandt. Wie Abbildung 5 illustriert, waren sowohl pre-miR-221- als auch anti-miR-221-Transfektionen in der Lage, den zellulären miR-221-Gehalt in die erwartete Richtung zu verschieben. Ausgehend von den Kontroll-Transfektionen konnte der zelluläre miR-221-Spiegel durch die pre-miR-221-Transfektionen um 7,96 respektive 7,5  $\Delta$ Ct erhöht werden. Die Behandlung mit anti-miR-221 minderte den miR-221-Gehalt der beiden Proben um 4,24 bzw. 6,78  $\Delta$ Ct. Die sich anschließenden Experimente zur Ermittlung der mRNA- und Proteinexpression in PC3-Zellen zeigten eine vergleichbar robuste Transfektions-Effizienz ( $\Delta$ Ct-Verschiebungen).

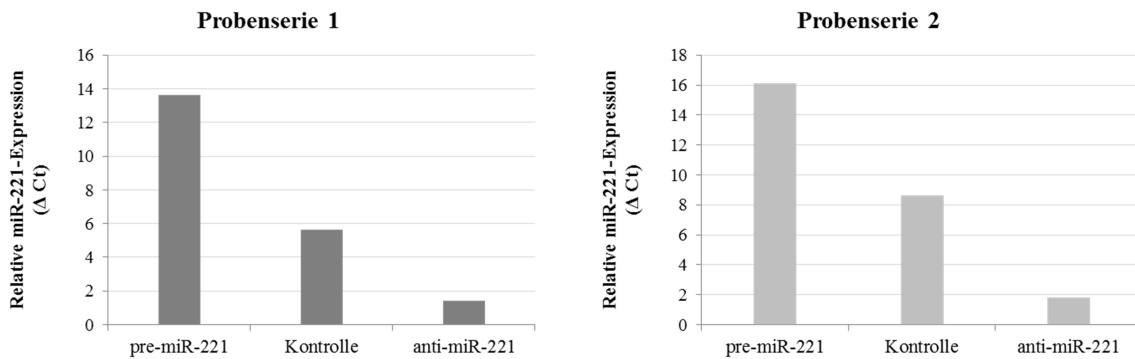


Abbildung 5: Verschiebung des zellulären miR-221-Gehaltes durch pre-miR-221 und anti-miR-221-Transfektionen. Relative miR-221-Expression von pre-miR-221-, pre-miR-Kontroll- und anti-miR-221-transfizierten PC3-Zellen in  $\Delta$ Ct-Werten zur Überprüfung der Transfektions-effizienz.

#### 4.4.1 Statistische Auswertung der Genexpression

Nach dem Auslesen der beiden Genchips wurden die Rohdaten in ein MA-Plot-Format übertragen, um die Stabilität der Signalintensitäten im Verlauf der Transfektionen zu beurteilen. Wie Abbildung 6 deutlich macht, liegt ein Großteil der Einzelausprägungen um den Ordinatenwert  $M = 0$ . Dies legt nahe, dass die gewonnenen Ergebnisse frei sind vom Einfluss einer systematisch auftretenden Störgröße – etwa einer Verunreinigung auf dem Genchip. Blau umrandet und rot beschriftet sind exemplarisch Gene, deren gemessene Farbintensitäten in den pre-mir-221-Proben zweifach bzw. vierfach stärker als in Kontroll-transfizierten Proben ausfielen.

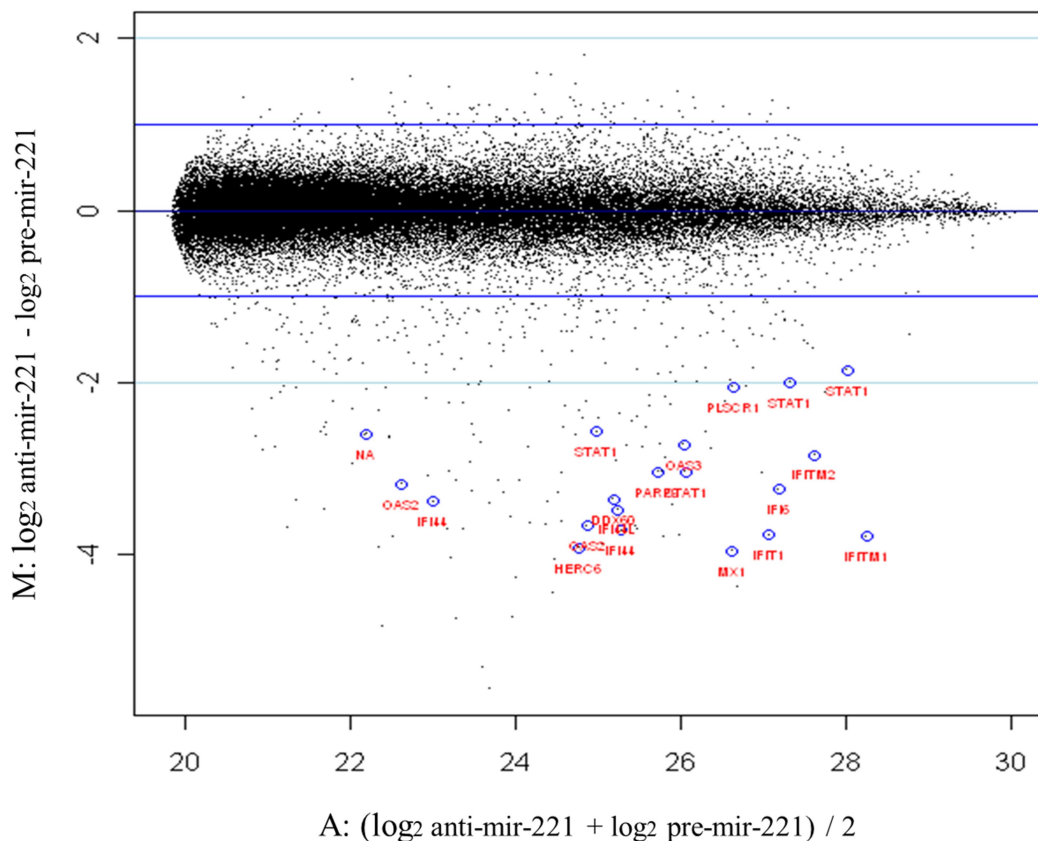


Abbildung 6: MA-Plot-Darstellung der im Microarray-Experiment erfassten Signalintensitäten. Jeder Punkt repräsentiert für ein Gen die Änderung im Verhältnis der Signalintensitäten in Abhängigkeit der Signalstärke. Die dunkelblauen und hellblauen Linien markieren die zweifache bzw. vierfache Änderung der Intensitätsverhältnisse. Blau umrandet sind ausgewählte Genpunkte, welche in pre-mir-221-transfizierten Proben eine signifikant stärkere Intensität aufwiesen.

Vergleicht man pre-miR-221- und pre-miR-Kontroll-transfizierte Proben miteinander, so zeigten insgesamt 424 Gene in den beiden Microarray-Experimenten eine mindestens um das Zweifache vom Ausgangszustand abweichende Expression – hiervon wurden 336 Genkandidaten verstärkt und 88 vermindert exprimiert. Tabelle 2 zeigt die am stärksten über- (linke Spalte) sowie vermindert exprimierten Gene (rechte Spalte).

Tabelle 2: Am stärksten von der Ausgangsexpression abweichende Gene im Microarray-basierten Vergleich der pre-miR-221- und pre-miR-Kontroll-Transfektionen.

Gen	n-fach	p-Wert	Gen	n-fach	p-Wert
RSAD2	47,271	0,0016	CXorf45	0,25	0,0202
TRIM22	28,669	0,0064	ACO1	0,285	0,0282
BST2	26,819	0,0016	235079_at	0,333	0,0057
XAF1	26,510	0,0065	235203_at	0,337	0,0477
MX2	21,978	0,0004	FAM101B	0,339	0,1118
TNFSF10	20,789	0,0121	TMEPAI	0,348	0,0227
OASL	19,283	0,0039	223366_at	0,361	0,0048
MX1	15,536	0,0001	225725_at	0,369	0,0065
HERC6	15,173	0,0001	ISCA1	0,385	0,0022
EPSTI1	15,053	0,0073	LOC100132853	0,389	0,0511
IFIH1	14,857	0,0005	KDSR	0,395	0,0046
IFI27	13,944	0,0006	MSRB3	0,401	0,0269
IFITM1	13,846	8,99E-05	HNMT	0,403	0,0195
CMPK2	13,756	0,0005	TXNDC12	0,404	0,0107
IFIT1	13,667	0,0001	PDE1C	0,412	0,0722
//	//	//			
<b>STAT1</b>	9,727	0,0004			
<b>IRF9</b>	3,985	0,0006			
<b>IRF1</b>	2,394	0,0523			

Eine farbliche Darstellung einzelner Gene in Abhängigkeit ihrer Signalintensität zeigt der Heat Plot (vgl. Abbildung 7). Rote Balken signalisieren eine hohe, grüne Balken eine geringe Signalintensität auf dem Genchip. In zeilenweiser Skalierung sind die

Intensitäten ausgewählter Gene abgebildet, welche in pre-miR-221-transfizierten Proben verstärkt exprimiert werden. Mit dieser Darstellungsmethode lässt sich für jedes betrachtete Gen die Stabilität der Signalexpression im Verlauf der beiden Microarray-Experimente beurteilen.

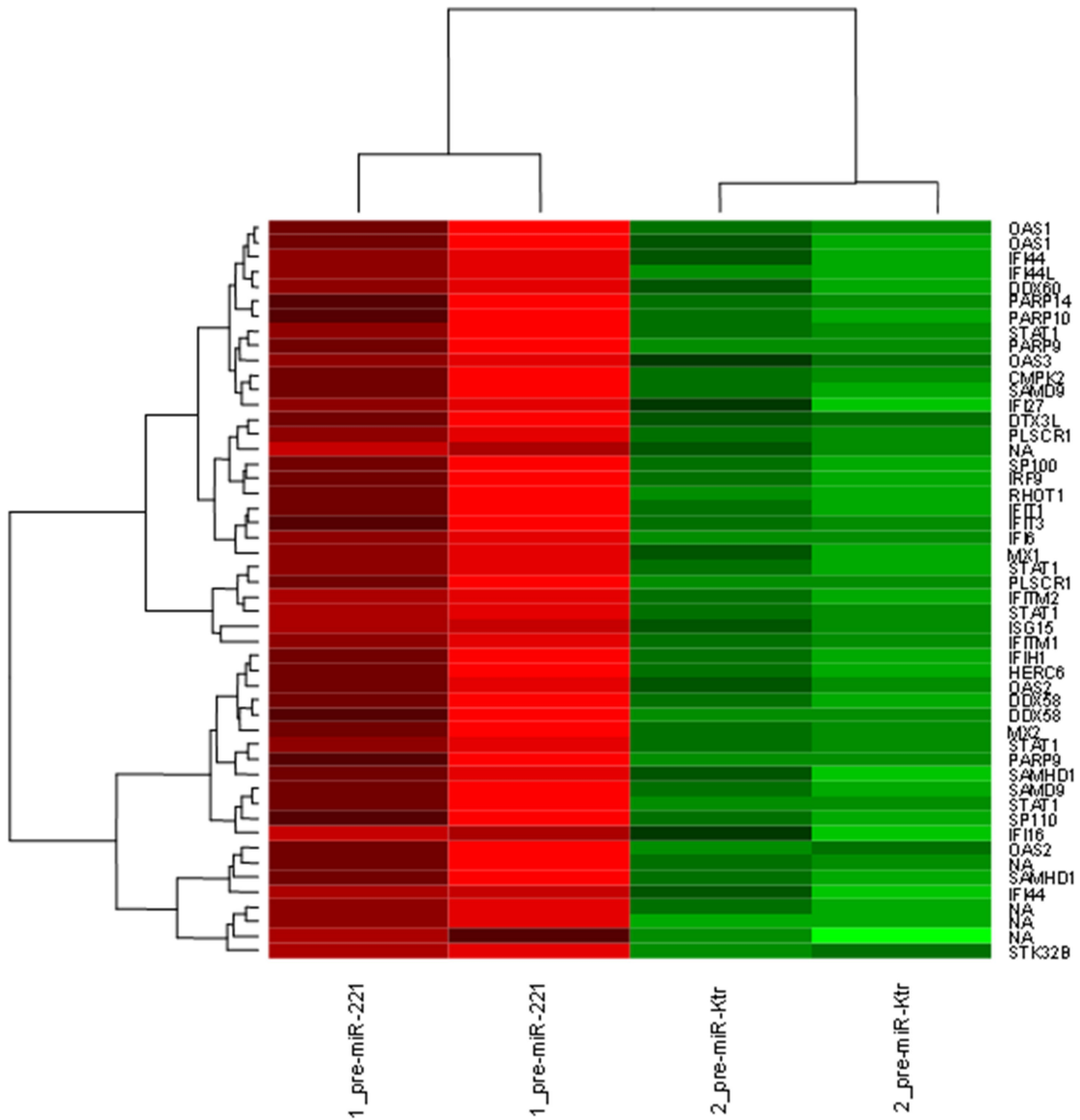


Abbildung 7: Heat Plot für ausgewählte, in pre-miR-221-transfizierten Proben überexprimierte Gene. Die qualitative Darstellung mit zeilenweiser Skalierung erlaubt für jedes Gen die Betrachtung der Signalexpression im Verlauf der beiden Microarray-Experimente. Rote Farbe bedeutet eine hohe, grüne Farbe eine geringe Signalintensität.



Im Vergleich zur qualitativen Darstellung des Heat Plot ermöglicht Abbildung 8 eine quantitative Beurteilung der Genexpression in Form der logarithmisch berechneten Signal-Stärken für ausgewählte Gene. Rote Punkte signalisieren die Expression der pre-miR-221-transfizierten Proben, grüne diejenige der Kontrollproben.

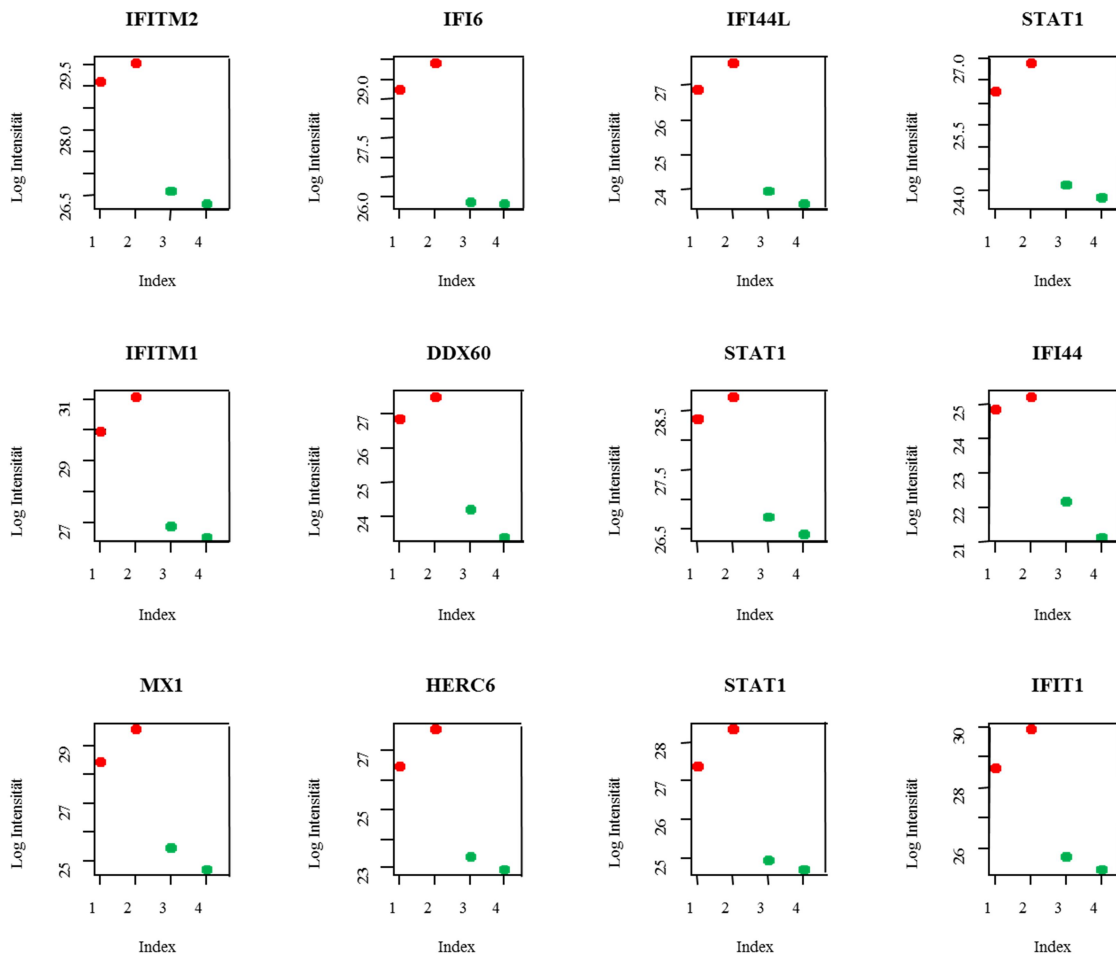


Abbildung 8: Überexpression ausgewählter Gene in pre-miR-221-transfizierten Proben. Logarithmische Darstellung der in den Microarray-Untersuchungen gemessenen Signalintensitäten von pre-miR-221- (rot) und pre-miR-Kontroll-transfizierten Proben (grün).

#### 4.4.2 Bioinformatische Zuordnung regulierter Signalwege

Unter Zuhilfenahme bioinformatischer Analyseprogramme (Interferome Database, DAVID Functional Annotation und Ingenuity Systems Pathway Analysis) wurde die

Gesamtheit der im Microarray-Experiment abweichend exprimierten Gene auf besonders regulierte zelluläre Funktionen hin untersucht.

#### 4.4.2.1 Interferome-Datenbank

Ein Abgleich der im Microarray-Experiment vermehrt transkribierten Gene mit der Interferome-Datenbank ergab, dass die 30 am stärksten überexprimierten Kandidaten (vgl. Tabelle 2) sämtlich zur Familie der Interferon-induzierten Gene gehören. Wie Abbildung 9 veranschaulicht, wird ein Großteil der betrachteten Gene sowohl von Typ I- als auch von Typ II-Interferon induziert.

