

Aus der Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie  
der Universität Würzburg  
Direktor: Prof. Dr. med. Hubert Kübler

**MicroRNA-Expressionsprofile im Hochrisiko-Prostatakarzinom**

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

vorgelegt von

Nico Stenger  
aus Alzenau

Würzburg, Mai 2018



Referent: Prof. Dr. med. Hubertus Riedmiller

Koreferent/-in: Prof. Dr. med. Paul-Gerhardt Schlegel

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 16.12.2019

Der Promovend ist Arzt.



*Meinen Eltern*



## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Prostatakarzinom.....	1
1.1.1	Definition und Epidemiologie des Prostatakarzinoms.....	1
1.1.2	Screening und Primärdiagnose des Prostatakarzinoms.....	1
1.1.3	Grading des Prostatakarzinoms.....	2
1.1.4	Staging des Prostatakarzinoms.....	3
1.1.5	Therapie des Prostatakarzinoms.....	4
1.1.6	Prognose des Prostatakarzinoms.....	6
1.1.7	Karzinogenese und molekulare Marker des Prostatakarzinoms.....	9
1.2	MicroRNA (miRNA).....	11
1.2.1	Biogenese der miRNA.....	12
1.2.2	Nomenklatur der miRNA .....	13
1.2.3	Bedeutung der miRNA in der Tumorgenese.....	14
1.2.4	Onkomirs – miRNAs als Onkogene oder Tumorsuppressoren.....	15
1.2.5	Bedeutung der miRNA in Diagnostik und Prognose von Tumoren.....	16
1.2.6	Bedeutung der miRNA im Prostatakarzinom.....	17
1.3	Fragestellung der Arbeit.....	19
2	Material und Methoden.....	21
2.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	21
2.2	Chemikalien.....	22
2.3	Primer und Sonden.....	22
2.4	Kits.....	23
2.5	Software.....	24
2.6	Prostatakarzinom- und Prostatahyperplasiematerial.....	24
2.6.1	Herkunft der Proben .....	24
2.6.2	Klinisch-pathologische Eigenschaften der Proben.....	24
2.7	Gewinnung der RNA und miRNA aus FFPE-Material.....	25
2.8	miRNA-Microarray.....	28
2.9	Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR).....	30
2.10	Statistische Methoden.....	32
2.11	Datenbanksuche nach Zielgenen.....	33

3 Ergebnisse.....	34
3.1 Klinisch-pathologische Parameter und Auswahl der Proben.....	34
3.2 Das globale miRNA-Expressionsprofil im Hochrisiko-Prostatakarzinom.....	39
3.3 miRNA-Expressionsprofile in Subgruppen des Hochrisiko-Prostatakarzinoms. .	43
3.3.1 miRNA-Expressionsprofile nach Gleason-Score.....	43
3.3.2 Assoziation von miRNAs mit klinischen Parametern.....	44
3.4 Technische Validierung der Expressionsniveaus spezifischer miRNAs im Hochrisiko-Prostatakarzinom mittels qRT-PCR.....	48
3.4.1 Auswahl der zu validierenden miRNAs.....	48
3.4.2 Bestätigung der Expressionsniveaus von sieben miRNAs im Prostatakarzinom gegenüber BPH-Gewebe mittels qRT-PCR.....	49
3.5 Expressionsniveaus spezifischer miRNAs im Hochrisiko-Prostatakarzinom in einem erweiterten Kollektiv.....	51
3.5.1 Bestätigung der Expressionsniveaus von sieben miRNAs im Prostatakarzinom gegenüber BPH-Gewebe in einem erweiterten Kollektiv.....	51
3.5.2 Herunterregulation von miR-221 und -125b im Prostatakarzinom und Klassifikation der Prostatakarzinomproben anhand dreier miRNAs.....	53
3.6 Expression ausgewählter miRNAs in Prognosegruppen des Hochrisiko- Prostatakarzinoms nach Gleason-Score in einem erweiterten Kollektiv.....	55
3.6.1 miR-422a.....	55
3.6.2 miR-221.....	56
3.7 Identifikation potentieller Zielgene elf ausgewählter miRNAs mittels Datenbanksuche.....	58
4 Diskussion.....	61
4.1 Das miRNA-Expressionsprofil im Prostatakarzinom.....	62
4.1.1 Prostatakarzinomspezifische miRNA-Expressionsprofile .....	62
4.1.2 Limitierungen der Vergleichbarkeit von miRNA-Expressionsprofilen.....	68
4.1.3 Bewertung des Vergleichs des identifizierten miRNA-Expressionsprofils mit der Literatur.....	73
4.1.4 Identifikation und Bedeutung einzelner prostatakarzinomspezifisch regulierter miRNAs.....	77



4.2 miRNA-Expressionsunterschiede in Subgruppen des Hochrisiko-Prostatakarzinoms.....	81
4.2.1 Nicht-überwachte hierarchische Clusteranalyse.....	81
4.2.2 miRNA-Expressionsunterschiede nach klinischem Verlauf des Hochrisiko-Prostatakarzinoms .....	82
4.2.3 miR-515-3p und miR-147 – mögliche Bedeutung im Prostatakarzinom.....	83
4.2.4 miRNA-Expressionsunterschiede in Prognosegruppen des Hochrisiko-Prostatakarzinoms nach Gleason-Score.....	84
4.2.5 Die Rolle von miR-221.....	85
4.3 Potentielle Zielgene elf ausgewählter miRNAs.....	89
5 Zusammenfassung.....	92
6 Literaturverzeichnis.....	94
7 Abbildungsverzeichnis.....	105
8 Tabellenverzeichnis.....	106
9 Abkürzungsverzeichnis.....	108



# **1 Einleitung**

## **1.1 Prostatakarzinom**

### **1.1.1 Definition und Epidemiologie des Prostatakarzinoms**

Das Prostatakarzinom (PCa) ist ein Adenokarzinom ausgehend von den Epithelzellen der Prostata. Im Jahre 2014 wurde es 57.370 mal bei Männern in Deutschland neu diagnostiziert. Es ist mit 23% aller Krebserkrankungen die häufigste Krebserkrankung beim Manne und mit 11,3% die zweithäufigste krebsbedingte Todesursache in Deutschland. Das mittlere Erkrankungsalter liegt zur Zeit bei 72 Jahren.<sup>1</sup>

Eine Besonderheit beim PCa ist dessen mögliche Einteilung nach dem Verlauf in zwei Formen: das latente, klinisch inapparente (auch: insignifikantes) PCa und das klinisch apparente (signifikante) PCa.<sup>2</sup> Autopsiestudien haben gezeigt, dass die Zahl der Karzinomträger um ein Vielfaches höher ist, als die Zahl derer, die am PCa versterben.<sup>3</sup> 1992 konstatierten Scardino et al Folgendes: Ein Mann in der westlichen Welt hat ein Lebenszeitrisiko von ca. 40% am PCa zu erkranken, aber nur ein 10%iges Risiko, symptomatisch zu werden und ein 3%iges Risiko, am PCa zu versterben.<sup>4</sup> Die Inzidenz hat sich in den letzten zwei Jahrzehnten insbesondere durch verbesserte Screeningmaßnahmen stark vergrößert, die Mortalität ist in derselben Zeit nur leicht gesunken. 2014 betrug in Deutschland die altersstandardisierte Inzidenz 92,7/100.000 und die Mortalität 19,7/100.000 (Europastandard).<sup>1</sup>

### **1.1.2 Screening und Primärdiagnose des Prostatakarzinoms**

Die digital-rektale Untersuchung (DRU) und die Bestimmung des prostataspezifischen Antigens (PSA-Wert) im Serum sind zusammen die Bestandteile der Früherkennung (=Screening) des PCa. Bei auffälligem Befund der DRU und/oder erhöhtem PSA-Wert schließt sich weitere Diagnostik an (s. Tab. 1, S. 2).<sup>5</sup> Die Diskussion um den besten PSA-Grenzwert für die Einleitung weiterer Diagnostik ist noch immer umstritten.<sup>6</sup> Noch dazu ist die Studienlage für den mortalitätssenkenden Nutzen des PSA-Screenings widersprüchlich, denn zwei große Studien kamen diesbezüglich zu unterschiedlichen Ergebnissen.<sup>7-8</sup> Eine Neubewertung ebendieser Arbeiten betrachtet nun den

mortalitätssenkenden Nutzen wiederum als erwiesen.<sup>9</sup> Insgesamt möchte man die PCa-spezifische Mortalität senken, aber vermeiden, Patienten mit klinisch insignifikantem PCa einer unnötigen Therapie zuzuführen. Man spricht auch von der Vermeidung von Überdiagnose. Eine Überdiagnose liegt vor, wenn ein Patient auch bei ausbleibender Therapie nie während seiner Lebenszeit symptomatisch wird. Die Schätzungen zum Ausmaß der Überdiagnose variieren stark: Je nach Studie (und Definition) werden Überdiagnoseraten von gescreenten Patienten angegeben, die von 10%<sup>10</sup>, über 43%<sup>11</sup> bis 50%<sup>12</sup> reichen. Das PSA-Screening wird in Deutschland derzeit interessierten Männern ab 45 Jahren mit einer mutmaßlichen Lebenserwartung von >10 Jahren angeboten.<sup>5</sup> Es ist keine Leistung der gesetzlichen Krankenkassen.

PSA-Wert (ng/ml)	PCa-Wahrscheinlichkeit
<4,0	<2%
<2,5	<2%
2,5-4,0	~18%
4-10	~25%
>10	~67%

*Tabelle 1: Wahrscheinlichkeit des Vorliegens eines PCa in Abhängigkeit vom Serum-PSA-Spiegel.<sup>13</sup>*

Für die Primärdiagnose "Prostatakarzinom" werden eine digital-rektale Untersuchung, Bestimmung des Serum-PSA und eine mit transrektaler Ultraschalluntersuchung (TRUS-) gesteuerte Stanzbiopsie der Prostata durchgeführt. Mit dem Biopsat können die Diagnose gesichert und andere Erkrankungen der Prostata ausgeschlossen werden.<sup>5</sup>

### **1.1.3 Grading des Prostatakarzinoms**

Mit dem Biopsiematerial (aber auch mit dem postoperativen Prostatektomiepräparat) findet ein Grading (histologische Beurteilung der Differenzierung) des Tumors statt. Beim PCa geschieht dies mit Hilfe des sog. Gleason-Score (GS; auch Gleason-Summe). Die Erstellung dieses Scores stützt sich auf Wachstumsmuster des Tumors. Dabei werden fünf Wachstumsmuster unterschieden, wobei 1 am meisten differenziert ist und 5 am geringsten. Dem im Tumor vorherrschenden Wachstumsmuster und dem

zweithäufigsten werden dann jeweils die Werte von 1 bis 5 zugeordnet (Gleason-Grad) und diese addiert. So entstehen GS von  $1+1=2$  (für sehr gut differenzierte) bis  $5+5=10$  (für sehr schlecht differenzierte PCa). Dem GS aus dem postoperativen Prostatektomiepräparat kommt große Bedeutung als prognostischer Marker zu und von ihm hängt maßgeblich die weitere postoperative therapeutische Vorgehensweise ab.<sup>14</sup> Mit dem GS aus dem Biopsiematerial wird insbesondere über die Primärtherapie entschieden (s. folgende Kapitel).

#### **1.1.4 Staging des Prostatakarzinoms**

Zur Bestimmung des klinischen T-Stadiums des PCa wird der DRU-Befund herangezogen. Durchgeführte bildgebende Untersuchungen (z.B. TRUS) werden dabei berücksichtigt. Bei Patienten mit einem  $GS \geq 8$  oder einer Kategorie cT3/4 sollte vor der Entscheidung über eine therapeutische Maßnahme eine kernspin- oder computertomographische Untersuchung der Beckenorgane durchgeführt werden, um den Nodalstatus (N-Kategorie) zu bestimmen. Patienten mit  $PSA > 10 \text{ ng/ml}$  und zusätzlich  $GS \geq 8$  oder Kategorie cT3/4 oder solche mit Knochenschmerzen erhalten bei bioptisch gesichertem PCa auch eine Skelettszintigraphie zur Evaluierung der ossären Metastasierung. Mittels dieser Untersuchungen wird das TNM-Stadium des Prostatakarzinoms nach UICC bestimmt (s. Tab. 2, S. 4).

T-Stadium	Erläuterung
Tx	Primärtumor nicht beurteilbar
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
T1	Klinisch nicht erkennbarer Tumor, weder tastbar noch in bildgebenden Verfahren sichtbar
T1a	Tumor zufälliger histologischer Befund in 5% oder weniger des resezierten Gewebes
T1b	Tumor zufälliger histologischer Befund in mehr als 5% des resezierten Gewebes
T1c	Tumor durch Nadelbiopsie diagnostiziert (z.B. bei erhöhtem PSA)
T2	Tumor begrenzt auf Prostata
T2a	Tumor befällt die Hälfte eines Lappens oder weniger
T2b	Tumor befällt mehr als die Hälfte eines Lappens
T2c	Tumor in beiden Lappen
T3	Tumor durchbricht Prostatakapsel
T3a	Extrakapsuläre Ausbreitung (einseitig oder beidseitig)
T3b	Tumor infiltriert Samenblase(n)
T4	Tumor ist fixiert oder infiltriert andere benachbarte Strukturen als Samenblasen
N-Stadium	
Nx	Regionäre Lymphknoten nicht beurteilbar
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Regionäre Lymphknotenmetastasen
M-Stadium	
Mx	Vorliegen von Fernmetastasen nicht beurteilbar
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen vorhanden

*Tabelle 2: TNM-Klassifikation des Prostatakarzinoms nach UICC 2002.<sup>15</sup>*

### 1.1.5 Therapie des Prostatakarzinoms

Nach der Interdisziplinären Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms vom Dezember 2016 stehen je nach Tumorstadium verschiedene Therapiemöglichkeiten zur Verfügung<sup>5</sup>: Je nach TNM-Stadium, Gleason-Score und PSA-Wert kommen radikale Prostatektomie, primäre (oder adjuvante) Strahlentherapie/Brachytherapie und primäre oder (neo-)adjuvante Hormontherapie oder eine kombinierte Hormon-Chemotherapie in Frage. Bei Patienten mit Prostatakarzinom und erhöhtem Risiko (>cT1c oder PSA>10 oder GS>6) wird i.d.R. eine Lymphadenektomie durchgeführt. Die Chemotherapie hat insbesondere beim hormonrefraktären (androgenunabhängigen) PCa einen Stellenwert.

Die Bedeutung der Nebenwirkungen der Therapie wird in Anbetracht der zunehmenden Lebenserwartung nach frühzeitiger Diagnosestellung (z.B. durch Screening) immer größer. Wichtige (Langzeit-)Nebenwirkungen sind erektile Dysfunktion, Inkontinenz, Brustschmerzen und Gynäkomastie (s. Tabelle 3, S. 5).

Therapieform	Erektile Dysfunktion	Inkontinenz	Brustschmerzen & Gynäkomastie
Radikale Prostatektomie	20-100%	0-70%	-
Stahlentherapie	10-85%	0-60%	-
Hormontherapie	Bis 85,1%	-	49-80%

*Tabelle 3: Relative Häufigkeit von Nebenwirkungen der Therapieformen des PCa (Auswahl). Starke Schwankungen in den Angaben ergeben sich durch große Abhängigkeit von multiplen Faktoren, z.B. Art der Operation/Strahlen-/Hormontherapie, Erfahrung des Operateurs und (Strahlen-)Dosis.<sup>16-17</sup>*

Um diese im Hinblick auf die Lebensqualität teilweise einschneidenden Nebenwirkungen zu vermeiden, werden derzeit vermehrt Strategien wie Active Surveillance oder Watchful Waiting diskutiert und angewendet<sup>5</sup>: Watchful Waiting bezeichnet eine abwartende Haltung ohne verstärkte Kontrollen. Bei symptomatischer Progression wird dann i.d.R. eine palliative Therapie eingeleitet. Active Surveillance hat dem gegenüber das Ziel, bei einem ansonsten gesunden und für eine radikale Therapie geeigneten Patienten mit einem wenig aggressiven PCa die definitive Therapie unter genauer Überwachung (u. a. mit Kontrollbiopsie) hinauszuschieben bis zu dem Zeitpunkt, an dem sich die Tumorbilogie oder der Patientenwunsch ändert. Hierzu wären entsprechende Marker z.B. aus der Tumorbilogie zur Einschätzung des Rezidivrisikos wünschenswert.

### **1.1.6 Prognose des Prostatakarzinoms**

In Anbetracht der interindividuellen Variabilität des PCa in seiner klinischen Verlaufsform (signifikantes versus insignifikantes PCa) sowie Überdiagnoseraten von mindestens 10% kommt der Prognosefindung eine besondere Bedeutung zu (s. Abschnitt 1.1.1, S. 1). Im Vergleich zu anderen malignen Krebserkrankungen ist die Prognose des PCa über alle Patienten hinweg mit einer Fünfjahresüberlebensrate von ca. 91% günstig, insbesondere da 75% der Tumor in frühen Stadien (T1/T2) erkannt werden.<sup>1</sup> Bei differenzierter Betrachtung ergeben sich jedoch erhebliche Problemstellungen im Bezug auf die Möglichkeit der Vorhersage des Verlaufs des PCa. Diese sollen im Folgenden kurz dargestellt werden.

#### **1.1.6.1 Anerkannte prognostische Marker des Prostatakarzinoms und ihre Limitationen**

Die Prognose des PCa kann zu verschiedenen Zeitpunkten im Krankheits- oder Therapieverlauf mit jeweils zur Verfügung stehenden Prognosefaktoren beurteilt werden. Diese werden nach einer Empfehlung des College of American Pathologists (CAP) entsprechend ihrer durch Studien belegten Validität in drei Kategorien eingeteilt<sup>18</sup>: Für die Faktoren der Kategorie I ist die prognostische Bedeutung bereits hinreichend bewiesen. Hierzu gehören das TNM-Stadium, der Status der Resektionsränder, das Grading (Gleason-Score) und der PSA-Wert bei Diagnosestellung. Faktoren der Kategorie II fehlt trotz ausführlicher biologischer und klinischer Forschung der Zuverlässigkeitsnachweis durch valide Studienergebnisse. Diese Faktoren sind das Tumolvolumen im Biopsiegut, das Tumolvolumen im Operationspräparat, der histologische Subtyp und die DNA-Ploidie. Kategorie III enthält Faktoren, u.a. perineurale Infiltration oder lymphatische Mikrometastasen, die nicht ausreichend erforscht sind, um deren prognostischen Nutzen belegen zu können. Nachfolgend wird insbesondere auf die für diese Arbeit besonders relevanten Faktoren, den PSA-Wert sowie den Gleason-Score, eingegangen.

#### **1.1.6.2 PSA-Wert**

Wie bereits erwähnt korreliert der PSA-Spiegel im Serum mit der Wahrscheinlichkeit des Vorliegens eines PCa (siehe Tab.7, S.22). Da mit steigendem Alter die Häufigkeit



für eine nicht-karzinomassoziierte Ursache für eine PSA-Erhöhung zunimmt, wird zunehmend versucht, den PSA-Wert als Langzeitparameter zu verwenden.<sup>19</sup> Verschiedene Studien konnten eine Assoziation zwischen leichten PSA-Erhöhungen (je nach Studie zwischen 0,51 und 2,5ng/ml) bei gesunden Männern im Alter von 40 bis 55 Jahren und der Häufigkeit einer späteren Prostatakarzinomdiagnose finden.<sup>19-20</sup> Außerdem ist erwiesen, dass höhere PSA-Spiegel im Serum mit größerem Tumolvolumen<sup>21-22</sup>, höherem pathologischem Stadium<sup>23</sup> und mit höherem Gleason-Score<sup>21, 23</sup> einhergehen. PSA-Werte bei Diagnosestellung von >20ng/ml sind ein prognostisches Zeichen für höhere Rezidivraten. Trotzdem liegt das PCa-spezifische Überleben nach radikaler Prostatektomie nach 5 bzw. 7 Jahren bei 90% bzw. 86% in diesem Kollektiv.<sup>24</sup> Die prognostische Aussagekraft des PSA-Wertes alleine ist also nicht stark oder differenziert genug, um schwerwiegende Verläufe vorherzusagen zu können.

Wichtig ist der PSA-Wert auch im Follow-up nach Prostatektomie oder Strahlentherapie, denn ein nachweisbares PSA im Serum (meist definiert als >0,2ng/ml) zeigt das Vorhandensein eines Rückfalles an, meistens bevor man auf andere Weise den Tumor feststellen kann.<sup>6</sup> Man spricht dann von PSA-Progression oder biochemischer Progression. In einer Studie von Pound et al hatten 15% von 1997 Patienten nach radikaler Prostatektomie eine biochemische Progression.<sup>25</sup> Der nachfolgende natürliche Krankheitsverlauf ist sehr variabel. Mit Hilfe der PSA-Verdopplungszeit wird versucht das Vorliegen einer metachronen Fernmetastasierung vorherzusagen.<sup>25-26</sup> In den meisten Fällen handelt es sich um einen langsam voranschreitenden Verlauf, so dass andere Todesursachen als das PCa das Überleben der Patienten stärker beeinflussen. Andererseits kann gerade beim durch das PSA-Screening jünger gewordene Patientenkollektiv, das deutlich weniger Begleiterkrankungen hat, das PCa dann trotz des langsamen Verlaufs zum Tode führen.<sup>27</sup> Im o.g. Kollektiv von 317 Patienten mit einem präoperativen PSA-Wert von >20ng/ml erlitten 25,3% eine biochemische Progression und 14% (also nur 55% derer mit biochemischer Progression) eine klinische Progression, welche letztlich Lebensqualität und Mortalität beeinflusst. Für eine Zuordnung von Patienten mit biochemischer Progression zu einem bestimmten weiteren Krankheitsverlauf fehlen zurzeit noch die entsprechenden Prognosefaktoren.

### 1.1.6.3 Gleason-Score (Grading)

Der Gleason-Score kann aus Biopsiematerial (präoperativ) und aus einem Prostatektomiepräparat (postoperativ) bestimmt werden und hat dadurch unterschiedliche Wertigkeit. Zwar stimmen die Gleason-Scores aus den Biopsien i.d.R. relativ gut mit dem späteren Präparat überein, dennoch kommt es in 26%-57% der Fälle zum Undergrading in der Biopsie<sup>28-30</sup>. Das heißt, dass der Gleason-Score in der Biopsie niedriger ausfällt als im korrespondierenden Prostatektomiepräparat. Zum Gegenteil – dem Overgrading – kommt es selten. Etwa 10% aller positiven Prostatabiopsien ergeben einen Gleason-Score von 2-4, etwa 20% einen Gleason-Score von 8-10 und etwa 70% einen Gleason-Score von 5-7.<sup>28</sup> Die aus Biopsiematerial stammenden Gleason-Scores werden zusammen mit anderen Prognosefaktoren wie PSA-Wert und klinischem T-Stadium in Nomogrammen benutzt, um zu versuchen den Verlauf des PCa trotz Undergrading im Biopsiematerial vorherzusagen. Je nach klinischer Situation (z.B. prä- vs. posttherapeutisch) stehen weitere Nomogramme zur Verfügung<sup>31-36</sup>. Zwar sind die Vorhersagen mit diesen Nomogrammen genauer als Expertenmeinungen.<sup>37</sup> Eine unreflektierte Anwendung von Nomogrammen kann aus verschiedenen Gründen (u.a. aufgrund populationsbasierter Unterschiede im PCa) zu negativen Folgen für Patienten führen. So führte die Anwendung der sog. Partintables in einigen Fällen zu deutlichem Understaging.<sup>38</sup> Für das progressionsfreie Überleben nach radikaler Prostatektomie ist der Gleason-Score aus dem Prostatektomiepräparat ein anerkannter und unabhängiger prognostischer Marker (s. Tabelle 4, S. 9).<sup>39</sup>

Insgesamt können die derzeit bekannten o. g. prognostischen Marker den Verlauf der Erkrankung nicht gut vorhersagen. Patienten mit erhöhtem Risiko für einen aggressiven Verlauf der Erkrankung können nur schwer erkannt werden. Das Einleiten der für den Patienten optimalen Therapie wird dadurch deutlich erschwert.

Gleason-Score	progressionsfreies Überleben (%)	
	4 Jahre	10 Jahre
2-4	100	95,6
5-6	96,9	81,9
7	76,9	51,5
8-9	59,1	34,9

*Tabelle 4: Gleason-Score als unabhängiger Prognosefaktor für das postoperative Progressionsrisiko. Angegeben ist das progressionsfreie Überleben nach vier und zehn Jahren.<sup>39</sup>*

#### **1.1.6.4 Gruppen des Prostatakarzinoms nach Rezidivrisiko**

Entsprechend o.g. Erkenntnisse wird das lokal begrenzte PCa (im Gegensatz zum metastasierten) bezüglich des Risikos der Entwicklung eines Rezidivs in drei Gruppen eingeteilt<sup>35-36</sup>:

- Niedrig: PSA  $\leq 10$  ng/ml und Gleason-Score  $\leq 6$  und cT-Kategorie  $\leq 2a$
- Mittel: PSA  $> 10$  ng/ml bis 20 ng/ml oder Gleason-Score 7 oder cT-Kategorie 2b
- Hoch: PSA  $> 20$  ng/ml oder Gleason-Score  $\geq 8$  oder cT-Kategorie  $\geq 2c$

In der vorliegenden Arbeit werden PCa mit hohem Rezidivrisiko als HR-PCa (Hochrisiko-Prostatakarzinome) bezeichnet.

#### **1.1.7 Karzinogenese und molekulare Marker des Prostatakarzinoms**

Die mikro- und makroskopische Karzinogenese des PCa läuft nach heutiger Vorstellung wie folgt ab<sup>40</sup>: PCa entstehen vor allem in der peripheren Zone der Prostata, z.T. multifokal im Sinne von unterschiedlichen Tumorklonen. Als frühester histologischer Vorläufer des PCa ist die prostatistische intraepitheliale Neoplasie (PIN) anerkannt. Diese kann – muss aber nicht – bei der Entstehung eines lokal-invasiven PCa vorkommen. Schließlich kommt es zur Lymphknoten- und Fernmetastasierung. Im Laufe der Tumorprogression entwickelt das zunächst mit vermehrter Apoptose und Wachstumsstopp auf Androgenentzug reagierende PCa seine Androgenunabhängigkeit.

Das PCa kann in drei Formen eingeteilt werden<sup>41</sup>: Als sporadische PCa werden solche bezeichnet, bei denen die Familienanamnese für PCa leer ist. Beim familiären PCa liegt eine weitere PCa-Erkrankung in der Familie vor. Das hereditäre PCa bildet einen

Spezialfall des familiären PCa mit  $\geq 3$  Fällen in einer Familie,  $\geq 2$  Fällen unter 55 Jahre oder PCa in drei aufeinanderfolgenden Generationen. Um den oben beschriebenen mikro- und makroskopischen Vorgängen molekulare Veränderungen zuordnen zu können, wurden vor allem diese hereditären PCa auf bestimmte Empfänglichkeitsgene (Prostatakarzinomgene) hin untersucht. Dabei wurden beispielsweise mit HPC1/RNASEL<sup>42</sup>, PCAP<sup>43</sup>, HPC2/ELAC2<sup>44</sup> und CHEK2<sup>45</sup> mehrere solcher Gene gefunden. Diese kommen zwar auch im sporadischen PCa vor, jedoch nur in einem verhältnismäßig geringen Anteil und erklären deren Entstehung damit nur unzureichend.<sup>46</sup> Als weitere Risikofaktoren für die Entwicklung eines PCa wurden Vitamin-D- und Androgen-Rezeptor-Polymorphismen<sup>47</sup> und der GSTP1-Verlust<sup>48</sup> gefunden. In frühen Stadien scheinen auch Veränderungen des WNT-Signaltransduktionsweges eine Rolle zu spielen.<sup>49</sup> Für einige Tumorsuppressorgene wie PTEN, p27<sup>Kip1</sup>, p53, oder NKX3.1 wurde deren Verlust oder zumindest der Verlust ihrer Heterozygotie (engl. loss of heterocycosity) als wichtiger Schritt in der Tumorprogression oder als Risikofaktor beschrieben.<sup>50-53</sup> Meist im späteren Verlauf des PCa kommt es zu chromosomalen Aberrationen (Polyploidie, Deletionen) und schließlich zur Aktivierung von Onkogenen wie MYC, EGFR/ErbB und BCL2.<sup>54-58</sup> Mittlerweile wurde auch eine Genfusion (vergleichbar mit der Genfusion BCR-ABL1 bei der chronischen myeloischen Leukämie) beim PCa gefunden. Das TMPRSS2-ETS-Fusionsgen führt mit seiner Aktivierung zur vermehrten Invasion und Änderungen im Bezug auf die Zelladhäsion.<sup>59</sup> Die Angaben zur Häufigkeit des Auftretens dieses Fusionsgens schwanken in verschiedenen Kollektiven allerdings erheblich.

Trotz all dieser Entdeckungen bleibt der Mechanismus der Karzinogenese des PCa im Hinblick auf die chronologischen und kausalen Zusammenhänge der aufgeführten Veränderungen weiter unklar und keiner der aufgeführten molekularen Marker eignet sich bislang als unabhängiger Prognosefaktor. Abbildung 1 (S. 11) gibt eine Übersicht über die molekularen Veränderungen im PCa.

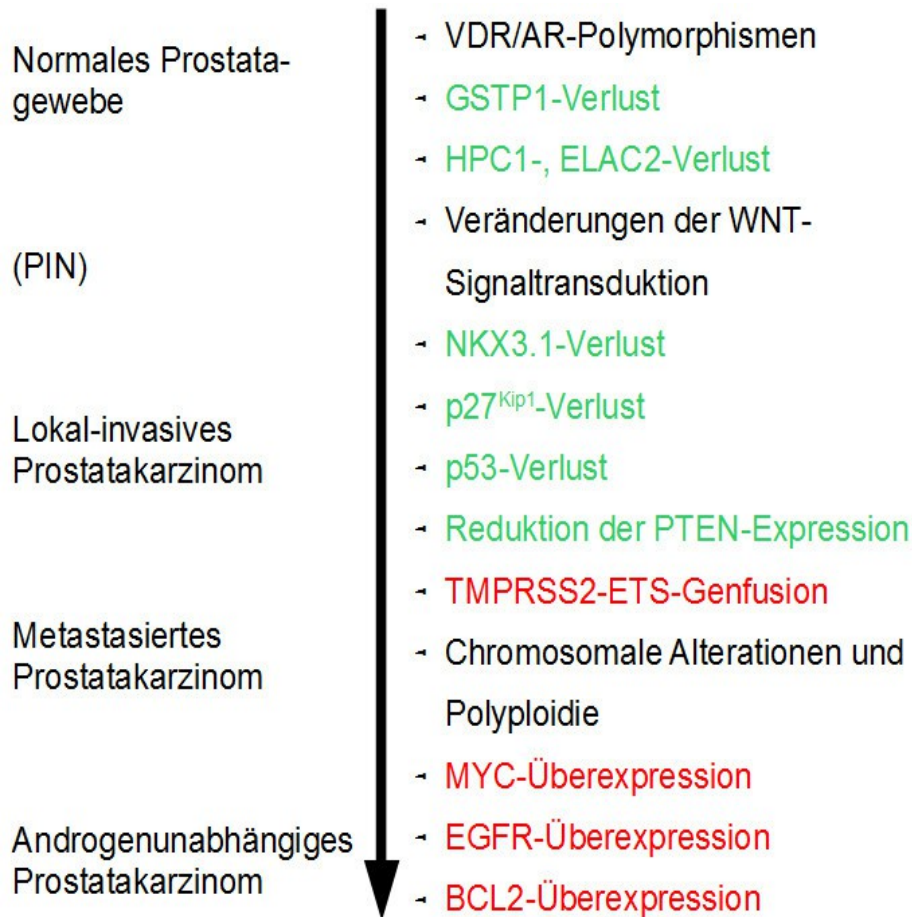


Abbildung 1: Molekulare Veränderungen im Prostatakarzinom im Laufe seiner Initiation und Progression. PIN: prostatistische intraepitheliale Neoplasie, **rot:** (Proto-) Onkogen, **grün:** Tumorsuppressor. VDR/AR: Vitamin-D- und Androgen-Rezeptor

## 1.2 MicroRNA (miRNA)

MicroRNA sind endogene, evolutionär konservierte und nicht-kodierende RNAs von ca. 22 Nukleotiden Länge, die 1993 von Lee et al in *Caenorhabditis elegans* entdeckt wurden.<sup>60</sup> Sie regulieren die Genexpression negativ auf posttranskriptioneller Ebene und könnten so einen Einfluss auf die Expression von schätzungsweise 30% der menschlichen Gene haben.<sup>61</sup> Dadurch spielen sie eine wichtige Rolle in vielen Bereichen der Zellbiologie u.A. in Stoffwechsel<sup>62</sup>, Immunität<sup>63</sup>, Entwicklung<sup>64</sup>, Zelldifferenzierung und Zellzyklus<sup>65</sup>. Ihre Erforschung könnte daher wesentlich zum Verständnis verschiedener Krankheiten beitragen – insbesondere der Tumorgenese<sup>66-67</sup>.

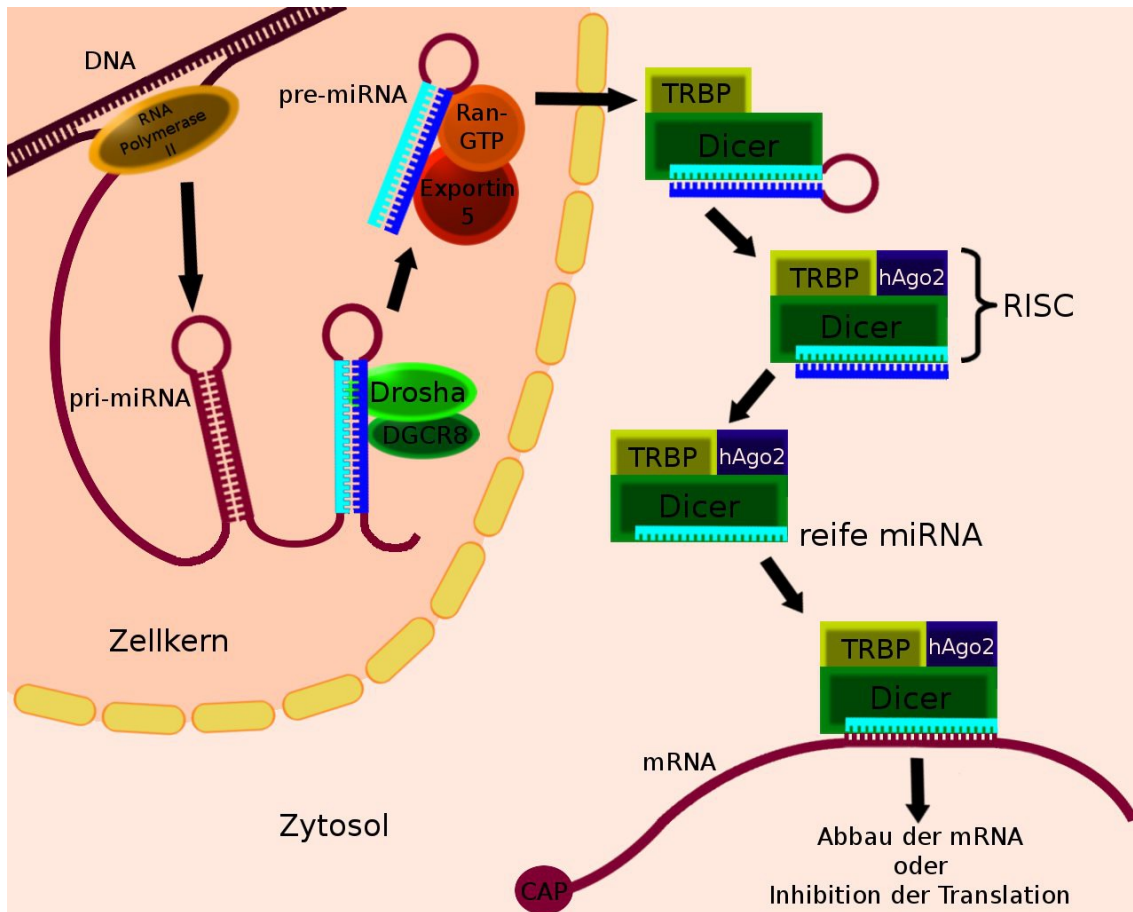


Abbildung 2: Übersicht über die Biogenese von miRNA. *pri-miRNA*: primäre miRNA, *pre-miRNA*: Vorläufer-miRNA, *DGCR8*: DiGeorge syndrome critical region gene 8, *TRBP*: transactivating response RNA binding protein, *hAgo2*: human argonaute protein 2. *CAP*: stabilisierende Cap-Struktur der mRNA. Für weitere Erklärungen siehe Text.

