

Aus dem Institut für Virologie  
Klinische Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

# **Das MicroRNA-Profil des Prostata- Karzinoms und Identifizierung von microRNA-Zielgenen**

**Dissertation**

**zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften**

**der Medizinischen Fakultät**

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2011

Vorgelegt von Jaroslaw Szczyrba

geb. am 25.03.1982 in Ruda

*„Wenige wissen, wie viel man wissen muß,  
um zu wissen, wie wenig man weiß.“*

*Heisenberg*

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2. Summary</b>	<b>2</b>
<b>3. Einleitung</b>	<b>3</b>
<b>3.1. Die Prostata</b>	<b>3</b>
<b>3.2. Erkrankungen der Prostata</b>	<b>4</b>
3.2.1. Benigne Prostatahyperplasie (BPH)	4
3.2.2. Das Prostatasarkom	5
3.2.3. Das Prostatakarzinom	6
3.2.3.1. Epidemiologie des Prostatakarzinoms	6
3.2.3.2. Pathologie und Einteilung des Prostatakarzinoms	7
3.2.3.3. Ursachen für die Entstehung von Prostatakarzinomen	9
<b>3.3. RNA-Interferenz</b>	<b>11</b>
3.3.1. microRNAs	12
3.3.2. miRNAs und Krebsentstehung	17
<b>3.4. Ausgangspunkt und Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>20</b>
<b>4. Material</b>	<b>21</b>
<b>4.1. Geräte</b>	<b>21</b>
<b>4.2. Chemikalien, Membranen, Filter</b>	<b>21</b>
<b>4.3. Puffer und Lösungen</b>	<b>23</b>
<b>4.4. Enzyme</b>	<b>29</b>
<b>4.5. Größen- und Molekulargewichtsmarker</b>	<b>29</b>
4.5.1. DNA-Größenstandard	29
4.5.2. Protein-Molekulargewichtsmarker	30
<b>4.6. Antikörper</b>	<b>31</b>
<b>4.7. Patientenmaterial</b>	<b>31</b>
<b>4.8. Zelllinien</b>	<b>33</b>
<b>4.9. Bakterienstämme</b>	<b>33</b>
<b>4.10. Nährmedien</b>	<b>34</b>
4.10.1. Bakterien	34
4.10.2. Kulturmedien für Säugerzellen	34
<b>4.11. Vektoren</b>	<b>35</b>
4.11.1. pGEM-T	35
4.11.2. pCEP4	35
4.11.3. pSG5	36
4.11.4. pSG5-HA-C1	37
4.11.5. pGEX-4T-1	37
4.11.6. pEGFP-C1	38

---

4.11.7.	pGL3-promoter .....	39
4.11.8.	pMIR-REPORT™ .....	39
4.11.9.	Volllängen-cDNA-Klone .....	40
4.11.10.	miRNA-Expressionsplasmide .....	41
4.11.11.	Reporterplasmide .....	42
<b>4.12.</b>	<b>Effektorplasmide .....</b>	<b>45</b>
<b>4.13.</b>	<b>Oligonukleotide .....</b>	<b>45</b>
<b>4.14.</b>	<b>Peptide .....</b>	<b>47</b>
<b>4.15.</b>	<b>Software .....</b>	<b>48</b>
<b>5.</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>49</b>
<b>5.1.</b>	<b>Bakterielle Zellkultur .....</b>	<b>49</b>
5.1.1.	Aufzucht und Lagerung von Bakterien .....	49
5.1.2.	Herstellung kompetenter Bakterien (CaCl <sub>2</sub> /RbCl-Methode) .....	49
5.1.3.	Transformation kompetenter Bakterien .....	50
5.1.4.	Blau-Weiß-Selektion .....	50
<b>5.2.</b>	<b>Eukaryotische Zellkultur .....</b>	<b>51</b>
5.2.1.	Kultur adhärenter Monolayer-Zellkulturen .....	51
5.2.2.	Zellzahlbestimmung mittels CASY .....	51
5.2.3.	Transfektion eukaryotischer Zellen mit Nanofectin .....	51
5.2.4.	Transfektion eukaryotischer Zellen mit Lipofectamine™ .....	52
<b>5.3.</b>	<b>DNA-Techniken .....</b>	<b>52</b>
5.3.1.	Isolierung von Plasmid-DNA .....	52
5.3.1.1.	Analytische Isolierung von Plasmid-DNA (Boiling Präparation) .....	52
5.3.1.2.	Plasmid-DNA-Präparation mittels NucleoBond™ .....	53
5.3.2.	Photometrische Konzentrationsbestimmung .....	53
5.3.3.	PCR .....	54
5.3.4.	Zielgerichtete Mutagenese .....	56
5.3.5.	Agarosegelelektrophorese .....	57
5.3.6.	NucleoSpin-Extraktion von DNA-Fragmenten .....	58
5.3.7.	Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen .....	58
5.3.8.	Dephosphorylierung von Vektor-DNA .....	59
5.3.9.	Ligation von DNA-Fragmenten .....	60
5.3.10.	Ligation von PCR-Fragmenten in pGEM®-T .....	60
<b>5.4.</b>	<b>RNA-Techniken .....</b>	<b>61</b>
5.4.1.	RNA-Isolation .....	61
5.4.2.	Northern Blot .....	61
5.4.2.1.	Herstellung des Polyacrylamidgels und Gelelektrophorese .....	62
5.4.2.2.	RNA Transfer .....	62
5.4.2.3.	Herstellung einer radioaktiv markierten Sonde .....	63
5.4.2.4.	Spezifischer Nachweis von RNA .....	64

5.4.2.5.	Strippen der Nylonmembran .....	65
5.4.3.	cDNA-Synthese.....	65
<b>5.5.</b>	<b>Quantitative Real-Time PCR.....</b>	<b>66</b>
5.5.1.	qRT-PCRs für miRNAs mit SYBRGreen .....	66
5.5.2.	qRT-PCRs für mRNAs mit Hilfe der Universal ProbeLibrary .....	67
5.5.3.	Relative Quantifizierung .....	69
<b>5.6.</b>	<b>Luciferase-Assays .....</b>	<b>69</b>
5.6.1.	Luciferase-Assay System .....	69
5.6.2.	Dual-Luciferase® Reporter Assays .....	70
<b>5.7.</b>	<b>Bestimmung der Transfektionseffizienz mittels FACS .....</b>	<b>71</b>
<b>5.8.</b>	<b>Apoptose Assay .....</b>	<b>72</b>
<b>5.9.</b>	<b>Proteintechniken .....</b>	<b>73</b>
5.9.1.	Herstellen von Sample-Buffer-Proteinextrakten aus eukaryotischen Zellen .....	73
5.9.2.	SDS-PAGE.....	74
5.9.3.	Herstellung eines SDS-Polyacrylamidgels und Gelelektrophorese.....	74
5.9.4.	Western Blot.....	75
5.9.5.	Herstellung von Antigenen für die Immunisierung von Versuchstieren .....	76
5.9.5.1.	Induktion der rekombinanten Proteinexpression in Bakterien .....	76
5.9.5.2.	Präparative Proteinaufarbeitung mittels SDS-PAGE .....	77
5.9.5.3.	Herstellung nativer Extrakte aus induzierten Bakterien .....	78
5.9.6.	Aufreinigung von Kaninchenseren .....	79
5.9.7.	Gewinnung monoklonaler Antikörper aus Versuchstieren.....	80
<b>5.10.</b>	<b>Herstellung der cDNA-Banken.....</b>	<b>80</b>
5.10.1.	Isolierung der kleinen RNA-Fraktion aus Gewebe.....	80
5.10.2.	cDNA-Synthese.....	81
<b>5.11.</b>	<b>Auswertung der Sequenzdaten .....</b>	<b>82</b>
5.11.1.	Generierung einer miRNA-Datenbank.....	82
5.11.2.	Entfernen von Adaptersequenzen und Poly(A)-Schwanz .....	82
5.11.3.	Vereinfachen der Sequenz-Banken .....	82
5.11.4.	Sequenz Vergleich.....	83
5.11.5.	Manuelle Überprüfung der Annotationen .....	83
5.11.6.	Identifizierung von ncRNAs.....	84
5.11.7.	Auswertung der analysierten Sequenzbanken .....	84
<b>6.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>85</b>
<b>6.1.</b>	<b>Fragestellung.....</b>	<b>85</b>
<b>6.2.</b>	<b>Herstellung von cDNA-Banken aus Tumor- bzw. Normalgewebe.....</b>	<b>86</b>
<b>6.3.</b>	<b>Sequenz-Analyse der hergestellten cDNA-Banken .....</b>	<b>87</b>
6.3.1.	Klassifizierung nicht-kodierender RNAs in den untersuchten cDNA-Banken.....	87
6.3.2.	Expressionsanalyse zellulärer miRNAs .....	88
6.3.2.1.	Vergleich der miRNA-Expression innerhalb der Normalgewebe-Pools.....	89

6.3.2.2.	Relative miRNA-Expression innerhalb der Prostatakarzinom-Pools .....	90
6.3.2.3.	Vergleich der miRNA-Expression zwischen Normal- und Prostatakarzinomgewebe.....	91
6.3.3.	Keine Identifizierung von potentiell neuen miRNAs .....	92
<b>6.4.</b>	<b>Validierung differentiell exprimierter miRNAs .....</b>	<b>93</b>
<b>6.5.</b>	<b>Untersuchung differentiell exprimierter miRNAs in Prostatazelllinien .....</b>	<b>98</b>
<b>6.6.</b>	<b>Identifizierung von Ziel-mRNAs differentiell exprimierter miRNAs in Prostatakarzinomen .....</b>	<b>99</b>
6.6.1.	Potentielle Zielgene differentiell exprimierter miRNAs im Prostatakarzinom .....	100
6.6.2.	Herstellung von miRNA-Expressionsvektoren.....	102
6.6.3.	Untersuchung des Einflusses verschiedener miRNAs auf die 3'UTRs von BRD2, GOLPH2, JMJD2B und TOP1 .....	103
6.6.4.	MYO6 als Target von miR-143 und miR-145.....	109
6.6.4.1.	Regulation der 3'UTR von MYO6 durch miR-143 und miR-145.....	109
6.6.4.2.	Untersuchung der MYO6-Expression in Prostatazelllinien .....	113
6.6.4.3.	Einfluss von miR-143 und miR-145 auf die endogene Proteinmenge von MYO6 in Prostatazellen .....	115
6.6.5.	SEC23A als Target von miR-200c und miR-375 .....	116
6.6.5.1.	Regulation der 3'UTR von SEC23A durch miR-200c und miR-375 .....	116
6.6.5.2.	Charakterisierung und Aufreinigung mono- und polyklonaler $\alpha$ -SEC23A Seren.....	119
6.6.5.2.1	Charakterisierung und Aufreinigung des $\alpha$ -SEC23A Kaninchenserums .....	120
6.6.5.2.2	Charakterisierung monoklonaler SEC23A Antikörper.....	122
6.6.5.3.	Analyse der SEC23A-Expression in Prostatazelllinien .....	123
6.6.5.4.	Regulation der endogene Proteinmenge von SEC23A durch miR-200c und miR-375 in unterschiedlichen Zelllinien .....	125
6.6.5.5.	Untersuchung der Apoptose bei SEC23A-Überexpression in Prostatazelllinien.....	127
6.6.6.	ZNF217 als Target von miR-24.....	129
6.6.6.1.	Einfluss von miR-24 auf die Aktivität des ZNF217-Reporterkonstrukts.....	129
6.6.6.2.	Expressionsanalyse des ZNF217-Proteins in Prostatazelllinien .....	131
6.6.6.3.	Analyse der Korrelation zwischen der mRNA von ZNF217 und miR-24 in Prostatazelllinien .....	132
6.6.6.4.	miR-24 reguliert die endogene Proteinmenge von ZNF217 in 293T Zellen .....	133
<b>7.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>135</b>
<b>7.1.</b>	<b>Auswahl der Gewebe für die Herstellung der cDNA-Banken .....</b>	<b>135</b>
<b>7.2.</b>	<b>Analyse der cDNA-Banken.....</b>	<b>136</b>
7.2.1.	Verteilung nicht-kodierender RNAs in den untersuchten Geweben .....	136
7.2.2.	Differentielle Expression zellulärer miRNAs in den untersuchten Geweben .....	137
7.2.2.1.	Expressionsunterschiede innerhalb der Normalgewebekbanken .....	137
7.2.2.2.	Unterschiede der miRNA-Expression zwischen den Prostatakarzinom-Banken .....	137
7.2.2.3.	Expressionsunterschiede der miRNAs in Prostatakarzinomen im Vergleich zum Normalgewebe .....	138
7.2.2.4.	Induzierte miRNAs im Prostatakarzinom .....	140
7.2.2.5.	Reprimierte miRNAs der Prostataumore im Vergleich zum Normalgewebe .....	142

---

7.2.3.	Vergleich dieses miRNA-Expressionsprofils mit anderen veröffentlichten miRNA-Profilen des Prostatakarzinoms .....	144
<b>7.3.</b>	<b>Identifizierung möglicher neuer miRNAs .....</b>	<b>146</b>
<b>7.4.</b>	<b>Validierung der Expression zellulärer miRNAs mittel Northern Blots.....</b>	<b>147</b>
<b>7.5.</b>	<b>Expression der deregulierten miRNAs in Zelllinien .....</b>	<b>149</b>
<b>7.6.</b>	<b>Identifizierung von Zielgenen differentiell exprimierter miRNAs in Prostatakarzinomen .....</b>	<b>150</b>
7.6.1.	miR-143 und miR-145 regulieren posttranskriptionell die Expression von MYO6.....	151
7.6.2.	SEC23A als Target von miR-200c und miR-375 .....	153
7.6.3.	Regulation der ZNF217-Proteinexpression durch miR-24.....	155
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>157</b>
<b>9.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>180</b>
9.1.	Tabellen.....	180
9.2.	Publikationen.....	186
9.3.	Danksagung.....	187
<b>10.</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>188</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau der humanen Prostata (De Marzo et al., 2007) .....	3
Abbildung 2: Schema der Biogenese und Funktion humaner miRNAs (Winter et al., 2009).....	14
Abbildung 3: Übersicht der Mechanismen der miRNA-vermittelten posttranskriptionellen Genregulation (Filipowicz, Bhattacharyya, and Sonenberg, 2008). .....	15
Abbildung 4: Mögliche Mechanismen für die Deregulation der miRNA-Expression im Prostatakarzinom (Pang et al., 2010) .....	18
Abbildung 5: 1 kb Plus DNA-Leiter (Quelle: Invitrogen) .....	29
Abbildung 6: ColorPlus Prestained Protein Ladder (Quelle: NEB) .....	30
Abbildung 7: pGEM-T Vektor der Firma Promega zur Klonierung von PCR-Produkten.....	35
Abbildung 8: pCEP4-Expressionsplasmid der Firma Invitrogen (Quelle: Invitrogen) .....	36
Abbildung 9: pSG5-Expressionsplasmid der Firma Stratagene (Quelle: Stratagene) .....	37
Abbildung 10: Vektorkarte von pGEX-4T-1 (Quelle: GE Healthcare) .....	38
Abbildung 11: Vektorkarte von pEGFP-C1 (Quelle:Clontech) .....	38
Abbildung 12: Vektorkarte von pGL3-promoter (Quelle:Promega) .....	39
Abbildung 13: Schematische Darstellung des pMIR-REPORT™ Vektors (Ambion) .....	40
Abbildung 14: Schema des Caspase 3/7 Assays (Quelle: Promega).....	72
Abbildung 15: Qualitätskontrolle der aus den Geweben isolierten RNA und der PCR-amplifizierten cDNA (Quelle: vertis Biotechnologie AG) .....	86
Abbildung 16: Verteilung nicht-kodierender RNAs bzw. Transkripte in den Sequenz-Datenbanken der untersuchten Gewebe .....	87
Abbildung 17: Vergleich der relativen miRNA-Expression zwischen Prostatakarzinom und gesundem Prostatagewebe .....	91
Abbildung 18: Expression der miR-200c in Prostatakarzinomen im Vergleich zum korrespondierenden Normalgewebe.....	94
Abbildung 19: Expression der miR-375 im Prostatakarzinom verglichen mit Kontrollgewebe .....	95
Abbildung 20: Expressionsvergleich der miR-143 zwischen Prostatakarzinom- und Normalgewebe..	95
Abbildung 21: Expression der miR-145 in Prostatakarzinomen im Vergleich zum entsprechenden Normalgewebe.....	96
Abbildung 22: Relative Expressionsänderung deregulierter miRNAs im Prostatakarzinom aus Sequenzierung und Northern Blot-Analyse .....	97
Abbildung 23: Expressionsanalyse induzierter miRNAs in Prostatazelllinien .....	98
Abbildung 24: Untersuchung reprimierter miRNAs in Prostatazelllinien .....	99
Abbildung 25: Expression klonierter miRNA-Expressionsplasmide im Northern Blot.....	103
Abbildung 26: Schematische Übersicht über die vorhergesagte Bindestelle für miR-143 in der BRD2-3'UTR .....	104
Abbildung 27: Einfluss von miRNA-143 auf die BRD2-3'UTR .....	105
Abbildung 28 : Schematische Übersicht über die vorhergesagten Bindestellen für miR-27a und miR-27b in der GOLPH2-3'UTR .....	105
Abbildung 29: Einfluss von miR-23a/27a und miR-27b auf die 3'UTR von GOLPH2.....	106

Abbildung 30: Schematische Darstellung der möglichen Bindestellen von miR-27a, miR-27b und miR-29a in der JMJD2B-3'UTR .....	107
Abbildung 31: Regulation der 3'UTR von JMJD2B durch miR-23a/27a, miR-27b und miR-29a .....	107
Abbildung 32: Schema der vorhergesagten Bindestellen für miR-23a und miR-24 innerhalb der TOP1-3'UTR .....	108
Abbildung 33: Einfluss von miR-23a/27a und miR-24 auf die 3'UTR von TOP1 .....	109
Abbildung 34: Regulation der MYO6-3'UTR durch miR-143 und miR-145 .....	110
Abbildung 35: Schematische Übersicht über die vorhergesagten Bindestellen für miR-143 und miR-145 in der MYO6-3'UTR.....	111
Abbildung 36: Identifizierung der Zielsequenz von miR-143 in der MYO6-3'UTR .....	112
Abbildung 37: Untersuchung der Bindestellen von miR-145 in der MYO6-3'UTR.....	113
Abbildung 38: Untersuchung endogener Proteinexpression von MYO6 in verschiedenen Prostatazelllinien.....	114
Abbildung 39: Einfluss von miR-143 und miR-145 auf die endogene Expression von MYO6 in LNCaP-Zellen .....	115
Abbildung 40: Einfluss von miR-200c und miR-375 auf die 3'UTR von SEC23A .....	116
Abbildung 41: Schematische Übersicht über die vorhergesagten Bindestellen für miR-200c und miR-375 in der SEC23A-3'UTR .....	117
Abbildung 42: Identifizierung der Zielsequenzen von miR-200c in der SEC23A-3'UTR.....	118
Abbildung 43: Untersuchung der Bindestelle von miR-375 in der SEC23A-3'UTR .....	119
Abbildung 44: Untersuchung der Spezifität des SEC23A-Kaninchenserums .....	120
Abbildung 45: Untersuchung des aufgereinigten anti-SEC23A-Serums.....	121
Abbildung 46: Untersuchung des monoklonalen SEC23A Antikörpers 2H4 .....	122
Abbildung 47: Nachweis der Proteinexpression von SEC23A in verschiedenen Prostatazelllinien mit verschiedenen generierten Antikörperseren .....	123
Abbildung 48: Expressionsverhältnis von SEC23A, miR-200c und miR-375 zwischen Prostatakarzinomzelllinien und Prostatafibroblasten.....	124
Abbildung 49: Reduktion von SEC23A durch miR-200c und miR-375 in 293T Zellen .....	125
Abbildung 50: Reduktion von SEC23A durch miR-200c und miR-375 in LNCaP Zellen .....	126
Abbildung 51: Reduktion von SEC23A durch miR-200c und miR-375 in DU145 Karzinomzellen .....	127
Abbildung 52: Einfluss von SEC23A auf die Apoptose in LNCaP und DU145 Prostatazelllinien .....	128
Abbildung 53: Einfluss der miR-24 auf die 3'UTR von ZNF217 .....	129
Abbildung 54: Schematische Darstellung der vorhergesagten Bindestelle von miR-24 in der ZNF217-3'UTR.....	130
Abbildung 55: Identifizierung der Bindestelle von miR-24 in der 3'UTR von ZNF217 .....	131
Abbildung 56: Analyse der Proteinexpression von ZNF217 in Prostatazelllinien .....	132
Abbildung 57: Expressionsverhältnis von miR-24 und ZNF217-mRNA zwischen DU145 und PNF-08.....	133
Abbildung 58: Regulierung der Proteinmenge von ZNF217 durch miR-24 in 293T Zellen.....	134
Abbildung 59: Ausschnitt einer Gegenüberstellung mehrerer veröffentlichter miRNA-Expressionsprofile (Coppola <i>et al.</i> , 2010).....	145

---

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Abkürzungen der Aminosäuren .....	XI
Tabelle 2: TNM-Klassifizierung des Prostatakarzinoms (UICC, 2002) .....	8
Tabelle 3: Übersicht der Gewebe, die für die cDNA-Banken-Herstellung verwendet wurden .....	31
Tabelle 4: Übersicht der zur Validierung verwendeten Gewebe .....	32
Tabelle 5: Klonierte miRNA-Expressionskonstrukte einschließlich der zur Amplifikation verwendeten Oligonukleotide .....	41
Tabelle 6: Pipettierschema eines 50 µl Standard-PCR-Ansatzes .....	55
Tabelle 7: Schema eines PCR-Standardprogramms .....	55
Tabelle 8: Reaktionsansatz zur Durchführung der zielgerichteten Mutagenese .....	56
Tabelle 9: PCR-Programm zur Durchführung der zielgerichteten Mutagenese .....	56
Tabelle 10: Auftrennungsbereich verschiedener Agarosegele .....	57
Tabelle 11: Pipettierschema zum quantitativen Nachweis von miRNAs mittels SYBRGreen I .....	67
Tabelle 12: Programm zur Amplifizierung von miRNAs mittels LightCycler .....	67
Tabelle 13: PCR-Ansatz für die Amplifikation von cDNA mittels Universal ProbeLibrary .....	68
Tabelle 14: PCR-Programm zur Amplifizierung von cDNA mit Hilfe der Universal ProbeLibrary .....	68
Tabelle 15: Komponenten für ein 7,5 %- bzw. 10 %iges Polyacrylamidgel .....	75
Tabelle 16: Übersicht über die vor der Sequenzierung addierten Adaptersequenzen .....	81
Tabelle 17: Verwendete Barcode-Sequenzen zur Identifizierung der entsprechenden cDNA-Banken..	81
Tabelle 18: Vergleich der am stärksten exprimierten miRNAs in den Normalgewebe-Banken .....	89
Tabelle 19: Vergleich der am stärksten exprimierten miRNAs in den Prostatakarzinom-Pools .....	90
Tabelle 20: Deregulierte miRNAs in Prostatakarzinomen verglichen zum Normalgewebe .....	92
Tabelle 21: miRNA-Expression in den untersuchten cDNA-Banken .....	180

---

## Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$	anti
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintri-phosphat
bp	Basenpaare
BPH	benigne Prostatahyperplasie
BRD2	<i>Bromodomain-containing protein 2</i>
BSA	bovines Serumalbumin
<i>C.elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
cDNA	complementary (komplementäre) DNA
CIP	<i>calf intestinal phosphatase</i> (alkalische Phosphatase)
Ct	cycle threshold
CTP	Cytidintri-phosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtri-phosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) Carbodiimide)
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
GOLPH2	<i>Golgi membrane protein 1</i>
GTP	Guanosintri-phosphat
h	Stunde
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	bidestilliertes Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid
JMJD2B	<i>Jumonji domain-containing protein 2B</i>
Kb	Kilobasen
kDa	Kilo-Dalton
LB	Luria Broth

---

MCS	<i>multiple cloning site</i>
min	Minute
MYO6	<i>Myosin VI</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
miRNA	microRNA
ncRNA	<i>non-coding RNA</i>
NTP	Nukleosidtriphosphate
Oligo	Oligonukleotid
ORF	<i>open reading frame</i> (offener Leserahmen)
PCR	Polymerasekettenreaktion
piRNA	<i>PIWI-interacting RNA</i>
pre-miRNA	<i>precursor microRNA</i>
pri-miRNA	<i>primary microRNA</i>
qRT-PCR	quantitative Real-Time PCR
RISC	<i>RNA induced silencing complex</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
s	Sekunde
SEC23A	<i>Sec23 homolog A</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
snoRNA	<i>small nucleolar RNA</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PSA	prostataspezifisches Antigen
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TOP1	<i>Topoisomerase 1</i>
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer RNA
U	<i>Unit</i> (Einheit)
UTP	Uridintriphosphat

UTR	<i>untranslated region</i> (untranslatierte Region)
UV	ultraviolett
ü.N.	über Nacht
v/v	<i>volume per volume</i> (Volumen per Volumen)
w/v	<i>weight per volume</i> (Gewicht per Volumen)
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-galactopyranosid
ZNF217	<i>Zinc finger protein 217</i>

Tabelle 1: Abkürzungen der Aminosäuren

<b>Aminosäure</b>	<b>Dreibuchstaben-Code</b>	<b>Einbuchstaben-Code</b>
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Aspartat	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glycin	Gly	G
Glutamin	Gln	Q
Glutamat	Glu	E
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

## 1. Zusammenfassung

Das Prostatakarzinom ist bei Männern die am häufigsten diagnostizierte Krebsart, deren Ursache noch nicht vollständig aufgeklärt ist. Unter anderem wird ein Zusammenhang zwischen miRNA-Fehlregulation und der Entstehung dieser Tumorentität vermutet. MiRNAs sind kleine nichtkodierende RNAs, die posttranskriptionell die Genexpression regulieren und als Onkogene oder Tumorsuppressoren in die Krebsentstehung oder –progression involviert sind. Bereits mehrere veröffentlichte miRNA-Expressionsprofile konnten aufgrund von Diskrepanzen die Rolle von miRNAs im Prostatakarzinom nicht eindeutig belegen. Ziel dieser Arbeit war es zunächst, die Deregulation der miRNA-Expression im Prostatakarzinom mit Hilfe einer neuen Methode zu analysieren. Hierzu wurde ein miRNA-Expressionsprofil von Prostatakarzinom- und Normalgewebe mittels 454-Sequenzierung erstellt. Durch semimanuelle Sequenzanalyse konnten 33 differentiell exprimierte miRNAs bestimmt werden. Die Validierung dieser Ergebnisse erfolgte durch Northern Blots anhand von vier miRNAs in einer größeren Patientenkohorte. Im Anschluss sollte die funktionelle Analyse von Ziel-mRNAs helfen, einen direkten Einfluss fehlregulierter miRNAs auf die Entstehung und Progression dieser Tumorentität aufzudecken. So konnte das Motorprotein Myosin VI als Zielgen für miR-143 und miR-145 identifiziert werden. Durch die Reduktion beider miRNAs im Prostatakarzinom könnte die gesteigerte Expression dieses Proteins durch seine Fähigkeit, die Angiogenese zu induzieren und die Zellmigration zu steigern, die Progression des Prostatakarzinoms unterstützen. Desweiteren wurde SEC23A als Zielgen für die überexprimierten miR-200c und miR-375 identifiziert. Dieses im Prostatakarzinom reprimierte Protein steht bislang nicht im Zusammenhang mit der Krebsentstehung, kann jedoch bei Überexpression die Lebensfähigkeit von Prostatakarzinomzellen reduzieren und so aufgrund der Regulierung durch miRNAs das Tumorwachstum begünstigen. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass miR-24 die Expression des Onkogens ZNF217, welches in die Wachstumsregulation der Zelle eingreift, beeinflusst und so das Tumorwachstum induzieren kann. Somit konnte insgesamt gezeigt werden, dass im Prostatakarzinom eine veränderte miRNA-Expression vorliegt, und diese vorteilhaft für Tumorwachstum und –progression ist.

---

## 2. Summary

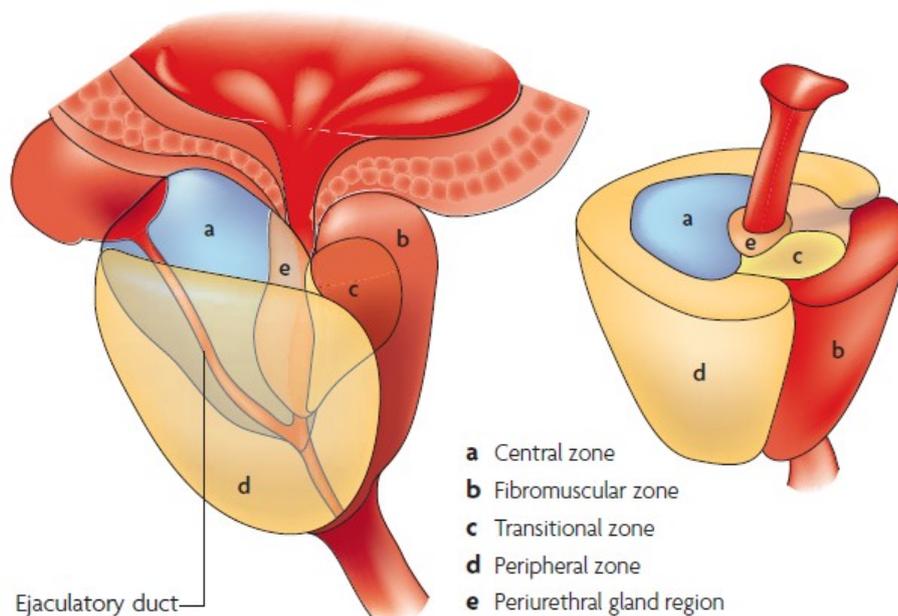
Prostate carcinoma is the most frequently diagnosed cancer type in men, whose cause hasn't been fully illuminated yet. Amongst others, a connection between the deregulation of miRNA expression and the development of this tumor entity is assumed. MiRNAs are small non-coding RNAs which posttranscriptionally regulate gene expression and which are involved in tumor development and progression as oncogenes or tumour suppressors. Several already published miRNA expression profiles couldn't clarify the role of miRNAs in prostate carcinoma because of discrepant results.

The aim of this thesis was first to analyse the deregulation of miRNA expression in prostate carcinoma with a new method. For this purpose, a miRNA expression profile of prostate carcinoma and normal prostate tissue was developed by 454 sequencing. Semi manual analysis of the sequences obtained revealed the deregulation of several miRNAs whose expression was validated by northern blotting in a larger series of tumor tissues. The subsequent functional analysis of target mRNAs should afford to elucidate a direct impact of differentially expressed miRNAs on tumour formation and progression. Here, the motor protein MYO6 was identified as a target of miRNA miR-143 and miR-145. Because of repression of both miRNAs in prostate carcinoma, the increased expression of MYO6 might enhance tumor progression by inducing angiogenesis and raising cell migration. In addition, SEC23A was identified as target of the overexpressed miR-200c and miR-375. This protein, which is reduced in prostate carcinoma, couldn't be linked to cancer development yet. However, its overexpression leads to a reduced viability of prostate tumor cells, so the regulation of SEC23A by miRNAs might promote tumor growth. Furthermore, the regulation of the oncogene ZNF217 by miR-24 could be demonstrated. This Protein interferes with regulation of cell growth and might contribute to tumor progression because of its increased amount in prostate carcinoma. In summary, the deregulation of miRNA-Expression in prostate carcinoma was verified and this might benefit tumor growth and progression.

### 3. Einleitung

#### 3.1. Die Prostata

Die Prostata oder Vorsteherdrüse ist eine akzessorische Geschlechtsdrüse, welche neben den Hoden, Nebenhoden, der Samenleiter, der Samenblasen und kleineren Drüsen zu den inneren männlichen Geschlechtsorganen gehört. Sie besitzt gewöhnlich die Größe einer Kastanie und liegt kaudal zur Harnblase, wobei sie den ersten Abschnitt der Harnleiter (Urethra) umkleidet. Die Prostata besteht aus vielen einzelnen Drüsen sowie aus glatter Muskulatur und ist von einer Bindegewebskapsel umschlossen. Insgesamt ist sie in fünf unterschiedliche Bereiche unterteilt, die in Abbildung 1 zu sehen sind. Zu unterscheiden sind die außen liegende periphere Zone und die fibromuskuläre Region sowie die sich im Inneren befindende zentrale und Transitionalzone (Übergangszone). Direkt an der Harnröhre liegt außerdem die Region, welche die periurethralen Drüsen beinhaltet.



**Abbildung 1: Schematischer Aufbau der humanen Prostata (De Marzo et al., 2007)**

Dargestellt ist der Aufbau der menschlichen Prostata mit ihren unterschiedlichen Zonen. a: zentrale Zone, b: fibromuskuläre Zone, c: Transitionalzone (Übergangszone), d: periphere Zone, e: Region mit periurethralen Drüsen. Die zentrale Zone beinhaltet zwei Spritzkanälchen, die aus Samenleiter und Samenblasenausgang gebildet werden.

Die Prostata besitzt verschiedene Funktionen, wobei die wichtigste die Produktion eines Sekrets ist, welches während der Ejakulation in die Harnröhre abgegeben wird und sich dort mit den Spermien vermischt. Diese dünnflüssige, trübe Flüssigkeit macht etwa 30 % des Ejakulatvolumens aus und enthält neben Zitronensäure, Prostaglandinen und Phosphatasen auch Spermin und die Serinprotease PSA (prostataspezifisches Antigen). Das vorhandene Spermin dient dem Schutz der Spermien-DNA und induziert die Bewegung der Spermien, wohingegen das PSA die Dünnsflüssigkeit des Ejakulats gewährleistet. Desweiteren erhöht der pH-Wert des Sekrets, welcher bei 6,4 liegt, das Überleben der Spermien im sauren Milieu der Vagina (Schiebler, 2005). Eine weitere Funktion der Prostata zusammen mit dem Blasenschließmuskel ist der Verschluss der Blase während des Samenergusses, um den Eintritt des Ejakulats in die Blase zu verhindern. Desweiteren wird in der Prostata das männliche Geschlechtshormon Testosteron in seine biologisch aktivste Form, das Dihydrotestosteron (DHT), umgewandelt, das die Entwicklung und Funktion der Prostata steuert.

### **3.2. Erkrankungen der Prostata**

#### **3.2.1. Benigne Prostatahyperplasie (BPH)**

Die gutartige Prostatavergrößerung oder benigne Prostatahyperplasie ist die häufigste gutartige Erkrankung des Mannes. Aufgrund des hormonbedingten lebenslangen Wachstums der Prostata kann bereits ab dem 30. Lebensjahr eine exponentielle Zunahme des Prostatagewebes (Prostataadenom) beginnen. Bei über 80jährigen sind etwa 90 % der Männer von BPH betroffen, jedoch entwickeln nur etwa 25-30 % aller Männer mit BPH Symptome, wie Beschwerden bei der Miktion und Harnstau. Von der gutartigen Gewebswucherung sind die Transitional- und die zentrale Zone betroffen, welche in direktem Kontakt zur Harnröhre stehen und für das Auftreten der Symptome verantwortlich sind (Miller, 2007).

Die Ursachen für die Entstehung der BPH sind noch nicht eindeutig geklärt, jedoch spielen hier viele verschiedene Faktoren eine Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass die Funktion des Enzyms 5- $\alpha$ -Reduktase in Verbindung mit BPH steht (Hayward, Rosen, and Cunha, 1997). Bei der Reduktion von Testosteron durch die 5- $\alpha$ -Reduktase entsteht Dihydrotestosteron (DHT), das für das Prostatawachstum essentiell ist. Das Sinken des Testosteron-Spiegels mit zunehmendem Alter ruft auch

---

eine steigende Sensitivität der Prostata gegenüber Östrogen hervor, dessen Konzentration im Blut altersbedingt ansteigt. Weiterhin kann eine erhöhte Expression von Wachstumsfaktoren, wie beispielsweise TGF-beta 1 oder IGF-1 zum verstärkten Prostatawachstum beitragen, indem die Apoptose gehemmt und Zellproliferation induziert wird (Timme et al., 1995). Ebenfalls im Zusammenhang mit der BPH-Entstehung stehen Entzündungen der Prostata, welche durch aktivierte T-Zellen und Makrophagen ausgelöst werden (Kramer et al., 2002). Desweiteren konnte kein Zusammenhang zwischen der benignen Prostatahyperplasie und der Entstehung eines Prostatakarzinoms bestätigt werden.

Die BPH führt nur in sehr seltenen Fällen zum Tod, wobei dieser durch ein postrenales Nierenversagen oder eine Sepsis aufgrund des Harnstaus ausgelöst wird.

### **3.2.2. Das Prostatasarkom**

Das Prostatasarkom ist ein sehr seltener, maligner Tumor, der seinen Ursprung im Bindegewebe der Prostata hat und häufig frühzeitig hämatogen metastasiert. Die Prävalenz dieses Sarkoms liegt bei 0,1-0,2 % aller malignen Prostatatumore (Nigro and MacLennan, 2005; Vadoros et al., 2008). Die Prostatasarkome lassen sich hauptsächlich in zwei Klassen unterteilen: Rhabdomyosarkome, welche im frühen Kindesalter auftreten, und bei Erwachsenen ab dem 40. Lebensjahr vorkommende Leiomyosarkome. Die Metastasierung durch ein Prostatasarkom erfolgt vornehmlich in Lunge, Leber und das Skelett. Die Ursache für diese sehr aggressive Art der Prostatatumore ist bislang unbekannt. Vermutet wird ein Zusammenhang mit dem Li-Fraumeni-Syndrom, welches durch Mutationen im p53-Gen verursacht wird. Weiterhin wird diskutiert, ob ein vorangehendes Prostatakarzinom die Bildung eines Sarkoms auslösen kann. Die durchschnittliche Prognose bei betroffenen Patienten ist verglichen mit einem Prostatakarzinom deutlich schlechter und liegt bei mehreren Monaten bis maximal fünf Jahren (Nigro and MacLennan, 2005).

### 3.2.3. Das Prostatakarzinom

#### 3.2.3.1. Epidemiologie des Prostatakarzinoms

In den letzten Jahrzehnten hat sich das Prostatakarzinom in der männlichen Bevölkerung der westlichen Welt zu einem Hauptgesundheitsproblem entwickelt (Crawford, 2003). Es ist weltweit die am häufigsten diagnostizierte Krebserkrankung vor Darm- und Lungenkrebs, wobei die Zahl an Neuerkrankungen in Deutschland im Jahr 2006 bei etwa 60.000 lag und 26,2 % aller diagnostizierten Krebsfälle entsprach. 11.577 Sterbefälle wurden 2006 durch Prostatakrebs verursacht und machten 10,3 % aller Krebssterbefälle in Deutschland aus, wodurch das Prostatakarzinom zur dritthäufigsten Ursache von Krebsletalität beim Mann in Deutschland zählt. Verglichen mit den übrigen Ländern der Europäischen Union liegen die in Deutschland ermittelten Erkrankungsrate für Prostatakrebs im Mittelfeld. In den USA wurden im Jahr 2010 über 217.000 neue Prostatakarzinome diagnostiziert. Dabei zeigen 25-30 % der Tumoren ein aggressives Wachstum, was zu fast 32.000 Todesfällen jährlich führt und in den USA die zweithäufigste Ursache von Krebstod beim Mann repräsentiert (Greenlee et al., 2000; Jemal et al., 2010). Seit Anfang der 90er Jahre ist die Sterberate für Prostatakrebs weltweit rückläufig, jedoch steigt die Inzidenzrate kontinuierlich seit Ende der 80er Jahre. Die zunehmende Früherkennung, welche durch die Einführung von PSA als diagnostischen Marker vermehrt stattfindet, könnte eine mögliche Erklärung für das weiterhin steigende Risiko für Prostatakrebs darstellen. Hinsichtlich der Inzidenz des Prostatakarzinoms zeigen sich neben geographischen auch ethnische Unterschiede. Die USA und Kanada weisen weltweit das höchste Erkrankungsrisiko auf, wobei vor allem die farbige Bevölkerung Nordamerikas die stärkste Risikogruppe (ca.21 %) repräsentiert. So konnte in einer Studie aus dem Jahre 1996 gezeigt werden, dass fortgeschrittene Tumoren der Prostata bei männlichen Farbigen 2.5 mal häufiger als bei Kaukasiern festgestellt wurden (Jackson, 1996). Die weltweit niedrigsten Inzidenzraten zeigen asiatische Populationen, die im Bereich von 1-7 % liegen. Als weitere Risikofaktoren gelten neben Alter und ethnischer Herkunft auch exogene Einflüsse. So kann fettreiche Ernährung, Selen- oder Vitamin D-Mangel das Prostatakrebsrisiko deutlich erhöhen. Desweiteren konnte bestätigt werden, dass chronische Prostataentzündungen (Prostatitis) zur Entstehung eines Prostatakarzinoms führen können.

### 3.2.3.2. Pathologie und Einteilung des Prostatakarzinoms

97 % aller Prostatatumore sind lokal begrenzte, multifokale Adenokarzinome, wobei 85 % dieser Karzinome in Drüsenzellen der peripheren Zone ihren Ursprung haben und die restlichen 15 % innerhalb der Transitionalzone wachsen. Zu den seltenen und ungewöhnlichen Karzinomarten gehören plattenepitheliale, muzinöse und papillär-duktales Karzinome, sowie adenoid-zystische (Basalzell-) Karzinome und kleinzellige Tumore mit neuroendokriner Differenzierung. Insgesamt kann man drei Wachstumsmuster des Adenokarzinoms unterscheiden: glanduläres, cribriformes und solides Karzinomwachstum. Mittlerweile ist bekannt, dass die prostatistische intraepitheliale Neoplasie (PIN), welche aus normal gebauten Prostatadrüsen mit dysplastischen Zellen besteht, eine Vorstufe des Prostatakarzinoms ist. Hervorgerufen wird diese durch androgen-abhängige Proliferation des luminalen Epithels und ist gewöhnlich in der Peripherie und in der Transitionalzone der Prostata lokalisiert. Hier wird je nach Dysplasie zwischen „low grade“ und „high grade“ PIN unterschieden.

Die lymphogene Metastasierung betrifft vor allem die obturatorischen und iliakalen Lymphknoten entlang der Beckengefäße. Dabei besteht eine enge Korrelation zwischen der Existenz von Lymphknotenmetastasen, dem Tumolvolumen und der Tumorlokalisation innerhalb der Prostata bei niedrig differenzierten Adenokarzinomen (McNeal et al., 1990). Die hämatogenen Metastasen sind bevorzugt im Skelettsystem, wie beispielsweise Becken und Wirbelsäule, jedoch auch in einzelnen Organen wie Lunge, Leber, Nebennieren oder Hoden lokalisiert. Hierbei entsprechen die Metastasen in der Regel histologisch dem Primärtumor.

Prädiktive Parameter, welche heutzutage für das Prostatakarzinom herangezogen werden, sind die Stadienanalyse (Staging) mit Bestimmung des Tumolvolumens, die histologische Differenzierung (Grading), sowie die Bestimmung der PSA-Menge im Blut.

Das Tumorstadium des Prostatakarzinoms, bei dem Größe und örtliche Ausdehnung sowie Lymphknotenbefall und Metastasierung berücksichtigt werden, wird mit Hilfe des TNM-Systems bestimmt. Die ursprünglich 1967 erstellten Tumorstadien des Prostatakarzinoms wurden in regelmäßigen Abständen aktualisiert, wobei die in Tabelle 2 dargestellte Klassifizierung seit 2002 gültig ist (Hermanek and Sobin, 1988; Takayasu and Otaguro, 1967; UICC, 2002).

**Tabelle 2: TNM-Klassifizierung des Prostatakarzinoms (UICC, 2002)**

<b>nicht tastbarer Tumor</b>	<b>T1a</b>	Tumor zufälliger hist. Befund (inzidentes K.) in < 5 % weniger des Gewebes
	<b>T1b</b>	Tumor zufälliger hist. Befund (inzidentes K.) in > 5 % des Gewebes
	<b>T1c</b>	Tumor durch Stanzbiopsie oder durch hohe PSA-Werte identifiziert
<b>tastbarer Tumor</b>	<b>T2a</b>	Befall von weniger als 50 % eines Seitenlappens
	<b>T2b</b>	Befall von mehr als 50 % eines Seitenlappens
	<b>T2c</b>	Tumor in beiden Seitenlappen
<b>extraprostatitisches Tumorwachstum</b>	<b>T3a</b>	Durchbruch des Tumors durch die Prostatakapsel
	<b>T3b</b>	Samenblaseninfiltration
<b>Infiltration</b>	<b>T4</b>	Infiltration von Nachbarorganen: Harnblase, Rektum, Schließmuskel oder Beckenwand
<b>Lymphknotenbefall</b>	<b>N0</b>	kein Lymphknotenbefall
	<b>N1</b>	regionärer Lymphknotenbefall
<b>Vorliegen von Metastasen</b>	<b>M0</b>	keine Fernmetastasen
	<b>M1a</b>	Nachweis von extraregionären Lymphknotenmetastasen
	<b>M1b</b>	Knochenmetastasen
	<b>M1c</b>	weitere Fernmetastasen

Um Prostatakarzinome histologisch zu beurteilen und Prognosen bezüglich der Aggressivität des Tumors treffen zu können, wurde in den 1970er Jahren die sogenannte Gleason-Graduierung eingeführt. Zunächst gibt der Gleason-Grad den jeweiligen Entdifferenzierungsgrad des vorherrschenden und des zweithäufigsten Drüsentyps wieder, wobei ein Wert von 1 (sehr gut differenziert) bis 5 (entdifferenziert, keine Drüsenmuster erkennbar) zugeordnet wird:

- Gleason-Grad 1 oder 2: gut umschriebene, gleich aussehende Drüsenform ohne Invasion des Stromas.
- Gleason-Grad 3: variable Drüsenformationen mit Invasion von Drüsenzellen in das Stroma, einzelne Drüsen aber noch stratifizierbar.
- Gleason-Grad 4: Drüsen nicht mehr einzeln abgrenzbar, aber Drüsenherkunft noch erkennbar.
- Gleason-Grad 5: Drüsenherkunft nicht mehr erkennbar, strang- oder haufenartiges Zellwachstum, Tumorzellzentren mit Nekrose.

Die Summe beider Werte ergibt wiederum den Gleason-Score, der theoretisch 2 (1+1) bis 10 (5+5) betragen kann und eine prognostische Aussage über den Tumor erlaubt. Dabei bedeutet ein Gleason-Score von 8-10 eine deutlich schlechtere Prognose als Werte <7 (Gleason, 1992).

Ende der 1980er Jahre erfolgte die Einführung der Analyse des PSA-Spiegels in der Prostatakarzinom-Diagnostik (Baron et al., 1988; Fornara et al., 1987). Dieses Antigen ist jedoch lediglich ein organspezifischer, nicht aber ein tumorspezifischer Marker, da auch Patienten, die an benigner Prostatahyperplasie leiden, ein erhöhtes PSA-Niveau zeigen (Armitage et al., 1988). Der Normwert des PSA-Spiegels ist altersabhängig und liegt bei einem 60jährigen gewöhnlich bei 4 ng/ml. Deutlich erhöhte PSA-Werte finden sich bei Patienten mit Prostatakarzinomen, nur mäßig erhöhte hingegen bei der benignen Prostatahyperplasie [24]. Mittlerweile konnte ebenfalls gezeigt werden, dass erhöhte PSA-Werte bei Harnretention, Prostatitis oder bei rektaler Palpation der Prostata im Serum der Patienten detektiert werden können. Umgekehrt kann in Einzelfällen keine Veränderung der PSA-Menge in Prostatakarzinom-Patienten beobachtet werden, so dass diese falsch-positiven bzw. falsch-negativen Ergebnisse bei der Interpretation der erhaltenen PSA-Werte zu berücksichtigen sind.

Um eine eindeutige Aussage über ein möglich vorhandenes Prostatakarzinom zu treffen, erfolgt bei der Diagnostik inzwischen eine Kombination aus PSA-Test, digital-rektaler Untersuchung (DRU) und Biopsie. Hierbei dient der PSA-Test bei der Vorsorge bloß als Hinweis auf eine mögliche Gewebsentartung der Prostata, die endgültige Bestätigung eines Karzinoms liefert nur eine Stanzbiopsie mit anschließender Klassifizierung.

### **3.2.3.3. Ursachen für die Entstehung von Prostatakarzinomen**

Obwohl mittlerweile mehrere Risikofaktoren bekannt sind, welche die Entstehung eines Prostatakarzinoms begünstigen, sind die molekularen Mechanismen innerhalb der Prostatazellen während der Tumorentstehung und –progression noch weitgehend unbekannt.

Wie bei anderen Krebsarten spielen hier vermutlich veränderte Expressionsmuster von Onkogenen und Tumorsuppressoren eine entscheidende Rolle. Mehrere Arbeitsgruppen zeigten in unterschiedlichen Studien, dass eine Vielzahl von Onkogenen sowohl im Prostatakarzinomgewebe wie auch in

Prostatakarzinomzelllinien überexprimiert wird. Beispielsweise konnten erhöhte Proteinmengen an C-MYC, BCL-2, K-RAS sowie FOS in Prostatakarzinomgewebe nachgewiesen werden, welche bekanntermaßen in direktem Kontext mit der Tumorigenese stehen (Davies et al., 1988; McDonnell et al., 1992; Rijnders et al., 1985; Segal et al., 1994).

Umgekehrt wurden Mutationen oder sogar Deletionen von mehreren Tumorsuppressor-Genen in Prostatakarzinomgeweben detektiert. So führen beispielsweise häufig beobachtete Mutationen im p53-Gen zum Funktionsverlust dieses Proteins, wohingegen eine starke p53-Expression in Prostatakarzinomen bestätigt werden konnte (Effert et al., 1992; Mellon et al., 1992). Desweiteren sind Verlust der Tumorsuppressoren PTEN und CDKN1B sowie Rb mit dem Prostatakarzinom assoziiert, was die Entstehung und Progression dieser Tumorentität begünstigen kann (Bookstein et al., 1990; Cairns et al., 1997; Cheville et al., 1998; Tsihlias et al., 1998).

Diese oben beschriebenen Veränderungen der Expression von Onkogenen und Tumorsuppressionen sind oft auf genetische Veränderungen zurückzuführen. Es ist hinreichend belegt, dass Karzinome durch viele unterschiedliche Veränderungen stufenweise ausgelöst werden (Carter, Piantadosi, and Isaacs, 1990). Diese können durch chromosomale Aberrationen, wie Deletionen oder Translokationen, ausgelöst werden. Trotz dieser Tatsache weisen Prostatakarzinome nur in weniger als 5 % aller Fälle hereditäre Formen auf (Carter et al., 1992; Carter et al., 1991). Hierbei sind die Gene ELAC2, RNASEL, MSR1, NSB1 und CHEK2 mit einer möglichen hereditären Prädisposition verknüpft, wobei auftretende Polymorphismen innerhalb dieser Gene als Risikofaktor für die Karzinomentstehung genannt werden (Cybulski, 2007; Orr-Urtreger et al., 2006; Rebbeck et al., 2000; Rennert et al., 2002; Xu et al., 2002). Die sporadisch auftretenden Prostatakarzinome zeigen hingegen häufig Mutationen im TLR4- und CDKN1B-Gen (Kibel et al., 2003; Zheng et al., 2004).

Eine weitere genetische Besonderheit in Prostatakarzinomen sind auftretende Genfusionen zwischen der Familie der onkogenen ETS-Transkriptionsfaktoren und des androgenregulierten TMPRSS2-Gens (Tomlins et al., 2005). Hierbei wurde die TMPRSS2-ERG-Genfusion als häufigste Fusionsart identifiziert, welche in 50 % aller Prostatakarzinome auftritt (Mehra et al., 2007; Park et al., 2010).

### 3.3. RNA-Interferenz

Unter RNA-Interferenz versteht man die Inhibierung der Genexpression, welche posttranskriptionell durch nicht-kodierende RNA-Moleküle vermittelt wird. Erstmals wurde das Phänomen der RNA-Interferenz in den 90er Jahren des letzten Jahrhunderts in Pflanzen beobachtet. Durch das Einbringen einer zusätzlichen Genkopie eines Blütenfarbstoffes in Petunien versuchten Wissenschaftler die entsprechende Blütenfarbe zu intensivieren. Jedoch führte die zusätzliche Genkopie zum gegenteiligen Ergebnis, so dass die Intensität der Blütenfarbe abnahm bzw. nur noch weiße Blüten vorhanden waren (Napoli, Lemieux, and Jorgensen, 1990). Diese Hemmung des endogenen Gens durch eine zusätzliche Genkopie wurde als Kosuppression bezeichnet.

Drei Jahre später entdeckten Wissenschaftler bei der Untersuchung von Entwicklungsmutanten in *C.elegans* ein kurzes Transkript namens *lin-4*, das nicht für ein Protein kodierte. Es stellte sich heraus, dass das 22 nt große RNA-Molekül, welches eine Komplementarität zu mehreren Abschnitten der 3'-UTR der *lin-14* mRNA besitzt, in der Lage war, die *lin-14* Proteinexpression zu hemmen. Die negative Regulation von *lin-14* diente der Steuerung der Fadenwurmentwicklung (Lee, Feinbaum, and Ambros, 1993; Wightman, Ha, and Ruvkun, 1993). Die Biologen vermuteten, dass das *lin-4* Transkript seine Wirkung durch die Bindung an die teilweise komplementäre 3'UTR der *lin-14*-mRNA ausübt. 1998 konnten Craig Mello und Andrew Fire zeigen, dass durch Einführen von doppelsträngiger RNA in *C.elegans* die Genexpression des jeweiligen Gens inhibiert werden kann und ein sogenannter „knock-down“ erzielt wird, wofür sie 2006 den Nobelpreis für Physiologie und Medizin erhielten (Fire et al., 1998). Ein Jahr danach konnte durch Andrew Hamilton und David Baulcombe in Pflanzen gezeigt werden, dass der durch dsRNA ausgelöste Abbau der mRNA durch 21-23 nt lange RNAs erfolgt (Hamilton and Baulcombe, 1999). Im Anschluss ergaben Untersuchungen dieser RNA-Fragmente, dass sie strukturell sehr ähnlich den ursprünglich in Nematoden entdeckten kleinen RNA-Moleküle waren und diese, trotz geringer Komplementarität zu ihren entsprechenden Zielsequenzen, ebenfalls Gene inhibieren können (Lau et al., 2001; Olsen and Ambros, 1999; Pasquinelli et al., 2000; Reinhart et al., 2000; Wightman, Ha, and Ruvkun, 1993).

---

Insgesamt lassen sich diese RNA-Moleküle aufgrund ihrer unterschiedlichen Prozessierung in drei Klassen unterteilen: siRNA (small interfering RNA), miRNA (microRNA) und piRNA (PIWI-interacting RNA). Nachdem die Funktionsweise der RNA-Interferenz als Mechanismus zur Expressionsregulation von Genen aufgeschlüsselt wurde, konzentriert sich die Forschung momentan auf die Identifizierung von Zielgenen, die durch die RNAi beeinflusst werden. Die neu gewonnen Erkenntnisse könnten einen besserer Einblick in die Regulation physiologischer Prozesse liefern. Im Folgenden wird die Entstehung und Funktion von miRNAs erläutert.

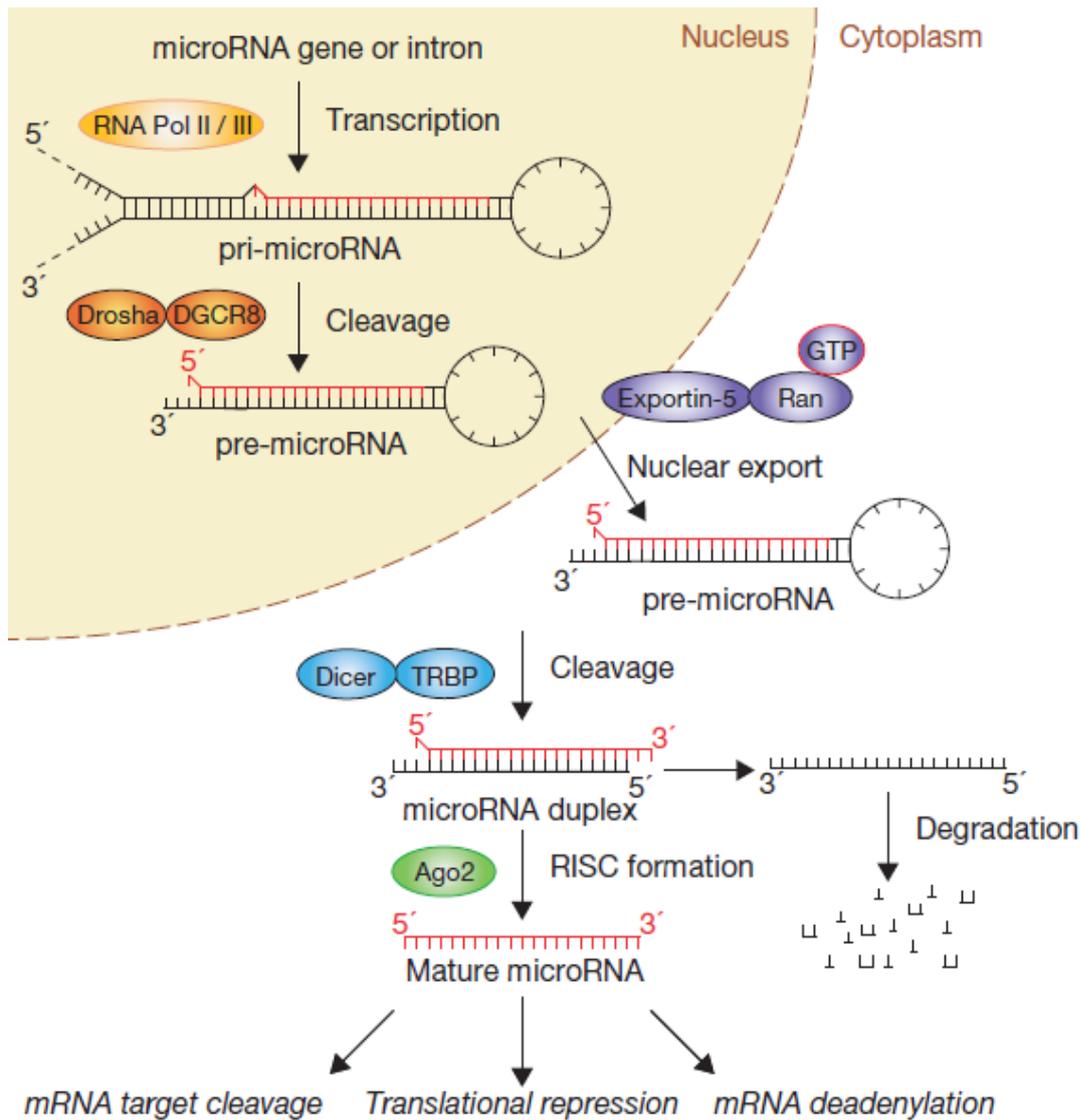
### **3.3.1. microRNAs**

Anfang des Jahrtausends zeigten mehrere Untersuchungen, dass die durch dsRNA induzierte mRNA-Degradation durch 21-23 nt lange RNA-Moleküle vermittelt wird (Elbashir, Lendeckel, and Tuschl, 2001; Zamore et al., 2000). Dies führte zu einer Suche nach endogenen RNA-Molekülen, die für dieses Phänomen verantwortlich waren, wobei mehrere Arbeitsgruppen auf miRNAs stießen (Lagos-Quintana et al., 2001; Lau et al., 2001; Lee and Ambros, 2001). Sie definierten sie als etwa 22 Nukleotid lange endogene RNAs, die sequenzspezifisch am posttranskriptionellen Regulationsmechanismus der Genexpression beteiligt sind. Durch das Sequenzieren von cDNA Banken konnten mittlerweile in vielen eukaryotischen Organismen, wie beispielweise Vertebraten, Nematoden, Insekten und Pflanzen, jedoch auch in Viren wie EBV, CMV, KSHV und SV40 miRNAs identifiziert werden (Bartel, 2004; Cullen, 2006; Pfeffer et al., 2004). Auffällig ist der hohe Konservierungsgrad der miRNA-Sequenzen, der sowohl zwischen eng verwandten Spezies, als auch zwischen weit entfernten Organismen vorhanden ist (Lim et al., 2003).

Bis dato sind 940 unterschiedliche humane miRNA-Vorläufer beschrieben und man schätzt, dass etwa 3 % aller Gene für miRNAs kodieren (Sen et al., 2009). MiRNA-Gene sind sehr unterschiedlich angeordnet und können einzeln oder in Genclustern vorliegen. Einige miRNA-kodierenden Sequenzen liegen dabei in intergenischen Regionen und werden als eigene, unabhängige Transkriptionseinheiten exprimiert (Lau et al., 2001). Die meisten miRNA-Gene befinden sich jedoch innerhalb von Introns oder Exons Protein-kodierender oder nicht-kodierender Gene (Rodriguez et al., 2004). Es wird vermutet, dass die miRNA-Gene innerhalb anderer Gensequenzen keine eigenen Promotoren besitzen, sondern aus den

entsprechenden Introns bzw. Exons prozessiert werden (Aravin et al., 2003; Lai et al., 2003).

In Abbildung 2 sind die Prozessierungsschritte bei der Biogenese von miRNAs dargestellt. Zunächst erfolgt im Zellkern die Transkription der primären Transkripte (pri-miRNA), wobei dies in den meisten Fällen mit Hilfe der RNA-Polymerase II und selten durch RNA-Polymerase III stattfindet. Die pri-miRNA, welche eine Länge von mehreren kb haben kann, weist eine typische Haarnadelstruktur auf und besitzt, ähnlich einer mRNA, am 5'-Ende eine m<sup>7</sup>G-Cap-Struktur und besitzen ein polyadenyliertes 3'-Ende (Borchert, Lanier, and Davidson, 2006; Cai, Hagedorn, and Cullen, 2004; Lee et al., 2004). Im Anschluss wird die charakteristische Haarnadelstruktur von einem Microprozessorkomplex erkannt, der sich aus der dsRNA spezifischen RNase III Drosha und dem dsRNA bindenden Protein DGCR8 (Di-George syndrome critical region gene 8), welcher als Kofaktor dient, zusammensetzt (Gregory et al., 2004; Han et al., 2004). Die Prozessierung durch diesen Komplex resultiert in einem ~60-100 nt langen miRNA-Vorläufer (pre-miRNA), wobei eine „stem-loop“-Struktur mit einem zwei Nukleotid langen Überhang am 3' Ende geschaffen wird (Zeng and Cullen, 2003). Die Precursor-miRNA wird anschließend mit Hilfe von Exportin-5 unter Verbrauch von GTP aktiv aus dem Kern ins Cytoplasma transportiert (Lund et al., 2004; Yi et al.) und dort an der terminalen Schleife geschnitten, so dass ein ~22 nt langer, imperfekter microRNA-Duplex entsteht. Dieser Prozessierungsschritt wird durch einen Komplex aus der RNase III Dicer und dem dsRNA-bindenden Protein TRBP (immunodeficiency virus transactivating response RNA binding protein) katalysiert (Grishok et al., 2001; Hutvagner and Zamore, 2002; Ketting et al., 2001; Lee et al., 2003). Der Duplex-Strang, dessen 5' Ende die schwächere Basenpaar-Bindung besitzt, stellt die reife miRNA dar und wird nach Bindung von Ago2 in einen Ribonukleoproteinkomplex namens RISC (RNA induced silencing complex) integriert, während der andere Strang meist abgebaut wird (Khvorova, Reynolds, and Jayasena, 2003; Schwarz et al., 2003; Wiemer, 2007). Der Prozess der Zusammenlagerung der einzelnen RISC-Komponenten ist noch nicht verstanden und ihre Funktion weitestgehend unbekannt, wobei die Familie der Argonaut-Proteine die wichtigste Komponente darstellt.



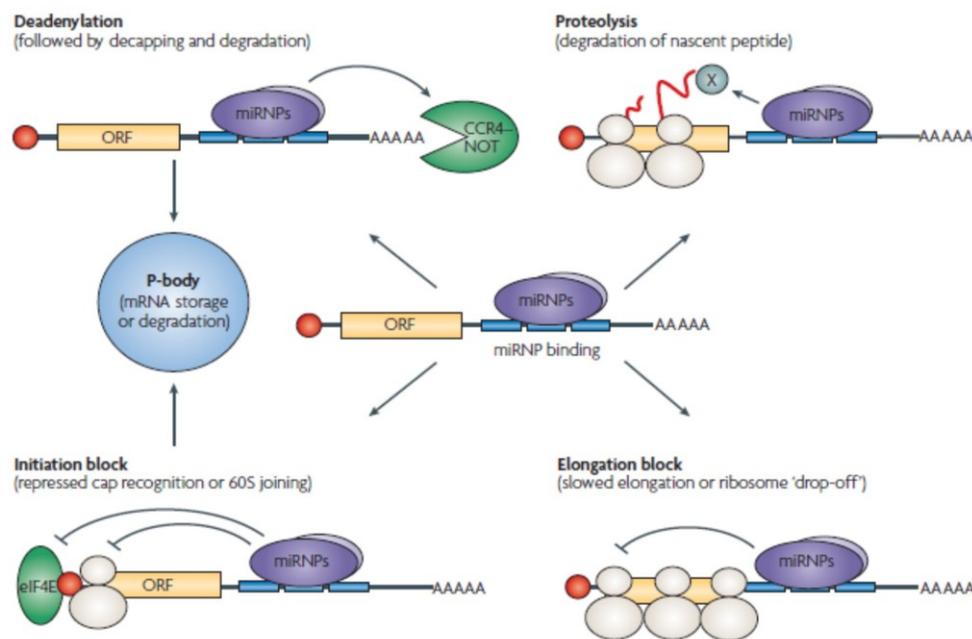
**Abbildung 2: Schema der Biogenese und Funktion humaner miRNAs (Winter et al., 2009)**

Die Transkription der pri-miRNAs erfolgt hauptsächlich durch RNA-Polymerase II im Zellkern. Die anschließende Prozessierung des primären Transkriptes zur pre-miRNA wird durch Drosha und DGCR8 vermittelt. Die mittels Exportin 5 ins Cytoplasma transportierte pre-miRNA wird durch Dicer geschnitten, wobei ein ~ 22 nt langer miRNA-Duplex mit je zwei nt-Überhängen an beiden Enden entsteht. Die miRNA, mit der schwächsten Basenpaarung am 5'-Ende wird in den RISC-Komplex eingebaut und zur Ziel-mRNA geführt, während der andere miRNA-Strang abgebaut wird.

Nach der Integrierung der reifen miRNA wird der RISC-Komplex zur Ziel-mRNA geführt. Bei perfekter Komplementarität zwischen microRNA und 3'UTR der mRNA kommt es zum Abbau der entsprechenden mRNA und bei imperfekter Komplementarität zur Repression der Translation (Bartel, 2004; Engels and Hutvagner, 2006). Es gibt jedoch auch in seltenen Fällen die Möglichkeit des mRNA-Abbaus bei imperfekter Komplementarität zwischen miRNA und mRNA (Bagga et al., 2005). Desweiteren ist mittlerweile bekannt, dass in Zellen, die sich im Zellzyklusarrest befinden, eine Induktion der Translation und Proteinproduktion durch

miRNAs erfolgen kann (Vasudevan, Tong, and Steitz, 2007). Inzwischen weiß man auch, dass miRNAs ihre Ziel-mRNA nicht nur durch Bindung an die 3'UTR regulieren, sondern auch in der Lage sind, mit der 5'UTR oder dem offenen Leserahmen zu interagieren (Lytle, Yario, and Steitz, 2007; Qin et al., 2010; Tay et al., 2008). In den meisten Fällen ist nur eine partielle Sequenzübereinstimmung von miRNA und mRNA gegeben, wobei die Seed-Sequenz, welche die Nukleotide 2-8 darstellt, eine kritische Rolle bei der miRNA-Bindung spielt (Doench and Sharp, 2004).

