

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

Direktor: Universitäts-Professor Dr. med. H. Riedmiller

**Die Bedeutung der miR-146b beim Prostatakarzinom – eine molekularbiologische
Funktionsanalyse anhand von LNCaP-Zellen sowie eine klinische Analyse an zwei
Prostatakarzinomkollektiven**

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

vorgelegt von
Anna Marie Elisabeth Feiden
aus München

Würzburg, April 2017

Referent: Universitäts-Professor Dr. med. Hubertus Riedmiller

Koreferent: Universitäts-Professor Dr. med. Andreas Rosenwald

Dekan: Professor Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 02.05.2018

Die Promovendin ist Ärztin

1	Einleitung	1
1.1	Das Prostatakarzinom – die Notwendigkeit verlässlicher Biomarker	1
1.2	Biomarker	2
1.3	microRNAs - ihre Biosynthese und Funktion	3
1.4	miRNA Expression beim Prostatakarzinom.....	5
1.5	Vorarbeiten – Microarray-Analyse an Hochrisiko-PCa	6
1.6	Rolle von miR-146b – aktueller Wissensstand	7
1.7	(Proto)Onkogene - die Aktivisten in der Kanzerogenese.....	8
1.8	Der Ras/Raf/MAPK Signalweg.....	9
1.9	Konzept der vorliegenden Arbeit	10
2	Material und Methoden	12
2.1	Primäre Prostatakarzinom-Gruppen	12
2.1.1	Beschreibung der Patientenkohorte I – natives Frischgewebe (n=60)	12
2.1.2	Beschreibung der Patientenkohorte II – Formalin fixiertes in Paraffin eingebettetes Gewebe (n=34)	12
2.2	Zellkultur	14
2.2.1	Tumorzelllinie	14
2.2.2	Kultivierung der Tumorzelllinie.....	15
2.2.2.1	Geräte, Materialien, Chemikalien und Biochemikalien für die Zellkultur:	15
2.2.3	Transiente Transfektion der LNCaP Zellen.....	16
2.2.4	Proliferationstest transfizierter LNCaP Zellen / MTS-Assay.....	16
2.2.5	RNA-Extraktion	17
2.2.5.1	Geräte, Materialien und Chemikalien und Biochemikalien zur transienten Transfektion, MTS-Assay und RNA-Extraktion:	18
2.2.6	Reverse Transkription und quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion.....	19
2.2.6.1	Polymerasekettenreaktion - Methodik.....	19
2.2.6.2	Reverse Transkription- Methodik:	20
2.2.6.3	Quantitative Real Time Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) – Methodik	20
2.2.6.4	Versuchsaufbau allgemeine cDNA-Synthese für „SybrGreen“ Real Time PCR	22

2.2.6.5	Versuchsaufbau spezifische cDNA-Synthese und „Taqman Sonden“ Real Time PCR.....	23
2.2.6.6	Materialien, Geräte und Substanzen zur Reverse Transkription und quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion.....	25
2.2.6.7	Primersequenzen.....	26
2.2.7	Luciferase-Assay - Methodik	26
2.2.8	Luciferase-Assay - Versuchsaufbau	27
2.2.8.1	Materialien, Geräte und Substanzen zum Luciferase Assay	30
2.3	Datenverarbeitung und Statistik	31
2.3.1	Datenverarbeitung des MTS-Tests	31
2.3.2	Datenverarbeitung qRT-PCR	31
2.3.3	Datenverarbeitung Luciferase-Assay	31
2.3.4	Statistik.....	31
3	Ergebnisse.....	32
3.1	Die Bedeutung der microRNA-146b im primären PCa-Tumorgewebe	32
3.1.1	Klinisch-pathologische Charakteristika der PCa-Kohorte I.....	32
3.1.2	Assoziationsanalysen von miR-146b in der PCa-Kohorte I.....	33
3.1.3	Klinisch-pathologische Charakteristika der PCa-Kohorte II.....	35
3.1.4	Assoziationsanalysen von miR-146b in der Patientenkohorte II.....	36
3.1.4.1	Subgruppenanalyse der PCa-Kohorte II (Hochrisiko-PCa-Proben)...	38
3.1.5	Expressionsanalysen von miR-146b in der PCa-Kohorte II im Vergleich zu BPH-Gewebe.....	39
3.2	Funktionsanalysen von miR-146b <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	41
3.2.1	Transfektion von miR-146b in LNCaP Zellen	41
3.2.2	Proliferationsverhalten von miR-146b transfizierten LNCaP Zellen	42
3.2.3	Identifikation von Zielgenen der miR-146b	43
3.2.3.1	Der Expressionsstatus von IGF-1 und PDGFA nach transienter miR- 146b Transfektion.....	44
3.2.3.2	Die Expression von NFkB in pre- und antago-miR-146b transfizierten LNCaP Zellen.....	45
3.2.3.3	Expression von N-Ras nach pre-miR-146b und antago-miR-146b Transfektion.....	46
3.2.3.4	N-Ras als potentielles Ziel-Gen von miR-146b	47
3.2.3.5	Direkte Interaktion von miR-146b mit der 3' UTR von N-Ras	48

3.2.3.6	Genregulation von N-Ras und miR-146b im primären PCa-Tumorgewebe (Kohorte I)	49
4	Diskussion	52
4.1	miR-146b – ein potentieller prognostischer Marker?	53
4.1.1	Die miR-146b Expression und die Assoziation zu etablierten klinischen Prognoseparametern	53
4.2	miR-146b als Tumormarker	56
4.2.1	Die miR-146b Expression in benignem und malignem Prostatagewebe ...	56
4.3	Die Bedeutung der miR-146b auf zellulärer Ebene beim PCa	59
4.3.1	Expression und Transfektion von microRNA-146b in LNCaP Zellen.....	59
4.3.2	miR-146b – ein Tumorsuppressor	59
4.3.3	Mögliche Targets der miR-146b beim Prostata-Ca.....	60
4.3.4	N-Ras – ein neu identifiziertes Target der microRNA-146b.....	62
4.3.5	Die Interaktion von N-Ras und miR-146b im Tumorgewebe	63
5	Zusammenfassung	65
6	Literaturverzeichnis	67
7	Abbildungsverzeichnis	73
8	Danksagung	1

1 Einleitung

1.1 Das Prostatakarzinom – die Notwendigkeit verlässlicher Biomarker

Die Inzidenz des Prostatakarzinoms ist in den letzten Jahren stetig angestiegen und erreichte im Jahr 2014 laut den Zahlen des Robert Koch Institutes einen Wert von 70.000 Männern in Deutschland(1). Damit ist das Prostata-Ca die häufigste Krebserkrankung bei Männern in Deutschland. Nach dem Bronchialkarzinom und dem kolorektalen Karzinom steht das Prostatakarzinom an dritter Stelle der Krebstodesursachen. Das Risiko für einen 35-jährigen Mann in den nächsten zehn Jahren an einem Prostatakarzinom (PCa) zu erkranken liegt unter 0,1%, das eines 75-jährigen Mannes hingegen bei 6%. Somit kann von einer mit dem Lebensalter steigenden Inzidenz ausgegangen werden. Der steigenden Inzidenz gegenübergestellt bleibt eine über die letzten Jahre weitgehende Konstanz der Mortalität.

Die Diagnostik basiert auf der Bestimmung des PSA-Wertes (Prostata-spezifisches Antigen), der digital rektalen Untersuchung, dem transrektalen Ultraschall sowie der zur histologischen Sicherung durchgeführten Stanzbiopsie. Der Verlauf der Erkrankung ist sehr heterogen und reicht vom langsam wachsenden Tumor bis zum schnell metastasierenden, zum Tode führenden Karzinom. Nach der histo-pathologischen Beurteilung fließen der PSA-Wert, das Tumorstadium sowie der Gleason Score (ein Maß für den Differenzierungsgrad der Karzinomzellen) in die Risikobeurteilung und damit die Planung des weiteren Procedere ein. In Hinblick auf eine potenzielle Rezidiventwicklung können so drei verschiedene Risikogruppen eruiert werden. Während das sogenannte „low-risk“ Prostatakarzinom durch einen PSA-Wert ≤ 10 ng/ml und/oder einem Gleason-Score ≤ 6 und/oder ein TNM-Stadium $\leq 2a$ charakterisiert ist, wird die Existenz eines Prostatakarzinoms mit hohem Rezidivrisiko („high-risk“) durch einen PSA-Wert ≥ 20 ng/ml und/oder einen Gleason-Score ≥ 8 und/oder eine pT-Kategorie ≥ 3 beschrieben(2). Die Heterogenität des Tumors wird deutlich, wenn man den Verlauf der Erkrankung bei Patienten mit Hochrisiko-PCa analysiert. Obwohl es sich hierbei um die Gruppe mit dem aggressivsten Progress handelt, entwickeln nur 30% der Patienten Metastasen und versterben aufgrund der Erkrankung(3-5). Dies zeigt den Bedarf an neuen prognostischen Markern auf, die eine bessere Subklassifizierung der jeweiligen Risikogruppen ermöglichen, sodass eine

Übertherapie vermieden und die Patienten individuellen Therapiestrategien zugeführt werden können.

Als Therapiestrategien stehen das sogenannte Watchful waiting oder die Active Surveillance bei älteren Patienten im geringen Tumorstadium zur Verfügung (für Details s. EAU-Guidelines). Patienten mit aggressiveren Tumoren werden einer radikalen Prostatektomie oder einer Strahlentherapie unterzogen. Im Falle eines Progresses kann die Androgendeprivation durchgeführt werden. Im Laufe der Zeit kommt es in der Regel zur Androgenresistenz, sodass trotz medikamentöser Behandlung ein Progress nicht aufzuhalten ist. Bei zusätzlichen Schmerzen wird die Chemotherapie (Docetaxel) oder die CYP17A1 Therapie mit Abiraterone durchgeführt.

In der vorliegenden Arbeit steht die Evaluation der miR-146b als möglicher prognostischer Marker im Vordergrund. In einer Pilotstudie der Forschungsgruppe der Klinik und Poliklinik für Urologie des Universitätsklinikums Würzburg wurde die microRNA-146b als möglicher prognostischer Biomarker im Hochrisiko-PCa identifiziert. Das Ziel der Arbeit ist es die Expression und Bedeutung dieser microRNA in zwei weiteren unabhängigen Kollektiven zu untersuchen und ihre Funktion auf molekularer Ebene zu analysieren.

1.2 Biomarker

Zu Beginn der Arbeit soll der Begriff Biomarker genau definiert werden. Die *Biomarkers Definitions Working Group* legte folgende Definition fest: Biomarker sind objektiv gemessene und evaluierte Indikatoren von normalen biologischen Prozessen, pathologischen Prozessen oder pharmakologischen Reaktionen auf eine therapeutische Intervention(6). Biomarker sind Indikatoren, die den Verdacht auf ein mögliches zukünftiges Ereignis wie Karzinomentstehung, Progress, Rezidiv oder krankheitsbedingten Tod stellen und somit die Entscheidung des weiteren Procedere maßgeblich beeinflussen(6).

Man unterscheidet diagnostische, prognostische und prädiktive Marker. Die prognostischen Marker differenzieren den Endpunkt von Subgruppen mit der Vorgabe,

dass eine zukünftig geplante Therapie durchgeführt oder weggelassen wird. Bei den prädiktiven Markern ist bereits eine Therapie im Gange und die Wahrscheinlichkeit für einen Benefit oder einen Progress wird anhand des Markers ermittelt (7).

Biomarker können jede Art von Parameter sein, angefangen beim Puls, über komplexere chemische Tests bis hin zu laborchemischen Tests von Körperflüssigkeiten oder Gewebe; in den letzten Jahren haben microRNAs an Bedeutung bei der Biomarkersuche bei Tumoren gewonnen.

1.3 microRNAs - ihre Biosynthese und Funktion

Bei den microRNAs (miRNAs) handelt es sich um eine Klasse kleiner nichtkodierender RNAs, die eine bedeutende Funktion in der Regulation der Genexpression haben(8-10). Sie beeinflussen das Zellwachstum, die Differenzierung, Apoptose und Proliferation(11, 12). Die Länge dieser kleinen RNA-Moleküle beträgt ca. 22 Nukleotide(13). Lin-4 war die erste microRNA, welche 1993 von Lee et al. im Fadenwurm *C. elegans* entdeckt wurde(14). Es sind rund 206 Spezies bekannt, die miRNAs exprimieren, allein im Menschen sind es über 2.500 miRNAs(12, 15). Ungefähr 1% des menschlichen Genoms kodiert für diese miRNAs, die vermutlich 1/3 aller Protein-Gene regulieren(16).

Primäre miRNAs werden zunächst durch das Enzym RNA Polymerase II als größere Vorläufermoleküle transkribiert. Diese werden im Zellkern mithilfe der Ribonuklease Drosha und DGCR8 gespalten. So entsteht die pre-miRNA mit einer Länge von ca. 65 Nukleotiden(17). In einem weiteren Schritt wird die pre-miRNA durch das zytosolische Enzym Dicer in eine reife miRNA umgewandelt. Nach Integration dieser reifen miRNA in den RISC-Komplex („RNA-induced silencing complex“) erfolgt eine Bindung an die 3'UTR der Ziel-mRNA, wodurch die regulatorische Funktion eingeleitet wird (s. Abb.1)(18). Jede microRNA ist so in der Lage die Expression zahlreicher Ziel-mRNAs zu reglementieren(19). Genexpressionregulationen können auf der post-transkriptionalen und der translationalen Ebene stattfinden(20).

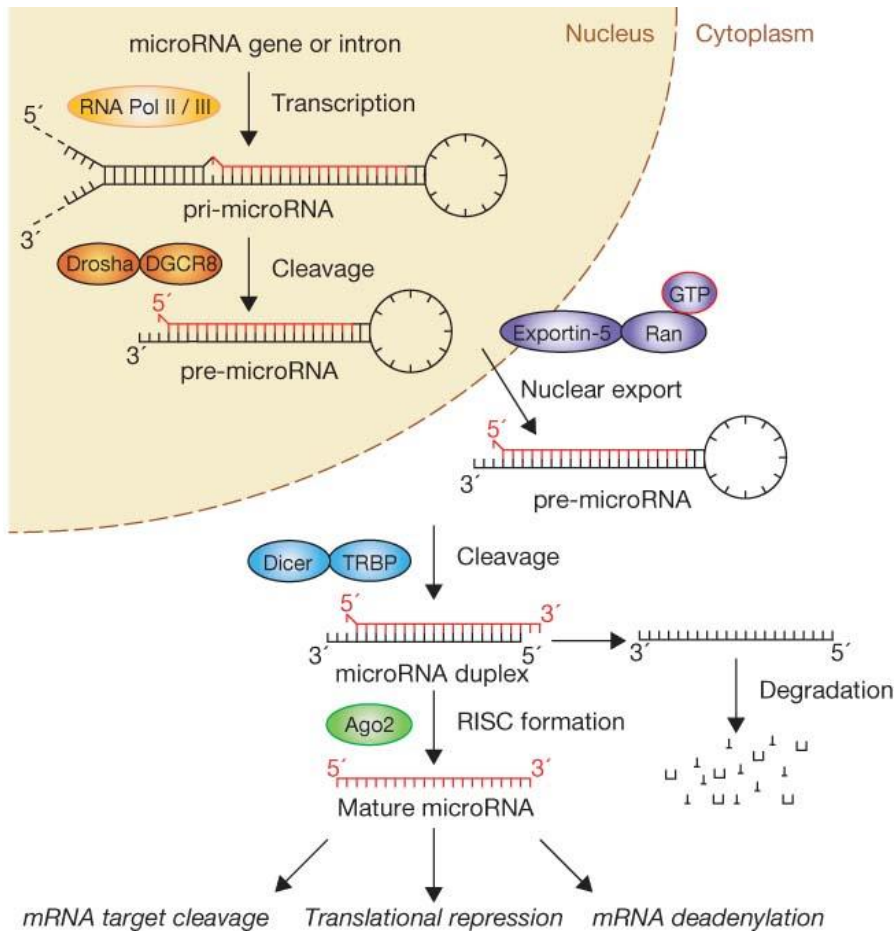


Abbildung 1: Darstellung des microRNA Signalwegs von den Vorstufen zur reifen microRNA(21)

MiRNAs sind an der Pathogenese von Erkrankungen wie Diabetes mellitus, rheumatoide Arthritis, Morbus Alzheimer und malignen Tumoren beteiligt(22-25). Gerade bei letztgenanntem können sie sowohl tumorsuppressive Eigenschaften aufweisen als auch onkogen wirken(20). Die Expression der miRNAs korreliert mit biologischen Charakteristika des Tumors, wie Progression, Therapieansprechen und Metastasen. Entsprechend zeigen die miRNAs großes Potential als Marker für Diagnose, Prognose oder Vorhersage des Krankheitsverlaufs(12). Entsprechend kann man bei der Suche der Biomarker die Expression der miRNAs mit Endpunkten wie Progress oder krankheitsspezifische Mortalität assoziieren. Karzinomabhängige Expressionsänderungen können im Gewebe und verschiedenen Körperflüssigkeiten (Serum, Urin, etc.) nachgewiesen werden.

1.4 miRNA Expression beim Prostatakarzinom

In den vergangenen Jahren wurde eine Vielzahl von Arbeiten publiziert, in denen bestimmte miRNA-Profile aufgrund ihrer Expression eine Differenzierung zwischen benignem und malignem Gewebe oder Körperflüssigkeiten ermöglichten(12, 26-33). Da in der vorliegenden Arbeit mit PCa-Gewebe gearbeitet wurde, wird der aktuelle Stand der Wissenschaft schwerpunktmäßig die miRNA Expression im Gewebe betreffen, anstatt die Expression in anderen Körperflüssigkeiten:

In Expressionsstudien von Prostatakarzinompatienten präsentierte sich für die Mehrzahl der microRNAs oftmals eine starke Suppression im malignen Gewebe im Vergleich zum benignen, sodass von einer tumorsuppressiven Funktion ausgegangen werden kann(12). Auch im Expressionsvergleich innerhalb der Karzinomgewebe zeigte sich häufiger eine Herunterregulation in Gewebeproben von Patienten mit schlechteren Karzinomeigenschaften (Differenzierungsgrad, klinischer Progress)(12, 20, 26, 27, 34, 35). Zwischen den verschiedenen Studien gibt es kaum Übereinstimmung in Bezug auf spezifische miRNA-Expression. Folgende miRs wurden in mehreren Studien als dereguliert beschrieben, wenn es um den Vergleich von wenig differenziertem Gewebe oder fortgeschrittener Erkrankung im Vergleich zu besserer Differenzierung oder lokalisierter Erkrankung ging: miR-21, -145, -205, -221, -222, -373 sowie Mitglieder der let-7 Familie (20, 34-43).

Bei der Suche nach prognostischen Markern beim Prostatakarzinom bieten sich Assoziationsanalysen zwischen miRNA-Expression und klinischen Endpunkten wie biochemischer Progress (BCR) oder klinischer Progress (CF) an, wobei letzteres ein lokales Voranschreiten der Erkrankung sowie die Metastasierung umfasst. Nur wenige Publikationen zeigen ein verlässliches Studiendesign mit Auswahl einer geeigneten Patientenkohorte, die entsprechende Endpunkte bei langem Follow-up aufzeigt beziehungsweise mit Testung der Ergebnisse an unabhängigen Kohorten. Die Überschneidung gleicher Marker-miRs ist daher sehr gering. Einige Arbeitsgruppen konnten die vermehrte Expression von miR-30d, miR-96 und die Herabregulation von miR-224 mit erhöhtem Risiko für BCR in Verbindung bringen (44-46). Einen anderen Arbeitsansatz wählte die Arbeitsgruppe um Spahn et al. Die Expressionsanalysen wurden hier anhand von Gewebeproben von Patienten mit Hochrisiko-PCa

durchgeführt. In der multivarianten Analyse präsentierte sich die supprimierte miR-221 als unabhängiger prognostischer Marker für klinischen Progress; dies konnte in einer weiteren Arbeit an einer unabhängigen Kohorte bestätigt werden, zusätzlich wurde die Rolle als unabhängiger prädiktiver Marker für karzinom-spezifische Mortalität ausgearbeitet(4, 47). Ein weiterer prognostischer Marker ist let-7b dessen Suppression mit schlechteren Karzinomeigenschaften (erhöhter PSA, GS, pT) assoziiert ist, in einer unabhängigen Kohorte konnte let-7b in der multivarianten Analyse als prognostischer Marker für klinischen Progress identifiziert werden(20).

Obwohl viele Studien den zukünftigen klinischen Nutzen der microRNAs betonen, konnte noch keine Implementierung als Biomarker beim PCa in den klinischen Alltag erfolgen. Diese Tatsache motiviert an den vielversprechenden Ansätzen weiter zu forschen.

1.5 Vorarbeiten – Microarray-Analyse an Hochrisiko-PCa

In Voruntersuchungen an Hochrisiko-Prostatakarzinomgewebe in der Klinik und Poliklinik für Urologie des Universitätsklinikums Würzburg wurde miR-146b als potentieller prognostischer Marker identifiziert. Mittels Microarray-Analyse gelang die Isolierung von 7 miRNAs (darunter miR-146b) welche signifikante Expressionsunterschiede zwischen folgenden drei Gewebe-Arten aufwiesen: BPH-Gewebe, Hochrisiko-PCa Gewebe von Patienten mit klinischem Progress sowie Hochrisiko-PCa Gewebe ohne klinisches Fortschreiten der Tumorerkrankung (20). Insgesamt handelte es sich um 19 Gewebeproben (6 BPH, 6 Hochrisiko mit Progress, 7 Hochrisiko ohne Progress). Die initial mittels Microarray-Analyse erhobenen Expressionsdaten wurden in einem weiteren Versuch mittels qRT-PCR bestätigt. Dabei dominiert im BPH-Gewebe eine sehr starke Expression von miR-146b im Vergleich zum malignen Gewebe, was als mögliches Korrelat zur propagierten tumorsuppressiven Funktion von miR-146b im Prostata-Ca angesehen werden kann. Erstaunlicherweise war die Expression in der Patientengruppe mit klinisch progressionsfreiem Überleben geringer als die der Patienten mit Progress; wobei beide maligne Subgruppen unter der Expression von miR-146b im BPH Gewebe bleiben. Diese gegensätzliche Expression war der treibende Impuls die Expression von miR-146b an zwei unabhängigen

Kollektiven zu prüfen sowie eine molekulare Funktionsanalyse der miR-146b in LNCaP Zellen durchzuführen.

1.6 Rolle von miR-146b – aktueller Wissensstand

Erstmals wurden miR-146a und miR-146b, welche derselben microRNA Familie angehören, in der Maus entdeckt. Sie unterscheiden sich bei einer Länge von 22 Nukleotiden in nur 2 Nukleinsäuren, sodass eine 91%ige Homologie vorliegt(48). Während die miR-146b-5p an der 3'-Bindungsstelle Arginin und Cytosin enthält, befinden sich an dieser Stelle bei der miR-146a-5p Guanin und Uridin. Lokalisiert ist die miR-146b auf Chromosom 10q24.32. In der vorliegenden Arbeit wurde mit der miR-146b-5p gearbeitet, diese zeigt folgende Sequenz auf: 5'-UGAGAACUGAAUCCAUAGGCU-3'.

