

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

**Das komparative MicroRNA-Profil zunehmend maligner
Prostatakarzinome und Identifizierung von microRNA-
Zielgenen**

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2013

vorgelegt von
Martin Hart
geb. am 15.05.1979
in Saarlouis

„Die Wissenschaft fängt eigentlich erst da an
interessant zu werden, wo sie aufhört.“

Justus von Liebig

Inhaltsverzeichnis

1.	Zusammenfassung	1
2.	Summary	2
3.	Einleitung	3
3.1.	Die Prostata.....	3
3.2.	Das Prostatakarzinom.....	4
3.2.1.	Epidemiologie und Risikofaktoren des Prostatakarzinoms.....	4
3.2.2.	Histopathologie, Klassifikation und Diagnostik des Prostatakarzinoms	6
3.2.3.	Entstehung des Prostatakarzinoms	9
3.3.	RNA-Interferenz	11
3.4.	microRNAs	12
3.5.	microRNAs und Karzinogenese.....	17
3.6.	miRNAs und Prostatakarzinom.....	19
3.7.	Ausgangspunkt und Zielsetzung der Arbeit.....	20
4.	Material	22
4.1.	Geräte	22
4.2.	Chemikalien, Membranen, Filter, Säulen	22
4.3.	Puffer und Lösungen	24
4.4.	Enzyme	30
4.5.	Größen- und Molekulargewichtsmarker.....	31
4.5.1.	DNA-Größenstandard	31
4.5.2.	Protein-Molekulargewichtsmarker.....	31
4.6.	Antikörper	32
4.6.1.	Primärantikörper.....	32
4.6.2.	Sekundärantikörper.....	33

4.7.	Adhärente Zelllinien	33
4.8.	Bakterienstämme	34
4.9.	Nähr- und Kulturmedien	34
4.9.1.	Kulturmedien für Säugerzellen.....	34
4.9.2.	Kulturmedium für Bakterien.....	34
4.10.	Patientenmaterial	35
4.11.	Vektoren	37
4.11.1.	pGEM-T.....	37
4.11.2.	pMIR-REPORT™	38
4.11.3.	pSG5	38
4.11.4.	microRNA-Expressionsplasmide	39
4.11.5.	Reporterplasmide	40
4.12.	Oligonukleotide	43
4.12.1.	Oligonukleotidprimer	43
4.12.2.	Northern Blot-Sonden	44
4.12.3.	Antisense Oligonukleotide.....	44
4.13.	Computersoftware	45
5.	Methoden	46
5.1.	Bakterielle Zellkultur	46
5.1.1.	Aufzucht und Lagerung von Bakterien (Hart, 2010)	46
5.1.2.	Herstellung kompetenter Bakterien (Hart, 2010)	47
5.1.3.	Transformation kompetenter Bakterien (Hart, 2010)	47
5.1.4.	Blau-Weiß-Selektion (Hart, 2010)	48
5.2.	Eukaryotische Zellkultur	49
5.2.1.	Kultivierung von adhärennten Monolayer-Zellkulturen (modifiziert nach (Hart, 2010))	49
5.2.2.	Zellzahlbestimmung mittels Fuchs-Rosenthal-Zählkammer	50
5.2.3.	Transfektion eukaryotischer Zellen mit Nanofectin™ (Hart, 2010)	51
5.2.4.	Transfektion von PCa-Zelllinien mit JetPrime	51
5.2.5.	Transfektion von PCa-Zelllinien mit Antisense-Oligonukleotiden	52
5.3.	DNA-Techniken	52