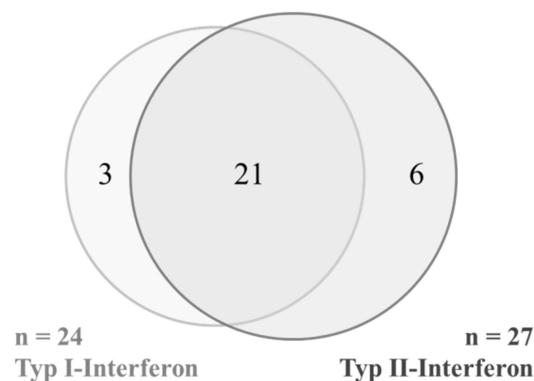


Abbildung 9: Im Microarray-Experiment am stärksten überexprimierte Gene sind Interferon-induziert. Venn-Diagramm zur Regulierung der untersuchten Gene in Abhängigkeit vom Interferon-Typ. Betrachtet wurden die 30 Gene, welche im Microarray-Experiment die stärkste positive Abweichung in den pre-miR-221-Transfektionen im Vergleich zu den Kontroll-Transfektionen zeigten.

#### 4.4.2.2 DAVID Functional Annotation-Analyse

Um auf modulierte zelluläre Funktionen zu schließen, wurden im Anschluss die 424 abweichend exprimierten Gene mit Hilfe von DAVID Functional Annotation analysiert. Tabelle 3 zeigt die hierbei identifizierten zellulären Funktionen mit der höchsten Signifikanz.

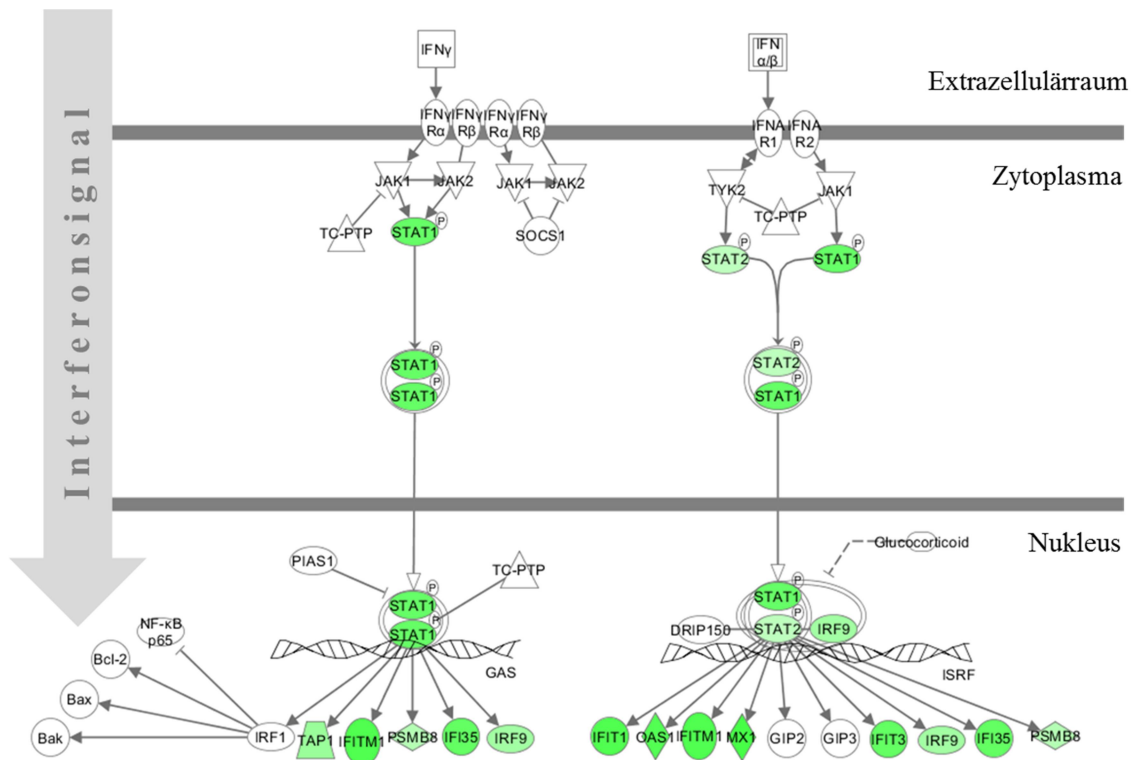
Tabelle 3: miR-221 beeinflusst die Expression von Genen aus dem Feld der Immunabwehr. Mit DAVID Functional Annotation ermittelte zelluläre Funktionen, welche nach miR-221-Überexpression hochsignifikant überrepräsentiert erschienen. n gibt die Zahl der abweichend exprimierten Gene an.

Funktion / Signalweg	n	p-Wert
Reaktion auf ein Virus	24	1,4 <sup>-20</sup>
Antivirale Abwehr	19	1,3 <sup>-19</sup>
Immunantwort	39	1,2 <sup>-12</sup>
Wirt-Virus-Interaktion	19	7,0 <sup>-8</sup>
Abwehrreaktion	29	9,7 <sup>-8</sup>

Inhaltliche Redundanzen der aufgelisteten Zellfunktionen entstehen dadurch, dass DAVID Functional Annotation zur Analyse auf mehrere Gendatenbanken und Thesauri – unter anderem GO term ([www.geneontology.org](http://www.geneontology.org)) – zur Identifikation der regulierten Signalwege zurück greift.

#### 4.4.2.3 Ingenuity Systems-Analyse

Die Identifikation beeinflusster Signalwege mit Hilfe von Ingenuity Systems (vgl. Abbildung 10) ergab, dass miR-221 sowohl den Interferon  $\gamma$ - als auch den Interferon  $\alpha/\beta$ -Signalweg moduliert, indem ein Großteil der am Signal beteiligten Gene durch die erhöhten miR-221-Spiegel signifikant überexprimiert werden (in der Abbildung grün dargestellt). Die Nicht-Erfassung von IRF1 in der Ingenuity-Systems-Analyse beruhte darauf, dass IRF1 in der Microarray-Untersuchung das geforderte Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  mit einem Wert von  $p = 0,0523$  (vgl. Tabelle 2) nicht erreichte.



© 2000-2011 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

Abbildung 10: miR-221 verstärkt die Expression Interferon-induzierter Gene. Mit Hilfe von Ingenuity Systems identifizierte Signalwege, welche durch die miR-221-Erhöhung beeinflusst werden. Im Microarray-Experiment signifikant verstärkt exprimierte Gene sind grün schraffiert. Abbildung modifiziert nach Ingenuity Systems.

#### 4.5 Validierung identifizierter Signalwege

Im weiteren Verlauf der Untersuchung richtete sich das Hauptaugenmerk darauf, die mit Hilfe der Microarray-Experimente gewonnen Erkenntnisse mit der Hilfe weiterer experimenteller Verfahren zu bestätigen. Vor allem sollte dabei überprüft werden, ob die durch die DAVID-Funktionsanalyse in Aussicht gestellten Signalwege tatsächlich in pre-miR-221-transfizierten PCa-Zellen aktiviert sind. Deshalb wurden zunächst Untersuchungen mit Hilfe des Verfahrens der Quantitativen Polymerase-Ketten-Reaktion (Real-time PCR) durchgeführt, um ein genaueres Maß für die mRNA-Expression in transfizierten Zellen zu erlangen.

#### 4.5.1 Real time-PCR

Als zu überprüfende Kandidaten wurden aufgrund ihrer beobachteten Überexpression in der Microarray-Untersuchung und der bioinformatisch identifizierten Zellfunktionen die drei Gene Interferon Regulatory Factor 1 (IRF1), Interferon Regulatory Factor 9 (IRF9) und Signal Transducer and Activator of Transcription 1 (STAT1) ausgewählt. Sämtliche Ergebnisse der Real-time PCR-Untersuchungen berechneten sich aus den Ausprägungen dreier unabhängiger Einzelexperimente. Die Untersuchung mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion bestätigte, dass die Transfektion mit pre-miR-221 gegenüber einer Kontroll-Transfektion die Expression von IRF1, IRF9 und STAT1 signifikant erhöhte und bestätigte auf diese Weise die Ergebnisse der Microarray-Experimente (vgl. Abbildung 11). Zum Beobachtungszeitpunkt 2 Tage p. T. erhöhte miR-221 die Expression von IRF1 und IRF9 um 2,53  $\Delta$ Ct bzw. 2,49  $\Delta$ Ct ( $p = 0,037$  bzw.  $p = 0,038$ ). Im Fall von STAT1 erhöhte die Re-Expression von miR-221 in den untersuchten PC3-Zellen die mRNA-Expression um 4,06  $\Delta$ Ct ( $p = 0,012$ ).

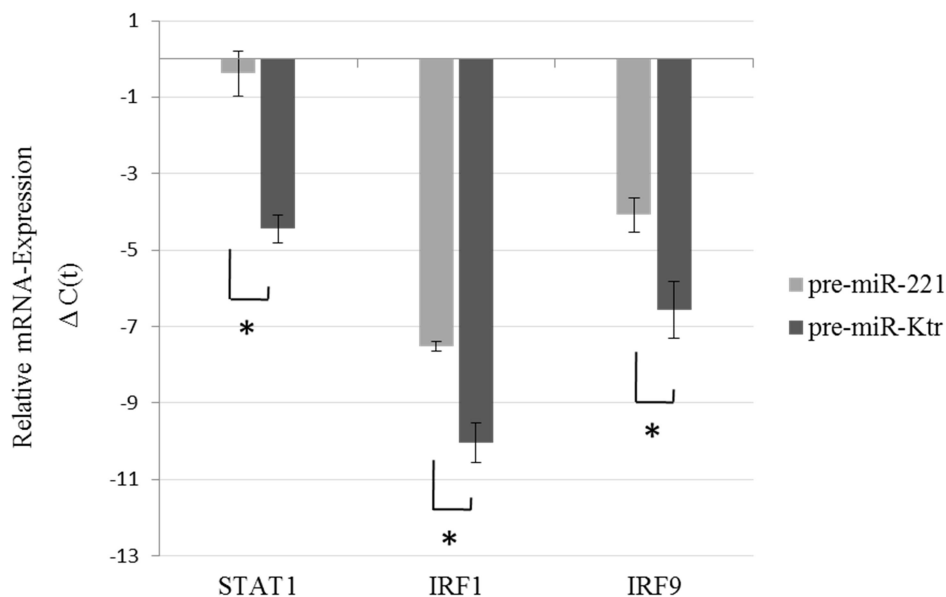


Abbildung 11: Die Transfektion mit pre-miR-221 verstärkt in PC3-Zellen die Expression von STAT1, IRF1 und IRF9. Relative mRNA-Expression von STAT1, IRF1 und IRF9 zum Zeitpunkt 2 Tage p. T. in Abhängigkeit von der pre-miR-221- bzw. der Kontroll-Transfektion. Im ungepaarten Student's t-Test signifikante Ergebnisse ( $p < 0,05$ ) sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet.

#### 4.5.2 Western Blot

Die Ergebnisse der Western Blot-Experimente sind in Abbildung 12 dargestellt. Es zeigte sich, dass die pre-miR-221-Transfektion zur Phosphorylierung des STAT1-Moleküls am Tyrosinrest 701 führt. Dieser Schritt gilt gemeinhin als notwendig zur Aktivierung des STAT1-Signals und zur Weitergabe des Interferon  $\gamma$ -Signals [87, 88]. Die im Microarray-Experiment gefundene und in der Polymerase-Kettenreaktion bestätigte Überexpression des STAT1-Proteins ließ sich hingegen nicht eindeutig bestätigen.

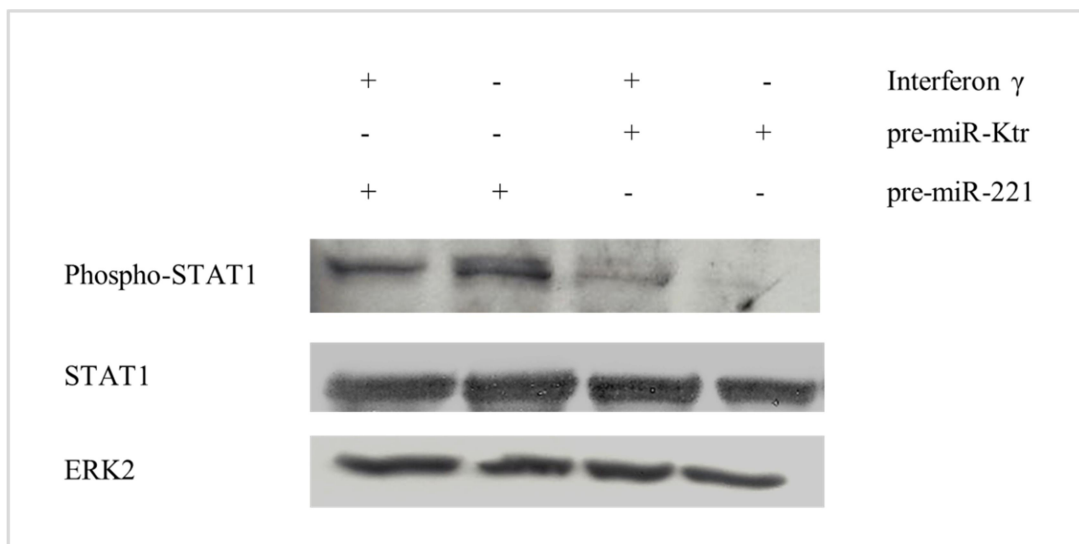


Abbildung 12: Die Transfektion mit pre-miR-221 führt in PC3-Zellen zur Phosphorylierung von STAT1. Dargestellt sind die Proteinmengen von Phospho-STAT1, STAT1 und ERK2 in Abhängigkeit von der Transfektion sowie der Zugabe von Interferon  $\gamma$ . Zeitpunkt der Beobachtung: 2 Tage p. T. Das Protein ERK2 diente als Maß für die eingesetzte Gesamt-Proteinmenge.

#### 4.5.3 Proliferationstests

In beiden betrachteten PCa-Zelllinien verstärkte die Transfektion mit pre-miR-221 den bremsenden Effekt von Interferon  $\gamma$  auf die Proliferation der Zellen (vgl. Abbildung 13).

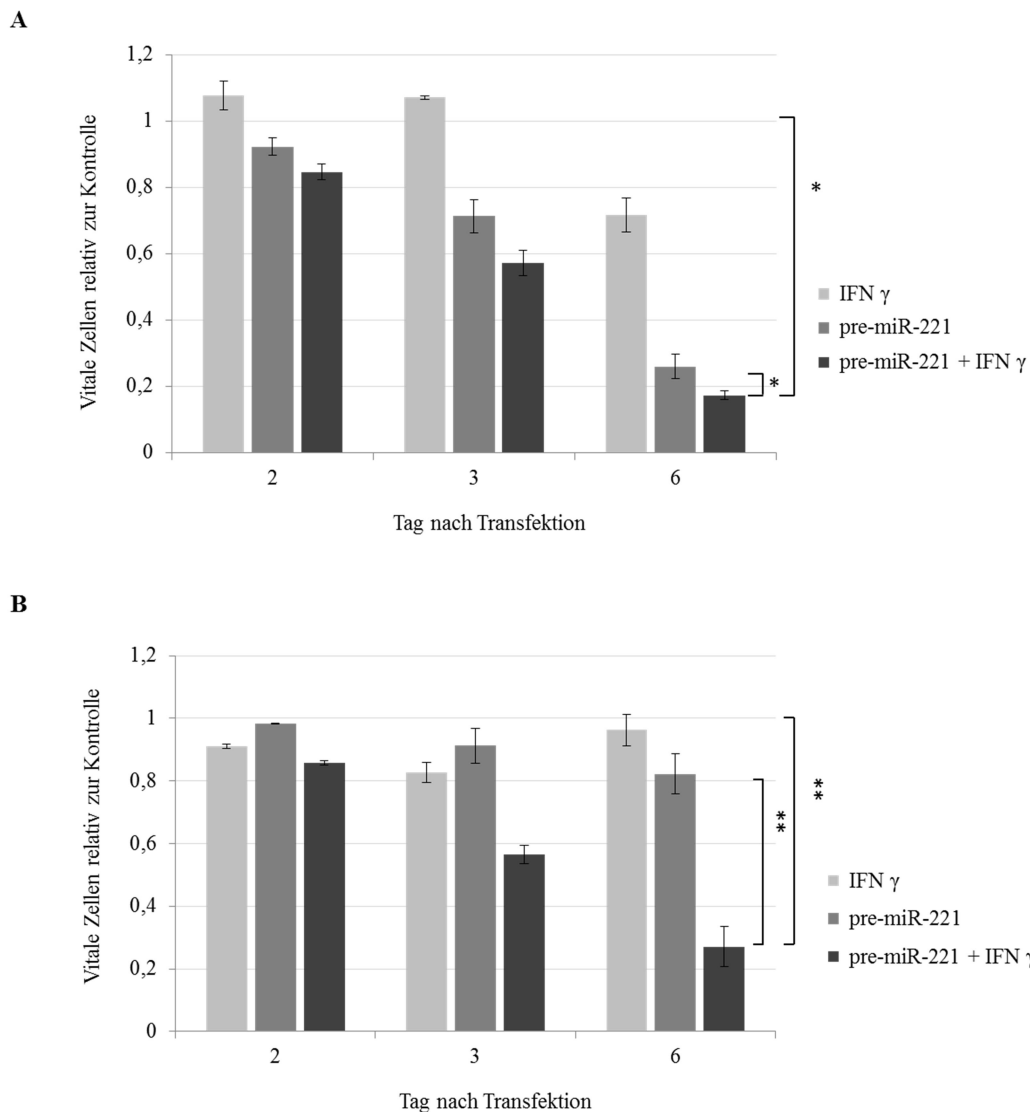


Abbildung 13: miR-221 sensitiviert PC3- (A) und DU145-Zellen (B) für den tumorsuppressiven Effekt von Interferon  $\gamma$ . Messung der Proliferationsaktivität als relativer Anteil vitaler Zellen in Abhängigkeit von der Transfektion, der Zugabe von Interferon  $\gamma$  und dem Beobachtungszeitpunkt (2, 3 und 6 Tage p. T.). Im ungepaarten Student's t-Test signifikante Ergebnisse ( $p < 0,05$ ) sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet, hochsignifikante Ergebnisse ( $p < 0,01$ ) mit zwei Sternen (\*\*).