Mit der Veröffentlichung der 19. Version (Release 19) der MicroRNA-Datenbank mirbase.org im August 2012 wurden 21264 miRNAs gelistet, davon 2042 für den Menschen.<sup>68-71</sup> Die Erlangung weiterer Erkenntnisse auf dem Gebiet der miRNA soll in der Zukunft zur Verbesserung von Diagnostik und Therapie einzelner Erkrankungen beitragen.

### 1.2.1 Biogenese der miRNA

Die RNA Polymerase II transkribiert im Zellkern Gene, die bestimmte miRNA kodieren.<sup>72</sup> Das Transkriptionsprodukt ist ein Polynukleotid mit autokomplementären

Bereichen, die sich aneinanderlagern und so eine oder mehrere sog. Haarnadel-Strukturen (auch: Hairpin-Strukturen) bilden, und als primäre miRNA (pri-miRNA) bezeichnet wird.<sup>72</sup> Ein Proteinkomplex bestehend aus Drosha, einer RNase-3-Endonuklease, und dem ds-RNA bindenden Protein DGCR8 (auch Pasha genannt) schneidet das Doppelstrangstück (Haarnadel) heraus, welches nun pre-miRNA (precursor-miRNA, Vorläufer-miRNA) wird.<sup>73-75</sup> Diese pre-miRNA wird anschließend über Exportin 5 und den Kofaktor Ran-GTP aus dem Zellkern in das Zytosol transportiert<sup>76</sup>. Hier entfernt ein zytoplasmatischer Enzymkomplex aus Dicer, einer weiteren RNase-3-Endonuklease, und transactivating response RNA binding protein (TRBP) weitere Nukleotide, so dass eine dsRNA mit überhängendem 3'-Ende entsteht.<sup>77-79</sup> Zusammen mit dem human argonaute protein hAgo2 (EIF2C2) bilden Dicer und TRBP den RNA induced silencing complex (RISC).<sup>80</sup> An der Bildung von RISC sind noch weitere Proteine beteiligt, deren Assoziationsreihenfolge und Funktionen aber noch unklar sind.<sup>81</sup> Der sog. Passagierstrang der dsRNA wird entfernt und abgebaut und die reife miRNA bleibt zurück.<sup>77, 80, 82</sup> In den RISC kann nun mRNA gebunden werden, die zur reifen miRNA komplementär ist. Abhängig vom Grad der Komplementarität wird entweder der Abbau der gebundenen mRNA durch Entfernung des Poly-A-Schwanzes beschleunigt (hoch komplementär) oder deren Translation gehemmt (niedrig komplementär).<sup>77, 80, 82</sup> Ersteres ist häufig bei Pflanzen der Fall und weniger bei Säugetieren, während Letzteres in Säugetieren häufiger vorkommt.<sup>83-85</sup> Der genaue Mechanismus der Translationsinhibition ist noch nicht geklärt, als sicher gilt aber, dass die miRNA in Säugern vor allem in der 3'UTR (untranslated region, nicht translatierte Region am 3'-Ende) bindet, und dass nicht nur eine miRNA, sondern mehrere miRNAs (mit z.T. unterschiedlicher Basensequenz) hier binden müssen, um die Translation inhibieren zu können.<sup>81, 86</sup> Abbildung 2 (S. 12) gibt eine Übersicht über die Entstehung von miRNA.

### **1.2.2 Nomenklatur der miRNA**

Einzelne miRNAs werden benannt durch die Zusammensetzung des Präfixes "miR" mit einer Identifikationsnummer, z.B. miR-21.<sup>87</sup> Identische oder fast identische Orthologe werden mit derselben Nummer benannt. So unterscheidet sich miR-1 bei *Drosophila*

melanogaster nur in einem Nukleotid von miR-1 beim Menschen.<sup>87</sup> In der vorliegenden Arbeit wird zur Verdeutlichung der Zugehörigkeit zur jeweiligen Spezies ein Kürzel von drei Buchstaben vorangestellt, "hsa" für homo sapiens, "mmu" für mus musculus und "rno" für rattus norvegicus, so dass sich beispielsweise die Schreibweise "hsa-miR-221" ergibt. Wo kein solches Kürzel angegeben ist, kann von der Zugehörigkeit zur Spezies homo sapiens ausgegangen werden. Auch innerhalb einer Spezies wird identischen oder sehr ähnlichen miRNA-Sequenzen dieselbe Nummer zugeordnet. Zur weiteren Unterscheidung wird hier ein Suffix angehängt, das je nach Spezies eine Zahl oder ein Buchstabe sein kann, also z.B. hsa-miR-125b. Wenn bei zwei miRNAs aus derselben pre-miRNA klar ist, welche die vorherrschende reife miRNA ist und welche dieser nur in der Haarnadelstruktur als Passagierstrang gegenüberliegt, dann bleibt die Bezeichnung der vorherrschenden reifen miRNA bestehen (z.B. miR-56) und der gegenüberliegenden wird ein Stern zugeordnet (z.B. miR-56\*). Wenn eine derartige Zuordnung aufgrund der Datenlage nicht eindeutig möglich ist, so wird zur eindeutigen Identifizierung der miRNAs "-5p" bzw. "-3p" angehängt, um die Lage der miRNA in Bezug auf das 5'- bzw. 3'-Ende der pre-miRNA zu beschreiben. So ergeben sich Schreibweisen wie "miR-142-5p" (näher am 5'-Ende) und "miR-142-3p" (näher am 3'-Ende).<sup>87</sup>

### **1.2.3 Bedeutung der miRNA in der Tumorgenese**

Für die Tumorgenese spielen sechs Aspekte eine zentrale Rolle<sup>88</sup>: Überwinden des programmierten Zelltodes, Unabhängigkeit von Wachstumsfaktoren, Insensitivität gegenüber wachstumshemmenden Faktoren, grenzenloses Replikationspotential der Tumorzellen, andauernde Nährstoffversorgung (durch Angiogenese) und Fähigkeit zur Invasion und Metastasierung. Da ca. 30% der menschlichen Gene in ihrer Expression von miRNAs beeinflusst werden, war bereits früh klar, dass miRNAs auch in entsprechende molekulare Mechanismen der Tumorgenese involviert sind.<sup>61</sup> In *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans* wurde gezeigt, dass einige miRNAs in zugehörige Signaltransduktionswege regulatorisch eingreifen, so z.B. für lin-4, miR-2/6/11/13/308 und für miR-14.<sup>60, 89-90</sup> In vielen Untersuchungen wurden miRNA-Expressionsprofile von verschiedenen Tumoren angefertigt, die belegten, dass



die miRNA-Expression in den entsprechenden Tumoren dysreguliert ist.<sup>91</sup> Zwar mag dies in vielen Fällen nicht in kausalem Zusammenhang mit der Tumorgenese oder -progression stehen.<sup>91</sup> Doch die Tatsache, dass sich ca. 50% der miRNA-Gene an sog. "fragile sites" oder an tumorassoziierten Genloci befinden, legt eine wirklich aktive Rolle der miRNAs in der Tumorentstehung nahe.<sup>92</sup>

#### **1.2.4 Onkomirs – miRNAs als Onkogene oder Tumorsuppressoren**

Mittlerweile ist gesichert, dass einige miRNAs eine Funktion als Tumorsuppressor oder als Onkogen einnehmen. Diese miRNAs werden dann Onkomirs (engl. oncomir) genannt.<sup>93</sup>

Als Tumorgene werden Gene bezeichnet, deren Produkte einen Effekt auf die normale Zellproliferation, die Gewebedifferenzierung oder die Apoptose haben. Ist dieser Effekt positiv im Sinne von gesteigerter Proliferation, gesteigerter Entdifferenzierung oder längerem Überleben durch geringere Apoptoserate, so spricht man von einem (Proto-) Onkogen. Ist er negativ, nennt man es Tumorsuppressorgen. Dabei sind diese Gene Teil eines komplexen Netzwerks inter- und intrazellulärer Kommunikationsprozesse und kodieren beispielsweise Hormone, Wachstumsfaktoren, deren Rezeptoren, Zelladhäsionsmoleküle, intrazytoplasmatische Signalmediatoren oder intranukleäre Regulatoren von Transkription und Zellzyklus.<sup>94-95</sup>

Gleiches gilt für die Benennung von miRNAs: Wenn nun eine miRNA *hoch exprimiert* wird und einen für das Tumorgewebe positiven Effekt (s.o.) hat, dann erfüllt sie damit die Definition eines Onkogens. Ihre vermehrte Expression führt zu mehr Zellproliferation, Entdifferenzierung oder längerem Überleben der Zelle. Ein Beispiel einer solchen Onkomir ist miR-21. Sie ist in einer Vielzahl von Tumorentitäten heraufreguliert.<sup>67</sup> Es wurde nachgewiesen, dass miR-21 in Glioblastomzellen die Apoptose blockiert, und dass ihre Inhibition in Tumorzelllinien (Leber, Glioblastom und Brustkrebs) zur Aktivierung von Caspasen und damit Apoptoseinduktion führt.<sup>96-98</sup> Als mögliche Zielgene für miR-21 sind hierbei das phosphatase and tensin homolog (PTEN)<sup>98</sup>, tropomyosin 1 (TPM1)<sup>99</sup> und programmed cell death 4 (PDCD4) nachgewiesen.<sup>97</sup>

Ist die *niedrige* Expression einer miRNA mit einem für das Tumorgewebe positiven Effekt (s.o.) verbunden, dann ist diese miRNA definitionsgemäß eine tumorsuppressorische miRNA. Beispielsweise inhibieren miRNAs der miR-let-7-Familie mRNAs bekannter Onkogene wie Ras<sup>100-101</sup>, c-myc<sup>102</sup> und HMGA2<sup>103</sup> und verhindern so bei niedriger Expression Apoptose und Zellzyklusarrest in Kolonkarzinom-, Bronchialkarzinom- und Burkittlymphomzelllinien.<sup>100, 102-103</sup>

Ein weiteres Beispiel für die Rolle von miRNAs als Tumorsuppressoren ist das miR-15/miR-16-1-Cluster. Es ist in bestimmten Subgruppen von chronisch lymphatischer Leukämie herunterreguliert (deletiert) im Vergleich zur Expression in gesunden CD5+ B-Zellen.<sup>104</sup> Das antiapoptotisch wirksame BCL-2 ist ein Zielgen des genannten Clusters und wird durch niedrige Expression des miR-15/miR-16-1-Clusters enthemmt, so dass die Apoptoserate verringert wird.<sup>105</sup>

### **1.2.5 Bedeutung der miRNA in Diagnostik und Prognose von Tumoren**

Mit der Möglichkeit, die Expressionsniveaus einer großen Anzahl von miRNAs in Proben unterschiedlicher Tumore zu untersuchen, konnten miRNA-Expressionsprofile gefunden werden, die zwischen Normalgewebe und Tumorgewebe zuverlässig unterscheiden können.<sup>66</sup> Klinische Anwendung zur Diagnose könnte zum Beispiel beim duktalem Adenokarzinom des Pankreas erfolgen: Mit den miRNAs miR-217 und miR-196a kann in Feinnadelaspirationsbiopsien Tumorgewebe nachgewiesen und von entzündlichen Veränderungen abgegrenzt werden.<sup>106</sup>

Darüber hinaus weisen einige Tumore bestimmte miRNA-Expressionsprofile auf, die mit der Prognose der Patienten assoziiert sind. Dies wurde beispielsweise für die chronisch-lymphatische Leukämie und das Kolonkarzinom gezeigt.<sup>107-108</sup> Auch einzelne miRNAs gewinnen als prognostische Marker an Bedeutung: Hohe Expression von miR-21 im Tumorgewebe ist unabhängig von anderen Faktoren assoziiert mit kurzer Überlebenszeit und schlechtem therapeutischem Outcome beim Kolonkarzinom.<sup>107</sup> In Patienten mit Bronchialkarzinom sind niedrige Expressionsniveaus von miR-let-7a mit kurzem postoperativem Überleben assoziiert.<sup>109-110</sup> Verschiedene miRNAs können also Tumore auf molekularer Ebene klassifizieren.

### 1.2.6 Bedeutung der miRNA im Prostatakarzinom

Gene mit einer Rolle in der Entstehung oder Progression des PCa sind zwar bekannt. Ihre Erforschung hat jedoch bisher nicht die erhofften Konsequenzen für den klinischen Alltag als mögliche molekulare Biomarker gebracht (s. Abschnitt 1.1.7, S. 9). Erste Untersuchungen lassen bereits hoffen, dass verschiedene miRNAs eine Möglichkeit bieten als mögliche Biomarker im PCa zu dienen.

Dass Androgene eine herausragende Rolle im PCa spielen ist schon seit langem bekannt. Der Signaltransduktionsweg des Androgenrezeptors (AR) ist derzeit der am besten erforschte im PCa.<sup>111</sup> Die miR-125b-Expression ist abhängig von Androgenen und wahrscheinlich Teil der Signaltransduktion des AR.<sup>112</sup> In den meisten Studien wird eine Herunterregulation von miR-125b im PCa gefunden und als Zielgen ist BAK1, ein proapoptotischer Faktor, bekannt.<sup>112-114</sup>

Für eine weitere miRNA, miR-16, ist im PCa das Zielgen BCL-2 bekannt und die in zwei Studien beobachtete Herunterregulation von miR-16 führt zur Überexpression von BCL-2.<sup>105, 114-116</sup> Werden miR-16-Spiegel in LNCaP-Zellen artifiziell wiederhergestellt, so führt dies zu vermehrter Apoptose und Wachstumsstop.<sup>115</sup>

In mehreren Studien wurde miR-221 in Prostataktomiepräparaten als herunterreguliert gefunden.<sup>113-114, 116-119</sup> Als Zielgen wird p27<sup>Kip1</sup> diskutiert<sup>120</sup>, und eine negative Korrelation von miR-221 mit der Expression des Protoonkogens c-Kit wurde gefunden.<sup>119</sup> Tabelle 5 (S. 18) gibt eine Zusammenfassung über miRNAs mit einer Rolle im PCa und deren Zielgene.

Für mehrere miRNAs sind somit Wechselwirkungen mit im Prostatakarzinom bekannten (Proto-) Onkogenen oder Tumorsuppressorgenen nachgewiesen. Trotz dieser Erkenntnisse ist bisher jedoch keine miRNA in der klinischen Anwendung, die den Verlauf des Prostatakarzinoms mit ausreichender Sicherheit vorhersagen kann.

miRNA	Zielgen	Referenz
miR-16	BCL2	105
miR-101	EZH2	121
miR-449	HDAC1	122
miR-34	SIRT1	123
miR-146	ROCK1	124
miR-221 <sup>+</sup>	p27 <sup>Kip1</sup> c-kit	119, 125
miR-125b <sup>+</sup>	BAK1	112
let-7-Familie	EZH2 RAS HMGA2	101, 103, 126

*Tabelle 5: miRNAs mit einer Rolle im Prostatakarzinom und ihre nachgewiesenen Zielgene. <sup>+</sup>=Auswahl*

### 1.3 Fragestellung der Arbeit

Der Krankheitsverlauf des Prostatakarzinoms kann sehr variabel sein. Dies erschwert klinische Entscheidungen erheblich, da eine optimale Behandlung aufgrund eines Mangels an zuverlässigen Prognosemarkern schwer möglich ist. MiRNAs haben nachweislich eine wichtige Rolle in der Regulation der Genexpression und könnten daher als molekulare Prognosemarker für das Prostatakarzinom dienen.

Die in dieser Arbeit untersuchten PCa-Proben wurden aus einem Hochrisikokollektiv entnommen. Eine zusätzliche Selektion der Proben geschah nach dem Gleason-Score und dem klinischen Verlauf: die eine Gruppe, ca. die Hälfte der verwendeten PCa-Proben, wies einen Gleason-Score von 10 auf, während die andere Hälfte einen Gleason-Score  $<8$  hatte. Entsprechend unterschied sich der klinische Verlauf der beiden Gruppen (z.B. in der Dauer des progressionsfreien Überlebens).

Mit Hilfe aller Proben des Hochrisiko-Kollektivs sollen zunächst mögliche Unterschiede in der miRNA-Expression im Vergleich zu nicht tumorösem Kontrollgewebe (benignes Hyperplasiegewebe) gefunden werden und weiterführend durch den Vergleich der beiden PCa-Gruppen mit unterschiedlichem klinischen Verlauf prognostisch relevante miRNA identifiziert werden.

Aufgrund der analysierten miRNA-Expressionsprofile sollen mögliche Zielgene einzelner HR-PCa-spezifischer miRNAs mittels Datenbanksuche vorhergesagt und diskutiert werden.

Vor diesem Hintergrund sollen somit folgende Fragen im Rahmen der Arbeit untersucht werden:

- Kann zwischen malignem und benignem Prostatagewebe mit Hilfe eines globalen miRNA-Expressionsprofiles unterschieden werden? Welche spezifischen miRNAs sind im Hochrisiko-Prostatakarzinom (HR-PCa) dabei aberrant exprimiert?

- Kann zwischen prognostisch relevanten Untergruppen des PCa mit Hilfe eines miRNA-Expressionsprofils unterschieden werden? Durch welche miRNAs wird dieses Profil charakterisiert?
- Welche relevanten Zielgene der identifizierten miRNAs können vorhergesagt werden?

Mit Hilfe dieser Untersuchungen sollen Grundlagen geschaffen werden, um das Potential von miRNAs als Prognosefaktoren für das PCa zu evaluieren.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Name	Hersteller
Array Slides	NexterionR HiSens E	Schott
Reaktionsgefäße	Eppendorf Tubes	Eppendorf
Deckgläschen	GasketSlides G2534	Agilent Technologies
Exsikkator	Exsikkator EX06	Hartenstein (Verteiber)
Fraktionator	flashPAGETM Fractionator	Ambion
Heizbank	HBT130	HLC Biotech
Hybridisierungskammer	Hybridization Chamber G2534A	Agilent Technologies
Hybridisierungsöfen	Hybridization Oven G2545A	Agilent Technologies
Microarrayscanner	ScanArray 4000	Packard Bioscience – BioChip Technologies
Mikrotom	keiner	Leitz
Photometer	SmartSpecTM plus	BIORAD
Photometerküvette	UV-Küvette Ultravette	Carl Roth GmbH
Pipetten	Transferpette	BRAND
Pipettenspitzen	Filtertips	Biosphere
qRT-PCR	Opticon2	Biozym
qRT-PCR Strips	PCR-Softstrips, farblos	Biozym
Spotter	keiner	Genpak
Thermocycler	Primus 96 Plus	MWG-Biotech
Thermocycler Strips	ThinWall 8-Tube Strip weiß RT	Biozym
Tubes	Collection Tubes	Quiagen GmbH
Vakuumzentrifuge	Speed Vac SC110	Savant
Refrigerated Vapor Trap	RVT100	Savant
Vakuumpumpe	VP100	Savant
Vortex	Vortex Mixer	neoLab
Zentrifuge	Centrifuge 5415D	Eppendorf

*Tabelle 6: Geräte und Verbrauchsmaterialien.*

## 2.2 Chemikalien

Bezeichnung	Name	Hersteller
Betaine	B2754	Sigma
Cy3 Dye	Cy3 Post-Labeling Reactive Dye	GE Healthcare
DMSO	Dimethylsulfoxid	AppliChem
Ethanol	Ethanol	Apotheke des Klinikums der Universität Würzburg
Ethanolamin	Ethanolamin	Fluka
HPLC-Wasser	HPLC-Wasser	Hartenstein
Nuclease-freies Wasser	Nuclease-free Water	Ambion
Rnase Dekontaminationslösung	Rnase-Zap	Ambion
Rnase Dekontaminationslösung für Elektroden	ElectroZap Electrode Decontamination Solution	Ambion
Roti-Histol	Roti-Histol	Carl Roth GmbH
SDS	Sodium Dodecylsulfat	Serva
SSC	Standard Saline Citrate	Sigma/Merck
Tris	Trizmahydrochlorid	Sigma

*Tabelle 7: Verwendete Chemikalien, die nicht in den verwendeten Kits enthalten waren.*

## 2.3 Primer und Sonden

In den Microarrayuntersuchungen wurden die 662 Sonden aus dem *mirVana*<sup>TM</sup> miRNA Probe Set V2 der Firma Ambion benutzt. Hierbei sind 328 Sonden für miRNAs des Menschen (hsa), 114 für miRNAs der Maus (mmu), 46 für miRNAs der Ratte (rno), 152 ambi-miRs und 22 Kontrollen. Eine vollständige Liste der Sonden mit deren genauer Bezeichnung sowie deren genauer Sequenz kann online unter [www.ambion.com/techlib/resources/miRNA\\_array/Ambion\\_probes\\_1564V2\\_Oct06.xls](http://www.ambion.com/techlib/resources/miRNA_array/Ambion_probes_1564V2_Oct06.xls) eingesehen werden.



Name	Target Sequenz
hsa-let-7a	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU
hsa-let-7b	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU
hsa-miR-125b	UCCCUAGAGACCCUAACUUGUGA
hsa-miR-126	UCGUACCGUGAGUAAUAAUGC
hsa-miR-16	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG
hsa-miR-221	AGCUACAUUGUCUGCUGGGUUUC
hsa-miR-29a	UAGCACCAUCUGAAAUCGGUU
hsa-miR-422a	CUGGACUUAGGGUCAGAAGGCC
RNU6B	CGCAAGGAUGACACGCAAAUUCGUGAAGCGUCCAUUUUUU

*Tabelle 8: Primer aus der Reihe TaqManR MicroRNA Assay der Firma Ambion, die in den qRT-PCR Untersuchungen benutzt wurden.*

## 2.4 Kits

Name	Hersteller
mirVanaTM miRNA Probe Set (Probe Set 1564V2)	Ambion
mirVanaTM miRNA Labeling Kit	Ambion
flashPAGETM Buffer Kit	Ambion
flashPAGETM Pre-cast Gel	Ambion
flashPAGETM Reaction Clean-Up Kit	Ambion
TaqManR MicroRNA Assay	Ambion
TaqManR MicroRNA Reverse Transcription Kit	Ambion
TaqManR Universal PCR Master Mix	Ambion
RecoverAllTM Total Nucleic Acid Isolation Kit	Ambion

*Tabelle 9: Verwendete Kits.*

## 2.5 Software

Name	Hersteller
ScanAlyze Ver. 2.50	© Michael Eisen, Lawrence Berkeley National Lab, California, USA
R Version 2.3.1	© The R Foundation for Statistical Computing
Open.Office.org Version 3.1.1	© Sun Microsystems
GIMP 2.4.5 (GNU Image Manipulation Program)	© Spencer Kimball, Peter Mattis und das GIMP-Entwicklerteam
EndNote X3	© Thomson Reuters

*Tabelle 10: Im Rahmen der Arbeit benutzte Software.*

## 2.6 Prostatakarzinom- und Prostatahyperplasiematerial

### 2.6.1 Herkunft der Proben

Alle PCa-Proben stammen aus Formalin-fixiertem und in Paraffin eingebettetem (FFPE-) Material, das im Zeitraum von 1989 bis 2005 in der Urologischen Klinik des Städtischen Krankenhauses Karlsruhe durch radikale Prostatektomie gewonnen wurde (s. Tabelle 14, S. 37). Die Proben wurden von Prof. Dr. med. Martin Spahn zur Verfügung gestellt. Die benignen Prostatahyperplasien (BPH-Proben, Referenzgewebe, „Kontrollgewebe“) wurden durch Adenomektomie an der Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie der Universität Würzburg gewonnen. Die Studie wurde von der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg geprüft und genehmigt (59/04). Von allen Patienten lag eine schriftliche Einverständniserklärung vor.

### 2.6.2 Klinisch-pathologische Eigenschaften der Proben

Eine Fernmetastasierung wurde mit einer Skelettszintigraphie ausgeschlossen. Der präoperative PSA-Wert betrug bei allen Patienten  $>20$  ng/ml. Patienten mit bioptisch gesichertem PCa wurden mit einer radikalen Prostatektomie und einer pelvinen Lymphadenektomie behandelt. Die Lymphknoten- und Prostatektomiepräparate bekamen ein Staging nach der TNM-Klassifikation von 2002 und ein Grading nach

Gleason durch einen Facharzt für Pathologie. Bei Adenomektomie wurde ein PCa histologisch ausgeschlossen. Kein Patient erhielt eine neoadjuvante Strahlen-, Chemo- oder Hormontherapie. Die Nachuntersuchung beinhaltete DRU, TRUS und Bestimmung des Serum-PSA. Sie wurde in den ersten beiden Jahren alle drei Monate, in den folgenden drei Jahren alle 6 Monate und danach einmal jährlich durchgeführt. PSA-Progression wurde definiert als  $PSA \geq 0,2\text{ng/ml}$  an zwei aufeinanderfolgenden Nachuntersuchungsterminen. Ein histologisch nachgewiesenes Lokalrezidiv oder eine mit Computertomographie oder Skelettszintigraphie nachgewiesene Fernmetastasierung wurde als klinische Progression definiert. Das PCa-spezifische Überleben entspricht dem Zeitraum von der radikalen Prostatektomie bis zum prostatakarzinomassoziierten Tod des Patienten (s. Tab. 13 u. 14, S. 36 u. 37).

## **2.7 Gewinnung der RNA und miRNA aus FFPE-Material**

Die Gewinnung der gesamt RNA und miRNA aus dem FFPE Material der einzelnen BPH und PCa geschah sowohl für den RNA Microarray als auch für die qRT-PCR auf dieselbe Weise. Die Paraffinblöcke mit den Proben wurden zunächst nach Maß eines mikroskopisch beurteilten histologischen Schnittes so zurechtgeschnitten, dass die neoplastische Zellularität eines Schnittes  $>90\%$  war ( $>80\%$  adenoides Gewebe bei BPH). Mit dem Mikrotom wurden sodann zwei  $40\ \mu\text{m}$  dicke Schnitte angefertigt. Danach wurde die RNA mit dem RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit der Firma Ambion<sup>R</sup> wie folgt extrahiert: Zur Deparaffinisierung wurden die beiden Scheiben zunächst für 5 min homogenisiert und dann in einem Zentrifugenreaktionsgefäß mit 1 ml Roti-Histol (statt Xylene) auf dem Vortex gemischt und für 3 min bei  $50^\circ\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurde bei Raumtemperatur und Maximalgeschwindigkeit für 2 min zentrifugiert und dann das Roti-Histol verworfen ohne das Pellet zu berühren. Nun wurde 1 ml 100%iger Ethanol hinzugefügt, kurz gevortext, bei Raumtemperatur und Maximalgeschwindigkeit für 2 min zentrifugiert und der Ethanol abpipettiert und verworfen. Diese Waschung mit Ethanol wurde nochmals wiederholt und anschließend nach einer weiteren Zentrifugation möglichst der gesamte Alkohol entfernt. Jetzt trocknete das Pellet für 10-15 min an der Luft. Nun schloss sich der Proteaseverdau an. Hierbei wurden dem Pellet  $400\ \mu\text{l}$  Verdauopuffer und  $4\ \mu\text{l}$  Protease zugesetzt und das

Reaktionsgefäß vorsichtig geschüttelt. Nach kurzem Abzentrifugieren wurde nun bei 50°C für 3 h inkubiert. Hier begann die eigentliche Extraktion der RNA mit dem Hinzufügen von 480 µl Isolationsadditiv und kurzem Vortexen. Anschließend wurden 1,1 ml 100% Ethanol hinzupipettiert und die Probe auf zwei Aliquots à 550 µl verteilt und jeweils vorsichtig gemischt. Von beiden Aliquots wurde nun 700 µl auf je einen Filter auf einen Sammelreaktionsgefäß gegeben und bei 10.000 g für 20-60 sek zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Prozedur so lange wiederholt bis die gesamte Probe filtriert war. Von der Lösung "Wash 1" wurden 700 µl auf den Filter gegeben und bei 10.000 g für 30 sek filtriert. Der Durchfluss wurde verworfen. Nun wurde mit 500 µl der Lösung "Wash 2/3" in der gleichen Weise verfahren und nochmals zentrifugiert, um restliche Flüssigkeit aus dem Filter zu entfernen. Von einem Reaktionsgemisch aus 6 µl 10x DNase Puffer, 4 µl DNase und 50 µl nukleasefreiem Wasser pro Reaktion wurden 60 µl auf die Mitte des Filters gegeben und bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert. Die Waschungen mit "Wash 1" und "Wash 2/3" wurden wie oben wiederholt und danach durch Zentrifugation bei 10.000 g für 1 min die restliche Flüssigkeit aus dem Filter entfernt. Zur Elution der RNA wurde der Filter auf ein neues Sammelreaktionsgefäß gesetzt, und 30 µl 95°C heißes nukleasefreies Wasser wurde auf die Mitte des Filters gegeben. Die Probe ruhte dann für 1 min bei Raumtemperatur und wurde für 1 min bei Maximalgeschwindigkeit zentrifugiert. Die Prozedur der Elution wurde mit weiteren 30 µl (95°C) wiederholt. Es standen nun etwa 60 µl RNA-Lösung zur Verfügung. Die Menge an gewonnener gesamt RNA wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm an einer Verdünnung von 1:100 gemessen. Gleichzeitig wurde der Quotient aus der Absorption bei 260 nm und 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) bestimmt. Dieser lag zwischen im Mittel bei 1,62. Für den Quotienten  $A_{260}/A_{230}$  lag der Mittelwert bei 1,40. Für die folgenden Untersuchungen mittels qRT-PCR wurden Aliquots der jeweiligen Proben zu einer Konzentration von 10 ng gesamt-RNA/µl verdünnt. Um in den Microarrayuntersuchungen verwendet werden zu können, wurde die miRNA aus der gesamt RNA aufgereinigt (siehe folgende Abschnitte). Die Lagerung der gesamt RNA erfolgte bei -20°C.

Die Gewinnung der miRNA aus der gesamt RNA geschah mit dem flashPAGE™ Fractionator der Firma Ambion®. Dieser trennt mittels Gelelektrophorese alle RNA  $\leq 40$

nt von der restlichen RNA. Zur Vorbereitung wurde die untere Pufferkammer mit 1 ml ElectroZap Elektrodendekontaminationslösung und dann zweimal mit je 1 ml nukleasefreiem Wasser gespült. Die untere Pufferkammer wurde mit 260 µl FlashPAGE Lower Running Buffer beladen. Darauf wurde ein flashPAGE Pre-cast Gel gesetzt. In diese Kammer wurde 250 µl des Upper Running Buffer gegeben. Zur gesamt RNA von 15 µg (in einem Maximalvolumen von 50 µl) wurde das gleiche Volumen flashPAGE Gel Loading Buffer gegeben (Maximales Gesamtvolumen 100 µl), dies dann für 2 min bei 95°C inkubiert und danach sofort auf Eis gesetzt. Die Mischung aus RNA und Loading Buffer wurde nun auf den Upper Running Buffer pipettiert. Der Fractionator wurde geschlossen und eine Spannung von 75 - 80 V wurde eingestellt. Wenn nach etwa 12 min die blaue Farbe aus dem Gel lief (mit ihr laufen die 40 nt RNA) wurde der Fractionator geöffnet und damit der Stromkreis unterbrochen. Nun befanden sich alle Fraktionen der RNA <40 nt im Lower Running Buffer. Dieser wurde in ein neues RNase-freies Tube gegeben und dabei das Volumen gemessen (230 -240 µl). Der Fractionator wurde dann wieder wie zu Beginn gespült mit ElectroZap Elektrodendekontaminationslösung und nukleasefreiem Wasser.

Zur Extraktion der miRNA aus dem lower running buffer wurde das „flashPAGE™ Reaction Clean-Up Kit“ der Firma Ambion verwendet. Zunächst erfolgte die Anfeuchtung des Filters mit 500 µl der flashPAGE Filter Wetting Solution und Abzentrifugierung derselben bei 2500 g für 1 Minute. Zum Lower Running Buffer (enthält RNA) wurde nun 135 µl flashPAGE Filter Binding Additive gegeben, gut gemischt, anschließend 1,1 ml 100%iger Ethanol und nochmals gemischt. Diese knapp 1,5 ml der entstandenen Mischung wurden nun zu je ca. 500 µl auf den angefeuchteten Filter gegeben und bei 10000 g für 1 min zentrifugiert, der Durchfluss jeweils verworfen. Jetzt wurde 500 µl der flashPAGE Wash Solution auf den Filter gegeben und bei 10000 g für 1 min zentrifugiert, der Durchfluss verworfen. Nach nochmaliger Waschung und Zentrifugation wurde der Filter in einem Reaktionsgefäß trocken zentrifugiert. Der Filter wurde in ein neues Reaktionsgefäß eingesetzt und 15 µl 95°C heißen nukleasefreien Wassers darauf gegeben. Nach 5 min Inkubationszeit bei 60°C wurde das Eluat durch Zentrifugation bei 10000 g für 1 min im Reaktionsgefäß aufgefangen. Es folgte die Wiederholung des letzten Schrittes mit weiteren 15 µl

nukleasefreien Wassers. Falls das RNA  $\leq 40$  nt enthaltende Eluat nicht sofort weiterverwendet wurde, wurde es bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

## 2.8 miRNA-Microarray

Die Hybridisierung der miRNA-Microarrays und deren statistische Auswertung wurden im Labor für Microarray Anwendungen des IZKF (Interdisziplinäres Zentrum für Klinische Forschung) der Universität Würzburg durchgeführt. Es wurden 662 verschiedene Oligonukleotide, darunter 22 Kontrollen, 328 Oligonukleotide für miRNAs des Menschen, 114 für miRNAs der Maus, 46 für miRNAs der Ratte und 152 sog. ambi-miRs aus dem mirVana™ miRNA Probe Set (Probe Set 1564V2) von Ambion<sup>R</sup> in vierfacher Ausführung auf Schott NexterionR HiSens E gespottet. Dabei wurde folgendermaßen vorgegangen: Der Inhalt jedes Wells einer 96-well Platte wurde mit je  $10\ \mu\text{l}$   $3\times$  SSC,  $1,5\ \text{M}$  Betain resuspendiert, es resultierte eine Konzentration von  $50\ \mu\text{M}$ . Nun folgte das Drucken (Spotten) mit dem Spotter der Firma Genpak. Bis zur Hybridisierung wurden die Slides im Exsikkator aufbewahrt. Bei allen folgenden Block- bzw. Waschprozessen wurde HPLC-Wasser verwendet und alle benötigten Gefäße zuvor mit RNase-Zap ausgewischt. Um unspezifische Bindung von markierter RNA am Hintergrund zu vermeiden, wurden die Objektträger zuerst geblockt. Dafür wurden diese für 2-5 min in einer feuchten Kammer mit  $42^{\circ}\text{C}$  warmem  $0,5\times$  SSC rehydriert. Dabei lagen die Slides mit der bedruckten Seite nach unten. Anschließend wurden sie sofort auf einer  $130^{\circ}\text{C}$  heißen Platte für  $\sim 3$  sek getrocknet und im  $50^{\circ}\text{C}$  heißen, frisch angesetzten Blocking Buffer ( $1\ \text{M}$  Tris, pH 9;  $50\ \text{mM}$  Ethanolamin;  $0,1\%$  SDS) für 20 min geblockt. Dabei wurden sie alle 5 min bewegt. Danach wurden die Slides 3 mal in HPLC-Wasser gewaschen (2 mal 1 min und 1 mal für 10 sek) und schließlich für 5 min bei 800 rpm trocken zentrifugiert.