Noch nicht alle Mechanismen der miRNA-vermittelten posttranskriptionellen Genrepression konnten bislang aufgeklärt werden. Die bis dato bestätigten und denkbaren Mechanismen sind in Abbildung 3 zusammengefasst (Fabian, Sonenberg, and Filipowicz, 2010). Der miRNA-RISC-Komplex kann einerseits die Initiation der Translation hemmen, indem der Komplex entweder die Zusammenlagerung der 60S und 40S Ribosomenuntereinheiten an der mRNA zum 80S Komplex verhindert oder die Erkennung der 5'-Cap-Struktur inhibiert.



**Abbildung 3: Übersicht der Mechanismen der miRNA-vermittelten posttranskriptionellen Genregulation (Filipowicz, Bhattacharyya, and Sonenberg, 2008).**

Die mRNA-Translation kann einerseits während der Translationsinitiation durch Hemmen der 5'-Cap-Erkennung oder der Bildung des 80s Ribosomenkomplex verhindert werden. Die zweite Möglichkeit ist die Inhibierung der Translationselongation durch gedrosselte Elongation oder Ribosomen „Drop-off“. Außerdem kann es durch Deadenylierung von mRNAs und die anschließende Entfernung ihrer 5'-Cap-Struktur zur Degradation der mRNA kommen. Der RISC-Komplex kann ebenfalls zum Abbau der entstehenden Peptide führen, wobei dieser Mechanismus noch nicht aufgeklärt ist.

Die andere Möglichkeit ist die Inhibierung der Translation in Postinitiationsschritten. Hier kann eine Elongationshemmung durch verlangsamte Elongation oder eine vorzeitige Termination mit daraus resultierendem Ribosomen „Drop-off“ erreicht werden, wobei der genaue Mechanismus noch nicht bekannt ist. Desweiteren kann die miRNA-vermittelte Translationshemmung auch durch Abbau der Ziel-mRNA erfolgen. Hierbei führt die Deadenylierung der mRNA und das anschließende Entfernen der 5'-Cap-Struktur zu ihrer Degradation. Es wird jedoch auch vermutet, dass der RISC-Komplex in der Lage ist, während der Proteinbiosynthese das neu synthetisierte Peptid proteolytisch zu spalten.

Translational stillgelegte mRNAs werden innerhalb der Zelle zur Speicherung oder zum Abbau in sogenannten Prozessierungs- oder P-Bodies gelagert (Liu et al., 2005). Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass die nicht abgebauten mRNAs signalabhängig erneut zur Translation eingesetzt werden können (Bhattacharyya et al., 2006).

Um Vorhersagen der Ziel-mRNAs für miRNAs machen zu können, werden bioinformatische Programme verwendet, die mit bestimmten Algorithmen potentielle Zielgene vorschlagen (Stark et al., 2003). Da nur selten eine vollständige Komplementarität zwischen der miRNA und ihrer Ziel-mRNA besteht, ist diese Vorhersage sehr schwierig und liefert eine hohe Zahl falsch-positiver Ergebnisse. Jedoch konnte gezeigt werden, dass die Nukleotide 2-8 der Sequenz (Seed-Sequenz) eine kritische Rolle für die Funktion der microRNA haben (Lewis, Burge, and Bartel, 2005). Alle bioinformatisch vorausgesagten Ziel-mRNAs müssen jeweils experimentell bestätigt werden, wobei nur ein Bruchteil als tatsächliches Target verifiziert werden kann. Schätzungen gehen aber davon aus, dass über ein Drittel aller humanen Gene durch miRNAs posttranskriptionell reguliert werden (Barbato et al., 2009; Bartel and Chen, 2004; Lewis, Burge, and Bartel, 2005). Es wird vermutet, dass miRNAs im Verbund ihre Funktion ausüben und ein Effekt nur bei der Bindung mehrerer verschiedener miRNAs an die 3'-UTR auftritt. Außerdem ist es sehr wahrscheinlich, dass andere Faktoren, wie RNA-bindende Proteine, einen Einfluss auf die RNA-Interferenz besitzen (Rajewsky, 2006).

In den letzten Jahren konnte in verschiedenen Untersuchungen gezeigt werden, dass miRNAs in viele zelluläre Abläufe, wie beispielsweise Wachstum und Differenzierung, Entwicklung sowie Apoptose involviert sind und daher eine deregulierte miRNA-Expression in vielen verschiedenen Krankheitsbildern zu finden ist

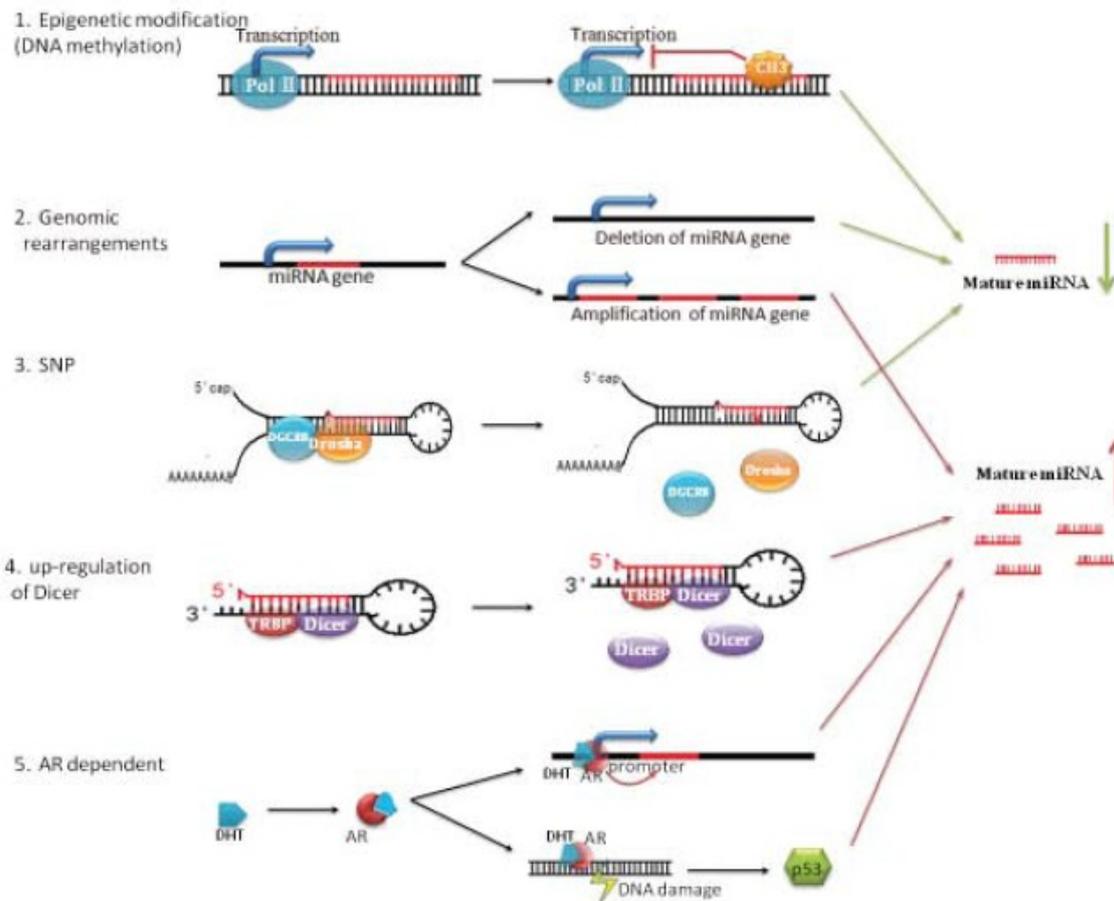
(Chen et al., 2004; Lagos-Quintana et al., 2002; Subramanian and Steer, 2010; Wiemer, 2007; Wienholds and Plasterk, 2005). Die Rolle von miRNAs bei der Entstehung und Progression von Krebs soll nachfolgend erläutert werden

### 3.3.2. miRNAs und Krebsentstehung

Der Zusammenhang zwischen deregulierten miRNAs und Krebs konnte erstmals 2002 durch Calin und Kollegen gezeigt werden, die in chronisch lymphatischer B-Zell Leukämie eine Repression bzw. den Verlust von miR-15a und miR-16-1 aufgrund einer chromosomale Deletion des Lokus 13q14 beobachtet haben (Calin et al., 2002). Diese Entdeckung führte dazu, dass miRNA-Expressionsprofile unterschiedlicher Tumore erstellt wurden, um den Zusammenhang zwischen miRNA-Fehlexpression und Tumorigenese oder –progression zu verstehen.

Eine veränderte miRNA-Expression in Tumoren kann durch unterschiedliche Vorgänge innerhalb der Tumorzelle begründet werden. Eine Übersicht der verschiedenen Mechanismen zur Deregulation der miRNA-Expression ist am Beispiel von Prostata Tumoren in Abbildung 4 dargestellt. MiRNA-Gene können epigenetisch beeinflusst werden, so dass Histonmodifikationen und DNA-Methylierungen zur Expressionsänderung dieser miRNAs führen können (Agirre et al., 2009; Saito and Jones, 2006; Ting et al., 2008). Da eine große Zahl von miR-Genen CpG-Inseln beinhalten, könnte dieser Mechanismus bei der miRNA-Deregulation sehr wichtig sein (Visone and Croce, 2009). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass miRNA-Gene in Chromosomregionen liegen, welche fragil sind und aufgrund von häufigen Deletionen und Rekombinationen mit der Krebsentstehung im Zusammenhang stehen (Calin et al., 2004). Desweiteren können Mutationen und Polymorphismen innerhalb der pri-miRNA-Sequenz eine Fehlregulation bewirken, indem die Prozessierung durch Drosha beeinflusst wird, und beispielsweise familiäre Prädispositionen für bestimmte Tumorarten erklären. Eine weitere Möglichkeit, die miRNA-Expression zu verändern, sind Defekte in der miRNA-Prozessierungsmaschinerie (Kumar et al., 2007; Newman and Hammond, 2010). Beispielsweise kann ein Fehler im Drosha-Prozessierungsschritt die miRNA-Expression in Primärtumoren allgemein reprimieren (Thomson et al., 2006). Umgekehrt konnte jedoch im Prostatakarzinom gezeigt werden, dass Dicer in diesen Tumoren überexprimiert ist und zur verstärkten miRNA-Prozessierung führen kann (Chiosea et al., 2006). Schließlich kann speziell in Prostatagewebe der

Androgenrezeptor, dessen Aktivität in Prostata Tumoren induziert ist, die Überexpression einzelner miRNAs bewirken. Dies wurde im Fall der miR-21 von Ribas und Kollegen bereits nachgewiesen (Ribas et al., 2009).



**Abbildung 4: Mögliche Mechanismen für die Deregulation der miRNA-Expression im Prostatakarzinom (Pang et al., 2010)**

Die Fehlexpression von miRNAs kann mittels unterschiedlicher Mechanismen verursacht werden. Epigenetische Modifikationen, wie DNA-Methylierung, können zur Inhibierung der miRNA-Transkription führen. Eine weitere Möglichkeit ist das Auftreten chromosomaler bzw. genetischer Umstrukturierungen, die in einer veränderten miRNA-Expression resultieren. Außerdem können Polymorphismen innerhalb der pri-miRNA-Sequenz die Drosha-vermittelte Prozessierung hemmen. Veränderungen in der Prozessierungsmaschinerie verursachen ebenfalls eine Deregulation der miRNA-Expression. Desweiteren kann im Prostatakarzinom die Induktion des Androgenrezeptors zu einer verstärkten Expression einzelner miRNAs führen.

MiRNAs können sowohl als Onkogene wie auch als Tumorsuppressoren agieren, wobei diese Funktion jeweils vom Ziel-Gen und dem Expressionsniveau der miRNA abhängig ist. Eine onkogene Wirkung wird durch eine überexprimierte miRNA erzielt, die beispielsweise die Expression von Tumorsuppressorgenen reprimiert, welche für die Hemmung von Wachstum, Angiogenese oder Invasion verantwortlich sind. Die ersten als Onkogene beschriebenen miRNAs waren miR-155 und das miR-17-92-

Cluster (Eis et al., 2005; He et al., 2005). Die zum miR-17-92-Cluster gehörenden miR-17, -18a, -19a, -19b-1, -20a, und -92-1 inhibieren u.a. die Tumorsuppressoren Bim, p21 und PTEN (Inomata et al., 2009; Xiao et al., 2008), wohingegen die Überexpression von miR-155 in B-Zellen zu einer Lymphomentwicklung führt (Costinean et al., 2006). Auf der anderen Seite können miRNAs mit Tumorsuppressorfunktion, welche aus der Regulierung von Onkogenen resultiert, in Tumoren reprimiert oder vollständig inhibiert sein. Hier wären als Beispiel miR-15 und miR-16 zu nennen, deren Expression in chronisch lymphatischer Leukämie verringert ist und die für die Inhibierung des Onkogens BCL2 zuständig sind (Cimmino et al., 2005).

### 3.4. Ausgangspunkt und Zielsetzung der Arbeit

Obwohl das Prostatakarzinom die am häufigsten auftretende Krebserkrankung in männlichen Individuen darstellt und es eines der Schwerpunkte in der heutigen Krebsforschung repräsentiert, sind die molekularen Mechanismen der Tumorigenese dieser Tumorentität immer noch weitgehend unverstanden. Die Ursache hierfür ist unter anderem die starke Heterogenität dieser Tumorart, welche auf viele verschiedene Risikofaktoren und unterschiedliche Ursachen für die Tumorentstehung zurückzuführen ist (Scardino, 2000). Außerdem konnte durch viele Studien ein Zusammenhang zwischen miRNAs und Krebs hergestellt werden, da miRNAs als Onkogene bzw. Tumorsuppressoren an der Entstehung oder Progression von Tumoren beteiligt sind.

Zu Beginn dieser Arbeit existierten bereits mehrere Veröffentlichungen, welche die Expression zellulärer miRNAs in Prostatakarzinomgewebe untersucht haben (Ambs et al., 2008; Lu et al., 2005; Ozen et al., 2008; Porkka et al., 2007; Tong et al., 2009; Volinia et al., 2006), wobei Unterschiede in der miRNA-Expression zwischen Normal- und Tumorgewebe gezeigt werden konnten. Überraschenderweise enthielten diese Veröffentlichungen unterschiedliche und zum Teil gegensätzliche Ergebnisse. Da die in diesen Studien verwendeten Methoden auf Microarrays beruhten, war das Ziel dieser Arbeit zunächst, ein miRNA-Expressionsprofil des Prostatakarzinoms im Vergleich zum Normalgewebe mit Hilfe der 454-Sequenzierung zu erstellen, um die Deregulation der miRNA-Expression im Prostatakarzinom weiter zu erforschen. Im Anschluss sollten die Sequenzierungsdaten mit Hilfe von Northern Blots für ausgesuchte deregulierte miRNAs in primärem Prostatatumor- und Normalgewebe validiert werden. Desweiteren sollten für die fehlregulierten miRNAs Zielgene identifiziert werden, um einen möglichen Einfluss dieser miRNAs auf Tumorentstehung oder –progression zu bestimmen.

## 4. Material

### 4.1. Geräte

Blotkammer	LKB 2005 Transphor Electro Blotting Unit
Durchflusszytometer	FACScan™ von Becton Dickinson BD
Kryophylle	Beta A (Christ)
Luminometer	Lumat LB 9501, Berthold Technologies GmbH & Co.KG
PCR-Maschine	Peltier Thermal Cycler 200 der Firma MJ Research Light Cycler 1.5 (Roche)
Phosphoimager	Phosphoimager™-Typhoon mit Exponierplatten, -Kammer und Belichter, Personal Densitometer, Molecular Dynamics (Amersham)
Photometer	Pharmacia Biotech Ultraspec 3000 NanoDrop™ 2000c (PEQLAB)
Platereader	Victor X™ (Perkin Elmer)
Semi-Dry Blotter	2117 Multiphor, LKB Bromma
Ultraschallgerät	Bronson Sonifier 250
UV-Dokumentation	ChemiDoc™ XRS+ (Biorad)
Zellzähl-Gerät	CASY™-Counter, Schade Systems
Zentrifugen	Heraeus Megafuge 1,0 R (mit Kühlung) Heraeus Picofuge (Tischzentrifuge ohne Kühlung) Sigma 202 MK (Tischzentrifuge mit Kühlung)

### 4.2. Chemikalien, Membranen, Filter

Acrylamid	Serva
Agarose	Invitrogen
Amidoschwarz	Sigma
Ammoniumpersulfat	Serva
Ampicillin (Binotal™)	Bayer
Bactoagar	DIFCO
Bisacrylamid	Serva
Bromphenolblau	Serva

---

Bovines Serumalbumin (BSA)	New England Biolabs
Caspase-Glo® 3/7 Assay	Promega
CASYton	Innovatis
Coomassie Brilliant Blue™ R-250	Serva
50x Denhardt's Solution	Sigma
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Dual-Luciferase Reporter® Assay System	Promega
EDC	Sigma
EDTA	Serva
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Sigma
Fötales Kälberserum (FKS)	PAA Laboratories GmbH
Gamma- <sup>32</sup> P-UTP(3000 Ci/mmol)	Hartmann Analytik
Glycin	Serva
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Sigma
Hybond™-N+ Membran	Amersham
Hyperfilm ECL™	Amersham
Illustra™ NAP™-25 Säule	GE Healthcare
Imidazol	Sigma
Isopropanol	Roth
Isopropylthiogalactosid (IPTG)	Novagen
Kb plus Leiter	Invitrogen
LightCycler FastStart DNA Master PLUS SYBRGreen I-Kit	Roche
Lipofectamine™	Invitrogen
Luciferase Assay System	Promega
Magermilchpulver	Töpfer
3-Mercapto-1,2-propandiol	Sigma
MiScript Reverse Transcription Kit	Qiagen
Nanofectin™	PAA Laboratories (Pasching, A)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
Nitrocellulosemembran (Protran™)	Schleicher&Schuell
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Serva

NucleoBond	Macherey-Nagel
NucleoSpin Extract™	Macherey-Nagel
Nukleotide (dNTPs)	Sigma
Nukleotide (NTPs)	Invitrogen
Paraformaldehyd	Sigma
PeqGOLD TriFast™	PeqLab
Penicillin/ Streptomycin	PAA Laboratories
pGEM®-T	Promega
PonceauS™	Sigma
Röntgen-Entwickler-Konzentrat	ADEFO Chemie GmbH
Röntgen-Fixier-Konzentrat	ADEFO Chemie GmbH
SequaGel® Sequencing System	National Diagnostics
Taq DNA Polymerase, dNTPack 5 U/μl	Roche
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Serva
Triton X-100	Serva
Trypsin/EDTA	PAA Laboratories GmbH
Tween®20	Serva
X-Gal	Sigma
Zellulosefilter Whatman™ #1	Herolab (Maidstone, USA)

Alle weiteren, hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden über die Firmen Merck (Darmstadt) und Roth (Karlsruhe) in analysereiner Form bezogen.

### 4.3. Puffer und Lösungen

Amidoschwarz-Färbelösung	:	Isopropanol	25,0 % (v/v)
		Essigsäure	10,0 % (v/v)
		Amidoschwarz	0,1 % (w/v)
2xBromphenolblau Ladepuffer	:	Urea	8 M
		EDTA	50 mM
		Bromphenolblau	0,2-0,4 mg/ml

---

Blaumarker	:	Bromphenolblau	0,25 % (w/v)
		Glycerol	50 % (v/v)
		EDTA	50 mM
Blockingpuffer	:	Magermilchpulver in PBS-Puffer	5 % (w/v)
Coomassie-Lösung	:	Isopropanol	10 % (v/v)
		Eisessig	25 % (v/v)
		Coomassie Blue	0,02 % (w/v)
50x Denhardt's Solution	:	Albumin fraction V	1 %
		Polyvinylpyrrolidon K30	1 %
		Ficoll 400	1 %
dNTPs	:	dATP, dCTP, dGTP, dTTP	je 10 mM
ECL-Lösung A	:	Luminol in DMSO	250 mM
ECL-Lösung B	:	p-Coumarsäure in DMSO	90 mM
ECL-Lösung C	:	Tris HCL pH 8,5	1M
ECL-Lösungs-Mix	:	Lösung A	2,5 ml
		Lösung B	1,13 ml
		Lösung C	2ml
		ad 250 ml H <sub>2</sub> O	
Entfärbelösung	:	Isopropanol	10 % (v/v)
		Essigsäure	10 % (v/v)
Ethidiumbromidlösung	:	Ethidiumbromid	10 mg/ml H <sub>2</sub> O

---

FACS-Fix	:	2 % Paraformaldehyd in PBS-Puffer, pH 7.5	
Hybridisierungspuffer (Northern Blot)	:	20xSSC	7,5 ml
		1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,6 ml
		10 %SDS	21,0 ml
		50xDenhardt's Solution Sonicated	0,6 ml
		Salmon sperm DNA	0,3 ml
MgCl <sub>2</sub>	:	(2 M) MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	20,33 g
		MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	24,65 g
		ad 100 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub> , sterilfiltrieren	
New Wash-Puffer	:	NaCl	50 mM
		Tris HCl pH 7,5	10 mM
		EDTA	2,5 mM
		Ethanol	50 % (v/v)
		ad 100 ml H <sub>2</sub> O	
Puffer N2	:	Tris	100 mM
		Ethanol	15 % (v/v)
		KCl	900 mM
		Triton X-100	0,15 % (v/v)
		ad pH 6,3 mit H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	
Puffer N3	:	Tris	100 mM
		Ethanol	15 % (v/v)
		KCl	1,15 M
		ad pH 6,3 mit H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	

---

Puffer N5	:	Tris	100 mM
		Ethanol	15 % (v/v)
		KCl	1 M
		ad pH 8,5 mit H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	
PBS	:	NaCl	140 mM
		KCl	25 mM
		MgCl <sub>2</sub>	0,5 mM
		CaCl <sub>2</sub>	1 mM
		Na-K-Phosphat	10 mM
S1-Puffer	:	Tris-HCl	50 mM
		EDTA	10 mM
		RNase A	100 µg/ml
		pH 8.0	
S2-Puffer	:	NaOH	200 mM
		SDS	1 % (w/v)
S3-Puffer	:	Kaliumacetat	2,8 M
		pH 5.1	
2x Sample-Buffer	:	Tris HCL (pH6,8)	130 mM
		SDS	6 % (w/v)
		3-Mercapto-1,2propandiol	10 % (v/v)
		Glycerol	10 % (w/v)
		Bromphenolblau	0,05 % (w/v)
20xSSC-Puffer (Stammlösung)	:	NaCl	3 M
		tri-Natriumcitrat-2-hydrat	0,3 M
SDS-Laufpuffer	:	Tris/HCl	0,025 M
		SDS	0,1 % (w/v)
		Glycin	0,2 M

---

Sammelgelstock	:	Tris-HCl pH 6,8	0,5 M
		SDS	0,4 % (w/v)
SOB-Medium	:	Trypton	20,0 g
		Hefe-Extrakt	5,0 g
		NaCl	0,6 g
		KCl	0,5 g
		ad 1000 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub> , autoklaviert	
		Zugabe von 20 mM MgCl <sub>2</sub> direkt vor Gebrauch	
STET-Puffer	:	Tris (pH 8,0)	10 mM
		EDTA (pH 8,0)	50 mM
		Triton X-100	0,5 % (v/v)
		Saccharose	8 % (w/v)
		Zugabe von 0,5 mg/ml Lysozym direkt vor Gebrauch	
Stripping-Puffer	:	Tris (pH 8,0)	0.05 mM
		EDTA	0,2 mM
		Na-Pyrophosphat	0,05 % (v/v)
		Denhardt's Solution	0,1x
TAE-Puffer 50x	:	Tris	2 M
		Natriumacetat	25 mM
		EDTA	0,5 M
		ad pH 7,8 mit Essigsäure	
TBE-Puffer	:	Tris	89 mM
		Borsäure	89 mM
		EDTA	2 mM

---

TE-Puffer	:	Tris	10 mM
		EDTA	1 mM
		ad pH 7,6 mit Essigsäure	
TNE-Puffer	:	Tris (pH 7,4)	50 mM
		NaCl	300 mM
		EDTA	2 mM
		DTT	2 mM
		Aprotinin	0,9 µg
		Glycerol	10 %
		ad 100 ml mit H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub> , Lagerung bei 4°C.	
Transferpuffer	:	Tris/HCl	25 mM
		Glycin	192 mM
		Methanol	20 % (v/v)
		SDS	0,05 % (w/v)
Trenngelstock	:	Tris-HCl pH 8,8	1,5 M
		SDS	0,4 % (w/v)
Transformations-Lösung 1	:	RbCl	0,10 M
		MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,05 M
		CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,01 M
		CH <sub>3</sub> COOH (pH7)	0,03 M
		Glycerol	15,0 % (v/v)
		ad 1000 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub> , sterilfiltriert	
		ad pH 5,8 mit 0,2 M CH <sub>3</sub> COOH	
Transformations-Lösung 2	:	MOPS (pH6,8)	0,500 M
		RbCl	0,010 M
		CaCl <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	0,075 M
		Glycerol	15 % (v/v)
		ad 1000 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub> , sterilfiltriert	

#### 4.4. Enzyme

Alkalische Phosphatase	Roche Applied Science
DNaseI (amplification grade)	Invitrogen
<i>Klenow</i> Fragment	Fermentas
Lysozym aus Hühnereiweiß	Boehringer
<i>Pfu</i> -Polymerase	Promega
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs
T7-Polymerase	New England Biolabs
<i>Taq</i> -Polymerase	Sigma

#### 4.5. Größen- und Molekulargewichtsmarker

##### 4.5.1. DNA-Größenstandard

Bei der Gelelektrophorese erfolgte die Größenbestimmung der DNA-Fragmente durch den 1 kb Plus Marker (Invitrogen), der folgende Fragmentgrößen enthält:

12000, 11000, 10000, 9000, 8000, 7000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2000, 1650, 1000, 850, 650, 500, 400, 300, 200, 100 bp.



Abbildung 5: 1 kb Plus DNA-Leiter (Quelle: Invitrogen)

#### 4.5.2. Protein-Molekulargewichtsmarker

Zur Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen wurden bei der SDS-PAGE (Polyacrylamidgelelektrophorese) zwei verschiedene Größenstandards verwendet. Bei 10%igen Acrylamidgelen wurde ein selbst hergestellter „Low molecular weight Marker“ eingesetzt, der folgende Proteine (von Sigma bezogen) in angegebener Konzentration enthält:

Phosphorylase b	94	kDa	0,5 mg/ml
Kälberserumalbumin	67	kDa	0,7 mg/ml
Ovalbumin	43	kDa	1 mg/ml
Carboanhydrase	30	kDa	0,5 mg/ml
Trypsininhibitor aus Sojabohnen	20,1	kDa	1 mg/ml
Lactalbumin	14,4	kDa	0,5 mg/ml

Die Bestimmung des Molekulargewichts bei niederprozentigen Acrylamidgelen erfolgte mit dem „ColorPlus Prestained Protein Ladder“ (NEB).

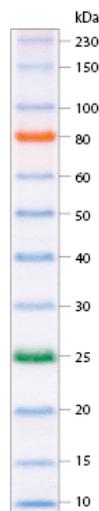


Abbildung 6: ColorPlus Prestained Protein Ladder (Quelle: NEB)

#### 4.6. Antikörper

In dieser Arbeit wurden folgende Antikörper verwendet:

- anti-human-Myosin VI (Sigma-Aldrich, KA15, Kaninchen) 2 µg/ml
- anti-human-SEC23A (selbst hergestellt, polyklonales Kaninchenserum) 1:5
- anti-human-SEC23A 2H4 (monoklonal, Ratte, Dr. Kremmer, München) 1:5
- anti-human-ZNF217 (Sigma-Aldrich, Kaninchen) 500 µg/ml
- anti-human-GAPDH (Cell Signaling, 14C10, Kaninchen) 1:1000
- anti-HA (monoklonal, Ratte, Dr. Kremmer, München) 1:200
- anti-GST (monoklonal, Ratte, Dr. Kremmer, München) 1:100
- anti-human-β-Aktin (Sigma-Aldrich, Maus) 1:5000
- anti-Ratte Meerrettichperoxidase-gekoppelt 1:5000
- anti-Maus Meerrettichperoxidase-gekoppelt 1:5000
- anti-Kaninchen Meerrettichperoxidase-gekoppelt 1:5000

#### 4.7. Patientenmaterial

Die Gewebe für die Herstellung der cDNA-Banken wurden am Institut für Pathologie der Universitätskliniken des Saarlandes in Homburg nach den aktuellen Richtlinien der ethnischen Kommission entnommen und für diese Studie zur Verfügung gestellt. Die Patientendaten sowie die Charakterisierung der Gewebe können Tabelle 3 entnommen werden.

**Tabelle 3: Übersicht der Gewebe, die für die cDNA-Banken-Herstellung verwendet wurden**

	Alter	Stadium	Gleason	Gleason Summe
<b>Pool 3 (Ca)</b>	68	pT2c	3+4	7
	60	pT3b	4+3	7
	72	pT2c	3+4	7
	64	pT2c	3+4	7
	65	pT2c	4+3	7
<b>Pool 4 (Ca)</b>	70	pT2c	3+4	7
	66	pT4	4+3	7
	63	pT2c	3+3	6
	62	pT2c	4+3	7
	64	pT2c	3+4	7

Die restlichen, für die Validierung der Sequenzierungsergebnisse verwendeten, Gewebe wurden am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums in Regensburg entnommen und anschließend die Gesamt-RNA in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wullich in Erlangen extrahiert und zur Verfügung gestellt. Tabelle 4 enthält die Patientendaten und Gewebecharakteristika der verwendeten Proben.

**Tabelle 4: Übersicht der zur Validierung verwendeten Gewebe**

Patient	Alter	Stadium	Gleason Score	Gleason Summe
A	75	3b	5 + 3	8
B	68	2c	4 + 3	7
C	56	2a	3 + 4	7
D	67	2c	3 + 4	7
E	63	3b	3 + 3	6
F	54	3a	4 + 3	7
G	74	3a	5 + 3	8
H	68	2c	3 + 2	5
I	68	2a	2 + 3	5
J	66	2a	3 + 4	7
K	69	2c	5 + 3	8
L	65	2c	3 + 4	7
M	71	3b	5 + 3	8
N	59	3b	5 + 4	9
O	58	3a	4 + 5	9
P	69	3b	5 + 3	8
Q	70	3b	4 + 5	9
R	74	3b	5 + 3	8
S	46	2a	3 + 3	6
T	62	2c	3 + 4	7
U	70	3a	3 + 5	8
V	56	3a	3 + 3	6
W	67	3b	5 + 4	9
X	66	2c	3 + 3	6
Y	68	3a	4 + 5	9
Z	69	3a	3 + 3	6

#### 4.8. Zelllinien

- 293T: Humane Nierenepithelzelllinie, die sich von HEK293 Zellen ableitet (Graham et al., 1977). Diese exprimiert zusätzlich das SV40 Large T-Antigen, welches die Expression von episomalen Plasmiden mit dem „SV40 origin of replication“ ermöglicht (Shein and Enders, 1962; Zur Hausen, 1967).
- DU145: Humane Prostatakarzinomzelllinie, die aus einer Hirnmetastase hervorgeht. Diese Zellen sind nicht hormonsensitiv und exprimieren kein PSA (Mickey et al., 1977; Stone et al., 1978). (Zur Verfügung gestellt von Dr. Jung, Homburg)
- DU145-MN1: Eine generierte Tochterlinie der Prostatakarzinomzelllinie DU145 (Bex et al., 2001).
- LNCaP: Humane androgen-sensitive Prostatakarzinomzelllinie, die aus einer Lymphknotenmetastase generiert wurde (Horoszewicz et al., 1983). (Zur Verfügung gestellt von Dr. Jung, Homburg)
- PNF-08: Prostatafibroblastenzelllinie, welche aus humanem nicht-malignem Prostatagewebe etabliert wurde. (Zur Verfügung gestellt von Dr. Unteregger, Homburg)

#### 4.9. Bakterienstämme

- E.coli*pMOSBlue: Diese Bakterien stammen aus dem „pMOSBlueT-Vektor“ Kit der Firma Amersham. Sie wurden sowohl zur Vermehrung rekombinanter DNA als auch im Blue-White Screening bei der Klonierung rekombinanter DNA eingesetzt.

---

*E.coli*BL21/DE3: Dieser *E.coli*-Stamm verfügt über eine sehr hohe Expressionsrate und wurde deshalb für die Expression rekombinanter Proteine eingesetzt (Studier and Moffatt, 1986).

#### 4.10. Nährmedien

##### 4.10.1. Bakterien

Die Kultivierung von Bakterien erfolgte in 2,5 % (w/v) zuvor autoklaviertem LB-Medium (Luria Broth Base (GIBCO)). Zum Ausstrich von Bakterien wurde 3,75 % (w/v) Luria's Agar (GIBCO) autoklaviert, in Petrischalen gegossen und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert. Zur Selektion transformierter Bakterien wurde zusätzlich Ampicillin (0,1 % [w/v]) bzw. Kanamycin (30 µg/ml) je nach Resistenzgen des zu transformierenden Plasmids dem Nährmedium hinzugefügt.

##### 4.10.2. Kulturmedien für Säugerzellen

DMEM: Zur Kultivierung von 293T-Zellen wurde "Dulbecco's Modified Eagle Medium" (PAA) mit 10 % fötalem Kälberserum und einem "4er Antibiotikum" aus 40 U/ml Penicillin-G40, 10 U/ml Moronal, 10 µg/ml Neomycinsulfat und 50 µg/ml Streptomycinsulfat versetzt.

Die Kultivierung der PNF-08-Zellkultur erfolgte in DMEM mit 10 % FKS, welches zusätzlich mit 1 % Penicillin/Streptomycin und 1 % nicht-essentieller Aminosäuren (beides PAA) ergänzt wurde.

RPMI 1640: DU145, DU145-MN1 und LNCaP-Zellkulturen wurden in RPMI 1640 gehalten, welches mit 10 % FKS und 1 % Penicillin/Streptomycin (PAA) versetzt war.

## 4.11. Vektoren

### 4.11.1. pGEM-T

Der pGEM-T® Vektor wird zur Klonierung von PCR-Produkten verwendet und resultiert aus dem durch einen *EcoR* V-Restriktionsverdau linearisierten Vektor pGEM®-5Zf (+) (Promega, Madison/Wsc.; USA). Die anschließende Ligation von je einem 3'-terminalen Thymidin ermöglicht zum einen die Klonierung von PCR-Produkten mit Adenin-Überhang und verhindert zum anderen die Rezirkularisierung des Vektors. Das high-copy-number pGEM®-T Plasmid kodiert für den Selektionsmarker Ampicillin und besitzt eine multiple Klonierungsstelle für die Klonierung von DNA-Fragmenten ohne Adenosinüberhang, welche von T7- und SP6-RNA-Polymerase-Promotoren flankiert wird. Die sogenannte MCS (multiple cloning site) befindet sich innerhalb der für das Peptid  $\beta$ -Galaktosidase kodierenden Region. Durch Ligation von Inserts wird dieses Gen zerstört, wodurch eine Unterscheidung inserthaltiger Klone von insertlosen in einer Blau-Weiß-Selektion ermöglicht wird.

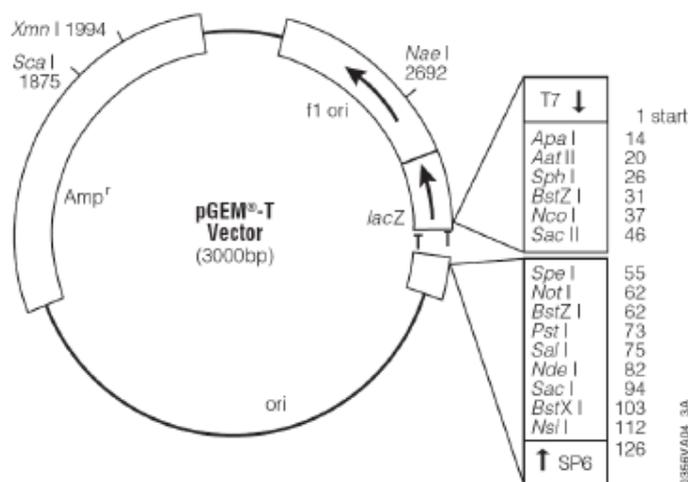


Abbildung 7: pGEM-T Vektor der Firma Promega zur Klonierung von PCR-Produkten (Quelle: Promega)

### 4.11.2. pCEP4

Der pCEP4-Vektor der Firma Invitrogen ist ein episomal replizierender Vektor, welcher einen Cytomegalo-virus (CMV) Promotor besitzt und so eine hohe Transkriptionsrate rekombinant in die Multiple-Cloning-Site inserierter Gene ermöglicht. Der Epstein-Barr Virus Replikationsursprung (OriP) und das EBNA-1 Gen

erlauben eine extrachromosomale Replikation in humanen sowie in Primaten- und Kaninchenzellen. Neben einer Ampicillinresistenzgen enthält dieser Vektor eine Hygromycin-Genkassette, welche eine stabile Transfektion von Zellen ermöglicht.

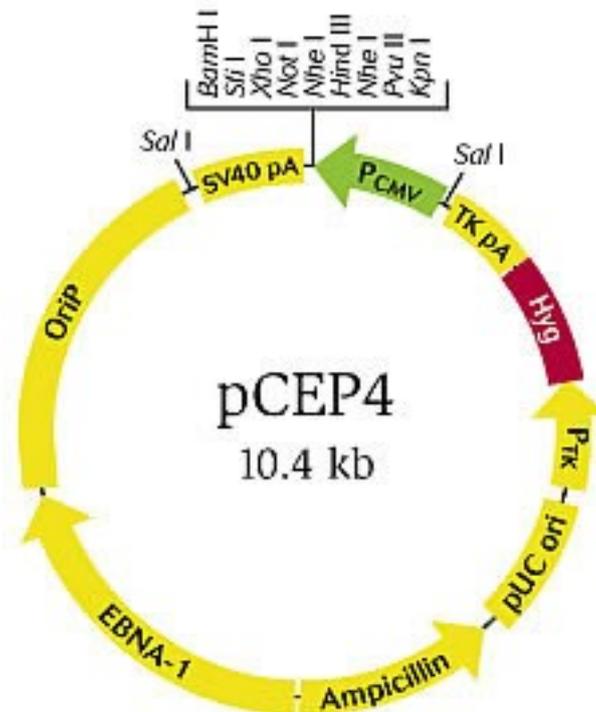


Abbildung 8: pCEP4-Expressionsplasmid der Firma Invitrogen (Quelle: Invitrogen)

#### 4.11.3. pSG5

Der eukaryotische Expressionsvektor pSG5 der Firma Stratagene ist ein high-copy Expressionsplasmid, welches sowohl für *in vivo* als auch für *in vitro* Expressionen einsetzbar ist. Der SV40 Promotor, das  $\beta$ -Globin-Intron und das SV40 Polyadenylierungssignal ermöglichen eine effiziente Expression *in vivo* und der T7-Promotor erleichtert die *in vitro* Transkription klonierter Inserts. Weiterhin besitzt der pSG5-Vektor einen prokaryotischen Replikationsursprung (pUC ori) für die autonome Replikation in Bakterien und einen „ori“ (origin of replication) aus dem filamentösen Phagen f1, welcher die Synthese von Einzelstrang-DNA ermöglicht. Die Klonierung von DNA-Fragmenten erfolgt über die Multiple Cloning-Site (MCS), welche die Schnittstellen *EcoRI*, *BamHI* und *BglII* enthält und die Selektion transformierter Bakterien wird durch das enthaltene Ampicillinresistenzgen gewährleistet.

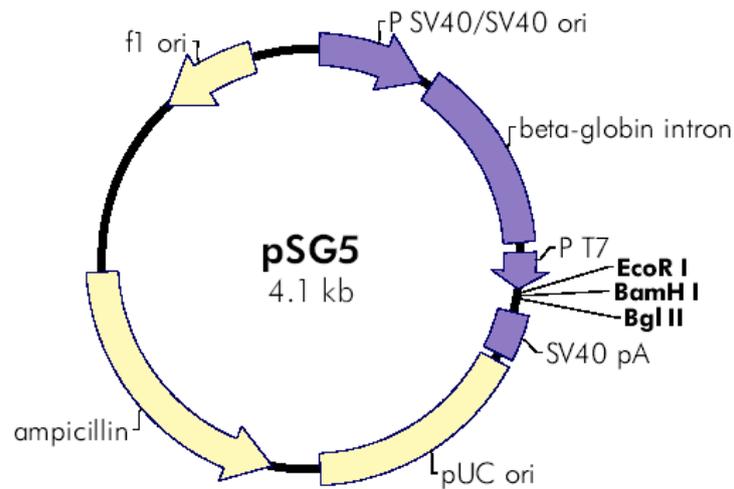


Abbildung 9: pSG5-Expressionsplasmid der Firma Stratagene (Quelle: Stratagene)

#### 4.11.4. pSG5-HA-C1

Dieser Vektor unterscheidet sich nur geringfügig vom pSG5 Expressionsplasmid. Der Ausgangsvektor wurde mit einer Linker-Sequenz modifiziert und enthält eine erweiterte MCS, die zusätzlich am Ende ein "HA-tag" besitzt. Dies ermöglicht z.B. einen Nachweis des klonierten und exprimierten Proteins mit einem HA-Antikörper in der SDS-PAGE. Die erweiterte MCS entspricht derjenigen des Vektors pEGFP-C1 und erlaubt somit ein unkompliziertes Umklonieren des Inserts.

#### 4.11.5. pGEX-4T-1

Der pGEX-4T-1 Vektor der Firma GE Healthcare ermöglicht die Herstellung von Fusionsproteinen mit der 26 kDa großen Gluthation-S-Transferase (GST). Hierfür besitzt das Plasmid eine Multiple-Cloning-Site, die direkt hinter dem GST-Gen liegt und außerdem eine Thrombin-Erkennungssequenz beinhaltet. Das GST-Fusionsprotein steht unter der Kontrolle eines chemisch induzierbaren tac-Promotors, der eine hohe Expressionsrate gewährleistet. Desweiteren enthält der Vektor ein *E.coli*/BR322 „ori“, ein Ampicillinresistenzgen sowie ein lac I<sup>q</sup> Markergen, welches ein Blau-Weiß-Screening ermöglicht.

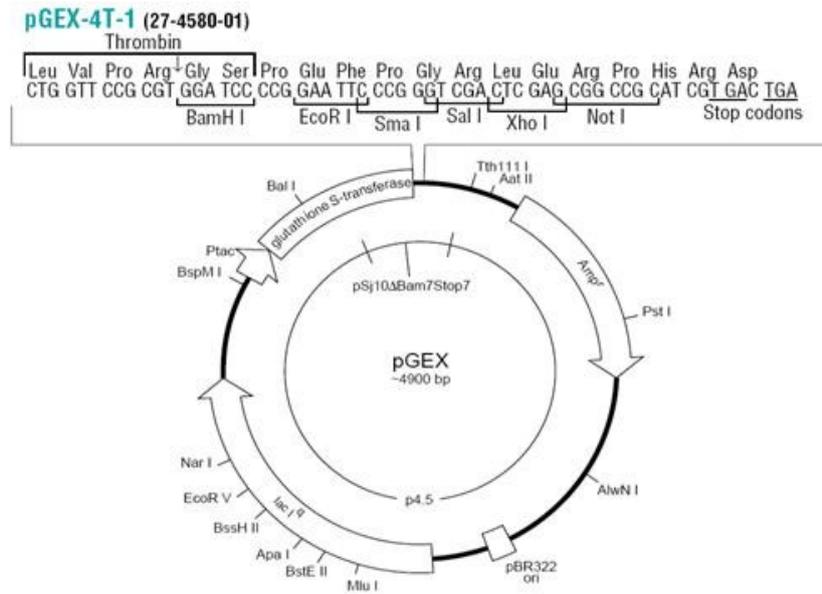


Abbildung 10: Vektorkarte von pGEX-4T-1 (Quelle: GE Healthcare)

#### 4.11.6. pEGFP-C1

Der Vektor pEGFP-C1 (Clontech) ermöglicht die transiente oder stabile Expression von EGFP in Zellen durch eine Kanamycin-/ Neomycin-Selektion. Durch Klonieren spezifischer DNA-Fragmente in die MCS, können EGFP-Fusionsproteine mit Hilfe des CMV-Promotors exprimiert werden.

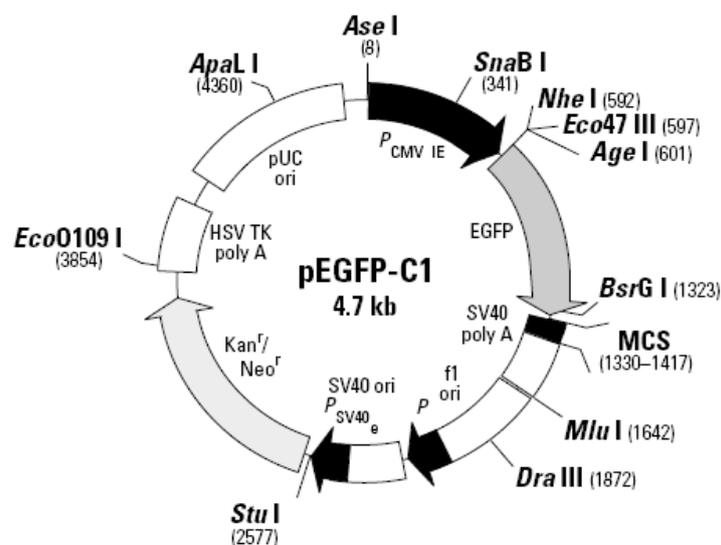


Abbildung 11: Vektorkarte von pEGFP-C1 (Quelle:Clontech)

Durch Anregung bei einer Wellenlänge von 488 nm kann die maximale Emission des EGFP-Chromophors bei 507 nm im Durchflusszytometer oder im

Fluoreszenzmikroskop detektiert und somit z.B. die Transfektionsrate ermittelt werden.

#### 4.11.7. pGL3-promoter

Der pGL3-promoter Vektor (Promega) ermöglicht eine quantitative Analyse von Faktoren, die in der Genregulation eine Rolle spielen. Das Plasmid besitzt ein modifiziertes Gen für die firefly Luciferase (*luc+*) und eine MCS mit deren Hilfe regulatorische Sequenzen, wie z.B. 3'UTRs, hinter das Luciferase-Gen kloniert werden können. Desweiteren sind ein Ampicillinresistenzgen als Selektionsmarker, ein Replikationsursprung („ori“) zur autonomen Replikation in Bakterien und ein „f1 ori“ zur Herstellung einzelsträngiger DNA vorhanden. Außerdem enthält der Vektor einen SV40 Promotor und ein SV40 Polyadenylierungssignal zur Termination der Transkription.

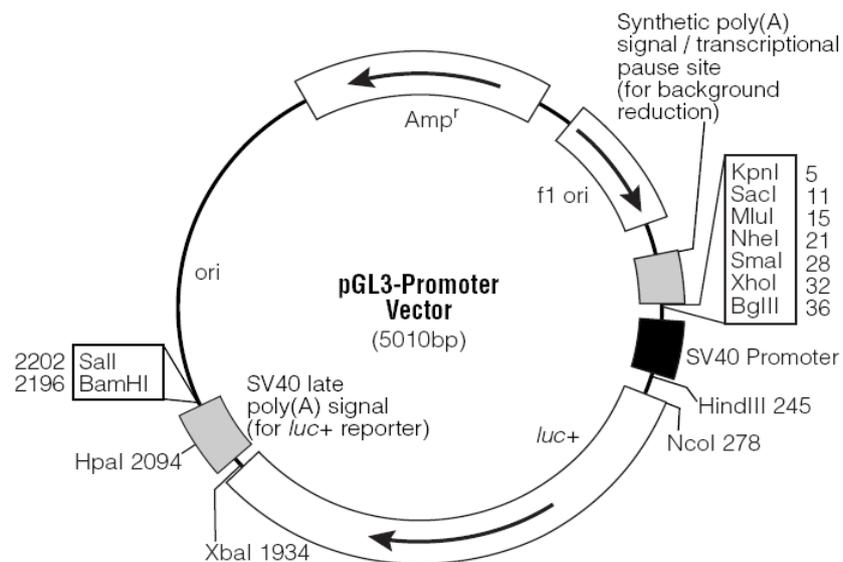


Abbildung 12: Vektorkarte von pGL3-promoter (Quelle:Promega)

#### 4.11.8. pMIR-REPORT™

Durch das Klonieren einer spezifischen 3'UTR-Sequenz hinter das Firefly-Luciferase-Gen ermöglicht der pMIR-REPORT™ Vektor (Ambion) die Analyse von miRNA-Effekten auf ihre Ziel-mRNAs. Der in dieser Arbeit eingesetzte Reportervektor pMIR-RNL-TK entspricht nicht dem Originalvektor pMIR-REPORT™, sondern ist ein modifiziertes Plasmid welches von der Arbeitsgruppe Meister (Max-Planck-Institut, Martinsried) zur Verfügung gestellt wurde. Hier wurde zusätzlich ein Gen für die

Renilla-Luciferase unter der Kontrolle eines TK-Promoters in den Vektor kloniert, wodurch eine interne Normalisierung ermöglicht wird, die mögliche Unterschiede in der Transfektionseffizienz zwischen verschiedenen Ansätzen ausgleicht.

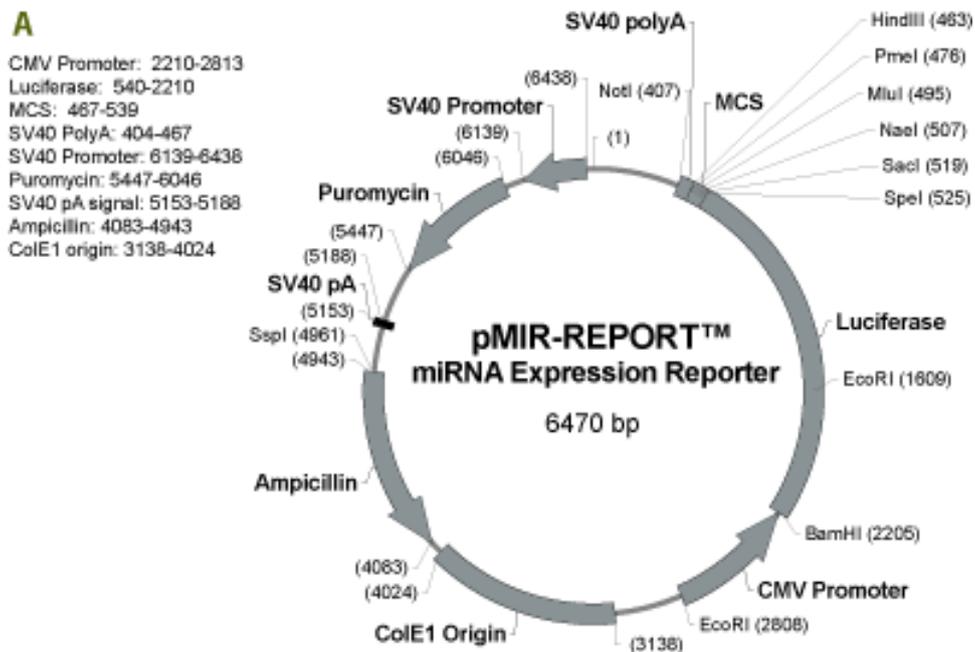


Abbildung 13: Schematische Darstellung des pMIR-REPORT™ Vektors (Ambion)

#### 4.11.9. Vollängen-cDNA-Klone

SEC23A-cDNA: Vollängen-cDNA-Klon von SEC23A inklusive 5'UTR und 3'UTR im eukaryotischen Expressionsvektor pBluescriptR (imaGenes, IRATp970H0924D).

SEC23B-cDNA: Vollängen-cDNA-Klon von SEC23B im Expressionsvektor pCMV-SPORT6, der die vollständige 5'UTR und Teile der 3'UTR enthält (imaGenes, IRATp970E064D).

#### 4.11.10. miRNA-Expressionsplasmide

Alle miRNA-Expressionsplasmide wurden aus humaner, genomischer DNA aus Blut amplifiziert. Neben der miRNA-Vorläufer-Sequenz wurden zusätzlich rechts und links mindestens 100 bp kloniert um eine Expression bzw. Prozessierung der miRNAs zu gewährleisten. Für die Amplifikation von miR-375 diente ein synthetisiertes Oligonukleotid (Geneart) als Template-DNA. Folgende von Dr. Natalie Motsch hergestellten miR-Expressionskonstrukte wurden in dieser Arbeit verwendet:

**miR-143:** Dieses pSG5-Expressionskonstrukt trägt ein 406 bp großes Insert, welches die genomische Sequenz des Vorläufermoleküls von miR-143 beinhaltet.

**miR-200c:** Insgesamt 340 bp der genomischen Region, welche die Vorläufersequenz von miR-200c enthält, wurden amplifiziert und in den Expressionsvektor pSG5 kloniert.

**miR-23a/27a:** Das 580 bp große Amplifikat, welches in den pSG5-Expressionsvektor kloniert wurde, enthält die Vorläufersequenz des miR-23a/27a-Clusters, aus dem beide miRNAs prozessiert werden können.

In Tabelle 5 sind alle selbst hergestellten miRNA-Expressionsplasmide zusammengefasst, einschließlich der verwendeten Schnittstellen, Primer und der daraus resultierenden Amplifikatgröße.

**Tabelle 5: Klonierte miRNA-Expressionskonstrukte einschließlich der zur Amplifikation verwendeten Oligonukleotide**

miRNA	Primernamen	Oligosequenz	Schnittstellen	Größe
miR-1	5'miR1_eco 3'miR1_bam	5'-GGAATTCGTGCCTGCTCACACAGAGAGGGCT-3' 5'-CGGGATCCACTTCCACCTGCTGACACAGGCAA-3'	<i>EcoR</i> I <i>BamH</i> I	411 bp
miR-145	5'miR145_Eco 3'miR145_Bam	5'-GGAATTC <sup>CC</sup> CAGAGCAATAAGCCACATCC-3' 5'-CGGGATCC <sup>CG</sup> GAAACATGGTTCATAAGCCCTCT-3'	<i>EcoR</i> I <i>BamH</i> I	355 bp
miR-24	5'miR24_Eco 3'miR24_Bam	5'-CGAATTC <sup>TT</sup> GTTCTGGGCGCGGTGAACTC-3' 5'-CGGGATCC <sup>CC</sup> CATGCAGATGACTGGCACC-3'	<i>EcoR</i> I <i>BamH</i> I	362 bp

miR-27b	5'miR-27b_Eco 3'miR-27b_Bam	5'-CGGAATTCGCTCCTCCAGAAACCGTGGTTCG-3' 5'-CGGGATCCGACAGTGCATCCTTGGGGTCAAG-3'	EcoR I BamH I	389 bp
miR-29a	5'miR29a_Eco 3'miR29a_Bam	5'-CGAATTCAGAGACTTGAGCATCTGTGGA-3' 5'-CGGGATCCACATGCAATTCAGGTCAGTGA -3'	EcoR I BamH I	504 bp
miR-375	5'miR-375_Eco 3'miR-375_Bam	5'-CGGAATTCGAGGGTGGCTGGGAAAGGAG-3' 5'-CGGGATCCGAATGGAGCCTGGCAGCCCA -3'	EcoR I BamH I	460 bp

#### 4.11.11. Reporterplasmide

pGL3-MYO6 3'UTR: Bei diesem Konstrukt wurden die ersten 1349 bp der 3'UTR von MYO6 hinter das Firefly-Luciferase-Gen in pGL3-promoter kloniert. Die Amplifikation des Inserts erfolgte mit spezifischen Primern und genomischer DNA als Template. Anschließend wurde das Fragment mit Hilfe von *Age* I und *Pml* I in die MCS des pGL3-promoter kloniert.

pGL3-MYO6 mut I: Durch eine zielgerichtete Mutagenese mit spezifischen Primern wurde die zur miR-145 komplementäre Sequenz in der 3'UTR von MYO6 (Basen 366-375) ausgetauscht.

pGL3-MYO6 mut II: Bei diesem Vektor wurden die zur Ziel-Sequenz der miR-145 komplementären Basen 801-810 innerhalb der MYO6 3'UTR mit Hilfe von spezifischen Primern durch eine zielgerichtete Mutagenese ausgetauscht.

pGL3-MYO6 mut I+II: Dieses Plasmid enthält die MYO6 3'UTR, bei der beide miR-145-Target-Sequenzen durch zielgerichtete Mutagenese ausgetauscht wurden.

pGL3-MYO6 mut 143: Dieses Konstrukt resultiert aus der zielgerichteten Mutation der zur miR-143-Ziel-Sequenz komplementären Basen 832-841 der MYO6 3'UTR mit Hilfe von spezifischen Primern.

- 
- pMIR-SEC23A 3'UTR: Klonierung der kompletten 3'UTR sowie der letzten 208 bp der kodierenden Sequenz von SEC23A hinter das Firefly-Luciferase-Gen des Vektors pMIR-RNL-TK. Die Amplifikation erfolgte mit spezifischen Primern aus einer testis-cDNA und das PCR-Produkt wurde anschließend mit Hilfe von *Spe I* und *Sac I* in die MCS des Vektors kloniert.
- pMIR-SEC23A mut I: Zielgerichtete Mutation der zur miR-200c-Seed-Sequenz komplementären Basen 854-860 der SEC23A 3'UTR mit Hilfe von spezifischen Primern.
- pMIR-SEC23A mut II: Bei diesem Konstrukt wurden die zur Seed-Sequenz der miR-200c komplementären Basen 944-951 innerhalb der SEC23A 3'UTR mit Hilfe von spezifischen Primern durch eine zielgerichtete Mutagenese ausgetauscht.
- pMIR-SEC23A mut I+II: Dieser Vektor beinhaltet die SEC23A 3'UTR, bei der beide zur Seed-Sequenzen der miR-200c komplementären Basen durch zielgerichtete Mutagenese ersetzt worden sind.
- pMIR-SEC23A mut 375: Mit Hilfe einer zielgerichteten Mutagenese und spezifischen Primern wurde die zur miR-375 komplementäre Sequenz in der 3'UTR von SEC23A (Basen 185-191) ausgetauscht.
- pMIR-ZNF217 3'UTR: Dieser Vektor enthält die Basen 1054-1949 der ZNF217 3'UTR hinter dem Firefly-Luciferase-Gen. Diese 895 bp wurden mit spezifischen Primern aus genomischer DNA amplifiziert und über *Spe I* und *Sac I* in die MCS des Vektors kloniert.

- 
- pMIR-ZNF217 mut: Durch eine zielgerichtete Mutagenese mit spezifischen Primern wurde die zur miR-24 komplementäre Sequenz in der 3'UTR von ZNF217 (Basen 1602-1610) ausgetauscht.
- pMIR-BRD2 3'UTR: Dieses Konstrukt enthält die komplette 3'UTR und die letzten 106 bp der kodierenden Sequenz von BRD2. Das 841 bp lange Insert wurde mit Hilfe von spezifischen Primern und testis-cDNA als Template amplifiziert und über *Spe* I und *Nae* I hinter das Firefly-Luciferase-Gen des Vektors pMIR-RNL-TK kloniert.
- pMIR-GOLPH2 3'UTR: Klonierung der 3'UTR von GOLPH2 sowie der letzten 66 bp der kodierenden Sequenz hinter das Firefly-Luciferase-Gen in pMIR-RNL-TK. Das 1459 bp große PCR-Produkt wurde über *Spe* I und *Sac* I in die MCS des Vektors kloniert.
- pMIR-JMJD2B 3'UTR: Das Plasmid enthält die Basen 1-969 der 3'UTR und die letzten 159 bp der kodierenden Sequenz von JMJD2B. Das 1128 bp lange Insert wurde mit Hilfe von spezifischen Primern und testis-cDNA als Template amplifiziert und über *Spe* I und *Sac* I hinter das Firefly-Luciferase-Gen des Vektors pMIR-RNL-TK kloniert.
- pMIR-TOP1 3'UTR: Dieses Konstrukt enthält die komplette 3'UTR und die letzten 56 bp der kodierenden Sequenz von TOP1. Das 1164 bp lange PCR-Produkt wurde mit Hilfe von spezifischen Primern und genomischer DNA als Template amplifiziert und über *Spe* I und *Sac* I hinter das Firefly-Luciferase-Gen des Vektors pMIR-RNL-TK kloniert.

#### 4.12. Effektorplasmide

- pGEX-SEC23A:** Bei diesem Plasmid wurden 1116 bp, die für die Aminosäuren 71-442 von SEC23A kodieren, mit Hilfe von spezifischen Primern und der SEC23A-cDNA als Template amplifiziert und über *BamH I* und *EcoR I* in die MCS des Vektors pGEX-4T-1 kloniert.
- pSG5-HA-SEC23A:** Dieser Vektor enthält die vollständige kodierende Sequenz von SEC23A. Die Amplifikation des Inserts erfolgte mit spezifischen Primern und der SEC23A-cDNA als Template. Anschließend wurde das Fragment mit Hilfe von *Xho I* und *BamH I* in die MCS des modifizierten pSG5 kloniert.
- pSG5-HA-SEC23B:** Die vollständige kodierende Sequenz von SEC23B wurde mit Hilfe spezifischer Primer und der SEC23B-cDNA amplifiziert und durch *EcoR I* und *BamH I* in die MCS des pSG5-HA Plasmids kloniert.
- pCEP4-SEC23A:** Dieses Konstrukt enthält die vollständige kodierende Sequenz von SEC23A, welche mit Hilfe spezifischer Primer und der SEC23B-cDNA amplifiziert und durch *Xho I* und *BamH I* in die MCS des pCEP4 Vektors kloniert wurde.

#### 4.13. Oligonukleotide

Zur Klonierung der oben genannten Reporter- und Effektorplasmide wurden folgende Oligonukleotide von MWG Biotech eingesetzt:

5'MYO6-3'UTR_Age	5'-ACCGGTCACACCAGCCTTACAGCTGGG-3'
3'MYO6-3'UTR_Pml	5'-CACGTGGGCTCACAAACTAGTCAGC-3'
5'MYO6-3'UTR_Mut_I	5'-GCACAGTACCATGCGATATCTCTAATAAAACATGAGC-3'

---

3'MYO6-3'UTR_Mut_I	5'-GCTCATGTTTTATTAGAGATATCGCATGGTACTGTGC-3'
5'MYO6-3'UTR_Mut_II	5'-GGCATAGTGGCTAGCCGCGGAGGAATTCAAATATTC-3'
3'MYO6-3'UTR_Mut_II	5'-GAATATTTGAATTCCTCCGCGGCTAGCCACTATGCC-3'
5'MYO6-3'UTR_Mut_143	5'-CAAATATTCTTTCAATCGATATCGTATAGTGATTTTTG-3'
3'MYO6-3'UTR_Mut_143	5'-CAAAAATCACTATACGATATCGATTGAAAGAATATTTG-3'
5'SEC23-3'UTR_Spe	5'-GGACTAGTCACTCCAGATTTCCAATGC-3'
3'SEC23-3'UTR_Sac	5'-CGAGCTCGTGGCATTTAGGCCTAGCGTA-3'
5'SEC23-3'UTR_Mut_I	5'-GCATTATATCCTTACACGTGTTAACACTATTTTGGCAG-3'
3'SEC23-3'UTR_Mut_I	5'-CTGCCAAAATAGTGTTAACACGTGTAAGGATATAATGC-3'
5'SEC23-3'UTR_Mut_II	5'-GTGGTTCTTATTGAACGGTCGACATATAATGTTTGC-3'
3'SEC23-3'UTR_Mut_II	5'-GCAAACATTATATGTCGACCGTTCAATAAGAACCAC-3'
5'SEC23-3'UTR_Mut_375	5'-GAGAGCAATAACGTGACTTTATTTTGCTTACC-3'
3'SEC23-3'UTR_Mut_375	5'-GGTAAGCAAATAAAGTCGACGTTATTGCTCTC-3'
5'ZNF217-3'UTR_Spe	5'-GACTAGTTGGCATTGGGTGAACTGTGG-3'
3'ZNF217-3'UTR_Sac	5'-CGAGCTCGAAGTACAAAGGGCTGTAGGA-3'
5'ZNF217-3'UTR_Mut	5'-CCTGTTCCACAACACACGTGGTATGTACATAATCTAG-3'
3'ZNF217-3'UTR_Mut	5'-CTAGATTATGTACATACCACGTGTGTTGTGAACAGG-3'
5'BRD2-3'UTR_Spe	5'-GGACTAGTCGCAAGTAGCAGTGTACAC-3'
3'BRD2-3'UTR_Nae	5'-CAGCCGGCCACAGCAAAGCCTACTG-3'
5'GOLPH2-3'UTR_Spe	5'-GACTAGTGAAGATCAGAAAAGAGACACC-3'
3'GOLPH2-3'UTR_Sac	5'-CGAGCTCGCTTCAGTGACTGTGTGCCTG-3'
5'JMJD2B-3'UTR_Spe	5'-GACTAGTACCGCAGGAGCCCGCCTTCTC-3'
3'JMJD2B-3'UTR_Sac	5'-CGAGCTCCACTACCAACCAGAAGGGCCT-3'
5'TOP1-3'UTR_Spe	5'-GGACTAGTAAGTTTGCCTGGGCCATTGAC-3'
3'TOP1-3'UTR_Sac	5'-CGAGCTCGTGTGGGAAATGGACTCTGCAC-3'
5'SEC23A_GEX_Bam	5'-CGGGATCCAATCCTTTATGTCAAGTG-3'
3'SEC23A_GEX_Eco	5'-CGGAATTCGCCACCTGTTCCCTATCTC-3'
5'SEC23A_HA_Xho	5'-CCGCTCGAGCAATGACAACCTATTTGG-3'
3'SEC23A_HA_Bam	5'-CGGGATCCAGCAGCACTGGACACAGCAAG-3'
5'SEC23B_HA_Eco	5'-CGGAATTCGATGGCGACATACCTGGAGT-3'
3'SEC23B_HA_Bam	5'-CGGGATCCACAGGCACTGGAGACAGCCAG-3'
5'SEC23A_Xho	5'-CCGCTCGAGCAATGACAACCTATTTGG-3'
3'SEC23A_Bam	5'-CGGGATCCTCAAGCAGCACTGGACACAGC-3'

Die Herstellung von spezifischen Sonden zur miRNA-Detektion im Northern Blot erfolgte mit folgenden Oligonukleotiden:

Sonde miR-1	5'-TGGAATGTAAAGAAGTATGTATCCTGTCTC-3'
Sonde miR-126	5'-TCGTACCGTGAGTAATAATGCGCCTGTCTC-3'
Sonde miR-143	5'-TGAGATGAAGCACTGTAGCTCCCTGTCTC-3'
Sonde miR-145	5'-GTCCAGTTTTCCCAGGAATCCCTCCTGTCTC-3'
Sonde miR-200c	5'-TAATACTGCCGGGTAATGATGGACCTGTCTC-3'
Sonde miR-24	5'-TGGCTCAGTTCAGCAGGAACAGCCTGTCTC-3'
Sonde miR-27b	5'-TTCACAGTGGCTAAGTTCTGCCCTGTCTC-3'
Sonde miR-29a	5'-TAGCACCATCTGAAATCGGTTACCTGTCTC-3'
Sonde miR-375	5'-TTTGTTTCGTTCCGGCTCGCGTGACCTGTCTC-3'

Folgende Primer wurden zur Amplifikation spezifischer cDNA-Sequenzen in der Real-Time PCR eingesetzt:

5'-SEC23A_RT	5'-AGTCAACCCTTCACAGACTCATAA-3'
3'-SEC23A_RT	5'-TCATCTGTAAGAATAGGTGCTCCA-3'
5'-ZNF217_RT	5'-TTGTGTGCCTGCTGGTAGTC-3'
3'-ZNF217_RT	5'-CTCTTTTGTGCCATGCTGTTAG-3'
5'-GAPDH_RT	5'-GGTTGAGTTTAAGCCAATCCA-3'
3'-GAPDH_RT	5'-GGTTGAGTTTAAGCCAATCCA-3'
5.8sRNA	5'-CTACGCCTGTCTGAGCGTCGCTT-3'
qRTmiR-143	5'-TGAGATGAAGCACTGTAGCTC-3'
qRTmiR-145	5'-GTCCAGTTTTCCCAGGAATCCCTAA-3'
qRTmiR-200c	5'-TAATACTGCCGGGTAATGATGGA-3'
qRTmiR-24	5'-TGGCTCAGTTCAGCAGGAACAG-3'
qRTmiR-375	5'-TTTGTTTCGTTCCGGCTCGCGTGAAA-3'

#### 4.14. Peptide

Für die Generierung von monoklonalen SEC23A-Antikörpern wurden Louc/C Ratten mit einem synthetisch hergestellten Peptid (PSL, Heidelberg) immunisiert. Dieses Peptid entspricht den Aminosäuren 205-230 des SEC23A-Proteins:

NH<sub>2</sub>-GLSKVPLTQATRGPQVQQPPPSNRFL-C-CO<sub>2</sub>

#### 4.15. Software

Zur Textverarbeitung diente Microsoft Word 2007™ (Microsoft Corp.). Die Auswertung und Zusammenfassung der Sequenzdatenbanken sowie der Luciferase-Assays und Real-Time PCRs wurde in Microsoft Excel 2007™ durchgeführt (Microsoft Corp.). Die Grafiken wurden mit Hilfe des Programms CorelDRAW X3™ (Corel Corp.) erstellt. Die Internetseiten des *NCBI* (National Center Of Biotechnology Information: [www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/)), sowie angeschlossene Dienste wurden verwendet um Nukleotid-Sequenzabgleiche durchzuführen. Die Abbildungen und die statistische Auswertung der Luciferase-Assays wurden mit dem Programm Sigma Plot 10.0 (Systat Software) erstellt. FACS-Analysen wurden mit Hilfe des Programmes CellQuest 3.1 (BD Bioscience) durchgeführt. Die Software ImageQuant (Version 5.1) diente der Bearbeitung und Quantifizierung der Northern Blots, die Software Quantity One (Biorad) hingegen wurde für die Analyse von Western Blots eingesetzt. Zur *in silico* Vorhersage von miRNA Targets wurden die Programme TargetScan (<http://www.targetscan.org/>), PicTar (<http://pictar.mdc-berlin.de/>), microRNA.org (<http://www.microrna.org>) und RNAhybrid (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid>) herangezogen.