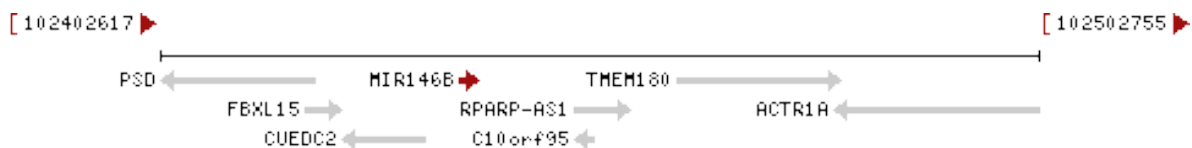


Abbildung 2: Chromosom 10 - NC_000010.11 - Lokalisationsort der miR-146b (NCBI, National Center for Biotechnology Information, www.ncbi.nlm.nih.gov)

Die Funktion von miR-146 ist sehr divers: In verschiedenen hämatopoetischen Zellen zeigen die Mitglieder der miR-146 Familie ein spezifisches Expressionsmuster(49). Sie werden mit dem Inflammationsprozess sowie mit Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht(50, 51). Zielgene im Rahmen des Entzündungsprozesses sind COX-2(52), humanes Antigen R (HuR)(53), IL-1-Rezeptor(54, 55), TNF Rezeptor assoziierter Faktor 6 (TRAF 6)(54, 55), IL-1(56), IL-6(54) und IL-8(54, 57).

Die Menge an Arbeiten zur Rolle der miR-146b Familie im Prostatakarzinom ist sehr überschaubar. In androgen-unabhängigen PCa-Zelllinien und im primären Prostatakarzinomgewebe konnte eine geringe Expression von miR-146a/b nachgewiesen werden(20, 58-60). Bezüglich der miR-146 Expression und der

Assoziation oder Korrelation zu klinisch-pathologischen Parametern wurde lediglich eine Studie mit Untersuchungen von Serum von Patienten mit Prostatakarzinom gefunden. Die Kollegen um Selth fanden eine signifikant vermehrte Expression von miR-141, 146b-3p und -194 in einer Screening-Analyse. In der entsprechenden Validierungskohorte von 70 Patienten zeigte sich die miR-146b Expression in der multivariaten Analyse als unabhängiger Prädiktor für den biochemischen Progress(61).

Die dargestellten Ergebnisse lassen noch einige Fragen zur Rolle der miR-146b offen. Welche Funktion kommt dieser miRNA in der Pathogenese oder Progression des Prostatakarzinoms zu und spielt sie eine mögliche Rolle als prognostischer Biomarker; sie waren daher Anlass für die durchgeführten Untersuchungen.

1.7 (Proto)Onkogene - die Aktivisten in der Kanzerogenese

Der Begriff Onkogene impliziert bereits, dass diese als Bestandteile des zellulären Genoms kausal an der Tumorentstehung beteiligt sind. Konkret basiert diese Eigenschaft auf der Stimulation von Proliferations- und Differenzierungsprozessen, welche sich den regulären Zellwachstumskontrollmechanismen entziehen und so die Entstehung von neoplastischen Zellen fördern. Somatische Mutationen infolge schädigender Einflüsse wie beispielsweise ionisierender Strahlung bewirken die Bildung von Onkogenen als mutierte Formen ihrer physiologisch existierenden Vorstufen, den Protoonkogenen. Punktmutationen, Deletionen, Insertionen sowie Genamplifikationen und chromosomale Translokationen können zur Aktivierung von Protoonkogenen führen. Neben RET und HER2/neu gehört Ras zu den bedeutendsten Onkogenen. Zahlreiche maligne Tumore, unter anderem das Lungenkarzinom, kolorektale Karzinome, Schilddrüsenkarzinome, das Blasenkarzinom sowie das exokrine Pankreaskarzinom weisen spezifische Punktmutationen in der Ras Genfamilie auf(62-67). Mulholland et al. postulierten eine Assoziation von Pten Suppression und erhöhter Aktivität des Ras/MAPK Signalwegs bei der Progression des Prostatakarzinoms(68). Die Arbeitsgruppe um Carter et al. analysierte mittels Oligodeoxynukleotid Hybridisierungsassay mögliche Punktmutationen der Ras-Genfamilie beim Prostatakarzinom. Sowohl in einer etablierten Zelllinie (TSU-PR1) als

auch im primär duktalem Prostatakarzinom konnten Ha-Ras Mutationen nachgewiesen werden, welche mit dem Krankheitsfortschritt in Verbindung gebracht wurden(69). Da die vorliegende Arbeit im Besonderen auf die Interaktion von N-Ras und der microRNA-146b in der Tumorprogression des Prostatakarzinoms eingeht, wird der Signaltransduktionsweg um N-Ras im folgenden Abschnitt genauer beleuchtet.

1.8 Der Ras/Raf/MAPK Signalweg

Die Ras Genfamilie besteht aus folgenden Mitgliedern: Ha-Ras, Ki-Ras und N-Ras, welche für gleichnamige GTP-bindende Proteine kodieren(70). Diese wirken im Rahmen des sogenannten Ras/Raf/MAPK Pathways auf zelluläre Prozesse ein. Nach Bindung von Wachstumsfaktoren wie beispielsweise EGF (epidermic growth factor) oder PDGF (platelet-derived growth factor) an die extrazelluläre Domäne des Tyrosinkinaserzeptors, wird der intrazelluläre Rezeptorteil aktiviert(71). Über die Bindung an die Raf-Kinase kommt es zur Phosphorylierung der MEK-Kinase. Die dritte somit aktivierte Proteinkinase (MAPK) stellt die eigentliche Effektor kinase dar (Abb.3). Vor allem die MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 spielen eine übergeordnete Rolle bei der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren im Zellkern(72, 73). Zahlreiche MAPK/ERK Targets sind beteiligt an der Ras induzierten Zelltransformation im Rahmen von Proliferation und Differenzierung(74).

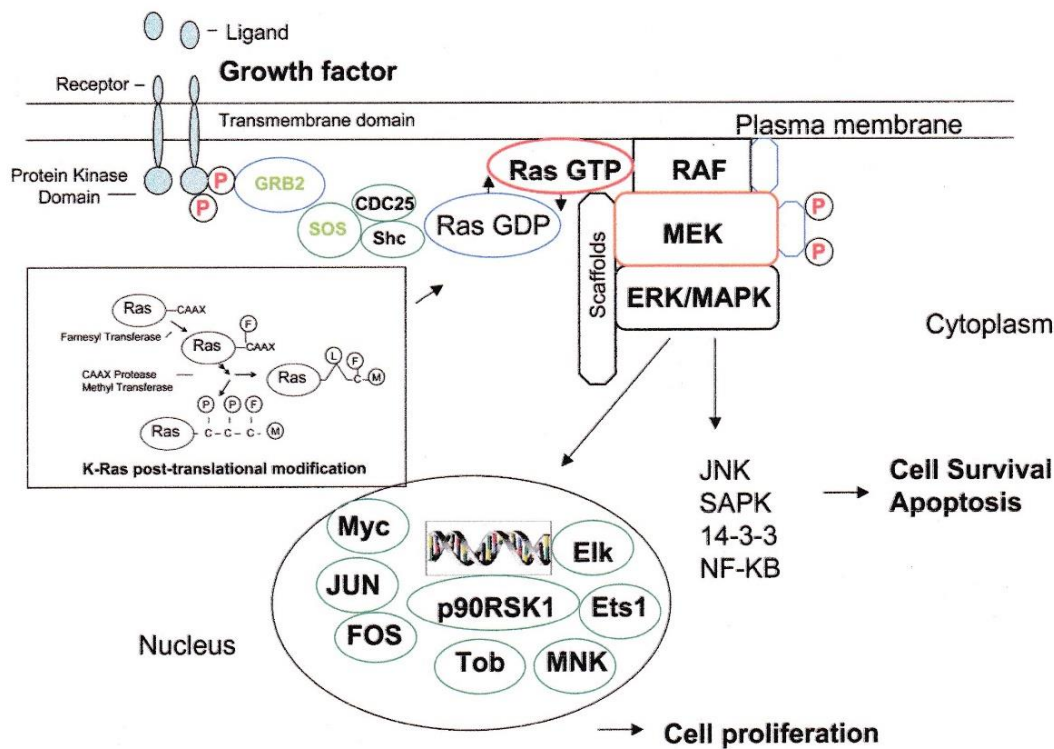


Abbildung 3: Überblick über den Ras/Raf/MAPK Signaltransduktionsweg(73)

1.9 Konzept der vorliegenden Arbeit

Das Prostatakarzinom stellt als dritthäufigste Todesursache bei Männern ein ernstzunehmendes Gesundheitsproblem dar. Der verbesserten Diagnostik in den vergangenen Jahren mit steigenden Inzidenzzahlen stehen weitgehend konstant bleibende Mortalitätsraten gegenüber. Bisherige Prognosemarker wie PSA, pT-Stadium und Gleason Score allein sind nicht ausreichend, um den genauen Verlauf der Erkrankung vorherzusagen. Trotz bestehender Risikoeinteilungen in low, intermediate und high-risk ist der Erkrankungsverlauf sehr heterogen. Durch den schlecht abschätzbaren Progress der Erkrankung kommt es beispielsweise zu Übertherapien bei Patienten, bei denen das Prostatakarzinom möglicherweise gar keinen lebensverkürzenden oder lebensverändernden Einfluss hat. Um den Patienten individuelle Therapiestrategien anzubieten, bedarf es zusätzlicher prognostischer Biomarker, um die Risikoeinteilungen zu subklassifizieren.

Als mögliche Biomarker kommen microRNAs, kleine nicht kodierende RNA-Stränge in Betracht, deren Funktion in der Beteiligung bei Proliferations- und Differenzierungsprozessen liegt.

In Vorarbeiten stellte sich die miR-146b als potentieller prognostischer Marker dar. Anhand der diskriminativen Expression gelang es zwischen high-risk PCa-Gewebe mit und ohne Rezidiv zu unterscheiden, was sie zu einem möglichen prognostischen Indikator qualifiziert.

Folgende Versuche zur biologischen Funktion der miR-146b wurden für die vorliegende Arbeit durchgeführt:

Versuchsteil 1: Expressions- und Assoziationsanalysen zu miR-146b an zwei voneinander unabhängigen Kollektiven: Kohorte I als unselektierte Gruppe (frisch gefrorene Gewebeproben) sowie Kohorte II mit einem hohen Anteil an Hochrisiko-PCa (Formalin fixiert in Paraffin eingebettet).

Versuchsteil 2: biologische Funktion, Regulation von miR-146b in der repräsentativen Tumorzelllinie LNCaP, Transiente Transfektion mit anschließender Evaluation der Zellproliferation; Suche nach potentiellen Zielgenen von miR-146b, Identifizierung von *nras* als Target, Bestätigung des Targets N-Ras in einer Subgruppe der Kohorte I (ex vivo)

2 Material und Methoden

2.1 Primäre Prostatakarzinom-Gruppen

Im Folgenden werden die beiden Patientenkollektive beschrieben, deren Gewebematerial und klinische Daten in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden. Die Studie wurde vom Ethik-Komitee der Universität Würzburg (59/04) genehmigt, von allen Patienten lag eine schriftliche Einverständniserklärung vor. In dieser Arbeit wurde mit zwei Patientenkohorten gearbeitet, die im Folgenden mit den Zusätzen I respektive II beschrieben werden.

2.1.1 Beschreibung der Patientenkohorte I – natives Frischgewebe (n=60)

Die Proben der ersten Patientenkohorte (n=60) bestehen aus gefrorenem PCa-Gewebe, welches unmittelbar nach operativer Entfernung eingefroren wurde. Die mikroskopische Differenzierung von malignem und benignem Gewebe erfolgte durch einen erfahrenen Pathologen (Herr Prof. Dr. P. Ströbel). Auf den 2-4 µm dicken Schnitten wurden die Tumoreale mit mindestens 80% Tumoranteil markiert. Die RNA-Isolation erfolgte nach u.a. Procedere. Bei dieser Gruppe handelt es sich um eine rein zufällige Zusammenstellung von Patienten, die im Zeitraum von 2006-2012 in der Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie der Universität Würzburg eine radikale Prostatektomie erhalten hatten. Die genauen histopathologischen Parameter sind dem Ergebnisteil (3.1.1) zu entnehmen. Diese Kohorte diente der Expressionsbestimmung von miR-146b sowie den zusätzlichen Assoziationsanalysen. Zusätzlich wurde an Teilen dieser Kohorte der ex vivo Nachweis der Targetbeziehung von N-Ras und miR-146b durchgeführt.

2.1.2 Beschreibung der Patientenkohorte II – Formalin fixiertes in Paraffin eingebettetes Gewebe (n=34)

Die zweite Patientenkohorte umfasst 34 in Formalin fixierte und in Paraffin eingebettete Gewebeproben. Bei dieser Gruppe handelt es sich um ein vorselektioniertes Kollektiv mit einem hohen Anteil (56%) von Patienten mit Hochrisiko-PCa (die genauen klinisch-pathologischen Parameter sind dem Ergebnisteil zu entnehmen). Anhand dieser Gruppe

wurden die Ergebnisse der Voruntersuchungen von Schubert et al. an einer unabhängigen Kohorte validiert. Die Patienten hatten im Zeitraum von 2003-2006 eine radikale Prostatektomie in der Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie erhalten. Die Gewebeprobe waren anhand von 2-4µm dicken Schnitten von einem erfahrenen Pathologen (Herr Prof. Dr. A. Rosenwald) mikroskopisch analysiert und Tumoreale mit einem malignen Anteil von > 80% farblich markiert worden. Die RNA-Isolation erfolgte anschließend nach unten aufgeführtem Procedere. Die Gewebeprobe dienten zur Expressionsanalyse von miR-146b mittels qRT-PCR und zur Durchführung von Assoziationsanalysen. Parameter wie Alter, PSA-Wert, Gleason-Score, TNM-Klassifikation sind dem Ergebnisteil zu entnehmen. Das Follow-up betrug 69,8 Monate.

Um Expressionslevel zwischen malignem und benignem Gewebe vergleichen zu können, wurden n=12 Gewebeprobe mit benigner Prostatahyperplasie (gewonnen im Rahmen einer transurethralen Resektion der Prostata), ebenfalls in Formalin fixiert und Paraffin gebettet, verwendet. Die histopathologische Analyse war ebenfalls durch einen erfahrenen Pathologen (s.o.) erfolgt.

Bei den Patienten beider Kohorten wurde zunächst ein Follow-up alle 3 Monate in den ersten 2 Jahren nach der Operation vorgenommen. Danach wurde der Zeitraum ausgedehnt auf alle 6 Monate in den nächsten 3 Jahren. Ab dem 6. postoperativen Jahr erfolgte ein jährliches Follow-up. Zum präoperativen Staging zählten bei allen Patienten eine DRU, ein abdominopelvines Computertomogramm (CT) sowie eine Knochenszintigraphie. Unter histologisch-pathologischen Gesichtspunkten wurde eine Einteilung des Gewebes nach TNM-Klassifikation, Tumordifferenzierungsgrad sowie Gleason-Grading-System vorgenommen. Zudem wurden die Proben auf eine vorliegende Perineuralscheideninfiltration überprüft. Als klinische Parameter wurden das Alter der Patienten, das Alter bei Operation und der prä- und postoperative PSA-Wert erfasst. Ein sog. biochemischer Progress implizierte in der hier vorgenommenen Einteilung einen PSA-Anstieg auf größer gleich 0,2ng/µl bei zwei jeweils aufeinanderfolgenden Follow-up Untersuchungen. Der Überbegriff Tumorrezidiv wurde

definiert als Lokalrezidiv und/oder Fernmetastasen. Dies wurde je nach Fall histologisch gesichert oder durch CT oder Knochen-Scan bestätigt.

2.2 Zellkultur

2.2.1 Tumorzelllinie

In der vorliegenden Arbeit wurde anhand der Zelllinie LNCaP (Abb. 4) die Regulation und funktionelle Bedeutung der microRNA-146b *in vitro* analysiert. LNCaP Zellen sind Androgen-sensitive Prostatakarzinomzellen. Sie wurden aus einem supraclavikulären Lymphknoten (links) eines 50-jährigen männlichen Kaukasiers im Jahr 1977 isoliert (*Left Node Carcinoma of the Prostate*). Hinsichtlich der Morphologie handelt es sich bei den LNCaP Zellen um adhärenzte Epithelzellen, welche in Aggregaten und in Einzelzellen wachsen. Sie besitzen eine hohe Testosteron-5-alpha-Reduktase- und eine hohe saure Phosphatase-Aktivität. Die Verdopplungszeit beträgt ca. 36 Stunden.

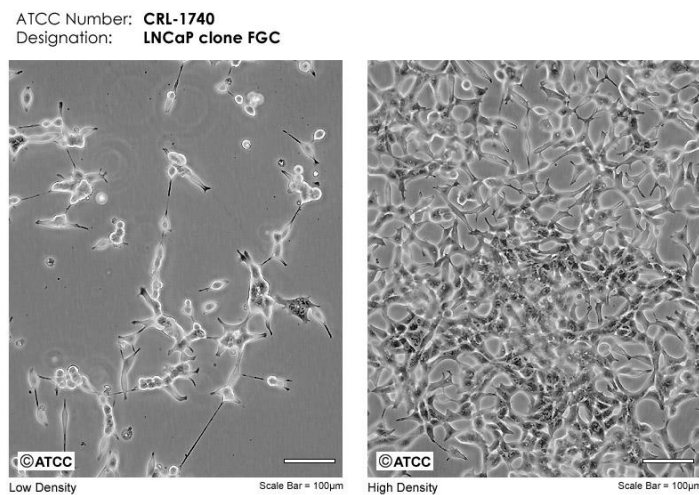


Abbildung 4: Mikroskopisches Bild der LNCaP-Zellen mit niedriger (links) und hoher (rechts) Wachstumsdichte (aus: ATCC - The Global Bioresource Center, www.actcc.org/)

2.2.2 Kultivierung der Tumorzelllinie

Die Tumorzellen wurden bei 37°C, 6% CO₂ und 95% Luftfeuchte in 75cm² Kulturflaschen im Inkubator gehalten. Im Rahmen der wöchentlichen Zellpassagen, nach Erreichen von 80% konfluentem Wachstum, wurden die Zellen mit PBS (Phosphate buffered saline) gewaschen und mit Trypsin/EDTA (0,25%) für drei Minuten bei 37°C vom Flaschenboden abgelöst. Diese Reaktion wurde mithilfe des RPMI Mediums abgestoppt, die Zellen ausreichend resuspendiert und daraufhin für 5 min bei 1200rpm zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Zellen wiederum in Medium resuspendiert. Mittels Neubauer Zellzählkammer konnte die Zellzahl bestimmt werden, um sie daraufhin in einer Dichte von 3x10⁶/20ml auszusäen. Diese Arbeit erfolgte stets unter der Sterilbank; Einmalartikel wurden steril verpackt gekauft, hitzebeständige Materialien wurden durch Autoklavieren (25 min) bei 120°C sterilisiert. Für die folgenden Versuche wurden Zellen der 20.- 35. Generation genutzt.

2.2.2.1 Geräte, Materialien, Chemikalien und Biochemikalien für die Zellkultur:

Gerät	Hersteller
Brutschrank CB210	WTB Binder (Deutschland)
Sterilbank 06 12	PRETTL (Deutschland)
Zentrifuge	Thermo scientific
Lichtmikroskop	Leitz (Deutschland)

Materialien	Hersteller
Zellkulturflaschen T75	Cellstar greiner bio-one
Einmal Sterilglaspipetten 2,0 – 25,0ml	Cellstar greiner bio-one
Pipetten 20µl – 1000µl	Gibson
Pipettenspitzen 20µl – 1000µl	Sarsteat AB & Co
Neubauer improved Zellzählkammer	Brandt

Chemikalien und Biochemikalien	Hersteller
LNCaP Zelllinie	American Tissue Culture Collection
RPMI Medium 1640 supplementiert mit:	(ATCC)

FCS dialysiert	GIBCO (Deutschland)
Glutamax (Invitrogen) 100x	GIBCO
NEAA 100x	GIBCO
HEPES Buffer	GIBCO
Sodium pyruvate	Biochrom
Dulbeccos PBS	GIBCO
Trypan-Blau (0,4%)	Biochrom
Trypsin/EDTA	Sigma (USA)
	Invitrogen (USA)

2.2.3 Transiente Transfektion der LNCaP Zellen

Die Transfektion erfolgte mittels precursor- und antago-miR-146b. Als Kontrolle wurde eine sogenannte scrambled miRNA (scr) eingesetzt. Hierbei handelt es sich um eine miRNA, die keine Homologie im menschlichen Genom besitzt, das Ziel ist es sequenz-unspezifische Effekte der miRNA im Rahmen der Transfektion auszuschließen. Tag 1 der Transfektion diente zum Erstellen des Transfektionsansatzes. Nach Vorlage von 500µl Opti-MEM wurden jeweils die pre-, anti- und scr- microRNA (30µl) im Doppelansatz in die 6-well Platten pipettiert. Nach 15-20 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden dem Ansatz die Zellen in einer Anzahl von $3,5 \times 10^5$ in 2,5ml/well zugeführt. Anschließend erfolgte für 48 Stunden die Inkubation im Brutschrank.

Tag 3 begann mit dem Waschen des Ansatzes mittels PBS sowie dem Ablösen der Zellen mit Trypsin für 3 Minuten im Brutschrank. Analog zur Zellkultur wurde diese Reaktion mit RPMI Medium abgestoppt, der Ansatz in die Eppendorf-cups pipettiert und danach für 5 min bei 1200rpm zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 2ml PBS resuspendiert. Nach dem Zentrifugieren für 5 min bei 1400rpm, wurde der Überstand abpipettiert, 700µl Qiazol über das Zellpellet pipettiert und resuspendiert.

2.2.4 Proliferationstest transfizierter LNCaP Zellen / MTS-Assay

Der MTS-Assay ist ein kolorimetrisches Verfahren, bei welchem der gelbe Farbstoff Tetrazoliumsalz (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) zu

Formazan reduziert wird. Hierbei dienen vor allem NADH und NADPH als Reduktionsäquivalente. Der im Monochromator gemessene Farbumschlag korreliert mit der Glykolyserate der Zellen.

Der MTS-Assay diente zur Beurteilung der Vitalität der Zellen unter Transfektionsbedingungen sowie der Einschätzung der Proliferationsfähigkeit der LNCaP Zellen nach transient veränderter miR-146b-Expression. Dazu wurde zunächst analog zur oben beschriebenen Transfektion ein Transfektionsansatz bestehend aus 50µl Opti-MEM, 0,5µl Lipofectamine 2000, und den entsprechenden microRNAs (2µl) hergestellt und in 96-well Platten pipettiert. Nachdem die Zellen in der gewünschten Anzahl von 1×10^4 pro well dazugegeben wurden, erfolgte die Inkubation im Brutschrank. Nach zwei Tagen wurden 20µl Cell Titer 96 Reagenz dazugegeben. Daraufhin inkubierte dieser Ansatz für drei Stunden im Brutschrank. Anschließend konnte die Anzahl vitaler Zellen in Korrelation zum Farbumschlag als Absorption bei 492nm im Photometer gemessen werden. Dieselben Arbeitsschritte erfolgten auch nach vier- und sechstägiger Inkubation des Transfektionsansatzes im Brutschrank. Somit konnten detaillierte Aussagen zur Vitalität der LNCaP-Zellen getroffen werden.

Gemäß Herstellerprotokoll wurde eine Referenzwellenlänge von 630-700 nm verwendet, um Hintergrundphänomene wie unspezifische Absorptionen oder Zellablagerungen zu subtrahieren. Die Digitalisierung der Absorptionen erfolgte durch die „Ascent Software for Multiskan“. Die erhobenen Daten wurden in Excel-Tabellen bearbeitet.