Um die miRNA anzureichern wurden RNA-Stücke mit einer Länge von kleiner als 40 Basen aus Gesamt-RNA mittels des flashPage™ Fractionator System abgetrennt. Anschließend wurden diese kurzen RNA Sequenzen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cyanin3 (Cy3) markiert, damit sie beim abschließenden Scan entsprechende Lichtsignale emittieren konnten. Dies wurde mit dem „mirVana™ miRNA Labeling Kit“ der Firma Ambion<sup>R</sup> durchgeführt. Hierbei wurde die aufgereinigte miRNA zuerst

in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und mit 3 µl nukleasefreiem Wasser resuspendiert. Darauf wurde das Poly(A) Polymerase Reaktionsgemisch gegeben bestehend aus 1 µl miRNA zur Positivkontrolle (in einer Verdünnung von 1:500 mit nukleasefreiem Wasser), 10 µl 2x Poly(A) Polymerase Reaktionspuffer, 2 µl 25mM MnCl<sub>2</sub>, 2 µl 10x Amine-NTP-Mix und 2 µl Poly(A) Polymerase. Es folgte eine Inkubation für 2 h bei 37°C. Zur Post-Tailing miRNA Aufreinigung wurde nun der Probe 10 µl miRNA Carrier und 350 µl des miRNA-Bindungs- und Waschlösungspuffer hinzugegeben und dies nach Vortexen für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Diese Mischung wurde nun auf ein miRNA Labeling Cartridge in einem Reaktionsgefäß gegeben und bei 10.000 g für etwa 10 sek zentrifugiert, bis alles durch den Filter gelaufen war. Der Durchfluss wurde verworfen. Jetzt wurde noch 2 mal 300 µl des miRNA-Bindungs- und Waschlösungspuffers auf den Filter gegeben und jeweils für 15 sek bei 10.000 g zentrifugiert. Um den Filter zu trocknen, wurde nochmals für 1 min bei 10.000 g zentrifugiert. In einem neuen Reaktionsgefäß wurde auf die miRNA Labeling Cartridge 15 µl der 95°C heißen Elutionslösung gegeben, bei 65°C für 5-10 min inkubiert, bei 10.000 g kurz zentrifugiert und dann erneut 15 µl der 95°C heißen Elutionslösung aufgegeben, bei 65°C 5-10 min inkubiert und bei 10.000 g für 1 min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde vakuumgetrocknet. Die getrocknete, geteilte und aufgereinigte miRNA wurde nun mit 7 µl nukleasefreiem Wasser resuspendiert. Der Inhalt eines Fläschchens Cy3 (40 nmol) wurde mit 16 µl DMSO resuspendiert. Davon wurden 4 µl zusammen mit 9 µl Kopplungspuffer und die 7 µl der amino-modifizierten miRNA zur Probe gegeben und nach kurzem Vortexen für 1 h im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion und Abfangen der übrigen Farbstoffmoleküle wurden 4,5 µl 4 M Hydroxylamin hinzugegeben, gevortext und im Dunkeln für 15 min inkubiert. Das Entfernen nicht gekoppelter Farbstoffe begann mit dem Hinzufügen von 350 µl miRNA Binde-/Waschlösungspuffer zur markierten miRNA. Nach kurzem Mischen wurde bei Raumtemperatur im Dunkeln für 5 min inkubiert. Die Mischung wurde auf eine miRNA Labeling Cartridge gegeben und bei 10.000 g für 15 sek zentrifugiert. Nun wurde nacheinander 2 mal 300 µl Binde-/Waschlösungspuffer auf den Filter gegeben, jeweils bei 10.000 g für 15 sek zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Der Filter wurde bei 10.000 g für 1 min trocken zentrifugiert. In einem neuen Tube

wurde 26 µl 95°C heißes nukleasefreies Wasser auf den Filter pipettiert, für 10 min bei 65°C inkubiert und schließlich für 1 min bei 10.000 g zentrifugiert. Die fluoreszenzmarkierte miRNA wurde dann innerhalb von 30 min hybridisiert.

Für die Hybridisierung wurde nun aus 163 µl 3x miRNA Hybridisierungspuffer, 307 µl nukleasefreiem Wasser (jeweils 65°C) und 26 µl der vorbereiteten miRNA-Probe der sogenannte Hybridisierungsgemisch in einem Reaktionsgefäß gemischt. Dieses wurde für 3 min bei 95°C inkubiert und anzentrifugiert. Danach wurde die Hybridisierungskammer (mit Deckglas und vorbereitetem Microarray-Glasträger), mit dem Hybridisierungsgemisch beladen, geschwenkt. Dabei wurde auf die freie Beweglichkeit der Luftblase geachtet. Die eigentliche Hybridisierung erfolgte über 17h im Hybridisierungsöfen der Firma Agilent bei 42°C und 6 rpm.

Nach der Hybridisierung wurde das Hybridisierungsgemisch in einer niedrig stringenten Waschlösung (940 ml HPLC-Wasser, 10 ml Waschmittelkonzentrat und 50 ml Salzkonzentrat) abgespült. Nach 20-30s Waschen unter kräftigem Schütteln in niedrig stringenter Waschlösung wurden die Glasträger in einen neuen Ständer überführt und 2 mal je 20-30 sek in je einem frischen Ansatz von hoch stringenter Waschlösung (995 ml HPLC-Wasser und 5 ml Salzkonzentrat) unter kräftigem Schütteln gewaschen. Danach wurden die Glasträger nochmals ganz kurz in ein frisches Gefäß mit hoch stringenter Waschlösung eingetaucht und dann für 5 min bei 800 rpm trocken zentrifugiert.

Nun wurden die Glasträger mit dem konfokalen Laserscanner ScanArray 4000 eingescannt (555 nm Exzitation, 570 nm Emission). Die Akquisition der Daten wurde mit der Software ScanAlyze Ver. 2.50 (Michael Eisen, Lawrence Berkeley National Lab, California, USA) durchgeführt.

## **2.9 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)**

Die qRT-PCR wurde im Urologischen Forschungslabor der Universitätsklinik Würzburg sowie im Forschungslabor der Chirurgischen Klinik II mit Hilfe des jeweiligen „TaqMan<sup>R</sup> MicroRNA Assay“ (Primer), dem „TaqMan<sup>R</sup> MicroRNA Reverse Transcription Kit“ sowie dem „TaqMan<sup>R</sup> Universal PCR Master Mix“ durchgeführt. Hierbei wurde zunächst die miRNA aus der wie oben beschrieben gewonnenen gesamt



RNA in reverser Transkription cDNA hergestellt und danach die qRT-PCR durchgeführt. Für die reverse Transkription wurde pro Probe zunächst der RT-mastermix aus 0,15µl dNTPs (100mM), 1,0µl multiMultiScribe™ Reverse Transcriptase (50U/µl), 1,5µl 10x Reverse Transcription Buffer, 0,19µl RNase Inhibitor (20U/µl) und 4,16µl nukleasefreies Wasser zu einer Gesamtmenge von 7µl zusammenpipettiert, gemischt und auf Eis gestellt. Um Verluste beim Pipettieren auszugleichen, wurde regelhaft 7µl mehr Mastermix angesetzt. In den Thermocyclerstrips wurde nun jeweils 7µl des Mastermix mit je 5µl der verdünnten gesamt RNA gemischt und kurz abzentrifugiert. Schließlich wurde jeweils 3µl des jeweiligen RT-Primer hinzugefügt, gemischt und abzentrifugiert. Im Thermocycler wurde nun die reverse Transkription durchgeführt. Die Programmierung des Thermocycler ist Tab. 11 (S. 31) zu entnehmen. Zur Normalisierung wurde der Primer RNU6B verwendet.

Step Type	Zeit (min)	Temperatur (°C)
HOLD	30	16
HOLD	30	42
HOLD	5	85
HOLD	∞	4
Reaktionsvolumen 15,0µl		

*Tabelle 11: Programmierung des Thermocycler für die reverse Transkription mit TaqMan MicroRNA Assays.*

Die qRT-PCR erfolgte pro Probe in zweifacher Ausführung. Zum Ausgleich von Pipettierverlusten wurde beim Ansetzen der Reaktionen 10% auf die folgenden Angaben aufgeschlagen. Pro Reaktion wurden 10,00µl TaqMan 2x Universal PCR Master Mix (No AmpErase UNG) mit 7,67µl nukleasefreiem Wasser gemischt. Dazu wurde im PCR-Reaktionsgefäß (8er Stripes) 1,0µl 20x TaqMan MicroRNA Assay mix (Primer) und danach 1,33µl vom Produkt aus der reversen Transkription gegeben, vorsichtig gemischt und kurz abzentrifugiert. Das Gesamtvolumen pro Reaktion betrug 20µl. Nun wurde die qRT-PCR im Opticon2 von Biozym mit der Programmierung wie aus Tab. 12 (S. 32) ersichtlich durchgeführt. Zur Normalisierung wurde der Primer RNU6B verwendet. Die relative miRNA-Expression wurde dann mit der komparativen  $\Delta C_T$ -Methode ( $\Delta C_T = C_{T-Probe} - C_{T-RNU6B}$ ) berechnet. Vielfache der miRNA-Expression

wurden mit der  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode bestimmt, um so eine relative Expressionsveränderung einer miRNA in einer Probe gegenüber BPH-Gewebe angeben zu können (z.B. Expressionsveränderung >2). Dabei gilt<sup>127</sup>:

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T-PCa-Probe} - \text{medianes } \Delta C_{T-BPH};$$

$$\Delta C_{T-PCa-Probe} = C_{T-PCa-Probe} - C_{T-RNU6b}; \Delta C_{T-BPH} = C_{T-BPH} - C_{T-RNU6b}.$$

Step Type	Enzymaktivierung	PCR	
	HOLD	CYCLE (40 Zyklen)	
		Denaturierung	Annealing
Zeit	10 min	15 sec	60 sec
Temperatur (°C)	95	95	60
Reaktionsvolumen 20µl			
Datenakquisition bei 60°C			

*Tabelle 12: Programmierung des qRT-Cyclers für die Durchführung der qRT-PCR mit TaqMan MicroRNA Assays.*

## 2.10 Statistische Methoden

Die statistische Analyse der Daten aus den Microarrayuntersuchungen wurde mit verschiedenen Paketen des Bioconductorprojektes ([www.bioconductor.org](http://www.bioconductor.org)) unter R Version 2.3.1 (© The R Foundation for Statistical Computing) durchgeführt. Die gemessenen Signalintensitäten wurden mittels Varianzstabilisierung normalisiert.<sup>128</sup> Dann wurden die medianen Intensitäten der Quadruplikate berechnet. Die Hintergrundintensität wurde nicht subtrahiert. Um statistisch signifikant unterschiedlich exprimierte miRNAs zu finden wurde das Paket Limma (Linear Models for Microarray Analysis) benutzt. Hierbei ist die robuste Analyse auch bei kleineren Fallzahlen nach dem Modell von Smyth möglich.<sup>129</sup> Zur Vermeidung der Alphafehler-Kumulierung wurde eine Adjustierung der p-Werte mit der FDR-Methode (false discovery rate) durchgeführt. Ein adjustierter p-Wert < 0,05 (adj. p < 0,05) wurde als statistisch signifikant gewertet.

Die PAM-Klassifikation (prediction analysis for microarrays) der Daten aus der qRT-PCR wurde mit der Methode der "nearest shrunken centroids" nach Tibshirani et al mit

dem "pamr" Bioconductor Paket für R durchgeführt.<sup>130</sup> Hierbei werden die Schwerpunkte ("centroids") der jeweiligen Klasse (also z.B. Klasse der PCa mit GS10) nach Standardisierung mit der Standardabweichung der Klasse den centroids der Gesamtheit der Klassen angenähert ("shrinkage"). So bekommen Gene (miRNAs) innerhalb derselben Klasse eine stärkere Gewichtung, wenn sie stabil (mit geringer Varianz) exprimiert sind. Mit zunehmendem shrinkage-Parameter  $\Delta$ , werden immer mehr miRNAs aus der Klassenvorhersage eliminiert. Der beste Wert für  $\Delta$  wird durch eine 10-fache Kreuzvalidierung bestimmt, die die Anzahl der Falschklassifizierungen ("misclassification errors") für verschiedene  $\Delta$ -Werte gibt. Daten aus einzelnen Gruppen in den Untersuchungen der qRT-PCR wurden mit dem Welch-Test verglichen. Ein Wert von  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant gewertet.

## 2.11 Datenbanksuche nach Zielgenen

Für die Suche nach Zielgenen ("Targets") bestimmter miRNAs wurden die Datenbanken MicroCosm Targets Version 5 (<http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm/htdocs/targets/v5/>)<sup>69-70</sup>, TargetScan Version 6.2 (<http://www.targetscan.org>)<sup>61, 131-132</sup> und der PicTar Algorithmus (<http://pictar.mdc-berlin.de/>)<sup>133</sup> verwendet. Zum Abgleich der erhaltenen Datensätze wurde das Datenbankverwaltungsprogramm aus dem Officepaket OpenOffice.org 3.1.1 verwendet.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Klinisch-pathologische Parameter und Auswahl der Proben

In dieser Arbeit wurde ein vorselektiertes Prostatakarzinomkollektiv verwendet, um mittels Microarray-Analysen miRNAs zu identifizieren, die mit der Entstehung bzw. der Progression des Prostatakarzinoms in Verbindung stehen (s. Tab. 13 u. 14, S. 36 u. 37). Hierzu wurden 14 Tumorpräparate aus einem der Arbeitsgruppe vorliegenden Hochrisiko-Prostatakarzinomkollektiv (n= 256) ausgewählt, sodass alle untersuchte Tumore einen präoperativen Serum-PSA-Wert von >20ng/ml und/oder eine T-Kategorie  $\geq 2c$  und/oder einen Gleason-Score  $\geq 8$  aufwiesen. Bei der Auswahl der 14 Tumorproben wurde darauf geachtet, dass sich zwei Gruppen ergaben, die sich anhand des Gleason-Score unterscheiden ließen. Sechs PCa-Proben besitzen einen Gleason-Score von 10 und stellen somit die potentiell aggressivsten PCa innerhalb des Hochrisiko-Kollektives dar, während die restlichen acht Tumorproben einen Gleason-Score von 6 oder 7 aufwiesen, also eine potentiell weniger aggressive Untergruppe darstellen. Damit boten acht PCa-Proben zwei der genannten Kriterien für hohes Risiko (präoperativer Serum-PSA-Wert von >20ng/ml UND T-Kategorie  $\geq 2c$ ), während die anderen sechs – alle mit einem Gleason-Score von 10 – drei dieser Risikofaktoren boten (Serum-PSA-Wert von >20ng/ml UND T-Kategorie  $\geq 2c$  UND Gleason-Score  $\geq 8$ ). Wie zu erwarten, zeigen sich klinisch unterschiedliche Verläufe in den beiden Untergruppen mit zwei bzw. drei Risikofaktoren, wenn man die PSA-Progression und das tumorfreie Überleben betrachtet (s. Tabellen 15 und 16, S. 38 u. 38).

Ein Ziel der Studie war es, ein miRNA-Expressionsprofil zu identifizieren, das für Prostatakarzinomgewebe spezifisch ist. Hierzu sollte die globale Expression der miRNAs in den 14 Tumoren im Vergleich zu 6 BPH-Proben analysiert werden (s. Kap. 3.2, S. 39). Zudem sollte durch die Analyse von potentiell hoch-aggressiven (GS=10/ n=6) und potentiell weniger aggressiven (GS<8/ n=8) Tumoren die Identifikation eines prognoseassoziierten miRNA-Profiles (s. Kap. 3.3, S. 43) und prognoserelevanter einzelner miRNAs (s. Kap. 3.5 und 3.6, S. 51 und 55) ermöglicht werden.

Um die ermittelten tumor- bzw. progressionsassoziierten miRNAs zu validieren, wurde ein zweites Kollektiv verwendet. In diesem Kollektiv sind auch alle Tumore enthalten, die für die initialen Microarray-Analysen bereits verwendet wurden, sodass es sich nicht um ein unabhängiges Kollektiv handelt. Zusätzlich zu den bereits untersuchten Tumoren wurden 5 aggressive (GS=10/ n=11) und 3 weniger aggressive Tumorproben analysiert. Somit ergab sich eine Erweiterung des Probenkollektives auf 23 Proben im Kollektiv 2. Um eine interne und technische Validierung durchzuführen wurde die Expression ausgewählter miRNAs in diesem Kollektiv mittels qRT-PCR ermittelt (s. Kap. 3.4, S. 48). Die beiden Kollektive 1 und 2 unterscheiden sich nicht in ihrer Zusammensetzung nach den klinisch-pathologischen Parametern (s. Tab. 17, S. 39). So sollte durch die Erweiterung der Anzahl des Probenkollektives die statistische Robustheit der erzielten Ergebnisse verbessert werden. Eine noch größere Erweiterung der Probenzahl war nicht möglich, da im übergeordneten Hochrisiko-Prostatakarzinomkollektiv (n= 256) keine weiteren Tumoren mit einem Gleason-Score von 10 vorhanden waren.

Probennummer	Alter	T	Gleason-Score (GS)	PSA-Progression (Monate)	Klinische Progression (Monate)	Tod durch Tumor	Follow-up (Monate)
1	62	4	5+5	23	23	●	45
2	62	4	5+5	63	63	●	78
3	61	4	5+5	9	9	●	61
7	66	3b	5+5	72	77	-	91
8	70	3b	5+5	13	13	●	46
11	57	3a	5+5	-	-	-	76
12	71	3b	3+4	-	-	-	97
13	74	4	3+4	52	113	-	113
14	63	2b	3+4	-	-	-	73
15	67	3b	3+4	23	-	-	78
20	70	3b	3+4	-	-	-	116
21	64	3b	3+4	1	70	●	84
22	52	3b	3+3	120	-	-	133
23	59	3a	3+3	-	-	-	145
63,5 (52-74)				23 (1-120)	63 (9-113)	5/14 (36%)	81 (45-145)
Median (Min-Max)						Anteil verstorbener Patienten	

*Tabelle 13: Übersicht über die PCa-Proben aus den Microarrayuntersuchungen (Kollektiv 1, n=14) und deren Eigenschaften mit T-Stadium und Gleason-Score. Beschreibung klinischer Aspekte der Patienten wie Alter (bei Operation), PSA-Progression, klinische Progression, Tod durch Tumor und Follow-up Zeiten (= PCa-spezifische Überlebenszeit bei verstorbenen Patienten). Präoperativer PSA-Wert bei allen Patienten >20ng/ml. ●=ja. – =nein/keine.*

	Alter	T	Gleason-Score (GS)	PSA-Progression (Monate)	Klinische Progression (Monate)	Tod durch Tumor	Follow-up (Monate)	Microarray (Kollektiv 1)	qRT-PCR (Kollektiv 2)
1	62	4	5+5	23	23	●	45	●	●
2	62	4	5+5	63	63	●	78	●	●
3	61	4	5+5	9	9	●	61	●	●
4	67	3b	5+5	14	58	●	58	-	●
5	70	3b	5+5	9	20	●	31	-	●
6	64	3b	5+5	43	43	●	63	-	●
7	66	3b	5+5	72	77	-	91	●	●
8	70	3b	5+5	13	13	●	46	●	●
9	54	3a	5+5	46	46	●	56	-	●
10	68	3a	5+5	-	-	-	132	-	●
11	57	3a	5+5	-	-	-	76	●	●
12	71	3b	3+4	-	-	-	97	●	●
13	74	4	3+4	52	113	-	113	●	●
14	63	2b	3+4	-	-	-	73	●	●
15	67	3b	3+4	23	-	-	78	●	●
16	62	3a	3+4	71	-	-	71	-	●
17	68	3b	3+4	-	-	-	63	-	●
18	74	3b	3+4	-	-	-	99	-	●
19	57	4	3+4	4	22	-	107	-	●
20	70	3b	3+4	-	-	-	116	●	●
21	64	3b	3+4	1	70	●	84	●	●
22	52	3b	3+3	120	-	-	133	●	●
23	59	3a	3+3	-	-	-	145	●	●
	64 (52-74)			23 (1-120)	44,5 (9-113)	9/23 (39%)	78 (31-145)		

*Tabelle 14: Beschreibung der PCa-Proben in Kollektiv 1 (Microarray) und 2 (qRT-PCR) mit T-Stadium und Gleason-Score und klinischer Aspekte der Patienten (Alter bei Operation, PSA-Progression, klinische Progression, Tod durch Tumor und Follow-up Zeiten (= PCa-spezifische Überlebenszeit bei verstorbenen Patienten) und durchgeführter Untersuchungen (Microarray und qRT-PCR). Die letzte Zeile gibt den jeweiligen Median sowie in Klammern Minimum und Maximum bzw. den Anteil der Verstorbenen Patienten an. Präoperativer PSA-Wert bei allen Patienten >20ng/ml. ●=ja. – =nein.*

	PCa-Proben mit 3 Kriterien für hohes Rezidivrisiko, Gleason 10 (n=6)	PCa-Proben mit 1 oder 2 Kriterien für hohes Rezidivrisiko, Gleason 6 oder 7 (n=8)
Alter (Jahre)	62 (57-70)	65,5 (52-74)
Gleason 10 (Anzahl)	6 (100%)	0
Gleason 6 oder 7 (Anzahl)	0 (0%)	8 (100%)
T-Kategorie $\geq 2c$ (Anzahl der Tumorproben)	6 (100%)	7 (88%)
PSA > 20 ng/mL (Anzahl der Tumorproben)	6 (100%)	8 (100%)
Zeit bis zur PSA-Progression (Monate)	23 (9-72)	37,5 (1-120)
Zeit bis zur klinischen Progression (Monate)	23 (9-77)	91,5 (70-113)
Follow-up (Monate)	68,5 (45-91)	105 (73-145)
Pca-spezifischer Tod (Anzahl/Anteil)	4 (67%)	1 (13%)
Überlebenszeit der Verstorbenen (Monate)	53,5 (45-78)	84
Mittleres Überleben (Monate)	68,5	-

*Tabelle 15: Klinisch-pathologische Parameter der im Kollektiv 1 untersuchten PCa-Proben in Abhängigkeit von den Kriterien für hohes Rezidivrisiko: Serum-PSA-Wert von >20ng/ml, T-Kategorie  $\geq 2c$  und Gleason-Score  $\geq 8$ . Zeitangaben in Monaten oder Jahren mit Median (Minimum-Maximum) als Lagemaß. - =keine Angabe möglich.*

	PCa-Proben mit 3 Kriterien für hohes Rezidivrisiko, Gleason 10 (n=12)	PCa-Proben mit 1 oder 2 Kriterien für hohes Rezidivrisiko, Gleason 6 oder 7 (n=11)
Alter (Jahre)	64 (54-70)	65,5 (52-74)
Gleason 10 (Anzahl)	11 (100%)	0
Gleason 6 oder 7 (Anzahl)	0 (0%)	12 (100%)
T-Kategorie $\geq 2c$ (Anzahl der Tumorproben)	11 (100%)	11 (92%)
PSA > 20 ng/mL (Anzahl der Tumorproben)	11 (100%)	12 (100%)
Zeit bis zur PSA-Progression (Monate)	23 (9-72)	37,5 (1-120)
Zeit bis zur klinischen Progression (Monate)	43 (9-77)	70 (22-113)
Follow-up (Monate)	61 (31-132)	98 (63-145)
Pca-spezifischer Tod (Anzahl/Anteil)	8 (73%)	1 (8%)
Überlebenszeit der Verstorbenen (Monate)	58 (31-78)	84
Mittleres Überleben (Monate)	61	-

*Tabelle 16: Klinisch-pathologische Parameter der im Kollektiv 2 untersuchten PCa-Proben in Abhängigkeit von den Kriterien für hohes Rezidivrisiko: Serum-PSA-Wert von >20ng/ml, T-Kategorie  $\geq 2c$  und Gleason-Score  $\geq 8$ . Zeitangaben in Monaten oder Jahren mit Median (Minimum-Maximum) als Lagemaß. - =keine Angabe möglich.*



	Kollektiv 1 (Microarray, n=14)	Kollektiv 2 (qRT-PCR, n=23)
Alter (Jahre)	63,5 (52-74)	64 (52-74)
Gleason 10 (Anzahl)	6 (43%)	11 (48%)
Gleason 6/7 (Anzahl)	8 (57%)	12 (52%)
Zeit bis zur PSA-Progression (Monate)	23 (1-120)	23 (1-120)
Zeit bis zur klinischen Progression (Monate)	63 (9-113)	44,5 (9-113)
Follow-up (Monate)	81 (45-145)	78 (31-145)
PCa-spezifischer Tod (Anzahl/Anteil)	5 (36%)	9 (39%)
Überlebenszeit der Verstorbenen (Monate)	61 (65-84)	58 (31-84)

*Tabelle 17: Die untersuchten Kollektive 1 und 2 der Microarray- und qRT-PCR-Untersuchungen unterschieden sich nach den klinisch-pathologischen Parametern nicht erheblich. Zeitangaben in Monaten oder Jahren mit Median (Minimum-Maximum) als Lagemaß.*

### **3.2 Das globale miRNA-Expressionsprofil im Hochrisiko-Prostatakarzinom**

Mit Hilfe der Microarray-Analyse wurde das jeweilige Expressionsniveau von 640 verschiedenen miRNAs in 6 BPH und 14 PCa davon 6 PCa mit GS10 und 8 PCa mit GS6/7 (Kollektiv 1, s. Tab. 13, S. 36) untersucht. Nach Normalisierung der Rohdaten durch Varianzstabilisierung wurde mit Limma (Linear Models for Microarray Analysis) ein signifikanter Unterschied des Expressionsniveaus zwischen BPH und PCa mit jeweils einem adjustierten p-Wert  $<0,05$  (adj. p  $<0,05$ ) für 52 verschiedene miRNAs gefunden (Abbildung 4, S. 42). Als im PCa herauf- bzw. herunterreguliert wurde dabei jede miRNA betrachtet, die darüber hinaus eine mehr als 2-fache Über- oder Unterexpression gegenüber der Expression in den BPH-Proben ( $>2$ -fach bzw.  $<0,5$ -fach) aufwies. Unter Verwendung der angegebenen Kriterien waren 51 miRNAs in den PCa-Proben herunter- und eine heraufreguliert. Unter den herunterregulierten miRNAs fanden sich insbesondere miR125b, miR-221 und miR-let-7a/c (s. vollständige Liste in Abb. 4, S. 42) Die PCa-Proben unterscheiden sich damit im Hinblick auf die Expression dieser 52 miRNAs von den BPH.

Um die Ergebnisse aus den Microarrayuntersuchungen zu veranschaulichen, wurden diese jeweils in einer sog. Heatmap dargestellt (Abb. 3 und 6). Hierbei werden den jeweiligen Intensitätswerten aus den Messungen Rot- bzw. Grünwerte zugeordnet (Falschfarbendarstellung). Rot steht für hohe Intensitätswerte bzw. grün für niedrige und

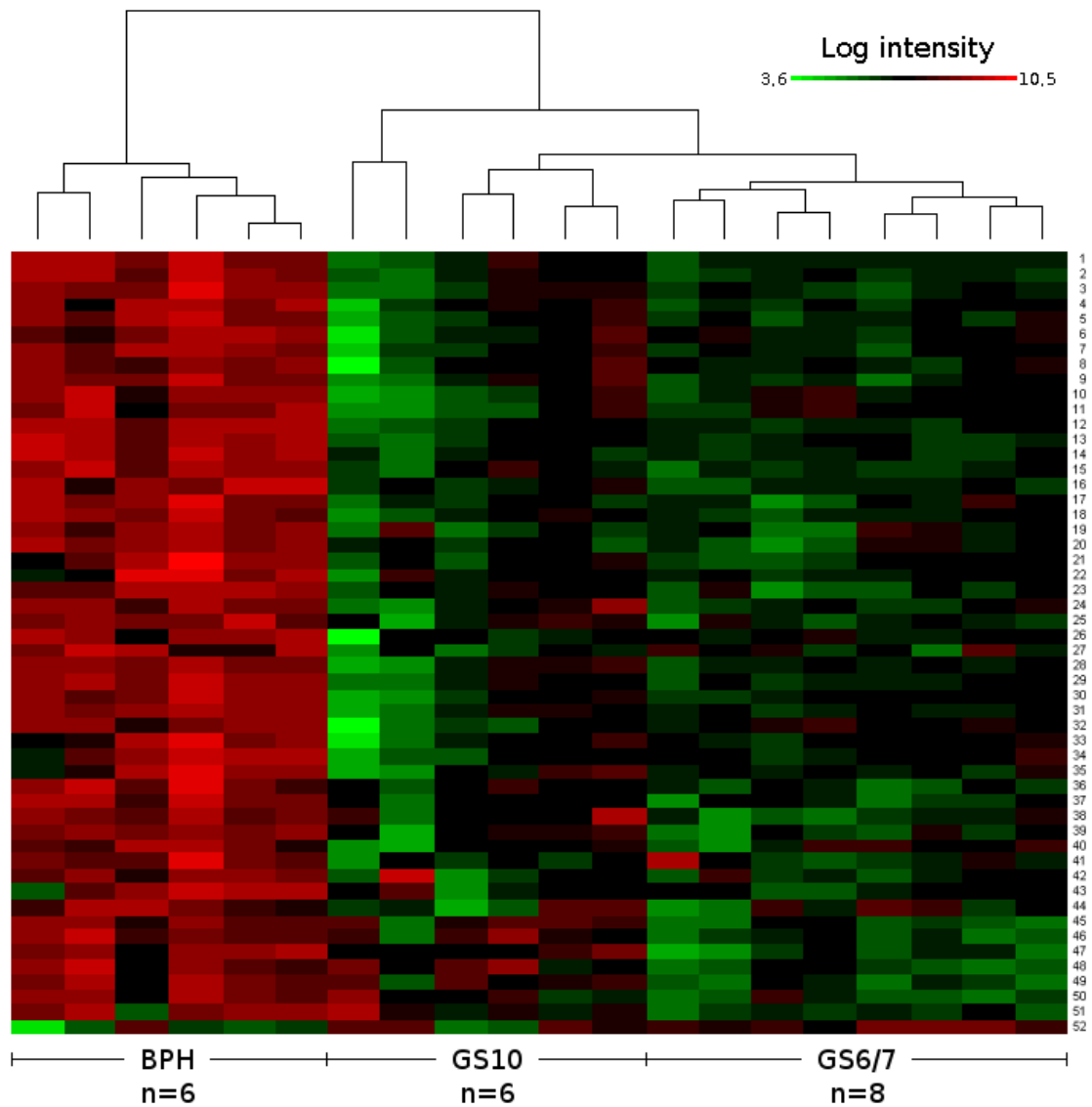


Abbildung 3: Heatmap der Expressionsniveaus aus der Microarray-Analyse mit 52 signifikant unterschiedlich exprimierten miRNAs 1-52 (BPH vs. PCa mit GS10 und GS6/7,  $\text{adj. } p < 0.05$ , Expressionsveränderung  $> 2$  oder  $< 0,5$ -fach,  $n=20$ ). Das Dendrogramm trennt die BPH deutlich von den PCa (GS10 und GS6/7). Alle PCa mit GS6/7 wurden unter einem Ast zusammengefasst und daneben vier der PCa mit GS10. Zwei der PCa GS10 wurden unter den PCa eigenständig gruppiert. Für die Bezeichnungen der einzelnen miRNAs 1-52 s. Abbildung 4 (S. 42).

damit für hohe bzw. niedrige Expression der jeweiligen miRNA. Die Kanten des Dendrogramms an den Seiten der Heatmap stellen das Ergebnis aus einer nicht-überwachten hierarchischen Clusteranalyse der einzelnen Proben dar. Abbildung 3 (S. 40) zeigt wie beschrieben die Falschfarbendarstellung der Expressionswerte der in Abbildung 4 (S. 42) genannten miRNAs. Basierend auf den Intensitätswerten der 52 signifikant unterschiedlich exprimierten miRNAs konnten mittels einer nicht-überwachten hierarchischen Clusteranalyse alle 6 BPH von den untersuchten PCa-Proben getrennt werden. Alle PCa mit GS6/7 wurden unter einem Ast zusammengefasst. Daneben bekamen vier der PCa GS10 auf gleichem Niveau einen Ast. Zwei der PCa GS10 waren unter den PCa eigenständig gruppiert (siehe Dendrogramm in Abb. 3, S. 40). Diese Aufteilung schien nahezuzeigen, dass in PCa je nach Eigenschaften des Tumors, die hier unter dem Gleason-Score subsumiert werden, unterschiedliche miRNAs differenziell exprimiert sein könnten.

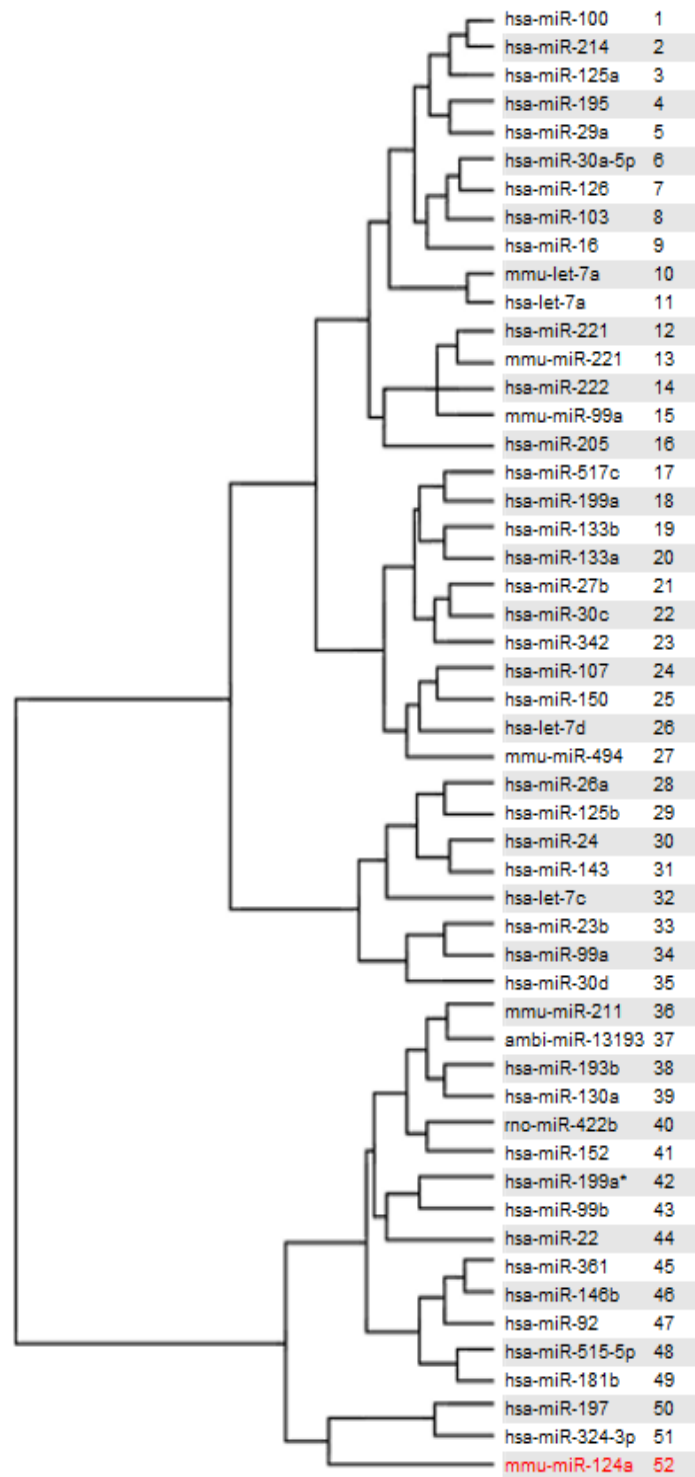


Abbildung 4: Signifikant unterschiedlich regulierte miRNAs bei Vergleich PCa vs. BPH. Nummer 1-51 waren herunterreguliert (schwarz) und Nummer 52 heraufreguliert (rot). (Expressionsveränderung  $>2$  oder  $<0,5$ -fach und adj.  $p < 0,05$ ). Für Hinweise zur Nomenklatur s. Kap. 1.2.2 (S. 13).