## 5. Methoden

### 5.1. Bakterielle Zellkultur

#### 5.1.1. Aufzucht und Lagerung von Bakterien

Die Vermehrung von Plasmid-DNA erfolgte durch Transformation von Bakterien mit dem entsprechenden Plasmid, anschließendes Animpfen von 50-100 ml LB-Medium und dessen Inkubation auf einem Schüttler über Nacht bei 37°C. Für analytische Zwecke wurden transformierte Bakterien zunächst auf einer LB-Agarplatte ausplattiert, über Nacht bei 37°C inkubiert und am nächsten Tag 2 ml LB-Medium mit einer Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Zum Animpfen des Mediums können auch Bakterien aus der Stammhaltung (DMSO-Stocks) benutzt werden. Die Langzeitlagerung von Bakterien erfolgte nach Zugabe von 20 % (v/v) DMSO zu 400µl Bakteriensuspension bei -70°C. Die Lagerung von LB-Agarplatten erfolgte nach Abdichtung mit Parafilm kurzfristig bei 4 °C.

#### 5.1.2. Herstellung kompetenter Bakterien (CaCl<sub>2</sub>/RbCl-Methode)

(Kushner, 1978)

Bakterien sind natürlicherweise nicht befähigt, Fremd-DNA aufzunehmen, zeigen somit keine Kompetenz. Um Plasmid-DNA in Bakterien einbringen zu können um eine effiziente Plasmid-Amplifikation zu ermöglichen erfolgte eine Kompetenzinduktion mit Hilfe der Rubidium-Methode.

30 ml SOB-Medium (pur) wurde mit 300 µl MgCl<sub>2</sub>-Lösung versetzt, mit 50 µl einer auf Eis aufgetauten *E.coli*-pMOS-Suspension angeimpft und über Nacht auf einem Schüttler bei 37°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 200 ml SOB-Medium (pur) mit 8 ml der Vorkultur angeimpft und bei 37°C geschüttelt bis die Zellsuspension eine OD<sub>550</sub> von ~0,3 aufwies. Anschließend wurden die Bakterien für 15 min auf Eis abgekühlt, 10 min bei 3000 rpm und 4 °C pelletiert und jedes Pellet in je 16 ml Transformationspuffer 1 resuspendiert. Nach einer erneuten Inkubation von 15 min auf Eis wurden die Zellen wiederum für 10 min bei 3000 rpm und 4 °C zentrifugiert und jeweils in 4 ml Transformations-Lösung 2 resuspendiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension in Eppendorfgefäße aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Bakterien erfolgte bei -70 °C.

### 5.1.3. Transformation kompetenter Bakterien

(Lederberg and Cohen, 1974)

Mit Hilfe des Hitzeschocks können kompetente Bakterien dazu gebracht werden, fremde Plasmid-DNA aufzunehmen. Dazu wurden 50 µl einer kompetenten, auf Eis aufgetauten Bakteriensuspension mit 1 µg der gewünschten Plasmid-DNA bzw. 10 µl eines Ligationsansatzes versetzt und 20 min auf Eis inkubiert. Es erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 90 s im Wasserbad, wodurch die Bakterienzellwand kurzfristig permeabel wird und die Plasmid-DNA vom Bakterium aufgenommen werden kann, wobei dieser Mechanismus noch nicht vollständig aufgeklärt ist. Nach Abkühlen der Suspension auf Eis wurde diese nach Zugabe von 100 µl antibiotikafreiem LB-Medium 30 min bei 37°C inkubiert um den durch den Hitzeschock gestressten Bakterien das Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase zu erleichtern und somit eine höhere Bakterienausbeute zu gewährleisten. Diese sogenannte Vorkultur wurde daraufhin entweder auf einer LB-Agarplatte ausplattiert oder zum Animpfen einer Hauptkultur verwendet und über Nacht bei 37°C inkubiert bzw. geschüttelt. Die transformierten Bakterien konnten je nach dem Resistenzgen, für welches das jeweilige Plasmid kodierte, selektioniert werden. In dieser Arbeit wurden LB-Agarplatten oder LB-Medium mit 0,1 % [w/v] Ampicillin oder mit 30 µg/ml Kanamycin versetzt

### 5.1.4. Blau-Weiß-Selektion

Diese Screening-Methode beruht auf einer enzymatischen Reaktion, bei der das Substrat X-Gal in Anwesenheit des Induktors IPTG (Isopropylthiogalaktosid) durch das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase zu einem blauen Produkt umgewandelt wird. Mit dieser sogenannten Blau-Weiß-Selektion lässt sich z.B. der Erfolg einer Ligation nachweisen. Allerdings muss der verwendete Bakterienstamm  $\beta$ -Galaktosidase-defizient sein (z.B. pMOS), das aufgenommene Plasmid eine MCS (multiple cloning site) innerhalb des  $\beta$ -Galaktosidase-Gens (*lacZ*) tragen (z.B. pGEM-T) und die LB-Agarplatten mit X-Gal und IPTG vorbehandelt sein. Bei erfolgreicher Ligation wurde ein Insert in die multiple cloning site kloniert und das *LacZ*-Gen unterbrochen. Die entsprechende Bakterienkolonie konnte keine  $\beta$ -Galaktosidase produzieren und blieb weiß, wo hingegen Bakterien, die das Plasmid ohne Insert trugen, blaue Kolonien bildeten.

## **5.2. Eukaryotische Zellkultur**

### **5.2.1. Kultur adhärenter Monolayer-Zellkulturen**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ausschließlich mit Monolayer-Zellkulturen gearbeitet. Monolayer-Zellen wachsen adhärent auf Unterlagen. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen (75 cm<sup>2</sup>) bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank kultiviert. Normalerweise wurden 293-T-, DU145- und DU145-MN1-Zellen montags und freitags 1:10, LNCaP-Zellen 1:5 und die Fibroblastenlinie PNF-08 1:3 in neue Flaschen gesplittet. Hierbei wurde zunächst der Zellrasen nach steriler Mediumabnahme mit 1 ml Trypsin/EDTA gespült um Mediumreste vollständig zu entfernen und anschließend mit 1 ml Trypsin für wenige Minuten bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert um die Zellen abzulösen und sie zu vereinzeln. Zum Abstoppen der Trypsin-Reaktion wurde FKS-haltiges Medium hinzugegeben, ein Teil dieser Suspension in eine neue Flasche passagiert und mit supplementiertem Medium auf 20 ml Gesamtvolumen aufgefüllt.

### **5.2.2. Zellzahlbestimmung mittels CASY**

Um eine effiziente Transfektion von Monolayer-Kulturen zu gewährleisten wurde die Zellzahl vor der Transfektion bestimmt. 7 µl der zu messenden Zellsuspension wurden in 7 ml Elektrolytlösung (CASYTon™) resuspendiert und im CASY™-Counter (Schade) gemessen. Die Zellzahl, Größe und Membranintegrität der Zellen verändern den Widerstand der Lösung innerhalb der Messkapillare und werden in einem Histogramm graphisch dargestellt.

### **5.2.3. Transfektion eukaryotischer Zellen mit Nanofectin**

Bei Nanofectin™ handelt es sich um ein DNA-Transfektionsreagenz, das sich durch eine hohe Transfektionseffizienz und geringe Zytotoxizität auszeichnet. Es besteht aus einem positiv geladenen Polymer, welches von einem porösen Nanopartikel umschlossen ist. Die zu transfizierende DNA kann an das Polymer binden und dieser Nanopartikel-Polymer-DNA-Komplex somit von den Zellen über Endocytose aufgenommen werden, während die DNA durch den Nanopartikel-Komplex vor Degradation geschützt ist. Adhärenente Zellen wurden laut Vorschrift ausgesät, nach

24 Stunden transfiziert und 48 Stunden nach der Transfektion geerntet und weiterverwendet.

#### **5.2.4. Transfektion eukaryotischer Zellen mit Lipofectamine™**

Lipofectamine™ ist ein Transfektionsreagenz von Invitrogen zur Transfektion von eukaryotischen Zellen mit DNA/siRNA. Das Reagenz setzt sich zusammen aus mehrfach positiv geladenen und neutralen Lipiden im Verhältnis 3:1. Diese Lipide können die zu transfizierende DNA in Form von Liposomen umschließen und werden anschließend von der Zelle aufgenommen. LNCaP-Zellen wurden laut Vorschrift in einer Verdünnung von 1:3 in 6-Loch-Platten ausgesät, 24 h später mit 2 µg DNA bzw. 15 µg Lipofectamine™ und 48 h danach geerntet.

### **5.3. DNA-Techniken**

#### **5.3.1. Isolierung von Plasmid-DNA**

##### **5.3.1.1. Analytische Isolierung von Plasmid-DNA (Boiling Präparation)**

(modifiziert nach Birnboim and Doly, 1979)

Bei der sogenannten „Boiling-Präparation“ erfolgte die Isolation von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab. Hierbei wurden 2 ml einer Ampicillin-haltigen LB-Flüssigkultur mit einer einzelnen Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurde die Zellsuspension in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt, 5 min bei 5000 rpm und 4°C zentrifugiert und das entstandene Pellet in 200 µl STET-Puffer resuspendiert. Nach der Lyse der Bakterien, die durch Zugabe von 1 µl Lysozym (0,5 mg/ml) und eine Inkubation von 10 min auf Eis erfolgte, wurden die Proben 45 s bei 98,5 °C gekocht, auf Eis abgekühlt und abzentrifugiert (15 min, 13.000 rpm, 4°C). Das nun vorliegende Pellet aus Zelltrümmern und Proteinen konnte mit einem sterilen Zahnstocher entfernt und die DNA durch Zugabe von 200 µl Isopropanol, Mischen und Abzentrifugieren (15 min, 13000 rpm, 4°C) gefällt werden. Im letzten Schritt wurde das Pellet an der Luft getrocknet und in 20 µl S1-Puffer (+RNase) aufgenommen. Die RNA wurde für 10 min bei 37°C abgebaut und die DNA für 5 min bei 50°C gelöst.

### 5.3.1.2. Plasmid-DNA-Präparation mittels NucleoBond™

Die Herstellung großer Mengen hochreiner Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des NUCLEOBOND™-Kits (Macherey Nagel) durchgeführt, bei dem die Bakterien einer alkalischen Lyse unterzogen werden und das Zelllysate durch eine Ionenaustauscher-Säule nach Firmenvorschrift laufen gelassen wird. Durch Verwendung von NUCLEOBOND™-AX 100-Säulen (Midipräparation) können max. 100 ml Bakterienkultur aufgearbeitet werden.

Eine 50 ml Übernachtskultur wurde 15 min bei 5000 rpm geerntet, der Überstand verworfen und das Bakterienpellet in Puffer S1 (+RNaseA) resuspendiert. Die Zugabe des Lysepuffers S2 führt durch das enthaltene SDS zum Auflösen der bakteriellen Zellwand und Freisetzung der Zellbestandteile. Die alkalischen Bedingungen denaturieren anschließend die chromosomale DNA, die Plasmid-DNA und die Proteine. Durch die Zugabe eines Neutralisationspuffers können die beiden Stränge der Plasmid-DNA wieder hybridisieren und bleiben in Lösung, während die weitaus größere chromosomale DNA einzelsträngig bleibt und mit den ebenfalls denaturierten Proteinen ausfällt. Bei der eigentlichen Aufreinigung der Plasmid-DNA durch Anionen-Austauscher-Säulen binden die stark negativ geladenen Nukleinsäuren aufgrund der Salz- und pH-Bedingungen an die Säule, während die weit weniger stark negativ geladenen Proteine durchlaufen. Nach Waschen der Säule zur Entfernung ebenfalls gebundener RNA und restlicher Proteine erfolgte die Elution der Plasmid-DNA und ihre Fällung mit Isopropanol. Anschließend wurde das DNA-Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen, in TE-Puffer gelöst und die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt.

### 5.3.2. Photometrische Konzentrationsbestimmung

(Birnboim and Doly, 1979; Maniatis, 1989)

Da Nukleinsäuren bei der Wellenlänge 260 nm Licht absorbieren, ist die Absorption ein Maß für den DNA-Gehalt einer Lösung. Eine optische Dichte (OD) von 1,0 bei  $\lambda = 260$  nm entspricht bei:

- doppelsträngiger DNA (dsDNA) einer Konzentration von 50 mg/ml
- einzelsträngiger DNA (ssDNA) und RNA einer Konzentration von 40 mg/ml
- Oligonukleotid-DNA einer Konzentration von 33 mg/ml

Die Ursache für die höhere Absorption von einzelsträngiger DNA im Vergleich zu doppelsträngiger DNA ist der sogenannte Hyperchromizitätseffekt. Zur Bestimmung der Reinheit der Nukleinsäuren wurde der Quotient aus  $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$  bestimmt, da Proteine bei  $OD_{280\text{ nm}}$  ihr Absorptionsmaximum besitzen. Der Quotient  $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$  beschreibt die Reinheit der DNA-Probe und sollte bei reiner DNA zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Tiefere Werte sind ein Hinweis auf Verunreinigungen mit Proteinen oder Phenolresten, höhere Werte zeigen größere Mengen an RNA an. Die Ermittlung der Konzentration bzw. Reinheit von DNA und RNA wurde mit Hilfe eines Ultrospec 3000 Photometer (Pharmacia) bzw. eines Nanodrop2000c (PEQLAB) durchgeführt.

### 5.3.3. PCR

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist ein enzymatisches *in vitro*-Verfahren zur selektiven Amplifikation eines DNA-Bereichs definierter Länge aus einem Gemisch von Nukleinsäuremolekülen. Dieses Verfahren nutzt die Fähigkeit der DNA-Polymerase von einem freien 3'-Hydroxy-Ende eines Doppelstrangbereiches ausgehend einen zur einzelsträngigen DNA-Matrize komplementären Strang zu synthetisieren. Im ersten Schritt der Amplifikation wird die doppelsträngige DNA-Matrize bei 94°C denaturiert und somit in zwei Einzelstränge getrennt. Bei der darauffolgenden Abkühlung können sich synthetische Oligonukleotide (Primer), die zu jeweils einem der beiden Matrizeneinzelstränge komplementär sind, an das jeweilige komplementäre Template anlagern (Annealing).

Die dafür gewählte Temperatur ist abhängig vom Schmelzpunkt und letztlich vom GC-Gehalt der verwendeten Primer, liegt jedoch gewöhnlich zwischen 51°C und 65°C. Anschließend erfolgt eine Temperaturerhöhung auf 72°C, um es der DNA-Polymerase zu ermöglichen, ausgehend von den freien 3'-Hydroxy-Enden der Primer, einen, zur Matrize komplementären, Tochterstrang in Gegenwart von dNTP's (Desoxyribonukleosidtriphosphate) zu erzeugen (Elongation). Die neusynthetisierten DNA-Stränge sind von unbestimmter Länge, deren 5' Ende einer der beiden Primer darstellt und die somit definierte Ausgangspunkte besitzen. Diese können nun ebenfalls als Template wirken, so dass im dritten Zyklus fast ausschließlich doppelsträngige DNA vorliegt, die von den Primern flankiert ist. Durch Wiederholung der Zyklen (Denaturierung, Annealing und Extension) lässt sich die gewünschte Zielsequenz fast exponentiell amplifizieren. Die aus dem thermophilen Bakterium

*Thermus aquaticus* stammende Polymerase (*Taq*-Polymerase) besitzt ein Temperaturoptimum von 72°C und bleibt bei den Denaturierungsschritten von 94°C stabil. Bei der Synthese der Primer wurde darauf geachtet, dass beide Primer eine ähnliche Schmelztemperatur aufweisen, keine Selbstkomplementarität besitzen und keine Sekundärstrukturen ausbilden können. Die Primer wurden in lyophilisierter Form von der Firma MWG Biotech bezogen, in sterilem Wasser aufgenommen und 0,25 µM in der PCR eingesetzt. Die PCR-Reaktionen wurden in einem Peltier Thermal Cycler 200 der Firma MJ Research durchgeführt. In der nachfolgenden Tabelle ist ein typischer PCR-Ansatz aufgeführt.

**Tabelle 6: Pipettierschema eines 50 µl Standard-PCR-Ansatzes**

Komponente	Volumen	Endkonzentration
dNTPs	2 µl	je 100 mM
10×Reaktionspuffer	5 µl	1×
5'-Primer	1 µl	50 µM
3'-Primer	1 µl	50 µM
Matrizen DNA	1-5 µl	0,1-0,5 µg
<i>Taq</i> -Polymerase	0,5 µl	5 U
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 50 µl	

Zur Überprüfung auf eventuelle Kontaminationen wurde bei jeder PCR eine Wasserkontrolle, die alle Komponenten bis auf die Template-DNA enthält, mitgeführt. Das in Tabelle 7 dargestellte PCR-Programm variierte je nach Schmelztemperatur der Primer in der Annealing-Temperatur und je nach Sequenzlänge des Amplifikats in der Elongationsdauer (0,5 – 1 min pro 1 kb Sequenzlänge).

**Tabelle 7: Schema eines PCR-Standardprogramms**

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
Denaturierung	94°C	2 min
Denaturierung	94°C	1 min
Annealing	51-65°C	1 min
Extension	72°C	1 min
Letzte Extension	72°C	10 min

} x 38

Die abschließende Extension dient dem Auffüllen von noch einzelsträngig vorhandener DNA. Im Anschluss an die PCR wurden 20 µl der amplifizierten DNA im Agarosegel aufgetrennt um den Erfolg der PCR zu überprüfen.

### 5.3.4. Zielgerichtete Mutagenese

Um gezielt Nukleotide in der 3'UTR von Ziel-Sequenzen zu verändern, bediente man sich der Methode der zielgerichtete Mutagenese (site-directed mutagenesis). Im ersten Schritt erfolgte eine PCR mit einem Plasmid, welches die Matrizen-DNA trug und zwei zueinander komplementären Primern, die die gewünschte Mutation aufwiesen. Mit Hilfe einer Proofreading-Polymerase (*Pfu*-Polymerase) erfolgte die Amplifikation der mutierten Plasmidsequenz in wenigen Zyklen (Tabelle 8).

**Tabelle 8: Reaktionsansatz zur Durchführung der zielgerichteten Mutagenese**

Komponente	Menge / Volumen	Endkonzentration
dNTPs	2 µl	je 100 mM
10×Reaktionspuffer	5 µl	1×
5'-Mutagenese-Primer	1 µl	50 µM
3'-Mutagenese-Primer	1 µl	50 µM
Matrizen DNA	0,5-1 µl	50 ng
Pfu Polymerase	2 µl	5 U
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 50 µl	

Tabelle 9 zeigt das für die Mutagenese verwendete PCR-Programm.

**Tabelle 9: PCR-Programm zur Durchführung der zielgerichteten Mutagenese**

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
Denaturierung	95 °C	1 min
Denaturierung	95 °C	1 min
Annealing	48 °C–56 °C (abh.von Primern)	50 s
Extension	72 °C (2 min pro kb)	0,5 -1 min
Letzte Extension	72 °C	10 min

} x 18

Im Anschluss an die PCR wurde das Amplifikat reisoliert und die parentale DNA, welche methyliert bzw. hemimethyliert ist, mit Hilfe des methylierungsspezifischen Restriktionsenzym *Dpn* I abgebaut, während die neu synthetisierte, mutierte DNA

intakt blieb. Die Transfektion der mutierten DNA in Bakterien führte zum Ligieren der DNA zu einem zirkularisierten Plasmid und zur Vermehrung des mutierten Plasmids. Durch Einfügen einer spezifischen Restriktionsschnittstelle in die Mutagenese-Primer konnten anschließend leicht Klone identifiziert werden, welche die Mutation trugen.

### 5.3.5. Agarosegelelektrophorese

(Maniatis, 1989)

Die Agarosegelelektrophorese ist eine molekularbiologische Technik um Nukleinsäuren aufzutrennen und DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe sichtbar zu machen. Aufgrund der negativen Ladung von DNA-Molekülen wandern diese im elektrischen Feld zur Anode hin. Dabei wirken die Agarosegele wie Molekularsiebe, die kleine Moleküle schneller durch die Poren des Gels wandern lassen als größere. Die Konzentration des Gels richtet sich nach der Größe der aufzutrennenden DNA, weil die Agarosekonzentration die Porengröße bestimmt (Tabelle 10).

**Tabelle 10: Auftrennungsbereich verschiedener Agarosegele**

Agarosemenge (%)	DNA-Trennbereich (kb)
0,5	1-30
0,7	0,8-12
1,0	0,5-7
1,2	0,4-6
1,5	0,2-3
2	0,1-2

In dieser Arbeit wurden 1,5%ige Agarosegele verwendet. Die entsprechende Menge Agarose wurde in 450 ml 1xTAE-Puffer durch Aufkochen im Mikrowellenherd aufgelöst, nach Abkühlen auf etwa 60°C mit 25 µl Ethidiumbromid-Stammlösung (10 mg/ml in H<sub>2</sub>O) versetzt und anschließend auf einer zuvor mit 1%iger Agarose abgedichteten Glasplatte mit Kunststoffeinfassung (24,5×24,5×1 cm) gegossen. Das vollständig auspolymerisierte Gel wurde in Klarsichtfolie eingepackt und bis zum Gebrauch bei 4°C aufbewahrt.

Die Proben wurden mit 1/5 ihres Gesamtvolumens an glycerolhaltigem Blaumarker versetzt, um das Absinken der DNA-Lösung in die Geltaschen zu gewährleisten und die Lauffront der DNA im Gel sichtbar zu machen. Das Gel wurde in eine mit 1xTAE

gefüllte Kammer gelegt und die DNA durch Anlegen eines elektrischen Feldes aufgetrennt (~1 h; 140 V). Das separate Auftragen eines Größenstandards (10 µl der 1 kb-Plus Leiter) erlaubte die Größenbestimmung der aufgetrennten Fragmente. Die Dokumentation dieser Fragmente wurde durch Zugabe des Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid, welcher in doppelsträngige DNA interkaliert, ermöglicht und erfolgte nach der Auftrennung unter UV-Licht bei 254 nm (ChemiDoc™ XRS+, Biorad). Das kurzwellige UV-Licht schädigt die DNA stark und macht sie somit unbrauchbar für weitere gentechnische Arbeiten, weshalb DNA-Stücke, die weiterverwendet werden sollten, zuvor unter langwelligem UV-Licht ( $\lambda=366$  nm) mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten wurden.

### **5.3.6. NucleoSpin-Extraktion von DNA-Fragmenten**

Das NucleoSpin-Extraktion Kit von Macherey-Nagel wurde entsprechend des Hersteller-Protokolls verwendet um DNA aus einem Agarosegel zu extrahieren oder eine DNA-Lösung aufzureinigen. Diese Methode basiert auf einer Ionenaustauschchromatographie, bei der die DNA an Säulen, die Silicagel enthalten, gebunden wird. Durch mehrmaliges Waschen der Säule werden anschließend unspezifisch gebundene Moleküle entfernt und die DNA mit Hilfe eines Elutionspuffers von der Säule gelöst. Die reisolierte DNA konnte nun mit Hilfe von Restriktionsenzymen gespalten oder direkt zur Klonierung in Vektoren eingesetzt werden.

### **5.3.7. Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen**

(Maniatis, 1989)

Restriktionsendonukleasen (=Restriktionsenzyme) dienen Mikroorganismen zum Schutz vor fremder DNA, da sie hochspezifisch Methylierungsmuster und Sequenzen doppelsträngiger DNA erkennen und diese an genau definierbaren Stellen schneiden können. Die in der Molekularbiologie eingesetzten Restriktionsenzyme der Klasse II erkennen eine Sequenz von vier, sechs oder acht, in seltenen Fällen eine Sequenz von fünf Basen und schneiden die DNA innerhalb dieser Erkennungssequenz. Häufig handelt es sich bei diesen Sequenzen um Palindrome, d.h. symmetrisch aufgebaute Basenabfolgen, die somit in beiden Strängen gleich sind. Restriktionsendonukleasen können zwei verschiedene Varianten von Restriktionsschnitten erzeugen. Entweder

werden direkt gegenüberliegende Basenpaare geschnitten und es entstehen stumpfe Enden („blunt ends“) oder es werden am 5'- oder am 3'-Ende überhängende Enden (=„sticky ends“) durch versetztes Schneiden der DNA gebildet. Die Enzymaktivität wird in Units angegeben, wobei ein Unit (u) in der Lage ist, 1 µg DNA in optimalem Milieu und bei optimaler Temperatur (meistens 37°C) innerhalb von 60 min vollständig zu schneiden. Für analytische Zwecke wurde 0,5-1 µg DNA und für präparative Zwecke bis zu 4 µg DNA verwendet und je nach Enzym zwischen 2-10 U/µg DNA an Units eingesetzt. Der Verdau wurde jeweils unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen (Temperatur und Inkubationsdauer) durchgeführt. Im Folgenden ist ein Standardverdauansatz dargestellt:

<b>Restriktionsansatz:</b>	Restriktionsenzym 1 und/oder 2	1 U
	2x Restriktionspuffer	2 µl
	DNA	1-2 µg
	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 20 µl

Die Ansätze wurden vor Zugabe der Enzyme durchmischt, kurz abzentrifugiert, für mind. 2 Stunden bei 37°C inkubiert und danach mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese aufgetrennt um gegebenenfalls den Erfolg der Restriktion zu überprüfen und gleichzeitig die DNA von Reaktionspuffer und Enzymen zu reinigen.

### 5.3.8. Dephosphorylierung von Vektor-DNA

(Bolivar et al., 1977; Chaconas and van de Sande, 1980)

Nach der Restriktion von Plasmiden wurde mit Hilfe einer alkalischen Phosphatase (=CIP, calf intestinal phosphatase) die reaktive Phosphatgruppe am 5'-Ende entfernt um eine Rezirkularisierung bzw. eine Konkatemisierung der linearisierten Vektor-DNA zu verhindern. Bei Vektoren, die mit zwei unterschiedlichen Restriktionsenzymen geschnitten wurden und deren überhängende Enden demzufolge auch nicht komplementär zueinander sind, ist eine Rezirkularisierung unwahrscheinlich, eine Verbindung mehrerer Vektoren miteinander jedoch möglich. Die Dephosphorylierung wurde gleichzeitig mit der Restriktion durchgeführt, wobei der Restriktionsansatz zusätzlich mit 1µl CIP versetzt und für 2 h oder über Nacht bei

37°C inkubiert wurde. Die DNA wurde im Anschluss danach in einem Agarosegel aufgetrennt, reisoliert und zur Ligation von DNA-Fragmenten eingesetzt.

### 5.3.9. Ligation von DNA-Fragmenten

(Dugaiczky, Boyer, and Goodman, 1975; Sgaramella, Van de Sande, and Khorana, 1970)

Ligasen sind Enzyme, die die Verknüpfung von zueinander passenden DNA-Molekülen katalysieren, indem die Phosphodiesterbindungen benachbarter 3'-Hydroxy- und 5'-Phosphatenden unter Verbrauch von ATP geknüpft und somit die Bildung einer intakten, rekombinanten ds-DNA ermöglicht wird. In dieser Arbeit wurde die T4-DNA-Ligase verwendet, welche zu den DNA-Reparaturenzymen gehört und sich aus *E.coli*-Bakterien isolieren lässt, die mit dem Bakteriophagen T4 infiziert sind. Die Enden der beiden zu ligierenden Nukleinsäuremoleküle können dabei überhängend oder stumpf sein. Die Effektivität der Ligation ist abhängig von den eingesetzten Konzentrationen an Vektor- und Insert-DNA, so dass beide Komponenten in äquimolarer Menge (je 0,5-1 µg) eingesetzt wurden. Ein typischer Ligationsansatz von 10 µl Volumen ist dargestellt:

<b>Ligationsansatz:</b> Insert	4-7 µl
dephosphorylierter Vektor	1-4 µl
10x T4-Ligase-Puffer	1 µl
T4-Ligase (1U/µl)	1 µl

Der Ligationsansatz wurde für mindestens 3 h bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert und anschließend 5 µl des Ansatzes direkt zur Transformation kompetenter Bakterien eingesetzt. Um eine erfolgreichen Dephosphorylierung des Vektors zu überprüfen, wurde ein Ligationsansatz des dephosphorylierten Plasmids ohne Insert mitgeführt.

### 5.3.10. Ligation von PCR-Fragmenten in pGEM<sup>®</sup>-T

Der TA-Klonierungsvektor pGEM-T<sup>™</sup> (Promega) wurde zur direkten Klonierung von PCR-Fragmenten ohne vorhergehende Modifikation eingesetzt. Die vorhandenen 3'-T-Überhänge innerhalb der β-Galaktosidase kodierenden Region ermöglichen eine direkte Ligation der mit 3'-Adenosin-Überhängen versehenen PCR-Produkte, welche

während der Amplifikation durch die Taq-Polymerase entstehen. Solch eine Zwischenklonierung erleichtert die Modifikation des Inserts durch Restriktionsenzyme, da manche PCR-Produkte je nach Restriktionsschnittstelle und flankierender Sequenz nur schlecht geschnitten werden können und eine nachfolgende Ligation erschwert wird. Die Ligationsreaktion erfolgte mindestens 3 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Ein Ligationsansatz enthielt die folgenden Komponenten:

<b>Ligationsansatz pGEM<sup>®</sup>-T:</b>	pGEM-T Vektor	1 µl
	2x Ligationspuffer	5 µl
	T4-Ligase	40 U
	Insert	3 µl

## 5.4. RNA-Techniken

### 5.4.1. RNA-Isolation

Für die Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen wurde peqGOLD TriFast™ der Firma Peqlab nach einem modifizierten Protokoll verwendet. Das Reagenz enthält Phenol und Guanidinisothiocyanat in einphasiger Lösung, welches eine gleichzeitige Extraktion von RNA, DNA und Proteinen ermöglicht. Die Zugabe von Chloroform erzeugt eine Auftrennung in drei Phasen, wobei die RNA ausschließlich in der oberen Phase vertreten ist, während DNA und Protein in der unteren und Interphase vorhanden sind. Das Herstellerprotokoll für die Extraktion von RNA aus Zellkulturen wurde modifiziert, so dass die Zentrifugationsschritte für die Phasentrennung 30 min und die RNA-Präzipitation für 45 min bei 6000 rpm betragen. Der Waschschrift mit Ethanol wurde ausgelassen, da die kleinen miRNA-Moleküle ebenfalls mit dem Ethanol gewaschen werden.

### 5.4.2. Northern Blot

Um einzelsträngige RNA-Fragmente identifizieren zu können wurde die Northern-Blot-Methode durchgeführt, bei der die Gesamt-RNA in der Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt, auf einer Membran fixiert und das gewünschte Fragment

durch Hybridisierung mit einer spezifischen, markierten Sonde nachgewiesen wird. Diese Sonde ist ein einzelsträngiges Nukleinsäuremolekül und bindet an die immobilisierte RNA aufgrund homologer Basenpaarung. Der Nachweis erfolgt durch die Markierung der Sonde, die radioaktive Moleküle (z.B. Phosphor) oder nicht-radioaktive Bestandteile wie z.B. Digoxigenin oder Biotin enthält.

#### **5.4.2.1. Herstellung des Polyacrylamidgels und Gelelektrophorese**

12%ige Polyacrylamidgele wurden mit Hilfe des SequaGel<sup>®</sup> Kit (National Diagnostics) hergestellt. Die vorhandenen 3 Komponenten (SequaGel<sup>™</sup>-Konzentrat, -Verdüner und -Puffer) enthalten neben Acrylamid und Bisacrylamid auch 7M Harnstoff, der eine Denaturierung der RNA verursacht und somit deren Sekundärstrukturen auflöst. Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes, wandert die negativ geladene RNA in Richtung Anode, wobei größere Moleküle langsamer durch das Gel wandern als kürzere. Im Folgenden ist die Zusammensetzung eines 12%igen Polyacrylamidgels dargestellt.

***Polyacrylamidgel für RNA:***

- 24 ml SequaGel<sup>®</sup> konzentriert
- 21 ml SequaGel<sup>®</sup> verdünnt
- 5 ml SequaGel<sup>®</sup> Puffer
- 400 µl APS (10 %)
- 20 µl TEMED

Die RNA-Proben wurden zunächst mit 5-10 µl 2x Bromphenolblau Ladepuffer versetzt und anschließend in die Taschen des Gels gefüllt und ~3 h bei 10-15 Watt elektrophoretisch aufgetrennt. Der Erfolg der Elektrophorese wurde durch Anfärben der RNA in einer Ethidiumbromidlösung (100 ml 1x TBE + 10 µl Ethidiumbromid [10 mg/ml]) überprüft und mit einem Geldokumentationssystem bei einer Wellenlänge von 254 nm dokumentiert.

#### **5.4.2.2. RNA Transfer**

Der anschließende RNA-Transfer auf eine Nylonmembran (Hybond<sup>™</sup>-N+, Amersham) erfolgte in einer Semi-dry-Blotkammer (Star Lab GmbH). Hierzu wurden zunächst fünf in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> getränkte Whatman Filterpapiere auf die Anode gelegt,

darüber die Nylonmembran, gefolgt vom Polyacrylamidgel und abschließend wieder 5 Filterpapiere. Das Blotting der RNA erfolgte für 30 min bei 15 V. Um besonders kleine RNA-Moleküle wie miRNAs effizient auf Nylonmembranen zu fixieren, kam das Verfahren des chemischen „Cross-Linking“ zum Einsatz (Pall and Hamilton, 2008). Hierbei wird das 5'-terminale Monophosphat der RNA mit den Amino-Gruppen der Membran gekoppelt, so dass das gesamte RNA-Molekül zur Bindung der Sonde zur Verfügung steht. Dazu wurde eine 0,16 M EDC Lösung in 0,13 M 1-Methylimidazol hergestellt und mit dieser drei Lagen Whatman-Papier getränkt. Die Membran wurde anschließend aufgelegt, mit Frischhaltefolie luftdicht verpackt und für 1-2 h bei 55°C inkubiert.

#### **5.4.2.3. Herstellung einer radioaktiv markierten Sonde**

Die in dieser Arbeit verwendeten radioaktiv markierten RNA-Sonden wurden mit Hilfe des mirVana™ miRNA Probe Construction-Kit von Ambion hergestellt. Die synthetisierten DNA-Oligonukleotide, welche spezifisch für die nachzuweisende Sequenz sind, besitzen einen Überhang, der komplementär zum 3'-Ende des T7-Promotor-Primer ist (5'-CCTGTCTC-3'). Dadurch kann das Template mit einem T7-Primer hybridisieren und der Gegenstrang kann zu einem dsDNA-Template mit Hilfe des Exo-Klenow Enzyms aufgefüllt werden.

**Hybridisierung:**

- 2 µl T7-Promotor-Primer (100 µM)
- 2 µl Oligo-Template (100 µM)
- 6 µl Hybridisierungspuffer

Die Hybridisierung von Template und Primer erfolgte für 5 min bei 70°C und anschließender Inkubation bei RT für ebenfalls 5 min. Danach wurde der folgende Reaktionsmix zu den hybridisierten Oligonukleotiden gegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert:

**Klenow-Reaktionsansatz:**

- 2 µl 10x Klenow Reaction Buffer
- 2 µl 10x dNTP Mix
- 4 µl Nuclease-free Water
- 2 µl Exo-Klenow

Das hergestellte dsDNA-Template konnte nun für die *in vitro* Transkriptionsreaktion verwendet oder bei -20°C gelagert werden. Die Transkription erfolgte mit P<sup>32</sup>-markiertem UTP und wurde nach folgendem Schema angesetzt, gemischt, abzentrifugiert und für 10 min bei 37°C inkubiert:

***In vitro* Tanskription:**

- 1 µl dsDNA Template
- 2 µl 10x Transkriptions Puffer
- 1 µl 10 mM ATP
- 1 µl 10 mM CTP
- 1 µl 10 mM GTP
- 5 µl gelabeltes UTP (<sup>32</sup>P)
- 2 µl T7-RNA-Polymerase
- ad 20 µl mit Nuklease-freiem Wasser

Anschließend wurde die Template-DNA im Ansatz durch Zugabe von 1 µl DNaseI (Inkubation bei 37°C für 10 min) verdaut und die radioaktiv markierte Sonde direkt zur Hybridisierung eingesetzt.

#### **5.4.2.4. Spezifischer Nachweis von RNA**

Zunächst wurden ~30 ml Hybridisierungspuffer auf 50°C erwärmt, um alle enthaltenen Bestandteile zu lösen. Im Anschluss erfolgte mit Hilfe des gelösten Puffers die Prähybridisierung der RNA-tragende Membran in einem Glaszylinder (100 ml Gesamtvolumen) für 30 min auf einem Drehrad in einem Wärmeschrank bei 50°C. Nach Zugabe der radioaktiv markierten Sonde, die spezifisch gegen eine RNA-Sequenz gerichtet war, wurde die Membran über Nacht bei 50°C auf dem Drehrad inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Hybridisierungslösung verworfen und der Blot zunächst zweimal für je 15 min mit 30 ml eines Hochsalzpuffers (5x SSC/ 0,1 % SDS) und anschließend mit einem Niedrigsalzpuffer (1x SSC/ 0,1 % SDS) bei 50°C gewaschen. Nach Exposition der Membran auf einer Phosphorscreenplatte über Nacht erfolgte die Detektion der gebundenen radioaktiven Sonde mit einem Phosphoimager<sup>TM</sup>-Typhoon (Molecular Dynamics).

#### 5.4.2.5. Strippen der Nylonmembran

In dieser Arbeit wurden Northern Blots u.a. mit RNA durchgeführt, die aus Prostata-Gewebe isoliert wurde. Da die Menge des Gewebes beschränkt war, mussten die vorhandenen Blots mit mehreren Sonden aufeinanderfolgend inkubiert und die Signale unabhängig voneinander dokumentiert werden. Um dies zu ermöglichen wurden diese Membranen zwischen den einzelnen Hybridisierungen gestrippt, und somit von den bereits gebundenen RNA-Sonden befreit.

Die Blots wurden hierzu nach der jeweiligen Detektion mit ~30 ml eines auf 80°C erhitzten Stripping-Puffers 2-3 h bei 70°C auf dem Drehrad inkubiert und anschließend zum Hybridisieren weiterverwendet.

#### 5.4.3. cDNA-Synthese

Die Herstellung von cDNA aus Gesamt-RNA ermöglicht u.a. eine Expressionsanalyse von Genen in einer quantitativen Real-Time PCR.

Um mögliche Kontaminationen der RNA mit genomischer DNA auszuschließen, wurde zunächst ein DNaseI Verdau der extrahierten Gesamt-RNA durchgeführt.

**DNaseI-Verdau:**

- 1 µg RNA
- 1 µl DNaseI (amplification grade)
- 1 µl 10x DNaseI Reaction-Buffer
- ad 10 µl RNase freies Wasser

Die Reaktion wurde nach einer 15minütigen Inkubation bei RT mit 2 µl 25 mM EDTA für 10 min bei 65°C abgestoppt. Die nun DNA-freie RNA konnte anschließend mit Hilfe des miScript Reverse Transcription Kit (Qiagen) in cDNA umgeschrieben werden. Hierbei wird die RNA in einem Reaktionsschritt mit einem Poly(A)-Schwanz versehen und revers transkribiert. Der im folgenden beschriebene Ansatz wurde für 60 min bei 37°C inkubiert:

**Reverse Transkription:**

- 1 µg RNA
- 4 µl RT-Puffer
- 1 µl Transkriptions-Mix
- ad 20 µl RNase freies Wasser

Die anschließende Inaktivierung der vorhandenen Enzyme erfolgte für 5 min bei 95°C. Die cDNA wurde in der nachfolgenden Real-Time PCR 1:10 eingesetzt oder dauerhaft bei -20°C gelagert.

## **5.5. Quantitative Real-Time PCR**

Die Methode der quantitativen Real-Time PCR wurde benutzt, um eine quantitative Aussage über die Expression von miRNAs bzw. mRNAs zu machen. Hierbei handelt es sich um eine modifizierte Form der herkömmlichen PCR, die eine Quantifizierung der amplifizierten cDNA ermöglicht.

### **5.5.1. qRT-PCRs für miRNAs mit SYBRGreen**

Um miRNAs nachweisen zu können wurde die quantitative Real-Time PCR mit dem LightCycler-Karussell-System<sup>TM</sup> unter Verwendung des „LightCycler FastStart DNA Master PLUS SYBRGreen I“-Kit von Roche durchgeführt. Die Verwendung von Glaskapillaren als Reaktionsgefäße ermöglicht ein wesentlich effizienteres Heizen und Abkühlen der Proben mittels Luft, wodurch die PCR von ~3,5 h auf ~45 min verkürzt werden kann. Die Bestimmung der Fluoreszenz und damit der Menge an amplifizierter DNA in „Echtzeit“ nach jedem Amplifikationsschritt wird durch die Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes SYBRGreen, der in doppelsträngiger DNA interkaliert und im gebundenen Zustand fluoresziert, ermöglicht. Durch schrittweise Erhöhung der Temperatur von 55°C auf 95°C, die sogenannte Schmelzkurvenanalyse, wird der amplifizierte DNA-Doppelstrang nach dem letzten Extensionsschritt denaturiert, so dass die Fluoreszenzintensität kontinuierlich abnimmt und unspezifische Nebenprodukte identifiziert werden können. Die Amplifikation erfolgte mit Hilfe eines spezifischen 5'-miRNA-Primers und eines 3'-Primers, der an die Adaptersequenz des in der cDNA-Synthese eingesetzten PolyT-universal-tag bindet. Tabelle 11 zeigt einen typischen Real-Time PCR Ansatz für eine LightCycler-Kapillare.

Tabelle 11: Pipettierschema zum quantitativen Nachweis von miRNAs mittels SYBRGreen I

Komponente	Volumen	Endkonzentration
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	9 µl	
5'-Primer	1 µl	0,5 µM
3'-Primer	1 µl	0,5 µM
5x Master Mix	4 µl	1x
cDNA 1:10 verd.	5 µl	

Das zur Amplifizierung eingesetzte Programm ist in Tabelle 12 aufgeführt.

Tabelle 12: Programm zur Amplifizierung von miRNAs mittels LightCycler

Acquisitionsmodus	Zyklen	Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	Slope
nein	1	Preinkubation	95 °C	10 min	20 °C/s
nein nein einmal	55	Amplifikation Denaturierung Annealing Extension	95 °C 68 °C 72 °C	10 s 5 s 6 s	20 °C/s 20 °C/s 5 °C/s
kontinuierlich		Schmelzkurve	95 °C 55 °C 95 °C	15 s	20 °C/s 20 °C/s 0,1 °C/s
nein	1	Abkühlen	40 °C	30 s	20 °C/s

### 5.5.2. qRT-PCRs für mRNAs mit Hilfe der Universal ProbeLibrary

Die quantitative Analyse von mRNAs wurde ebenfalls mit dem LightCycler-Karussell-System<sup>TM</sup> durchgeführt. In diesem Fall wurden jedoch Sonden der Universal ProbeLibrary von Roche verwendet. Diese Sondenbibliothek beinhaltet 165 verschiedene, kurze Hydrolyse-Sonden, die am 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff FAM und am 3'-Ende mit einem Quencher-Farbstoff (TAMRA) markiert sind. Der Quencher absorbiert das Fluoreszenzsignal des Farbstoffes. Jedoch führt die 5'-Nuklease-Aktivität der Polymerase zum Abbau der Sonde, sobald diese während der PCR spezifisch an eine Sequenz bindet, so dass eine räumliche Trennung von Fluoreszenzfarbstoff und „Quencher“ entsteht und es zur Emission von Fluoreszenzlicht kommt. Tabelle 13 zeigt das Pipettierschema eines typischen PCR-Ansatzes.

Tabelle 13: PCR-Ansatz für die Amplifikation von cDNA mittels Universal ProbeLibrary

Komponente	Volumen	Endkonzentration
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	4,4 µl	
MgCl <sub>2</sub> 25mM	3,2 µl	4 mM
10x <i>Taq</i> -Puffer	2 µl	1x
TE-SS 40 ng/µl	1 µl	2 ng/µl
DMSO konz.	1 µl	5 %
Tween 20 10 %	1 µl	0,5 %
BSA 20 ng/µl	0,5 µl	0,5 ng
dNTPs 10 mM	0,4 µl	200 nmol
Sonde 1 µM	0,5 µl	20 nmol
5'-Primer 10 µM	0,5 µl	250 nmol
3'-Primer 10 µM	0,5 µl	250 nmol
<i>Taq</i> -Polymerase	0,1 µl	0,5 U
cDNA 1:10 verd.	5 µl	

Für alle Primerpaare wurde folgendes Programm zur Amplifikation der cDNA verwendet:

Tabelle 14: PCR-Programm zur Amplifizierung von cDNA mit Hilfe der Universal ProbeLibrary

Acquisitionsmodus	Zyklen	Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	Slope
nein	1	Preinkubation	95°C	10 min	20 °C/s
nein	1	Touch-Down			
		Denaturierung	95°C	5 s	20 °C/s
		Annealing	65°C	5 s	20 °C/s
		Extension	62°C	10 s	5 °C/s
nein	55	Amplifikation			
nein		Denaturierung	95°C	15 s	20 °C/s
einmal		Annealing	55°C	30 s	20 °C/s
		Extension	62°C	30 s	20 °C/s
nein	1	Abkühlen	40°C	30 s	20 °C/s

### 5.5.3. Relative Quantifizierung

Mit Hilfe der relativen Quantifizierung ist es möglich, die Menge exprimierter miRNAs bzw. mRNAs zwischen zwei unabhängigen Proben miteinander zu vergleichen. Diese kann mit Hilfe eines internen Standards, 5.8sRNA für miRNAs und GAPDH für mRNAs, und der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode bestimmt werden.

$$\frac{E_{(\text{Test})}^{\Delta Ct (\text{Test})}}{E_{(\text{Kontrolle})}^{\Delta Ct (\text{Kontrolle})}} = \text{Expressionsänderung}$$

## 5.6. Luciferase-Assays

Mit diesen Reporterassays ist es möglich, Genexpression und zelluläre Abläufe, die daran gekoppelt sind, zu untersuchen. Man macht sich dabei die Eigenschaft der Firefly-Luciferase bzw. Renilla-Luciferase zu nutze, Luciferin in Anwesenheit von  $O_2$ , ATP und  $Mg^{2+}$  bzw. Coelenterazinen in Licht umzuwandeln.

### 5.6.1. Luciferase-Assay System

Um den Einfluss von miRNAs auf die 3'UTR von MYO6 zu untersuchen, wurde der Reportervektor pGL3 (Promega) verwendet. Dieses Plasmid kodiert für die Firefly-Luciferase und erlaubt es, regulatorische Sequenzen hinter die kodierende Region des Reporterproteins zu klonieren. Zunächst wurden  $1 \times 10^5$  293T-Zellen in 24-Lochplatten ausgesät. Nach 24 h erfolgte die Transfektion der Zellen mit 0,8  $\mu g$  Effektorplasmid und 0,2  $\mu g$  Reporterplasmid sowie mit je 0,2  $\mu g$  pEGFP-c1, um eine Normalisierung der Firefly-Aktivität zu ermöglichen. Die Transfektionseffizienz konnte mit Hilfe der Durchflusszytometrie aufgrund der fluoreszierenden Eigenschaften von EGFP bestimmt werden. Zur Messung der Luciferase-Aktivität wurde 48 h nach Transfektion das Medium abgenommen, die Zellen mit 100  $\mu l$  Trypsin/EDTA gespült und anschließend mit 100  $\mu l$  Trypsin/EDTA bei 37°C vom Boden gelöst und vereinzelt. Durch Zugabe von 900  $\mu l$  serumhaltigen Kulturmedium wurde die Reaktion gestoppt und die Zellen für 10 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde einmal mit PBS gewaschen und anschließend in 500  $\mu l$  PBS resuspendiert. Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz wurden 100  $\mu l$  für die FACS-Analyse

abgenommen und mit 100 µl 2%iger FACS-Fix-Lösung versetzt. Nach erneutem Pelletieren (10 min; 1200 rpm) wurden die restlichen Zellen nach kurzem Antrocknen in 100 µl 1xCCLR-Puffer bei RT lysiert und für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. 10 µl des Überstands wurden zur Bestimmung der Luciferase-Aktivität in ein Luminometer-Messröhrchen überführt, mit 20 µl Luciferin gemischt und im Lumat LB9501-Luminometer (Berthold) für 10 s gemessen. Nach der Bestimmung der Transfektionseffizienz in jedem Ansatz mittels FACS wurde die relative Luciferase-Aktivität errechnet und die Werte in Relation zueinander gesetzt.

Um die statistische Signifikanz der Abweichungen zu ermitteln wurde der in der Software Sigma Plot 10.0 vorhandene t-Test verwendet und p-Werte <0,05 als statistisch signifikant angesehen.

### **5.6.2. Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter Assays**

Das duale Luciferase-Assay-System ermöglicht in einem einzigen Messvorgang die Aktivität der Firefly- und die zur Normalisierung verwendete Expression der Renilla-Luciferase zu bestimmen. In dieser Arbeit wurde der Vektor pMIR-RNL-TK eingesetzt, der für beide Luciferasetypen kodiert. Hierbei wird eine spezifische Sequenz direkt hinter das für die Firefly-Luciferase kodierende Gen kloniert um einen miRNA-Einfluss auf diese Sequenz mit Hilfe der Luciferase-Aktivität zu untersuchen. Die Expression der Renilla-Luciferase erfolgt unabhängig von der klonierten Sequenz und kann zur Normalisierung der einzelnen Experimente herangezogen werden. Zuerst wurden  $1 \times 10^5$  293T-Zellen in 24-Lochplatten ausgesät. Nach 24 h Tag erfolgte die Transfektion der Zellen mit je 0,8 µg Effektorplasmid und 0,2 µg Reporterplasmid mit Hilfe von Nanofectin laut dem Herstellerprotokoll. 48 h nach Transfektion wurden die Lysate laut Protokoll des Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter Assays hergestellt und 1:100 in PLB verdünnt. 10 µl dieser Zelllysateverdünnung wurden anschließend mit 50 µl LARII vermengt und die Lumineszenz mit Hilfe eines Luminometers (Berthold Technologies GmbH & Co.KG) für 10 s bestimmt. Da Stop+Glo die Firefly-Aktivität stoppt und gleichzeitig das Substrat für die Renilla-Luciferase darstellt, konnte durch Zugabe von 50 µl Stop+Glo die Renilla-Luciferase-Aktivität durch Lumineszenz sofort bestimmt werden. Darauf folgend wurde zunächst die Aktivität der Firefly mit der Renilla-Aktivität normalisiert und die zu vergleichenden Werte zueinander in Bezug gesetzt. Die Ermittlung der statistischen Signifikanz der Abweichungen erfolgte mit

---

Hilfe des in der Software Sigma Plot 10.0 vorhandenen t-Tests, wobei p-Werte  $<0,05$  als statistisch signifikant angesehen wurden.

### **5.7. Bestimmung der Transfektionseffizienz mittels FACS**

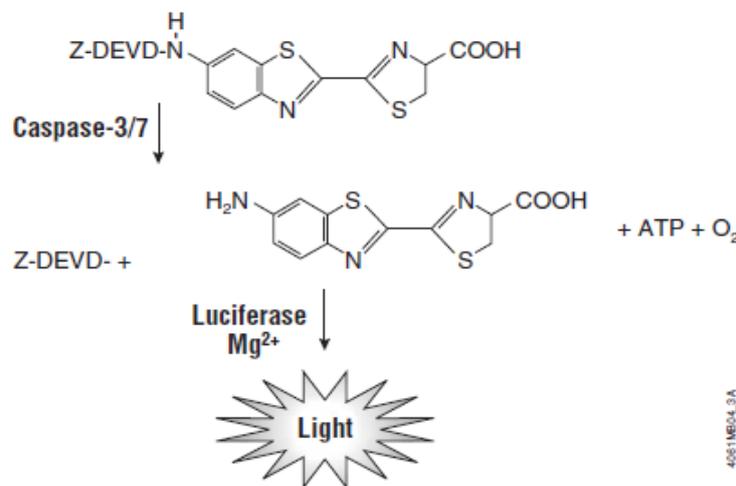
Die Durchflusszytometrie bzw. FACS-Analyse (Fluorescence Activated Cell Sorting) dient der Untersuchung von Einzelzellen innerhalb einer Suspension auf der Grundlage von Fluoreszenz- und/oder Streulichteigenschaften. Die sich in Lösung befindenden Zellen werden in eine Kapillare gesaugt, wo sie durch Überdruck stark beschleunigt werden und beim Eintritt in die Messkammer vereinzelt vorliegen. Das gleichzeitige Messen von Vorwärts- und 90°-Seitwärtsstreulicht erlaubt dabei die Bestimmung von relativer Größe und Granularität der Zellen. Auch Fluoreszenzfarbstoffe, die an Antikörper gekoppelt sind oder als fluoreszierende Proteine in der Zelle exprimiert werden, können durch den Argon-Laser bei 488 nm angeregt und detektiert werden.

Das emittierte Licht wird über ein optisches System gemessen und die relative Lichtintensität in Form von Punktdiagrammen, Intensitätskurven oder Histogrammen dargestellt.

In dieser Arbeit wurden die Zellen mit pEGFP kotransfiziert, um die Transfektionseffizienz im FACScan™ (Beckton Dickinson) zu bestimmen. 100 µl der zu analysierenden Zellen wurden 48 h nach Transfektion mit 100 µl FACS-Fixierlösung fixiert und dann im FACScan™ analysiert. Die Kontroll-Ansätze (Heringssperma-DNA ohne pEGFP) dienen der Unterscheidung der noch lebenden Zellpopulation von apoptotischen, nekrotischen Zellen oder Zelldebris und um eine Eigenfluoreszenz der Zellen auszuschließen. Anschließend wurde der Prozentsatz pEGFP-transfizierter Zellen innerhalb der lebenden Population ermittelt und somit auf die relative Transfektionseffizienz in den einzelnen Ansätzen rückgeschlossen.

## 5.8. Apoptose Assay

Um einen Einfluss eines ektopisch exprimierten Proteins auf die Apoptose von Zellen zu untersuchen wurde das Caspase-Glo™ 3/7 Assay System (Promega) verwendet. Hierbei wird die Aktivität der Cysteinproteasen Caspase 3 und 7 analysiert, welche eine Schlüsselrolle in der Signaltransduktion während der Apoptose in Eukaryoten spielen. Beide Enzyme werden im intrinsischen und extrinsischen Weg von Caspase 9 bzw. 8 durch proteolytische Spaltung in ihren aktiven Zustand gebracht. Die aktivierten Caspasen 3 und 7 sind im Anschluss direkt an der Apoptose beteiligt, da sie aktiv Lamin und Aktin abbauen, sie aktivieren jedoch auch sekundäre Zielgene wie beispielsweise DNasen, die für den Abbau der zellulären DNA während der Apoptose zuständig sind. Der Assay beinhaltet ein prolumineszentes Caspase-3/7 Substrat, welches die Tetrapeptidsequenz DEVD enthält. Dieses Substrat wird durch die Caspasen 3 und 7 gespalten und das daraus resultierende Spaltprodukt im Anschluss durch die im Assay enthaltene Luciferase in Anwesenheit von O<sub>2</sub>, ATP und Mg<sup>2+</sup> unter Freisetzung von Licht umgesetzt.



**Abbildung 14: Schema des Caspase 3/7 Assays (Quelle: Promega)**

Zunächst wurden  $1 \times 10^5$  DU145 oder LNCaP-Zellen in 24-Lochplatten ausgesät und nach 24 h mit 1 µg Effektorplasmid transfiziert. Zur Messung der Caspase 3/7-Aktivität wurde 48 h nach Transfektion das Medium abgenommen, die Zellen mit einer Lösung aus 50 µl Medium und 50 µl Caspase-Glo™ 3/7 Reagenz 1 h bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert und anschließend 50 µl des Lysats in eine 96-Well Platte überführt. Die Messung der Lumineszenz erfolgte im Victor X™ (Perkin Elmer) Platerader für 10 s.

## 5.9. Proteintechniken

### 5.9.1. Herstellen von Sample-Buffer-Proteinextrakten aus eukaryotischen Zellen

(Maniaits, 1989)

Um Proteinextrakte aus Monolayer-Zellkulturen herzustellen wurde ein 2x Sample-Buffer verwendet, welcher 3-Mercapto-1,2-Propanediol und SDS enthält. Ersteres reduziert Disulfidbrücken und führt so zur Auflösung der Tertiärstrukturen von Proteinen. Das enthaltene SDS zerstört alle nichtkovalenten Wechselwirkungen innerhalb des Proteins und führt außerdem bei allen Proteinen zu einem gleichen Masse-/Ladungsverhältnis. Aufgrund dieser Denaturierung ist die Wanderungstrecke der Proteine im Gel proportional zu ihrer Größe und nicht mehr abhängig von der eigenen Ladung.

Abtrypsinisierte Monolayerzellen wurden für 10 min bei 1100 rpm und 4°C pelletiert und einmal mit PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde anschließend auf Eis in einer definierten Menge 2xSample-Buffer resuspendiert, durch eine Ultraschallbehandlung von ~15 s aufgeschlossen und die Proteine für 5-10 min bei 98,5°C denaturiert. Das Lysat wurde in einem letzten Zentrifugationsschritt von 10 min bei 13000 rpm von nicht löslichen Zellbestandteilen befreit. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte durch Messen der Extinktion einer 1:100 Verdünnung in 0,1 N NaOH bei 280 nm mit einem Photometer. Der gemessene Wert wurde in folgende Formel eingesetzt, um das Lysatvolumen, welches in der Gelelektrophorese eingesetzt werden soll, zu berechnen.

$$\frac{6,4}{OD_{280}} = 30 \mu\text{g Protein}$$

Das Ergebnis der Formel entspricht der Menge 2x Sample-Buffer-Extrakt (in  $\mu\text{l}$ ), die 30  $\mu\text{g}$  Protein entspricht. Bis zur Verwendung wurde das Lysat bei -20°C gelagert.

### 5.9.2. SDS-PAGE

(Laemmli, 1970; Maniatis, 1989)

Bei einer SDS-Gelelektrophorese erfolgt die Auftrennung unter denaturierten Bedingungen hauptsächlich nach dem Molekulargewicht. Das sich im Puffer, Polyacrylamidgel und Probenpuffer im Überschuss befindende SDS lagert sich an die hydrophoben Regionen der Proteine an, wobei ein SDS-Molekül an je zwei Aminosäurereste binden kann. Dadurch wird das Protein in etwa proportional zu seiner Masse negativ geladen, die Eigenladung des Proteins wird vernachlässigbar und das Wandern der Proteine zur Anode wird gewährleistet. Die Matrix des Gels besteht aus Ketten polymerisierten Acrylamids, die durch Methylbisacrylamid quervernetzt sind. Die Polymerisation wird durch APS gestartet, wobei TEMED als Katalysator dient. Die Porengröße und somit die Auftrennungseigenschaften des Polyacrylamidgels hängen direkt vom eingesetzten Mengenverhältnis aus Acrylamid- und Bisacrylamid ab. Die elektrophoretische Beweglichkeit eines Proteins in einem Gel geeigneter Porengröße ist proportional zum Logarithmus des Molekulargewichts. In dieser Arbeit wurde ausschließlich die diskontinuierliche Gelelektrophorese durchgeführt, die in zwei Gelsystemen mit unterschiedlicher Porengröße und unterschiedlichen pH-Werten erfolgte, um eine hohe Auflösung bei der Trennung zu erreichen. Die Proteine laufen zunächst durch ein grobporiges Sammelgel (Uppergel) um eine einheitliche Lauffront zu erreichen. Die eigentliche Auftrennung erfolgt anschließend in einem feinporigen Trenngel (Bottomgel).

### 5.9.3. Herstellung eines SDS-Polyacrylamidgels und Gelelektrophorese

Für die Herstellung eines SDS-Polyacrylamidgels wurde zunächst das Trenngel gegossen, indem der Trenngelansatz zwischen zwei abgedichtete Glasplatten (14,5x16,5 cm), die durch einen Teflon-Abstandhalter voneinander getrennt waren, gegossen und mit destilliertem Wasser überschichtet wurde. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das Wasser abgegossen und das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet. Ein eingesetzter Teflonkamm sparte Geltaschen aus, um späteres Auftragen von Proteinproben zu ermöglichen. Nach der Polymerisation des Sammelgels wurden der Kamm sowie der Abstandhalter an der Unterseite des Trenngels entfernt und das Gel senkrecht in eine Gelelektrophoresekammer gespannt. Nach Auftragen der Proteinproben und 15 µl des entsprechenden

Größenstandards in die Taschen erfolgte die elektrophoretische Auftrennung im Sammelgel bei 25 mA und im 10%igen Trenngel bei 35 mA für ca. 2,5 h. Bei 7,5%igen Polyacrylamidgelen wurde die Stromstärke auf 15 mA für das Sammelgel und 25 mA für das Trenngel reduziert.

**Tabelle 15: Komponenten für ein 7,5%- bzw. 10%iges Polyacrylamidgel**

Komponente	Sammelgel	Trenngel	
		7,5 %	10 %
Sammel-/Trenngelstock	1,25 ml	4,0 ml	4,0 ml
Acrylamid (30 %)	750 µl	4,0 ml	5,3 ml
Bisacrylamid (2 %)	300 µl	1,6 ml	2,12 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	2,7 ml	6,4 ml	4,58 ml
APS (10 %)	50 µl	140 µl	140 µl
TEMED	20 µl	14 µl	14 µl

#### 5.9.4. Western Blot

Bei dieser Methode werden die zuvor im Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und bei niedriger Ionenstärke über hydrophobe Wechselwirkungen an diese immobilisiert, wobei das nach der Auftrennung und Immobilisierung entstandene Proteinmuster sowohl die Immunreaktivität als auch die funktionelle Aktivität beibehält. Diese Tatsache ermöglicht den Nachweis einzelner Proteine durch den Einsatz spezifischer Primär- und gekoppelte Sekundärantikörper durch chemische Lumineszenz. Der Aufbau des Blots erfolgte luftblasenfrei in einer mit Transferpuffer gefüllten Wanne. Folgende Komponenten wurden in dieser Reihenfolge in einem PVC-Gitter aufeinander gelegt: ein Wattetuch, zwei Filterpapiere, das Polyacrylamidgel, die Protran™-Nitrocellulose-Membran (Schleicher&Schuell), zwei Filterpapiere und wieder ein Wattetuch. Der Transfer wurde in einer mit Transferpuffer gefüllten Kammer (LKB 2005 Transphor Electro Blotting Unit) für 1,5 h bei 350 mA oder über Nacht bei 35 mA durchgeführt. Anschließend erfolgte eine unspezifische Gesamtproteinfärbung mit PonceauS™ (Sigma-Aldrich) für 10 min. Die Markerspur, die den „low molecular weight standard“ enthielt, wurde mit einem Skalpell abgetrennt, 10 min in Amidoschwarz-Lösung angefärbt und anschließend mit Entfärberlösung entfärbt. Beim Einsatz der „ColorPlus Prestained Protein Ladder“ als Größenstandard war keine zusätzliche

Färbung dieser Spur nötig. Die restliche Membran wurde für max. 30 min bei Raumtemperatur in 5%iger PBS-Milch und 0,2 % Tween geblockt, um unspezifische Bindungsstellen der Membran abzusättigen. Darauf folgend wurde diese mit dem entsprechenden Primär-Antikörper in 2-5 ml PBS-Milch (5 % + 0,2 % Tween) luftblasenfrei in Klarsichthüllen eingeschweißt und auf einem Taumler über Nacht bei 4°C inkubiert. Um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen, wurde die Membran am nächsten Morgen 3 × 15 min mit PBS-Puffer + 0,2 % Tween auf einem Taumler gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit einem gegen den Erstantikörper gerichteten Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Sekundärintikörper (1:5000 in 5 % PBS-Milch) für 1 h bei 4°C auf einem Taumler. Nach drei weiteren Waschschritten von 15 min in PBS-Puffer konnten die gebundenen Sekundärintikörper mit Hilfe des ECL™-Kits (Enhanced Chemoluminescence, Amersham) detektiert werden. Bei der hier ablaufenden chemischen Reaktion wird nach Zugabe von 5 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu 10 ml ECL-Lösung das Luminol oxidiert und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gleichzeitig oxidiert. Die entstehende Licht-Emission der Wellenlänge  $\lambda=428$  nm kann durch Auflegen eines blaulichtempfindlichen ECL™-Films (Hyperfilm ECL™, Amersham) dokumentiert werden. Dieser wurde abschließend entwickelt, fixiert und getrocknet.

### **5.9.5. Herstellung von Antigenen für die Immunisierung von Versuchstieren**

#### **5.9.5.1. Induktion der rekombinanten Proteinexpression in Bakterien**

Mit dieser Methode lassen sich große Mengen eines rekombinanten Proteins herstellen, die anschließend zur Immunisierung von Versuchstieren eingesetzt werden können. Das hier verwendete System arbeitet mit dem *E.coli*-Stamm BL21/DE3, der mit dem pGEX-4T-1 Vektor transformiert wird. Durch Zugabe von IPTG zum Kulturmedium wird das Gen der Gluthadion-S-Transferase induziert und das gewünschte Protein, welches direkt hinter die GST-kodierende Sequenz kloniert wurde, in großer Menge exprimiert. Hierzu wurden 50 µl BL21/DE3 Bakterien mit 2 µg des pGEX-Effektorplasmids transformiert, eine 20 ml Vorkultur (LB-Medium mit Ampicillin) angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Am nächsten Morgen wurden 2 ml Suspension aus der Vorkultur entnommen, um die Hauptkultur aus 200 ml LB-Medium mit Ampicillin anzuimpfen, und diese bei 37°C bis zu einer OD 600 nm von 0,6 geschüttelt. 50 ml der Suspension wurden für die Kontrolle vor der

Induktion (t=0 h) entnommen und abzentrifugiert (10 min, 5000 rpm, 4°C). Anschließend erfolgte die Induktion der Hauptkultur mit 0,1 mM IPTG (Endkonzentration). Nach 4 h wurde erneut die OD bei 600 nm einer 1:20 Verdünnung der Bakteriensuspension bestimmt, 10 ml der Suspension zur Induktionskontrolle (t=4 h) entnommen und sowohl die Kontrolle als auch der Rest der Hauptkultur für 10 min bei 5000 rpm pelletiert.

Die nun vorliegenden Pellets wurden auf Eis gekühlt und nach folgender Formel mit 2x Sample-Buffer versetzt:

$$\text{OD}_{600} \times \text{Aliquotmenge [ml]} \times \text{Verdünnung} \times 20 = 2 \times \text{Sample-Buffer Volumen [\mu l]}$$

Die Proben wurden anschließend einer Ultraschallbehandlung unterzogen und bei 98,5°C für 10 min denaturiert. Die Kontrolleextrakte wurden in einer SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und ein Western Blot durchgeführt, mit den induzierten Extrakten hingegen wurden präparative Gele angefertigt.