2.2.5 RNA-Extraktion

Bei der Isolierung der RNA wurde mit dem miRNeasy Mini Kit von Qiagen gearbeitet. Es wurde stets auf einen RNase-freien Arbeitsplatz geachtet (regelmäßige Wischdesinfektion mit RNase-Inhibitor-Lösungen, RNase-freie Handschuhe). Die Extraktion der RNA lässt sich mit folgenden fünf Schritten beschreiben: Homogenisation, Phasentrennung, Präzipitation, Waschung und Auflösung; diese werden im Folgenden kurz beschrieben. Nach Zugabe von 700µl Quiazol zum Zellpellet wie oben beschrieben, folgte direkt die RNA-Extraktion. Zunächst wurden zur Homogenisation 140µl Chloroform dazugegeben. Nach kurzzeitiger Inkubation bei Raumtemperatur und 15 minütiger Zentrifugation bei 12000xg war die Phasentrennung

deutlich zu erkennen. Die obere, farblose, wässrige Phase mit der RNA wurde in ein frisches collection tube überführt. Danach wurde das 1,5fache Volumen an 100% Ethanol zu der RNA gegeben, sorgfältig resuspendiert, die gefällte RNA auf die RNeasy Mini Säule pipettiert und anschließend bei > 8000xg (mind. 10000rpm) für 30 sec zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde einmalig mit dem Rest der RNA wiederholt. Die Säule wurde mit 700µl Buffer RWT gewaschen. Daraufhin wurde zweimal hintereinander 500µl Buffer RPE auf die Säule gegeben. Zwischen diesen Schritten wurde stets bei > 8000xg (mind. 10000rpm) zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Letztlich wurde 30-50µl RNase-freies Wasser direkt auf die Membran der trockenen Säule pipettiert und wiederum bei > 8000xg (mind. 10000rpm) zentrifugiert, um die RNA zu eluieren. Eine Kontrolle auf Reinheit der extrahierten RNA sowie auf deren Quantität erfolgte photometrisch am Nanodrop bei 280nm mit einer 1:100 Verdünnung bei einem Gesamtvolumen von 100 µl. Zum Nullabgleich diente eine mit destilliertem Wasser gefüllte Küvette.

2.2.5.1 Geräte, Materialien und Chemikalien und Biochemikalien zur transienten Transfektion, MTS-Assay und RNA-Extraktion:

Gerät	Hersteller
Zentrifuge / Minifuge	Heraeus (Deutschland)
Nanodrop	Bio-RAD
Multiscan MS (Monochromator)	Fa. Labsystems (USA)

Materialien	Hersteller
6-well Platten	Thermo scientific
96-well Platten	Thermo scientific
miRNeasy Mini Kit	Qiagen
Buffer RWT	Qiagen
Buffer RPE	Qiagen
DNase I stock solution	Qiagen

Chemikalien und Biochemikalien	Hersteller
Opti-MEM	Gibco
Lipofectamine 2000	Invitrogen
pre- / anti- miR 146b	Ambion
Qiazol Lysis Reagent	Qiagen
Chloroform	Carl Roth GmbH Deutschland
Ethanol	Carl Roth GmbH Deutschland
DEPC H ² O	Carl Roth GmbH Deutschland
Cell Titer 96 Reagenz	Promega

2.2.6 Reverse Transkription und quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion

2.2.6.1 Polymerasekettenreaktion - Methodik

Die Polymerasekettenreaktion dient der Vervielfältigung spezifischer DNA-Sequenzen. Somit können kleinste DNA-Mengen vervielfältigt und entsprechend nachgewiesen werden, es handelt sich um eine semiquantitative Amplifikation. Die PCR besteht aus 30-40 Zyklen, wobei jeder Zyklus aus drei Schritten besteht. Die Zyklen laufen bei unterschiedlichen Temperaturen ab.

Schritt 1: Denaturierung

Durch Erhitzen auf 95°C wird die DNA-Matrize in Einzelstränge aufgespalten.

Schritt 2: Annealing

Unter Annealing versteht man die Hybridisierung der Primer. Dabei lagern sich diese bei der raschen Abkühlung an die komplementäre Sequenz des jeweiligen DNA-Einzelstrangs an. Die notwendige Temperatur ist spezifisch für die einzelnen Primer und liegt in der Regel zwischen 50 und 65°C. Um unter optimalen Bedingungen zu arbeiten, wurde die Annealing-Temperatur den Herstellerinformationen gemäß angepasst. Allgemein gilt, je höher die Anzahl an Wasserstoffbrücken ist, also je höher der GC-Gehalt der Primer, desto höher ist die günstigste Annealing-Temperatur.

Schritt 3: Elongation

Unter Verwendung der Substrate, der sog. dNTPs, verlängert eine thermostabile DNA-Polymerase die Primer am freien 3'-OH-Ende. Hierfür liegt die optimale Arbeitstemperatur in der Regel bei 70–72°C. Pro Zyklus verdoppelt sich die Menge der DNA.

2.2.6.2 Reverse Transkription- Methodik:

Vor Durchführung der PCR muss die gewonnene RNA in cDNA umgewandelt werden, dies erfolgt über die reverse Transkription. Dazu wurden in dieser Arbeit zwei verschiedene Reverse-Transkriptions-Systeme verwendet.

Ursprünglich entstammt die Reverse Transkriptase den Anfang des 19. Jahrhundert erstmals beschriebenen Retroviren. Sie stellt eine RNA- und DNA-abhängige DNA-Polymerase dar, welche einzelsträngige RNA in doppelsträngige DNA transkribiert. Sie besitzt sowohl DNA-Polymerase-Aktivität, mit welcher sie den zur Vorlage komplementären DNA-Strang synthetisiert, als auch Ribonuklease (RNase)-H-Aktivität, welche RNA zu Oligonukleotiden abbaut. Wie oben beschrieben dient die reverse Transkriptase in der Molekularbiologie dazu, RNA, in diesem Fall mRNA, in vitro in komplementäre DNA, die sog. cDNA zu transkribieren.

2.2.6.3 Quantitative Real Time Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) – Methodik

Die qRT-PCR basiert auf der oben beschriebenen, herkömmlichen PCR, ermöglicht jedoch zusätzlich die Quantifizierung der DNA in Echtzeit. Zur Quantifizierung der Expression bedient man sich spezifischer Primer für die Ziel-Genabschnitte. Im Fall der „Taqman Sonden“ Real Time PCR, enthalten die Primer bereits Farbe. Dieser blaue Farbstoff wird abgespalten, sobald der entsprechende miRNA-Primer an die komplementäre Sequenz der spezifischen cDNA bindet. Dagegen enthalten die entsprechenden Primer für die „SybrGreen“ Real Time PCR keine Farbe. Um trotzdem ein Signal zu erhalten, enthält der Sybr-Green Mix einen grünen Farbstoff. Dieser wird zur gleichen Zeit aktiviert, wenn der entsprechende Primer an die komplementäre Sequenz der (allgemeinen) DNA bindet und so ebenfalls vom Laser detektiert. Die Quantifizierung der DNA erfolgt somit über die Messung der Fluoreszenzzunahme

eines Farbstoffes (hier FAM oder SybrGreen), die mit jedem Zyklus der PCR zunehmende Fluoreszenz steigt proportional zur Menge der amplifizierten DNA. Die Menge der amplifizierten DNA wird mithilfe des c_t -Werts (*Threshold*) angegeben, dieser ist ein Maß für die Quantifizierung und beschreibt das exponentielle Wachstum der Kurve. Dabei bezieht er sich auf denjenigen Zyklus, bei welchem die Fluoreszenz erstmals beginnt signifikant über den Hintergrundwert anzusteigen (s. Abb. 5). Die Fluoreszenz übersteigt den Schwellenwert umso schneller, je mehr Substrat (dNTP's) vor Durchführung der PCR in der Probe enthalten war. Je mehr Kopien während der Elongation entstehen, desto schneller können Fluoreszenzsignale detektiert werden.

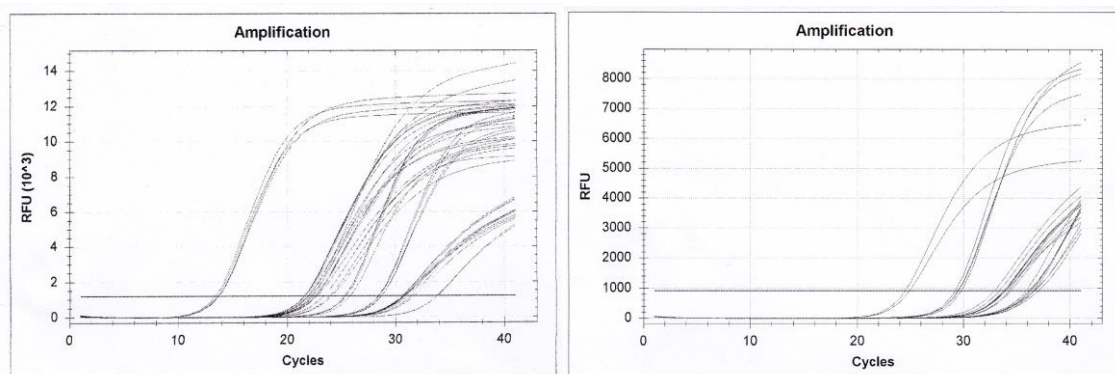


Abbildung 5: Exponentielle Darstellung der c_t -Werte. Dabei stellt die x-Achse die Anzahl der Zyklen dar, die y-Achse das festgelegte Fluoreszenz-Niveau. Dieses ist durch den Treshold (durchgezogene Linie) bestimmt. Der Treshold gibt die Anzahl der PCR-Zyklen an, die notwendig sind, um ein festgelegtes Fluoreszenz-Niveau zu aquirieren.

Zur besseren Vergleichbarkeit von Expressionsunterschieden verschiedener Proben, wurde mit sog. „Housekeeping genes“ gearbeitet. Dabei handelt es sich um konstitutiv exprimierte Gene, die somit unabhängig sind von Zelltyp, Zellstadium und anderen äußeren Einflüssen. Als „Housekeeper“ für die „SybrGreen“ Real Time PCR stand β -Actin zur Verfügung. Für die spezifische „Taqman“ Real Time PCR diente RNU6B zu diesem Zweck.

Folgende Primer wurden in der SYBR-GREEN Anregung verwendet: β -Actin, IGF-1, PDGF, NF κ B, N-Ras (genaue Primer-Sequenzen s. Kapitel 2.2.6.7.). Die Primer für die FAM-Anwendung waren: pre-/anti-miR-146b, sowie deren Kontrollen. Im Rahmen der reversen Transkription wurden die Primer in 5-facher Verdünnung eingesetzt, für die qRT-PCR in 20-facher Verdünnung.

2.2.6.4 Versuchsaufbau allgemeine cDNA-Synthese für „SybrGreen“ Real Time PCR

Für die allgemeine cDNA Synthese wurde mit dem ImProm II Reverse Transcriptions System von Promega gearbeitet. Dazu wurde 1 μ g RNA für die Transkription verwendet und die cDNA-Synthese mittels Random Primer durchgeführt. Die gewonnene cDNA wurde mit DEPC-H₂O 1:25 verdünnt und stand daraufhin für die „SybrGreen“ Real Time PCR zur Verfügung. Hierbei diene stets β -Actin als endogene Kontrolle. Der Ansatz wurde mithilfe des Absolute QPCR SYBR Green Mix erstellt.

Standardansatz „allgemeine“ cDNA Synthese

RNA-Verdünnung:

1 μ g RNA + x μ l DEPC-H₂O = 11,6 μ l

Für den Ansatz gilt: Multiplikation je nach Anzahl der gewünschten RNA's

ImProm II 5x Reaction Buffer	4 μ l
MgCl ₂ 25mM	1,2 μ l
dNTP Mix 10mM	1 μ l
rRNasin RNase Inhibitor 40U/ μ l	0,2 μ l
ImProm II Reverse Trankriptase	1 μ l
Random Primers 500 μ g/ml	1 μ l

8,4 μ l des cDNA Mix auf die RNA geben \rightarrow Gesamtvolumen: 20 μ l

Standardansatz „SybrGreen“ Real Time PCR	
cDNA 1:25 (100ng/μl)	2μl
Für den Ansatz gilt: Multiplikation je nach Anzahl der gewünschten RNA's	
DEPC-H ₂ O	12μl
Absolute Sybr Green Mix 2x	20μl
Primer 10x	4μl
=Sybr Green Real Time Mix	18μl

2.2.6.5 Versuchsaufbau spezifische cDNA-Synthese und „Taqman Sonden“ Real Time PCR

Die spezifische cDNA Synthese wurde mit dem Taqman MicroRNA Reverse Transcription Kit von Applied Biosystems durchgeführt. Um die Expression der miR146b zu erfassen, wurden spezielle Primer von Applied Biosystems verwendet (Taqman hsa-miR-146b). Als Housekeeper diente in allen Versuchen RNU6B. Für die „spezifische“ cDNA Synthese wurde die gewonnene RNA in einer Konzentration von 10ng/μl verdünnt.

Standardansatz „Spezifische cDNA Synthese	
RNA 10 ng/μl	1 μl
Für den Ansatz gilt: Multiplikation je nach Anzahl der gewünschten RNA's	
DEPC-H ₂ O	5,5μl
AB 5x RT Buffer	1μl
AB dNTP Mix 100mM	0,1μl
AB RNase Inhibitor 20U/μl	0,1μl
AB MultiScribe Reverse Transkriptase	0,3μl
miR Primer 5fach	2μl
9μl des cDNA Mix auf die RNA geben → Gesamtvolumen:	10μl

Nach erfolgreich durchgeführter spez. Taqman cDNA Synthese folgte die Real-Time-PCR (qRT-PCR) zur Quantifizierung der spezifischen microRNA. Hierzu wurde der Taqman 2x Universal PCR Master Mix genutzt. Der Ansatz wurde auf die spezifische cDNA gegeben und nach kurzer Zentrifugation auf jeweils 2 Eppendorf Cups á 20µl (Doppelwerte) pipettiert.

Standardansatz „Taqman Sonden“ Real Time PCR	
spez. cDNA	10µl
Für den Ansatz gilt: Multiplikation je nach Anzahl der gewünschten RNA's	
DEPC-H ₂ O	17µl
Taqman Universal UNG Mastermix 2x	30µl
spezifischer miR Primer 20fach	3µl
= Taqman Real Time Mix	50µl

Die Schmelzkurvenanalyse diente der Visualisierung der Amplifikationsprodukte und erfolgte nach der Amplifikation, welche primerabhängig ca. 40 Zyklen umfasste (s.Abb. 6). Standardmäßig startete die Analyse bei einer Temperatur von 75°C. Daraufhin stieg die Temperatur um jeweils 1°C alle 10 sec. an, bis eine Temperatur von 90°C erreicht war. Bis zum Erreichen der Zieltemperatur konnten so die Fluoreszenzsignale aufgezeichnet werden und das gewünschte Amplifikationsprodukt damit nachgewiesen werden.

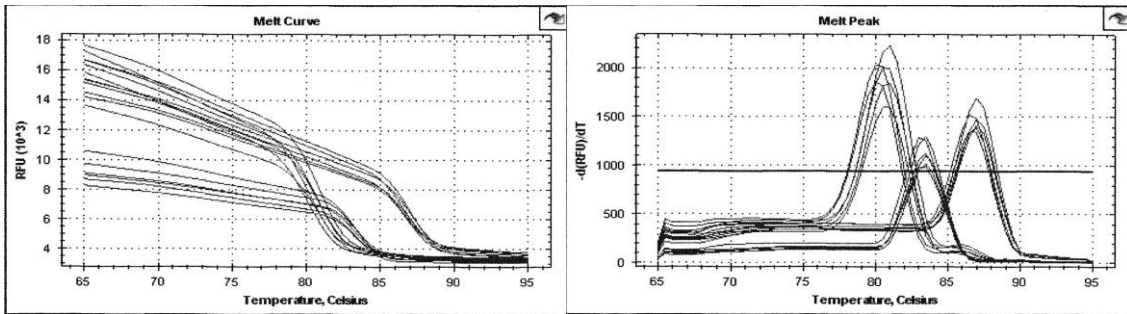


Abbildung 6: Darstellung der Schmelzkurve, wobei die x-Achse die Temperatur in Grad Celsius und die y-Achse das Fluoreszenz-Niveau abbildet. Das Fluoreszenzsignal nimmt ab, sobald die Schmelztemperatur des jeweiligen Amplifikationsproduktes erreicht ist.

2.2.6.6 Materialien, Geräte und Substanzen zur Reverse Transkription und quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion

Gerät	Hersteller
GeneAmp PCR System 9700	Applied Biosystems
CFX96 Cycler	BioRad

Substanz	Hersteller
Taqman MicroRNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems
Taqman 2x Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems
ImPromo II – Reverse Transcription System	Promega
Absolute qPCR SYBR Green Mix	Thermo Scientific
Primer 146b	Applied Biosystems
RNU6B	ambion
β-Actin	biomers.net
N-Ras	biomers.net
NFκB	biomers.net
PDGFA	Qiagen

IGF-1	biomers.net
-------	-------------

2.2.6.7 Primersequenzen

Name	Species	Mature miRNA Sequence
hsa-miR-146b-5p (biomers)	Homo sapiens	UGAGAACUGAAUCCAUAGGCU
h-βActin for h-βActin rev (biomers)		5'-cct ggc acc cag cac aat-3' 5'-ggc gat cca cac gga gta ct-3'
NRas_NM002524for NRas_NM002524rev (biomers)		5'-aac ctc agc caa gac cag aca g-3' 5'-tgg caa tcc cat aca acc ctg-3'
NFkB-p50s NFkB-p50as (biomers)		5'-aga atg gca gaa gat gat cca-3' 5'-tgg atc atc ttc tgc cat tct-3'
IGF-1sense IGF-1antisense (biomers)		5'tgg atg ctc ttc agt teg gtg-3' 5'agg ggt gcg caa tac atc t-3'
HS_PDGF α 1_SG (Qiagen)		als Kit geliefert (www.qiagen.com)
RNU6B		als Kit geliefert (www.qiagen.com)

2.2.7 Luciferase-Assay - Methodik

Der Luciferase-Assay ist eine molekularbiologische Methode zur Untersuchung der Genexpression und der Genregulation. In dieser Arbeit wurde mit sog. „Dualen Reportern“ gearbeitet. Der Begriff „Duale Reporter“ impliziert die simultane Expression und Messung zweier Reporterenzyme in einem System. Das bedeutet, dass ein Reporter die Aktivität des Luciferase-Gens unter den gegebenen Bedingungen des jeweiligen Experiments misst. Der andere Reporter dagegen besitzt eine konstitutive Aktivität und dient somit als interne Kontrolle. Da Duale Reporter Assays äußere Einflüsse auf das Experiment auf ein Minimum reduzieren, ermöglichen sie eine

zuverlässige Interpretation der Ergebnisse. Dabei diente die Luciferaseaktivität von *Photinus pyralis* (nordamerikanischer Leuchtkäfer) als Reporter gen. Die Luciferase von *Renilla reniformis* (Oktokorallenart, sog. Seefeder) stellte den Kontrollreporter dar.

2.2.8 Luciferase-Assay - Versuchsaufbau

Der Luciferase Assay wurde mit dem pMIR-Report-Vektor der Firma Ambion von Frau Katrin Borschert nach dem folgenden Protokoll durchgeführt.

Mittels PCR wurde das 323bp lange Fragment des zu untersuchenden Zielgens N-Ras vervielfältigt. In Tabelle 1 ist der dazu verwendete Primer dargestellt; dieser umgibt die Restriktionsenzyme *HinDIII* und *SpeI*.

Primer	Sequenz
N-Ras	<p><i>CTGCACTGACACCCCTGGTCCTGACTTCCCTGGAGGAGAAGTATTC</i> <i>CTGTTGCTGTCTTCAGTCTCACAGAGAAGCTCCTGCTACTTCCCCAGCTCTCAGTAGTTT</i> <i>AGTACAATAATCTCATAACTACCTCCTCACTTGGCTGTCTGACCAGAGAATGCACC</i> <i>TCTTGTTACTCCCTGTTATTTTTCTGCCCTGGGTCTTCCACAGCACAAACACACCTCTG</i> <i>CCACCCAGGTTTTTCATCTGAAAAGCAGTTCATGTCTGAAACAGAGAACCAAACCGCAA</i> <i>ACGTGAAATTCATTGAAAACAGTGTCTTGAGCTCTAAAGTAGCAACTGCTGGTGATTTT</i></p>

Tabelle 1: Primersequenz für N-Ras. Die Bindungsstelle für die miR-146b ist 10 bp lang. Die N-Ras 3'UTR miR-146b Bindungsstelle ist rot markiert.

Das Ergebnis war eine Gensequenz, welche die 3'UTR der entsprechenden Gen-mRNA beinhaltet. Diese Sequenz sollte nun in den Vektor kloniert werden. Dazu wurden durch die PCR die Überhänge von *SpeI* und *HinDIII* endständig in die Gensequenz integriert. Gemäß dem Herstellerprotokoll erfolgte die Klonierung der Promotorsequenzen in kommerziell erhältliche Plasmide. Als Reporter gen enthielten die Plasmide die Luciferase des amerikanischen Leuchtkäfers (*Photinus pyralis*) sowie ein Resistenzgen gegen Ampicillin; Kontrollreporter-Plasmid war der pRL-TK Vektor mit der *Renilla*-Luciferase.

Nach dem Auftauen der Zellen des E.coli Stammes XL blue-01 auf Eis, wurden 1-5 μ l Plasmid-DNA zu 100 μ l Bakteriensuspension pipettiert. Dieser Ansatz inkubierte für 30 min auf Eis. Danach wurde der Ansatz für 20 sek. in das 42°C warme Wasserbad gelegt. Es folgte eine 2-minütige Inkubation auf Eis. Nun wurden 900 μ l des warmen LB-Mediums (Luria-Broth-Medium) hinzugefügt. Dieser Ansatz inkubierte eine Stunde lang bei 37°C auf dem Bakterenschüttler. Nachdem 10 μ l dieses Ansatzes auf die Ampicillin-haltige Agarplatte pipettiert wurden, ruhte der Ansatz bei 37°C bis zum nächsten Tag. Dann wurde eine Kolonie mit einer sterilem Impföse aufgenommen, in 50ml LB-Medium mit Ampicillin suspendiert und zur Inkubation über Nacht bei 37°C auf den Bakterenschüttler gelegt.

Am nächsten Tag wurden die Zellen geerntet. Dazu wurden sie zunächst bei 4°C 10 min lang bei 6000 rpm zentrifugiert, sodass ein Pellet entstand. Dieses wurde entweder sofort aufgeschlossen oder bei -20°C eingefroren. Daraufhin folgte die Isolierung der Plasmid-DNA unter Verwendung des HiSpeed Plasmid Midi Isolation Kit von Qiagen. Entsprechend den Herstellerangaben ergaben sich diese Arbeitsschritte: die Zellyse (alkalisch) sowie die spezifische DNA-Bindung an eine Anionen-Austauscher-Säule bei entsprechenden Salz- und pH-Bedingungen. Am UV-Spektrometer wurde die Konzentration der Plasmidlösung bestimmt.

