

Aus der Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie  
der Universität Würzburg  
Direktor: Universitäts-Professor Dr. med. H. Riedmiller

**Untersuchungen zur Funktion und Expression von miR-205 und miR-221 im  
Prostatakarzinom unter besonderer Beachtung von miR-205 als Prognosemarker beim  
Hochrisiko-Patienten**

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

vorgelegt von  
**Charis Alexis Thomas Kalogirou**  
aus Buchen (Odenwald)

Würzburg, Juni 2012



Referent: Universitäts-Professor Dr. med. Hubertus Riedmiller

Koreferent: Professor Dr. med. Volker Kunzmann

Dekan: Professor Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 18.12.2013

Der Promovend ist Arzt

meinen Eltern

Πάντα χωρεῖ καὶ οὐδὲν μένει  
δις ἕς τὸν αὐτὸν ποταμὸν οὐκ ἂν ἐμβαίης

## 1 EINLEITUNG

1.1 Das Hochrisiko-PCa: eine onkologische Herausforderung.....	1
1.2 Tumorgenese.....	2
1.2.1 Hereditäre Formen des PCa.....	2
1.2.3 Sporadische Formen des PCa.....	2
1.2.3 Verlust von Tumorsuppressorgenen.....	3
1.2.4 Aktivierung von Onkogenen.....	4
1.3 micro-RNAs und ihre Rolle in zellbiologischen Vorgängen.....	4
1.3.1 Biosynthese und Funktion.....	5
1.3.2 Verbindung zu Tumorgenese und Krankheiten - aberrante Expression...8	
1.3.3 miR-205 und miR-221 als funktionelle Genregulatoren im PCa.....8	
1.3.4 Zukünftiges Potential der miRs in Diagnostik, Therapie und Prognose des PCa.....	8
2 FRAGESTELLUNG/PROGRAMM.....	10
3 MATERIAL UND METHODEN.....	11
3.1 Material.....	11
3.1.1 Zellkulturen.....	11
3.1.1.1 Tumorzelllinien.....	11
3.1.1.2 Zellkulturmedium DMEM.....	12
3.1.2 Chemikalien und Biochemikalien.....	12
3.1.2.2 Chemikalien für molekularbiologische Experimente.....	12
3.1.2.3 Oligonukleotide (Primer) für qRT-PCR.....	14
3.1.3 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	14
3.1.4 Software.....	15
3.1.5 Internetbasierte Datenbanken und Programme.....	15
3.1.6 Primäre PCa-Kollektive.....	15
3.1.6.1 Beschreibung des Hochrisiko-PCa-Kollektivs (n=89).....	15
3.1.6.2 Beschreibung des PCa-Kollektivs aus nativem Frischmaterial (n=16).....	17

3.2 Methoden.....	18
3.2.1 Sterilisation von Materialien und Lösungen.....	18
3.2.2 Kultivierung von Tumorzelllinien.....	18
3.2.3 Transfektion der Tumorzelllinien mit microRNA.....	18
3.2.4 RNA-Extraktion und Aufreinigung.....	19
3.2.5 Quantitäts- und Reinheitskontrolle der Nukleinsäuren.....	19
3.2.6 Vitalitätskontrolle der transfizierten Tumorzelllinien (MTS).....	19
3.2.7 Polymerasekettenreaktion.....	20
3.2.8 Reverse Transkription.....	20
3.2.9 Quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion.....	20
3.2.9.1 Prinzip der qRT-PCR und Überblick.....	20
3.2.9.2 Oligonukleotide (Primer).....	21
3.2.9.3 qRT-PCR-Ansatz.....	21
3.2.10 Agarose-Gelelektrophorese.....	23
3.2.11 Dual-Luciferase Reporter Assay.....	23
3.2.11.1 Allgemeines und Prinzip.....	23
3.2.11.2 Konstruktion von Reporterplasmiden.....	23
3.2.11.3 Transformation von kompetenten Zellen.....	25
3.2.11.4 Mini- und Midipräparation von Plasmiden.....	25
3.2.11.5 Identifikation durch Restriktionsverdau.....	25
3.2.11.6 Transfektion.....	25
3.2.11.7 Probenaufarbeitung und Luciferase-Assay.....	26
3.2.12 Datenverarbeitung.....	26
3.2.12.1 Datenverarbeitung des Proliferationsassays (MTS-Test).....	26
3.2.12.2 Datenverarbeitung der qRT-PCR-Daten.....	26
3.2.12.3 Datenverarbeitung in den Primärtumor-Kollektiven.....	27
3.2.12.4 Datenverarbeitung der Dual-Luciferase-Assay-Daten.....	27
3.2.13 Statistik.....	27
4 ERGEBNISSE.....	28
4.1 Die Bedeutung von MicroRNA-205 im PCa.....	28

4.1.1 Die miR-205-Expression in PCa-Zelllinien.....	28
4.1.2 Die Transfektionseffizienz in miR-205 transfizierten PCa-Zelllinien.....	29
4.1.3 Das Zellwachstum von miR-205-transfizierten PCa-Zelllinien.....	30
4.1.4 Die miR-205-Expression im Hochrisiko-PCa.....	33
4.1.5 Assoziationen zwischen miR-205-Expression und klinischen Daten im Hochrisiko-PCa-Kollektiv.....	34
4.1.5.1 Die Assoziation von miR-205-Expression mit lokaler Metastasierung, präoperativem PSA-Wert und dem Alter der Patienten.....	35
4.1.5.2 Die Assoziation von miR-205-Expression mit pT-Stadien und Gleason-Scores.....	36
4.1.5.3 Die Assoziation von miR-205-Expression mit biochemischem und klinischem Progress.....	37
4.1.5.4 Die miR-205-Expression als prognostischer Indikator für die Progression des PCa.....	38
4.1.5.5 Poweranalyse des Hochrisiko-PCa-Kollektivs.....	41
4.1.6 HER2/neu und HER3 als mögliche Zielgene von miR-205 im PCa.....	42
4.1.6.1 Die Expression von HER2/neu und HER3 nach pre-miR-205-Transfektion.....	43
4.1.6.2 Die Expression von HER2/neu und HER3 nach Transfektion mit antago-miR-205.....	44
4.1.7 Die Expression von HER2/neu und microRNA-205 in 16 Nativtumoren..	45
4.1.7.1 Der Vergleich der HER2/neu-Expression mit klinischen Merkmalen im Nativmaterial.....	47
4.2 Die Bedeutung von MicroRNA-221 im PCa.....	48
4.2.1 Die miR-221-Expression in PCa-Zelllinien.....	48
4.2.2 Das Zellwachstum von miR-221-transfizierten PCa-Zelllinien.....	49
4.2.3 c-kit und p27kip1 als Zielgene von miR-221.....	51
4.2.3.1 Die Regulation von c-kit in miR-221 kotransfizierten Prostatazelllinien.....	51
4.2.3.2 Die Regulation von p27Kip1 in miR-221 kotransfizierten Prostatazelllinien.....	53

5 DISKUSSION.....	55
5.1 Die miR-205 und miR-221 als Tumorsuppressoren und Okogene.....	55
5.2 MicroRNA-205 im PCa.....	56
5.2.1 Die Proliferationsinhibierung durch miR-205 in PCa-Zelllinien.....	57
5.2.2 Die Regulation von HER2/neu und HER3 durch miR-205 im PCa.....	58
5.2.3 Mögliche weitere Zielgene von miR-205 im PCa.....	61
5.2.4 miR-205 als mögliches Diagnostikum bei PCa.....	62
5.2.5 miR-205 als Prognoseindikator im PCa.....	63
5.3 MicroRNA-221 im PCa.....	67
5.3.1 Die ektopische Überexpression von miR-221 in PCa-Zelllinien.....	68
5.3.2 Die miR-221-vermittelte Regulation von p27Kip1 im PCa.....	69
5.3.3 Die miR-221-vermittelte Regulation von c-kit im PCa.....	70
6 ZUSAMMENFASSUNG.....	72
7 LITERATURVERZEICHNIS.....	74
8 APPENDIX.....	84
9. DANKSAGUNG.....	85
10. LEBENSLAUF.....	86

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Das Hochrisiko-PCa: eine onkologische Herausforderung

Das Prostatakarzinom (PCa) ist weltweit der häufigste maligne Tumor des älteren Mannes.<sup>1</sup> In Deutschland werden derzeit ca. 60.000 Neuerkrankungen pro Jahr diagnostiziert.<sup>2,3</sup> Durch die Einführung des Tumormarkers PSA (Prostata-spezifisches Antigen) ist es in den vergangenen Dekaden zudem zu einer stetigen Zunahme neu diagnostizierter PCa gekommen.<sup>4-7</sup> Durch den flächendeckenden Einsatz wurde zudem das Diagnosealter nach vorne verlegt, so dass das PCa nun auch eine Krankheit des jüngeren Mannes geworden ist.<sup>4,8-13</sup> Die Diagnostik des Tumors beinhaltet weiterhin die DRU (digital-rektale Untersuchung) und den transrektalen Ultraschall, die definitive Diagnose wird histopathologisch anhand entnommener Biopsien gestellt.<sup>14-16</sup>

Das lokal begrenzte PCa wird anhand der bei Diagnosestellung zur Verfügung stehenden Parameter (klinisches Tumorstadium, Gleason-Score der Biopsie und PSA-Wert<sup>17-22</sup>) in drei Risikogruppen eingeteilt (siehe Tabelle 1).

	Niedriges Risiko „ <i>low-risk-PCa</i> “	Mittleres Risiko „ <i>intermediate-risk-PCa</i> “	Hohes Risiko „ <i>high-risk-PCa</i> “
PSA (ng/ml)	≤ 10	10-20	> 20
oder			
Gleasonscore	≤ 6	7	≥ 8
oder			
pT-Stadium	1c oder 2a	2b	≥ 2c

**Tabelle 1: Risikoeinteilung der Prostatakarzinome nach Serum-PSA-Wert, Gleasonscore und pT-Stadium.<sup>25</sup> Jeweils eines der genannten Kriterien muss für die jeweilige Risikostufe erfüllt sein.**

Während für das *low-* und *intermediate-risk-PCa* sowohl durch die Strahlentherapie als auch durch den „Goldstandard“ der radikalen Prostatektomie 5-Jahres-Überlebensraten von 82 - 97,7% erreicht werden können<sup>23-40</sup>, stellt das *high-risk-PCa* eine Herausforderung für den Behandler dar. Eine verlässliche Prognoseabschätzung ist anhand der klinischen Parameter zum Zeitpunkt der Diagnosestellung nicht möglich.<sup>40</sup> Zusätzlich erschwert das Fehlen vergleichender randomisierter Studien die Therapieentscheidung dieser Gruppe mit

heterogenem Progressionsrisiko erheblich.<sup>41,42</sup> Obgleich die aktuellen Leitlinien derzeit eine antihormonelle Therapie in Kombination mit einer Radiatio präferieren, gewinnt die radikale Prostatektomie aufgrund der sehr guten Langzeitergebnisse von kürzlich veröffentlichten retrospektiven Analysen zunehmend an Bedeutung.<sup>43,44</sup>

Ziel der vorliegenden Arbeit ist daher die Identifikation neuer microRNA(miR)-basierter Biomarker zur Vorhersage der klinischen Progression sowie des PCa-bedingten Versterbens bei Patienten mit *high-risk*-PCa. Funktionelle Untersuchungen ausgewählter miR-Kandidaten sollen zudem Aufschluss über mögliche zielgerichtete Therapien (*targeted therapies*) geben.

### 1.2 Tumorgenese

Im folgenden Abschnitt wird die molekular-onkologische Ätiologie und Pathogenese des PCa unter Berücksichtigung von Tumorsuppressoren und Onkogenen dargestellt.

#### 1.2.1 Hereditäre Formen des PCa

Das PCa lässt sich in eine sporadische und genealogisch gehäufte Form unterteilen. Während der Teil der sporadischen PCa überwiegt (74 %), kann man die genealogisch gehäufte Form (26 %) noch unterteilen in die familiär gehäufte (81 % der Fälle) und die vererbte Form (19 % der Fälle).<sup>45</sup> Wie bei allen hereditären Karzinomen (Mamma-, Colon-, Ovarial-Ca) liegt das durchschnittliche Erkrankungsalter ca. 6-7 Jahre vor dem idiopathischer Malignome. So sind bis zu 43 % der an erblichen PCa Erkrankten jünger als 55 Jahre.<sup>45,46</sup> Aus diesem Grund sollte bei einem Diagnosealter unter dem 60. Lebensjahr mit oder ohne positive Familienanamnese an einen erblichen Tumor gedacht werden.<sup>46</sup> Im letzten Jahrzehnt wurden zahlreiche Untersuchungen veranlasst, die sich mit chromosomalen Aberrationen und spezifischen Genloci im PCa befassten. Diese werden angeschuldigt, in familiär gehäuften Fällen des PCas eine Rolle zu spielen und nicht nur auf diese beschränkt zu sein.<sup>47-49</sup>

#### 1.2.2 Sporadische Formen des PCa

Die meisten Karzinome der Prostata treten vermutlich sporadisch auf. Während sie in frühen Stadien meist euploid sind, liegen in späteren Stadien oft numerische oder strukturelle Alterationen vor. Die chromosomalen Veränderungen wirken dabei unter anderem über den Verlust von Tumorsuppressorgenen, die Aktivierung von Onkogenen sowie durch mutationsbedingte Gendefekte oder die Regulation von Gen-Expressionsleveln kanzerogen.<sup>47</sup>

### 1.2.3 Verlust von Tumorsuppressorgenen

Für hereditäre Karzinome propagierte Knudson - basierend auf Studien am Retinoblastom - Anfang der 70er Jahre die „two-hit“-Hypothese. Er postulierte die funktionelle Inaktivierung von Genen (Tumorsuppressorgene), deren physiologische Funktion u.a. in der Regulation von grundlegenden Zellmechanismen liegt und so die Entstehung eines Tumors verhindert. Nach Knudson liegt bei erblichen Tumoren eine Fehlfunktion oder ein Verlust eines Allels dieser Gene vor. Initial hält jedoch das noch intakte zweite Allel des Paares die Funktion aufrecht. Häufig mutiert das zweite Allel auch, was im kompletten Verlust der physiologischen Regulation der Tumorsuppressorfunktion resultiert und somit ein Karzinom entstehen lässt. Knudsons Hypothese wurde in den letzten Jahren jedoch noch unter Berücksichtigung epigenetischer Modifikationsmechanismen abgewandelt. Der Funktionsverlust des entsprechenden Gens wird folglich nicht nur durch Mutation oder Deletion hervorgerufen. Auch durch epigenetische Veränderungen (z.B. Methylierung des Promotors) oder Beeinträchtigung der biologischen Funktion der Proteinprodukte der Tumorsuppressorgene ist deren Funktionsverlust möglich.<sup>50,51</sup> Seit Knudsons Arbeit sind eine Vielzahl hereditärer Erkrankungen identifiziert worden. Da im Rahmen dieser Einleitung nicht alle Tumorsuppressorgene besprochen werden können, sollen exemplarisch p27kip1 und PTEN vorgestellt werden, welche in direktem Zusammenhang mit der Tumorgenese des PCa stehen. Der *Cyclin-dependent kinase inhibitor 1 B* (p27, Kip1), auch bekannt unter der Abkürzung CDKN1B kodiert für ein Protein, welches der Cip/Kip-Familie der Cyclin-abhängigen-Kinasen-Inhibitoren angehört. Dieses Protein bindet an cyclin-E-CDK2- oder cyclin D-CDK4-Komplexe, welche es hemmt. Es nimmt somit Einfluss auf die Zellzyklus-Progression im Stadium G1. Oft wird es als Zellzyklus-Inhibitor-Protein umschrieben, weil seine hauptsächliche Funktion im Stop oder der Verlangsamung des Zellzyklus liegt.<sup>52</sup> Interaktionen von CDKN1B mit der Serin-Threonin-Kinase AKT1, die eine wichtige Rolle bei Apoptose und Zellzyklus-Arrest innehat, wurden beschrieben.<sup>53</sup> Ebenso wurde eine Korrelation von CDKN1B-Polymorphismen und dem vermehrten Auftreten hereditärer PCa festgestellt.<sup>54</sup> Die Regulation von CDKN1B ist jedoch noch weitgehend unverstanden. Xu *et al.* postulierten in ihrer Arbeit einen Interaktions-Effekt zwischen CDKN1B und PTEN (*Phosphatase and Tensin homolog*), welche zusammengenommen eine größere Tumorsuppressorfunktion aufwiesen als die jeweiligen Gene alleine.<sup>55</sup>

### 1.2.4 Aktivierung von Onkogenen

Onkogene sind im Gegensatz zu Tumorsuppressorgenen eine Gruppe von Genen, deren überschießende Aktivierung zur Entstehung von Malignomen beiträgt. Alternierende Expressionslevel verschiedener Onkogene spielen in der Tumorgenese, im Progress und in der Metastasierung des PCa eine Rolle. Als wichtiges Onkogen konnte HER2/neu, ein Mitglied der EGF (*epidermal growth factor*)-Rezeptorfamilie, in vielen Malignomen identifiziert werden.<sup>56</sup> Vor allem beim Mammakarzinom wurde seine Funktion in der Pathogenese gut erforscht und dient als Angriffsziel für Therapien.<sup>57</sup> Seine physiologische Funktion liegt im Eingreifen in Zellwachstums- und Differenzierungsprozesse. Man vermutet, dass HER2/neu einen „*orphan receptor*“ (engl. „Waisenrezeptor“) darstellt, da ihn keine bekannten Liganden der EGF-Familie aktivieren können. EGF-Rezeptoren können nur unter Ligandenbindung dimerisieren. HER2/neu wird dabei als bevorzugter Bindungspartner anderer EGF-Rezeptoren in der Literatur geführt. So wird HER3, ein weiteres Mitglied der EGF-Rezeptorfamilie, im Falle der Aktivierung zum Substrat unter anderem für HER2/neu.<sup>58</sup> HER2/neu wird in vielen Malignomen überexprimiert vorgefunden, unter anderem im PCa.<sup>59,60</sup> Neben HER2/neu wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit c-kit (auch: CD117, KIT oder Stammzellfaktor-Rezeptor) als weiteres Onkogen bearbeitet. Als Rezeptortyrosinkinase wurde seine potentielle Rolle als Protoonkogen (inaktive Vorstufe des eigentlichen Onkogens) schon 1987 durch Yarden *et al.* erkannt.<sup>61</sup> c-kit wird in hämatopoetischen Stammzellen gebildet, kommt aber auch in einer Reihe von anderen Zelllinien vor. Sein Ligand, der Stammzellfaktor (SCF), aktiviert c-kit unter Dimerisierung des Rezeptors. c-kit spielt eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung und Proliferation von Stammzellen und ist an Hämatopoese und Angiogenese beteiligt. Die klinische Wirksamkeit des Wirkstoffes Imatinib wird zum Teil auf die c-kit-Tyrosinkinase-hemmende Wirkung zurückgeführt. Vor allem in soliden gastrointestinalen Tumoren, Mastzell-Erkrankungen und akuten myeloischen Leukämien wurden Mutationen dieses Gens beschrieben, aber auch in vielen weiteren Tumorentitäten (u.a. im PCa).<sup>95</sup>

### 1.3 Micro-RNAs und ihre Rolle in zellbiologischen Vorgängen

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Zusammenspiel von microRNAs (miRNAs oder miRs), ihren regulierten Zielgenen und dem möglichen Zusammenhang dieser Regulation mit der Tumorgenese, Klinik und Prognose von *high-risk*-PCa-Patienten. Im

folgenden Abschnitt wird ein Überblick über die Systematik der miRs und ihre Rolle in physiologischen und pathologischen Entitäten (unter besonderer Berücksichtigung des PCa) gegeben.

Reife miRs stellen eine Klasse natürlich vorkommender, kleiner nicht-kodierender RNA-Moleküle dar, deren Länge etwa 21-25 Nukleotide beträgt. miRNAs sind komplementär zu einer oder mehreren mRNAs, an deren 3' untranslateden Region sie binden. Ihre Funktion besteht weitestgehend in der Regulation der folgenden Translation, auf die sie sich hemmend auswirken.<sup>62</sup> Die erste miRNA, lin-4, wurde von Lee *et al.* im Jahre 1993 in *C. Elegans*-Spezies entdeckt und lange Zeit für eine molekulare Anomalie gehalten, bis im Jahre 2000 die zweite miRNA, let-7, identifiziert wurde. Anders als lin-4, wurde die Sequenz von let-7 hochkonserviert in einer ganzen Reihe von Organismen beschrieben. Der Begriff der microRNA wurde dann im Jahre 2001 durch Ambros *et al.* eingeführt.<sup>63-65</sup> Verschiedene Datenbanken, z.B. des Sanger-Instituts beschreiben miRNAs ausführlich, mit Einträgen zu Nomenklatur, Zielgenen, Funktionen und Auswirkungen bei verschiedenen Krankheiten (<http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/>). Bis vor kurzem war die Zahl aller vorkommenden miRNAs noch mit ca. 500 angegeben.<sup>66</sup> Neuere Studien gehen aber davon aus, dass diese Zahl weitaus höher, bei etwa eintausend miRNAs, liegt. Dies entspricht etwa 1% des gesamten humanen Transkriptoms.<sup>68,69</sup>

### 1.3.1 Biosynthese und Funktion von miRNAs

Die Gene, die für miRNAs kodieren, sind meist viel länger als das Endprodukt in Form der reifen miRNA. Viele miRNAs liegen in den Introns ihrer *Host*-Gene und teilen deren regulatorische Funktion, das primäre Transkript, und besitzen ein ähnliches Expressionsprofil. Für den Rest der miRNA-Gene, die von ihrem eigenen Promotor transkribiert werden, sind erst wenige Primärtranskripte identifiziert worden. miRNAs werden von der RNA-Polymerase II als große RNA-Vorläufermoleküle, pri-miRNAs genannt, transkribiert und werden mit Poly-A-Schwanz und 5' Methylkappe versehen.<sup>69</sup> Diese in der Nomenklatur als pri-miRNAs bezeichneten Vorläufer der miRNAs werden im Zellkern von einem Microprozessorkomplex, bestehend aus dem RNase III Enzym Drosha und dem doppelstrangbindenden Protein Pasha/DGCR prozessiert.<sup>70,71</sup> Die pri-miRNAs sind ungefähr 70 Nukleotide lang und werden zu unvollständigen Stammschleifen-Strukturen gefaltet. Danach werden sie ins Zytoplasma exportiert.

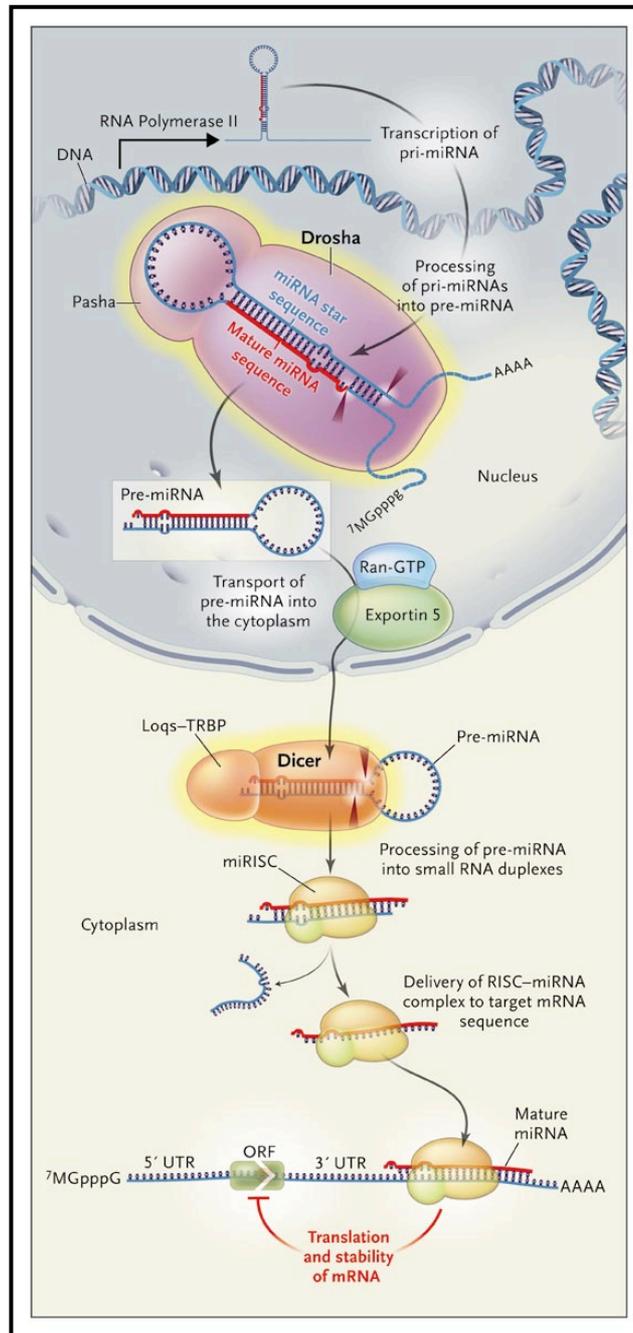


Abb. 1: Überblick über die miRNA-Prozessierung vom Gen über pri- zu pre-miRNA zum entgültigen RISC-Komplex mit reifer miRNA.

(aus: <http://helicase.pbworks.com/w/page/17605642/Jonathan-Puza>)

Beteiligte Strukturen sind hierbei das *karyopherin exportin 5* (Exp5) und der Ran-GTP-Komplex.<sup>72</sup> Ran (*ras-related nuclear protein*) ist ein kleines GTP-bindendes Protein, welches zur RAS-Superfamilie gehört und essentiell für die Translokation von RNA und Proteinen durch die Zellkernporen ist.<sup>72-74</sup> Im Zytoplasma werden die pre-miRNAs mittels des RNase III Enzyms Dicer nochmals weiter prozessiert. Hierbei entsteht eine Doppelstrang-miRNA von etwa 22 Nukleotiden Länge.<sup>75,76</sup> Die Formation des „*RNA-induced silencing complex*“ (RISC) wird ebenfalls von Dicer katalysiert.<sup>76</sup> RISC ist verantwortlich für die Transkriptionsblockade des betroffenen Gens und die RNA-Interferenz, welche häufig als Folge von miRNA-Expression beobachtet wird.<sup>77</sup>

Das Ergebnis der pre-miRNA-Stammeschleifenspaltung des Dicer-Enzymkomplexes sind zwei komplementäre kleine RNA-Stränge. Aber nur einer dieser beiden Stränge wird in den RISC-Komplex eingebaut. RISC ist ein Ribonukleoprotein-Komplex, welcher Mitglieder der Argonaut(Ago)-Proteinfamilie enthält. Argonaut-Proteine besitzen Exonuklease-Aktivität gegen mRNA-Stränge, welche eine Komplementarität zu der von ihnen gebunden miRNA aufweisen. Argonaut-Proteine sind auch daran beteiligt, den miRNA-Führungsstrang auszuwählen und den entsprechenden passageren Strang zu zerstören.<sup>78</sup> Der Führungsstrang wird anhand der 5'-Stabilität von Argonaut ausgewählt, der übrig bleibende, passagere Strang wird als RISC-Komplex-Substrat verwendet.<sup>79</sup> Der Strang mit der geringeren Stabilität der Basenpaare 2-5 am 5' Ende des Duplex wird vorzugsweise an RISC gebunden und wird so zur aktiven miRNA.<sup>79</sup> Nach Integration in den aktiven RISC-Komplex führen miRNAs ihre regulatorische Funktion dadurch aus, dass sie an die komplementäre 3' untranslatierte Region ihrer Ziel-mRNAs binden. Welcher Modus der post-translationalen Modifikation vorgenommen wird, wird nicht von der Herkunft der hemmenden RNA (siRNA oder miRNA) bestimmt, sondern vom Grad der Komplementarität. Wenn die miRNA hochkomplementär zu ihrer Ziel-mRNA ist, kann es diese spezifisch spalten. Endogen exprimierte miRNAs sind normalerweise zu ihren Ziel-mRNAs schwach komplementär und modulieren den Effekt auf die Genexpression durch translationale Repression.<sup>78</sup>

Aufgrund der beschriebenen Funktion von miRNAs konnte gezeigt werden, dass eine Vielzahl von Genen durch miRNAs in ihrer Expression reguliert werden können. Die beobachtete miRNA-vermittelte Genregulation scheint dabei insbesondere während Differenzierungsschritten in der Embryogenese eine Rolle zu spielen. Gleichzeitig wurde eine aberrante Expression verschiedener miRNAs in Tumoren beschrieben.

### **1.3.2 Verbindung zu Tumorgenese und Krankheiten - aberrante Expression**

Es gibt Hinweise, dass miRNA-Expressionen mit einer großen Zahl menschlicher Krankheiten assoziiert sind. Es wurden Verbindungen zu Herzkrankheiten, M. Alzheimer und M. Parkinson hergestellt.<sup>80-83</sup> Auch mit Tumorleiden wurden miRNAs in Verbindung gebracht. Studien, die Expressionsanalysen von miRNA in Tumorgewebe im Vergleich zu tumorfreiem Referenzgewebe zum Thema hatten, zeigten veränderte miRNA-Expressionen.<sup>84,85</sup> Eine Großzahl an miRNA-Genen wurden auch oft nahe an karzinomassoziierten Genregionen und tumorverdächtigen Genloci gefunden. Calin *et al.* beschrieben erstmals die Verbindung zwischen miR-15a- /16-1-Expression und einer Tumorerkrankung. Sie zeigten, dass diese miRNAs in 68% der Fälle von chronisch lymphatischer Leukämie (CLL) herabreguliert waren. miRNAs konnten sowohl die Rolle eines Onkogens (beispielsweise miRNA-155 und Mitglieder des miRNA-17-92 clusters), als auch die eines Tumorsuppressor-gens (bspw. miRNA-15a und miRNA-16-1 im CLL) einnehmen.<sup>86,87</sup>

### **1.3.3 miR-205 und miR-221 als funktionelle Genregulatoren im PCa**

Expressionsanalysen von miRNAs im PCa zeigten, dass für bestimmte miRNAs oft eine starke Herabregulation beobachtet werden konnte. Eigene Vorarbeiten und veröffentlichte Studien zeigten eine starke und frequente Herabregulation vor allem von miR-205 und miR-221 im PCa. Man kann annehmen, dass diese miRNAs eine Funktion in der Tumorgenese des Karzinoms innehaben, weshalb sie in der vorliegenden Arbeit bearbeitet wurden. Spahn *et al.* zeigten, dass die verminderte Expression von miRNA-221 mit einem aggressiveren Verlauf der Erkrankung und der Metastasierung positiv korrelierte. Die miR-221 wurde folglich als tumorsuppressive miR beschrieben.<sup>90</sup> MiRNA-205 scheint in der Prostata ebenfalls tumorsuppressive Funktion auszuüben, indem sie u.a. die Protein-Kinase-C $\epsilon$  herabreguliert.<sup>91</sup>

### **1.3.4 Zukünftiges Potential der miRs in Diagnostik, Therapie und Prognose des PCa**

Obwohl eine große Zahl von Studien krankheits- oder prognoseassoziierte Expressionsprofile von miRNAs zeigen konnten, haben diese bisher noch keinen Einzug in die klinische Nutzung gefunden. Auch im PCa sind mehrere karzinomassoziierte miRs beschrieben worden. Es besteht folglich berechtigte Hoffnung, dass diese miRs in der Klinik als neue Biomarker eine Ergänzung zu bereits etablierter Diagnostik, Therapie und Prognoseeinschätzung des PCa

darstellen könnten. Sowohl klinische als auch histopathologische Kriterien sind derzeit nicht ausreichend, um eine individualisierte Therapiesteuerung vorzunehmen, da durch diese Kriterien indolente Karzinome nicht sicher von aggressiven Tumoren unterschieden werden können. Die bisherige Risikogruppeneinteilung in *low-*, *intermediate-* und *high-risk-*Tumore ist hierbei unzureichend. Die Risikogruppen sind zudem heterogen bezüglich des Überlebens. Deshalb werden für das PCa neue Marker zur Identifikation aggressiver Tumore dringend benötigt. Die in der Grundlagenforschung neu beschriebenen microRNAs könnten - diese Problematik betreffend - in naher Zukunft als Biomarker zur PCa-Diagnostik und zur Risikogruppen-identifikation eingesetzt werden.<sup>94</sup>

Mehrere aktuelle Arbeiten legen nahe, dass vor allem miR-221 im *high-risk-PCa* stark herabreguliert ist und somit einen Parameter zur Identifizierung dieser Subgruppe darstellen könnte.<sup>90</sup> Als klinischer Prognose- und Hochrisikomarker wäre diese miR eine wertvolle Ergänzung zu bereits etablierten Parametern und könnte somit nicht nur aggressive Tumore detektieren, sondern daraus abgeleitet auch dem vermuteten Problem einer Übertherapie einer Großzahl von indolenten Karzinomen begegnen. Zusätzlich zu dieser diagnostischen und prognostischen Funktion ergeben sich möglicherweise neue Therapieansätze mit microRNAs. Die dem individuellen Krankheitsbild angeglichene Therapie (so genannte „*targeted therapy*“) mit Rekonstitution einer herabregulierten miRNA im Karzinom erscheint möglich. In Studien konnte gezeigt werden, dass in vitro ein solches Verfahren die Hyperproliferation von Karzinomzellen revidieren konnte.<sup>90</sup>

Diese Gentherapie mit microRNAs ist jedoch noch nicht ausreichend evaluiert. Erste Studien, in denen mit gewebespezifischen Viren die herabregulierte miR-26-Expression in Leberzellkarzinomen von Mäusen angehoben wurde, sind jedoch vielversprechend.<sup>95</sup> Bezogen auf das PCa könnte eine solche Therapie - nach entsprechenden Vorarbeiten- in Erwägung gezogen werden: Etablierung einer sicheren Methode durch weitere Versuche im Tiermodell und die Adaptation auf das PCa muss vor einem angedachten Einsatz einer solchen Gentherapie gewährleistet werden. Weiterhin sind eventuelle systemische Nebenwirkungen durch die ubiquitär exprimierten microRNAs bei einem medikamentösen Einsatz im Menschen auszuschliessen.

## 2 FRAGESTELLUNG / PROGRAMM

Das PCa ist das häufigste Malignom des Mannes. Gleichzeitig ist das PCa als eine heterogen verlaufende Tumorerkrankung bekannt: selbst *high-risk*-PCa-Patienten (PSA > 20 ng/mL o. Gleason-Score  $\geq 8$  o. cT-Stadium  $\geq 2c$ ) besitzen nach erfolgter operativer Therapie oftmals ein geringes Rezidivrisiko, während ca. 20% identisch klassifizierter Tumorpatienten einen hochaggressiven Verlauf aufweisen. Mit den klinischen Parametern gelingt es somit nur sehr schlecht, Patienten mit hohem Risiko präoperativ zu erkennen. Um dieses Problem zu lösen, müssen daher hochsensitive klinische Prognosemarker etabliert werden. Gleichzeitig könnten mit der Erforschung der biologischen Funktionen solcher Biomarker neue Therapieverfahren entwickelt werden. Sogenannte microRNAs stellen Moleküle dar, welche sich für dieses Vorhaben besonders zu eignen scheinen. MicroRNAs wurden als kleine, nicht-kodierende RNAs beschrieben, die in ihrer Funktion als posttranskriptionelle Regulatoren in vielen Organismen eine Rolle in Proliferations- und Differenzierungsprozessen spielen. Abberante Expressionen verschiedener miRs sind mit der Entwicklung von Karzinomen - inklusive des PCa - assoziiert worden. So wurde in Vorarbeiten bereits die Unterexpression von miR-205 und miR-221 in Zusammenhang mit der Genese und im Falle der miR-221 auch mit der Progression des PCa gebracht. Folgende Versuche zur biologischen Funktion dieser miRs beinhaltet die vorliegende Arbeit:

- Versuchsteil 1) Biologische Funktion, Regulation von miR-205 und miR-221 in PCa-Zellen und Einflussnahme der miRs auf das Zellwachstum von drei PCa-Zelllinien.
- Versuchsteil 2) Expression von miR-205 im primären PCa, *high-risk*-PCa und Assoziation von miR-205-Expression mit klinischen Daten und Rezidivfreiem Überleben im Hochrisikokollektiv.
- Versuchsteil 3) Regulation von Zielgenen durch miR-205 (HER2/neu und HER3) und miR-221 (c-kit und p27kip1)

### 3 MATERIAL UND METHODEN

Aus Gründen der Übersichtlichkeit wird der Abschnitt „Material und Methoden“ kleingedruckt wiedergegeben.

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Zellkulturen

###### 3.1.1.1 Tumorzelllinien

Die Zelllinien CRL1740 (nachfolgend „LNCaP“), CRL 1435 (nachfolgend „PC3“) und CRL 2505 (nachfolgend „22RV1“) wurden von der *American Tissue Culture Collection* (ATCC) bezogen. Ursprung aller oben genannten Zelllinien war ein Karzinom der Prostata. Die Zelllinie 22RV1 stammte von einem Xenograft (CWR22).