#### 5.9.5.2. Präparative Proteinaufarbeitung mittels SDS-PAGE

Diese Methode dient der Aufreinigung eines in Bakterien überexprimierten Proteins um dieses als Antigen zur Immunisierung von Versuchstieren einzusetzen. Im Gegensatz zur normalen SDS-PAGE werden hier Abstandhalter (Spacer), die drei mal so breit sind, und ein Kamm, der neben zwei Markertaschen eine durchgehende Tasche für den aufzutrennenden Proteinextrakt ausspart, verwendet. Nach der üblichen Auftrennung wird das Polyacrylamidgel angefärbt und die entsprechende Proteinbande, die sich über fast die komplette Breite des Gels erstreckt, ausgeschnitten und reisoliert.

Hierzu wurde ein 10%iges SDS-Präparationsgel gegossen und 500 µl des SDS-Proteinextraktes aufgetragen und aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend 30 min mit nicht fixierender Coomassie-Brilliant-Blue Lösung (ohne Isopropanol und Eisessig) gefärbt, die eine Elution des Proteins aus dem Gel ermöglicht. Die Entfärbung des Gels erfolgte mit einer 1 M Tris/HCl Lösung bis die Banden zu erkennen waren. Die entsprechende Bande, welche mit Hilfe des Größenstandards und aufgrund der Bandendicke identifiziert werden kann, wurde ausgeschnitten und zerkleinert. Dabei drückte man das Gelstück zunächst durch eine 10 ml Spritze und schließlich durch eine 5 ml Spritze. Das zerkleinerte Gelmaterial wurde in ca. 25 ml

einer 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Lösung aufgenommen und bei RT ü.N. auf einem Drehrad inkubiert, um das Diffundieren des Proteins aus der Gelmatrix in die Lösung zu ermöglichen. Nach der Zentrifugation für 10 min bei 3000 rpm wurde der Überstand abgenommen, bei  $-20^\circ\text{C}$  aufbewahrt und das Pellet erneut mit 25 ml 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Lösung bei RT für 2-3 Stunden auf dem Drehrad inkubiert. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt wurden die Überstände vereinigt und in zwei 50 ml Gefäßen bei  $-70^\circ\text{C}$  eingefroren. Die Schrägstellung der Gefäße erzeugte dabei eine größere Oberfläche der Flüssigkeit, die eine Gefriertrocknung erleichterte. Die gefrorene Proteinlösung wurde anschließend mit Parafilm verschlossen, mit Löchern versehen und für mindestens 48 h in einer Kryophylle gefriergetrocknet. Das so entstandene gefriergetrocknete Pulver wurde in 2,5 ml PBS gelöst und mit Hilfe von illustra NAP<sup>TM</sup>-25 Säulen (GE Healthcare) von verbliebenen Acrylamidresten und anderen Verunreinigungen befreit. Die mit Sephadex<sup>TM</sup> G-25-Sepharose befüllten Säulen fungieren als Molekularsieb, wobei sie kleine Moleküle zurückhalten und große Teilchen passieren lassen. Hierbei erfolgte zunächst die Äquilibrierung einer Säule mit 25 ml PBS und im Anschluss die Beladung mit 2,5 ml Proteinlösung. Das gereinigte Protein wurde mit 3,5 ml PBS von der Säule eluiert und konnte nach der Konzentrationsbestimmung zur Immunisierung von Kaninchen eingesetzt werden.

#### 5.9.5.3. Herstellung nativer Extrakte aus induzierten Bakterien

Um native Proteinextrakte herzustellen wurde ein Lysepuffer verwendet, der kein 3-Mercapto-1,2-Propanediol und SDS, sondern Lysozym enthält. Die Bakterienkultur wurde 4 h nach der Induktion pelletiert und in TNE-Puffer aufgenommen. Das Puffervolumen errechnet sich dabei nach folgender Formel:

$$\text{OD}_{600} \times \text{Aliquotmenge [ml]} \times \text{Verdünnung} \times 20 = \text{TNE-Puffer Volumen [\mu l]}$$

Zu diesem Reaktionsansatz wurde der Protease-Inhibitor PMSF (1 mM Endkonzentration) und Lysozym (1mg/ml Endkonzentration) zugegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zugabe von Triton-X-100 bis zu einer Endkonzentration von 0,5 % (v/v) und eine weitere Inkubation von 10 min auf Eis. Um den Extrakt von DNA zu befreien wurde der Ansatz mit DNase (10 $\mu\text{g/ml}$ ),  $\text{MgCl}_2$  (10 mM Endkonzentration) und NaCl (1 M Endkonzentration) versetzt, für 20 min bei RT inkubiert und abschließend einem Ultraschallaufschluss unterzogen (~15 s).

Nach einem Zentrifugationsschritt (10 min, 13000 rpm, 4°C) konnte der Überstand abgenommen und bei -20°C gelagert werden.

Diese hergestellten nativen Lysozymextrakte wurden von Dr. Kremmer zur Charakterisierung der generierten monoklonalen Antikörper im ELISA verwendet.

#### **5.9.6. Aufreinigung von Kaninchenserum**

Bei der Herstellung eines Kaninchensersums wird ein aufgereinigtes GST-Fusionsprotein als Antigen injiziert um eine Immunantwort auszulösen und somit eine Antikörperproduktion im Versuchstier anzuregen. Jedoch enthalten diese Seren auch Antikörper, die spezifisch gegen das GST-Fragment oder Reste bakterieller Proteine gerichtet sind. Diese führen zu starken Hintergrundsignalen und zusätzlichen Banden im Western Blot und erschweren die Detektion des gewünschten Proteins. Um das Kaninchenserum von diesen Antikörpern zu befreien wurde dieses in zwei Schritten aufgereinigt. Im ersten Schritt wurden zunächst die unspezifischen, gegen bakterielle Proteine gerichteten, Antikörper entfernt. Dazu wurden Nitrocellulosemembranen in 15 cm Petrischalen mit einem Bakterienlysate überschichtet. Jeweils 50 ml einer *E.coli*pMOSBlue-Kultur wurden pelletiert, in 30 ml Medium resuspendiert und durch Ultraschallaufschluss lysiert. Das Bakterienlysate wurde anschließend mit insgesamt drei Membranen ü.N. bei 4°C auf einem Taumler inkubiert. Nachdem die Proteine an die Membran binden konnten, folgten drei Waschschrte mit PBS für je 15 min. Im Anschluss wurde das 1:10 in PBS mit 0,05 % Natriumazid (Endkonzentration) verdünnte Kaninchenserum nacheinander auf die vorbehandelten Membranen gegeben und jeweils für mind. 4 h bei °C inkubiert. Dieser Vorgang ermöglichte das sukzessive Binden der unerwünschten Antikörper an die, auf der Membran immobilisierten, Bakterienproteine. Im zweiten Schritt wurde das Kaninchenserum von  $\alpha$ -GST-Antikörpern befreit, indem man das Serum auf eine mit GST gekoppelte Glutathion-Sepharose-Säule gab. 500  $\mu$ l Glutathion-Sepharose wurden mit einem nativen Lysozymextrakt aus induzierten, pGEX-4T-1 transformierten, *E.coli*BL21-Bakterien versetzt und ü.N. bei 4°C auf einem Rotator inkubiert wurden. Nach 3-maligem Waschen der Säule mit PBS und kurzem Sedimentieren bei 1000 rpm wurde der Überstand verworfen, das Serum hinzugegeben und der Ansatz ü.N. bei 4°C rotiert. Die  $\alpha$ -GST-Antikörper binden dabei an das immobilisierte GST in der Sepharose und sind somit nicht mehr im Serum enthalten. Das Kaninchenserum

konnte nach einem Sedimentationsschritt abgenommen und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert werden.

### **5.9.7. Gewinnung monoklonaler Antikörper aus Versuchstieren**

Die hier beschriebenen Experimente wurden in München von Frau Dr. Elisabeth Kremmer durchgeführt. Als Versuchstiere dienten Ratten (LOU/C). Es wurden jeweils drei Immunisierungen intraperitoneal (i.p.) und subcutan (s.c.) mit  $50\ \mu\text{g}$  des an Ovalbumin gekoppelten SEC23A-Peptids durchgeführt. Die letzte Immunisierung (final boost) wurde zwei Monate nach der Grundimmunisierung i.p. und drei Tage vor der Fusion s.c. durchgeführt. Im Anschluss erfolgte eine Fusion von Milzzellen der immunisierten Ratte und der Myelomzelllinie (P3X63-Ag8.653). Die erhaltenen Hybridoma-Zellen wurden in Mikrotiterplatten ausgesät und bei  $37^{\circ}\text{C}$  und  $5\ \%$   $\text{CO}_2$  inkubiert. Klone, welche spezifische Antikörper gegen SEC23A bilden, wurden mit Hilfe von „Solid-Phase-Immunoassays“ identifiziert. Dabei erfolgte die Testung mit gebundenen, an BSA gekoppelten SEC23A Peptiden als Selektionsindikator und SEC23B-GST Proteinen als Negativkontrolle, um eine Kreuzreaktivität der Antikörper mit SEC23B zu verhindern. Einzelne Immunoglobulinsubtypen der monoklonalen Antikörper wurden durch das Verwenden von Biotin-gekoppelten, IgG-subtypspezifischen  $\alpha$ -Ratte-IgG monoklonalen Antikörpern (ATCC, Rockville, MA, USA) bestätigt.

### **5.10. Herstellung der cDNA-Banken**

Je 5 Gewebeproben wurden zu insgesamt vier Pools vereinigt. Pool 1 und 2 enthielt Normalgewebe, Pool 3 und 4 Prostatatumorgewebe. Sowohl die Herstellung der cDNA-Banken aus den Gewebepools wie auch die Sequenzierung der cDNA erfolgte durch die Firma vertis Biotechnologie AG (Freising), soll aber im Folgenden kurz zusammengefasst werden.

#### **5.10.1. Isolierung der kleinen RNA-Fraktion aus Gewebe**

Die RNA-Fraktion  $<500\ \text{nt}$  wurde mit dem mirVana miRNA isolation kit (Ambion) isoliert, in einem denaturierenden  $15\%$ igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit

SYBRgreenII angefärbt. Anschließend wurden die RNAs der Länge 19-29 nt durch passive Elution aus dem Gel gewonnen, mit Ethanol gefällt und in Wasser gelöst.

### 5.10.2. cDNA-Synthese

Die RNA wurde zunächst mit Hilfe der Poly(A)-Polymerase mit einem 3'-Poly(A)-Schwanz versehen und am 5'-Phosphatrest mit einem RNA-Adapter ligiert. Die anschließende Erststrangsynthese erfolgte mit einem spezifischen Oligo(dT)-Adapter-Primer unter Verwendung einer M-MLV-RNaseH<sup>-</sup>. Die abschließende PCR-Amplifikation der vorliegenden cDNA fand mit Hilfe von spezifischen 454-Adaptoren (siehe Tabelle 16) bis zu einer Konzentration von ~30 ng/μl statt.

Die hergestellte cDNA war von folgenden Adaptersequenzen mit einer Länge von insgesamt 104 Basen flankiert (Tabelle 16), was einer Gesamtlänge von 120-145 bp entsprach.

**Tabelle 16: Übersicht über die vor der Sequenzierung addierten Adaptersequenzen**

Adapter	Sequenz
5'-Adapter	GACCTTGGCTGTCACTCA
5'-454-Adapter	GCCTCCCTCGCGCCATCAGC
Oligo(dT)-Adapter	ACGAGACATCGCCCCGC(T) <sub>25</sub>
3'-454-Adapter	GCCTTGCCAGCCCGCTCAG

Zusätzliche, im 5'-Adapter enthaltene, Barcode-Sequenzen, die der späteren Identifizierung der Sequenzen aus verschiedenen Gewebepools dienen, sind in Tabelle 17 zusammengefasst.

**Tabelle 17: Verwendete Barcode-Sequenzen zur Identifizierung der entsprechenden cDNA-Banken**

cDNA-Bank	Barcode	PCR-Zyklen
Pool1 (normal)	ACTA	18
Pool 2 (normal)	AGGT	18
Pool 3 (Tumor)	ATCG	18
Pool 4 (Tumor)	CAAT	18

## 5.11. Auswertung der Sequenzdaten

Die Auswertung der 454-Sequenzierungsdaten fand mit Hilfe von Makros, die von Jiayun Zhu entwickelt und zur Verfügung gestellt wurden, statt.

### 5.11.1. Generierung einer miRNA-Datenbank

Als ersten Schritt erfolgte die Erstellung einer miRNA-Datenbank, mit der die Sequenzdaten später verglichen werden konnten. Hierzu wurden die Dateien `mature.fa.gz` bzw. `maturestar.fa.gz` von der Internet-Seite <http://mirbase.org/sequences/ftp.shtml> heruntergeladen und in eine Excel-Tabelle eingefügt. miRNA-Name und die entsprechende Sequenz wurden mit Hilfe des Makros „Database reconstruction“ in zwei Spalten aufgeteilt, so dass anschließend eine neue Tabelle mit nur humanen miRNA Sequenzen vorlag. Das Makro „Rename“ diente der Vereinfachung der miRNA-Namen und fügte zusätzlich eine neue Spalte mit der DNA-Sequenz der microRNAs hinzu. Alle in den Sequenzen vorhandenen A's wurden entfernt, um eine spätere Annotierung der miRNAs in den Banken zu ermöglichen.

### 5.11.2. Entfernen von Adaptersequenzen und Poly(A)-Schwanz

Die erhaltenen Sequenzierdaten, welche die Barcodesequenz, sowie die 5'-Adaptersequenz und den 3'-Poly(A)-Schwanz enthielten, lagen in einem Rich-Text-Format vor und wurden in Excel-Tabellen kopiert. Um die 5'-Adaptersequenz bzw. den Barcode mit einer Gesamtlänge von 24 Basen zu entfernen, wurde das Makro „DE\_TAG“ ausgeführt und die ersten 24 Basen gelöscht. Alle in der Sequenzierung nicht lesbaren Basen „N's“ wurden ebenfalls entfernt. An die restlichen, oft unterschiedlich langen Poly(A)-Sequenzen wurde am 3'-Ende ein „Z“ angehängt und alle enthaltenen „AZ“ gelöscht. Diese Prozedur wurde wiederholt, bis alle am 3'-Ende freistehenden „A's“ entfernt waren.

### 5.11.3. Vereinfachen der Sequenz-Banken

Die Vereinfachung der Sequenz-Banken wurde mit dem Makro „SAME\_READ“ durchgeführt. Hierbei erfolgte nach dem alphabetischen Sortieren der Sequenzen die

Aufsummierung aller „gleichen“ Sequenzen um diese später mit der miRNA-Datenbank vergleichen zu können.

Da die mittels 454-Sequenzierung erhaltenen Sequenzen oft zusätzliche „A´s“ enthalten, mussten alle in der Sequenz vorkommenden „A´s“ gelöscht werden, um die Identifizierung der Sequenzen nicht zu stören. Der daraus resultierende Nachteil ist die Generierung vieler falsch-positiver Annotierungen, die später von Hand überprüft werden müssen. Das Makro „MERGE\_deA“ ermöglichte anschließend die Erstellung einer Tabelle, die jeder Sequenz ihre vorkommende Anzahl sowie ihre Abfolge mit und ohne „A´s“ zuordnet.

#### **5.11.4. Sequenz Vergleich**

Der eigentliche Abgleich der unbekanntenen Sequenzen (ohne „A“) mit der miRNA-Datenbank (Sequenzen ohne „A“) erfolgte durch das Makro „ANNOTATION“, welches nacheinander alle Basen überprüft und Übereinstimmungen erkennt. Bei diesem Abgleich wurde jedoch darauf verzichtet, die ersten beiden bzw. letzten Basen der miRNA zu prüfen, da miRNA-Sequenzen oft am 5'- bzw. 3'-Ende degradiert oder modifiziert sind. Diese wenig stringenten Bedingungen führten wiederum zu vielen falsch-positiven Ergebnissen, die später von Hand erkannt und eliminiert werden mussten.

#### **5.11.5. Manuelle Überprüfung der Annotationen**

Die, aufgrund der gewählten Vergleichsbedingungen der Makros, vorhandenen falsch-negativen, jedoch vor allem falsch-positiven Annotierungen machten eine manuelle Überprüfung der Annotation nötig. Hierzu wurde eine Tabelle erstellt, die alle Sequenzen, ihre jeweilige Anzahl, ihre Sequenz mit und ohne „A“, sowie die jeweilige Annotierung enthält. Dabei wurden die identifizierten miRNA-Namen, die durch Vergleich der Sequenzen „ohne A“ erhalten wurden, ihren jeweiligen Sequenzen mit „A“ zugeordnet. Anschließend erfolgte die manuelle Überprüfung, bei der kontrolliert wurde, ob die jeweilige Sequenz mit „A“ ebenfalls der miRNA entsprach. Dies wurde mit Hilfe der miRNA-Datenbank und der Such-Funktion der miRNA-Sanger-Database (<http://www.mirbase.org/search.shtml>) durchgeführt.

---

Die nicht annotierten Sequenzen wurden zunächst ebenfalls manuell nach möglicherweise nicht erkannten miRNAs durchsucht, da Sequenzierfehler ebenfalls zu falsch-negativen Ergebnissen führen können.

#### **5.11.6. Identifizierung von ncRNAs**

Die übrigen, Nicht-miRNA-Sequenzen wurden im nächsten Schritt zunächst mit anderen ncRNA-Sequenzen verglichen. Dies erfolgte analog zur miRNA-Annotation unter Zuhilfenahme des Makros „ncRNA\_annotation“, jedoch mit einer anderen ncRNA-Datenbank, welche mit fRNADB: Blast (<http://www.ncrna.org/frnadb/blast>, <http://gene.fudan.sh.cn/>) und sno/scaRNAbase (snoRNAbase.nsf) erstellt wurde. Da auch hier viele Sequenzen keiner ncRNA zugeordnet und somit nicht identifiziert werden konnten, fand im Anschluss bei mehrfachem Vorkommen einer Sequenz ein Abgleich mit humanen Transkripten unter Verwendung von Blast (NCBI Nucleotide Blast) statt.

#### **5.11.7. Auswertung der analysierten Sequenzbanken**

Der abschließende Schritt der Sequenzauswertung beinhaltete die Aufsummierung aller identifizierten Sequenzen. Das Makro „AUSWERTUNG“ zählte dabei die jeweilige Anzahl aller vorkommenden miRNAs und ncRNAs zusammen und machte eine Aussage über das Vorkommen der verschiedenen miRNAs bzw. ncRNAs in den einzelnen Banken erst möglich. Die relative Expression einer miRNA wurde mit Hilfe der Gesamtzahl an miRNA-Sequenzen errechnet.

## 6. Ergebnisse

### 6.1. Fragestellung

Das Prostatakarzinom ist die am häufigsten diagnostizierte Tumorart in der männlichen Bevölkerung. Aufgrund der sehr starken Heterogenität dieses Karzinoms sind die Ursachen für die Entstehung dieser Krebsart nicht eindeutig bestimmt. In vielen verschiedenen Tumorentitäten, unter anderem auch Prostata, konnte eine veränderte miRNA-Expression im Vergleich zu gesundem Gewebe nachgewiesen werden, welche einen möglichen Auslöser für die Krebsentstehung darstellen kann.

Zu Beginn dieser Arbeit waren bereits mehrere Studien zum miRNA-Expressionsprofil im Prostatakarzinom veröffentlicht (Ambs et al., 2008; Lu et al., 2005; Ozen et al., 2008; Porkka et al., 2007; Tong et al., 2009; Volinia et al., 2006). Diese Studien zeigten jedoch sehr unterschiedliche und zum Teil widersprüchliche Ergebnisse, welche zusammengefasst die Rolle von miRNAs bei der Entstehung und der Progression des Prostatakarzinoms nicht eindeutig klären konnten.

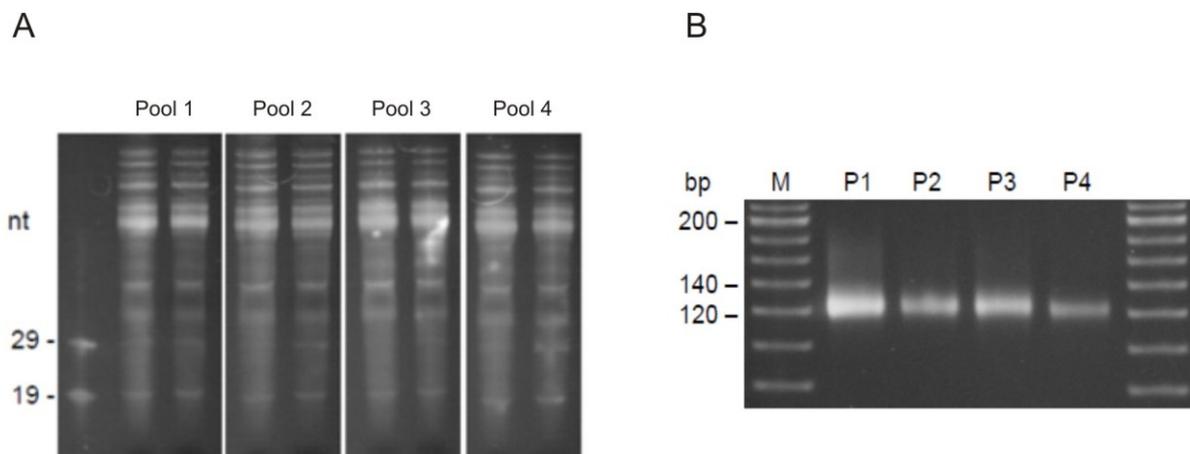
Ziel dieser Arbeit war es somit, ein miRNA-Expressionsprofil des Prostatakarzinoms mit einer für diese Tumorentität noch nicht verwendeten Methode, dem „454 deep-sequencing“ zu erstellen. Durch den Vergleich des Expressionsprofils von Prostatakarzinom und gesundem Prostatagewebe sollten zunächst im Prostatakarzinom deregulierte miRNAs identifiziert werden. Die Validierung der aus der Sequenzierung erhaltenen Ergebnisse erfolgte sowohl in Zelllinien als auch im primären Prostatakarzinomgewebe durch Northern Blots.

Mit Hilfe von Luciferase-Reportergen-Assays sollten anschließend Ziel-mRNAs identifiziert werden, um den Einfluss der deregulierten miRNAs auf die Tumorigenese und –progression des Prostatakarzinoms aufzuklären. Der Einfluss der deregulierten miRNAs auf die Expression entsprechender Zielgene sollte in verschiedenen Zelllinien zusätzlich durch Western Blots demonstriert werden.

## 6.2. Herstellung von cDNA-Banken aus Tumor- bzw. Normalgewebe

Die für die Herstellung der cDNA-Banken verwendeten Tumor- und Normalgewebe (siehe Tabelle 3) wurden vom Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Regensburg zur Verfügung gestellt. Es wurden insgesamt zehn Prostatakarzinome und zehn der entsprechenden Normalprostata-Gewebe verwendet, wobei jeweils fünf Gewebeproben vereinigt wurden. Die Herstellung der cDNA-Banken aus den insgesamt vier Gewebe-Pools erfolgte durch die Firma vertis Biotechnologie AG. Die Sequenzierung der Banken führte die Firma 454 Life Sciences durch.

Zunächst wurde die RNA mit einer Fragmentlänge von weniger als 500 bp aus den entsprechenden Geweben extrahiert und die RNA-Qualität im Anschluss an die Gelelektrophorese dokumentiert. Das Gelbild in Abbildung 15A zeigt distinkte Banden der aufgereinigten RNA, was für eine gute Qualität der RNA ohne Degradation spricht. Nach der Reisolation der kleinen RNA-Fraktion mit der Größe von 19-29 nt aus den Gelen folgte 3'-Poly(A)-Tailing, Ligation der Adaptersequenzen und die reverse Transkription der RNA in cDNA. Abbildung 15B zeigt die PCR-amplifizierte cDNA mit der erwarteten Fragmentlänge von 120–145 bp, die sich durch die Ligation von verschiedenen Adapttern und des Poly(A)-Schwanzes ergibt.



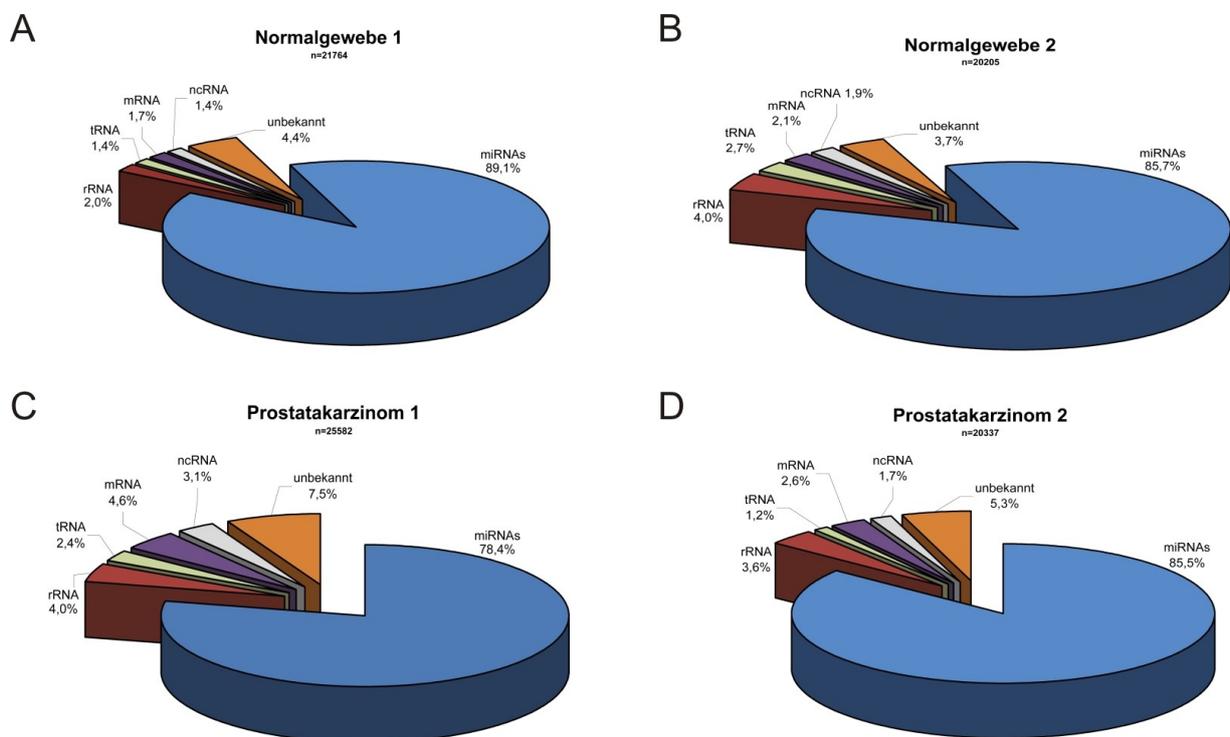
**Abbildung 15: Qualitätskontrolle der aus den Geweben isolierten RNA und der PCR-amplifizierten cDNA (Quelle: vertis Biotechnologie AG)**

A: Die RNA-Fraktion <500 bp wurde mit dem mirVana miRNA Isolation Kit (Ambion) aus Prostata-Tumor- und Prostata-Normalgewebe isoliert, in einem denaturierenden 15%igen Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und mit SYBRgreenII angefärbt. B: Analyse der PCR-amplifizierten cDNAs in einem 6%igen Polyacrylamid-Gel. Die mit verschiedenen Adapttern und dem Poly(A)-Schwanz versehenen cDNAs zeigten die erwartete Größe von 120 – 145 bp.

### 6.3. Sequenz-Analyse der hergestellten cDNA-Banken

#### 6.3.1. Klassifizierung nicht-kodierender RNAs in den untersuchten cDNA-Banken

Die aus der Sequenzierung der cDNA-Banken erhaltenen Sequenzen wurden zunächst semi-manuell mit Hilfe der in Abschnitt 5.11 beschriebenen Methode analysiert und ausgewertet. Abbildung 16 zeigt die Expressionsmuster nicht-kodierender RNAs für die einzelnen Karzinom- bzw. Normalgewebe-Pools.



**Abbildung 16: Verteilung nicht-kodierender RNAs bzw. Transkripte in den Sequenz-Datenbanken der untersuchten Gewebe**

Abgebildet ist die Verteilung nicht-kodierender RNAs und mRNA-Fragmente in Prostanormalgewebe (A+B) und Prostatakarzinomen (C+D). Die Gesamtzahl der nach der Sequenzierung erhaltenen Sequenzen ist pro Pool als „n“ angegeben und das relative Sequenzvorkommen, welches in % angeführt ist, errechnet sich aus der absoluten Sequenzanzahl des jeweiligen RNA-Typs im Verhältnis zur Gesamtzahl aller Sequenzen des jeweiligen Pools. miRNA=microRNA; mRNA=messenger RNA; nc=non-coding RNA; rRNA=ribosomal RNA; tRNA=transfer RNA

Für die erste Normalgewebesammlung konnten 89,1 % von insgesamt 21764 analysierten Sequenzen als miRNAs identifiziert werden. Desweiteren waren 2 % der Sequenzen rRNA, 1,7 % mRNA-Fragmente und jeweils 1,4 % tRNA bzw. andere ncRNAs, wobei 4,4 % der Sequenzen nicht identifiziert werden konnten.

Ein ähnliches Expressionsmuster zeigte auch der zweite Normalgewebepool, wo 85,7 % der insgesamt 20205 Sequenzen miRNAs repräsentierten. Weiterhin stellten 3,6 % rRNA, 2,6 % humane Transkripte (mRNA), 1,7 % ncRNA und 1,2 % tRNA dar, 5,3 % der Sequenzen konnten nicht zugeordnet werden.

Die Anzahl der für die Prostatakarzinomgewebe erhaltenen Sequenzen war mit 25582 bzw. 20337 vergleichbar mit denen der cDNA-Banken aus Normalgewebe. Im ersten Tumorpool konnten 78,4 % bekannten miRNAs, 4,6 % mRNAs, 4 % rRNAs, 3,1 % ncRNAs und 2,4 % tRNAs zugeordnet werden, während 7,5 % der Sequenzen auch nach der manuellen Analyse nicht identifiziert werden konnten.

Im zweiten Prostatakarzinompool wurden 85,5 % der in der cDNA-Bank vorhandenen Sequenzen als miRNAs erkannt. Ferner waren 3,6 % rRNAs, 2,6 % mRNA-Fragmente, 1,7 % ncRNAs und 1,2 % tRNAs, wobei 5,3 % der Sequenzen nicht identifiziert werden konnten.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass in allen vier cDNA-Banken der Anteil an identifizierten miRNAs 78-90 % betrug und den Großteil der Sequenzen ausmachte. Auch die prozentuale Verteilung anderer nicht-kodierender RNAs war in den Banken sehr ähnlich und schwankte nur in geringem Maße.

### **6.3.2. Expressionsanalyse zellulärer miRNAs**

Da jeweils die Normalgewebe- und Karzinomgewebe-Proben auf je zwei Pools aufgeteilt wurden, erfolgte zunächst die Gegenüberstellung der entsprechenden Sequenzdatenbanken. Hierbei konnte eine Aussage über die Homogenität der Gewebezusammenstellung gemacht werden, wobei ein anschließender Zusammenschluss der passenden Sequenzbanken ermöglicht werden konnte.

Verglichen wurde hierbei die relative miRNA-Expression, welche der Anzahl einer bestimmten miRNA im Verhältnis zur Gesamt-miRNA-Zahl des untersuchten Gewebes entspricht. Da viele miRNAs eine hohe Sequenzhomologie zeigen, konnten einige miRNAs aufgrund der zahlreichen Modifikationen, die auf die Sequenzierung zurückzuführen sind, nicht voneinander unterschieden werden, so dass beide miRNAs für die Analyse aller Banken zusammengefasst wurden (Bsp.: miR-23a+23b).

### 6.3.2.1. Vergleich der miRNA-Expression innerhalb der Normalgewebe-Pools

Um zu gewährleisten, dass in beiden Normalgewebe-Pools vergleichbare Gewebeprouben enthalten waren und somit auch das miRNA-Expressionsprofil keinen starken Schwankungen unterliegt, wurden die Sequenzierungsergebnisse beider Gruppen gegenübergestellt. Der Vergleich der Expressionsprofile erfolgte bezüglich der 20 am stärksten exprimierten miRNAs beider Gewebepools.

**Tabelle 18: Vergleich der am stärksten exprimierten miRNAs in den Normalgewebe-Banken**

Normalgewebe Pool 1		Normalgewebe Pool 2	
miRNA	relative Expression [%]	miRNA	relative Expression [%]
hsa-miR-23a+23b	11,46	hsa-miR-23a+23b	9,35
hsa-miR-27b	9,12	hsa-miR-27b	8,94
hsa-miR-199a-3p+199b-3p	6,50	hsa-miR-16	4,96
hsa-miR-16	5,95	hsa-miR-199a-3p+199b-3p	4,88
hsa-miR-26a	5,53	hsa-miR-26a	4,44
hsa-miR-145	5,25	hsa-miR-27a	3,51
hsa-miR-27a	4,76	hsa-miR-195	3,19
hsa-miR-26b	3,56	hsa-miR-145	3,09
hsa-miR-21	3,29	hsa-miR-26b	3,06
hsa-miR-143	3,25	hsa-miR-200c	2,88
hsa-miR-195	3,16	hsa-miR-200b	2,78
hsa-miR-24	2,94	hsa-miR-21	2,52
hsa-miR-125b	1,96	hsa-miR-24	2,51
hsa-miR-15a	1,69	hsa-miR-143	1,91
hsa-miR-29c	1,61	hsa-miR-15a	1,46
hsa-miR-200c	1,49	hsa-miR-125b	1,42
hsa-miR-29a	1,45	hsa-miR-29c	1,41
hsa-miR-200b	1,35	hsa-miR-29a	1,23
hsa-miR-15b	1,26	hsa-miR-151-5p	1,12
hsa-miR-424	1,04	hsa-let-7a	0,96

Aus Tabelle 18 ist ersichtlich, dass 18 miRNAs in beiden Sequenzbanken übereinstimmend überexprimiert waren. Hierbei handelte es sich um miRNA 23a+23b, miR-199a-3p+5p, miR-16, miR-143, miR-145, miR-21, miR-26a, miR-26b, miR-27a, miR-27b, miR-195, miR-24, miR-125b, miR-15a, miR-29c, sowie miR-200b, miR-200c und miR-29a. In Pool 2 fehlte miR-424 und miR-15b, wohingegen in Pool 1 miRNA let-7a und miR-151-5p nicht vertreten waren. Trotz minimaler Schwankungen der relativen Expressionswerte zeigten die cDNA-Banken aus Normalgewebe somit ein vergleichbares miRNA-Muster und erlaubten das Zusammenfassen beider Sequenzbanken zu einer.

### 6.3.2.2. Relative miRNA-Expression innerhalb der Prostatakarzinom-Pools

Analog zu den Normalgewebekbanken wurden beide Prostatakarzinom-Pools gegenübergestellt und hinsichtlich der 20 am stärksten exprimierten miRNAs verglichen. Tabelle 19 zeigt hierbei, dass die Unterschiede innerhalb der Prostatakarzinom-Gewebe größer sind als diejenigen im Normalgewebe. Zu den 15 am stärksten vorhandenen miRNAs in beiden Karzinom-Banken gehören miR-15b, miR-16, miR-21, miR-23a und b, miR-24, miR-26a und b, miR-27a und b, miR-145, miR-195, miR-199a-3p bzw. -199b-3p, sowie miR-200b, miR-200c und miR-151-5p.

Tabelle 19: Vergleich der am stärksten exprimierten miRNAs in den Prostatakarzinom-Pools

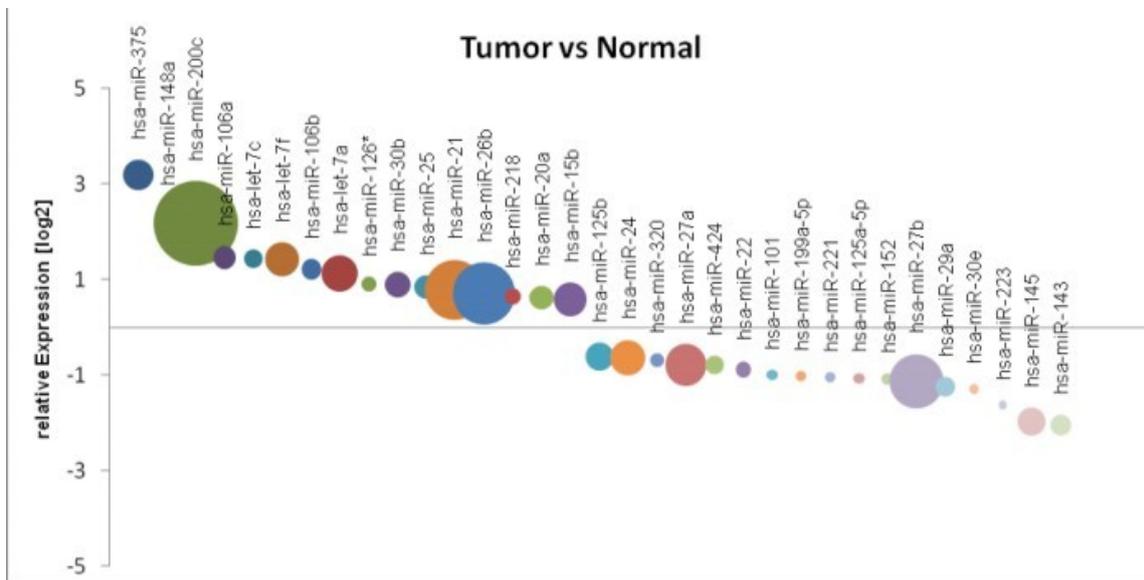
Prostatakarzinom Pool 1		Prostatakarzinom Pool 2	
miRNA	relative Expression [%]	miRNA	relative Expression [%]
hsa-miR-16	9,44	hsa-miR-23a+23b	15,80
hsa-miR-200c	8,75	hsa-miR-200c	13,00
hsa-miR-23a+23b	5,54	hsa-miR-26b	7,79
hsa-miR-27b	4,77	hsa-miR-21	7,59
hsa-miR-26a	4,55	hsa-miR-26a	6,04
hsa-miR-26b	4,25	hsa-miR-195	4,33
hsa-miR-199a-3p+199b-3p	4,02	hsa-miR-16	4,19
hsa-miR-21	3,55	hsa-miR-27b	4,14
hsa-miR-27a	3,46	hsa-miR-200b	3,43
hsa-miR-195	3,35	hsa-miR-199a-3p+199b-3p	3,22
hsa-miR-200b	2,93	hsa-let-7f	2,93
hsa-miR-15a	2,50	hsa-let-7a	2,78
hsa-miR-29c	2,35	hsa-miR-375	2,28
hsa-miR-15b	2,11	hsa-miR-24	1,81
hsa-miR-125b	2,03	hsa-miR-27a	1,58
hsa-miR-24	1,98	hsa-miR-374b	1,47
hsa-miR-151-5p	1,83	hsa-miR-15b	1,24
hsa-miR-30b	1,76	hsa-miR-92a	1,03
hsa-miR-126	1,46	hsa-miR-151-5p	0,83
hsa-miR-145	1,46	hsa-miR-145	0,67

Auffällig ist, dass die relativen Expressionswerte höheren Schwankungen unterlagen, als dies in der Gegenüberstellung der Normalgewebe zu beobachten war. Beispielsweise war miR-92a im Pool 2 mit 1,03 % vertreten, konnte im ersten Pool jedoch nicht nachgewiesen werden. Ähnliches galt auch für miR-15a, miR-29c, miR-125b, miR-30b und miR-126 in der ersten Karzinom-Bank, welche im zweiten Prostatakarzinom-Pool nur sehr schwach exprimiert waren und aufgrund niedriger Expressionswerte nicht in der Tabelle vertreten sind. Da jedoch 75 % der in dieser

Gegenüberstellung aufgelisteten miRNAs übereinstimmten, wurden die aus der Sequenzierung erhaltenen Sequenzen beider Karzinom-Pools, ähnlich denjenigen aus Normalgewebe, in einer Datenbank zusammengefasst und ausgewertet.

### 6.3.2.3. Vergleich der miRNA-Expression zwischen Normal- und Prostatakarzinomgewebe

Im nächsten Schritt erfolgte die Gegenüberstellung der jeweils zusammengefassten Prostatakarzinom- und Normalgewebe-cDNA-Bank. Hierbei konnten deutliche Unterschiede zwischen beiden Sequenz-Banken bestimmt werden. Zunächst ließ sich feststellen, dass in den verschiedenen cDNA-Banken eine unterschiedliche Anzahl von miRNAs vorhanden war. Das Normalgewebe exprimierte 240 unterschiedlicher miRNAs, die Prostatakarzinome dagegen nur 217 verschiedene. Anschließend wurde eine Eingrenzung der deregulierten miRNAs vorgenommen, wobei eine relative Expression von mindestens 0,1 % und eine mindestens 1,5-fache Expressionsänderung einer miRNA innerhalb beider cDNA-Banken vorausgesetzt wurde.



**Abbildung 17: Vergleich der relativen miRNA-Expression zwischen Prostatakarzinom und gesundem Prostatagewebe**

Dargestellt ist die Änderung der relativen Expression von miRNAs, welche in beiden Banken eine Expression von mindestens 0,1 % und eine mindestens 1,5-fache Expressionsänderung im Vergleich der Prostatakarzinome zum Prostata-Normalgewebe zeigten. Die relative Expression ist als log2 dargestellt, wobei jede Blase eine einzelne miRNA darstellt und die Blasengröße ihrer relativen Expression innerhalb der Prostatakarzinome entspricht. Die miRNAs oberhalb der x-Achse sind in Prostatakarzinomen hochreguliert, miRNAs unterhalb der x-Achse reprimiert. Von insgesamt 33 deregulierten miRNAs wurden 17 reprimiert und 16 induziert.

In Abbildung 17 sind die deregulierten miRNAs in einem sogenannten Blasendiagramm dargestellt. Die einzelnen Blasen entsprechen jeweils einer miRNA und die Blasengröße ihrer relativen Expression innerhalb der Prostatakarzinom-Bank. In den Prostatakarzinomen wurden im Vergleich zum Normalgewebe insgesamt 33 deregulierte miRNAs gefunden, von denen 16 induziert und 17 reprimiert waren.

Die drei am stärksten induzierten miRNAs waren miR-375, miR-148a sowie miR-200c. Zu den am stärksten reprimierten miRNAs gehörten miR-143, miR-145 und miR-223. Die genauen Expressionsveränderungen sowie relativen Expressionswerte sind für alle 33 deregulierten miRNAs in Tabelle 20 zusammengefasst.

**Tabelle 20: Deregulierte miRNAs in Prostatakarzinomen verglichen zum Normalgewebe**

induzierte miRNAs			reprimierte miRNAs		
miRNA	rel. Expression [%]	Veränderung (x-fach)	miRNA	rel. Expression [%]	Veränderung (x-fach)
hsa-miR-375	1,35	9,12	hsa-miR-143	0,63	0,24
hsa-miR-148a	0,74	4,93	hsa-miR-145	1,06	0,26
hsa-miR-200c	9,93	4,54	hsa-miR-223	0,11	0,33
hsa-miR-106a	0,72	2,76	hsa-miR-30e	0,15	0,41
hsa-let-7c	0,49	2,74	hsa-miR-29a	0,57	0,42
hsa-let-7f	1,61	2,71	hsa-miR-27b	4,16	0,46
hsa-miR-106b	0,57	2,33	hsa-miR-152	0,20	0,47
hsa-let-7a	1,88	2,20	hsa-miR-125a-5p	0,18	0,48
hsa-miR-126*	0,35	1,87	hsa-miR-221	0,15	0,49
hsa-miR-30b	0,91	1,87	hsa-miR-199a-5p	0,14	0,49
hsa-miR-25	0,75	1,79	hsa-miR-101	0,17	0,50
hsa-miR-21	5,02	1,73	hsa-miR-22	0,37	0,55
hsa-miR-26b	5,45	1,65	hsa-miR-424	0,54	0,58
hsa-miR-218	0,37	1,57	hsa-miR-27a	2,41	0,58
hsa-miR-20a	0,79	1,54	hsa-miR-320	0,29	0,63
hsa-miR-15b	1,59	1,51	hsa-miR-24	1,76	0,65
			hsa-miR-125b	1,10	0,65

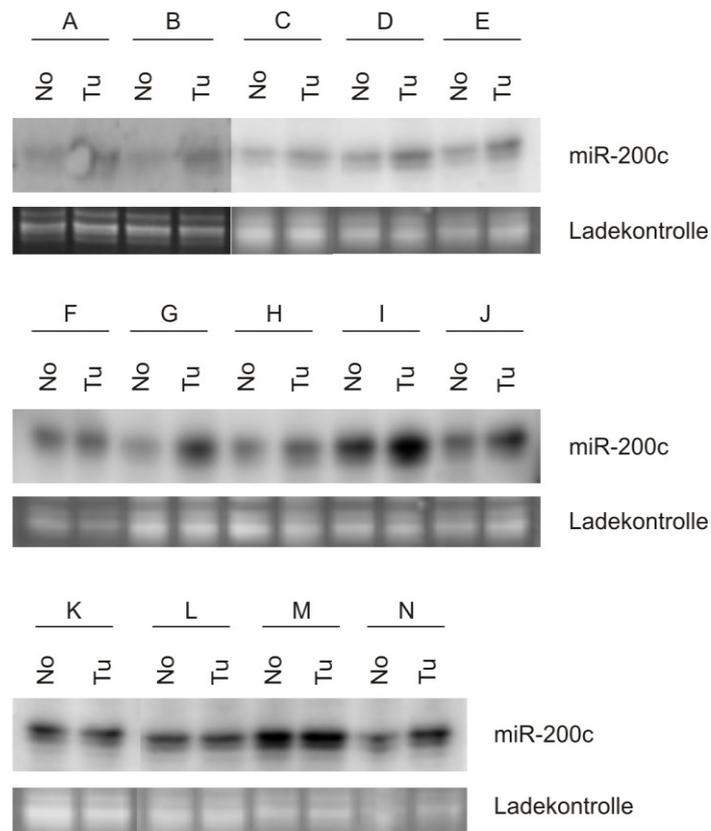
### 6.3.3. Keine Identifizierung von potentiell neuen miRNAs

Im Gegensatz zu Array-Analysen, bei denen nur bereits bekannte Sequenzen untersucht werden, bietet die 454-Sequenzierung den Vorteil, neue miRNAs, welche noch nicht beschrieben wurden, zu identifizieren. In dieser Arbeit wurden die Sequenzen untersucht, die ~20 nt lang und weder als bekannte miRNAs noch ncRNAs identifiziert werden konnten. Bei dem Suchvorgang erfolgte zunächst ein Abgleich der Sequenz mit der miRNA-Datenbank von Sanger, um mögliche neue

miRNAs von bereits bekannten miRNA-Vorläufern zu finden. Da bei dieser Prozedur keine neuen miRNAs gefunden werden konnten, wurden die zu untersuchenden Sequenzen und ~100 nt der sie umgebenden Nukleotide mit Hilfe des Programms mfold analysiert. Hierbei erfolgte eine Vorhersage der Faltung dieser Sequenzbereiche, um eventuelle Haarnadelstrukturen von miRNA-Vorläufern zu finden. Auch mit diesem Ansatz konnten keine neuen miRNAs in den vorliegenden cDNA-Banken identifiziert werden.

#### **6.4. Validierung differentiell exprimierter miRNAs**

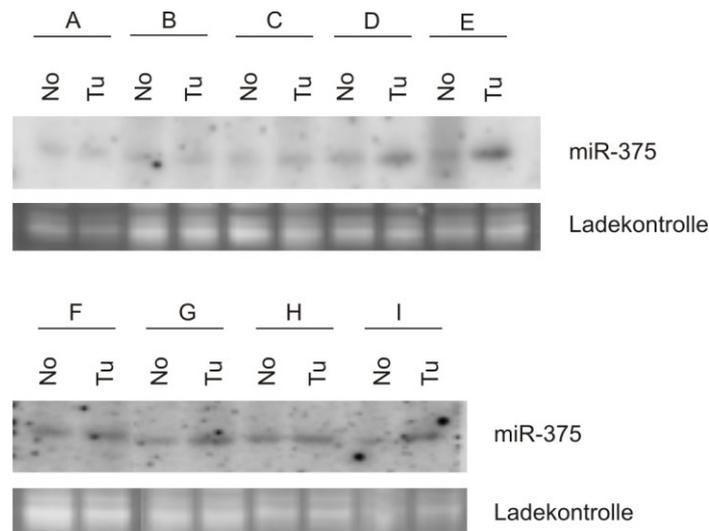
Um eine qualitative Beurteilung der Sequenzierungsergebnisse machen zu können, sollten nun die erhaltenen Expressionsunterschiede der miRNAs zwischen Normal- und Tumorgewebe mit einer zweiten Methode validiert werden. Da das für die Sequenzierung verwendete Gewebe nicht mehr zur Verfügung stand, erfolgte die Validierung mit Normal- bzw. Tumorgewebe aus einer größeren Patientenkohorte, welche vom Institut für Pathologie des Universitätsklinikums in Regensburg zur Verfügung gestellt wurden. Aus diesem Material wurde die Gesamt-RNA extrahiert und die Expressionsunterschiede der miRNAs mit Hilfe von Northern Blots analysiert, wobei für die Bestätigung der Ergebnisse insgesamt vier miRNAs ausgewählt wurden, die im Prostatakarzinom im Vergleich zum Prostatanormalgewebe differentiell exprimiert waren. Nach der Detektion der miRNA-Expression mittels radioaktiv markierter Sonden erfolgte die Quantifizierung der erhaltenen Signale mit Hilfe von ImageQuant, indem die miRNA-Banden zur entsprechenden tRNA-Bande normalisiert wurden. Hierbei sollte erwähnt werden, dass die Benennung der einzelnen Gewebepaare nicht derer in Tabelle 4 entspricht, sondern nur der Übersicht innerhalb der Abbildungen dient. In Abbildung 18 sind Northern Blots zum Nachweis der miR-200c-Expression dargestellt.



**Abbildung 18: Expression der miR-200c in Prostatakarzinomen im Vergleich zum korrespondierenden Normalgewebe**

Je 5 µg Gesamt-RNA aus Normal- und dem entsprechenden Prostatakarzinomgewebe wurden in einem 12,5%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran geblottet. Der Nachweis erfolgte mit einer spezifischen, radioaktiv markierten RNA-Sonde, welche gegen miR-200c gerichtet war. Als Ladekontrolle diente Ethidiumbromid-gefärbte tRNA. Die Expression vom miR-200c war in 10 von 14 Gewebepaaren deutlich erhöht. No=Normalgewebe, Tu=Prostatakarzinomgewebe, A-N=Patienten

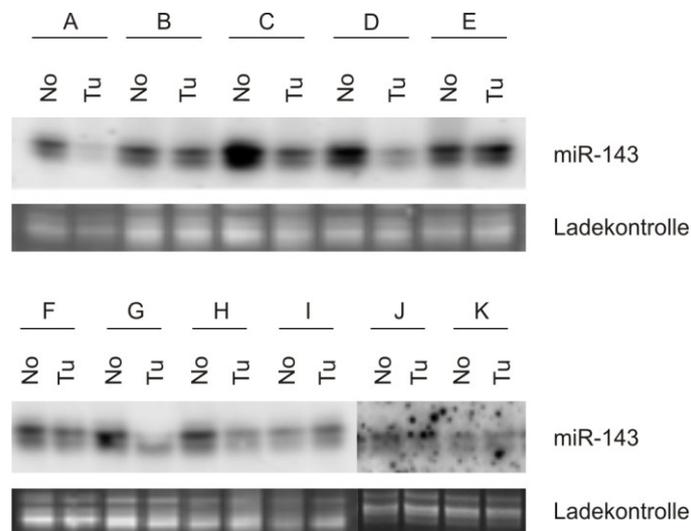
Als Ladekontrolle wurde tRNA durch Färben des Gels mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht und zur Normalisierung verwendet. Wie zu erkennen ist, konnte in 10 von 14 Gewebepaaren eine Induktion der miR-200c-Expression gezeigt und die aus der Sequenzierung hervorgehende Hochregulierung von miR-200c im Prostatakarzinomgewebe somit bestätigt werden.



**Abbildung 19: Expression der miR-375 im Prostatakarzinom verglichen mit Kontrollgewebe**

Pro Tumor- und entsprechendem Normalgewebe wurden 5 µg Gesamt-RNA elektrophoretisch in einem 12,5%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Expression der miR-375 mit einer spezifischen, radioaktiv markierten RNA-Sonde nachgewiesen. Ethidiumbromid-gefärbte tRNA diente als Ladekontrolle. In 6 von 9 Fällen konnte eine Induktion der Expression von miR-375 beobachtet werden. No=Normalgewebe, Tu=Prostatakarzinomgewebe, A-I=Patienten

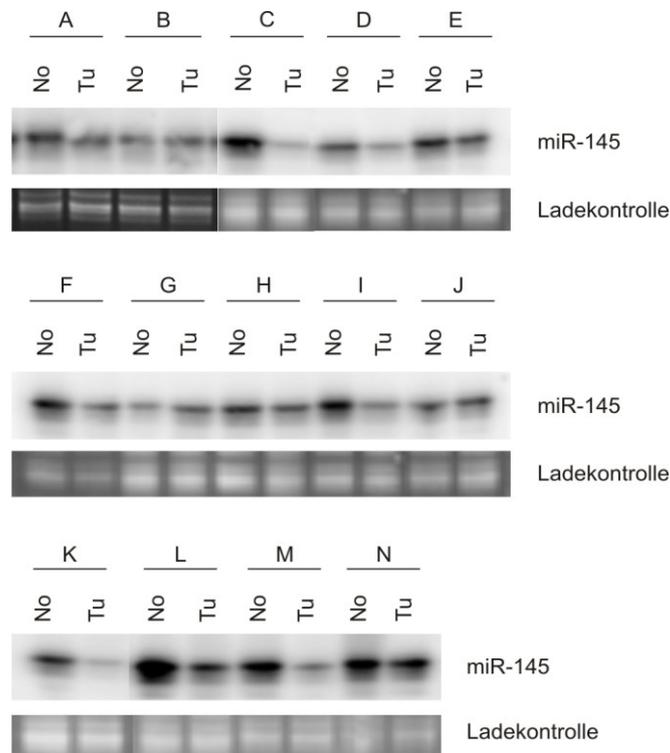
Die Validierung der Expression von miR-375 ist in Abbildung 19 gezeigt. Mit Hilfe der Northern Blots konnte die Induktion der miR-375 in 6 von 9 Gewebepaaren bestätigt werden.



**Abbildung 20: Expressionsvergleich der miR-143 zwischen Prostatakarzinom- und Normalgewebe**

Je 5 µg Gesamt-RNA aus Normal- und entsprechendem Prostatakarzinomgewebe wurden in einem 12,5%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf einer Nylonmembran immobilisiert. Der Nachweis erfolgte mit einer spezifischen, radioaktiv markierten RNA-Sonde, welche gegen miR-143 gerichtet war. Als Ladekontrolle diente Ethidiumbromid-gefärbte tRNA. Die Expression vom miR-143 war in 8 von 11 Gewebepaaren reprimiert. No=Normalgewebe, Tu=Prostatakarzinomgewebe, A-K=Patienten

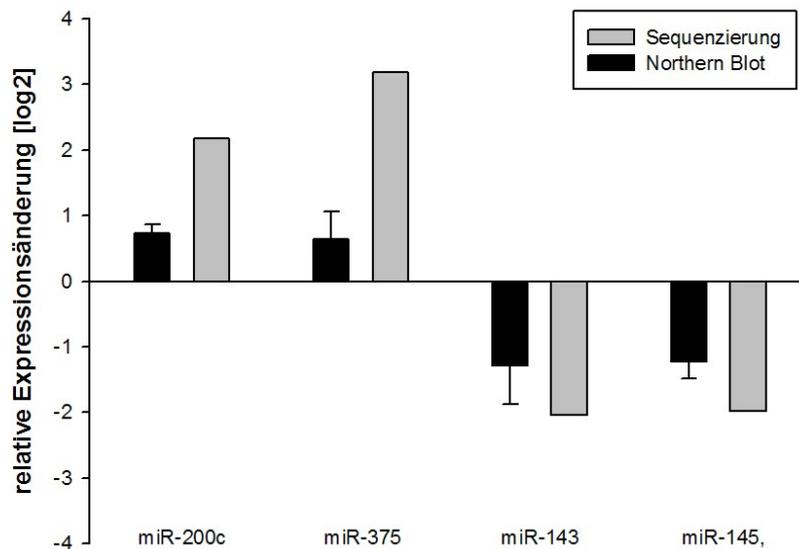
Abbildung 20 zeigt die Expressionsanalyse von miR-143 in 11 Gewebepaaren. Wie man erkennt, konnte in 8 von 11 Gewebepaaren eine deutliche Repression in Prostatakarzinomen im Vergleich zum entsprechenden Normalgewebe beobachtet werden. Dies entspricht auch den Ergebnissen der Sequenzierung, wo miR-143 als eine herunterregulierte miRNA identifiziert worden ist. Die Ergebnisse für die im Vergleich von Prostatakarzinom- und Normalgewebe herunterregulierten miR-145 ist in Abbildung 21 dargestellt. Die Repression dieser miRNA konnte in 11 von 14 Fällen bestätigt und somit die Ergebnisse der Sequenzierung auch im Fall der miR-145 validiert werden.



**Abbildung 21: Expression der miR-145 in Prostatakarzinomen im Vergleich zum entsprechenden Normalgewebe**

In einem 12,5%igen Polyacrylamidgel wurden je 5 µg Gesamt-RNA aus Normal- und entsprechendem Prostatakarzinomgewebe aufgetrennt und auf eine Nylonmembran geblottet. Der Nachweis erfolgte mit einer spezifischen, radioaktiv markierten RNA-Sonde. Als Ladekontrolle diente Ethidiumbromid-gefärbte tRNA. Die Repression vom miR-145 war in 11 von 14 Gewebepaaren nachweisbar. No=Normalgewebe, Tu=Prostatakarzinomgewebe, A-N=Patienten

Um eine genauere Aussage über die Deregulierung innerhalb der Gewebeprobe treffen zu können, erfolgte im Anschluss an die Northern Blot Analyse die Quantifizierung der miRNA-Signale.



**Abbildung 22: Relative Expressionsänderung deregulierter miRNAs im Prostatakarzinom aus Sequenzierung und Northern Blot-Analyse**

Mit Hilfe des Programms ImageQuant wurden die miRNA-Signale aller Northern Blots quantifiziert. Hierzu wurden zunächst die jeweiligen miRNA-Banden zur entsprechenden tRNA normalisiert und die Prostatakarzinomsignale in Relation zum Normalgewebe gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Expressionsänderung der getesteten Gewebepaare in log<sub>2</sub>-Skalierung und die dazugehörigen Standardfehler. Die schwarzen Balken zeigen die Ergebnisse resultierend aus den Northern Blots, wohingegen die Sequenzierungsergebnisse in grau dargestellt sind.

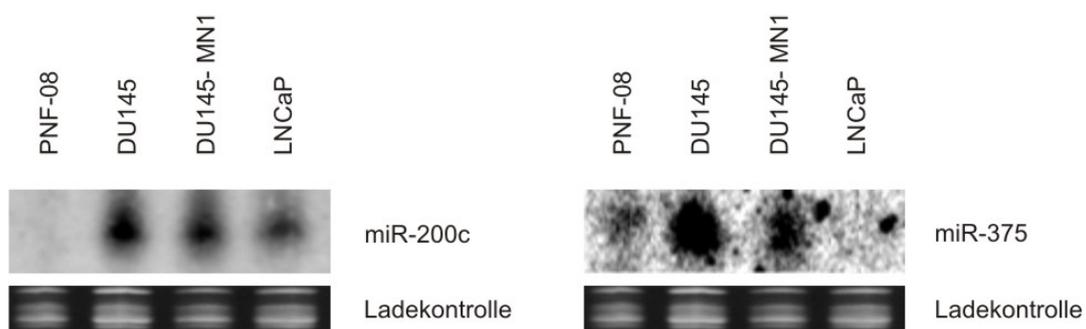
Hierbei wurden jeweils die Expressionsunterschiede innerhalb der einzelnen Gewebepaare gemittelt und in Abbildung 22 logarithmisch (log<sub>2</sub>) dargestellt. Auffällig ist, dass die relative Expressionsänderung der miRNAs geringer ist, als dies in der Sequenzierung der Fall war. Am gravierendsten ist dabei der Unterschied bei miR-375. Hier zeigte die Sequenzierung eine 9-fache Induktion, wohingegen nur eine 1,5-fache Überexpression in den Northern Blots festgestellt werden konnte. Auch im Falle der miR-200c konnte anstatt der 4,5-fachen Induktion aus der Sequenzierung nur eine 1,7-fache Expressionserhöhung beobachtet werden.

Abschließend kann man festhalten, dass die Deregulierung der vier ausgewählten miRNAs aus der Sequenzierung im Northern Blot in den meisten Patientenproben bestätigt werden konnte und die Expressionsänderung, welche sich aus der Sequenzierung ergab, tendenziell nachvollziehbar ist.

### 6.5. Untersuchung differentiell exprimierter miRNAs in Prostatazelllinien

Um ein geeignetes Zellsystem für funktionelle Untersuchungen der differentiell regulierten miRNAs bestimmen zu können, sollten verschiedene Prostatazelllinien bezüglich der Expression deregulierter miRNAs analysiert werden. Als Prostatakarzinomzelllinien wurden DU145, DU-MN1 sowie LNCaP Zellen und als Nicht-Karzinomlinie Prostatafibroblasten namens PNF-08 ausgewählt und im Northern Blot untersucht. Hierbei erfolgte die Auftrennung von 20 µg Gesamt-RNA der jeweiligen Zelllinie in einem 12,5%igen Polyacrylamidgel. Nach dem Blotten des Gels auf eine Nylonmembran wurden die einzelnen miRNAs mit Hilfe von radioaktiv markierten, zur miRNA komplementären RNA-Sonden detektiert. Es wurden in den verschiedenen Zelllinien die miRNAs untersucht, welche bereits zur Validierung der Sequenzierungsergebnisse ausgewählt wurden. Hierzu gehörten miR-200c und miR-375, die als überexprimiert identifiziert wurden, sowie miR-143 und miR-145 als reprimierte miRNAs.

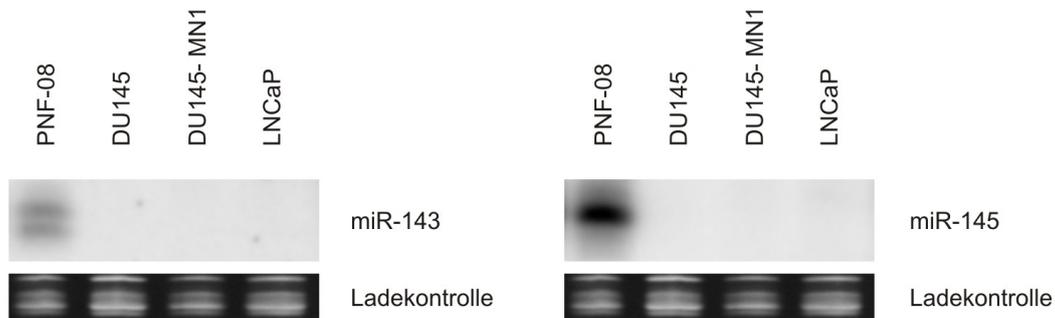
Für miR-200c konnten endogene Signale in allen drei Prostatakarzinomzelllinien, jedoch nicht in Prostatafibroblasten detektiert werden. Die Expression von miR-375 war in den Karzinomzelllinien DU145 und DU145-MN1 deutlich stärker als in den Prostatafibroblasten, während die miRNA in LNCaP-Zellen nicht detektiert werden konnte (Abbildung 23).



**Abbildung 23: Expressionsanalyse induzierter miRNAs in Prostatazelllinien**

Je 20 µg Gesamt-RNA verschiedener Zelllinien wurden in einem 12,5%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend auf einer Nylonmembran immobilisiert. Der Nachweis der miRNAs erfolgte mit spezifischen, radioaktiv markierten RNA-Sonden. miR-200c zeigt in Prostatafibroblasten (PNF-08) keine endogene Expression, jedoch ist sie in den Karzinomzelllinien detektierbar. Die Expression von miR-375 ist in DU145 und DU145-MN1 im Vergleich zu Prostatafibroblasten induziert, kann jedoch in LNCaP nicht nachgewiesen werden.

Wie in Abbildung 24 dargestellt ist, zeigten beide reprimierten miRNAs in den verschiedenen Zelllinien das erwartete Expressionsmuster. Sowohl miR-143 wie auch miR-145 konnten in den Prostatafibroblasten nachgewiesen werden, waren jedoch in keiner der drei Karzinomzelllinien exprimiert.



**Abbildung 24: Untersuchung reprimierter miRNAs in Prostatazelllinien**

In einem 12,5%igen Polyacrylamidgel wurden je 20 µg Gesamt-RNA verschiedener Prostatazelllinien elektrophoretisch aufgetrennt. Nach der anschließenden Immobilisierung der RNA auf einer Nylonmembran wurden die miRNAs mit spezifischen, radioaktiv markierten RNA-Sonden nachgewiesen. Beide miRNAs zeigen eine Expression in Prostatafibroblasten, jedoch nicht in den drei Prostatakarzinomzelllinien.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass die verwendeten Zelllinien ein sehr gutes *in vitro* Modellsystem für die analysierten Tumore darstellen. Die Induktion von miR-200c und miR-375, welche in Prostatakarzinomen im Vergleich zum Normalgewebe festgestellt wurde, konnte in zwei von drei Karzinomzelllinien bestätigt werden. Die Induktion der Expression von miR-375 war lediglich in LNCaP-Zellen nicht nachweisbar. Die beobachtete Repression von miR-143 und miR-145 in den Tumoren ließ sich hingegen vollständig in allen Karzinomzelllinien bestätigen.

## 6.6. Identifizierung von Ziel-mRNAs differentiell exprimierter miRNAs in Prostatakarzinomen

Um eine Aussage über die Funktionalität und Rolle der deregulierten miRNAs bei der Tumorentstehung bzw. -progression machen zu können, erfolgte anschließend die Identifizierung von Zielgenen für die differentiell exprimierten miRNAs. Die *in silico*-Vorhersage von miRNA-Targets mittels verschiedenen Algorithmen ist jedoch sehr unzuverlässig, da in der Regel mehrere Hundert Ziel-Gene vorhergesagt werden und nur ein Bruchteil dieser experimentell bestätigt werden kann. Aufgrund dieser Tatsache wurden die erhaltenen Vorhersagen zusätzlich mit mRNA-

Expressionsdaten verknüpft, um die Zahl der möglichen Ziel-Gene einzugrenzen (Barbato et al., 2009). Für das Prostatakarzinom gibt es bereits mehrere veröffentlichte mRNA-Expressionsstudien, welche in der Online-Datenbank Oncomine frei verfügbar sind und zur Zielgen-Vorhersage verwendet wurden (Dhanasekaran et al., 2001; Lapointe et al., 2007; Lapointe et al., 2004; Welsh et al., 2003; Yu et al., 2004). Diese mRNA-Daten wurden mit den durch Algorithmen vorhergesagten Ziel-Genen fehlregulierter miRNAs (Pictar, TargetScan) abgeglichen und jene Targets ausgewählt, die mindestens in drei der fünf mRNA-Datenbanken als dereguliert beschrieben waren. Im Folgenden wurden die 3'UTRs von BRD2, GOLPH2, JMJD2B, MYO6, SEC23A sowie TOP1 und ZNF217 untersucht.