5.3.1.1.	Analytische Isolierung von Plasmid-DNA (Boiling Präparation).....	52
5.3.1.2.	Präparative Plasmid-DNA-Isolation mittels NucleoBond™ (Hart, 2010)	53
5.3.2.	Photometrische Konzentrationsbestimmung (Hart, 2010) (Maniatis, 1989) (Birboim and Doly, 1979)	54
5.3.3.	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) (Hart, 2010).....	55
5.3.4.	Zielgerichtete Mutagenese (modifiziert nach (Hart, 2010)).....	57
5.3.5.	Agarosegelelektrophorese (Hart, 2010).....	58
5.3.6.	NucleoSpin-Gelextraktion von DNA (Hart, 2010)	60
5.3.7.	Enzymatische Modifikation von DNA	60
5.3.7.1.	Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen (Hart, 2010).....	60
5.3.7.2.	Dephosphorylierung von Vektor-DNA (Hart, 2010)	62
5.3.7.3.	Ligation von DNA-Fragmenten (Hart, 2010)	62
5.3.7.4.	Ligation von PCR-Fragmenten in pGEM®-T (Hart, 2010).....	63
5.4.	RNA-Techniken.....	64
5.4.1.	RNA-Isolation (Hart, 2010).....	64
5.4.2.	Northern Blot (Hart, 2010).....	64
5.4.2.1.	Herstellung des Polyacrylamidgels und Gelelektrophorese (modifiziert nach (Hart, 2010))	65
5.4.2.2.	RNA Transfer (Hart, 2010).....	66
5.4.2.3.	Herstellung einer radioaktiv markierten Sonde (Hart, 2010).....	66
5.4.2.4.	Spezifischer Nachweis von RNA (Hart, 2010)	67
5.4.2.5.	Stripping der Nylonmembran	68
5.5.	Dual-Luciferase® Reporter Assay (Hart, 2010)	68
5.6.	Proteintechniken	70
5.6.1.	Herstellung von Proteinextrakten unter reduzierenden Bedingungen aus eukaryotischen Zellen (Hart, 2010) (Maniatis, 1989)	70
5.6.2.	Herstellung von nativen Proteinextrakten aus eukaryotischen Zellen	71
5.6.3.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) (Hart, 2010).....	71
5.6.4.	Herstellung eines SDS-Polyacrylamidgels und Gelelektrophorese	72
5.6.5.	Western Blot (Hart, 2010)	73
5.7.	Zellproliferationsassay	74
5.8.	Bestimmung der Zellzahl mittels Durchflusszytometrie	75
5.9.	Illumina-Sequenzierung von fünf cDNA-Banken aus humanen Prostatageweben	76
5.9.1.	Zusammensetzung der Prostatagewebeepools.....	76
5.9.2.	Isolierung der kleinen RNA-Fraktion und Aufreinigung der microRNAs	76

5.9.3.	cDNA-Synthese.....	77
5.9.4.	Sequenzierung des cDNA-Pools	78
5.9.5.	Auswertung der Sequenzdaten.....	78
6.	Ergebnisse	79
6.1.	Fragestellung	79
6.2.	Illumina-Sequenzierung von fünf cDNA-Banken aus humanen Prostatageweben	80
6.2.1.	Herstellung von fünf cDNA-Banken aus humanen Prostatageweben	80
6.2.2.	Sequenzanalyse der fünf cDNA-Banken aus humanen Prostatageweben	81
6.2.2.1.	Vergleich der miRNA-Expression in den gesunden Gewebepools.....	82
6.2.2.2.	Vergleich der miRNA-Expression zwischen gesundem Prostatagewebe und den Prostata-tumor-pools mit zunehmender Malignität	84
6.3.	Analyse der Expression deregulierter microRNAs zur Validierung der Illumina-Sequenzierung	88
6.3.1.	Validierung der Sequenzierungsergebnisse durch Northern Blots	89
6.3.2.	Validierung der Sequenzierungsergebnisse durch quantitative Real-Time-PCRs in einem unabhängigen Patientenkollektiv	91
6.4.	Analyse deregulierter miRNAs in Prostatakarzinomzelllinien.....	92
6.5.	Identifizierung von Zielgenen deregulierter miRNAs in zunehmend malignen Prostatakarzinomen	93
6.5.1.	Potentielle Zielgene deregulierter miRNAs in zunehmend malignen Prostatakarzinomen .	94
6.5.2.	Herstellung des miRNA-200b-Expressionsplasmids	96
6.5.3.	Analyse der Auswirkung der Expression verschiedener miRNAs auf die 3'UTRs von ADIPOR2, NLK, MOB1A, PLAU, SEC62 und SH3GLB1	97
6.5.4.	SEC23A als Zielgen der miRNA-200b	106
6.5.4.1.	Posttranskriptionelle Regulation der SEC23A-3'UTR durch miR-200b	106
6.5.4.2.	Regulation des endogenen SEC23A-Proteinniveaus durch Expression der miRNA-200b in Prostatakarzinomzelllinien	109
6.5.4.3.	Analyse der Korrelation zwischen der Sec23A-mRNA-Expression und der Expression miR-200b in Prostata-tumoren mit zunehmenden Malignitätsgraden	110
6.5.5.	PHLPP1 als Zielgen der miRNA-375	111
6.5.5.1.	Posttranskriptionelle Regulation der PHLPP1-3'UTR durch miR-375	111
6.5.5.2.	Effekt der miR-375-Überexpression in Prostatakarzinomzelllinien auf das endogene PHLPP1-Proteinniveau	113
6.5.6.	PHLPP2 als Zielgen der miRNA-15a	115