###### I) LNCaP:

Der LNCaP-Klon wurde 1977 von J.S. Horoszewicz, et al. aus einer Nadelpunktion eines supraklavikulären Lymphknotens (*Left-Node Carcinoma of the Prostate*) links isoliert. Donor war ein 50 Jahre alter, männlicher Kaukasier. Die Zelllinie ist hypotetraploid und zeigt ein klusterartiges Wachstumsmuster. Außerdem ist die Zelllinie sehr stark durch 5-alpha-Reduktase im Wachstum und der Saure-Phosphatase-Produktion stimulierbar (stark Androgen/Östrogen-Rezeptor positiv). Die Verdopplungszeit betrug ca. 36 Stunden.

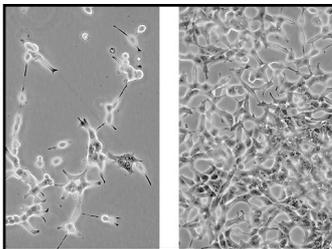


Abb. 2: Darstellung der LNCaP-Morphologie im ca. 40- und 90%igen konfluenten Wachstumsstadium (Quelle: [www.atcc.org](http://www.atcc.org)).

###### II) PC3:

Die PC-3 Linie wurde aus einer Knochenmetastase eines Grade-IV-Adenokarzinoms der Prostata eines 62-jährigen männliche Kaukasiers acquiriert. Die Zelllinie ist triploid mit einer modalen Zahl von 62 Chromosomen. Etwa 20 Marker-Chromosomen wurden in jeder Zelle gefunden. Schwache Saure-Phosphatase- und Wachstumsaktivität durch 5-alpha-Reduktase ist induzierbar. Die Zelllinie zeigte ein regelhaftes Wachstum, die Verdopplungszeit betrug ca. 30 Stunden.

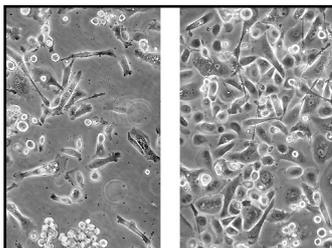


Abb.3: Darstellung der PC-Morphologie im ca. 50- und 90%igen konfluenten Wachstumsstadium (Quelle: [www.atcc.org](http://www.atcc.org)).

III) 22RV1:

Die 22RV1-Linie ist eine humane epitheliale PCa-Zelllinie, die aus dem Androgen-Rezeptor-abhängigen Xenograft CWR22 isoliert wurde. Sie exprimiert das Prostata-spezifische Antigen (PSA) und ist durch den Wachstumsfaktor EGF im Wachstum stimulierbar. Schwache Wachstumsaktivität ist durch 5-alpha-Reduktase-Zufuhr induzierbar. Die Zelllinie zeigte regelhaftes Wachstum, die Verdopplungszeit betrug ca. 40 Stunden.

**3.1.1.2 Zellkulturmedium DMEM**

Dieses für die oben genannten Tumorzelllinien verwendete Medium enthielt als Grundlage *Dulbecco's minimal essential medium*, welchem 5 ml Natrium Pyruvat, 5 ml MEM NEAA und 5 ml HEPES zugegeben wurde. Vor Gebrauch wurden 50 ml 10% fetales Kälberserum (FBS) hinzugegeben. Vor Verwendung wurden alle Medien auf 37°C erwärmt.

**3.1.2. Chemikalien und Biochemikalien**

**3.1.2.1 Zellkulturreagenzien**

Produkt	Hersteller
OPTI-MEM	GIBCO (Deutschland)
Natrium Pyruvat	GIBCO (Deutschland)
MEM NEAA	GIBCO (Deutschland)
Trypsin	Invitrogen (USA)
TRIzol	Invitrogen (USA)
Lipofectamine 2000	Invitrogen (USA)
DMEM High Glucose Medium	PAA (Österreich)
Fetales Kälberserum (10%)	PAA (Österreich)
Dulbecco's PBS	PAA (Österreich)
HEPES	PAA (Österreich)
Trypan-Blau (0,4%)	Sigma (USA)

**3.1.2.2 Chemikalien für Molekularbiologische Experimente**

Produkt	Hersteller
Alamar Blue®	AdB Serotec (UK)
<i>Escherichia coli</i> XL-Blue 01	Agilent (USA)
phRL-TK - Vektor	Ambion (USA)
Ampicillin	AppliChem (Deutschland)

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
TAQMAN UNC	Applied Biosystems (USA)
TAQMAN Micro-RNA Assay (mir 205)	Applied Biosystems (USA)
pre/anti-mir 205	Applied Biosystems (USA)
pre/anti-mir 221	Applied Biosystems (USA)
pre/anti-mir Kontrolle	Applied Biosystems (USA)
TAQMAN Micro-RNA Assay (mir 221)	Applied Biosystems (USA)
Agarose	Biodeal Laboratories (Indien)
<i>Hind</i> III-Restriktionsenzym	New England Biolabs (USA)
<i>Spe</i> I-Restriktionsenzym	New England Biolabs (USA)
1 kb DNA Ladder	New England Biolabs (USA)
NEBuffer 2 (10X)	New England Biolabs (USA)
NEBuffer 4 (10X)	New England Biolabs (USA)
MicroElute Gel Extraction Kit	Omega Bio-Tek (USA)
Agar	Oxoid (UK)
IM-PROM II Reverse Transcription System	Promega (Deutschland)
Dual Luciferase Reporter Assay System	Promega (Deutschland)
Cell Titer 96	Promega (Deutschland)
T4-DNA-Ligase	Promega (Deutschland)
Rapid Ligation Buffer (2X)	Promega (Deutschland)
pMIRREPORT - Vektor	Promega (Deutschland)
Passive Lysis Puffer	Promega (Deutschland)
Ultra Pure Water	Promega (Deutschland)
HiSpeed® Plasmid Midi Kit	Qiagen (Australien)
SYBR-GREEN	Qiagen (Australien)
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Roth (Deutschland)
Ethidiumbromid	Roth (Deutschland)
Ethanol	Roth (Deutschland)
Essigsäure	Roth (Deutschland)
Tris	Roth (Deutschland)
Natriumchlorid (NaCl)	Roth (Deutschland)
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Roth (Deutschland)
DEPC-H <sub>2</sub> O	Roth (Deutschland)

**3.1.2.3 Oligonukleotide (Primer) für qRT-PCR**

Um die Expression der miR-Zielgene zu untersuchen, mussten Oligonukleotidprimer eingesetzt werden. Die als Primer bezeichneten Oligodesoxyribonukleotide determinierten dabei den zu kopierenden Sequenzabschnitt, indem sie an Orten komplementärer Sequenz mit der Ziel-DNA hybridisierten und als Starter für die Polymerisation dienten.

Bezeichnung/Hersteller	Sequenz	Fluoreszenzmarkierung
GapdH (MWG)	for 5'- cca gcc gag cca cat cgc tc -3' rev 5'- atg agc ccc agc ctt ctc cat -3'	5' SBG1
β-Actin (biomers)	for 5'- cct ggc acc cag cac aat -3' rev 5'- ggc gat cca cac gga ct -3'	5' SBG1
HER2/neu (biomers)	for 5'- gac ctg ctg aac tgg tgt atg -3' rev 5'- cat ggt tgg gac tct tga cca -3'	5' SBG1
HER2/neu (Qiagen)	als Kit geliefert, siehe <a href="http://www.qiagen.com">www.qiagen.com</a>	5' SBG1
HER3 (Qiagen)	als Kit geliefert, siehe <a href="http://www.qiagen.com">www.qiagen.com</a>	5' SBG1

**3.1.3 Geräte und Verbrauchsmaterialien**

Gerät	Modell(e)	Hersteller
Autoklav	3850 EL	Systec (Deutschland)
Brutschrank	CB 210	WTB Binder (Deutschland)
Cycler / qRT Cycler	Primus 96 Opticon 2	MWG (USA) BIO-RAD (USA)
Digitaldrucker	DVP-1200	SEIKO (Japan)
Geldokumentationssystem	GelDoc XR	BIO-RAD (USA)
Küvetten	UltraVette 70 - 850 µl	Roth (Deutschland)
Mikroskop	Diavert	Leitz (Deutschland)
Monochromator	MultiSKAN MS	Labsystems (USA)
Photometer	Smartspec Pro	BIO-RAD (USA)
Röhrchen	Polypropylen mit Schraubdeckel, 15-50 ml Eppendorf Röhrchen 2ml	Sarstedt (Deutschland) Eppendorf (Deutschland)
Sterilbank	06 12	PRETTL (Deutschland)
Wasserbad	TW12	Julabo (Deutschland)

Gerät	Modell(e)	Hersteller
Zellkultur	Kulturschalen/Kulturflaschen	Cellstar / NUNC (USA / Deutschland)
	Einmal Sterilglaspipette: 2,0-25,0 ml	NUNC (Deutschland)
	Fuchs-Rosenthal-Kammer	Brandt (Deutschland)
	Accu-Jet Pro	Brandt (Deutschland)
Zentrifuge	Biofuge primo	Heraeus (Deutschland)
	Minifuge	Heraeus (Deutschland)
	Centrifuge 5415 D	Eppendorf (Deutschland)

### 3.1.4 Software

Software
Access Software for Multiskan
Apple IWork 9
Microsoft Excel Office XP
Opticon 2 Software
Quantity One 4.5.2 (BIO-RAD)

### 3.1.5 Internetbasierte Datenbanken und Programme

Datenbanken / Programme
NCBI-Homepage ( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">http://www.ncbi.nlm.nih.gov</a> )
Primerdesign ("Genome Database"; <a href="http://gdbwww.gdb.org">http://gdbwww.gdb.org</a> )
Primerbestellung ( <a href="http://www.biomers.net">http://www.biomers.net</a> , <a href="http://www.qiagen.com">http://www.qiagen.com</a> , <a href="http://www.mwg-biotech.com">http://www.mwg-biotech.com</a> )
Computerassistierte miRNA-Zielgen-Vorraussage ( <a href="http://www.targetscan.org">http://www.targetscan.org</a> )
Computerassistierte miRNA-Zielgen-Vorraussage ( <a href="http://www.microrna.org">http://www.microrna.org</a> )
Computerassistierte miRNA-Zielgen-Vorraussage ( <a href="http://mirnamap.mbc.nctu.edu.tw">http://mirnamap.mbc.nctu.edu.tw</a> )

### 3.1.6 Primäre PCa-Kollektive

Diese Studie wurde vom Ethik-Komitee der Universität Würzburg bewilligt (no. 59/04) und von allen Patienten der im folgenden beschriebenen Kollektive lag eine schriftliche Einverständniserklärung vor.

#### 3.1.6.1 Beschreibung des Hochrisiko-PCa-Kollektivs (n=89)

Um einen erweiterten Blick über die Verteilung von miR-Expressionen im PCa zu erlangen, wurde in dieser Arbeit die sich ständig erweiternde Hochrisiko-Tumordatenbank (Stand: 16.06.2009) der *European multicenter clinical and translational Prostate cancer research group (EMPaCT)* analysiert. Erfasst wurden klinische

Merkmale, unter anderem das Alter, das TNM-Staging, der Gleason-Score, der präoperative PSA-Wert, der PSA- und klinische Progress. Außerdem lag ein langes *Follow-Up* für dieses Patientengut vor. Die Proben lagen in Form von paraffineingebetteten Geweben entweder von radikalen Prostataektomiepräparaten oder Lymphknoten-metastasen (Gewebe mit >90% Karzinomanteil wurde verwendet) oder von Prostata-Adenomektomiepräparaten (Gewebe mit >80% Adenomanteil ohne Karzinomnachweise wurde verwendet) vor. Tabelle 3 gibt einen Überblick über das verwendete Kollektiv:

Merkmal	n=	
Anzahl der ausgewerteten Karzinome	89	
Anzahl der ausgewerteten BPH	9	
Gewebeeinbettung	Paraffin	
miR-205-Expression Karzinome ( $\Delta Ct$ )	-7,08 - 4,86 ( $\emptyset$ 0,60)	
miR-205-Expression BPH ( $\Delta Ct$ )	2,45 - 4,45 ( $\emptyset$ 3,26)	
Alter bei Operation (Jahre)	52-78 ( $\emptyset$ 65,8)	
Follow-Up-Zeit (Monate)	1-153 ( $\emptyset$ 74,2)	
Verstorben (Nicht PCa-spezifisch)	13 (nach $\emptyset$ 57 Monaten)	
Verstorben (PCa-spezifisch)	11 (nach $\emptyset$ 41 Monaten)	
Gleason-Score	$\leq 6$ 2 (2,25%) 7            36 (40,45%) $\geq 8$ 50 (56,18%)	
Tumor-Stadium (pT-Stadium)	pT2        13 (14,61%) pT3a      23 (25,84%) pT3b      38 (42,70%) pT4        15 (16,85%)	
Lymphknotenstatus	pN0        56 (62,92%) pN+        33 (37,08%)	
PSA-Wert präoperativ	20 - 156 ( $\emptyset$ 49,6)	
PSA-Progress	JA        28 (31,46%) NEIN     61 (68,54%)	
Zeitpunkt PSA-Progress (Monate)	4 - 122 ( $\emptyset$ 35,21)	
Klinischer Progress	JA        20 (22,47%) NEIN     69 (77,53%)	
Zeitpunkt klinischer Progress (Monate)	4-113 ( $\emptyset$ 33,15)	

**Tabelle 3: 89 *high-risk*-PCa und 9 BPH im Überblick. Reevaluierung der Gleason-Score aller Tumore durch den Pathologen (P.Ströbel, Universitätsklinik Mannheim).**

Bei allen Patienten wurde präoperativ eine DRE, ein pelvines CT und Knochenszintigramm durchgeführt. Ein positiver Lymphknotenstatus wurde nicht als Ausschlusskriterium für die Aufnahme in das Kollektiv geführt.

Das *Follow-Up* wurde unmittelbar nach Operation im 3-monatigen Abstand für 2 Jahre vorgenommen, halbjährlich in den drei darauffolgenden und danach jährlich. PSA-Progression wurde als PSA-Erhöhung  $\geq 0.2$  ng/ml in zwei aufeinander folgenden *Follow-Up*-Sitzungen definiert. Klinischer Progress wurde entweder als bewiesenes lokales Wiederauftreten des Karzinoms (Lokalrezidiv) oder nachgewiesene Metastasen in CT oder Knochenszintigramm definiert. BPH-Proben wurden von Adenomektomie-Patienten mit normalen Serum-PSA-Werten acquirit. Ein Karzinom wurde histopathologisch ausgeschlossen.

Bestandteil der Tumorbank sind neun BPH als Referenzgewebe und 89 High-Risk-PCa (präoperativer Serum-PSA $>20$ ng/ $\mu$ l). Keiner der Patienten erhielt zu irgendeinem Zeitpunkt neoadjuvante-, Hormon-, Strahlen- oder Chemotherapie.

**3.1.6.2 Beschreibung des PCa-Kollektivs aus nativem Frischmaterial (n=16)**

Von den innerhalb des Zeitraumes vom 15.04.2008 bis zum 18.07.2008 radikal prostatektomierten Patienten wurden für das folgende Kollektiv 16 zufällige Präparate ausgewählt, welche nicht paraffiniert, sondern nativ eingebettet vorlagen. Mit diesem Material wurden Versuche möglich, die mit paraffiniertem Material (Hochrisikokollektiv, siehe 3.1.6.1) nicht realisierbar wären. Das Kollektiv war zudem in seiner klinischen Zusammenstellung rein zufällig und somit zusätzlich als Kontrolle zum spezifischen Hochrisikokollektiv geeignet. Von diesen 16 Patienten wurden nativ eingebettete Gewebeproben in der Tumordatenbank der Arbeitsgruppe angelegt. Der zuständige Pathologe bestimmte aus dem Nativmaterial Tumor- und Normalgewebe (=tumorfrees Gewebe). Die Gewebeproben wurden anschließend im Labor einer RNA-Extraktion wie in 3.2.4 beschrieben unterzogen.

<b>Merkmal</b>	<b>n=</b>	
Anzahl der ausgewerteten Karzinome	16	
Gewebeeinbettung	Nativmaterial	
Alter bei Operation	61,3 Jahre (50-71)	
Gleason-Score	$\leq 6$	3 (18,75%)
	7	7 (43,75%)
	$\geq 8$	6 (37,50%)
Tumor-Stadium	pT2	6 (37,50%)
	pT3a	4 (25,00%)
	pT3b	4 (25,00%)
	pT4	2 (12,50%)
Lymphknotenstatus	pN0	14 (87,50%)
	pN+	2 (12,50%)
Resektionsstatus	R0	10 (62,50%)
	R+	6 (37,50%)
PSA-Wert präoperativ	10,9 (3,2 - 39,6)	

**Tabelle 2: 16 Nativtumoren mit zugehörigen klinischen Daten.**

### 3.2 Methoden

#### 3.2.1 Sterilisation von Materialien und Lösungen

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

#### 3.2.2 Kultivierung von Tumorzelllinien

Die Tumorzellen wurden in 75cm<sup>2</sup> Kulturflaschen im oben beschriebenen DMEM (*Dulbeccos's minimal essential medium*) und bei 37°C, 6% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchte kultiviert. Die Zellaussaat erfolgte in einer Dichte von 20.000- 30.000 Zellen pro cm<sup>2</sup>. Bei Erreichen von 80% konfluentem Wachstum (etwa alle 3-4 Tage) wurden die Zellen abgelöst und subkultiviert, nach Absaugen des Mediums und zweimaligem Spülen mit PBS wurden die Tumorzellen mit 3 ml Trypsin (0,05% Trypsin) 5 min bei 37°C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in ein 50ml Falcon-Zentrifugationsröhrchen überführt und 10 min bei 4°C und 1000 u/min zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Zellen in DMEM resuspendiert und die Zellzahl in der Fuchs-Rosenthal-Kammer bestimmt. Die Tumorzellen wurden im 80%-igen subkonfluenten Wachstumsstadium in die Versuche eingesetzt. Die Zelllinien wurden so regelmäßig passagiert und nach ca. 20 Passagen verworfen.

#### 3.2.3 Transiente Transfektion der Tumorzelllinien mit microRNA

Die Transfektion von microRNA mit kationischen Lipiden wurde mit precursor- und antago-microRNA sowie mit precursor- und antago-microRNA-Kontrollen durchgeführt. Hierbei wurde mit Lipofectamine 2000 gearbeitet. Im Folgenden wurde die Transfektion für ein 6-well-Format beschrieben. Einen Tag vor der Transfektion wurden die Zellen ausplattiert, sodass sie zum Zeitpunkt der Transfektion zu ca. 70-80 % konfluent waren (Zellzahl etwa 10<sup>5</sup> Zellen pro 1 ml). Zur Präparation der microRNA-Lipofectamine- 2000-Komplexe wurden 20 bis 100 pmol micro-RNA in 100 µl serumfreien Opti-MEM-Medium gelöst. In weiteren 100 µl Opti-MEM-Medium wurden 3 µl Lipofectamine 2000 gelöst. Beide Ansätze wurden 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend zusammengeführt und für weitere 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Entfernung des Serums wurden während dieser Zeit die Zellen einmal mit PBS gewaschen und bis zur Transfektion in PBS inkubiert. Anschließend wurden die microRNA-Lipofectamine-2000-Ansätze mit Opti-MEM-Medium auf 500 µl aufgefüllt und direkt auf die Zellen gegeben. Nach 12-16 Stunden Inkubation im Brutschrank erfolgte ein Mediumwechsel, wobei jeweils 2 ml Normalmedium auf die Zellen gegeben wurde. Außerdem wurde die Transfektion am gleichen Tag zusätzlich für zwei 96-well-Formate durchgeführt, die für Überprüfung vitaler Zellen an Tag 2 und Tag 5 post Transfectionem mittels Monochromator und Testlösung nötig war (siehe 3.2.6). Bei der Transfektion im 96-well-Format wurde in Triplikaten transfiziert (nach oben beschriebenem Standardprotokoll). Die Transfektion erfolgte wie oben beschrieben für alle microRNAs und in allen oben genannten Zelllinien.

#### 3.2.4 RNA-Extraktion und Aufreinigung

Die Isolierung der RNA aus dem Frischmaterial erfolgte 48h post transfectionem in fünf Schritten. Hierbei wurde auf eine RNase-freie Arbeitsumgebung (Wischdesinfektion der Arbeitsflächen mit RNase-Inhibitor-Lösungen, RNase-freie Handschuhe) und RNase-freie Medien und Reaktionsgefäße geachtet.

Im folgenden wird das Standardprotokoll für die RNA-Extraktion beschrieben.

- (I) Homogenisation:** Den Proben wurde pro 50-100mg je 1ml TRIzol zugesetzt.
- (II) Phasentrennung:** Der Ansatz wurde bei Raumtemperatur für 5 Min. inkubiert. Nach Zugabe von 0,2ml Chlorophorm pro 1ml TRIzol wurde die Probe mindestens 15 sec. lang geschüttelt, nochmals 2-3 Min. bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zentrifugiert (2-8°C; 12.000g; 15 Min.).
- (III) Präzipitation:** Nach Abnahme des Überstandes wurde 0,5ml Isopropanol pro 1ml TRIzol zugegeben und bei Raumtemperatur 10 Min. inkubiert und geschüttelt. Anschließend erfolgte die Pelletierung der Proben (2-8°C; 12.000g; 10 Min.).
- (IV) Waschung:** Nach Entfernen des Überstandes wurde das RNA-Pellet in 1ml 75%-Ethanol pro 1ml TRIzol gewaschen, kurz geschüttelt und zentrifugiert (2-8°C; 7.500g; 5 Min.).
- (V) Auflösung:** Nach vorsichtigen Abgießens des Überstandes wurde das Pellet luftgetrocknet (30 Min.), in 50µl RNasefreiem Wasser gelöst und zur völligen Resuspension bei 55-60°C für 10 Min. inkubiert.

### 3.2.5 Quantitäts- und Reinheitskontrolle der Nukleinsäuren

Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung für sowohl DNA als auch RNA erfolgte photometrisch bei 260nm und 280nm in einer 1:100-Verdünnung (Gesamtvolumen 100µl). Als Nullabgleich wurde eine mit ddH<sub>2</sub>O gefüllte Küvette verwendet.

### 3.2.6 Vitalitätskontrolle der transfizierten Tumorzelllinien (MTS-Assay)

Mittels des „Cell Titer 96 Assays“ der Firma Promega, das auf Basis des Salzes Tetrazolium (Methyltetrazoliumsulfat, s.u.) arbeitet, wurde im Monochromator die Anzahl vitaler Zellen als Korrelation zum Farbumschlag (siehe unten) zwei Tage post transfectionem vermessen. Das Cell Titer 96 Assay Reagenz wurde zunächst in pH 7 gepufferter PBS-Lösung im Verhältnis 1:10 verdünnt. Zeitgleich wurden die 96-well-Platten mit den transfizierten Zellen aufbereitet: Das Medium wurde aus allen Vertiefungen entfernt und zwei Mal mit PBS gespült. Anschließend wurden pro Vertiefung 100µl der verdünnten Assay-Lösung eingebracht. Die so präparierten Platten wurden drei Stunden im Inkubator gelagert und deren Absorptionen anschließend bei 490nm im Monochromator gemessen.

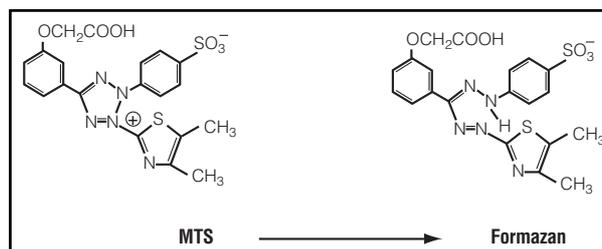


Abb. 4: Reaktionsbeschreibung des MTS-Salzes und seinem in Zellen umgesetzten Endprodukt Formazan, dessen Absorption bei 490nm vermessen wird. Die Absorption (Farbumschlag) von Formazan ist so direkt proportional zum Anteil lebender Zellen.

Als Referenzwellenlänge wurde 610nm gewählt, um Hintergrundphänomene - wie etwa Zellrückstände und andere unspezifische Absorptionen - zu eliminieren. Die Absorptionen wurden mittels der „Ascent Software for Multiskan“ digitalisiert und in Excel-Tabellen abgespeichert. Zur weiteren Datenverarbeitung siehe 3.2.12.1.

### 3.2.7 Polymerasekettenreaktion (PCR) - Allgemeines

Die semiquantitative Amplifikation der untersuchten cDNA-Abschnitte erfolgte mit der Polymerasekettenreaktion. Diese Methode ermöglichte die in-vitro-Vervielfältigung von Nukleinsäuren und verläuft in drei sich zyklisch wiederholenden Phasen: <sup>96</sup>

- (I) Denaturierung:** Durch kurzzeitiges Erhitzen über die DNA-Schmelztemperatur (92°C-98°C) hinaus wurde die DNA-Doppelhelix in Einzelstränge aufgetrennt.
- (II) Annealing:** Während des anschließenden raschen Abkühlens (50°C-65°C) banden zwei synthetische Oligonukleotide (Primer) an ihre komplementären Sequenzen der DNA-Einzelstränge, welche die zu amplifizierende Region flankierten.
- (III) Elongation:** Bei 72°C wurden die beiden DNA-Einzelstränge durch die Taq-DNA-Polymerase in 3'-Richtung - d.h. in Richtung auf die Zielsequenz - durch Anlagerung der im Reaktionsansatz vorhandenen Nukleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) zu Doppelsträngen komplettiert.

Um eine exponentielle Zunahme der amplifizierten DNA zu erhalten, wurden die drei Phasen der PCR mehrfach nacheinander durchlaufen. Unter optimalen Bedingungen verdoppelte sich dabei mit jedem durchlaufenen Zyklus die Anzahl der synthetisierten DNA-Moleküle. Primerabhängig wurden 30-40 Zyklen durchlaufen.

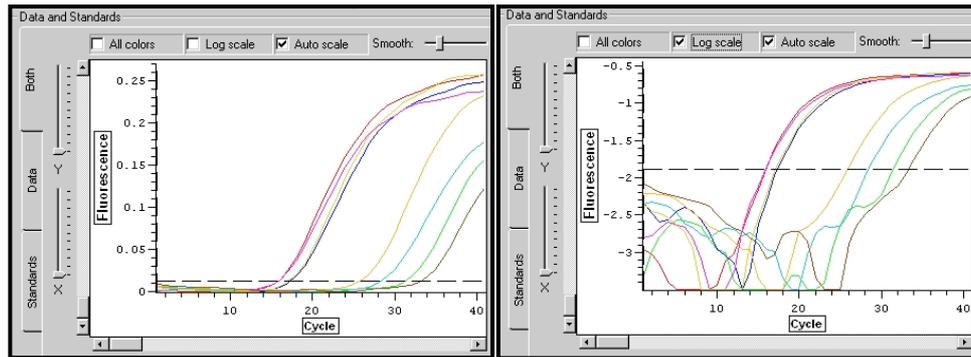
### 3.2.8 Reverse Transkription

Die gewonnene RNA musste zuerst in einem Zwischenschritt (= reverse Transkription) in cDNA umwandelt werden. Die Anwendung der reversen Transkription mit nachfolgender Polymerasekettenreaktion (PCR) zum Nachweis, bzw. mittels Real-Time-PCR (qRT-PCR) zur Quantifizierung einer spezifischen mRNA, stellt eine Routinemethode in der Molekular-biologie dar. Die Transkription von mRNA zu cDNA wurde mit Hilfe von zwei Reverse-Transkriptions-Systemen durchgeführt: für die zufällige, komplette Amplifikation des in der Zelle enthaltenen RNA-Gehalts mittels Random Primern wurde das „*Im-Prom-II Reverse Transcription System*“ nach einem modifizierten Protokoll des Herstellers Promega verwendet. Das Ziel war hierbei, mögliche Ziel-mRNAs mittels qPCR und SYBR-GREEN Anregung nachzuweisen. Für die Amplifikation der Genabschnitte der jeweiligen micro-RNA von Interesse wurden die micro-RNA-Assay-Kits für micro-RNA 205 und 221 von Applied Biosystems mit speziellen Primern verwendet, um in der qPCR und FAM-Anwendung die Expressionen der jeweiligen micro-RNAs zu erfassen. Für den Promega-Ansatz wurde die vorliegende RNA auf 1µg/ml verdünnt und ad 11,6 µl DEPC-H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Für den micro-RNA-Assay-Ansatz wurde die RNA auf 10ng/ml verdünnt und ad 50µl DEPC-H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Die Ansätze für die in einem sterilen Eppendorfgefäßen stattfindende Transkriptionsreaktion erfolgten wie vom Hersteller empfohlen (für die Standardprotokolle, siehe Beiheft „*Im-Prom-II Reverse Transcription System*“, Promega, Ausgabe 2009).

### 3.2.9 Quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)

#### 3.2.9.1 Prinzip der qRT-PCR und Überblick

Die Real-Time PCR (qRT-PCR) ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerasekettenreaktion mit reverser Transkriptase (RT-PCR, 3.2.7-8) beruht und zusätzlich die Quantifizierung der gewonnenen DNA in Echtzeit möglich macht. Die qRT-PCR ist anderen Methoden der Expressionsanalyse überlegen: Detektion und Analyse eines bestimmten Gentranskriptes erfolgen in der qRT-PCR unter Ausnutzung der Geschwindigkeit und Sensitivität der PCR. <sup>97</sup>



**Abb. 5 und 6: Darstellung von Ct-Wert-Bestimmungen.** Exponentielle (links) und logarithmische (rechts) Darstellung der der Ct-Werte. Der Ct-Wert einer Probe entsprach der Anzahl Zyklen (x-Achse), die nötig waren, um ein durch den *Threshold* (gestrichelte Linie, in diesem Fall 0.013) vorab festgelegtes Fluoreszenz-Niveau (y-Achse) zu erreichen. Je geringer der Ct-Wert einer Probe, desto höher war die eingesetzte DNA-Ausgangsmenge. Durch Normalisierung mittels *housekeeping-genes* konnte indirekt auf den Genexpressionslevel der Probe geschlossen werden.

Die Quantifizierung erfolgte durch Messung der Fluoreszenzzunahme von einem Farbstoff (z.B. SYBR-GREEN oder FAM in der vorliegenden Arbeit), der mit seiner positiven Ladung mit der negativ geladenen DNA interkalierte. Die so mit jedem Zyklus der qRT-PCR zunehmende Fluoreszenz korrelierte also mit der quantitativen Zunahme der amplifizierten DNA. Als Maß für die Quantifizierung wurden die sog. Ct-(=cycle threshold)-Werte bestimmt. Diese entsprechen der Anzahl der PCR-Zyklen, die notwendig waren, um ein festgelegtes Fluoreszenz-Niveau (siehe Abb. 5 und 6) zu erreichen. Der Ct-Wert verhielt sich somit umgekehrt proportional zur cDNA-Ausgangsmenge. Diese Methode erlaubt einen indirekten Rückschluss auf das Expressionsmaß bestimmter Gene. Um die relativen Genexpressionslevel zwischen verschiedenen Proben vergleichbar zu machen, mussten evtl. vorhandene cDNA-Konzentrationsunterschiede der Probe durch Normalisierung ausgeglichen werden. Dies gelang mithilfe sog. „*housekeeping-genes*“. Diese Gene werden idealerweise ubiquitär in jeder Zelle in gleichbleibender Stärke exprimiert. In dieser Arbeit wurden zu diesem Zweck die Gene GapdH und  $\beta$ -Actin für SYBR-GREEN-Anwendungen und RNU6B für FAM-Anwendungen verwendet. Der „*Threshold*“ (Schwellenwert) wurde für alle Experimente auf 0.015 festgelegt

### 3.2.9.2 Oligonukleotide (Primer)

Für Sequenzen intronüberspannender Primer siehe 3.1.2.3. Falls Primer in Kits geliefert wurden (Qiagen), war die Sequenz nur dem Hersteller bekannt; in diesem Falle sei auf die jeweilige Hersteller-Website verwiesen. Folgende Primer wurden in der SYBR-GREEN Anregung verwandt: HER2, HER3, GapdH,  $\beta$ -Actin, jeweils in einer 1:10 Verdünnung mit PBS. Die Primer wurden auf eine 100 pmol-Verdünnung (vom Hersteller im Datenblatt vorgegeben) eingestellt. Verwendete Primer FAM-Anwendung: pre/anti-miR-205, pre/anti-miR-221, Kontrollen (5-fach verdünnte Primer für reverse Transkription, 20-fach verdünnte Primer für die qRT-PCR, mit den in 3.1.2.3 beschriebenen Kits geliefert und fertig angesetzt).

### 3.2.9.3 qRT-PCR Ansatz und Schmelzkurvenanalyse

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

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

Standardansatz FAM - Anregung qRT-PCR	
Universal PCR Mastermix	22,50µl
DEPC-H2O	12,75µl
20x Primer (Assay-Kit)	2,25µl
cDNA-Probe	8,00µl
	2x22,75µl = <b>45,50µl</b>

Amplifikationsschema für (I) im qRT-PCR Cyler (Opticon 2), programmiert mit zugehörigem Opticon Monitor 2 Programm:

- 95°C für 15 Minuten (Initiations-Denaturierung)
- 94°C für 15 Sekunden (Denaturierung)
- 60°C für 1 Minute (*Annealing* / Elongation, sog. „two-step-PCR“)
- Platten-Scan
- Wiederholung in 40 Zyklen (Anschließend keine Schmelzkurvenanalyse)

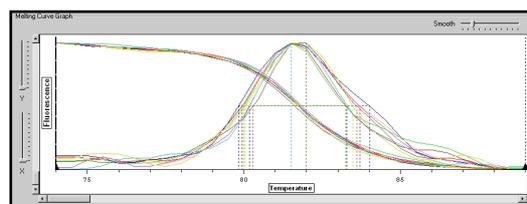
**(II) Standardansatz für Reaktion II (als Doppelansatz):**

Standardansatz SBG1 - Anregung qRT-PCR	
Quantitect SYBR-GREEN	20,00µl
DEPC-H2O	12,00µl
10x Primer	4,00µl
cDNA-Probe (50ng/µl)	4,00µl
	2x22,00µl = <b>40,00µl</b>

Amplifikationsschema und Schmelzkurvenanalyse für (II) im qRT-PCR Cyler (Opticon 2), programmiert mit zugehörigem Opticon Monitor 2 Programm:

- 95°C für 15 Minuten (Initiations-Denaturierung)
- 94°C für 15 Sekunden (Denaturierung)
- 55°C für 30 Sekunden (*Annealing*)
- 72°C für 30 Sekunden (Elongation)
- Platten-Scan
- Wiederholung in 40 Zyklen
- Schmelzkurvenanalyse von 74,0 °C bis 90,0 °C, Platten-Scan alle 0,5 °C, Halten für 3 Sekunden.

Zur Charakterisierung der während der qRT-PCR in (II) entstandenen PCR-Produkte wurde im Anschluss an die 40 Zyklen der Amplifikation eine Schmelzkurvenanalysen durchgeführt.



**Abb. 7: Charakterisierung der Amplifikationsprodukte mittels Schmelzkurvenanalyse. Bei Erreichen der für das gewünschte Produkt spezifischen Schmelztemperatur kommt es zu einer starken Abnahme des Fluoreszenzsignals. Unspezifische, unerwünschte Nebenprodukte schmelzen meist schon bei geringeren Temperaturen und zeigen sich als zusätzlicher Peak.**

Das Standard-Temperaturprofil zur Schmelzkurvenanalyse begann mit der Einstellung der Temperatur auf 74°C. Anschließend wurde die Temperatur alle 10 sec. um jeweils 1°C schrittweise auf 90°C erhöht. Dabei wurden die Fluoreszenzsignale der Proben so oft sequenziell gemessen, bis die Zieltemperatur erreicht war. Mit Hilfe der Schmelzkurven-analyse konnte das spezifische postulierte Amplifikat nachgewiesen werden. Unspezifische Produkte waren meist kleiner und wiesen eine niedrigere Schmelztemperatur auf.