In PC3-Zellen sorgte die pre-miR-221-Transfektion in Verbindung mit der Interferon  $\gamma$ -Behandlung für eine signifikante Herabregulation an Tag 6 p. T. im Vergleich zur Kontrolle auf im Mittel ca. 17% ( $p = 0,026$ ). Im Vergleich zur alleinigen miR-221-

Transfektion, die bereits zu einer Reduktion auf 26% des Referenzwertes führt, kommt es zu einer betragsmäßig kleinen aber dennoch signifikanten Verringerung der Proliferation um rund 9 Prozentpunkte ( $p = 0,042$ ). Deutlich hiervon divergieren die Ergebnisse der ebenfalls untersuchten DU145-Zellen: Während die bloße pre-miR-221-Transfektion an Tag 6 p. T. eine vergleichsweise geringe Verringerung der Proliferation zur Folge hat (vgl. Abbildung 4), kommt es als Folge der Transfektion zu einer statistisch hochsignifikanten Sensitivierung der PCa-Zellen gegenüber Interferon  $\gamma$  – verglichen mit der alleinigen pre-miR-221-Transfektion fällt der relative Anteil vitaler Zellen um circa 55 Prozentpunkte ( $p = 0,0005$ ). Gegenüber der Kontroll-Transfektion sinkt der relative Anteil vitaler Zellen nach pre-miR-221-Transfektion und Interferon-Behandlung auf circa 27% ( $p = 0,002$ ).

#### **4.6 Validierung möglicher Zielgene von miR-221**

Auf der Suche nach den relevanten Zielgenen von miR-221 stellte sich die Frage, welche Gene vermindert exprimiert werden müssten, um ein STAT1-Signal gezielt hervorzurufen bzw. ein bereits bestehendes Signal zu verstärken. Eine Literaturrecherche brachte folgende Gegenspieler von JAK-STAT-vermittelten Signalwegen als mögliche Zielsequenzen von miR-221 hervor:

- Interferon Regulatory Factor 2 (IRF2) [89, 90]
- Suppressor of Cytokine Signaling 1 (SOCS1) [91, 92]
- Suppressor of Cytokine Signaling 3 (SOCS3) [91, 93]
- Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11 (PTPN11/SHP2) [94, 95]
- Protein inhibitor of activated STAT1 (PIAS1) [96]
- Protein inhibitor of activated STAT4 (PIAS4 / PIASy) [97, 98]

Ihre Überprüfung auf komplementäre Sequenzen zu miR-221 erfolgte mit Hilfe der Suchalgorithmen von microRNA.org [75], miRDB [76, 77], Pictar [78] und TargetScan [79, 80] (vgl. Tabelle 4).



Tabelle 4: Vorhergesagte miR-221-Bindungsstellen für ausgewählte Inhibitoren JAK/STAT-vermittelter Signalwege in Abhängigkeit des benutzten Suchalgorithmus.

Algorithmus	IRF2	SOCS1	SOCS3	PTPN11	PIAS1	PIAS4
microRNA.org	✓	✗	✓	✗	✗	✗
miRDB	✓	✗	✓	✗	✗	✗
PicTar	✓	✗	✗	-	✗	-
TargetScan	✓	✓	✓	✗	✗	✗

Die Datenbankanalyse zeigte, dass sowohl IRF2 als auch SOCS1 und SOCS3 über prognostizierte miR-221-Bindungsstellen verfügen. Da SOCS1 jedoch lediglich von einem der vier Suchprogramme als Zielgen vorhergesagt wurde, konzentrierten sich die weiteren Experimente auf IRF2 und SOCS3, welche durch alle bzw. drei der vier Programme als Bindungspartner errechnet wurden. Abbildung 14 zeigt die mit Hilfe des microRNA.org-Algorithmus ermittelten Bindungs-Sequenzen von miR-221 an die 3'UTR von IRF2 sowie SOCS3.

3' CUUUGGGUCGUCUGUUACAUCGA 5' miR-221  
 5' -AGCUUUUAUGAGCUCAUGUAGCA- 3' IRF2

3' CUUUGGGUCGUCUGUUACAUCGA 5' miR-221  
 5' -ACAAUUUA-CAGG-AAUGUAGCA- 3' SOCS3

Abbildung 14: miR-221 bindet an die 3'UTR von IRF2 und SOCS3. Vorhergesagte miR-221-Anlagerung an die Sequenzen von IRF2 und SOCS3. Komplementäre miRNA-mRNA-Abschnitte sind schwarz, nicht-komplementäre grau schraffiert dargestellt.

Im weiteren Verlauf wurde zunächst untersucht, ob die transiente Transfektion mit pre-miR-221 in PC3-Zellen verglichen mit pre-miR-Kontroll-transfizierten Zellen zu einer Expressionsverminderung von IRF2 und SOCS3 zum Zeitpunkt 2 Tage p. T. führt.

#### 4.6.1 Real time-PCR

Zunächst wurde die mRNA-Expression von SOCS3 und IRF2 nach pre-miR-221-Transfektion im Vergleich zur Kontroll-Transfektion mittels Real time-PCR untersucht. Abbildung 15 illustriert die Ergebnisse aus vier unabhängigen Einzelexperimenten. Für SOCS3 zeigte sich eine 2,0-fache, im Falle von IRF2 ergaben die Experimente eine 2,075-fache Herabregulation der mRNA im Vergleich zu den Kontroll-Untersuchungen.

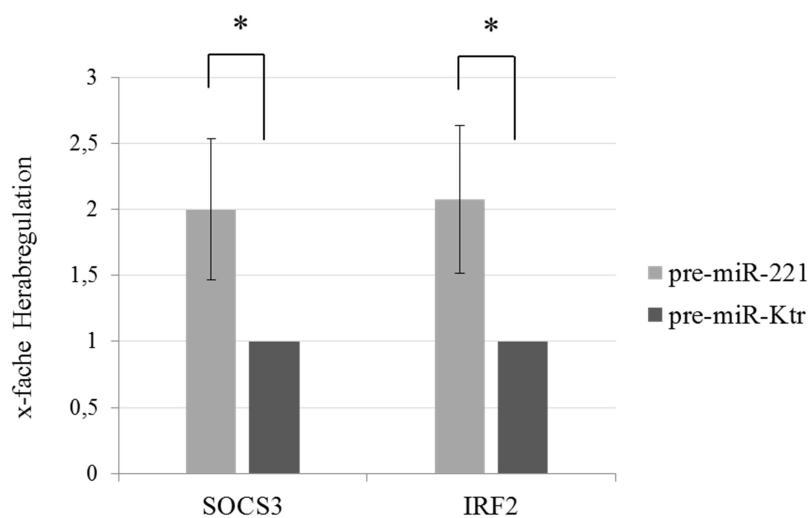


Abbildung 15: miR-221 verringert die Expression von SOCS3 und IRF2. Herabregulation von SOCS3- und IRF2-mRNA nach pre-miR-221-Transfektion gegenüber einer pre-miR-Kontroll-Transfektion (PC3-Zellen, 2 Tage p. T.). Im ungepaarten Student's t-Test signifikante Ergebnisse ( $p < 0,05$ ) sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet.

Mit  $p = 0,033$  bzw.  $p = 0,031$  fielen sowohl die Herabregulation von SOCS3 als auch die von IRF2 statistisch signifikant aus.

#### 4.6.2 Western Blot

Auch die Western Blot-Experimente stützen die Annahme, dass miR-221 den zellulären IRF2- und SOCS3-Gehalt reguliert – die Transfektion mit pre-miR-221 führt zur Senkung der Proteinexpression von IRF2 und SOCS3 in PC3-Zellen (vgl. Abbildung 16). Dieser Effekt ließ sich sowohl einen als auch zwei Tage p. T. beobachten. Im Gegensatz hierzu blieb der zelluläre Proteingehalt an ERK2, welches als Ladungskontrolle der Western Blot-Experimente fungierte, von der Transfektion unbeeinflusst.

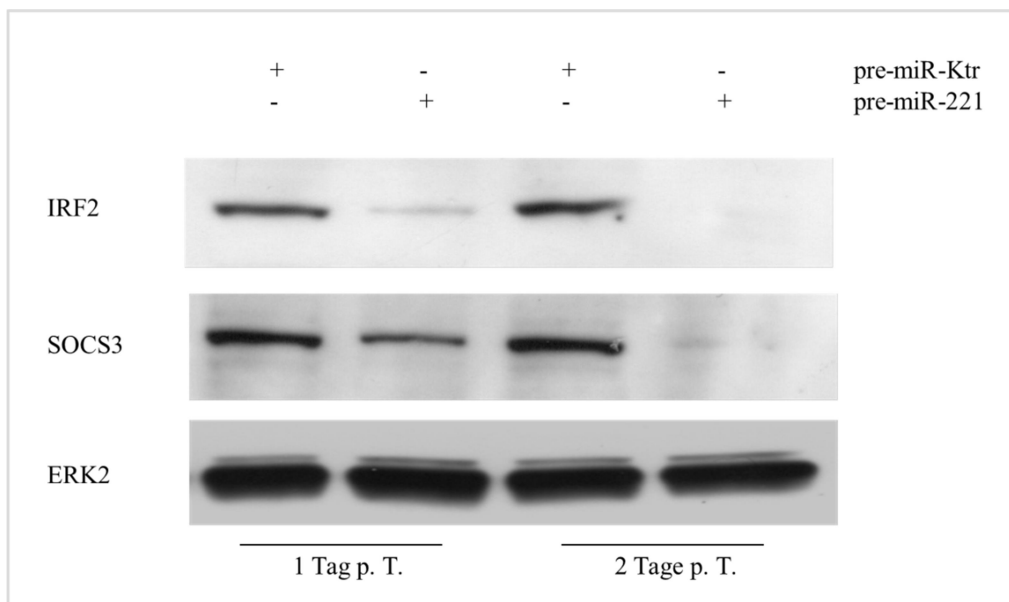


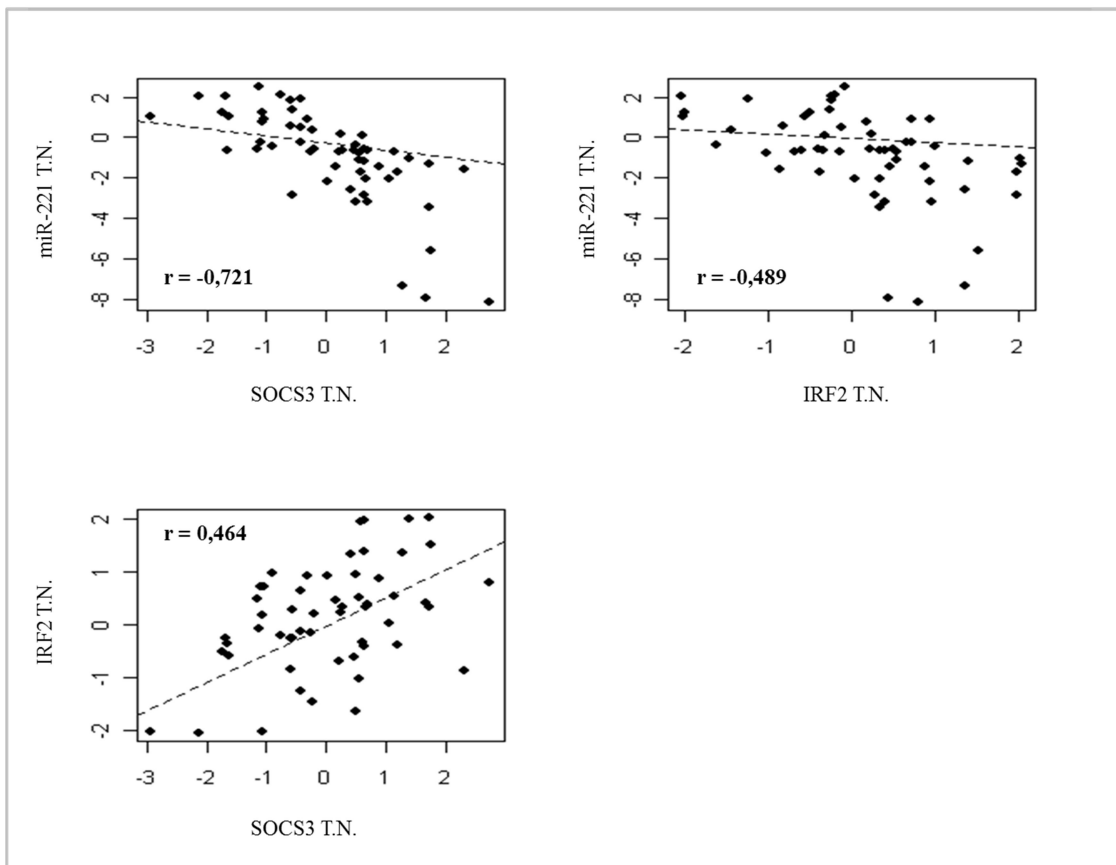
Abbildung 16: Die Überexpression von miR-221 senkt den Proteingehalt an IRF2 und SOCS3. Western Blot-Ergebnisse für IRF2, SOCS3 und ERK2 in Abhängigkeit von pre-miR-221- bzw. pre-miR-Kontroll-Transfektionen zu den Beobachtungszeitpunkten ein bzw. zwei Tage p. T. Das Protein ERK2 diente als Maß für die eingesetzte Gesamt-Proteinmenge.

#### 4.7 Expression von miR-221 und ihrer Zielgene in Nativmaterial

Die in vitro gezeigte miR-221-Regulation von IRF2 und SOCS3 wurde abschließend auf ihre Relevanz in Nativtumoren untersucht. Hierfür wurde in einem etablierten PCa-Kollektiv des Forschungslabors der Klinik und Poliklinik für Urologie und

Kinderurologie zunächst die miR-221-Expression im Tumor- und korrespondierendem Normalgewebe der Patienten gemessen. Diese wurde in Beziehung gesetzt zur Tumor- sowie Normalgewebs-Expression von IRF2 und SOCS3. Die in Abbildung 17 dargestellten Korrelationsanalysen zeigen, dass eine Herabregulation von miR-221 tendenziell mit einer Erhöhung von IRF2 und SOCS3 im Tumorgewebe einhergeht. Für die PCa-Proben ergab sich ein Pearson-Korrelationskoeffizient von  $r = -0,489$  für das Verhältnis von miR-221 und IRF2 und  $r = -0,721$  für miR-221 und SOCS3 (vgl. Teilabbildung A). Noch deutlicher fielen die Ergebnisse aus bei Betrachtung der Spearman-Rang-Korrelation, die eine ordinale Datenskalierung verwendet (vgl. Teilabbildung B):  $r_s = -0,549$  für das Paar miR-221 und IRF2 bzw.  $r_s = -0,784$  für das Verhältnis von miR-221 und SOCS3.

#### A Pearson Korrelation



## B Spearman Rang-Korrelation

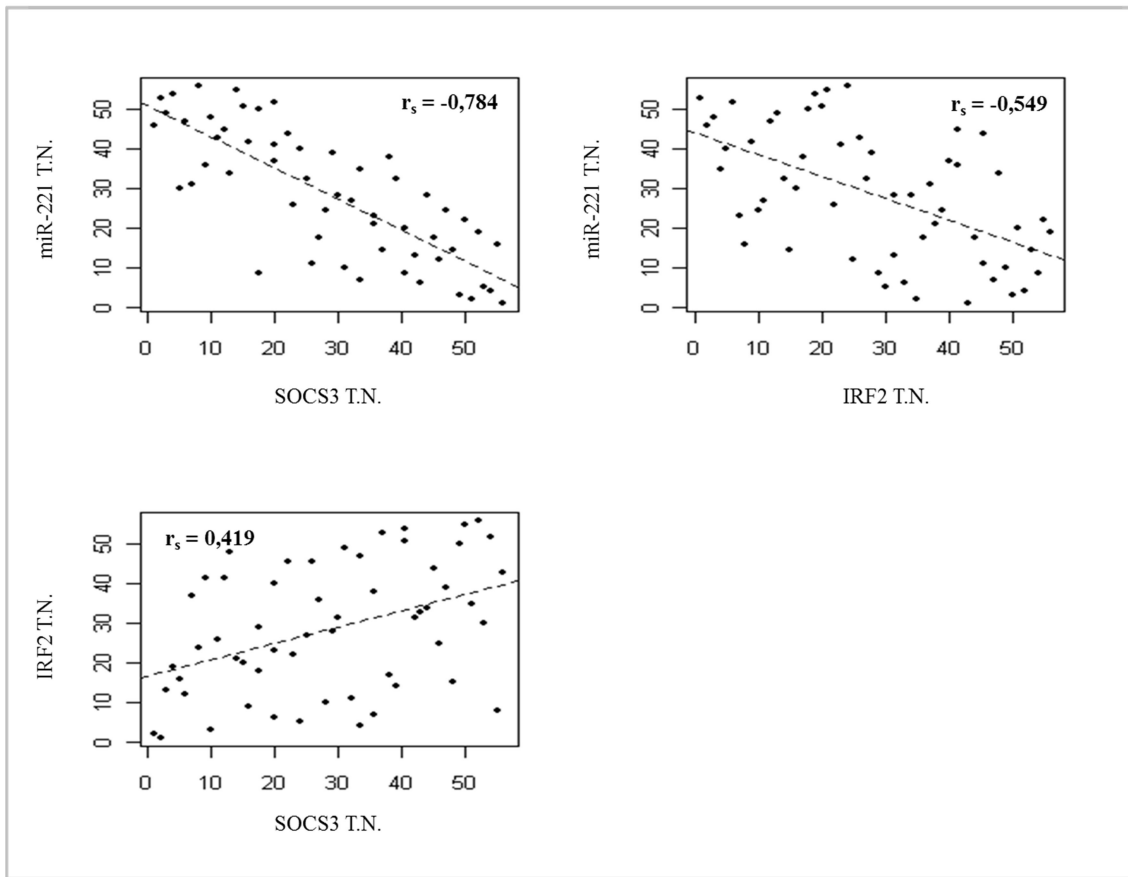


Abbildung 17: Die Herabregulation von miR-221 im Tumorgewebe ist negativ korreliert mit der Expression von IRF2 und SOCS3 in Tumor- und korrespondierendem Normalgewebe von PCa-Patienten. Teil (A) zeigt die Ergebnisse bei Berechnung des Pearson-Korrelationskoeffizienten. (B) Resultate bei Verwendung des Spearman-Rang-Korrelationskoeffizienten.

Sowohl die Benutzung des Pearson-Korrelations- als auch des Spearman-Rang-Korrelationsverfahrens ergab außerdem eine positive Korrelation zwischen IRF2 und SOCS3. Diese fiel betragsmäßig jedoch deutlich schwächer aus als die gezeigten Korrelationskoeffizienten zwischen miR-221 und IRF2 bzw. SOCS3 ( $r = 0,464$  sowie  $r_s = 0,419$ ).