Das Plasmid wurde durch Restriktionsenzyme geschnitten, um zu kontrollieren ob ein bestimmtes Insert vorhanden war. Der Restriktionsansatz entspricht dem Herstellerprotokoll. Die verdauten Plasmide wurden in einem ethidiumbromidhaltigen 0,8%-igen TAE-Agarosegel (Tris-Acetat-EDTA-Puffer-Agarosegel) elektrophoretisch aufgetrennt. Danach wurden die gewonnenen Fragmentlängen unter UV-Licht mit einem DNA-Standard verglichen. Nach Aufarbeitung der entsprechenden Bande im TAE-Agarosegel (MicroElute Gel Extraction Kit), wurden die Proben an die Firma GATC (Ravensburg) weitergeleitet, welche mittels Sequenzierung die Inserts auf die richtige Basenabfolge überprüfte.

Daraufhin wurden die entsprechenden Reporter- und Kontrollplasmide in die LNCaP Zellen transfiziert. Beide, der Reporter- sowie der Kontrollvektor, wurden zu 50ng/ μ l verdünnt und zu dem Ansatz gegeben. Gleichzeitig wurden pre- und antago-miR-146b sowie die Kontroll-miR in die Zellen kotransfiziert.

48 Stunden post transfectionem wurden die Zellen mit PBS (Phosphate buffered saline) gewaschen. Danach wurden 500µl PLB (Passive Lysis Buffer) dazu pipettiert. Dieser Ansatz befand sich 15 min lang bei Raumtemperatur auf dem Schüttler und wurde dann bei 4°C und 20.000rpm für eine Minute zentrifugiert. Es wurden 100µl Luciferase-Assay-Reagenz vorgelegt und mit 20µl des Zelllysats-Überstandes versetzt. Daraufhin wurde für 10 Sekunden im Luminometer die Luciferase-Aktivität gemessen. Hierbei reagierte Luciferin zu Luciferyl-AMP in Anwesenheit von Magnesium-Ionen und ATP. Katalysiert wurde die Reaktion von der Luciferase des Leuchtkäfers *Photinus pyralis*. Diese Luciferase wird auch firefly luciferase genannt und ist ein monomeres Protein, welches keine posttranslationale Prozessierung erfährt. Das entstandene Luciferyl-AMP oxidierte unter Emission von Licht einer Wellenlänge von 562nm. Gleichzeitig oxidierte die Renilla-Luciferase - das Reporterenzym in dieser Reaktion - Coelenteraten-Luciferin unter Freisetzung von Licht einer Wellenlänge von 482nm. Diese beiden Reaktionen sind in Abbildung 7 veranschaulicht. Durch die Entstehung luminiszierender Produkte konnte eine Aussage über die Aktivität der Reporterenzyme Firefly- und Renilla-Luciferase getroffen werden. Dabei diente die jeweilige Substratspezifität der Enzyme zur Unterscheidung der Lumineszenzreaktionen. Zum Ausgleich von Fehlerschwankungen erfolgte die Normalisierung der Firefly-Luciferase auf die konstitutive Renilla-Luciferase. Mittels Photomultiplier wurden die Photonen gezählt. Aus den direkt gezählten Lichtimpulsen wurden relative Lichtimpulse berechnet und in einer Excel-Tabelle dargestellt. Schließlich wurde die gemessene Luciferase-Aktivität auf den Proteingehalt der Proben normiert.

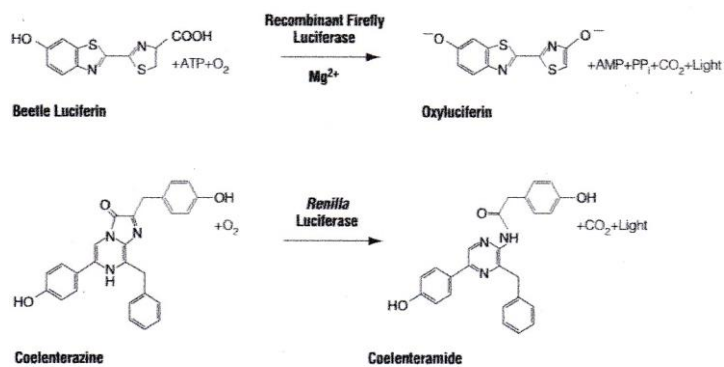


Abbildung 7: Reaktionsablauf der Recombinant Firefly Luciferase, welche unter Anwesenheit von ATP, Mg²⁺ und O₂ Licht emittiert und der Renilla Luciferase, welche für die Lumineszenz-Reaktion O₂ und Coelenterate-Luciferin benötigt – gemäß Herstellerprotokoll.

2.2.8.1 Materialien, Geräte und Substanzen zum Luciferase Assay

Gerät	Hersteller
Luminometer Lumat LB 9507	Berthold Technologies
Wasserbad	Julabo

Matreilien	Hersteller
pMIR-Report-Vektor	Ambion
HiSpeed Plasmid Midi Isolation Kit	Qiagen

Substanz	Hersteller
LB-Medium (Luria-Broth-Medium)	Promega
HindIII Restriktionsenzym	New England Biolabs
SpeI-Restriktionsenzym	New England Biolabs

2.3 Datenverarbeitung und Statistik

2.3.1 Datenverarbeitung des MTS-Tests

Die Analyse der MTS-Assays erfolgte mittels des Multiscan MS Monochromator. Die damit erhobenen Werte wurden in Excel transferiert. Dabei wurden stets dreifach-Bestimmungen durchgeführt, von denen das arithmetische Mittel gebildet wurde. Dieses wurde in den entsprechenden Säulendiagrammen, den verschiedenen Transfektionstagen zugeordnet, veranschaulicht.

2.3.2 Datenverarbeitung qRT-PCR

Die bei der qRT-PCR gewonnenen C_t -Werte wurden in Excel importiert und hiermit ausgewertet. Bei Verdacht auf Artefakte oder Vorliegen von Nebenprodukten, wurden diese C_t -Werte nicht zur weiteren Datenverarbeitung und Diagrammerstellung genutzt. Es wurde stets mit Doppelwerten gearbeitet, sodass für jede Probe zwei Reaktionsansätze vorhanden waren. Zunächst wurde das arithmetische Mittel dieser beiden C_t -Werte gebildet. Danach wurde die Differenz der Expressionswerte und des jeweiligen „Housekeepers“ (β -Actin bei SYBR-Green und RNU6B bei Taqman) gebildet. Das x-fache Expressionsverhältniss wurde mittels „ $\Delta\Delta CT$ -Methode“ durch folgende Formel berechnet: $2^{-(\Delta CT(\text{Kontrolle-Normalisiert})-\Delta CT(\text{Probe-Normalisiert}))}$ =relative x-fache Expression.

2.3.3 Datenverarbeitung Luciferase-Assay

Die bei dem Luciferase-Assay gewonnen Daten wurde in Excel transferiert und die Werte der 6 Messungen für jede Zelllinie und Kotransfektion zur weiteren Analyse in Tabellen geordnet. Dabei wurde zuvor wiederum der Quotient aus der Lumineszenz des Kontrollvektors und des Reporter-Vektors gebildet. Der dargestellte Messwert ergab sich aus dem jeweils gebildeten arithmetischen Mittel der 6 Messungen.

2.3.4 Statistik

Wichtigstes Instrument der statistischen Auswertung war der T-Test, mit welchem die Mediane normalverteilter Daten verglichen wurden. Signifikante Ergebnisse (p -Wert < 0,05) wurden mit einem „*“ gekennzeichnet. Zudem erfolgte eine Korrelationsanalyse; der Pearson'sche Korrelationskoeffizient wurde anhand der Expressionslevel berechnet.

3 Ergebnisse

Der Ergebnisteil ist in zwei Rubriken gegliedert: zu Beginn werden die Expressionsanalysen von miR-146b an zwei unterschiedlichen, voneinander unabhängigen Prostatakarzinom-Kohorten vorgestellt. Im Anschluss folgen die Funktionsanalysen der miR-146b, die deren Bedeutung auf zellulärer Ebene darstellen soll.

3.1 Die Bedeutung der microRNA-146b im primären PCa-Tumorgewebe

Die miR-146b gehört zu einer Gruppe von sieben microRNAs, die aufgrund ihrer Expression in der eingangs erwähnten Microarray-Analyse eine Differenzierung zwischen BPH-Gewebe sowie Hochrisiko-PCa Gewebe mit- und ohne Rezidiv ermöglichten. Dieses Ergebnis führte zu der Frage, ob die miR-146b eine mögliche prognostische Bedeutung beim Prostatakarzinom haben könnte. Dies stellte den Ausgangspunkt der ersten Untersuchungen der vorliegenden Arbeit dar. An einem zu den Voruntersuchungen unabhängigen Kollektiv (Kohorte I) wurde die miR-146b Expression erhoben und ihre Assoziation zu etablierten prognostischen Parametern wie PSA, GS und pT-Stadium analysiert. Bei den Gewebeproben der Kohorte I handelte es sich um kryoasservierte Proben.

Die Tumorproben der Kohorte II waren in Formalin fixiert und in Paraffin gebettet. Aufgrund des längeren Follow-up mit klinischen Daten, welche Endpunkte wie biochemischer oder klinischer Progress umfassten, konnte die potentielle Assoziation von miR-146b mit klinisch relevanten Endpunkten untersucht werden. Zusätzlich wurden die Expressionsdaten dieser Gruppe zum Vergleich der miR-146b Ausprägung im benignen, ebenfalls Paraffin gebetteten, Gewebe verwendet.

3.1.1 Klinisch-pathologische Charakteristika der PCa-Kohorte I

Für die folgenden Untersuchungen wurde ein, zu den Voruntersuchungen unabhängiges, Patientenkollektiv (Gesamtkohorte I) herangezogen, das aus 60 Patienten bestand. Diese hatten im Zeitraum von 2006 bis 2012 in der urologischen Klinik der Universität Würzburg eine radikale Prostatektomie erhalten. Es handelte sich um unmittelbar an die Entnahme kryoasserviertes Gewebe. Die klinisch-pathologischen Charakteristika zum

Operationszeitpunkt sind der Tabelle 2 zu entnehmen. Der prä-operative PSA-Wert lag im Mittel bei 14,5ng/ml, rund 38% der Patienten hatten einen GS ≥ 8 und circa 27% wiesen ein pT $\geq 3b$ auf; es handelte sich um ein zufällig gewähltes, unselektioniertes Kollektiv. Das eingefrorene Gewebe wurde mikroskopisch von einem erfahrenen Pathologen (Herr Prof. Ströbel) als Karzinomgewebe identifiziert und wie im Material und Methodenteil beschrieben, aufgearbeitet.

Tabelle 2: klinisch-pathologische Charakteristika der PCa-Kohorte I

	n	%
Gesamtkohorte I	60	
Alter bei Operation (Jahre)	64,9 (49-76)	
Gleason Score		
≤ 6	11	18,34
7	26	43,33
≥ 8	23	38,33
Tumorstadium		
pT2	35	58,33
pT3a	9	15,00
pT3b	12	20
pT4	4	6,67
Lymphknotenmetastasen		
N0	48	80,00
N1	12	20,00
PSA-Wert prä-operativ (ng/ml)	14,5 (0,6-87,4)	

3.1.2 Assoziationsanalysen von miR-146b in der PCa-Kohorte I

Das pT-Stadium, der prä-operative PSA-Wert sowie der Gleason Score fließen in die aktuellen Risiko-Einteilungen von D'Amico ein, um ein mögliches Progressionsrisiko vorherzusagen. Diese klinisch-pathologischen Parameter wurden daher mit der Expression von miR-146b assoziiert, nachdem der Expressionsstatus mittels qRT-PCR ermittelt worden war.

Patienten mit einem prä-operativen PSA von ≤ 4 ng/ml hatten eine deutlich höhere miR-146b Expression im Vergleich zu Patienten mit einem über 4 ng/ml gelegenen PSA-Wert ($p < 0.05$). In Abbildung 8 werden die Expressionsunterschiede von miR-146b in Abhängigkeit vom pT-Stadium deutlich. Patienten mit einem pathologisch-ermittelten Tumorstadium von $\leq 3a$ zeigten ebenso eine signifikant vermehrte Expression von miR-146b im Vergleich zu Patienten mit weiter fortgeschrittenem Tumor ($\geq 3b$). Einzig in Bezug auf den Gleason Score konnten keine signifikanten Ergebnisse erzielt werden.

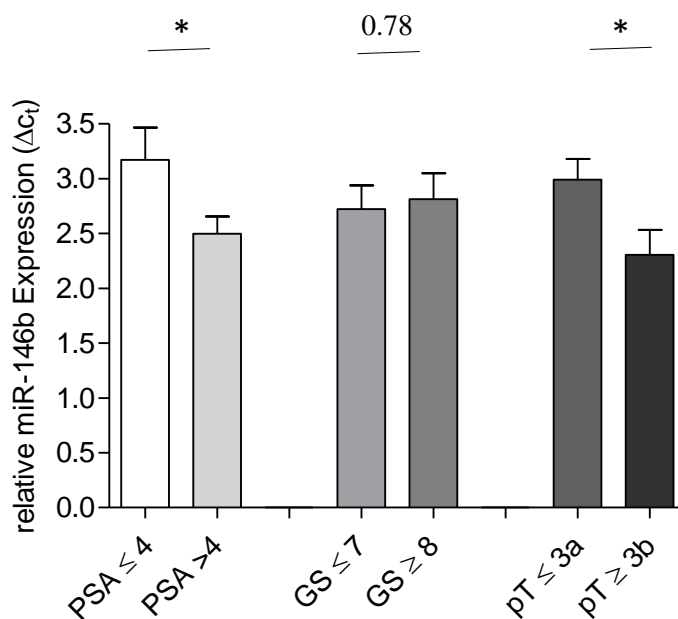


Abbildung 8: Assoziation der miR-146b-Expression zu etablierten Prognoseparametern in der PCa-Kohorte I

Relative Expression von miR-146b in 60 PCa-Gewebeproben (kryokonserviert). Die Expression wurde mittels qRT-PCR ermittelt. Die Subgruppen wurden anhand der pathologischen Tumorcharakteristika PSA, GS und pT-Stadium gebildet. Es wird die mittlere Expression mit Fehlerbalken für die Standardabweichung gezeigt. Signifikanzen wurden mittels student's T-Test errechnet; p-Werte $> 0,05$ wurden auf der verbindenden Linie hervorgehoben.

Die Herabregulation von miR-146b zeigt eine Assoziation zu aggressiveren Tumorcharakteristika wie erhöhtes PSA und fortgeschrittenes Tumorstadium.

3.1.3 Klinisch-pathologische Charakteristika der PCa-Kohorte II

Nach positiven Assoziationen von miR-146b zu etablierten prognostischen Markern wie PSA und pT-Stadium, erfolgte die Evaluation einer möglichen Assoziation zu klinischen Endpunkten wie biochemischer und klinischer Progress (BCR und CF). Notwendig war dazu die Arbeit mit einem zweiten Kollektiv, welches sich durch ein entsprechendes Follow-up und einen hohen Anteil von Hochrisiko-PCa Patienten (mit Erreichen entsprechender Endpunkte) auszeichnete.

Die zweite Patientenkohorte (im Folgenden als Kohorte II bezeichnet) umfasst 34 in Formalin fixierte und Paraffin eingebettete Gewebeproben, die im Rahmen von radikalen Prostatektomien in den Jahren 2003–2006 in Würzburg asserviert worden sind. Die Gewebeschnitte wurden von einem erfahrenen Pathologen (Herr Prof. Rosenwald) mikroskopisch untersucht und entsprechend der Beschreibung im Material und Methodenteil aufgearbeitet.

Die Beschreibung der klinisch-pathologischen Charakteristika der Kohorte II ist in Tabelle 3 zusammengefasst. Es handelt sich um eine vorselektionierte Gruppe mit einem hohen Anteil von Hochrisiko-PCa: 56% (n=19), 44% waren an einem Niedrig- bzw. Intermediär-Risiko-PCa erkrankt. In der Gruppe mit dem höchsten Progressionsrisiko hatten 9 Patienten (47%) ein biochemisches Rezidiv (BCR), wobei fünf von ihnen zusätzlich ein klinisches Rezidiv (CF) entwickelten. Die Zeit bis zum Progress lag bei 42,7 beziehungsweise 65,3 Monaten. Von den 15 Patienten mit Niedrig- bzw. Intermediär-Risiko-PCa hatten nur 2 Patienten ein biochemisches Rezidiv. Das Alter der Patienten der Gesamtkohorte I zum Zeitpunkt der Operation lag im Mittel bei 62,7 Jahren. Das Follow-up betrug knapp 70 Monate im Durchschnitt.

Tabelle 3: klinisch-pathologische Charakteristika der PCa-Kohorte II

	n	%
Gesamtkohorte II		
Alter bei Operation (Jahre)	62,7 (44-76)	
Follow-up (Monate)	69,8 (6-107)	
Gleason Score		

≤ 6	14	41,18
7	11	32,35
≥ 8	9	26,47
Tumorstadium		
pT2	19	55,88
pT3a	10	29,41
pT3b	3	8,82
pT4	2	5,88
Lymphknotenmetastasen		
N0	30	88,24
N1	4	11,76
PSA-Wert prä-operativ (in ng/ml)	22,3 (3,3 - 192)	
Hochrisiko-PCa Patienten	19	55,88
<u>mit Rezidiv</u>	9	
BCR (durchschn. Zeitpunkt bis Rezidiv in Mo)	9 (42,7 Mo)	
CF (durchschn. Zeitpunkt bis Rezidiv in Mo)	5 (65,3 Mo)	
<u>ohne Rezidiv</u>	10	
Intermediär- und Niedrigrisiko-PCa Patienten	15	44,12
<u>mit Rezidiv</u>	2	
BCR (durchschn. Zeitpunkt bis Rezidiv in Mo)	2 (56 Mo)	
CF (durchschn. Zeitpunkt bis Rezidiv in Mo)		
<u>ohne Rezidiv</u>	13	

3.1.4 Assoziationsanalysen von miR-146b in der Patientenkohorte II

Wie bereits in den Assoziationsanalysen der ersten Kohorte wurde die miR-146b Expression in Analogie zu den etablierten Prognosemarkern Gleason-Score, PSA und pT-Stadium evaluiert. Durch die zusätzlich dokumentierte Nachsorge mit

entsprechendem Follow-up konnten klinische Endpunkte wie das Auftreten eines biochemischen Progress (BCR) oder eines Krankheitsrezidivs (CF) assoziiert werden.

Verglichen wurde die relative miR-146b Expression bei einem PSA-Wert ≤ 4 mg/ml und >4 mg/ml, einem Gleason-Score ≤ 7 und ≥ 8 sowie einem pT-Stadium $\leq 3a$ und $\geq 3b$; hierbei zeigte sich eine etwas stärkere Herunterregulation im Tumorgewebe mit höherem Gleason-Score beziehungsweise weiter fortgeschrittenem Tumorstadium, allerdings waren die Ergebnisse nicht signifikant ($p=0.62$ und $p=0.71$). Bei Patienten mit biochemischem Progress zeigt sich eine etwas höhere miR-146b Expression als bei denjenigen die im Beobachtungszeitraum progressionsfrei blieben, jedoch waren die Ergebnisse ohne statistische Signifikanz ($p=0.25$). Bei der Assoziation von miR-146b Expression und klinischem Progress war der Effekt entgegengesetzt; die Ergebnisse unterschritten auch hier nicht das Signifikanzniveau.

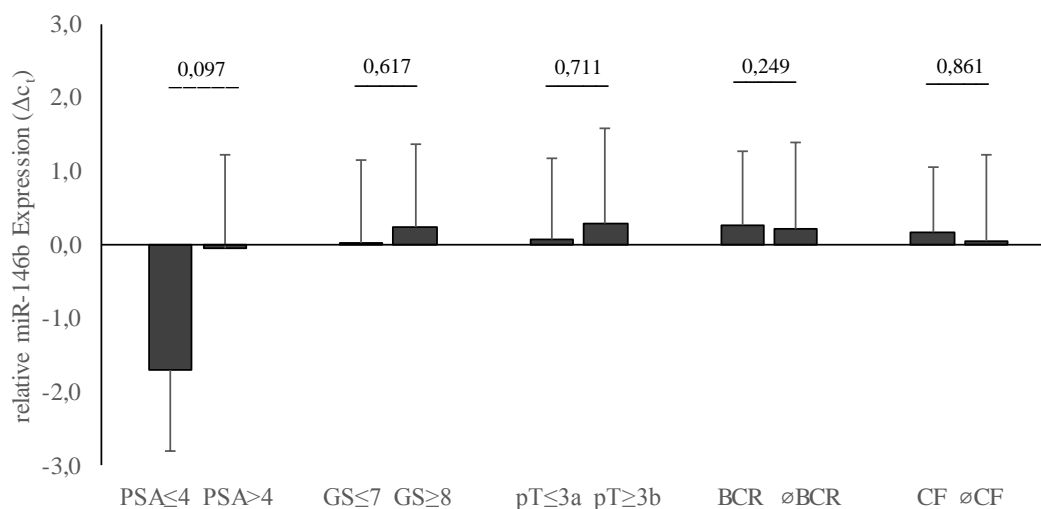


Abbildung 9: Assoziation der relativen miR-146b Expression im primären PCa-Tumorkollektiv II zu klinisch wichtigen Prognose-Parametern

Relative Expression von miR-146b in 34 PCa-Gewebeproben (Paraffin gebettet, formalin fixiert). Die Expression wurde mittels qRT-PCR ermittelt. Die Subgruppen wurden anhand der pathologischen Tumoreigenschaften wie PSA ≤ 4 vs. PSA > 4 , GS ≤ 7 vs. GS ≥ 8 beziehungsweise pT $\leq 3a$ vs. pT $\geq 3b$ gebildet. Subgruppen wurden zusätzlich in Abhängigkeit vom biochemischen – bzw. klinischen Progress (BCR, CF) gebildet. Es wird die mittlere Expression mit Fehlerbalken für die Standardabweichung gezeigt. Signifikanzen wurden mittels student's T-Test errechnet; p-Werte $> 0,05$ wurden auf der verbindenden Linie hervorgehoben.

Die in Kohorte I detektierte Assoziation von supprimierter miR-146b Expression und den pathologischen Parametern PSA und pT-Stadium konnte in der vorselektionierten Kohorte (mit hohem Hochrisiko-PCa-Anteil) nicht bestätigt werden. Die Assoziation zu klinisch relevanten Parametern wie BCR und CF zeigte ebenfalls keine statistisch signifikanten Ergebnisse, somit konnte miR-146b an der vorliegenden vollständigen Kohorte II nicht als prognostischer Marker bestätigt werden.

3.1.4.1 Subgruppenanalyse der PCa-Kohorte II (Hochrisiko-PCa-Proben)

Die Vorarbeiten, in denen miR-146b als potentieller prognostischer Marker aufgefallen war, waren an reinem Hochrisiko-PCa-Gewebe erfolgt. Es stellte sich somit die Frage, ob eine prognostische Funktion an der Subgruppe der Kohorte II, dem reinen Hochrisiko-PCa, nachgewiesen werden könnte.

Aus der zweiten Kohorte wurden die 19 Gewebeproben selektioniert, welche die Kriterien eines Hochrisiko-PCas erfüllten (s. Einleitung). Hiervon hatten n=9 ein Hochrisiko-PCa mit Rezidiv, die restlichen 10 Patienten hatten einen rezidivfreien Verlauf im Rahmen des Follow-ups (s. Tab. 3).