**3.2.10 Agarose-Gelelektrophorese**

Die Ergebnisse der in (I) und (II) durchgeführten qRT-PCR-Amplifikationen wurden zusätzlich zur Schmelzkurvenanalyse mittels Gelelektrophorese in 0,9%igem Agarosegel auf unspezifische Amplifikationsprodukte kontrolliert. Zur Herstellung des Geles wurden 0,9g Agarose in 100ml 0,5x TBE-Puffer in der Mikrowelle kurz aufgekocht und unter Rühren auf 60°C abgekühlt. Nach Zugabe von 8µl Ethidiumbromid wurde die Lösung luftblasenfrei in das Gelelektrophoresesystem gegossen. Sobald das Gel auspolymerisiert war, konnte es in die mit 0,5x TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer transferiert werden. Nach Entfernen des Gelkammes erfolgte die Beladung der Geltaschen. Jeweils 20µl PCR-Produkt wurden mit 5µl Ladepuffer versetzt und in eine der Geltaschen pipettiert. Zur Bestimmung der Fragmentgröße der DNA-Proben wurde eine leere Tasche mit 5µl einer 100bp-DNA-Basenleiter beladen. Bei 120V für 40 Min. erfolgte die Auftrennung der DNA-Fragmente, anschließend konnten die DNA-Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht und photodokumentiert werden.

**3.2.11 Dual-Luciferase Reporter Assay**

**3.2.11.1 Allgemeines und Prinzip**

Genetische Reporter-Assays werden in der Zellphysiologie standardmäßig eingesetzt, um Genexpression zu studieren. Duale Reporter, wie sie in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, erhöhen die Genauigkeit der Experimente, indem zwei Reporterenzyme in einem System gleichzeitig exprimiert und gemessen werden. Typischerweise ist der eine „experimentelle“ Reporter mit dem zu messenden Effekt der spezifischen Bedingungen der Experimente verbunden, während die Aktivität des anderen sog. „Kontroll“-Reporters eine interne Kontrolle mit solider Grundaktivität darstellt.<sup>98,99</sup> Eine zum Kontrollreporter durchgeführte Normalisierung minimierte die experimentelle Variabilität in den Experimenten. Mit Hilfe dieser Methode wurde eine verlässliche Auswertung der experimentellen Daten durch Reduzierung externer Einflüsse ermöglicht.

**3.2.11.2 Konstruktion von Reporter-Plasmiden**

Für die Versuche wurde der pMIR-Report-Vektor der Firma Ambion verwandt.

Primer-Bezeichnung	Sequenz
c-kit	SpeI for 5' - ctg <b>act agt</b> atg tgg aac aag cct atc agc - 3' Hind III rev 5' - gta <b>aag ctt</b> tgc ctt tta tat tgg gea gtg - 3'
p27Kip1	SpeI for 5' - ggg <b>tac tag</b> ttc ctt gtt tat cag ata cat cac t - 3' Hind III rev 5' - ggt <b>aag ctt</b> tt aaa tga agt atc agc tgt ctc - 3'

**Tabelle 4: Darstellung der Primersequenzen für c-kit und p27Kip1. Rot unterlegt sind die Ansatzstellen für die Restriktionsenzyme an den multiple cloning sites Hind III und SpeI.**

Die jeweils 512bp und 520bp langen Fragmente der vorausgesagten Zielgene von miR-221, c-kit und p27kip1, wurden mittels PCR amplifiziert (Protokoll siehe unten). Hierbei wurden die in Tabelle 4 beschriebenen Primer verwendet, welche die Restriktionsstellen *Hind*III und *Spe*I flankierten (rot markiert: Ansatzstellen für Restriktionsenzyme im Klonierungsprozess).

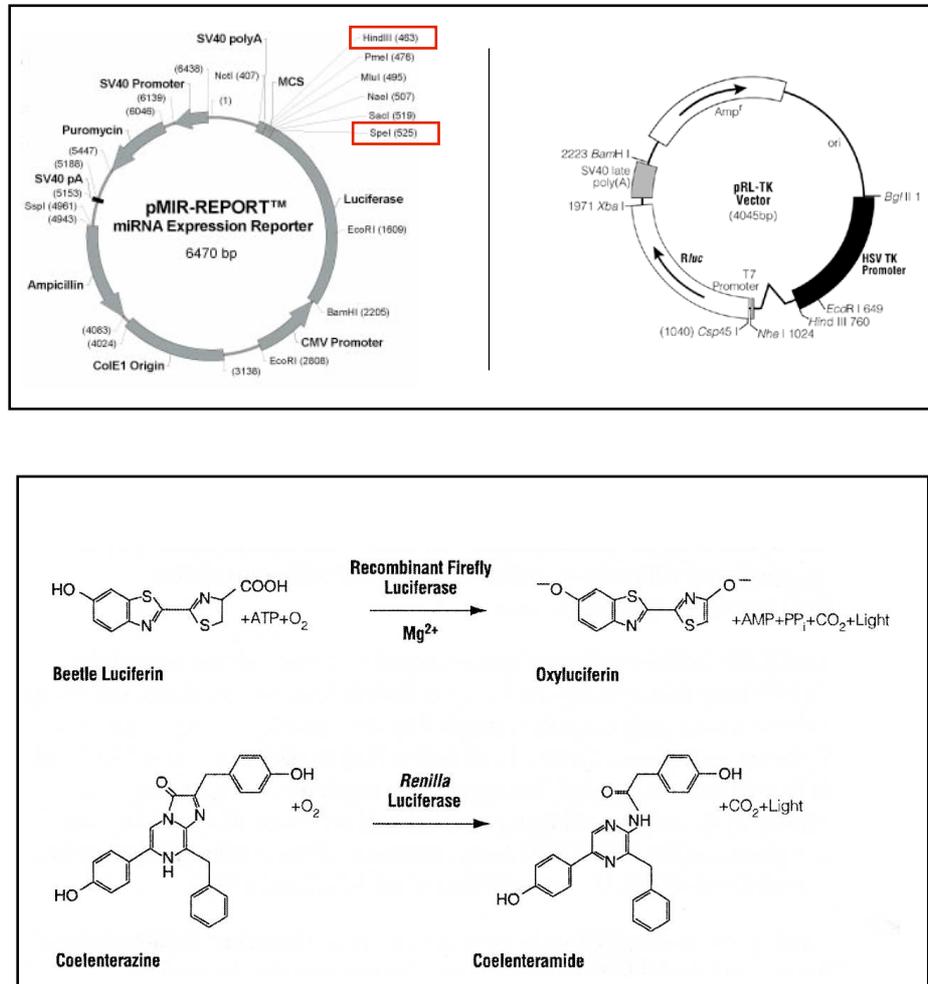


Abb. 8: Darstellung der verwendeten Vektoren für die Dual-Luciferase-Assay-Versuche (A). Darstellung der Reaktion der *firefly*- und *renilla*-Luciferase (B). (A) Links dargestellt der pMIR-REPORT-Vektor, in dessen *Spe*I und *Hind*III-*cloning-sites* (rote Kästen) die Gensequenzen kloniert wurden, rechts der pRL-TK Kontrollvektor mit der Renilla-Luciferase (modifiziert nach Beiheft Promega/Ambion, 2009). (B) Die Reaktionen der verschiedenen Luciferasen im Vergleich. *firefly*-Luciferase emittiert bei Aktivierung Licht mit der Wellenlänge von 560nm, *renilla*-Luciferase mit einer Wellenlänge von 482nm. Durch die unterschiedliche Substratspezifität ist eine selektive Zuordnung der bioluminiszierenden Reaktion gewährleistet (Promega 2006).

Protokoll der spezifischen Amplifikations-PCR:

- 1) 95°C - 30-60 sec (Denaturierung)
- 2) 50-65°C - 30-90 sec (*Annealing*)
- 3) 72°C - 30-90 sec (Elongation)

Die erhaltenen Gensequenzen enthielten die 3'UTR der jeweiligen Gen-mRNAs. An den Enden der Gensequenz waren durch die PCR die Überhänge von SpeI und HindIII eingesetzt worden, um die Sequenzen in die Vektoren klonieren zu können (siehe Abb. 8). Die Promotorsequenzen wurden in kommerziell erhältliche Plasmide nach Herstellerprotokoll kloniert. Die Plasmide enthielten als Reportergen die Luciferase des nordamerikanischen Leuchtkäfers (*Photinus pyralis*) und zusätzlich ein Resistenzgen gegen Ampicillin (siehe Abb. 8). Als Kontrollreporter-Plasmid diente der pRL-TK Vektor von Ambion, der die Renilla-Luciferase enthielt.<sup>100,101</sup>

### 3.2.11.3 Transformation von kompetenten Zellen

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

### 3.2.11.4 Mini- und Midipräparation von Plasmiden

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

### 3.2.11.5 Identifikation durch Restriktionsverdau

Zur Überprüfung, ob das Plasmid ein bestimmtes Insert enthielt, wurde das Plasmid mit einem oder zwei Restriktionsenzymen geschnitten. Der Restriktionsansatz wurde entsprechend den Angaben des Herstellers hergestellt. Nach elektrophoretischer Auftrennung der verdauten Plasmide in einem präparativen, ethidiumbromidhaltigen 0,8%-igen TAE-Agarosegel (Tris-Acetat-EDTA-Puffer-Agarosegel) erfolgte eine Beurteilung der erhaltenen Fragmentlängen unter UV-Licht gegenüber einem DNA-Standard definierter Größe. Zum Vergleich wurden die entsprechenden ursprünglichen DNA-Plasmide und Kontrollplasmide ebenso behandelt. Die entsprechende Bande im TAE-Agarosegel wurde ausgeschnitten und aufgereinigt (*MicroElute Gel Extraction Kit*). Um die Plasmide mit den gewünschten Inserts auf richtige Basenabfolge zu überprüfen, wurden die Proben an die Firma GATC (Ravensburg) gesandt, welche eine Insertüberprüfung mittels Sequenzierung durchführte und danach zurückschickte.

### 3.2.11.6 Transfektion

Die Zelllinien LNCaP, PC3 und 22RV1 wurden in Anzuchtplatten mit zwölf Vertiefungen ohne Antibiotikazugabe angezüchtet. In die Zellen wurden die in 3.2.11.2 beschriebenen Reporter- und

Kontrollplasmide transfiziert; der Vektor PMIR-Report wurde dabei in der Verdünnung 50ng/µl und der Kontrollvektor pRL-TK in 50ng/µl zugegeben. Außerdem wurden pre-/antago-miR-221 und Kontroll-miRs in jeden Ansatz kotransfiziert (Protokoll siehe 3.2.3). Am Tage nach der Transfektion wurde das Medium erneuert.

### 3.2.11.7 Pobenaufarbeitung und Luciferase-Assay

Nach erfolgter Transfektion wurden die Zellen 48 Stunden p.T. mit kalter Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) gespült. Nach Entfernung des PBS wurden die Zellen mit 500 µl *Passive Lysis Buffer* (PLB) (Promega; in einer 1:5 Verdünnung mit *Ultra Pure Water*) pro Well versetzt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Das erhaltene Zellysate wurde anschließend in ein Reaktionsgefäß überführt und für eine Minute bei 20000 rpm und 4°C zentrifugiert. Für die Messung der Luciferase-Aktivität wurden 20 µl des Zellysate-Überstandes in 100 µl vorgelegtes Luciferase-Assay-Reagenz gegeben und in direktem Anschluss im Luminometer Lumat LB 9507 für 10 Sekunden vermessen. Diese Arbeit wurde von Frau Katrin Borschert durchgeführt. Dabei kam das duale System des Assays zum Tragen (siehe auch Abbildung 8): Das Luciferase-Enzym des Leuchtkäfers *Photinus pyralis* (*firefly luciferase*) ist ein monomeres Protein, das keiner posttranslationalen Prozessierung unterliegt. Die Luciferase katalysierte die Umsetzung von Luciferin in Gegenwart von Magnesium-Ionen und ATP zu Luciferyl-AMP, das in einem weiteren Schritt unter Freisetzung von Licht der Wellenlänge 562 nm oxidiert wurde. Das Reporterenzym mit der *Renilla*-Luciferase oxidierte Coelenteraten-Luciferin, wobei Licht der Wellenlänge 482 nm emittiert wurde. Die Bestimmung der Aktivitäten der Reporterenzyme *Firefly*- und *Renilla*-Luciferase erfolgt anhand der Bildung lumineszierender Produkte, wobei die unterschiedliche Substratspezifität der beiden Enzyme die selektive Unterscheidung der Lumineszenzreaktionen ermöglicht. Die Normalisierung der *Firefly*-Luciferase-Aktivität auf die konstitutive *Renilla*-Luciferase-Aktivität diente dem Ausgleich experimenteller Schwankungen. Die Photonen wurden mit Hilfe eines Photomultipliers gezählt. Als Rohdaten erhielt ich von Frau Borschert so genannte relative Lichteinheiten (RLU = *relative light units*) in Excel-Tabellen, die aus den direkt gezählten Lichtimpulsen berechnet wurden. Die so gemessene Luciferase-Aktivität wurde von Frau Borschert auf den Proteingehalt der Proben normiert (für die weitere Datenverarbeitung siehe 3.2.12.5).

### 3.2.12 Datenverarbeitung und Statistik

#### 3.2.12.1 Datenverarbeitung des Proliferationsassays (MTS-Test)

Die Proliferationsassays wurden mittels einem Monochromator analysiert. Die vom Monochromator auf den Computer übertragenen Daten wurden in Excel importiert. Da in Triplikaten (drei gleiche Proben in drei Vertiefungen) transfiziert wurde, wurde von diesen Proben das arithmetische Mittel bestimmt, welches den Probenwert darstellte. Danach wurde der Quotient *Probenwert/Kontrollwert* gebildet, um in Prozent darzustellen, wieviele Zellen in der Probe vital waren. Das arithmetische Mittel von den Ergebnissen an Tag 2 und Tag 5 post transfectionem wurde gebildet um aufzuzeigen, wie viele Zellen etwa an Tag 3 vital waren.

#### 3.2.12.2 Datenverarbeitung der qRT-PCR-Daten

Die während der qRT-PCR aufgezeichneten Rohdaten wurden anschließend an die Amplifikation mit der Software „*Opticon Monitor 2*“ ausgewertet. Die erhaltenen Ct-Werte wurden in Excel importiert. Werte, die in der Schmelzkurvenanalyse oder Gelelektrophorese Anhalt gaben, dass artefaktuelle Ct-Werte oder unspezifische Nebenprodukte vorlagen, wurden von der weiteren Verarbeitung ausgeschlossen. Da für jede Probe zwei Reaktionsansätze in jedem Lauf vorbereitet wurden (Doppelansatz), konnte - solange keine artefaktuellen Werte

oder Nebenprodukte nachgewiesen konnten - auf einen zweiten Lauf verzichtet werden, da für jede cDNA-Probe zwei einwandfreie Ct-Werte vorlagen. Die Weiterverarbeitung der Rohdaten erfolgte in mehreren Schritten:

- Bilden des arithmetischen Mittels der zwei Ct-Werte des Doppelansatzes
- Berechnung der Normalisierungsfaktoren: Normalisierung der Expressionsdaten über die Differenz der Expressionswerte der *Housekeeping*-Genes  $\beta$ -Actin und GapdH in der SYBR-GREEN-Anregung bzw. RNU6B in der FAM-Anwendung.
- Errechnen des x-fachen Expressionsverhältnisses durch die Formel:

$$2^{-(\Delta\text{CT}(\text{Kontrolle-Normalisiert})-\Delta\text{CT}(\text{Probe-Normalisiert}))} \equiv \text{relative x-fache Expression}$$

unter Annahme gleicher RNA-Ausgangsmengen und 100%iger Effizienz der qRT-PCR. Diese Art der Errechnung ist als „ $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode“ bekannt.

### 3.2.12.3 Datenverarbeitung in den Primärtumor-Kollektiven

Die durch die oben beschriebenen Methoden acquirierten  $\Delta\text{Ct}$ -Werte wurden in Excel importiert. Die Expressionsparameter von miR-205 und HER2/neu und HER3 wurden, soweit nicht anders angegeben, als kontinuierlicher Wert analysiert. Wenn klinische Parameter oder Expressionswerte in Gruppen zusammengefasst oder dichotomisiert wurden, so wurde dies in der entsprechenden Grafik oder Tabelle kenntlich gemacht und beschrieben.

### 3.2.12.4 Datenverarbeitung der Dual-Luciferase-Assay-Daten

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

### 3.2.13 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte hauptsächlich mit dem Statistikprogramm „R“.<sup>102</sup> Die Mediane normalverteilter Daten wurden durch einen zweiseitigen ungepaarten t-Test verglichen. Assoziationen bezüglich der miR-Expression und klinischen Merkmalen wurden im allgemeinen PCa-Kollektiv (n=16) aufgrund der kleinen Stichprobenmenge mit dem exakten Test nach Fischer berechnet. Die Analyse des Hochrisiko-PCa-Kollektivs wurde in Zusammenarbeit mit dem Interdisziplinären Zentrum für klinische Forschung (Labor für Microarray-Anwendungen, Leitung: Dr. S. Kneitz, Mitarbeit: Dr. C. J. Scholz) der Universität Würzburg realisiert. Verschiedene Risikofaktoren wurden in uni- und multivariaten Cox-Regressionsmodellen auf Assoziationen mit der Zeit bis zum klinischem Progress mit den Bioconductorpaketen *survival* und *BMA* untersucht.<sup>103,104</sup> Die Teststärke („*power*“-)-Analyse wurde mit Hilfe des Pakets *powerSurvEpi* berechnet.<sup>105</sup> Kaplan-Meier-Kurven wurden mit binärisierten/dichotomisierten Parametern erstellt; für kontinuierliche Parameter (miR-205-Expression) wurde ein optimaler Schwellwert (mit dem Paket *ROC* definiert) zur Binärisierung verwendet.<sup>106</sup> Die jeweils geltenden Umrechnungen der Ergebnisse der verschiedenen statistischen Methoden auf den gebräuchlichen p-Wert wurden im Anschluss an die Berechnungen durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde mit  $\alpha=5\%$  festgelegt. Alle signifikanten Assoziationen mit einem p-Wert von  $0.01 \leq p < 0.05$  wurden mit einem „\*“ gekennzeichnet, alle als hochsignifikant definierten Assoziationen ( $p < 0.01$ ) mit „\*\*\*“.

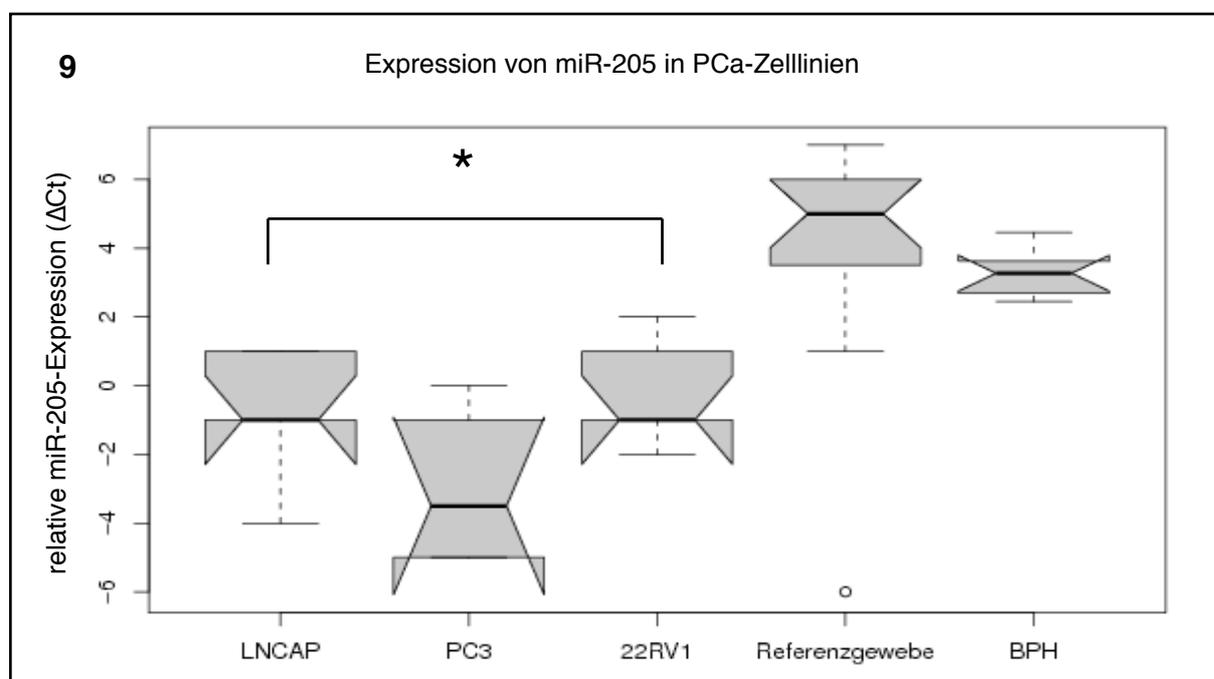
## 4 ERGEBNISSE

Es wurden Untersuchungen zur Bedeutung von miR-205/221 im Rahmen der Genese und Progression des PCa durchgeführt. Die Arbeit wurde gegliedert: zuerst wird auf die Ergebnisse der miR-205-Experimente eingegangen, nachfolgend werden die Ergebnisse bezüglich der Bedeutung von miR-221 im PCa beschrieben.

### 4.1 Die Bedeutung der microRNA-205 im PCa

#### 4.1.1 Die miR-205-Expression in PCa-Zelllinien

Um eine Einsicht in die biologische Funktion von miR-205 in PCa-Zellen zu erlangen, wurde die Expression in drei verschiedenen PCa-Zelllinien (LNCaP, PC3, 22RV1) mittels qRT-PCR analysiert. Abbildung 9 zeigt die relative Expression von miR-205 in PCa-Zelllinien im Vergleich zu Referenzgeweben. Verglichen wurde die relative miR-205-Expression als  $\Delta\text{Ct}$ -Werte der Zelllinien mit denen von tumorfreien Referenzgeweben ( $n=16$ ) und von BPH-Proben ( $n=9$ , Erläuterungen zu den Referenzgeweben: siehe auch 3.1.6.1-2).



**Abb. 9:** Darstellung der relativen miR-205-Expression in drei PCa-Zelllinien. Dargestellt ist die Expression in den PCa-Zelllinien LNCaP, PC3 und 22RV1 sowie in Referenzgeweben (=tumorfreie Prostata,  $n=16$ ) und in BPH-Proben ( $n=9$ , siehe auch 3.1.6.1-2). Die in der qRT-PCR gewonnenen  $\Delta\text{Ct}$ -Werte für die Zelllinien setzen sich aus jeweils sechs unabhängigen Messungen zusammen. Die Ermittlung der Werte wird in 3.2.12.2 erklärt.

Alle Karzinomzelllinien unterscheiden sich signifikant von beiden Referenzgeweben ( $p$ -Wert =  $<0.01$ ): Am stärksten wird miR-205 in der Zelllinie PC3 herabreguliert ( $\Delta\text{Ct}$ -Median:-3,5). Die Expressionsmediane ( $\Delta\text{Ct}$ : -1) von LNCaP und 22RV1-Zellen waren identisch. Untereinander unterscheiden sich die Zelllinien jedoch nicht: LNCaP verglichen zu PC3:  $p$ -Wert = 0.0893; 22RV1 verglichen zu PC3:  $p$ -Wert = 0.0622. Auch die Mediane der beiden Referenzgewebe unterscheiden sich nicht ( $p$ -Wert = 0.289).

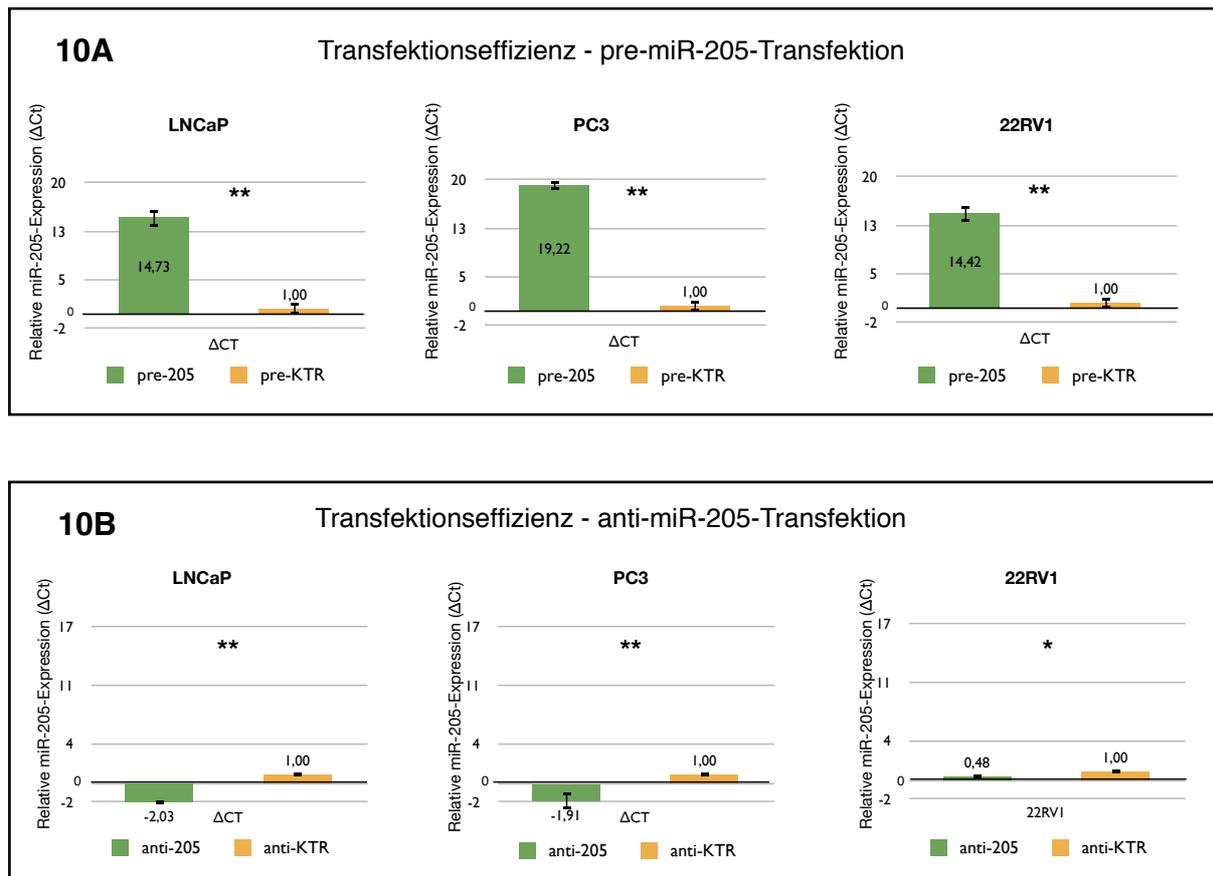
Zusammenfassend ist die miR-205-Expression gegenüber der tumorfreier Gewebe in allen drei untersuchten Zelllinien herabreguliert (siehe Abbildung 9).

#### 4.1.2 Die Transfektionseffizienz in miR-205 transfizierten PCa-Zelllinien

Aufgrund der beobachteten Herabregulation von miR-205 in den PCa-Zelllinien sollte mittels transienter Transfektion die Expression von miR-205 ektopisch angehoben und weiter verringert werden. Um die Transfektionseffizienz zu beurteilen, wurde in den drei Zelllinien mittels qRT-PCR die Über- oder Unterexpression von pre- bzw. anti-miR-205-transfizierten Zellen gemessen. Es wurden jeweils drei untereinander unabhängige Experimente durchgeführt, deren Ergebnisse als arithmetisches Mittel (mit Standardabweichung) dargestellt sind. Abbildung 10 fasst die gewonnenen Ergebnisse zusammen.

Für die Transfektion mit precursor-miR-205 konnten folgende Beobachtungen gemacht werden (siehe Abbildung 10A): Transfizierte PC3-Zellen zeigten mit einer relativen Expression von  $\Delta\text{Ct}=19,22$  (entspricht einer 610-fachen Überexpression nach der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode) die stärkste Überexpression, gefolgt von LNCaP- ( $\Delta\text{CT}=14,73$  ;  $\Delta\Delta\text{Ct}=27,12$ -fache Überexpression) und 22RV1-Zellen ( $\Delta\text{CT}=14,42$  ;  $\Delta\Delta\text{Ct}=21,92$ -fache Überexpression).

Abbildung 10B zeigt Versuche nach antago-miR-205 Transfektion. Die stärkste Herabregulation von miR-205 wiesen LNCaP-Zellen mit einem  $\Delta\text{Ct}$ -Wert ( $p$ -Wert= $<0.01$ ) von -2,03 auf. Dies entspricht einer 4,08-fache Unterexpression (Berechnung nach  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode). Die PC3-Linie zeigt eine starke Unterexpression ( $\Delta\text{Ct}=-1,91$ ;  $p$ -Wert= $<0.01$ ;  $\Delta\Delta\text{Ct}=3,76$ -fache Unterexpression). 22RV1-Zellen zeigten eine Unterexpression von miR-205 nach der Transfektion mit antago-miR-205 ( $\Delta\text{Ct}=0,48$ ;  $p$ -Wert= $<0.05$ ;  $\Delta\Delta\text{Ct}=1,39$ -fachen Unterexpression).

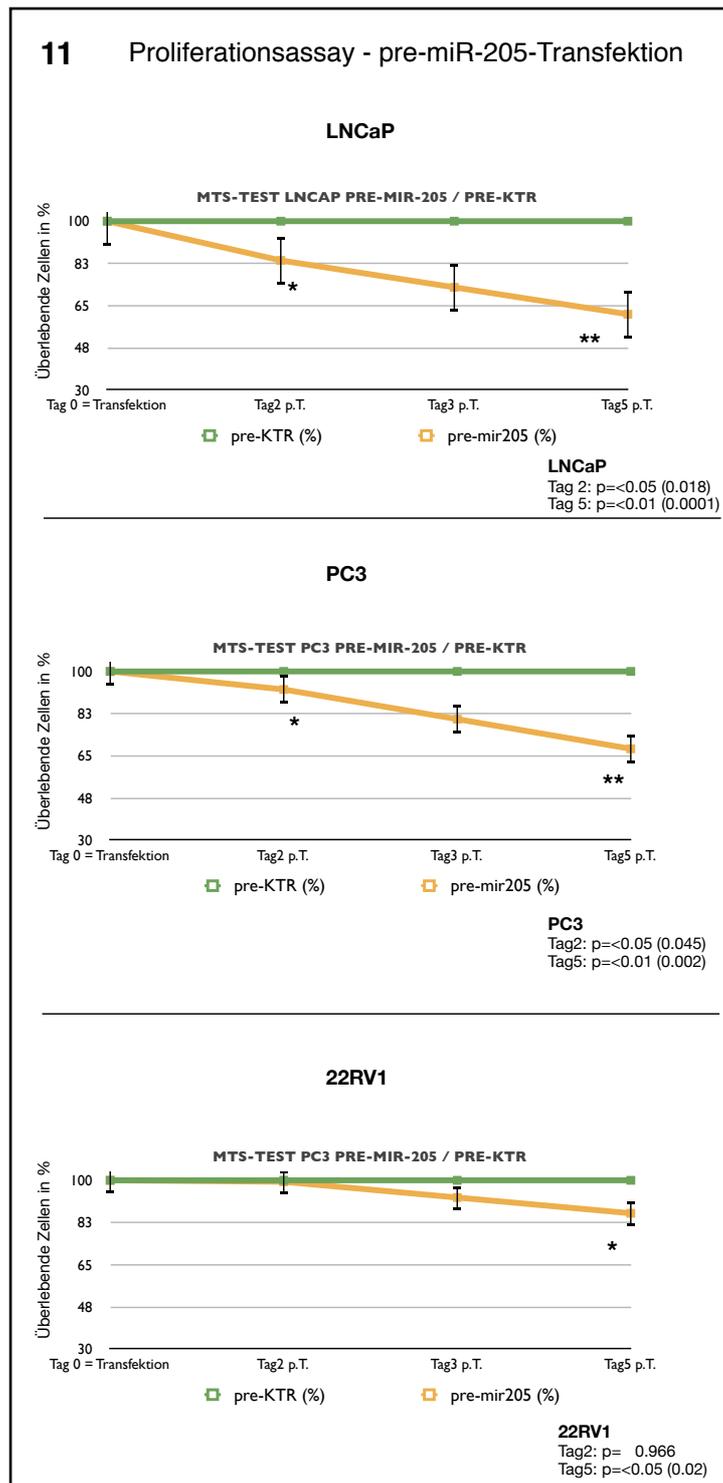


**Abb. 10:** Darstellung der relativen miR-205-Expression in drei mit (A) pre-miR-205 bzw. (B) anti-miR-205 (grün) und mit Kontroll-miRs transfizierte (gelb) Prostatazelllinien. Für die Berechnung der  $\Delta Ct$ -Werte 48h post transfectionem, siehe Kapitel 3.2.9. Die Diagramme zeigen das arithmetische Mittel dreier unabhängiger Experimente mit Standardabweichung. Signifikanzen im student's t-Test wurden mit \*\* ( $p < 0.01$ ) und \* ( $p < 0.05$ ) dargestellt. Den  $\Delta Ct$ -Werten der Kontrolle wurde zufällig der Wert 1 zugeordnet.

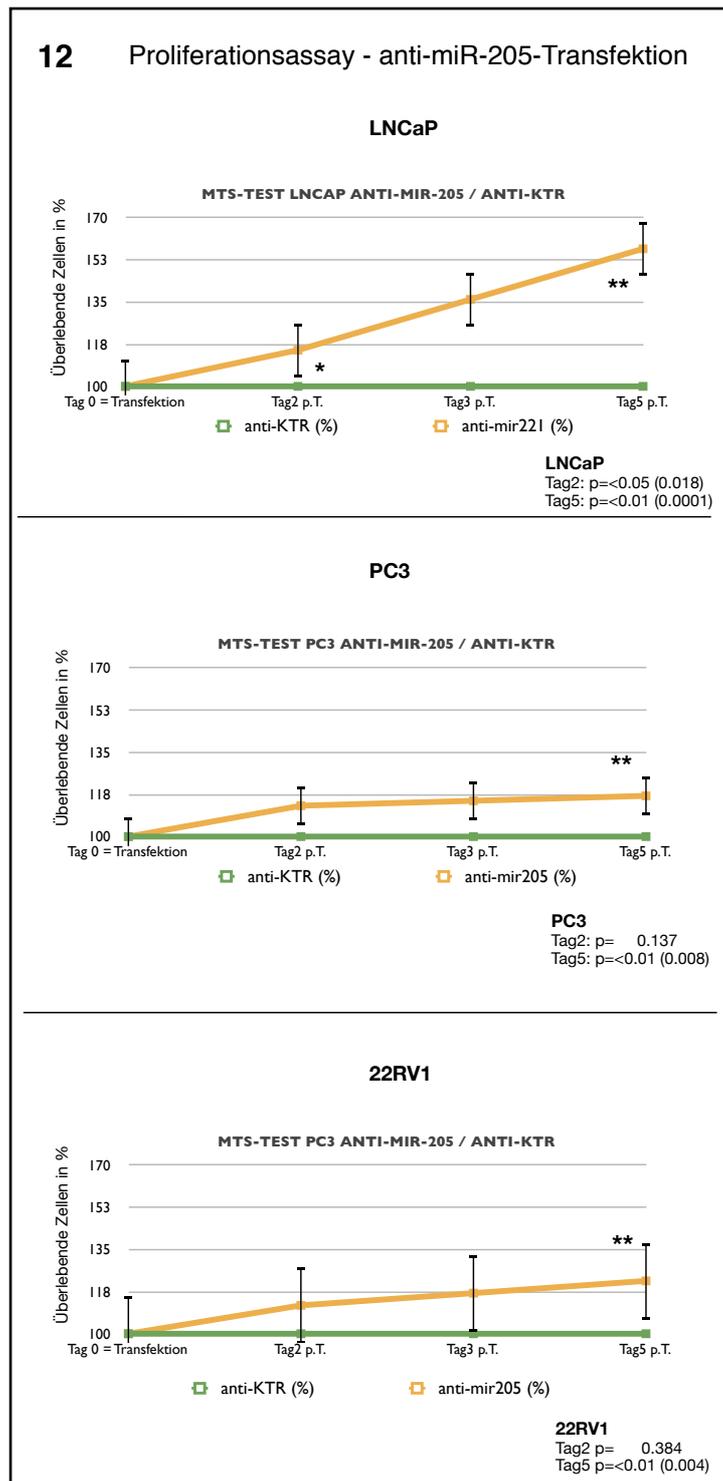
Die Transfektionsexperimente waren somit in allen drei PCa-Zelllinien sowohl für die Transfektion mit precursor-miR-205 als auch mit antago-miR-205 effizient, auch wenn die beobachtete Herabregulation von miR-205 in den antago-miR transfizierten PCa-Zelllinien weniger stark ausfiel als die precursor-miR-205-vermittelte Überexpression von miR-205.