## 5 DISKUSSION

Betrachtet man die Literatur zur Wirkung von miR-221 in verschiedenen Tumoren, so fällt auf, dass beinahe alle bisherigen Veröffentlichungen eine onkogene Rolle zeigen. Zwar konnte nachgewiesen werden, dass miR-221 in einigen Neoplasien die Expression des c-KIT-Onkogens reguliert [63, 65] – und somit zumindest in diesem Kontext eine klar tumorsuppressive Rolle spielt. Dennoch richtete sich bisher der weitaus größere Teil der Aufmerksamkeit auf die miR-221-vermittelte Regulation von p27, einem Inhibitor der Cyclin-abhängigen Kinase (CDK) [99]. Dieser Mechanismus sorgt für die Beschleunigung des Zellwachstums und seine Regulation durch miR-221 konnte unter anderem für das papilläre Schilddrüsenkarzinom [100], das Melanom [101] und das Hepatozelluläre Karzinom [102, 103] gezeigt werden. Selbst für das PCa wurde – auf der Basis von Experimenten mit der Androgen-abhängigen Zelllinie LNCaP – eine Regulation von p27 und dementsprechend eine onkogene Rolle von miR-221 gefordert. Dies deckt sich mit der Beobachtung, dass die ektope Überexpression von miR-221 in LNCaP-Zellen die Zellproliferation steigert [56]. Die vermeintliche Generalisierbarkeit der LNCaP-Daten auf das PCa als gesamte klinische Entität stützen die Autoren hierbei auch auf den unterschiedlichen miR-221-Gehalt der PCa-Zelllinien: Im Vergleich zu LNCaP-Zellen verfügen die in ihrem malignen Potential weiter fortgeschrittenen DU145- und PC3-Zellen über signifikant höhere miR-221-Spiegel – ein Ergebnis, das auch in der vorliegenden Untersuchung bestätigt werden konnte (vgl. Abbildung 2). Daneben zeigen Experimente mit Androgen-unabhängigen Abkömmlingen von LNCaP-Zellen, dass der Prozess der zunehmenden Androgen-Resistenz von einem miR-221-Anstieg flankiert wird [104, 105].

Wendet man sich jedoch ab von reinen *in vitro*-Beobachtungen und richtet den Blick auf die miR-221-Expression in Nativtumoren, so zweifelt man an einer allgemeingültigen Wirkung als Onkogen. Zwar erscheint miR-221 in der Mehrheit der untersuchten Neoplasien tatsächlich überexprimiert (vgl. Tabelle 5). Bereits bei der Betrachtung von Mammakarzinomen zeigen sich jedoch widersprüchliche Ergebnisse, die scheinbar vom Rezeptor-Status der Proben abhängen: Während Hormon-Rezeptor-sowie HER2/neu-negative Karzinome signifikant höhere miR-221-Spiegel aufweisen [106], zeigen Hui et al. an einem größtenteils aus Östrogen-Rezeptor-positiven Tumoren bestehenden Kollektiv eine signifikante Herabregulation [107]. Daneben

existieren Tumorentitäten – hierunter das klarzellige Nierenzellkarzinom, das Kaposi-Sarkom und eben das PCa – für die mehrere Untersuchungen unabhängig voneinander eine signifikante Herabregulation von miR-221 im Tumorgewebe zeigen konnten. Insbesondere für das PCa stehen die Ergebnisse im Nativmaterial somit in deutlichem Widerspruch zur weithin angenommenen Rolle von miR-221 als Tumortreiber.

Tabelle 5: miR-221-Gehalt in Nativmaterial ausgewählter Neoplasien – Verhältnis Tumor- zu angrenzendem Normalgewebe.

Tumorentität	Expression Tumor	Quellen
Astrozytom / Glioblastom	↑	[108, 109]
Kolonkarzinom	↑	[55]
GIST	↓	[110, 111]
Hepatozelluläres Karzinom	↑	[103, 112-114]
Kaposi-Sarkom	↓	[115]
Klarzelliges Nierenzellkarzinom	↓	[116, 117]
Kopf- und Halstumoren	↑	[118]
Magenkarzinom	↑	[54, 119]
Mammakarzinom	↑ / ↓	[106, 107, 120]
Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom	↓	[121, 122]
Ovarialkarzinom	↑	[123]
Pankreaskarzinom	↑	[53, 124, 125]
Papilläres Schilddrüsenkarzinom	↑	[126, 127]
PCa	↓	[63, 128-132]

## **5.1 miR-221 hemmt Wachstum von Androgen-unabhängigen PCa-Zellen**

In der eigenen Forschungsgruppe durchgeführte Vorarbeiten bestätigten zumindest in Teilen die für LNCaP-Zellen bereits veröffentlichten Ergebnisse: Die Transfektion mit pre-miR-221 führt zu einem Anstieg der zellulären Proliferation (MTS-Test-Ergebnisse von LNCaP-Zellen freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. med. vet. Burkhard Kneitz).

Vor dem klinischen Hintergrund, dass miR-221 im fortgeschrittenen PCa und dessen Metastasen besonders herabreguliert erscheint [63], wurden für die im Anschluss durchgeführten Experimente jedoch Androgen-unabhängige DU145- und PC3-Zellen verwandt. Diese Zellen zeigen eine gänzlich andere Reaktion auf die pre-miR-221-Transfektion: Die in Abbildung 3 dargestellten mikroskopischen Aufnahmen von PC3-Zellen legen bereits nahe, dass die Erhöhung von miR-221 zu einer Abnahme der proliferierenden Zellen führt – ein Effekt, der zwei sowie fünf Tage nach pre-miR-221-Transfektion zu beobachten war, und der sowohl im Vergleich mit pre-miR-Kontrolltransfizierten als auch im Vergleich mit unbehandelten Zellen deutlich wurde. Die Ergebnisse der MTS-Tests (vgl. Abbildung 4) bestätigen den bei Betrachtung der Mikroskop-Aufnahmen gewonnenen Eindruck: Eine Transfektion von PC3-Zellen mit pre-miR-221 führt verglichen mit Kontrollproben zu einer signifikanten Verminderung der Zahl vitaler Zellen. Die ebenfalls Androgen-unabhängige Zelllinie DU145 reagiert auf die Überexpression von miR-221 ebenfalls mit einer signifikanten Wachstumsinhibition, wenn auch in geringerem Maße als PC3-Zellen. Im Gegensatz zu den Androgen-unabhängigen PC3- und DU145-Zellen scheinen Androgen-abhängige LNCaP-Zellen somit nicht geeignet, eine potentiell schützende von miR-221 im PCa nachzuvollziehen. Aufgrund ihrer hohen Sensitivität im MTS-Test (vgl. Abbildung 4) wurden PC3-Zellen für die sich anschließenden Microarray-Experimente verwandt.

## **5.2 miR-221 aktiviert zelluläres STAT1-Signal**

Bereits bei einem ersten Blick auf die Expressionsdaten des Microarray-Experiments fällt auf, dass ein Großteil der beobachteten Gene durch die pre-miR-221-Transfektion vermehrt und nicht vermindert exprimiert wird. Dieses Ergebnis verwundert zunächst – schließlich geht man davon aus, dass der Mechanismus der miRNA-Regulation darauf



beruht, dass spezifische mRNA-Sequenzen abgebaut bzw. von der weiteren Translation abgehalten werden [25]. Die eingehendere Beschäftigung mit den überexprimierten Genkandidaten zeigt außerdem, dass ein Großteil von ihnen zur Familie der Interferon-induzierten Gene gehört (vgl. Abbildung 9).

Die mit Hilfe von DAVID Microarray Annotation identifizierten zellulären Funktionen, welche hochsignifikant überrepräsentiert erscheinen, entstammen allesamt dem Bereich der Immunabwehr (vgl. Tabelle 3). Die in Tabelle 3 genannten inhaltlichen Überschneidungen von Bezeichnungen wie *Virusantwort* und *Antivirale Abwehr* resultieren daraus, dass DAVID Microarray Annotation auf unterschiedliche Gendatenbanken und Thesauri zurückgreift.

Zur Bestätigung der auf bioinformatischem Wege erlangten Ergebnisse wurden pre-miR-221-transfizierte und pre-miR-Kontroll-transfizierte Proben auf die mRNA-Expression von typischen Vertretern des Interferonsignals hin untersucht. Abbildung 11 fasst die Ergebnisse der PCR-Untersuchungen zusammen und bestätigt die im Microarray-Experiment gewonnenen Daten: Die Erhöhung des zellulären miR-221-Spiegels führt zur signifikanten Überexpression von IRF1, IRF9 und STAT1. Neben ihrer Rolle als klassische Angehörige der Familie Interferon-induzierter Gene sollen im Folgenden einige Tumor-spezifische Funktionen dieser Gene erläutert werden.

### **5.2.1 Interferon-induzierte Gene und ihre Rolle in Neoplasien**

Als Dreh- und Angelpunkt des Interferon-vermittelten, zellulären Signals gilt der Transkriptionsfaktor STAT1. Dies rechtfertigt sich erstens in seiner zentralen Rolle während der JAK / STAT-vermittelten Virusabwehr: Der (partielle) Mangel an STAT1 und die hieraus entstehende insuffiziente Typ I-Interferon-Antwort wurde mit tödlich verlaufenden Virusinfektionen im Menschen verknüpft [133]. Zweitens zeigen Versuche an Tumor-Modellen der Maus, dass Tiere ohne funktionierendes STAT1 deutlich früher [134] bzw. sogar spontan [135] Karzinome entwickeln. Das klassische Modell zur Signalweiterleitung mittels STAT1 beginnt am Interferonrezeptor, genauer: der assoziierten Januskinase (JAK). Hier wird STAT1 an einem Tyrosinrest (Y<sup>701</sup>) phosphoryliert und damit aktiviert [87]. Abhängig von der Art des Rezeptors bildet STAT1 über Disulfid-Brücken entweder Homodimere mit einem weiteren STAT1-

Molekül aus oder Heterodimere gemeinsam mit STAT2. Anschließend wandern die Komplexe in den Nukleus, um ihre transkriptionale Aktivität zu entfalten [136]. Besonderes Augenmerk verdient jedoch – unabhängig von der Frage der Aktivierung – die in dieser Arbeit gezeigte Überexpression der STAT1-mRNA. Ging man früher nämlich davon aus, dass der zelluläre mRNA-Gehalt nicht von Belang für die Signalweitergabe ist, so weiß man mittlerweile, dass auch unphosphoryliertes STAT1 Signalfunktionen in der Zelle ausüben kann. Cheon und Stark konnten zeigen, dass unphosphoryliertes STAT1 ein besonders lang wirksames Interferonsignal vermittelt, welches noch aktiv ist, wenn ein durch klassische STAT1-Aktivierung mediiertes Signal bereits abgeklungen ist [137]. Für das PCa und dessen ossäre Metastasierung erscheinen daneben Forschungsergebnisse interessant, die mit Hilfe von STAT1-defizienten Mäusen nachweisen, dass STAT1 die Signalweiterleitung des Transkriptionsfaktors RUNX2 konterkariert [138]. Letztgenannter spielt nicht nur in Osteoblasten eine große Rolle, sondern wird auch im fortgeschrittenen PCa und dessen Knochenmetastasen verstärkt exprimiert [139, 140]. Jedoch zeigen die in Abbildung 12 dargestellten Ergebnisse der Western-Blot-Experimente, dass durch die pre-miR-221-Transfektion auch der klassische Weg der STAT1-vermittelten Signalweiterleitung beschritten wird: die aktivierende Phosphorylierung am Tyrosinrest.

Zahlreiche Publikationen belegen außerdem die schützende Rolle von IRF1 in Neoplasien [141] – zum einen als Vermittler des tumorsuppressiven Interferonsignals und eigenständiger Induktor von Interferon  $\beta$  [142], andererseits als direkter Gegenspieler des Onkogens IRF2 [143, 144]. Die Bedeutung dieser Aufgaben unterstreichen Beobachtungen, dass IRF1 der onkogenen Transformation von Zellen, verursacht etwa durch c-myc- oder ha-ras-vermittelte Signale, entgegen wirkt [145-148].

Das ebenfalls zur Familie der IRF gehörende IRF9 bildet zusammen mit phosphoryliertem STAT1 und STAT2 den ISGF3-Komplex, welcher als Folge eines Interferon Typ I-Signals die Transkription zahlreicher Gene beeinflusst [149, 150]. Insbesondere in der Frühphase der Interferon  $\alpha$ -gesteuerten Virusabwehr spielt IRF9 auf diese Weise eine prominente Rolle [151]. Daneben scheint IRF9 erforderlich zu sein für das Zusammenspiel von Interferon-Signalen und dem apoptotisch wirkenden TRAIL

(Tumor Necrosis Factor Apoptosis Inducing Ligand)-Signal [152]. Beide Wege sind eng miteinander verknüpft und laufen häufig konzertiert ab [153, 154].

### 5.2.2 miR-221 und ihre Rolle im Rahmen von Virusinfektionen

Gut vereinbar mit der gezeigten Aktivierung des zellulären STAT1-Signals durch miR-221 erscheinen diverse Forschungsergebnisse aus dem Bereich der Infektiologie. Hier zeigt sich, dass mehrere Virenarten in der Lage sind, die miR-221-Spiegel ihrer Wirtszellen zu verringern – wohl um auf diese Weise ein Infektions-freundlicheres Milieu zu schaffen (vgl. Abbildung 18).

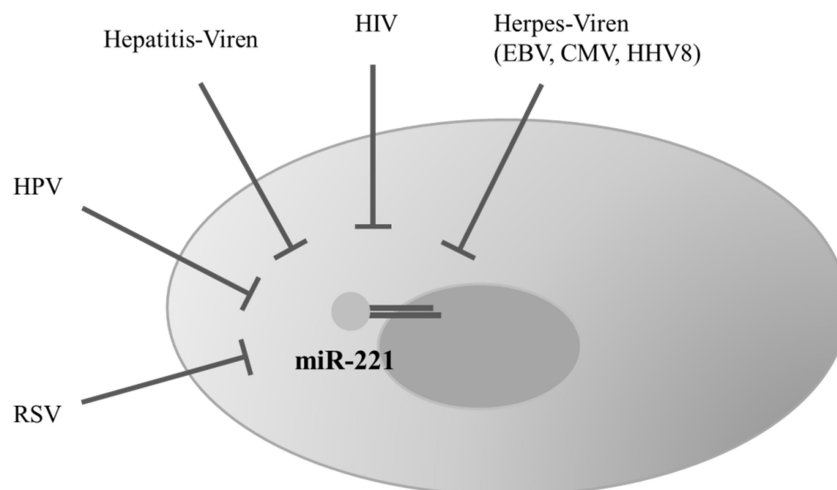


Abbildung 18: Viren senken den zellulären miR-221-Gehalt. Auswahl von Virenarten, die im Rahmen der Infektion in der Lage scheinen, die zelluläre miR-221-Expression zu inhibieren.

Dieser Strategie bedienen sich unter anderem das HI-Virus [155, 156], das Hepatitis-B-Virus im akuten Stadium der Infektion [157], das RS-Virus [158, 159] und HPV [160]. Auffällig erscheint außerdem die Häufung der Vertreter der Herpesviren, welche die miR-221-Expression verringern können. Hierzu zählen EBV (HHV4) [161], CMV (HHV5) [162] und HHV8, der Verursacher des Kaposi-Sarkoms [163]. Weitere Untersuchungen könnten klären, ob in Analogie zur Aktivierung des STAT1-Signals in PCa-Zellen diese Viren dazu in der Lage sind, das antivirale Abwehrprogramm der

Zelle durch eine miR-221-Herabregulation und die konsekutive Schwächung des STAT1-Signals zu unterlaufen.

Erst kürzlich erschien (nach Beendigung der hier gezeigten Experimente und nach Erscheinen der zugehörigen Publikation) eine Arbeit, welche diese Hypothese zur Rolle von miR-221 in Virusinfektionen zu bestätigen scheint. Hierin zeigen die Autoren, dass die Überexpression von miR-221 im Rahmen einer chronisch verlaufenden Hepatitis C-Infektion das zelluläre Interferon-Signal durch die Regulation von SOCS1 und SOCS3 unterstützt [164].

### **5.2.3 Regulation von Interferon-Signalen durch miR-221**

Im Gegensatz zu letztgenannter Publikation geht die bisherige Literatur nicht von einem aktivierenden, sondern einem bremsenden Einfluss von miR-221 auf das Interferonsignal aus. So zeigen Hu et al. in Cholangiozyten, dass miR-221 die Translation des Interferon-induzierten Gens ICAM1 vermindert und dass Interferon  $\gamma$  den zellulären Gehalt an miR-221 STAT1-abhängig verringert [165]. Auch in Glioblastomzellen konnte demonstriert werden, dass durch niedrigere miR-221-Spiegel die Transkriptionsfaktoren STAT1 und STAT2 vermehrt exprimiert und phosphoryliert werden [166]. In Melanomzellen scheint miR-221 ebenfalls als Gegenspieler des zellulären Interferon  $\beta$ -Signals zu fungieren, indem es dessen Proliferations-hemmende Wirkung konterkariert [167]. Auch für das tumorsuppressive TRAIL-Signal, welches die Apoptose von entarteten Zellen auslöst, ist ein hemmender Einfluss von miR-221 beschrieben. Hierfür verantwortlich gemacht wird die miR-221-gesteuerte Regulation von p27, PTEN und TIMP3, die zumindest im Hepatozellulären Karzinom und dem Nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom die Resistenz gegenüber dem TRAIL-Signal erhöht [58, 168, 169].

Insbesondere für das Nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom sind die Parallelen zum PCa augenfällig: Während Expressionsdaten in Nativtumoren für beide Entitäten eine tumorsuppressive Rolle von miR-221 nahelegen und ihre Herabregulation mit einer schlechteren Prognose in beiden Tumoren assoziiert scheint, fordern Arbeiten auf der Basis von Zellkultur-Experimenten onkogene Teilfunktionen [58, 170]. Für das PCa weisen jedoch auch die durchgeführten MTS-Tests (vgl. Abbildung 13) auf eine

aktivierende Wirkung von miR-221 auf das zelluläre STAT1-Signal hin: Sowohl in PC3-Zellen als auch in DU145-Zellen lässt sich zu allen Beobachtungszeitpunkten eine additive Wirkung von Interferon  $\gamma$  und der pre-miR-221-Transfektion auf die Proliferationseinschränkung beobachten. Besonders eindrucksvoll zeigt sich dieser Effekt in DU145-Zellen. Zwar führt hier die Gabe von Interferon  $\gamma$  bzw. miR-221 für sich alleine betrachtet bereits zu einem Rückgang der Proliferation, jedoch potenziert die miR-221-Transfektion den beobachteten Interferon  $\gamma$ -Effekt (vgl. Abschnitt B). In PC3-Zellen (vgl. Abschnitt A) sorgt bereits die alleinige Transfektion mit miR-221 für einen so starken Effekt, dass der additive Effekt durch Interferon  $\gamma$  wohl deshalb nur in geringerem aber dennoch signifikantem Ausmaß beobachtet werden kann.