6.5.6.1.	Auswirkung der ektopischen Expression der miRNA-375 auf die endogene PHLPP2-Proteinmenge in Prostatakarzinomzelllinien	117
6.5.6.2.	Untersuchung der Korrelation zwischen der PHLPP1- und PHLPP2-mRNA-Expression und der Expression der miRNAs miR-375 und -15a in primären Prostatatumoren zunehmender Malignitätsgrade	119
6.5.6.3.	Effekt der ektopischen Expression der miR-375 und -15a auf die Zellproliferation von Prostatakarzinomzelllinien	120
6.5.6.4.	Auswirkung der Expression von miR-375- und -15a-Inhibitoren auf die Zellproliferation von Prostatakarzinomzelllinien	122
7.	Diskussion.....	124
7.1.	Illumina-Sequenzierung von fünf cDNA-Banken aus humanen Prostatageweben	125
7.1.1.	Herstellung der fünf cDNA-Banken aus humanen Prostatageweben.....	125
7.1.2.	Sequenzanalyse der fünf cDNA-Banken aus humanen Prostatageweben	126
7.1.2.1.	Vergleich der miRNA-Expression in den gesunden Gewebepools.....	126
7.1.2.2.	Vergleich der miRNA-Expression zwischen gesundem Prostatagewebe und den Prostatatumorpoolen mit zunehmender Malignität.....	127
7.1.2.3.	In zunehmend malignen Prostatakarzinomen induzierte miRNAs.....	130
7.1.2.4.	In zunehmend malignen Prostatakarzinomen reprimierte miRNAs	135
7.1.3.	Vergleich dieses miRNA-Expressionsprofils mit anderen publizierten miRNA-Expressionsprofilen des Prostatakarzinoms	137
7.2.	Expressionsanalyse deregulierter miRNAs zur Validierung der Illumina-Sequenzierung.	139
7.2.1.	Validierung der Illumina-Sequenzierung durch Northern Blots.....	139
7.2.2.	Validierung der Illumina-Sequenzierung durch quantitative Real-Time-PCRs in einem unabhängigen Patientenkollektiv	140
7.3.	Untersuchung deregulierter miRNAs in Prostatakarzinomzelllinien	141
7.4.	Identifizierung von Zielgenen differentiell exprimierter miRNAs in zunehmend malignen Prostatakarzinomen	142
7.4.1.	Potentielle Zielgene differentiell exprimierter miRNAs in zunehmend malignen Prostatakarzinomen	142
7.4.2.	Posttranskriptionelle Regulation von SEC23A durch miR-200b	143
7.4.3.	PHLPP1 als Zielgen der miR-375	145
7.4.4.	miR-15a reguliert posttranskriptionell die Expression von PHLPP2	147
7.4.5.	Auswirkungen der ektopischen Expression der miR-375 und -15a auf die Zellproliferation von Prostatakarzinomzelllinien.....	149