#### 4.1.3 Das Zellwachstum von miR-205-transfizierten PCa-Zelllinien

In letzter Zeit konnte in Publikationen eine Funktion von miR-205 in der Regulation der Proliferation von Karzinomzellen nachgewiesen werden. Um diese Funktion auch in PCa-Zelllinien nachzuvollziehen, wurde das Proliferationsverhalten in miR-205 transfizierten PCa-Zellen (LNCaP, PC3, 22RV1) analysiert. Versuchsbeschreibung siehe Kapitel 3.2.6



**Abb. 11:** Darstellung des Zellwachstums von drei Prostatazelllinien unter transienter Transfektion mit pre-miR-205 (gelb) und pre-miR-Kontrollen (grün). Angegeben sind die Anteile vitaler Zellen in Prozent im Vergleich zu kontrolltransfizierten Zellen. Jeweils an Tag 2 und Tag 5 post transfectionem wurde der Proliferationsassay mit MTS-Reagenz und Monochromator durchgeführt. Signifikanzen im student's t-Test wurden mit \*\* ( $p < 0.01$ ) und \* ( $p < 0.05$ ) dargestellt. Die Abweichungsbalken setzen sich aus der Standardabweichung der drei durchgeführten, untereinander unabhängigen Experimente zusammen. Grundlage für die Errechnung des Vitalitätswertes an Tag 3,5 war das arithmetische Mittel der Zahlen von Tag 2 und Tag 5 p.T.



**Abb. 12:** Darstellung des Zellwachstums von drei Prostatazelllinien unter transienter Transfektion mit anti-miR-205 (gelb) und anti-miR-Kontrollen (grün). Angegeben sind die Anteile vitaler Zellen in Prozent im Vergleich zu kontrolltransfiziertem Zellen. Jeweils an Tag 2 und Tag 5 post transfectionem wurde der Proliferationsassay mit MTS-Reagenz und Monochromator durchgeführt. Signifikanzen im student's t-Test wurden mit \*\* ( $p < 0.01$ ) und \* ( $p < 0.05$ ) dargestellt. Die Abweichungsbalken setzen sich aus der Standardabweichung der drei durchgeführten, untereinander unabhängigen Experimente zusammen. Grundlage für die Errechnung des Vitalitätswertes an Tag 3,5 war das arithmetische Mittel der Zahlen von Tag 2 und Tag 5 p.T.

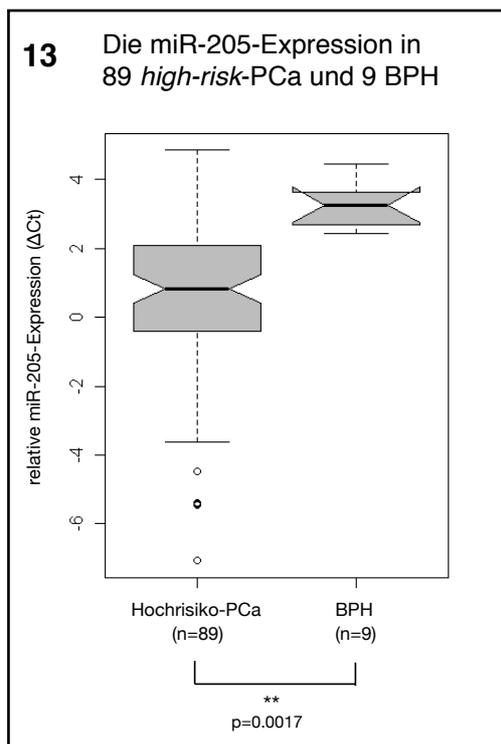
Wie Abbildung 11 zeigt, fand in allen drei Zelllinien nach transienter Transfektion mit pre-miR-205 im Vergleich zur Kontrolle eine signifikante Herabsetzung des Anteils vitaler Zellen im 5-Tageszeitraum statt. Die LNCaP- und PC3-Zelllinien zeigten eine signifikante Reduktion auf insgesamt 61% (LNCaP) bzw. 68% (PC3) vitale Zellen an Tag 5 post transfectionem (p-Wert= $\leq 0.01$ ). Die Zelllinie 22RV1 weist eine signifikante Zellreduktion von 86 % vitaler Zellen an Tag 5 p.T. (p-Wert= $\leq 0.05$ ) auf. An Tag 2 p.T. lässt sich bei LNCaP- und PC3-Zellen eine Zellreduktion auf 84% (LNCaP) bzw. 93% (PC3) vitale Zellen beobachten (p-Wert= $\leq 0.05$ ). Bei 22RV1-Zellen kann an Tag 2 p.T. keine Zellreduktion der Zellen beobachtet werden (99% lebende Zellen, p-Wert=0.966).

Es wurden parallele Versuche in anti-miR-205 transfizierten Zellen durchgeführt. Die Ergebnisse in Abbildung 12 zeigen in allen drei Zelllinien im Vergleich zur Kontrolle eine signifikante Erhöhung des Anteils vitaler Zellen im 5-Tageszeitraum. Am deutlichsten manifestiert sich dies in LNCaP-Zellen: Mit durchschnittlich 157% vitalen, transfizierten Zellen (p-Wert= $\leq 0.01$ ) an Tag 5 p.T. und 115% vitalen Zellen an Tag 2 p.T. (p-Wert= $\leq 0.05$ ) zeigte sie die stärkste Proliferationssteigerung. Die Vitalität der transfizierten Zellproben der Linien PC3 und 22RV1 waren zu vergleichen: während bei 22RV1-Zellen eine Proliferationssteigerung der transfizierten Proben von 122 % an Tag 5 p.T. beobachtet werden kann, fällt die Steigerung in gleichen Proben der PC3-Zelllinie mit 117 % vitalen Zellen an Tag 5 p.T. geringfügig schwächer aus (p= $\leq 0.01$ ). In beiden Zelllinien kann auch an Tag 2 p.T. Proliferationssteigerungen (22RV1= 112% ; PC3= 113%) beobachtet werden, die jedoch statistisch nicht signifikant sind (22RV1: p-Wert = 0.384 ; PC3: p-Wert = 0.137).

Diese Proliferationsexperimente zeigen, dass in allen PCa-Zelllinien vor allem durch die Transfektion mit pre-miR-205 eine signifikante Inhibierung der Proliferation an Tag 5 p.T. hervorgerufen werden kann.

#### **4.1.4 Die miR-205-Expression im *high-risk-PCa***

Um eine aberrante miR-205-Expression im primären PCa zu bestätigen, wurden Proben eines Hochrisiko-PCa Kollektiv untersucht. Es wurden für alle 89 PCa-Proben die miR-205-Expression mittels qRT-PCR analysiert. Als Referenz dienten neun BPH. Die komplette Beschreibung des Kollektivs sowie seiner klinischen Daten ist in 3.1.6.1 gezeigt. Abbildung 13 fasst das Ergebnis der miR-205-Expression im Hochrisikokollektiv zusammen.



**Abb. 13: Die miR-205-Expression in 89 *high-risk-PCa*-Patienten und 9 BPH-Patienten.**  
 Als Boxplots dargestellt ist die relative miR-205-Expression in Form von  $\Delta Ct$ -Werten aus den qRT-PCR-Messungen bei 89 PCa-Patienten (links) im Vergleich zu neun BPH-Patienten (rechts).  
 Signifikanzen im student's t-Test wurden mit \*\* ( $p < 0.01$ ) und \* ( $p < 0.05$ ) gekennzeichnet. Signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Boxplots wurden zusätzlich mit verbindenden Linien und dem zugehörigen p-Wert gekennzeichnet.

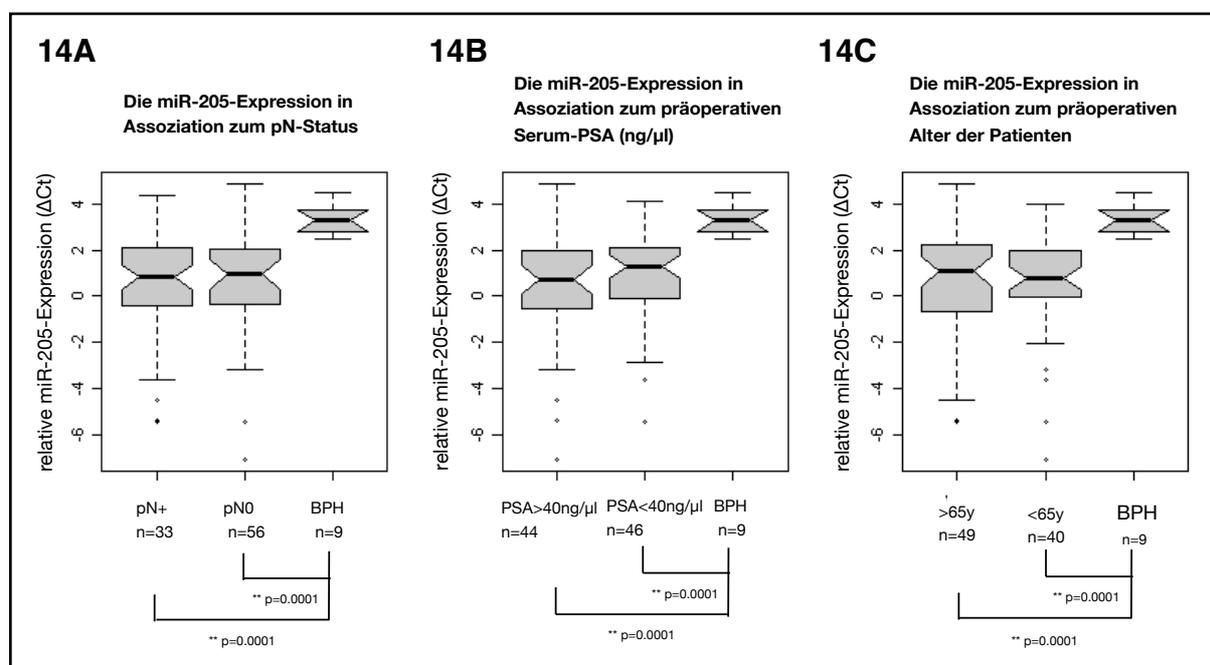
Der Expressionsmedian von miR-205 (Median  $\Delta Ct_{PCa} = 0.82$ ) der 89 Hochrisiko-Patienten liegt signifikant niedriger als der Expressionmedian der neun BPH-Proben (Median  $\Delta Ct_{BPH} = 3.27$ , p-Wert= $<0.01$ ). Ausgehend vom Wert des Expressionmedians der BPH-Proben (Median  $\Delta Ct_{BPH} = 3.27$ ) weisen 82 PCa-Patienten eine reduzierte Expression von miR-205 auf ( $\Delta Ct < 3.27$ ). Dies entspricht 92% der Patienten. Nach der  $\Delta\Delta Ct$ -Methodik ( $\Delta Ct_{Tumor} - \Delta Ct_{Kontrolle}$ )<sup>2</sup> konnten auch 70 PCa-Patienten (entspricht 78% des Kollektivs) ermittelt werden, die miR-205 mehr als zweifach herabregulieren (im Vergleich zu BPH-Proben).

#### 4.1.5 Assoziationen zwischen miR-205-Expression und klinischen Daten im Hochrisiko-PCa-Kollektiv

Um zu untersuchen, inwieweit die miR-205-Expression mit dem Auftreten klinisch wichtiger Parameter in Verbindung steht, wurde im folgenden die Assoziation verschiedener Parameter mit der Unterexpression der miR-205 untersucht.

#### 4.1.5.1 Die Assoziation von miR-205-Expression mit lokaler Metastasierung, präoperativem PSA-Wert und dem Alter der Patienten

Die lokale Lymphknotenmetastasierung (pN), der präoperativen PSA-Wertes und das Alter der Patienten sind Parameter für die PCa-Prognoseabschätzung. Die Ergebnisse in Abbildung 14 zeigen, dass sich die miR-205-Expressionen der oben genannten Parameter signifikant zur BPH-Expression ( $p\text{-Wert} < 0.01$ ) unterscheidet. Die gewonnenen Ergebnisse zeigen für die untersuchten Parameter untereinander jedoch keine statistisch signifikante Assoziation (Lymphknotenmetastasierung:  $p\text{-Wert} = 0.2239$ ; präoperativer PSA-Wert:  $p\text{-Wert} = 0.6106$ ; präoperatives Alter der Patienten:  $p\text{-Wert} = 0.8636$ ).



**Abb. 14:** Assoziation von miR-205-Expression mit lokaler Metastasierung (pN), präoperativem Serum-PSA (ng/ $\mu$ l) und dem präoperativen Alter der Patienten im Hochrisikokollektiv. Signifikanzen im student's t-Test wurden mit \*\* ( $p < 0.01$ ) und \* ( $p < 0.05$ ) dargestellt. Signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Parametern und der BPH-Referenzgewebe wurden mit verbindenden Linien und dem zugehörigen p-Wert gekennzeichnet.

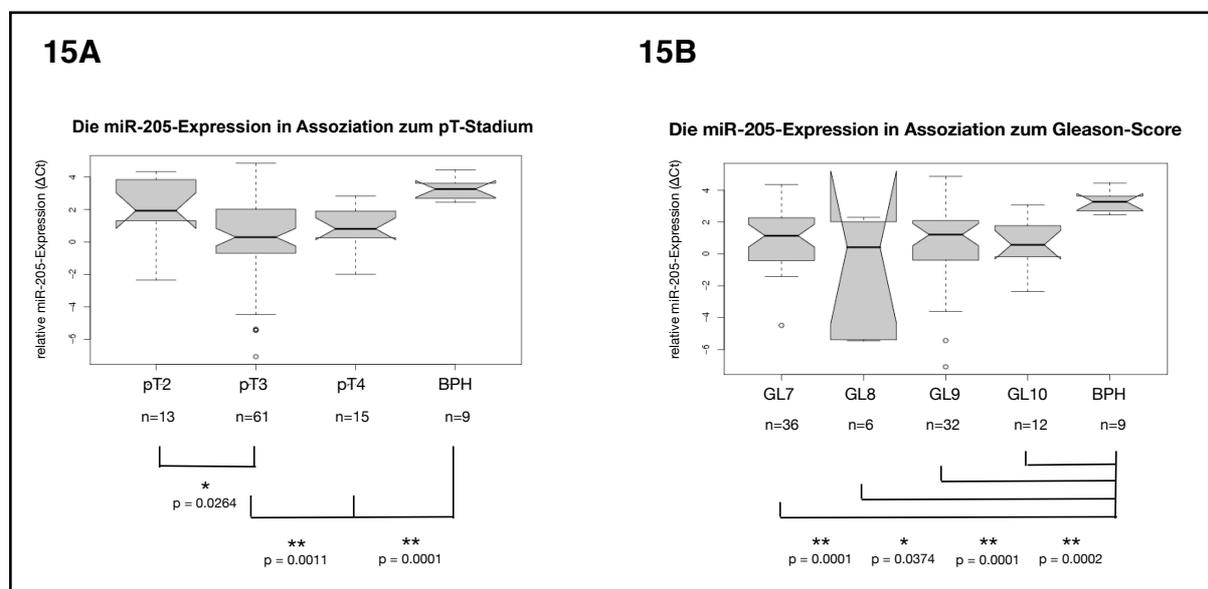
**A:** Die miR-205-Expression von Tumoren mit lokaler Metastasierung (pN) und von BPH-Referenzgewebe im High-Risk PCa-Kollektiv.

**B:** Die miR-205-Expression von Tumoren mit erhöhtem präoperativem Serum-PSA und von BPH-Referenzgewebe im High-Risk PCa-Kollektiv.

**C:** Die miR-205-Expression von PCa-Patienten mit hohem präoperativem Alter und von BPH-Referenzgewebe im High-Risk PCa-Kollektiv.

#### 4.1.5.2 Die Assoziation von miR-205-Expression mit pT-Stadien und Gleason-Scores

Das klinische Stadium des PCa wird als prognostischer und therapeutischer Parameter für das PCa verwendet, daher wurde das pT-Stadium mit der miR-205-Expression assoziiert.



**Abb. 15: Assoziationen von miR-205-Expression mit verschiedenen pT- (A) und Gleason-Scores. (B) Signifikanzen im student's t-Test wurden mit \*\* ( $p < 0.01$ ) und \* ( $p < 0.05$ ) dargestellt. Signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Parametern und der BPH-Kontrolle wurden mit verbundenen Linien und dem zugehörigen p-Wert gekennzeichnet.**

**A: Die miR-205-Expression von PCa-Patienten mit verschiedenen pT-Stadien und von BPH-Referenzgewebe im High-Risk PCa-Kollektiv.**

**B: Die miR-205-Expression von Tumoren mit verschiedenen Gleason-Scores und von BPH-Referenzgewebe im High-Risk PCa-Kollektiv.**

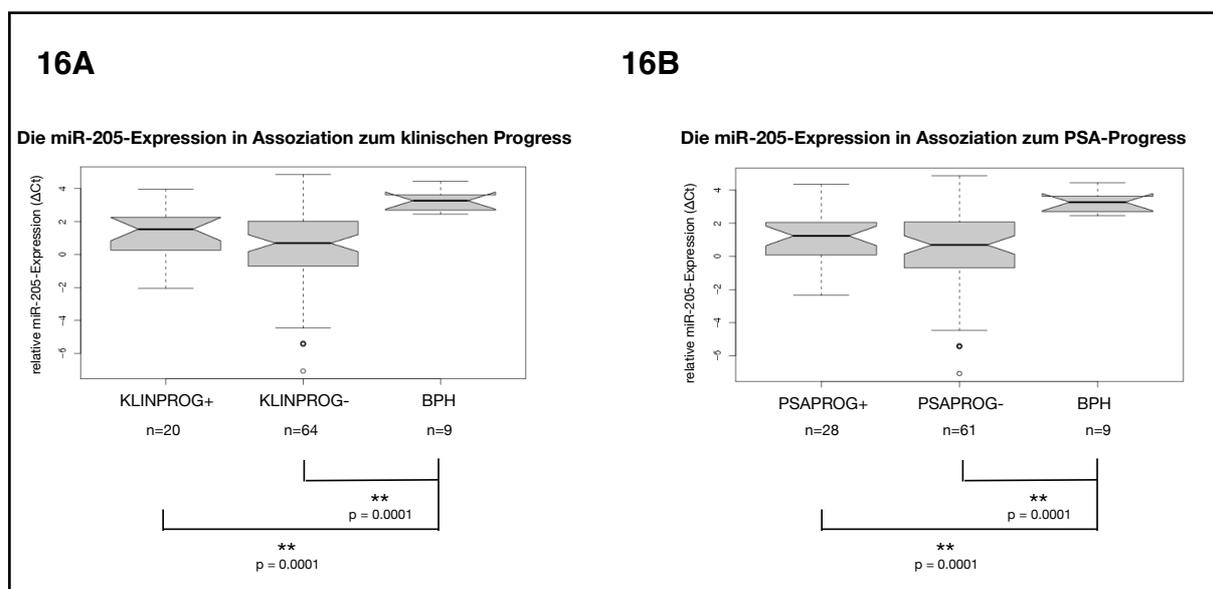
Abbildung 15A zeigt, dass die mediane miR-205-Expression in allen pT-Stadien niedriger als die der BPH-Proben ist. Es können pT3 und pT4-Karzinome signifikant vom BPH-Gewebe getrennt werden ( $p$ -Wert  $< 0.01$ ), pT2-Tumore jedoch nicht ( $p$ -Wert = 0.0860). Tumore mit den Stadien pT3 und pT4 weisen eine stärkere Herabregulation als pT2-Tumore auf. Dabei unterscheidet sich die Expressionen von pT2- ( $n=13$ ) und pT3-Karzinomen ( $n=61$ ) signifikant ( $pT3 < pT2$ ,  $p$ -Wert  $< 0.05$ ). Die miR-205-Expression in pT4-Stadien ( $n=15$ ) ist im Vergleich zu pT2-Karzinomen ( $n=13$ ) zwar ebenfalls reduziert, jedoch nicht signifikant ( $p$ -Wert = 0.1160). Ebenso konnten pT3- und pT4-Karzinomen ( $n=15$ ) nicht signifikant getrennt werden ( $p$ -Wert = 0.3420). Es wird gezeigt, dass eine Unterscheidung zwischen pT3- und

pT4-Stadium anhand der miR-205-Expression nicht gelingt. Es können nur pT2-Tumore vom pT3-Tumoren signifikant getrennt werden.

Der Gleason-Score wird als Parameter zur Aggressivitätsabschätzung des PCa verwandt. Auch für diesen Parameter wurde mit der miR-205-Expression assoziiert. Die Ergebnisse in Abbildung 15B zeigen, dass die Gruppen mit den verschiedenen Gleason-Stadien alle signifikant anhand der Expression von BPH-Gewebe getrennt werden können (Gleason 7,9,10: p-Wert= $<0.01$ ; Gleason 8: p-Wert= $<0.05$ ). Zusammenfassend konnte jedoch gezeigt werden, dass eine zunehmende miR-205-Unterexpression nicht mit steigenden Gleason-Scores assoziiert ist.

#### 4.1.5.3 Die Assoziation von miR-205-Expression mit PSA- und klinischem Progress

Verlässliche klinische Marker, die vor invasiver Therapie die Progression eines PCa zuverlässig voraussagen könnten, werden dringend benötigt.



**Abb. 16: Assoziation von miR-205-Expression mit PSA- und klinischem Progress.**

Signifikanzen im student's t-Test wurden mit \*\* ( $p < 0.01$ ) und \* ( $p < 0.05$ ) dargestellt. Signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Boxplots wurden mit verbindenden Linien und dem zugehörigen p-Wert gekennzeichnet.

**A: Die miR-205-Expression von PCa-Patienten mit und ohne klinischen Progress und von BPH-Referenzgeweben im High-Risk PCa-Kollektiv.**

**B: Die miR-205-Expression von PCa-Patienten mit und ohne PSA-Progress und von BPH-Referenzgeweben im High-Risk PCa-Kollektiv.**

Da die miR-205-Expression mit dem pT-Stadium des PCa assoziiert war, wurden auch Endpunkte „klinische“ und „biochemische“ (=PSA)-Progression mit der miR-205-Expression assoziiert. Das ganze Kollektiv zeigt eine signifikant niedrigere miR-205-Expression als die von neun BPH-Proben ( $p\text{-Wert} \leq 0.01$ ). Karzinompatienten, die keine Progression (klinisch und biochemisch) aufwiesen, zeichnen sich durch eine niedrigere mediane miR-205-Expression aus als Patienten mit Progression. Dies fällt jedoch in statistischen Tests nicht signifikant auf (siehe Abbildung 16A/B).

#### **4.1.5.4 Die miR-205-Expression als prognostischer Indikator für die Progression des PCa**

Die Beobachtung, dass der miR-205-Expressionsmedian bei progredienten Karzinomen höher liegt als bei progressionsfreien Patienten (nicht signifikant, siehe 4.1.5.3), bildete die Grundlage zur Evaluation von miR-205 als möglichem prognostischen Indikator für das Auftreten von Progression im PCa. Um die Hypothese - aufgrund der miR-205-Expression kann möglicherweise das Progressionsrisiko eines PCa vorhergesagt werden - zu überprüfen, wurde das Kollektiv mittels einer ROC-Analyse (*receiver operating characteristics*) in zwei Gruppen aufgeteilt (in Zusammenarbeit mit dem IZKF, Labor für Microarray-Anwendungen unter der Leitung von Dr. S. Kneitz, siehe 3.2.13):

Der Schwellenwert, welcher die Gruppen nach milder (Gruppe **A**) oder starker (Gruppe **B**) miR-205-Unterexpression in Vergleich zu BPH-Gewebe dichotomisierte, wurde mittels einer ROC-Analyse als  $\Delta\text{Ct} = 1.49$  festgesetzt. Beide Gruppen wurden in einer Kaplan-Meier-Überlebensanalyse auf das Auftreten eines klinischen Rezidivs untersucht.

Die Analyse (siehe Abbildung 17) zeigt einen signifikanten Unterschied bezüglich des progressionsfreien Überlebens zwischen den beiden Gruppen: Die Ereignisrate für das gesicherte klinische Rezidiv liegt für stark miR-205-unterexprimierende PCa (Gruppe B) mit 73,9% nach 113 Monaten signifikant höher als für miR-205 milde unterexprimierende PCa (Gruppe A) mit 62% im gleichen Zeitraum (log rank test:  $p\text{-Wert} \leq 0.05$ ). Die Korrelation der miR-205-Expression und des biochemischen Progresses wurde ebenfalls mittels Kaplan-Meier-Analysen untersucht. Es zeigt sich, dass die miR-205-Expression und das Ereignis des PSA-Rezidivs zu korrelieren sind (Daten nicht gezeigt). Dies bedeutet zusammenfassend, dass nicht etwa eine starke, sondern eine milde Herabregulation von miR-205 signifikant mit dem früheren Auftreten klinischer Progression des PCa korreliert.

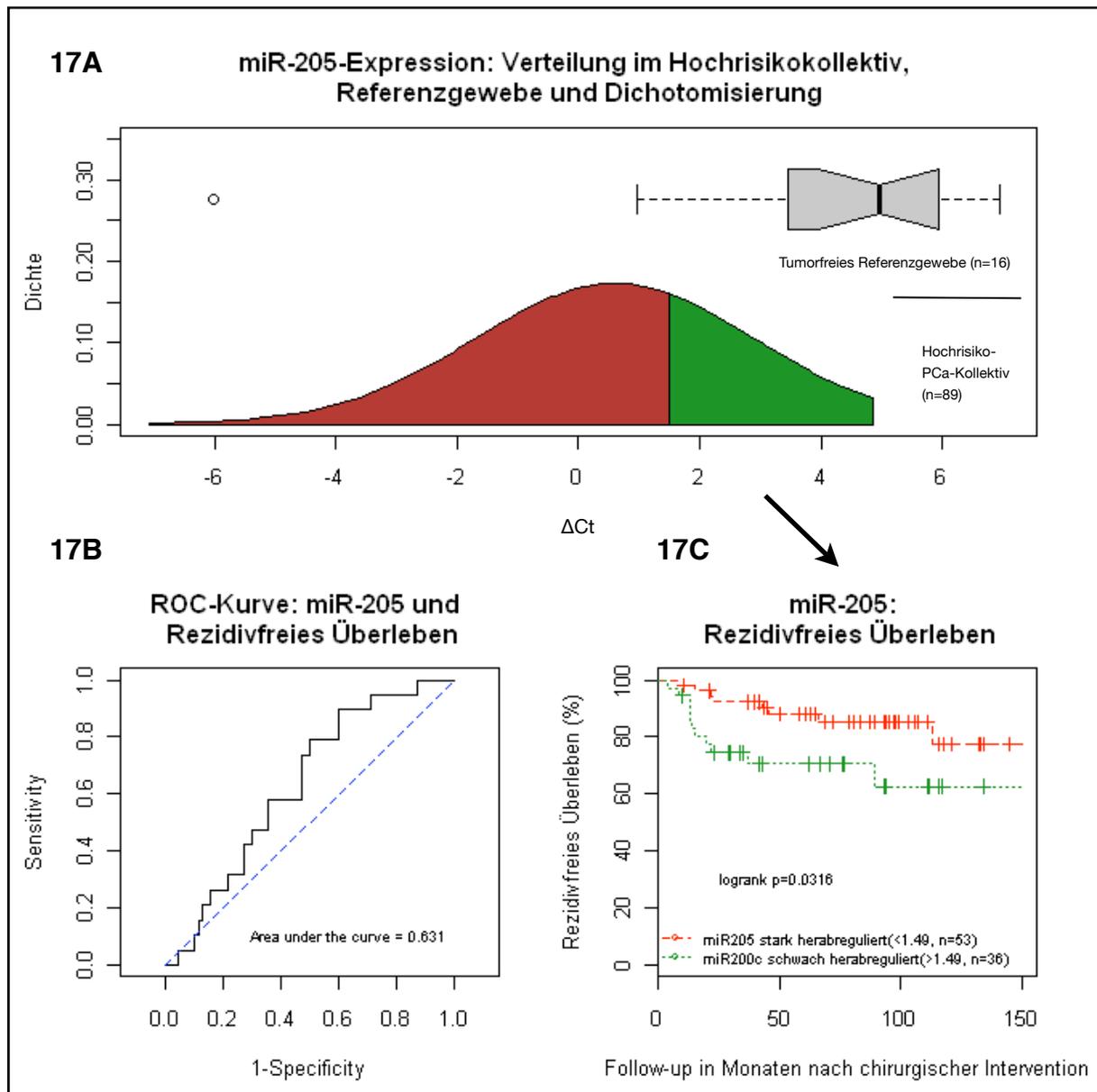


Abb. 17: Überlebensanalyse von Patienten mit einem *high-risk-PCa*.

(A) Das Patientenkollektiv wurde nach der miR-205-Expression dichotomisiert (miR-205 schwach =  $\Delta\text{Ct} > 1,49$  und miR-205 stark =  $\Delta\text{Ct} < 1,49$  herabreguliert, im Vergleich zu tumorfreiem Referenzgewebe. Dichotomisierung: siehe ROC-Kurve).

(B) ROC-Analyse (*Receiver operating characteristics*) des logistischen Regressionsmodells, in dem die miR-205-Expression mit dem Ereignis einer Progression des PCa korreliert wurde. Festlegen des optimalen Schwellenwerts durch Errechnung des Youden-Index (Maximierung der Sensitivität und Spezität).

(C) Kaplan-Meier-Analyse des Hochrisikokollektivs nach erfolgter Dichotomisierung durch ROC. Die Überlebenskurven wurden mit dem *bioconductor package for survival* in R generiert. Schwache miR-205-Unterexpression war signifikant mit früherer Progression (klinischer Progress) des Karzinoms assoziiert (log rank  $p=0.0316$ ).

In uni- und multivariaten Cox-Regressionsmodellen wurde die miR-205-Expression und andere klinische Parameter mit der klinischen Progression des PCa korreliert (siehe Tabelle 5 und 6). Die Ergebnisse zeigen, dass miR-205 als kontinuierlicher Parameter univariat getestet nur marginal signifikant mit dem Progressionsrisiko korreliert (p-Wert = 0.0821).

Parameter	Hazard ratio	HR min 95% CI	HR max 95% CI	p-Wert
miR-205 (kontinuierlich)	1.2243	0.9746	1.538	0.0821
miR-205 (dichotomisiert)	2.407	0.9937	5.83	0.0517
praeOP-PSA (kontinuierlich)	1.01428	1.002	1.026	0.0195
Gleason-Score (kontinuierlich)	2.2818	1.398	3.724	0.000962
pT-Stadium (kontinuierlich)	3.1297	1.411	6.944	0.00501
kombinierter pT (2a/b vs. 3a/b/4)	2.9486	0.9856	8.821	0.0531

**Tabelle 5: Univariate Cox-Regression für die Parameter miR-205, miR-205 dichotomisiert ( $\Delta C_t = 1,49$ ), präoperativer Serum-PSA (ng/ $\mu$ l), Gleason, pT-Stadium, kombiniertes pT-Stadium (siehe 3.1.6.1). Dargestellt ist weiterhin die jeweilige *hazard ratio* (HR), das Konfidenzintervall (CI) und der p-Wert für jeden korrespondierenden Parameter.**

Parameter	Hazard ratio	HR min 95% CI	HR max 95% CI	p-Wert
miR-205 (kontinuierlich)	1.504823	1.107	2.046	0.00911
praeOP-PSA (kontinuierlich)	1.020611	1.004	1.037	0.01330
Gleason-Score (kontinuierlich)	2.209925	1.383	3.532	0.00092
kombinierter pT (2a/b vs. 3a/b/4)	5.684124	1.688	19.143	0.00503

**Tabelle 6: Multivariates Modell für die aufgeführten Parameter in der Cox-Regression. Nach dem Bayesianischen Informationskriterium (BIC) wurde das oben stehende Modell mit den Parametern miR-205, präoperativem Serum-PSA (ng/ $\mu$ l), Gleason-Score und kombiniertem pT-Stadium (siehe 4.1.2.4., BIC = -19.11, *posterior probability* = 0.508, Daten nicht gezeigt) als „best-fitting-model“ ausgewählt. Die Tabelle zeigt außerdem die jeweilige *hazard ratio* (HR), das Konfidenzintervall (CI) und den p-Wert für jeden Parameter.**

Dichotomisiert man nun das Patientengut nach  $\Delta Ct = 1.49$  in eine miR-205 hoch- und niedrig-exprimierende Gruppe, so erhöht sich auch die Signifikanz (p-Wert = 0.0517). Weiterhin marginal signifikant kann univariat ein kombiniert hohes pT-Stadium (pT3a und pT4 in Kombination) mit dem Auftreten einer Progression korreliert werden (p-Wert = 0.0531), während das hohe nicht kombinierte pT-Stadium signifikant auffiel (p-Wert= $<0.01$ ). Auch ein hohes präoperatives Serum-PSA und ein hoher Gleason-Score können univariat mit dem Eintritt einer Progression korreliert werden (lineare Regression, p-Wert= $<0.01$ ). Da das Ereignis der Progression von mehreren Variablen als nur der miR-205-Expression abhängig ist, wurde mittels des bayesischen Informationskriteriums ein multivariates Modell ausgewählt. Die Ergebnisse der Cox-Regression dieses multivariaten Modells zeigen, dass alle ausgewählten Parameter hochsignifikant mit Progression des PCa korrelieren. Im einzelnen waren dies eine hohe miR-205-Expression (p-Wert=0.0091, HR=1.50), ein hoher präoperativer PSA-Wert (p-Wert=0.01330, HR=1.02), ein hoher Gleason-Score (p-Wert=0.00092,HR=2.21) und ein hohes kombiniertes pT-Stadium (p-Wert=0.00503, HR=5.68).

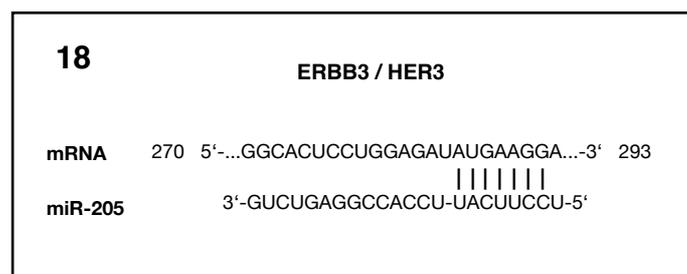
Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass eine milde Herabregulation (Gruppe A) signifikant mit einer früheren Progression und einem schlechteren prognostischen *Outcome* des *high-risk*-PCa assoziiert ist.

#### 4.1.5.5 Poweranalyse des Hochrisiko-PCa-Kollektivs

Wie in 4.1.5.5 gezeigt, konnte im univariaten Regressionsmodell (=lineare Regression) der kontinuierlichen miR-205-Expression nur marginal signifikant mit dem Progressionsrisiko in *high-risk*-PCa-Patienten korreliert werden (p-Wert = 0.0821). Das vorliegende Kollektiv mit 89 Patienten kann naturgemäß nicht die Grundgesamtheit aller PCa-Patienten weltweit darstellen, sondern muss als Stichprobe gesehen werden. Daher konnte zusätzlich mittels einer Teststärke-Analyse (siehe 3.2.13) kalkuliert werden, wie viele weitere Patienten dem Kollektiv hinzugefügt werden müssten, um den marginal signifikanten Effekt der Progressionsrisikoerhöhung der kontinuierlichen miR-205-Expression im *high-risk*-PCa auch univariat über das Signifikanzniveau von  $\alpha = 5\%$  ( $p = 0.05$ ) zu heben. Die durchgeführte Poweranalyse zeigt, dass das Kollektiv um 72 Patienten auf eine Grundgesamtheit von 161 vergrößert werden müsste, um die kontinuierliche miR-205-Expression als statistisch signifikanten Parameter für die Progressionsvorraussage des PCa zu bestätigen.

#### 4.1.6 HER2/neu und HER3 als mögliche Zielgene von miR-205 im PCa

Um die miR-205-vermittelte Proliferationsinhibierung in PCa-Zellen und die aberrante miR-205-Expression im PCa in einen biochemisch funktionellen Kontext zu setzen, wurde die Regulation möglicher Zielgene von miR-205 im PCa untersucht. Eine computerassistierte Voraussage beweist, dass die Tyrosinkinase HER3 ein Zielgen von miR-205 darstellt (siehe Abbildung 18, Bindungsstelle der miR-205 an Nukleotidposition 287-293 der 3'UTR der humanen ERBB3-mRNA). Für HER2/neu kann computerassistiert jedoch keine Bindungsstelle an der 3'UTR der mRNA gefunden werden. Die Tatsache, dass miR-205 gemäß computerassistierter Voraussage jedoch auch TOB2 (*transducer of ERBB2,2*) reguliert, unterstützt die Vermutung, dass eine enge funktionale Verbindung zwischen der Expression von HER2/neu und miR-205 besteht.