#### **5.2.4 Interferon-Signal als Erklärungsansatz für divergente LNCaP-Reaktion**

Die in der vorliegenden Arbeit gezeigte Aktivierung des STAT1-Signals durch miR-221 bietet auch eine Erklärung dafür an, dass ihre tumorsuppressive Rolle im PCa nicht mit Hilfe von LNCaP-Zellen nachvollzogen werden kann. Schließlich zeigen diese Zellen eine ausgeprägte Interferon-Resistenz [66] und exprimieren keine Januskinase 1 (JAK1), einen zentralen Bestandteil von Interferonrezeptoren [171]. Daneben weisen LNCaP-Zellen eine heterozygote, die Funktion einschränkende Mutation für das RNase L (Ribonuclease L)-Gen auf [172]. Hierbei handelt es sich nicht nur um einen wichtigen Baustein der Interferon-basierten Abwehr, sondern auch um ein Tumorsuppressor-Gen im PCa, dessen Ausfall mit familiären PCa-Fällen assoziiert ist [173]. Besonders interessant erscheint weiterhin, dass auch SOCS3, eines der hier untersuchten Zielgene von miR-221, in unbehandelten LNCaP-Zellen nicht exprimiert wird. Erst die Anregung der Zellen durch Zugabe von Interleukin 6 bzw. die Behandlung mit de-methylierenden Agentien führt zur Re-Expression von SOCS3 [174].

#### **5.2.5 miR-221 als mögliche Determinante viraler PCa-Impfstrategien**

Bezeichnenderweise lassen sich auch Virus-basierte Impfstrategien in PCa-Zellen nach ihrer Wirksamkeit in LNCaP- und PC3-Zellen unterteilen. Eine Hauptdeterminante der divergenten Reaktionen scheint der Zustand des zellulären Interferonsignals zu sein. Die

verschiedenen Ansätze fasst Abbildung 19 zusammen. Das in Teil A dargestellte Modell fußt auf der Behinderung bzw. vollständigen Ausschaltung des Interferonsignals durch die Karzinomzellen, die dadurch einen Selektionsvorteil erlangen. Genau dieser fehlenden Interferonantwort ist es jedoch ebenfalls zu verdanken, dass die Zellen besonders verwundbar gegenüber einer Infektion mit Viren sind – schließlich wird die zelluläre Interferon-Kaskade im klassischen Sinne durch virale Infektionen verursacht. In der Folge können sich RS-Viren [175] und VS-Viren [176] in den Tumorzellen vergleichsweise ungehindert vermehren und führen somit letztendlich zur Apoptose. Es verwundert nicht, dass gerade LNCaP-Zellen besonders stark auf die Behandlung mit diesen onkolytischen Viren ansprechen. Darüber hinaus konnten Carey et al. zeigen, dass PC3-Zellen im Vergleich zu LNCaP-Zellen gerade deshalb unzureichend auf die Beimpfung mit VS-Viren ansprechen, weil sie ein Interferonsignal aktivieren [177]. Es erscheint plausibel, dass dieses Signal in PC3-Zellen von einer Erhöhung des miR-221-Spiegels flankiert, wenn nicht gar verursacht wird.

Die in Teil B dargestellte Strategie verspricht hingegen in PC3-Zellen besonderen Erfolg: Durch das Einschleusen von inaktivierten Sendai-Viren in die Zellen wird die anti-virale und tumorsuppressive Interferon-Antwort hervorgerufen [178, 179]. In der Folge kommt es ebenfalls zur Apoptose der Tumorzellen. Gut passend zur Interferonantwort durch die Viren in PC3-Zellen wurde auch gezeigt, dass Sendai-Partikel ein TRAIL-Signal in PCa-Zellen induzieren [180].

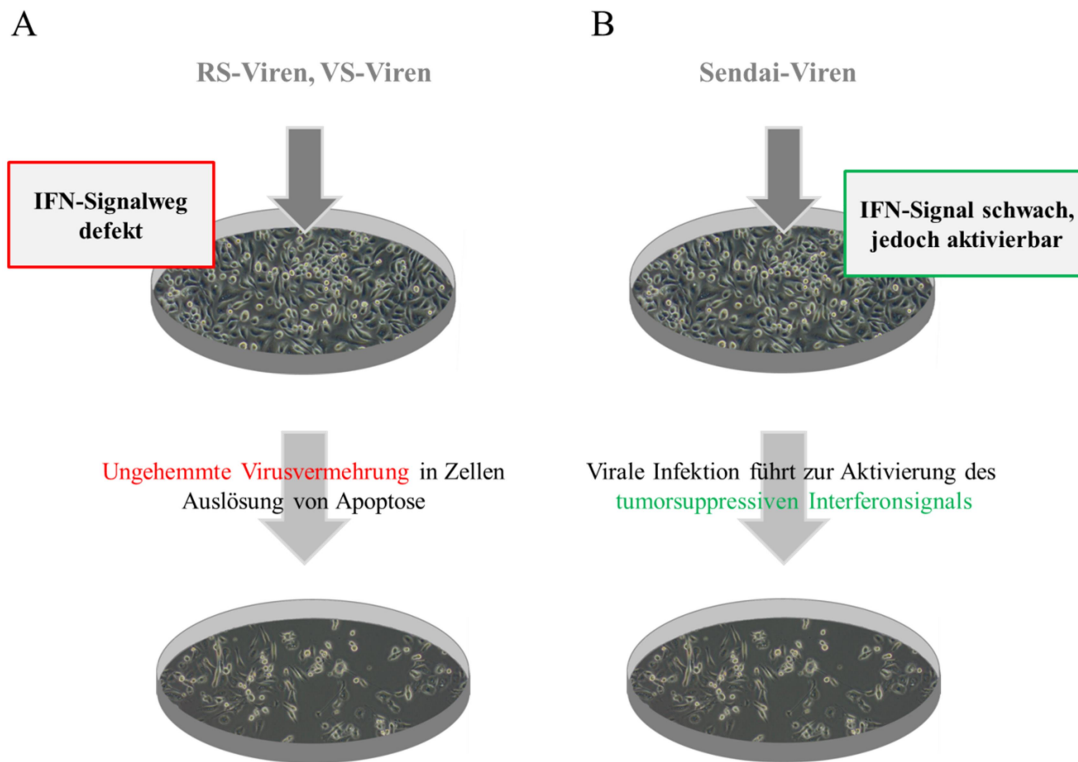


Abbildung 19: Unterschiedliche Auswirkungen viraler Impfstrategien in PCa-Zellen. Idealtypische Aufteilung nach der Aktivierbarkeit des zellulären Interferon-Signals.

Während die erstgenannte Strategie einen Defekt des Interferon-Systems ausnutzt, ruft die zweite das zelluläre Interferonsignal gezielt hervor. Es stellt sich die Frage, ob miR-221 als klinischer Parameter im PCa eine Aussage über den Aktivierungsgrad des protektiven Interferonsignals treffen könnte. Es wäre denkbar, dass ein niedriger miR-221-Spiegel – im Sinne der in Teil B dargestellten Impfstrategie – gerade diejenigen Patienten identifiziert, deren zelluläres Interferon- bzw. STAT1-Signal schwach ausgeprägt ist, jedoch durch eine gezielte Immuntherapie gestärkt werden könnte. Diese Frage kann durch die alleinige Betrachtung von PCa-Zellen ohne weitere Untersuchungen an Immunzellen jedoch nicht abschließend behandelt werden. Vor dem Hintergrund, dass LNCaP-Zellen über den geringsten Gehalt an miR-221 aller betrachteter PCa-Zelllinien verfügen (vgl. Abbildung 2), steht außerdem zu befürchten, dass ein besonders niedriger miR-221-Gehalt der Patientenprobe auch ein defektes und somit nicht aktivierbares Interferonsystem der Zellen anzeigen könnte. Letztlich stellt sich hier die Frage nach der Repräsentativität der Zelllinie LNCaP für das PCa als

gesamte Entität. Erste Zweifel diesbezüglich wurden bereits bei der primären Beschreibung von LNCaP-Zellen und ihrer Interferon-Resistenz – damals vor dem Hintergrund groß angelegter Studien zur Interferon-Therapie von PCa – im Jahre 1983 geäußert [66].

### **5.3 miR-221 reguliert IRF2 und SOCS3 in vitro**

Für beide betrachteten miR-221-Zielgene sind spezifische Aufgaben sowohl in der Abwehr von Pathogenen als auch in der Tumorentstehung und -progression beschrieben worden. Diese sollen im folgenden Teil skizziert werden.

#### **5.3.1 IRF2 im Rahmen von Immunabwehr und Onkogenese**

Bereits kurz nach der Entdeckung von IRF1 und seiner aktivierenden Wirkung auf das Interferonsystem folgte die Entdeckung von IRF2, einem weiteren Mitglied der IRF-Familie. Dabei wird IRF2 zeitlich eng gekoppelt an ein Interferonsignal exprimiert und inhibiert dieses, indem es mit dem Transkriptionsfaktor IRF1 um dessen Promotor-Bindungsstellen konkurriert [89]. Auch nach der Aufdeckung eines ganzen IRF-Netzwerkes, das derzeit aus neun Mitgliedern besteht, gilt IRF2 weiterhin als der zentrale Gegenspieler von IRF1 [90, 181]. Es scheint jedoch zu kurz gegriffen, IRF2 lediglich als Bremse der Immunabwehr zu begreifen. Zwar hemmen auch einige Virenarten die IRF1-Wirkung kompetitiv, indem sie eigene, im Virusgenom kodierte IRFs (virale IRFs, sog. vIRFs) einsetzen [182, 183]. Experimente mit Knockout-Mäusen zeigen jedoch, dass ausreichend hohe IRF2-Spiegel für die B-Zell-Lymphopoese von Nöten sind [184]. Daneben scheint IRF2 in der Entwicklung von NK- und T-Helferzellen eine grundlegende Rolle zu spielen [185].

Vergleichsweise eindeutig hingegen erscheint die Rolle von IRF2 als Onkogen [186]. So konnte gezeigt werden, dass IRF2 in Fibroblasten eine onkogene Transformation der Zellen verursacht und dieser Vorgang durch die verstärkte Expression von IRF1 wieder umgekehrt werden kann [143]. Diese Beobachtungen führten dazu, dass Forscher für verschiedene Entitäten das Verhältnis von IRF1 zu IRF2 genauer untersuchten. Entsprechend haben im Hepatozellulären Karzinom die zellulären Mengen an IRF1 und



IRF2 einen Einfluss auf die Tumorprogression und die Invasionsfähigkeit – mit einem prognostisch ungünstigen Ergebnis im Falle niedriger IRF1- und hoher IRF2-Spiegel [187]. Hierzu passend konnte bereits für Melanom- [188], Mammakarzinom- [189] und Ösophaguskarzinom-Zellen [190] gezeigt werden, dass IRF2 ein tumorsuppressives Interferon  $\gamma$ -Signal abbremst. Neben seiner Funktion im namensgebenden Interferon-Haushalt scheint IRF2 jedoch über weitere Funktionen in Tumoren zu verfügen. Unter anderem beeinflusst es die zelluläre Verteilung von NF- $\kappa$ B und sorgt für dessen Ansammlung im Zellkern [191]. Hierbei handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, für den bereits eine onkogene Rolle – insbesondere in Androgen-unabhängigen PCa-Zellen – gezeigt werden konnte [192, 193]. Von Interesse scheint außerdem eine Studie, welche zeigt, dass Tumor-initiiierende Zellen der Prostata mit Stammzell-Eigenschaften ein verstärktes NF- $\kappa$ B-Signal aufweisen [194]. Daneben reguliert IRF2 den Zellzyklus durch seinen Einfluss auf das Histon H4 und ist für den Übergang der Zellen in die S-Phase notwendig [195, 196].

### **5.3.2 SOCS3 als Regulator von STAT1-/STAT3-Signalwegen**

Auch SOCS3 wird nach dem Prinzip einer negativen Rückkopplung als Antwort auf ein Zytokinsignal vermehrt produziert [197]. Dementsprechend konnte in verschiedenen zellulären Systemen gezeigt werden, dass eine Behandlung mit Interferon die Expression von SOCS3 erhöht – dies führt wiederum zur Einschränkung der STAT1-vermittelten Transkription [198, 199]. Insbesondere während viraler Infektionen spielen Angehörige der SOCS-Familie eine prominente Rolle, denn zahlreiche Viren bedienen sich dieser wirtseigenen Proteine, um die Interferon-vermittelte Abwehrreaktion der Wirtszelle abzuschwächen [200]. Im Speziellen benutzen etwa das Hepatitis B- [201] und Hepatitis C-Virus [202], HIV [203], Influenza A [204, 205], EBV [206], HSV1 [207] und HHV8 [208] das wirtseigene SOCS3, um die antivirale Reaktion der befallenen Zelle zu konterkarieren

Eine Beurteilung der Rolle von SOCS3 in Tumoren fällt dahingegen nicht so eindeutig aus. In vielen Entitäten, darunter im Magen- [209], Pankreas- [210] und dem Hepatozellulären Karzinom [211, 212], wird SOCS3 nämlich eine protektive Rolle zugeschrieben. Dies liegt vor allem daran, dass SOCS3 im Rahmen onkologischer

Fragestellungen vornehmlich ein hemmender Einfluss auf STAT3 und nicht STAT1 zugebilligt wird. Begründet wird dies mit der Bindungsspezifität der einzelnen Vertreter der SOCS-Familie: Wie SOCS1 bindet zwar auch SOCS3 an die Zytokinrezeptor-assoziierten Kinasen JAK1, JAK2 und TYK2. Wenngleich beide SOCS-Proteine somit dieselben Substrate besitzen, fordert das vorherrschende Modell zur SOCS-Wirkung jedoch, dass STAT1-vermittelte Signale vornehmlich von SOCS1 und nicht von SOCS3 gebremst werden [91, 197]. Auch neuere Forschungsarbeiten zur Funktion von SOCS3 auf Rezeptorebene gehen davon aus, dass der Inhibitor eine größere Affinität zum Interleukin-6 (IL6)-Rezeptor besitzt und somit stärker den STAT3- als den STAT1-Haushalt beeinflusst [213]. Nach allgemeiner Auffassung besteht die Aufgabe von STAT3 unter anderem darin, die schädlichen Einflüsse des Immunsystems auf das Tumorwachstum zu vermitteln – einerseits durch die Begünstigung der Tumor-Immunevasion, andererseits als zentraler Transkriptionsfaktor von onkogen wirkenden, Tumor-assoziierten Entzündungsprozessen [214]. Aufgrund der häufig beobachteten Konkurrenz zwischen dem STAT3- und dem Interferon-vermittelten STAT1-Signal [215, 216] gehen Forscher davon aus, dass – dem Beispiel von IRF1 und IRF2 auffallend ähnlich – auch das Verhältnis von STAT1 zu STAT3 eine entscheidende Determinante für die Tumorprogredienz ist [217].

Folgt man der Argumentation zur SOCS3 / STAT3-Spezifität, so ließe sich hieraus auf den ersten Blick allenfalls eine onkogene Rolle von miR-221 ableiten. Tatsächlich wird für Entitäten wie Magen- [60, 119], Pankreas- [53, 59, 125] und Hepatozelluläres Karzinom [102, 103] eine onkogene Funktion von miR-221 gefordert. Auch im PCa stellt die IL6 / STAT3-Achse eine wichtige Säule der Progression dar [218-220], STAT3 wird dementsprechend als Onkogen betrachtet [221, 222]. Es erscheint deshalb nur konsequent, dass – zumindest für Androgen-abhängige PCa-Zellen – eine protektive Rolle von SOCS3 gefordert wird, zumal SOCS3 in LNCaP-Zellen aufgrund von Methylierung nicht exprimiert wird [174].

Dieses Bild ändert sich jedoch bei der Betrachtung von weiter fortgeschrittenen PCa-Zelllinien, denn hier scheint SOCS3 als Tumorpromotor zu wirken [223, 224]. Zwei Erklärungsansätze könnten dazu beitragen, diese abweichende Funktion von SOCS3 zu erklären: Zum einen ist die Rolle von STAT3 in Neoplasien keineswegs abschließend geklärt. Neuere Arbeiten am Glioblastom konnten zeigen, dass STAT3 in Abhängigkeit

vom Mikromilieu auch tumorsuppressive Eigenschaften ausüben kann [225]. Interessant sind in diesem Zusammenhang auch die Ergebnisse von Lu et al., welche in Mäuse-Fibroblasten zeigen, dass hohe STAT3-Spiegel pro- und nicht antiapoptotisch wirken, wenn sie durch eine Herabregulation von SOCS3 verursacht werden [226]. Das in der vorliegenden Arbeit gezeigte anti-virale STAT1-Signal lässt außerdem vermuten, dass die Regulation von STAT1 durch SOCS3, welche im Rahmen von Infektion und Inflammation bereits hinreichend etabliert ist [204, 227], auch in Neoplasien funktionieren könnte. Demnach wäre die strikte Trennung der SOCS-Vertreter nach STAT1- und STAT3-Spezifität, welche bisher vor allem in der Forschung zu soliden Tumoren vorherrscht, wohl allzu dogmatisch. Hierzu passt, dass im Bereich der Hämatologie SOCS3 durchaus eine bremsende Rolle gegenüber schützenden Interferon-Signalen zugeschrieben wird, etwa im Multiplen Myelom [228], der Chronisch Myeloischen Leukämie (CML) [229] und dem T-Zell-Lymphom [230].

#### **5.4 Expression von IRF2 und SOCS3 in PCa-Proben**

Auch der abschließende Vergleich der miR-221-Expression mit der IRF2- sowie SOCS3-Expression in Tumor- und Normalgewebe von PCa-Patienten (vgl. Abbildung 17) lässt eine *in vivo*-Regulation beider Gene durch miR-221 vermuten: Deutlich negative Korrelationen zeigen, dass die Herabregulation von miR-221 im Karzinom tendenziell mit einem höheren Gehalt an IRF2 und SOCS3 einhergeht. Die betragsmäßig geringer ausfallende positive Korrelation zwischen IRF2 und SOCS3 legt außerdem den Schluss nahe, dass beide Gene direkte Ziele von miR-221 sind und nicht eine der beiden Zielstrukturen – lediglich im Zuge der Regulation der anderen – mitbeeinflusst wird.