### **6.6.1. Potentielle Zielgene differentiell exprimierter miRNAs im Prostatakarzinom**

BRD2 (Bromodomain-containing protein 2, RING3) ist eine im Zellkern lokalisierte Kinase, die zur Familie der BET-Proteine (bromodomains and extraterminal) gehört und wurde laut der Oncomine-Expressionsdatenbank in Prostatakarzinomen als überexprimiert identifiziert. Aufgrund der Bromodomäne ist BRD2 in Transkriptionskomplexen von Zellzyklusgenen zusammen mit E2F zu finden, wo es als Transaktivator oder Repressor fungieren kann (Denis et al., 2000). BRD2 ist an der Regulation von Zellwachstum und Transformation beteiligt und stellte deshalb ein interessantes miRNA-Target dar. Weiterhin ist bekannt, dass BRD2 bei Überexpression als Onkogen fungiert und eine Rolle bei der Genese akuter Leukämie spielt (Denis and Green, 1996). Für die BRD2-3'UTR wurde eine Bindestelle für miR-143 vorhergesagt.

GOLPH2 (Golgi membrane protein 1, GOLM1) ist ein Phospho-Glykoprotein, welches im Golgi-Apparat am Transportprozess von Proteinen beteiligt ist. Es wurde bereits in mehreren Publikationen beschrieben, dass GOLPH2 im Prostatakarzinom überexprimiert ist und als zukünftiger neuer Biomarker für die Diagnose von Prostatakrebs diskutiert wird (Kristiansen et al., 2008; Varambally et al., 2008b). Da der Grund für die Induktion dieses Proteins noch nicht bekannt war und möglicherweise reprimierte miRNAs für die Überexpression dieses diagnostischen Markers verantwortlich sein könnten, wurde GOLPH2 als mögliches Ziel-Gen untersucht. Die TargetScan-Vorhersage lieferte Bindestellen für miR-27a und -27b innerhalb der GOLPH2 3'UTR.

JMJD2B (Jumonji domain-containing protein 2B) ist ein Vertreter der Methyltransferasen und ist an Histonmodifikationen beteiligt. Somit ist dieses Protein in die Transkriptionsregulation involviert und stellte deshalb ein interessantes miRNA-Target da. Desweiteren ist bekannt, dass JMJD2B in Brust- und Nierenkrebs überexprimiert ist und zur Progression dieser Tumorentitäten beiträgt (Beyer et al., 2008; Yang et al.). Da dieses Gen als überexprimiert identifiziert wurde, erfolgte die Suche nach Bindestellen für im Prostatakarzinom reprimierte miRNAs. Laut Vorhersage sollten miR-27a, miR-27b und miR-29a an die 3'UTR von JMJD2B binden.

Eine weitere mRNA, welche laut Expressionsdaten von Oncomine im Prostatakarzinom als hochreguliert identifiziert wurde, war MYO6 (Myosin VI). MYO6 gehört zur Familie der Motorproteine, wobei es als unkonventionelles Motorprotein bezeichnet wird. Dies beruht auf der Tatsache, dass MYO6 beim Vesikeltransport während der Endocytose eine Rolle spielt und nicht zur Exocytose beiträgt. MYO6 ist in prostatistischen intraepithelialen Neoplasien (PIN) überexprimiert (Dunn et al., 2006) und stellt somit ein potentiell Markermolekül für Prostatakrebs dar (Wei et al., 2008). Außerdem wurde bereits beschrieben, dass MYO6 bei Überexpression zur Zellmigration beiträgt (Buss, Luzio, and Kendrick-Jones, 2002) und in die Invasion von Prostatakrebszellen involviert sein kann (Knudsen, 2006). Da diese Veränderungen zur Progression des Prostatakarzinoms führen können, stellte MYO6 ebenfalls ein interessantes miRNA-Target dar. Die Vorhersage von Bindestellen für herunterregulierte miRNAs in der MYO6-3'UTR ergab drei mögliche Targetsequenzen, zwei für miR-145 und eine Bindestelle für miR-143.

SEC23A (Sec23 homolog A) war, laut Prostata-Expressionsstudien aus der Online-Datenbank Oncomine, eine der reprimierten mRNAs im Prostatakarzinom. Diese mRNA kodiert für ein Transportprotein, welches eine Komponente des COPII-Komplexes darstellt und an der Vesikelbildung am endoplasmatischen Retikulum beteiligt ist (Lang et al., 2006; Townley et al., 2008). Obwohl bislang kein Zusammenhang zwischen der Deregulation von SEC23A und der Tumorentstehung bzw. -progression besteht, die SEC23A-mRNA jedoch in allen fünf Prostata-Expressionsbanken als reprimiert beschrieben war, erfolgte die Auswahl dieser mRNA als mögliches Ziel von miRNAs. Da diese mRNA als herunterreguliert identifiziert worden ist, wurden Targetsequenzen innerhalb der 3'UTR für induzierte

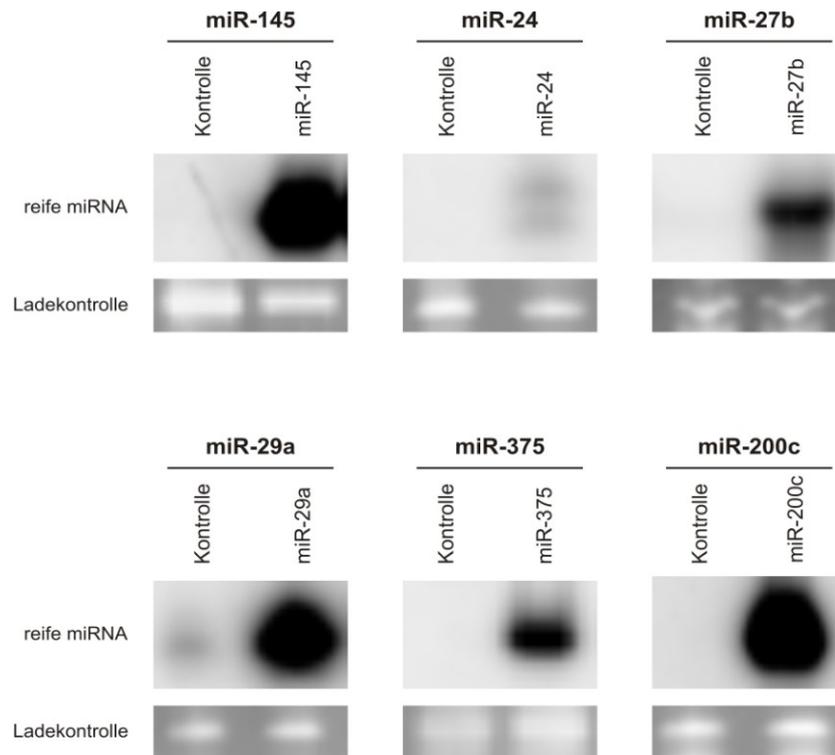
miRNAs gesucht. Dabei ergaben sich zwei Bindestellen für miR-200c und eine für miR-375.

TOP1 (Topoisomerase 1) ist ein Enzym, das zur Familie der DNA-Topoisomerasen gehört und durch Einführen von Einzelstrangbrüchen DNA entwinden kann und somit bei der Replikation und Transkription eine Rolle spielt. Die Überexpression dieses Enzyms führt zur Anhäufung von DNA-Schäden und kann zur Transformation und Entartung von Zellen führen (Goswami et al., 2008), was dieses Protein als mögliches miRNA-Ziel interessant machte. Für die TOP1-3'UTR wurden Bindestellen für die herunterregulierten miR-23a und miR-24 vorhergesagt.

Die mRNA von ZNF217 (Zinc finger protein 217) wurde in allen fünf Expressionsdatenbanken des Prostatakarzinoms im Vergleich zum gesunden Prostatagewebe als hochreguliert identifiziert. Sie kodiert für einen Transkriptionsfaktor, wobei ZNF217 zusammen mit CtBP2 an Promotersequenzen bindet und dort als transkriptioneller Repressor fungiert (Krig et al., 2007). Weiterhin ist bekannt, dass ZNF217 eine Rolle bei der Histonmodifikation spielt (Banck et al., 2009). Außerdem liegt es in vielen verschiedenen Tumorentitäten, wie z.B. Ovarial- oder Brusttumoren, überexprimiert vor (Dimova et al., 2009; Shimada et al., 2005), was die Untersuchung dieser mRNA bezüglich einer Regulation durch miRNAs sehr interessant machte. Die Vorhersage von Zielsequenzen für reprimierte miRNAs durch das Programm TargetScan ergab eine Bindestelle für miR-24, welche durch ihre verminderte Expression im Prostatakarzinom eine Erhöhung der Proteinmenge von ZNF217 bewirken könnte.

### **6.6.2. Herstellung von miRNA-Expressionsvektoren**

Um in Experimenten einen Einfluss der deregulierten miRNAs durch ihre ektopische Expression untersuchen zu können, wurden zunächst die nötigen miRNA-Expressionsvektoren hergestellt. Hierbei erfolgte die Klonierung der eigentlichen miRNA-Vorläufer-Sequenz wie der zusätzlich ~100 umliegenden Basen in den eukaryotischen Expressionsvektor pSG5, um eine Prozessierung der Primärtranskripte zu ermöglichen. Mit Hilfe radioaktiv markierter, spezifischer Sonden konnte in den anschließenden Northern Blots nach transienter Transfektion von 293T-Zellen die jeweilige miRNA-Expression bestätigt werden.



**Abbildung 25: Expression klonierter miRNA-Expressionsplasmide im Northern Blot**

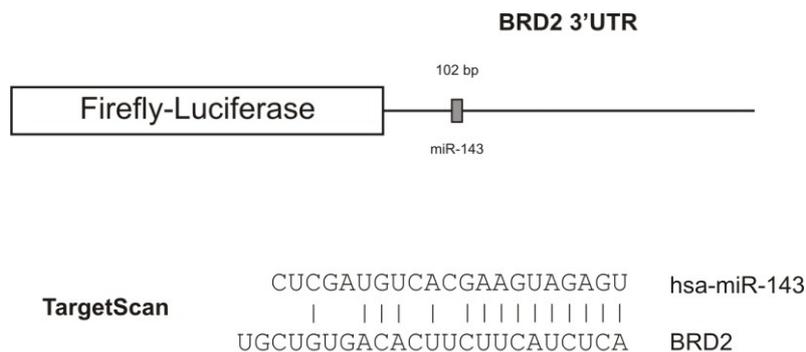
293T-Zellen wurden mit dem Kontrollvektor oder den entsprechenden miRNA-Expressionsplasmiden transfiziert und nach 48 h erfolgte die RNA-Isolierung. 20 µg Gesamt-RNA wurde anschließend im 12,5%igen, harnstoffhaltigen Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran geblottet. Der Nachweis der reifen miRNAs erfolgte mittels einzelsträngiger, radioaktiv markierter RNA-Sonden. Als Ladekontrolle wurde tRNA durch Färben des Gels mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

Die Northern Blots in Abbildung 25 zeigten für die gewünschten miRNAs deutlich stärkere Signale nach Transfektion der miRNA-Expressionsplasmide in 293T-Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Somit konnten die hergestellten miRNA-Expressionsplasmide in 293T-Zellen exprimieren und die entsprechenden miRNAs prozessiert werden.

### 6.6.3. Untersuchung des Einflusses verschiedener miRNAs auf die 3'UTRs von BRD2, GOLPH2, JMJD2B und TOP1

Um einen Einfluss der miRNAs auf die Regulation der vorhergesagten Target-mRNA zu analysieren wurden Luciferase-Assay durchgeführt. Hierzu wurden Reporterkonstrukte hergestellt, in denen die 3'UTR von BRD2, GOLPH2, JMJD2B bzw. TOP1 hinter das Firefly-Luciferase-Gen in den Vektor pMIR-RNL-TK inseriert wurden. Die Durchführung der Luciferase-Assays erfolgte mit dem Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter System. 48 h nach transienter Transfektion von 293T-Zellen mit 0,8 µg Effektor- und 0,2 µg Reporterplasmid wurden die Zellen lysiert und die Luciferase-

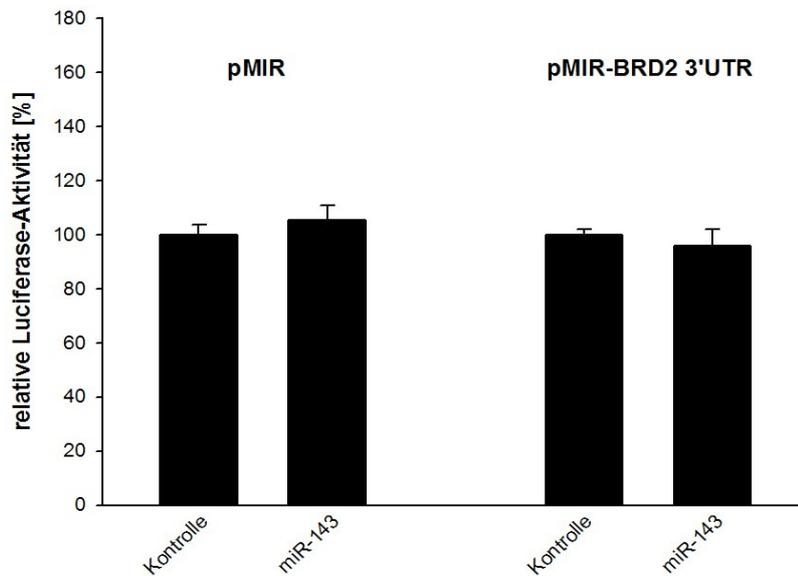
Aktivität detektiert. Bei einer Interaktion der kotransfizierten miRNA mit der 3'UTR würde eine Translationshemmung der Luciferase stattfinden und daraus eine geringere Menge des Luciferase-Proteins sowie eine Reduktion der Luciferase-Aktivität resultieren. Als Erstes wurde der Einfluss von miR-143 auf die 3'UTR von BRD2 getestet. Abbildung 26 zeigt die vorhergesagte Bindestelle der miR-143 innerhalb der BRD2-3'UTR.



**Abbildung 26: Schematische Übersicht über die vorhergesagte Bindestelle für miR-143 in der BRD2-3'UTR**

Dargestellt sind das Reporter-Konstrukt sowie die Bindestelle für miR-143 in der BRD2-3'UTR, die mit Hilfe des Programms TargetScan vorhergesagt wurde.

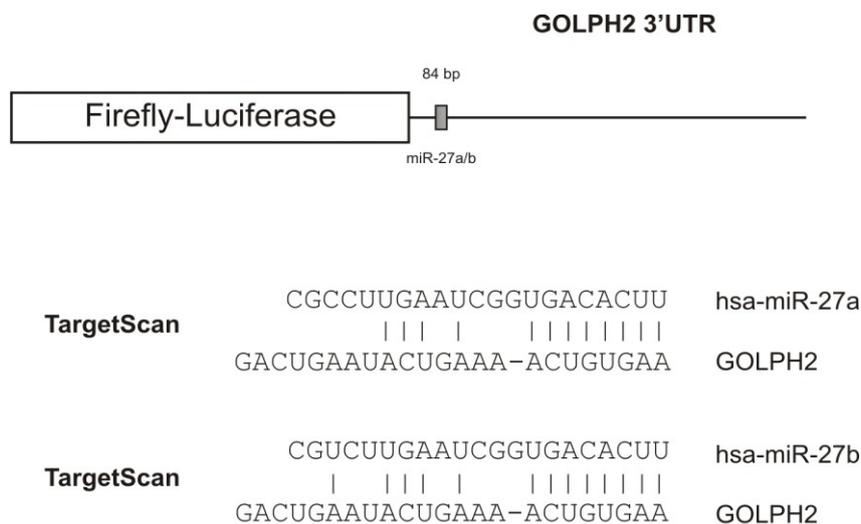
In Abbildung 27 sind die mittleren Luciferase-Aktivitäten mit ihrem jeweiligen Standardfehler aus vier unabhängigen Experimenten mit Duplikaten dargestellt. Die Luciferase-Aktivität der mit leerem Expressionsvektor kotransfizierten Zellen wurde auf 100 % und der miR-143-Ansatz dazu in Bezug gesetzt. Es lässt sich erkennen, dass die Expression von miR-143 weder einen signifikanten Effekt auf die Luciferase-Aktivität des leeren Reportervektors, noch auf die des Reporterkonstrukts hat. Somit konnte BRD2 als vorhergesagtes Target für miR-143 experimentell nicht bestätigt werden.



**Abbildung 27: Einfluss von miRNA-143 auf die BRD2-3'UTR**

293T-Zellen wurden mit 0,8 µg Effektor- und 0,2 µg Reporterplasmid transfiziert und 48 h später Luciferase-Assays durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus vier unabhängigen Experimenten mit Standardfehler. Die Luciferase-Aktivität der kontroll-transfizierten Zellen wurde auf 100 % gesetzt. MiR-143 zeigt keinen signifikanten Effekt auf Kontrollvektor und 3'UTR.

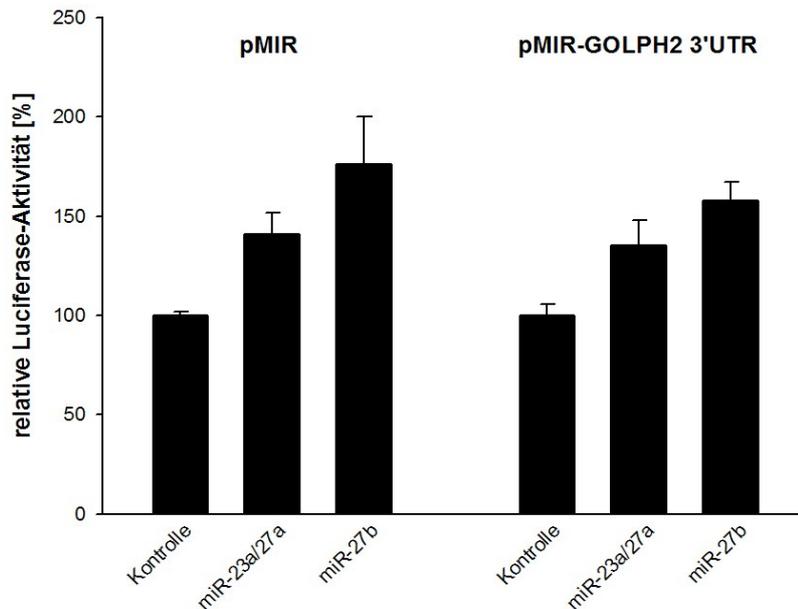
Im Anschluss fand die Untersuchung der GOLPH2-3'UTR bezüglich des Einflusses von miR-27a und miR-27b statt. In Abbildung 28 sind die vorhergesagten Zielsequenzen für beide miRNAs in der GOLPH2-3'UTR dargestellt.



**Abbildung 28 : Schematische Übersicht über die vorhergesagten Bindestellen für miR-27a und miR-27b in der GOLPH2-3'UTR**

Dargestellt sind die Bindestellen für miR-27a und miR-27b in der GOLPH2-3'UTR, die mit Hilfe des Programms TargetScan vorhergesagt wurden, sowie das Reportergenkonstrukt.

Abbildung 29 zeigt die Regulation der GOLPH2-3'UTR durch miR-23a/27a und miR-27b, wobei es sich hier um Mittelwerte und die zugehörigen Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten im Doppelansatz handelt. Die mittlere Luciferase-Aktivität der mit dem Kontrollplasmid transfizierten Zellen wurde auf 100 % und die restlichen Ansätze dazu in Bezug gesetzt.

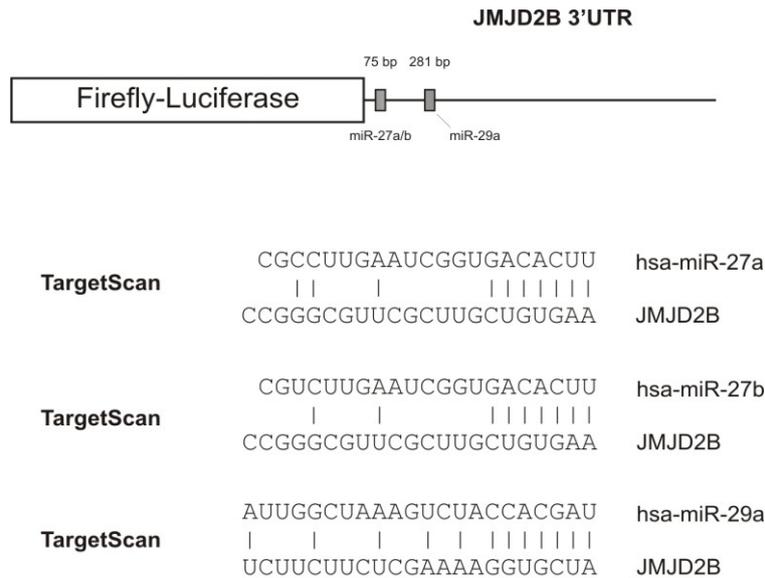


**Abbildung 29: Einfluss von miR-23a/27a und miR-27b auf die 3'UTR von GOLPH2**

293T Zellen wurden mit je 0,2 µg Reporterplasmid und 0,8 µg Kontrollvektor bzw. miRNA transfiziert. 48 h nach Transfektion der Zellen wurden Luciferase-Assays durchgeführt. Abgebildet sind die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten mit Standardfehler, die je als Duplikate durchgeführt wurden. Die Luciferase-Aktivität der kontroll-transfizierten Zellen wurde auf 100 % gesetzt. Beide miRNA-Expressionsplasmide zeigen keinen negativen Effekt auf die GOLPH2-3'UTR.

Es lässt sich erkennen, dass miR-27b und das miR-23a/27a-Cluster, entgegen der Erwartung, eine induzierende Wirkung sowohl auf den Leervektor wie auch auf das 3'UTR-Konstrukt haben. Eine negative Regulierung der 3'UTR durch die verwendeten miRNAs ließ sich nicht nachweisen und die Vorhersage der Bindung dieser beiden miRNAs an diese 3'UTR somit nicht bestätigen.

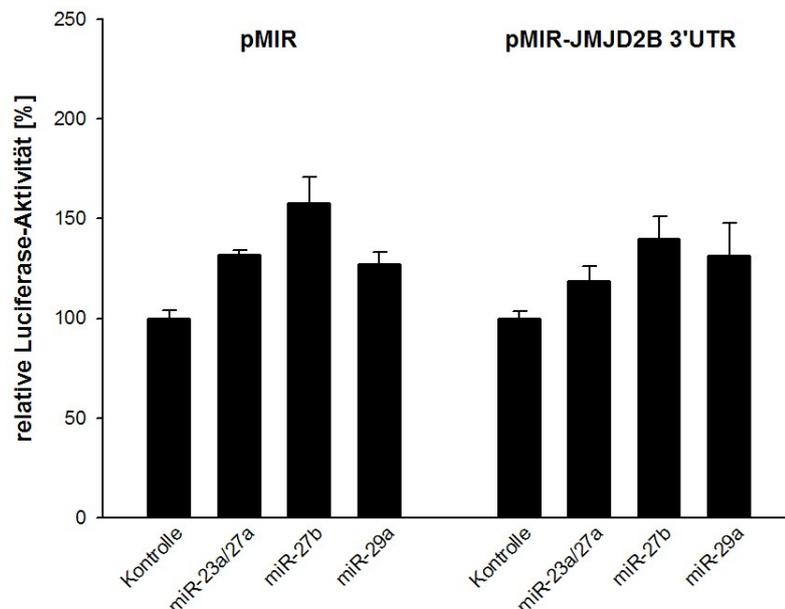
Anschließend erfolgte die Untersuchung der miRNA-Regulation von JMJD2B, wobei die möglichen Target-Sequenzen in Abbildung 30 zusammengefasst sind.



**Abbildung 30: Schematische Darstellung der möglichen Bindestellen von miR-27a, miR-27b und miR-29a in der JMJD2B-3'UTR**

Gezeigt sind das Schema des Reportergenkonstrukts sowie die Bindestellen für miR-27a, miR-27b und miR-29a in der JMJD2B-3'UTR, welche mittels TargetScan vorhergesagt wurden.

In Abbildung 31 ist ein Balkendiagramm der mittleren Luciferase-Aktivitäten aus vier unabhängigen Versuchen im Doppelansatz bzw. den zugehörigen Standardfehlern dargestellt.

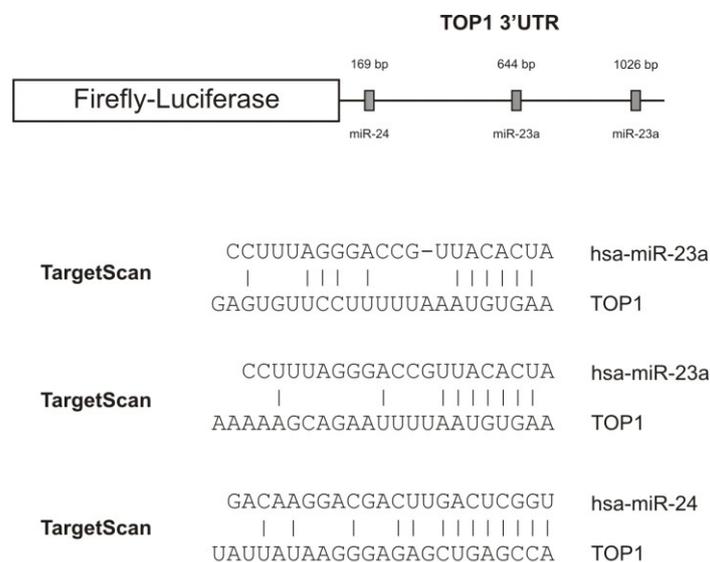


**Abbildung 31: Regulation der 3'UTR von JMJD2B durch miR-23a/27a, miR-27b und miR-29a**

Die Luciferase-Assays wurden 48 h nach Transfektion von 0,2 µg Reporter- und 0,8 µg Effektorplasmid durchgeführt. Die mittlere Luciferase-Aktivität des Kontrollansatzes wurde jeweils auf 100 % gesetzt. Abgebildet sind die Mittelwerte aus vier unabhängigen Versuchen. Sowohl die Überexpression des miR-23a/27a-Clusters wie auch von miR-27b und miR-29a führten bei der JMJD2B-3'UTR zu keiner Reduktion der Luciferase-Aktivität.

Die mittlere Luciferase-Aktivität der kontroll-transfizierten Zellen wurde auf 100 % und alle anderen Ansätze dazu in Bezug gesetzt. Man kann erkennen, dass wiederum alle drei miRNA-Konstrukte zu einer Induktion der Luciferase-Aktivität des JMJD2B-3'UTR Reporters führen, jedoch keine Reduktion hervorrufen. Dabei entspricht die Induktion des Reporterkonstrukts derjenigen des Leervektors. Folglich konnte JMJD2B als Target für miR-27a, miR-27b und miR-29a nicht validiert werden.

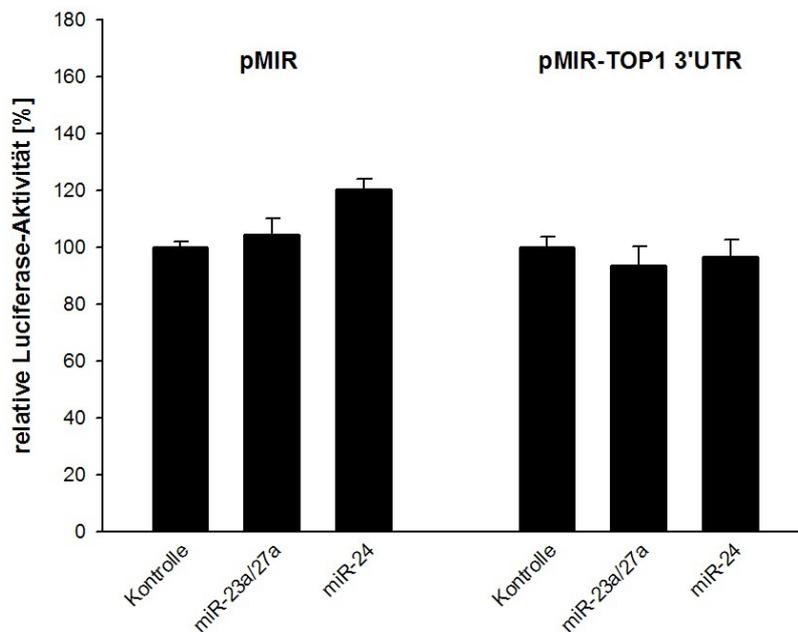
Im Anschluss erfolgte die Analyse der TOP1-3'UTR, wobei die enthaltenen vorhergesagten Bindestellen für miR-23a und miR-24 in Abbildung 32 schematisch gezeigt sind.



**Abbildung 32: Schema der vorhergesagten Bindestellen für miR-23a und miR-24 innerhalb der TOP1-3'UTR**

Dargestellt sind die Bindestellen für miR-23a und miR-24 in der TOP1-3'UTR, die mit Hilfe des Programms TargetScan vorhergesagt wurden.

Die Ergebnisse der Luciferase-Assays bezüglich der TOP1-3'UTR sind in Abbildung 33 gezeigt. Zu sehen sind die Mittelwerte der Luciferase-Aktivität mit ihrem jeweiligen Standardfehler aus fünf unabhängigen Experimenten als Duplikate, wobei die mittlere Luciferase-Aktivität der kontroll-transfizierten Ansätze auf 100 % gesetzt wurde. Vergleicht man den Kontrollansatz mit der Kofransfektion von TOP1-3'UTR und miRNAs wird deutlich, dass miR-23a und miR-24 keinen Einfluss auf die 3'UTR haben und es zu keiner statistisch signifikanten Reduktion der Luciferase-Aktivität kommt. Insofern konnte auch diese 3'UTR als Ziel für diese beiden miRNAs experimentell nicht validiert werden.



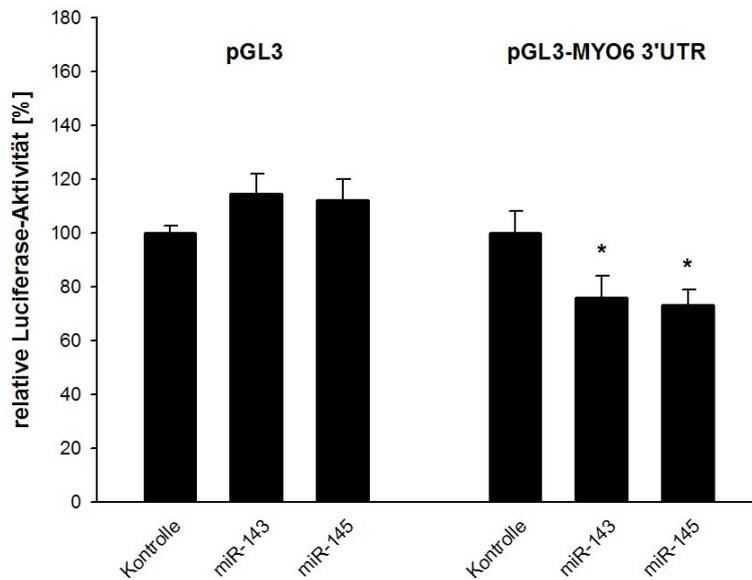
**Abbildung 33: Einfluss von miR-23a/27a und miR-24 auf die 3'UTR von TOP1**

Je 0,2 µg Reporterplasmid und 0,8 µg Kontrollvektor bzw. miRNA wurden in 293T Zellen transfiziert und 48 h nach Transfektion Luciferase-Assays durchgeführt. Abgebildet sind die Ergebnisse aus fünf unabhängigen Experimenten mit Standardfehler, die je im Doppelansatz durchgeführt wurden. Die Luciferase-Aktivität der kontroll-transfizierten Zellen wurde auf 100 % gesetzt. Weder das miR-23a/27a-Cluster noch miR-24 hatten einen Effekt auf die 3'UTR von TOP1.

#### 6.6.4. MYO6 als Target von miR-143 und miR-145

##### 6.6.4.1. Regulation der 3'UTR von MYO6 durch miR-143 und miR-145

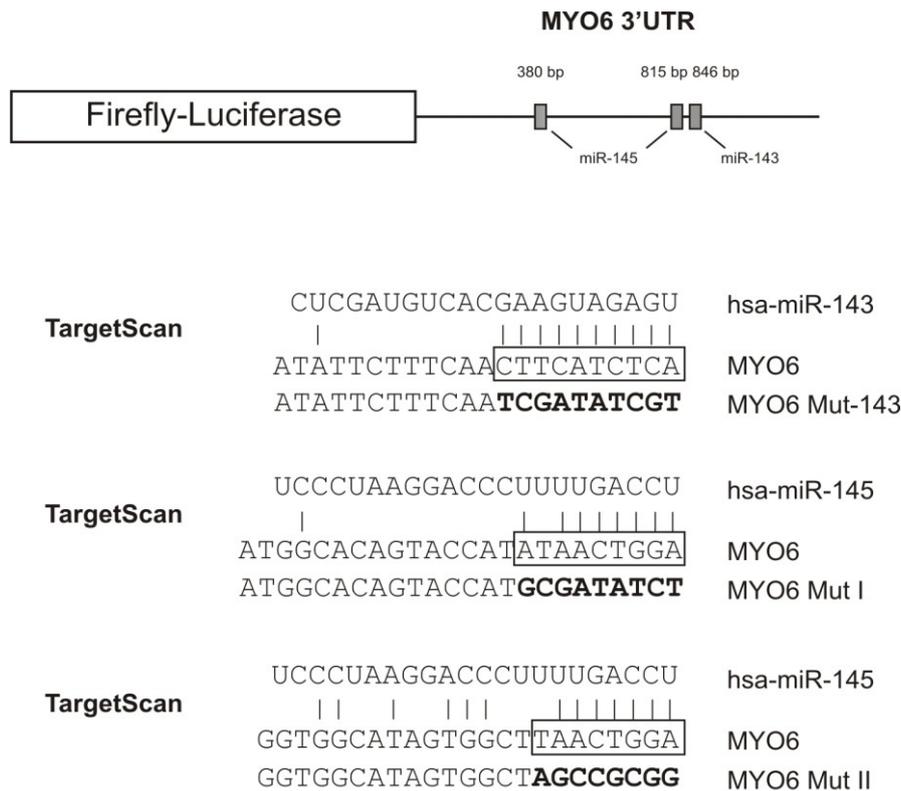
Als Erstes sollte mit Hilfe von Luciferase-Assays die Bindung der verschiedenen miRNAs an die MYO6-3'UTR untersucht werden. Hierzu wurden die ersten 1,3 kbp der 3'UTR von MYO6, welche alle vorhergesagten Zielsequenzen enthalten, in den Reportervektor pMIR-RNL-TK hinter das für die Firefly-Luciferase kodierende Gen kloniert. Die Luciferase-Assays wurden 48 h nach Transfektion von 0,8 µg Effektor- und 0,2 µg Reporterplasmid in 293T Zellen durchgeführt. Abbildung 34 zeigt die mittleren, relativen Luciferase-Aktivitäten mit den zugehörigen Standardfehlern, wobei die mittlere Luciferase-Aktivität der kontroll-transfizierten Ansätze auf 100 % gesetzt wurde. Es handelt sich um die Ergebnisse aus sechs unabhängigen Experimenten, die im Doppelansatz durchgeführt wurden. Es zeigt sich, dass sowohl miR-143 als auch miR-145 einen deutlichen Einfluss auf die MYO6-3'UTR besitzen.



**Abbildung 34: Regulation der MYO6-3'UTR durch miR-143 und miR-145**

293T Zellen wurden mit je 0,2 µg Reporterplasmid und 0,8 µg Kontrollvektor bzw. miRNA transfiziert. 48 h nach Transfektion von 293T-Zellen wurden Luciferase-Assays durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus sechs unabhängigen Experimenten mit Standardfehler, die je als Duplikate erfolgten. Die Luciferase-Aktivität der kontroll-transfizierten Zellen wurde auf 100 % gesetzt. Die Kotretransfektion von miR-143 führte zu einer Reduktion der Luciferase-Aktivität um 24 % ( $p < 0,05$ ), diejenige von miR-145 resultierte in einer Abnahme der Luciferase-Aktivität um 27 % ( $p < 0,05$ ).

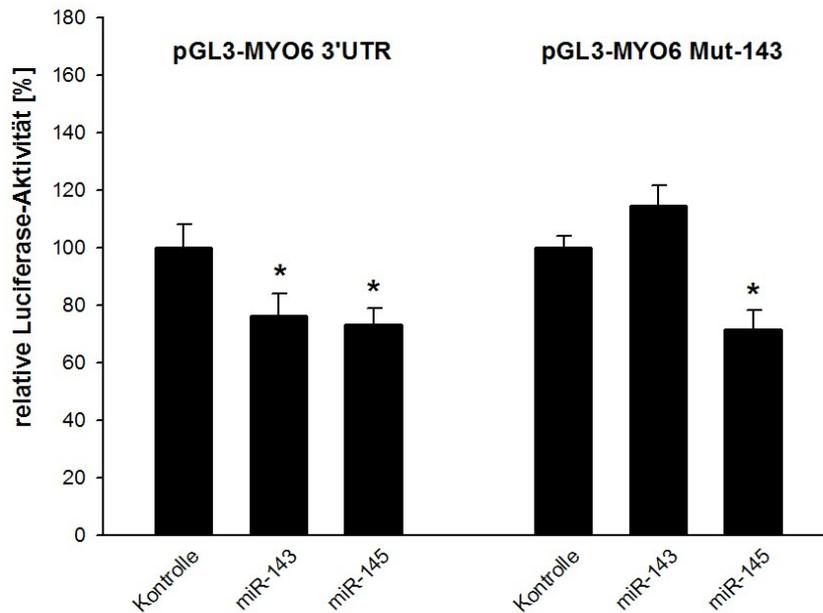
Im Vergleich zur Kontrolle führte die Kotretransfektion von MYO6-3'UTR und miR-143 zu einer statistisch signifikanten Reduktion der Luciferase-Aktivität des 3'UTR-Reporters auf 76 % ( $p < 0,05$ ). Auch die Transfektion von miR-145 resultierte in einer reduzierten Luciferase-Aktivität, welche 73 % betrug und wiederum statistisch signifikant war. Da beide miRNAs keinen signifikanten Effekt auf den leeren Reporter hatten, war die beobachtete Reduktion ein spezifischer Effekt der jeweiligen miRNA auf die 3'UTR. Die Reporterassays zeigten somit, dass miR-143 und miR-145 in der Lage sind an die 3'UTR von MYO6 zu binden und die Luciferase-Aktivität zu reduzieren. Insofern konnte die Vorhersage von MYO6 als Target von miR-143 und miR-145 bestätigt werden. Wie bereits erwähnt, ergaben sich zwei unterschiedliche Bindestellen für miR-145 und eine Targetsequenz für miR-143 in der MYO6-3'UTR. Abbildung 35 zeigt die einzelnen vorhergesagten Bindestellen der jeweiligen miRNA.



**Abbildung 35: Schematische Übersicht über die vorhergesagten Bindestellen für miR-143 und miR-145 in der MYO6-3'UTR**

Dargestellt sind die Bindestellen für miR-143 und miR-145 in der MYO6-3'UTR, die mit Hilfe des Programms TargetScan vorhergesagt wurden. Die Sequenz, welche zur Identifizierung der tatsächlichen miRNA-Zielsequenz mutiert wurde, ist umrahmt. Die durch Mutation erhaltene Sequenz ist in Fettschrift hervorgehoben.

Die vorhergesagten Zielsequenzen innerhalb der 3'UTR sollten mit Hilfe von MYO6-3'UTR Mutanten bestätigt werden. Zur Herstellung dieser Mutanten wurde eine zielgerichtete Mutagenese durchgeführt, bei der neben der zur Seed-Region komplementären Sequenz zwei weitere Nukleotide ausgetauscht wurden. Die Seed-Sequenz erstreckt sich dabei vom zweiten bis zum achten Nukleotid der miRNA-Sequenz und ist essentiell für die Bindung der miRNA an die Target-mRNA. Mit diesen mutierten Reporter-genkonstrukten wurden erneut Luciferase-Assays durchgeführt. Abbildung 36 und Abbildung 37 zeigen jeweils die mittleren, relativen Luciferase-Aktivitäten und Standardfehler aus vier bzw. fünf unabhängigen Experimenten. Die Aktivität der kontroll-transfizierten Zellen wurde wiederum auf 100 % und die Kofunktions mit der jeweiligen miRNA in Bezug dazu gesetzt.



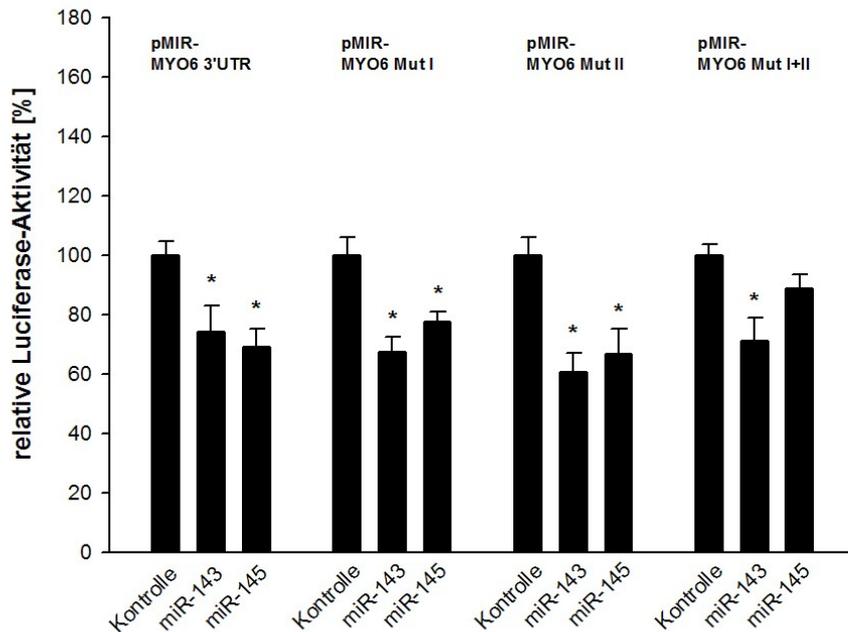
**Abbildung 36: Identifizierung der Zielsequenz von miR-143 in der MYO6-3'UTR**

Die Luciferase-Assays wurden 48 h nach Transfektion von 0,2 µg pMIR-Reporter- und 0,8 µg Effektorplasmid durchgeführt. Dargestellt sind vier unabhängige Versuche im Doppelansatz mit zugehörigen Standardfehlern. Die mittlere Luciferase-Aktivität der Kotransfektion von Reporter- und Kontrollplasmid wurde auf 100 % gesetzt. Die Expression von miR-143 führte bei der MYO6-3'UTR zu einer Reduktion der Luciferase-Aktivität um ~24 % ( $p < 0,05$ ), zeigte jedoch keinen Einfluss auf die Aktivität der Mutante. Die Ansätze mit miR-145 dienten als Positivkontrolle, wobei die Expression von miR-145 jeweils eine Reduktion der Luciferase-Aktivität von Wildtyp-3'UTR und Mutante auf ~72 % ( $p < 0,05$ ) bewirkte.

Wie in Abbildung 36 zu sehen ist, hat die Kotransfektion von miR-143 und der 3'UTR-Mutante keinen Effekt auf die Luciferase-Aktivität dieses Konstrukts. Die leichte, nicht signifikante, Erhöhung der Luciferase-Aktivität entspricht derjenigen des Kontrollansatzes von pMIR-Leervektor und miRNA. Somit kann man schlussfolgern, dass miR-143 tatsächlich an die 3'UTR von MYO6 über die vorhergesagte Bindestelle bindet, da die Mutante nicht mehr durch miR-143 beeinflussbar ist. Im Gegensatz dazu bindet jedoch miR-145 an die mutierte 3'UTR und reduziert die Luciferase-Aktivität des Reporterkonstrukt auf 72 % ( $p < 0,05$ ), was der Reduktion des Wildtyp-Konstrukts entspricht.

Abbildung 37 zeigt die Ergebnisse der Luciferase-Assays, welche mit Mutanten der miR-145-Bindestellen durchgeführt wurden. Es ist zu erkennen, dass miR-145 die Luciferase-Aktivität von Mutante I um 22 % ( $p < 0,05$ ) und von Mutante II um ~30 % ( $p < 0,05$ ) reduzierte. Die Mutante I+II, in der beide Bindestellen der miRNA ersetzt sind, zeigte dagegen keine statistisch signifikante Regulation durch die miRNA. Da beide Einzelmутanten der 3'UTR eine Reduktion der Luciferase-Aktivität, die sich

statistisch nicht vom Wildtyp unterschieden, zeigten und nur die Doppelmutante nicht mehr durch miR-145 beeinflussbar war, stellen beide Bindestellen tatsächlich Zielsequenzen für miR-145 innerhalb der MYO6-3'UTR dar.



**Abbildung 37: Untersuchung der Bindestellen von miR-145 in der MYO6-3'UTR**

Dargestellt sind die Ergebnisse aus fünf unabhängigen Versuchen im Doppelansatz mit zugehörigen Standardfehlern. Die Luciferase-Assays wurden 48 h nach Transfektion von 0,2 µg pMIR-Reporter- und 0,8 µg Effektorplasmid durchgeführt und die mittlere Luciferase-Aktivität der Kontroll-Transfektionen auf 100 % gesetzt. Die Expression von miR-145 führt bei der MYO6-3'UTR zu einer Reduktion der Luciferase-Aktivität um ~24 % ( $p < 0,05$ ). Die Mutanten I bzw. II zeigten eine Reduktion von 22 % bzw. 30 %. Die Doppelmutante I+II konnte durch miR-145 nicht mehr beeinflusst werden. Die Ansätze mit miR-143 dienten als Positivkontrolle, wobei die Expression von miR-143 jeweils eine Reduktion der Mutanten um 25-40 % ( $p < 0,05$ ) bewirkte.

Die Ansätze mit kotransfizierter miR-143 dienten in diesen Assays wiederum als Positivkontrolle. Die Transfektion von miR-143 resultierte bei allen Reporterkonstrukten in einer statistisch signifikanten Abnahme der Luciferase-Aktivität von 25-40 % ( $p < 0,05$ ).

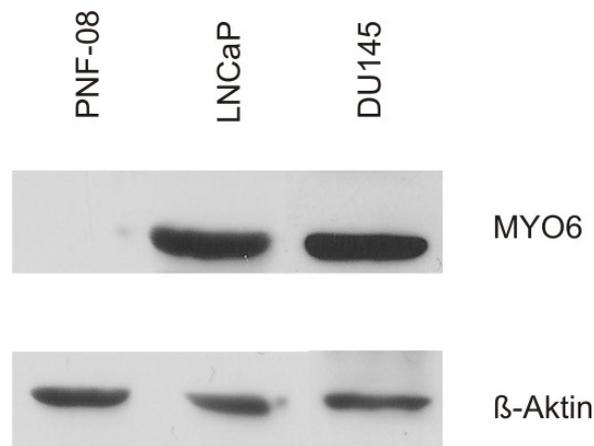
Abschließend lässt sich sagen, dass diese Ergebnisse ein weiterer Hinweis darauf sind, dass miR-143 und miR-145 die mRNA von MYO6 über die vorhergesagten Zielsequenzen regulieren.

#### 6.6.4.2. Untersuchung der MYO6-Expression in Prostatazelllinien

Um in Zelllinien funktionelle Analysen bezüglich miRNA-Einflüssen auf endogene Proteinmengen durchführen zu können, wurde zunächst die Proteinexpression von

MYO6 in verschiedenen Prostatazelllinien mittels Western Blot untersucht. Zusätzlich ließ sich so eine Aussage über eine mögliche Korrelation von Protein- und miRNA-Expression in Prostatakarzinom- und normalen Prostatazellen machen.

Hierzu wurden aus PNF-08, LNCaP und DU145 Zellen Proteinextrakte hergestellt, 30 µg dieser in einem 7,5%igen Gel aufgetrennt und endogenes MYO6 bzw.  $\beta$ -Aktin als Ladekontrolle im Western Blot mit Hilfe spezifischer Antikörper detektiert. In Abbildung 38 ist ein Western Blot mit endogenen Proteinmengen von MYO6 der einzelnen Zelllinien dargestellt.



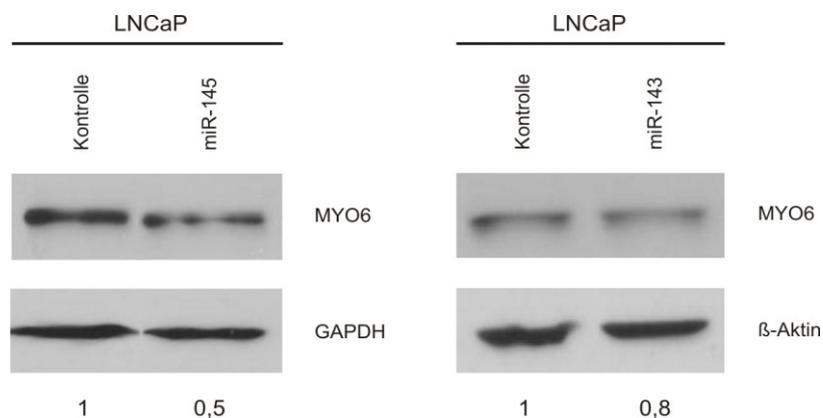
**Abbildung 38: Untersuchung endogener Proteinexpression von MYO6 in verschiedenen Prostatazelllinien**

30 µg der jeweiligen Proteinextrakte wurden in einem 7,5%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und MYO6 bzw.  $\beta$ -Aktin als Ladekontrolle mit Hilfe spezifischer Antikörper im Western Blot sichtbar gemacht. MYO6 wird in LNCaP und DU145 Karzinomzellen exprimiert, jedoch nicht in Prostatafibroblasten (PNF-08).

Wie zu erkennen ist, konnte in normalen Prostatafibroblasten (PNF-08) keine endogene MYO6-Expression nachgewiesen werden, in den Karzinomzellen LNCaP und DU145 ist MYO6 jedoch stark exprimiert. Somit konnten beide Karzinomzelllinien in späteren Experimenten eingesetzt werden. Außerdem wird deutlich, dass die Expression von MYO6 mit der Expression der miR-143 und miR-145 invers korreliert, da, wie bereits in Abschnitt 6.5 beschrieben, beide miRNAs nur in normalen Prostatafibroblasten exprimiert wurden und in Prostatakarzinomzellen nicht detektierbar waren.

### 6.6.4.3. Einfluss von miR-143 und miR-145 auf die endogene Proteinmenge von MYO6 in Prostatazellen

Im Anschluss an die Luciferase-Assays, in denen ein Einfluss der miR-143 und miR-145 auf MYO6 auf mRNA-Ebene gezeigt werden konnte, sollte nun die Regulierung von MYO6 durch diese miRNAs auf Proteinebene analysiert werden. Dazu wurden LNCaP Zellen jeweils mit 2  $\mu\text{g}$  eines miRNA-Expressionsplasmids bzw. des Kontrollvektors transfiziert. Aus diesen Zellen wurden nach 48 h Proteinextrakte hergestellt und 30  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein in einem 7,5%igen SDS-Gel aufgetrennt. Die Proteindetektion erfolgte in einem Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen MYO6 und GAPDH bzw.  $\beta$ -Aktin im Falle der Transfektion von miR-143. Da  $\beta$ -Aktin als Target von miR-145 beschrieben war (Takagi et al., 2009) und infolgedessen keine geeignete Ladekontrolle darstellte, wurde im Western Blot mit Extrakten aus miR-145-transfizierten Zellen GAPDH als Ladekontrolle detektiert. Die Quantifizierung der Signale erfolgte mittels ImageQuant. Abbildung 39 zeigt jeweils eines von drei repräsentativen Experimenten.



**Abbildung 39: Einfluss von miR-143 und miR-145 auf die endogene Expression von MYO6 in LNCaP-Zellen**

LNCaP-Zellen wurden in 6-Lochplatten mit Lipofectamine und je 2  $\mu\text{g}$  miR-Expressionsplasmid bzw. Kontrollvektor transfiziert und 48 h später Proteinextrakte angefertigt. Die Auftrennung von 30  $\mu\text{g}$  Proteinextrakt erfolgte im 7,5%igen SDS-Gel. Die Proteine MYO6 und  $\beta$ -Aktin bzw. GAPDH wurden mit spezifischen Antikörpern im Western Blot nachgewiesen. Die Quantifizierung der Banden erfolgte mittels ImageQuant, wobei das Verhältnis von MYO6 zu  $\beta$ -Aktin bzw. GAPDH in Zellen, welche mit einem leeren Expressionsplasmid transfiziert wurden, gleich eins gesetzt wurde. Die ektopische Expression der miR-145 reduzierte die MYO6-Menge um  $\sim 50\%$  wohingegen die Transfektion der miR-143 in einer Reduktion um  $\sim 20\%$  resultierte.

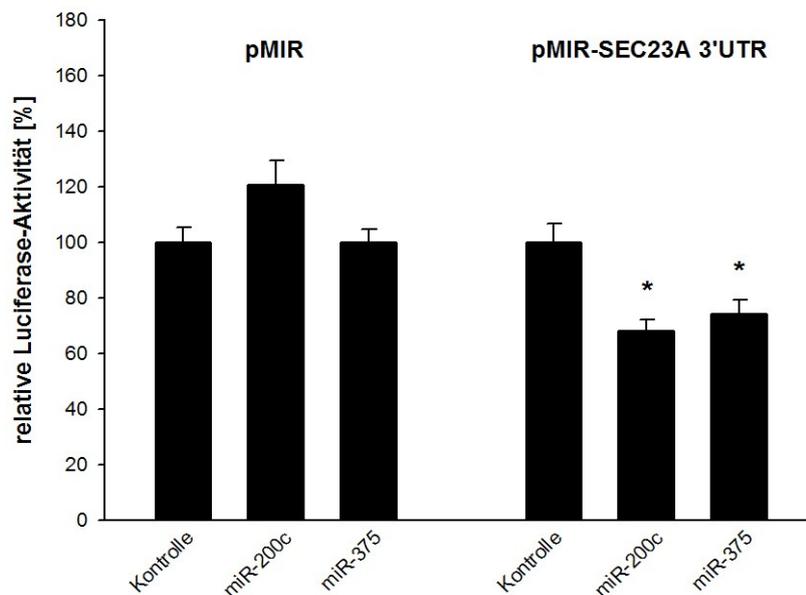
Wie zu erkennen ist, führte die ektopische Expression von miR-145 in LNCaP Zellen zu einer deutlichen Reduktion der MYO6-Proteinmenge auf  $\sim 50\%$ , die Transfektion von miR-143 reduzierte die endogene MYO6-Menge auf  $\sim 80\%$ . Mit Hilfe der

durchgeführten Reporterassays und des Western Blots konnte also gezeigt werden, dass miR-143 und miR-145 an die 3'UTR von MYO6 binden und dies in der Reduktion der MYO6-Proteinmenge resultiert.

### 6.6.5. SEC23A als Target von miR-200c und miR-375

#### 6.6.5.1. Regulation der 3'UTR von SEC23A durch miR-200c und miR-375

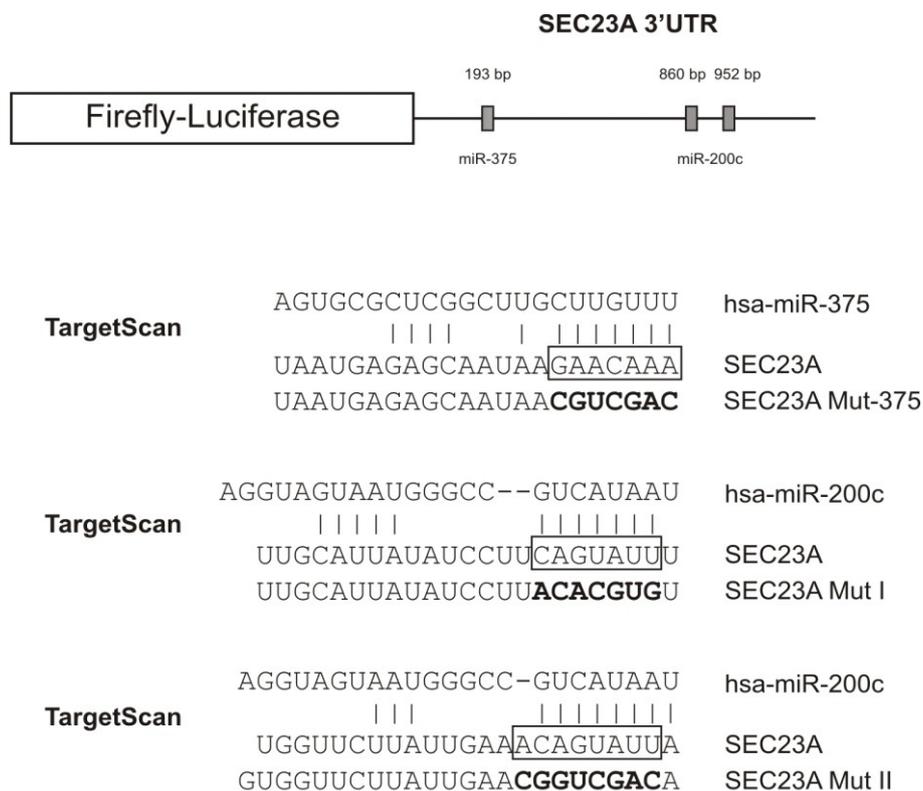
Zunächst wurde die Bindung von miR-200c und miR-375 an die 3'UTR von SEC23A in Luciferase-Assays untersucht. Dazu wurde die vollständige 3'UTR hinter das Firefly-Luciferase-Gen von pMIR-RNL-TK kloniert und 48 h nach Transfektion von 0,8  $\mu$ g Effektor- und 0,2  $\mu$ g Reporterplasmid in 293T-Zellen die Luciferase-Aktivität analysiert. In Abbildung 40 sind die relativen, mittleren Luciferase-Aktivitäten aus vier unabhängigen Experimenten mit zugehörigen Standardfehlern dargestellt, wobei die mittlere Luciferase-Aktivität der Kontrollansätze auf 100 % gesetzt wurde.



**Abbildung 40: Einfluss von miR-200c und miR-375 auf die 3'UTR von SEC23A**

293T Zellen wurden mit je 0,2  $\mu$ g Reporterplasmid und 0,8  $\mu$ g Kontrollvektor bzw. miRNA transfiziert. 48 h nach Transfektion der Zellen wurden Luciferase-Assays durchgeführt. Dargestellt sind die Ergebnisse aus vier unabhängigen Experimenten mit Standardfehler, die je als Duplikate erfolgten. Die Luciferase-Aktivität der kontroll-transfizierten Zellen wurde auf 100 % gesetzt. Die Koftransfektion von miR-200c resultierte in einer Reduktion der Luciferase-Aktivität um 32 % ( $p < 0,05$ ), diejenige von miR-375 führte zu einer Abnahme der Luciferase-Aktivität um 26 % ( $p < 0,05$ ).

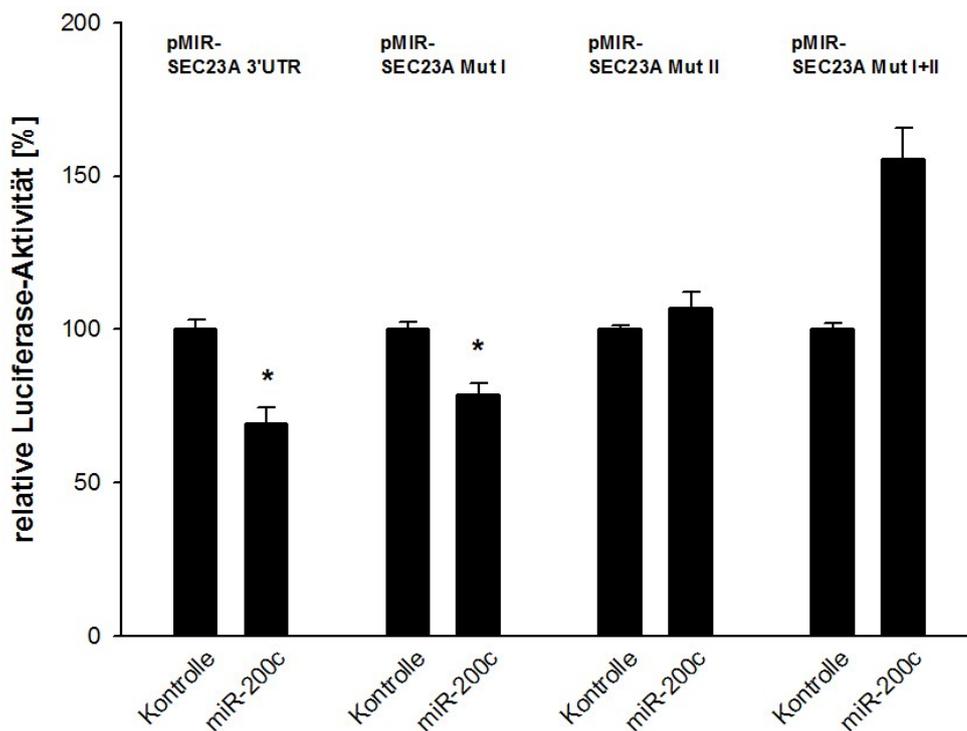
Wie deutlich zu erkennen ist, führte die Kotransfektion von miR-200c zu einer Reduktion der Luciferase-Aktivität des Reporterkonstrukts um ~32 % ( $p < 0,05$ ), wohingegen der Ansatz mit miR-375 einen Rückgang der Luciferase-Aktivität um ~26 % ( $p < 0,05$ ) verzeichnen ließ. Da miR-200c zu einer nicht signifikanten Induktion des Reporterkonstrukts führte und miR-375 keinen Einfluss auf den Leervektor zeigte, handelte es sich um einen spezifischen Effekt der miRNAs auf die SEC23A-3'UTR. Anschließend wurden die potentiellen Bindestellen beider miRNAs in der 3'UTR mutiert, um die Bindung von miR-200c und miR-375 an SEC23A näher zu analysieren. Sollte es sich bei den vorhergesagten Bindestellen um funktionelle Zielsequenzen handeln, dürften die Mutanten keine Beeinflussung mehr durch die entsprechende miRNA zeigen. Dazu wurden mittels zielgerichteter Mutagenese die zur Seed-Sequenz komplementären Nukleotide ausgetauscht. Nach der TargetScan-Vorhersage ergaben sich in der 3'UTR zwei Bindestellen für miR-200c und eine für miR-375, welche in Abbildung 41 dargestellt sind.



**Abbildung 41: Schematische Übersicht über die vorhergesagten Bindestellen für miR-200c und miR-375 in der SEC23A-3'UTR**

Gezeigt sind die Bindestellen für miR-200c und miR-375 in der SEC23A-3'UTR, die mit Hilfe des Programms TargetScan vorhergesagt wurden. Die zur Identifizierung der tatsächlichen miRNA-Zielsequenz mutierten Nukleotide der SEC23A-3'UTR sind umrahmt.

Mit den 3'UTR-Mutanten erfolgten erneut Luciferase-Assays, deren Ergebnisse in Abbildung 42 und Abbildung 43 zusammengefasst sind. Es handelt sich dabei um die relativen, mittleren Luciferase-Aktivitäten mit ihrem Standardfehler aus sechs bzw. vier unabhängigen Experimenten, die im doppelten Ansatz durchgeführt worden sind. Wie man zunächst in Abbildung 42 erkennen kann, reduzierte miR-200c die Luciferase-Aktivität von Mutante I um 22 % ( $p < 0,05$ ), zeigte jedoch keinen Effekt auf die Luciferase-Aktivität von Mutante II. Zusätzlich wurde eine Induktion der Aktivität von Doppelmutante I+II beobachtet. Da Mutante I weiterhin durch miR-200c beeinflussbar ist, Mutante II jedoch keine Reduktion der Luciferase-Aktivität zeigt, kann ausgeschlossen werden, dass Bindestelle I eine Zielsequenz für miR-200c innerhalb der SEC23A-3'UTR darstellt. Jedoch ist ersichtlich, dass miR-200c tatsächlich an die 3'UTR von SEC23A über die zweite vorhergesagte Bindestelle bindet.

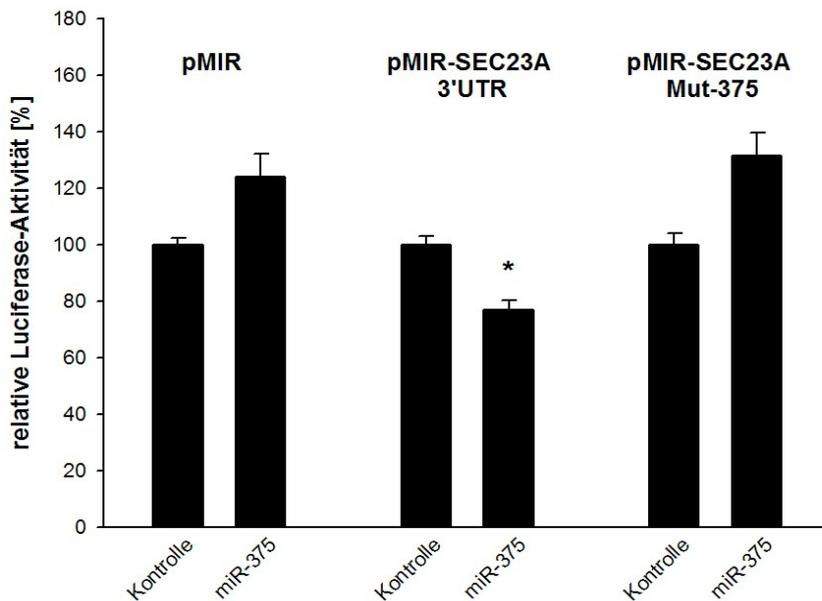


**Abbildung 42: Identifizierung der Zielsequenzen von miR-200c in der SEC23A-3'UTR**

Die Luciferase-Assays wurden 48 h nach Transfektion von 0,2 µg pMIR-Reporter- und 0,8 µg Effektorplasmid in 293T-Zellen durchgeführt. Abgebildet sind die Ergebnisse aus sechs unabhängigen Versuchen als Duplikate mit zugehörigen Standardfehlern. Die mittlere Luciferase-Aktivität der Kotransfektion von Reporter- und Kontrollplasmid wurde auf 100 % gesetzt. Die Expression von miR-200c führt bei der Mutante I zu einer Reduktion der Luciferase-Aktivität um ~22 % ( $p < 0,05$ ), zeigt jedoch keinen Einfluss auf die Aktivität der Mutante II. Die Doppelmutante I+II zeigt nach Transfektion der miRNA eine Induktion auf ~150 %.

In Abbildung 43 wird deutlich, dass miR-375 die Luciferase-Aktivität der Wildtyp-3'UTR statistisch signifikant um 23 % ( $p < 0,05$ ) reduzierte, jedoch keinen Effekt auf die 3'UTR-Mutante hatte, in der die Zielsequenz für miR-375 ersetzt worden war.

Somit konnte die vorhergesagte Bindestelle für miR-375 sowie die zweite Zielsequenz für miR-200c bestätigt und die Regulation der SEC23A-3'UTR durch miR-200c und miR-375 in Luciferase-Assays validiert werden.



**Abbildung 43: Untersuchung der Bindestelle von miR-375 in der SEC23A-3'UTR**

Je 0,2 µg Reporterplasmid und 0,8 µg Kontrollvektor bzw. miRNA wurden in 293T Zellen transfiziert und 48 h später Luciferase-Assays durchgeführt. Abgebildet sind die Ergebnisse aus vier unabhängigen Experimenten mit Standardfehler, die je im Doppelansatz durchgeführt wurden. Die Luciferase-Aktivität der mit Kontrollplasmid transfizierten Zellen wurde auf 100 % gesetzt. Während miR-375 die Luciferase-Aktivität der wt-3'UTR statistisch signifikant um 23 % ( $p < 0,05$ ) reduziert, hat sie keinen Effekt auf die mutierte SEC23A-3'UTR.