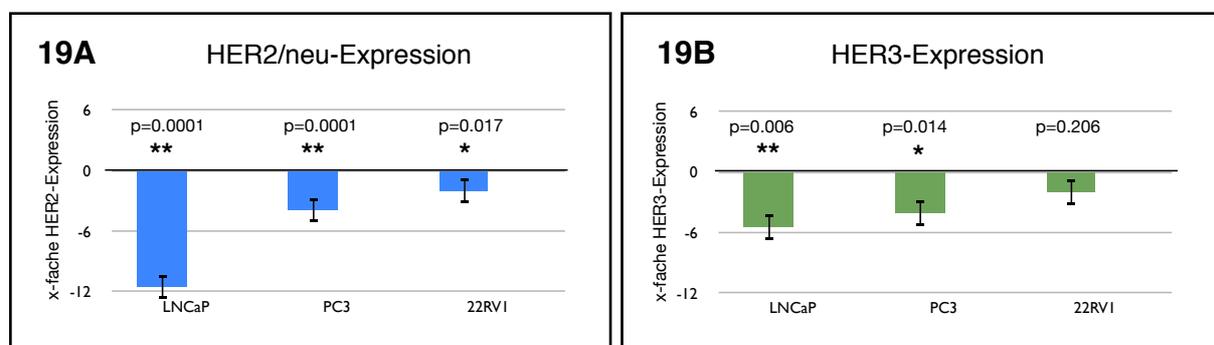
**Abb. 18: Mögliche Bindungsstellen von miR-205 an Ziel-mRNA: ERBB3 (HER3)**  
 Internethasierte Datenbanken berechneten für die möglichen Ziel-mRNA ERBB3 (HER3) Bindungsstellen für miR-205 (Ausschnitt aus „Targetscan“). Gezeigt ist der mRNA-Ausschnitt von ERBB3 mit Angabe der Nukleotidpositionen des Ausschnitts. Zwischen dem miR- und mRNA-Ausschnitt sind die miR-Bindungsstellen eingezeichnet.

Hieraus ergibt sich die Fragestellung, ob eine Inhibierung von HER2 auch in PCa-Zellen mit aberranter miR-205-Expression zu beobachten ist. Hierzu wurde aus pre- oder antago-miR-205 transfizierten Zellen und Kontrollzellen 48h post transfectionem RNA aufgereinigt, welche mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben wurde. Diese cDNA wurde dann mittels quantitativer qRT-PCR jeweils auf HER2/neu- und HER3-Expression analysiert. Für den genauen Versuchsaufbau siehe Kapitel 3.2.8-9. Im Folgenden wird die Expression von HER2/neu und HER3 nach transienter miR-205-Transfektion in PCa-Zellen gezeigt.

#### 4.1.6.1 Die Expression von HER2/neu und HER3 nach pre-miR-205-Transfektion

Um zu untersuchen, ob die Gene HER2/neu und HER3 aufgrund einer Überexpression von miR-205 in PCa-Zellen in ihrer Expression inhibiert werden, wurde die Expression dieser Gene in mit miR-205 transient transfizierten PCa-Zellen analysiert. Abbildung 19 zeigt hierzu die relative vielfache Expression von HER2/neu und HER3 in precursor-miR-205 transfizierten Zellen im Bezug zu kontrolltransfizierten Zellen ( $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methodik, siehe Kapitel 3.2.12.2). Am stärksten kann eine HER2/neu-Unterauspression in LNCaP-Zellen festgestellt werden. Im Vergleich mit pre-miR-Kontroll transfizierten Proben ist die Expression von HER2/neu in pre-miR-205 transfizierten Zellen 11,54-fach erniedrigt ( $p$ -Wert= $<0.01$ ). Geringer, aber immer noch signifikant unterschiedlich, manifestierte sich die aberrante Expression von HER2/neu dagegen in PC3- und 22RV1-Zellen.

Die Erkenntnis, dass HER2/neu mit HER3 ligandenabhängig in Verbindung steht und einen Komplex bildet, wirft die Frage nach Expressionsunterschieden von HER3 in pre-miR-205 transfizierten Prostatazelllinien auf. Abbildung 19B zeigt hierzu die relative vielfache Expression von HER3 in pre-miR-205 transfizierten Zellen.



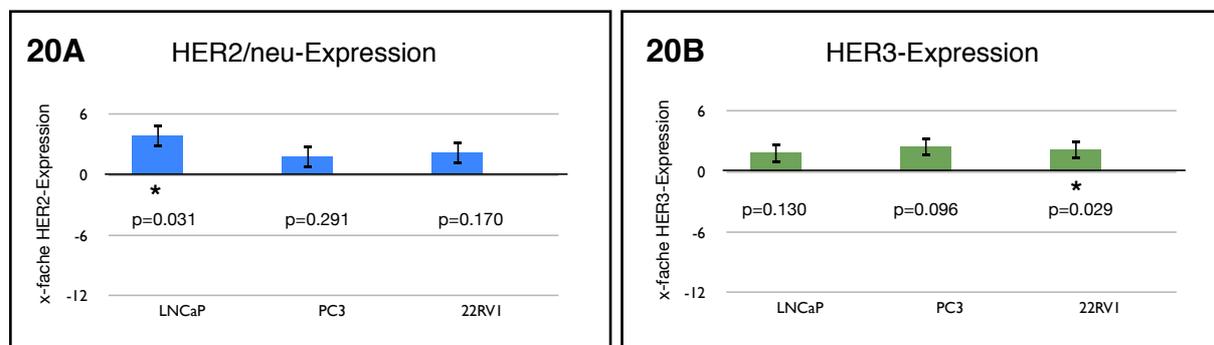
**Abb. 19:** Darstellung der Expression von HER2/neu (A) und HER 3 (B) in pre-miR-205 transfizierten PCa-Zellen.

Die relative HER2/neu-Expression wurde mittels qRT-PCR und  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode (siehe 3.2.12.2) ermittelt. Als Kontrolle wurden die Ct-Werte von Kontrollzellen nach transienter Transfektion mit einer Kontroll-miR verwendet. Für die jeweiligen Zelllinien sind die Mittelwerte von drei unabhängig durchgeführten Experimenten als x-fache Unterexpressionen dargestellt. Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt. Signifikanzen im student's t-Test wurden mit \*\* ( $p<0.01$ ) und \* ( $p<0.05$ ) angegeben.

In dieser Versuchsreihe zeigt die LNCaP-Linie ebenfalls mit einer 5,48-fachen Expressionserniedrigung von HER3 in pre-miR-205 transfizierten Proben ( $p$ -Wert= $<0.01$ ) die stärkste Reaktion der drei Zelllinien. Die HER3-Expression in PC3-Zellen fällt mit einer relativen 4,08-fachen Erniedrigung in pre-miR-205 transfizierten Proben im Vergleich mit den Kontrollen auf ( $p$ -Wert= $<0.05$ ). Eine relative 2,01-fachen Erniedrigung der HER3-Expression kann in 22RV1-Zellen unter gleichen Bedingungen beobachtet werden. Im student's t-Test fällt dieser Unterschied jedoch nicht auf ( $p$ -Wert = 0.206). Die Ergebnisse zeigen für die Zelllinien LNCaP und PC3 jeweils eine signifikante, miR-205-vermittelte Herabregulation von HER2/neu und HER3. In 22RV1-Zellen kann zwar eine signifikante Inhibierung der HER2/neu-Expression beobachtet werden (siehe Abbildung 19A), die beobachtete HER3-Unterexpression ist jedoch in diesen Zellen nicht signifikant (siehe Abbildung 19B).

#### 4.1.6.2 Die Expression von HER2/neu und HER3 nach Transfektion mit antago-miR-205

Da eine ektope Überexpression von miR-205 eine Herabregulation von HER2/neu und HER3 bewirkte, sollte auch die HER2/neu- und HER3-Expression nach miR-205-Inhibierung mittels transients anti-miR-205-Transfektion untersucht werden.



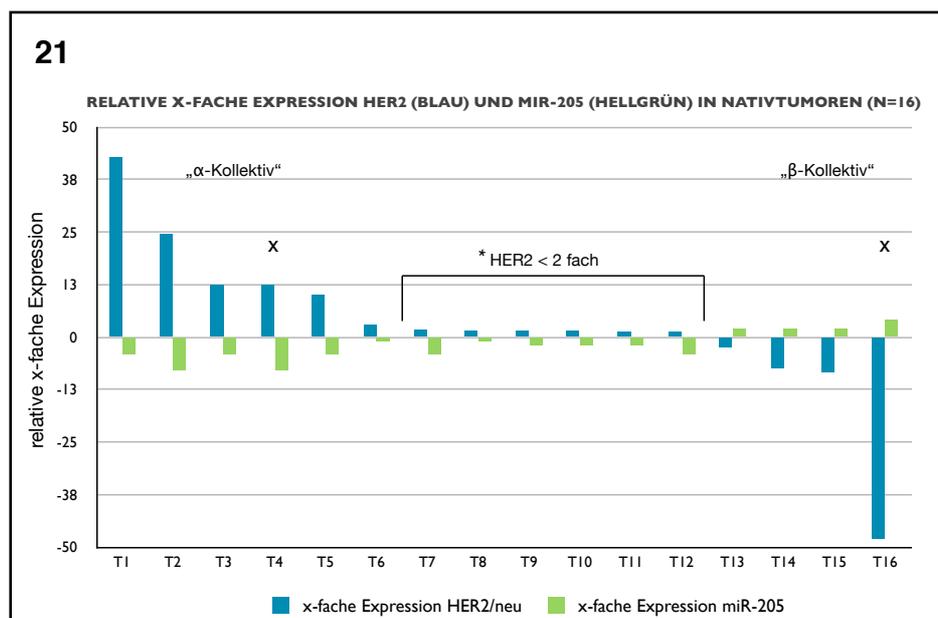
**Abb. 20: Darstellung der Expression von HER2/neu (A) und HER 3 (B) in antago-miR-205 transfizierten PCa-Zellen.**

Die relative HER2/neu-Expression wurde mittels qRT-PCR und  $\Delta\Delta C_t$ -Methode (siehe 3.2.12.2) ermittelt. Als Kontrolle wurden die Ct-Werte von Kontrollzellen nach transienter Transfektion mit einer Kontroll-miR verwendet. Für die jeweiligen Zelllinien sind die Mittelwerte von drei unabhängig durchgeführten Experimenten als x-fache Unterexpressionen dargestellt. Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt. Signifikanzen im student's t-Test wurden mit \*\* ( $p=<0.01$ ) und \* ( $p=<0.05$ ) angegeben.

Abbildung 20 fasst die antago-miR-205-vermittelte HER2/neu- und HER3-Überexpression in anti-miR-205 transfizierten Zellen zusammen: Die gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass in allen anti-miR-205 transfizierten PCa-Zelllinien die Expression von HER2/neu und HER3 im Vergleich zur Kontrolle erhöht war. Die HER2/neu-Überexpression war nur in der LNCaP-Zelllinie statistisch signifikant reguliert, die HER3-Überexpression in der 22RV1-Linie. Die geringste HER3-Überexpression zeigen LNCaP-Zellen.

#### 4.1.7 Die Expression von HER2/neu und microRNA-205 in 16 Nativtumoren

Um die Bedeutung der Regulation von HER2/neu durch miR-205 auch im primären Karzinom zu verifizieren, wurde die Assoziation von der HER2/neu-expression und aberranter miR-205-Expression untersucht. Hierzu wurde auf nativ asserviertes Material eines allgemeinen PCa-Kollektivs (siehe 3.1.6.2) zurückgegriffen.



**Abb. 21: Die vielfache Expression von HER2 und mir-205 in 16 primären PCa-Proben.**

Die Berechnung der relativen Expression ist in Kapitel 4.14 dargestellt (Seite 64).

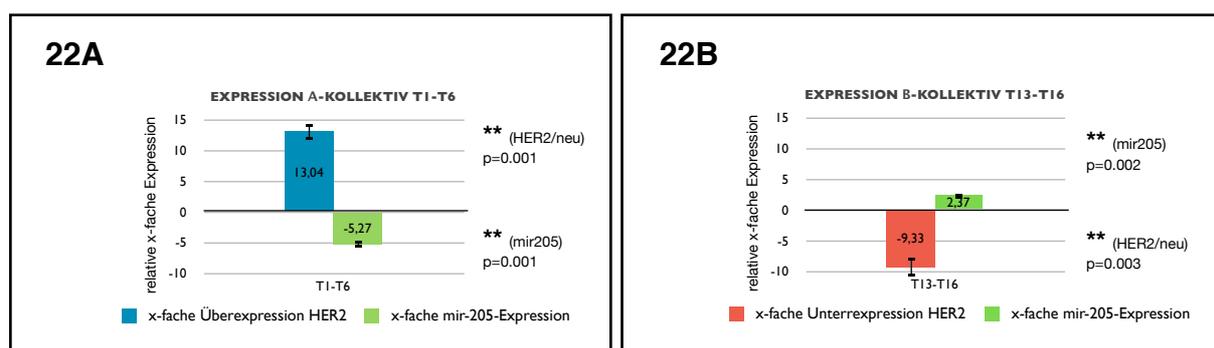
Die Proben wurden nach abfallender HER2/neu-Expression aufgetragen. Zu erkennen sind für die jeweilige Gewebeprobe des Tumors (nummeriert von T1-T16) als dunkelblaue Balken die HER2/neu Expression, als hellgrüne Balken die zugehörige miR-205 Expression ( $\Delta\Delta Ct$ ). Mit einem „x“ wurden Tumore gekennzeichnet, die regionäre Lymphknotenmetastasen (pN+) aufwiesen.

Außerdem wurde ein positiv ( $\alpha$ , n=6) und negativ ( $\beta$ , n=4) HER2/neu-exprimierendes Kollektiv gebildet (siehe Abbildung 22). Tumoren, die HER2/neu um den Faktor <2 exprimierten (n=6), wurden von dieser Datenverarbeitung ausgeschlossen.

Die Expression von miR-205 und HER2/neu wird in der Abbildung 21 als relative x-fache Expression dargestellt ( $\Delta\Delta C_t$ -Methode, Formel und Procedere siehe 3.2.12.2).

Es wurden anhand der miR-205-Expression zwei Subgruppen gebildet, um die inverse Assoziation von miR-205 und HER2/neu-Expression darzustellen. Das „ $\alpha$ -Kollektiv“ beinhaltet Karzinome, die HER2/neu mehr als 2-fach überexprimieren. Das „ $\beta$ -Kollektiv“ enthält Karzinome, die HER2/neu mehr als 2-fach unterexprimieren. Bei der Auswertung zeigt sich im „ $\alpha$ -Kollektiv“ durchschnittlich eine 13-fache relative HER2/neu Expressionserhöhung; die miR-205 Expressionserniedrigung ist in diesen sechs Tumorproben durchschnittlich 5,27-fach erniedrigt (p-Wert= $<0.01$ , siehe Abbildung 22A). Im „ $\beta$ -Kollektiv“ lässt sich durchschnittlich eine 9,33-fache Expressionerniedrigung von HER2/neu im Vergleich zu tumorfreien Arealen beobachten; die miR-205- Expression ist im Vergleich zur durchschnittlichen Expression in tumorfreien Gewebeproben um 2,37-fach erhöht (p-Wert= $<0.01$ , siehe Abbildung 22B).

Bezüglich des gesamten Kollektivs kann durchgehend eine inverse Assoziation von miR-205- und HER2/neu-Expression beobachtet werden. Die überwiegende Zahl (n=12) der Tumoren weisen eine Unterexpression von miR-205 und eine Überexpression von HER2/neu auf. Von diesen Tumoren weisen jedoch nur sechs eine mehr als 2-fache Überexpression von HER2/neu auf. Weiterhin wird gezeigt, dass in allen Tumoren, die eine positive HER2/neu Expression aufweisen, eine negative miR-205 Expression beobachtet werden kann (n=6).



**Abb. 22: Die durchschnittliche Expression von HER2/neu und miR-205 in den Kollektiven „ $\alpha$ “ (25A) und „ $\beta$ “ (25B).**

Die Berechnung der relativen vielfachen Expression ist in Kapitel 4.14 dargestellt (Seite 64).  
 Signifikanzen im student's t-Test wurden mit \*\* (p= $<0.01$ ) und \* (p= $<0.05$ ) dargestellt.  
 Die Abweichungsbalken setzen sich aus der Standardabweichung der Expressionsdaten der zwölf Tumorproben (Proben: T1-T6 und T13-T16) zusammen.

Die erfassten miR-205 Expressionswerte des gesamten Studienkollektivs korrelieren jedoch nicht mit der Intensität der HER2/neu Expression (Korrelationskoeffizient nach Bravais und Pearson: -0.26 , p-Wert (einseitig) = 0.3111). Die HER2/neu Expressionsspanne reicht von 43-fach erhöht (T1) bis 48-fach erniedrigt (T16) im Vergleich zum tumorfreien Referenzgewebe. Die miR-205 Expression bewegt sich im Rahmen von 8-fach erniedrigt (T4) bis 4-fach erhöht (T16) im Vergleich zur durchschnittlichen miR-205 Expression in makroskopisch tumorfreien Gewebearealen (relative Angaben für HER2/neu und miR-205, siehe Formel 3.2.12.2). Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass in den 16 untersuchten primären PCa-Proben im Vergleich zum tumorfreien Referenzgewebe die HER2/neu-Expression invers mit der miR-205-Expression assoziiert ist. Die Intensität der miR-205 und HER2-/neu-Expression korreliert nicht signifikant.

#### 4.1.7.1 Der Vergleich der HER2/neu-Expression mit klinischen Merkmalen im Nativmaterial

Im vorgestellten Kollektiv wurden Assoziationen zwischen klinischen Daten und dem Expressionsstatus von HER2/neu untersucht. Hierzu wurden klinische Daten des Kollektivs (n=16) in eine Niedrig/Mittelrisikogruppe und Mittel/Hochrisikogruppe eingeteilt (siehe Tabelle 6), um eine risikoabhängige Auswertung zu ermöglichen. Die Ergebnisse zeigen für keinen der untersuchten Parameter statistisch signifikante Assoziationen zur HER2/neu-Expression in den einzelnen Tumoren (siehe Supp. Abbildung 1, Appendix).

Merkmal	Gruppe1 - Niedrig- bis Mittelrisikokarzinome	Gruppe2 - Mittel- bis Hochrisikokarzinome
Gleason-Score	5,6 und 7 (mäßig differenziertes PCa)	8,9 und 10 (gering differenziertes PCa)
pT-Stadium	1 und 2a/b/c (lokal begrenztes PCa)	3a/b/c und 4 (lokal fortgeschrittenes PCa)
PSA-Wert	PSA<10 ng/dl	PSA>10 ng/dl
Freies PSA in %	FPSA<10%	FPSA>10%
Lymphknotenstatus	N0	N+
Resektionsstatus	R0	R+

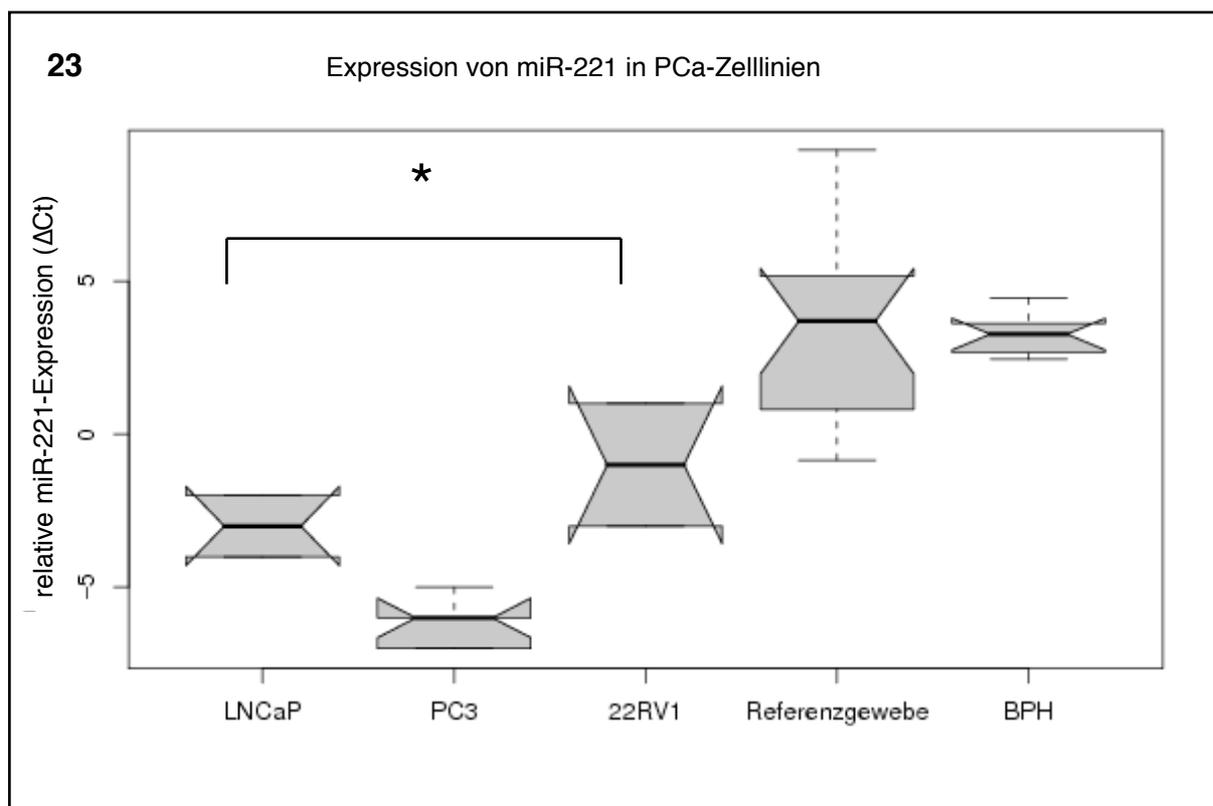
**Tabelle 6: Risikogruppeneinteilung in Niedrig- bis Mittelrisiko- und Mittel- bis Hochrisiko-Tumore im allgemeinen PCa-Kollektiv (n=16)**

## 4.2 Die Bedeutung der microRNA-221 im PCa

In aktuellen Studien konnte gezeigt werden, dass miR-221 häufig im PCa herabreguliert ist. Aus diesem Grund war es ein Ziel der Arbeit, die biologische Bedeutung der miR-221 in PCa-Zellen zu untersuchen.

### 4.2.1 Die miR-221-Expression in PCa-Zelllinien

Zuerst sollte der Frage nach der basalen miR-221-Expression in den verwendeten Zelllinien im Vergleich zu BPH- und tumorfreiem Referenzgewebe nachgegangen werden. Hierzu wurde die relative Expression von miR-221 der Zelllinien in Form von  $\Delta\text{Ct}$ -Werten gegen die miR-221-Expression von 16 tumorfreien Prostatageweben (=Referenzgewebe) und neun BPH-Proben verglichen. Abbildung 23 zeigt die Expressionsunterschiede als Boxplots (Erläuterungen zu den Referenzgeweben: siehe auch 3.1.6.1-2).



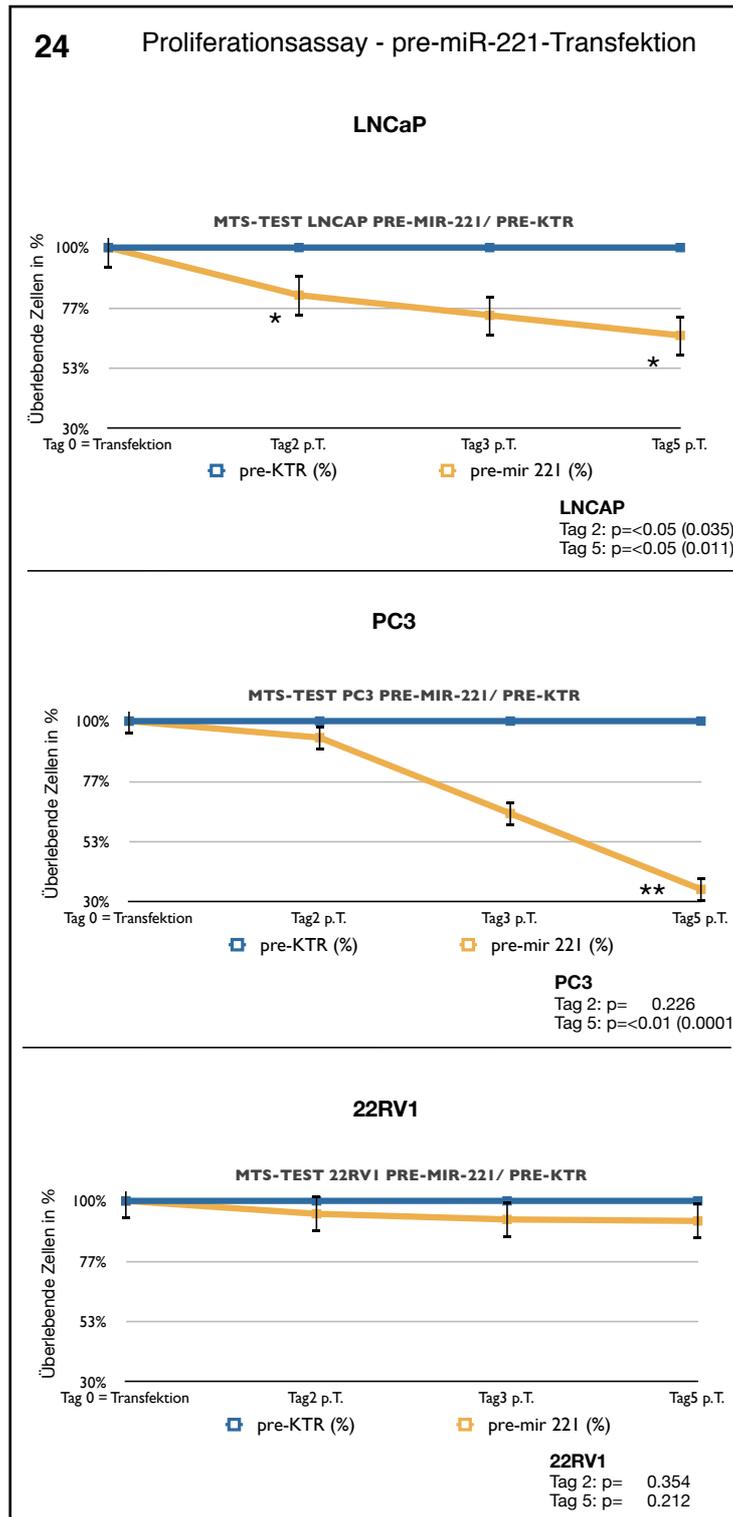
**Abb. 23:** Darstellung der relativen miR-221-Expression in drei PCa-Zelllinien. Dargestellt ist die miR-221 Expression in 16 Referenzgeweben (= tumorfreie Prostata, siehe auch 3.1.6.2) und in neun BPH (siehe auch 3.1.6.1). Die in der qRT-PCR gewonnenen  $\Delta\text{Ct}$ -Werte für die Zelllinien setzen sich aus jeweils sechs unabhängigen Messungen zusammen.

MiR-221 ist in PC3-Zellen mit einem Expressionsmedian von  $\Delta Ct_{PC3} = -6,17$  herabreguliert. Die miR-221-Expression dieser Zellen unterscheidet sich signifikant von den miR-221 Expressionsmedianen  $\Delta Ct_{\text{Referenzgewebe}} = 3,233$  und  $\Delta Ct_{BPH} = 3,155$  (p-Wert für PC3-Zellen verglichen mit Referenzgewebe und BPH jeweils  $<0.01$ ). Die miR-221-Expression in LNCaP-Zellen kann mit einem Expressionsmedian von  $\Delta Ct_{LNCaP} = -3$  ebenfalls signifikant ( $p < 0.01$ ) von der Expression der Referenzgewebe getrennt werden. 22RV1-Proben weisen einen durchschnittlichen Expressionsmedian von  $\Delta Ct_{22RV1} = -0,833$  auf und unterscheiden sich signifikant sowohl vom Expressionsmedian der BPH-Proben als auch vom Expressionsmedian der Referenzgewebe (p-Wert von jeweils  $<0.01$ ). Die Expression von miR-221 kann auch zwischen den Zelllinien statistisch getrennt werden: PC3 weist eine stärkere miR-221 Unterexpression im Vergleich zu LNCaP- und 22RV1-Zellen auf (p-Wert jeweils  $<0.01$ ). Zusammengefasst weisen alle untersuchten PCa-Zelllinien eine signifikant erniedrigte miR-221-Expression auf. Die Zelllinie PC3 weist dabei die stärkste Herabregulation von miR-221 auf.

#### 4.2.2 Das Zellwachstum von miR-221-transfizierten PCa-Zelllinien

Aktuelle Literatur berichtet von miR-221-vermittelter Proliferationsinhibierung bzw. -aktivierung in verschiedenen Tumorentitäten. Aus diesem Grund wurde mittels MTS-Assays die miR-221-vermittelte Modulation des Zellwachstums von PCa-Zellen untersucht. Abbildung 24 zeigt die Proliferationsinhibierung pre-miR-221-transfizierter PCa-Zellen (zum Versuchsaufbau des MTS-Proliferationsassays siehe Abschnitt 3.2.6). Wie Abbildung 24 zeigt, kann in PC3-Zellen die stärkste Abnahme der Proliferation (35% vitale Zellen an Tag 5 p.T, p-Wert= $<0.01$ ) nach pre-miR-221-Transfektion beobachtet werden. Zellen der Linie LNCaP und 22RV1 zeigen an Tag 5 p.T. eine Reduktion auf 66% (LNCaP, p-Wert= $<0.05$ ) bzw. 92% (22RV1, p-Wert=0.212) vitaler Zellen. An Tag 2 p.T. zeigt LNCaP eine Reduktion auf insgesamt 82% (LNCaP, p-Wert=0.035) vitale Zellen. PC3- und 22RV1-Zellen zeigen keine signifikante Reduktion an Tag 2 p.T.. PC3: 94% vitale Zellen (p-Wert = 0.226), 22RV1: 95% vitale Zellen (p-Wert = 0.354).

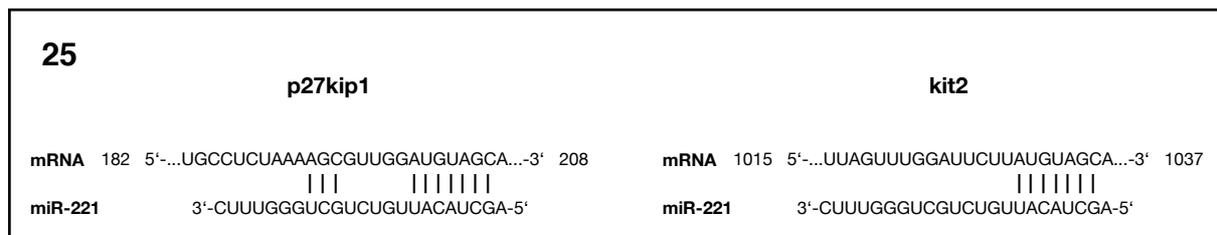
Die transiente Transfektion mit precursor-miR-221 ruft somit in LNCaP und PC3-Zellen eine signifikante Inhibierung der Proliferation an Tag 5 p.T. hervor.



**Abb. 24:** Darstellung des Zellwachstums von drei Prostatazelllinien unter transienter Transfektion mit pre-miR-221 (gelb) und pre-miR-Kontrollen (blau). Angegeben sind die vitalen Zellen in Prozent im Vergleich zu kontrolltransfizierten Zellen. Jeweils an Tag 2 und Tag 5 post transfectionem wurde der Proliferationsassay mit MTS-Reagenz und Monochromator durchgeführt. Signifikanzen im student's t-Test wurden mit \*\* ( $p < 0.01$ ) und \* ( $p < 0.05$ ) dargestellt. Die Abweichungsbalken setzen sich aus der Standardabweichung der drei durchgeführten, untereinander unabhängigen Experimente zusammen. Grundlage für die Errechnung des Vitalitätswertes an Tag 3,5 war das arithmetische Mittel der Zahlen von Tag 2 und Tag 5 p.T. (hierzu siehe Kapitel 3.2.6).

### 4.2.3 c-kit und p27kip1 als Zielgene von miR-221

Durch die oben beschriebenen Experimente wurde gezeigt, dass PCa-Zellen durch Heraufregulation der miR-221-Expression in ihrer Proliferation gehemmt werden. Dies lässt die Vermutung zu, dass miR-221 Gene reguliert, die in die Proliferation der Tumorzelle eingreifen. Aktuelle Veröffentlichungen beschreiben die Gene c-kit und p27kip1 als mögliche Zielgene von miR-221 im PCa. Computerassiiert können verschiedene Internetdatenbanken (hier ein Ausschnitt aus „TargetsCan“) für die 3' UTR der mRNA von c-kit an Nukleotidpositionen 1030-1036 (siehe Abbildung 25) und 1959-1965 zwei mögliche Bindungsstellen mit miR-221 vorhersagen. Für das Gen p27kip1 können die Datenbanken für die miR-221 an den Nukleotidpositionen 202-208 (siehe Abbildung 25) und 275-281 der p27kip1-mRNA mögliche Bindungsstellen für miR-221 determinieren.



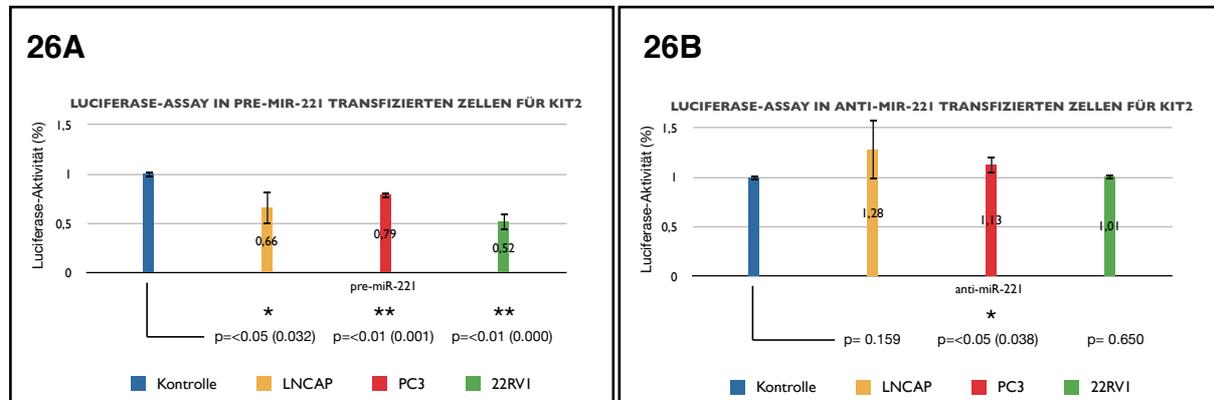
**Abb. 25: Mögliche Bindungsstellen von miR-221 an Ziel-mRNAs.** Internetbasierte Datenbanken berechneten für die möglichen Ziel-mRNAs p27kip1 und c-kit Bindungsstellen für miR-221 (oben: Ausschnitt aus „TargetsCan“). Gezeigt ist der jeweilige mRNA-Ausschnitt von p27kip1 und c-kit mit Angabe der Nukleotidposition des jeweiligen Ausschnitts. Zwischen dem miR- und mRNA-Ausschnitt sind die miR-Bindungsstellen eingezeichnet.

Aus diesem Grund wurde für beide Zielgene ein Luciferase-Assay angefertigt, um die vorhergesagte Bindung zwischen dem Zielgen und miR-221 funktionell nachzuweisen. Für den genauen Experimentablauf siehe 3.2.11.1 bis 3.2.11.7.

#### 4.2.3.1 Die Regulation von c-kit in miR-221 kotransfizierten Prostatazelllinien

Während die Bindung von miR-221 an die 3'UTR der p27kip1-mRNA in PCa-Zellen bereits nachgewiesen wurde, konnte bisher kein solcher Nachweis für eine direkte Interaktion zwischen miR-221 mit der c-kit-mRNA erbracht werden. Abbildung 26A und 26B zeigt die

durchschnittliche Luciferaseaktivität des c-kit-Vektors der drei PCa-Zelllinien als Quotient mit der Renilla-Luciferaseaktivität des Kontrollvektors nach Kotransfektion mit miR-221.