Innerhalb der malignen Gewebeproben zeigten Patienten mit einem Rezidiv eine vermehrte miR-146b Expression als Patienten ohne Rezidiv; dies entspricht den Ergebnissen der Vorarbeiten. Die Expressionsunterschiede waren jedoch nicht signifikant ($p=0.34$) (s.Abb.10). Die miR-146b Expression als Differenzierungskriterium zwischen Hochrisikopatienten mit und ohne Rezidiv konnte im vorliegenden Kollektiv (reines Hochrisiko-PCa) somit nicht bestätigt werden. Zusätzlich durchgeführte Assoziationsanalysen zu pathologischen und klinischen Parametern wie PSA, GS, pT-Stadium, BCR in der reinen Hochrisiko-PCa-Subgruppe zeigten keine signifikanten Ergebnisse.

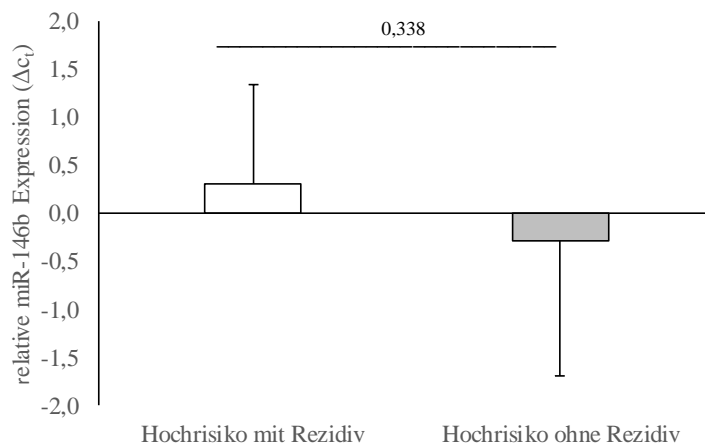


Abbildung 10: Relative miR-146b Expression in Hochrisiko-PCa Gewebe (Subgruppe aus Kohorte I) von n=19 Patienten mit -bzw. ohne Rezidiv

Gegenüberstellung der miR-146b Expression im Paraffin-gebetteten Hochrisiko Tumorgewebe mit - (n = 9) und ohne Rezidiv (n = 10); abgebildet sind die Mittelwerte der mittels qRT-PCR gewonnenen ΔC_t -Werte unter Berücksichtigung des *Housekeepers* RNU6B. Die Visualisierung der Signifikanzen im student's T-Test erfolgte mittels * ($p < 0,05$). Die Standardabweichungen wurden durch Fehlerbalken gekennzeichnet

3.1.5 Expressionsanalysen von miR-146b in der PCa-Kohorte II im Vergleich zu BPH-Gewebe

Die Assoziationsanalysen zu pathologischen und klinischen Parametern hatten in der Kohorte II keine signifikanten Ergebnisse gezeigt. Abschließend wurde die Rolle als möglicher Tumormarker überprüft. Hierzu wurde die miR-146b Expression der gesamten Kohorte zur Expression in 12 ebenfalls in Paraffin eingebetteten BPH-Proben untersucht. Mittels qRT-PCR wurde die miR-146b Expression in beiden Gewebetypen ermittelt, als „*Housekeeper*“ fungierte RNU6B.

Die gewonnenen Expressionsdaten zeigten eine starke miR-146b Suppression im Tumorgewebe gegenüber dem BPH-Referenzgewebe ($p < 0,05$) (s. Abb.11). Der Expressionsmedian von miR-146b lag bei ΔC_{tPCa} : -0,10, wohingegen der Median der benignen Proben bei ΔC_{tBPH} : 1,78 lag. 100 % aller Tumورproben lagen mit ihrer Expression unter dem Median der BPH-Proben. Zusätzlich wurde die Ausprägung der miR-146b im BPH-Gewebe mit der Expression in der Subgruppe der Kohorte II (dem

reinen Hochrisiko-PCa) verglichen. Der Expressionsmedian lag bei den Proben der malignen Subgruppe leichtgradig über dem der kompletten Kohorte

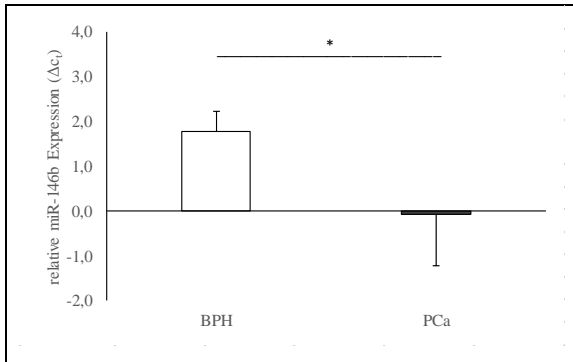


Abbildung 11: Relative miR-146b Expression im primären PCa-Gewebe (Gesamtkollektiv Kohorte II, n=34) sowie 12 BPH-Gewebe-Proben

Die relative miR-146b Expression ist dargestellt in Form von Δc_t -Werten aus den qRT-PCR Messungen der in Paraffin eingebetteten 34 Tumorgewebeproben (Niedrig-, Intermediär-, Hochrisiko-PCa) sowie der 12 BPH-Gewebeproben. Dargestellt sind die Mittelwerte der miR-146b Expression mit zugehöriger Standardabweichung. Signifikanzen im student's T-Test wurden mit * bei einem p-Wert<0,05 gekennzeichnet.

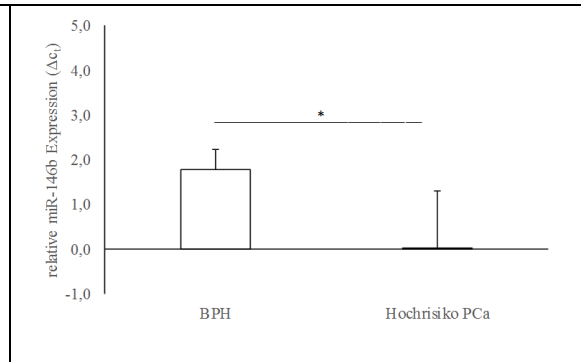


Abbildung 12: Relative miR-146b Expression im Hochrisiko-PCa-Gewebe (Subgruppe aus Kohorte II n=19) und 12 BPH-Gewebe-Proben

Die relative miR-146b Expression ist dargestellt in Form von Δc_t -Werten aus den qRT-PCR Messungen der Hochrisiko-PCa Proben (Subgruppe der Kohorte II) sowie der BPH-Gewebeproben. Dargestellt sind die Mittelwerte der miR-146b Expression mit zugehöriger Standardabweichung. Signifikanzen im student's T-Test wurden mit * bei einem p-Wert<0,05 gekennzeichnet.

Die Expressionsanalysen an der PCa-Kohorte II zeigten eine signifikant supprimierte Expression von miR-146b im Tumorgewebe im Vergleich zum BPH Gewebe. Sowohl die Gewebeproben der Kohorte II als auch das BPH-Gewebe waren in Paraffin eingebettet. Bei den Proben der Kohorte I handelt es sich um kryoasserviertes Material. Aufgrund der unterschiedlichen Präparation zur miRNA-Isolation und damit möglicherweise verbundenen Unterschieden in den Expressionsdaten haben wir auf einen Vergleich der miR-146b Expression in BPH und Kohorte I verzichtet.

Der miR-146b kann eine Rolle als Tumormarker zugesprochen werden, inwiefern diese microRNA eine Funktion als Tumorsuppressor hat, muss in der anschließenden Funktionsanalyse anhand der Tumorzellen überprüft werden.

3.2 Funktionsanalysen von miR-146b *in vitro* und *in vivo*

3.2.1 Transfektion von miR-146b in LNCaP Zellen

Für die Funktionsanalyse wurde mit den repräsentativen androgenabhängigen LNCaP Zellen gearbeitet. Ausgangspunkt für die weiteren Versuche war die ektope Steigerung, respektive Suppression der miR-146b Expression mittels transienter Transfektion.

In drei voneinander unabhängigen Experimenten wurden die LNCaP Zellen mit pre- und anti-146b transfiziert. Als Kontrolle diente eine scrambled-miRNA (scr) (Details siehe Material und Methoden Kapitel 2.2.3). Die Expressionslevel nach Transfektion wurden mittels qRT-PCR analysiert. Zellen, die mit pre-miR-146b transfiziert worden waren, zeigten eine auf das 285-fache gesteigerte Expression (ΔC_t : 16,1) im Vergleich zur Kontrolle (scr) ($\Delta\Delta C_t$ -Methodik, siehe Material und Methoden). Die Suppression durch anti-miR-146b um das 32-fache ($\Delta\Delta C_t$ -Methode) zeigte einen ΔC_t -Wert von -2,6. Der durchgeführte T-Test bestätigte die Signifikanz der Ergebnisse bei einem p-Wert von stets $<0,05$.

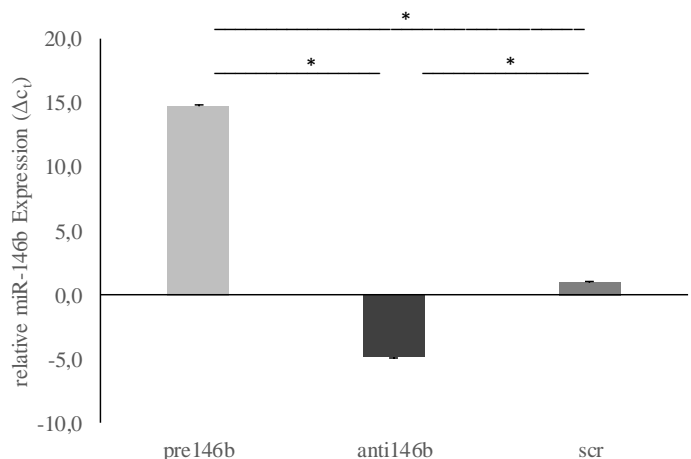


Abbildung 13: Transiente Transfektion von miR-146b in LNCaP Zellen

Darstellung der relativen Expression von miR-146b in mit pre-, anti- und Kontroll-miR (scr) transfizierten LNCaP Zellen 48h nach Transfektion. Die Überexpression und Suppression wurde mittels qRT-PCR detektiert, das Ausmaß der Regulation wurde mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methodik berechnet. Als Kontrolle wurden die ΔC_t -Werte einer Transfektion mit einer scrambled-miR verwendet. Abgebildet ist das arithmetische Mittel dreier unabhängiger Experimente mit Standardabweichung. Die mittels student's T-Test errechneten Signifikanzen wurden mit * ($p < 0,05$) visualisiert.

3.2.2 Proliferationsverhalten von miR-146b transfizierten LNCaP Zellen

Mithilfe des MTS-Assays sollte der Einfluss von miR-146b auf das Proliferationsverhalten von LNCaP Zellen überprüft werden. Die Experimente wurden in dreifacher Ausführung unabhängig voneinander durchgeführt.

Während sich am 2. Tag post transfectionem noch keine signifikanten Proliferationsunterschiede abbildeten, zeigten LNCaP Zellen mit vermehrter miR-146b Expression ein signifikantes, auf 81 % reduziertes Wachstums am 4. Tag post transfectionem im Vergleich zu den kontroll-transfizierten Zellen. Wie in Abb. 13 dargestellt, wiesen die mit pre-146b transfizierten Zellen am 6. Tag eine auf 42% verminderte Zahl vitaler Zellen im Vergleich zur Kontrolle auf. Die Signifikanz der Ergebnisse wurde mittels student's T-Test analysiert und zeigte für den 4. und 6. Tag p-Werte $< 0,05$. Zellen mit vermehrter miR-146b Expression führten zu einer deutlichen Proliferationshemmung 4 und 6 Tage nach Transfektion in LNCaP Zellen.

In Experimenten mit anti-miR-146b transfizierten Zellen konnten 2 sowie 4 Tage post transfectionem keine signifikanten Proliferationsunterschiede im Vergleich mit Kontrollzellen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

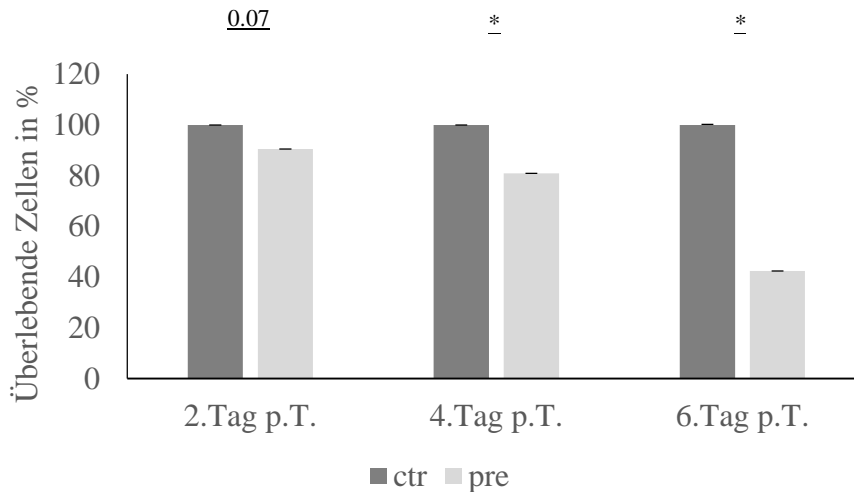


Abbildung 14: Proliferationsverhalten von LNCaP Zellen nach transienter Transfektion mit pre-miR-146b

Evaluation des Zellwachstums in mit pre-miR-146b und Kontroll-transfizierten LNCaP-Zellen. Dargestellt sind die überlebenden Zellen (in %) im Vergleich zu den kontrolltransfizierten Zellen. Der Proliferationsassay wurde an Tag 2, 4 und 6 post transfectionem mittels MTS-Reagenz und Monochromator analysiert. Die anhand des student's t-Test errechneten Signifikanzen wurden mit * ($p < 0,05$) visualisiert.

3.2.3 Identifikation von Zielgenen der miR-146b

Um die molekulare Rolle von miR-146b besser zu beurteilen, wurde die Funktionsanalyse um eine mögliche Targetfindung erweitert. Mithilfe der Datenbank der microRNA.org-Webseite (siehe Material und Methoden) wurde eine Zielgen-Vorhersage durchgeführt. Für miR-146b-3p/5p ergab die Analyse 6757 potentielle Targets mit einem mirSVR Score von -2.98 bis -0.00. Der mirSVR Wert korreliert linear mit dem Ausmaß der Herunterregulation des möglichen Zielgens(75). Von den vorhergesagten Zielgenen entfielen 1.100 auf Homo sapiens. Die restlichen verteilten sich auf Mus musculus, Rattus norvegicus, Caenorhabditis elegans etc. Zusätzlich zu dieser Zuordnung orientierten wir uns am Alignment Score der potentiellen Targets

sowie an der Literaturrecherche. Durch die oben aufgeführten Versuche mit verminderter Zellproliferation nach Hochregulation der miRNA, liegt die Vermutung nahe, dass miR-146b Gene reguliert, die Einfluss auf die Proliferation der Tumorzelle haben. Daher konzentrierten wir uns bei der weiterführenden Targetanalyse auf folgende 4 Gene:

gene_symbol	mirna_alignment	gene_alignment	mirsvr_score	function
PDGFRA	ucggauaccuuaagU CAAGAGu	ucuaaguccuaaaA GUUCUCa	-0.8508	Growth factor
NRAS	ucGGAUACCUU AAGUCAAGAGu	ucUCUAUUUGA- GAAGUUCUCa	-0.5220	Oncogen
IGFL1	ucggauaccuUA- AG-UCAAGAGu	auuuuccaucAUCU CAAGUUCUCu	-0.8616	Growth factor
NFKBIZ	ucggauaccuUAAG UCAAGAGu	aaacaacauAUUU AGUUCACu	-0.1743	Transcription factor

In ersten Targetanalysen wurde der Expressionsstatus der angegebenen Gene in mit miR-146b transfizierten (pre-/anti) LNCaP Zellen untersucht, um eine mögliche gegenläufige Expression zu detektieren. Im Verlauf der Untersuchungen zeigte N-Ras das höchste Potential für eine mögliche relevante Target-Beziehung, es folgte daher ein Luciferase Assay. Im Folgenden werden die Expressionsanalysen zunächst von IGF-1 und PDGFA aufgeführt und deren Ausscheiden in weiteren Targetanalysen begründet. Für eine bessere Übersicht werden die Ergebnisse der Analysen zu NFkB und N-Ras in zwei weiteren Kapiteln vorgestellt.

3.2.3.1 *Der Expressionsstatus von IGF-1 und PDGFA nach transienter miR-146b*

Transfektion

Mittels qRT-PCR wurde die Expression der potenziellen Zielgene IGF-1 und PDGFA in LNCaP Zellen mit ektopt veränderter miR-146b Expression untersucht. Bereits in den Kontroll-transfizierten Zellen (scr) wurde das Fluoreszenzsignal für IGF-1 und PDGFA erst ab einem qRT-PCR Cycle von > 30 detektiert (Daten nicht gezeigt). Dies weist auf eine nur sehr geringe Expression der Gene in der LNCaP Zelllinie hin. Die weitere

Analyse der mit pre- und anti-miR-146b transfizierten Zellen ist dadurch stark eingeschränkt. Dabei zeigte die IGF-1 Expression keine Reaktion auf die ekto suppressierte miR-146b Expression in transfizierten LNCaP Zellen. Im Rahmen der tumorsuppressiven Funktion der miR-146b müsste die herabregulierte miR-146b Expression mit einer verstärkten Expression der potenziellen Targets einhergehen. Für PDGFA zeigte sich ein signifikanter Effekt: Zellen mit verminderter miR-146b Expression hatten eine deutlich höhere PDGFA-Expression als die Kontrollzellen. Aufgrund der kaum detektierbaren Expression der potentiellen Zielgene wurde von weiterführenden Experimenten mit den vorhergesagten Targets IGF-1 und PGDFA abgesehen und das Augenmerk auf die beiden anderen möglichen Zielgene der miR-146b gerichtet.

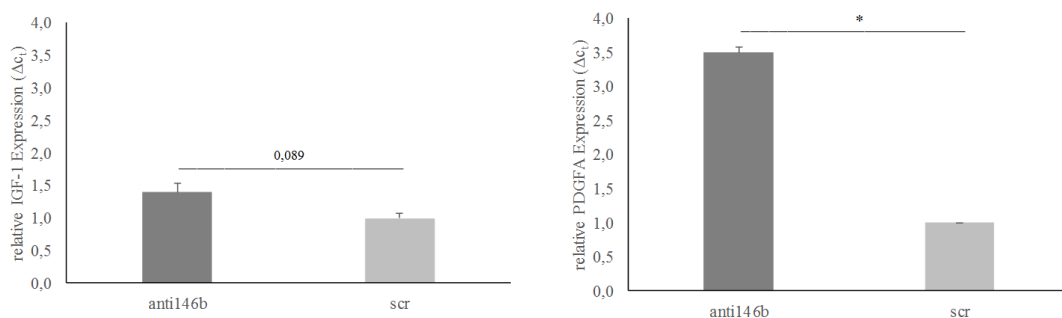


Abbildung 15: Relative IGF-1 und PDGFA Expression nach transienter Herabregulation der miR-146b

Die relative Expression von IGF-1 (links) und PDGFA (rechts) in anti-miR-146b transient transfizierten LNCaP Zellen im Vergleich zu kontroll-transfizierten Zellen. Dargestellt sind die mittels qRT-PCR gewonnen Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente als x-fache Suppression mit entsprechender Standardabweichung. Signifikante Expressionsunterschiede wurden mittels student's T-Test errechnet und mit * ($p < 0,05$) angegeben.

3.2.3.2 Die Expression von NFkB in pre- und anti-miR-146b transfizierten LNCaP Zellen

Analog zum oben beschriebenen Versuchsaufbau wurde auch die Expression von NFkB in miR-146b transfizierten LNCaP Zellen untersucht. In drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten zeichneten sich keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen pre-, anti-miR-146b und kontroll-transfizierten

LNCaP Zellen ab. Aus diesem Grund wurde auch NFkB aus weiteren Experimenten ausgeschlossen.

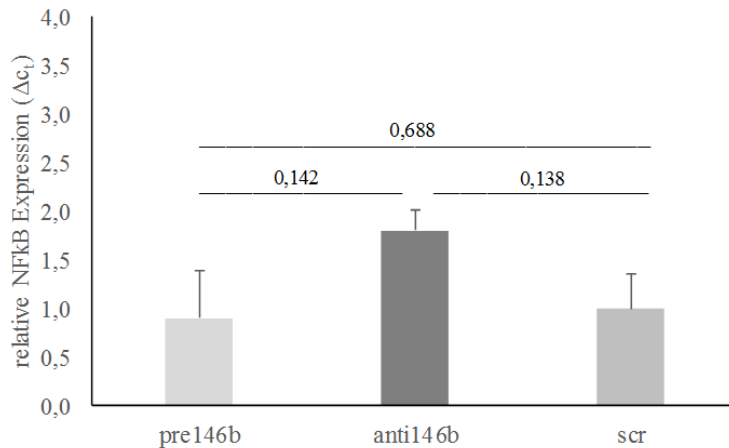


Abbildung 16: relative NFkB Expression nach transienter Transfektion mit pre- und anti-miR-146b

Darstellung der relativen NFkB Expression in pre- und anti-miR-146b transfizierten LNCaP Zellen sowie kontroll-transfizierten LNCaP Zellen. Abgebildet sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Die mittels student's T-Test errechneten Signifikanzen wurden mit $p > 0,05$ bestimmt und visualisiert.

3.2.3.3 *Expression von N-Ras nach pre-miR-146b und anti-miR-146b Transfektion*

Das Expressionsniveau von N-Ras in pre- sowie anti-miR-146b transfizierten LNCaP Prostatakarzinomzelllinien wurde mittels qRT-PCR untersucht. Die Expression von N-Ras war in LNCaP Zellen mit vermehrter miR-146b Expression (pre-146b) um 123% supprimiert ($p < 0,05$). Auch die Gegenüberstellung anti-miR-146b transfizierter und kontroll-transfizierter LNCaP Zellen wies signifikante Unterschiede auf ($p < 0,05$). In anti-miR-146b transfizierten LNCaP Zellen war die N-Ras Expression im Vergleich zur Kontrolle auf das 3,1-fache erhöht (Abb. 13).

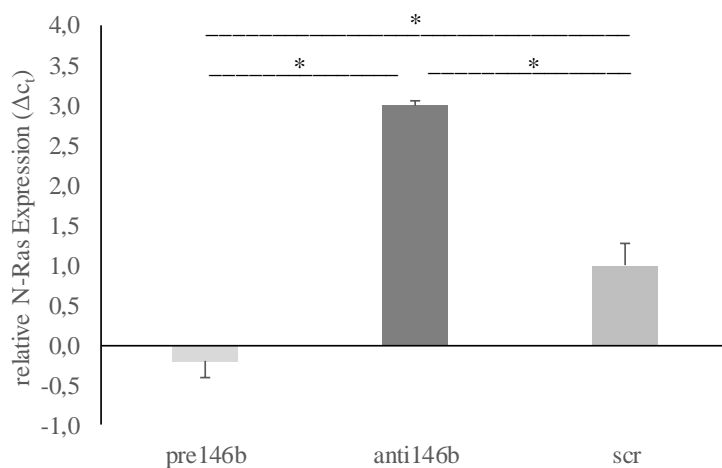


Abbildung 17: relative N-Ras Expression nach transienter Transfektion mit pre- und anti-146b

Graphische Darstellung der relativen N-Ras Expression in transient transfizierten (pre-146b/anti-146b) LNCaP Zellen in einem Säulendiagramm. Ermittelt wurde die relative N-Ras Expression 48h post transfectionem mittels qRT-PCR in drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. Abgebildet sind die Differenzen des *Housekeepers* β -Actin und N-Ras mit Standardabweichung. Die mittels student's T-Test errechneten Signifikanzen wurden mit * ($p < 0,05$) visualisiert.