#### **5.5 Modell zur Rolle von miR-221 im PCa**

Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten *in vitro*-Ergebnisse sowie die Daten zur Expression von miR-221, IRF2 und SOCS3 in Nativtumoren legen das folgende Modell zur Wirkung von miR-221 im PCa nahe (vgl. Abbildung 20):

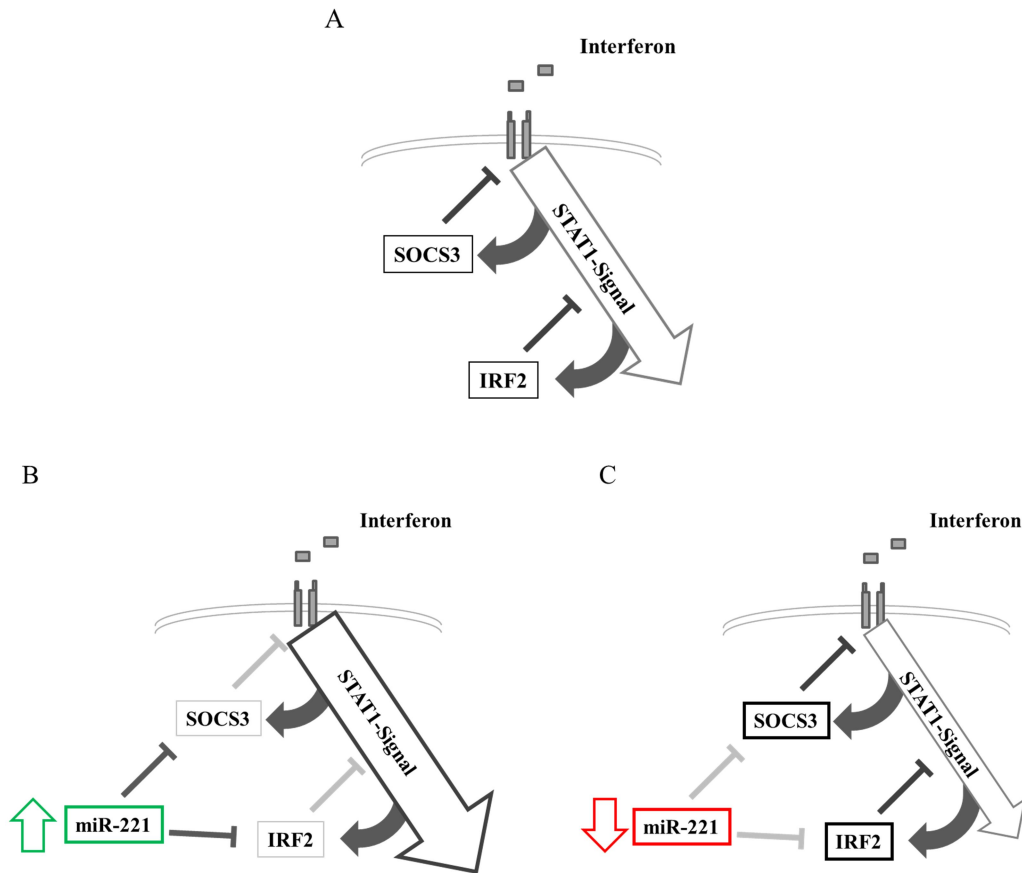


Abbildung 20: Modulation des STAT1-Signals in PCa-Zellen durch miR-221. (A) Die als Reaktion auf ein STAT1-Signal verstärkten exprimierten Inhibitoren SOCS3 und IRF2 hemmen das STAT1-Signal im Sinne einer negativen Rückkopplung. Ein hoher miR-221-Gehalt (B) stärkt durch die Inhibierung von SOCS3 und IRF2 das STAT1-Signal. Im prognostisch ungünstigen Hochrisikokarzinom der Prostata (C) sorgen niedrige miR-221-Spiegel für ein relativ schwaches STAT1-Signal, da SOCS3 und IRF2 ungehindert exprimiert werden.

Das protektive STAT1-Signal wird von den physiologischen Inhibitoren SOCS3 und IRF2 auf unterschiedlichen Regulationsebenen behindert (vgl. Teilabbildung A) – im Falle von SOCS3 durch die direkte Interaktion am Rezeptor, bei IRF2 durch die kompetitive Hemmung der IRF1-vermittelten Transkription im Zellkern.

Erweitert man dieses System um miRNA als zusätzliche Regulationsebene, so zeigen die vorgestellten Ergebnisse eine Regulation von SOCS3 und IRF2 durch miR-221. Im klinisch günstigen Fall mit (vergleichsweise) hohen miR-221-Spiegeln (vgl.

Teilabbildung B) führt die verminderte Expression von SOCS3 und IRF2 zu einer konsekutiven Stärkung des STAT1-Signals. Umgekehrt verhält es sich im prognostisch ungünstigen Fall (C): der Wegfall der miR-221-vermittelten Inhibierung von SOCS3 und IRF2 schränkt das STAT1-Signal ein. Daneben könnte die Wirkung von miR-221 nicht nur auf einer ungerichteten Aktivierung des STAT1-Signals beruhen. Angesichts der bereits erwähnten Bedeutung des STAT1- / STAT3- und des IRF1- / IRF2-Verhältnisses in anderen Tumorentitäten könnte miR-221 für die Feinjustierung zu Gunsten der beiden schützenden Einflussfaktoren IRF1 und STAT1 verantwortlich sein.

Außerhalb des PCa stellt sich aufgrund der gezeigten Stärkung des zellulären Interferon-Signals die Frage, ob miR-221 zukünftig als *ImmunomiR* stärker ins Blickfeld rücken sollte. Dieser Begriff bezeichnet miRNA, welche die zelluläre Immunantwort regulieren [231] und umfasst als klassische Vertreter etwa miR-155 und miR-146 [232]. Interessant erscheinen in diesem Zusammenhang Arbeiten zu T-Helferzellen: So demonstrieren Grigorjev et al., dass die T-Zell-Aktivierung eine deutliche Expressionsänderung zahlreicher miRNA-Vertreter zur Folge hat – mit einer mehr als 7800-fachen Überexpression ist miR-221 in dieser Untersuchung die am stärksten regulierte miRNA [233]. Passend zur möglicherweise auch in Immunzellen funktionierenden Regulation von SOCS3 durch miR-221 konnte gezeigt werden, dass eine hohe SOCS3-Expression die T-Helferzellen im Ruhezustand hält und ein Absinken des Spiegels zur Aktivierung der Zellen notwendig ist [234].

Mit Blick auf die Anwendung von miR-221 als prognostischer Marker im PCa stellt sich die Frage, ob die klinische Aussagekraft durch die Betrachtung mehrerer miRNA-Kandidaten weiter verbessert werden könnte. Die Bestimmung solcher Signaturen hat sich bereits zur Beurteilung des klinischen Verlaufs von Chronisch Lymphatischer Leukämie (CLL) [235], Magen- [236] und Bronchialkarzinomen [237] als nützlich erwiesen.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Der klinische Verlauf von PCa-Erkrankungen ist extrem unterschiedlich und lässt sich mit den bisher üblichen Verfahren wie der feingeweblichen Beurteilung der Prostatastanzbiopsie bzw. des OP-Präparates und der PSA-Wert-Bestimmung nur unzureichend vorhersagen. Für eine bessere Versorgung von PCa-Patienten sind deshalb neuartige Marker notwendig, die das individuelle Progressions-Risiko bestimmen. Ein hoffnungsvoller Ansatz sind miRNA-Vertreter als Prognose-Parameter. Besonders interessant in dieser Hinsicht ist miR-221, die im PCa-Gewebe signifikant niedriger exprimiert wird. Jedoch existieren für diese in den meisten Neoplasien als Onkogen betrachtete miRNA kaum Erklärungsansätze für eine tumorsuppressive Funktion im PCa.

Die vorliegende Arbeit konnte mit Hilfe von Microarray-basierten Expressionsanalysen und deren bioinformatischer Auswertung sowie zell- und molekularbiologischen Experimenten erstmals zeigen, dass miR-221 das protektive Interferon-Signal in PCa-Zellen stärkt und auf diese Weise deren Proliferation hemmt. Daneben konnten zwei prominente Inhibitoren dieses Signals, IRF2 und SOCS3, als neue Zielgene von miR-221 *in vitro* nachgewiesen und eine Korrelation von miR-221 mit diesen Zielgenen auch in PCa-Nativmaterial identifiziert werden. Somit konnte erstmals ein Mechanismus der – vorher lediglich aufgrund der Herabregulation in PCa-Nativmaterial postulierten – tumorsuppressiven Funktion von miR-221 im Rahmen der PCa-Entstehung und -Progression dargestellt werden.

Eine Aktivierung des JAK / STAT-vermittelten Interferon-Signals durch miR-221 erscheint auch in einem breiteren infektiologischen Kontext interessant – sind doch zahlreiche Virenarten wie das HI-Virus, Hepatitis- und Herpesviren in der Lage, die zelluläre miR-221-Expression zu vermindern und auf diese Weise wohl das antivirale Interferon-Signal zu umgehen. Die Erhöhung der zellulären miR-221-Spiegel könnte nach diesem Prinzip auch Interferon-basierte Therapie-Strategien unterstützen bzw. erst ermöglichen.

Für das PCa müssen weitere experimentelle sowie klinisch-translazionale Untersuchungen zeigen, ob miR-221 als Bestandteil einer Biomarker-Signatur dazu beiträgt, Patienten mit einem letalen PCa frühzeitig zu identifizieren und der dringend

notwendigen Primärtherapie bzw. einer adjuvanten Behandlung zuzuführen. Im Gegenzug könnte zahlreichen Patienten, deren (hohe) miR-221-Expression im Tumorgewebe einen günstigeren Verlauf prognostiziert, die übermäßige Therapie erspart werden.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Thompson, I.M., Jr. und C.M. Tangen, *Prostate cancer - uncertainty and a way forward*. N Engl J Med, 2012. **367**(3): p. 270-1.
2. Bray, F. et al., *Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 1995*. Eur J Cancer, 2002. **38**(1): p. 99-166.
3. Ferlay, J. et al., *Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012*. Eur J Cancer, 2013. **49**(6): p. 1374-403.
4. Schroder, F.H. et al., *Screening and prostate-cancer mortality in a randomized European study*. N Engl J Med, 2009. **360**(13): p. 1320-8.
5. Schroder, F.H. et al., *Prostate-cancer mortality at 11 years of follow-up*. N Engl J Med, 2012. **366**(11): p. 981-90.
6. Schroder, F.H. 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*. Lancet, 2014. **384**(9959): p. 2027-35.
7. Cooperberg, M.R., P.R. Carroll und L. Klotz, *Active surveillance for prostate cancer: progress and promise*. J Clin Oncol, 2011. **29**(27): p. 3669-76.
8. Bill-Axelsson, A. et al., *Radical prostatectomy versus watchful waiting in early prostate cancer*. N Engl J Med, 2011. **364**(18): p. 1708-17.
9. Wilt, T.J. et al., *Radical prostatectomy versus observation for localized prostate cancer*. N Engl J Med, 2012. **367**(3): p. 203-13.
10. Tannock, I.F., *Eradication of a disease: how we cured symptomless prostate cancer*. The Lancet, 2002. **359**(9314): p. 1341-1342.
11. Etzioni, R. et al., *Overdiagnosis due to prostate-specific antigen screening: lessons from U.S. prostate cancer incidence trends*. J Natl Cancer Inst, 2002. **94**(13): p. 981-90.
12. Carter, H.B., *Prostate cancers in men with low PSA levels--must we find them?* N Engl J Med, 2004. **350**(22): p. 2292-4.
13. Moyer, V.A. und U.S.P.S.T. Force, *Screening for prostate cancer: U.S. Preventive Services Task Force recommendation statement*. Ann Intern Med, 2012. **157**(2): p. 120-34.
14. Katz, M.H., *Can we stop ordering prostate-specific antigen screening tests?* JAMA Intern Med, 2013. **173**(10): p. 847-8.
15. Keller, D.L., *Why I will continue to screen prostate-specific antigen for myself and other appropriate men*. JAMA Intern Med, 2014. **174**(1): p. 164.
16. Meng, M.V. et al., *Treatment of patients with high risk localized prostate cancer: results from cancer of the prostate strategic urological research endeavor (CaPSURE)*. J Urol, 2005. **173**(5): p. 1557-61.
17. Joniau, S. et al., *Stratification of high-risk prostate cancer into prognostic categories: a European multi-institutional study*. Eur Urol, 2015. **67**(1): p. 157-64.
18. Ambros, V., *A hierarchy of regulatory genes controls a larva-to-adult developmental switch in C. elegans*. Cell, 1989. **57**(1): p. 49-57.
19. Lee, R.C., R.L. Feinbaum und V. Ambros, *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*. Cell, 1993. **75**(5): p. 843-54.



20. Wightman, B., I. Ha und G. Ruvkun, *Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in C. elegans*. Cell, 1993. **75**(5): p. 855-62.
21. Ruvkun, G., B. Wightman und I. Ha, *The 20 years it took to recognize the importance of tiny RNAs*. Cell, 2004. **116**(2 Suppl): p. S93-6, 2 p following S96.
22. He, L. und G.J. Hannon, *MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation*. Nat Rev Genet, 2004. **5**(7): p. 522-31.
23. Wu, L. und J.G. Belasco, *Let me count the ways: mechanisms of gene regulation by miRNAs and siRNAs*. Mol Cell, 2008. **29**(1): p. 1-7.
24. Breving, K. und A. Esquela-Kerscher, *The complexities of microRNA regulation: mirandering around the rules*. Int J Biochem Cell Biol, 2010. **42**(8): p. 1316-29.
25. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. Cell, 2004. **116**(2): p. 281-97.
26. Calin, G.A. et al., *Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(9): p. 2999-3004.
27. Calin, G.A. und C.M. Croce, *MicroRNA signatures in human cancers*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(11): p. 857-66.
28. Calin, G.A. und C.M. Croce, *MicroRNA-cancer connection: the beginning of a new tale*. Cancer Res, 2006. **66**(15): p. 7390-4.
29. Zhang, B. et al., *microRNAs as oncogenes and tumor suppressors*. Dev Biol, 2007. **302**(1): p. 1-12.
30. Sotiropoulou, G. et al., *Emerging roles of microRNAs as molecular switches in the integrated circuit of the cancer cell*. RNA, 2009. **15**(8): p. 1443-61.
31. Olson, P. et al., *MicroRNA dynamics in the stages of tumorigenesis correlate with hallmark capabilities of cancer*. Genes Dev, 2009. **23**(18): p. 2152-65.
32. Nair, V.S., L.S. Maeda und J.P. Ioannidis, *Clinical outcome prediction by microRNAs in human cancer: a systematic review*. J Natl Cancer Inst, 2012. **104**(7): p. 528-40.
33. Chan, E., D.E. Prado und J.B. Weidhaas, *Cancer microRNAs: from subtype profiling to predictors of response to therapy*. Trends Mol Med, 2011. **17**(5): p. 235-43.
34. Casanova-Salas, I. et al., *miRNAs as biomarkers in prostate cancer*. Clin Transl Oncol, 2012. **14**(11): p. 803-11.
35. Kong, D. et al., *miR-200 regulates PDGF-D-mediated epithelial-mesenchymal transition, adhesion, and invasion of prostate cancer cells*. Stem Cells, 2009. **27**(8): p. 1712-21.
36. Gandellini, P. et al., *miR-205 Exerts tumor-suppressive functions in human prostate through down-regulation of protein kinase Cepsilon*. Cancer Res, 2009. **69**(6): p. 2287-95.
37. Puhr, M. et al., *Epithelial-to-mesenchymal transition leads to docetaxel resistance in prostate cancer and is mediated by reduced expression of miR-200c and miR-205*. Am J Pathol, 2012. **181**(6): p. 2188-201.
38. Bhatnagar, N. et al., *Downregulation of miR-205 and miR-31 confers resistance to chemotherapy-induced apoptosis in prostate cancer cells*. Cell Death Dis, 2010. **1**: p. e105.
39. Kopp, F. et al., *miR-200c sensitizes breast cancer cells to doxorubicin treatment by decreasing TrkB and Bmi1 expression*. PLoS One, 2012. **7**(11): p. e50469.

40. Yu, J. et al., *miR-200b suppresses cell proliferation, migration and enhances chemosensitivity in prostate cancer by regulating Bmi-1*. *Oncol Rep*, 2014. **31**(2): p. 910-8.
41. Esquela-Kerscher, A. und F.J. Slack, *Oncomirs - microRNAs with a role in cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2006. **6**(4): p. 259-69.
42. Barbano, R. et al., *A miRNA signature for defining aggressive phenotype and prognosis in gliomas*. *PLoS One*, 2014. **9**(10): p. e108950.
43. Marino, A.L. et al., *MicroRNA expression as risk biomarker of breast cancer metastasis: a pilot retrospective case-cohort study*. *BMC Cancer*, 2014. **14**: p. 739.
44. Wang, Z. et al., *Prognostic role of MicroRNA-21 in gastric cancer: a meta-analysis*. *Med Sci Monit*, 2014. **20**: p. 1668-74.
45. Vergho, D. et al., *Combination of expression levels of miR-21 and miR-126 is associated with cancer-specific survival in clear-cell renal cell carcinoma*. *BMC Cancer*, 2014. **14**: p. 25.
46. Gowrishankar, B. et al., *MicroRNA expression signatures of stage, grade, and progression in clear cell RCC*. *Cancer Biol Ther*, 2014. **15**(3): p. 329-41.
47. Ribas, J. et al., *miR-21: an androgen receptor-regulated microRNA that promotes hormone-dependent and hormone-independent prostate cancer growth*. *Cancer Res*, 2009. **69**(18): p. 7165-9.
48. Reis, S.T. et al., *miR-21 may acts as an oncomir by targeting RECK, a matrix metalloproteinase regulator, in prostate cancer*. *BMC Urol*, 2012. **12**: p. 14.
49. Takahashi, C. et al., *Regulation of matrix metalloproteinase-9 and inhibition of tumor invasion by the membrane-anchored glycoprotein RECK*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(22): p. 13221-6.
50. Oh, J. et al., *The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis*. *Cell*, 2001. **107**(6): p. 789-800.
51. Frankel, L.B. et al., *Programmed cell death 4 (PDCD4) is an important functional target of the microRNA miR-21 in breast cancer cells*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(2): p. 1026-33.
52. Li, T. et al., *MicroRNA-21 directly targets MARCKS and promotes apoptosis resistance and invasion in prostate cancer cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009. **383**(3): p. 280-5.
53. Lee, E.J. et al., *Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer*. *Int J Cancer*, 2007. **120**(5): p. 1046-54.
54. Kim, Y.K. et al., *Functional links between clustered microRNAs: suppression of cell-cycle inhibitors by microRNA clusters in gastric cancer*. *Nucleic Acids Res*, 2009. **37**(5): p. 1672-81.
55. Sun, K. et al., *MicroRNA-221 inhibits CDKN1C/p57 expression in human colorectal carcinoma*. *Acta Pharmacol Sin*, 2011. **32**(3): p. 375-84.
56. Galardi, S. et al., *miR-221 and miR-222 expression affects the proliferation potential of human prostate carcinoma cell lines by targeting p27Kip1*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(32): p. 23716-24.
57. Mercatelli, N. et al., *The inhibition of the highly expressed miR-221 and miR-222 impairs the growth of prostate carcinoma xenografts in mice*. *PLoS One*, 2008. **3**(12): p. e4029.