7.4.6.	Einfluss der Expression von miR-375 und -15a-Inhibitoren auf die Zellproliferation von Prostatakarzinomzelllinien	151
8.	Literaturverzeichnis	152
9.	Anhang	177
9.1.	Rohsequenzdaten der Illumina-Sequenzierung	177
9.2.	Publikationen und Vorträge	203
9.2.1.	Publikationen.....	203
9.2.2.	Vorträge.....	203
9.2.3.	Poster	204
9.3.	Danksagung	205
9.4.	Lebenslauf..... Fehler! Textmarke nicht definiert.	

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Prostata	3
Abbildung 2: Einteilung der Drüsenmorphologie nach Gleason.....	8
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Biogenese und Funktion humaner miRNAs (Cordes et al., 2010)	14
Abbildung 4: Modelle der miRNA-vermittelten Translationregulation der Ziel-mRNA (Carthew and Sontheimer, 2009).....	15
Abbildung 5: Mechanismen der Deregulation der miRNA-Expression in Karzinomen (Di Leva and Croce, 2010).....	18
Abbildung 6: 1 kb Plus DNA-Leiter (Quelle: Invitrogen)	31
Abbildung 7: ColorPlus Prestained Protein Ladder (Quelle: NEB)	32
Abbildung 8: Vektorkarte des pGEM-T Vektor (Promega) zur direkten Klonierung von PCR-Produkten mit Adenosinüberhängen (Quelle: Promega).....	37
Abbildung 9: pMIR-REPORT™ -Vektor (Ambion) zur Analyse von microRNA-Effekten auf 3'UTRs von Target-mRNAs (Quelle: Ambion)	38
Abbildung 10: pSG5 Expressionsvektor der Firma Stratagene (Quelle:Stratagene).....	39
Abbildung 11: Fuchs-Rosenthal-Zählkammer (Quelle: rogosampaic.com)	50
Abbildung 12: Gelelektrophoretische Auftrennung der kleinen RNA-Fraktion zur Elution der miRNA-Fraktion (Quelle: vertis Biotechnologie AG)	80
Abbildung 13: Qualitätskontrolle der amplifizierten cDNAs der jeweiligen Gewebepools (Quelle: vertis Biotechnologie AG)	81
Abbildung 14: Induzierte miRNAs in Prostatakarzinomen verschiedener Malignitätsgrade	87
Abbildung 15: Reprimierte miRNAs in Prostatakarzinomen verschiedener Malignitätsgrade	88
Abbildung 16: Northern Blots zur Validierung der Sequenzierungsergebnisse in den zur Sequenzierung verwendeten Prostatagewebepools.....	89
Abbildung 17: Quantifizierung der Northern Blots zur Validierung der Sequenzierungsergebnisse in den zur Sequenzierung verwendeten Prostatagewebepools.....	90
Abbildung 18: Validierung der Sequenzierungsergebnisse durch qRT-PCR in einem unabhängigen Patientenkollektiv	92
Abbildung 19: Expression der miR-15a und -200b in den PCa-Zelllinien	93
Abbildung 20: Expressionskontrolle des pSG5-miR-200b-Expressionsvektors.....	97
Abbildung 21: Schematische Darstellung der ADIPOR2-3'UTR mit den vorhergesagten Bindestellen für miR-200b, -200c und -375	98
Abbildung 22: Effekte der miRNAs miR-200b, -200c und -375 auf die ADIPOR2-3'UTR	99
Abbildung 23: Schematische Übersicht über die NLK-3'UTR mit den vorhergesagten Bindestellen der miR-25, -148a und -375	99
Abbildung 24: Einfluss der miR-25, -148a und -375 auf die 3'UTR von NLK	100
Abbildung 25: Schema der MOB1A-3'UTR mit vorhergesagter Bindestelle für miRNA-375	101
Abbildung 26: Auswirkung der Expression der miR-375 auf die MOB1A-3'UTR.....	101