3.2.3.4 *N-Ras als potentielles Ziel-Gen von miR-146b*

Aus den oben beschriebenen Experimenten geht hervor, dass eine gegenläufige Regulation von miR-146b und N-Ras vorliegt. Letzteres hat beim Prostatakarzinom vor allem Bedeutung als Onkogen in der Tumorprogression. Es besteht die Vermutung, dass miR-146b über eine direkte Interaktion mit dem potentiellen Ziel-Gen die Proliferation der Karzinomzellen beeinflusst. Im Rahmen der internetbasierten Targetsuche (www.microRNA.org) konnten für die 3' UTR der mRNA von N-Ras an drei Nukleotidpositionen potenzielle Bindungsstellen von miR-146b vorhergesagt werden (s. Abbildung 18). Deshalb wurde für das Zielgen N-Ras ein Luciferase-Assay durchgeführt, um so die vorhergesagte Bindung zwischen miR-146b und N-Ras funktionell zu bestätigen. Der genaue Versuchsaufbau ist unter 2.2.8 beschrieben.

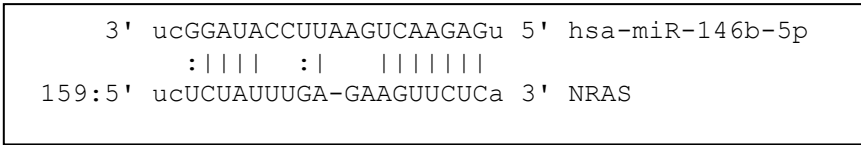


Abbildung 18: vorhergesagte Bindungsstellen von miR-146b an N-Ras (Ausschnitt aus microRNA.org/pictar)

Mithilfe der angegebenen Internetdatenbank wurden drei Bindungsstellen für miR-146b mit dem potentiellen Ziel-Gen N-Ras berechnet. Es kommt der jeweilige Abschnitt unter Angabe der Nukleotidposition mit den potentiellen Bindungsstellen (gekennzeichnet durch vertikale Linien) zur Darstellung.

3.2.3.5 Direkte Interaktion von miR-146b mit der 3' UTR von N-Ras

Nach Anzucht der LNCaP-Zellen in den entsprechenden Platten, wurde der pMirReportLuciVektor sowie der Kontrollvektor in die LNCaP-Zellen transfiziert. Zudem wurde die pre-miR-146 bzw. die Kontroll-miR in jeden Ansatz kotransfiziert. In Abbildung 18 wird die Luciferaseaktivität des N-Ras-Vektors in der LNCaP-Zelllinie für die Kotransfektion mit precursor-miR-146b dargestellt. In mit pre-146b kotransfizierten LNCaP Zellen zeigt sich eine auf 51% reduzierte Luciferaseaktivität im Vergleich zur Kontrolle (p-Wert < 0.05). Aus den drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten wurden die Mittelwerte gebildet und prozentual dargestellt.

Die Ergebnisse beweisen eine effektive Bindung zwischen miR-146b und der 3'UTR des N-Ras-Vektors nach Kotransfektion mit pre-146b. Somit hat miR-146b über N-Ras Einfluss auf den Signalweg der Tumorprogression.

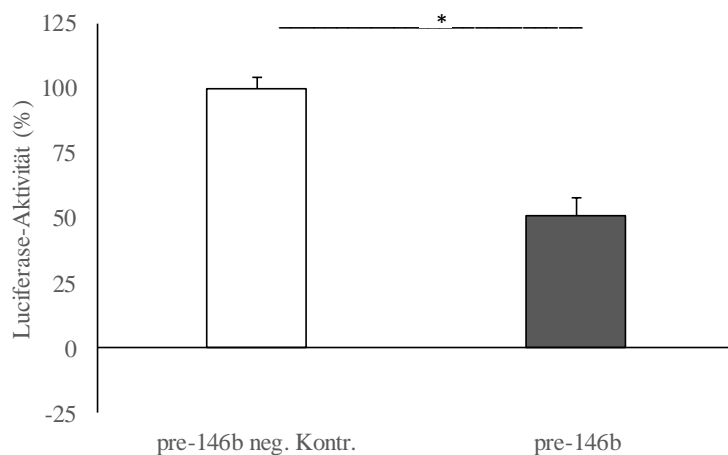


Abbildung 19: Luciferase-Assay zur Bestimmung einer direkten Interaktion von miR-146b und N-Ras

Messung der Luciferaseaktivität mit Hilfe eines Dual-Reporter-Assays in LNCaP-Zellen. Die Kotretransfektion erfolgte mit precursor-miR-146b. Die y-Achse stellt die Luciferase-Aktivität als Quotienten der Lumineszenz des N-Ras-Vektors zu der des Renilla-Kontrollvektors dar. Für die Luciferaseaktivität der Kontrollzellen wurde zufällig ein Wert von 100% gewählt. Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt. Signifikanzen im student's T-Test wurden mit * ($p < 0,05$) visualisiert.

3.2.3.6 *Genregulation von N-Ras und miR-146b im primären PCa-Tumorgewebe (Kohorte I)*

Aus den dargestellten Beobachtungen kristallisierte sich nun folgende Fragestellung heraus: Ist eine gegenläufige Expression von N-Ras und miR-146b auch im primären Tumorgewebe zu beobachten? Da die mRNA-Isolation aus Formalin fixiertem, in Paraffin-eingebettetem Material erschwert ist und daher die Ergebnisse unter Umständen nur eingeschränkt aussagekräftig sind, wurde nativ eingefrorenes Material der Kohorte I verwendet. Die mRNA-Isolation erfolgte wie in Kapitel 2.2.5 beschrieben. Um eine mögliche gegenläufige Expression von nras und miR-146b zu beobachten wurden insgesamt 30 Gewebeproben der Kohorte I (zufällig gewählt) in zwei Subkohorten mit relativ vermehrter, respektive verminderter miR-146b Expression unterteilt. Die erste Gruppe $n=12$ (Subgruppe IA) enthielt Proben deren miR-146b Expression einen ΔC_t -Wert von $\leq 1,7$ zeigte. Die Proben der Subgruppe IB $n=18$ (vermehrte miR-146b Expression) wiesen ΔC_t -Werte von $\geq 3,2$ auf. Im t-Test beider Subgruppen ergab sich für die miR-146b Expression ein signifikanter p-Wert von $6.07e^{-11}$ (Daten nicht gezeigt). Nach Subklassifizierung von 30 Gewebeproben der Kohorte I

entsprechend ihrer miR-146b Expression erfolgte mittels qRT-PCR die Expressionsanalyse von N-Ras. Das mittlere Expressionslevel lag in der Subgruppe IA bei einem Δc_t -Wert von 4,8, während die Proben der Subgruppe IB Δc_t -Werte von 3,5 auf, der t-Test ergab einen p-Wert von 0,02 (s. Abb. 19). Der Expressionsunterschied von N-Ras zwischen beiden Subgruppen ist somit signifikant.

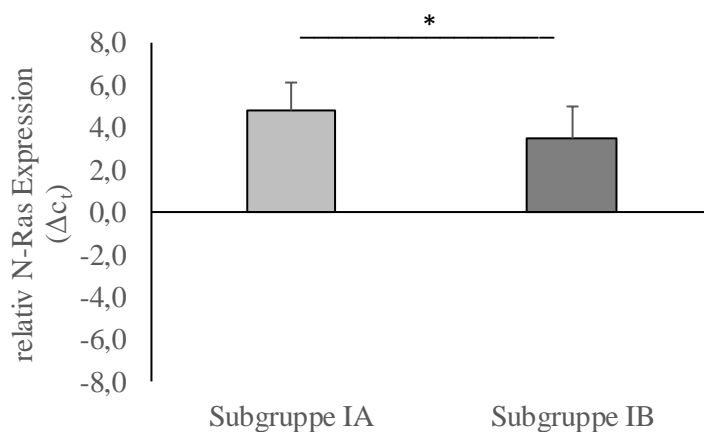


Abbildung 20: Expression von N-Ras im primären Tumorgewebe

N-Ras Expression in primärem Tumorgewebe in n=30 Proben des PCa-Patientenkollektivs I. Die Subgruppen IA und IB beinhalten je $n_{IA}=12$ und $n_{IB}=18$ nativ asservierte Gewebeproben von Patienten mit verminderter (Δc_t -Wert $\leq 1,7$, Subgruppe IA) und vermehrter (Δc_t -Wert $\geq 3,2$, Subgruppe IB) miR-146b Expression. In den Subgruppen wurde mittels qRT-PCR der Expressionsstatus von N-Ras ermittelt. Abgebildet sind die Δc_t -Werte von N-Ras mit den dazugehörigen Standardabweichungen. Signifikanzen im student's T-Test wurden mit * ($p < 0,05$) visualisiert.

Nachdem ein signifikanter Expressionsunterschied von N-Ras im primären Tumorgewebe mit verminderter und vermehrter miR-146b-Expression detektiert worden war, folgte abschließend die Korrelationsanalyse zu beiden Genen. Diese gelang mithilfe des Pearsonschen Korrelationskoeffizienten, der über die komplette Subgruppe (n=30) errechnet wurde. Der Koeffizient, als Maß für den linearen Zusammenhang ergab einen Wert von -0,5, sodass ein negativer Zusammenhang der beiden Parameter (miR-146b und N-Ras) ex vivo nachgewiesen werden kann (Abb.20).

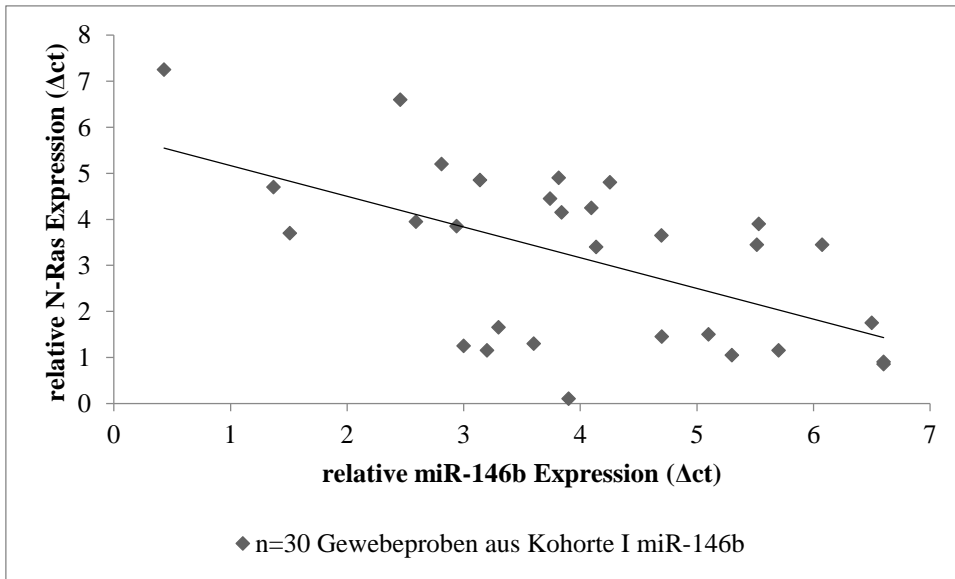


Abbildung 21: Korrelationsanalyse von miR-146b und N-Ras ex vivo.

In n=30 Gewebeproben der Kohorte I erfolgte die qRT-PCR Analyse zur miR-146b und N-Ras. Die Expressionslevel, normalisiert mittels RNU6B respektive β -Actin, wurden verwendet um den Pearson'schen Korrelationskoeffizienten zu berechnen ($r = -0.5$). Dieser wird mithilfe der Geraden visualisiert, die Rhomben entsprechen den Expressionslevels der jeweiligen Gewebeproben

4 Diskussion

Der besseren Prognosebeurteilung des Prostatakarzinoms kommt eine zunehmend wichtigere Bedeutung zu. Nach steigenden Inzidenzzahlen, bei verbesserter Diagnostik, und weitgehend gleichbleibenden Mortalitätsraten muss die Risikostratifizierung verbessert werden. Ein Ziel im Rahmen der Prostatakarzinomforschung sollte die bessere Identifizierung des zum Tode führenden Karzinoms sein, um Übertherapien zu vermeiden und den Patienten individuelle Therapiekonzepte anbieten zu können. Der Etablierung von Biomarkern, die neben den bestehenden Prognosemarkern, wie pT-Stadium, PSA und Gleason Score, anhand der Expression die Prognoseeinschätzung verbessern können, kommt große Bedeutung zu. Die microRNAs werden als mögliche Biomarker diskutiert, da sie wichtige Funktionen in der Genregulation übernehmen, indem sie unter anderem die Translation hemmen(76). Sie nehmen zudem eine wichtige Rolle in der Zelldifferenzierung, Zellproliferation und Apoptose ein (77).

Aufgrund des meist langsamen Progresses der Erkrankung ist es sinnvoll mit Patientenkollektiven zu arbeiten, die an einem Hochrisiko-PCa erkrankt sind und von denen neben den Gewebeproben und den klinisch-pathologischen Parametern auch ein langes Follow-up vorliegt mit entsprechenden klinischen Endpunkten wie PSA-Progress (BCR) oder klinischem Rezidiv (CF). In Vorarbeiten der Würzburger Arbeitsgruppe an derartigem Hochrisiko-PCa-Gewebe konnten sieben miRNAs identifiziert werden, die aufgrund ihres unterschiedlichen Expressionsniveaus zwischen Patienten mit und ohne Rezidiv sowie BPH-Proben unterscheiden konnten(20). Unter diesen diskriminativen microRNAs befand sich die miRNA-146b, welche bisher noch nicht näher in Hinblick auf das Prostatakarzinom analysiert worden war. Der Ausgangspunkt dieser Arbeit war somit die Expression von miR-146b an einem unabhängigen Kollektiv zu prüfen, eine mögliche prognostische Relevanz herauszuarbeiten und auf zellulärer Ebene die Funktion der miR-146b beim Prostatakarzinom zu analysieren.

4.1 miR-146b – ein potentieller prognostischer Marker?

4.1.1 Die miR-146b Expression und die Assoziation zu etablierten klinischen

Prognoseparametern

Um die microRNA 146b auf ihr mögliches Potential als prognostischer Marker hin zu prüfen, wurden zunächst Assoziationsanalysen mit den bereits bestehenden Prognosemarkern PSA, Gleason-Score und pT-Stadium in der Kohorte I durchgeführt. Die Analyse zu etablierten Prognosemarkern hatte statistische Signifikanz gezeigt: verminderte miR-146b Expression war mit erhöhtem PSA und fortgeschrittenem pT-Stadium assoziiert. In Bezug auf den Gleason Score konnten keine signifikanten Unterschiede detektiert werden. Somit waren zwei von drei etablierten Prognosemarkern mit der Expression von miR-146b assoziiert, wobei die Expression der microRNA im weiter fortgeschrittenen Tumorstadium supprimiert war. Neben den Expressionsunterschieden konnten Regressionsanalysen keine signifikanten Ergebnisse aufzeigen (Daten nicht gezeigt).

Die Arbeitsgruppe um Lin untersuchte 60 PCa-Gewebeproben und nicht-karzinomäses Prostatagewebe mittels FISH (Fluoreszenz in situ Hybridisierung) auf miR-146a und miR-184 Expression. Sie fanden einen deutlichen Verlust der miR-146a im hochgradigen hormonrefraktären PCa mit Gleason Score 9-10(58). Sie beobachteten einen konsekutiven Abfall von miR-146a je höhergradiger der Tumor (Einteilung nach GS und Hormonabhängigkeit). Diese Ergebnisse unterstützen die von uns detektierte Verbindung von verminderter miR-146b Expression und fortgeschrittenem klinischen Stadium beziehungsweise erhöhten Prognosemarkern pT und PSA. Die Arbeitsgruppe hatte sich auf die Analyse der miR-146a konzentriert, bei einer Homologie von 91% in Bezug auf die Basensequenz wird dieses Ergebnis vermutlich auch auf die miR-146b zutreffen(48).

Ein konträres Ergebnis präsentiert die Arbeitsgruppe um Walter, die vor allem eine Hochregulation von miR-146b und weiteren miRs im malignen Material gegenüber Stroma und Epithel detektiert hatte (s.u.). Sie konnten diesen Anstieg auch in einer Subgruppe (GS \geq 8) im Vergleich zu benignem Material zeigen. Sie fanden keinen Zusammenhang zwischen dysregulierten miRNAs und unterschiedlichen PCa-Risikogruppen (43). Bei diesem Ergebnis muss bedacht werden, dass es trotz größter

Sorgfalt bei der Microdissektion der Formalin fixierten, Paraffin eingebetteten Proben zu einer Kontamination gekommen sein könnte. Des Weiteren beschäftigt sich die Studie auch nicht mit molekularen Mechanismen, welche die unterschiedliche miR-Expression in verschiedenen Stadien des PCa erläutern könnten. So ist es möglich, dass dieselbe miR sowohl Onkogene als auch Tumorsuppressorgene regulieren kann. In der vorliegenden Arbeit wurde das miR-146b Expressionsniveau im Tumorgewebe durch die Erforschung der Tumorpathways – der Interaktion mit dem Onkogen N-Ras - verifiziert.

In der vorliegenden Kohorte sind anhand der Expression von miR-146b Unterteilungen der Gewebeproben anhand der verschiedenen Prognosemarker (PSA, pT) möglich, jedoch spielt die miR-146b keine Rolle als unabhängiger prognostischer Marker in Bezug auf bestehende Prognoseparameter. Eine mögliche Begründung hierfür liegt möglicherweise in der Wahl des Kollektivs. Die untersuchten Patienten befanden sich zum Zeitpunkt der Untersuchung alle in einem hormon-sensiblen Stadium. Möglicherweise würden Expressionsanalysen an einer Kohorte mit Patienten mit hormonrefraktärem Karzinom signifikante Assoziationsergebnisse erbringen. Erneut bleibt die Gruppengröße ein mögliches Kriterium, das die fehlende Signifikanz begründet.

Die Microarray-Analyse, die Ausgangspunkt für die vorliegende Arbeit war, hatte 7 miRNAs identifiziert (darunter miR-146b), die anhand der Expression zwischen sechs BPH Proben, sieben Hochrisiko Prostata-Ca Proben ohne klinischen Progress sowie sechs mit klinischem Rezidiv unterscheiden konnten. Für miR-146b wurde die höchste Expression im benignen Gewebe detektiert; Patienten mit Rezidiv hatten eine signifikant höhere Expression als Patienten ohne Rezidiv, es handelte sich also nicht um eine konsekutive Herabregulation(20). Ein Ziel der Arbeit war es zu überprüfen, ob die miR-146b im vorliegenden Kollektiv entsprechende Gewebetypen differenzieren könnte. Da von den Patienten der Kohorte I kein ausreichendes Follow-up mit entsprechenden klinischen Endpunkten wie biochemisches oder klinisches Rezidiv vorlag, wurde für diese Fragestellung mit einem weiteren Kollektiv gearbeitet. Das Kollektiv II umfasste 34 in Paraffin eingebettete mit Formalin fixierte Gewebeproben

mit einem mittleren Follow-up von 69,8 Monaten, davon hatten 19 Patienten ein Hochrisiko-PCa (entsprechend der Microarray Analyse). Es erfolgte die Gegenüberstellung der miR-146b Expression der Hochrisikopatienten, von denen n=9 ein Rezidiv hatten und n=10 Patienten im Beobachtungsintervall rezidivfrei geblieben waren (Rezidiv umfasste BCR und CF). Die Expression zeigte folgendes Muster: Patienten mit BPH-Gewebe hatten hohe miR-146b-Level, Patienten mit Rezidiv zeigten ein niedrigeres Expressionsniveau und Patienten ohne Rezidiv hatten die geringste miR-146b Expression. Dieses Expressionsmuster entsprach den Voruntersuchungen, war jedoch nicht statistisch signifikant. Auch in Einzelanalysen, in denen die klinischen Endpunkte biochemischer Progress und klinischer Progress getrennt voneinander untersucht wurden, konnte die postulierte Markerfunktion zur Differenzierung von Hochrisikopatienten für die miR-146b im vorliegenden Kollektiv nicht bestätigt werden.

Da die Expressionstendenz die Gleiche wie im durchgeführten Microarray ist, bleibt zu vermuten, dass bei größeren Fallzahlen ein statistisch signifikantes Ergebnis erreichbar wäre. Das Follow-up der Patienten aus der Microarray-Analyse der Voruntersuchung ist mit 106 Monaten deutlich länger als das der dieser Arbeit vorliegenden Kohorte II (Follow-up: 69,8 Monate). Entsprechend ist der Anteil von Patienten mit klinischem Progress in der Ausgangskohorte größer als in der für diese Arbeit analysierten. Eine Theorie ist, dass die Expressionsunterschiede zwischen Patienten mit und ohne Rezidiv erst nach weiterem Fortschreiten der Erkrankung, also eher bei klinischem als biochemischem Rezidiv, auffallen. Andererseits muss die Interpretation der Microarray-Untersuchung kritisch erfolgen, diese ist an einem deutlich kleineren Kollektiv (n=13 Karzinompatienten) erfolgt im Vergleich zum 34 Patienten umfassenden Kollektiv II dieser Arbeit, sodass möglicherweise die geringe Gruppengröße zu einem abweichenden Ergebnis geführt haben könnte.

Nach unserem Kenntnisstand existieren bislang keine weiteren Untersuchungen, die das Expressionsverhalten von miR-146b in Gewebe von PCa-Patienten mit und ohne Rezidiv untersucht haben. Die Gruppe um Selth arbeitete mit dem gleichen Ansatz, jedoch wurden hier Blut-Seren von je 8 Patienten mitzeitigem PSA-Rückfall mit Patienten ohne biochemisches Rezidiv mittels Microarray untersucht. Die Ergebnisse wurden an einer unabhängigen Kohorte von 70 Patienten validiert, hier bestätigte sich

die vermehrte Expression von miR-146b-3p und miR-194 bei Patienten mit Rezidiv im Vergleich zu Patienten ohne Rezidiv (HR 1,29 (1,07-1,57) $p=0,004$). In der multivarianten Analyse war die miR-146b-3p Expression ein unabhängiger Marker für biochemischen Progress (HR 1,14 (1,02–1,27) $p=0,019$)(61). Die vermehrte Expression von miR-146b im Serum ist passend zu der von uns detektierten verminderten Expression im Gewebe.

Sowohl die signifikanten Expressionsunterschiede zwischen Gewebeproben und Seren von Patienten mit und ohne Rezidiv, sowie die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Tendenz der miR-146b Expressionsdifferenzen, legen nahe, dass es sich um einen prognostischen Marker handeln könnte. Am vorliegenden Patientenkollektiv konnte dies nicht bestätigt werden. Zukünftig sollten weitere Validierungsstudien an größeren Kohorten mit längerem Follow-up und entsprechenden Endpunkten erfolgen.

Erstaunlicherweise zeigten die Expressionsanalysen zu bereits etablierten Prognosemarkern wie PSA, pT-Stadium oder GS keine signifikanten Unterschiede im zweiten Kollektiv im Gegensatz zur ersten untersuchten Gruppe. Gründe hierfür könnten erneut in der geringen Gruppengröße liegen, so war das Kollektiv I mit $n=64$ Patienten nahezu doppelt so groß wie das zweite Kollektiv mit $n=34$ Patienten.