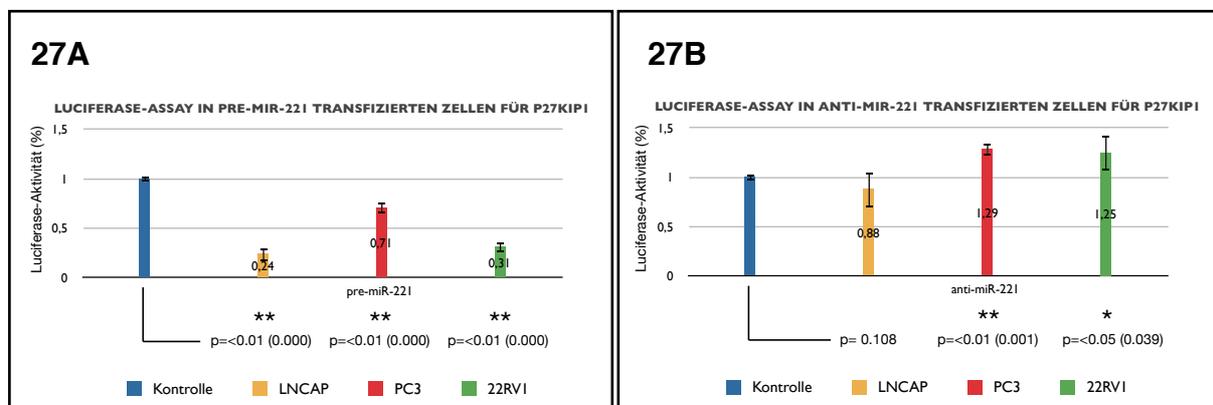
**Abb. 26:** Analyse der c-kit-Regulation durch Messung der Luciferase-Aktivität mittels Dual-Reporter-Assay in den drei Prostatazelllinien LNCaP, PC3 und 22RV1, kotransfiziert mit (A) precursor-miR-221 bzw. (B) antago-miR-221. Die Ordinate stellt die Luciferaseaktivität als Quotienten der Luminiszenz des c-kit-Vektors zur Luminiszenz des Renilla-Kontrollvektors dar. Dargestellt ist die Luciferaseaktivität in den Zelllinien LNCaP (gelb), PC3 (rot) und 22RV1 (grün) und mit Kontroll-miRs kotransfizierte Zellen (blau). Für die Luciferaseaktivität der Kontrollzellen wurde zufällig ein Wert von 1 = 100% festgelegt. Die Fehlerbalken setzen sich aus der Standardabweichung aus fünf unabhängigen Versuchen zusammen. Signifikanzen im student's t-Test wurden mit \*\* ( $p < 0.01$ ) und \* ( $p < 0.05$ ) dargestellt.

Vergleicht man die einzelnen Zelllinien, wird bei Kotransfektion mit pre-miR-221 die stärkste Depression der Luciferaseaktivität mit einer durchschnittlichen Abnahme von 48% in 22RV1-Zellen beobachtet ( $p$ -Wert= $<0.01$ ). In LNCaP- und PC3-Zellen wird eine durchschnittliche Abnahme der Luciferaseaktivität von 34% (LNCaP) bzw. 21% (PC3) registriert ( $p$ -Wert jeweils  $<0.01$ , siehe Abbildung 26A). Durch die Inhibierung der endogenen miR-221-Funktion nach Kotransfektion mit antago-miR-221 zeigt sich in 22RV1- und LNCaP-Zellen keine signifikante Verstärkung der Luciferaseaktivität. Eine schwache, statistisch signifikante Erhöhung der Luciferaseaktivität lässt sich jedoch in der PC3-Zelllinie beobachten ( $p$ -Wert= $<0.05$ , siehe Abbildung 26B). Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass nach Kotransfektion mit pre-miR-221 eine effektive Bindung zwischen miR-221 und des 3'UTR-Bereich des c-kit-Vektors existiert.

#### 4.2.3.2 Die Regulation von p27Kip1 in miR-221 kotransfizierten Prostatazelllinien

Abbildung 27A/B zeigen die Luciferaseaktivität des p27kip1-Vektors (als Quotient zur Luminiszenz des Renilla-Kontrollvektors) in den einzelnen Zelllinien, jeweils für die Kotransfektion mit precursor-miR-221 (27A) und mit antago-miR-221 (27B).

In pre-mir-221 kotransfizierten Zellproben zeigen alle drei Zelllinien eine signifikante Herabsetzung der Luciferaseaktivität bezüglich des p27kip1-Vektors, vergleicht man sie mit den Kontrollen (siehe Abbildung 27A): LNCaP: 76%ige, 22RV1: 69%ige, PC3: 23%ige Herabsetzung der Luciferaseaktivität (p-Wert jeweils <0.01).



**Abb. 27: Analyse der p27kip1-Regulation durch Messung der Luciferase-Aktivität mittels Dual-Reporter-Assay in den drei Prostatazelllinien LNCaP, PC3 und 22RV1, kotransfiziert mit (A) precursor-miR-221 bzw (B) antago-miR-221.** Die Ordinate stellt die Luciferaseaktivität in % als Quotienten der Luminiszenz des p27kip1-Vektors zur Luminiszenz des Renilla-Kontrollvektors dar. Dargestellt ist die Luciferaseaktivität in den Zelllinien LNCaP (gelb), PC3 (rot) und 22RV1 (grün) und mit Kontroll-miRs kotransfizierte Zellen (blau). Für die Luciferaseaktivität der Kontrollzellen wurde zufällig ein Wert von 1 = 100% festgelegt. Die Fehlerbalken setzen sich aus der Standardabweichung von fünf unabhängigen Messungen zusammen. Signifikanzen im student's t-Test wurden mit \*\* (p < 0.01) und \* (p < 0.05) dargestellt.

In antago-miR-221 kotransfizierten PCa-Zellen lassen sich folgende Beobachtungen machen: LNCaP-Zellen zeigen keinen Unterschied der Luciferaseaktivität im Hinblick auf p27kip1. PC3- und 22RV1 Zellen weisen eine erhöhte Luciferaseaktivität von 29% (PC3, p-Wert < 0.01), bzw. 25% (22RV1, p-Wert < 0.05) auf.

Diese Beobachtung lassen auf eine effektive Bindung zwischen der miR-221 und der 3'UTR des p27kip1-Vektors - vor allem nach Kotransfektion mit pre-miR-221 - schließen.

## 5 DISKUSSION

Die Prostata stellt die häufigste Malignomlokalisierung des Mannes dar. Die Ätiologie und die molekularen Ursachen der Tumorgenese dieses Karzinoms sind dabei bis heute nur teilweise bekannt. MicroRNAs, die in den letzten Jahren entdeckt wurden, sind posttranslationale Regulatoren der Genexpression und spielen offensichtlich eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Progression von vielen Malignomen. Seit der Erstbeschreibung im Jahre 1993 wurden für fast alle Karzinomarten Arbeiten zur Bedeutung der miRs in deren Tumorgenese vorgelegt.<sup>107</sup> Gleichzeitig wurde deutlich, dass die Stärke der microRNA-Expression und die Regulation ihrer Ziel-mRNAs in verschiedenen Karzinomen, inklusive des PCa, erheblich differieren (siehe Tabelle 8). In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnten für das PCa zwei besonders stark und häufig aberrant exprimierte microRNAs identifiziert werden: miR-205 und miR-221. Das Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung von miR-205 bzw. miR-221 für die Karzinogenese des PCa weiter aufzuklären und den Stellenwert dieser miRs als diagnostische und prognostische Marker für das PCa zu überprüfen.

### 5.1 Die miR-205 und miR-221 als Tumorsuppressoren und Onkogene

In den letzten Jahren wurde gezeigt, dass aberrante miR-205- und miR-221-Expressionen in verschiedenen Malignomen nachzuweisen sind. Vergleicht man die unterschiedlichen Publikationen, so wird deutlich, dass für die einzelnen Tumorentitäten keine einheitliche Über- oder Unterexpression von miR-205 und miR-221 beobachtet werden kann (siehe Tabelle 8). Für das PCa wird jedoch von einer tumorsuppressiven Funktion von miR-221 und miR-205 ausgegangen, da diese anhand eigener Ergebnisse und in mehreren unabhängigen Studien im primären PCa und in PCa-Zelllinien als unterexprimiert beschrieben werden (Tabelle 8).

Die unterschiedliche Regulation von miR-205 und miR-221 in verschiedenen Karzinomen erscheint auf den ersten Blick paradox, kann aber durch die Beobachtung erklärt werden, dass die miR-vermittelte Regulierung von mRNA-Molekülen von der jeweiligen spezifischen mikrozellulären Umwelt determiniert wird.<sup>121</sup> Als ein Beispiel können hier die unterschiedlichen Grundtypen von Malignomen, etwa solide und hämatologische Tumoren, genannt werden. Diese unterscheiden sich bezüglich ihrer zellulären Umwelt, des Zellmetabolismus und somit der Therapieplanung. Dies könnte eine mögliche Erklärung von unterschiedlichen miR-Expressionen in verschiedenen Tumoren sein.<sup>86,113</sup>

miR-205			miR-221		
Studie	Tumorentität	Expression	Studie	Tumorentität	Expression
Markou et al. <sup>108</sup>	Broncial-Ca	↑	He et al. <sup>116</sup>	Thyroidea-Ca	↑
Childs et al. <sup>109</sup>	HNSCC	↓	Calin et al. <sup>86</sup>	CML	↑
Dijckmeester et al. <sup>110</sup>	Barrett's - Ösophagus	↓	Takamizawa et al. <sup>117</sup>	Bronchial-Ca	↑
Iorio et al. <sup>111</sup>	Mamma-Ca	↓	Iorio et al. <sup>118</sup>	Mamma-Ca	↑
			Lee et al. <sup>119</sup>	Pankreas-Ca	↑
			Ciafre et al. <sup>120</sup>	Glioblastom	↑
Ambs et al. <sup>112</sup> Porrka et al. <sup>113</sup> Schaefer et al. <sup>93,1114</sup> Gandellini et al. <sup>91</sup> Ozen et al. <sup>115</sup>	PCa	↓↓	Ambs et al. <sup>112</sup> Porrka et al. <sup>113</sup> Spahn et al. <sup>90</sup>	PCa	↓↓
Kalogirou	PCa-Zelllinien	↓↓ (endogen)	Kalogirou	PCa-Zelllinien	↓↓ (endogen)

**Tabelle 8: Studien zur miR-205- und miR-221-Expression in verschiedenen Malignomen. Getrennt für miR-205 und miR-221 werden die jeweiligen Autoren der Studie, das untersuchte Malignom und die jeweilige Expression der miR (im Vergleich zu tumorfreiem Prostatagewebe) dargestellt.<sup>86,90,91,107,108,109,110,111,112,113,114,115,116,117,118,119,120</sup>**  
**Begriffserklärung: HNSCC = head and neck squamous cell carcinoma / CML = chronic myeloic leukaemia**

Weiterhin ist akzeptiert, dass nicht notwendigerweise eine einseitige, direkte Interaktion von microRNAs und Ziel-mRNA-Molekülen besteht, sondern diese Verbindung einer übergeordneten, dynamischen Regulation unterliegt.<sup>122</sup> Die Suche und Identifikation nach weiteren potentiellen Zielgenen dieser miRs stellt einen Schlüssel für das Verständnis der Funktion der miRNAs in der mikrozellulären Umwelt dar.

### 5.2 MicroRNA-205 im PCa

Auch im Diskussionsteil dieser Arbeit sollen getrennt nach den zwei durchgeführten Projekten zuerst die Ergebnisse des miR-205-Projektteils diskutiert werden. Vorarbeiten aus dem Labor für Translationale PCa-Forschung der Klinik und Poliklinik für Urologie und

Kinderurologie der Universität Würzburg sowie Ergebnisse aus Studien zeigten eine Herabregulation von miR-205 im PCa (siehe Tabelle 8).

Daher ist anzunehmen, dass miR-205 im PCa als potentielle Tumorsuppressor-miR funktioniert. Aufbauend auf diesem Ergebnis wurde ein etabliertes Zellmodell verwandt, um die Funktionen von miR-205 in PCa-Zellen weiter zu untersuchen. Hierzu wurden permanent wachsende Prostatazelllinien mit pre-/antago-miR-205 transient transfiziert. Die endogene Expression von miR-205 wurde in den verschiedenen Zelllinien mittels qRT-PCR bestimmt (siehe 3.2.9), um die Herabregulation von miR-205 in diesen Zelllinien zu verifizieren. Die Ergebnisse zeigen dabei, dass in allen verwendeten Zelllinien miR-205 herabreguliert ist. Die Zelllinie PC3 zeigt, verglichen mit den anderen beiden PCa-Zelllinien LNCaP und 22RV1, eine besonders starke Herabregulation von miR-205. Bereits veröffentlichte Studien zur miR-205-Expression in PCa-Zelllinien bestätigen diese Ergebnisse.<sup>113,91</sup> Basierend auf diesen Ergebnissen konnte erwartet werden, dass eine ektoische Überexpression von miR-205 Eigenschaften der Tumorzelle verändern könnte.

### **5.2.1 Die Proliferationsinhibierung durch miR-205 in PCa-Zelllinien**

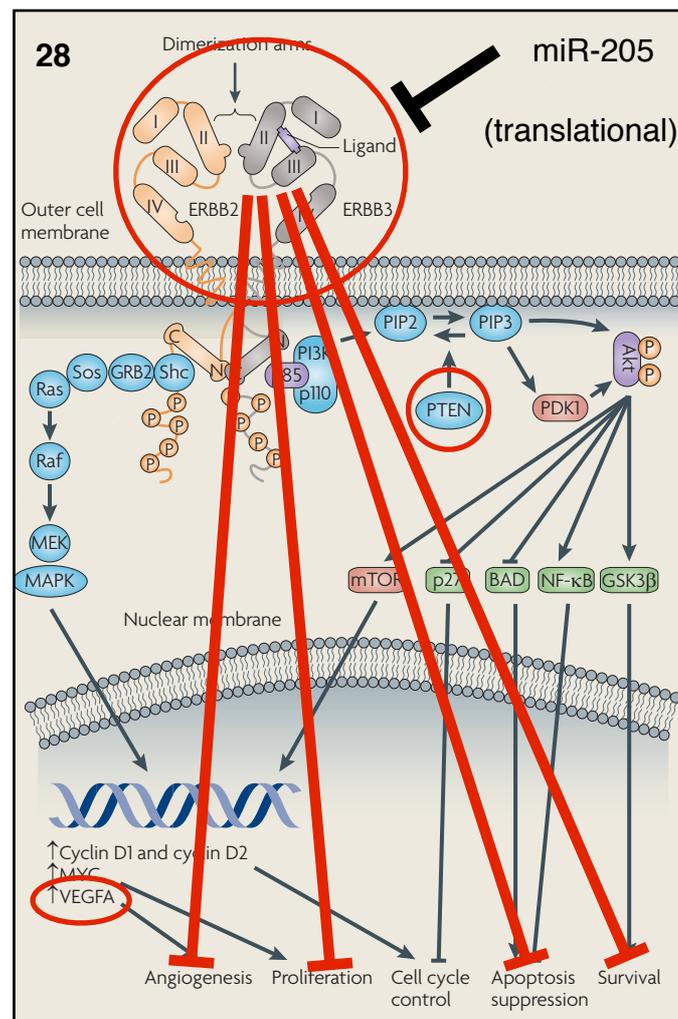
Um den Einfluss von miR-205 auf biologische Funktionen der Tumorzelle, wie beispielsweise Proliferation oder Apoptose zu analysieren, wurde in der vorliegenden Arbeit durch ektoische Überexpression die miR-205-Expression in PCa-Zellen angehoben.

In allen drei PCa-Zelllinien kann hierbei nach ektoischer Überexpression von miR-205 eine signifikante Inhibierung der Proliferation von bis zu 37% (in PC3-Zellen) festgestellt werden. Dies bestätigt die tumorsuppressive Wirkung der miR-205 im PCa, da sie augenscheinlich die Hyperproliferation der Tumorzelle revidieren kann. Anhand der Literatur liessen sich die Effekte der miR-205 auf die Proliferation von Tumorzellen vergleichen. Im Mamma-Ca ist - ebenso wie für das PCa - eine Herabregulation von miR-205 nachgewiesen.<sup>110,123,127</sup> Die Autoren konnten in Mamma-Ca-Zellen eine Inhibierung der Proliferation bei Überexpression mit miR-205 beobachten und brachten diese mit dem HER3-angegliederten PI3K/AKT-Signaltransduktionsweg in Verbindung.<sup>111</sup> Diese Arbeiten zeigen, dass miR-205 im Mammakarzinom offensichtlich eine tumorsuppressive Eigenschaft besitzt. Dies motivierte zu weiteren Experimenten in PCa-Zellen, um zu klären, ob der beobachtete proliferationsinhibierende Effekt aufgrund vermehrter Apoptose zustande kam. Während die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse auf eine Proliferationsinhibierung durch miR-205 in PCa-Zellen

hindeuten, zeigte eine Untersuchung von Gandellini et al. kontroverse Ergebnisse. Die Autoren beschreiben in ihrer Arbeit keine signifikante Inhibierung der Proliferation bei ektopischer Überexpression von miR-205 und gleichzeitiger Herabregulation des Zielgens PRCKE (Proteinkinase C, $\epsilon$ ) in PC3- und DU145-Zellen.<sup>91</sup> Eine offensichtliche Erklärung der kontroversen Ergebnisse kann nicht gefunden werden. Wu und Kollegen beschäftigten sich ebenfalls mit der Proliferation von PCa-Zelllinien und der Expression von PRCKE. Die Autoren weisen eine Proliferationssteigerung in PCa-Zellen nach PRCKE-Überexpression nach.<sup>174</sup> Da Gandellini et al. PRCKE als Zielgen von miR-205 beschreiben und deren Überexpression in PCa-Zelllinien offensichtlich eine Proliferationssteigerung hervorruft, ist anzunehmen, dass - wie in der vorliegenden Arbeit bestätigt- die miR-205 einen proliferationsmodulierenden Einfluss auf PCa-Zellen nehmen kann. Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass miR-205 tumorsuppressive Funktion im Rahmen einer Proliferationsinhibierung in PCa-Zellen ausübt. Die Inhibierung der Proliferation wird mit einer möglichen miR-205-vermittelten Inhibierung von proliferationsfördernden Zielgenen, beispielsweise dem in Studien bestätigten miR-205-Zielgen HER3, erklärt.

### **5.2.2 Die Regulation von HER2/neu und HER3 durch miR-205 im PCa**

MiR-205-Überexpression übt einen nachgewiesenen proliferationsinhibierenden Einfluss auf PCa-Zellen aus. Um einen möglichen zugrundeliegenden Mechanismus der miR-205-vermittelten Proliferationsregulation zu untersuchen, wurde die Identifikation von Genen, die durch miR-205 reguliert werden und mit der Proliferation von Tumorzellen assoziiert sind, vorgenommen. In Studien zum Mammakarzinom wurde die direkte Interaktion von miR-205 und HER3-mRNA durch Reporterassays bereits bestätigt und mit Proliferationsinhibierung von Mammakarzinom-Zellen in Verbindung gebracht.<sup>111</sup> Daher sollte diese Interaktion auch im PCa überprüft werden. In Vorarbeiten konnte für HER3 bioinformatisch eine hochkonservierte miR-205-Bindungsstelle in der 3'UTR von HER3-mRNA bestätigt werden. Für HER2 jedoch konnte computerassistent keine miR-205-Bindungsstelle an der 3'UTR der HER2-mRNA determiniert werden. HER2 ist dennoch funktionell in demselben Signaltransduktionsweg wie HER3 und anderen miR-205-Zielgenen zu finden (siehe Abbildung 28), was die naheliegende Annahme aufwirft, dass HER2 durch miR-205 indirekt mitreguliert wird.



**Abb. 28: Signaltransduktion bei ERBB2/3-Suppression.**  
 Mit roten Kreisen sind weitere bioinformatisch vorhergesagte Zielgene der miR-205 in den Signaltransduktionswegen AKT und MAPK (VEGF-A und PTEN) markiert. (modifiziert nach: Baselga et al. - *Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3*, 2009, *Nat Rev Cancer*<sup>58</sup>)

Dies motivierte zur simultanen Beobachtung der Expression dieser zwei Rezeptoren in ektopisch miR-205-überexprimierten PCa-Zellen. Die Ergebnisse zeigen dabei, dass in miR-205 überexprimierten PCa-Zelllinien die HER3-Expression im Vergleich zu Kontrollzellen signifikant herabreguliert ist. MiR-205 reguliert ihr vorhergesagtes Zielgen HER3 also nicht nur im Mamma-, sondern auch im PCa. Weiterhin zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass auch HER2 in ektopisch miR-205 überexprimierten PCa-Zellen signifikant herabreguliert ist. Es kann also von einer indirekten Regulierung von HER2 durch miR-205 ausgegangen werden. Diese Beobachtung wird durch die Tatsache gestützt, dass für miR-205 bioinformatisch eine Bindungsstelle an der 3' UTR der TOB2-mRNA (Transducer of ERbB2,

2) beschrieben wurde. Da TOB2 die Expression von HER2 regulieren kann, wurde über diesen Signalweg die indirekte Regulation von HER2 durch miR-205 vermutet. Hierzu sollten jedoch weiterführende Reporterassay-Versuche angestellt werden, um die direkte Bindung von miR-205 und diesen Zielgenen noch nachzuweisen.

Um die Regulation von HER2 durch miR-205-Unterexpression in primären PCa weiter zu verifizieren, wurde die HER2-Expression in einem PCa-Kollektiv untersucht. In diesem PCa-Kollektiv, welches 16 primäre PCa-Proben enthielt, kann eine Assoziation von miR-205-Unter- und HER2-Überexpression beobachtet werden. Dies bestätigt die Annahme der indirekten Regulation von HER2 durch miR-205 auch im primären PCa. Um die beobachtete miR-205-Unterexpression in PCa-Zellen mit der Proliferationsinhibierung und der gleichzeitigen Überexpression des Onkogens HER2 und HER3 zu verbinden, wurden folgende Annahmen zur miR-205-gesteuerten Veränderung von Signaltransduktionswegen getätigt: es erscheint denkbar, dass die beobachteten Proliferationseffekte mit Veränderungen der Signaltransduktion durch HER2 in Verbindung stehen (siehe Abbildung 28). Die Suppression von HER2 könnte somit über die fehlende Aktivierung des MAPKinase-Signalwegs mitverantwortlich für die beobachtete Proliferationsinhibierung sein. Ein weiterer möglicher Signalweg, der durch miR-205 reguliert sein könnte, ist der PI3K/AKT-Transduktionsweg. Die verstärkende Einflussnahme von HER2/3-Dimeren auf den AKT-Signaltransduktionsweg steht vor allem im Zusammenhang mit der eingeleiteten Apoptosevermeidung über GSK3 $\beta$  (Glykogen-synthasekinase-3-beta) und BAD (bcl-2-assoziiertes Zelllebensderegulator). Die Folge wäre die HER2/3-gesteuerte Suppression des AKT-Transduktionswegs und somit die Apoptoseeinleitung der Tumorzelle. Auch dieser Signalweg würde die Ergebnisse des Proliferationsassays erklären (siehe Abbildung 28). Vergleicht man die Ergebnisse dieser Arbeit mit der Literatur, kann in Studien bei Patienten mit lokalisiertem PCa gezeigt werden, dass die HER2-Überexpression signifikant mit der Progression des Tumors, dessen Apoptoseresistenz und der Angiogenese assoziiert ist.<sup>125,126</sup> Die Überexpression von HER2 im vorliegenden Kollektiv (n=16) kann im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Studien jedoch nicht mit klinisch-pathologischen Merkmalen des PCa korreliert werden. Es wird vermutet, dass das Kollektiv von zu geringem Umfang ist, um ein signifikantes Ergebnis zu erhalten. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass miR-205 ihr vorhergesagtes Zielgen HER3 auch im PCa reguliert. Obwohl keine miR-205-Bindungsstelle in der 3'UTR der HER2-mRNA besteht, wurde eine Unterexpression von

HER2 in miR-205 überexprimierten PCa-Zellen beobachtet. Die Annahme, dass miR-205 HER2 im PCa indirekt reguliert und im Prozess der Tumorgenese involviert ist, wird weiterhin durch die Assoziation in einem primären PCa-Kollektiv bestätigt. Diese Beobachtungen verifizieren die tumorsuppressive Funktion von miR-205 im Prostatakarzinom.

### 5.2.3 Mögliche weitere Zielgene von miR-205 im PCa

Da grundlegende Mechanismen der Tumorentwicklung nicht nur durch die Regulation eines einzigen Zielgens, sondern eher vom Zusammenspiel mehrerer Gengruppen determiniert sein dürften, kann die direkte Regulation von weiteren Genen durch miR-205 nicht ausgeschlossen werden.<sup>127</sup> Daher werden in diesem Abschnitt weitere Zielgene von miR-205 als mögliche Induktoren und Regulatoren der Tumorgenese diskutiert. Der Tumorsuppressor *vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor A* (VEGF-A) wurde bereits in mehreren Studien im PCa evaluiert und mit Zellproliferation, Angiogenese, metastatischer Potenz und Invasivität in Verbindung gebracht.<sup>128,129</sup> Es konnte gezeigt werden, dass VEGF-A bioinformatisch als direktes Zielgen von miR-205 vorhergesagt ist (Recherchedaten nicht gezeigt). VEGF-A kann die für die Invasivität und metastatische Potenz wichtige Angiogenese induzieren und findet sich im gleichen Signaltransduktionsweg wie HER2/3 (siehe Abbildung 28). Die Regulation des VEGF-A-Tumorsuppressors durch miR-205 ist im Rahmen der Tumorgenese des PCa anzunehmen. Diese Vermutung wird durch die bestätigte Regulation von HER3 im gleichen Signaltransduktionszweig unterstützt (MAPKinase-Signaltransduktion, Abb. 28). Die Regulation von VEGF-A durch miR-205 sollte deshalb in qRT-PCR-Experimenten und Reporter-Assays weiterhin untersucht werden. Der Tumorsuppressor PTEN (siehe 1.2.2) ist ebenfalls ein computerassistent vorausgesagtes Zielgen der miR-205, was die mögliche Einflussnahme dieser miR auf den AKT-Signaltransduktionsweg wahrscheinlich macht.<sup>55</sup> Diese beschriebenen weiteren Zielgene stellen jedoch nur einen kleinen Ausschnitt aus der Gesamtheit der von miR-205 direkt oder indirekt regulierten Gene dar und sollen einen Einblick in die Komplexität der miR-205-vermittelten Signaltransduktion in Tumorzellen geben. Die Fülle an sich gegenseitig beeinflussenden Signaltransduktionswegen, die von miR-205 gesteuert werden, soll dazu motivieren, weitere Zielgene dieser miR zu identifizieren und mit grundlegenden Prozessen des PCa in Verbindung zu bringen.

#### 5.2.4 miR-205 als mögliches Diagnostikum bei PCa

Neben invasiven Methoden zur Diagnostik des PCa wird die Bestimmung des Serum-PSA als nicht-invasive Methode zum Screening des PCa flächendeckend eingesetzt. Obwohl durch dieses Diagnostikum mehr PCa entdeckt werden, muss auf Limitationen bezüglich Spezifität und Sensitivität der PSA-Serum-Bestimmung hingewiesen werden: der Serum-PSA-Wert besitzt nur eine geringe karzinomassoziierte Sensitivität bei der Detektierung von frühen Stadien des Karzinoms, er versagt bei der Differenzierung von indolenten und lebensbedrohlichen Hochrisikokarzinomen, er korreliert nicht mit der Tumorgröße und interferiert mit anderen glandulären Serinproteasen der Prostata, beispielsweise Kallikrein 1 und 2.<sup>10</sup> Neben Patienten mit einem Karzinom werden erhöhte PSA-Werte auch bei Patienten mit Prostatitis und anderen nicht karzinomassoziierten Prostataerkrankungen gemessen.<sup>130</sup> Um die Limitationen der klinisch etablierten PSA-Bestimmung sinnvoll zu ergänzen, wäre also die Einführung eines zusätzlichen, hochspezifischen diagnostischen Markers von großem klinischen Wert. Die Untersuchungen dieser Arbeit zeigen, dass miR-205 in 105 untersuchten primären Proben von *low*-, *intermediate*- und *high-risk*-Tumoren progressiv herabreguliert ist (78% der Karzinome weisen eine mehr als zweifache Herabregulation gegenüber benignem Gewebe auf). Diese Beobachtung wurde durch verschiedene miR-Expressionsstudien im primären PCa und PCa-Zelllinien bestätigt (siehe Tabelle 8). Außerdem bestätigten Schaefer und Kollegen in ihrer Arbeit, dass die miR-205-Unterexpression in einem zeitgenössischem PCa-Kollektiv zwischen benignem und malignem Prostatagewebe (*overall correct classification* (OCC) = 72%) unterscheiden kann.<sup>93</sup> In dieser Arbeit wird somit eine Rolle von miR-205 in der PCa-Genese aufgezeigt und bestätigt. Hieraus ergibt sich die Schlussfolgerung, dass miR-205 möglicherweise als diagnostischer Marker einsetzbar ist. Die diagnostische Relevanz der miR-205 wurde außerdem durch die Beobachtung unterstrichen, dass die Expression von Onkogenen (HER2/neu und HER3) durch miR-205 reguliert wird. Um eine nicht-invasive Bestimmung der miR-205 als geeigneten diagnostischen Marker nutzen zu können, stellt die aberrante miR-205-Expression im Karzinom eine Voraussetzung dar. Mehrere Studien legten dazu nahe, dass eine nicht-invasive Diagnostik des PCa anhand von selektiven Bestimmungen von molekularen Markern in Urin- oder Blutproben möglich ist.<sup>92,131</sup> Soll nun das bestmögliche Screeningverfahren ausgewählt werden, ist die Spezifität zentrales Auswahlkriterium: bei der Bestimmung im peripheren Blut beispielsweise wäre die miR-205-Expression nicht prostataspezifisch. Es ist zu erwarten, dass die prostataspezifische

miR-205-Expression von anderen Organen, die andere Expressions-levels besitzen, überlagert und verfälscht würde. Die zellgebundene Bestimmung von miR-205-Detektion in Exprimaturin zeichnet sich im Gegensatz zu Blutkontrollen durch eine höhere Spezifität aus und würde sich daher als Methode der Wahl anbieten. Ob die Implementation der miR-205 als spezifischer PCa-Marker in zellgebundenen Urin-bestimmungen eine sinnvolle Ergänzung zur bereits etablierten Diagnostik des Karzinoms darstellt, muss in weiterführenden Studien evaluiert werden. Ausserdem sollte der retrospektive Ansatz dieser Arbeit durch prospektive Studien erweitert werden, um einen möglichen Nutzen der miR-205-Urinbestimmung in der Früherkennung des PCa zu verifizieren. Die bisher in mehreren Multizenterstudien nachgewiesene Eignung von Urintests in der Diagnostik des PCa, sowie die hohe Spezifität der miR-205-Expression im PCa lässt jedoch auf eine mögliche Implementation der miR-205-Bestimmung als spezifisches Diagnostikum hoffen.<sup>132,133</sup>

### **5.2.5 miR-205 als Prognoseindikator im PCa**

Nach der Diagnose eines PCa ist es wichtig, die Prognose dieser Patienten einzuschätzen. Durch die Einführung der Bestimmung des Serum-PSA werden zwar mehr Karzinome detektiert, eine präoperative Risiko- und Prognoseabschätzung des Karzinoms gelingt mit diesem Marker dabei nicht. Doch gerade die zuverlässige Identifikation von maximal therapie-bedürftigen Hochrisikokarzinomen wäre für eine individualisierte Therapieplanung vorteilhaft: die Eindämmung der vermuteten chirurgischen Übertherapie einer großen Zahl von indolenten Karzinomen könnte erreicht werden. Somit wird also ein zusätzlicher prognostischer Marker dringend benötigt, der eine solche präoperative Risikoabschätzung des PCa einschliesst. Deshalb wurde in dieser Arbeit untersucht, ob miR-205 als stark regulierte miR im PCa einen solchen prognostischen Marker darstellen könnte. Hierzu wurden klassische klinische Parameter des PCa, wie der Gleason-Score, das pN-Stadium, das Alter bei OP und der präoperative Serum-PSA auf eine mögliche Assoziation mit einer miR-205-Expression analysiert. Die Ergebnisse zeigten dabei, dass im vorliegenden Kollektiv keine Assoziation der miR-205-Expression und den angeführten Parametern (exklusive des pT-Stadiums) hergestellt werden kann. Als einziger klinischer Parameter können im vorliegenden Hochrisikokollektiv erhöhte pT-Stadien mit der miR-205-Herabregulation assoziiert werden. Die miR-205-Expression unterscheidet sich allerdings nicht zwischen allen pT-Stadien signifikant. Weiterhin variiert die Gruppengröße der einzelnen pT-Stadien stark. Aufgrund

dieser Limitationen muss die Relevanz dieser Assoziation als gering eingeschätzt werden. Vergleich man diese beschriebenen Ergebnisse mit der Arbeit von Gandellini et al., ergibt sich ein kontroverser Punkt: Gandellini und Kollegen korrelierten in ihrer Studie eine starke miR-205-Unterepression in primären Tumoren mit lokaler Metastasierung (pN+).<sup>91</sup> Diese Beobachtung kann in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Eine mögliche Erklärung stellt dabei die Verwendung unterschiedlich großer Kollektive dar: Während in seiner Studie nur fünf PCa-pN+-Proben gegen 25 PCa-pN0-Proben verglichen wurden, besteht das in der vorliegenden Arbeit verwendete Kollektiv aus 28 pN+-Patienten und 61 pN0-Patienten. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die miR-205-Expression nicht mit klassischen klinischen Parametern, die eine erhöhte Aggressivität anzeigen, assoziiert ist. Obwohl keine Assoziation der miR-205-Expression mit diesen klinischen Parametern besteht, kann sie trotzdem mit der Prognose des Karzinoms assoziiert sein. Dies leitet sich aus der Beobachtung ab, dass die zur Zeit angewandten klinischen Parameter die Prognose des PCa nicht exakt voraussagen können. Deshalb wurde das verwendete Hochrisiko-PCa-Kollektiv, bei dem uns Daten zum PSA-Wiederaufstieg nach Therapie (PSA-Progress) und zum gesicherten Rezidiv vorliegen, auf eine Assoziation der miR-205-Expression mit diesen prognostischen Parametern untersucht.

Um Überlebensanalysen und Teile der Regressionsmodelle möglich zu machen, wurde das Hochrisiko-PCa-Kollektiv dichotomisiert: **Gruppe A** umfasste diejenigen Tumore, die einen  $\Delta\text{Ct}$ -Wert von größer 1.46 aufwiesen, also miR-205 schwach herabregulierten. In **Gruppe B** wurden andererseits diejenigen Tumore eingeschlossen, die einen  $\Delta\text{Ct}$ -Wert von kleiner 1.46 aufwiesen. Die Tumore der Gruppe B regulierten miR-205 somit stark herab. Die Überlebensanalyse zeigte, dass eine starke Herabregulation (Gruppe B) von miR-205 ein prognostisch günstiges Zeichen darstellte. Eine schwache Herabregulation von miR-205 war ein prognostisch ungünstiges Zeichen. Bezüglich des progressionsfreien Überlebens in Gruppe B konnte ein signifikanter Überlebensvorteil gegenüber Gruppe A festgestellt werden.

Dieses Ergebnis war auf den ersten Blick überraschend: Eine starke Herabregulation von miR-205 charakterisiert zwar die meisten Karzinome, eine starke Herabregulation ist aber gleichzeitig ein prognostisch günstiges Zeichen im *high-risk*-PCa.

Daher wurden zur Verifikation der Ergebnisse der Überlebensanalyse Untersuchungen anhand von Regressionsmodellen durchgeführt, um herauszufinden, inwiefern eine schwache miR-205-Unterexpression das Progressionsrisiko im PCa anzeigt. Die Ergebnisse zeigen dabei, dass im multivariaten Modell, für das die Parameter pT-Stadium, Gleason-Score und präoperativer PSA-Wert ausgewählt wurden, eine schwache miR-205-Herabregulation (Gruppe A) signifikant das Progressionsrisiko erhöht. Dieses Ergebnis bestätigt somit die Beobachtungen in der Überlebensanalyse: eine starke miR-205-Herabregulation stellt ein prognostisch günstiges Zeichen im *high-risk*-PCa dar. Im univariaten Regressionsmodell konnte eine schwache miR-205-Herabregulation (Gruppe A) nur marginal signifikant mit Progressionsrisiko korreliert werden. Als mögliche Erklärung dieses Ergebnisses kann die geringe Fallzahl des Kollektivs angeführt werden. Es konnte durch eine Teststärke- („Power“) Analyse berechnet werden, wie viele Patienten dem Kollektiv hinzugefügt werden müssten, um auch univariat ein hochsignifikantes Ergebnis für Gruppe A zu erhalten. Deshalb planen wir bei Erreichen dieser Fallzahl die univariate Regression zu wiederholen, um das in der multivariaten Regression erzielte Ergebnis zu verifizieren. In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde bereits in einem konventionellen Kollektiv die Rolle von miR-205 in der Prognose des PCa untersucht. Diese Arbeit von Schaefer und Kollegen wies jedoch keine Assoziation von miR-205-Expressionslevel mit Überlebensnachteilen oder einer Progressionsrisikoerhöhung nach.<sup>93</sup> Allerdings wurde dort der biochemische (=PSA-) Progress als Endpunkt festgesetzt, während in der vorliegenden Arbeit insbesondere das klinische Wiederauftreten (=Metastasierung) des Tumors untersucht wurde. Dies gilt gegenüber dem PSA-Rezidiv als weitaus relevanterer Indikator für die Tumorprogression. Interessanterweise werden bezüglich des PSA-Rezidivs die Ergebnisse dieser Arbeit durch die Studie von Schaefer et al. bestätigt: die miR-205-Expression ist nicht mit dem PSA-Rezidiv assoziiert. Das klinische Wiederauftreten und somit der eindeutige Tumorprogress (rezidivfreies Überleben) korreliert in der vorliegenden Arbeit jedoch signifikant mit der miR-205-Expression. Diese unterschiedlichen Ergebnisse können dadurch erklärt werden, dass das in dieser Arbeit verwendete Hochrisikokollektiv viele dieser Ereignisse aufweist (22,5% der Karzinome sind klinisch progredient). Somit wird gezeigt, dass durch die miR-205-Expression klinisch progrediente *high-risk*-PCa identifiziert werden können.