### 6.6.5.2. Charakterisierung und Aufreinigung mono- und polyklonaler $\alpha$ -SEC23A Seren

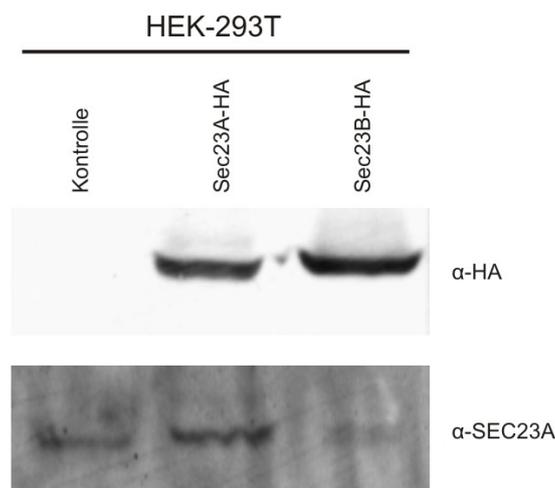
Die Interaktion von miR-375 und miR-200c mit der SEC23A-3'UTR konnte, wie oben gezeigt, mittels Reporter-Gen-Assays bestätigt werden. Jedoch stellen Luciferase-Assays eine sehr artifizielle Methode dar, deren Ergebnisse auf Proteinebene mittels Western Blots validiert werden müssen. Da zum Zeitpunkt dieser Experimente keine spezifischen SEC23A-Antikörper kommerziell erhältlich waren, erfolgte die Herstellung dieser mittels Immunisierung von Versuchstieren. Hierzu wurde zunächst, wie in Abschnitt 5.9.5 beschrieben, ein SEC23A-Polypeptid hergestellt,

aufgereinigt und in Zusammenarbeit mit der AG Zimmermann (Homburg) als Antigen in Kaninchen injiziert. Die Antigenverabreichung erfolgte insgesamt sechs Mal im Abstand von zwei Wochen, wobei vor jeder Injektion Serum entnommen und im Western Blot auf vorhandene SEC23A-Antikörper untersucht wurde.

Parallel dazu wurden auch monoklonale SEC23A-Antikörper in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Elisabeth Kremmer (Helmholtz Zentrum, München), wie in 5.9.7 beschrieben, hergestellt. Hierbei erfolgte die Immunisierung von Lou/C-Ratten mit einem synthetischen SEC23A-Peptid. Nach der Generierung von Hybridomazellen wurden deren Überstände auf Reaktivität mit ektopisch exprimiertem SEC23A hin untersucht.

#### 6.6.5.2.1 Charakterisierung und Aufreinigung des $\alpha$ -SEC23A Kaninchensерums

Zum Testen der polyklonalen SEC23A-Seren wurden zunächst 293T-Zellen in 10cm-Schalen mit einem SEC23A-HA-, SEC23B-HA-Expressionsplasmid bzw. einem Kontrollvektor transfiziert und 48 h später Proteinextrakte hergestellt. Da SEC23A und -B eine Homologie der Aminosäuresequenz von ~90 % zeigen, sollte mit Proteinextrakten aus SEC23B-transfizierten Zellen die Spezifität des Kaninchensерums untersucht werden. Anschließend erfolgte die Auftrennung von 30  $\mu$ g der entsprechenden Extrakte in einem 10%igen SDS-Gel.

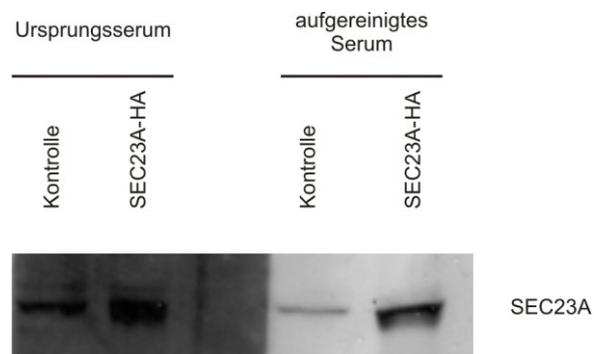


**Abbildung 44: Untersuchung der Spezifität des SEC23A-Kaninchensерums**

293T Zellen wurden in 10cm-Schalen mit 8  $\mu$ g SEC23A-HA- oder SEC23B-HA-Expressionsplasmid bzw. Kontrollvektor transfiziert. 48 h nach Transfektion erfolgte die Extraktion der Gesamtproteine und die Auftrennung von 30  $\mu$ g Extrakt in einem 10%igen Polyacrylamidgel. SEC23A wurde mittels des Kaninchensерums bzw. eines spezifischen HA-Antikörpers als Positivkontrolle detektiert. Das Kaninchensерum erkannte sowohl das überexprimierte SEC23A wie auch das endogen vorhandene Protein in kontrolltransfizierten Zellen und zeigte keine Kreuzreaktivität mit SEC23B.

Der Western-Blot wurde mit SEC23A-Seren bzw. einem HA-spezifischen Antikörper als Positivkontrolle inkubiert, wobei Abbildung 44 einen Western Blot zeigt, bei dem das Endserum verwendet wurde. Wie deutlich zu erkennen ist, erkannte das Kaninchenserum spezifisch sowohl das überexprimierte SEC23A wie auch das endogene Protein in kontrolltransfizierten Zellen. Das Molekulargewicht des detektierten Proteins entsprach dabei dem des Signals, welches mit dem HA-spezifischen Antikörper sichtbar gemacht wurde. Die Intensität der Bande in SEC23B-transfizierten Zellen entsprach derjenigen des endogenen Signals. Dies bestätigt die Spezifität des Kaninchensersums bezüglich der SEC23A-Detektion und schließt somit Kreuzreaktionen der Antikörper mit SEC23B aus.

Anschließend erfolgte eine zusätzliche Aufreinigung des Kaninchensersums, um unspezifische Antikörper aus dem Serum zu entfernen und das Hintergrundsignal des Serums zu minimieren. Die Seren wurden, wie im Abschnitt 5.9.5.3 beschrieben, durch Affinitätschromatographie aufgereinigt und erneut im Western Blot getestet. Die Membranen wurden anschließend mit dem aufgereinigten bzw. nicht aufgereinigten Serum inkubiert.



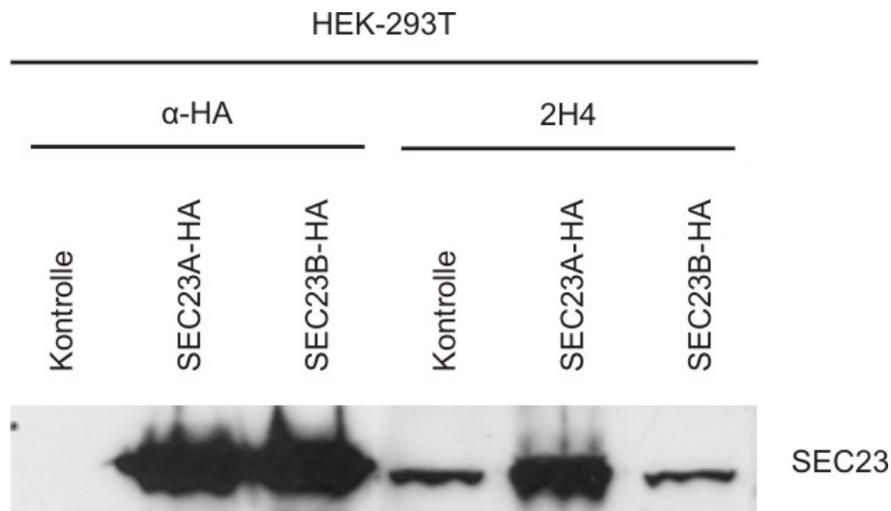
**Abbildung 45: Untersuchung des aufgereinigten anti-SEC23A-Serums**

Je 8 µg SEC23A-HA-Expressionsplasmid bzw. Kontrollvektor wurden in 293T Zellen transient transfiziert und 48 h später Proteinextrakte angefertigt. Die Auftrennung von je 30 µg Extrakt erfolgte in einem 10%igen SDS-Gel. Der Western Blot wurde anschließend mit dem aufgereinigten bzw. dem unbehandelten Serum inkubiert. Beide Kaninchenseren erkannten endogenes wie auch das überexprimierte SEC23A, wobei das aufgereinigte Serum schwächere Hintergrundsignale produzierte.

Wie Abbildung 45 verdeutlicht, zeigte der Blot, welcher mit dem aufgereinigten Serum inkubiert wurde, deutlich schwächere Hintergrundsignale. Dieses Serum erlaubte eine bessere Quantifizierung der Signale und konnte somit in späteren Experimenten eingesetzt werden.

#### 6.6.5.2.2 Charakterisierung monoklonaler SEC23A Antikörper

Bei der Analyse der monoklonalen SEC23A-Antikörper wurden, analog zur Untersuchung der Kaninchenseren, 293T-Zellen mit SEC23A-HA-, SEC23B-HA-Expressionsplasmiden bzw. einem Kontrollvektor transfiziert. 48 h nach Transfektion erfolgte die Extraktion der Gesamtproteine und die Auftrennung von 30 µg Extrakt in einem 10%igen Polyacrylamidgel. Der Western-Blot wurde mit monoklonalen SEC23A-Seren bzw. einem HA-spezifischen Antikörper als Positivkontrolle inkubiert. Wie in Abbildung 46 zu erkennen ist, detektiert der monoklonale Antikörper 2H4 das überexprimierte sowie das endogene SEC23A in kontrolltransfizierten Zellen. Da das detektierte Signal in SEC23B-transfizierten Zellen vergleichbar mit demjenigen aus kontrolltransfizierten Zellen war, lässt sich daraus schließen, dass dieser monoklonale SEC23A Antikörper spezifisch SEC23A erkennt und nicht mit SEC23B kreuzreagiert.



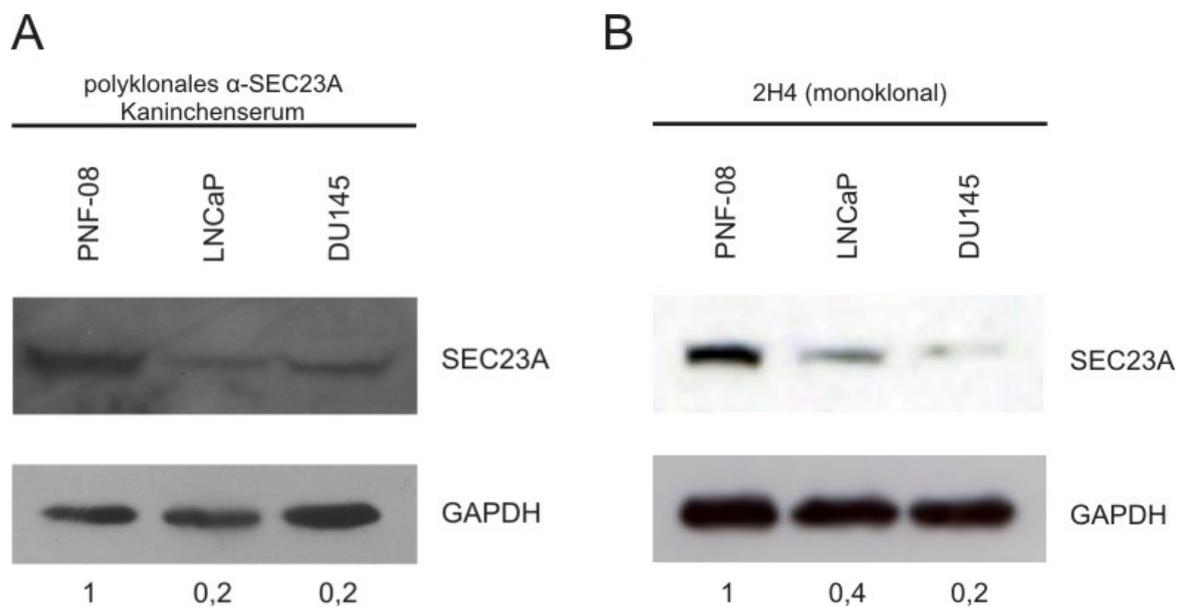
**Abbildung 46: Untersuchung des monoklonalen SEC23A Antikörpers 2H4**

293T Zellen wurden mit 8 µg SEC23A-HA- oder SEC23B-HA-Expressionsplasmid bzw. Kontrollplasmid transfiziert und 48 h nach Transfektion die Gesamtproteine extrahiert. Die anschließende Auftrennung von 30 µg Extrakt erfolgte in einem 10%igen Polyacrylamidgel. SEC23 wurde mittels des monoklonalen Antikörpers 2H4 bzw. eines spezifischen HA-Antikörpers als Positivkontrolle detektiert. Das monoklonale SEC23A Antikörper erkannte sowohl das überexprimierte SEC23A wie auch das endogen vorhandene Protein in kontrolltransfizierten Zellen und zeigte keine Kreuzreaktivität mit SEC23B.

### 6.6.5.3. Analyse der SEC23A-Expression in Prostatazelllinien

Analog zur Analyse von MYO6 wurde zunächst die Expression des SEC23A-Proteins in verschiedenen Prostatazelllinien mit Hilfe von Western Blots untersucht, um durch eine mögliche Korrelation von Protein- und miRNA-Expression in Prostatakarzinom- bzw. normalen Prostatazellen eine weitere Bestätigung der Verknüpfung von miR-200c, miR-375 und SEC23A im Prostatakarzinom zu erhalten.

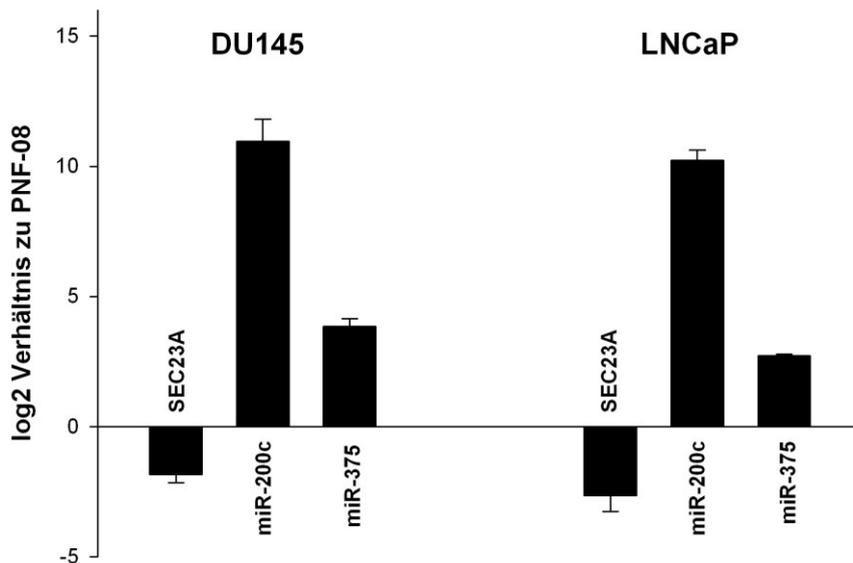
30 µg Proteinextrakt aus PNF-08, LNCaP und DU145 Zellen wurden in einem 10%igen Acrylamid-Gel aufgetrennt und anschließend endogenes SEC23A bzw. GAPDH als Ladekontrolle im Western Blot mit Hilfe spezifischer Antikörper nachgewiesen. Abbildung 47 zeigt endogene Proteinmengen von SEC23A in einzelnen Prostatazelllinien. Wie zu erkennen ist, konnte SEC23A in allen drei Zelllinien endogen nachgewiesen werden. In den Karzinomzellen LNCaP und DU145 war die Proteinmenge von SEC23A im Vergleich zu normalen Prostatafibroblasten (PNF-08) jedoch deutlich um 60-80 % reduziert.



**Abbildung 47: Nachweis der Proteinexpression von SEC23A in verschiedenen Prostatazelllinien mit verschiedenen generierten Antikörperseren**

Aus unterschiedlichen Prostatazelllinien wurden Proteinextrakte hergestellt und 30 µg der entsprechenden Extrakte in einem 10%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Detektion von SEC23A erfolgte mit einem polyklonalen Kaninchenserum oder monoklonalen Antikörper (2H4) bzw. GAPDH als Ladekontrolle mit Hilfe eines spezifischen GAPDH-Antikörpers. Zur Quantifizierung wurde das Verhältnis zwischen SEC23A und GAPDH in Prostatafibroblasten gleich eins gesetzt. SEC23A wurde verstärkt in PNF-08 Zellen exprimiert und zeigte eine reduzierte Expression in LNCaP und DU145 Zellen auf 20-40 %.

Die verminderte SEC23A-Proteinexpression in den verschiedenen Zelllinien wurde zusätzlich mit Hilfe einer quantitativen Real-Time PCR validiert, um eine mögliche Korrelation zwischen der Expression von miR-200c, miR-375 und SEC23A auf RNA- bzw. mRNA-Ebene zeigen zu können. Die Amplifikation bzw. Detektion der miR-200c und miR-375 erfolgte mit Hilfe von SYBR Green und spezifischen Primern, die der SEC23A-mRNA mittels spezifischer Primer und der „Universal Probe Library“ von Roche. Als internen Standard für die cDNA wurde die 5.8sRNA für miRNAs und GAPDH für mRNAs analysiert, um eine relative Quantifizierung mittels  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Methode zu erlauben. In Abbildung 48 sind die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten mit den entsprechenden Standardabweichungen dargestellt.



**Abbildung 48: Expressionsverhältnis von SEC23A, miR-200c und miR-375 zwischen Prostatakarzinomzelllinien und Prostatafibroblasten**

Die Expression von miR-200c, miR-375 und der SEC23A-mRNA wurde mittels quantitativer Real-Time PCR im LightCycler in den verschiedenen Prostatazelllinien in drei unabhängigen Experimenten bestimmt. Dargestellt sind die log<sub>2</sub>-Werte der relativen Quantifizierung mit der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Methode, wobei die Werte der Karzinomzelllinien im Verhältnis zu Prostatafibroblasten gesetzt wurden. Während in den Karzinomzellen weniger SEC23A als in den Prostatafibroblasten nachgewiesen werden konnte, wurden miRNA-200c und miR-375 stärker in Karzinomzelllinien exprimiert.

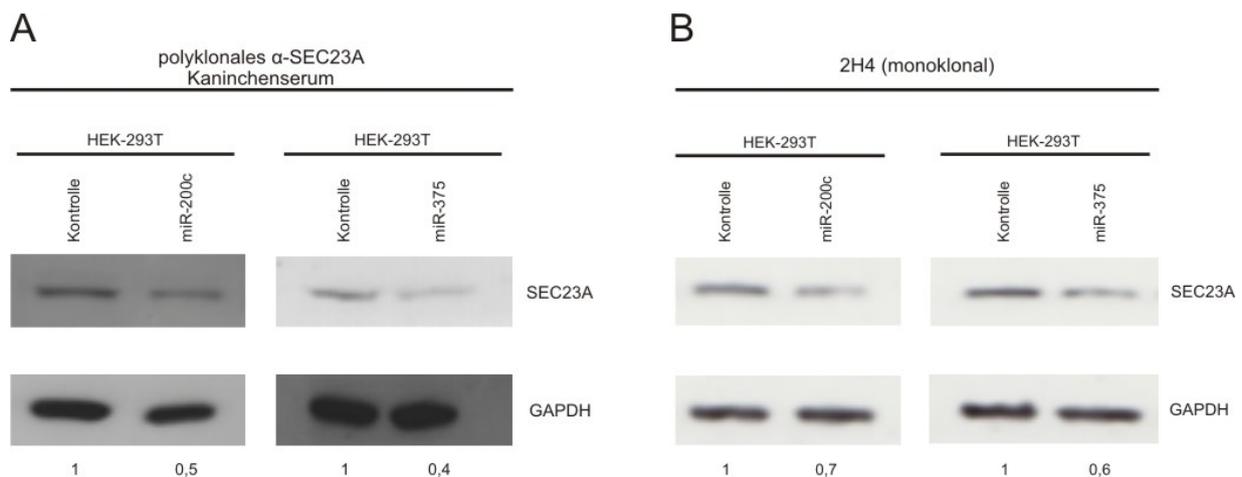
Wie bereits in vorhergehenden Northern Blots gezeigt werden konnte, war die Expression von miR-200c und miR-375 in den Prostatakarzinomzelllinien im Vergleich zu den Prostatafibroblasten induziert. Die mRNA von SEC23A war dagegen schwächer in DU145 und LNCaP Zellen exprimiert als in den PNF-08

Zellen. Somit besteht eine inverse Korrelation der Expression von SEC23A, miR-200c und miR-375 in Prostatakarzinomzellen, verglichen mit Prostatafibroblasten, was ebenfalls für eine Regulation von SEC23A durch beide miRNAs spricht.

#### 6.6.5.4. Regulation der endogene Proteinmenge von SEC23A durch miR-200c und miR-375 in unterschiedlichen Zelllinien

Im nächsten Schritt sollte die Reduktion der endogenen SEC23A-Menge in verschiedenen Zelllinien durch miR-200c und miR-375 gezeigt werden. Da die Prostatakarzinomzelllinien DU145 und LNCaP bereits eine hohe endogene Expression von miR-200c zeigten und die Prostatafibroblastenlinie PNF-08 nicht transfiziert werden konnte, wurde in folgenden Experimenten zunächst auf 293T-Zellen zurückgegriffen. Wie in Abschnitt 6.6.5.2 zu sehen war, exprimierten 293T-Zellen endogen SEC23A und lassen sich sehr einfach und effizient transfizieren. Außerdem konnte mittels Northern Blots keine endogene Expression der miR-200c und miR-375 nachgewiesen werden (Abbildung 25).

Die Zellen wurden mit je 8 µg Kontrollvektor oder miR-200c bzw. miR-375 transfiziert und 48 h später Proteine extrahiert. 30 µg der entsprechenden Extrakte wurde in einem 10%igen Gel aufgetrennt und endogenes SEC23A bzw. GAPDH als Ladekontrolle im Western Blot mit Hilfe spezifischer Antikörper detektiert.



**Abbildung 49: Reduktion von SEC23A durch miR-200c und miR-375 in 293T Zellen**

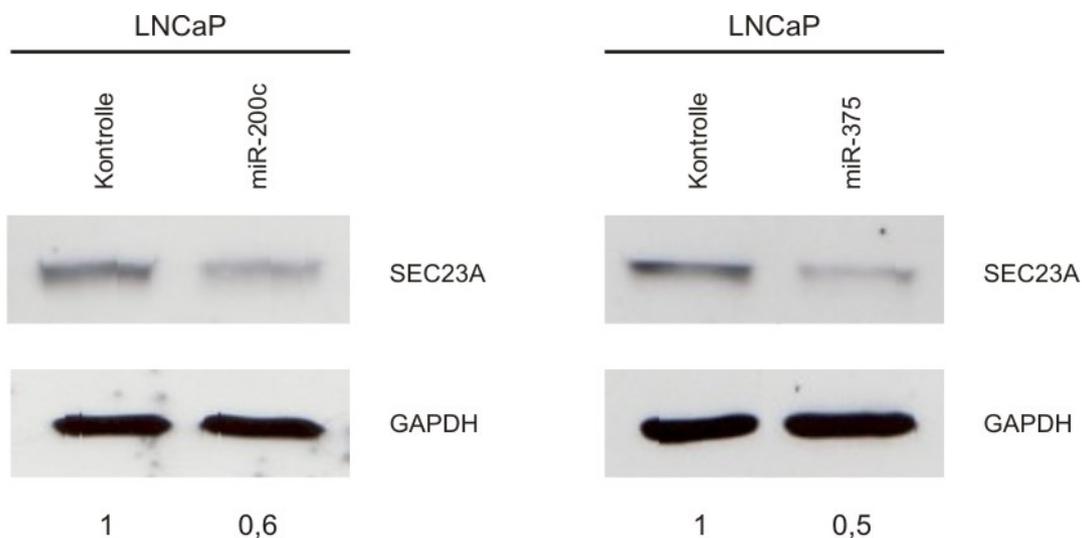
293T Zellen wurden in 10cm-Schalen mit 8 µg Kontrollvektor oder miRNA-Expressionsplasmid transfiziert. 48 h nach Transfektion erfolgte die Extraktion der Gesamtproteine und die Auftrennung von 30 µg Extrakt in einem 10%igen Polyacrylamidgel. SEC23A und die Ladekontrolle GAPDH wurden mit Hilfe spezifischer Antikörper im Western Blot detektiert. Die Transfektion von miR-200c bzw. miR-375 führt jeweils zu einer Reduktion der Proteinmenge von SEC23A um etwa 50-60 %. Zur Quantifizierung wurde das Verhältnis zwischen SEC23A und GAPDH kontrolltransfizierter Zellen gleich eins gesetzt.

Da der monoklonale SEC23A-Antikörper 2H4 erst zu einem späteren Zeitpunkt verfügbar war, erfolgte der Nachweis der SEC23A-Expression im Western Blot zunächst mit dem polyklonalen Kaninchenserum. Dieser Versuch wurde im Anschluss unabhängig wiederholt und der 2H4 Antikörper eingesetzt. Alle folgenden Analysen der Proteinexpression von SEC23A erfolgten ausschließlich mit dem monoklonalen Antikörper 2H4.

Abbildung 49 zeigt, dass sowohl miR-200c als auch miR-375 die endogene Proteinmenge von SEC23A um 50-60 % reduzieren konnten.

Aufgrund der deutlichen Reduktion der SEC23A Proteinexpression in 293T Zellen wurde dieses Experiment anschließend in den Prostatazelllinien LNCaP und DU145, trotz der bereits endogen vorhandenen Expression von miR-200c und miR-375, durchgeführt.

Beide Zelllinien wurden mit je 2 µg Kontrollvektor oder miR-200c bzw. miR-375 in 6-Loch-Platten transfiziert, 48 h später Proteine extrahiert und 30 µg der entsprechenden Extrakte in einem 10%igen Gel aufgetrennt.



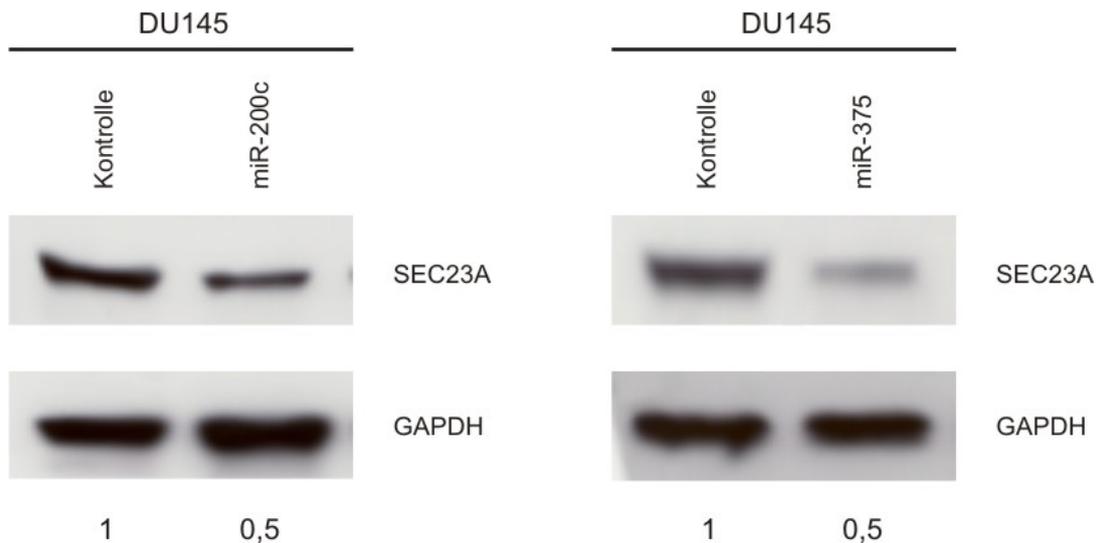
**Abbildung 50: Reduktion von SEC23A durch miR-200c und miR-375 in LNCaP Zellen**

LNCaP Zellen wurden in 6-Loch Platten mit 2 µg Kontrollvektor oder miRNA-Expressionsplasmid transfiziert und 48 h nach Transfektion Proteinextrakte hergestellt. Die Auftrennung von 30 µg Extrakt erfolgte in einem 10%igen Polyacrylamidgel. SEC23A und die Ladekontrolle GAPDH wurden mit Hilfe spezifischer Antikörper im Western Blot detektiert. Die Transfektion von miR-200c bzw. miR-375 reduzierte jeweils die Proteinmenge von SEC23A um etwa 40-50 %. Zur Quantifizierung wurde das Verhältnis zwischen SEC23A und GAPDH kontrolltransfizierter Zellen gleich eins gesetzt.

Die Detektion von SEC23A bzw. GAPDH als Ladekontrolle erfolgte im Western Blot mit Hilfe spezifischer Antikörper. Abbildung 50 zeigt jeweils eines von drei repräsentativen Experimenten in LNCaP Prostatakarzinomzellen. Wie deutlich zu

erkennen ist, führte die Überexpression von miR-200c in LNCaP Zellen zu einer Reduktion der SEC23A Proteinmenge auf 60 % und im Falle von miR-375 zur Reduktion um 50 %.

Ähnliches konnte in den DU145 Prostatakarzinomzellen beobachtet werden. Hier resultierte die Überexpression von miR-200c und miR-375 jeweils in einer Reduktion der endogenen SEC23A Proteinmenge um 50 % (Abbildung 51).



**Abbildung 51: Reduktion von SEC23A durch miR-200c und miR-375 in DU145 Karzinomzellen**

DU145 Zellen wurden in 6-Lochplatten mit je 2 µg miR-Expressionsplasmid bzw. Kontrollvektor transfiziert, 48 h später Proteinextrakte angefertigt und 30 µg Proteinextrakt in einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt. Die Proteine SEC23A und GAPDH wurden mit spezifischen Antikörpern im Western Blot nachgewiesen. Die Quantifizierung der Banden erfolgte mittels ImageQuant, wobei das Verhältnis von SEC23A zu GAPDH in Zellen, welche mit einem leeren Expressionsplasmid transfiziert wurden, gleich eins gesetzt wurde. Die ektopische Expression der miR-200c und miR-375 führte jeweils zu einer Reduktion der SEC23A Proteinmenge um ~50 %.

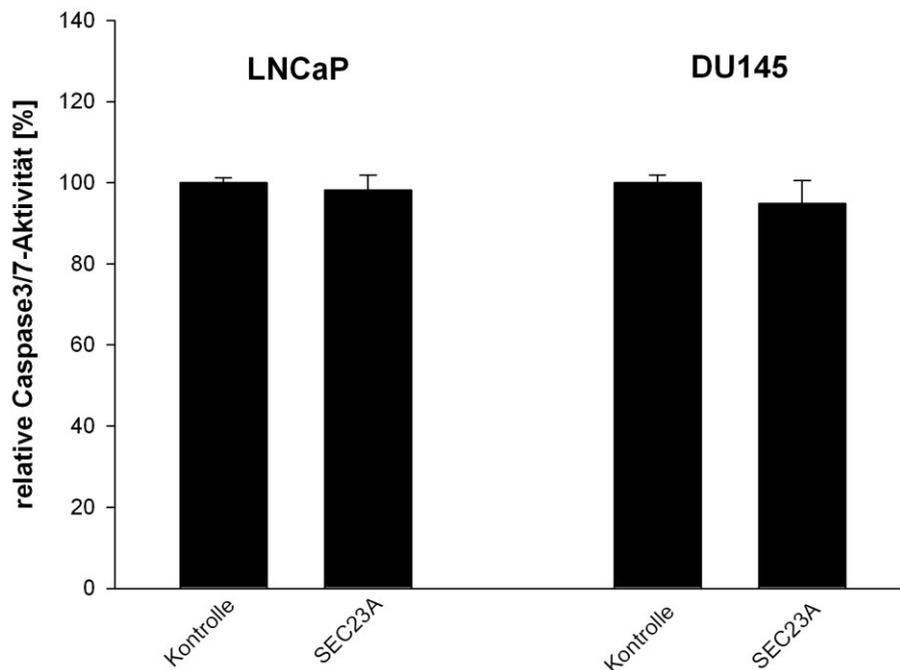
Somit konnte gezeigt werden, dass miR-200c und miR-375 auch einen Einfluss auf die endogene Proteinmenge von SEC23A haben und, resultierend aus den Reporter-Gen-Assays, folglich an die 3'UTR von SEC23A binden können.

#### 6.6.5.5. Untersuchung der Apoptose bei SEC23A-Überexpression in Prostatazelllinien

Um einen Einblick in eine mögliche Funktion von SEC23A bei der Entstehung bzw. Progression des Prostatakarzinoms zu erhalten, wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wullich (Erlangen) verschiedene funktionelle Assays durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Untersuchung der Apoptose bei Überexpression von SEC23A in verschiedenen Prostatazelllinien. Hierbei wurde die

Aktivität von Caspase 3 und 7 analysiert, welche in der Signalkaskade während der Apoptose eine zentrale Rolle spielen. Beide Caspasen werden durch proteolytische Spaltung während der Initiationsphase der Apoptose aktiviert und führen anschließend zur Aktivierung von sekundären Zielgenen innerhalb der Caspasekaskade oder direkt zum Abbau zellulärer Strukturproteine (s. 5.8.).

Hierzu wurden DU145 und LNCaP Zellen mit 1 µg eines SEC23A-Expressionskonstrukts oder Kontrollplasmids transfiziert und 48 h später die Caspase 3/7-Aktivität bestimmt. Abbildung 52 zeigt die Ergebnisse aus sechs unabhängigen Experimenten als Duplikate mit dem jeweiligen Standardfehler. Die Caspase-Aktivität aus den mit Kontrollplasmid transfizierten Ansätzen wurde auf 100 % gesetzt.



**Abbildung 52: Einfluss von SEC23A auf die Apoptose in LNCaP und DU145 Prostatazelllinien**

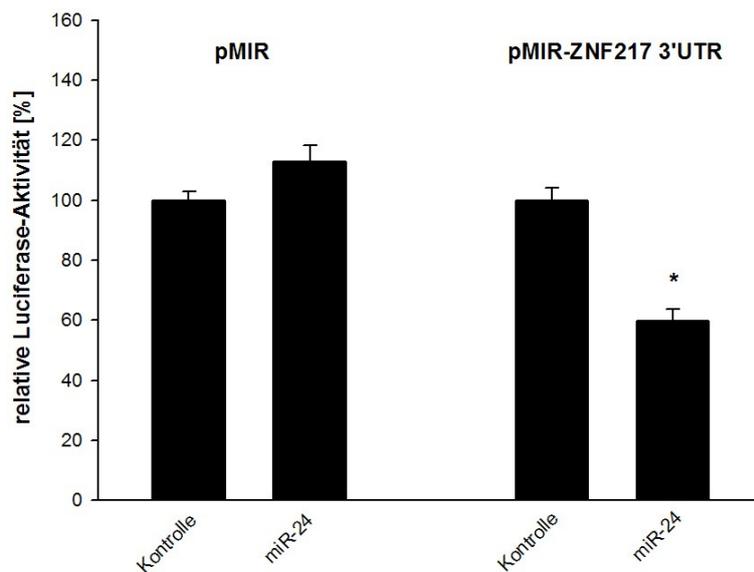
LNCaP bzw. DU145 Zellen wurden in 24-Loch-Platten mit 1 µg SEC23A-Expressionsplasmid oder Kontrollvektor transfiziert und 48 h später Caspase 3/7-Assays durchgeführt. Abgebildet sind die Ergebnisse aus sechs unabhängigen Experimenten mit Standardfehler, die je im Doppelansatz durchgeführt wurden. Die Caspase-Aktivität der mit Kontrollplasmid transfizierten Zellen wurde auf 100 % gesetzt. Die Überexpression von SEC23A hat in beiden Zelllinien keinen Einfluss auf die Apoptose.

Abbildung 52 verdeutlicht, dass die Überexpression von SEC23A keine Veränderung der Caspase 3/7-Aktivität bewirkt und folglich die Apoptose nicht beeinflusst.

### 6.6.6. ZNF217 als Target von miR-24

#### 6.6.6.1. Einfluss von miR-24 auf die Aktivität des ZNF217-Reporterkonstrukts

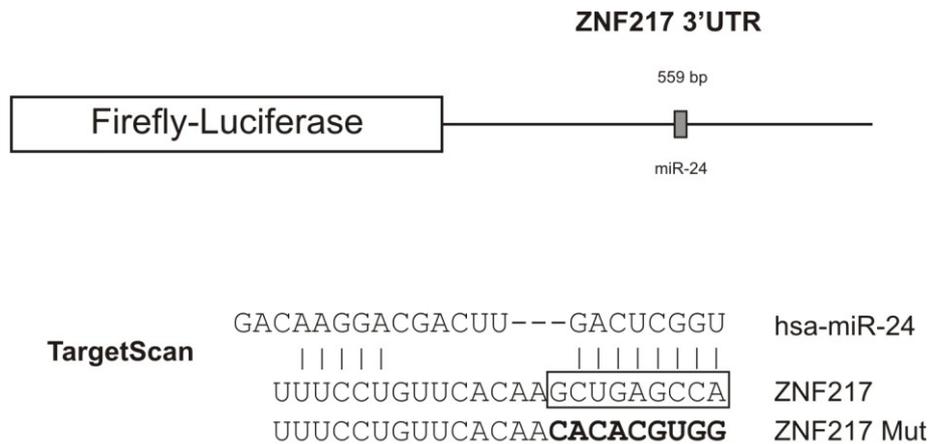
Der Einfluss der miR-24 auf die 3'UTR von ZNF217 wurde in Luciferase-Assays 48 h nach transienter Transfektion von 0,2 µg Reporter- und 0,8 µg Effektorplasmid untersucht. In Abbildung 53 sind die Ergebnisse aus fünf unabhängigen Experimenten im Doppelansatz mit zugehörigem Standardfehler dargestellt, wobei die mittlere Luciferase-Aktivität der mit dem Kontrollplasmid transfizierten Ansätze auf 100 % festgelegt wurde. Es lässt sich erkennen, dass die Koftransfektion von miR-24 eine Reduktion der Luciferase-Aktivität des Reporterkonstrukts um 40 % ( $p < 0,05$ ) bewirkte.



**Abbildung 53: Einfluss der miR-24 auf die 3'UTR von ZNF217**

48 h nach Transfektion von 293T-Zellen mit 0,2 µg Reporter- und 0,8 µg Effektorplasmid erfolgten Luciferase-Assays. Es sind die relativen, mittleren Luciferase-Aktivitäten mit ihren Standardfehlern aus fünf unabhängigen Experimenten in Duplikaten dargestellt. miR-24 reduziert die Aktivität der *wt*-3'UTR statistisch signifikant um 40 % ( $p < 0,05$ ).

Anschließend wurde die Bindung von miR-24 an die ZNF217-3'UTR näher untersucht. Hierbei erfolgte zunächst die Modifikation der miRNA-Bindestelle innerhalb der 3'UTR, indem mittels zielgerichteter Mutagenese neben der Seed-Sequenz noch zwei weitere Nukleotide ausgetauscht wurden.

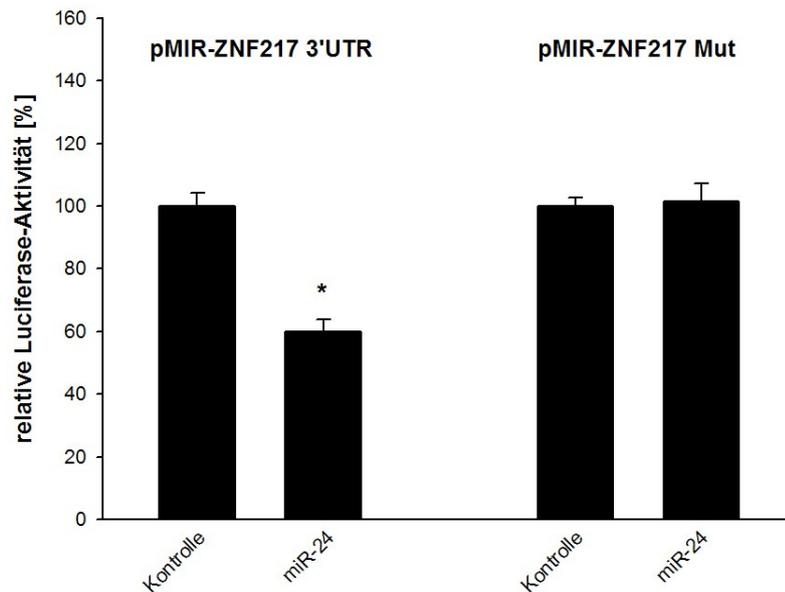


**Abbildung 54: Schematische Darstellung der vorhergesagten Bindestelle von miR-24 in der ZNF217-3'UTR**

Dargestellt ist die Lokalisation der vorhergesagten Bindestelle von miR-24 in der 3'UTR von ZNF217. Die zur miR-24 komplementäre Seed-Sequenz in der 3'UTR von ZNF217, die mutiert wurde, ist markiert.

Die miR-24-Bindestelle in der ZNF217-3'UTR, sowie die mutierte Sequenz, sind in Abbildung 54 dargestellt. MiR-24 wurde im Anschluss hinsichtlich der Bindung der mutierten 3'UTR von ZNF217 erneut in Luciferase-Assays untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 55 dargestellt, wobei es sich um die relativen, mittleren Luciferase-Aktivitäten von vier unabhängiger Experimenten, die im Doppelansatz durchgeführt worden waren, und die dazugehörigen Standardfehler handelt.

Die miRNA führte zu keiner Reduktion der Luciferase-Aktivität des mutierten Konstrukts während die Aktivität des *wt*-Konstrukts durch Kotransfektion von miR-24 erneut statistisch signifikant auf 60 % ( $p < 0,05$ ) reduziert wurde. Somit konnte die vorhergesagte Bindestelle für miR-24 in der ZNF217-3'UTR und folglich die Regulation der ZNF217-3'UTR durch diese miRNA in Luciferase-Assays bestätigt werden.

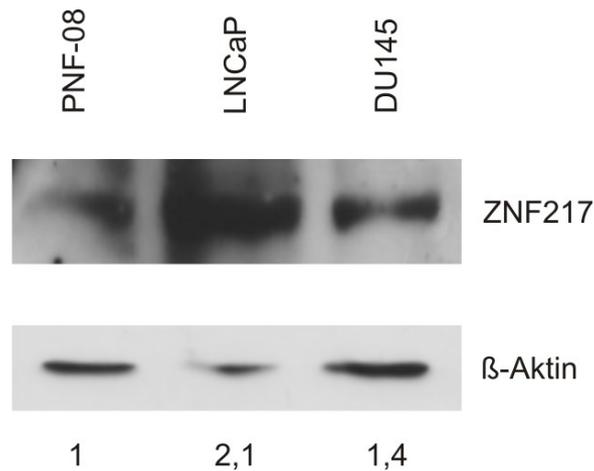


**Abbildung 55: Identifizierung der Bindestelle von miR-24 in der 3'UTR von ZNF217**

Dargestellt sind die Ergebnisse aus vier unabhängigen Versuchen im Doppelansatz mit zugehörigen Standardfehlern. Die Luciferase-Assays wurden 48 h nach Transfektion von 0,2 µg pMIR-Reporter- und 0,8 µg Effektorplasmid durchgeführt und die mittlere Luciferase-Aktivität der Kontrolltransfektionen auf 100 % gesetzt. Die Expression von miR-24 führte zu einer Reduktion der Luciferase-Aktivität bei der ZNF217-3'UTR um ~40 % ( $p < 0,05$ ), zeigte jedoch keinen Einfluss auf die Aktivität der Mutante.

#### 6.6.6.2. Expressionsanalyse des ZNF217-Proteins in Prostatazelllinien

Im nächsten Schritt wurde die Expression von ZNF217 in den verschiedenen Prostatazelllinien mit Hilfe von Western Blots analysiert, um einen weiteren Anhaltspunkt für die Deregulation dieses Proteins und dessen Beeinflussung durch miR-24 zu erhalten. Im Anschluss an die Proteinextraktion aus den jeweiligen Prostatazelllinien erfolgte die Auftrennung von 30 µg Extrakt in einem 7,5%igen SDS-Gel. Endogenes ZNF217 bzw.  $\beta$ -Aktin als Ladekontrolle wurden im Western Blot mit Hilfe spezifischer Antikörper detektiert. Wie in Abbildung 56 zu erkennen ist, konnte ZNF217 zunächst in allen drei Zelllinien endogen nachgewiesen werden.



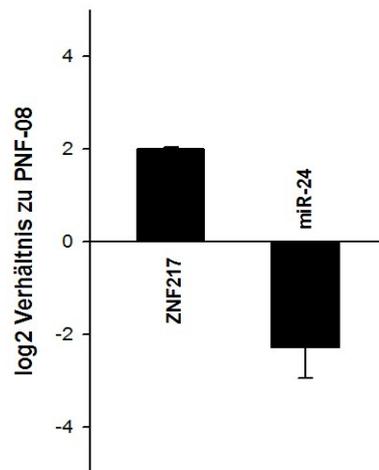
**Abbildung 56: Analyse der Proteinexpression von ZNF217 in Prostatazelllinien**

30  $\mu$ g Proteinextrakt verschiedenerer Prostatazelllinien wurde in einem 7,5%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf einer Nitrocellulosemembran immobilisiert. Mit Hilfe spezifischer Antikörper wurden ZNF217 bzw.  $\beta$ -Aktin als Ladekontrolle im Western Blot detektiert. Zur Quantifizierung wurde das Verhältnis zwischen ZNF217 und  $\beta$ -Aktin in PNF-08 Zellen gleich eins gesetzt. ZNF217 wurde verstärkt in LNCaP- und DU145-Karzinomzellen exprimiert und zeigte im Vergleich dazu eine reduzierte Expression in Prostatafibroblasten.

Die Proteinmenge von ZNF217 war in den Karzinomzellen LNCaP und DU145 im Vergleich zu normalen Prostatafibroblasten (PNF-08) jedoch deutlich erhöht. Dies deckt sich mit den mRNA-Expressionsdaten aus Oncomine, wo ZNF217 als hochreguliert im Prostatakarzinom beschrieben wurde.

#### 6.6.6.3. Analyse der Korrelation zwischen der mRNA von ZNF217 und miR-24 in Prostatazelllinien

Um eine mögliche Korrelation zwischen der Expression von miR-24 und ZNF217 auf RNA-Ebene zeigen zu können, wurde zusätzlich eine quantitative Real-Time PCR mit cDNA der verschiedenen Prostatazelllinien durchgeführt. Die Amplifikation bzw. Detektion von miR-24 erfolgte mit Hilfe von SYBR Green und spezifischen Primern, die Analyse der SEC23A-mRNA mittels spezifischer Primer und der „Universal Probe Library“ von Roche. Um eine relative Quantifizierung mittels  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Methode zu ermöglichen, wurde als internen Standard für die cDNA die 5.8sRNA für miRNAs und GAPDH für mRNAs untersucht. Abbildung 57 zeigt die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten als  $\log_2$  mit den entsprechenden Standardabweichungen.



**Abbildung 57: Expressionsverhältnis von miR-24 und ZNF217-mRNA zwischen DU145 und PNF-08**

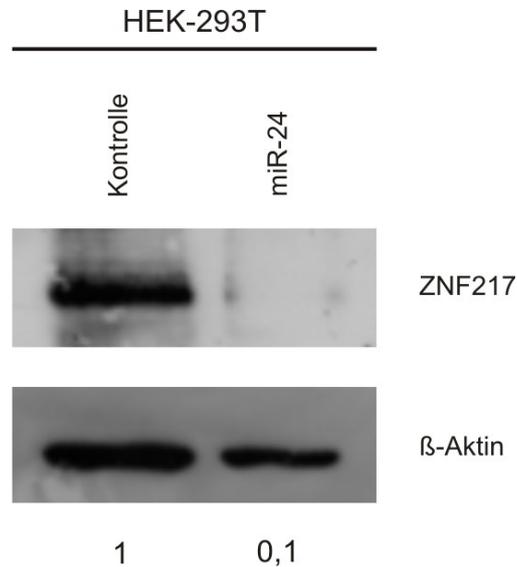
Die Expression von miR-24 und der ZNF217-mRNA wurde mittels quantitativer Real-Time PCR im LightCycler in DU145 und PNF-08 Zellen in drei unabhängigen Experimenten bestimmt. Dargestellt sind die log<sub>2</sub>-Werte der relativen Quantifizierung mit der  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  Methode, wobei die Werte der Prostatakarzinomzellen DU145 im Verhältnis zu Prostatafibroblasten (PNF-08) gesetzt wurden. Während in DU145 weniger miR-24 als in den Prostatafibroblasten nachgewiesen werden konnte, wurde die ZNF217-mRNA verglichen mit PNF-08 stärker in DU145 exprimiert.

Wie man deutlich erkennen kann, war die Expression von miR-24 in der Prostatakarzinomzelllinie DU145 im Vergleich zu den Prostatafibroblasten reduziert. Da die Expression der miR-24 in LNCaP nicht detektiert werden konnte, war die Gegenüberstellung im Bezug zu PNF-08 graphisch nicht möglich. Im Gegensatz dazu war die mRNA von ZNF217 stärker in DU145 und LNCaP Zellen exprimiert als in den PNF-08 Zellen. Diese Ergebnisse zeigen somit eine inverse Korrelation der Expression von ZNF217 und miR-24 in Prostatakarzinomzellen und sind ein weiterer Indiz für eine Regulation von ZNF217 durch miR-24.

#### **6.6.6.4. miR-24 reguliert die endogene Proteinmenge von ZNF217 in 293T Zellen**

Im folgenden Experiment sollte ein Einfluss der miRNA auf die Proteinmenge von ZNF217 analysiert werden, nachdem ein Effekt von miR-24 auf ZNF217 auf mRNA-Ebene gezeigt werden konnte. Hierbei wurden 293T-Zellen mit miR-24 bzw. einem Kontrollplasmid transient transfiziert und nach 48 h Sample-Buffer-Extrakte hergestellt. 30 µg Gesamtprotein wurden anschließend in einem 7,5%igen SDS-Gel aufgetrennt. Der Proteinnachweis erfolgte in einem Western Blot mit spezifischen

Antikörpern gegen ZNF217 bzw.  $\beta$ -Aktin als Ladekontrolle. Die Quantifizierung der Signale erfolgte mit Hilfe des Programms ImageQuant, wobei das Verhältnis von ZNF217 zu  $\beta$ -Aktin in kontrolltransfizierten Zellen gleich eins gesetzt wurde.



**Abbildung 58: Regulierung der Proteinmenge von ZNF217 durch miR-24 in 293T Zellen**

48 h nach Transfektion von 8  $\mu$ g Kontrollvektor oder miRNA-Expressionsplasmid in 293T Zellen erfolgte die Extraktion der Gesamtproteine. 30  $\mu$ g Extrakt wurden in einem 7,5%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und ZNF217 bzw. die Ladekontrolle  $\beta$ -Aktin mit Hilfe spezifischer Antikörper im Western Blot nachgewiesen. Die Transfektion von miR-24 bewirkte eine Reduktion der Proteinmenge von ZNF217 um etwa 90 %. Zur Quantifizierung wurde das Verhältnis zwischen ZNF217 und  $\beta$ -Aktin kontrolltransfizierter Zellen gleich eins gesetzt.

In Abbildung 58 ist ein von drei repräsentativen Western Blots dargestellt, indem die Transfektion von miR-24 die Expression des ~110 kDa großen ZNF217-Proteins um 90 % reduzierte.

Insgesamt kann man aufgrund der Ergebnisse aus Luciferase-Assays, der quantitativen Real-Time PCR und der Western Blots folgern, dass ZNF217 durch Binden der miR-24 an seine 3'UTR posttranskriptionell reguliert wird und somit als Ziel dieser miRNA bestätigt werden konnte.

## 7. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die miRNA-Expression in Prostatatumoren zu analysieren und im folgenden ein miRNA-Expressionsprofil zu erstellen. Hierzu erfolgte zunächst die Herstellung von cDNA-Banken aus Prostatatumor- und Normalgewebe, welche anschließend mittels der 454-Methode sequenziert und semimanuell analysiert wurden. Beim Vergleich der miRNA-Expressionsprofile von Tumor- und Normalgewebe ergaben sich deutliche Unterschiede, die in einer größeren Gewebekohorte anhand ausgewählter miRNAs mittels Northern Blots bestätigt werden konnten. Die im Prostatakarzinom deregulierten miRNAs lieferten hierbei Anhaltspunkte für die Einflussnahme einzelner miRNAs auf die Tumorentstehung und die Schaffung für die Tumorprogression günstiger Bedingungen. Bei der Untersuchung möglicher Zielgene für die fehlregulierten miRNAs konnten insgesamt drei Targets identifiziert werden. MYO6 konnte als Ziel-mRNA für die in Prostatakarzinomen reprimierten miR-143 und miR-145 bestätigt werden, wobei die MYO6-Überexpression über unterschiedliche Mechanismen zu Progression dieser Tumorentität beiträgt. Mit SEC23A erfolgte die Identifizierung eines Targets für miR-200c und miR-375. Beide miRNAs waren im Vergleich zum Normalgewebe induziert wobei miR-375 bis dato nicht in Zusammenhang mit Krebserkrankungen gebracht wurde. Außerdem konnte das Onkogen ZNF217 als Zielgen für miR-24, die in den Tumoren im Vergleich zum Kontrollgewebe reduziert war, identifiziert werden.

### 7.1. Auswahl der Gewebe für die Herstellung der cDNA-Banken

Die zur Sequenzierung eingesetzten Gewebe wurden von Herrn Prof. Dr. Grobholz, Institut für Pathologie der Universitätskliniken des Saarlandes in Homburg, ausgewählt und zur Verfügung gestellt. Von den insgesamt zehn Tumorgeweben zeigten acht die Klassifikation T2c, was den Befall beider Seitenlappen der Prostata beschreibt. Die beiden restlichen Tumore hatten sich über die Prostatakapsel ausgebreitet und befielen die Samenblase (T3b) bzw. Nachbarstrukturen (T4). Außerdem wiesen neun der zehn Tumore einen Gleason-Score von 7, ein Tumor einen Wert von 6 auf. Diese Charakteristika der Tumorgewebe zeigen, dass es sich um weniger aggressive Tumore handelte, welche eine günstige Prognose zeigten und nicht metastasierend waren (Gleason, 1966). Die zehn Tumorgewebe waren somit medizinisch gesehen ähnlich charakterisiert, so dass bereits zu Beginn

Schwankungen der miRNA-Expression zwischen den Geweben zumindest eingegrenzt werden konnten. Als Vergleichsgewebe dienten zehn Prostataproben, welche bei einer radikalen Zystektomie (Blasenentfernung) gewonnen wurden. Hierbei erfolgte nach der Entnahme des Gewebes die Untersuchung der Prostata, so dass eine Abwesenheit von Prostatatumorzellen verifiziert werden konnte. Obwohl die ausgewählten Gewebeproben nahezu gleiche Charakteristika aufwiesen, wurden die zehn Tumor- und Normalgewebe jeweils in zwei Pools aufgeteilt, um bei späterem Vergleich individuelle Expressionsschwankungen aufzudecken.

Die Gesamtanzahl der verwendeten Gewebe war ausreichend um eine statistische Beurteilung der analysierten Daten zu ermöglichen, jedoch wurde die Validierung der Sequenzierungsergebnisse in einer größeren Kohorte von Patientenmaterial durchgeführt.

## **7.2. Analyse der cDNA-Banken**

### **7.2.1. Verteilung nicht-kodierender RNAs in den untersuchten Geweben**

Im Anschluss an die Auswertung der cDNA-Banken wurde die prozentuale Verteilung nicht-kodierender RNAs in den einzelnen Banken bestimmt und miteinander verglichen. Die anfänglich hohe Anzahl nicht zuzuordnender Sequenzen resultierte aus falschen „A“s innerhalb der Sequenzen, welche ein Artefakt der Sequenzierungsmethode darstellten. Die anschließende semi-manuelle Untersuchung dieser Sequenzen verminderte die Zahl falsch-negativer Ergebnisse.

In den Banken konnten somit zwischen 78 % und 89 % der analysierten Sequenzen zellulären miRNAs zugeordnet werden. Die Gesamtzahl der erhaltenen Sequenzen schwankte nur sehr gering und lag bei 21764 bzw. 20205 für die Normalgewebe-Banken und 25582 sowie 20337 in den cDNA-Banken aus Tumormaterial. Die ähnlichen Zahlenwerte können ein Hinweis auf eine gute RNA-Qualität der Gewebepreparationen sein, da eine RNA-Degradation sich in der Sequenzanzahl widerspiegeln kann. Die nur geringen Schwankungen könnten auf die unterschiedliche Effizienz der cDNA-Synthese zurückzuführen sein, wie in Abbildung 15B zu sehen ist. Auch die Schwankungen der einzelnen ncRNAs, wie rRNA und tRNA, waren im Vergleich der einzelnen Banken sehr gering, wobei die Größenordnung ihrer Expressionswerte denen aus anderen Veröffentlichungen entsprach (Kuchenbauer et al., 2008; Neilson et al., 2007; Zhu et al., 2009).

## **7.2.2. Differentielle Expression zellulärer miRNAs in den untersuchten Geweben**

### **7.2.2.1. Expressionsunterschiede innerhalb der Normalgewebekbanken**

Um individuumsabhängige Expressionsschwankungen der miRNAs im gesunden Prostatagewebe zu analysieren, wurden die Expressionsmuster beider Normalgewebe-Banken miteinander verglichen. Hierbei lag das Hauptaugenmerk auf den 20 am stärksten exprimierten miRNAs. Diese Gegenüberstellung der cDNA-Banken hat gezeigt, dass die Kontrollgewebe qualitativ ein sehr homogenes Expressionsmuster besessen haben und somit ein ideales Vergleichsgewebe repräsentieren. Insgesamt 18 miRNAs waren in beiden Banken übereinstimmend am stärksten exprimiert, wobei es nur geringe quantitative Unterschiede gab. Bis dato gibt es keine Untersuchungen, die eine Aussage über quantitative Differenzen der miRNA-Expression zwischen gesunden Prostatageweben mittels Sequenzierung getroffen haben. Jedoch gibt es Veröffentlichungen, die zeigen, dass in gesunden Hautzellen sowie Magengewebe ein stabiles Expressionsmuster vorzufinden ist, und gesundes Gewebe somit nur in geringem Maße individuellen Schwankungen ausgesetzt ist (Holst, 2010; Holst, Kaczowski, and Gniadecki, 2010; Ribeiro-dos-Santos et al., 2010). Der sogenannte „Normalzustand“ im Bezug auf die miRNA-Expression wurde vor wenigen Jahren in einem sogenannten Expressionsatlas veröffentlicht (Landgraf et al., 2007). Die vorliegenden Daten der Normalgewebekbanken sind mit diesen bereits veröffentlichten Expressionsdaten größtenteils konsistent. Lediglich miR-29c und miR-424, welche in der Rangliste der 20 am stärksten exprimierten miRNAs auftauchen (Tabelle 18), sind im veröffentlichten Expressionsatlas nicht vertreten.

Eine Erklärung hierfür könnte die verwendete Analyse-Methode in der erwähnten Veröffentlichung sein, da bei Landgraf und Kollegen insgesamt nur 416 unterschiedliche humane miRNAs identifiziert worden sind.

### **7.2.2.2. Unterschiede der miRNA-Expression zwischen den Prostatakarzinom-Banken**

Analog zum Normalgewebe folgte die Gegenüberstellung beider cDNA-Banken aus Prostatakarzinomgewebe, bei der wiederum die Expression der 20 am stärksten

exprimierten miRNAs analysiert wurde. Der Vergleich beider Tumorbanken wies größere Unterschiede im miRNA-Expressionsmuster auf als derjenige der Kontrollgewebe. Beispielweise war miR-16 doppelt so stark in Bank 1 vertreten wie in Bank 2 und miR-15, miR-29c, miR-25b und miR-126 in der ersten Tumorbank deutlich stärker exprimiert als in der zweiten, wo sie nicht in der Tabelle aufgeführt edoch in anderen Tumorentitäten als dereguliert bekannt sind (Cimmino et al., 2005; Li et al., ; Sengupta et al., 2008; Shi et al., 2010).

Diese Expressionsunterschiede zwischen den Tumor pools bestätigen die Tatsache, dass Prostatakarzinome zu den heterogensten Tumorarten zählen. Es wurde bereits in verschiedenen Veröffentlichungen berichtet, dass in einem einzigen Prostatatumor unterschiedliche Foci vorhanden sein können, die im Dysplasiegrad und genetischer Stabilität variieren (Schulz, Burchardt, and Cronauer, 2003). Die vielen unterschiedlich auftretenden chromosomalen Aberrationen in Prostatakarzinomen könnten eine Erklärung für die Expressionsunterschiede sein (Verma et al., 1999).

Ein weiterer Erklärungsansatz ist der Gehalt an Tumorgewebe in den verwendeten Proben. Die in der Sequenzierung eingesetzten Tumorgewebeprobe bestanden nicht ausschließlich aus Tumorzellen sondern besaßen einen Tumoranteil von >70 %. Da umliegendes Stromagewebe ein anderes miRNA-Muster besitzt als das entsprechende Tumorgewebe, könnten Schwankungen der Karzinommenge im jeweiligen Gewebepool die Ursache der beobachteten Expressionsabweichungen sein.

### **7.2.2.3. Expressionsunterschiede der miRNAs in Prostatakarzinomen im Vergleich zum Normalgewebe**

Um fehlregulierte miRNAs in den Prostatakarzinomen zu identifizieren, wurde das miRNA-Muster mit dem aus Normalgewebe verglichen. Hierzu wurden jeweils die vereinigten cDNA-Banken der entsprechenden Gewebepools gegenübergestellt, wobei unterschiedlich viele zelluläre miRNAs identifiziert werden konnten. Die Prostatakarzinome exprimierten mit 217 unterschiedlichen miRNAs weniger miRNAs als dies im Normalgewebe der Fall war. Dort konnten 240 unterschiedliche miRNAs identifiziert werden.

Dies steht im Einklang mit einer Veröffentlichung von Zhang und Kollegen, in der am Beispiel akuter lymphatischer Leukämie gezeigt werden konnte, dass das miRNA-Expressionsmuster von Tumoren im Vergleich zum Normalgewebe weniger komplex

ist (Zhang and Chen, 2009). Betrachtet man alle exprimierten miRNAs und setzt eine Veränderung der Expression von mindestens 1,5 voraus, ist außerdem die Mehrzahl der miRNAs im Tumor reprimiert, was ebenfalls in anderen Untersuchungen beobachtet wurde (Calin et al., 2004; Kumar et al., 2007; Lu et al., 2005). Eine allgemeine Repression der miRNA-Expression führt dabei zur verstärkten Tumorigenese (Kumar et al., 2007), wobei diese Repression viele unterschiedliche Ursachen haben kann.

Calin und Kollegen haben in einer Studie gezeigt, dass viele miRNA-Gene in fragilen Chromosomenregionen liegen, welche mit Tumoren assoziiert sind, und chromosomale Instabilität Veränderungen im miRNA-Expressionsmuster nach sich zieht (Calin et al., 2004). Dabei kann es sowohl zur Repression wie auch zur Induktion einzelner miRNAs kommen. Desweiteren können Veränderungen in der miRNA-Prozessierungsmaschinerie innerhalb der Tumore für die miRNA-Repression verantwortlich sein. Kumar und Kollegen zeigten, dass ein Verlust von Dicer in einer Reduktion von reifen miRNAs resultiert (Kumar et al., 2007). Weitere Möglichkeiten zur Stilllegung bzw. Repression von miRNAs sind epigenetische Modifikationen, die mit Transformation und somit der Krebsentstehung in Verbindung stehen (Jones and Baylin, 2007). Dazu gehören Histonmodifikationen und die Hypermethylierung von CpG-Inseln in genregulatorischen DNA-Abschnitten (Lim et al., 2010; Valeri et al., 2009). Diese epigenetischen Veränderungen resultieren in der Stilllegung der entsprechenden Gene, wie bereits mehrere Arbeitsgruppen im Falle von miRNAs beschrieben haben (Saito et al., 2009; Saito et al., 2006; Scott et al., 2006).

Schließlich gibt es noch Regulierungsmöglichkeiten, bei denen Proteine durch Interaktionen während der miRNA-Prozessierung auf diese einwirken. Mehrere Veröffentlichungen berichten, dass Tumorsuppressorproteine, wie p53, p63 und p73 mit der miRNA-Prozessierungsmaschinerie interagieren und die Reifung bestimmter miRNAs induzieren (Boominathan, 2010; Suzuki et al., 2009). Auf der anderen Seite konnten mehrere Forschungsgruppen zeigen, dass RNA-bindende Proteine an Vorläufertranskripte von miRNAs binden und somit die Drosha-vermittelte Prozessierung zu reifen miRNAs inhibieren (Newman, 2008; Viswanathan, 2008).

Betrachtet man die Expression der miRNAs innerhalb einzelner miRNA-Cluster, waren die Verhältnisse der Expressionswerte in den entsprechenden Clustern beider cDNA-Banken konsistent, jedoch die einzelnen miRNAs eines Clusters nie gleich stark exprimiert. Dies bestätigt die Arbeit von Yu und Kollegen, die diese Tatsache

für die meisten miRNA-Cluster in verschiedenen Leukämiezellen demonstrierte (Yu et al., 2006). Allerdings existiert auch eine neuere Veröffentlichung, die beschreibt, dass miRNAs eines Clusters unabhängig voneinander transkribiert und reguliert werden können (Song and Wang, 2008).

Beispielweise waren in den cDNA-Banken alle miRNAs des miR-200b Clusters vertreten, allerdings waren miR-200a und miR-429 sehr schwach exprimiert, wohingegen miR-200b 2-3 % aller miRNA-Sequenzen ausmachte. Ähnliches gilt für das miR-200c Cluster, wo miR-200c die am stärksten exprimierte miRNA in den Banken war und miR-141 kaum identifiziert werden konnte. Die gemeinsam in einem Cluster kodierten miR-143 und miR-145 waren ebenfalls in beiden cDNA-Banken im gleichen Verhältnis zueinander vorhanden. Dies galt auch für viele andere Cluster, die hier nicht einzeln aufgeführt werden können. Allerdings waren auch Cluster vorhanden, deren miRNAs durch ihrer hohe Sequenzähnlichkeit und eventuelle Sequenzierungsfehler nicht unterschieden und deshalb ihre Expressionszahlen nicht beurteilt werden konnten.

#### **7.2.2.4. Induzierte miRNAs im Prostatakarzinom**

Im Anschluss an die Eingrenzung der deregulierten miRNAs zur Erleichterung der Analyse ergab sich eine Gesamtzahl von 33 deregulierten miRNA, wobei 16 miRNAs als induziert und 17 als reprimiert identifiziert wurden (Tabelle 20). Aufgrund der großen Zahl an deregulierten miRNAs wird hier auf ausgewählte veränderte miRNAs eingegangen.

Die in Prostatakarzinomen am stärksten induzierte miRNA miR-375 ist in Magen- und Leberkarzinomen als reprimiert beschrieben, wobei sie im Magenkarzinom durch Regulation von JAK2 und PDK1 Zellproliferation induziert und das Zellüberleben reguliert (Ding et al., 2010; Ladeiro et al., 2008; Tsukamoto et al., 2010). Eine kürzlich erschienene Arbeit zeigt jedoch auch, dass miR-375 in Brusttumoren überexprimiert vorliegt und durch einen Feedback-Loop mit dem Östrogenrezeptor alpha die Zellproliferation verstärkt (de Souza Rocha Simonini et al., 2010). Da die Expression dieses Rezeptors während der Prostatakarzinom-Progression verstärkt wird, könnte die Überexpression von miR-375 das Voranschreiten dieser Tumorentität beschleunigen (McPherson, Ellem, and Risbridger, 2008; Prins and Korach, 2008).

Die induzierte miR-148a ist eine weitere miRNA, die neben vielen anderen Tumoren im Magenkarzinom reprimiert ist, allerdings in LNCaP Prostatakarzinomzellen das Zellwachstum begünstigt (Chen et al., 2010; Lujambio et al., 2008; Murata et al., 2010). Durch Repression von CAND1 verstärkt miR-148a die Zellproliferation und kann das Wachstum von Prostatakarzinomen steigern.

MiR-200c zählt zu den am stärksten exprimierten miRNAs im Prostatakarzinom und war im Vergleich zum Normalgewebe stark induziert. Dies widerspricht jedoch vielen Veröffentlichungen, die gezeigt haben, dass eine verminderte miR-200c-Expression den Transkriptionsfaktor ZEB1 induziert und somit E-Cadherin reprimiert (Hurteau et al., 2009; Park et al., 2008; Wang and Ruan, 2010). Die Inhibition von E-Cadherin führt zur epithelial-mesenchymalen Transition (EMT), die in Invasion von Tumorzellen und somit in Metastasierung resultiert (Burk et al., 2008; Gregory et al., 2008; Korpala and Kang, 2008). Yu und Kollegen haben kürzlich gezeigt, dass die Überexpression von miR-200c die Invasion von Krebszellen zwar inhibiert, jedoch die Zellproliferation verstärkt (Yu et al., 2010). Da die in dieser Arbeit verwendeten Prostatatumore weniger aggressiv waren und keine Metastasierung zeigten, könnte die erhöhte miR-200c-Expression zunächst die Proliferation der Tumorzellen begünstigen. Es ist denkbar, dass im fortgeschrittenen Tumorstadium eine Reduzierung der miR-200c-Menge, z.B. durch DNA-Methylierung des kodierenden Gens, stattfindet, wie dies in vielen Brusttumoren der Fall ist (Neves et al., 2010) und folglich die EMT als späteres Ereignis eintritt.