4.2 miR-146b als Tumormarker

4.2.1 Die miR-146b Expression in benignem und malignem Prostatagewebe

Da die Vorarbeiten zur miR-146b diese als potentiellen Tumormarker identifiziert hatten, war ein Ziel der vorliegenden Arbeit dies an einem größeren Patientenkollektiv zu prüfen. Die genaue Subklassifikation dieser Kohorte II wurde bereits im Ergebnisteil veranschaulicht. 34 in Paraffin eingebettete Prostatakarzinom-Gewebeproben mit einem hohen Anteil an Patienten mit Hochrisiko-PCa ($n=19$) sowie 12 BPH-Proben wurden daher auf ihre Expression von miR-146b hin analysiert. Die mittels qRT-PCR explorierte miR-146b Expression im Prostata-Ca zeigte eine gegenüber dem BPH-Gewebe hochgradige Suppression. Alle malignen Proben lagen in ihrer miR-146b Expression signifikant unter der im benignen Gewebe. Dieses Ergebnis bestätigt die genannten Vorarbeiten, in denen mittels Microarray und qRT-PCR eine signifikant

verminderte Expression von miR-146b (und 60 weiteren miRs) in 12 Gewebeproben von Patienten mit Hochrisiko-PCa gegenüber dem BPH-Gewebe detektiert worden war (20). Mit der vorliegenden Arbeit gilt die miR-146b als Tumormarker im reinen Hochrisiko-Kollektiv und im gemischten Kollektiv als validiert.

In der Literatur finden sich viele Beispiele für microRNAs, die zwischen benignem Prostatahyperplasiegewebe und malignem Prostatagewebe anhand ihres Expressionsprofils unterscheiden können. Die meisten microRNAs sind im malignen Gewebe vermindert exprimiert im Vergleich zum benignen Gewebe. Die Arbeitsgruppe um Ozen et al. analysierten mittels Microarray die Expression von ca. 500 miRNAs in 10 benignen Gewebeproben und 16 Prostata-Ca Proben, sie beschrieben einen Großteil der microRNAs als herunterreguliert im malignen Gewebe im Vergleich zum benignen Gewebe(26). Auch Porka et al. konnten mittels Oligonukleotid Hybridisierungsassay zeigen, dass 37 der 51 analysierten microRNAs supprimiert waren im karzinomatösen Gewebe, wobei 15 dieser untersuchten miRNAs nur im hormonrefraktären Karzinom im Gegensatz zum BPH Gewebe herabreguliert waren(77). Die Arbeitsgruppe um Schäfer untersuchte mittels Microarray-Analyse das Expressionsverhalten der miRNAs in 70 Prostatektomiepräparaten und den zugehörigen Normalgewebeproben. Auch hier zeigte sich eine starke Herabregulation einer Mehrzahl der microRNAs im malignen Gewebe(45).

Insgesamt findet man in der Literatur nur sehr wenige Expressionsversuche zu miR-146b; in den oben genannten Studien wurde die miR-146b nicht explizit aufgeführt bzw. validiert, sodass ein direkter Vergleich der Expressionslevel nicht möglich ist. Der Nachteil bei großen Microarray-Analysen besteht unter anderem darin, dass meist nur ein geringer Teil der differenziert exprimierten microRNAs mit einer anderen Methode (beispielsweise qRT-PCR) oder an einer unabhängigen Kohorte validiert wird. Zudem muss beim Vergleich der Studien darauf geachtet werden, ob es sich beim benignen Gewebe um Hyperplasie-Gewebe oder Karzinom-umgebendes Normalgewebe handelt.

Mittels FISH-Analyse untersuchten Lin und Kollegen PCa-Gewebe und nicht-karzinomatöses Prostatagewebe auf die miR-146a und miR-184-Expression hin. Die Tumorproben wurden anhand ihres Gleason Scores sowie ihrer Androgenabhängigkeit beziehungsweise ihrer Androgenunabhängigkeit unterteilt. Die miR-146a Expression

war in den Gewebeproben mit einem GS größer 7 deutlich vermindert im Vergleich zum Normalgewebe. Benignes Hyperplasiegewebe wurde nicht differenziert analysiert, sodass ein direkter Vergleich mit den dieser Arbeit vorliegenden Ergebnissen nicht möglich ist. Aber die Tendenz: verminderte Expression im malignen Gewebe, erhöhte Expression im benignen/normalen PCa-Gewebe bleibt die Gleiche(58).

Eine unserem Versuchsaufbau recht ähnliche Arbeit wurde von Ding und Kollegen publiziert und zeigt ein ähnliches Expressionsprofil wie das hier vorgestellte. Sie untersuchten 18 Gewebeproben von PCa Patienten und das dazugehörige Normalgewebe in Bezug auf die miR-146b Expression hin. Jede maligne Gewebeprobe zeigte ein signifikant vermindertes ($p < 0,05$) miR-146b Level im Vergleich zur korrespondierenden benignen Probe(78). Das Kollektiv wurde von den Autoren nicht weiter vorgestellt, sodass eine Aussage bezüglich des Risikoprofils der Kohorte nicht möglich ist. Zusätzlich verglich die Arbeitsgruppe das Expressionsverhalten in 4 PCa-Zelllinien (LNCaP, PC-3, DU-145, 22RV1) mit 2 benignen Zelllinien (PNT2C2, WPMY-1), auch hier war das Expressionsniveau im malignen Milieu signifikant erniedrigt(78).

Ein konträres Ergebnis präsentieren Walter et al., diese fanden 34 signifikant höher exprimierte microRNAs, darunter miR-146b, in ca. 40 PCa-Gewebeproben im Gegensatz zu dem von ihnen untersuchten Stroma beziehungsweise benignen Epithel. Generell war die Zahl der höher exprimierten miRNAs im malignen Gewebe größer im Vergleich zum benignen(43). Einschränkend muss hier der Versuchsaufbau beschrieben werden, bei dem es keine Validierung der Ergebnisse nach dem PCR-Array gab. Die Versuche wurden an einem Kollektiv mit eher niedrigem Progressionsrisiko durchgeführt.

Bis auf die letzte Studie stehen die hier vorgestellten Daten zum Expressionsverhalten von miR-146b in einem PCa-Kollektiv (II) mit einem hohen Anteil an Hochrisiko-PCa-Patienten in Einklang mit anderen publizierten Ergebnissen. MiR-146b kommt somit eine Rolle als Tumormarker zu, einerseits im reinen Hochrisiko- aber auch im gemischten Kollektiv (mit hohem Hochrisiko-Anteil). Das im Karzinom verminderte Expressionsverhalten lässt zusätzlich eine tumorsuppressive Funktion vermuten.

4.3 Die Bedeutung der miR-146b auf zellulärer Ebene beim PCa

4.3.1 Expression und Transfektion von microRNA-146b in LNCaP Zellen

Der erste Schritt in der Funktionsanalyse war den Expressionsstatus von miR-146b in LNCaP Zellen zu eruieren um die ausreichende Expression für die Folgeversuche zu verifizieren. Das ausreichende Expressionsniveau konnte bestätigt werden (Daten nicht gezeigt) und entspricht dem anderer Arbeitsgruppen.

Anschließend wurde mittels transienter Transfektion die Expression der miR-146b in LNCaP Zellen ekto verändert. Dabei gelang eine effektive gegenläufige Expression, welche als etablierte Methode zur Verifikation der Transfektionseffizienz angesehen wird. Durch ektope Veränderung konnte somit die pre-miR-146b Expression auf das 285 fache gesteigert, die anti-miR-146b um das 32-fache supprimiert werden. Dieses Resultat motivierte zur Analyse des Proliferationsverhaltens in LNCaP Zellen nach transienter Transfektion mit miR-146b. Dominierende Fragestellung dabei war, ob die ektope veränderte Expression von miR-146b Einfluss nimmt auf das Zellwachstum.

4.3.2 miR-146b – ein Tumorsuppressor

In mehreren unabhängigen Proliferationsassays zeigte sich nach ektopeischer Steigerung der Expression der miR-146b in LNCaP-Zellen eine signifikante Proliferationsinhibierung. Das Zellwachstum war im Vergleich zur Kontrolle um bis zu 42% vermindert. Somit kann ein hemmender Einfluss von miR-146b auf das Wachstum der Tumorzellen dokumentiert werden. Dies erhärtet den Verdacht, dass es sich bei miR-146b um einen Tumorsuppressor handelt.

In der von Ding und Kollegen publizierten Studie wurden ähnliche Ergebnisse beobachtet; hier konnten in PC-3 Zellen nach gain-of-function Transfektion deutliche proliferationsinhibierende Effekte detektiert werden. Zusätzlich zur induzierten Apoptose zeigte sich eine supprimierte Zellproliferation(78). Lin und Kollegen wählten einen anderen Ansatz: mittels eines Vektor-basierten miRNA knock-in (anstatt einer Transfektion) wurde miR146a in PC-3 Zellen gebracht. Die eingebrachte miR-146b führte zur Suppression von ROCK1, einer Serin/Threonin Kinase, welche über die GTPase RhoA auf Actinomysin einwirkt und die Kontraktionskraft fördert(79). Somit kam es laut den Erklärungen der Arbeitsgruppe, zur verminderten

Tumorzellproliferation. Diese wurde mittels Zellzyklus Analyse über eine DNA-Density Flow Cytometrie gemessen(58). Gemäß den Vorarbeiten der Arbeitsgruppe um Lin handelte es sich bei ROCK1 um ein vorhergesagtes Target der miR-146a(80). Im Matrigel Zell-Invasionsassay mit PC-3-miR146a-Zellen konnte zusätzlich eine 34%-ige Reduktion der Invasion im Vergleich zu Kontrollzellen detektiert werden. Die Ergebnisse der beiden Arbeitsgruppen bestätigen die von uns beobachteten tumor-suppressive Funktion von miR-146b.

Im Mamma-Ca gibt es konträre Aussagen über die Rolle von miR-146b als Tumorsuppressor. Die Arbeitsgruppe um Garcia konnte keine proliferationshemmende Wirkung von miR-146b auf das Wachstum von repräsentativen Mamma-Ca-Zellen nachweisen, sie erklärten dies mit der direkten Interaktion vom Tumorsuppressorgen BRCA1 und mir-146a/b-5p(81). Eine weitere Arbeitsgruppe konnte einen negativen Effekt von miR-146b-Überexpression auf die Metastasierungswahrscheinlichkeit beim Mamma-Ca nachweisen, durch eine Unterdrückung des Transkriptionsfaktors NFkB (der in unseren Versuchen keine Targetbeziehung zu miR-146b hatte)(82). Abschließend sei noch ein Ergebnis aus dem Bereich des Magenkarzinoms vorgestellt: mittels MTT-Assay konnte ein inhibierender Effekt der miR-146a auf die Zellproliferation in der Magenkarzinomzelllinie MKN-45 festgestellt werden(83).

4.3.3 Mögliche Targets der miR-146b beim Prostata-Ca

Mittels in silico Analyse und Literaturrecherche konnten vier Gene als potentielle Targets der miR-146b auffindig gemacht werden. Dabei handelt es sich um IGF-1, PDGFA, NFkB und N-Ras. Eine hohe IGF- (=insulin-like growth factor) Expression ist laut einer Studie von Kalla mit einer schlechteren Prognose sowie einer raschen Tumorpogression beim Mammakarzinom assoziiert(84). Die Arbeitsgruppe um Shao postulierte eine direkte Interaktion von PDGF – plateled-derived growth factor- und miR-146b in menschlichen Glioblastom-Zelllinien(76). In der vorliegenden Arbeit hatten IGF-1 und PDGFA im Rahmen der qRT-PCR Untersuchungen ein sehr geringes Expressionsniveau gezeigt, sodass keine klare Aussage über eine mögliche Targetbeziehung von IGF-1 und PDGFA getroffen werden kann. Es ist zu vermuten, dass diese beiden Gene keine relevante Funktion in der hier verwendeten

repräsentativen Tumorzellreihe LNCaP besitzen, sodass diese Gene aus weiterführenden Experimenten ausgeschlossen wurden.

Obwohl das potentielle Zielgen NFκB ein hinreichendes Expressionsniveau in unseren Versuchen zeigte, bildete sich nach transienter Transfektion mit miR-146b in den androgen-sensitiven LNCaP Zellen keine signifikante gegenläufige Regulation ab. Wir gehen nach unseren Untersuchungen davon aus, dass es keine relevante Targetbeziehung von NFκB zu miR-146b gibt.

Resümee einer Studie von Palayoor et al. ist, dass NFκB konstitutiv in den hormon-unabhängigen Prostatakarzinomzelllinien PC-3 und DU-145 aktiviert ist, nicht jedoch in der androgenabhängigen LNCaP Zelllinie (85). In Analogie dazu propagierte auch die Arbeitsgruppe um Gasparian et al., dass eine aberrante IKK Aktivität zu einer konstitutiven Aktivierung des NFκB Pathways in androgen-unabhängigen Prostatakarzinomzelllinien führt, sodass neben einer proliferationsstimulierenden Wirkung NFκB als bedeutender Faktor in der Entwicklung eines hormonrefraktären Prostatakarzinoms angesehen wird(86).

Viele Malignomentitäten exprimieren konstitutiv NFκB, dadurch steigen die Proliferation, Angiogenese und Metastasierungstendenz stark an. Im Mamma-Ca ist NFκB als direktes Target von miR-146b nachgewiesen worden. In der etablierten Mamma-Ca Zelllinie MDA-MB-231 korrelierte die miR-146a und miR-146b Überexpression mit einer verminderten NFκB Aktivität. Infolge der Suppression von zwei Adapterproteinen im IL-1 und Toll-like-Rezeptor Signaltransduktionsweg konnte das inhibitorische Protein IκB den Transkriptionsfaktor NFκB in seiner proliferationsfördernden Funktion hemmen(82).

Die konstitutive Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB spielt auch bei Inflammationsprozessen eine wichtige Rolle (85, 87-90). Hier zeigte sich miR-146b als wichtiger Aktivator bei intestinaler Verletzung durch Colitis in Mäusen(91). Durch die Aktivierung von NFκB durch miR-146b wurde die Entzündungsreaktion unterstützt, die epitheliale Barrierefunktion stabiler und das Langzeitüberleben der Mäuse verbessert. In humanen dendritischen Zellen bewirkt miR-146a durch Suppression von TRAF und IRAK1/2, zwei wichtigen Proteinen der NFκB-Signalkaskade, eine Inhibition der NFκB Aktivierung(55, 82).

Ein möglicher Erklärungsansatz für den in der vorliegenden Arbeit nicht detektierten Zusammenhang von miR-146b Expression und NFκB könnte das immer wieder zu beobachtende Phänomen sein, dass die miR-vermittelte Steuerung von Targets durch ein komplexes Gebilde verschiedenster „Pathway-Komponenten“ wie Kinasen, Zytokine, Chemokine, Zielgene usw. konfiguriert ist. Vor allem die tumorspezifische Mikroumgebung ermöglicht den Tumorzellen mit Komponenten dieser Umgebung Signalwege zu aktivieren und in diesem Zusammenhang anderweitig relevante Targets zu umgehen.

4.3.4 N-Ras – ein neu identifiziertes Target der microRNA-146b

Das Onkogen N-Ras codiert für ein Membran-Protein, welches als GTP-bindendes Protein eine Schlüsselrolle im Signaltransduktionsweg für Zellwachstum und Zelldifferenzierung einnimmt..

Die computerbasierte Target-Suche hatte N-Ras als potentielles Zielgen der miR-146b beim Prostata-Ca aufgezeigt. Nach ektopter Steigerung der miR-146b Expression konnte eine signifikante Suppression der relativen N-Ras Expression um 123% detektiert werden. Aufgrund dieser signifikanten Resultate war der Anreiz gegeben die Interaktion zwischen N-Ras und miR-146b in einem Reporter-Luciferase-Assay zu verifizieren. Dieser bestätigte N-Ras als direktes Target der miR-146b. Im Hinblick auf den bereits beschriebenen Proliferationsassay lässt sich hier eine gemeinsame Schnittstelle erkennen. Die Suppression der Luciferaseaktivität des N-Ras Vektors in LNCaP Zellen, deren miR-146b Expression ektopt gesteigert wurde, könnte in Verbindung stehen mit dem proliferationshemmenden Effekt dieser Zellen. Indem eine Überexpression von miR-146b das Onkogen N-Ras in seiner Aktivität beeinflusst, verändern sich auch die wachstumsstimulierenden Signale auf die Zelle. Die Zellproliferation und Zelldifferenzierung werden reduziert.

Viele Studien referieren eine wichtige Bedeutung von N-Ras in der Tumorprogression des Prostatakarzinoms. Die N-Ras Expression ist assoziiert mit der Entwicklung zum hormonrefraktären Prostatakarzinom über eine Aktivierung des MAP-Kinase-Signalweges. Zu diesem Fazit kam die Arbeitsgruppe um Traynor et al., indem sie ein Kollektiv von 61 Patienten untersuchten, welche nach Diagnosestellung eines

Prostatakarzinoms zunächst mittels Androgendeprivationstherapie behandelt wurden. Im weiteren Verlauf kam es zur Entwicklung eines hormonrefraktären Karzinoms, welches durch Gewebeproben im Rahmen einer TURP oder einer TRUS-basierten Biopsie nachgewiesen wurde. Immunhistochemische Analysen zeigten einen Anstieg der N-Ras Membranexpression beim Übergang eines hormonsensitiven in ein hormonrefraktäres Prostatakarzinom. Dieser war verbunden mit einer verkürzten Zeitspanne bis zur Rezidivierung der malignen Erkrankung ($p=0,01$), einem reduzierten krankheitsspezifischen Überleben ($p=0,008$) sowie mit niedrigeren PSA-Werten beim Rückfall ($p=0,02$). Außerdem korrelierte die N-Ras Expression mit einer erhöhten Phosphorylierungsrate der MAP-Kinase ($p=0,010$) sodass diese dadurch konstitutiv aktiv war, sowie einem erhöhten Ki67-Proliferationsindex ($p=0,02$)(92).

Auch in HUVEC Zellen (human umbilical vein endothelial cells) war eine gegenläufige Expression von miR-146a und N-Ras nachgewiesen worden. Auch im Reporter-Luciferase-Assay konnte eine direkte Targetbeziehung nachgewiesen werden(93). Somit kommt miR-146a eine neue Rolle in der Angiogenese in Endothelzellen zu.

4.3.5 Die Interaktion von N-Ras und miR-146b im Tumorgewebe

Um die bisherigen Resultate in einen histo-pathologischen Kontext zu implementieren, wurde zunächst eine aberrante miR-146b Expression in nativ asserviertem primären Tumorgewebe eines Prostatakarzinom Patientenkollektiv nachgewiesen. Anhand der miR-146b Expression wurde dieses Kollektiv in zwei Gruppen, entsprechend mit hoher respektive geringer miR-146b Expression unterteilt (s. Kapitel 3.2.3.6). Gewebeproben mit einem $\Delta c \leq 1,7$ zeigten eine signifikant höhere N-Ras Expression, als Karzinomproben mit einer erhöhten miR-146b Expression. In der Korrelationsanalyse, die über die gesamte Subgruppe des Kollektivs I ($n=30$) durchgeführt wurde, konnte ein Korrelationskoeffizient von -0.5 ermittelt werden. Die Ergebnisse bestätigen die im Luciferase Assay nachgewiesene Targetbeziehung *in vivo*. Eine stärkere Korrelation im Sinne eines höheren Koeffizienten ist bei der Heterogenität des Tumors kaum zu erwarten. Das Tumorgewebe selbst ist heterogen, eine klare Differenzierung zum umgebenden Normalgewebe, die mikroskopisch erfolgte, kann eine Fehlerquelle sein, sowie die anschließende mRNA und miRNA-Extraktion aus dem Tumorgewebe. Bei

diesen Prozessen ist eine gewisse Verunreinigung mit umgebenden Normalgewebe nicht auszuschließen, was sich in den Expressionslevels widerspiegeln kann.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals N-Ras als direktes Target von miR-146b in LNCaP-Tumorzellen beschrieben werden. Dem Nachweis *in vitro* gelang anhand des primären P-Ca-Gewebes die direkte Targetbeziehung auch *ex vivo* zu bestätigen. Unseres Wissens sind wir die ersten, die eine solche Beziehung publizieren.

Eine mögliche Folgerung daraus wäre in Zukunft medikamentös die microRNA-146b zu beeinflussen, um die proliferationsfördernde N-Ras Signalkaskade zu unterbrechen. Ein detaillierteres Verständnis der molekularen Mechanismen und regulierten Pathways vor dem Hintergrund der microRNA Expressionprofile ist für die Auswahl und das Design der targetbasierten Therapiestrategien beim Prostatakarzinom unabdingbar(43). Dies impliziert jedoch auch, dass noch weitere Forschungsarbeit auf diesem Gebiet geleistet werden muss.

5 Zusammenfassung

Das Prostatakarzinom besitzt als häufigster maligner Tumor des Mannes größte klinische Relevanz. Aufgrund der Heterogenität der Erkrankung ist die Etablierung neuer Prognosemarker und damit die individualisierte Therapie ein aktuelles Thema. Die Funktionsanalyse der microRNA-146b beim Prostatakarzinom konzentrierte sich einerseits auf die Erforschung der Bedeutung der miR-146b bei der Tumorprogression und hatte andererseits das Ziel die miR-146b als potentiellen Biomarker zu untersuchen.

Die vorliegende Arbeit befasste sich zunächst mit der miR-146b Expression in Tumor- und Normalgewebe. Dabei zeigte sich eine starke Suppression der miR-146b im Tumorgewebe im Gegensatz zu benignen Prostatahyperplasiegewebe. Mittels eines 60 Patienten umfassenden Kollektivs (Kollektiv I) konnte eine Assoziation der miR-146b Expression zu den bekannten Prognosemarkern PSA und pT-Stadium aufgezeigt werden. Auf dieser Basis wurde anhand eines zweiten Patientenkollektivs (n=34, Kollektiv II) mit hohem Anteil an Hochrisikokarzinomen (n=19) die Funktion der miR-146b als Tumormarker verifiziert. Hinsichtlich ihrer Bedeutung als prognostischer Marker konnten erste Ergebnisse in diese Richtung erzielt werden, jedoch noch nicht definitiv bestätigt werden.

In einer etablierten Prostatakarzinomzelllinie konnte ein proliferationshemmender Effekt der miR-146b nachgewiesen werden. Nachdem eine erfolgreiche gegenläufige Regulation von N-Ras in miR-146b transfizierten LNCaP Zellen gelang, wurde ein Luciferase-Assay durchgeführt, um die molekulare Interaktion von N-Ras und miR-146b zu eruieren. Dieser Luciferase-Assay bestätigte das Onkogen N-Ras als direktes Target der miR-146b. Im folgenden Versuchsteil wurde diese Kernaussage an einer Subgruppe des beschriebenen Kollektivs I verifiziert. Diese Analyse ergab, dass eine hohe miR-146b Expression mit einer supprimierten N-Ras Expression verbunden ist. Infolgedessen konnte für die miR-146b eine tumorsuppressive Funktion basierend auf einer Interaktion mit dem Onkogen N-Ras postuliert werden.

Zusammenfassend konnten infolge der Interaktion von N-Ras und miR-146b, die sowohl in vivo als auch in vitro nachgewiesen wurde, neue Ansätze zum Verständnis der Tumorprogression geliefert werden. Die miR-146b Expression zeigte eindeutige Ergebnisse in der Unterscheidung zwischen gutartigem und bösartigem Gewebe, sodass

ihre Bedeutung in der Karzinogenese akkreditiert werden konnte. Auf der Grundlage ergänzender Forschungsarbeit könnte die miR-146b zukünftig Ausgangspunkt klinischer Studien sein, welche sich mit der Prognoseabschätzung und individualisierten sogenannten Target-basierten Therapiestrategien auseinandersetzen.