58. Garofalo, M. et al., *miR-221&222 regulate TRAIL resistance and enhance tumorigenicity through PTEN and TIMP3 downregulation*. *Cancer Cell*, 2009. **16**(6): p. 498-509.
59. Sarkar, S. et al., *Down-regulation of miR-221 inhibits proliferation of pancreatic cancer cells through up-regulation of PTEN, p27(kip1), p57(kip2), and PUMA*. *Am J Cancer Res*, 2013. **3**(5): p. 465-77.
60. Chun-Zhi, Z. et al., *MicroRNA-221 and microRNA-222 regulate gastric carcinoma cell proliferation and radioresistance by targeting PTEN*. *BMC Cancer*, 2010. **10**: p. 367.
61. Li, J., *PTEN, a Putative Protein Tyrosine Phosphatase Gene Mutated in Human Brain, Breast, and Prostate Cancer*. *Science*, 1997. **275**(5308): p. 1943-1947.
62. Cairns, P. et al., *Frequent inactivation of PTEN/MMAC1 in primary prostate cancer*. *Cancer Res*, 1997. **57**(22): p. 4997-5000.
63. Spahn, M. et al., *Expression of microRNA-221 is progressively reduced in aggressive prostate cancer and metastasis and predicts clinical recurrence*. *Int J Cancer*, 2010. **127**(2): p. 394-403.
64. Yang, J. et al., *Prognostic role of microRNA-221 in various human malignant neoplasms: a meta-analysis of 20 related studies*. *PLoS One*, 2014. **9**(1): p. e87606.
65. Felli, N. et al., *MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(50): p. 18081-6.
66. Horoszewicz, J.S. et al., *LNCaP model of human prostatic carcinoma*. *Cancer Res*, 1983. **43**(4): p. 1809-18.
67. Stone, K.R. et al., *Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145)*. *Int J Cancer*, 1978. **21**(3): p. 274-81.
68. Mickey, D.D. et al., *Heterotransplantation of a human prostatic adenocarcinoma cell line in nude mice*. *Cancer Res*, 1977. **37**(11): p. 4049-58.
69. Kaighn, M.E. et al., *Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3)*. *Invest Urol*, 1979. **17**(1): p. 16-23.
70. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. *J Immunol Methods*, 1983. **65**(1-2): p. 55-63.
71. Cory, A.H. et al., *Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture*. *Cancer Commun*, 1991. **3**(7): p. 207-12.
72. Samarajiwa, S.A. et al., *INTERFEROME: the database of interferon regulated genes*. *Nucleic Acids Res*, 2009. **37**(Database issue): p. D852-7.
73. Huang da, W., B.T. Sherman und R.A. Lempicki, *Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources*. *Nat Protoc*, 2009. **4**(1): p. 44-57.
74. Huang da, W., B.T. Sherman und R.A. Lempicki, *Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists*. *Nucleic Acids Res*, 2009. **37**(1): p. 1-13.
75. Betel, D. et al., *The microRNA.org resource: targets and expression*. *Nucleic Acids Res*, 2008. **36**(Database issue): p. D149-53.
76. Wang, X., *miRDB: a microRNA target prediction and functional annotation database with a wiki interface*. *RNA*, 2008. **14**(6): p. 1012-7.
77. Wang, X. und I.M. El Naqa, *Prediction of both conserved and nonconserved microRNA targets in animals*. *Bioinformatics*, 2008. **24**(3): p. 325-32.

78. Krek, A. et al., *Combinatorial microRNA target predictions*. Nat Genet, 2005. **37**(5): p. 495-500.
79. Lewis, B.P., C.B. Burge und D.P. Bartel, *Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets*. Cell, 2005. **120**(1): p. 15-20.
80. Grimson, A. et al., *MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing*. Mol Cell, 2007. **27**(1): p. 91-105.
81. Mullis, K. et al., *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1986. **51 Pt 1**: p. 263-73.
82. Saiki, R.K. et al., *Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia*. Science, 1985. **230**(4732): p. 1350-4.
83. Saiki, R.K. et al., *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*. Science, 1988. **239**(4839): p. 487-91.
84. Schneeberger, C. et al., *Quantitative detection of reverse transcriptase-PCR products by means of a novel and sensitive DNA stain*. PCR Methods Appl, 1995. **4**(4): p. 234-8.
85. Renart, J., J. Reiser und G.R. Stark, *Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(7): p. 3116-20.
86. Towbin, H., T. Staehelin und J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(9): p. 4350-4.
87. Shuai, K. et al., *Activation of transcription by IFN-gamma: tyrosine phosphorylation of a 91-kD DNA binding protein*. Science, 1992. **258**(5089): p. 1808-12.
88. Qureshi, S.A., M. Salditt-Georgieff und J.E. Darnell, Jr., *Tyrosine-phosphorylated Stat1 and Stat2 plus a 48-kDa protein all contact DNA in forming interferon-stimulated-gene factor 3*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(9): p. 3829-33.
89. Harada, H. et al., *Structurally similar but functionally distinct factors, IRF-1 and IRF-2, bind to the same regulatory elements of IFN and IFN-inducible genes*. Cell, 1989. **58**(4): p. 729-39.
90. Harada, H. et al., *Structure and regulation of the human interferon regulatory factor 1 (IRF-1) and IRF-2 genes: implications for a gene network in the interferon system*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(2): p. 1500-9.
91. Song, M.M. und K. Shuai, *The suppressor of cytokine signaling (SOCS) 1 and SOCS3 but not SOCS2 proteins inhibit interferon-mediated antiviral and antiproliferative activities*. J Biol Chem, 1998. **273**(52): p. 35056-62.
92. Bhattacharyya, S. et al., *Glucocorticoids target suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) and type I interferons to regulate Toll-like receptor-induced STAT1 activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(23): p. 9554-9.
93. Bode, J.G. et al., *IFN-alpha antagonistic activity of HCV core protein involves induction of suppressor of cytokine signaling-3*. FASEB J, 2003. **17**(3): p. 488-90.

94. Wu, T.R. et al., *SHP-2 is a dual-specificity phosphatase involved in Stat1 dephosphorylation at both tyrosine and serine residues in nuclei*. J Biol Chem, 2002. **277**(49): p. 47572-80.
95. Baron, M. und J.L. Davignon, *Inhibition of IFN-gamma-induced STAT1 tyrosine phosphorylation by human CMV is mediated by SHP2*. J Immunol, 2008. **181**(8): p. 5530-6.
96. Liu, B. et al., *Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(18): p. 10626-31.
97. Liu, B. et al., *A transcriptional corepressor of Stat1 with an essential LXXLL signature motif*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(6): p. 3203-7.
98. Kubota, T. et al., *PIASy inhibits virus-induced and interferon-stimulated transcription through distinct mechanisms*. J Biol Chem, 2011. **286**(10): p. 8165-75.
99. Nicoloso, M.S. et al., *MicroRNAs--the micro steering wheel of tumour metastases*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(4): p. 293-302.
100. Visone, R. et al., *MicroRNAs (miR)-221 and miR-222, both overexpressed in human thyroid papillary carcinomas, regulate p27Kip1 protein levels and cell cycle*. Endocr Relat Cancer, 2007. **14**(3): p. 791-8.
101. Felicetti, F. et al., *The promyelocytic leukemia zinc finger-microRNA-221/-222 pathway controls melanoma progression through multiple oncogenic mechanisms*. Cancer Res, 2008. **68**(8): p. 2745-54.
102. Fornari, F. et al., *MiR-221 controls CDKN1C/p57 and CDKN1B/p27 expression in human hepatocellular carcinoma*. Oncogene, 2008. **27**(43): p. 5651-61.
103. Fu, X. et al., *Clinical significance of miR-221 and its inverse correlation with p27Kip1 in hepatocellular carcinoma*. Mol Biol Rep, 2011. **38**(5): p. 3029-35.
104. Sun, T. et al., *The role of microRNA-221 and microRNA-222 in androgen-independent prostate cancer cell lines*. Cancer Res, 2009. **69**(8): p. 3356-63.
105. Xu, G. et al., *Characterization of the small RNA transcriptomes of androgen dependent and independent prostate cancer cell line by deep sequencing*. PLoS One, 2010. **5**(11): p. e15519.
106. Radojicic, J. et al., *MicroRNA expression analysis in triple-negative (ER, PR and Her2/neu) breast cancer*. Cell Cycle, 2011. **10**(3): p. 507-517.
107. Hui, A.B. et al., *Robust global micro-RNA profiling with formalin-fixed paraffin-embedded breast cancer tissues*. Lab Invest, 2009. **89**(5): p. 597-606.
108. Ciafre, S.A. et al., *Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **334**(4): p. 1351-8.
109. Conti, A. et al., *miR-21 and 221 upregulation and miR-181b downregulation in human grade II-IV astrocytic tumors*. J Neurooncol, 2009. **93**(3): p. 325-32.
110. Koelz, M. et al., *Down-regulation of miR-221 and miR-222 correlates with pronounced Kit expression in gastrointestinal stromal tumors*. Int J Oncol, 2011. **38**(2): p. 503-11.
111. Subramanian, S. et al., *MicroRNA expression signature of human sarcomas*. Oncogene, 2008. **27**(14): p. 2015-26.
112. Gramantieri, L. et al., *MicroRNA-221 targets Bmf in hepatocellular carcinoma and correlates with tumor multifocality*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(16): p. 5073-81.
113. Pineau, P. et al., *miR-221 overexpression contributes to liver tumorigenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(1): p. 264-9.

114. Rong, M., G. Chen und Y. Dang, *Increased miR-221 expression in hepatocellular carcinoma tissues and its role in enhancing cell growth and inhibiting apoptosis in vitro*. BMC Cancer, 2013. **13**: p. 21.
115. O'Hara, A.J. et al., *Tumor suppressor microRNAs are underrepresented in primary effusion lymphoma and Kaposi sarcoma*. Blood, 2009. **113**(23): p. 5938-41.
116. Heinzelmann, J. et al., *Specific miRNA signatures are associated with metastasis and poor prognosis in clear cell renal cell carcinoma*. World J Urol, 2011. **29**(3): p. 367-73.
117. Nakada, C. et al., *Genome-wide microRNA expression profiling in renal cell carcinoma: significant down-regulation of miR-141 and miR-200c*. J Pathol, 2008. **216**(4): p. 418-27.
118. Avissar, M. et al., *MicroRNA expression ratio is predictive of head and neck squamous cell carcinoma*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(8): p. 2850-5.
119. Liu, K. et al., *Increased Expression of MicroRNA-221 in Gastric Cancer and Its Clinical Significance*. Journal of International Medical Research, 2012. **40**(2): p. 467-474.
120. Sempere, L.F. et al., *Altered MicroRNA expression confined to specific epithelial cell subpopulations in breast cancer*. Cancer Res, 2007. **67**(24): p. 11612-20.
121. Duncavage, E. et al., *Use of microRNA expression levels to predict outcomes in resected stage I non-small cell lung cancer*. J Thorac Oncol, 2010. **5**(11): p. 1755-63.
122. Yu, S.L. et al., *MicroRNA signature predicts survival and relapse in lung cancer*. Cancer Cell, 2008. **13**(1): p. 48-57.
123. Dahiya, N. et al., *MicroRNA expression and identification of putative miRNA targets in ovarian cancer*. PLoS One, 2008. **3**(6): p. e2436.
124. Zhang, Y. et al., *Profiling of 95 microRNAs in pancreatic cancer cell lines and surgical specimens by real-time PCR analysis*. World J Surg, 2009. **33**(4): p. 698-709.
125. Panarelli, N.C. et al., *MicroRNA expression aids the preoperative diagnosis of pancreatic ductal adenocarcinoma*. Pancreas, 2012. **41**(5): p. 685-90.
126. He, H. et al., *The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(52): p. 19075-80.
127. Chen, Y.T. et al., *MicroRNA analysis as a potential diagnostic tool for papillary thyroid carcinoma*. Mod Pathol, 2008. **21**(9): p. 1139-46.
128. Ambis, S. et al., *Genomic profiling of microRNA and messenger RNA reveals deregulated microRNA expression in prostate cancer*. Cancer Res, 2008. **68**(15): p. 6162-70.
129. Gordanpour, A. et al., *miR-221 Is down-regulated in TMPRSS2:ERG fusion-positive prostate cancer*. Anticancer Res, 2011. **31**(2): p. 403-10.
130. Porkka, K.P. et al., *MicroRNA expression profiling in prostate cancer*. Cancer Res, 2007. **67**(13): p. 6130-5.
131. He, H.C. et al., *Global analysis of the differentially expressed miRNAs of prostate cancer in Chinese patients*. BMC Genomics, 2013. **14**: p. 757.
132. Schaefer, A. et al., *Diagnostic and prognostic implications of microRNA profiling in prostate carcinoma*. Int J Cancer, 2010. **126**(5): p. 1166-76.
133. Dupuis, S. et al., *Impaired response to interferon-alpha/beta and lethal viral disease in human STAT1 deficiency*. Nat Genet, 2003. **33**(3): p. 388-91.

134. Klover, P.J. et al., *Loss of STAT1 from mouse mammary epithelium results in an increased Neu-induced tumor burden*. Neoplasia, 2010. **12**(11): p. 899-905.
135. Chan, S.R. et al., *STAT1-deficient mice spontaneously develop estrogen receptor alpha-positive luminal mammary carcinomas*. Breast Cancer Res, 2012. **14**(1): p. R16.
136. Ramana, C.V. et al., *Complex roles of Stat1 in regulating gene expression*. Oncogene, 2000. **19**(21): p. 2619-27.
137. Cheon, H. und G.R. Stark, *Unphosphorylated STAT1 prolongs the expression of interferon-induced immune regulatory genes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(23): p. 9373-8.
138. Kim, S. et al., *Stat1 functions as a cytoplasmic attenuator of Runx2 in the transcriptional program of osteoblast differentiation*. Genes Dev, 2003. **17**(16): p. 1979-91.
139. Chua, C.W. et al., *Suppression of androgen-independent prostate cancer cell aggressiveness by FTY720: validating Runx2 as a potential antimetastatic drug screening platform*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(13): p. 4322-35.
140. Akech, J. et al., *Runx2 association with progression of prostate cancer in patients: mechanisms mediating bone osteolysis and osteoblastic metastatic lesions*. Oncogene, 2010. **29**(6): p. 811-21.
141. Chen, F.F. et al., *Function and mechanism by which interferon regulatory factor-1 inhibits oncogenesis*. Oncol Lett, 2013. **5**(2): p. 417-423.
142. Fujita, T. et al., *Induction of endogenous IFN-alpha and IFN-beta genes by a regulatory transcription factor, IRF-1*. Nature, 1989. **337**(6204): p. 270-2.
143. Harada, H. et al., *Anti-oncogenic and oncogenic potentials of interferon regulatory factors-1 and -2*. Science, 1993. **259**(5097): p. 971-4.
144. Taniguchi, T., M.S. Lamphier und N. Tanaka, *IRF-1: the transcription factor linking the interferon response and oncogenesis*. Biochim Biophys Acta, 1997. **1333**(1): p. M9-17.
145. Tanaka, N., M. Ishihara und T. Taniguchi, *Suppression of c-myc or fosB-induced cell transformation by the transcription factor IRF-1*. Cancer Lett, 1994. **83**(1-2): p. 191-6.
146. Tanaka, N. et al., *Cellular commitment to oncogene-induced transformation or apoptosis is dependent on the transcription factor IRF-1*. Cell, 1994. **77**(6): p. 829-39.
147. Kroger, A. et al., *IRF-1 reverts the transformed phenotype of oncogenically transformed cells in vitro and in vivo*. Oncogene, 2003. **22**(7): p. 1045-56.
148. Nozawa, H. et al., *Loss of transcription factor IRF-1 affects tumor susceptibility in mice carrying the Ha-ras transgene or nullizygoty for p53*. Genes Dev, 1999. **13**(10): p. 1240-5.
149. Veals, S.A. et al., *Subunit of an alpha-interferon-responsive transcription factor is related to interferon regulatory factor and Myb families of DNA-binding proteins*. Mol Cell Biol, 1992. **12**(8): p. 3315-24.
150. Borden, E.C. et al., *Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine*. Nat Rev Drug Discov, 2007. **6**(12): p. 975-90.
151. Maiwald, T. et al., *Combining theoretical analysis and experimental data generation reveals IRF9 as a crucial factor for accelerating interferon alpha-induced early antiviral signalling*. FEBS J, 2010. **277**(22): p. 4741-54.
152. Tsuno, T. et al., *IRF9 is a key factor for eliciting the antiproliferative activity of IFN-alpha*. J Immunother, 2009. **32**(8): p. 803-16.