### **3.3 miRNA-Expressionsprofile in Subgruppen des Hochrisiko-Prostatakarzinoms**

Bevor auf zwei Untergruppen des Prostatakarzinoms eingegangen wird, soll nochmals an die Auswahl der Proben im Kollektiv 1 erinnert werden: Bei etwa 43% der untersuchten PCa-Proben des Kollektiv 1 sind aufgrund ihres Gleason-Score von 10 aggressivere Verläufe zu erwarten als bei den übrigen 57% mit einem Gleason-Score von 6 oder 7 (s. Tab. 15, S. 38). So wurden klinisch unterschiedliche Verläufe in den beiden Untergruppen nach Risikofaktoren beobachtet: kürzere mediane Zeit bis zur PSA-progression (23 vs. 37,5 Monate), kürzere mediane Zeit bis zur klinischen Progression (23 vs. 91,5 Monate) und höhere PCa-assoziierte Mortalität im Beobachtungszeitraum (67% vs. 13%) in der Gruppe Gleason-Score 10. Mit dieser Vorauswahl der Tumore in eine potentiell aggressive und eine weniger aggressive Subgruppe sollten durch einen Vergleich zwischen diesen beiden Gruppen miRNAs identifiziert werden, die mit einem aggressiven klinischen Verlauf assoziiert sind.

#### **3.3.1 miRNA-Expressionsprofile nach Gleason-Score**

Die beiden Untergruppen der PCa definiert nach deren Gleason-Score (6/7 vs. 10) wurden miteinander verglichen, um die im jeweiligen Falle signifikant unterschiedlich exprimierten miRNAs zu identifizieren. So ergaben sich im Vergleich der Gruppen GS6/7 vs. BPH 62 miRNAs, bei GS10 vs. BPH 48 miRNAs und bei vs. GS10 vs. GS6/7 sechs miRNAs, in denen sich die beiden jeweiligen Gruppen signifikant unter Verwendung der in Kapitel 3.2 (S. 39) beschriebenen Kriterien voneinander unterschieden. Die miRNAs aus diesen Gegenüberstellungen wurden nun miteinander verglichen, um feststellen zu können, welche miRNAs ausschließlich in einer der genannten drei Gegenüberstellung und welche zusätzlich in den anderen Vergleichen signifikant reguliert sind, so dass letztendlich ggf. Rückschlüsse gezogen werden können, ob bestimmte miRNAs mit ihren Expressionswerten spezifisch einem bestimmten Gleason-Score zugeordnet werden können. Zur anschaulichen Darstellung dieses Sachverhaltes eignet sich besonders ein Venn-Diagramm (Abb. 5, S. 46).

Es fällt auf, dass keine miRNA in allen drei Vergleichen signifikant unterschiedlich reguliert ist (entsprechend fehlender miRNAs im Überschneidungsfeld aller drei Kreise

im Venn-Diagramm in Abb. 5, S. 46). Somit kann keine miRNA identifiziert werden die im Vergleich zum BPH-Gewebe gering in PCa mit Gleason-Score 6/7 und noch geringer in PCa mit Gleason-Score 10 exprimiert wird.

Drei spezifische miRNAs fallen besonders auf. So sind miR-422a und miR-515-3p in den PCa-Proben mit Gleason-Score 10 gegenüber PCa-Proben mit Gleason-Score 6/7 nach den genannten Kriterien (s. Kapitel 3.2, S.39) signifikant niedriger exprimiert. Gleichzeitig findet sich kein signifikanter Expressionsunterschied zwischen ihrer Expression in Proben mit Gleason-Score 6/7 und BPH-Gewebe und ebenfalls kein signifikanter Expressionsunterschied zwischen Proben mit Gleason-Score 10 und BPH-Gewebe. Damit ist diese Herunterregulation der beiden miRNAs miR-422a sowie miR-515-3p spezifisch für dieses Kollektiv von PCa mit einem Gleason-Score 10.

Die dritte zu beachtende miRNA ist miR-147. Diese miRNA ist nach den genannten Kriterien in der Gruppe der PCa mit Gleason-Score 6/7 gegenüber dem BPH-Gewebe höher exprimiert. In PCa mit Gleason-Score 10 ist ihre Expression signifikant niedriger als in solchen mit Gleason-Score 6/7. Zwischen PCa mit Gleason-Score 10 und BPH besteht kein Unterschied in ihrer Expression.

### **3.3.2 Assoziation von miRNAs mit klinischen Parametern**

Neben der Einteilung nach dem Gleason-Score erlaubte das Kollektiv 1 der PCa-Proben (siehe Tab. 13 und 18, S. 36 und 45) auch Gegenüberstellungen nach prognostisch relevanten Endpunkten wie der PSA-Progression (ja vs. nein), Tod durch Tumor (ja vs. nein) und klinische Progression (ja vs. nein). Keine der signifikant unterschiedlich regulierten miRNAs konnte mit den beiden erstgenannten Parametern assoziiert werden. Bei den unter dem Gesichtspunkt der klinischen Progression gegenübergestellten PCa zeigten sich 5 miRNAs als herunterreguliert (Kriterien aus Kap. 3.2, S.39). Diese miRNAs sind mmu-miR-291a-5p, hsa-miR-515-3p, hsa-let-7b, ambi-miR-7510 und hsa-miR-147.

Mit 24 miRNAs, die einen p-Wert von  $<0,05$  aufwiesen, wurde eine weitere nicht überwachte hierarchische Cluster-Analyse durchgeführt. Abbildung 6 (S. 47) zeigt das Ergebnis mit der Bezeichnung der 24 miRNAs und ihre Expressionswerte in den

einzelnen PCa in Form einer wie zuvor beschriebenen Heatmap mit Falschfarbendarstellung. Zugehörige p-Werte und Expressionsveränderungen werden in der Tabelle 19 (S. 48) dargestellt.

Es finden sich also zwei miRNAs wieder, die schon bei den Expressionsvergleichen nach Gleason-Score aufgefallen waren (s. Kapitel 3.3, S. 43): miR-515-3p und miR-147. Diese beiden miRNAs sind in den PCa-Proben mit klinischer Progression signifikant niedriger exprimiert und nach den genannten Kriterien (s. Kap. 3.2, S.39) herunterreguliert gegenüber den PCa-Proben ohne klinische Progression im Beobachtungszeitraum.

	klinische Progression (n=7)	keine klinische Progression (n=7)
Altersmedian (Min-Max)	64(61-74)	63(52-71)
Gleason-Score (GS)	5xGS10 und 2xGS7	1xGS10 und 6xGS6/7
Mediane Zeit zur PSA-Progression in Monaten (Min-Max)	23(1-72)	71,5(23-120)
Anzahl(Anteil) der Patienten mit PSA-Progression	7(100%)	2(29%)
Mediane Follow-up Zeit in Monaten (Min-Max)	78(45-91)	97(73-145)
PCa-spezifischer Tod (Anzahl der Pat./Anteil)	5 (71%)	0 (0%)

*Tabelle 18: Klinisch-pathologische Parameter der beiden Untergruppen der PCa aus Kollektiv 1 nach klinischer Progression.*

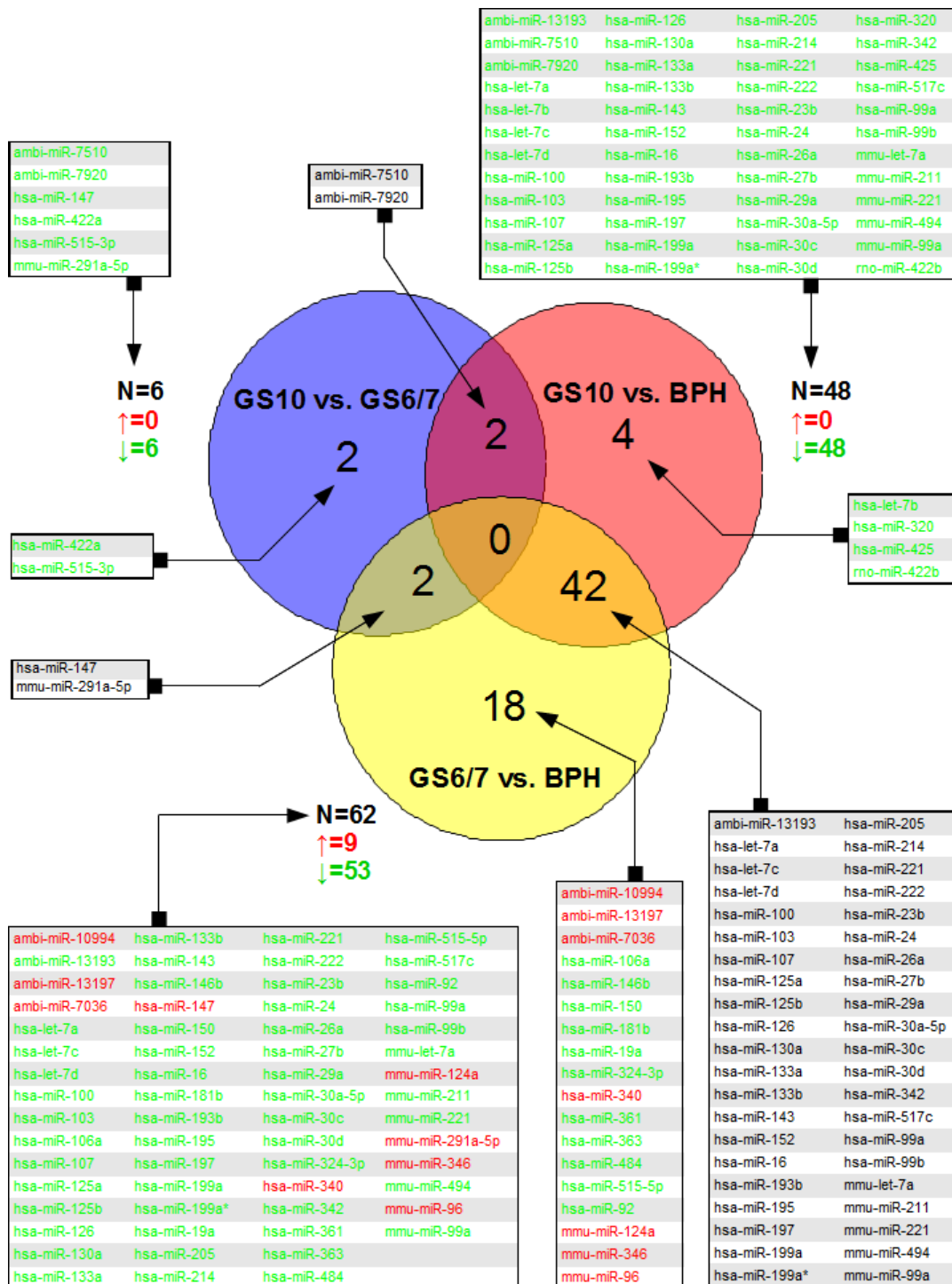


Abbildung 5: Venn-Diagramm mit den in den Gegenüberstellungen GS10 vs. GS6/7 (blau), GS10 vs. BPH (rot) und GS6/7 vs. BPH (gelb) jeweils signifikant unterschiedlich exprimierten miRNAs. (adj.  $p < 0.05$  und Expressionsveränderung  $> 2$  oder  $< 0,5$ -fach). N=Gesamtzahl der miRNAs in einer Gegenüberstellung; ↑= (Anzahl) hochregulierte(r) miRNAs; ↓= (Anzahl) herunterregulierte(r) miRNAs;  $n_{GS10}=6$ ;  $n_{GS6/7}=8$ ;  $n_{BPH}=6$ .



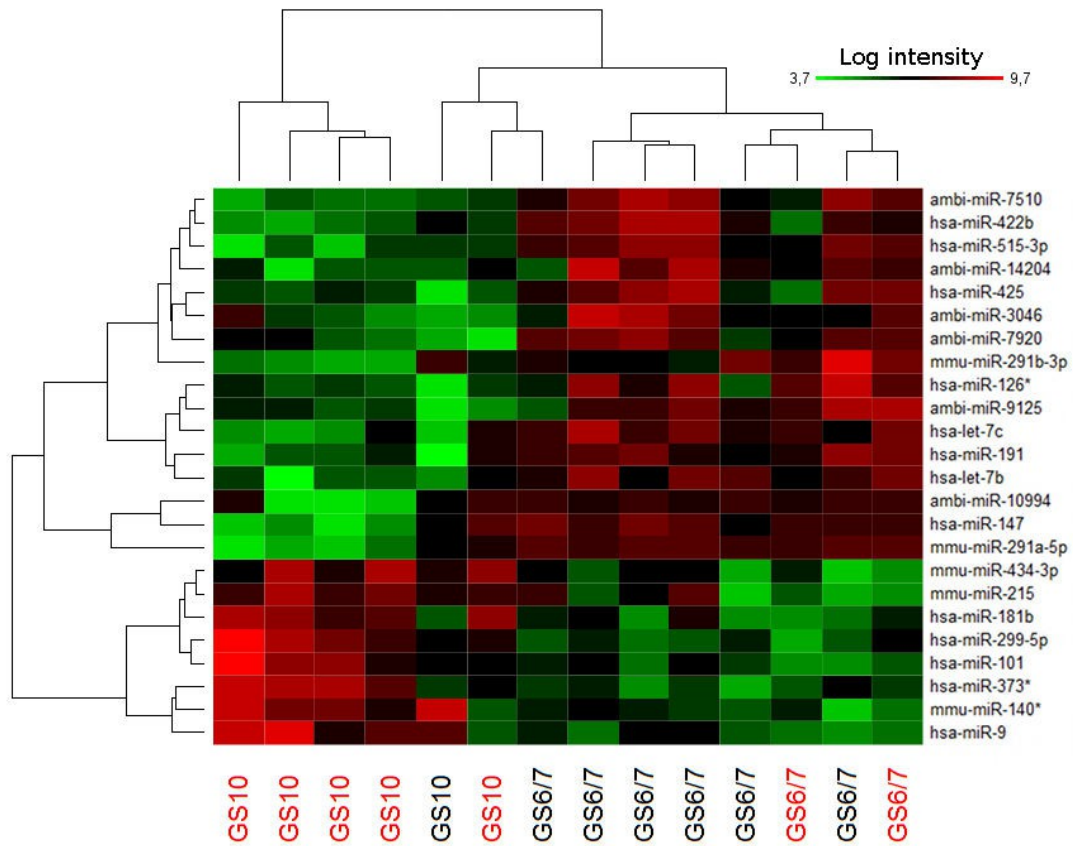


Abbildung 6: Heatmap der Expressionsniveaus von 24 miRNAs aus der Microarray-Analyse aus der Gegenüberstellung der Gruppen der PCa mit klinischer Progression (rot,  $n_1=7$ ) und ohne klinische Progression (schwarz,  $n_2=7$ ) ( $n=14$ ). Für p-Werte der einzelnen miRNAs und Expressionsveränderung s. Tabelle 19 (S. 48). Die nicht-überwachte hierarchische Clusteranalyse wies im Dendrogramm vier von sieben PCa mit klinischer Progression einen Hauptast zu. Der zweite Hauptast beinhaltet alle übrigen PCa (drei mit und 7 ohne Progression). Vier von sechs PCa mit Gleason-Score 10 werden zusammengruppiert. Für Hinweise zur Nomenklatur s. Kap. 1.2.2, S. 13.

miRNA	p-Wert	adjustierter p-Wert	Expressionsveränderung
mmu-miR-291a-5p	0,0000	0,0073	0,0359
hsa-miR-515-3p	0,0000	0,0073	0,3567
hsa-let-7b	0,0001	0,0134	0,2912
ambi-miR-7510	0,0002	0,0267	0,4650
hsa-miR-147	0,0004	0,0480	0,1805
hsa-let-7c	0,0005	>0,05	0,4144
mmu-miR-140*	0,0006	>0,05	2,8541
ambi-miR-7920	0,0007	>0,05	0,4443
ambi-miR-14204	0,0010	>0,05	0,3574
hsa-miR-191	0,0009	>0,05	0,5064
ambi-miR-9125	0,0012	>0,05	0,5154
hsa-miR-299-5p	0,0013	>0,05	1,8420
hsa-miR-126*	0,0018	>0,05	0,4461
mmu-miR-434-3p	0,0016	>0,05	1,8690
hsa-miR-101	0,0018	>0,05	2,0436
hsa-miR-9	0,0017	>0,05	2,1669
hsa-miR-425	0,0023	>0,05	0,5002
hsa-miR-373*	0,0022	>0,05	1,7955
mmu-miR-291b-3p	0,0026	>0,05	0,4577
hsa-miR-422b	0,0026	>0,05	0,5250
ambi-miR-3046	0,0027	>0,05	0,4760
mmu-miR-215	0,0030	>0,05	1,9002
hsa-miR-181b	0,0029	>0,05	1,9093
ambi-miR-10994	0,0035	>0,05	0,2108

*Tabelle 19: 24 miRNAs aus der Microarray-Analyse des Kollektiv 1 mit signifikant unterschiedlicher Expression in der Gruppe der PCa mit klinischer Progression ( $n_1=7$ ) gegenüber der Gruppe ohne klinische Progression ( $n_2=7$ ,  $n_{gesamt}=14$ ,  $p<0,05$ ). Eine Expressionsveränderung  $<0,5$ -fach und adj.  $p<0,05$  liegt bei 5 miRNAs vor (grün=herunterreguliert, schwarz=Kriterien nicht erfüllt).*

### 3.4 Technische Validierung der Expressionsniveaus spezifischer miRNAs im Hochrisiko-Prostatakarzinom mittels qRT-PCR

#### 3.4.1 Auswahl der zu validierenden miRNAs

Um die Ergebnisse aus den Microarrayuntersuchungen technisch zu validieren, wurden die in den Microarrayuntersuchungen verwendeten RNA-Isolate der 6 BPH und 14 PCa (Kollektiv 1) in qRT-PCR-Assays untersucht. Acht miRNAs wurden nach folgenden Kriterien ausgewählt: Zum Einen sollten solche miRNAs herangezogen werden, die in

der Herunterregulation im PCa in den vorangegangenen Microarrayuntersuchungen statistisch hochsignifikant waren (adj.  $p < 0,01$ ) und eine Expressionsveränderung  $>2$ -fach aufzeigten. Dies galt vor allem für die miRNAs miR-221, -125b, -29a, -126, -16 und let-7a. Zum Anderen sollten sie schon in anderen Studien am PCa oder anderen Malignomen als Onkomir identifiziert worden sein oder in Malignomen zumindest differentiell exprimiert worden sein. Dies galt für die genannten miRNAs (miRNAs miR-221, -125b, -29a, -126, -16 und let-7a) sowie let-7b.<sup>101, 103, 105, 112, 119, 125-126, 134-136</sup>

MiR-422a war in den Microarrayuntersuchungen bei BPH vs. PCa zwar nicht signifikant unterschiedlich reguliert. Aber in PCa-Proben mit GS10 war miR-422a gegenüber Proben mit GS6/7 signifikant niedriger exprimiert. Dieser Umstand wurde als möglicherweise so ergiebig gewertet, dass miR-422a weiter untersucht werden sollte. Letztendlich wurden also miR-221, -125b, -29a, -126, -16, let-7a, let-7b und miR-422a ausgewählt für die weitere Expressionsanalyse in der qRT-PCR, um die relative Expression dieser miRNAs zu überprüfen.

#### **3.4.2 Bestätigung der Expressionsniveaus von sieben miRNAs im Prostatakarzinom gegenüber BPH-Gewebe mittels qRT-PCR**

Die bereits vorhandenen RNA-Isolate der Proben wurden wie unter Kap. 2.9 (S. 30) beschrieben mittels qRT-PCR auf die Expression der Kandidaten-miRNAs hin analysiert. Zur Normalisierung der Expressionsdaten wurde die Expression der für diese Anwendung bereits gut etablierten RNU6B verwendet. Wie von einem Normalisierungsfaktor zu erwarten ist, war die Expression von RNU6b nicht signifikant unterschiedlich unter den BPH und PCa Proben, sowie zwischen BPH und PCa. Damit war die Voraussetzung zur Normalisierung gegeben. Die normalisierten Expressionsdaten der miRNAs miR-221, -125b, -29a, -126, -16, let-7a, let-7b und miR-422a waren im Durchschnitt in den PCa-Proben gegenüber den BPH signifikant niedriger exprimiert ( $p < 0,05$ , s. Abb. 7, S. 50). Die Ergebnisse stimmten damit in 7 von 8 miRNAs mit den Ergebnissen aus den vorangegangenen Microarrayuntersuchungen überein: Die miRNAs miR-221, -125b, -29a, -126, -16, let-7a und let-7b sind mit beiden Untersuchungsmethoden im PCa-Gewebe gegenüber BPH-Gewebe herunterreguliert. Die Expression von miR-422a zeigte in den Microarrayuntersuchungen zwischen

Prostatakarzinom und BPH keinen signifikanten Unterschied. Die Untersuchungen mittels qRT-PCR dagegen wiesen hier einen signifikanten Expressionsunterschied nach (s. auch Kap. 3.6.1, S. 55). Die qRT-PCR Ergebnisse bestätigen somit die durch die Microarrayuntersuchungen gewonnenen Expressiondaten für 7 von 8 Kandidaten-miRNAs und lassen so auf eine große Verlässlichkeit der gewonnenen Ergebnisse schließen.

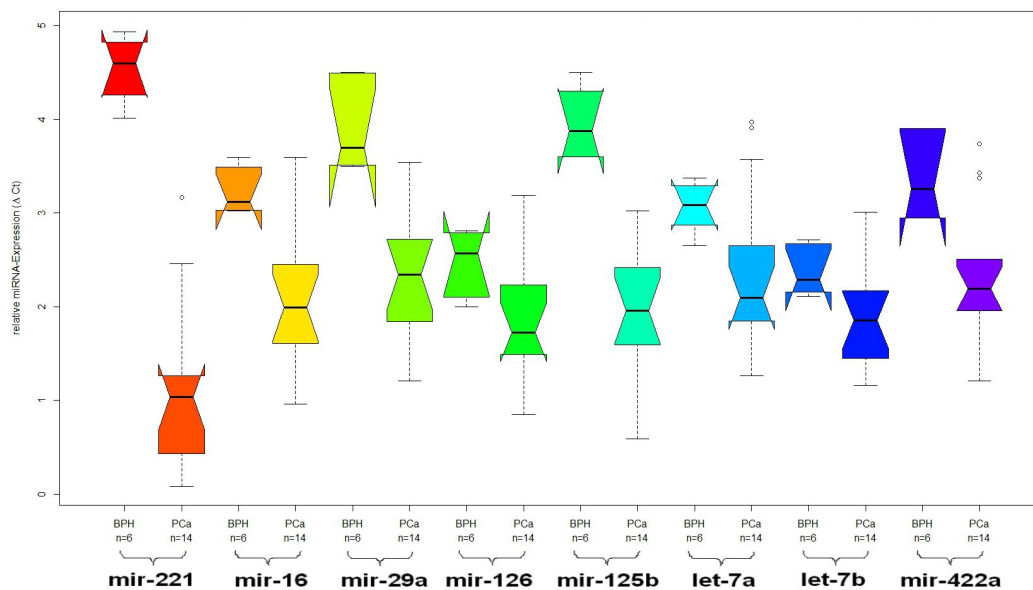


Abbildung 7: Boxplot der  $\Delta C_T$ -Werte der einzelnen miRNAs aus der qRT-PCR-Analyse von Kollektiv 1. Die Beträge der  $\Delta C_T$ -Werte wurden zur Veranschaulichung auf ein Intervall von 0 bis 5 adjustiert. Höhere  $\Delta C_T$ -Werte entsprechen hier daher höheren relativen Expressionswerten bzw. niedrigere  $\Delta C_T$ -Werte niedrigeren Expressionswerten und ein Vergleich der  $\Delta C_T$ -Werte der einzelnen miRNAs untereinander ist daher nicht zulässig. In den PCa-Proben waren miR-221, -16, -29a, -126, -125b, let-7a, let-7b und miR-422a jeweils signifikant niedriger exprimiert als in den BPH-Proben. ( $p < 0,05$ ,  $n_{BPH} = 6$ ,  $n_{PCa} = 14$ )

### **3.5 Expressionsniveaus spezifischer miRNAs im Hochrisiko-Prostatakarzinom in einem erweiterten Kollektiv**

Um die Ergebnisse aus den Microarrayuntersuchungen weiter zu validieren, wurden nun neun BPH und 23 PCa (Kollektiv 2) in qRT-PCR-Assays untersucht. Dieses erweiterte Kollektiv beinhaltete dabei diejenigen PCa und BPH aus den Microarrayuntersuchungen (siehe Tab. 14 und 16, S. 37 und 38). Als zusätzliche Proben wurden weitere HR-PCa (Gleason-Score 10) aus dem übergeordneten Kollektiv von HR-PCa sowie eine vergleichbare Anzahl weniger aggressiver PCa (GS<8) ausgewählt. Es wurde darauf geachtet, dass die Tumore beider Gruppen in ihren klinisch-pathologischen Parametern zusammenpassen („matching“, s. Tab. 17, S. 39). Die untersuchten miRNAs waren nach den oben beschriebenen Kriterien ausgewählt worden (s. Kap. 3.4.1, S. 48).

#### **3.5.1 Bestätigung der Expressionsniveaus von sieben miRNAs im Prostatakarzinom gegenüber BPH-Gewebe in einem erweiterten Kollektiv**

Die Expression der als „house keeper“ benutzten RNU6B wurde analysiert und war nicht signifikant unterschiedlich unter den BPH und PCa Proben, sowie zwischen BPH und PCa. Damit war die Voraussetzung zur Benutzung der RNU6B Werte zur Normalisierung der Messwerte der einzelnen miRNAs gegeben. Die normalisierten Expressionswerte der miRNAs miR-221, -125b, -29a, -126, -16, let-7a, let-7b und miR-422a waren in den PCa gegenüber den BPH hochsignifikant herunterreguliert ( $p < 0,01$ , s. Abb. 8, S. 52). Die Ergebnisse aus den Untersuchungen im Kollektiv 2 stimmten die Regulationsrichtung betreffend mit den Ergebnissen aus den qRT-PCR-Untersuchungen aus Kollektiv 1 überein: Die miRNAs miR-221, -125b, -29a, -126, -16, let-7a, let-7b und miR-422a sind in beiden Kollektiven im PCa-Gewebe gegenüber BPH-Gewebe herunterreguliert.

Betrachtet man die Streuung der  $\Delta C_T$ -Werte so fällt auf, dass diese in den BPH wesentlich geringer war als in den Tumoren, die Schwankungsbreite der Expression der miRNAs in den BPH also niedriger war. Bei Betrachtung der Lage der Werte stechen zwei miRNAs besonders hervor: miR-221 und miR-125b. Hier liegt das Minimum der Expression der miRNAs in den BPH höher als das Maximum in den PCa (s. auch Kap.

3.5.2, S. 53). Der Expressionsunterschied zwischen dem Referenzgewebe und dem Tumorgewebe war hier also besonders groß.

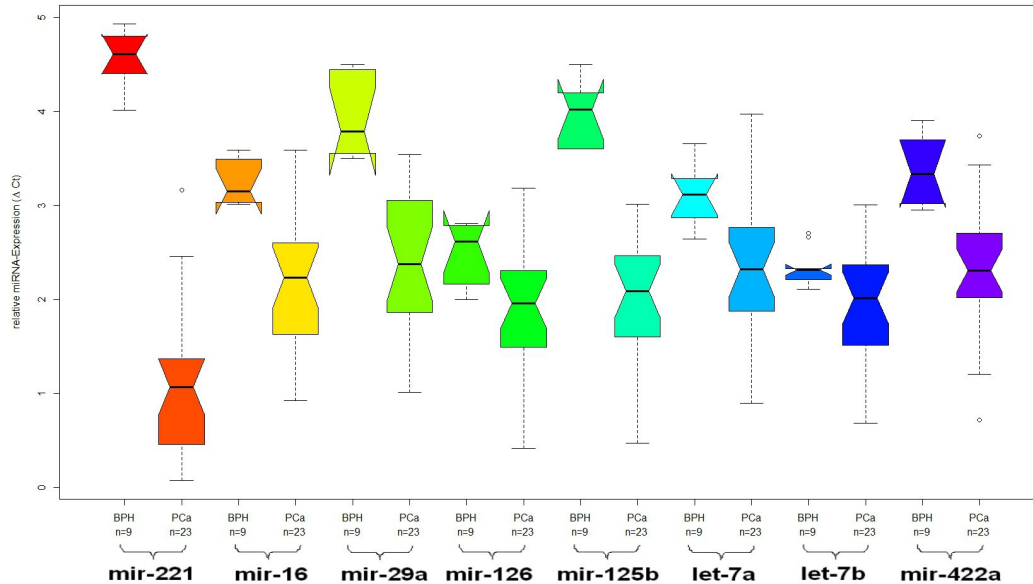


Abbildung 8: Boxplot der  $\Delta C_T$ -Werte der einzelnen miRNAs aus der qRT-PCR-Analyse von Kollektiv 2. Die Beträge der  $\Delta C_T$ -Werte wurden zur Veranschaulichung auf ein Intervall von 0 bis 5 adjustiert. Höhere  $\Delta C_T$ -Werte entsprechen hier daher höheren relativen Expressionswerten bzw. niedrigere  $\Delta C_T$ -Werte niedrigeren Expressionswerten und ein Vergleich der  $\Delta C_T$ -Werte der einzelnen miRNAs untereinander ist daher nicht zulässig. In den PCa-Proben waren miR-221, -16, -29a, -126, -125b, let-7a, let-7b und miR-422a jeweils hochsignifikant niedriger exprimiert als in den BPH-Proben. ( $p < 0,01$ ,  $n_{BPH} = 9$ ,  $n_{PCa} = 23$ )

### 3.5.2 Herunterregulation von miR-221 und -125b im Prostatakarzinom und Klassifikation der Prostatakarzinomproben anhand dreier miRNAs

Für die Interpretation der Expressionsniveaus der miRNAs in den einzelnen PCa-Proben wurden ebenso strikte Kriterien wie in den Microarrayuntersuchungen angelegt: Als herunter- bzw. heraufreguliert wurden die jeweiligen miRNAs in einer PCa-Probe betrachtet, wenn ihr Expressionsunterschied  $<0,5$  bzw.  $>2$  im Verhältnis zur medianen Expression in den BPH-Proben betrug (s. Tabelle 20, S. 53). Dieser Expressionsunterschied der miRNA-Expression wurde mit der  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode bestimmt (s. Kap. 2.9, S. 30).<sup>127</sup> MiRNAs mit einem geringeren Expressionsunterschied zwischen PCa und dem Median der BPH wurden als nicht reguliert bezeichnet.

Probennummer	miR-221 ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ )	mir-16 ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ )	miR-29a ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ )	miR-126 ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ )	miR-125b ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ )	let-7a ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ )	let-7b ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ )	miR-422a ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ )
1	0,17	0,77	0,59	0,77	0,49	1,37	0,88	1,33
2	0,08	0,52	0,20	0,56	0,17	0,47	0,60	0,63
3	0,06	0,64	0,38	0,48	0,20	0,22	0,69	1,03
4	0,09	0,79	0,36	0,82	0,31	0,84	1,61	0,67
5	0,06	0,73	0,72	0,53	0,34	0,58	0,65	0,49
6	0,04	0,45	0,22	0,35	0,19	0,32	0,48	0,30
7	0,06	0,21	0,27	0,52	0,26	0,74	0,45	0,49
8	0,10	1,25	0,77	1,49	0,29	1,74	1,43	0,74
9	0,06	0,66	0,38	0,90	0,33	0,44	1,11	0,52
10	0,07	0,49	0,15	0,68	0,09	0,37	1,13	0,30
11	0,04	0,54	0,48	1,42	0,25	0,43	0,88	0,47
12	0,07	0,20	0,42	0,64	0,22	0,72	0,76	0,39
13	0,05	0,32	0,20	0,29	0,11	0,54	0,54	0,33
14	0,09	0,57	0,48	0,64	0,36	1,81	0,90	0,42
15	0,09	0,33	0,26	0,79	0,12	0,86	0,82	0,43
16	0,23	0,62	0,83	0,34	0,41	0,60	0,70	0,51
17	0,09	0,37	0,84	0,69	0,34	0,64	0,99	0,43
18	0,12	0,20	0,72	0,46	0,38	0,28	0,55	0,57
19	0,11	0,28	0,27	0,46	0,49	0,41	0,81	0,23
20	0,05	0,20	0,17	0,32	0,23	0,31	0,32	0,16
21	0,37	0,49	0,61	1,03	0,30	0,72	1,08	1,07
22	0,09	0,37	0,38	0,91	0,19	1,29	1,16	0,47
23	0,18	0,38	0,36	0,22	0,09	0,45	0,47	0,69

Tabelle 20:  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Werte der einzelnen miRNAs im Kollektiv 2. Zur Berechnung s. Kap. 2.9, S. 30. Als herunterreguliert wurde ein  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Wert von  $<0,5$  betrachtet (grün).

Bei weiterer Betrachtung der Expressionsniveaus der untersuchten miRNAs in den

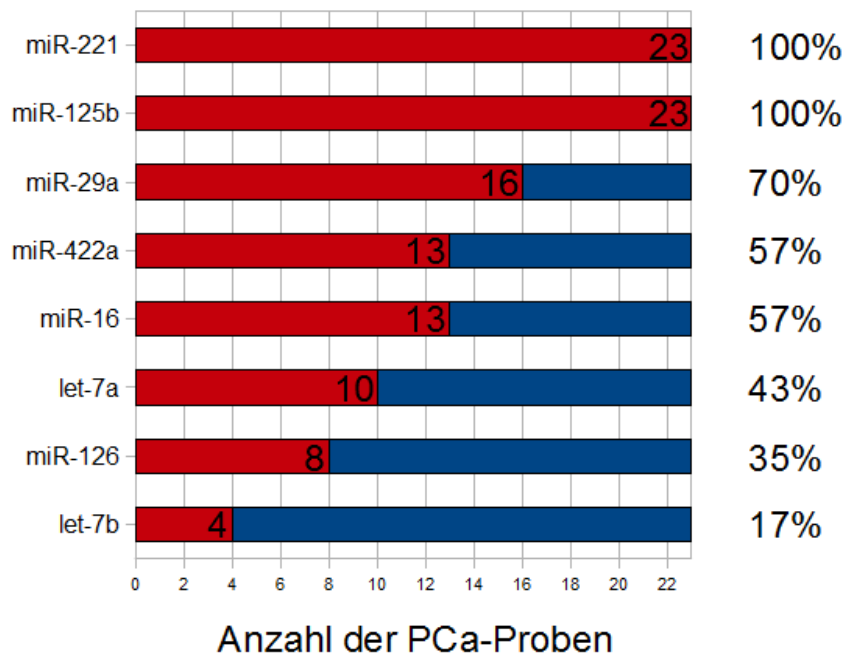


Abbildung 9: Anzahl und Anteil der PCa-Proben, in denen die jeweilige miRNA herunterreguliert ist (Expressionsunterschied  $< 0,5$ -fach). MiR-221 und miR-125b waren in allen Proben herunterreguliert, die übrigen miRNAs nur teilweise. (rote Balken: herunterreguliert, blaue Balken: nicht reguliert,  $n=23$ ).

einzelnen PCa-Proben konnte unter Beachtung dieser Kriterien beobachtet werden, dass die beiden miRNAs miR-221 und miR-125b in allen PCa des Kollektivs 2 herunterreguliert waren, die übrigen miRNAs nur in einem mehr oder weniger großen Anteil der PCa-Proben (s. Abb. 9, S. 54).