Abbildung 27: schematische Darstellung der PLAU-3'UTR mit der vorhergesagten Bindestelle der miRNA-143	102
Abbildung 28: Regulation der PLAU-3'UTR durch miRNA-143	103
Abbildung 29: Schema der SEC62-3'UTR mit vorhergesagter Bindestelle für miR-145	103
Abbildung 30: Effekte der miR-145 auf die SEC62-3'UTR.....	104
Abbildung 31: Schematische Übersicht der SH3GLB1-3'UTR mit den miR-375-Bindestellen	105
Abbildung 32: Auswirkung der miR-375-Expression auf die SH3GLB1-3'UTR	105
Abbildung 33: Effekt der miRNA-200b-Expression auf die SEC23A-3'UTR	106
Abbildung 34: Schematische Darstellung der vorhergesagten miR-200b-Bindestellen in der SEC23A-3'UTR	107
Abbildung 35: Identifizierung der funktionellen miR-200b-Bindestelle in der SEC23A-3'UTR	108
Abbildung 36: Reduktion von SEC23A durch Expression der miRNA-200b in PCa-Zelllinien	109
Abbildung 37: Korrelation zwischen der SEC23A-mRNA-Expression und der miR-200b-Expression	110
Abbildung 38: Auswirkung der miR-375-Überexpression auf die PHLPP1-3'UTR	111
Abbildung 39: Schematische Übersicht der PHLPP1-3'UTR mit Bindestelle der miR-375	112
Abbildung 40: Verifizierung der Regulation der PHLPP1-3'UTR durch miR-375.....	113
Abbildung 41: Regulation der PHLPP1-Proteimenge durch miR-375 in PCa-Zelllinien	114
Abbildung 42: Effekt der Überexpression der miR-15a auf die PHLPP2-3'UTR.....	115
Abbildung 43: Schematische Darstellung der PHLPP2-3'UTR mit miR-15a-Bindestelle	116
Abbildung 44: Identifizierung der Bindestelle der miR-15a in der PHLPP2-3'UTR.....	117
Abbildung 45: Effekt der miR-15a-Expression auf den PHLPP2-Proteinniveau in PCa-Zelllinien.....	118
Abbildung 46: Korrelation der PHLPP1-mRNA-Expression mit der miR-375-Expression bzw. der PHLPP2-mRNA-Expression mit der miR-15a-Expression	119
Abbildung 47: Auswirkung der Überexpression der miR-375 und -15a auf die Zellproliferation der PCa-Zelllinien LNCaP und DU145	121
Abbildung 48: Effekt der Expression von miR-375 bzw. -15a-Inhibitoren auf die Zellproliferation von DU145-Zellen	122
Abbildung 49: Gegenüberstellung mehrerer miRNA-Expressionsprofile des Prostatakarzinoms (Maugeri-Sacca et al., 2012)	137
Abbildung 50: Auswirkungen der Überexpression der miRNAs miR-375 und miR-15a auf den PI3K/AKT-Signalweg	150