Die zur miR-17-Familie gehörenden miR-106a und -b sowie miR-20a und miR-25 sind in vielen verschiedenen soliden Tumoren wie auch Lymphomen überexprimiert (Li et al., 2009b; Xiao et al., 2009) und werden als Protoonkogene deklariert. miR-106b und miR-25 inhibieren p21, BIM und p53 und begünstigen somit neoplastische Progression und Zellproliferation (Kan et al., 2009; Kumar et al., 2010), wohingegen miR-106a an der malignen Transformation von Zellen beteiligt ist (Jiang et al., 2010). miR-20a besitzt ebenfalls onkogenes Potential und wurde bereits im Zusammenhang mit der Entstehung von Prostatakrebs genannt (Pesta et al., 2010). Die vier angesprochenen miRNAs der miR-17-Familie zeigten im Prostatatumorgewebe im Vergleich zum Kontrollgewebe eine stärkere Expression und könnten durch oben erwähnte Induktion von Proliferation, Transformation und Invasion der Prostatazellen zu Tumorentstehung und -Wachstum beitragen. Die restlichen Mitglieder dieser Familie, wie miR-17 oder miR-92, waren in Prostatakarzinomen nur sehr schwach

exprimiert, besitzen jedoch abhängig vom Zellhintergrund unterschiedliche Funktionen (Xiang and Wu, 2009).

Ein Teil der let-7-Familie, wie let-7a, -7c und let-7f, waren in Prostatatumoren ebenfalls stärker exprimiert als im Normalgewebe. Die miRNAs dieser Familie sind jedoch als Tumorsuppressoren bekannt und die Expression dieser miRNAs ist in vielen Tumorarten reprimiert (Johnson et al., 2007; O'Day and Lal, 2010; Takamizawa et al., 2004; Zhang et al., 2007). Kuehbacher und Kollegen haben jedoch gezeigt, dass let-7f ebenfalls Tumorstadium begünstigen kann, indem die Angiogenese durch Hemmen entsprechender Inhibitoren induziert wird und diese miRNA zur Prostatakarzinom-Progression beitragen kann (Kuehbacher et al., 2007). Die Überexpression von let-7a steht im Widerspruch zur Arbeit von Dong und Kollegen, die eine inhibierende Wirkung dieser miRNA auf Zellproliferation in Prostatakrebszellen gezeigt haben (Dong et al., 2010). Um die stärkere Expression dieser miRNA in den untersuchten Tumoren zu erklären und zusätzliche mögliche Funktionen von let-7a aufzudecken, müssten weitere Zielgene dieser miRNA identifiziert werden.

Eine weitere induzierte miRNA, welche in einer großen Zahl von Tumoren als überexprimiert und Onkogen beschrieben wird, ist miR-21 (Asangani et al., 2008; Chan, Krichevsky, and Kosik, 2005; Folini et al., 2010; Selcuklu, Donoghue, and Spillane, 2009; Visone and Croce, 2009). Die vorliegende Überexpression dieser miRNA deckt sich mit einer Veröffentlichung von Li und Kollegen, die gezeigt hat, dass miR-21 in Prostatakrebszellen induziert ist und durch Inhibierung von MARCKS antiapoptotisch wirkt (Li et al., 2009a). Desweiteren verstärkt miR-21 das Wachstum des Prostatakarzinoms, wie Ribas und Kollegen zeigen konnten, und ist somit ein wichtiger Ausgangspunkt bei der Tumorigenese und –Progression des Prostatakarzinoms (Ribas et al., 2009).

#### **7.2.2.5. Reprimierte miRNAs der Prostatatumore im Vergleich zum Normalgewebe**

Zu den am stärksten reprimierten miRNAs gehörten die in einem Cluster kodierten miR-143 und miR-145. Die in Prostatakarzinomen jeweils um 75 % reprimierten miRNAs konnten in vielen anderen Tumorentitäten als Tumorsuppressoren identifiziert werden und zeigten eine verminderte Expression in beispielweise Magen-, Darm-, und Brusttumoren (Akao et al., 2007; Iorio et al., 2005; Michael et al., 2003).

Durch Expressionsinhibierung dieser miRNAs kommt es zum verstärkten Zellwachstum sowie zur Invasion und Metastasierung von Tumoren (Sachdeva and Mo, 2010). Die Herunterregulierung dieser miRNAs in den hier untersuchten Geweben, welche sich mit den Arbeiten von Clapé bzw. Zaman und Kollegen deckt (Clape et al., 2009; Zaman et al., 2010), kann somit zur Tumorprogression von Prostatakarzinomen beitragen.

Die Funktionen der hier reprimierten miR-223 sind im Zusammenhang mit Krebs noch nicht eindeutig geklärt. Zwar konnte eine erhöhte Expression dieser miRNA in Blasenkrebs festgestellt werden, jedoch ist diese miRNA unter anderem in Leberkarzinomzellen reprimiert und führt zur Überexpression des Onkoproteins STMN1 (Gottardo et al., 2007; Stamatopoulos et al., 2009; Wong et al., 2008). Weiterhin ist miR-223 an der Regulierung der Erythropoese beteiligt, was auf eine Multifunktionalität dieser miRNA hinweist. Ihre Rolle im Prostatakarzinom ist daher momentan nicht offensichtlich (Felli et al., 2009). Ähnliches gilt für die herunterregulierte miR-29a, die eine unterschiedliche Expression in verschiedenen Tumorarten zeigt. Zhao und Kollegen beschrieben eine verminderte Expression in Mantellzellymphomen, die eine Induktion von CDK6 bewirkt und so zur Pathogenese dieser Tumorart beiträgt (Zhao et al., 2010), wohingegen Zanette und Kollegen eine Induktion dieser miRNA in chronischer und akuter lymphatischer Leukämie zeigten (Zanette et al., 2007). Wie die Repression dieser miRNA zur Progression bzw. Entstehung von Prostatakarzinomen beiträgt bleibt ungeklärt, jedoch sind die unterschiedlichen Aussagen eine weitere Bestätigung der Tatsache, dass miRNAs zellspezifisch als Onkogene oder Tumorsuppressoren fungieren können (Gebeshuber, Zatloukal, and Martinez, 2009; Visone and Croce, 2009).

Die Repression von miR-30e scheint angesichts der wenigen bekannten Funktionen vorteilhaft für Tumorzellen zu sein. Wu und Kollegen zeigten, dass miR-30e in verschiedenen Tumoren eine geringere Expression als im Normalgewebe zeigt und die daraus resultierende Überexpression des Targets UBC9 Zellwachstum begünstigt (Wu et al., 2009).

Ungeklärt bleibt die verminderte Expression von miR-27a und -b. Während bislang kein Zusammenhang zwischen Deregulation von miR-27b und Krebs besteht, ist miR-27a in vielen Veröffentlichungen als Onkogen beschrieben. Bislang wurde die Überexpression von miR-27a in Brust-, Bauchspeicheldrüsen- und Magenkrebs verifiziert, wobei die Induktion in Brusttumoren zur Inhibierung des

Transkriptionsfaktors FOXO1 und dadurch zur Aufhebung des Zellzyklusarrestes und verminderter Apoptose führt (Guttilla and White, 2009; Liu et al., 2009; Ma et al., 2010). Diese Tatsache würde bei reprimierter Expression von miR-27a einen Nachteil für das Wachstum des Prostatakarzinoms bedeuten, so dass die Funktion dieser miRNA in dieser Tumorentität nicht geklärt werden kann.

MiR-24 ist ein Tumorsuppressor, welcher unter anderem in Zervixkarzinomen reprimiert ist und in dem hier untersuchten Gewebe ebenfalls als herunterreguliert identifiziert wurde (Wang et al., 2008). Durch Aktivierung von E2F2 und MYC kann die Verringerung der miR-24 Menge zu verstärkter Zellproliferation führen und folglich einen Wachstumsvorteil gegenüber dem Normalgewebe bewirken (Lal et al., 2009; Mishra et al., 2009). Ähnliches gilt für miR-101, deren Repression in Prostatakarzinom von Varambally und Kollegen beschrieben wurde (Varambally et al., 2008a). Weiterhin findet sich eine reduzierte Expression dieser miRNA in Magen- und Lungentumoren, durch die EZH2 und FOS hochreguliert werden und daraus resultierend die Proliferation, Migration und Invasion innerhalb der Tumore begünstigt wird (Wang et al., 2010; Yang et al., 2010). Die in der vorliegenden Arbeit festgestellte Repression dieser miRNA im Prostatakarzinom deckt sich somit mit den eben erwähnten Arbeiten und stellt eine Möglichkeit für die Entstehung und Progression des Prostatakarzinoms dar.

Momentan sind nur wenige Funktionen der miR-424 bekannt, welche in dieser Arbeit als reprimiert identifiziert wurde. Pallasch und Kollegen beschrieben eine Repression dieser miRNA in chronisch lymphatischer Leukämie, die mit einer Überexpression des Onkogens PLAG1 einhergeht (Pallasch et al., 2009). Imig, Motsch und Mitarbeiter zeigten eine Regulation von c-MYB durch miR-424 (Imig et al., 2010). Eine weitere Arbeit berichtete ebenfalls von einer verminderten miR-424 Expression in Wucherungen der Gebärmutter Schleimhaut (Endometriosen) (Ohlsson Teague et al., 2009). Eine Herunterregulierung dieser miRNA scheint somit einen Vorteil für das Wachstum von Gewebe nach sich zu ziehen.

### **7.2.3. Vergleich dieses miRNA-Expressionsprofils mit anderen veröffentlichten miRNA-Profilen des Prostatakarzinoms**

Zu Beginn dieser Arbeit waren bereits mehrere Untersuchungen veröffentlicht, in denen ebenfalls ein miRNA-Expressionsprofil der Prostatakarzinome erstellt wurde. Es handelt sich dabei um fünf Analysen, welche mittels Microarrays durchgeführt

wurden (Ambs et al., 2008; Lu et al., 2005; Ozen et al., 2008; Porkka et al., 2007; Tong et al., 2009; Volinia et al., 2006) und eine Veröffentlichung, bei der mittels einer Hybridisierung in flüssiger Phase (mirMASA) das entsprechende Expressionsprofil erstellt wurde (Tong et al., 2009). Es ist auffällig, dass die unterschiedlichen Arbeiten in ihren Ergebnissen variierten und oft konträre Aussagen trafen.

	Volinia	Ambs	Porkka	Ozen	Tong
<i>let-7a</i>	↓		↓		↑
<i>let-7b</i>		↓	↓	↓	
<i>let-7c</i>			↓	↓	
<i>let-7d</i>	↑		↓	↓	
<i>let-7f</i>			↓	↓	
<i>let-7g</i>			↓	↓	
<i>let-7i</i>	↑	↑		↓	
<i>miR-100</i>			↓		↓
<i>miR-125a</i>		↑	↓	↓	
<i>miR-125b</i>			↓	↓	↓
<i>miR-128</i>	↓	↓			
<i>miR-141</i>					↑
<i>miR-143</i>			↓		↓
<i>miR-145</i>			↓		↓
<i>miR-146</i>	↑				
<i>miR-148</i>	↑		↓		
<i>miR-16</i>	↑		↓	↓	
<i>miR-181</i>	↑	↑			
<i>miR-184</i>	↑		↑		
<i>miR-195</i>	↑		↓		
<i>miR-196</i>	↑	↑			
<i>miR-198</i>	↑		↑		
<i>miR-199a</i>	↑		↓		
<i>miR-205</i>		↓	↓		↓
<i>miR-20a</i>	↑				↑
<i>miR-21</i>	↑				

**Abbildung 59: Ausschnitt einer Gegenüberstellung mehrerer veröffentlichter miRNA-Expressionsprofile (Coppola et al., 2010)**

Abgebildet ist ein Teil der von Coppola und Kollegen veröffentlichten Gegenüberstellung von miRNA-Expressionsprofilen des Prostatakarzinoms. Verglichen wurden die Daten folgender Arbeiten bezüglich der Expression fehlregulierter miRNAs: Volinia et al., 2005; Ambs et al., 2008; Porkka et al., 2007; Ozen et al., 2008; Tong et al., 2009.

Coppola und Kollegen verglichen die Ergebnisse einiger miRNA-Expressionsprofile und fassten diese in einem Review zusammen, wobei ein kleiner Ausschnitt der Gegenüberstellung in Abbildung 59 dargestellt ist (Coppola, De Maria, and Bonci, 2010). Zum Beispiel konnte die Repression der miR-143 nur von Porkka und Tong identifiziert werden, wohingegen die Arbeitsgruppen von Volinia, Ambs und Ozen keine Deregulation dieser miRNA beschrieben. Vor allem die Veröffentlichungen von Volinia bzw. Porkka und Kollegen zeigten Unterschiede zu dem in dieser Arbeit erstellten miRNA-Expressionsprofil. Keine der hier als induziert identifizierten miRNA wurde von Porkka und Kollegen in ihren Untersuchungen erwähnt. Die Untersuchung

von Tong und Kollegen ergab hingegen ein miRNA-Expressionsprofil, das dem hier erstellten Profil des Prostatakarzinoms am nächsten kommt (Tong et al., 2009). Die Ausnahmen waren miR-375, welche in der vorliegenden Arbeit eine 9-fache Induktion im Tumorgewebe zeigte, jedoch in der Veröffentlichung von Tong *et al* nicht beschrieben war, und die hier 1,6-fach überexprimierte let-7f, die laut Tong und Kollegen unverändert exprimiert wurde.

Die deutlichen Unterschiede der Ergebnisse, die beim Vergleich der bereits veröffentlichten Analysen untereinander wie auch mit dieser Arbeit deutlich wurden, könnten durch unterschiedliches Ausgangsmaterial begründet werden. Violinia und Kollegen verwendeten Gesamt-mRNA in ihrer Studie, wobei hier sowohl reife miRNAs als auch Vorläufertranskripte (pre-miRNAs) detektiert werden und so zu verfälschten Ergebnissen führen können. Desweiteren nutzten Ozen und Kollegen benignes Prostatagewebe als Kontrolle, was jedoch normalem Prostatagewebe von Nicht-Krebs-Individuen nicht entspricht. Es gab ebenso Unterschiede in der Anzahl der untersuchten Gewebeproben. So schwankte diese von 9 Tumorgeweben bei Porkka und Kollegen bis zu 40 in der Analyse von Tong, wobei Ausreißer, die aufgrund der Heterogenität der Prostatakarzinome oft auftreten, bei niedriger Probenzahl stärker ins Gewicht fallen können. Eine weitere Erklärung für die Unterschiede innerhalb der Ergebnisse im Vergleich zu dieser Arbeit könnte die Verwendung verschiedener Methoden sein. Mehrere Veröffentlichungen konnten bis dato zeigen, dass Microarray-Ergebnisse verschiedener Hersteller im Vergleich zueinander deutlichen Schwankungen unterliegen und oft schwer vergleichbar sind (Git et al., 2010; Pradervand et al., 2010). Ähnliche Differenzen ergeben sich beim Vergleich von Sequenzierungs-Ergebnissen mit Microarray-Daten, wobei hier die Abweichungen moderater sind (Willenbrock et al., 2009).

### **7.3. Identifizierung möglicher neuer miRNAs**

Bei der Analyse der nicht identifizierten Sequenzen konnten keine neuen miRNAs gefunden werden, wobei jedoch nicht ausgeschlossen werden kann, dass bislang nicht beschriebene miRNAs im Prostatagewebe exprimiert werden. Da der Abgleich der unbekannt Sequenzen mit der NCBI Sequenzbank manuell geschah, könnten einzelne Sequenzen fälschlicherweise anderen nicht-kodierenden RNAs zugeordnet worden sein. Wie bereits mehrere Arbeitsgruppen gezeigt haben, können miRNAs auch aus anderen ncRNAs prozessiert werden, so dass beim Sequenzabgleich eine

mögliche neue miRNA z.B. als snoRNA deklariert wird (Brameier et al., 2010; Ender et al., 2008; Saraiya and Wang, 2008). Eine weitere Erklärung kann die hohe Anzahl an falschen „A“s sein, die durch die Sequenzierungsmethode eingebracht wurde. Diese Sequenzveränderung könnte natürlich auch dazu führen, dass unbekannte Sequenzen durch zusätzliche „A“s falsch annotiert wurden und beim endgültigen Abgleich von unbekanntem Sequenzen somit nicht mehr zur Verfügung standen. Da der Großteil der humanen miRNAs bereits beschrieben ist, zeigen derzeit neuidentifizierte miRNAs eine sehr schwache Expression bzw. werden sie nur in bestimmten Geweben spezifisch exprimiert. Zhu und Kollegen haben bei der Identifizierung neuer humaner miRNAs gezeigt, dass diese innerhalb der untersuchten cDNA-Banken teilweise nur mit einer Gesamtzahl von 1-10 Sequenzen vertreten sind (Zhu et al., 2009). Bei der Herstellung der cDNA-Banken finden verschiedene Modifikationen der cDNA, wie die Ligation von Adaptersequenzen statt die enzymabhängig ist und nicht gleichermaßen effektiv für alle RNA-Moleküle stattfindet. Somit könnten einzelne miRNA-Sequenzen abhanden kommen, was bei der geringen Expression unbekannter miRNAs ausschlaggebend sein kann.

#### **7.4. Validierung der Expression zellulärer miRNAs mittel Northern Blots**

Das Ziel der Northern-Blot-Analyse war die Bestätigung der Sequenzierungsergebnisse mittels einer zweiten, unabhängigen Methode. Für diese Validierung wurde eine Kohorte von 26 Prostatatumoren und dem entsprechenden Normalgewebe analysiert, da das für die Sequenzierung verwendete Gewebe nicht mehr in großen Mengen zur Verfügung stand. Von den deregulierten miRNAs im Prostatakarzinom verglichen mit dem Kontrollgewebe wurden jeweils zwei induzierte und reprimierte miRNAs ausgewählt und ihre Expression in den einzelnen Gewebepaaren untersucht und verglichen (Abbildung 18-21). Hierbei konnte insgesamt die Deregulation der vier miRNAs in den meisten Gewebeproben bestätigt werden (Abbildung 22). Zunächst ist jedoch festzuhalten, dass die Expression jeder der vier miRNAs nicht in allen Gewebeproben analysiert werden konnte, da die Menge der Gewebe stark begrenzt war. Beispielweise konnte die Expression von miR-375 in lediglich 9 und diejenige von miR-143 nur in 11 Gewebepaaren untersucht werden. Dies erklärt auch die größeren Standardabweichungen bei der Quantifizierung der Bandensignale in Abbildung 22, welche mit steigender Probenzahl abnimmt. Die Tatsache, dass eine Deregulierung der untersuchten

miRNAs nicht in allen Patientenproben beobachtet werden konnte, kann mehrere Gründe haben. Zunächst können die unterschiedlichen pathologischen Charakteristika eine Erklärung für die Ergebnisse sein. Wie der Tabelle 4 zu entnehmen ist, schwankte der Gleason-Score der zur Validierung verwendeten Gewebe zwischen 5 und 9 und das Patientenalter zwischen 46 und 75 Jahren. Die zur Sequenzierung eingesetzten Gewebe zeigten hingegen fast ausschließlich einen Gleason-Score von 7 und stammten von Patienten im Alter zwischen 60 und 72 Jahren. Während der Tumorprogression können Veränderungen im miRNA-Expressionsmuster auftreten, da aggressivere Tumorstadien eine deutlich veränderte miRNA-Expression zeigen (Neves et al., 2010; Wang et al., 2009). Da hier einzelne Gewebeproben mit Ergebnissen aus einem Pool verglichen werden, kommen auch individuelle Schwankungen der miRNA-Expression deutlicher zum tragen, da, wie bereits erwähnt, Prostata Tumore sehr heterogen sind. Weiterhin könnten Unterschiede im Tumorgehalt der einzelnen Gewebepreparationen die Ergebnisse verfälschen. Neben den eigentlichen Tumorzellen sind ebenfalls Stromazellen und infiltrierende Lymphozyten in unterschiedlichen Verhältnissen enthalten, so dass eine unterschiedliche Zusammensetzung innerhalb einzelner Patientenproben für Ausreißer in der Validierung verantwortlich sein kann.

Vergleicht man die Ergebnisse der Northern Blots mit der Sequenzierung wird deutlich, dass der Grad der Deregulierung der untersuchten miRNAs im Northern Blot geringer war als dies die Sequenzierungsergebnisse gezeigt haben. Zurückzuführen ist dies auf die unterschiedlichen verwendeten Methoden. Wu und Kollegen haben bei der Untersuchung von miRNA-Expressionen gezeigt, dass die Ergebnisse aus Micro-Arrays, Klonierung und quantitativer Real-Time PCR sich nur zum Teil decken und die Ergebnisse somit deutlich variieren können (Wu et al., 2007).

Die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wullich aus Erlangen, welche in dieser Arbeit als Kooperationspartner fungierte, führte zusätzlich die Validierung der vier ausgewählten miRNAs mittels quantitativer RT-PCR durch. Hierbei erfolgte die Bestätigung der Ergebnisse in einer Kohorte von insgesamt 50 Patientenproben, wobei die Deregulierung von miR-143, miR-145 sowie miR-200c und miR-375 erneut bestätigt werden konnte.

## 7.5. Expression der deregulierten miRNAs in Zelllinien

Die Untersuchung der Expression differentiell regulierter miRNAs in Prostatazelllinien sollte einerseits die Deregulation, welche mittels Sequenzierung identifiziert wurde, in Zelllinien bestätigen und andererseits zeigen, ob die vorliegenden Karzinomzelllinien ein geeignetes *in vitro* System für spätere funktionelle Experimente darstellen. Hierzu wurden uns freundlicherweise die Prostatakarzinomzelllinien LNCaP, DU145 und DU145-MN1 sowie die PNF-08 Prostatafibroblastenlinie aus dem Institut für Urologie in Homburg zur Verfügung gestellt und konnten anschließend durch Northern Blots analysiert werden.

Die in Prostatakarzinomen im Vergleich zum Normalgewebe reprimierten miRNAs miR-143 und miR-145 zeigten auch in den Zelllinien ein ähnliches Expressionsprofil. Sowohl miR-143 wie auch miR-145 konnten in Prostatafibroblasten nachgewiesen werden, wo hingegen keine Expression dieser miRNAs in den Prostatakarzinomzellen detektierbar war (Abbildung 24). Auffällig war hier die vollständige Repression von miR-143 und miR-145 in den Tumorzelllinien, während es in den Tumoren jeweils nur zu einer Expressionsreduzierung beider miRNA kam. Ähnliches konnte auch im Falle der in den Prostata Tumoren induzierten miRNA-200c verzeichnet werden. In den drei Prostatakarzinomzelllinien ließ sich eine starke Expression der miRNA nachweisen, wohingegen keine Expression in Prostatafibroblasten detektiert wurde (Abbildung 23). Die ebenfalls in den Tumoren überexprimierte miR-375 zeigte hingegen andere Ergebnisse in den Zelllinien. In DU145 und DU145-MN1 Zellen konnte die laut Sequenzierung beobachtete Induktion im Vergleich zu Prostatafibroblasten in Northern Blots bestätigt werden, jedoch zeigte sie in LNCaP Zellen keine Expression. Die spätere Untersuchung der miRNA-Expression mittels Real-Time PCR ergab jedoch, dass miR-375 im Vergleich zur miR-200c geringfügig überexprimiert wird.

Ein Grund für die unterschiedlichen Expressionen innerhalb der Prostatazelllinien könnte die genetische Ausstattung der Zellen sein. Da Zelllinien über einen längeren Zeitraum passagiert werden, entsprechen sie oft nicht mehr zu 100 % den Ursprungstumoren. Veränderungen im Karyotyp durch chromosomale Aberrationen könnten den vollständigen Expressionsverlust von miR-143 und miR-145 in den Prostatakarzinomzelllinien sowie die geringe miR-375-Expression in LNCaP erklären.

Die Ergebnisse zeigten, dass die untersuchten Zelllinien ein relativ gutes Modellsystem für Prostatakarzinome darstellten und sie somit für funktionelle Studien bezüglich miRNA-Überexpression benutzt werden konnten.

### **7.6. Identifizierung von Zielgenen differentiell exprimierter miRNAs in Prostatakarzinomen**

Die Identifizierung von Zielgenen von miRNAs hat sich als ein schwieriges und zeitintensives Verfahren herausgestellt. Zwar ist es möglich, Ziel-mRNAs mit Hilfe von Algorithmen vorherzusagen, jedoch ergeben sich hier als Ergebnis zum Teil mehrere Hundert mögliche mRNAs für eine miRNA. Ein weiteres Problem ist die Tatsache, dass die Mehrzahl dieser Vorhersagen falsch-positiv ist. Um die große Zahl an möglichen Zielgenen einzugrenzen, erfolgte ein Abgleich der Targetlisten mit mRNA-Expressionsdaten, da dieses Vorgehen die Wahrscheinlichkeit einer richtigen Vorhersage erhöht, und bereits in einer Veröffentlichung beschrieben war (Barbato et al., 2009). In der mRNA-Expressionsbank Oncomine, welche im Internet frei verfügbar ist, existierten mehrere Expressionsstudien von Prostatakarzinomen wobei fünf Datenbanken zur Targetidentifizierung verwendet wurden (Dhanasekaran et al., 2001; Lapointe et al., 2007; Lapointe et al., 2004; Rhodes et al., 2007; Welsh et al., 2003; Yu et al., 2004).

Im Anschluss wurde der Einfluss der in Prostatakarzinomen im Vergleich zum Normalgewebe deregulierten miRNAs auf mRNAs, welche mit Hilfe des Datenabgleiches ausgesucht wurden, mittels Luciferase-Assays analysiert. Als induzierte mRNAs wurden BRD2, GOLPH2, JMJD2B, MYO6 sowie TOP1 und ZNF217 untersucht, während SEC23A eine reprimierte Ziel-mRNA darstellte.

Die BRD2-3'UTR zeigte trotz der Vorhersage einer Bindestelle für miR-143 keine Beeinflussung durch miR-143 (Abbildung 27). Laut TargetScan sollte die GOLPH2-3'UTR Bindestellen für miR-27a und miR-27b enthalten. Abbildung 29 zeigt jedoch, dass beide miRNAs die Luciferase-Aktivität des Reporterkonstrukts nicht reduzieren konnten. Auch JMJD2B konnte nicht als Zielgen für miR-27a und miR-27b sowie miR-29a verifiziert werden. Alle drei miRNAs waren nicht in der Lage, die 3'UTR von JMJD2B zu regulieren (Abbildung 31). Das gleiche galt für die 3'UTR von TOP1, in der Bindestellen für miR-23a und miR-24 vorhergesagt wurden. Sowohl miR-23a als auch miR-24 zeigten keinen reprimierenden Effekt auf das Reporterkonstrukt (Abbildung 33).

Die Untersuchungen haben gezeigt, dass trotz der Verknüpfung von mRNA-Expressionsdaten und miRNA-Zielvorhersagen, der Großteil der vorhergesagten Targets nicht validiert werden konnte und die nicht bestätigten Zielgene deregulierter miRNAs falsch-positive Vorhersagen waren. Es ist davon auszugehen, dass die ausgesuchten mRNAs tatsächlich im Prostatakarzinom fehlreguliert sind, da in den Expressionsstudien genügend große Patientenkohorten untersucht wurden und die in dieser Arbeit analysierten mRNAs in mindestens 3 der 5 Expressionsstudien dereguliert waren. Die differentielle Expression der Ziel-mRNAs kann nicht auf eine deregulierte miRNA-Expression zurückgeführt werden. So könnten beispielweise chromosomale Aberrationen wie auch Transaktivierung oder Repression des Promotors zur Deregulation der mRNAs führen.

#### **7.6.1. miR-143 und miR-145 regulieren posttranskriptionell die Expression von MYO6**

Die Voraussage mittels TargetScan ergab, dass eine Bindung der im Prostatakarzinom reprimierten miR-143 und miR-145 in der MYO6-3'UTR möglich ist. Die anschließenden Luciferase-Assays bestätigten diese Vorhersage, da beide miRNAs in der Lage waren, die Luciferase-Aktivität des Reporterkonstrukts um 26-32 % zu reduzieren. Durch Mutation der 3'UTR konnten zwei Bindestellen für miR-145 und eine Zielsequenz für miR-143 verifiziert werden. Die Analyse der Proteinexpression von MYO6 in Prostatazelllinien zeigte eine hohe Expression von MYO6 in DU145 und LNCaP Karzinomzelllinien sowie keine Expression in Prostatafibroblasten, welche invers mit der miRNA-Expression von miR-143 und miR-145 korrelierte. Dies war ein weiterer indirekter Hinweis für eine Regulierung der MYO6-Expression durch beide miRNAs. Die folgende Überexpression der miRNAs in LNCaP Zellen resultierte in einer verringerten Proteinexpression von MYO6. Hierbei reprimierte miR-145 die Proteinmenge um 50 %, wohingegen die Überexpression von miR-143 nur zu einer Reduzierung der MYO6-Menge um 20 % führte (Abbildung 39). Die Unterschiede der miRNAs in der Fähigkeit, die endogene MYO6-Expression zu beeinflussen, könnten durch die unterschiedlichen Transfektionseffizienzen der Expressionsplasmide begründet werden. Northern Blots, welche mit RNA aus zuvor transfizierten LNCaP Zellen durchgeführt wurden, haben gezeigt, dass die Überexpression von miR-143 im Vergleich zur miR-145 eine geringere Effizienz zeigte und somit schwächere Signale von miR-143 detektiert wurden. Die Ergebnisse

zeigten folglich, dass MYO6 ein Zielgen für miR-143 und miR-145 darstellt und durch diese posttranskriptionell reguliert wird.

Die Überexpression von MYO6 in Prostatakarzinomen, die bereits in mehreren Veröffentlichungen beschrieben wurde, kann durch verschiedene Mechanismen vorteilhaft für den Tumor sein (Dunn et al., 2006; Loikkanen et al., 2009; Su et al., 2001; Wei et al., 2008). MYO6 ist ein Motorprotein, welches in der Endocytose eine Rolle spielt, wobei es am Vesikeltransport entlang der Aktinfilamente beteiligt ist (Aschenbrenner, Lee, and Hasson, 2003; Buss et al., 2001). Jedoch zeigten Puri und Kollegen kürzlich in ihrer Untersuchung, dass eine Überexpression von MYO6 keinen Einfluss auf die Endocytose hat, jedoch die Sekretion bestimmter Proteine, wie PSA und VEGF, induziert wird (Puri et al., 2010). VEGF ist ein Wachstumsfaktor, der die Angiogenese fördert und durch so neugebildete Blutgefäße das Tumorstadium begünstigt. Desweiteren ist bekannt, dass MYO6 an der Zellmembran wichtige Aufgaben übernimmt. Es interagiert gleichzeitig mit E-Cadherin und den Aktinfilamenten und ermöglicht einerseits so die Bildung von Adhäsionsverbindungen (adherens junctions) zwischen einzelnen Zellen, die zur Gewebestabilisierung nötig sind (Breshears and Titus, 2007). Auf der anderen Seite ist MYO6 an der Migration von Zellen beteiligt, wobei diese Funktion auch ohne E-Cadherin erhalten bleibt (Birchmeier and Behrens, 1994; Buss, Luzio, and Kendrick-Jones, 2002). Dies bedeutet, dass MYO6 im frühen Stadium des Prostatakarzinoms das Tumorstadium durch Induktion der Angiogenese begünstigt und die Zellmigration erhöht. Im späteren Karzinomstadium führt der mehrmals beschriebene Verlust von E-Cadherin zur epithelial-mesenchymalen Transition, wobei Tumorzellen durch Verlust von Zell-Zell-Bindungen metastasieren können (Cao et al., 2008; Contreras et al., 2010; Herranz et al., 2008). Hier könnte das Fehlen von E-Cadherin die freie Menge an MYO6 erhöhen, MYO6 die Migration einzelner Zellen verstärken und so die Metastasierung vorantreiben.

Loikkanen und Kollegen konnten außerdem zeigen, dass MYO6 anscheinend mit dem Androgenrezeptor (AR) interagiert und als Koaktivator dient (Loikkanen et al., 2009). Es ist hinlänglich bekannt, dass der Androgenrezeptor in die Entstehung und Progression des Prostatakarzinoms involviert ist, da er als Transkriptionsfaktor vor allem für die Regulation der Proliferation und des Zellwachstums zuständig ist (Asatiani and Gelmann, 2005; Kung and Evans, 2009). Kung und Kollegen

vermuteten, dass die Überexpression von Kofaktoren eine mögliche Erklärung für deregulierte hormonunabhängige Aktivierung des AR wäre.

Zusammenfassend lässt sich deutlich erkennen, dass eine MYO6-Überexpression in Prostatakarzinomen, welche durch die reprimierten miR-143 und miR-145 verursacht werden kann, zur Entstehung, Progression und Invasion der Tumoren beiträgt und somit gravierende Folgen für das Prostatagewebe nach sich zieht.

### **7.6.2. SEC23A als Target von miR-200c und miR-375**

Laut Vorhersage konnten miR-200c und miR-375, welche beide in Prostatumoren hochreguliert waren, an die 3'UTR von SEC23A binden. Die Analyse des miRNA-Effektes auf die 3'UTR von SEC23A wurde zunächst mit Hilfe von Luciferase-Assays durchgeführt. Beide miRNAs waren in der Lage, die Luciferase-Aktivität des Reportergenkonstrukts signifikant zu reduzieren. MiR-200c führte zu einer Reduktion von 32 % während miR-375 eine Repression von 26 % hervorrief. Durch anschließende Mutagenese der vorhergesagten miRNA-Zielsequenzen in der 3'UTR konnte jeweils eine Bindungsstelle für miR-200c und miR-375 bestätigt werden. Die Expressionsanalyse von miR-200c, miR-375 und der SEC23A-mRNA, welche mittels quantitativer Real-Time PCR erfolgte, ergab eine inverse Korrelation der miRNAs zur SEC23A-mRNA in DU145 und LNCaP Prostatazelllinien, was einen Zusammenhang zwischen der Induktion beider miRNAs und der Expressionsinhibierung von SEC23A erhärtete. Ähnliche Ergebnisse brachte die Untersuchung der Proteinexpression von SEC23A, die eine reduzierte Proteinmenge in den Prostatakarzinomzelllinien im Vergleich zu Prostatafibroblasten zeigte. Die Überexpression von miR-200c in 293T Zellen reduzierte die Menge von SEC23A um 30-50 %, die ektopische Expression von miR-375 hingegen führte zu einer Abnahme der SEC23A Menge um 40-60 % (Abbildung 49). Die Reduktion der SEC23A Proteinexpression konnte ebenfalls in Prostatakarzinomzelllinien beobachtet werden. Die Überexpression beider miRNAs resultierte in LNCaP sowie in DU145 Zellen in einer Reduktion der SEC23A Proteinmenge um 40-50 %. Die verschiedenen Experimente zeigen deutlich, dass miR-200c und miR-375 in der Lage sind, SEC23A posttranskriptionell zu regulieren und SEC23A somit ein Zielgen dieser miRNAs darstellt.

Bislang ist bekannt, dass SEC23A, welches eine Komponente des COPII-Komplexes ist, während der Biogenese von Vesikeln am endoplasmatischen Retikulum (ER) eine Rolle spielt und für das „Sortieren“ von Cargo-Proteinen während der

Vesikelbildung zuständig ist (Aridor et al., 1998; Fromme, Orci, and Schekman, 2008; Paccaud et al., 1996; Townley et al., 2008). Eine Repression von SEC23A in Tumorzellen würde eine verminderte Vesikelbildung bedeuten und somit den Proteintransport vom ER zum Golgi-Apparat verringern. Diese Vermutung wird zusätzlich durch die Arbeit von Sharpe und Kollegen unterstützt, die eine Hemmung des mit SEC23A interagierenden SEC24 durch AKT-vermittelte Phosphorylierung beschrieben (Dudognon et al., 2004; Pagano et al., 1999; Sharpe, Luu, and Brown, 2010). AKT wird in aggressiven Prostatatumoren durch Verlust von PTEN überexprimiert und hemmt durch verstärkte SEC24-Phosphorylierung die Vesikelbildung (Majumder and Sellers, 2005). Es ist bekannt, dass Veränderungen im Golgi-Apparat nötig sind, um z.B. die Mitose und Zellmigration einzuleiten und ein Zusammenhang zwischen Golgi-Apparat-Aufbau und Karzinogenese vermutet wird (Liu, Vong, and Zheng, 2007; Sutterlin et al., 2002). Somit wäre es auch denkbar, dass die Veränderung im Vesikeltransport vom ER zum Golgi-Apparat Auswirkungen auf Zellentartungen hat. Desweiteren könnte die Repression des Proteintransports zum Golgi-Apparat die Funktionalität von Proteinen, welche im Golgi-Apparat modifiziert werden müssen, hemmen. Cho und Mitarbeiter konnten zeigen, dass MHC I Moleküle durch Interaktion mit dem Sec23/24 Komplex in COPII Vesikeln zum Golgi-Apparat transportiert werden (Cho et al., 2011). Eine verringerte SEC23A Expression im Prostatakarzinom könnte somit auch den MHC I Transport zur Zelloberfläche hemmen und so eine Immunreaktion durch cytotoxische T-Zellen, welche von entarteten Prostatazellen verursacht werden könnte, reprimieren. Diese Theorie wird durch eine neue Veröffentlichung von Seliger und Kollegen gestützt, die eine verringerte MHC I Expression in Prostatatumorgewebe sowie in Prostatakarzinomzelllinien beschrieben (Seliger et al., 2011). Zukünftige Experimente sollen zeigen, ob der Transport von MHC I Molekülen zur Zelloberfläche hin tatsächlich durch eine Veränderung der SEC23A Proteinmenge beeinflusst wird.

Weitere Untersuchungen unserer Kooperationspartner in Erlangen haben ergeben, dass DU145 und LNCaP Prostatakarzinomzellen nach SEC23A-Überexpression ein verringertes „wound healing“ zeigen und SEC23A so tumorsuppressive Eigenschaften besitzen könnte. Um eine genaue Aussage machen zu können, ob es sich hierbei um einen Einfluss auf die Zellmigration, -proliferation oder Apoptose der Zellen handelt, wurden weitere funktionelle Assays durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Analyse der Apoptose bei ektopischer

Expression von SEC23A. Im Idealfall würde die SEC23A-Überexpression Apoptose induzieren, und so das geringere „wound-healing“-Vermögen der transfizierten Zellen erklären. Die Ergebnisse zeigten jedoch, dass SEC23A keinen Einfluss auf die Apoptose von Prostatakarzinomzelllinien besitzt und die ektopische Expression von SEC23A die Aktivität von Caspase 3 und 7 nicht verändert. Daraus resultierend liegt die Ursache der beobachteten „wound-healing“-Ergebnisse wahrscheinlich in einer Beeinflussung der Zellproliferation oder –migration. Dies konnte im Gegenzug durch unsere Kooperationspartner bestätigt werden, da sie sowohl eine verringerte Proliferationsrate als auch geringere Zellmigration in Folge der SEC23A Überexpression zeigen konnten. Die Reduktion von SEC23A im Prostatakarzinom wäre folglich vorteilhaft für die Tumorprogression, da die Zellproliferation sowie die Zellmigration erhöht wären. Dies ist ein weiterer Hinweis für eine mögliche tumorsuppressive Funktion von SEC23A. Jedoch müsste dies in weiteren Experimenten bestätigt werden. Dazu sollten mögliche neue Interaktionspartner von SEC23A untersucht werden, welche eine neue Funktion im Kontext der Tumorigenese aufdecken könnten.

### **7.6.3. Regulation der ZNF217-Proteinexpression durch miR-24**

Mit Hilfe von TargetScan wurde eine Bindestelle für miR-24 in der ZNF217 vorhergesagt, welche in Reporterassays untersucht wurde. In diesen Luciferase-Assay ließ sich die Bindung dieser miRNA an die ZNF217-3'UTR nachweisen, da die Kotransfektion von miR-24 und Reportergenkonstrukt zu einer Senkung der Luciferase-Aktivität um 40 % führte. Durch anschließende Mutation der 3'UTR konnte die vorhergesagte Bindestelle für miR-24 bestätigt werden, was ein direkter Hinweis auf die Interaktion zwischen miR-24 und der ZNF217-mRNA war. Die Korrelation von miR-24 und ZNF217-mRNA, welche mit Hilfe der Real-Time PCR in verschiedenen Prostatazelllinien untersucht wurde, war ein weiterer Anhaltspunkt für die posttranskriptionelle Regulierung von ZNF217 durch miR-24. Die Untersuchung der Proteinexpression von ZNF217 in Prostatazelllinien ergab wiederum, dass die Proteinmenge in den Tumorzelllinien deutlich erhöht ist und invers mit der miRNA-Expression korreliert. Die Überexpression von miR-24 in 293T Zellen zeigte, dass die miRNA die endogene Proteinexpression von ZNF217 wie erwartet um ca. 90 % reduzieren kann. Die Analyse des miRNA-Effekts konnte in LNCaP und DU145

Zellen jedoch nicht durchgeführt werden, da die Transfektion der miR-24 sich lethal auf die obengenannten Zellen auswirkte.

Um einen endgültigen Nachweis zu erbringen, dass die Reduktion von miR-24 zur Induktion von ZNF217 in Prostatakarzinomen führt, müssten die Versuche in Prostatakarzinomzelllinien wiederholt werden. Insgesamt konnte jedoch gezeigt werden, dass miR-24 in der Lage ist, ZNF217 posttranskriptionell zu regulieren.

Das Onkogen ZNF217 ist an der Modifikation von Histonen beteiligt, indem es an spezifische DNA-Sequenzen bindet und dort histonmodifizierende Proteine, wie z.B. JARID1B, organisiert (Banck et al., 2009). Unter anderem inhibiert es den Tumorsuppressor CDKNB2, welcher an der Wachstumsregulation von Zellen beteiligt ist (Thillainadesan et al., 2008). Die Überexpression von ZNF217 sowie eine Beteiligung an der Tumorigenese wurde zunächst in Brusttumoren beschrieben, wo die Induktion von ZNF217 einer chromosomalen Amplifikation zu Grunde liegt (Collins et al., 1998; Shimada et al., 2005). Mittlerweile gibt es jedoch auch Veröffentlichungen, die eine Rolle von ZNF217 in anderen Tumoren, wie Darm- und Prostatakarzinomen, zeigten (Bar-Shira et al., 2002; Quinlan et al., 2007; Rooney et al., 2004; Yang et al., 2005). Die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wullich aus Erlangen konnte zusätzlich mittels quantitativer Real-Time PCR eine Induktion der ZNF217 mRNA in Prostata Tumoren verschiedener Patienten nachweisen, welche mit einer Repression der miR-24 in den entsprechenden Geweben korrelierte. Die so beschriebene und in Prostatazelllinien sowie in Tumorgewebe identifizierte Überexpression von ZNF217 könnte somit zur Tumorprogression beitragen. Ob die Induktion in Prostata Tumoren durch eine chromosomale Veränderung verursacht wird, müsste genauer untersucht werden. Jedoch könnte die Repression der miR-24 eine solch entstandene Hochregulierung zusätzlich verstärken bzw. in Tumoren ohne eine mögliche chromosomale Aberration für die Induktion von ZNF217 verantwortlich sein.

## 8. Literaturverzeichnis

Agirre, X., Vilas-Zornoza, A., Jimenez-Velasco, A., Martin-Subero, J. I., Cordeu, L., Garate, L., San Jose-Eneriz, E., Abizanda, G., Rodriguez-Otero, P., Fortes, P., Rifon, J., Bandres, E., Calasanz, M. J., Martin, V., Heiniger, A., Torres, A., Siebert, R., Roman-Gomez, J., and Prosper, F. (2009). Epigenetic silencing of the tumor suppressor microRNA Hsa-miR-124a regulates CDK6 expression and confers a poor prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res* **69**(10), 4443-53.

Akao, Y., Nakagawa, Y., Kitade, Y., Kinoshita, T., and Naoe, T. (2007). Downregulation of microRNAs-143 and -145 in B-cell malignancies. *Cancer Sci* **98**(12), 1914-20.

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., and Croce, C. M. (2008). Genomic profiling of microRNA and messenger RNA reveals deregulated microRNA expression in prostate cancer. *Cancer Res* **68**(15), 6162-70.

Aravin, A. A., Lagos-Quintana, M., Yalcin, A., Zavolan, M., Marks, D., Snyder, B., Gaasterland, T., Meyer, J., and Tuschl, T. (2003). The small RNA profile during *Drosophila melanogaster* development. *Dev Cell* **5**(2), 337-50.

Aridor, M., Weissman, J., Bannykh, S., Nuoffer, C., and Balch, W. E. (1998). Cargo selection by the COPII budding machinery during export from the ER. *J Cell Biol* **141**(1), 61-70.

Armitage, T. G., Cooper, E. H., Newling, D. W., Robinson, M. R., and Appleyard, I. (1988). The value of the measurement of serum prostate specific antigen in patients with benign prostatic hyperplasia and untreated prostate cancer. *Br J Urol* **62**(6), 584-9.

Asangani, I. A., Rasheed, S. A., Nikolova, D. A., Leupold, J. H., Colburn, N. H., Post, S., and Allgayer, H. (2008). MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene* **27**(15), 2128-36.

Asatiani, E., and Gelmann, E. P. (2005). Targeted therapies for prostate cancer. *Expert Opin Ther Targets* **9**(2), 283-98.

Aschenbrenner, L., Lee, T., and Hasson, T. (2003). Myo6 facilitates the translocation of endocytic vesicles from cell peripheries. *Mol Biol Cell* **14**(7), 2728-43.

Bagga, S., Bracht, J., Hunter, S., Massirer, K., Holtz, J., Eachus, R., and Pasquinelli, A. E. (2005). Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell* **122**(4), 553-63.

Banck, M. S., Li, S., Nishio, H., Wang, C., Beutler, A. S., and Walsh, M. J. (2009). The ZNF217 oncogene is a candidate organizer of repressive histone modifiers. *Epigenetics* **4**(2), 100-6.

- Bar-Shira, A., Pinthus, J. H., Rozovsky, U., Goldstein, M., Sellers, W. R., Yaron, Y., Eshhar, Z., and Orr-Urtreger, A. (2002). Multiple genes in human 20q13 chromosomal region are involved in an advanced prostate cancer xenograft. *Cancer Res* **62**(23), 6803-7.
- Barbato, C., Arisi, I., Frizzo, M. E., Brandi, R., Da Sacco, L., and Masotti, A. (2009). Computational challenges in miRNA target predictions: to be or not to be a true target? *J Biomed Biotechnol* **2009**, 803069.
- Baron, J. C., Peyret, C., Leroy, M., Teillac, P., Najean, Y., and Le Duc, A. (1988). Prostate-specific antigen in prostatic cancer. *Am J Clin Oncol* **11 Suppl 2**, S75-6.
- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**(2), 281-97.
- Bartel, D. P., and Chen, C. Z. (2004). Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNAs. *Nat Rev Genet* **5**(5), 396-400.
- Bex, A., Wullich, B., Endris, V., Otto, T., Rembrink, K., Stockle, M., and Rubben, H. (2001). Comparison of the malignant phenotype and genotype of the human androgen-independent cell line DU 145 and a subline derived from metastasis after orthotopic implantation in nude mice. *Cancer Genet Cytogenet* **124**(2), 98-104.
- Beyer, S., Kristensen, M. M., Jensen, K. S., Johansen, J. V., and Staller, P. (2008). The histone demethylases JMJD1A and JMJD2B are transcriptional targets of hypoxia-inducible factor HIF. *J Biol Chem* **283**(52), 36542-52.
- Bhattacharyya, S. N., Habermacher, R., Martine, U., Closs, E. I., and Filipowicz, W. (2006). Stress-induced reversal of microRNA repression and mRNA P-body localization in human cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **71**, 513-21.
- Birchmeier, W., and Behrens, J. (1994). Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochim Biophys Acta* **1198**(1), 11-26.
- Birnboim, H. C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**(6), 1513-23.
- Bolivar, F., Rodriguez, R. L., Greene, P. J., Betlach, M. C., Heyneker, H. L., Boyer, H. W., Crosa, J. H., and Falkow, S. (1977). Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* **2**(2), 95-113.
- Bookstein, R., Rio, P., Madreperla, S. A., Hong, F., Allred, C., Grizzle, W. E., and Lee, W. H. (1990). Promoter deletion and loss of retinoblastoma gene expression in human prostate carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(19), 7762-6.
- Boominathan, L. (2010). The tumor suppressors p53, p63, and p73 are regulators of microRNA processing complex. *PLoS One* **5**(5), e10615.
- Borchert, G. M., Lanier, W., and Davidson, B. L. (2006). RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol* **13**(12), 1097-101.

- Brameier, M., Herwig, A., Reinhardt, R., Walter, L., and Gruber, J. (2010). Human box C/D snoRNAs with miRNA like functions: expanding the range of regulatory RNAs. *Nucleic Acids Res.*
- Breshears, L. M., and Titus, M. A. (2007). Motor Proteins: tightening your belt with myosin VI. *Curr Biol* **17**(21), R915-7.
- Burk, U., Schubert, J., Wellner, U., Schmalhofer, O., Vincan, E., Spaderna, S., and Brabletz, T. (2008). A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells. *EMBO Rep* **9**(6), 582-9.
- Buss, F., Arden, S. D., Lindsay, M., Luzio, J. P., and Kendrick-Jones, J. (2001). Myosin VI isoform localized to clathrin-coated vesicles with a role in clathrin-mediated endocytosis. *Embo J* **20**(14), 3676-84.
- Buss, F., Luzio, J. P., and Kendrick-Jones, J. (2002). Myosin VI, an actin motor for membrane traffic and cell migration. *Traffic* **3**(12), 851-8.
- Cai, X., Hagedorn, C. H., and Cullen, B. R. (2004). Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *Rna* **10**(12), 1957-66.
- Cairns, P., Okami, K., Halachmi, S., Halachmi, N., Esteller, M., Herman, J. G., Jen, J., Isaacs, W. B., Bova, G. S., and Sidransky, D. (1997). Frequent inactivation of PTEN/MMAC1 in primary prostate cancer. *Cancer Res* **57**(22), 4997-5000.
- 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., and 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**(24), 15524-9.
- Calin, G. A., Sevignani, C., Dumitru, C. D., Hyslop, T., Noch, E., Yendamuri, S., Shimizu, M., Rattan, S., Bullrich, F., Negrini, M., and Croce, C. M. (2004). Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(9), 2999-3004.
- Cao, Q., Yu, J., Dhanasekaran, S. M., Kim, J. H., Mani, R. S., Tomlins, S. A., Mehra, R., Laxman, B., Cao, X., Yu, J., Kleer, C. G., Varambally, S., and Chinnaiyan, A. M. (2008). Repression of E-cadherin by the polycomb group protein EZH2 in cancer. *Oncogene* **27**(58), 7274-84.
- Carter, B. S., Beaty, T. H., Steinberg, G. D., Childs, B., and Walsh, P. C. (1992). Mendelian inheritance of familial prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(8), 3367-71.
- Carter, B. S., Steinberg, G. D., Beaty, T. H., Childs, B., and Walsh, P. C. (1991). Familial risk factors for prostate cancer. *Cancer Surv* **11**, 5-13.
- Carter, H. B., Piantadosi, S., and Isaacs, J. T. (1990). Clinical evidence for and implications of the multistep development of prostate cancer. *J Urol* **143**(4), 742-6.

- Chaconas, G., and van de Sande, J. H. (1980). 5'-32P labeling of RNA and DNA restriction fragments. *Methods Enzymol* **65**(1), 75-85.
- Chan, J. A., Krichevsky, A. M., and Kosik, K. S. (2005). MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res* **65**(14), 6029-33.
- Chen, C. Z., Li, L., Lodish, H. F., and Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* **303**(5654), 83-6.
- Chen, Y., Song, Y., Wang, Z., Yue, Z., Xu, H., Xing, C., and Liu, Z. (2010). Altered expression of MiR-148a and MiR-152 in gastrointestinal cancers and its clinical significance. *J Gastrointest Surg* **14**(7), 1170-9.
- Cheville, J. C., Lloyd, R. V., Sebo, T. J., Cheng, L., Erickson, L., Bostwick, D. G., Lohse, C. M., and Wollan, P. (1998). Expression of p27kip1 in prostatic adenocarcinoma. *Mod Pathol* **11**(4), 324-8.
- Chiosea, S., Jelezcova, E., Chandran, U., Acquafondata, M., McHale, T., Sobol, R. W., and Dhir, R. (2006). Up-regulation of dicer, a component of the MicroRNA machinery, in prostate adenocarcinoma. *Am J Pathol* **169**(5), 1812-20.
- Cho, S., Ryoo, J., Jun, Y., and Ahn, K. (2011). Receptor-mediated ER export of human MHC class I molecules is regulated by the C-terminal single amino acid. *Traffic* **12**(1), 42-55.
- Cimmino, A., Calin, G. A., Fabbri, M., Iorio, M. V., Ferracin, M., Shimizu, M., Wojcik, S. E., Aqeilan, R. I., Zupo, S., Dono, M., Rassenti, L., Alder, H., Volinia, S., Liu, C. G., Kipps, T. J., Negrini, M., and Croce, C. M. (2005). miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(39), 13944-9.
- Clape, C., Fritz, V., Henriquet, C., Apparailly, F., Fernandez, P. L., Iborra, F., Avances, C., Villalba, M., Culine, S., and Fajas, L. (2009). miR-143 interferes with ERK5 signaling, and abrogates prostate cancer progression in mice. *PLoS One* **4**(10), e7542.
- Collins, C., Rommens, J. M., Kowbel, D., Godfrey, T., Tanner, M., Hwang, S. I., Polikoff, D., Nonet, G., Cochran, J., Myambo, K., Jay, K. E., Froula, J., Cloutier, T., Kuo, W. L., Yaswen, P., Dairkee, S., Giovanola, J., Hutchinson, G. B., Isola, J., Kallioniemi, O. P., Palazzolo, M., Martin, C., Ericsson, C., Pinkel, D., Albertson, D., Li, W. B., and Gray, J. W. (1998). Positional cloning of ZNF217 and NABC1: genes amplified at 20q13.2 and overexpressed in breast carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(15), 8703-8.
- Contreras, H. R., Ledezma, R. A., Vergara, J., Cifuentes, F., Barra, C., Cabello, P., Gallegos, I., Morales, B., Huidobro, C., and Castellon, E. A. (2010). The expression of syndecan-1 and -2 is associated with Gleason score and epithelial-mesenchymal transition markers, E-cadherin and beta-catenin, in prostate cancer. *Urol Oncol* **28**(5), 534-40.
- Coppola, V., De Maria, R., and Bonci, D. (2010). MicroRNAs and prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* **17**(1), F1-17.

- Costinean, S., Zanesi, N., Pekarsky, Y., Tili, E., Volinia, S., Heerema, N., and Croce, C. M. (2006). Pre-B cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high-grade lymphoma in E(mu)-miR155 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(18), 7024-9.
- Crawford, E. D. (2003). Epidemiology of prostate cancer. *Urology* **62**(6 Suppl 1), 3-12.
- Cullen, B. R. (2006). Viruses and microRNAs. *Nat Genet* **38** Suppl, S25-30.
- Cybulski, C. (2007). Selected aspects of inherited susceptibility to prostate cancer and tumours of different site of origin. *Hered Cancer Clin Pract* **5**(3), 164-79.
- Davies, P., Eaton, C. L., France, T. D., and Phillips, M. E. (1988). Growth factor receptors and oncogene expression in prostate cells. *Am J Clin Oncol* **11** Suppl 2, S1-7.
- de Souza Rocha Simonini, P., Breiling, A., Gupta, N., Malekpour, M., Youns, M., Omranipour, R., Malekpour, F., Volinia, S., Croce, C. M., Najmabadi, H., Diederichs, S., Sahin, O., Mayer, D., Lyko, F., Hoheisel, J. D., and Riazalhosseini, Y. (2010). Epigenetically Dereglated microRNA-375 Is Involved in a Positive Feedback Loop with Estrogen Receptor {alpha} in Breast Cancer Cells. *Cancer Res*.
- Denis, G. V., and Green, M. R. (1996). A novel, mitogen-activated nuclear kinase is related to a Drosophila developmental regulator. *Genes Dev* **10**(3), 261-71.
- Denis, G. V., Vaziri, C., Guo, N., and Faller, D. V. (2000). RING3 kinase transactivates promoters of cell cycle regulatory genes through E2F. *Cell Growth Differ* **11**(8), 417-24.
- Dhanasekaran, S. M., Barrette, T. R., Ghosh, D., Shah, R., Varambally, S., Kurachi, K., Pienta, K. J., Rubin, M. A., and Chinnaiyan, A. M. (2001). Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. *Nature* **412**(6849), 822-6.
- Dimova, I., Raicheva, S., Dimitrov, R., Doganov, N., and Toncheva, D. (2009). Coexistence of copy number increases of c-Myc, ZNF217, CCND1, ErbB1 and ErbB2 in ovarian cancers. *Onkologie* **32**(7), 405-10.
- Ding, L., Xu, Y., Zhang, W., Deng, Y., Si, M., Du, Y., Yao, H., Liu, X., Ke, Y., Si, J., and Zhou, T. (2010). MiR-375 frequently downregulated in gastric cancer inhibits cell proliferation by targeting JAK2. *Cell Res* **20**(7), 784-93.
- Doench, J. G., and Sharp, P. A. (2004). Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev* **18**(5), 504-11.
- Dong, Q., Meng, P., Wang, T., Qin, W., Qin, W., Wang, F., Yuan, J., Chen, Z., Yang, A., and Wang, H. (2010). MicroRNA let-7a inhibits proliferation of human prostate cancer cells in vitro and in vivo by targeting E2F2 and CCND2. *PLoS One* **5**(4), e10147.
- Dudognon, P., Maeder-Garavaglia, C., Carpentier, J. L., and Paccaud, J. P. (2004). Regulation of a COPII component by cytosolic O-glycosylation during mitosis. *FEBS Lett* **561**(1-3), 44-50.

- Dugaiczyk, A., Boyer, H. W., and Goodman, H. M. (1975). Ligation of EcoRI endonuclease-generated DNA fragments into linear and circular structures. *J Mol Biol* **96**(1), 171-84.
- Dunn, T. A., Chen, S., Faith, D. A., Hicks, J. L., Platz, E. A., Chen, Y., Ewing, C. M., Sauvageot, J., Isaacs, W. B., De Marzo, A. M., and Luo, J. (2006). A novel role of myosin VI in human prostate cancer. *Am J Pathol* **169**(5), 1843-54.
- Effert, P. J., Neubauer, A., Walther, P. J., and Liu, E. T. (1992). Alterations of the P53 gene are associated with the progression of a human prostate carcinoma. *J Urol* **147**(3 Pt 2), 789-93.
- Eis, P. S., Tam, W., Sun, L., Chadburn, A., Li, Z., Gomez, M. F., Lund, E., and Dahlberg, J. E. (2005). Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(10), 3627-32.
- Elbashir, S. M., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* **15**(2), 188-200.
- Ender, C., Krek, A., Friedlander, M. R., Beitzinger, M., Weinmann, L., Chen, W., Pfeffer, S., Rajewsky, N., and Meister, G. (2008). A human snoRNA with microRNA-like functions. *Mol Cell* **32**(4), 519-28.
- Engels, B. M., and Hutvagner, G. (2006). Principles and effects of microRNA-mediated post-transcriptional gene regulation. *Oncogene* **25**(46), 6163-9.
- Fabian, M. R., Sonenberg, N., and Filipowicz, W. (2010). Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu Rev Biochem* **79**, 351-79.
- Felli, N., Pedini, F., Romania, P., Biffoni, M., Morsilli, O., Castelli, G., Santoro, S., Chicarella, S., Sorrentino, A., Peschle, C., and Marziali, G. (2009). MicroRNA 223-dependent expression of LMO2 regulates normal erythropoiesis. *Haematologica* **94**(4), 479-86.
- Filipowicz, W., Bhattacharyya, S. N., and Sonenberg, N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* **9**(2), 102-14.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., and Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**(6669), 806-11.
- Folini, M., Gandellini, P., Longoni, N., Profumo, V., Callari, M., Pennati, M., Colecchia, M., Supino, R., Veneroni, S., Salvioni, R., Valdagni, R., Daidone, M. G., and Zaffaroni, N. (2010). miR-21: an oncomir on strike in prostate cancer. *Mol Cancer* **9**, 12.
- Fornara, P., Sturm, W., Fabricius, P. G., and Schmiedt, E. (1987). [Clinical relevance of radioimmunologic determination of prostate specific antigen in prostate cancer]. *Urologe A* **26**(3), 158-61.
- Fromme, J. C., Orci, L., and Schekman, R. (2008). Coordination of COPII vesicle trafficking by Sec23. *Trends Cell Biol* **18**(7), 330-6.

- Gebeshuber, C. A., Zatloukal, K., and Martinez, J. (2009). miR-29a suppresses tristetruprolin, which is a regulator of epithelial polarity and metastasis. *EMBO Rep* **10**(4), 400-5.
- Git, A., Dvinge, H., Salmon-Divon, M., Osborne, M., Kutter, C., Hadfield, J., Bertone, P., and Caldas, C. (2010). Systematic comparison of microarray profiling, real-time PCR, and next-generation sequencing technologies for measuring differential microRNA expression. *Rna* **16**(5), 991-1006.
- Gleason, D. F. (1966). Classification of prostatic carcinomas. *Cancer Chemother Rep* **50**(3), 125-8.
- Gleason, D. F. (1992). Histologic grading of prostate cancer: a perspective. *Hum Pathol* **23**(3), 273-9.
- Goswami, A., Qiu, S., Dexheimer, T. S., Ranganathan, P., Burikhanov, R., Pommier, Y., and Rangnekar, V. M. (2008). Par-4 binds to topoisomerase 1 and attenuates its DNA relaxation activity. *Cancer Res* **68**(15), 6190-8.
- Gottardo, F., Liu, C. G., Ferracin, M., Calin, G. A., Fassan, M., Bassi, P., Sevignani, C., Byrne, D., Negrini, M., Pagano, F., Gomella, L. G., Croce, C. M., and Baffa, R. (2007). Micro-RNA profiling in kidney and bladder cancers. *Urol Oncol* **25**(5), 387-92.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., and Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* **36**(1), 59-74.
- Greenlee, R. T., Murray, T., Bolden, S., and Wingo, P. A. (2000). Cancer statistics, 2000. *CA Cancer J Clin* **50**(1), 7-33.
- Gregory, P. A., Bracken, C. P., Bert, A. G., and Goodall, G. J. (2008). MicroRNAs as regulators of epithelial-mesenchymal transition. *Cell Cycle* **7**(20), 3112-8.
- Gregory, R. I., Yan, K. P., Amuthan, G., Chendrimada, T., Doratotaj, B., Cooch, N., and Shiekhattar, R. (2004). The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* **432**(7014), 235-40.
- Grishok, A., Pasquinelli, A. E., Conte, D., Li, N., Parrish, S., Ha, I., Baillie, D. L., Fire, A., Ruvkun, G., and Mello, C. C. (2001). Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell* **106**(1), 23-34.
- Guttilla, I. K., and White, B. A. (2009). Coordinate regulation of FOXO1 by miR-27a, miR-96, and miR-182 in breast cancer cells. *J Biol Chem* **284**(35), 23204-16.
- Hamilton, A. J., and Baulcombe, D. C. (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* **286**(5441), 950-2.
- Han, J., Lee, Y., Yeom, K. H., Kim, Y. K., Jin, H., and Kim, V. N. (2004). The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev* **18**(24), 3016-27.
- Hayward, S. W., Rosen, M. A., and Cunha, G. R. (1997). Stromal-epithelial interactions in the normal and neoplastic prostate. *Br J Urol* **79** Suppl 2, 18-26.

- He, L., Thomson, J. M., Hemann, M. T., Hernando-Monge, E., Mu, D., Goodson, S., Powers, S., Cordon-Cardo, C., Lowe, S. W., Hannon, G. J., and Hammond, S. M. (2005). A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* **435**(7043), 828-33.
- Hermanek, P., and Sobin, L. H. (1988). Urology and the TNM classification. *Lancet* **2**(8626-8627), 1495.
- Herranz, N., Pasini, D., Diaz, V. M., Franci, C., Gutierrez, A., Dave, N., Escriva, M., Hernandez-Munoz, I., Di Croce, L., Helin, K., Garcia de Herreros, A., and Peiro, S. (2008). Polycomb complex 2 is required for E-cadherin repression by the Snail1 transcription factor. *Mol Cell Biol* **28**(15), 4772-81.
- Holst (2010). Reproducible pattern of microRNA in normal human skin. *Exp Dermatol* **19**(8), e201-5.
- Holst, L. M., Kaczkowski, B., and Gniadecki, R. (2010). Reproducible pattern of microRNA in normal human skin. *Exp Dermatol* **19**(8), e201-5.
- Horoszewicz, J. S., Leong, S. S., Kawinski, E., Karr, J. P., Rosenthal, H., Chu, T. M., Mirand, E. A., and Murphy, G. P. (1983). LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res* **43**(4), 1809-18.
- Hurteau, G. J., Carlson, J. A., Roos, E., and Brock, G. J. (2009). Stable expression of miR-200c alone is sufficient to regulate TCF8 (ZEB1) and restore E-cadherin expression. *Cell Cycle* **8**(13), 2064-9.
- Hutvagner, G., and Zamore, P. D. (2002). A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* **297**(5589), 2056-60.
- Imig, J., Motsch, N., Zhu, J. Y., Barth, S., Okoniewski, M., Reineke, T., Tinguely, M., Faggioni, A., Trivedi, P., Meister, G., Renner, C., and Grasser, F. A. (2010). microRNA profiling in Epstein-Barr virus-associated B-cell lymphoma. *Nucleic Acids Res.*
- Inomata, M., Tagawa, H., Guo, Y. M., Kameoka, Y., Takahashi, N., and Sawada, K. (2009). MicroRNA-17-92 down-regulates expression of distinct targets in different B-cell lymphoma subtypes. *Blood* **113**(2), 396-402.
- 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., and Croce, C. M. (2005). MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res* **65**(16), 7065-70.
- Jackson, E. (1996). Racial differences in prostate cancer studied at a rural veterans affairs medical center. *AUA Today*, 13-19.
- Jemal, A., Siegel, R., Xu, J., and Ward, E. (2010). Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* **60**(5), 277-300.

- Jiang, Y., Wu, Y., Greenlee, A. R., Wu, J., Han, Z., Li, X., and Zhao, Y. (2010). miR-106a-mediated Malignant Transformation of Cells Induced by Anti-benzo[a]pyrene-trans-7,8-diol-9,10-epoxide. *Toxicol Sci.*
- Johnson, C. D., Esquela-Kerscher, A., Stefani, G., Byrom, M., Kelnar, K., Ovcharenko, D., Wilson, M., Wang, X., Shelton, J., Shingara, J., Chin, L., Brown, D., and Slack, F. J. (2007). The let-7 microRNA represses cell proliferation pathways in human cells. *Cancer Res* **67**(16), 7713-22.
- Jones, P. A., and Baylin, S. B. (2007). The epigenomics of cancer. *Cell* **128**(4), 683-92.
- Kan, T., Sato, F., Ito, T., Matsumura, N., David, S., Cheng, Y., Agarwal, R., Paun, B. C., Jin, Z., Oлару, A. V., Selaru, F. M., Hamilton, J. P., Yang, J., Abraham, J. M., Mori, Y., and Meltzer, S. J. (2009). The miR-106b-25 polycistron, activated by genomic amplification, functions as an oncogene by suppressing p21 and Bim. *Gastroenterology* **136**(5), 1689-700.
- Ketting, R. F., Fischer, S. E., Bernstein, E., Sijen, T., Hannon, G. J., and Plasterk, R. H. (2001). Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev* **15**(20), 2654-9.
- Khvorova, A., Reynolds, A., and Jayasena, S. D. (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* **115**(2), 209-16.
- Kibel, A. S., Suarez, B. K., Belani, J., Oh, J., Webster, R., Brophy-Ebbers, M., Guo, C., Catalona, W. J., Picus, J., and Goodfellow, P. J. (2003). CDKN1A and CDKN1B polymorphisms and risk of advanced prostate carcinoma. *Cancer Res* **63**(9), 2033-6.
- Knudsen, B. (2006). Migrating with myosin VI. *Am J Pathol* **169**(5), 1523-6.
- Korpai, M., and Kang, Y. (2008). The emerging role of miR-200 family of microRNAs in epithelial-mesenchymal transition and cancer metastasis. *RNA Biol* **5**(3), 115-9.
- Kramer, G., Steiner, G. E., Handisurya, A., Stix, U., Haitel, A., Knerer, B., Gessl, A., Lee, C., and Marberger, M. (2002). Increased expression of lymphocyte-derived cytokines in benign hyperplastic prostate tissue, identification of the producing cell types, and effect of differentially expressed cytokines on stromal cell proliferation. *Prostate* **52**(1), 43-58.
- Krig, S. R., Jin, V. X., Bieda, M. C., O'Geen, H., Yaswen, P., Green, R., and Farnham, P. J. (2007). Identification of genes directly regulated by the oncogene ZNF217 using chromatin immunoprecipitation (ChIP)-chip assays. *J Biol Chem* **282**(13), 9703-12.
- Kristiansen, G., Fritzsche, F. R., Wassermann, K., Jager, C., Tolls, A., Lein, M., Stephan, C., Jung, K., Pilarsky, C., Dietel, M., and Moch, H. (2008). GOLPH2 protein expression as a novel tissue biomarker for prostate cancer: implications for tissue-based diagnostics. *Br J Cancer* **99**(6), 939-48.