153. Kumar-Sinha, C. et al., *Molecular cross-talk between the TRAIL and interferon signaling pathways*. J Biol Chem, 2002. **277**(1): p. 575-85.
154. Clarke, N. et al., *Tumor suppressor IRF-1 mediates retinoid and interferon anticancer signaling to death ligand TRAIL*. EMBO J, 2004. **23**(15): p. 3051-60.
155. Yeung, M.L. et al., *Changes in microRNA expression profiles in HIV-1-transfected human cells*. Retrovirology, 2005. **2**: p. 81.
156. Bennasser, Y., M.L. Yeung und K.T. Jeang, *HIV-1 TAR RNA subverts RNA interference in transfected cells through sequestration of TAR RNA-binding protein, TRBP*. J Biol Chem, 2006. **281**(38): p. 27674-8.
157. Zhang, Z.Z. et al., *Hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma at the miRNA level*. World J Gastroenterol, 2011. **17**(28): p. 3353-8.
158. Othumpangat, S., C. Walton und G. Piedimonte, *MicroRNA-221 modulates RSV replication in human bronchial epithelium by targeting NGF expression*. PLoS One, 2012. **7**(1): p. e30030.
159. Thornburg, N.J., S.L. Hayward und J.E. Crowe, Jr., *Respiratory syncytial virus regulates human microRNAs by using mechanisms involving beta interferon and NF-kappaB*. MBio, 2012. **3**(6).
160. Wald, A.I. et al., *Alteration of microRNA profiles in squamous cell carcinoma of the head and neck cell lines by human papillomavirus*. Head Neck, 2011. **33**(4): p. 504-12.
161. Imig, J. et al., *microRNA profiling in Epstein-Barr virus-associated B-cell lymphoma*. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(5): p. 1880-93.
162. Wang, F.Z. et al., *Human cytomegalovirus infection alters the expression of cellular microRNA species that affect its replication*. J Virol, 2008. **82**(18): p. 9065-74.
163. Wu, Y.H. et al., *The manipulation of miRNA-gene regulatory networks by KSHV induces endothelial cell motility*. Blood, 2011. **118**(10): p. 2896-905.
164. Xu, G. et al., *MiR-221 accentuates IFNs anti-HCV effect by downregulating SOCS1 and SOCS3*. Virology, 2014. **462-463**: p. 343-50.
165. Hu, G. et al., *miR-221 suppresses ICAM-1 translation and regulates interferon-gamma-induced ICAM-1 expression in human cholangiocytes*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2010. **298**(4): p. G542-50.
166. Zhang, C. et al., *Global changes of mRNA expression reveals an increased activity of the interferon-induced signal transducer and activator of transcription (STAT) pathway by repression of miR-221/222 in glioblastoma U251 cells*. Int J Oncol, 2010. **36**(6): p. 1503-12.
167. Das, S.K. et al., *Human polynucleotide phosphorylase selectively and preferentially degrades microRNA-221 in human melanoma cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(26): p. 11948-53.
168. Garofalo, M. et al., *MicroRNA signatures of TRAIL resistance in human non-small cell lung cancer*. Oncogene, 2008. **27**(27): p. 3845-55.
169. Acunzo, M. et al., *miR-130a targets MET and induces TRAIL-sensitivity in NSCLC by downregulating miR-221 and 222*. Oncogene, 2012. **31**(5): p. 634-42.
170. Garofalo, M. et al., *EGFR and MET receptor tyrosine kinase-altered microRNA expression induces tumorigenesis and gefitinib resistance in lung cancers*. Nat Med, 2012. **18**(1): p. 74-82.
171. Dunn, G.P. et al., *IFN unresponsiveness in LNCaP cells due to the lack of JAK1 gene expression*. Cancer Res, 2005. **65**(8): p. 3447-53.



172. Xiang, Y. et al., *Effects of RNase L mutations associated with prostate cancer on apoptosis induced by 2',5'-oligoadenylates*. *Cancer Res*, 2003. **63**(20): p. 6795-801.
173. Silverman, R.H., *Implications for RNase L in prostate cancer biology*. *Biochemistry*, 2003. **42**(7): p. 1805-12.
174. Bellezza, I. et al., *Suppressor of cytokine signaling-3 antagonizes cAMP effects on proliferation and apoptosis and is expressed in human prostate cancer*. *Am J Pathol*, 2006. **169**(6): p. 2199-208.
175. Echchgadda, I. et al., *Oncolytic targeting of androgen-sensitive prostate tumor by the respiratory syncytial virus (RSV): consequences of deficient interferon-dependent antiviral defense*. *BMC Cancer*, 2011. **11**: p. 43.
176. Stojdl, D.F. et al., *Exploiting tumor-specific defects in the interferon pathway with a previously unknown oncolytic virus*. *Nat Med*, 2000. **6**(7): p. 821-5.
177. Carey, B.L. et al., *Early steps of the virus replication cycle are inhibited in prostate cancer cells resistant to oncolytic vesicular stomatitis virus*. *J Virol*, 2008. **82**(24): p. 12104-15.
178. Kawaguchi, Y. et al., *Efficient eradication of hormone-resistant human prostate cancers by inactivated Sendai virus particle*. *Int J Cancer*, 2009. **124**(10): p. 2478-87.
179. Gao, H. et al., *Induction of apoptosis in hormone-resistant human prostate cancer PC3 cells by inactivated Sendai virus*. *Biomed Environ Sci*, 2014. **27**(7): p. 506-14.
180. Matsushima-Miyagi, T. et al., *TRAIL and Noxa are selectively upregulated in prostate cancer cells downstream of the RIG-I/MAVS signaling pathway by nonreplicating Sendai virus particles*. *Clin Cancer Res*, 2012. **18**(22): p. 6271-83.
181. Paun, A. und P.M. Pitha, *The IRF family, revisited*. *Biochimie*, 2007. **89**(6-7): p. 744-53.
182. Zimring, J.C., S. Goodbourn und M.K. Offermann, *Human herpesvirus 8 encodes an interferon regulatory factor (IRF) homolog that represses IRF-1-mediated transcription*. *J Virol*, 1998. **72**(1): p. 701-7.
183. Burysek, L. und P.M. Pitha, *Latently expressed human herpesvirus 8-encoded interferon regulatory factor 2 inhibits double-stranded RNA-activated protein kinase*. *J Virol*, 2001. **75**(5): p. 2345-52.
184. Matsuyama, T. et al., *Targeted disruption of IRF-1 or IRF-2 results in abnormal type I IFN gene induction and aberrant lymphocyte development*. *Cell*, 1993. **75**(1): p. 83-97.
185. Lohoff, M. et al., *Deficiency in the transcription factor interferon regulatory factor (IRF)-2 leads to severely compromised development of natural killer and T helper type 1 cells*. *J Exp Med*, 2000. **192**(3): p. 325-36.
186. Tanaka, N. und T. Taniguchi, *The interferon regulatory factors and oncogenesis*. *Semin Cancer Biol*, 2000. **10**(2): p. 73-81.
187. Yi, Y. et al., *Interferon regulatory factor (IRF)-1 and IRF-2 are associated with prognosis and tumor invasion in HCC*. *Ann Surg Oncol*, 2013. **20**(1): p. 267-76.
188. Yim, J.H. et al., *Enhancing in vivo tumorigenicity of B16 melanoma by overexpressing interferon regulatory factor-2: resistance to endogenous IFN-gamma*. *J Interferon Cytokine Res*, 1999. **19**(7): p. 723-9.

189. Yim, J.H. et al., *The role of interferon regulatory factor-1 and interferon regulatory factor-2 in IFN-gamma growth inhibition of human breast carcinoma cell lines*. J Interferon Cytokine Res, 2003. **23**(9): p. 501-11.
190. Wang, Y. et al., *Negative feedback regulation of IFN-gamma pathway by IFN regulatory factor 2 in esophageal cancers*. Cancer Res, 2008. **68**(4): p. 1136-43.
191. Chae, M. et al., *IRF-2 regulates NF-kappaB activity by modulating the subcellular localization of NF-kappaB*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **370**(3): p. 519-24.
192. Palayoor, S.T. et al., *Constitutive activation of IkappaB kinase alpha and NF-kappaB in prostate cancer cells is inhibited by ibuprofen*. Oncogene, 1999. **18**(51): p. 7389-94.
193. Huang, S. et al., *Blockade of NF-kappaB activity in human prostate cancer cells is associated with suppression of angiogenesis, invasion, and metastasis*. Oncogene, 2001. **20**(31): p. 4188-97.
194. Rajasekhar, V.K. et al., *Tumour-initiating stem-like cells in human prostate cancer exhibit increased NF-kappaB signalling*. Nat Commun, 2011. **2**: p. 162.
195. Vaughan, P.S. et al., *Activation of a cell-cycle-regulated histone gene by the oncogenic transcription factor IRF-2*. Nature, 1995. **377**(6547): p. 362-5.
196. Vaughan, P.S. et al., *Cell cycle regulation of histone H4 gene transcription requires the oncogenic factor IRF-2*. J Biol Chem, 1998. **273**(1): p. 194-9.
197. Krebs, D.L. und D.J. Hilton, *SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling*. Stem Cells, 2001. **19**(5): p. 378-87.
198. Vlotides, G. et al., *SOCS-1 and SOCS-3 inhibit IFN-alpha-induced expression of the antiviral proteins 2,5-OAS and MxA*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **320**(3): p. 1007-14.
199. Zimmerer, J.M. et al., *IFN-alpha-induced signal transduction, gene expression, and antitumor activity of immune effector cells are negatively regulated by suppressor of cytokine signaling proteins*. J Immunol, 2007. **178**(8): p. 4832-45.
200. Akhtar, L.N. und E.N. Benveniste, *Viral exploitation of host SOCS protein functions*. J Virol, 2011. **85**(5): p. 1912-21.
201. Koeberlein, B. et al., *Hepatitis B virus overexpresses suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS3) thereby contributing to severity of inflammation in the liver*. Virus Res, 2010. **148**(1-2): p. 51-9.
202. Persico, M. et al., *Elevated expression and polymorphisms of SOCS3 influence patient response to antiviral therapy in chronic hepatitis C*. Gut, 2008. **57**(4): p. 507-15.
203. Akhtar, L.N. et al., *Suppressor of cytokine signaling 3 inhibits antiviral IFN-beta signaling to enhance HIV-1 replication in macrophages*. J Immunol, 2010. **185**(4): p. 2393-404.
204. Pauli, E.K. et al., *Influenza A virus inhibits type I IFN signaling via NF-kappaB-dependent induction of SOCS-3 expression*. PLoS Pathog, 2008. **4**(11): p. e1000196.
205. Pothlichet, J., M. Chignard und M. Si-Tahar, *Cutting edge: innate immune response triggered by influenza A virus is negatively regulated by SOCS1 and SOCS3 through a RIG-I/IFNAR1-dependent pathway*. J Immunol, 2008. **180**(4): p. 2034-8.
206. Michaud, F. et al., *Epstein-Barr virus interferes with the amplification of IFNalpha secretion by activating suppressor of cytokine signaling 3 in primary human monocytes*. PLoS One, 2010. **5**(7): p. e11908.

207. Yokota, S. et al., *Induction of suppressor of cytokine signaling-3 by herpes simplex virus type 1 confers efficient viral replication*. *Virology*, 2005. **338**(1): p. 173-81.
208. Butler, L.M. et al., *Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus inhibits expression and function of endothelial cell major histocompatibility complex class II via suppressor of cytokine signaling 3*. *J Virol*, 2012. **86**(13): p. 7158-66.
209. Inagaki-Ohara, K. et al., *Enhancement of leptin receptor signaling by SOCS3 deficiency induces development of gastric tumors in mice*. *Oncogene*, 2014. **33**(1): p. 74-84.
210. Lesina, M. et al., *Stat3/Socs3 activation by IL-6 transsignaling promotes progression of pancreatic intraepithelial neoplasia and development of pancreatic cancer*. *Cancer Cell*, 2011. **19**(4): p. 456-69.
211. Riehle, K.J. et al., *Regulation of liver regeneration and hepatocarcinogenesis by suppressor of cytokine signaling 3*. *J Exp Med*, 2008. **205**(1): p. 91-103.
212. Wu, W.Y. et al., *Prognostic significance of phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3 and suppressor of cytokine signaling 3 expression in hepatocellular carcinoma*. *Exp Ther Med*, 2011. **2**(4): p. 647-653.
213. Babon, J.J. et al., *Suppression of cytokine signaling by SOCS3: characterization of the mode of inhibition and the basis of its specificity*. *Immunity*, 2012. **36**(2): p. 239-50.
214. Li, N., S.I. Grivennikov und M. Karin, *The unholy trinity: inflammation, cytokines, and STAT3 shape the cancer microenvironment*. *Cancer Cell*, 2011. **19**(4): p. 429-31.
215. Ho, H.H. und L.B. Ivashkiv, *Role of STAT3 in type I interferon responses. Negative regulation of STAT1-dependent inflammatory gene activation*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(20): p. 14111-8.
216. Wang, W.B., D.E. Levy und C.K. Lee, *STAT3 negatively regulates type I IFN-mediated antiviral response*. *J Immunol*, 2011. **187**(5): p. 2578-85.
217. Regis, G. et al., *Ups and downs: the STAT1:STAT3 seesaw of Interferon and gp130 receptor signalling*. *Semin Cell Dev Biol*, 2008. **19**(4): p. 351-9.
218. Chen, T., L.H. Wang und W.L. Farrar, *Interleukin 6 activates androgen receptor-mediated gene expression through a signal transducer and activator of transcription 3-dependent pathway in LNCaP prostate cancer cells*. *Cancer Res*, 2000. **60**(8): p. 2132-5.
219. Steiner, H. et al., *Accelerated in vivo growth of prostate tumors that up-regulate interleukin-6 is associated with reduced retinoblastoma protein expression and activation of the mitogen-activated protein kinase pathway*. *Am J Pathol*, 2003. **162**(2): p. 655-63.
220. Qu, Y. et al., *Generation of prostate tumor-initiating cells is associated with elevation of reactive oxygen species and IL-6/STAT3 signaling*. *Cancer Res*, 2013. **73**(23): p. 7090-100.
221. Abdulghani, J. et al., *Stat3 promotes metastatic progression of prostate cancer*. *Am J Pathol*, 2008. **172**(6): p. 1717-28.
222. Gu, L. et al., *Transcription factor Stat3 stimulates metastatic behavior of human prostate cancer cells in vivo, whereas Stat5b has a preferential role in the promotion of prostate cancer cell viability and tumor growth*. *Am J Pathol*, 2010. **176**(4): p. 1959-72.

223. Puhr, M. et al., *Down-regulation of suppressor of cytokine signaling-3 causes prostate cancer cell death through activation of the extrinsic and intrinsic apoptosis pathways*. *Cancer Res*, 2009. **69**(18): p. 7375-84.
224. Horndasch, M. und Z. Culig, *SOCS-3 antagonizes pro-apoptotic effects of TRAIL and resveratrol in prostate cancer cells*. *Prostate*, 2011. **71**(12): p. 1357-66.
225. de la Iglesia, N. et al., *Identification of a PTEN-regulated STAT3 brain tumor suppressor pathway*. *Genes Dev*, 2008. **22**(4): p. 449-62.
226. Lu, Y. et al., *Loss of SOCS3 gene expression converts STAT3 function from anti-apoptotic to pro-apoptotic*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(48): p. 36683-90.
227. Jo, D. et al., *Intracellular protein therapy with SOCS3 inhibits inflammation and apoptosis*. *Nat Med*, 2005. **11**(8): p. 892-8.
228. Usui, E. et al., *Upregulated production of IL-6, but not IL-10, by interferon-alpha induces SOCS3 expression and attenuates STAT1 phosphorylation in myeloma cells*. *Hematol J*, 2004. **5**(6): p. 505-12.
229. Takeuchi, K. et al., *Expression of SOCS3 mRNA in bone marrow cells from CML patients associated with cytogenetic response to IFN- $\alpha$* . *Leukemia Research*, 2005. **29**(2): p. 173-178.
230. Brender, C. et al., *Constitutive SOCS-3 expression protects T-cell lymphoma against growth inhibition by IFN  $\alpha$* . *Leukemia*, 2004. **19**(2): p. 209-213.
231. Asirvatham, A.J. et al., *MicroRNA targets in immune genes and the Dicer/Argonaute and ARE machinery components*. *Molecular Immunology*, 2008. **45**(7): p. 1995-2006.
232. Asirvatham, A.J., W.J. Magner und T.B. Tomasi, *miRNA regulation of cytokine genes*. *Cytokine*, 2009. **45**(2): p. 58-69.
233. Grigoryev, Y.A. et al., *MicroRNA Regulation of Molecular Networks Mapped by Global MicroRNA, mRNA, and Protein Expression in Activated T Lymphocytes*. *The Journal of Immunology*, 2011. **187**(5): p. 2233-2243.
234. Yu, C.R. et al., *Suppressor of Cytokine Signaling 3 Regulates Proliferation and Activation of T-helper Cells*. *Journal of Biological Chemistry*, 2003. **278**(32): p. 29752-29759.
235. Calin, G.A. et al., *A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia*. *N Engl J Med*, 2005. **353**(17): p. 1793-801.
236. Li, X. et al., *Survival prediction of gastric cancer by a seven-microRNA signature*. *Gut*, 2010. **59**(5): p. 579-85.
237. Boeri, M. et al., *MicroRNA signatures in tissues and plasma predict development and prognosis of computed tomography detected lung cancer*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(9): p. 3713-8.

## 8 DANKSAGUNG

An dieser Stelle sollen einige Personen genannt werden, die entscheidenden Anteil an der Entstehung dieser Arbeit haben. Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater und klinischen Lehrer, Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Hubertus Riedmiller, für die Unterstützung bedanken, welche er meinen zaghafte Gehversuchen in der medizinischen Forschung entgegengebracht hat und immer noch bringt.

Besonderen Dank verdient Herr Dr. med. vet. Burkhard Kneitz, der als Leiter des urologischen Forschungslabors mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand. Ohne seine Expertise und seine Geduld wäre dieses Projekt nicht möglich gewesen. Daneben danke ich Priv.-Doz. Dr. med. Martin Spahn, der es verstand, eine Brücke zwischen Laborergebnissen und Patienten zu schlagen und mich für die Urologie als klinisches Fach zu begeistern.

Vera Schwartz, Barbara Dexler und Katrin Borschert danke ich nicht nur für die geduldige Einarbeitung, sondern auch für die freundliche und versierte Unterstützung während meiner gesamten Laborzeit.

Für die Durchführung der Microarray-Experimente und ihre Hilfe bei der statistischen und bioinformatischen Auswertung der Genexpressionsdaten danke ich Frau Dr. med. vet. Susanne Kneitz, der Leiterin der Microarray Core Unit am Interdisziplinären Zentrum für Klinische Forschung (IZKF) der Universität Würzburg.

Der abschließende Dank gilt meiner Familie und hier zunächst meinen Eltern für die Großzügigkeit, ihren Sohn nach dem Erststudium weiter finanziell zu unterstützen und ihm so ein Medizinstudium zu ermöglichen. Zuletzt verdienen meine Frau und meine Kinder eine Entschuldigung für viele Stunden der Abwesenheit und – beinahe noch schlimmer – viele Stunden der lediglich physischen Anwesenheit.

## 9 LEBENSLAUF

### Persönliche Daten:

Name: Krebs  
Vorname: Markus Karl Ludwig

### Schulische Ausbildung:

1986 bis 1990: Grundschule Schöllkrippen  
1990 bis 1999: Hanns-Seidel-Gymnasium Hösbach

### Universitäre Ausbildung:

2000 bis 2006: Studium der Betriebswirtschaftslehre an der  
Universität Mannheim, Abschluss: Diplom-Kaufmann  
  
Diplomarbeit: Strategisches Management von Forschungs-  
und Entwicklungsprogrammen in der pharmazeutischen  
Industrie  
  
2006 bis 2012: Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-  
Universität Würzburg  
  
2011 bis 2012: Praktisches Jahr:  
  
Universitätsklinikum Würzburg  
Leopoldina Krankenhaus Schweinfurt  
Strong Memorial Hospital, University of Rochester  
Medical Center, Rochester (NY), USA

### Berufliche Tätigkeit:

seit 02/2013: Assistenzarzt der Klinik und Poliklinik für Urologie und  
Kinderurologie, Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Markus Krebs