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: TNM-Klassifikation des Prostatakarzinoms (Sobin, 2009)	7
Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Primäantikörper mit den entsprechenden Verdünnungen	32
Tabelle 3: Charakteristika der zur Sequenzierung und Validierung der Sequenzierung verwendeten Patientenkollektive	36
Tabelle 4: Liste der verwendeten Expressionsplasmide	40
Tabelle 5: Zur Klonierung verwendete Oligonukleotidprimer	43
Tabelle 6: Zur Sondenmarkierung verwendete DNA-Oligonukleotide	44
Tabelle 7: Liste der verwendeten Antisense Oligonukleotide	44
Tabelle 8: Pipettierschema eines 50 µl Standard-PCR-Ansatzes.....	56
Tabelle 9: Verwendetes Standard-PCR-Programm	57
Tabelle 10: Pipettierschema eines Standard-PCR-Ansatzes einer zielgerichteten Mutagenese	57
Tabelle 11: Mutagenese-PCR-Programm	58
Tabelle 12: Eingesetzte Agarosekonzentrationen je nach aufzutrennender Fragmentgröße.....	59
Tabelle 13: Standard-Restriktionsansatz	61
Tabelle 14: Standard-Ligationsansatz	63
Tabelle 15: Zusammensetzung eines 12%igen Polyacrylamidgels	65
Tabelle 16: Komponenten für ein 8,75%iges Polyacrylamidgel	73
Tabelle 17: Verwendete Barcodesequenzen zur Identifizierung der jeweiligen cDNA-Banken.....	77
Tabelle 18: Aufteilung der Gesamtreads auf die Gewebepools	82
Tabelle 19: Vergleich der am stärksten exprimierten miRNAs in den gesunden Prostatageweben.....	83
Tabelle 20: Induzierte miRNAs in Prostatakarzinomen zunehmender Malignitätsgrade	85
Tabelle 21: Reprimierte miRNAs in Prostatakarzinomen zunehmender Malignitätsgrade	86
Tabelle 22: Rohsequenzdaten der Illumina-Sequenzierung	177

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen der Aminosäuren

Aminosäure	Dreibuchstaben-Code	Einbuchstaben-Code
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

Verzeichnis der Abkürzungen

λ	Wellenlänge [nm]
α	anti
μ	Mikro-

A	Ampere
aa	Aminosäuren
Abb.	Abbildung
ADIPOR2	adiponectin receptor 2
Ago	Argonaut Protein
AKT	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2
bHLHZ	Basic-Helix-Loop-Helix-Leucin-Zipper
bp	Basenpaare
BPH	benigne Prostatahyperplasie
BSA	Bovines Serumalbumin
BTG2	BTG family, member 2
C-	Carboxy-
CAND1	cullin-associated and neddylation-dissociated 1
CASP-7	caspase 7
CDKN1B	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B
CHEK2	CHK2 checkpoint homolog
CIP	calf intestinal phosphatase
CMV	Zytomegalie Virus
c-MYC	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog
CRB3	rumbs homolog 3 (Drosophila)
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DGCR8	DiGeorge syndrome critical region gene 8
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat

Drosha	double-stranded RNA-specific endoribonuclease
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
dsRNA	doppelsträngige Ribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuraciltriphosphat
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
EBV	Epstein-Barr Virus
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDC	Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
eIF4F	eukaryotic translation initiation factor 4E
eIF6	eukaryotic translation initiation factor 6
ELAC2	elaC homolog 2
EPCAM	epithelial cell adhesion molecule
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERG	v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog (avian)
ERK1	mitogen-activated protein kinase 3
ERK2	mitogen-activated protein kinase 1
ETS	E26 transformations-spezifisch
ETV1	ets variant 1
ETV4	ets variant 4
F11R	F11 receptor
FASN	fatty acid synthase
FKS	fötales Kälberserum
FOXA-1	Forkhead box protein A1
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H2O(bi)dest	(bi)destilliertes Wasser
HEF1	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 9
HEK	Human Embryonic Kidney

HMGA2	high mobility group AT-hook 2
hnRNP-K	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K
IPTG	Isopropylthiogalactosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KRAS	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
KSHV	Kaposi Sarkom assoziiertes Herpes Virus
LB	Luria's Broth
m	Milli-
M	molar
MCS	Multiple Cloning Site
MHC-I	major histocompatibility complex, class I
min	Minute
miR	microRNA
miRNA	microRNA
MMP11	matrix metalloproteinase 11 (stromelysin 3)
MOB1A	MOB kinase activator 1A
mRNA	messenger RNA
mTOR	mechanistic target of rapamycin
ms	Millisekunde
MSR1	macrophage scavenger receptor 1
MST1	macrophage stimulating 1
mut	Mutante
MYO6	Myosin VI
N-	Amino-
NaAc	Natriumacetat
NEB	New England Biolabs
NKX3.1	NK3 homeobox 1
NLK	nemo-like kinase
NP40	Nonoxil 40
NSB1	Gen des Nijmegen breakage syndrome
nt	Nukleotid
O ₂	Sauerstoff