- Kuchenbauer, F., Morin, R. D., Argiropoulos, B., Petriv, O. I., Griffith, M., Heuser, M., Yung, E., Piper, J., Delaney, A., Prabhu, A. L., Zhao, Y., McDonald, H., Zeng, T., Hirst, M., Hansen, C. L., Marra, M. A., and Humphries, R. K. (2008). In-depth characterization of the microRNA transcriptome in a leukemia progression model. *Genome Res* **18**(11), 1787-97.
- Kuehbacher, A., Urbich, C., Zeiher, A. M., and Dimmeler, S. (2007). Role of Dicer and Drosha for endothelial microRNA expression and angiogenesis. *Circ Res* **101**(1), 59-68.
- Kumar, M., Lu, Z., Takwi, A. A., Chen, W., Callander, N. S., Ramos, K. S., Young, K. H., and Li, Y. (2010). Negative regulation of the tumor suppressor p53 gene by microRNAs. *Oncogene*.
- Kumar, M. S., Lu, J., Mercer, K. L., Golub, T. R., and Jacks, T. (2007). Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. *Nat Genet* **39**(5), 673-7.
- Kung, H. J., and Evans, C. P. (2009). Oncogenic activation of androgen receptor. *Urol Oncol* **27**(1), 48-52.
- Kushner, S. (1978). An improved method for transformation of Escherichia coli with coli-derived plasmids. In "Genetic Engineering" (B. Nicosia, Ed.). Elsevier, Amsterdam.
- Ladeiro, Y., Couchy, G., Balabaud, C., Bioulac-Sage, P., Pelletier, L., Rebouissou, S., and Zucman-Rossi, J. (2008). MicroRNA profiling in hepatocellular tumors is associated with clinical features and oncogene/tumor suppressor gene mutations. *Hepatology* **47**(6), 1955-63.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(5259), 680-5.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* **294**(5543), 853-8.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2002). Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol* **12**(9), 735-9.
- Lai, E. C., Tomancak, P., Williams, R. W., and Rubin, G. M. (2003). Computational identification of Drosophila microRNA genes. *Genome Biol* **4**(7), R42.
- Lal, A., Navarro, F., Maher, C. A., Maliszewski, L. E., Yan, N., O'Day, E., Chowdhury, D., Dykxhoorn, D. M., Tsai, P., Hofmann, O., Becker, K. G., Gorospe, M., Hide, W., and Lieberman, J. (2009). miR-24 Inhibits cell proliferation by targeting E2F2, MYC, and other cell-cycle genes via binding to "seedless" 3'UTR microRNA recognition elements. *Mol Cell* **35**(5), 610-25.

- Landgraf, P., Rusu, M., Sheridan, R., Sewer, A., Iovino, N., Aravin, A., Pfeffer, S., Rice, A., Kamphorst, A. O., Landthaler, M., Lin, C., Socci, N. D., Hermida, L., Fulci, V., Chiaretti, S., Foa, R., Schliwka, J., Fuchs, U., Novosel, A., Muller, R. U., Schermer, B., Bissels, U., Inman, J., Phan, Q., Chien, M., Weir, D. B., Choksi, R., De Vita, G., Frezzetti, D., Trompeter, H. I., Hornung, V., Teng, G., Hartmann, G., Palkovits, M., Di Lauro, R., Wernet, P., Macino, G., Rogler, C. E., Nagle, J. W., Ju, J., Papavasiliou, F. N., Benzing, T., Lichter, P., Tam, W., Brownstein, M. J., Bosio, A., Borkhardt, A., Russo, J. J., Sander, C., Zavolan, M., and Tuschl, T. (2007). A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell* **129**(7), 1401-14.
- Lang, M. R., Lapierre, L. A., Frotscher, M., Goldenring, J. R., and Knapik, E. W. (2006). Secretory COPII coat component Sec23a is essential for craniofacial chondrocyte maturation. *Nat Genet* **38**(10), 1198-203.
- Lapointe, J., Li, C., Giacomini, C. P., Salari, K., Huang, S., Wang, P., Ferrari, M., Hernandez-Boussard, T., Brooks, J. D., and Pollack, J. R. (2007). Genomic profiling reveals alternative genetic pathways of prostate tumorigenesis. *Cancer Res* **67**(18), 8504-10.
- Lapointe, J., Li, C., Higgins, J. P., van de Rijn, M., Bair, E., Montgomery, K., Ferrari, M., Egevad, L., Rayford, W., Bergerheim, U., Ekman, P., DeMarzo, A. M., Tibshirani, R., Botstein, D., Brown, P. O., Brooks, J. D., and Pollack, J. R. (2004). Gene expression profiling identifies clinically relevant subtypes of prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(3), 811-6.
- Lau, N. C., Lim, L. P., Weinstein, E. G., and Bartel, D. P. (2001). An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* **294**(5543), 858-62.
- Lederberg, E. M., and Cohen, S. N. (1974). Transformation of *Salmonella typhimurium* by plasmid deoxyribonucleic acid. *J Bacteriol* **119**(3), 1072-4.
- Lee, R. C., and Ambros, V. (2001). An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* **294**(5543), 862-4.
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., and Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* **75**(5), 843-54.
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Radmark, O., Kim, S., and Kim, V. N. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* **425**(6956), 415-9.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K. H., Lee, S., Baek, S. H., and Kim, V. N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *Embo J* **23**(20), 4051-60.
- Lewis, B. P., Burge, C. B., and Bartel, D. P. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* **120**(1), 15-20.

- Li, T., Li, D., Sha, J., Sun, P., and Huang, Y. (2009a). MicroRNA-21 directly targets MARCKS and promotes apoptosis resistance and invasion in prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* **383**(3), 280-5.
- Li, X. M., Wang, A. M., Zhang, J., and Yi, H. Down-regulation of miR-126 expression in colorectal cancer and its clinical significance. *Med Oncol*.
- Li, Y., Tan, W., Neo, T. W., Aung, M. O., Wasser, S., Lim, S. G., and Tan, T. M. (2009b). Role of the miR-106b-25 microRNA cluster in hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* **100**(7), 1234-42.
- Lim, L. P., Glasner, M. E., Yekta, S., Burge, C. B., and Bartel, D. P. (2003). Vertebrate microRNA genes. *Science* **299**(5612), 1540.
- Lim, S., Metzger, E., Schule, R., Kirfel, J., and Buettner, R. (2010). Epigenetic regulation of cancer growth by histone demethylases. *Int J Cancer* **127**(9), 1991-8.
- Liu, J., Valencia-Sanchez, M. A., Hannon, G. J., and Parker, R. (2005). MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat Cell Biol* **7**(7), 719-23.
- Liu, T., Tang, H., Lang, Y., Liu, M., and Li, X. (2009). MicroRNA-27a functions as an oncogene in gastric adenocarcinoma by targeting prohibitin. *Cancer Lett* **273**(2), 233-42.
- Liu, Z., Vong, Q. P., and Zheng, Y. (2007). CLASPIing microtubules at the trans-Golgi network. *Dev Cell* **12**(6), 839-40.
- Loikkanen, I., Toljamo, K., Hirvikoski, P., Vaisanen, T., Paavonen, T. K., and Vaarala, M. H. (2009). Myosin VI is a modulator of androgen-dependent gene expression. *Oncol Rep* **22**(5), 991-5.
- Lu, J., Getz, G., Miska, E. A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., Sweet-Cordero, A., Ebert, B. L., Mak, R. H., Ferrando, A. A., Downing, J. R., Jacks, T., Horvitz, H. R., and Golub, T. R. (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* **435**(7043), 834-8.
- Lujambio, A., Calin, G. A., Villanueva, A., Ropero, S., Sanchez-Cespedes, M., Blanco, D., Montuenga, L. M., Rossi, S., Nicoloso, M. S., Faller, W. J., Gallagher, W. M., Eccles, S. A., Croce, C. M., and Esteller, M. (2008). A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(36), 13556-61.
- Lund, E., Guttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J. E., and Kutay, U. (2004). Nuclear export of microRNA precursors. *Science* **303**(5654), 95-8.
- Lytle, J. R., Yario, T. A., and Steitz, J. A. (2007). Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(23), 9667-72.
- Ma, Y., Yu, S., Zhao, W., Lu, Z., and Chen, J. (2010). miR-27a regulates the growth, colony formation and migration of pancreatic cancer cells by targeting Sprouty2. *Cancer Lett*.

- Majumder, P. K., and Sellers, W. R. (2005). Akt-regulated pathways in prostate cancer. *Oncogene* **24**(50), 7465-74.
- Maniatis, T., Sambrook J. and Fritsch E.F. (1989). "Molecular Cloning, a laboratory manual ", 2nd ed. Laboratory Press 1-3, Cold Spring Harbor.
- McDonnell, T. J., Troncoso, P., Brisbay, S. M., Logothetis, C., Chung, L. W., Hsieh, J. T., Tu, S. M., and Campbell, M. L. (1992). Expression of the protooncogene bcl-2 in the prostate and its association with emergence of androgen-independent prostate cancer. *Cancer Res* **52**(24), 6940-4.
- McNeal, J. E., Villers, A. A., Redwine, E. A., Freiha, F. S., and Stamey, T. A. (1990). Histologic differentiation, cancer volume, and pelvic lymph node metastasis in adenocarcinoma of the prostate. *Cancer* **66**(6), 1225-33.
- McPherson, S. J., Ellem, S. J., and Risbridger, G. P. (2008). Estrogen-regulated development and differentiation of the prostate. *Differentiation* **76**(6), 660-70.
- Mehra, R., Tomlins, S. A., Shen, R., Nadeem, O., Wang, L., Wei, J. T., Pienta, K. J., Ghosh, D., Rubin, M. A., Chinnaiyan, A. M., and Shah, R. B. (2007). Comprehensive assessment of TMPRSS2 and ETS family gene aberrations in clinically localized prostate cancer. *Mod Pathol* **20**(5), 538-44.
- Mellon, K., Thompson, S., Charlton, R. G., Marsh, C., Robinson, M., Lane, D. P., Harris, A. L., Horne, C. H., and Neal, D. E. (1992). p53, c-erbB-2 and the epidermal growth factor receptor in the benign and malignant prostate. *J Urol* **147**(2), 496-9.
- Michael, M. Z., SM, O. C., van Holst Pellekaan, N. G., Young, G. P., and James, R. J. (2003). Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res* **1**(12), 882-91.
- Mickey, D. D., Stone, K. R., Wunderli, H., Mickey, G. H., Vollmer, R. T., and Paulson, D. F. (1977). Heterotransplantation of a human prostatic adenocarcinoma cell line in nude mice. *Cancer Res* **37**(11), 4049-58.
- Miller, J. (2007). "Praxis der Urologie." Georg Thieme Verlag.
- Mishra, P. J., Song, B., Mishra, P. J., Wang, Y., Humeniuk, R., Banerjee, D., Merlino, G., Ju, J., and Bertino, J. R. (2009). MiR-24 tumor suppressor activity is regulated independent of p53 and through a target site polymorphism. *PLoS One* **4**(12), e8445.
- Murata, T., Takayama, K., Katayama, S., Urano, T., Horie-Inoue, K., Ikeda, K., Takahashi, S., Kawazu, C., Hasegawa, A., Ouchi, Y., Homma, Y., Hayashizaki, Y., and Inoue, S. (2010). miR-148a is an androgen-responsive microRNA that promotes LNCaP prostate cell growth by repressing its target CAND1 expression. *Prostate Cancer Prostatic Dis.*
- Napoli, C., Lemieux, C., and Jorgensen, R. (1990). Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell* **2**(4), 279-289.

- Neilson, J. R., Zheng, G. X., Burge, C. B., and Sharp, P. A. (2007). Dynamic regulation of miRNA expression in ordered stages of cellular development. *Genes Dev* **21**(5), 578-89.
- Neves, R., Scheel, C., Weinhold, S., Honisch, E., Iwaniuk, K. M., Trompeter, H. I., Niederacher, D., Wernet, P., Santourlidis, S., and Uhrberg, M. (2010). Role of DNA methylation in miR-200c/141 cluster silencing in invasive breast cancer cells. *BMC Res Notes* **3**, 219.
- Newman, M. A. (2008). Lin-28 interaction with the Let-7 precursor loop mediates regulated microRNA processing. *Rna* **14**(8), 1539-49.
- Newman, M. A., and Hammond, S. M. (2010). Emerging paradigms of regulated microRNA processing. *Genes Dev* **24**(11), 1086-92.
- Nigro, K. G., and MacLennan, G. T. (2005). Rhabdomyosarcoma of the bladder and prostate. *J Urol* **173**(4), 1365.
- O'Day, E., and Lal, A. (2010). MicroRNAs and their target gene networks in breast cancer. *Breast Cancer Res* **12**(2), 201.
- Ohlsson Teague, E. M., Van der Hoek, K. H., Van der Hoek, M. B., Perry, N., Wagaarachchi, P., Robertson, S. A., Print, C. G., and Hull, L. M. (2009). MicroRNA-regulated pathways associated with endometriosis. *Mol Endocrinol* **23**(2), 265-75.
- Olsen, P. H., and Ambros, V. (1999). The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Dev Biol* **216**(2), 671-80.
- Orr-Urtreger, A., Bar-Shira, A., Bercovich, D., Matarasso, N., Rozovsky, U., Rosner, S., Soloviov, S., Rennert, G., Kadouri, L., Hubert, A., Rennert, H., and Matzkin, H. (2006). RNASEL mutation screening and association study in Ashkenazi and non-Ashkenazi prostate cancer patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **15**(3), 474-9.
- Ozen, M., Creighton, C. J., Ozdemir, M., and Ittmann, M. (2008). Widespread deregulation of microRNA expression in human prostate cancer. *Oncogene* **27**(12), 1788-93.
- Paccaud, J. P., Reith, W., Carpentier, J. L., Ravazzola, M., Amherdt, M., Schekman, R., and Orci, L. (1996). Cloning and functional characterization of mammalian homologues of the COPII component Sec23. *Mol Biol Cell* **7**(10), 1535-46.
- Pagano, A., Letourneur, F., Garcia-Estefania, D., Carpentier, J. L., Orci, L., and Paccaud, J. P. (1999). Sec24 proteins and sorting at the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **274**(12), 7833-40.
- Pall, G. S., and Hamilton, A. J. (2008). Improved northern blot method for enhanced detection of small RNA. *Nat Protoc* **3**(6), 1077-84.

- Pallasch, C. P., Patz, M., Park, Y. J., Hagist, S., Eggle, D., Claus, R., Debey-Pascher, S., Schulz, A., Frenzel, L. P., Claasen, J., Kutsch, N., Krause, G., Mayr, C., Rosenwald, A., Plass, C., Schultze, J. L., Hallek, M., and Wendtner, C. M. (2009). miRNA deregulation by epigenetic silencing disrupts suppression of the oncogene PLAG1 in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **114**(15), 3255-64.
- Park, K., Tomlins, S. A., Mudaliar, K. M., Chiu, Y. L., Esgueva, R., Mehra, R., Suleman, K., Varambally, S., Brenner, J. C., MacDonald, T., Srivastava, A., Tewari, A. K., Sathyanarayana, U., Nagy, D., Pestano, G., Kunju, L. P., Demichelis, F., Chinnaiyan, A. M., and Rubin, M. A. (2010). Antibody-based detection of ERG rearrangement-positive prostate cancer. *Neoplasia* **12**(7), 590-8.
- Park, S. M., Gaur, A. B., Lengyel, E., and Peter, M. E. (2008). The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. *Genes Dev* **22**(7), 894-907.
- 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., and Ruvkun, G. (2000). Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature* **408**(6808), 86-9.
- Pesta, M., Klecka, J., Kulda, V., Topolcan, O., Hora, M., Eret, V., Ludvikova, M., Babjuk, M., Novak, K., Stolz, J., and Holubec, L. (2010). Importance of miR-20a expression in prostate cancer tissue. *Anticancer Res* **30**(9), 3579-83.
- Pfeffer, S., Zavolan, M., Grasser, F. A., Chien, M., Russo, J. J., Ju, J., John, B., Enright, A. J., Marks, D., Sander, C., and Tuschl, T. (2004). Identification of virus-encoded microRNAs. *Science* **304**(5671), 734-6.
- Porkka, K. P., Pfeiffer, M. J., Waltering, K. K., Vessella, R. L., Tammela, T. L., and Visakorpi, T. (2007). MicroRNA expression profiling in prostate cancer. *Cancer Res* **67**(13), 6130-5.
- Pradervand, S., Weber, J., Lemoine, F., Consales, F., Paillusson, A., Dupasquier, M., Thomas, J., Richter, H., Kaessmann, H., Beaudoin, E., Hagenbuchle, O., and Harshman, K. (2010). Concordance among digital gene expression, microarrays, and qPCR when measuring differential expression of microRNAs. *Biotechniques* **48**(3), 219-22.
- Prins, G. S., and Korach, K. S. (2008). The role of estrogens and estrogen receptors in normal prostate growth and disease. *Steroids* **73**(3), 233-44.
- Puri, C., Chibalina, M. V., Arden, S. D., Kruppa, A. J., Kendrick-Jones, J., and Buss, F. (2010). Overexpression of myosin VI in prostate cancer cells enhances PSA and VEGF secretion, but has no effect on endocytosis. *Oncogene* **29**(2), 188-200.
- Qin, W., Shi, Y., Zhao, B., Yao, C., Jin, L., Ma, J., and Jin, Y. (2010). miR-24 regulates apoptosis by targeting the open reading frame (ORF) region of FAF1 in cancer cells. *PLoS One* **5**(2), e9429.

- Quinlan, K. G., Verger, A., Yaswen, P., and Crossley, M. (2007). Amplification of zinc finger gene 217 (ZNF217) and cancer: when good fingers go bad. *Biochim Biophys Acta* **1775**(2), 333-40.
- Rajewsky, N. (2006). L(ou)sy miRNA targets? *Nat Struct Mol Biol* **13**(9), 754-5.
- Rebbeck, T. R., Walker, A. H., Zeigler-Johnson, C., Weisburg, S., Martin, A. M., Nathanson, K. L., Wein, A. J., and Malkowicz, S. B. (2000). Association of HPC2/ELAC2 genotypes and prostate cancer. *Am J Hum Genet* **67**(4), 1014-9.
- Reinhart, B. J., Slack, F. J., Basson, M., Pasquinelli, A. E., Bettinger, J. C., Rougvie, A. E., Horvitz, H. R., and Ruvkun, G. (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **403**(6772), 901-6.
- Rennert, H., Bercovich, D., Hubert, A., Abeliovich, D., Rozovsky, U., Bar-Shira, A., Soloviov, S., Schreiber, L., Matzkin, H., Rennert, G., Kadouri, L., Peretz, T., Yaron, Y., and Orr-Urtreger, A. (2002). A novel founder mutation in the RNASEL gene, 471delAAAG, is associated with prostate cancer in Ashkenazi Jews. *Am J Hum Genet* **71**(4), 981-4.
- Rhodes, D. R., Kalyana-Sundaram, S., Mahavisno, V., Varambally, R., Yu, J., Briggs, B. B., Barrette, T. R., Anstet, M. J., Kincead-Beal, C., Kulkarni, P., Varambally, S., Ghosh, D., and Chinnaiyan, A. M. (2007). Oncomine 3.0: genes, pathways, and networks in a collection of 18,000 cancer gene expression profiles. *Neoplasia* **9**(2), 166-80.
- Ribas, J., Ni, X., Haffner, M., Wentzel, E. A., Salmasi, A. H., Chowdhury, W. H., Kudrolli, T. A., Yegnasubramanian, S., Luo, J., Rodriguez, R., Mendell, J. T., and Lupold, S. E. (2009). miR-21: an androgen receptor-regulated microRNA that promotes hormone-dependent and hormone-independent prostate cancer growth. *Cancer Res* **69**(18), 7165-9.
- Ribeiro-dos-Santos, A., Khayat, A. S., Silva, A., Alencar, D. O., Lobato, J., Luz, L., Pinheiro, D. G., Varuzza, L., Assumpcao, M., Assumpcao, P., Santos, S., Zanette, D. L., Silva, W. A., Jr., Burbano, R., and Darnet, S. (2010). Ultra-deep sequencing reveals the microRNA expression pattern of the human stomach. *PLoS One* **5**(10), e13205.
- Rijnders, A. W., van der Korput, J. A., van Steenbrugge, G. J., Romijn, J. C., and Trapman, J. (1985). Expression of cellular oncogenes in human prostatic carcinoma cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* **132**(2), 548-54.
- Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J. L., and Bradley, A. (2004). Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res* **14**(10A), 1902-10.
- Rooney, P. H., Boonsong, A., McFadyen, M. C., McLeod, H. L., Cassidy, J., Curran, S., and Murray, G. I. (2004). The candidate oncogene ZNF217 is frequently amplified in colon cancer. *J Pathol* **204**(3), 282-8.
- Sachdeva, M., and Mo, Y. Y. (2010). miR-145-mediated suppression of cell growth, invasion and metastasis. *Am J Transl Res* **2**(2), 170-80.

- Saito, Y., Friedman, J. M., Chihara, Y., Egger, G., Chuang, J. C., and Liang, G. (2009). Epigenetic therapy upregulates the tumor suppressor microRNA-126 and its host gene EGFL7 in human cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* **379**(3), 726-31.
- Saito, Y., and Jones, P. A. (2006). Epigenetic activation of tumor suppressor microRNAs in human cancer cells. *Cell Cycle* **5**(19), 2220-2.
- Saito, Y., Liang, G., Egger, G., Friedman, J. M., Chuang, J. C., Coetzee, G. A., and Jones, P. A. (2006). Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer Cell* **9**(6), 435-43.
- Saraiya, A. A., and Wang, C. C. (2008). snoRNA, a novel precursor of microRNA in *Giardia lamblia*. *PLoS Pathog* **4**(11), e1000224.
- Scardino, P. T. (2000). The Gordon Wilson Lecture. Natural history and treatment of early stage prostate cancer. *Trans Am Clin Climatol Assoc* **111**, 201-41.
- Schiebler, T. H. (2005). "Anatomie: Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie." 9. Ausgabe Springer.
- Schulz, W. A., Burchardt, M., and Cronauer, M. V. (2003). Molecular biology of prostate cancer. *Mol Hum Reprod* **9**(8), 437-48.
- Schwarz, D. S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., and Zamore, P. D. (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* **115**(2), 199-208.
- Scott, G. K., Mattie, M. D., Berger, C. E., Benz, S. C., and Benz, C. C. (2006). Rapid alteration of microRNA levels by histone deacetylase inhibition. *Cancer Res* **66**(3), 1277-81.
- Segal, N. H., Cohen, R. J., Haffeejee, Z., and Savage, N. (1994). BCL-2 proto-oncogene expression in prostate cancer and its relationship to the prostatic neuroendocrine cell. *Arch Pathol Lab Med* **118**(6), 616-8.
- Selcuklu, S. D., Donoghue, M. T., and Spillane, C. (2009). miR-21 as a key regulator of oncogenic processes. *Biochem Soc Trans* **37**(Pt 4), 918-25.
- Seliger, B., Stoehr, R., Handke, D., Mueller, A., Ferrone, S., Wullich, B., Tannapfel, A., Hofstaedter, F., and Hartmann, A. (2011). Association of HLA class I antigen abnormalities with disease progression and early recurrence in prostate cancer. *Cancer Immunol Immunother* **59**(4), 529-40.
- Sen, C. K., Gordillo, G. M., Khanna, S., and Roy, S. (2009). Micromanaging vascular biology: tiny microRNAs play big band. *J Vasc Res* **46**(6), 527-40.
- Sengupta, S., den Boon, J. A., Chen, I. H., Newton, M. A., Stanhope, S. A., Cheng, Y. J., Chen, C. J., Hildesheim, A., Sugden, B., and Ahlquist, P. (2008). MicroRNA 29c is down-regulated in nasopharyngeal carcinomas, up-regulating mRNAs encoding extracellular matrix proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(15), 5874-8.

- Sgaramella, V., Van de Sande, J. H., and Khorana, H. G. (1970). Studies on polynucleotides. C. A novel joining reaction catalyzed by the T4-polynucleotide ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **67**(3), 1468-75.
- Sharpe, L. J., Luu, W., and Brown, A. J. (2010). Akt phosphorylates Sec24: New clues into the regulation of ER-to-Golgi trafficking. *Traffic*.
- Shein, H. M., and Enders, J. F. (1962). Transformation induced by simian virus 40 in human renal cell cultures. I. Morphology and growth characteristics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **48**, 1164-72.
- Shi, X. B., Xue, L., Ma, A. H., Tepper, C. G., Kung, H. J., and White, R. W. (2010). miR-125b promotes growth of prostate cancer xenograft tumor through targeting pro-apoptotic genes. *Prostate*.
- Shimada, M., Imura, J., Kozaki, T., Fujimori, T., Asakawa, S., Shimizu, N., and Kawaguchi, R. (2005). Detection of Her2/neu, c-MYC and ZNF217 gene amplification during breast cancer progression using fluorescence in situ hybridization. *Oncol Rep* **13**(4), 633-41.
- Song, G., and Wang, L. (2008). MiR-433 and miR-127 arise from independent overlapping primary transcripts encoded by the miR-433-127 locus. *PLoS One* **3**(10), e3574.
- Stamatopoulos, B., Meuleman, N., Haibe-Kains, B., Saussoy, P., Van Den Neste, E., Michaux, L., Heimann, P., Martiat, P., Bron, D., and Lagneaux, L. (2009). microRNA-29c and microRNA-223 down-regulation has in vivo significance in chronic lymphocytic leukemia and improves disease risk stratification. *Blood* **113**(21), 5237-45.
- Stark, A., Brennecke, J., Russell, R. B., and Cohen, S. M. (2003). Identification of Drosophila MicroRNA targets. *PLoS Biol* **1**(3), E60.
- Stone, K. R., Mickey, D. D., Wunderli, H., Mickey, G. H., and Paulson, D. F. (1978). Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). *Int J Cancer* **21**(3), 274-81.
- Studier, F. W., and Moffatt, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**(1), 113-30.
- Su, A. I., Welsh, J. B., Sapinoso, L. M., Kern, S. G., Dimitrov, P., Lapp, H., Schultz, P. G., Powell, S. M., Moskaluk, C. A., Frierson, H. F., Jr., and Hampton, G. M. (2001). Molecular classification of human carcinomas by use of gene expression signatures. *Cancer Res* **61**(20), 7388-93.
- Subramanian, S., and Steer, C. J. (2010). MicroRNAs as gatekeepers of apoptosis. *J Cell Physiol* **223**(2), 289-98.
- Sutterlin, C., Hsu, P., Mallabiabarrena, A., and Malhotra, V. (2002). Fragmentation and dispersal of the pericentriolar Golgi complex is required for entry into mitosis in mammalian cells. *Cell* **109**(3), 359-69.

- Suzuki, H. I., Yamagata, K., Sugimoto, K., Iwamoto, T., Kato, S., and Miyazono, K. (2009). Modulation of microRNA processing by p53. *Nature* **460**(7254), 529-33.
- Takagi, T., Iio, A., Nakagawa, Y., Naoe, T., Tanigawa, N., and Akao, Y. (2009). Decreased expression of microRNA-143 and -145 in human gastric cancers. *Oncology* **77**(1), 12-21.
- Takamizawa, J., Konishi, H., Yanagisawa, K., Tomida, S., Osada, H., Endoh, H., Harano, T., Yatabe, Y., Nagino, M., Nimura, Y., Mitsudomi, T., and Takahashi, T. (2004). Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res* **64**(11), 3753-6.
- Takayasu, H., and Otaguro, K. (1967). [TNM classification--cancer of the prostate]. *Gan No Rinsho* **13**(6), 382-3.
- Tay, Y., Zhang, J., Thomson, A. M., Lim, B., and Rigoutsos, I. (2008). MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. *Nature* **455**(7216), 1124-8.
- Thillainadesan, G., Isovich, M., Loney, E., Andrews, J., Tini, M., and Torchia, J. (2008). Genome analysis identifies the p15ink4b tumor suppressor as a direct target of the ZNF217/CoREST complex. *Mol Cell Biol* **28**(19), 6066-77.
- Thomson, J. M., Newman, M., Parker, J. S., Morin-Kensicki, E. M., Wright, T., and Hammond, S. M. (2006). Extensive post-transcriptional regulation of microRNAs and its implications for cancer. *Genes Dev* **20**(16), 2202-7.
- Timme, T. L., Truong, L. D., Slawin, K. M., Kadmon, D., Park, S. H., and Thompson, T. C. (1995). Mesenchymal-epithelial interactions and transforming growth factor-beta 1 expression during normal and abnormal prostatic growth. *Microsc Res Tech* **30**(4), 333-41.
- Ting, A. H., Suzuki, H., Cope, L., Schuebel, K. E., Lee, B. H., Toyota, M., Imai, K., Shinomura, Y., Tokino, T., and Baylin, S. B. (2008). A requirement for DICER to maintain full promoter CpG island hypermethylation in human cancer cells. *Cancer Res* **68**(8), 2570-5.
- Tomlins, S. A., Rhodes, D. R., Perner, S., Dhanasekaran, S. M., Mehra, R., Sun, X. W., Varambally, S., Cao, X., Tchinda, J., Kuefer, R., Lee, C., Montie, J. E., Shah, R. B., Pienta, K. J., Rubin, M. A., and Chinnaiyan, A. M. (2005). Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science* **310**(5748), 644-8.
- Tong, A. W., Fulgham, P., Jay, C., Chen, P., Khalil, I., Liu, S., Senzer, N., Eklund, A. C., Han, J., and Nemunaitis, J. (2009). MicroRNA profile analysis of human prostate cancers. *Cancer Gene Ther* **16**(3), 206-16.
- Townley, A. K., Feng, Y., Schmidt, K., Carter, D. A., Porter, R., Verkade, P., and Stephens, D. J. (2008). Efficient coupling of Sec23-Sec24 to Sec13-Sec31 drives COPII-dependent collagen secretion and is essential for normal craniofacial development. *J Cell Sci* **121**(Pt 18), 3025-34.

- Tsihlias, J., Kapusta, L. R., DeBoer, G., Morava-Protzner, I., Zbieranowski, I., Bhattacharya, N., Catzavelos, G. C., Klotz, L. H., and Slingerland, J. M. (1998). Loss of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is a novel prognostic factor in localized human prostate adenocarcinoma. *Cancer Res* **58**(3), 542-8.
- Tsukamoto, Y., Nakada, C., Noguchi, T., Tanigawa, M., Nguyen, L. T., Uchida, T., Hijiya, N., Matsuura, K., Fujioka, T., Seto, M., and Moriyama, M. (2010). MicroRNA-375 is downregulated in gastric carcinomas and regulates cell survival by targeting PDK1 and 14-3-3zeta. *Cancer Res* **70**(6), 2339-49.
- UICC (2002). "TNM Classification of Malignant Tumours." 6th ed. (W. C. Sobin LH, Ed.) Wiley-Liss.
- Valeri, N., Vannini, I., Fanini, F., Calore, F., Adair, B., and Fabbri, M. (2009). Epigenetics, miRNAs, and human cancer: a new chapter in human gene regulation. *Mamm Genome* **20**(9-10), 573-80.
- Vandoros, G. P., Manolidis, T., Karamouzis, M. V., Gkermepesi, M., Lambropoulou, M., Papatsoris, A. G., Zachos, I., and Konstantinopoulos, P. A. (2008). Leiomyosarcoma of the prostate: case report and review of 54 previously published cases. *Sarcoma* **2008**, 458709.
- Varambally, S., Cao, Q., Mani, R. S., Shankar, S., Wang, X., Ateeq, B., Laxman, B., Cao, X., Jing, X., Ramnarayanan, K., Brenner, J. C., Yu, J., Kim, J. H., Han, B., Tan, P., Kumar-Sinha, C., Lonigro, R. J., Palanisamy, N., Maher, C. A., and Chinnaiyan, A. M. (2008a). Genomic loss of microRNA-101 leads to overexpression of histone methyltransferase EZH2 in cancer. *Science* **322**(5908), 1695-9.
- Varambally, S., Laxman, B., Mehra, R., Cao, Q., Dhanasekaran, S. M., Tomlins, S. A., Granger, J., Vellaichamy, A., Sreekumar, A., Yu, J., Gu, W., Shen, R., Ghosh, D., Wright, L. M., Kladney, R. D., Kuefer, R., Rubin, M. A., Fimmel, C. J., and Chinnaiyan, A. M. (2008b). Golgi protein GOLM1 is a tissue and urine biomarker of prostate cancer. *Neoplasia* **10**(11), 1285-94.
- Vasudevan, S., Tong, Y., and Steitz, J. A. (2007). Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* **318**(5858), 1931-4.
- Verma, R. S., Manikal, M., Conte, R. A., and Godec, C. J. (1999). Chromosomal basis of adenocarcinoma of the prostate. *Cancer Invest* **17**(6), 441-7.
- Visone, R., and Croce, C. M. (2009). MiRNAs and cancer. *Am J Pathol* **174**(4), 1131-8.
- Viswanathan, S. R. (2008). Selective blockade of microRNA processing by Lin28. *Science* **320**(5872), 97-100.
- Volinia, S., Calin, G. A., Liu, C. G., Ambs, S., Cimmino, A., Petrocca, F., Visone, R., Iorio, M., Roldo, C., Ferracin, M., Prueitt, R. L., Yanaihara, N., Lanza, G., Scarpa, A., Vecchione, A., Negrini, M., Harris, C. C., and Croce, C. M. (2006). A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(7), 2257-61.

- Wang, H. J., Ruan, H. J., He, X. J., Ma, Y. Y., Jiang, X. T., Xia, Y. J., Ye, Z. Y., and Tao, H. Q. (2010). MicroRNA-101 is down-regulated in gastric cancer and involved in cell migration and invasion. *Eur J Cancer* **46**(12), 2295-303.
- Wang, J., and Ruan, K. (2010). miR-200c affects the mRNA expression of E-cadherin by regulating the mRNA level of TCF8 during post-natal epididymal development in juvenile rats. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **42**(9), 628-34.
- Wang, L., Tang, H., Thayanithy, V., Subramanian, S., Oberg, A. L., Cunningham, J. M., Cerhan, J. R., Steer, C. J., and Thibodeau, S. N. (2009). Gene networks and microRNAs implicated in aggressive prostate cancer. *Cancer Res* **69**(24), 9490-7.
- Wang, X., Tang, S., Le, S. Y., Lu, R., Rader, J. S., Meyers, C., and Zheng, Z. M. (2008). Aberrant expression of oncogenic and tumor-suppressive microRNAs in cervical cancer is required for cancer cell growth. *PLoS One* **3**(7), e2557.
- Wei, S., Dunn, T. A., Isaacs, W. B., De Marzo, A. M., and Luo, J. (2008). GOLPH2 and MYO6: putative prostate cancer markers localized to the Golgi apparatus. *Prostate* **68**(13), 1387-95.
- Welsh, J. B., Sapinoso, L. M., Kern, S. G., Brown, D. A., Liu, T., Bauskin, A. R., Ward, R. L., Hawkins, N. J., Quinn, D. I., Russell, P. J., Sutherland, R. L., Breit, S. N., Moskaluk, C. A., Frierson, H. F., Jr., and Hampton, G. M. (2003). Large-scale delineation of secreted protein biomarkers overexpressed in cancer tissue and serum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(6), 3410-5.
- Wiemer, E. A. (2007). The role of microRNAs in cancer: No small matter. *Eur J Cancer* **43**(10), 1529-44.
- Wienholds, E., and Plasterk, R. H. (2005). MicroRNA function in animal development. *FEBS Lett* **579**(26), 5911-22.
- Wightman, B., Ha, I., and Ruvkun, G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* **75**(5), 855-62.
- Willenbrock, H., Salomon, J., Sokilde, R., Barken, K. B., Hansen, T. N., Nielsen, F. C., Moller, S., and Litman, T. (2009). Quantitative miRNA expression analysis: comparing microarrays with next-generation sequencing. *Rna* **15**(11), 2028-34.
- Wong, Q. W., Lung, R. W., Law, P. T., Lai, P. B., Chan, K. Y., To, K. F., and Wong, N. (2008). MicroRNA-223 is commonly repressed in hepatocellular carcinoma and potentiates expression of Stathmin1. *Gastroenterology* **135**(1), 257-69.
- Wu, F., Zhu, S., Ding, Y., Beck, W. T., and Mo, Y. Y. (2009). MicroRNA-mediated regulation of Ubc9 expression in cancer cells. *Clin Cancer Res* **15**(5), 1550-7.
- Wu, H., Neilson, J. R., Kumar, P., Manocha, M., Shankar, P., Sharp, P. A., and Manjunath, N. (2007). miRNA profiling of naive, effector and memory CD8 T cells. *PLoS One* **2**(10), e1020.
- Xiang, J., and Wu, J. (2009). Feud or Friend? The Role of the miR-17-92 Cluster in Tumorigenesis. *Curr Genomics* **11**(2), 129-35.

- Xiao, B., Guo, J., Miao, Y., Jiang, Z., Huan, R., Zhang, Y., Li, D., and Zhong, J. (2009). Detection of miR-106a in gastric carcinoma and its clinical significance. *Clin Chim Acta* **400**(1-2), 97-102.
- Xiao, C., Srinivasan, L., Calado, D. P., Patterson, H. C., Zhang, B., Wang, J., Henderson, J. M., Kutok, J. L., and Rajewsky, K. (2008). Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with increased miR-17-92 expression in lymphocytes. *Nat Immunol* **9**(4), 405-14.
- Xu, J., Zheng, S. L., Komiya, A., Mychaleckyj, J. C., Isaacs, S. D., Hu, J. J., Sterling, D., Lange, E. M., Hawkins, G. A., Turner, A., Ewing, C. M., Faith, D. A., Johnson, J. R., Suzuki, H., Bujnovszky, P., Wiley, K. E., DeMarzo, A. M., Bova, G. S., Chang, B., Hall, M. C., McCullough, D. L., Partin, A. W., Kassabian, V. S., Carpten, J. D., Bailey-Wilson, J. E., Trent, J. M., Ohar, J., Bleecker, E. R., Walsh, P. C., Isaacs, W. B., and Meyers, D. A. (2002). Germline mutations and sequence variants of the macrophage scavenger receptor 1 gene are associated with prostate cancer risk. *Nat Genet* **32**(2), 321-5.
- Yang, J., Jubb, A. M., Pike, L., Buffa, F. M., Turley, H., Baban, D., Leek, R., Gatter, K. C., Ragoussis, J., and Harris, A. L. The histone demethylase JMJD2B is regulated by estrogen receptor alpha and hypoxia, and is a key mediator of estrogen induced growth. *Cancer Res* **70**(16), 6456-66.
- Yang, S. H., Seo, M. Y., Jeong, H. J., Jeung, H. C., Shin, J., Kim, S. C., Noh, S. H., Chung, H. C., and Rha, S. Y. (2005). Gene copy number change events at chromosome 20 and their association with recurrence in gastric cancer patients. *Clin Cancer Res* **11**(2 Pt 1), 612-20.
- Yang, Y., Li, X., Yang, Q., Wang, X., Zhou, Y., Jiang, T., Ma, Q., and Wang, Y. J. (2010). The role of microRNA in human lung squamous cell carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* **200**(2), 127-33.
- Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G., and Cullen, B. R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* **17**(24), 3011-6.
- Yu, J., Ohuchida, K., Mizumoto, K., Sato, N., Kayashima, T., Fujita, H., Nakata, K., and Tanaka, M. (2010). MicroRNA, hsa-miR-200c, is an independent prognostic factor in pancreatic cancer and its upregulation inhibits pancreatic cancer invasion but increases cell proliferation. *Mol Cancer* **9**, 169.
- Yu, J., Wang, F., Yang, G. H., Wang, F. L., Ma, Y. N., Du, Z. W., and Zhang, J. W. (2006). Human microRNA clusters: genomic organization and expression profile in leukemia cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* **349**(1), 59-68.
- Yu, Y. P., Landsittel, D., Jing, L., Nelson, J., Ren, B., Liu, L., McDonald, C., Thomas, R., Dhir, R., Finkelstein, S., Michalopoulos, G., Becich, M., and Luo, J. H. (2004). Gene expression alterations in prostate cancer predicting tumor aggression and preceding development of malignancy. *J Clin Oncol* **22**(14), 2790-9.

- Zaman, M. S., Chen, Y., Deng, G., Shahryari, V., Suh, S. O., Saini, S., Majid, S., Liu, J., Khatri, G., Tanaka, Y., and Dahiya, R. (2010). The functional significance of microRNA-145 in prostate cancer. *Br J Cancer* **103**(2), 256-64.
- Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A., and Bartel, D. P. (2000). RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* **101**(1), 25-33.
- Zanette, D. L., Rivadavia, F., Molfetta, G. A., Barbuzano, F. G., Proto-Siqueira, R., Silva-Jr, W. A., Falcao, R. P., and Zago, M. A. (2007). miRNA expression profiles in chronic lymphocytic and acute lymphocytic leukemia. *Braz J Med Biol Res* **40**(11), 1435-40.
- Zeng, Y., and Cullen, B. R. (2003). Sequence requirements for micro RNA processing and function in human cells. *Rna* **9**(1), 112-23.
- Zhang, B., Pan, X., Cobb, G. P., and Anderson, T. A. (2007). microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol* **302**(1), 1-12.
- Zhang, H., and Chen, Y. (2009). New insight into the role of miRNAs in leukemia. *Sci China C Life Sci* **52**(3), 224-31.
- Zhao, J. J., Lin, J., Lwin, T., Yang, H., Guo, J., Kong, W., Dessureault, S., Moscinski, L. C., Rezania, D., Dalton, W. S., Sotomayor, E., Tao, J., and Cheng, J. Q. (2010). microRNA expression profile and identification of miR-29 as a prognostic marker and pathogenetic factor by targeting CDK6 in mantle cell lymphoma. *Blood* **115**(13), 2630-9.
- Zheng, S. L., Augustsson-Balter, K., Chang, B., Hedelin, M., Li, L., Adami, H. O., Bensen, J., Li, G., Johnsson, J. E., Turner, A. R., Adams, T. S., Meyers, D. A., Isaacs, W. B., Xu, J., and Gronberg, H. (2004). Sequence variants of toll-like receptor 4 are associated with prostate cancer risk: results from the CAncer Prostate in Sweden Study. *Cancer Res* **64**(8), 2918-22.
- Zhu, J. Y., Pfuhl, T., Motsch, N., Barth, S., Nicholls, J., Grasser, F., and Meister, G. (2009). Identification of novel Epstein-Barr virus microRNA genes from nasopharyngeal carcinomas. *J Virol* **83**(7), 3333-41.
- Zur Hausen, H. (1967). Induction of specific chromosomal aberrations by adenovirus type 12 in human embryonic kidney cells. *J Virol* **1**(6), 1174-85.

## 9. Anhang

### 9.1. Tabellen

Tabelle 21: miRNA-Expression in den untersuchten cDNA-Banken

miRNA	Gesamt zahl	rel.miRNA Expression [%]						
	Normal				Tumor			
	1 n=19395		2 n=17314		1 n=20068		2 n=17396	
hsa-let-7a	147	0,76	193	0,96	278	1,39	484	2,38
hsa-let-7a*	1	0,01	1	0,00	5	0,02	3	0,01
hsa-let-7b	94	0,48	58	0,29	109	0,54	85	0,42
hsa-let-7b*	1	0,01	1	0,00	0	0,00	1	0,00
hsa-let-7c	39	0,20	32	0,16	88	0,44	111	0,55
hsa-let-7d	17	0,09	10	0,05	9	0,04	10	0,05
hsa-let-7d*	7	0,04	4	0,02	0	0,00	2	0,01
hsa-let-7e	10	0,05	13	0,06	0	0,00	25	0,12
hsa-let-7f	143	0,74	91	0,45	143	0,71	509	2,50
hsa-let-7f-1*	1	0,01	1	0,00	0	0,00	0	0,00
hsa-let-7g	118	0,61	76	0,38	71	0,35	122	0,60
hsa-let-7i	14	0,07	1	0,00	16	0,08	0	0,00
hsa-let-7i*	1	0,01	12	0,06	5	0,02	0	0,00
hsa-miR-1	27	0,14	29	0,14	25	0,12	14	0,07
hsa-miR-100	21	0,11	9	0,04	5	0,02	8	0,04
hsa-miR-101	84	0,43	49	0,24	59	0,29	9	0,04
hsa-miR-103	187	0,96	153	0,76	275	1,37	23	0,11
hsa-miR-106a	45	0,23	58	0,29	248	1,24	40	0,20
hsa-miR-106b	46	0,24	51	0,25	209	1,04	20	0,10
hsa-miR-106b*	1	0,01	0	0,00	0	0,00	1	0,00
hsa-miR-10a	2	0,01	1	0,00	2	0,01	1	0,00
hsa-miR-10a*	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,00
hsa-miR-10b	7	0,04	9	0,04	7	0,03	13	0,06
hsa-miR-125a-5p	81	0,42	69	0,34	47	0,23	26	0,13
hsa-miR-125b	380	1,96	286	1,42	407	2,03	35	0,17
hsa-miR-125b-1*	0	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00
hsa-miR-125b-2*	0	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00
hsa-miR-126	195	1,01	146	0,72	292	1,46	55	0,27
hsa-miR-126*	40	0,21	34	0,17	48	0,24	94	0,46
hsa-miR-127-3p	0	0,00	1	0,00	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-128a/128b	10	0,05	2	0,01	15	0,07	7	0,03
hsa-miR-130a	12	0,06	18	0,09	3	0,01	12	0,06
hsa-miR-130b	0	0,00	0	0,00	2	0,01	0	0,00
hsa-miR-130b*	1	0,01	0	0,00	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-132	16	0,08	6	0,03	11	0,05	54	0,27
hsa-miR-132*	0	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00

hsa-miR-133a/133b	40	0,21	22	0,11	15	0,07	3	0,01
hsa-miR-134	1	0,01	1	0,00	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-135a	14	0,07	35	0,17	28	0,14	20	0,10
hsa-miR-135b	1	0,01	2	0,01	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-136	0	0,00	0	0,00	2	0,01	0	0,00
hsa-miR-136*	2	0,01	0	0,00	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-139-5p	10	0,05	6	0,03	8	0,04	4	0,02
hsa-miR-140-3p	19	0,10	15	0,07	20	0,10	1	0,00
hsa-miR-140-5p	7	0,04	7	0,03	8	0,04	2	0,01
hsa-miR-141	54	0,28	91	0,45	150	0,75	29	0,14
hsa-miR-141*	4	0,02	1	0,00	1	0,00	0	0,00
hsa-miR-142-3p	23	0,12	6	0,03	4	0,02	0	0,00
hsa-miR-142-5p	26	0,13	7	0,03	6	0,03	0	0,00
hsa-miR-143	631	3,25	386	1,91	164	0,82	90	0,44
hsa-miR-145	1019	5,25	625	3,09	292	1,46	137	0,67
hsa-miR-145*	6	0,03	1	0,00	5	0,02	3	0,01
hsa-miR-146a	14	0,07	8	0,04	7	0,03	6	0,03
hsa-miR-146b-5p	13	0,07	5	0,02	8	0,04	13	0,06
hsa-miR-148a	20	0,10	40	0,20	234	1,17	65	0,32
hsa-miR-148b	3	0,02	2	0,01	14	0,07	2	0,01
hsa-miR-149	0	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00
hsa-miR-150	11	0,06	2	0,01	0	0,00	6	0,03
hsa-miR-151-3p	15	0,08	48	0,24	28	0,14	63	0,31
hsa-miR-151-5p	177	0,91	227	1,12	368	1,83	144	0,71
hsa-miR-152	81	0,42	88	0,44	72	0,36	9	0,04
hsa-miR-153	0	0,00	1	0,00	16	0,08	5	0,02
hsa-miR-155	13	0,07	7	0,03	4	0,02	58	0,29
hsa-miR-15a	328	1,69	295	1,46	501	2,50	69	0,34
hsa-miR-15b	245	1,26	169	0,84	424	2,11	215	1,06
hsa-miR-15b*	0	0,00	1	0,00	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-16	1154	5,95	1003	4,96	1895	9,44	729	3,58
hsa-miR-16-2*	2	0,01	1	0,00	4	0,02	1	0,00
hsa-miR-17*	4	0,02	1	0,00	5	0,02	0	0,00
hsa-miR-181a	5	0,03	4	0,02	6	0,03	0	0,00
hsa-miR-181a-2*	2	0,01	0	0,00	0	0,00	1	0,00
hsa-miR-181b	1	0,01	2	0,01	3	0,01	0	0,00
hsa-miR-181d	0	0,00	2	0,01	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-182	1	0,01	12	0,06	55	0,27	9	0,04
hsa-miR-183	0	0,00	2	0,01	19	0,09	20	0,10
hsa-miR-185	7	0,04	11	0,05	29	0,14	3	0,01
hsa-miR-186	10	0,05	3	0,01	10	0,05	1	0,00
hsa-miR-187	11	0,06	15	0,07	1	0,00	2	0,01
hsa-miR-18a/18b	3	0,02	3	0,01	6	0,03	2	0,01
hsa-miR-190	6	0,03	8	0,04	19	0,09	0	0,00
hsa-miR-190b	0	0,00	1	0,00	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-191	94	0,48	72	0,36	156	0,78	33	0,16
hsa-miR-192/215	0	0,00	3	0,01	4	0,02	1	0,00

hsa-miR-193a-5p	1	0,01	0	0,00	3	0,01	1	0,00
hsa-miR-193b	1	0,01	0	0,00	1	0,00	2	0,01
hsa-miR-194	11	0,06	5	0,02	14	0,07	2	0,01
hsa-miR-195	613	3,16	645	3,19	672	3,35	754	3,71
hsa-miR-196a	0	0,00	2	0,01	8	0,04	4	0,02
hsa-miR-196b	7	0,04	4	0,02	14	0,07	8	0,04
hsa-miR-199a-3p/199b-3p	1261	6,50	987	4,88	806	4,02	561	2,76
hsa-miR-199a-5p	71	0,37	42	0,21	52	0,26	5	0,02
hsa-miR-199b-5p	14	0,07	7	0,03	22	0,11	0	0,00
hsa-miR-19a	3	0,02	1	0,00	7	0,03	0	0,00
hsa-miR-19b	44	0,23	24	0,12	72	0,36	4	0,02
hsa-miR-200a	14	0,07	13	0,06	13	0,06	1	0,00
hsa-miR-200a*	1	0,01	0	0,00	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-200b	262	1,35	562	2,78	587	2,93	597	2,94
hsa-miR-200b*	5	0,03	3	0,01	2	0,01	21	0,10
hsa-miR-200c	289	1,49	582	2,88	1755	8,75	2261	11,12
hsa-miR-203	2	0,01	3	0,01	7	0,03	3	0,01
hsa-miR-204	2	0,01	3	0,01	2	0,01	1	0,00
hsa-miR-205	34	0,18	34	0,17	4	0,02	1	0,00
hsa-miR-206	0	0,00	3	0,01	3	0,01	0	0,00
hsa-miR-208b	0	0,00	1	0,00	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-20a	84	0,43	120	0,59	287	1,43	31	0,15
hsa-miR-20b	26	0,13	33	0,16	44	0,22	5	0,02
hsa-miR-20b*	0	0,00	2	0,01	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-21	638	3,29	509	2,52	712	3,55	1321	6,50
hsa-miR-210	0	0,00	0	0,00	3	0,01	0	0,00
hsa-miR-212	5	0,03	2	0,01	3	0,01	8	0,04
hsa-miR-214	24	0,12	28	0,14	9	0,04	9	0,04
hsa-miR-218	49	0,25	44	0,22	45	0,22	105	0,52
hsa-miR-22	127	0,65	142	0,70	128	0,64	21	0,10
hsa-miR-22*	31	0,16	43	0,21	21	0,10	1	0,00
hsa-miR-221	47	0,24	76	0,38	38	0,19	23	0,11
hsa-miR-221*	5	0,03	4	0,02	3	0,01	0	0,00
hsa-miR-222	51	0,26	66	0,33	16	0,08	14	0,07
hsa-miR-223	111	0,57	26	0,13	41	0,20	5	0,02
hsa-miR-223*	1	0,01	0	0,00	0	0,00	2	0,01
hsa-miR-224	2	0,01	6	0,03	2	0,01	4	0,02
hsa-miR-23a/23b	2222	11,46	1889	9,35	1111	5,54	2749	13,52
hsa-miR-24	570	2,94	507	2,51	398	1,98	314	1,54
hsa-miR-24-1*	1	0,01	6	0,03	5	0,02	1	0,00
hsa-miR-24-2*	1	0,01	0	0,00	3	0,01	0	0,00
hsa-miR-25	77	0,40	89	0,44	173	0,86	130	0,64
hsa-miR-26a	1072	5,53	897	4,44	913	4,55	1051	5,17
hsa-miR-26b	691	3,56	618	3,06	852	4,25	1355	6,66
hsa-miR-27a	924	4,76	709	3,51	695	3,46	274	1,35
hsa-miR-27b	1769	9,12	1806	8,94	957	4,77	721	3,55

hsa-miR-27b*	2	0,01	0	0,00	1	0,00	0	0,00
hsa-miR-28-3p	36	0,19	60	0,30	27	0,13	11	0,05
hsa-miR-28-5p	58	0,30	51	0,25	93	0,46	25	0,12
hsa-miR-29a	281	1,45	249	1,23	191	0,95	37	0,18
hsa-miR-29a*	1	0,01	0	0,00	0	0,00	1	0,00
hsa-miR-29b	65	0,34	52	0,26	46	0,23	46	0,23
hsa-miR-29b-2*	0	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00
hsa-miR-29c	313	1,61	284	1,41	472	2,35	44	0,22
hsa-miR-29c*	0	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00
hsa-miR-301a/301b	1	0,01	0	0,00	3	0,01	0	0,00
hsa-miR-30a	95	0,49	82	0,41	117	0,58	20	0,10
hsa-miR-30a*	21	0,11	15	0,07	34	0,17	18	0,09
hsa-miR-30b	91	0,47	101	0,50	354	1,76	10	0,05
hsa-miR-30b*	0	0,00	1	0,00	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-30c	115	0,59	65	0,32	116	0,58	7	0,03
hsa-miR-30c-2*	0	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00
hsa-miR-30d	65	0,34	36	0,18	123	0,61	21	0,10
hsa-miR-30e	82	0,42	60	0,30	51	0,25	8	0,04
hsa-miR-30e*	19	0,10	30	0,15	23	0,11	22	0,11
hsa-miR-31	2	0,01	5	0,02	2	0,01	0	0,00
hsa-miR-31*	0	0,00	3	0,01	1	0,00	0	0,00
hsa-miR-32	10	0,05	8	0,04	12	0,06	15	0,07
hsa-miR-32*	2	0,01	1	0,00	5	0,02	0	0,00
hsa-miR-320	109	0,56	77	0,38	73	0,36	46	0,23
hsa-miR-324-3p	12	0,06	14	0,07	15	0,07	1	0,00
hsa-miR-324-5p	3	0,02	5	0,02	1	0,00	0	0,00
hsa-miR-326	1	0,01	0	0,00	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-328	1	0,01	4	0,02	1	0,00	1	0,00
hsa-miR-329	0	0,00	0	0,00	0	0,00	2	0,01
hsa-miR-331-3p	1	0,01	0	0,00	2	0,01	0	0,00
hsa-miR-331-5p	0	0,00	1	0,00	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-335	5	0,03	7	0,03	17	0,08	1	0,00
hsa-miR-337-3p	4	0,02	1	0,00	3	0,01	2	0,01
hsa-miR-338-3p	0	0,00	5	0,02	1	0,00	0	0,00
hsa-miR-339-3p	3	0,02	1	0,00	3	0,01	0	0,00
hsa-miR-339-5p	0	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00
hsa-miR-33a*	0	0,00	0	0,00	4	0,02	0	0,00
hsa-miR-340	9	0,05	8	0,04	9	0,04	0	0,00
hsa-miR-340*	0	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00
hsa-miR-342-3p	17	0,09	14	0,07	6	0,03	2	0,01
hsa-miR-345	2	0,01	5	0,02	7	0,03	0	0,00
hsa-miR-34a	34	0,18	16	0,08	26	0,13	1	0,00
hsa-miR-34a*	1	0,01	1	0,00	1	0,00	0	0,00
hsa-miR-34b*	0	0,00	2	0,01	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-361-3p	2	0,01	0	0,00	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-361-5p	56	0,29	60	0,30	76	0,38	23	0,11
hsa-miR-362-3p	5	0,03	5	0,02	10	0,05	1	0,00

hsa-miR-363	6	0,03	2	0,01	12	0,06	4	0,02
hsa-miR-365	32	0,16	22	0,11	16	0,08	43	0,21
hsa-miR-369-3p	3	0,02	4	0,02	3	0,01	7	0,03
hsa-miR-374a	46	0,24	28	0,14	56	0,28	37	0,18
hsa-miR-374a*	2	0,01	1	0,00	0	0,00	2	0,01
hsa-miR-374b	123	0,63	109	0,54	97	0,48	256	1,26
hsa-miR-374b*	4	0,02	1	0,00	3	0,01	1	0,00
hsa-miR-375	20	0,10	39	0,19	151	0,75	396	1,95
hsa-miR-376a	1	0,01	0	0,00	0	0,00	2	0,01
hsa-miR-376a*	0	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00
hsa-miR-376c	4	0,02	5	0,02	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-377	1	0,01	0	0,00	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-378	6	0,03	11	0,05	7	0,03	1	0,00
hsa-miR-378*	6	0,03	8	0,04	5	0,02	0	0,00
hsa-miR-379	1	0,01	2	0,01	1	0,00	1	0,00
hsa-miR-381	1	0,01	2	0,01	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-409-3p	1	0,01	0	0,00	0	0,00	1	0,00
hsa-miR-410	4	0,02	0	0,00	4	0,02	0	0,00
hsa-miR-411*	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,00
hsa-miR-421	5	0,03	8	0,04	4	0,02	0	0,00
hsa-miR-423-3p	5	0,03	8	0,04	11	0,05	3	0,01
hsa-miR-423-5p	1	0,01	1	0,00	7	0,03	0	0,00
hsa-miR-424	202	1,04	165	0,82	177	0,88	40	0,20
hsa-miR-425	11	0,06	14	0,07	29	0,14	4	0,02
hsa-miR-429	10	0,05	17	0,08	28	0,14	20	0,10
hsa-miR-450a	0	0,00	3	0,01	3	0,01	0	0,00
hsa-miR-451	5	0,03	12	0,06	32	0,16	1	0,00
hsa-miR-452	4	0,02	0	0,00	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-454	3	0,02	2	0,01	1	0,00	6	0,03
hsa-miR-455-3p	20	0,10	10	0,05	10	0,05	6	0,03
hsa-miR-455-5p	0	0,00	0	0,00	2	0,01	2	0,01
hsa-miR-484	8	0,04	7	0,03	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-487a	1	0,01	1	0,00	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-487b	0	0,00	3	0,01	0	0,00	3	0,01
hsa-miR-490-5p	3	0,02	0	0,00	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-493	0	0,00	2	0,01	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-493*	0	0,00	2	0,01	0	0,00	6	0,03
hsa-miR-495	0	0,00	2	0,01	0	0,00	6	0,03
hsa-miR-497	48	0,25	29	0,14	0	0,00	5	0,02
hsa-miR-498	0	0,00	1	0,00	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-499-5p	2	0,01	4	0,02	0	0,00	1	0,00
hsa-miR-500*	0	0,00	1	0,00	0	0,00	1	0,00
hsa-miR-501-3p	1	0,01	0	0,00	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-502-3p	5	0,03	1	0,00	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-503	0	0,00	5	0,02	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-505	6	0,03	0	0,00	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-532-3p	3	0,02	6	0,03	0	0,00	0	0,00

hsa-miR-532-5p	16	0,08	12	0,06	0	0,00	1	0,00
hsa-miR-542-3p	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,00
hsa-miR-543	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,00
hsa-miR-548b-3p	0	0,00	1	0,00	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-556-3p	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,00
hsa-miR-559	2	0,01	0	0,00	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-574-3p	5	0,03	6	0,03	0	0,00	2	0,01
hsa-miR-574-5p	0	0,00	3	0,01	0	0,00	8	0,04
hsa-miR-582-5p	4	0,02	12	0,06	0	0,00	1	0,00
hsa-miR-590-3p	15	0,08	11	0,05	0	0,00	23	0,11
hsa-miR-598	1	0,01	7	0,03	0	0,00	5	0,02
hsa-miR-606	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,00
hsa-miR-628-3p	3	0,02	1	0,00	0	0,00	1	0,00
hsa-miR-628-5p	0	0,00	2	0,01	0	0,00	1	0,00
hsa-miR-643	1	0,01	0	0,00	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-651	0	0,00	1	0,00	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-652	17	0,09	20	0,10	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-654-3p	1	0,01	0	0,00	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-655	0	0,00	1	0,00	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-656	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,00
hsa-miR-660	13	0,07	0	0,00	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-7	1	0,01	0	0,00	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-7-1*	4	0,02	2	0,01	0	0,00	8	0,04
hsa-miR-744	1	0,01	2	0,01	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-766	2	0,01	2	0,01	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-769-5p	0	0,00	1	0,00	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-874	1	0,01	1	0,00	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-886-5p	1	0,01	2	0,01	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-887	5	0,03	7	0,03	0	0,00	3	0,01
hsa-miR-889	1	0,01	0	0,00	0	0,00	8	0,04
hsa-miR-9	1	0,01	4	0,02	0	0,00	6	0,03
hsa-miR-9*	1	0,01	0	0,00	0	0,00	6	0,03
hsa-miR-923	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,00
hsa-miR-92a	67	0,35	78	0,39	0	0,00	179	0,88
hsa-miR-92b	3	0,02	0	0,00	0	0,00	5	0,02
hsa-miR-93	52	0,27	44	0,22	0	0,00	18	0,09
hsa-miR-95	0	0,00	2	0,01	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-96	5	0,03	0	0,00	0	0,00	0	0,00
hsa-miR-98	0	0,00	2	0,01	0	0,00	7	0,03
hsa-miR-99a	47	0,24	20	0,10	0	0,00	2	0,01
hsa-miR-99b	9	0,05	5	0,02	0	0,00	4	0,02

## 9.2. Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden als folgende wissenschaftliche Artikel veröffentlicht:

**Szczyrba, J.\***, Nolte, E.\*, Wach, S., Kremmer, E., Stöhr, R., Hartmann, A., Wieland, W., Wullich, B. and Grässer, F.A.. (2011) Downregulation of Sec23A protein by miRNA-375 in prostate carcinoma. *Mol Cancer Res*, Manuskript akzeptiert / in Druck.

\* These authors contributed equally to this work

**Szczyrba, J.**, Loprich, E., Wach, S., Jung, V., Unteregger, G., Barth, S., Grobholz, R., Wieland, W., Stohr, R., Hartmann, A., Wullich, B., and Grasser, F. (2010). The microRNA profile of prostate carcinoma obtained by deep sequencing. *Mol Cancer Res* **8**(4), 529-38.

Wach, S.\*, Nolte, E.\*, **Szczyrba, J.**, Stöhr, R., Hartmann, A., Ørntoft, T., Dyrskjøt, L., Eltze, E., Wieland, W., Keck, B., Ekici, AB., Grässer, F., Wullich, B. (2011). Diagnostic miRNA profiles detected by multi-platform miRNA screening. *Int J Cancer*. doi: 10.1002/ijc.26064.

\* These authors contributed equally to this work

Hart, M., Wach, S., Nolte, E., **Szczyrba, J.**, Perner, S., Menon R., Taubert, H., Hartmann, A., Stöhr, R., Wieland, W., Grässer, F.A. and Wullich, B. Regulation of ERG protein by microRNA miR-145 (Int J Cancer, zur Veröffentlichung eingereicht).

Teile dieser Arbeit wurden auf folgenden Kongressen und Symposien in Form von Postern vorgestellt:

04/2011 AACR 102st Annual Meeting, Orlando (USA)

06/2010 „RNA and cancer“, Pezcoller Symposium, Trento (Italien)

04/2010 AACR 101st Annual Meeting, Washington (USA)

### 9.3. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Friedrich Grässer, möchte ich für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, für das Überlassen der interessanten Themen, für seine Hilfsbereitschaft sowie für sein Vertrauen hinsichtlich der eigenverantwortlichen Bearbeitung von Projekten danken.

Unseren Kooperationspartnern Prof. Dr. med. Bernd Wullich und Dr. Sven Wach sowie Dipl.-Biol. Elke Löprich danke ich für die gute und vor allem erfolgreiche Zusammenarbeit sowie ihre Hilfsbereitschaft.

Dr. Jiayun Zhu danke ich für die Bereitstellung der Makros, welche die Auswertung der Daten deutlich beschleunigt haben. Frau Dr. Elisabeth Kremmer vom Helmholtz Zentrum in München danke ich für die Übernahme der Herstellung der monoklonalen Antikörper.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. Stephanie Barth für ihre Unterstützung, ihre Diskussionsbereitschaft und ihre Ratschläge.

Besonders danken möchte ich Frau Dr. Natalie Motsch für ihre Unterstützung und Motivation in den letzten drei Jahren sowie für ihre Freundschaft in und außerhalb des Labors.

Meinen aktuellen und ehemaligen Kollegen der Arbeitsgruppe Grässer danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre, vor allem Frau Ruth Nord für ihre Hilfsbereitschaft und ihre tatkräftige Unterstützung im Labor.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei allen anderen Mitarbeitern der Virologie für ihre Hilfsbereitschaft und die angenehme Atmosphäre. Vor allem Frau Barbara Best hatte bei Problemen jeglicher Art immer eine Lösung.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich herzlich für ihre Unterstützung während des vorangegangenen Studiums und der Promotion.

Von ganzem Herzen danke ich Anne Janowski für ihren Beistand und ihre Geduld sowie ihren unaufhörlichen Glauben an mich. Ihre Unterstützung hat wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

## 10. Lebenslauf

### Persönliche Angaben

Name	Jaroslav Thomas Szczyrba
Geburtsdatum	25.03.1982 in Ruda
Nationalität	deutsch

---

### Ausbildung

08/1991 - 06/2001	Hochwald-Gymnasium Wadern Abschluss: Abitur
08/2001 - 05/2002	Zivildienst am therapeutischen Bauernhof der Arbeiterwohlfahrt in Münchweiler
10/2002 - 09/2008	Biologie-Studium mit Schwerpunkt Human- und Molekularbiologie an der Universität des Saarlandes Abschluss: Diplom (Note: sehr gut)  Hauptfach: Virologie und Immunologie Nebenfach: Molekularbiologie, Entwicklungsbiologie  Thema der Diplom-Arbeit: „Untersuchung nicht- kodierender RNAs des Epstein-Barr-Virus“
Seit 10/2008	Wissenschaftlicher Mitarbeiter und Promotion am Institut für Virologie der Universitätskliniken des Saarlandes

---

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die Arbeit selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Saarbrücken, Mai 2011

-----  
Jaroslaw Szczyrba