Auf der Basis der Expression der acht miRNAs wurde eine Klassifikation der Proben nach BPH und PCa mit PAM (prediction analysis for Microarrays) nach Tibshirani et al durchgeführt.<sup>130</sup> Die Karzinome konnten mit einer Klassifikationsrate von 100% gegenüber den BPH-Proben mit einem Kreuzvalidierungsfehler von 0% unter Zuhilfenahme der Expressionswerte der drei am häufigsten in den PCa-Proben herunterregulierten miRNAs miR-221, miR-125b und miR-29a eingeordnet werden (s. Abb. 10, S. 55).



	BPH	PCa	Class Error rate
1	9	0	0
2	0	23	0

Misclassification rate= 0

	id	PCa-score	BPH-score
[1]	miR-221	1.4427	-0.5645
[2]	miR-125b	1.0688	-0.4182
[3]	miR-29a	0.779	-0.3048

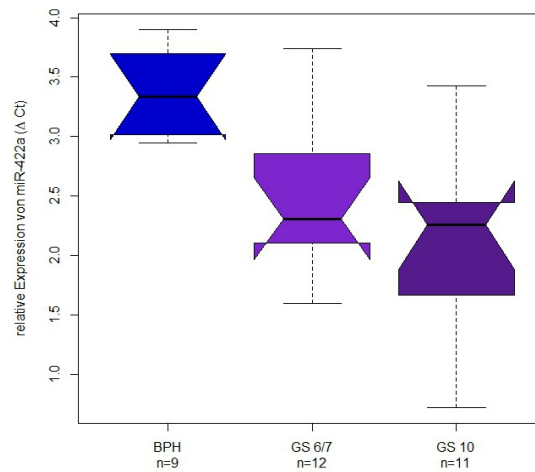
*Abbildung 10: Klassifikation der einzelnen Proben mit PAM (prediction analysis for Microarrays) wie unter 2.10 (S. 32) erläutert. Die Karzinome wurden mit den drei miRNAs miR-221, -125b und -29a mit einer Klassifikationsrate von 100% gegenüber den BPH mit einem Kreuzvalidierungsfehler von 0% eingeordnet.*

### **3.6 Expression ausgewählter miRNAs in Prognosegruppen des Hochrisiko-Prostatakarzinoms nach Gleason-Score in einem erweiterten Kollektiv**

Mit dem oben beschriebenen erweiterten Kollektiv (Kollektiv 2) konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede der Expression der acht untersuchten miRNAs zwischen Untergruppen des Prostatakarzinoms nach klinischer Progression nachgewiesen werden. Beispielhaft werden hier jedoch die Ergebnisse für die Expressionsanalyse der miRNAs miR-422a und miR-221 im Prostatakarzinom nach Gleason-Score dargestellt.

#### **3.6.1 miR-422a**

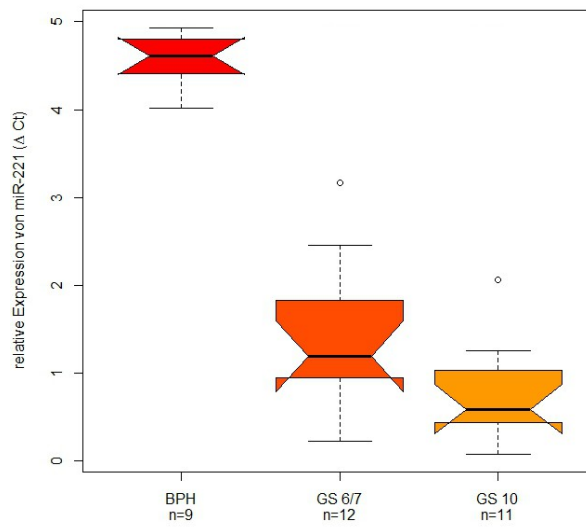
Für miR-422a waren die Ergebnisse aus den qRT-PCR-Untersuchungen (sowohl im Kollektiv 1 wie auch im Kollektiv 2) unerwartet: Die Microarrayuntersuchungen erbrachten für miR-422a im PCa gegenüber BPH keinen Hinweis auf eine differentielle Expression, die Untersuchungen mittels qRT-PCR dagegen jedoch schon (s. Abb. 8, S. 52). Betrachtet man die beiden nach Gleason-Score getrennten Untergruppen der Tumore kann man eine schwache Herunterregulation der miR-422a in Tumoren mit Gleason-Score 10 erkennen. Ein signifikanter Unterschied in der Expression von miR-422a in den Untergruppen GS6/7 vs. GS10, wie er zuvor in den Microarrayuntersuchungen gefunden wurde, konnte aber nicht bestätigt werden (s. Abb. 11, S. 56).



*Abbildung 11: Relative Expression von miR-422a in BPH, PCa mit Gleason-Score 6/7 (GS6/7) und PCa mit Gleason-Score 10 (GS10) im Kollektiv 2. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Expression in GS6/7 und GS10 ist nicht nachweisbar ( $p=0,15$ ).*

### 3.6.2 miR-221

Für die Expression von miR-221 dagegen konnte im Kollektiv 2 ein signifikanter Unterschied in den Prognosegruppen des PCa nach Gleason-Score mittels qRT-PCR gezeigt werden. Abbildung 12 zeigt hierzu die relative Expression von miR-221 in BPH und PCa mit Gleason-Score 6/7 bzw. Gleason-Score 10 (s. S. 57) mit signifikant niedrigeren Werten für PCa mit Gleason-Score 10 als für PCa mit Gleason-Score 6/7. Dieses Ergebnis zeigt somit eine Assoziation der miR-221 Expression mit der Aggressivität des untersuchten Tumors.



*Abbildung 12: Relative Expression von miR-221 in BPH, PCa mit Gleason-Score 6/7 (GS6/7) und PCa mit Gleason-Score 10 (GS 10) im Kollektiv 2. Die Expression von miR-221 ist in PCa mit Gleason-Score 10 im Vergleich zu PCa mit Gleason-Score 6/7 statistisch signifikant niedriger ( $p < 0,05$ ).*

### **3.7 Identifikation potentieller Zielgene elf ausgewählter miRNAs mittels Datenbanksuche**

Für die Auffindung möglicher Zielgene der acht ausgewählten miRNAs miR-221, miR-16, miR-29a, miR-125b, miR-126, miR-let-7a, miR-422a und miR-let-7b sowie zusätzlich der miR-515-3p, miR-515-5p und miR-147 wurde eine Suche in drei öffentlich zugänglichen Datenbanken durchgeführt: MicroCosm Targets Version 5 (<http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm/htdocs/targets/v5/>)<sup>69-70</sup>, TargetScan Version 6.2 (<http://www.targetscan.org>)<sup>61, 131-132, 137</sup> und mit dem PicTar Algorithmus (<http://pictar.mdc-berlin.de/>)<sup>133</sup>. Unter dem Begriff Zielgen ist dabei ein Gen zu verstehen, dessen zugehörige mRNA im 3' untranslatierten Bereich eine (teil-)komplementäre Sequenz zur entsprechenden miRNA aufweist. Somit kann das Genprodukt der mRNA einer entsprechenden Regulation durch die miRNA unterliegen. Als hypothetische Zielgene wurden diejenigen Gene gewertet, die in allen drei Datenbanken bei der jeweiligen miRNA gelistet waren. Ausnahmen stellen miR-422a, miR-515-3p und miR-515-5p dar, da sie nicht in der PicTar-Datenbank gelistet waren. Das Vorkommen in zwei Datenbanken wurde hier als ausreichend gewertet. Für die genannten elf miRNAs wurden insgesamt 365 mögliche mRNA-Ziele gefunden. Die Tabellen 21 (S. 59) und 22 (S. 60) zeigen von den gefundenen 365 Zielgenen aus Gründen der Übersicht diejenigen, deren Funktion bekannt ist und sich nach der Entrez Gene Datenbank<sup>138</sup> den Funktionsbereichen Zellmigration, Adhäsion, Zytoskelett und Angiogenese sowie Signaltransduktion mit Wachstumsfaktoren oder Zellzyklus und Zelltod zuordnen lassen. Insgesamt wurden für den Bereich Zellmigration, Adhäsion, Zytoskelett und Angiogenese 23, für Signaltransduktion und Wachstumsfaktoren 43 und für Zellzyklus und Zelltod 41 Zielgene gefunden.

miR-125b (50)		miR-29a (46)		miR-let-7a (45)
C9orf86	OSBPL9	BACH2	PDGFC	ACTA1
DCTN1	PTPN18	EML5	RAB30	CDC34
DDX42	SERTAD3	FOXJ2	SESTD1	CHD4
EIF2C2	SMARCD2	GLIS2	STRN4	LRIG3
ESRRA	TBC1D1	GPR37	TFEB	MAP4K3
KIAA0174	ZFYVE1	HBP1	TNFRSF1A	RNF5
MAP3K10		HIF3A	TRAF4	UHRF2
MAP3K11		MYBL2	ZBTB5	
MLF2		NASP	ZFP36L1	

#### miR-let-7b (48)

ACTA1

CDC34

MAP4K3

RANBP2

RNF5

*Tabelle 21: Vermeintliche Zielgene ("Targets") von miR-125b, miR-29a, miR-let-7a und miR-let-7b. Die Zahlen in Klammern geben die jeweilige Gesamtzahl der gefundenen Zielgene. Gezeigt werden hier nur die Gene mit bekannter Funktion. Farbliche Hervorhebung nach Funktionsbereichen der Gene: Zellmigration, Adhäsion, Zytoskelett, Angiogenese =blau, Signaltransduktion, Wachstumsfaktoren =grün, Zellzyklus, Zelltod =rot.*

Bei weiterer Betrachtung der Gene wurden 46 gefunden, die Ziel mehr als einer der untersuchten miRNAs waren, davon 35 als Ziele gleichermaßen von miR-let-7a und miR-let-7b. Wegen der Sequenzhomologie von miR-let-7a und miR-let-7b war dieses Ergebnis zu erwarten. Tabelle 23 (S. 60) zeigt Gene bekannter Funktion nach der Entrez Gene Datenbank<sup>138</sup>, deren mRNA Ziel mindestens zweier untersuchter miRNAs ist.

miR-16 (68)			miR-515-5p (65)*	
CARD10	G0S2	TGFBR3	ACVR2B	HRK
CCNE1	HOXC11	TLE4	AFF4	ICK
CCNT2	KIF21A	TSPYL2	AJAP1	ID3
CDC42EP2	LPHN2	WEE1	BTG2	NRP2
CHEK1	MYB	WNT7A	C13orf34	RBMS2
CUL2	RNF125	YWHAQ	CDCA7	
DIXDC1	SIAH1	ZNF622	CDH26	
EPHA1	TBP	ZSWIM3	F11R	
ESRRA	TFAP2D	ZYX	GNB4	

miR-147 (4)	miR-422a (26)*	miR-515-3p (36)*	miR-126 (3)	miR-221 (22)
ANK1	ADD2	BCOR	PLK2	ANGPTL2
RGS3	ANGPT4	CDH4	PTPN9	BMF
	IGF1R	CDKN1B	RGS3	CYR61
	PDE1B	DOCK4		FOS
	RIT1	THBS3		IRF2
	WDR37	TRAF4		MAPK10
				NLK
				PAK1

Tabelle 22: Vermeintliche Zielgene ("Targets") von miR-16, miR-515-5p, miR-147, miR-422a, miR-515-3p, miR-126 und miR-221. Die Zahlen in Klammern geben die jeweilige Gesamtzahl der gefundenen Zielgene. Gezeigt werden hier nur die Gene mit bekannter Funktion. Farbliche Hervorhebung nach Funktionsbereichen der Gene: Zellmigration, Adhäsion, Zytoskelett, Angiogenese =blau, Signaltransduktion, Wachstumsfaktoren =grün, Zellzyklus, Zelltod =rot, \*=in der PicTar-Datenbank nicht gelistet.

miRNA	gemeinsames Zielgen
hsa-miR-126, hsa-miR-147	RGS3
hsa-miR-16, hsa-miR-125b	ESRRA
hsa-miR-29a, hsa-miR-515-3p	TRAF4
miR-let-7a, miR-let-7b	ACTA1
miR-let-7a, miR-let-7b	CDC34
miR-let-7a, miR-let-7b	LRIG3
miR-let-7a, miR-let-7b	MAP4K3
miR-let-7a, miR-let-7b	RNF5

Tabelle 23: Zielgene mit bekannter Funktion, deren mRNA Ziel mehr als einer der untersuchten miRNAs ist. Zellmigration, Adhäsion, Zytoskelett, Angiogenese =blau, Signaltransduktion, Wachstumsfaktoren =grün, Zellzyklus, Zelltod =rot.

#### 4 Diskussion

Wie bereits in den Abschnitten 1.1.1 und 1.1.6 (S. 1 und 6) beschrieben, ist es beim PCa schwierig im Einzelfall die richtige Therapieentscheidung für den betroffenen Patienten zu fällen. Der Patient soll weder übertherapiert werden, damit dieser nicht unnötigerweise an Nebenwirkungen der Therapie leidet, noch soll der Patient einer zu zurückhaltenden Therapie zugeführt werden. Neue molekulare Marker sind also notwendig, mit denen bestimmt werden kann, welche Therapieoption gewählt werden sollte. Mit dem Wissen, dass etwa ein Drittel aller menschlichen Gene von miRNAs in ihrer Expression beeinflusst werden<sup>61</sup>, und dem Nachweis, dass miRNAs wesentlich zur Tumorentstehung und -progression beitragen können<sup>66-67, 92</sup>, entsteht die Annahme, dass spezifische miRNAs künftig diese Marker stellen könnten.

Hierzu wurden in der vorliegenden Arbeit Tumorproben aus einem Kollektiv von HR-PCa benutzt. Die PCa dieses Kollektives wurden durch einen hohen präoperativen Serum-PSA (>20ng/ml) und/oder eine T-Kategorie  $\geq 2c$  und/oder einen hohen Gleason-Score (GS>8) als Hochrisikotumore identifiziert. Um die Anzahl der initial in den sehr aufwendigen Microarray-Analysen zu untersuchenden Tumorproben möglichst niedrig zu halten und der Beobachtung zu entsprechen, dass auch in diesem Hochrisiko-Kollektiv ein hoher PSA Wert nicht zwingend mit einem aggressiven Verlauf des Tumors assoziiert ist<sup>24</sup>, wurden zwei Gruppen selektiert. Entsprechend dieser Selektion besteht das untersuchte Kollektiv 1 (n=14, Microarray) bzw. Kollektiv 2 (n=23, qRT-PCR) zu 43% bzw. 48% aus Proben mit einem Gleason-Score 10 und einem dementsprechend aggressiven klinischen Verlauf. Die Proben mit Gleason-Score 6/7 des jeweiligen Kollektivs zeichneten sich durch eine weitgehend indolente Verlaufsdaten durch einen weitgehend indolenten Verlauf aus (s. Kap. 3.1, S. 34 mit den Tabellen 13 bis 17). Dabei unterscheidet sich das als Kontroll-Kollektiv verwendete Kollektiv 2 nur in der Anzahl der verwendeten Tumore.

Entsprechend der Fragestellung und dem Konzept der Arbeit wird sich die folgende Diskussion in einen Teil über das miRNA-Expressionsprofil im Prostatakarzinom im Allgemeinen (s. Kap. 4.1, S. 62) und in einen Teil über miRNA-Expressionsunterschiede in prognoserelevanten Untergruppen des Prostatakarzinoms

gliedern (s. Kap. 4.2, S. 81). Zuletzt wird in Kürze auf die Zielsuche zu den korrespondierenden hier identifizierten miRNAs eingegangen (s. Kap. 4.3, S. 89).

#### **4.1 Das miRNA-Expressionsprofil im Prostatakarzinom**

In der vorliegenden Arbeit konnten bezüglich der miRNA-Expressionsprofile aus Microarray-Analysen im Vergleich zwischen dem oben beschriebenen PCa-Kollektiv 1 und nicht-tumorös verändertem Prostatagewebe (Gewebe von BPH-Proben) folgende Beobachtungen gemacht werden: 52 miRNAs wurden in PCa-Proben gegenüber BPH-Proben statistisch signifikant unterschiedlich exprimiert (adj.  $p < 0,05$ , relative Expression  $> 2$  oder  $< 0,5$ -fach, s. Abbildungen 3 und 4 auf den Seiten 40 und 42). Mit diesem identifizierten miRNA-Profil von 52 miRNAs konnten BPH und PCa in zwei unterschiedliche Gruppen mittels der nicht-überwachten hierarchischen Clusteranalyse fehlerfrei zugeordnet werden (s. Dendrogramm in Abbildung 3, S. 40). Des Weiteren waren von den 52 miRNAs im PCa eine höher und 51 niedriger exprimiert als im BPH-Gewebe. Die vorliegende Arbeit identifiziert damit ein 52 miRNAs zählendes, prostatakarzinomspezifisches miRNA-Expressionsprofil mit einer weitgehenden Herunterregulation der enthaltenen miRNAs. Mit diesem Profil ist eine Unterscheidung zwischen PCa-Gewebe und nicht-tumorös verändertem Kontrollgewebe möglich.

Im Folgenden sollen zunächst Beobachtungen aus der Literatur aus sechs Microarrayuntersuchungen im Vergleich zur vorliegenden Untersuchung zusammengetragen werden (s. Kap. 4.1.1, S. 62). Anschließend wird die Vergleichbarkeit der sechs Studien erörtert sowie deren untersuchte Kollektive im Bezug auf deren Risikoprofil analysiert (s. Kap. 4.1.2, S. 68), um schließlich die zuvor gemachten Beobachtungen bewerten und Schlussfolgerungen ziehen zu können (s. Kap. 4.1.3, S. 73). Zuletzt wird auf einzelne ausgewählte miRNAs und ihre Rolle im Prostatakarzinom eingegangen (s. Kap. 4.1.4, S. 77)

##### **4.1.1 Prostatakarzinomspezifische miRNA-Expressionsprofile**

Sechs Microarraystudien aus den Jahren 2007 bis 2012 zum Prostatakarzinom wurden zum Vergleich mit der vorliegenden Arbeit herangezogen.<sup>67, 113-114, 116, 118, 139</sup> Der Vergleich der Ergebnisse bezieht sich auf die Anzahl der miRNAs in den identifizierten Profilen,



die damit erreichte Genauigkeit der Clusteranalyse (Einordnung in Klassen und Vergleich mit bekannten Klassen wie Referenzgewebe und Tumorgewebe), die Überschneidung der einzelnen als spezifisch identifizierten miRNAs mit dieser Arbeit und das Expressionsniveau der identifizierten miRNAs.

Die *Anzahl der als PCa-spezifisch identifizierten miRNAs* im jeweiligen Profil schwankt in den genannten Arbeiten von 42 bis 78 (s. Tab. 24 und 25, S. 64 und 65), so dass dies mit der vorliegenden Arbeit (52 identifizierte miRNAs) gut vergleichbar ist. Insbesondere bezogen auf die Anzahl an untersuchten miRNAs sind die Arbeiten mit der vorliegenden in guter Übereinstimmung: 11-17 miRNAs (13 in der vorliegenden Arbeit) werden in 4 von den 6 Arbeiten pro 100 untersuchter miRNAs als differentiell exprimiert identifiziert (s. Tab. 25, S. 65).

In dieser Arbeit wird eine Clusteranalyse genutzt, um die untersuchten Proben in Klassen von miRNA-Expressionsprofilen einzuteilen. Da diese Klassen noch nicht bekannt sind, wurde eine nicht-überwachte Clustermethode benutzt.<sup>129</sup> Die erstellten Klassen wurden dann mit bekannten Eigenschaften verglichen. Die *Übereinstimmung der Clusteranalyse* mit den bekannten Eigenschaften (Referenzgewebe oder Tumorgewebe) in den Profilen der 6 Microarrayuntersuchungen am PCa und der vorliegenden Arbeit war ähnlich gut. Jeweils 85-100% der Prostatakarzinomproben können vom Referenzgewebe in der Clusteranalyse abgegrenzt werden (s. Tabelle 24, S. 64).<sup>114, 116, 139</sup>

Autor	Anzahl der miRNAs im verwendeten Profil	Korrekt klassifizierte(s)		Referenz
		Referenzgewebe	PCa	
Porkka	51	4 von 4 (100%)	9 von 9 (100%)	<sup>116</sup>
Wach	72	18 von 20 (90%)	17-19 von 20 (85-95%)	<sup>139</sup>
Schaefer	78	23 von 24 (96%)	20 von 24 (83%)	<sup>114</sup>
Stenger	52	6 von 6 (100%)	14 von 14 (100%)	

*Tabelle 24: Ergebnisse verschiedener Untersuchungen zum Clustering von Referenzgewebe und Prostatakarzinomgewebe anhand unterschiedlich großer miRNA-Profile.*

Bezüglich der *Überschneidung der einzelnen als spezifisch identifizierten miRNAs* zwischen den Arbeiten kann beobachtet werden, dass die 44 humanen miRNAs des Profils der vorliegenden Arbeit zu 14%-39% in den Profilen anderer Arbeiten vorkommen.

Betreffend das *Expressionsniveau der identifizierten miRNAs* zeigte sich, dass die Untersuchung von Volinia<sup>67</sup> im PCa hauptsächlich eine Heraufregulierung von miRNAs (39 von 45 miRNAs) findet, während Porkka<sup>116</sup> bzw. Ozen<sup>113</sup> verstärkt eine Herunterregulierung der miRNAs beobachten (37 von 51 bzw. 76 von 85 miRNAs). In den neueren Untersuchungen von Schaefer<sup>114</sup> und Wach<sup>139</sup> stehen die herauf- bzw. herunterregulierten miRNAs in etwa gleichem Verhältnis (7 bzw. 7 sowie 37 bzw. 35 miRNAs) wie auch bei Ambbs<sup>118</sup> (je 21 miRNAs). Dies scheint zwar zunächst heterogen. Wenn jedoch eine miRNA im Profil einer der sechs betrachteten und der vorliegenden Arbeit vorkommt, dann stimmt die Regulationsrichtung in 50%-100% in den 4 der 6 genannten Arbeiten überein (s. Tabelle 25, S. 65).

Autor	Anzahl der untersuchten humanen miRNAs	Anzahl der miRNAs im gefundenen Profil	A	B
Porkka <sup>116</sup>	319	51	17 (39%)	17 von 17 (100%)
Wach <sup>139</sup>	678	72	10 (23%)	8 von 10 (80%)
Ambs <sup>118</sup>	329	42	8 (18%)	4 von 8 (50%)
Volinia <sup>67</sup>	190	45	14 (32%)	3 von 11 (21%)
Schaefer <sup>114</sup>	470	78	6 (14%)	6 von 6 (100%)

*Tabelle 25: Größe und Überschneidung der miRNA-Profile des Prostatakarzinoms ausgewählter Arbeiten im Vergleich zur vorliegenden Arbeit. A: Anzahl der miRNAs vorkommend im Profil der vorliegenden Arbeit und des jeweiligen Autors (Anteil am vorliegenden miRNA-Profil von 44 humanen miRNAs), B: Anteil der niedrig exprimierten miRNAs aus A.*

Um eine Übersicht über die Fülle an Ergebnissen herzustellen, vergleicht Tabelle 26 (S. 67) die in der vorliegenden Arbeit als spezifisch für das PCa identifizierten miRNAs im Hinblick auf ihr Expressionsniveau mit den sechs o. g. Microarraystudien und bildet Kategorien. 13 bzw. 21 (insgesamt also 34 von 52) miRNAs werden dabei in ihrem Expressionsniveau in unterschiedlichem Maße bestätigt (**grün** bzw. **schwarz** in Tabelle 26). Konträres Expressionsverhalten zeigte sich nur bei 8 miRNAs (**rot**). 15 miRNAs der vorliegenden Arbeit kamen in den Profilen der genannten Arbeiten nicht als signifikant unterschiedlich exprimiert vor (**blau**). MiR-103, miR-125b, miR-16, miR-205, miR-221/222, miR-23b und let-7c werden in mindestens drei der in Tabelle 26 (S. 67) aufgeführten Arbeiten als herunterreguliert gefunden, ohne dass in den anderen Arbeiten eine gegenteilige Regulation gefunden wird. Diese 7 miRNAs wurden damit wiederholt im Prostatakarzinom als herunterreguliert gefunden. Bei 3 dieser miRNAs (miR-125b, miR-16 und miR-221) wurde die niedrige Expression im PCa in der vorliegenden Arbeit mittels qRT-PCR validiert (s. Abb. 8, S. 52).

*Zusammenfassend* fallen folgende Hauptbeobachtungen beim Vergleich dieser Arbeit mit den sechs genannten Microarrayuntersuchungen auf:

#### Übereinstimmende Beobachtungen:

- a) Die Größe des gefundenen prostatakarzinomspezifischen miRNA-Profiles ist bezogen auf die Anzahl der untersuchten miRNAs etwa gleich mit den Profilen der verglichenen Arbeiten.
- b) Tumorproben können im Vergleich zum jeweiligen Referenzgewebe wie in der vorliegenden Arbeit korrekt klassifiziert werden (83-100%).
- c) 34 von 52 der in der Arbeit als prostatakarzinomspezifisch identifizierten miRNAs werden durch die Vergleichsarbeiten bestätigt.
- d) Die miRNAs miR-103, miR-125b, miR-16, miR-205, miR-221/222, miR-23b und let-7c werden hier und in den anderen Arbeiten wiederholt im Prostatakarzinom als herunterreguliert (ohne konträre Regulation in einer der Arbeiten) gefunden. Die Expression der miRNAs miR-125b, miR-16, und miR-221 wurde darüber hinaus mittels qRT-PCR in der vorliegenden Arbeit bestätigt.

#### Nicht übereinstimmende Beobachtungen:

- e) Die hier als tumorspezifisch identifizierten miRNAs kommen nur zu 14%-39% in den anderen 6 Microarrayuntersuchungen vor. Wenn sie dort vorkommen, stimmt die Regulationsrichtung nicht immer überein (21-100% der Fälle).
- f) Ein kleiner Teil des prostatakarzinomspezifischen miRNA-Profiles wird nicht bestätigt. Acht miRNAs zeigen konträres Expressionsverhalten (s. rote miRNAs in Tab. 26, S. 67) und 15 miRNAs werden in der vorliegenden Arbeit neu als signifikant unterschiedlich exprimiert gefunden (s. blaue miRNAs in Tab. 26, S. 67).

Auch wenn eine relativ große Übereinstimmung zwischen den in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnissen mit der vorhandenen Literatur festzustellen ist, sollen im Anschluss mögliche Faktoren diskutiert werden, die die beobachteten Unterschiede erklären können.

miRNA	Schaefer <sup>114</sup>	Porkka <sup>116</sup>	Wach <sup>139</sup>	Ambis <sup>118</sup>	Volinia <sup>67</sup>	Ozen <sup>113</sup>	Stenger
miR-221	↓	↓	↓	↓	↔	k.A.	↓
miR-125b	↓	↓	↓	↔	↔	↓	↓
miR-222	↓	↓	↓	↔	↔	k.A.	↓
miR-16	↓	↓	↔	↔	↑	↓	↓
miR-205	↓	↔	↓	↓	↔	k.A.	↓
miR-195	↔	↓	↑	↔	↑	k.A.	↓
let-7a	↔	↓	↑	↔	↓	k.A.	↓
miR-23b	↔	↓	↓	n.u.	↔	k.A.	↓
miR-26a	↔	↓	↔	↑	↑	↓	↓
miR-92	↔	↓	↔	↑	↑	k.A.	↓
miR-125a	↔	↓	↔	↑	↔	↓	↓
let-7d	↔	↓	↔	↔	↑	↓	↓
miR-199a	↔	↓	↔	↔	↑	k.A.	↓
let-7c	↔	↓	↔	↔	↔	↓	↓
miR-103	↔	↓	↔	↔	↔	↓	↓
miR-143	↔	↓	↔	↔	↔	k.A.	↓
miR-99a	↔	↓	↔	↔	n.u.	k.A.	↓
miR-199a*	↔	↓	↔	n.u.	↔	k.A.	↓
miR-99b	↔	↔	↓	↑	n.u.	↓	↓
miR-197	↔	↔	↓	↔	↑	k.A.	↓
miR-214	↔	↔	↓	↔	↑	k.A.	↓
miR-126	↔	↔	↔	↓	↔	k.A.	↓
miR-133a	↔	↔	↔	↓	↔	k.A.	↓
miR-30c	↔	↔	↔	↔	↑	↓	↓
miR-181b	↓	↔	↔	↔	↑	k.A.	↓
miR-22	↔	↔	↔	↔	↓	k.A.	↓
miR-100	↔	↔	↔	↔	↔	k.A.	↓
miR-107	↔	↔	↔	↔	↔	k.A.	↓
miR-130a	↔	↔	↔	↔	↔	k.A.	↓
miR-133b	↔	↔	↔	↔	↔	k.A.	↓
miR-150	↔	↔	↔	↔	↔	k.A.	↓
miR-152	↔	↔	↔	↔	↔	k.A.	↓
miR-342	↔	↔	↔	↔	↔	k.A.	↓
miR-146b	↔	↔	↔	↔	n.u.	k.A.	↓
miR-193b	↔	↔	↔	↔	n.u.	k.A.	↓
miR-361	↔	↔	↔	↔	n.u.	k.A.	↓
miR-29a	↔	↔	↔	n.u.	↑	↓	↓
miR-24	↔	↔	↔	n.u.	↓	k.A.	↓
miR-30a	↔	↔	↔	n.u.	↔	↓	↓
miR-27b	↔	↔	↔	n.u.	↔	k.A.	↓
miR-30d	↔	↔	↔	n.u.	↔	k.A.	↓
miR-324-3p	↔	↔	↔	n.u.	↔	k.A.	↓
miR-515-5p	↔	↔	↔	n.u.	n.u.	k.A.	↓
miR-517c	↔	↔	↔	n.u.	n.u.	k.A.	↓

Tabelle 26: Übersicht über Regulationsrichtung von miRNAs im PCa in methodisch vergleichbaren Arbeiten. Eingeschlossen wurden humane miRNAs, die in der vorliegenden Arbeit im Tumorgewebe signifikant unterschiedlich zum Referenzgewebe exprimiert wurden. grün (13 miRNAs)= in  $\geq 3$  Arbeiten ↓, schwarz (8)= in  $< 3$  Arbeiten ↓ und kein ↑, rot(8)= in  $< 3$  Arbeiten ↓ und teilweise ↑, blau(15)= neu als signifikant unterschiedlich exprimiert gefunden, k.A.= Keine Angabe möglich, n.u.= nicht untersucht, ↔=kein Expressionsunterschied, ↑=hoch exprimiert, ↓=niedrig exprimiert.

#### 4.1.2 Limitierungen der Vergleichbarkeit von miRNA-Expressionsprofilen

Im Folgenden soll die Vergleichbarkeit der sechs Microarraystudien (s. Tab. 26, S. 67) mit der vorliegenden Arbeit untersucht werden. Damit soll die Voraussetzung zur Interpretation der Ergebnisse in Zusammenschau mit diesen sechs Arbeiten (Beobachtungen a bis f auf S. 65) geschaffen werden. Es soll auf folgende Themen eingegangen werden: Definition des Referenzgewebes, gewählte Verfahrensprotokolle, statistische Methoden und Risikoprofile der verwendeten Kollektive.

Zur Definition des Referenzgewebes: In der vorliegenden Arbeit wird Prostatahyperplasiegewebe anderer Patienten als Referenzgewebe genutzt. Von den verglichenen Microarraystudien nutzen Porkka und Volinia ebenfalls diesen Ansatz. Von Vorteil ist hier, dass mit großer Sicherheit nicht versehentlich tumoröses oder präkanzerös verändertes Material verwendet wird. Nachteilhaft könnten interindividuelle Schwankungen sein. Diese Schwankungen sind in dem hier verwendeten BPH-Gewebe jedoch gegenüber den Schwankungen innerhalb des Tumorkollektivs viel geringer (s. Abb. 8, S.52). Malignität spielt also bei der miRNA-Expression eine größere Rolle als die Interindividualität wie auch bei Volinia.<sup>67</sup> Die vornehmliche Herkunft von BPH-Gewebes aus der Transitionszone der Prostata (entgegen der vornehmlichen Herkunft des PCa zu 60-70% aus der peripheren Zone)<sup>40</sup> mag auch die miRNA-Expression beeinflussen. Wahrscheinlich sind diese Expressionsunterschiede jedoch eher auf tumorgenetische Veränderungen zurückzuführen als auf die normale Gewebeentwicklung der Prostata.<sup>140</sup>

Die am häufigsten als Referenzgewebe gebrauchte Alternative ist die Nutzung von assoziiertem (nicht-malignem) Prostatagewebe desselben Patienten (von Ambs, Schaefer, Ozen und Wach so praktiziert). Bei dieser Möglichkeit ist von Vorteil, dass interindividuelle Schwankungen keine Rolle spielen. Probleme könnte die teils multifokale Entstehung verschiedener Tumorklone in der peripheren Zone der Prostata bereiten.<sup>40</sup> Bei Gewinnung von Referenzmaterial aus ebendieser Zone könnte unwissentlich tumoröses oder präkanzerös verändertes Material als Referenzgewebe benutzt wird. Dies wäre eine Möglichkeit der Erklärung, warum bei Wach 10% und bei Schaefer 4% der Referenzgewebeproben wiederholt als Tumorgewebe klassifiziert

werden (s. Tabelle 24, S. 64 und Aussage b, S. 65). Weitere Möglichkeiten der Definition des Referenzgewebes wie Gewebe eines anderen Organs desselben Patienten, Prostatakarzinomgewebe eines anderen Patienten oder gesundes Prostatagewebe eines anderen Patienten zu nutzen sind für die vorliegende Fragestellung oder aus ethischen Gründen nicht brauchbar.

Veränderungen der miRNA-Expression im Sinne einer Präkanzerose sind beim nicht selten multifokal entstehenden PCa nicht sicher auszuschließen und damit sind Falschbestimmungen im assoziierten Nachbargewebe möglich.<sup>40</sup> Für einige miRNAs wurde gezeigt, dass ihre Expression sich zwischen BPH und assoziiertem Nachbargewebe nicht unterscheidet (miR-221, -125b, -29a und -16).<sup>119</sup> Diese Ergebnisse lassen sich nicht ohne Weiteres auf alle miRNAs verallgemeinern, sind jedoch ein guter Hinweis auf die untergeordnete Rolle der Wahl des Referenzgewebes im Hinblick auf die Fragestellung, ob malignes Gewebe vorliegt oder nicht.

Zur den gewählten Verfahrensprotokollen: Die benutzten Protokolle können in sehr vielen Punkten voneinander abweichen und entsprechende Folgen für die Interpretation haben. Es soll hier nur auf die Aufreinigung der gesamt-RNA in miRNA eingegangen werden.

Wird diese (z.B. gelelektrophoretische) Aufreinigung durchgeführt, so wird gewährleistet, dass nur RNA <50nt hybridisiert wird, und eine saubere Quantifizierung nur dieser kurzen RNA-Moleküle kann in den Folgeuntersuchungen stattfinden. In der vorliegenden Arbeit wurde eine solche gelelektrophoretische Aufreinigung wie auch bei Schaefer, Ozen und Porkka vorgenommen (s. Kap. 2.7, S. 25).