Aus diesen Erkenntnissen ergibt sich die Fragestellung, warum die miR-205 in aggressiven, progredienten Tumoren im Gegensatz zu nicht progredienten Tumoren eine Heraufregulation der Expression erfährt. Folgende Antworten lassen sich hierzu aus der Literatur ableiten:

Molekulare oder genetische Mechanismen, die die unterschiedliche Expression von miR-205 in den verschiedenen Stadien des PCa erklären, wurden bisher noch nicht ausreichend untersucht. Bereits bekannt ist jedoch, wie miRs und deren Expression in Tumorzellen modifiziert werden können. Eine mögliche Erklärung der miR-205-Regulation in aggressiven Tumoren könnte mit der Beobachtung in Zusammenhang stehen, dass miR-205 sowohl Onkogene als auch Tumorsuppressoren regulieren kann (siehe Tabelle 8). Ausserdem konnte gezeigt werden, dass die Herabregulation von miRs in Tumoren epigenetisch durch Hypermethylierung von sog. „CpG-Inseln“ an benachbarten DNA-Abschnitten oder Histonmodifikationen begründet werden kann.<sup>134,135</sup> Genomische Alterationen, beispielsweise durch die Expressionsstärke von miR-prozessierenden Enzymen wie Dicer, könnten ebenfalls eine Erklärung der Regulation von miRs in Tumoren darstellen.<sup>136</sup> Ausserdem konnte nachgewiesen werden, dass die Genabschnitte von miRs bevorzugt in DNA-Abschnitten liegen, die sog. „Hot Spots“ für chromosomale Veränderungen in karzinomassoziierten Tumorsuppressor- und Onkogenregionen der DNA darstellen.<sup>137</sup> Inwieweit jedoch die miR-205-Expressionsstärke die Regulation verschiedener Gene oder Gengruppen determiniert, ist unbekannt. Zwar wurden -wie bereits erwähnt - verschiedene Zielgene von miR-205 nachgewiesen, die Gesamtheit aller möglichen Zielgene ist dennoch nicht zu beurteilen. Da zusätzlich bekannt ist, dass miRs die Feinjustierung von Genen, z.B. in der Embryogenese, beeinflussen, kann die Expressionsstärke der Zielgene selbst eine Rolle spielen.<sup>138</sup> Denkbar ist somit, dass in den Tumoren Veränderungen der Expression von Genen, die im Rahmen der Tumorprogression auftreten, die Kontrollfunktion durch miR-205 stark modifizieren. So konnte z.B. gezeigt werden, dass miR-221 in Metastasen des PCa gegenüber dem Primärtumor eine verstärkte Herabregulation aufweist.<sup>90</sup> Auch hier zog offensichtlich die Veränderung des Tumorstadiums eine Veränderung einer miR-Expression nach sich. Die beobachtete Heraufregulation der miR-205-Expression in progredienten PCa könnte somit in Zusammenhang mit Veränderung der Expression von Tumorsuppressoren/Onkogenen bzw. Veränderungen der Funktion dieser Gene stehen. Ein zweiter möglicher Erklärungsansatz der miR-205-Heraufregulation während des PCa-Progresses wäre die Annahme, dass diese Heraufregulation nur einen sekundären Effekt eines anderen, unbekanntem Progressions-

effektes darstellt und es -obwohl statistisch signifikant mit der Prognose assoziiert - keinen kausalen Zusammenhang zwischen der miR-205-Heraufregulation mit dem Eintritt einer Progression gibt. Die Aufklärung der genauen Ursache der veränderten miR-205-Regulation, welche die Veränderungen während der Tumorprogression nach sich ziehen, ist allerdings nicht eindeutig zu klären, da es sich wie oben dargelegt bei der miR-vermittelten Genregulation um ein komplexes Zusammenspiel zwischen der miR, ihrer Zielgene und der jeweiligen spezifischen Zellumwelt handelt.<sup>121,122</sup> Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass miR-205 durchaus einen Marker darstellt, der das PCa bezüglich seiner Aggressivität und seines Rezidivverhaltens trennen kann. Gleichzeitig korreliert die Expression dieser miR nicht mit den klassischen klinischen Prognoseparametern. Diese Arbeit zeigt, dass miR-205 somit einen unabhängigen Marker zur Prognose des PCa darstellt. Um eine klinische Implementation als Prognosemarker möglich zu machen, muss eine Überprüfung der Ergebnisse dieser Arbeit in einem größeren Validierungskollektiv durchgeführt werden. Die Möglichkeit zur Identifikation von hochaggressiven, prognostisch ungünstigen Tumoren durch miR-205 (und die daraus resultierende Senkung der Übertherapie indolenter Karzinome) sollen jedoch zur weiteren experimentellen Evaluierung dieser miR motivieren.

### **5.3 MicroRNA-221 im PCa**

In Vorarbeiten aus dem Labor für translationale PCa-Forschung der Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie der Universität Würzburg und aus verschiedenen Studien geht hervor, dass miR-221 als karzinomassoziierte miR in verschiedenen Tumorentitäten einschliesslich des PCa häufig und stark reguliert ist. Die gegensätzliche Regulation von miR-221 in verschiedenen Karzinomarten begründet die Fragestellung, ob miR-221 als Onko- oder Tumorsuppressor-miR funktioniert. Auf das PCa bezogen konnte gezeigt werden, dass 98% der Karzinome des verwendeten Hochrisiko-PCa-Kollektivs eine signifikant erniedrigte Expression von miR-221 aufwiesen. Dieses Ergebnis spricht für eine tumorsuppressive Funktion von miR-221 im PCa.<sup>90</sup> Um die Tumorsuppressivität der miR-221 zu verifizieren und funktionell zu erklären, wurden in der vorliegenden Arbeit PCa-Zelllinien mit miR-221 transfiziert und die Proliferation der transfizierten Zellen gemessen. Außerdem wurde in einem Reporter-Luciferase-Assay eine direkte Bindung zwischen miR-221 und der 3'UTR möglicher Zielgen-mRNAs analysiert.

### 5.3.1 Die ektopische Überexpression von miR-221 in PCa-Zelllinien

Falls miR-221 im PCa wie postuliert eine tumorsuppressive Funktion besitzt, könnte die ektopische Überexpression von miR-221 in PCa-Zellen tumoröse Eigenschaften, wie z.B. die Hyperproliferation inhibieren. Daher wurde im Zellmodell die Beeinflussung der Proliferation durch miR-221 untersucht. Voraussetzung für eine antiproliferative Wirkung der ektopischen Überexpression stellt eine relative Herabregulation von miR-221 in den benutzten Zelllinien dar. Die Ergebnisse zeigen dabei, dass in allen verwendeten Zelllinien, aber vor allem in PC3-Zellen, die miR-221-Expression im Vergleich zur Kontrolle reduziert ist. Interessanterweise kann die stärkste Proliferationsinhibierung nach miR-221-Transfektion ebenfalls in PC3-Zellen festgestellt werden, welche die stärkste Herabregulation von miR-221 aufweisen. Die Proliferationsinhibierung von 22RV1 und LNCaP-Zellen fällt deutlich geringer aus. Diese Ergebnisse weisen eine antiproliferative Funktion von miR-221 nach. Dies bestätigt die tumorsuppressive Funktion der miR-221. Ebenfalls wird durch Caspase-Aktivitätsmessungen gezeigt, dass in den Zellen nach Transfektion verstärkt Apoptose eingeleitet wurde (mündl. Mitteilung Dr. Kneitz). Es ist also anzunehmen, dass miR-221 in PCa-Zellen über Zielgene von apoptose-induzierenden Signaltransduktionswegen Einfluss auf das Überleben und somit die Proliferation nimmt.

Vergleicht man diese Ergebnisse mit den Resultaten anderer Arbeiten, ergeben sich Kontroversen: es wurde von Galardi und Kollegen gezeigt, dass in PC3-Zellen im Vergleich zu LNCaP und 22RV1-Zellen die endogene miR-221-Expression erhöht war.<sup>88</sup> Die Autoren dieser Arbeit beobachteten im Gegensatz zu den vorliegenden Daten einen proliferationsaktivierenden Effekt bei ektopischer Überexpression mit miR-221 in LNCaP und 22RV1-Zellen. Mercatelli et al. beobachteten zudem, dass in Maus-Xenografts (LNCaP) eine Überexpression von miR-221 deren Wachstum stimulierte.<sup>89</sup> Diese Ergebnisse können nicht in Einklang mit der von den oben beschriebenen Autoren postulierten onkogenen Funktion der miR-221 im PCa gebracht werden. Die unterschiedlichen Ergebnisse könnten dadurch erklärt werden, dass in den verglichenen Arbeiten von Galardi und Mercatelli vor allem die Zelllinie LNCaP untersucht wurde. In der vorliegenden Arbeit kann bezüglich der LNCaP-Zellen festgehalten werden, dass sie zwar eine leicht erniedrigte Expression von miR-221 aufwiesen, diese sich aber nicht so stark wie beispielsweise die Expression in PC3-Zellen darstellt. Folglich kann in dem im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Proliferationsassay

bei LNCaP-Zellen auch eine schwächere Proliferationsinhibierung nach Transfektion nachgewiesen werden. Als mögliche Erklärung der abgeschwächten Regulation und Einflussnahme auf die Proliferation in LNCaP-Zellen könnte angeführt werden, dass die miR-221 in diesen Zellen aufgrund übergeordneter Mechanismen oder der mikrozellulären Umwelt - im Gegensatz zu PC3-Zellen - beispielsweise nicht mehr reguliert sein könnte und so keinen Einfluss auf die Proliferation ausübt. Eine definitive Erklärung der fehlenden oder abgeschwächten Proliferations-modulierung von miR-221 ist jedoch nicht möglich. Von großer Bedeutung ist aber, dass in einer Vielzahl von Studien folgendes eindeutig festgestellt werden konnte: primäre Tumoren der Prostata können durch erniedrigte miR-221-Expressionen charakterisiert werden.<sup>90,112,113</sup> Die Intensität dieser Unterexpression von miR-221 wurde in einer Studie aus unserer Arbeitsgruppe auch mit signifikant schlechterem klinischem Outcome und der Prognose im PCa korreliert. Die erzielten Ergebnisse in PC3-Zellen unterstreichen die tumorsuppressive Funktion der miR-221 im primären PCa.<sup>93</sup> Eine onkogene Funktion der miR-221, wie durch die Autoren Galardi und Mercantelli beschrieben, ist somit im primären Karzinom der Prostata nicht anzunehmen.

### **5.3.2 Die miR-221-vermittelte Regulation von p27Kip1 im PCa**

Um eine mögliche Erklärung der beobachteten Tumorsuppressorfunktion und des Proliferationseffekts auf PCa-Zellen zu finden, wurden mögliche proliferationsmodulierende Zielgene der miR-221 auf eine direkte Interaktion untersucht. Für viele Karzinomarten wurden dabei Belege für eine direkte Bindung von miR-221 und der 3'UTR des Tumorsuppressorgens p27Kip1 (CDKN1B) nachgewiesen.<sup>139-145</sup> Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen ergänzend, dass miR-221 direkt mit der 3'UTR von p27kip1-mRNA in PCa-Zellen interferiert. Allen bisher veröffentlichten Studien ist gemein, dass sie eine erhöhte miR-221-Expression mit gleichzeitiger Herabregulation von p27kip1 in den Tumoren feststellen und so von einer onkogenen Funktion der miR-221 ausgehen. So beschrieben Sun et al. vor allem in androgen-unabhängigen PCa-Zelllinien (LNCaP-Abl) eine Überexpression von miR-221 mit gleichzeitiger Herabregulation von p27kip1. Die Autoren beobachteten eine signifikant angestiegene Proliferation nach Überexpression mit miR-221 und postulierten eine onkogene Funktion von miR-221.<sup>146</sup> Möglicherweise könnte - vor allem durch den Verlust der Androgenabhängigkeit - in der PCazelle via bisher unverstandener biochemischer Prozesse die direkte Regulation von p27kip1 wieder aktiviert worden sein, was

den beschriebenen Effekt erklären könnte. Es wurde jedoch von Sun et al. keine Assoziation von miR-221-Überexpression mit einer Inhibierung von p27kip1 in primären Tumoren gezeigt.<sup>146</sup> Die Annahme, dass miR-221 p27kip1 auch im PCa reguliert, erscheint daher fraglich. Die nachgewiesene Herabregulation von miR-221 im PCa würde diesen Tumorsuppressor überexprimieren und somit eine tumorprotektive Funktion ausüben. Eine solche tumorprotektive Funktion würde jedoch gegensätzlich keine maligne Entität wie ein PCa begünstigen. Dieses Ergebnis wirft die Frage nach dem Effekt der miR-221-vermittelten Regulation auf die Inhibierung der RNA-Expression von p27kip1 im primären PCa auf. Spahn et al. konnten diese Fragestellung betreffend nachweisen, dass die miR-221-Expression und der p27kip1-mRNA-Gehalt in primären PCa-Proben nicht assoziiert waren. Trotz Interferenz der miR-221 an der 3'UTR der p27kip1-mRNA blieb die Inhibierung der RNA-Expression dieses Gens in primären Karzinomen augenscheinlich aus.<sup>90</sup>

Daher kann vermutet werden, dass die in Zelllinien beobachtete miR-221-vermittelte Inhibierung von p27kip1 keine Bedeutung für die Entstehung primärer PCa spielt. Eine andere Regulation von p27kip1, die nicht von miR-221 ausgeht, ist somit im PCa wahrscheinlich. Eine Benennung des genauen Vorgangs der vermuteten anderen p27kip1-Regulation ist jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht definitiv möglich und sollte durch weiterführende Studien untersucht werden.

### 5.3.3 Die miR-221-vermittelte Regulation von c-kit im PCa

Da in allen bisher veröffentlichten Expressionsstudien im PCa eine Herabregulation von miR-221 beschrieben wird, ist eine Regulation von Onkogenen, die als miR-221-Zielgene beschrieben werden können, zu vermuten. Als Zielgen von miR-221 wurde der Stammzellfaktor c-kit sowohl computerassistent beschrieben als auch experimentell bestätigt. So wurde in erythro-leukämischen Zellen nachgewiesen, dass die Herabregulation von miR-221 durch die Inhibition von c-kit an der Proliferationinhibierung dieser Zellen beteiligt war. Eine direkte Interaktionen von miR-221 und der 3'UTR der c-kit-mRNA wurde in der gleichen Arbeit nachgewiesen.<sup>148</sup> Im PCa konnten Spahn *et al.* aus unserer Arbeitsgruppe nachweisen, dass die miR-221-Expression im primären Karzinom mit dem Anstieg von mRNA-Konzentrationen von c-kit assoziiert war. Die Beobachtung, dass miR-221 im verwendeten Kollektiv außerdem mit der Metastasierung des PCa assoziiert war, liess die Vermutung auf eine miR-221-vermittelte Funktion von c-kit in diesem Ereignis des PCa zu.<sup>90</sup>

Der Nachweis einer direkten Interaktion von miR-221 und der 3'UTR von c-kit in PCa-Zellen ist zudem noch nicht erbracht worden. Die Ergebnisse des in dieser Arbeit durchgeführten Reporter-Luciferase-Assays zeigen nun die direkte Interaktion von miR-221 mit der 3'UTR der c-kit-mRNA in PCa-Zelllinien. Dies lässt den Schluss auf eine direkte Regulation von c-kit durch miR-221 in PCa-Zellen zu. Diese Beobachtungen lassen sich mit den Ergebnissen der Proliferationsassays dieser Zelllinien in Verbindung bringen. Die Herabregulation des Stammzellfaktors c-kit durch ektopische Überexpression von miR-221 könnte die Proliferationsinhibierung dieser Zellen erklären, da c-kit als Stammzellfaktor die Proliferation von Zellen modulieren kann. Die Relevanz der c-kit-Überexpression in der Tumorgenese und Progression des PCa wird in der Literatur bis dato kontrovers diskutiert. In einer Studie, in der 392 primäre PCa immunhistochemisch auf eine c-kit-Überexpression überprüft wurden, konnte nur in einer Probe eine signifikante Überexpression von c-kit beobachtet werden.<sup>148</sup> Auch klinische Studien, in denen Multi-Kinase-Inhibitoren (Sorafenib, inhibiert u.a. auch die c-kit-Signaltransduktion) bei androgenunabhängigen PCa eingesetzt wurden, konnte kein signifikanter Behandlungserfolg festgestellt werden.<sup>149</sup> Gegenätzlich konnten Di Lorenzo et al. zeigen, dass in 26 von 94 *high-risk*-PCa c-kit überexprimiert war. Obwohl nur marginal signifikant, zeigten die Autoren weiterhin, dass die Progression mit der Überexpression von c-kit korrelierte.<sup>150</sup> Aus diesem Grund ist das Potential von c-kit als spezifisches Onkogen in Metastasen des PCa in Expressionsstudien evaluiert worden: die Anwesenheit des c-kit-Bindungspartners SCF (Stammzellfaktor) konnte in Knochenmetastasen verstärkt beobachtet werden. Eine besonders starke Unterexpression von miR-221 in PCa-Metastasen ist zudem beschrieben worden.<sup>90,151</sup> Dies weist darauf hin, dass c-kit im PCa vor allem ein spezifisches Onkogen in der Metastasierungskaskade darstellen könnte. Daraus abgeleitet könnte die miR-221 vermittelte Regulation von c-kit möglicherweise einen Marker darstellen, schon vor Eintritt eines solchen Ereignisses die Metastasierung des PCa anzeigen könnte. Die klinische Relevanz eines solchen Markers wäre von großem Wert, da mit den bisher etablierten Screeningparametern und klinischen Aggressivitätsfaktoren der Eintritt einer Metastasierung nicht abgeschätzt werden kann. Weitere Experimente zu c-kit in Metastasen, wie z.B. qRT-PCR oder Western-Blots, sollten jedoch in der Zellkultur und primären Karzinomen durchgeführt werden, um diese Vermutung zu verifizieren.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Das Prostatakarzinom (PCa) ist weltweit das häufigste Malignom des Mannes mit weiter steigenden Inzidenz. Leider ist es bisher mit den gebräuchlichen Prognosefaktoren nicht möglich, diesen klinisch sehr heterogenen Tumor vor einer chirurgischen Therapie hinsichtlich des postoperativen Rezidivrisikos zu charakterisieren. Die Einführung neuer, hochsensitiver Biomarker, die diese Aufgabe zuverlässig erfüllen können, stellt vor allem für die Entwicklung individualisierter Therapieregimes von Patienten mit einem *high-risk*-PCa eine aktuelle Herausforderung dar. MicroRNAs rückten in den letzten Jahren als potentielle Biomarker zunehmend in den wissenschaftlichen Fokus. Sie stellen kleine RNA-Moleküle dar, welche posttranskriptionell die Genexpression in Organismen steuern und auch in der Regulation von Tumorsuppressoren und Onkogenen eine Rolle spielen. Differentielle Expressionslevels verschiedener RNAs wurden in sehr vielen Tumorentitäten, wie auch dem PCa beobachtet. Vorarbeiten aus unserem Labor zeigten, dass zwei microRNAs, miR-205 und miR-221, im PCa sehr stark unterexprimiert werden. Im Falle von miR-221 konnte zudem bereits eine Korrelation mit dem klinischen Verlauf und der Prognose des *high-risk*-PCa dargestellt werden. Aufbauend auf diesen Vorarbeiten sollte in einem Teilprojekt der vorliegenden Arbeit die tumorsuppressive Funktion von miR-221 im PCa untersucht werden. Mittels transienter Überexpression von miR-221 in PCa-Zelllinien konnte die Bedeutung von miR-221 als Regulator der Proliferation in PCa-Zellen beschrieben werden. Um die molekulare Wirkweise von miR-221 weiter darzustellen, wurde die posttranskriptionelle Inhibierung von p27kip1 und c-kit, zwei bekannten miR-221-Zielgenen, untersucht. In sogenannten Luciferase-Assays konnte eine direkte Interaktion von miR-221 mit definierten Sequenzen im 3'-untranslatierten Bereich (=3'UTR) beider Gene nachgewiesen werden. Erwartungsgemäß wurde aber in primären PCa-Tumoren, die anders wie viele andere Tumorentitäten eine reduzierte miR-221-Expression aufwiesen, keine Überexpression des potentiellen Tumorsuppressors p27kip1 beobachtet. Somit ist nachgewiesen, dass miR-221 zwar prinzipiell den Tumorsuppressor p27kip1 regulieren kann, dass allerdings dieser Mechanismus in primären PCa für die Regulation des Tumorsuppressors p27kip1 keine übergeordnete Rolle spielt. Anders verhält es sich bei dem potentiellen Onkogen c-kit. Die von mir durchgeführten Untersuchungen können erstmals eine direkte Interaktion von c-kit und miR-221 in PCa-Zellen nachweisen. Somit kann die beschriebene Proliferationsinhibierung und Apoptoseinduktion nach ektopischer miR-221-Überexpression im Zellmodell

mit einer miR-221-vermittelten c-kit-Inhibierung in Zusammenhang gebracht werden. Dieses Ergebnis wird durch den Nachweise einer inversen Assoziation der mir-221- und ckit-Expression in primären PCa-Fällen untermauert (nicht gezeigte Ergebnisse). Betrachtet man diese Ergebnisse in Zusammenhang mit der bekannten tumor-progressiven Funktionen von c-kit, könnte durch die fehlende/reduzierte miR-221-Inhibierung der c-kit-Translation die Entstehung und Progression vieler PCas erklärt werden. In einem zweiten Projektansatz wurde die Bedeutung und Funktion von miR-205 als möglicher Tumorsuppressor im PCa untersucht. Dabei kann gezeigt werden, dass mir-205 ebenfalls in der Lage ist, nach transienter Überexpression die Proliferation von PCa-Zellen zu inhibieren. Um molekulare Mechanismen und Wirkweisen von mir-205 zu untersuchen, wurden im Zellmodell die Expression der Onkogene HER2/neu und HER3, beides vorausgesagte miR-205-Zielgene, analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass in PCa-Zellen die Unterexpression von HER3 und HER/neu mit der ektopischen Überexpression von miR-205 assoziiert ist. Die HER2/neu-Expression konnte zusätzlich auch im primären Tumor mit der miR-205-Expression invers assoziiert werden, wodurch die Regulation dieses Zielgens auf nativer Ebene verifiziert wurde. Ein weiterer Fokus dieser Arbeit konzentrierte sich auf die Fragestellung, ob sich miR-205 als Prognosemarker im *high-risk*-PCa eignen könnte. Hierzu wurden in einem etablierten *high-risk*-PCa-Studienkollektiv die Expression von mir-205 analysiert und anschließend Korrelations- und Überlebensanalysen durchgeführt. Es konnte statistisch keine Assoziation zwischen der miR-205-Expression und verschiedenen Prognoseparametern, die in der Klinik präoperativ prognostische Vorrassagekraft besitzen, hergestellt werden. Allerdings fiel auf, dass Karzinome, die miR-205 relativ schwach herabregulierten, ein signifikant schlechteres prognostisches Outcome und Überlebensnachteile zeigten, im Vergleich zu Tumoren, die eine starke miR-205-Regulation aufweisen. Somit konnten im Hochrisikokollektiv mit Hilfe der miR-205-Expressionsanalyse Karzinome identifiziert werden, die ein erhöhtes Rezidivrisiko aufweisen. Die hier vorgelegten Untersuchungen stellen also erste Hinweise dar, dass miR-205 als unabhängiger prognostischer Marker im PCa Verwendung finden könnte. Zusammenfassend kann in der vorgelegten Arbeit gezeigt werden, dass die microRNAs miR-205 und miR-221 zwei tumorsuppressive RNAs im PCa darstellen. Eine mögliche zukünftige Implementation der Expressionsanalysen von miR-221 und/oder miR-205 als Progressionsmarker stellt eine vielversprechende Möglichkeit dar, in Zukunft die Prognose und vielleicht auch die Therapie des PCa zu verbessern.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

- (1) FERLAY, J., SHIN, H. R., BRAY, F., FORMAN, D., MATHERS, C. & PARKIN, D. M. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*, 127, 2893-917.
- (2) FERLAY, J., PARKIN, D. M. & STELIAROVA-FOUCHER, E. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer*; 46, 765-81.
- (3) ROBERT KOCH INSTITUTE (HRSG.) AND ASSOCIATION OF POPULATION-BASED CANCER REGISTRIES IN GERMANY (HRSG., 2010) „Cancer in Germany, 2005/2006. Incidence and Trends.“ 6: 72-75.
- (4) REITER, RE., DEKERNION, JB. (2002). „Epidemiology, etiology, and prevention of prostate cancer.“ In: Walsh, Retik, Vaughan, Wein (HRSG): Campbell’s Urology, 8th ed. Saunders, Philadelphia.
- (5) JEMAL, A., SIEGEL, R., WARD, E., HAO, Y., XU, J. & THUN, M. J. (2009) Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin*, 59, 225-49.
- (6) LANDIS, S. H., MURRAY, T., BOLDEN, S. & WINGO, P. A. (1998) Cancer statistics, 1998. *CA Cancer J Clin*, 48, 6-29.
- (7) MUIR, C. S., NECTOUX, J. & STASZEWSKI, J. (1991) The epidemiology of prostatic cancer. Geographical distribution and time-trends. *Acta Oncol*, 30, 133-40.
- (8) HANKEY, B. F., FEUER, E. J., CLEGG, L. X., HAYES, R. B., LEGLER, J. M., PROROK, P. C., RIES, L. A., MERRILL, R. M. & KAPLAN, R. S. (1999) Cancer surveillance series: interpreting trends in prostate cancer--part I: Evidence of the effects of screening in recent prostate cancer incidence, mortality, and survival rates. *J Natl Cancer Inst*, 91, 1017-24.
- (9) CARVALHAL, G. F., SMITH, D. S., MAGER, D. E., RAMOS, C. & CATALONA, W. J. (1999) Digital rectal examination for detecting prostate cancer at prostate specific antigen levels of 4 ng./ml. or less. *J Urol*, 161, 835-9.
- (10) SCHRODER, F. H., VAN DER MAAS, P., BEEMSTERBOER, P., KRUGER, A. B., HOEDEMAEKER, R., RIETBERGEN, J. & KRANSE, R. (1998) Evaluation of the digital rectal examination as a screening test for prostate cancer. Rotterdam section of the European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer. *J Natl Cancer Inst*, 90, 1817-23.
- (11) GANN, P. H., HENNEKENS, C. H. & STAMPFER, M. J. (1995) A prospective evaluation of plasma prostate-specific antigen for detection of prostatic cancer. *JAMA*, 273, 289-94.
- (12) OESTERLING, J. E., JACOBSEN, S. J., CHUTE, C. G., GUESS, H. A., GIRMAN, C. J., PANSER, L. A. & LIEBER, M. M. (1993) Serum prostate-specific antigen in a community-based population of healthy men. Establishment of age-specific reference ranges. *JAMA*, 270, 860-4.
- (13) STAMEY, T. A., YANG, N., HAY, A. R., MCNEAL, J. E., FREIHA, F. S. & REDWINE, E. (1987) Prostate-specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate. *N Engl J Med*, 317, 909-16.
- (14) Carter HB, Partin AW: Diagnosis and staging of prostate cancer In: Walsh, Retik, Vaughan, Wein (eds): Campbell’s Urology, 8th ed. Saunders, Philadelphia. 2002
- (15) COONER, W. H., MOSLEY, B. R., RUTHERFORD, C. L., JR., BEARD, J. H., POND, H. S., TERRY, W. J., IGEL, T. C. & KIDD, D. D. (1990) Prostate cancer detection in a clinical urological practice by ultrasonography, digital rectal examination and prostate specific antigen. *J Urol*, 143, 1146-52; discussion 1152-4.

- (16) GUSTAFSSON, O., CARLSSON, P., NORMING, U., NYMAN, C. R. & SVENSSON, H. (1995) Costeffectiveness analysis in early detection of prostate cancer: an evaluation of six screening strategies in a randomly selected population of 2,400 men. *Prostate*, 26, 299-309.
- (17) SOBIN L.H., GOSPODAROWICZ M.K., WITTEKIN C. (HRSG., 2009) UICC TNM Classification of Malignant Tumours, 7te Auflage, Oxford. Verlag Wiley-Blackwell. 243-248
- (18) MACKENZIE, R. (2009) Donald Gleason and the grading of prostate cancer. *J Insur Med*, 41, 4-5.
- (19) GLEASON, D. F. (1992) Histologic grading of prostate cancer: a perspective. *Hum Pathol*, 23, 273-9.
- (20) HUMPHREY, P. A. (2004) Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate. *Mod Pathol*, 17, 292-306.
- (21) ALGABA, F., EPSTEIN, J. I., FABUS, G., HELPAP, B., NAGLE, R. B. & POLITO, M. (1995) Working standards in prostatic intraepithelial neoplasia and atypical adenomatous hyperplasia. *Pathol Res Pract*, 191, 836-7.
- (22) PARTIN, A. W., KATTAN, M. W., SUBONG, E. N., WALSH, P. C., WOJNO, K. J., OESTERLING, J. E., SCARDINO, P. T. & PEARSON, J. D. (1997) Combination of prostate-specific antigen, clinical stage, and Gleason score to predict pathological stage of localized prostate cancer. A multi-institutional update. *JAMA*, 277, 1445-51.
- (23) JOHANSSON, J. E. (1994) Watchful waiting for early stage prostate cancer. *Urology*, 43, 138-42.
- (24) HANKS, G. E., MARTZ, K. L. & DIAMOND, J. J. (1988) The effect of dose on local control of prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 15, 1299-305.
- (25) THOMPSON, I., THRASHER, J. B., AUS, G., BURNETT, A. L., CANBY-HAGINO, E. D., COOKSON, M. S., D'AMICO, A. V., DMOCHOWSKI, R. R., ETON, D. T., FORMAN, J. D., GOLDENBERG, S. L., HERNANDEZ, J., HIGANO, C. S., KRAUS, S. R., MOUL, J. W. & TANGEN, C. M. (2007) Guideline for the management of clinically localized prostate cancer: 2007 update. *J Urol*, 177, 2106-31.
- (26) SKAGSETH, E., JR. (1967) [Retropubic prostatectomy. A clinical review and follow-up study]. *Nord Med*, 77, 621-4.
- (27) PARRA, R. O., ISORNA, S., PEREZ, M. G., CUMMINGS, J. M. & BOULLIER, J. A. (1996) Radical perineal prostatectomy without pelvic lymphadenectomy: selection criteria and early results. *J Urol*, 155, 612-5.
- (28) XYLINAS, E., MISRAI, V., COMPERAT, E., RENARD-PENNA, R., VAESSEN, C., BITKER, M. O., CHARTIER-KASTLER, E., RICHARD, F., CUSSENOT, O. & ROUPRET, M. (2009) [Oncologic and functional outcomes after radical prostatectomy in T3 prostate cancer]. *Prog Urol*, 19, 285-90.
- (29) ROEHRBORN, C. G. (1996) Fine-tuning the indication for prostatectomy. *J Urol*, 155, 203-5.
- (30) GUILLONNEAU, B. & VALLANCIEN, G. (2000) Laparoscopic radical prostatectomy: the Montsouris technique. *J Urol*, 163, 1643-9.
- (31) HANKEY, B. F., FEUER, E. J., CLEGG, L. X., HAYES, R. B., LEGLER, J. M., PROROK, P. C., RIES, L. A., MERRILL, R. M. & KAPLAN, R. S. (1999) Cancer surveillance series: interpreting trends in prostate cancer--part I: Evidence of the effects of screening in recent prostate cancer incidence, mortality, and survival rates. *J Natl Cancer Inst*, 91, 1017-24.
- (32) PORTER, C. R., KODAMA, K., GIBBONS, R. P., CORREA, R., JR., CHUN, F. K., PERROTTE, P. & KARAKIEWICZ, P. I. (2006) 25-year prostate cancer control and survival outcomes: a 40-year radical prostatectomy single institution series. *J Urol*, 176, 569-74.