6 Literaturverzeichnis

1. Robert Koch Institute (HRSG.) and association of population-based cancer registries in Germany (HRSG). *Cancer in Germany, 2009/2010*. 2014(9th edition 2014):88-91.
2. D'Amico AV. Risk-based management of prostate cancer. *The New England journal of medicine*. 2011;365(2):169-71.
3. Petrovich Z, Lieskovsky G, Stein JP, Huberman M, Skinner DG. Comparison of surgery alone with surgery and adjuvant radiotherapy for pT3N0 prostate cancer. *BJU international*. 2002;89(6):604-11.
4. Spahn M, Joniau S, Gontero P, Fieuws S, Marchioro G, Tombal B, et al. Outcome predictors of radical prostatectomy in patients with prostate-specific antigen greater than 20 ng/ml: a European multi-institutional study of 712 patients. *European urology*. 2010;58(1):1-7; discussion 10-1.
5. Wilt TJ, Brawer MK, Jones KM, Barry MJ, Aronson WJ, Fox S, et al. Radical prostatectomy versus observation for localized prostate cancer. *The New England journal of medicine*. 2012;367(3):203-13.
6. Sturgeon CM, Duffy MJ, Stenman UH, Lilja H, Brunner N, Chan DW, et al. National Academy of Clinical Biochemistry laboratory medicine practice guidelines for use of tumor markers in testicular, prostate, colorectal, breast, and ovarian cancers. *Clinical chemistry*. 2008;54(12):e11-79.
7. McShane LM, Hayes DF. Publication of tumor marker research results: the necessity for complete and transparent reporting. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2012;30(34):4223-32.
8. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science (New York, NY)*. 2001;294(5543):853-8.
9. Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science (New York, NY)*. 2001;294(5543):858-62.
10. Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science (New York, NY)*. 2001;294(5543):862-4.
11. Chow TF, Youssef YM, Lianidou E, Romaschin AD, Honey RJ, Stewart R, et al. Differential expression profiling of microRNAs and their potential involvement in renal cell carcinoma pathogenesis. *Clin Biochem*. 2010;43(1-2):150-8.
12. Schubert M, Junker K, Heinzelmann J. Prognostic and predictive miRNA biomarkers in bladder, kidney and prostate cancer: Where do we stand in biomarker development? *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2016;142(8):1673-95.
13. Ambros V. microRNAs: tiny regulators with great potential. *Cell*. 2001;107(7):823-6.
14. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75(5):843-54.
15. Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res*. 2011;39(Database issue):D152-7.
16. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116(2):281-97.

17. Han J, Lee Y, Yeom KH, Nam JW, Heo I, Rhee JK, et al. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell*. 2006;125(5):887-901.
18. Jing Q, Huang S, Guth S, Zarubin T, Motoyama A, Chen J, et al. Involvement of microRNA in AU-rich element-mediated mRNA instability. *Cell*. 2005;120(5):623-34.
19. Eddy SR. Non-coding RNA genes and the modern RNA world. *Nature reviews Genetics*. 2001;2(12):919-29.
20. Schubert M, Spahn M, Kneitz S, Scholz CJ, Joniau S, Stroebel P, et al. Distinct microRNA expression profile in prostate cancer patients with early clinical failure and the impact of let-7 as prognostic marker in high-risk prostate cancer. *PloS one*. 2013;8(6):e65064.
21. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature cell biology*. 2009;11(3):228-34.
22. Poy MN, Eliasson L, Krutzfeldt J, Kuwajima S, Ma X, Macdonald PE, et al. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature*. 2004;432(7014):226-30.
23. Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(7):2257-61.
24. Lukiw WJ, Zhao Y, Cui JG. An NF-kappaB-sensitive micro RNA-146a-mediated inflammatory circuit in Alzheimer disease and in stressed human brain cells. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(46):31315-22.
25. Nakasa T, Miyaki S, Okubo A, Hashimoto M, Nishida K, Ochi M, et al. Expression of microRNA-146 in rheumatoid arthritis synovial tissue. *Arthritis and rheumatism*. 2008;58(5):1284-92.
26. Ozen M, Creighton CJ, Ozdemir M, Ittmann M. Widespread deregulation of microRNA expression in human prostate cancer. *Oncogene*. 2008;27(12):1788-93.
27. Porkka KP, Pfeiffer MJ, Waltering KK, Vessella RL, Tammela TL, Visakorpi T. MicroRNA expression profiling in prostate cancer. *Cancer Res*. 2007;67(13):6130-5.
28. Larne O, Martens-Uzunova E, Hagman Z, Edsjo A, Lippolis G, den Berg MS, et al. miQ--a novel microRNA based diagnostic and prognostic tool for prostate cancer. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2013;132(12):2867-75.
29. Wach S, Nolte E, Szczyrba J, Stohr R, Hartmann A, Orntoft T, et al. MicroRNA profiles of prostate carcinoma detected by multiplatform microRNA screening. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2012;130(3):611-21.
30. Lodes MJ, Caraballo M, Suci D, Munro S, Kumar A, Anderson B. Detection of cancer with serum miRNAs on an oligonucleotide microarray. *PloS one*. 2009;4(7):e6229.
31. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(30):10513-8.
32. Moltzahn F, Olshen AB, Baehner L, Peek A, Fong L, Stoppler H, et al. Microfluidic-based multiplex qRT-PCR identifies diagnostic and prognostic microRNA signatures in the sera of prostate cancer patients. *Cancer Res*. 2011;71(2):550-60.

33. Bryant RJ, Pawlowski T, Catto JW, Marsden G, Vessella RL, Rhee B, et al. Changes in circulating microRNA levels associated with prostate cancer. *British journal of cancer*. 2012;106(4):768-74.
34. Ambs S, Prueitt RL, Yi M, Hudson RS, Howe TM, Petrocca F, et al. Genomic profiling of microRNA and messenger RNA reveals deregulated microRNA expression in prostate cancer. *Cancer Res*. 2008;68(15):6162-70.
35. Spahn M, Kneitz S, Scholz CJ, Stenger N, Rudiger T, Strobel P, et al. Expression of microRNA-221 is progressively reduced in aggressive prostate cancer and metastasis and predicts clinical recurrence. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2010;127(2):394-403.
36. Hart M, Nolte E, Wach S, Szczyrba J, Taubert H, Rau TT, et al. Comparative microRNA profiling of prostate carcinomas with increasing tumor stage by deep sequencing. *Mol Cancer Res*. 2014;12(2):250-63.
37. Hagman Z, Haflidadottir BS, Ceder JA, Larne O, Bjartell A, Lilja H, et al. miR-205 negatively regulates the androgen receptor and is associated with adverse outcome of prostate cancer patients. *British journal of cancer*. 2013;108(8):1668-76.
38. Kalogirou C, Spahn M, Krebs M, Joniau S, Lerut E, Burger M, et al. MiR-205 is progressively down-regulated in lymph node metastasis but fails as a prognostic biomarker in high-risk prostate cancer. *Int J Mol Sci*. 2013;14(11):21414-34.
39. Lichner Z, Fendler A, Saleh C, Nasser AN, Boles D, Al-Haddad S, et al. MicroRNA signature helps distinguish early from late biochemical failure in prostate cancer. *Clinical chemistry*. 2013;59(11):1595-603.
40. Wang L, Tang H, Thayanithy V, Subramanian S, Oberg AL, Cunningham JM, et al. Gene networks and microRNAs implicated in aggressive prostate cancer. *Cancer Res*. 2009;69(24):9490-7.
41. Melbo-Jorgensen C, Ness N, Andersen S, Valkov A, Donnem T, Al-Saad S, et al. Stromal expression of MiR-21 predicts biochemical failure in prostate cancer patients with Gleason score 6. *PLoS ONE*. 2014;9(11):e113039.
42. Li T, Li RS, Li YH, Zhong S, Chen YY, Zhang CM, et al. miR-21 as an independent biochemical recurrence predictor and potential therapeutic target for prostate cancer. *J Urol*. 2012;187(4):1466-72.
43. Walter BA, Valera VA, Pinto PA, Merino MJ. Comprehensive microRNA Profiling of Prostate Cancer. *Journal of Cancer*. 2013;4(5):350-7.
44. Kobayashi N, Uemura H, Nagahama K, Okudela K, Furuya M, Ino Y, et al. Identification of miR-30d as a novel prognostic maker of prostate cancer. *Oncotarget*. 2012;3(11):1455-71.
45. Schaefer A, Jung M, Mollenkopf HJ, Wagner I, Stephan C, Jentzmik F, et al. Diagnostic and prognostic implications of microRNA profiling in prostate carcinoma. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2010;126(5):1166-76.
46. Mavridis K, Stravodimos K, Scorilas A. Downregulation and prognostic performance of microRNA 224 expression in prostate cancer. *Clinical chemistry*. 2013;59(1):261-9.
47. Kneitz B, Krebs M, Kalogirou C, Schubert M, Joniau S, van Poppel H, et al. Survival in patients with high-risk prostate cancer is predicted by miR-221, which regulates proliferation, apoptosis, and invasion of prostate cancer cells by inhibiting IRF2 and SOCS3. *Cancer research*. 2014;74(9):2591-603.

48. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Current biology : CB.* 2002;12(9):735-9.
49. O'Connell RM, Zhao JL, Rao DS. MicroRNA function in myeloid biology. *Blood.* 2011;118(11):2960-9.
50. Labbaye C, Testa U. The emerging role of MIR-146A in the control of hematopoiesis, immune function and cancer. *Journal of hematology & oncology.* 2012;5:13.
51. Sonkoly E, Stahle M, Pivarcsi A. MicroRNAs and immunity: novel players in the regulation of normal immune function and inflammation. *Seminars in cancer biology.* 2008;18(2):131-40.
52. Sato T, Liu X, Nelson A, Nakanishi M, Kanaji N, Wang X, et al. Reduced miR-146a increases prostaglandin E(2) in chronic obstructive pulmonary disease fibroblasts. *American journal of respiratory and critical care medicine.* 2010;182(8):1020-9.
53. Cheng HS, Sivachandran N, Lau A, Boudreau E, Zhao JL, Baltimore D, et al. MicroRNA-146 represses endothelial activation by inhibiting pro-inflammatory pathways. *EMBO molecular medicine.* 2013;5(7):1017-34.
54. Larner-Svensson HM, Williams AE, Tsitsiou E, Perry MM, Jiang X, Chung KF, et al. Pharmacological studies of the mechanism and function of interleukin-1beta-induced miRNA-146a expression in primary human airway smooth muscle. *Respiratory research.* 2010;11:68.
55. Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2006;103(33):12481-6.
56. Opalinska JB, Bersenev A, Zhang Z, Schmaier AA, Choi J, Yao Y, et al. MicroRNA expression in maturing murine megakaryocytes. *Blood.* 2010;116(23):e128-38.
57. Perry MM, Moschos SA, Williams AE, Shepherd NJ, Larner-Svensson HM, Lindsay MA. Rapid changes in microRNA-146a expression negatively regulate the IL-1beta-induced inflammatory response in human lung alveolar epithelial cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950).* 2008;180(8):5689-98.
58. Lin SL, Chiang A, Chang D, Ying SY. Loss of mir-146a function in hormone-refractory prostate cancer. *RNA (New York, NY).* 2008;14(3):417-24.
59. Xu B, Wang N, Wang X, Tong N, Shao N, Tao J, et al. MiR-146a suppresses tumor growth and progression by targeting EGFR pathway and in a p-ERK-dependent manner in castration-resistant prostate cancer. *The Prostate.* 2012;72(11):1171-8.
60. Wang X, Gao H, Ren L, Gu J, Zhang Y, Zhang Y. Demethylation of the miR-146a promoter by 5-Aza-2'-deoxycytidine correlates with delayed progression of castration-resistant prostate cancer. *BMC cancer.* 2014;14:308.
61. Selth LA, Townley SL, Bert AG, Stricker PD, Sutherland PD, Horvath LG, et al. Circulating microRNAs predict biochemical recurrence in prostate cancer patients. *British journal of cancer.* 2013;109(3):641-50.
62. Rodenhuis S, van de Wetering ML, Mooi WJ, Evers SG, van Zandwijk N, Bos JL. Mutational activation of the K-ras oncogene. A possible pathogenetic factor in adenocarcinoma of the lung. *The New England journal of medicine.* 1987;317(15):929-35.

63. Bos JL, Fearon ER, Hamilton SR, Verlaan-de Vries M, van Boom JH, van der Eb AJ, et al. Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature*. 1987;327(6120):293-7.
64. Lemoine NR, Mayall ES, Wyllie FS, Williams ED, Goyns M, Stringer B, et al. High frequency of ras oncogene activation in all stages of human thyroid tumorigenesis. *Oncogene*. 1989;4(2):159-64.
65. Kovnat A, Buick RN, Choo B, De Harven E, Kopelyan I, Trent JM, et al. Malignant properties of sublines selected from a human bladder cancer cell line that contains an activated c-Ha-ras oncogene. *Cancer research*. 1988;48(17):4993-5000.
66. Almoguera C, Shibata D, Forrester K, Martin J, Arnheim N, Perucho M. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell*. 1988;53(4):549-54.
67. Grunewald K, Lyons J, Frohlich A, Feichtinger H, Weger RA, Schwab G, et al. High frequency of Ki-ras codon 12 mutations in pancreatic adenocarcinomas. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 1989;43(6):1037-41.
68. Mulholland DJ, Kobayashi N, Ruscetti M, Zhi A, Tran LM, Huang J, et al. Pten loss and RAS/MAPK activation cooperate to promote EMT and metastasis initiated from prostate cancer stem/progenitor cells. *Cancer research*. 2012;72(7):1878-89.
69. Carter BS, Epstein JI, Isaacs WB. ras gene mutations in human prostate cancer. *Cancer research*. 1990;50(21):6830-2.
70. Barbacid M. ras genes. *Annual review of biochemistry*. 1987;56:779-827.
71. Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*. 2000;103(2):211-25.
72. Marais R, Light Y, Paterson HF, Marshall CJ. Ras recruits Raf-1 to the plasma membrane for activation by tyrosine phosphorylation. *The EMBO journal*. 1995;14(13):3136-45.
73. Molina JR, Adjei AA. The Ras/Raf/MAPK pathway. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. 2006;1(1):7-9.
74. Liebmann C. Regulation of MAP kinase activity by peptide receptor signalling pathway: paradigms of multiplicity. *Cellular signalling*. 2001;13(11):777-85.
75. Betel D, Koppal A, Agius P, Sander C, Leslie C. Comprehensive modeling of microRNA targets predicts functional non-conserved and non-canonical sites. *Genome Biol*. 2010;11(8): R90.
76. Shao M, Rossi S, Chelladurai B, Shimizu M, Ntukogu O, Ivan M, et al. PDGF induced microRNA alterations in cancer cells. *Nucleic acids research*. 2011;39(10):4035-47.
77. Porkka KP, Pfeiffer MJ, Waltering KK, Vessella RL, Tammela TL, Visakorpi T. MicroRNA expression profiling in prostate cancer. *Cancer research*. 2007;67(13):6130-5.
78. Ding HY, Qian WQ, Xu J. MicroRNA-146b acts as a potential tumor suppressor in human prostate cancer. *Journal of BUON : official journal of the Balkan Union of Oncology*. 2016;21(2):434-43.
79. Rath N, Olson MF. Rho-associated kinases in tumorigenesis: re-considering ROCK inhibition for cancer therapy. *EMBO reports*. 2012;13(10):900-8.
80. Lin SL, Chang D, Ying SY. Hyaluronan stimulates transformation of androgen-independent prostate cancer. *Carcinogenesis*. 2007;28(2):310-20.

81. Garcia AI, Buisson M, Bertrand P, Rimokh R, Rouleau E, Lopez BS, et al. Down-regulation of BRCA1 expression by miR-146a and miR-146b-5p in triple negative sporadic breast cancers. *EMBO molecular medicine*. 2011;3(5):279-90.
82. Bhaumik D, Scott GK, Schokrpur S, Patil CK, Campisi J, Benz CC. Expression of microRNA-146 suppresses NF-kappaB activity with reduction of metastatic potential in breast cancer cells. *Oncogene*. 2008;27(42):5643-7.
83. Hou Z, Xie L, Yu L, Qian X, Liu B. MicroRNA-146a is down-regulated in gastric cancer and regulates cell proliferation and apoptosis. *Medical oncology (Northwood, London, England)*. 2012;29(2):886-92.
84. Kalla Singh S, Tan QW, Brito C, De Leon M, Garberoglio C, De Leon D. Differential insulin-like growth factor II (IGF-II) expression: A potential role for breast cancer survival disparity. *Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society*. 2010;20(2):162-70.
85. Palayoor ST, Youmell MY, Calderwood SK, Coleman CN, Price BD. Constitutive activation of IkappaB kinase alpha and NF-kappaB in prostate cancer cells is inhibited by ibuprofen. *Oncogene*. 1999;18(51):7389-94.
86. Gasparian AV, Yao YJ, Kowalczyk D, Lyakh LA, Karseladze A, Slaga TJ, et al. The role of IKK in constitutive activation of NF-kappaB transcription factor in prostate carcinoma cells. *Journal of cell science*. 2002;115(Pt 1):141-51.
87. Dejardin E, Bonizzi G, Bellahcene A, Castronovo V, Merville MP, Bours V. Highly-expressed p100/p52 (NFkB2) sequesters other NF-kappa B-related proteins in the cytoplasm of human breast cancer cells. *Oncogene*. 1995;11(9):1835-41.
88. Duffey DC, Chen Z, Dong G, Ondrey FG, Wolf JS, Brown K, et al. Expression of a dominant-negative mutant inhibitor-kappaBalpha of nuclear factor-kappaB in human head and neck squamous cell carcinoma inhibits survival, proinflammatory cytokine expression, and tumor growth in vivo. *Cancer research*. 1999;59(14):3468-74.
89. Sovak MA, Bellas RE, Kim DW, Zanieski GJ, Rogers AE, Traish AM, et al. Aberrant nuclear factor-kappaB/Rel expression and the pathogenesis of breast cancer. *The Journal of clinical investigation*. 1997;100(12):2952-60.
90. Nakshatri H, Bhat-Nakshatri P, Martin DA, Goulet RJ, Jr., Sledge GW, Jr. Constitutive activation of NF-kappaB during progression of breast cancer to hormone-independent growth. *Molecular and cellular biology*. 1997;17(7):3629-39.
91. Nata T, Fujiya M, Ueno N, Moriichi K, Konishi H, Tanabe H, et al. MicroRNA-146b improves intestinal injury in mouse colitis by activating nuclear factor-kappaB and improving epithelial barrier function. *The journal of gene medicine*. 2013;15(6-7):249-60.
92. Traynor P, McGlynn LM, Mukherjee R, Grimsley SJ, Bartlett JM, Edwards J. An increase in N-Ras expression is associated with development of hormone refractory prostate cancer in a subset of patients. *Disease markers*. 2008;24(3):157-65.
93. Halkein J, Tabruyn SP, Ricke-Hoch M, Haghikia A, Nguyen NQ, Scherr M, et al. MicroRNA-146a is a therapeutic target and biomarker for peripartum cardiomyopathy. *The Journal of clinical investigation*. 2013;123(5):2143-54.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung des microRNA Signalwegs von den Vorstufen zur reifen microRNA(20).....	4
Abbildung 2: Chromosom 10 - NC_000010.11 - Lokalisationsort der miR-146b (NCBI, National Center for Biotechnology Information, www.ncbi.nlm.nih.gov)	7
Abbildung 3: Überblick über den Ras/Raf/MAPK Signaltransduktionsweg(72)	10
Abbildung 4: Mikroskopisches Bild der LNCaP-Zellen	14
Abbildung 5: Exponentielle Darstellung der c_t -Werte.	21
Abbildung 6: Darstellung der Schmelzkurve.	25
Abbildung 7: Reaktionsablauf der Recombinant Firefly Luciferase.....	30
Abbildung 8: Assoziation der miR-146b-Expression zu etablierten Prognoseparametern in der PCa-Kohorte I	34
Abbildung 9: Assoziation der relativen miR-146b Expression im primären PCa-Tumorkollektiv II zu klinisch wichtigen Prognose-Parametern.....	37
Abbildung 10: Relative miR-146b Expression in Hochrisiko-PCa Gewebe (Subgruppe aus Kohorte I) von n=19 Patienten mit -bzw. ohne Rezidiv	39
Abbildung 11: Relative miR-146b Expression im primären PCa-Gewebe (Gesamtkollektiv Kohorte II, n=34) sowie 12 BPH-Gewebe-Proben.....	40
Abbildung 12: Relative miR-146b Expression im Hochrisiko-PCa-Gewebe (Subgruppe aus Kohorte II n=19) und 12 BPH-Gewebe-Proben.....	40
Abbildung 13: Transiente Transfektion von miR-146b in LNCaP Zellen	42
Abbildung 14: Proliferationsverhalten von LNCaP Zellen nach transients Transfektion mit pre-miR-146b	43
Abbildung 15: Relative IGF-1 und PDGFA Expression nach transients Herabregulation der miR-146b.....	45
Abbildung 16: relative NFkB Expression nach transients Transfektion mit pre- und anti-miR-146b.....	46
Abbildung 17: relative N-Ras Expression nach transients Transfektion mit pre- und anti-146b.....	47
Abbildung 18: vorhergesagte Bindungsstellen von miR-146b an N-Ras (Ausschnitt aus microRNA.org/pictar).....	48
Abbildung 19: Luciferase-Assay zur Bestimmung einer direkten Interaktion von miR-146b und N-Ras	49
Abbildung 20: Expression von N-Ras im primären Tumorgewebe	50
Abbildung 21: Korrelationsanalyse von miR-146b und N-Ras in vivo.	51

8 Danksagung

Die vorliegende Dissertation erfolgte an der Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg. Hiermit möchte ich mich bei Herrn Universitätsprofessor Dr. med. Hubertus Riedmiller für die Überlassung des Themas sowie die Unterstützung bei der Durchführung der Forschungsarbeit sowie die Korrekturen bedanken.

Ich möchte mich herzlich bei meiner Betreuerin Frau Dr. med. Maria Schubert für die kompetente und immer bereitwillige Unterstützung bedanken, die sie mir von Beginn an bei der Anfertigung der Experimente und der Fertigstellung des Manuskriptes entgegengebracht hat. Sie half mir hervorragend bei der Einführung in die Forschungsarbeit, von der Literaturrecherche bis hin zu der Diskussion über die entsprechenden Projekte der vorliegenden Arbeit sowie der Interpretation der Ergebnisse. Herrn Dr. med. vet. Burkhard Kneitz sei an dieser Stelle für die Erläuterung von Fragestellungen während der Forschungsarbeit sowie für die kritische Durchsicht der Arbeit gedankt.

Weiterhin bedanke ich mich bei Frau Katrin Borschert für die Durchführung und Erläuterung des Luciferase-Assays. Frau Gudrun Schell danke ich für ihre besondere Mühe bei der Einweisung in die labortechnischen Untersuchungen. Zudem danke ich Frau Barbara Dexler und Frau Vera Schwartz für die freundliche technische Unterstützung.

Abschließend möchte ich mich noch ganz herzlich bei meinen Eltern sowie vor allem bei meiner Schwester für ihre Unterstützung beim Fertigstellen dieser Arbeit bedanken.