Bei Wach, Ambs und Volinia wird dagegen diese Aufreinigung nicht unternommen. Dadurch ist es hier möglich, dass die in der Regel 70-80nt langen pre-miRNAs mithybridisiert und mitquantifiziert werden. An den beteiligten Proteinen auf dem Weg von der pre-miRNA zur biologisch aktiven reifen miRNA gibt es nachweislich Veränderungen im Tumorgewebe wie z.B. bei Dicer<sup>141</sup>, so dass die Menge an reifer miRNA nicht mit der an pre-miRNA korrelieren muss. Eine Blockierung der Prozessierung der pre-miRNA könnte bei Vorhandensein eines negativen Feedbackmechanismus ggf. sogar zu einer Überexpression der pre-miRNA bei niedrig

exprimierter, korrespondierender reifer miRNA führen und damit eine hohe Expression bei den genannten Arbeiten vortäuschen.

Interessanterweise sind gerade die Arbeiten *ohne* die genannte Aufreinigung von Wach, Ambis und Volinia die einzigen der hier verglichenen, die konträre Ergebnisse im Sinne entgegengesetzter Regulation einer miRNA zur vorliegenden Arbeit erbringen. Zumindest zum Teil könnten die konträren Ergebnisse oder die geringe Überschneidung der miRNA-Profile auf der Mitbestimmung von pre-miRNA beruhen (Aussagen e und f, S. 65).

Zu den statistischen Methoden und Kriterien der miRNA-Expressionsunterschiede: Die Kriterien, nach welchen eine miRNA als tumorspezifisch akzeptiert wird, variieren von Arbeit zu Arbeit. Die vorliegende Arbeit benutzt mit der False-Discovery-Rate-Methode eine mittelstrenge Korrekturmethode zur Vermeidung des Alphafehlers (Annahme eines Unterschiedes, obwohl keiner besteht; Fehler erster Art). Zur weiteren Definition von miRNAs als differentiell exprimiert nutzt sie daher einen adjustierten p-Wert von  $<0,05$  und zusätzlich einen Expressionsunterschied von  $>2$  (bzw.  $<0,5$ ). Diese insgesamt relativ stringenten Kriterien sollen die irrtümliche Identifikation von tumorspezifischen miRNA vermeiden.

Wach und Porkka benutzen deutlich weniger stringente Kriterien: Würden zum Beispiel die Kriterien Wachs auf die vorliegende Arbeit angewendet, so ergäben sich 94 in größerem Anteil heraufregulierte miRNAs (statt 52 fast ausschließlich herunterregulierte) als signifikant unterschiedlich exprimiert, da Wach zunächst keine Korrektur der Alphafehler-Kumulierung vorgenommen hat und auch kein Mindestwert für die relative Expressionsveränderung verlangt wird. Bei Porkka wird diese Alphafehler-Korrektur überhaupt nicht vorgenommen. Teilweise werden jedoch auch strengere Auswahlkriterien angelegt, so dass z.B. bei Schaefer von den initial 78 miRNAs im für das Clustering verwendeten Expressionsprofil später nur noch 14 miRNAs als unterschiedlich exprimiert betrachtet werden. So kann also ohne Weiteres die Größe des gefundenen miRNA-Expressionsprofils um mehr als 100% schwanken. Volinia nimmt eine Form der Korrektur der Alphafehler-Kumulierung vor, akzeptiert jedoch geringere Expressionsunterschiede (ab 1,5fach). Dies mag eine Erklärung dafür



sein, dass Volinia bei nur 190 untersuchten humanen miRNAs etwa genauso viele signifikant unterschiedlich exprimierte miRNAs (45) in seinem Expressionsprofil gefunden hat wie in der vorliegenden Arbeit (328 untersuchte humane miRNAs und 44 signifikant unterschiedlich exprimierte, s. Tabelle 25, S. 65).

Leider lässt sich keine Aussage dazu machen, welche der miRNAs nun dem Fehler erster Art unterliegen. Auch lassen sich mangels Verfügbarkeit der entsprechenden Daten und in Anbetracht des theoretisch hohen Aufwandes die Ergebnisse der anderen Autoren nicht neu mit vergleichbaren Kriterien berechnen. Dies muss als Schwachpunkt der Vergleichbarkeit hingenommen werden und kann ggf. einen Teil der Unterschiede hinsichtlich der Zusammensetzung der miRNA-Profile erklären (s. Aussagen e und f, S. 65).

Zu den Risikoprofilen der verwendeten Kollektive: Ein weiterer Unterschied zwischen der vorliegenden Arbeit und den publizierten Studien liegt in der Auswahl des untersuchten Kollektivs und mit den entsprechenden klinisch-pathologischen Eigenschaften. Die vorliegende Arbeit greift auf ein oben beschriebenes Hochrisikokollektiv zurück (s. Kapitel 3.1, S. 34 mit Tabellen 13-17, zur Definition s. Kap. 1.1.6, S.6). Durch die oben beschriebene Kollektivauswahl sollte die Chance erhöht werden, im PCa-Gewebe sicher Expressionsunterschiede der miRNAs gegenüber dem BPH-Gewebe zu finden und damit ein miRNA-Expressionsprofil zu identifizieren, das für Prostatakarzinomgewebe spezifisch ist. Innerhalb der Tumorkollektive selbst sollte diese Probenauswahl die Identifikation eines prognoseassoziierten miRNA-Profiles und prognoserelevanter einzelner miRNAs ermöglichen. Ziel sollte es ja sein im Sinne eines Screenings Expressionsveränderungen einzelner oder mehrerer miRNAs zu finden, die es erlauben könnten das Rezidivrisiko genauer zu beschreiben und damit schließlich den Verlauf der Erkrankung vorhersagen zu können. Ein Hochrisikokollektiv kann dies besser leisten, als ein Kollektiv mit mittlerem oder gar niedrigem Rezidivrisiko.

Leider sind die Angaben zum Risikoprofil der einzelnen Kollektive bei den Autoren z.T. unvollständig: Volinia macht zu seinem Kollektiv keine Angaben. Bei Ozen beschränken sich die klinischen Angaben darauf, dass die Hälfte seines Kollektivs

binnen eines Jahres nach Prostatektomie eine PSA-Progression erlitt. Porkka untersuchte mehr Zelllinien und Xenograft-Proben (insgesamt 15) als direkt vom Patienten gewonnene Proben (insgesamt acht). Bei diesen drei Autoren sind Vergleiche der benutzten Kollektive daher nicht möglich bzw. wenig sinnvoll. Ambs verwandte bei seiner Untersuchung ausschließlich Proben mit einem Gleason-Score 6 oder 7 (=niedriges bis mittleres Rezidivrisiko). Der präoperative PSA-Wert betrug im Median 6,1 ng/ml. Zur Vorbehandlung der Patienten und Metastasenstatus wurden keine Angaben gemacht. Insgesamt handelte es sich um ein Kollektiv mit niedrigem bis mittlerem und damit deutlich niedrigerem Rezidivrisiko als in der vorliegenden Arbeit. Angaben zum präoperativen PSA-Wert werden bei Wach et al nicht gemacht. Von den 20 untersuchten Prostatakarzinomproben waren zwei (10%) mit Gleason-Score 9, die übrigen 18 mit Gleason-Score 7, das Kollektiv also ein Mittel- und Hochrisikokollektiv. In der Arbeit von Schaefer wurden PCa mit einem Gleason-Score von 6 oder 7 (81% der Proben) und Gleason-Score 8 oder 9 (19% der Proben) verwandt. Der präoperative PSA-Wert betrug im Median 6,7 ng/ml. Auch Schaefer benutzte damit ein ein Mittel- und Hochrisikokollektiv.

Das Rezidivrisiko der untersuchten Kollektive nimmt von Ambs über Wach bis hin zu Schaefer zu. Eine akzeptable Vergleichbarkeit der Ergebnisse vor dem Hintergrund der Auswahl der Kollektive nach Rezidivrisiko besteht also höchstens mit den Arbeiten von Wach und Schaefer. Die vorliegende Arbeit untersuchte jedoch ausschließlich PCa mit einem hohen Rezidivrisiko und so besteht immer noch ein erheblicher Unterschied zu den anderen Kollektiven – auch zu Wach und Schaefer.

*Zusammenfassend* kann festgehalten werden, dass selbst bei Betrachtung nur dieser vier Kriterien schon erhebliche Unterschiede zwischen den Arbeiten und damit Einflussfaktoren der Ergebnisse bestehen. Die Wahl des Referenzgewebes scheint im Hinblick auf die hier vorliegende Fragestellung eine untergeordnete Rolle zu spielen, könnte aber eine Erklärung dafür liefern, dass zwei Autoren nur weniger präzise mit dem entsprechenden miRNA-Profil in der Lage sind ihr Kollektiv in maligne vs. nicht-maligne einzuordnen (s. Aussage b, S. 65). Für die Aufreinigungsmethode der Gesamt-RNA ist die Stärke des Einflusses nicht klar zu beurteilen. Das Fehlen der Aufreinigung

könnte teilweise erklären, dass miRNAs bei anderen Autoren häufiger als hochreguliert gefunden werden bzw. nicht als signifikant reguliert betrachtet werden (s. Aussage e, S. 65). Die Art der statistischen Auswertung ist sicher ein Schwachpunkt der Vergleichbarkeit und sie erklärt ggf. einen Teil der Unterschiede hinsichtlich der Zusammensetzung der miRNA-Profile (s. Aussagen e und f, S. 65).

Gemeinsamkeiten und Unterschiede der sechs Microarraystudien im Verhältnis zur vorliegenden Arbeit sollten insbesondere vor dem Hintergrund der stark differierenden Kollektive betrachtet werden. Bei Gemeinsamkeiten in den Expressionsprofilen sollte daher die Rolle der betroffenen miRNAs im Prostatakarzinom allgemein als bestätigt gesehen werden. Bei Unterschieden könnten diese zum Teil auf die Eigenschaften des hier untersuchten Hochrisikokollektivs zurückgeführt werden. Diese somit im HR-PCa als neu differentiell exprimiert identifizierten miRNAs könnten daher mit der Aggressivität des Prostatakarzinoms assoziiert sein.

#### **4.1.3 Bewertung des Vergleichs des identifizierten miRNA-Expressionsprofils mit der Literatur**

Den besprochenen Einflussfaktoren ist gemeinsam, dass unter den sechs Microarrayuntersuchungen im Bezug auf die Methoden teils Arbeiten sind, die vergleichbar sind, teils Arbeiten, die nicht oder schlecht mit der vorliegenden vergleichbar sind. Das jeweils untersuchte Studienkollektiv aller sechs Arbeiten ist bezüglich Aggressivität und Rezidivrisiko im Vergleich zu der vorliegenden Arbeit auf einem deutlich niedrigeren Niveau zu sehen. Die sechs Hauptbeobachtungen aus dem Vergleich der sechs Microarraystudien (s. Punkte a bis f, S. 65) können wie folgt bewertet werden.

##### **4.1.3.1 Bewertung übereinstimmender Beobachtungen**

zu den Beobachtungen a) und b)

Nach der obigen Betrachtung der Einflussfaktoren können einige Abweichungen der betrachteten Microarrayuntersuchungen erklärt werden. Einen Einfluss auf die Interpretation der Größe des miRNA-Profiles und der Genauigkeit des Clusterverfahrens mittels des gefunden Expressionsprofils hat dies jedoch nicht.

#### Zu den Beobachtungen c) und d)

Das vorliegende miRNA-Expressionsprofil wird trotz aller dargestellten Unterschiede der Arbeiten in Methoden und Kollektivwahl insgesamt in 34 von 52 miRNAs und damit in weiten Teilen bestätigt. Darüber hinaus werden acht miRNAs wiederholt in allen sechs Arbeiten als herunterreguliert gefunden ohne dass konträre Ergebnisse im Sinne von entgegengesetzter Regulation vorliegen (miR-103, miR-125b, miR-16, miR-205, miR-221/222, miR-23b und let-7c, s. Tab. 26, S. 67). Die Expression der miRNAs miR-125b, miR-16, und miR-221 wurde sogar mittels qRT-PCR bestätigt. Da dies über all die methodischen Unterschiede hinweg in den verschiedenen Risikokollektiven auftritt, ist hier festzuhalten, dass diesen miRNAs mit großer Sicherheit eine Rolle im Prostatakarzinom allgemein zukommt. Wie genau diese beschaffen ist, muss in weiteren Untersuchungen bestimmt werden.

#### **4.1.3.2 Bewertung nicht übereinstimmender Beobachtungen**

##### Zur Beobachtung e)

Dass hier identifizierte miRNAs nur in geringerem Anteil in den anderen Expressionsprofilen vorkommen (14-39%), kann mehrere Gründe haben: Manche Autoren haben einen Teil der hier untersuchten miRNAs nicht mituntersucht. Andere wiederum bestimmten teilweise pre-miRNA mit und erhielten so ggf. Falschbestimmungen. Auch geringfügige Unterschiede in den statistischen Kriterien können schnell eine miRNA aus dem Expressionsprofil ausschließen. Dies erklärt jedoch nicht alle Unterschiede zwischen den betrachteten Expressionsprofilen. Gerade die sich unterscheidende Risikostruktur der Kollektive kann hier ein Grund für Unterschiede in den Expressionsprofilen sein. Welcher Unterschied im Expressionsprofil nun auf methodische Ursachen und welcher auf Eigenschaften der Kollektive zurückzuführen sind, muss in weiteren Untersuchungen gezeigt werden.

##### Zur Beobachtung f)

Bei den acht miRNAs, die in den Kollektiven der anderen Arbeiten eine zu dieser Arbeit konträre Regulationsrichtung aufweisen (s. rote miRNAs in Tab. 26, S. 67), könnten wie unter obigem Absatz zusammengefasst methodische Unterschiede für diese Beobachtung Ursache sein. Ggf. spielen dies miRNAs aber eine Rolle im

hochaggressiven Prostatakarzinom. Eine dieser miRNAs, miR-181b, wird z.B. bei Schaefer und in der vorliegenden Arbeit als herunterreguliert gefunden (Kollektive höheren Risikos) und nur bei Volinia als hochreguliert. Diese Konstellation könnte nun auf die Eigenschaften des vorliegenden Kollektivs zurückzuführen sein und macht miR-181b zu einer weiteren im Hinblick auf die Prognose des Prostatakarzinoms interessanten untersuchenswerten miRNA.

Ähnlich verhält es sich mit den 15 miRNAs, die hier erstmals als differenziell exprimiert im (Hochrisiko-)Prostatakarzinom identifiziert worden sind (miR-100, miR-107, miR-130a, miR-133b, miR-150, miR-152, miR-342, miR-146b, miR-193b, miR-361, miR-27b, miR-30d, miR-324-3p, miR-515-5p und miR-517c, s. [blaue miRNAs](#) in Tab. 26, S. 67). Die Expressionsveränderungen dieser miRNAs kommen im vorliegenden Kollektiv vor, nicht aber in den andern sechs Kollektiven mit geringerem Rezidivrisiko. Hypothetisch könnten diese miRNAs also mit den Eigenschaften des PCa-Kollektivs und letztendlich vielleicht mit der Prognose des PCa assoziiert sein. Für einige dieser miRNAs gibt es mittlerweile Hinweise, wie diese in der Tumorbilogie des PCa impliziert sein könnten, insbesondere auch im Zusammenhang mit tumorbiologischen Veränderungen, die in fortgeschrittenen Stadien eine Rolle spielen. So bewirkt eine niedrige Expression von miR-107 und -27b in vitro eine stärkere Fähigkeit der Tumorzellen zur Zellmigration.<sup>142-143</sup> Bei Niedriger Expression von miR-133b kommt es durch Enthemmung von EGFR in Zelllinien zu stärkerer Tumorzellproliferation.<sup>144</sup> Die vorliegende Arbeit zeigt parallel dazu die Herunterregulation dieser miRNAs in den hier untersuchten fortgeschrittenen Prostatakarzinomen. Damit stellen diese drei miRNAs und ggf. auch die anderen 13 miRNAs aus dieser Gruppe sinnvolle Kandidaten für weitere Untersuchungen im Prostatakarzinom dar, um schließlich miRNAs als Prognosefaktoren identifizieren zu können.

*Zusammenfassend* kann man unter Berücksichtigung der beschriebenen Kriterien und Einschränkungen die erzielten Ergebnisse wie folgt beschreiben: Der Vergleich mit sechs Microarraystudien bestätigt das prostatakarzinomspezifische Expressionsprofil der vorliegenden Arbeit in weiten Teilen. Auch einzelne miRNAs werden als spezifisch

im PCa reguliert und in ihrer Expression bestätigt. So werden die miRNAs miR-103, miR-125b, miR-16, miR-205, miR-221/222, miR-23b und let-7c wiederholt im Prostatakarzinom als herunterreguliert gefunden. Die vorliegende Arbeit bestätigt dies nun auch für hochaggressive Prostatakarzinome. Dass diese miRNAs eine Rolle im Prostatakarzinom spielen, wird damit immer sicherer. Welche Rolle dies jedoch ist (prognostischer Marker?) bleibt noch offen und muss weiter untersucht werden. Die 15 miRNAs miR-100, miR-107, miR-130a, miR-133b, miR-150, miR-152, miR-342, miR-146b, miR-193b, miR-361, miR-27b, miR-30d, miR-324-3p, miR-515-5p und miR-517c (s. **blaue miRNAs** in Tab. 26, S. 67) sowie ggf. weitere acht miRNAs (s. **rote miRNAs** in Tab. 26, S. 67) könnten aufgrund ihrer Spezifität für die hier untersuchten HR-PCa möglicherweise mit der Aggressivität oder der Prognose des Prostatakarzinoms assoziiert sein und sollten dahingehend weiter untersucht werden. Da die hier gefundenen Unterschiede zu den anderen Expressionsprofilen auch auf methodische Unterschiede zurückgeführt werden könnten, wäre die Entwicklung eines Standards notwendig, um Microarrayuntersuchungen in Zukunft besser vergleichen zu können. Darüber hinaus bieten die Ergebnisse eine Grundlage, ausgewählte miRNAs gezielt in größeren Kollektiven (auch prospektiv) zu untersuchen, um die klinische Relevanz der Expressionsunterschiede zu evaluieren und weiterführend zu determinieren.

#### **4.1.4 Identifikation und Bedeutung einzelner prostatakarzinomspezifisch regulierter miRNAs**

Die vorliegende Arbeit zeigt für einige miRNAs im PCa eine differentielle Expression gegenüber Gewebe benigner Prostatahyperplasie. So stellt sich die Frage, welche Funktion diese miRNAs im Rahmen der Tumorgenese und Progression besitzen könnten. MiR-29a und miR-125b sind miRNAs, die hier zusammen in einem Klassifikator Prostatakarzinomproben korrekt von Hyperplasiegewebe unterscheiden können (s. Kap. 3.5.2, S.53), da sie häufig in den hier untersuchten Proben des Prostatakarzinoms herunterreguliert erscheinen. Ihre mögliche Funktion für die Tumorgenese des PCa soll im Folgenden diskutiert werden.

##### **4.1.4.1 miR-29a**

MiR-29a war in der vorliegenden Arbeit im Prostatakarzinom niedrig exprimiert gegenüber dem Kontrollgewebe. In einem Großteil der PCa-Proben des Kollektivs 2 (16 von 23) war miR-29a nach unseren strengen Kriterien herunterreguliert. Die große Häufigkeit dieser Herunterregulation ist bemerkenswert, da sie nahelegt, dass die Expression von miR-29a für das Prostatakarzinom spezifisch ist. So können anhand der Expressionswerte von miR-29a die hier untersuchten Prostatakarzinome in einem Klassifikator mit den zwei weiteren miRNAs miR-125b und miR-221 fehlerfrei vom Kontrollgewebe unterschieden werden (s. Kap. 3.5.2, S. 53). Die Zielgensuche in silico ergab zwei herausstechende Zielgene, die möglicherweise in der Tumorbiologie des PCa zum tragen kommen könnten (MYBL2 und TRAF4, s. Tabelle 21, S. 59).

In der Literatur wurden bisher keine einheitlichen Expressionswerte für miR-29a gefunden (s. Tab. 26, S. 67). Es gibt es mittlerweile Hinweise darauf, dass miR-29a im Regulationsnetzwerk des Androgenrezeptors wirkt und weitere Zielgene von miR-29a wurden experimentell bestätigt: TRIM68, PGK-1, LAMC1 und MCL1.<sup>145-146</sup> Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die in der vorliegenden Arbeit in der in silico Suche gefundenen hypothetischen Zielgene MYBL2 (v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog-like 2) und TRAF4 (tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factor 4) im PCa eine Rolle als Onkogen spielen. In Metastasen des PCa wird MYBL2 deutlich überexprimiert.<sup>147</sup> Für TRAF4 (tumor necrosis factor receptor

(TNFR)-associated factor 4) wurde eine inverse Korrelation der Expression zu miR-29a im metastasierten PCa gegenüber dem lokalisierten PCa gefunden. Zudem wurde TRAF4 ebenfalls experimentell als Zielgen bestätigt.<sup>148</sup> Beide Zielgene unterliegen gerade im metastasierten PCa Veränderungen in ihrer Expression. Auch unsere Daten weisen auf eine Funktion während der Progression des PCa hin, denn im hier untersuchten Hochrisikokollektiv zeigt sich die häufige und deutliche Herunterregulation dieser miRNA. In Kollektiven mit niedrigerem klinischen Risikoprofil zeigt sich jedoch miR-29a nicht als differentiell exprimiert.<sup>114, 116, 139</sup>

Diese Beobachtungen lassen weitere Untersuchungen sinnvoll erscheinen, die zeigen sollen, ob im PCa ein Zusammenhang zwischen der Expression von MYBL2 und miR-29a vorliegt und welcher Wert TRAF4 als Zielgen für miR-29a zukommt. Die Frage nach der Eignung von miR-29a als prognostischer Marker kann noch nicht beantwortet werden. Weitere Untersuchungen an einem erweiterten bzw. unabhängigen Kontrollkollektiv bzw. zur molekularen Funktion dieser miRNA mittels zellbiologischer Analyseverfahren sollten erfolgen.

#### **4.1.4.2 miR-125b**

Trotz einer sehr viel größeren Schwankungsbreite der miRNA-Expression im Tumorgewebe gegenüber dem Referenzgewebe war zu beobachten, dass miR-125b (und miR-221) in allen Tumorproben ausnahmslos herunterreguliert war, die übrigen miRNAs dagegen nur in 17-70% der Proben (s. Abbildung 9, S. 54). In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung wird miR-125b (und miR-221) in verschieden anderen Studien ebenso ausnahmslos als niedrig exprimiert im PCa angegeben (s. Tab. 26, S. 67). Diese Ergebnisse zeigen, dass miR-125b (und miR-221) sehr häufig und signifikant im PCa herunterreguliert ist. Darüber hinaus weist miR-125b (wie miR-221) auch eine sehr starke Herunterregulation auf (Expressionsunterschied <0,5-fach). Interessanterweise wurde in der Zielgensuche in der vorliegenden Arbeit für miR-125b EIF2C2 (=hAgo2) gefunden, das an der Biogenese der miRNAs teilnimmt. Diese Beobachtungen lassen die Spekulation zu, dass miR-125b (und miR-221) eine besondere Rolle in der Tumorbilogie des PCa



zukommt. Daher soll im Folgenden die Bedeutung dieser miRNA für das PCa kurz zusammengefasst werden.

Für die Untersuchung der Frage, ob miR-125b nun als Onkogen oder als Tumorsuppressor wirkt, können folgende Einflussfaktoren beachtet werden: die untersuchte Tumorentität, die Auswahl des Untersuchungsmaterials (Zelllinien vs. klinische Proben) und die Zusammensetzung des untersuchten Kollektivs (s. Tabelle 27, S. 80).

Über miR-125b ist bekannt, dass sie insbesondere mRNA aus der Genfamilie von BCL-2 zum Ziel hat und negativ reguliert: Zu den regulierten Genen der BCL-2-Familie gehören sowohl Gene mit pro-apoptotischer (z.B. BAK1) als auch mit anti-apoptotischer (z.B. MCL1, Bcl-2 und Bcl-X<sub>L</sub>) Wirkung.<sup>149-154</sup> Fielen nun aufgrund von Veränderungen im zellulären Mikromilieu pro-apoptotische Faktoren wie BAK1 aus, könnte eine Herunterregulierung von miR-125b der Tumorprogression gerade in späteren Stadien, in denen die Überexpression von Bcl-2 eine wichtige Rolle spielt, zum Vorteil gereichen, denn die Enthemmung der anti-apoptotischen Faktoren würde dann überwiegen (s. Abbildung 1, S. 11). Ob und in welchem Maße aber BAK1 im PCa (und seinen verschiedenen Stadien) durch andere Mechanismen reguliert wird, ist bisher unbekannt.

Die vorliegende Arbeit zeigt die deutliche und häufige Herunterregulation von miR-125b im HR-PCa. Darüber hinaus wird in Zusammenschau mit der Literatur deutlich, dass miR-125b eine bedeutende Rolle in der Tumorbiologie des PCa zukommt.<sup>112, 155-158</sup> Ihr kommt im fortgeschrittenen PCa wahrscheinlich eher die Rolle eines Tumorsuppressors zu. Weitere Untersuchungen sind jedoch notwendig, um die Rolle von miR-125b im Prostatakarzinom besser zu verstehen. EIF2C2 ist nicht zuletzt als Bestandteil des miRNA-Syntheseapparates ein untersuchenswertes potentiell Zielgen von miR-125b.

Tumor	Untersuchtes Gewebe	Regulations- richtung	Zielgen	miR- 125b Funktion	Referenz
Endometriumkarzinom	Zelllinien	↑	TP53INP1	OG	159
Kolonkarzinom	Klinische Proben	↑	-	-	160
Ovariakarzinom	Zelllinien	↑	BAK1	OG	161
Prostatakarzinom	Zelllinien und Niedrigrisikoproben	↑	BAK1	OG	112
Hepatozelluläres Karzinom	Zelllinien und klinische Proben	↓	MCL1	TS	152
Keimzelltumor	Zelllinien	↓	Lin28/41	TS	162
Mammakarzinom	Zelllinien	↓	ERBB2/3	TS	163
Melanom	Zelllinien	↓	-	-	164

*Tabelle 27: Regulationsrichtung von miR-125b und Assoziation mit Tumorprogression oder Tumorzellvermehrung in verschiedenen Arbeiten. ↑=hochreguliert, ↓=herunterreguliert in Assoziation mit Tumorprogression oder Tumorzellvermehrung. experimentell nachgewiesene Zielgene: Rot= (Proto-) Onkogen, grün= Tumorsuppressor; OG: Onkogen, TS: Tumorsuppressor.*

## **4.2 miRNA-Expressionsunterschiede in Subgruppen des Hochrisiko-Prostatakarzinoms**

Der Untersuchung globaler miRNA-Expressionsprofile im PCa schloss sich die Untersuchung von miRNA-Expressionsunterschieden in Untergruppen des PCa an, um Assoziationen zwischen der miRNA-Expression und bestimmten Prognose- oder Verlaufsgruppen herzustellen (s. Kap. 3.3, S. 43). Zunächst werden dabei die Ergebnisse der Cluster-Analyse diskutiert (s. Kap. 4.2.1, S. 81). Anschließend sollen Expressionsunterschiede in Untergruppen nach klinischem Verlauf betrachtet werden (s. Kap. 4.2.2, S. 82) und einzelne hier untersuchte miRNAs diskutiert werden (s. Kap. 4.2.3, S. 83). Zuletzt konzentriert sich die Diskussion dann auf Expressionsunterschiede in Prognosegruppen des Prostatakarzinoms nach Gleason-Score (s. Kap. 4.2.4, S. 84) und auf die hier als bedeutend identifizierte miR-221 (s. Kap. 4.2.5, S. 85).

Wie oben beschrieben stellen die in dieser Arbeit untersuchten Kollektive 1 und 2 Hochrisikokollektive dar. Entsprechend o.g. Vorselektion besteht das untersuchte Kollektiv 1 (n=14, Microarray) bzw. Kollektiv 2 (n=23, qRT-PCR) zu 43% bzw. 48% aus Proben mit einem Gleason-Score 10 und einem dementsprechend aggressiven klinischen Verlauf. Die Proben mit Gleason-Score 6/7 des jeweiligen Kollektivs zeichneten sich hingegen durch einen sehr günstigen klinischen Verlauf aus (s. Kap. 3.1, S. 34 mit den Tabellen 13 bis 17 sowie Kap. 4, S. 61, Absatz 2). Diese Auswahl wurde vorgenommen, um innerhalb der untersuchten Tumorkollektive miRNAs zu identifizieren, die mit der Prognose des PCa assoziiert sind.

### **4.2.1 Nicht-überwachte hierarchische Clusteranalyse**

Mit 24 miRNAs, die die größten Expressionsunterschiede zwischen den Tumoren mit und ohne klinischer Progression zeigten, wurde eine nicht-überwachte hierarchische Clusteranalyse durchgeführt. Diese wies im Dendrogramm vier von sieben PCa mit klinischer Progression einen Hauptast zu. Der zweite Hauptast beinhaltet alle übrigen PCa, drei mit und sieben ohne klinische Progression (s. Abbildung 6, S. 47, und Tabelle 19, S. 48). Somit ist mit Hilfe des miRNA-Expressionsprofils eine partielle Trennung in aggressiv verlaufende und weniger aggressiv verlaufende PCa festgestellt worden.

Porkka konnte ebenfalls in einem Clusterverfahren eine tendenzielle Trennung seines Kollektivs von Prostatakarzinomen nach weniger und mehr fortgeschrittenen Tumoren finden.<sup>116</sup> Dazu benutzte sie allerdings die Expressionsdaten von weit über 100 miRNAs. Die vorliegende Arbeit erbringt ein dazu vergleichbares Ergebnis (im Sinne von Unterscheidung in Untergruppen im Clusterverfahren) unter Nutzung von weit weniger Expressionsdaten (24 miRNAs) und erreicht eine Trennung in Subgruppen nach dem klinischen Verlauf. Die Ursache für dieses Gelingen der Gruppierung ist vor allem in der Auswahl des Kollektivs zu sehen.

Kritisch muss angemerkt werden, dass mittels der vorliegenden miRNAs-Expressionsdaten von 24 miRNAs eine signifikante Unterscheidung zwischen Prostatakarzinomen mit bestimmten klinisch-pathologischen Eigenschaften nicht möglich ist. Die Anzahl der in der vorliegenden Arbeit verwendeten miRNAs (24) ist bei vergleichbarem (nicht-signifikantem) Ergebnis mit partieller Trennung nach klinischen Parametern allerdings deutlich geringer als in bisherigen Arbeiten. Dies stellt einen weiteren Schritt zur Identifikation von einigen wenigen miRNAs dar, die in ihrer Expression mit klinisch-pathologischen Eigenschaften korrelieren. Es sollte eine Validierung in einem größeren unabhängigen Kollektiv erfolgen.

#### **4.2.2 miRNA-Expressionsunterschiede nach klinischem Verlauf des Hochrisiko-Prostatakarzinoms**

Die vorliegende Arbeit identifizierte im Kollektiv 1 die miRNAs miR-515-3p und miR-147 als herunterreguliert in PCa-Proben mit klinischer Progression gegenüber solchen ohne klinische Progression (s. Tab. 19, S. 48). Veröffentlichte Studien lassen vermuten, dass bestimmte miRNAs mit der Progression des Prostatakarzinoms assoziiert sind und damit letztlich Potential zum prognostischen Marker haben könnten. So entdeckte Ambis et al., dass miR-99b und miR-196a in seinem Kollektiv von Prostatakarzinomproben in ihrer Expression mit der extraprostatatischen Ausbreitung korrelierten.<sup>118</sup> Für miR-143 wurde eine Korrelation mit dem Gleason-Score beschrieben.<sup>139</sup> Für miR-221 wurde eine Korrelation mit der Metastasierungsrate festgestellt.<sup>119</sup> Im Folgenden soll daher auf die beiden miRNAs miR-515-3p und miR-147 eingegangen werden, die aufgrund der vorliegenden Arbeit in diese Kategorie von miRNAs gehören könnten.

## **4.2.3 miR-515-3p und miR-147 – mögliche Bedeutung im Prostatakarzinom**

### **4.2.3.1 miR-515-3p**

In der Literatur ist über miR-515-3p nicht viel bekannt. Die Überexpression von miR-515-3p mit negativer Regulierung von RasG12V (einer mutierten Variante von HRAS) und konsekutiver p21Waf1/Cip1-Herunterregulation (=CDKN1A) führt in bestimmten Zelllinien zu ausbleibender Zellseneszenz und ausbleibendem Zellzyklusarrest führt.<sup>165</sup> In diesem Zusammenhang könnte auch die Regulation von CDKN1B (= p27<sup>kip1</sup>) durch miR-515-3p eine Rolle spielen, das hier als potentielles Zielgen in der Datenbanksuche gefunden wurde (s. Tabelle 22, S. 60). Dieser Zusammenhang sollte im Prostatakarzinom weiter untersucht werden.

### **4.2.3.2 miR-147**

Neben des oben erläuterten Expressionsverhaltens von miR-147 in Verlaufsgruppen des PCa wurde bei den Untersuchungen im Kollektiv 1 eine Heraufregulierung in den PCa-Proben mit Gleason-Score 6/7 gegenüber dem BPH-Gewebe und gegenüber Proben mit Gleason-Score 10 gefunden. Zwischen den Proben mit Gleason-Score 10 und den BPH ließ sich kein signifikanter Unterschied in der Expression feststellen.

Über miR-147 ist bekannt, dass sie (zusammen mit miR-124 und miR-193a-3p) im Brustkrebs verschiedene Proteine des EGFR-(epidermal growth factor receptor)-Signaltransduktionsweges negativ reguliert, so dass es bei hoher Expression von miR-147 zu einem Zellzyklusarrest kommt.<sup>166</sup> In fortgeschrittenen PCa ist EGFR regelhaft heraufreguliert, nicht jedoch in weniger fortgeschrittenen.<sup>57</sup> Sollte ein Zusammenhang zwischen der hohen miR-147-Expression und der niedrigen EGFR im PCa bestehen, so könnte die oben beschriebene Heraufregulierung von miR-147 in GS6/7 hypothetisch dem Expressionsmuster von EGFR zu entsprechen (hohe Expression von miR-147 in weniger fortgeschrittenen PCa mit Gleason-Score 6/7 und zeitgleiche niedrige Expression von EGFR sowie niedrige Expression von miR-147 in PCa mit Gleason-Score 10 und hoher Expression von EGFR). Dieser Zusammenhang muss jedoch noch im Prostatakarzinom selbst untersucht werden, um miR-147 eine ggf. prognostische Bedeutung zuordnen zu können.

*Zusammenfassend* liefert die vorliegende Arbeit aufgrund ihrer Ergebnisse in Zusammenschau mit der aktuellen Literatur gute Gründe, die Rolle von miR-515-3p bzw. miR-147 im Zusammenspiel mit ihren teils nachgewiesenen teils hypothetischen Zielgenen CDKN1B bzw. EGFR mit Blick auf deren Verwendung als Prognosefaktoren im Prostatakarzinom weiter zu untersuchen. Die Frage, ob das jeweilige Expressionsverhalten dieser drei miRNAs wirklich auf das unterschiedliche Tumorstadium zurückzuführen ist, lässt sich mit den vorliegenden Informationen nicht beantworten. Um wirkliche Korrelationen oder kausale Zusammenhänge zwischen der Expression der miRNAs miR-515-3p und miR-147 und ihren entsprechenden Zielgenen im Prostatakarzinom herstellen zu können bzw. eine miRNA als einen prognostisch aussagekräftigen Biomarker zu bestätigen, sind funktionelle Untersuchungen, deutlich größere Fallzahlen sowie entsprechende statistische Analysen notwendig.