- (33) VASSILIKOS, E. J., YU, H., TRACHTENBERG, J., NAM, R. K., NAROD, S. A., BROMBERG, I. L. & DIAMANDIS, E. P. (2000) Relapse and cure rates of prostate cancer patients after radical prostatectomy and 5 years of follow-up. *Clin Biochem*, 33, 115-23.
- (34) DE VRIES, S. H., POSTMA, R., RAAIJMAKERS, R., ROEMELING, S., OTTO, S., DE KONING, H. J. & SCHRODER, F. H. (2007) Overall and disease-specific survival of patients with screen-detected prostate cancer in the European randomized study of screening for prostate cancer, section Rotterdam. *Eur Urol*, 51, 366-74; discussion 374.
- (35) GOKTAS, S. & CRAWFORD, E. D. (1999) Optimal hormonal therapy for advanced prostatic carcinoma. *Semin Oncol*, 26, 162-73.
- (36) Prostate Cancer Trialists' Collaborative Group. (1995). "Maximum androgen blockade in advanced prostate cancer: an overview of 22 randomised trials with 3283 deaths in 5710 patients." *Lancet* 346(8970): 265-9.
- (37) HUGGINS, C. & HODGES, C. V. (2002) Studies on prostatic cancer. I. The effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. 1941. *J Urol*, 167, 948-51; discussion 952.
- (38) RAGDE, H., ELGAMAL, A. A., SNOW, P. B., BRANDT, J., BARTOLUCCI, A. A., NADIR, B. S. & KORB, L. J. (1998) Ten-year disease free survival after transperineal sonography-guided iodine-125 brachytherapy with or without 45-gray external beam irradiation in the treatment of patients with clinically localized, low to high Gleason grade prostate carcinoma. *Cancer*, 83, 989-1001.
- (39) PORTER, C. R., GALLINA, A., KODAMA, K., GIBBONS, R. P., CORREA, R., JR., PERROTTE, P. & KARAKIEWICZ, P. I. (2007) Prostate cancer-specific survival in men treated with hormonal therapy after failure of radical prostatectomy. *Eur Urol*, 52, 446-52.
- (40) MERRILL, R. M., WEED, D. L. & FEUER, E. J. (1997) The lifetime risk of developing prostate cancer in white and black men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 6, 763-8.
- (41) GRUBB, R.L., KIBEL, A.S (2010): High-risk localized prostate cancer: role of radical prostatectomy. *Curr Opin Urol*, 20(3), 204-10
- (42) RAUSCH, S., SCHMITT, C., KAELBLE, T. (2012): Radical prostatectomy: an option for high-risk prostate cancer. *Adv. Urol*, 2012:410246. Epup 2011 Oct 2011.
- (43) YOSSEPOWITCH, O., EGGNER, S. E., BIANCO, F. J., JR., CARVER, B. S., SERIO, A., SCARDINO, P. T. & EASTHAM, J. A. (2007) Radical prostatectomy for clinically localized, high risk prostate cancer: critical analysis of risk assessment methods. *J Urol*, 178, 493-9; discussion 499.
- (44) SPAHN, M., JONIAU, S., GONTERO, P., FIEUWS, S., MARCHIORO, G., TOMBAL, B., KNEITZ, B., HSU, C. Y., VAN DER EECKT, K., BADER, P., FROHNEBERG, D., TIZZANI, A. & VAN POPPEL, H. Outcome predictors of radical prostatectomy in patients with prostate-specific antigen greater than 20 ng/ml: a European multi-institutional study of 712 patients. *Eur Urol*, 58, 1-7; discussion 10-1.
- (45) XU, J., MEYERS, D., FREIJE, D., ISAACS, S., WILEY, K., NUSSKERN, D., EWING, C., WILKENS, E., BUJNOVSZKY, P., BOVA, G. S., WALSH, P., ISAACS, W., SCHLEUTKER, J., MATIKAINEN, M., TAMMELA, T., VISAKORPI, T., KALLIONIEMI, O. P., BERRY, R., SCHAID, D., FRENCH, A., MCDONNELL, S., SCHROEDER, J., BLUTE, M., THIBODEAU, S., GRONBERG, H., EMANUELSSON, M., DAMBER, J. E., BERGH, A., JONSSON, B. A., SMITH, J., BAILEY-WILSON, J., CARPTEN, J., STEPHAN, D., GILLANDERS, E., AMUNDSON, I., KAINU, T., FREAS-LUTZ, D.,

- BAFFOE-BONNIE, A., VAN AUCKEN, A., SOOD, R., COLLINS, F., BROWNSTEIN, M. & TRENT, J. (1998) Evidence for a prostate cancer susceptibility locus on the X chromosome. *Nat Genet*, 20, 175-9.
- (46) ISAACS, S. D., KIEMENEY, L. A., BAFFOE-BONNIE, A., BEATY, T. H. & WALSH, P. C. (1995) Risk of cancer in relatives of prostate cancer probands. *J Natl Cancer Inst*, 87, 991-6.
- (47) SCHAID, D. J. & CHANG, B. L. (2005) Description of the International Consortium For Prostate Cancer Genetics, and failure to replicate linkage of hereditary prostate cancer to 20q13. *Prostate*, 63, 276-90.
- (48) DONG, X., WANG, L., TANIGUCHI, K., WANG, X., CUNNINGHAM, J. M., MCDONNELL, S. K., QIAN, C., MARKS, A. F., SLAGER, S. L., PETERSON, B. J., SMITH, D. I., CHEVILLE, J. C., BLUTE, M. L., JACOBSEN, S. J., SCHAID, D. J., TINDALL, D. J., THIBODEAU, S. N. & LIU, W. (2003) Mutations in CHEK2 associated with prostate cancer risk. *Am J Hum Genet*, 72, 270-80.
- (49) CYBULSKI, C., GORSKI, B., DEBNIAK, T., GLINIEWICZ, B., MIERZEJEWSKI, M., MASOJC, B., JAKUBOWSKA, A., MATYJASIK, J., ZLOWOCKA, E., SIKORSKI, A., NAROD, S. A. & LUBINSKI, J. (2004) NBS1 is a prostate cancer susceptibility gene. *Cancer Res*, 64, 1215-9.
- (50) KNUDSON, A. G., JR. (1984) Genetic predisposition to cancer. *Cancer Detect Prev*, 7, 1-8.
- (51) BOOKSTEIN, R. (2001) „Tumour suppressor genes in prostate cancer.“ In: Totowa NJ, (ed.) Prostate cancer: biology genetics and the new therapeutics. Humana Press. 61-93,
- (52) TOYOSHIMA, H. & HUNTER, T. (1994) p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell*, 78, 67-74.
- (53) FUJITA, N., SATO, S., KATAYAMA, K. & TSURUO, T. (2002) Akt-dependent phosphorylation of p27Kip1 promotes binding to 14-3-3 and cytoplasmic localization. *J Biol Chem*, 277, 28706-13.
- (54) CHANG, B. L., ZHENG, S. L., ISAACS, S. D., WILEY, K. E., TURNER, A., LI, G., WALSH, P. C., MEYERS, D. A., ISAACS, W. B. & XU, J. (2004) A polymorphism in the CDKN1B gene is associated with increased risk of hereditary prostate cancer. *Cancer Res*, 64, 1997-9.
- (55) XU, J., LANGEFELD, C. D., ZHENG, S. L., GILLANDERS, E. M., CHANG, B. L., ISAACS, S. D., WILLIAMS, A. H., WILEY, K. E., DIMITROV, L., MEYERS, D. A., WALSH, P. C., TRENT, J. M. & ISAACS, W. B. (2004) Interaction effect of PTEN and CDKN1B chromosomal regions on prostate cancer linkage. *Hum Genet*, 115, 255-62.
- (56) OLAYIOYE, M. A. (2001) Update on HER-2 as a target for cancer therapy: intracellular signaling pathways of ErbB2/HER-2 and family members. *Breast Cancer Res*, 3, 385-9.
- (57) BARON, A. T., WILKEN, J. A., HAGGSTROM, D. E., GOODRICH, S. T. & MAIHLE, N. J. (2009) Clinical implementation of soluble EGFR (sEGFR) as a theragnostic serum biomarker of breast, lung and ovarian cancer. *IDrugs*, 12, 302-8.
- (58) BASELGA, J. & SWAIN, S. M. (2009) Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3. *Nat Rev Cancer*, 9, 463-75.
- (59) EDWARDS, J., MUKHERJEE, R., MUNRO, A. F., WELLS, A. C., ALMUSHATAT, A. & BARTLETT, J. M. (2004) HER2 and COX2 expression in human prostate cancer. *Eur J Cancer*, 40, 50-5.
- (60) ULLEN, A., LENNARTSSON, L., HARMENBERG, U., LENNERNAS, B., MAJUMDER, K., HOLMBERG, A. R., NILSSON, S. & ELMBERGER, G. P. (2005) Prostate cancer cell lines lack amplification: overexpression of HER2. *Acta Oncol*, 44, 490-5.
- (61) YARDEN, Y., KUANG, W. J., YANG-FENG, T., COUSSENS, L., MUNEMITSU, S., DULL, T. J., CHEN, E., SCHLESSINGER, J., FRANCKE, U. & ULLRICH, A. (1987) Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *EMBO J*, 6, 3341-51.

- (62) CHO, W. (2007) OncomiRs: the discovery and progress of microRNAs in cancers. *Mol Cancer Res*, 25, 1.
- (63) LEE, R. C., FEINBAUM, R. L. & AMBROS, V. (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75, 843-54.
- (64) PASQUINELLI, A. E., REINHART, B. J., SLACK, F., MARTINDALE, M. Q., KURODA, M. I., MALLER, B., HAYWARD, D. C., BALL, E. E., DEGNAN, B., MULLER, P., SPRING, J., SRINIVASAN, A., FISHMAN, M., FINNERTY, J., CORBO, J., LEVINE, M., LEAHY, P., DAVIDSON, E. & RUVKUN, G. (2000) Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature*, 408, 86-9.
- (65) AMBROS, V. (2001) microRNAs: tiny regulators with great potential. *Cell*, 107, 823-6.
- (66) GRIFFITH-JONES S, S. H., DONGEN SV, ENRIGHT AJ. (2008) miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res*, 36, 154-158.
- (67) BENTWICH, I., AVNIEL, A., KAROV, Y., AHARONOV, R., GILAD, S., BARAD, O., BARZILAI, A., EINAT, P., EINAV, U., MEIRI, E., SHARON, E., SPECTOR, Y. & BENTWICH, Z. (2005) Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nat Genet*, 37, 766-70.
- (68) BEREZIKOV, E., GURYEV, V., VAN DE BELT, J., WIENHOLDS, E., PLASTERK, R. H. & CUPPEN, E. (2005) Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes. *Cell*, 120, 21-4.
- (69) LEE, Y., KIM, M., HAN, J., YEOM, K. H., LEE, S., BAEK, S. H. & KIM, V. N. (2004) MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*, 23, 4051-60.
- (70) HAN, J., LEE, Y., YEOM, K. H., KIM, Y. K., JIN, H. & KIM, V. N. (2004) The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev*, 18, 3016-27.
- (71) DENLI, A. M., TOPS, B. B., PLASTERK, R. H., KETTING, R. F. & HANNON, G. J. (2004) Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*, 432, 231-5.
- (72) YI, R., QIN, Y., MACARA, I. G. & CULLEN, B. R. (2003) Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev*, 17, 3011-6.
- (73) MOORE, M. S. & BLOBEL, G. (1993) The GTP-binding protein Ran/TC4 is required for protein import into the nucleus. *Nature*, 365, 661-3.
- (74) LUND, E., GUTTINGER, S., CALADO, A., DAHLBERG, J. E. & KUTAY, U. (2004) Nuclear export of microRNA precursors. *Science*, 303, 95-8.
- (75) BERNSTEIN, E., CAUDY, A. A., HAMMOND, S. M. & HANNON, G. J. (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409, 363-6.
- (76) HAMMOND, S. M. (2005) Dicing and slicing: the core machinery of the RNA interference pathway. *FEBS Lett*, 579, 5822-9.
- (77) HAMMOND, S. M., BERNSTEIN, E., BEACH, D. & HANNON, G. J. (2000) An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, 404, 293-6.
- (78) FILIPOWICZ, W., JASKIEWICZ, L., KOLB, F. A. & PILLAI, R. S. (2005) Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. *Curr Opin Struct Biol*, 15, 331-41.
- (79) SCHWARZ, D. S., HUTVAGNER, G., DU, T., XU, Z., ARONIN, N. & ZAMORE, P. D. (2003) Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*, 115, 199-208.
- (80) CHEN, C., RIDZON, D. A., BROOMER, A. J., ZHOU, Z., LEE, D. H., NGUYEN, J. T., BARBISIN, M., XU, N. L., MAHUVAKAR, V. R., ANDERSEN, M. R., LAO, K. Q., LIVAK, K. J. & GUEGLER, K. J. (2005) Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 33, e179.

- (81) VAN ROOIJ, E. & OLSON, E. N. (2007) MicroRNAs: powerful new regulators of heart disease and provocative therapeutic targets. *J Clin Invest*, 117, 2369-76.
- (82) LUKIW, W. J., ZHAO, Y. & CUI, J. G. (2008) An NF-kappaB-sensitive micro RNA-146a-mediated inflammatory circuit in Alzheimer disease and in stressed human brain cells. *J Biol Chem*, 283, 31315-22.
- (83) WANG, G., VAN DER WALT, J. M., MAYHEW, G., LI, Y. J., ZUCHNER, S., SCOTT, W. K., MARTIN, E. R. & VANCE, J. M. (2008) Variation in the miRNA-433 binding site of FGF20 confers risk for Parkinson disease by overexpression of alpha-synuclein. *Am J Hum Genet*, 82, 283-9.
- (84) CROCE, C. M. (2008) Oncogenes and cancer. *N Engl J Med*, 358, 502-11.
- (85) MELTZER, P. S. (2005) Cancer genomics: small RNAs with big impacts. *Nature*, 435, 745-6.
- (86) CALIN, G. A., DUMITRU, C. D., SHIMIZU, M., BICHI, R., ZUPO, S., NOCH, E., ALDLER, H., RATTAN, S., KEATING, M., RAI, K., RASSENTI, L., KIPPS, T., NEGRINI, M., BULLRICH, F. & CROCE, C. M. (2002) 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*, 99, 15524-9.
- (87) SAWERA, M., GORODKIN, J., CIRERA, S. & FREDHOLM, M. (2005) Mapping and expression studies of the mir17-92 cluster on pig chromosome 11. *Mamm Genome*, 16, 594-8.
- (88) GALARDI, S., MERCATELLI, N., GIORDA, E., MASSALINI, S., FRAJESE, G. V., CIAFRE, S. A. & FARACE, M. G. (2007) miR-221 and miR-222 expression affects the proliferation potential of human prostate carcinoma cell lines by targeting p27Kip1. *J Biol Chem*, 282, 23716-24.
- (89) MERCATELLI, N., COPPOLA, V., BONCI, D., MIELE, F., COSTANTINI, A., GUADAGNOLI, M., BONANNO, E., MUTO, G., FRAJESE, G. V., DE MARIA, R., SPAGNOLI, L. G., FARACE, M. G. & CIAFRE, S. A. (2008) The inhibition of the highly expressed miR-221 and miR-222 impairs the growth of prostate carcinoma xenografts in mice. *PLoS One*, 3, e4029.
- (90) SPAHN, M., KNEITZ, S., SCHOLZ, C. J., NICO, S., RUDIGER, T., STROBEL, P., RIEDMILLER, H. & KNEITZ, B. (2009) Expression of microRNA-221 is progressively reduced in aggressive prostate cancer and metastasis and predicts clinical recurrence. *Int J Cancer*.
- (91) GANDELLINI, P., FOLINI, M., LONGONI, N., PENNATI, M., BINDA, M., COLECCHIA, M., SALVIONI, R., SUPINO, R., MORETTI, R., LIMONTA, P., VALDAGNI, R., DAIDONE, M. G. & ZAFFARONI, N. (2009) miR-205 Exerts tumor-suppressive functions in human prostate through down-regulation of protein kinase Cepsilon. *Cancer Res*, 69, 2287-95.
- (92) LAXMAN, B., MORRIS, D. S., YU, J., SIDDIQUI, J., CAO, J., MEHRA, R., LONIGRO, R. J., TSODIKOV, A., WEI, J. T., TOMLINS, S. A. & CHINNAIYAN, A. M. (2008) A first-generation multiplex biomarker analysis of urine for the early detection of prostate cancer. *Cancer Res*, 68, 645-9.
- (93) SCHAEFER, A., JUNG, M., MOLLENKOPF, H. J., WAGNER, I., STEPHAN, C., JENTZMIK, F., MILLER, K., LEIN, M., KRISTIANSEN, G. & JUNG, K. Diagnostic and prognostic implications of microRNA profiling in prostate carcinoma. *Int J Cancer*, 126, 1166-76.
- (94) MISHRA, P. J. & BERTINO, J. R. (2009) MicroRNA polymorphisms: the future of pharmacogenomics, molecular epidemiology and individualized medicine. *Pharmacogenomics*, 10, 399-416.
- (95) ROSSI, J. J. (2009) New hope for a microRNA therapy for liver cancer. *Cell*, 137, 990-2.
- (96) MULLIS, K., FALOONA, F., SCHARF, S., SAIKI, R., HORN, G. & ERLICH, H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 51 Pt 1, 263-73.

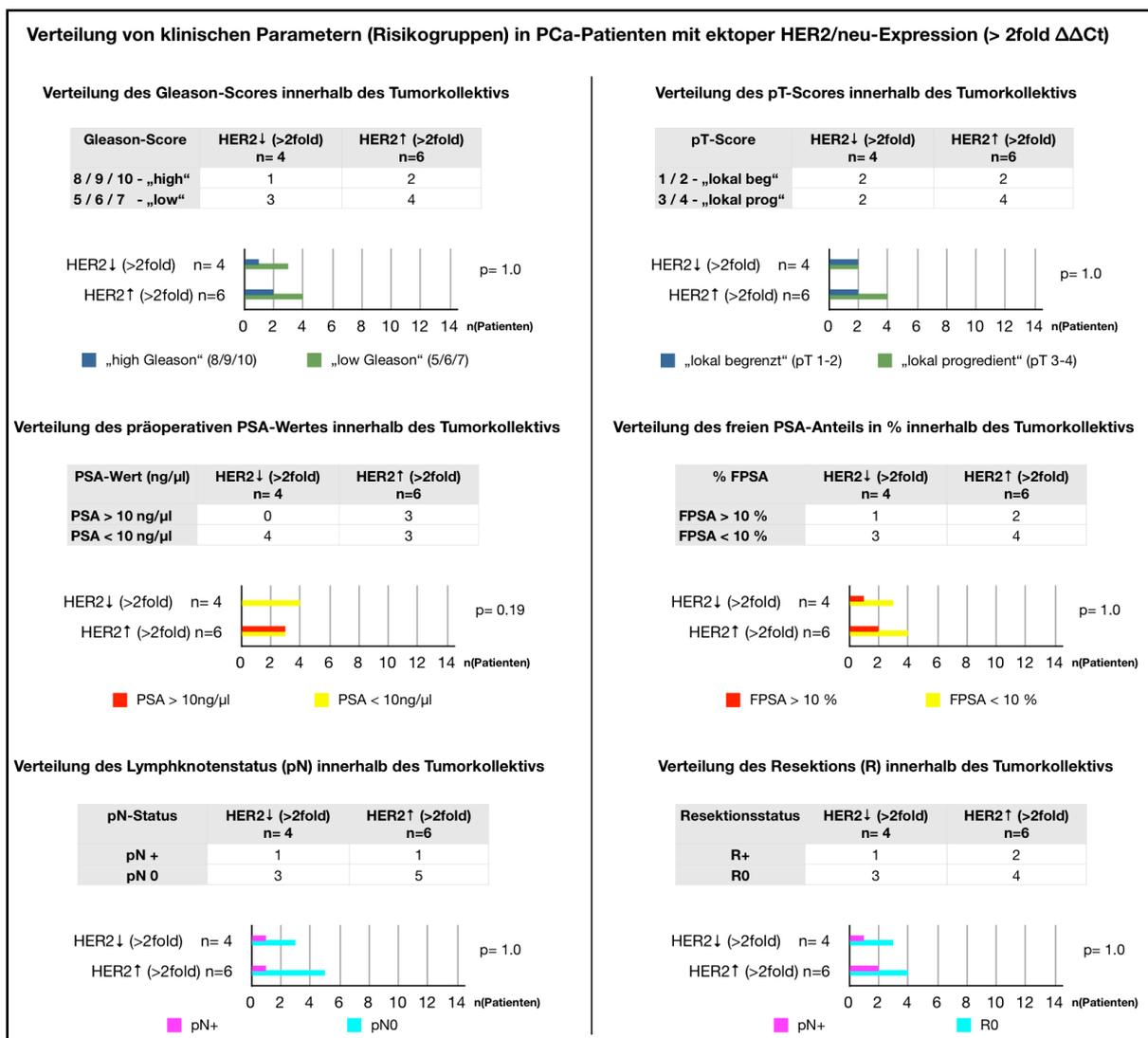
- (97) HIGUCHI, R., FOCKLER, C., DOLLINGER, G. & WATSON, R. (1993) Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)*, 11, 1026-30.
- (98) FARR, A. & ROMAN, A. (1992) A pitfall of using a second plasmid to determine transfection efficiency. *Nucleic Acids Res*, 20, 920.
- (99) WOOD, K. V., DE WET, J. R., DEWJI, N. & DELUCA, M. (1984) Synthesis of active firefly luciferase by in vitro translation of RNA obtained from adult lanterns. *Biochem Biophys Res Commun*, 124, 592-6.
- (100) MATTHEWS, J. C., HORI, K. & CORMIER, M. J. (1977) Purification and properties of Renilla reniformis luciferase. *Biochemistry*, 16, 85-91.
- (101) LORENZ, W. W., MCCANN, R. O., LONGIARU, M. & CORMIER, M. J. (1991) Isolation and expression of a cDNA encoding Renilla reniformis luciferase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 4438-42.
- (102) R DEVELOPMENT CORE TEAM (2009). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL: <http://www.R-project.org>
- (103) TERRY THERNEAU AND ORIGINAL R PORT BY THOMAS LUMLEY (2009). survival: Survival analysis, including penalised likelihood. R package version 2.35-7. URL: <http://CRAN.R-project.org/package=survival>
- (104) ADRIAN RAFTERY, JENNIFER HOETING, CHRIS VOLINSKY, IAN PAINTER AND KA YEE YEUNG (2009). BMA: Bayesian Model Averaging. R package version 3.12. URL: <http://CRAN.R-project.org/package=BMA>
- (105) WEILIANG QIU, JORGE CHAVARRO, ROSS LAZARUS, BERNARD ROSNER AND JING MA. (2009). powerSurvEpi: Power and sample size calculation for survival analysis of epidemiological studies. R package version 0.0.5. URL: <http://CRAN.R-project.org/package=powerSurvEpi>
- (106) VINCE CAREY AND HENNING REDESTIG FOR C++ LANGUAGE ENHANCEMENTS (). ROC: utilities for ROC, with uarray focus. R package version 1.18.0. URL: <http://www.bioconductor.org>
- (107) CALIN, G. A. & CROCE, C. M. (2006) MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer*, 6, 857-66.
- (108) MARKOU, A., TSAROUCHEA, E. G., KAKLAMANIS, L., FOTINO, M., GEORGOULIAS, V. & LIANIDOU, E. S. (2008) Prognostic value of mature microRNA-21 and microRNA-205 overexpression in non-small cell lung cancer by quantitative real-time RT-PCR. *Clin Chem*, 54, 1696-704.
- (109) CHILDS, G., FAZZARI, M., KUNG, G., KAWACHI, N., BRANDWEIN-GENSLER, M., MCLEMORE, M., CHEN, Q., BURK, R. D., SMITH, R. V., PRYSTOWSKY, M. B., BELBIN, T. J. & SCHLECHT, N. F. (2009) Low-level expression of microRNAs let-7d and miR-205 are prognostic markers of head and neck squamous cell carcinoma. *Am J Pathol*, 174, 736-45.
- (110) DIJCKMEESTER, W. A., WIJNHOFEN, B. P., WATSON, D. I., LEONG, M. P., MICHAEL, M. Z., MAYNE, G. C., BRIGHT, T., ASTILL, D. & HUSSEY, D. J. (2009) MicroRNA-143 and -205 expression in neosquamous esophageal epithelium following Argon plasma ablation of Barrett's esophagus. *J Gastrointest Surg*, 13, 846-53.
- (111) IORIO, M. V., CASALINI, P., PIOVAN, C., DI LEVA, G., MERLO, A., TRIULZI, T., MENARD, S., CROCE, C. M. & TAGLIABUE, E. (2009) microRNA-205 regulates HER3 in human breast cancer. *Cancer Res*, 69, 2195-200.
- (112) AMBS, S., PRUEITT, R. L., YI, M., HUDSON, R. S., HOWE, T. M., PETROCCA, F., WALLACE, T. A., LIU, C. G., VOLINIA, S., CALIN, G. A., YFANTIS, H. G., STEPHENS, R. M. & CROCE, C. M. (2008)

- Genomic profiling of microRNA and messenger RNA reveals deregulated microRNA expression in prostate cancer. *Cancer Res*, 68, 6162-70.
- (113) PORKKA, K. P., PFEIFFER, M. J., WALTERING, K. K., VESSELLA, R. L., TAMMELA, T. L. & VISAKORPI, T. (2007) MicroRNA expression profiling in prostate cancer. *Cancer Res*, 67, 6130-5.
- (114) SCHAEFER, A., JUNG, M., MILLER, K., LEIN, M., KRISTIANSEN, G., ERBERSDOBLER, A. & JUNG, K. Suitable reference genes for relative quantification of miRNA expression in prostate cancer. *Exp Mol Med*, 42, 749-58.
- (115) OZEN, M., CREIGHTON, C. J., OZDEMIR, M. & ITTMANN, M. (2008) Widespread deregulation of microRNA expression in human prostate cancer. *Oncogene*, 27, 1788-93.
- (116) HE, H., JAZDZEWSKI, K., LI, W., LIYANARACHCHI, S., NAGY, R., VOLINIA, S., CALIN, G. A., LIU, C. G., FRANSSILA, K., SUSTER, S., KLOOS, R. T., CROCE, C. M. & DE LA CHAPELLE, A. (2005) The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102, 19075-80.
- (117) TAKAMIZAWA, J., KONISHI, H., YANAGISAWA, K., TOMIDA, S., OSADA, H., ENDOH, H., HARANO, T., YATABE, Y., NAGINO, M., NIMURA, Y., MITSUDOMI, T. & TAKAHASHI, T. (2004) Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res*, 64, 3753-6.
- (118) IORIO, M. V., FERRACIN, M., LIU, C. G., VERONESE, A., SPIZZO, R., SABBIONI, S., MAGRI, E., PEDRIALI, M., FABBRI, M., CAMPIGLIO, M., MENARD, S., PALAZZO, J. P., ROSENBERG, A., MUSIANI, P., VOLINIA, S., NENCI, I., CALIN, G. A., QUERZOLI, P., NEGRINI, M. & CROCE, C. M. (2005) MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res*, 65, 7065-70.
- (119) LEE, E. J., GUSEV, Y., JIANG, J., NUOVO, G. J., LERNER, M. R., FRANKEL, W. L., MORGAN, D. L., POSTIER, R. G., BRACKETT, D. J. & SCHMITTGEN, T. D. (2007) Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer. *Int J Cancer*, 120, 1046-54.
- (120) CIAFRE, S. A., GALARDI, S., MANGIOLA, A., FERRACIN, M., LIU, C. G., SABATINO, G., NEGRINI, M., MAIRA, G., CROCE, C. M. & FARACE, M. G. (2005) Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. *Biochem Biophys Res Commun*, 334, 1351-8.
- (121) VOLINIA, S., CALIN, G. A., LIU, C. G., AMBS, S., CIMMINO, A., PETROCCA, F., VISIONE, R., IORIO, M., ROLDO, C., FERRACIN, M., PRUEITT, R. L., YANAIHARA, N., LANZA, G., SCARPA, A., VECCHIONE, A., NEGRINI, M., HARRIS, C. C. & CROCE, C. M. (2006) A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103, 2257-61.
- (122) BAEK, D., VILLEN, J., SHIN, C., CAMARGO, F. D., GYGI, S. P. & BARTEL, D. P. (2008) The impact of microRNAs on protein output. *Nature*, 455, 64-71.
- (123) WU, H., ZHU, S. & MO, Y. Y. (2009) Suppression of cell growth and invasion by miR-205 in breast cancer. *Cell Res*, 19, 439-48.
- (124) WU, D., FOREMAN, T. L., GREGORY, C. W., MCJILTON, M. A., WESCOTT, G. G., FORD, O. H., ALVEY, R. F., MOHLER, J. L. & TERRIAN, D. M. (2002) Protein kinase cepsilon has the potential to advance the recurrence of human prostate cancer. *Cancer Res*, 62, 2423-9.
- (125) VERNIMMEN, D., BEGON, D., SALVADOR, C., GOFFLOT, S., GROOTECLAES, M. & WINKLER, R. (2003) Identification of HTF (HER2 transcription factor) as an AP-2 (activator protein-2) transcription factor and contribution of the HTF binding site to ERBB2 gene overexpression. *Biochem J*, 370, 323-9.

- (126) ISHARWAL, S., MILLER, M. C., EPSTEIN, J. I., MANGOLD, L. A., HUMPHREYS, E., PARTIN, A. W. & VELTRI, R. W. (2008) Prognostic value of Her-2/neu and DNA index for progression, metastasis and prostate cancer-specific death in men with long-term follow-up after radical prostatectomy. *Int J Cancer*, 123, 2636-43.
- (127) MAJID, S., DAR, A. A., SAINI, S., YAMAMURA, S., HIRATA, H., TANAKA, Y., DENG, G. & DAHIYA, R. MicroRNA-205-directed transcriptional activation of tumor suppressor genes in prostate cancer. *Cancer*, 116, 5637-49.
- (128) QI, L., ROBINSON, W. A., BRADY, B. M. & GLODE, L. M. (2003) Migration and invasion of human prostate cancer cells is related to expression of VEGF and its receptors. *Anticancer Res*, 23, 3917-22.
- (129) ANAI, S., SAKAMOTO, N., SAKAI, Y., TANAKA, M., PORVASNIK, S., URBANEK, C., CAO, W., GOODISON, S. & ROSSER, C. J. (2009) Dual targeting of Bcl-2 and VEGF: A potential strategy to improve therapy for prostate cancer. *Urol Oncol*.
- (130) SCHRODER, F. H. (2009) PSA screening--a review of recent studies. *Eur J Cancer*, 45 Suppl 1, 402-4.
- (131) MITCHELL, P. S., PARKIN, R. K., KROH, E. M., FRITZ, B. R., WYMAN, S. K., POGOSOVA-AGADJANYAN, E. L., PETERSON, A., NOTEBOOM, J., O'BRIAN, K. C., ALLEN, A., LIN, D. W., URBAN, N., DRESCHER, C. W., KNUDSEN, B. S., STIREWALT, D. L., GENTLEMAN, R., VESSELLA, R. L., NELSON, P. S., MARTIN, D. B. & TEWARI, M. (2008) Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 10513-8.
- (132) VAN GILS, M. P., HESSELS, D., VAN HOOIJ, O., JANNINK, S. A., PEELEN, W. P., HANSSSEN, S. L., WITJES, J. A., CORNEL, E. B., KARTHAUS, H. F., SMITS, G. A., DIJKMAN, G. A., MULDER, P. F. & SCHALKEN, J. A. (2007) The time-resolved fluorescence-based PCA3 test on urinary sediments after digital rectal examination; a Dutch multicenter validation of the diagnostic performance. *Clin Cancer Res*, 13, 939-43.
- (133) SOKOLL, L. J., ELLIS, W., LANGE, P., NOTEBOOM, J., ELLIOTT, D. J., DERAS, I. L., BLASE, A., KOO, S., SARNO, M., RITTENHOUSE, H., GROSKOPF, J. & VESSELLA, R. L. (2008) A multicenter evaluation of the PCA3 molecular urine test: pre-analytical effects, analytical performance, and diagnostic accuracy. *Clin Chim Acta*, 389, 1-6.
- (134) LUJAMBIO, A., PORTELA, A., LIZ, J., MELO, S. A., ROSSI, S., SPIZZO, R., CROCE, C. M., CALIN, G. A. & ESTELLER, M. CpG island hypermethylation-associated silencing of non-coding RNAs transcribed from ultraconserved regions in human cancer. *Oncogene*, 29, 6390-401.
- (135) KUNEJ, T., GODNIC, I., FERDIN, J., HORVAT, S., DOVC, P. & CALIN, G. A. Epigenetic regulation of microRNAs in cancer: An integrated review of literature. *Mutat Res*.
- (136) PANG, Y., YOUNG, C. Y. & YUAN, H. MicroRNAs and prostate cancer. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 42, 363-9.
- (137) CALIN, G. A. & CROCE, C. M. (2006) MicroRNAs and chromosomal abnormalities in cancer cells. *Oncogene*, 25, 6202-10.
- (138) ZHAO, Y. & SRIVASTAVA, D. (2007) A developmental view of microRNA function. *Trends Biochem Sci*, 32, 189-97.
- (139) MARTINEZ-SANCHEZ, A. & GEBAUER, F. Regulation of p27(kip1) mRNA expression by microRNAs. *Prog Mol Subcell Biol*, 50, 59-70.
- (140) LE SAGE, C., NAGEL, R., EGAN, D. A., SCHRIER, M., MESMAN, E., MANGIOLA, A., ANILE, C., MAIRA, G., MERCATELLI, N., CIAFRE, S. A., FARACE, M. G. & AGAMI, R. (2007) Regulation of

- the p27(Kip1) tumor suppressor by miR-221 and miR-222 promotes cancer cell proliferation. *EMBO J*, 26, 3699-708.
- (141) VISIONE, R., RUSSO, L., PALLANTE, P., DE MARTINO, I., FERRARO, A., LEONE, V., BORBONE, E., PETROCCA, F., ALDER, H., CROCE, C. M. & FUSCO, A. (2007) MicroRNAs (miR)-221 and miR-222, both overexpressed in human thyroid papillary carcinomas, regulate p27Kip1 protein levels and cell cycle. *Endocr Relat Cancer*, 14, 791-8.
- (142) LORIMER, I. A. (2009) Regulation of p27Kip1 by miRNA 221/222 in glioblastoma. *Cell Cycle*, 8, 2685.
- (143) ZHANG, C., KANG, C., YOU, Y., PU, P., YANG, W., ZHAO, P., WANG, G., ZHANG, A., JIA, Z., HAN, L. & JIANG, H. (2009) Co-suppression of miR-221/222 cluster suppresses human glioma cell growth by targeting p27kip1 in vitro and in vivo. *Int J Oncol*, 34, 1653-60.
- (144) GRAMANTIERI, L., FORNARI, F., FERRACIN, M., VERONESE, A., SABBIONI, S., CALIN, G. A., GRAZI, G. L., CROCE, C. M., BOLONDI, L. & NEGRINI, M. (2009) MicroRNA-221 targets Bmf in hepatocellular carcinoma and correlates with tumor multifocality. *Clin Cancer Res*, 15, 5073-81.
- (145) FORNARI, F., GRAMANTIERI, L., FERRACIN, M., VERONESE, A., SABBIONI, S., CALIN, G. A., GRAZI, G. L., GIOVANNINI, C., CROCE, C. M., BOLONDI, L. & NEGRINI, M. (2008) MiR-221 controls CDKN1C/p57 and CDKN1B/p27 expression in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, 27, 5651-61.
- (146) SUN, T., WANG, Q., BALK, S., BROWN, M., LEE, G. S. & KANTOFF, P. (2009) The role of microRNA-221 and microRNA-222 in androgen-independent prostate cancer cell lines. *Cancer Res*, 69, 3356-63.
- (147) FELLI, N., FONTANA, L., PELOSI, E., BOTTA, R., BONCI, D., FACCHIANO, F., LIUZZI, F., LULLI, V., MORSILLI, O., SANTORO, S., VALTIERI, M., CALIN, G. A., LIU, C. G., SORRENTINO, A., CROCE, C. M. & PESCHLE, C. (2005) MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 18081-6.
- (148) ZELLWEGER, T., NINCK, C., BLOCH, M., MIRLACHER, M., KOIVISTO, P. A., HELIN, H. J., MIHATSCH, M. J., GASSER, T. C. & BUBENDORF, L. (2005) Expression patterns of potential therapeutic targets in prostate cancer. *Int J Cancer*, 113, 619-28.
- (149) DAHUT, W. L., SCRIPTURE, C., POSADAS, E., JAIN, L., GULLEY, J. L., ARLEN, P. M., WRIGHT, J. J., YU, Y., CAO, L., STEINBERG, S. M., ARAGON-CHING, J. B., VENITZ, J., JONES, E., CHEN, C. C. & FIGG, W. D. (2008) A phase II clinical trial of sorafenib in androgen-independent prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 14, 209-14.
- (150) DI LORENZO, G., AUTORINO, R., D'ARMIENTO, F. P., MIGNOGNA, C., DE LAURENTIIS, M., DE SIO, M., D'ARMIENTO, M., DAMIANO, R., VECCHIO, G. & DE PLACIDO, S. (2004) Expression of proto-oncogene c-kit in high risk prostate cancer. *Eur J Surg Oncol*, 30, 987-92.
- (151) WIESNER, C., NABHA, S. M., DOS SANTOS, E. B., YAMAMOTO, H., MENG, H., MELCHIOR, S. W., BITTINGER, F., THUROFF, J. W., VESSELLA, R. L., CHER, M. L. & BONFIL, R. D. (2008) C-kit and its ligand stem cell factor: potential contribution to prostate cancer bone metastasis. *Neoplasia*, 10, 996-1003.

## 8 APPENDIX



**Supp. Abb. 1:** Darstellung der Verteilung von klinischen Parametern (unterteilt in Risikogruppen, siehe Tabelle 6) in PCa-Patienten mit aberranter HER2-Expression. Als Grundlage der Gruppeneinteilung diente die HER2-Expression in 16 primären PCa. Die Berechnung der relativen Expression ist in Kapitel 3.2.12.2 beschrieben. 10 dieser Tumoren wiesen eine aberrante miR-205-Expression größer als den Faktor 2 auf, davon 4 Tumoren mit niedriger HER2-Expression (Gruppe HER2 ↓) und 6 Tumoren mit HER2-Überexpression (Gruppe HER2 ↑). Die Ordinate unterteilt die zwei verschieden exprimierenden Gruppen (HER2↑ und ↓) mit Nennung der Zahl der zugehörigen Patienten. Die Balken der Abszisse beschreiben die Anzahl der Patienten, die das jeweils vorgestellte klinische Merkmal (einzusehen in der jeweiligen Legende) aufweisen. Signifikanzen im student's t-Test wurden mit \*\* ( $p < 0.01$ ) und \* ( $p < 0.05$ ) dargestellt. Die p-Werte des Fisher's exact-test wurden rechts neben den jeweiligen Diagrammen notiert.

## **9 DANKSAGUNG**

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

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Univ-Prof. Dr. med. Hubertus Riedmiller insbesondere für die Überlassung des Themas, die jeweils schnellen Korrekturen der vorgelegten Manuskripte und seine Verbesserungsvorschläge.

Besonderer Dank gilt weiterhin meinem Betreuer, Dr. med. vet. Burkhard Kneitz, dem von der ersten Stunde an keine Mühe und keine Erläuterung noch so komplexer Fragestellungen zu viel gewesen ist und der mir unermüdlich sowohl bei der Interpretation als auch bei der Niederschrift der experimentellen Ergebnisse stets mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat. Ein weiterer besonderer Dank gilt dem Betreuer der translationalen PCa-Forschungsgruppe, Privatdozent Dr. med. Martin Spahn, der meine Manuskripte immer überdurchschnittlich schnell korrigierte, mich stets zur Fertigstellung der Arbeit ermunterte und im klinischen Bereich förderte.

Weiterhin bin ich allen denjenigen Menschen zu Dank verpflichtet, die durch den reibungslosen Ablauf des experimentellen Geschehens und die technische Unterstützung ihren Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Im besonderen sind dies die Leiterin der Micro-Array-Core-Unit des Interdisziplinären Zentrums für klinische Forschung (IZKF), Frau Dr. Susanne Kneitz und ihr Mitarbeiter Dr. Claus-Jürgen Scholz für die kompetente Hilfe bei der statistischen Umsetzung komplexer Regressions- und Überlebensmodelle.

Weiterhin bedanke ich mich bei Frau Katrin Borschert für die technische Unterstützung bei den Luciferaseassays. Frau Sabine Müller, Frau Vera Schwartz und Frau Barbara Dexler danke ich für die Einweisung und die exzellente technische Unterstützung.

Inbesondere möchte ich auf diesem offiziellen Weg meinen Eltern, denen diese Dissertation gewidmet ist, danken. Ihre Hingabe und Unterstützung für das Erreichen meiner Ziele ist und wird immer einzigartig bleiben.

## **10 LEBENSLAUF**

Der Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version dieser Arbeit nicht veröffentlicht.