#### **4.2.4 miRNA-Expressionsunterschiede in Prognosegruppen des Hochrisiko-Prostatakarzinoms nach Gleason-Score**

Wenn Prognosegruppen nach dem Gleason-Score gebildet wurden und hier die miRNA-Expression verglichen wurde, dann ergaben sich sechs miRNAs beim Vergleich GS10 vs. GS6/7 als signifikant unterschiedlich exprimiert, darunter die drei miRNAs miR-422a, miR-515-3p und miR-147 (s. Abb. 5, S. 46). Es zeigen sich also signifikante Expressionsunterschiede, diese sind aber bei weitem nicht so ausgeprägt wie die Expressionsunterschiede zwischen Tumor und Hyperplasiegewebe, wo 52 signifikant unterschiedlich exprimierte miRNAs gefunden wurden (s. Abb. 4, S. 42). Die Expression innerhalb des Tumorkollektivs ist also ähnlicher als zwischen Tumor- und Referenzgewebe. Daneben unterliegen einzelne miRNAs im PCa deutlich höheren Schwankungen als im Referenzgewebe (s. Abb. 8, 11 und 12, S. 52, 56 und 57).

Um die mögliche Rolle einzelner miRNAs im Prostatakarzinom besser zu verstehen, ist es ratsam den Wirkmechanismus der jeweiligen miRNA zu betrachten, soweit dieser bekannt ist. Die miRNAs miR-515-3p und miR-147 wurden dahingehend bereits kurz diskutiert (s. Kap. 4.2.3, S. 83).

MiR-422a war besonders interessant, weil sie im untersuchten Kollektiv 1 in der Gruppe mit Gleason-Score 10 signifikant niedriger exprimiert war. Für miR-422a

konnte dieses Expressionsverhalten jedoch im Kollektiv 2 nicht bestätigt werden, miR-422a war hier im PCa gegenüber dem Referenzgewebe insgesamt herunterreguliert (s. Abb. 8 und 11, S. 52 und 56). In Zusammenschau mit der Literatur könnte miR-422a dennoch eine Rolle hinsichtlich der Prognose zukommen: Als hypothetisches Zielgen von miR-422a wurde in der *in silico* Suche IGF1R (Insulin-like growth factor 1 receptor) gefunden (s. Tabelle 23, S. 60). Dieser Rezeptor ist im Prostatakarzinom bekanntermaßen überexprimiert.<sup>167</sup> In einem anderen Tumor (dem Osteosarkom Jugendlicher) kommt der Herunterregulation von miR-422a offenbar eine prognostische Bedeutung zu.<sup>168</sup> Mit der Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der Expression von IGF1R und miR-422a im Prostatakarzinom sollte daher die Bedeutung von miR-422a weiter geklärt werden.

#### **4.2.5 Die Rolle von miR-221**

Die Ergebnisse dieser Arbeit zur Expression von miR-221 im Prostatakarzinom lassen vermuten, dass dieser miRNA eine besondere Rolle im Prostatakarzinom zukommt, denn folgende Beobachtungen konnten an Hand der vergrößerten Untersuchungsgruppe (Kollektiv 2) gemacht werden: Zum einen konnte die Expression von miR-221 als im Prostatakarzinom gegenüber Referenzgewebe herunterreguliert validiert werden (s. Abb. 8, S. 52). Trotz einer sehr viel größeren Schwankungsbreite der miRNA-Expression im Tumorgewebe gegenüber dem Referenzgewebe war zu beobachten, dass miR-221 (und miR-125b) in allen Tumorproben ausnahmslos herunterreguliert war, die übrigen miRNAs dagegen nur in 17-70% der Proben (s. Abb. 9, S. 54). In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung wird miR-221 (und miR-125b) in verschiedenen anderen Studien ebenso ausnahmslos als niedrig exprimiert im PCa angegeben (s. Tab. 26, S. 67). Diese Ergebnisse zeigen, dass miR-221 (und miR-125b) sehr häufig und signifikant im PCa herunterreguliert ist. Außerdem weist miR-221 (wie miR-125b) auch eine sehr starke Herunterregulation auf (Expressionsunterschied <0,5-fach). Darüber hinaus ist miR-221 in Tumoren mit Gleason-Score 10 gegenüber Tumoren mit Gleason-Score 6/7 statistisch signifikant niedriger exprimiert (s. Abb. 12, S. 57). Diese Beobachtungen lassen die Spekulation zu dass miR-221 (und miR-125b) eine besondere Rolle in der Tumorbilogie (nicht zuletzt des höhergradigen

Prostatakarzinoms nach Gleason) und in der Prognose des PCa zukommt. Daher soll im Folgenden die Bedeutung dieser miRNA für das PCa erörtert werden. MiR-125b wurde bereits an anderer Stelle diskutiert (s. Kap. 4.1.4.2, S. 78).

#### **4.2.5.1 miR-221 als Onkogen oder Tumorsuppressor**

Die Datenlage zur miR-221-Expression und ihrer Funktion in Tumoren ergibt ein sehr heterogenes Bild (s. Tab. 28, S. 87). In verschiedenen Arbeiten wurde miR-221 in einigen Tumoren, z.T. auch im PCa, bald als überexprimiert und bald als niedrig exprimiert gefunden, jeweils in Assoziation mit vermehrtem Zellproliferation/verringertes Apoptoserate oder mit Tumorprogression. Entsprechend werden aus den Untersuchungen jeweils unterschiedliche Funktionen für miR-221 abgeleitet: Teils onkogene Funktion, teils tumorsuppressorische Funktion. Die untersuchte Tumorentität, die Auswahl des Untersuchungsmaterials (Zelllinien vs. klinische Proben) und die Zusammensetzung des untersuchten Kollektivs (wenig fortgeschrittene vs. fortgeschrittene Tumore) scheint für die Beurteilung der Funktion wichtig zu sein. Diese scheinbar konträren Beobachtungen zur Funktion von miR-221 (Onkogen vs. Tumorsuppressor) sollen im Folgenden kurz untersucht werden.



Tumor	Untersuchtes Gewebe	Regulations- richtung	Zielgen	MiR-221 Funktion	Referenz
Glioblastom	Zelllinien und klinische Proben	↑	CDKN1B =p27 <sup>Kip1</sup>	OG	169
Hepatozelluläres Karzinom	Zelllinien und klinische Proben	↑	PTEN	OG	170
Magenkarzinom	Klinische Proben	↑	-		171
Phäochromozytom	Zelllinien	↑	BLCL2L11 =Bim	OG	172
Erythroleukämie	Zelllinien	-	KIT =c-kit	TS	173
Prostatakarzinom	Zelllinien	↑	CDKN1B =p27 <sup>Kip1</sup>	OG	125
Prostatakarzinom	Klinische Proben	↓	KIT =c-kit*	TS	119

*Tabelle 28: Regulationsrichtung von miR-221 und Assoziation mit Tumorprogression oder Tumorzellvermehrung in verschiedenen Arbeiten. ↑=hochreguliert, ↓=herunterreguliert in Assoziation mit Tumorprogression oder Tumorzellvermehrung, experimentell nachgewiesene Zielgene: Rot= (Proto-) Onkogen, grün= Tumorsuppressor; OG: Onkogen, TS: Tumorsuppressor; \*= lediglich Korrelationsnachweis.*

#### 4.2.5.2 Das zelluläre Mikromilieu als Ursache unterschiedlicher Funktionen der miR-221

Mittlerweile ist weitgehend akzeptiert, dass die Expression und Wirkung einzelner miRNAs von einem spezifischen zellulären Mikromilieu abhängen, und dass es nicht einen singulären Zusammenhang zwischen dem Expressionsniveau einer einzigen miRNA und einer bestimmten mRNA gibt, sondern dass vielmehr eine Vielzahl von (z.T. von verschiedenen miRNAs abhängigen) Faktoren zu einem bestimmten Expressionsprofil führt.<sup>67, 174</sup> So mag p27<sup>Kip1</sup> im PCa zwar eine Rolle spielen (s. Kapitel 1.1.7, S. 9), aber dessen Regulation erheblich anders ablaufen, als dies im Glioblastomzelllinienmodell beobachtet wurde. Z.B. wird in 47% von Prostatakarzinommetastasen ein Verlust der Heterozygotie im Bereich des Genes CDKN1B (= p27<sup>Kip1</sup>) gefunden.<sup>175</sup> Weitere Mechanismen, die zu einer niedrigen Expression von p27<sup>Kip1</sup> im PCa führen sind bereits erforscht.<sup>176-177</sup> Die Regulation von p27<sup>Kip1</sup> über eine hohe miR-221-Expression wäre für den Tumor nicht mehr von Vorteil, da dies bereits über andere Mechanismen vom Tumor erreicht wurde.

Ähnliche Überlegungen müssen für Ergebnisse aus Zellkulturuntersuchungen angestellt werden. Bei Zellkulturen handelt es sich i. d. R. um einen einzigen Klon eines Tumors, der sich an sehr spezielle Kulturbedingungen angepasst hat. Aspekte wie die Invasion, Metastasierung, tumorfördernde Inflammation, Immunflucht und Induktion von Angiogenese werden im Zellkulturmodell nur selten abgebildet.<sup>178</sup> Für miR-221 wurde an HUVECs (human umbilical vein endothelial cells) nachgewiesen, dass sie im Bereich der Angiogenese regulatorisch über c-kit wirksam ist.<sup>179</sup> Bei hohen miR-221-Spiegeln bleibt die Angiogenese in diesem Modell aus. Möglicherweise kommt dieser Effekt auch im PCa zum tragen. Zumindest eine negative Korrelation der miR-221-Expression mit der mRNA-Expression des Protoonkogens c-kit in klinischen Proben des PCa wurde nachgewiesen.<sup>119</sup> In vivo könnte der pro-angiogenetische Effekt der Herunterregulation von miR-221 also vielleicht eine wichtigere Rolle spielen als die in Zellkulturuntersuchungen nachgewiesenen Effekte von miR-221.

Auch sind Veränderungen des zellulären Mikromilieus über die Entwicklung des PCa hin zu aggressiven Formen denkbar. Bestimmte genetische Alterationen treten teils bevorzugt in frühen (Inaktivierung von Tumorsuppressoren) und teils bevorzugt in späteren Stadien des PCa auf (Aktivierung von Onkogenen, s. Kapitel 1.1.7, S. 9). In einem Hochrisikokollektiv des PCa wurde eine allgemein niedrige (97,8% der Proben) und darüber hinaus zunehmend niedrige miR-221-Expression in Metastasen beobachtet.<sup>119</sup> Auch in der vorliegenden Arbeit findet sich ein Hochrisikokollektiv (s. Kap. 3.1, S. 34). Die Veränderung der miR-221-Expression über Tumorstadien hinweg reflektiert daher möglicherweise Veränderungen des zellulären Mikromilieus. In diesem Zusammenhang könnten hier gefundene potentielle Zielgene der miR-221 mit onkogenen Eigenschaften eine Rolle spielen, FOS (=c-fos) und IRF2 (s. Tabelle 22, S. 60). Bei beiden gibt es nun erste Hinweise, dass sie im PCa von Bedeutung sind.<sup>180-181</sup>

#### **4.2.5.3 miR-221 als Tumorsuppressor im Hochrisiko-Prostatakarzinom**

Die vorliegende Arbeit zeigt die deutliche und häufige Herunterregulation von miR-221 im Hochrisiko-Prostatakarzinom. In Zusammenschau mit der Literatur wird deutlich, dass miR-221 eine bedeutende Rolle in der Tumorbiologie des Prostatakarzinoms zukommt. Worin genau diese Rolle besteht, hängt jedoch insbesondere von einem

zellulären Mikromilieu ab und muss noch weiter untersucht werden. Wahrscheinlich überwiegt im fortgeschrittenen PCa die Tumorsuppressorfunktion der miR-221. FOS und IRF2 sind mögliche und untersuchenswerte Zielgene von miR-221.

#### **4.2.5.4 miR-221 als Prognosefaktor im Hochrisiko-Prostatakarzinom**

In der vorliegenden Arbeit wird für die Expression von miR-221 eine Assoziation mit dem Gleason-Score gefunden (s. Abb. 12, S. 57). Mittlerweile gibt es weitere Nachweise, dass miR-221 mit der Prognose des Prostatakarzinoms assoziiert ist: Spahn wies eine solche Assoziation zwischen der miR-221-Expression und dem Gleason-Score sowie der klinischen Progression ebenso nach.<sup>119</sup> Er geht sogar weiter und stellt die Hypothese auf, dass miR-221 eine stärkere prognostische Aussagekraft als der Gleason-Score habe. Nur eine prospektive Studie an einem großen Kollektiv könnte dies bestätigen.

*Zusammenfassend* kann die vorliegende Arbeit eine wichtige Rolle von miR-221 im Prostatakarzinom und insbesondere im HR-PCa nachweisen. Sie zeigt, dass miR-221 das Potential zu einem prognostischen Marker besitzen könnte. MiR-221 sollte in einem größeren Kollektiv im Zusammenhang mit möglichen Zielgenen, wie z.B. FOS und IRF2, untersucht werden, um dieses Potential zu bestätigen.

### **4.3 Potentielle Zielgene elf ausgewählter miRNAs**

Aufgrund der posttranskriptionellen Inhibierung einer Vielzahl von Zielgenen durch einzelne miRNAs kann vermutet werden, dass die aberrante Expression tumorassoziierter miRNAs einen Einfluss auf bekannte Onkogene oder Tumorsuppressoren ausübt. Mit den bekannten Bindungssequenzen in der mRNA der jeweiligen Zielgene der miRNAs ist es möglich mittels frei zugänglicher Online-Datenbanken potenzielle Zielgene für die jeweiligen miRNAs *in silico* vorherzusagen. Für die elf miRNAs miR-125b, -126, -147, -16, -221, -29a, -422a, 515-3p, -515-5p, -let-7a und -let-7b wurden insgesamt 365 Zielgene bei einer Suche *in silico* in drei Datenbanken gefunden (s. Tabellen 21 und 22, S. 59 und 60). Bei genauerer Betrachtung der gefundenen Zielgene fällt auf: Die meisten aufgelisteten Gene sind nicht direkt mit der Entstehung oder Promotion von Tumoren assoziiert. Zudem sind in

den Datenbanksuchen einige bereits experimentell nachgewiesenen Zielgene der entsprechenden miRNAs nicht zu finden. Beides ist leicht erklärbar. Wenn man bedenkt, dass Schätzungsweise 30% aller Gene durch miRNAs im Rahmen der physiologischen Zelldifferenzierung und Entwicklung reguliert werden, so ist verständlich, dass viele gefundenen Gene nichts mit Tumorgenese zu tun haben.<sup>61</sup> Das Fehlen bereits experimentell nachgewiesener Zielgene ist darauf zurückzuführen, dass diese Gene z.T. nur in einer oder zwei der o. g. Datenbanken gefunden wurden und daher nicht die angewandten Suchkriterien erfüllen. So wird HMGA2 für die let-7-Familie nur bei PicTar und TargetScan gefunden. Gleiches gilt für BCL-2 bei miR-16. Dennoch wurden auch Zielgene entdeckt, die ihrer Funktion nach eine Rolle in der Tumorentstehung haben oder haben könnten, so z.B. Cell Cycle Checkpoint Kinase (CHK1 bzw. CHEK1) für miR-16 und Avian Myeloblastosis Viral Oncogene Homolog-Like 2 (MYBL2) für miR-29a.

Bei der Interpretation der gefundenen potentiellen Zielgene ist zu bedenken, dass die Suche nach Zielgenen für miRNAs geschah, die allesamt im Karzinomgewebe herunterreguliert sind. So kommen entsprechend nur solche Zielgene für die Tumorenstehung und -progression in Frage, die Onkogene sind. Nur so kann die Herunterregulation der miRNAs im Tumor über eine nachfolgende verstärkte Expression des entsprechenden Zielgens einen kanzerogenen Effekt haben. Auch die molekulare Mikroumgebung kann hier eine große Rolle spielen (s. auch 4.2.5.2, S. 87).

Bei weiterem Vergleich der gefundenen Zielgene fielen 46 davon auf, deren mRNA Ziel von zwei miRNAs ist (s. Tabelle 23, S. 60). Dies ist insofern interessant, da man annehmen könnte, dass die beiden miRNAs ggf. zu einem gemeinsamen Netzwerk gehören, eben weil sie ein gemeinsames Zielgen haben. 35 (etwa 75%) von diesen Zielgenen waren Ziele der let-7-Familie und damit wahrscheinlich auf die deutliche Sequenzhomologie innerhalb dieser Familie zurückzuführen. Die übrigen 11 miRNAs jedoch waren Ziele sequenzunterschiedlicher miRNAs. Gerade wenn es um eine therapeutische Anwendung von miRNAs geht, wäre es sinnvoll im Sinne synergistischer Effekte an einem Zielgen verschiedene Angriffsstellen zu benutzen und nicht dieselbe. Eine bekannte Funktion von gefundenen Zielgenen haben beispielsweise

folgende: Die RGS-Familie (regulator of G-protein signaling), vermeintlich gemeinsames Zielgen von miR-126 und -147, spielt eine Rolle bei der Chemoresistenz von Brustkrebs.<sup>72</sup> ESSRA als vermeintliches Zielgen von miR-125b und -16 ist ein wichtiger Bestandteil des WNT-Signaltransduktionsweges, der in frühen Stadien des PCa eine Rolle spielt.<sup>49, 182</sup>

Im Rahmen dieser Untersuchungen muss Folgendes kritisch angemerkt werden. Die Tatsache, dass z.B. nicht eindeutig bekannt ist, ob eine miRNA absolut komplementär zu ihrer Ziel-mRNA sein muss, um eine regulatorische Wirkung zu haben, stellt eine maßgebliche Grenze für die Wertigkeit der in silico Zielgensuche von miRNAs dar. So werden in silico Zielgene aufgespürt, die offensichtlich keine zellbiologische oder klinische Relevanz zu besitzen scheinen. Auf der anderen Seite ist zu vermuten, dass beim Versuch diese vielen Zielgene auf ein vernünftiges Maß zu reduzieren, einige relevante Gene außer Acht gelassen. Daher ist es erforderlich die Bedeutung möglicher Zielgene tumorassoziierter miRNAs in vitro und in vivo zu validieren.

Dennoch kann diese Methode Anhaltspunkte geben, und die vorliegende Arbeit stellt mit CHEK1/miR-16, MYBL2/miR-29a, RGS/miR-126/miR-147, ESSRA/miR-125b/miR-16, IRF2/FOS/miR-221 sowie EIF2C2/miR-125b einige untersuchenswerte Paare im Zusammenhang mit der Prostatakarzinomentstehung und -promotion vor. Weitere Untersuchungen müssen jedoch den molekularen Nachweis eines Zusammenhanges zwischen aberrant exprimierter miRNA und dem jeweiligen Zielgen erbringen und dies dann mit anderen Alterationen der jeweiligen Signalkaskaden in Verbindung setzen.

## 5 Zusammenfassung

Das Prostatakarzinom (PCa) stellt die zweithäufigste krebsbedingte Todesursache bei Männern in Deutschland dar. Seine heterogenen Verlaufsformen erschweren es, eine optimale Therapieentscheidung zu treffen, denn die derzeit bekannten klinischen und molekularen Prognosemarker sind trotz intensiver Forschungsbemühungen nicht ausreichend in der Lage den Krankheitsverlauf vorherzusagen. Große Hoffnungen auf brauchbare prognostische Marker werden seit ihrer Entdeckung in miRNAs gesetzt, kleine genregulatorische, nicht-kodierende RNAs. MiRNAs regulieren im Rahmen einer posttranskriptionellen Inhibierung die Expression einer Vielzahl relevanter Zielgene. Für einige miRNAs ist bereits belegt, dass ihre differentielle Expression in verschiedenen Tumorentitäten mit der Genese und in einzelnen Fällen auch mit der Prognose assoziiert ist.

Diese Arbeit sollte untersuchen, welches globale miRNA-Expressionsprofil in einem Kollektiv von Hochrisiko-Prostatakarzinomen (HR-PCa) vorliegt und welche miRNAs im HR-PCa aberrant exprimiert sind. Zudem sollte sie klären, ob Assoziationen der so identifizierten miRNAs mit Prognosegruppen des PCa vorliegen. Somit sollten erste Hinweise auf prognostisch relevante miRNAs und deren mögliche Bedeutung für die Tumorgenese aber auch für die Progression des PCa erbracht werden. Hierzu wurde die Expression von 640 miRNAs mittels Microarray-Analysen in Proben eines HR-PCa-Kollektivs (n=14) bestimmt und anschließend die Expression von acht tumorassoziierten miRNAs mittels qRT-PCR in einem erweiterten HR-PCa-Kollektiv (n=23) evaluiert. Um eine Grundlage für weitere molekulare Analysen vorzubereiten, wurde eine Zielgensuche in drei verschiedenen Datenbanken für elf potentielle Onkomirs durchgeführt.

Im Vergleich zum nicht-tumorös veränderten Referenzgewebe wurden mittels Microarray-Analyse im HR-PCa 52 miRNAs als signifikant unterschiedlich exprimiert detektiert und es zeigte sich eine ausgeprägte Herunterregulation der globalen miRNA-Expression im HR-PCa. Mit diesen 52 miRNAs konnte in einer Clusteranalyse das Referenzgewebe von HR-PCa unterschieden werden. Bei 21 tumorspezifischen miRNAs zeigte sich eine Überlappung mit Daten bereits publizierter Studien. Hierunter

fanden sich die als Onkomirs beschriebenen miRNAs miR-let-7a, miR-126 und miR-16 mit jeweils möglichen Zielgenen wie z.B. MAP4K3, EGFR und ESSRA. 15 miRNAs waren – im Gegensatz zur Expression in Kollektiven mit konventionellem Risikoprofil – im HR-PCa gegenüber nicht-malignem Referenzgewebe signifikant unterschiedlich exprimiert, darunter miR-515-5p mit den vorhergesagten Zielgenen C13orf34 und CDCA7. Die vorliegenden qRT-PCR-Analysen zeigten eine deutliche und häufige Herunterregulation von miR-221, -125b und -29a im HR-PCa. Als mögliche Zielgene wurden z.B. FOS und IRF2 für miR-221, EIF2C2 für miR-125b sowie MYBL2 und TRAF4 für miR-29a vorhergesagt. Mit den genannten drei miRNAs konnte das HR-PCa vom nicht-malignen Referenzgewebe unterschieden werden.

Anhand eines Expressionsprofils von 24 miRNAs war eine partielle Trennung der Kollektive nach Gleason-Score möglich. Die miRNAs miR-147 und miR-515-3p waren in den Microarray-Analysen in Prognosegruppen nach dem Gleason-Score signifikant unterschiedlich exprimiert. Eine mittels qRT-PCR determinierte niedrige Expression von miR-221 konnte mit hohem Gleason-Score assoziiert werden. Die signifikant unterschiedliche Expression von miR-422a in Prognosegruppen des PCa konnte in den Validierungsexperimenten nicht bestätigt werden.

Die miRNAs miR-147, miR-515-3p bzw. miR-221 sind mit Blick auf ihr Potential als Prognosefaktoren Kandidaten für weitere Untersuchungen. Als potentielle Zielgene wurden z.B. RGS3, CDKN1B bzw. FOS/IRF2 vorhergesagt.

Die Bedeutung einzelner miRNAs als mögliche prognostische Marker sollte in größeren Kollektiven und anhand von funktionellen Untersuchungen weiter geklärt werden. Die vorliegende Arbeit stellt eine Grundlage dar, um in weiterführenden Untersuchungen die hier im HR-PCa aberrant exprimierten miRNAs als brauchbare prognostische Marker für das PCa zu bestätigen und deren molekulare Funktionen im Rahmen der Genese des HR-PCa zu definieren.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Krebs in Deutschland für 2013/2014. 11. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.). Berlin, 2017.
2. Klein EA, Platz EA, Thompson IM. Epidemiology, Etiology and Prevention of Prostate Cancer. In: Wein AJ, Kavoussi LR, Novick AC, Partin AW, Peters CA, (Hrsg.). Campbell-Walsh urology. 9. Auflage. Philadelphia: Saunders/Elsevier; 2007. S. 2863.
3. Sakr WA, Haas GP, Cassin BF, Pontes JE, Crissman JD. The frequency of carcinoma and intraepithelial neoplasia of the prostate in young male patients. *J Urol.* 1993 Aug;150(2 Pt 1):379-385.
4. Scardino PT, Weaver R, Hudson MA. Early detection of prostate cancer. *Hum Pathol.* 1992 Mar;23(3):211-222.
5. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): Konsultationsfassung: Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms, Lang-version 4.0, 2016 AWMF Registernummer: 043/022OL, <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Prostatakarzinom.58.0.html> (Zugriff am: 10.02.2018)
6. Lilja H, Ulmert D, Vickers AJ. Prostate-specific antigen and prostate cancer: prediction, detection and monitoring. *Nat Rev Cancer.* 2008 Apr;8(4):268-278.
7. Andriole GL, Crawford ED, Grubb RL, 3rd, Buys SS, Chia D, Church TR, et al. Mortality results from a randomized prostate-cancer screening trial. *N Engl J Med.* 2009 Mar 26;360(13):1310-1319.
8. Schroder FH, Hugosson J, Roobol MJ, Tammela TL, Ciatto S, Nelen V, et al. Screening and prostate-cancer mortality in a randomized European study. *N Engl J Med.* 2009 Mar 26;360(13):1320-1328.
9. Tsodikov A, Gulati R, Heijnsdijk EAM, Pinsky PF, Moss SM, Qiu S, et al. Reconciling the Effects of Screening on Prostate Cancer Mortality in the ERSPC and PLCO Trials. *Ann Intern Med.* 2017 Oct 3;167(7):449-455.
10. Telesca D, Etzioni R, Gulati R. Estimating lead time and overdiagnosis associated with PSA screening from prostate cancer incidence trends. *Biometrics.* 2008 Mar;64(1):10-19.
11. Postma R, Schroder FH, van Leenders GJ, Hoedemaeker RF, Vis AN, Roobol MJ, et al. Cancer detection and cancer characteristics in the European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer (ERSPC)--Section Rotterdam. A comparison of two rounds of screening. *Eur Urol.* 2007 Jul;52(1):89-97.
12. Draisma G, Boer R, Otto SJ, van der Cruijsen IW, Damhuis RA, Schroder FH, et al. Lead times and overdetection due to prostate-specific antigen screening: estimates from the European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2003 Jun 18;95(12):868-878.
13. Gretzer MB, Partin AW. Prostate Cancer Tumor Markers. In: Wein AJ, Kavoussi LR, Novick AC, Partin AW, Peters CA, (Hrsg.). Campbell-Walsh urology. 9. Auflage. Philadelphia: Saunders/Elsevier; 2007. S. 2899.



14. Epstein JI. Pathology of Prostatic Neoplasia. In: Wein AJ, Kavoussi LR, Novick AC, Partin AW, Peters CA, (Hrsg.). Campbell-Walsh urology. 9. Auflage. Philadelphia: Saunders/Elsevier; 2007. S. 2876.
15. Wittekind C, Klimpfinger M, Sobin LH. TNM-Atlas. 4. Auflage. Heidelberg: Springer Medizin Verlag; 2005. S. 263-291.
16. Damber JE, Aus G. Prostate cancer. Lancet. 2008 May 17;371(9625):1710-1721.
17. Potosky AL, Knopf K, Clegg LX, Albertsen PC, Stanford JL, Hamilton AS, et al. Quality-of-life outcomes after primary androgen deprivation therapy: results from the Prostate Cancer Outcomes Study. J Clin Oncol. 2001 Sep 1;19(17):3750-3757.
18. Bostwick DG, Grignon DJ, Hammond ME, Amin MB, Cohen M, Crawford D, et al. Prognostic factors in prostate cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. Arch Pathol Lab Med. 2000 Jul;124(7):995-1000.
19. Vickers AJ, Ulmert D, Serio AM, Bjork T, Scardino PT, Eastham JA, et al. The predictive value of prostate cancer biomarkers depends on age and time to diagnosis: towards a biologically-based screening strategy. Int J Cancer. 2007 Nov 15;121(10):2212-2217.
20. Loeb S, Roehl KA, Antenor JA, Catalona WJ, Suarez BK, Nadler RB. Baseline prostate-specific antigen compared with median prostate-specific antigen for age group as predictor of prostate cancer risk in men younger than 60 years old. Urology. 2006 Feb;67(2):316-320.
21. Grossklaus DJ, Smith JA, Jr., Shappell SB, Coffey CS, Chang SS, Cookson MS. The free/total prostate-specific antigen ratio (%fPSA) is the best predictor of tumor involvement in the radical prostatectomy specimen among men with an elevated PSA. Urol Oncol. 2002 Sep-Oct;7(5):195-198.
22. Stamey TA, Yang N, Hay AR, McNeal JE, Freiha FS, Redwine E. Prostate-specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate. N Engl J Med. 1987 Oct 8;317(15):909-916.
23. Pinsky PF, Andriole G, Crawford ED, Chia D, Kramer BS, Grubb R, et al. Prostate-specific antigen velocity and prostate cancer gleason grade and stage. Cancer. 2007 Apr 15;109(8):1689-1695.
24. Spahn M, Bader P, Woehr M, Frohneberg D. PCA with PSA >20 - Is there a chance of cure? Eur Urol Suppl. 2006;5(2):212.
25. Pound CR, Partin AW, Eisenberger MA, Chan DW, Pearson JD, Walsh PC. Natural history of progression after PSA elevation following radical prostatectomy. JAMA. 1999 May 5;281(17):1591-1597.
26. Freedland SJ, Humphreys EB, Mangold LA, Eisenberger M, Dorey FJ, Walsh PC, et al. Risk of prostate cancer-specific mortality following biochemical recurrence after radical prostatectomy. JAMA. 2005 Jul 27;294(4):433-439.
27. Freedland SJ, Moul JW. Prostate specific antigen recurrence after definitive therapy. J Urol. 2007 Jun;177(6):1985-1991.
28. Petersen RO, Sesterhenn I, Davis CJ, Ovid Technologies Inc. Urologic pathology. 3. Auflage. Philadelphia, Pa.; London: Lippincott Williams & Wilkins; 2009. S. 489.
29. Bostwick DG. Gleason grading of prostatic needle biopsies. Correlation with grade in 316 matched prostatectomies. Am J Surg Pathol. 1994 Aug;18(8):796-

- 803.
30. Steinberg DM, Sauvageot J, Piantadosi S, Epstein JI. Correlation of prostate needle biopsy and radical prostatectomy Gleason grade in academic and community settings. *Am J Surg Pathol.* 1997 May;21(5):566-576.
  31. Kattan MW, Eastham JA, Stapleton AM, Wheeler TM, Scardino PT. A preoperative nomogram for disease recurrence following radical prostatectomy for prostate cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1998 May 20;90(10):766-771.
  32. Kattan MW, Zelefsky MJ, Kupelian PA, Scardino PT, Fuks Z, Leibel SA. Pretreatment nomogram for predicting the outcome of three-dimensional conformal radiotherapy in prostate cancer. *J Clin Oncol.* 2000 Oct 1;18(19):3352-3359.
  33. Kattan MW, Potters L, Blasko JC, Beyer DC, Fearn P, Cavanagh W, et al. Pretreatment nomogram for predicting freedom from recurrence after permanent prostate brachytherapy in prostate cancer. *Urology.* 2001 Sep;58(3):393-399.
  34. Briganti A, Chun FK, Salonia A, Gallina A, Farina E, Da Pozzo LF, et al. Validation of a nomogram predicting the probability of lymph node invasion based on the extent of pelvic lymphadenectomy in patients with clinically localized prostate cancer. *BJU Int.* 2006 Oct;98(4):788-793.
  35. Steuber T, Graefen M, Haese A, Erbersdobler A, Chun FK, Schlom T, et al. Validation of a nomogram for prediction of side specific extracapsular extension at radical prostatectomy. *J Urol.* 2006 Mar;175(3 Pt 1):939-944; discussion 944.
  36. Chun FK, Briganti A, Graefen M, Montorsi F, Porter C, Scattoni V, et al. Development and external validation of an extended 10-core biopsy nomogram. *Eur Urol.* 2007 Aug;52(2):436-444.
  37. Karakiewicz PI, Hutterer GC. Predictive models and prostate cancer. *Nat Clin Pract Urol.* 2008 Feb;5(2):82-92.
  38. Fernando AB, Sanz G, Esteban LM, Sanz MJ, Martinez PG, de Jalon AG, et al. [Current validity of nomograms for prostate cancer staging]. *Arch Esp Urol.* 2006 Dec;59(10):989-1000.
  39. Epstein JI, Partin AW, Sauvageot J, Walsh PC. Prediction of progression following radical prostatectomy. A multivariate analysis of 721 men with long-term follow-up. *Am J Surg Pathol.* 1996 Mar;20(3):286-292.
  40. Schulz WA, Burchardt M, Cronauer MV. Molecular biology of prostate cancer. *Mol Hum Reprod.* 2003 Aug;9(8):437-448.
  41. Carter BS, Bova GS, Beaty TH, Steinberg GD, Childs B, Isaacs WB, et al. Hereditary prostate cancer: epidemiologic and clinical features. *J Urol.* 1993 Sep;150(3):797-802.
  42. Smith JR, Freije D, Carpten JD, Gronberg H, Xu J, Isaacs SD, et al. Major susceptibility locus for prostate cancer on chromosome 1 suggested by a genome-wide search. *Science.* 1996 Nov 22;274(5291):1371-1374.
  43. Berthon P, Valeri A, Cohen-Akenine A, Drelon E, Paiss T, Woehr G, et al. Predisposing gene for early-onset prostate cancer, localized on chromosome 1q42.2-43. *Am J Hum Genet.* 1998 Jun;62(6):1416-1424.
  44. Robbins CM, Hernandez W, Ahaghotu C, Bennett J, Hoke G, Mason T, et al. Association of HPC2/ELAC2 and RNASEL non-synonymous variants with prostate cancer risk in African American familial and sporadic cases. *Prostate.*

- 2008 Dec 1;68(16):1790-1797.
45. Dong X, Wang L, Taniguchi K, Wang X, Cunningham JM, McDonnell SK, et al. Mutations in CHEK2 associated with prostate cancer risk. *Am J Hum Genet.* 2003 Feb;72(2):270-280.
  46. Wang L, McDonnell SK, Elkins DA, Slager SL, Christensen E, Marks AF, et al. Analysis of the RNASEL gene in familial and sporadic prostate cancer. *Am J Hum Genet.* 2002 Jul;71(1):116-123.
  47. Ingles SA, Ross RK, Yu MC, Irvine RA, La Pera G, Haile RW, et al. Association of prostate cancer risk with genetic polymorphisms in vitamin D receptor and androgen receptor. *J Natl Cancer Inst.* 1997 Jan 15;89(2):166-170.
  48. Steinhoff C, Franke KH, Golka K, Thier R, Romer HC, Rotzel C, et al. Glutathione transferase isozyme genotypes in patients with prostate and bladder carcinoma. *Archives of toxicology.* 2000 Nov;74(9):521-526.
  49. Romero D, Kawano Y, Bengoa N, Walker MM, Maltry N, Niehrs C, et al. Downregulation of Dickkopf-3 disrupts prostate acinar morphogenesis through TGF-beta/Smad signaling. *J Cell Sci.* 2013 Feb 26.
  50. Whang YE, Wu X, Suzuki H, Reiter RE, Tran C, Vessella RL, et al. Inactivation of the tumor suppressor PTEN/MMAC1 in advanced human prostate cancer through loss of expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Apr 28;95(9):5246-5250.
  51. Kibel AS, Isaacs WB. G(1)/S cell cycle proteins as markers of aggressive prostate carcinoma. *Urology.* 2000 Mar;55(3):316-322.
  52. Navone NM, Troncoso P, Pisters LL, Goodrow TL, Palmer JL, Nichols WW, et al. p53 protein accumulation and gene mutation in the progression of human prostate carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 1993 Oct 20;85(20):1657-1669.
  53. Bowen C, Bubendorf L, Voeller HJ, Slack R, Willi N, Sauter G, et al. Loss of NKX3.1 expression in human prostate cancers correlates with tumor progression. *Cancer Res.* 2000 Nov 1;60(21):6111-6115.
  54. Nupponen N, Visakorpi T. Molecular biology of progression of prostate cancer. *Eur Urol.* 1999;35(5-6):351-354.
  55. Dong JT. Chromosomal deletions and tumor suppressor genes in prostate cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2001;20(3-4):173-193.
  56. Nupponen NN, Kakkola L, Koivisto P, Visakorpi T. Genetic alterations in hormone-refractory recurrent prostate carcinomas. *Am J Pathol.* 1998 Jul;153(1):141-148.
  57. Mimeault M, Johansson SL, Batra SK. Pathobiological implications of the expression of EGFR, pAkt, NF-kappaB and MIC-1 in prostate cancer stem cells and their progenies. *PLoS One.* 2012;7(2):e31919.
  58. McDonnell TJ, Troncoso P, Brisbay SM, Logothetis C, Chung LW, Hsieh JT, et al. Expression of the protooncogene bcl-2 in the prostate and its association with emergence of androgen-independent prostate cancer. *Cancer Res.* 1992 Dec 15;52(24):6940-6944.
  59. Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, Dhanasekaran SM, Mehra R, Sun XW, et al. Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science.* 2005 Oct 28;310(5748):644-648.
  60. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4*

- encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell*. 1993 Dec 3;75(5):843-854.
61. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. 2005 Jan 14;120(1):15-20.
  62. Boehm M, Slack FJ. MicroRNA control of lifespan and metabolism. *Cell Cycle*. 2006 Apr;5(8):837-840.
  63. Rodriguez A, Vigorito E, Clare S, Warren MV, Couttet P, Soond DR, et al. Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. *Science*. 2007 Apr 27;316(5824):608-611.
  64. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 2000 Feb 24;403(6772):901-906.
  65. Carleton M, Cleary MA, Linsley PS. MicroRNAs and cell cycle regulation. *Cell Cycle*. 2007 Sep 1;6(17):2127-2132.
  66. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*. 2005 Jun 9;435(7043):834-838.
  67. 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. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Feb 14;103(7):2257-2261.
  68. Griffiths-Jones S. The microRNA Registry. *Nucleic Acids Res*. 2004 Jan 1;32(Database issue):D109-111.
  69. Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res*. 2006 Jan 1;34(Database issue):D140-144.
  70. Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res*. 2008 Jan;36(Database issue):D154-158.
  71. Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res*. 2011 Jan;39(Database issue):D152-157.
  72. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*. 2004 Oct 13;23(20):4051-4060.
  73. Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*. 2004 Nov 11;432(7014):231-235.
  74. Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, et al. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*. 2004 Nov 11;432(7014):235-240.
  75. Han J, Lee Y, Yeom KH, Kim YK, Jin H, Kim VN. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev*. 2004 Dec 15;18(24):3016-3027.
  76. Bohnsack MT, Czaplinski K, Gorlich D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA*. 2004 Feb;10(2):185-191.

77. Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*. 2000 Mar 16;404(6775):293-296.
78. Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Balint E, Tuschl T, Zamore PD. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the *let-7* small temporal RNA. *Science*. 2001 Aug 3;293(5531):834-838.
79. Ketting RF, Fischer SE, Bernstein E, Sijen T, Hannon GJ, Plasterk RH. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev*. 2001 Oct 15;15(20):2654-2659.
80. Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, Nishikura K, et al. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature*. 2005 Aug 4;436(7051):740-744.
81. Wiemer EA. The role of microRNAs in cancer: no small matter. *Eur J Cancer*. 2007 Jul;43(10):1529-1544.
82. Diederichs S, Haber DA. Dual role for argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression. *Cell*. 2007 Dec 14;131(6):1097-1108.
83. Davis E, Caiment F, Tordo X, Cavaille J, Ferguson-Smith A, Cockett N, et al. RNAi-mediated allelic trans-interaction at the imprinted *Rtl1/Peg11* locus. *Curr Biol*. 2005 Apr 26;15(8):743-749.
84. Tang G, Reinhart BJ, Bartel DP, Zamore PD. A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes Dev*. 2003 Jan 1;17(1):49-63.
85. Yekta S, Shih IH, Bartel DP. MicroRNA-directed cleavage of *HOXB8* mRNA. *Science*. 2004 Apr 23;304(5670):594-596.
86. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004 Jan 23;116(2):281-297.
87. Ambros V, Bartel B, Bartel DP, Burge CB, Carrington JC, Chen X, et al. A uniform system for microRNA annotation. *RNA*. 2003 Mar;9(3):277-279.
88. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):57-70.
89. Leaman D, Chen PY, Fak J, Yalcin A, Pearce M, Unnerstall U, et al. Antisense-mediated depletion reveals essential and specific functions of microRNAs in *Drosophila* development. *Cell*. 2005 Jul 1;121(7):1097-1108.
90. Xu P, Vernoooy SY, Guo M, Hay BA. The *Drosophila* microRNA *Mir-14* suppresses cell death and is required for normal fat metabolism. *Curr Biol*. 2003 Apr 29;13(9):790-795.
91. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer*. 2006 Nov;6(11):857-866.
92. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Mar 2;101(9):2999-3004.
93. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006 Apr;6(4):259-269.
94. Bishop JM. Molecular themes in oncogenesis. *Cell*. 1991 Jan 25;64(2):235-248.
95. Hunter T. Oncoprotein networks. *Cell*. 1997 Feb 7;88(3):333-346.

96. Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res.* 2005 Jul 15;65(14):6029-6033.
97. Frankel LB, Christoffersen NR, Jacobsen A, Lindow M, Krogh A, Lund AH. Programmed cell death 4 (PDCD4) is an important functional target of the microRNA miR-21 in breast cancer cells. *J Biol Chem.* 2008 Jan 11;283(2):1026-1033.
98. Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, Ghoshal K, Jacob ST, Patel T. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology.* 2007 Aug;133(2):647-658.
99. Zhu S, Si ML, Wu H, Mo YY. MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1 (TPM1). *J Biol Chem.* 2007 May 11;282(19):14328-14336.
100. Akao Y, Nakagawa Y, Naoe T. let-7 microRNA functions as a potential growth suppressor in human colon cancer cells. *Biol Pharm Bull.* 2006 May;29(5):903-906.
101. Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, et al. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell.* 2005 Mar 11;120(5):635-647.
102. Sampson VB, Rong NH, Han J, Yang Q, Aris V, Soteropoulos P, et al. MicroRNA let-7a down-regulates MYC and reverts MYC-induced growth in Burkitt lymphoma cells. *Cancer Res.* 2007 Oct 15;67(20):9762-9770.
103. Lee YS, Dutta A. The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene. *Genes Dev.* 2007 May 1;21(9):1025-1030.
104. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Nov 26;99(24):15524-15529.
105. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Sep 27;102(39):13944-13949.
106. Szafranska AE, Davison TS, John J, Cannon T, Sipos B, Maghnouj A, et al. MicroRNA expression alterations are linked to tumorigenesis and non-neoplastic processes in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene.* 2007 Jun 28;26(30):4442-4452.
107. Schetter AJ, Leung SY, Sohn JJ, Zanetti KA, Bowman ED, Yanaihara N, et al. MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma. *JAMA.* 2008 Jan 30;299(4):425-436.
108. Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, et al. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2005 Oct 27;353(17):1793-1801.
109. Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H, et al. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res.* 2004 Jun 1;64(11):3753-3756.
110. Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, Seike M, Kumamoto K, Yi M, et al. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell.* 2006 Mar;9(3):189-198.
111. Porkka KP, Visakorpi T. Molecular mechanisms of prostate cancer. *Eur Urol.*

- 2004 Jun;45(6):683-691.
112. Shi XB, Xue L, Yang J, Ma AH, Zhao J, Xu M, et al. An androgen-regulated miRNA suppresses Bak1 expression and induces androgen-independent growth of prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Dec 11;104(50):19983-19988.
  113. Ozen M, Creighton CJ, Ozdemir M, Ittmann M. Widespread deregulation of microRNA expression in human prostate cancer. *Oncogene*. 2008 Mar 13;27(12):1788-1793.
  114. Schaefer A, Jung M, Mollenkopf HJ, Wagner I, Stephan C, Jentzmik F, et al. Diagnostic and prognostic implications of microRNA profiling in prostate carcinoma. *Int J Cancer*. 2009 Aug 12.
  115. Bonci D, Coppola V, Musumeci M, Addario A, Giuffrida R, Memeo L, et al. The miR-15a-miR-16-1 cluster controls prostate cancer by targeting multiple oncogenic activities. *Nat Med*. 2008 Nov;14(11):1271-1277.
  116. Porkka KP, Pfeiffer MJ, Waltering KK, Vessella RL, Tammela TL, Visakorpi T. MicroRNA expression profiling in prostate cancer. *Cancer Res*. 2007 Jul 1;67(13):6130-6135.
  117. Tong AW, Fulgham P, Jay C, Chen P, Khalil I, Liu S, et al. MicroRNA profile analysis of human prostate cancers. *Cancer Gene Ther*. 2009 Mar;16(3):206-216.
  118. Ambis 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 Aug 1;68(15):6162-6170.
  119. 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. *Int J Cancer*. 2010 Jul 15;127(2):394-403.
  120. Shi XB, Tepper CG, White RW. MicroRNAs and prostate cancer. *J Cell Mol Med*. 2008 Sep-Oct;12(5A):1456-1465.
  121. Varambally S, Cao Q, Mani RS, Shankar S, Wang X, Ateeq B, et al. Genomic loss of microRNA-101 leads to overexpression of histone methyltransferase EZH2 in cancer. *Science*. 2008 Dec 12;322(5908):1695-1699.
  122. Noonan EJ, Place RF, Pookot D, Basak S, Whitson JM, Hirata H, et al. miR-449a targets HDAC-1 and induces growth arrest in prostate cancer. *Oncogene*. 2009 Apr 9;28(14):1714-1724.
  123. Yamakuchi M, Ferlito M, Lowenstein CJ. miR-34a repression of SIRT1 regulates apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Sep 9;105(36):13421-13426.
  124. Lin SL, Chiang A, Chang D, Ying SY. Loss of mir-146a function in hormone-refractory prostate cancer. *RNA*. 2008 Mar;14(3):417-424.
  125. Galardi S, Mercatelli N, Giorda E, Massalini S, Frajese GV, Ciafre SA, et al. miR-221 and miR-222 expression affects the proliferation potential of human prostate carcinoma cell lines by targeting p27Kip1. *J Biol Chem*. 2007 Aug 10;282(32):23716-23724.
  126. Kong D, Heath E, Chen W, Cher ML, Powell I, Heilbrun L, et al. Loss of let-7 up-regulates EZH2 in prostate cancer consistent with the acquisition of cancer stem cell signatures that are attenuated by BR-DIM. *PLoS One*.

- 2012;7(3):e33729.
127. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc.* 2008;3(6):1101-1108.
  128. Huber W, von Heydebreck A, Sultmann H, Poustka A, Vingron M. Variance stabilization applied to microarray data calibration and to the quantification of differential expression. *Bioinformatics.* 2002;18 Suppl 1:S96-104.
  129. Smyth GK, Yang YH, Speed T. Statistical issues in cDNA microarray data analysis. *Methods Mol Biol.* 2003;224:111-136.
  130. Tibshirani R, Hastie T, Narasimhan B, Chu G. Diagnosis of multiple cancer types by shrunken centroids of gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 May 14;99(10):6567-6572.
  131. Friedman RC, Farh KK-H, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Research.* 2009;19(1):92-105.
  132. Grimson A, Farh KK-H, Johnston WK, Garrett-Engele P, Lim LP, Bartel DP. MicroRNA Targeting Specificity in Mammals: Determinants beyond Seed Pairing. 2007;27(1):91-105.
  133. Krek A, Grun D, Poy MN, Wolf R, Rosenberg L, Epstein EJ, et al. Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet.* 2005 May;37(5):495-500.
  134. Mott JL, Kobayashi S, Bronk SF, Gores GJ. mir-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis. *Oncogene.* 2007 Sep 13;26(42):6133-6140.
  135. Zhang J, Du YY, Lin YF, Chen YT, Yang L, Wang HJ, et al. The cell growth suppressor, mir-126, targets IRS-1. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 Dec 5;377(1):136-140.
  136. Xu H, Cheung IY, Guo HF, Cheung NK. MicroRNA miR-29 modulates expression of immunoinhibitory molecule B7-H3: potential implications for immune based therapy of human solid tumors. *Cancer Res.* 2009 Aug 1;69(15):6275-6281.
  137. Garcia DM, Baek D, Shin C, Bell GW, Grimson A, Bartel DP. Weak seed-pairing stability and high target-site abundance decrease the proficiency of lsy-6 and other microRNAs. *Nat Struct Mol Biol.* 2011 Oct;18(10):1139-1146.
  138. Maglott D, Ostell J, Pruitt KD, Tatusova T. Entrez Gene: gene-centered information at NCBI. *Nucleic Acids Res.* 2005 Jan 1;33(Database issue):D54-58.
  139. Wach S, Nolte E, Szczyrba J, Stohr R, Hartmann A, Orntoft T, et al. MicroRNA profiles of prostate carcinoma detected by multiplatform microRNA screening. *Int J Cancer.* 2012 Feb 1;130(3):611-621.
  140. Carlsson J, Helenius G, Karlsson MG, Andren O, Klinga-Levan K, Olsson B. Differences in microRNA expression during tumor development in the transition and peripheral zones of the prostate. *BMC Cancer.* 2013;13:362.
  141. Karube Y, Tanaka H, Osada H, Tomida S, Tatematsu Y, Yanagisawa K, et al. Reduced expression of Dicer associated with poor prognosis in lung cancer patients. *Cancer Sci.* 2005 Feb;96(2):111-115.
  142. Wang WX, Kyprianou N, Wang X, Nelson PT. Dysregulation of the mitogen granulin in human cancer through the miR-15/107 microRNA gene group. *Cancer Res.* 2010 Nov 15;70(22):9137-9142.



143. Ishteiwy RA, Ward TM, Dykxhoorn DM, Burnstein KL. The microRNA -23b/-27b cluster suppresses the metastatic phenotype of castration-resistant prostate cancer cells. *PLoS One*. 2012;7(12):e52106.
144. Tao J, Wu D, Xu B, Qian W, Li P, Lu Q, et al. microRNA-133 inhibits cell proliferation, migration and invasion in prostate cancer cells by targeting the epidermal growth factor receptor. *Oncol Rep*. 2012 Jun;27(6):1967-1975.
145. Pasqualini L, Bu H, Puhr M, Narisu N, Rainer J, Schlick B, et al. miR-22 and miR-29a Are Members of the Androgen Receptor Cistrome Modulating LAMC1 and Mcl-1 in Prostate Cancer. *Mol Endocrinol*. 2015 Jul;29(7):1037-1054.
146. Li Y, Kong D, Ahmad A, Bao B, Dyson G, Sarkar FH. Epigenetic deregulation of miR-29a and miR-125b by isoflavone contributes to the inhibition of prostate cancer cell growth and invasion. *Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society*. 2012 Aug;7(8):940-949.
147. Bar-Shira A, Pinthus JH, Rozovsky U, Goldstein M, Sellers WR, Yaron Y, et al. Multiple genes in human 20q13 chromosomal region are involved in an advanced prostate cancer xenograft. *Cancer Res*. 2002 Dec 1;62(23):6803-6807.
148. Ahmed F, Shiraishi T, Vessella RL, Kulkarni P. Tumor necrosis factor receptor associated factor-4: an adapter protein overexpressed in metastatic prostate cancer is regulated by microRNA-29a. *Oncol Rep*. 2013 Dec;30(6):2963-2968.
149. Zhao A, Zeng Q, Xie X, Zhou J, Yue W, Li Y, et al. MicroRNA-125b induces cancer cell apoptosis through suppression of Bcl-2 expression. *Journal of genetics and genomics = Yi chuan xue bao*. 2012 Jan;39(1):29-35.
150. Zhang H, Luo XQ, Feng DD, Zhang XJ, Wu J, Zheng YS, et al. Upregulation of microRNA-125b contributes to leukemogenesis and increases drug resistance in pediatric acute promyelocytic leukemia. *Mol Cancer*. 2011;10:108.
151. Zeng CW, Zhang XJ, Lin KY, Ye H, Feng SY, Zhang H, et al. Camptothecin induces apoptosis in cancer cells via microRNA-125b-mediated mitochondrial pathways. *Mol Pharmacol*. 2012 Apr;81(4):578-586.
152. Gong J, Zhang JP, Li B, Zeng C, You K, Chen MX, et al. MicroRNA-125b promotes apoptosis by regulating the expression of Mcl-1, Bcl-w and IL-6R. *Oncogene*. 2012 Jul 23.
153. Bousquet M, Nguyen D, Chen C, Shields L, Lodish HF. MicroRNA-125b transforms myeloid cell lines by repressing multiple mRNA. *Haematologica*. 2012 Nov;97(11):1713-1721.
154. Yip KW, Reed JC. Bcl-2 family proteins and cancer. *Oncogene*. 2008 Oct 27;27(50):6398-6406.
155. Shi XB, Xue L, Ma AH, Tepper CG, Kung HJ, White RW. miR-125b promotes growth of prostate cancer xenograft tumor through targeting pro-apoptotic genes. *Prostate*. 2011 Apr;71(5):538-549.
156. Amir S, Ma AH, Shi XB, Xue L, Kung HJ, Devere White RW. Oncomir miR-125b suppresses p14(ARF) to modulate p53-dependent and p53-independent apoptosis in prostate cancer. *PLoS One*. 2013;8(4):e61064.
157. Giangreco AA, Vaishnav A, Wagner D, Finelli A, Fleshner N, Van der Kwast T, et al. Tumor suppressor microRNAs, miR-100 and -125b, are regulated by 1,25-dihydroxyvitamin D in primary prostate cells and in patient tissue. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2013 May;6(5):483-494.

158. Sun D, Layer R, Mueller AC, Cichewicz MA, Negishi M, Paschal BM, et al. Regulation of several androgen-induced genes through the repression of the miR-99a/let-7c/miR-125b-2 miRNA cluster in prostate cancer cells. *Oncogene*. 2013 Mar 18.
159. Jiang F, Liu T, He Y, Yan Q, Chen X, Wang H, et al. MiR-125b promotes proliferation and migration of type II endometrial carcinoma cells through targeting TP53INP1 tumor suppressor in vitro and in vivo. *BMC Cancer*. 2011;11:425.
160. Nishida N, Yokobori T, Mimori K, Sudo T, Tanaka F, Shibata K, et al. MicroRNA miR-125b is a prognostic marker in human colorectal cancer. *Int J Oncol*. 2011 May;38(5):1437-1443.
161. Kong F, Sun C, Wang Z, Han L, Weng D, Lu Y, et al. miR-125b confers resistance of ovarian cancer cells to cisplatin by targeting pro-apoptotic Bcl-2 antagonist killer 1. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 2011 Aug;31(4):543-549.
162. Lee YS, Kim HK, Chung S, Kim KS, Dutta A. Depletion of human micro-RNA miR-125b reveals that it is critical for the proliferation of differentiated cells but not for the down-regulation of putative targets during differentiation. *J Biol Chem*. 2005 Apr 29;280(17):16635-16641.
163. Scott GK, Goga A, Bhaumik D, Berger CE, Sullivan CS, Benz CC. Coordinate suppression of ERBB2 and ERBB3 by enforced expression of micro-RNA miR-125a or miR-125b. *J Biol Chem*. 2007 Jan 12;282(2):1479-1486.
164. Glud M, Manfe V, Biskup E, Holst L, Dirksen AM, Hastrup N, et al. MicroRNA miR-125b induces senescence in human melanoma cells. *Melanoma research*. 2011 Jun;21(3):253-256.
165. Borgdorff V, Lleonart ME, Bishop CL, Fessart D, Bergin AH, Overhoff MG, et al. Multiple microRNAs rescue from Ras-induced senescence by inhibiting p21(Waf1/Cip1). *Oncogene*. 2010 Apr 15;29(15):2262-2271.
166. Uhlmann S, Mannsperger H, Zhang JD, Horvat EA, Schmidt C, Kublbeck M, et al. Global microRNA level regulation of EGFR-driven cell-cycle protein network in breast cancer. *Mol Syst Biol*. 2012;8:570.
167. Hellawell GO, Turner GD, Davies DR, Poulsom R, Brewster SF, Macaulay VM. Expression of the type 1 insulin-like growth factor receptor is up-regulated in primary prostate cancer and commonly persists in metastatic disease. *Cancer Res*. 2002 May 15;62(10):2942-2950.
168. Bahador R, Taheriazam A, Mirghasemi A, Torkaman A, Shakeri M, Yahaghi E, et al. Tissue expression levels of miR-29b and miR-422a in children, adolescents, and young adults' age groups and their association with prediction of poor prognosis in human osteosarcoma. *Tumour Biol*. 2015 Oct 1.
169. le Sage C, Nagel R, Egan DA, Schrier M, Mesman E, Mangiola A, et al. Regulation of the p27(Kip1) tumor suppressor by miR-221 and miR-222 promotes cancer cell proliferation. *EMBO J*. 2007 Aug 8;26(15):3699-3708.
170. Garofalo M, Di Leva G, Romano G, Nuovo G, Suh SS, Ngankea A, et al. miR-221&222 regulate TRAIL resistance and enhance tumorigenicity through PTEN and TIMP3 downregulation. *Cancer Cell*. 2009 Dec 8;16(6):498-509.
171. Kim BH, Hong SW, Kim A, Choi SH, Yoon SO. Prognostic implications for

- high expression of oncogenic microRNAs in advanced gastric carcinoma. *Journal of surgical oncology*. 2013 Apr;107(5):505-510.
172. Terasawa K, Ichimura A, Sato F, Shimizu K, Tsujimoto G. Sustained activation of ERK1/2 by NGF induces microRNA-221 and 222 in PC12 cells. *FEBS J*. 2009 Jun;276(12):3269-3276.
  173. Felli N, Fontana L, Pelosi E, Botta R, Bonci D, Facchiano F, et al. MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Dec 13;102(50):18081-18086.
  174. Baek D, Villen J, Shin C, Camargo FD, Gygi SP, Bartel DP. The impact of microRNAs on protein output. *Nature*. 2008 Sep 4;455(7209):64-71.
  175. Kibel AS, Faith DA, Bova GS, Isaacs WB. Loss of heterozygosity at 12P12-13 in primary and metastatic prostate adenocarcinoma. *J Urol*. 2000 Jul;164(1):192-196.
  176. Kibel AS, Suarez BK, Belani J, Oh J, Webster R, Brophy-Ebbers M, et al. CDKN1A and CDKN1B polymorphisms and risk of advanced prostate carcinoma. *Cancer Res*. 2003 May 1;63(9):2033-2036.
  177. Nakamura N, Ramaswamy S, Vazquez F, Signoretti S, Loda M, Sellers WR. Forkhead transcription factors are critical effectors of cell death and cell cycle arrest downstream of PTEN. *Mol Cell Biol*. 2000 Dec;20(23):8969-8982.
  178. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646-674.
  179. Poliseno L, Tuccoli A, Mariani L, Evangelista M, Citti L, Woods K, et al. MicroRNAs modulate the angiogenic properties of HUVECs. *Blood*. 2006 Nov 1;108(9):3068-3071.
  180. Zhang HT, Zhang D, Zha ZG, Hu CD. Transcriptional activation of PRMT5 by NF-Y is required for cell growth and negatively regulated by the PKC/c-Fos signaling in prostate cancer cells. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Nov;1839(11):1330-1340.
  181. Kneitz B, Krebs M, Kalogirou C, Schubert M, Joniau S, van Poppel H, et al. Survival in patients with high-risk prostate cancer is predicted by miR-221, which regulates proliferation, apoptosis, and invasion of prostate cancer cells by inhibiting IRF2 and SOCS3. *Cancer Res*. 2014 May 1;74(9):2591-2603.
  182. Auld KL, Berasi SP, Liu Y, Cain M, Zhang Y, Huard C, et al. Estrogen-related receptor alpha regulates osteoblast differentiation via Wnt/beta-catenin signaling. *Journal of molecular endocrinology*. 2012 Apr;48(2):177-191.

## 7 **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Molekulare Veränderungen im Prostatakarzinom im Laufe seiner Initiation und Progression.....	11
Abbildung 2: Übersicht über die Biogenese von miRNA.....	12
Abbildung 3: Heatmap der Expressionsniveaus aus der Microarray-Analyse mit 52 signifikant unterschiedlich exprimierten miRNAs 1-52 (BPH vs. PCa mit GS10 und GS6/7, adj. p<0.05, Expressionsveränderung >2 oder <0,5-fach, n=20).....	40

Abbildung 4: Signifikant unterschiedlich regulierte miRNAs bei Vergleich PCa vs. BPH.....	42
Abbildung 5: Venn-Diagramm mit den in den Gegenüberstellungen GS10 vs. GS6/7 (blau), GS10 vs. BPH (rot) und GS6/7 vs. BPH (gelb) jeweils signifikant unterschiedlich exprimierten miRNAs. (adj. $p < 0.05$ und Expressionsveränderung $> 2$ oder $< 0,5$ -fach ).....	46
Abbildung 6: Heatmap der Expressionsniveaus von 24 miRNAs aus der Microarray-Analyse aus der Gegenüberstellung der Gruppen der PCa mit klinischer Progression (rot, $n_1 = 7$ ) und ohne klinische Progression (schwarz, $n_2 = 7$ ) ( $n = 14$ ).....	47
Abbildung 7: Boxplot der $\Delta$ CT-Werte der einzelnen miRNAs aus der qRT-PCR-Analyse von Kollektiv 1.....	50
Abbildung 8: Boxplot der $\Delta$ CT-Werte der einzelnen miRNAs aus der qRT-PCR-Analyse von Kollektiv 2.....	52
Abbildung 9: Anzahl und Anteil der PCa-Proben, in denen die jeweilige miRNA herunterreguliert ist (Expressionsunterschied $< 0,5$ -fach). MiR-221 und miR-125b waren in allen Proben herunterreguliert, die übrigen miRNAs nur teilweise.....	54
Abbildung 10: Klassifikation der einzelnen Proben mit PAM (prediction analysis for Microarrays) wie unter 2.10 (S. 32) erläutert.....	55
Abbildung 11: Relative Expression von miR-422a in BPH, PCa mit Gleason-Score 6/7 (GS6/7) und PCa mit Gleason-Score 10 (GS10) im Kollektiv 2.....	56
Abbildung 12: Relative Expression von miR-221 in BPH, PCa mit Gleason-Score 6/7 (GS6/7) und PCa mit Gleason-Score 10 (GS 10) im Kollektiv 2.....	57

## 8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Wahrscheinlichkeit des Vorliegens eines PCa in Abhängigkeit vom Serum-PSA-Spiegel.....	2
Tabelle 2: TNM-Klassifikation des Prostatakarzinoms nach UICC 2002.....	4
Tabelle 3: Relative Häufigkeit von Nebenwirkungen der Therapieformen des PCa (Auswahl).....	5
Tabelle 4: Gleason-Score als unabhängiger Prognosefaktor für das postoperative Progressionsrisiko.....	9
Tabelle 5: miRNAs mit einer Rolle im Prostatakarzinom und ihre nachgewiesenen Zielgene. +=Auswahl.....	18
Tabelle 6: Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	21
Tabelle 7: Verwendete Chemikalien.....	22

Tabelle 8: Primer aus der Reihe TaqManR MicroRNA Assay der Firma Ambion.....	23
Tabelle 9: Verwendete Kits.....	23
Tabelle 10: Im Rahmen der Arbeit benutzte Software. ....	24
Tabelle 11: Programmierung des Thermocycler für die reverse Transkription mit TaqMan MicroRNA Assays.....	31
Tabelle 12: Programmierung des qRT-Cyclers für die Durchführung der qRT-PCR mit TaqMan MicroRNA Assays.....	32
Tabelle 13: Übersicht über die PCa-Proben aus den Microarrayuntersuchungen (Kollektiv 1, n=14).....	36
Tabelle 14: Beschreibung der PCa-Proben in Kollektiv 1 (Microarray) und 2 (qRT-PCR) mit T-Stadium und Gleason-Score und klinischer Aspekte der Patienten (Alter bei Operation, PSA-Progression, klinische Progression, Tod durch Tumor und Follow-up Zeiten (= PCa-spezifische Überlebenszeit bei verstorbenen Patienten) und durchgeführter Untersuchungen (Microarray und qRT-PCR).....	37
Tabelle 15: Klinisch-pathologische Parameter der im Kollektiv 1 untersuchten PCa-Proben in Abhängigkeit von den Kriterien für hohes Rezidivrisiko.....	38
Tabelle 16: Klinisch-pathologische Parameter der im Kollektiv 2 untersuchten PCa-Proben in Abhängigkeit von den Kriterien für hohes Rezidivrisiko.....	38
Tabelle 17: Die untersuchten Kollektive 1 und 2 der Microarray- und qRT-PCR-Untersuchungen unterschieden sich nach den klinisch-pathologischen Parametern nicht erheblich.....	39
Tabelle 18: Klinisch-pathologische Parameter der beiden Untergruppen der PCa aus Kollektiv 1 nach klinischer Progression. ....	45
Tabelle 19: 24 miRNAs aus der Microarray-Analyse des Kollektiv 1 mit signifikant unterschiedlicher Expression in der Gruppe der PCa mit klinischer Progression (n1=7) gegenüber der Gruppe ohne klinische Progression (n2=7, ngesamt=14, p<0,05).....	48
Tabelle 20: 2 <sup>-ΔΔCT</sup> -Werte der einzelnen miRNAs im Kollektiv 2.....	53
Tabelle 21: Vermeintliche Zielgene ("Targets") von miR-125b, miR-29a, miR-let-7a und miR-let-7b.....	59
Tabelle 22: Vermeintliche Zielgene ("Targets") von miR-16, miR-515-5p, miR-147, miR-422a, miR-515-3p, miR-126 und miR-221.....	60
Tabelle 23: Zielgene mit bekannter Funktion, deren mRNA Ziel mehr als einer der untersuchten miRNAs ist.....	60
Tabelle 24: Ergebnisse verschiedener Untersuchungen zum Clustering von Referenzgewebe und Prostatakarzinomgewebe anhand unterschiedlich großer miRNA-Profile.....	64

Tabelle 25: Größe und Überschneidung der miRNA-Profile des Prostatakarzinoms ausgewählter Arbeiten im Vergleich zur vorliegenden Arbeit.....	65
Tabelle 26: Übersicht über Regulationsrichtung von miRNAs im PCa in methodisch vergleichbaren Arbeiten.....	67
Tabelle 27: Regulationsrichtung von miR-125b und Assoziation mit Tumorprogression oder Tumorzellvermehrung in verschiedenen Arbeiten.....	80
Tabelle 28: Regulationsrichtung von miR-221 und Assoziation mit Tumorprogression oder Tumorzellvermehrung in verschiedenen Arbeiten.....	87

## 9 Abkürzungsverzeichnis

ABL1	c-abl oncogene 1
AR	Androgenrezeptor
BAK1	BRI1-associated receptor kinase
BCL-2	B-cell CLL/lymphoma 2
BCR	breakpoint cluster region
BMF	BCL2-Modifying Factor
BPH	Benigne Prostatahyperplasie
c-kit	s. KIT
c-myc	Siehe v-myc
CDKN1B	Cyclin Dependant Kinase Inhibitor 1B, auch p27KIP1
CHEK1	Checkpoint, S. Pombe, homolog of, 1. Auch CHK1: Cell Cycle Checkpoint Kinase
CLL	Chronisch-lymphatische Leukämie
DGCR8	DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8
DRU	Digital-rektale Untersuchung (engl. DRE)
dsRNA	Doppelstrang-RNA
EGFR	epidermal growth factor receptor
EIF2C2	Eucaryotic Translation Initiation Factor 2C, auch ARGONAUTE-2 (hAgo2)
ELAC2	elaC homolog 2
ESSRA	estrogen-related receptor alpha
FFPE	Formalin-fixiert und in Paraffin eingebettet
FOS	V-FOS FBJ Murine Osteosarcoma Viral Oncogene Homolog
GS	Gleason-Score
GSTP1	Glutathione S-transferase pi 1
hAgo2	Siehe EIF2C2
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HMGGA2	High mobility group AT-hook 2
HNPCC	hereditäres nicht-polypöses Kolonkarzinom
HPC1	siehe RNASEL

HPC2	s. PCAP
HRAS	v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
HR-PCa	Hochrisiko-Prostatakarzinom, high risk prostate cancer
hsa	Homo sapiens
IGF1R	Insulin-like growth factor 1 receptor
IRF2	interferon regulatory factor 2
IZKF	Interdisziplinäres Zentrum für klinische Forschung
KIT	v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog, auch c-kit
LAMC1	laminin gamma 1
MCL1	myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-bezogen)
miRNA	MicroRNA
MLH1	MutL homolog 1, auch als HNPCC bekannt
MMR-System	mismatch-repair-System
mmu	Mus musculus
MYBL2	V-MYB Avian Myeloblastosis Viral Oncogene Homolog-Like 2
NKX3.1	NK3 homeobox 1
p27KIP1	Siehe CDKN1B
PAM	Prediction analysis for microarrays
PCa	Prostatakarzinom, prostate cancer
PCAP	predisposing for prostate cancer
PDCD4	Programmed cell death 4
PGK-1	phosphoglycerate kinase 1
PIN	Prostatische intraepitheliale Neoplasie
pre-miRNA	Precursor microRNA, Vorläufer-microRNA
pri-miRNA	Primary microRNA, primäre microRNA
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
qRT-PCR	Quantitative real-time PCR
RET	Rearranged During Transfection Protooncogen
RGS	regulator of G-protein signaling
RISC	RNA induced silencing complex
RNASEL	ribonuklease L (2',5'-oligoadenylate synthetase-dependent)
rno	Rattus norvegicus
TP53	Tumor protein p53
TPM1	Tropomyosin 1
TRAF4	Tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factor 4
TRBP	Transactivating response RNA binding protein
TRIM68	tripartite motif-containing protein 68
TRUS	Transrektale Ultraschalluntersuchung

UTR Untranslated region, nicht translatierte Region  
v-myc v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog, auch c-  
myc



## **Danksagung**

Mein Dank gilt zunächst Prof. Dr. med. Hubertus Riedmiller, ehemaliger Direktor der Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie des Universitätsklinikums Würzburg, für die Übernahme des Referates sowie für die Erlaubnis und die Möglichkeit im Forschungslabor der Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie der Universität Würzburg die nötigen Untersuchungen durchführen zu dürfen.

Herzlich danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. med. Paul-Gerhardt Schlegel für die freundliche Übernahme der Aufgaben und Pflichten, die das Koreferat mit sich bringt.

Größten und herzlichen Dank richte ich an meinen Betreuer, den Leiter des Forschungslabors der Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie der Universität Würzburg, Herrn Dr. Burkhard Kneitz, für die freundliche Überlassung des Themas und für sein immer offenes Ohr für meine Fragen. Mit viel Geduld stand er mir immer mit wertvollen Ratschlägen während aller Phasen der Entstehung der Arbeit zur Seite. So hat er maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Für die Unterstützung und ausführliche Erläuterung im Bezug auf mathematische und statistische Fragen bedanke ich mich herzlich bei Frau Dr. Susanne Kneitz, der Leiterin der Core Facility der zentralen Einheit für Microarray-Anwendungen des Interdisziplinären Zentrums für Klinische Forschung der Universität Würzburg. Ihre Hilfestellung war bei den enormen Datenmengen unverzichtbar.

Des weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. med. Martin Spahn, Zentrum für Urologie Zürich, für die Überlassung des Untersuchungsmaterials sowie für die regelmäßige Hilfestellung bei klinischen Fragen.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei Frau Sabine Müller für die ausführliche Einarbeitung in der qRT-PCR und bei Frau Margarethe Göbel für die Einarbeitung im Microarraylabor. Herzlichen Dank entrichte ich ebenfalls an die Mitglieder des Teams des urologischen Forschungslabors, Frau Barbara Dexler und Frau Vera Schwartz, für die herzliche und unkomplizierte Aufnahme im Labor.