OD	optische Dichte
ORF	open reading frame
ori	Ursprung der Plasmidreplikation (origin of replication)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
P-Bodies	Processing Bodies
PBS	phosphate buffered saline
PBX3	pre-B-cell leukemia homeobox 3
PCa	Prostate carcinoma
PCR	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PHLPP1	PH domain leucine-rich repeat protein phosphatase 1
PHLPP2	PH domain leucine-rich repeat protein phosphatase 2
PKC	proline-rich transmembrane protein 2
PLAU	plasminogen activator, urokinase
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIN	prostatistische intraepithelialen Neoplasien
piRNA	piwi-interacting RNA
PNPase	polyribonucleotide nucleotidyltransferase 1
pox	Peroxidase
pre-miR	precursor microRNA
pri-miR	primary microRNA
PSA	Prostataspezifisches Antigen
PTEN	Phosphatase and tensin homologue
PVC	Polyvinylchlorid
p53	protein 53
Rb	Retinoblastom
RISC	RNA induced silencing complex
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
RNASEL	Ribonuclease L
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RRP41	exosome component 4

RT	Raumtemperatur
S6K	ribosomal protein S6 kinase
SB	Sample Buffer
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEC23A	Sec23 homolog A
SEC62	SEC62 homolog
sek	Sekunden
SERPIN5	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 5
SETDB1	Histone-Lysin-N-Methyltransferase
SH3GLB1	SH3-domain GRB2-like endophilin B1
siRNA	small interfering RNA,
SOB	Super Optimal Broth
STAT5	signal transducer and activator of transcription 5
SV40	simian virus 40
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat- Ethylendiamintetraacetat
Taq	Thermus aquaticus
TE	Tris- Ethylendiamintetraacetat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TMPRSS2	Transmembran Serin Protease
TRBP	the HIV-1 TAR RNA binding protein
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
UTR	untranslated region
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen (volume per volume)
w/v	Gewicht pro Volumen (weight per volume)
wt	Wildtyp
XRN1	5'-3' exoribonuclease 1
ZEB1	zinc finger E-box binding homeobox 1
ZEB2	zinc finger E-box binding homeobox 2

1. Zusammenfassung

Obwohl der Prostatakrebs weltweit die am zweithäufigsten diagnostizierte Krebserkrankung des Mannes repräsentiert, sind die molekularen Mechanismen der Karzinogenese und der Metastasierung teilweise unverstanden (Ferlay et al., 2010). In den letzten Jahren häufen sich die Hinweise an der Beteiligung von miRNAs an der Entstehung, Progression und Metastasierung des Prostatakarzinoms (Maugeri-Sacca et al., 2012). Durch den Vergleich verschiedener miRNA-Expressionsprofile des Prostatakarzinoms wurde klar, dass bislang noch keine schlüssige miRNA-Signatur existiert (Maugeri-Sacca et al., 2012). Ein kürzlich veröffentlichtes miRNA-Expressionsprofil von Szczyrba et al., welche die miRNA-Expression in niedrigmalignen Prostatatumoren mit korrespondierenden nicht malignen Prostatageweben verglich, bildete die Grundlage dieser Arbeit (Szczyrba et al., 2010). Zur Erweiterung dieser Studie analysierte wurde die miRNA-Expression in organbegrenzten Prostatatumoren (pT2), in Tumoren mit extrakapsulärem Wachstum (pT3,N0) und in metastasierenden Prostatatumoren (pT3,N1) im Vergleich zu nicht malignen Prostatageweben analysiert. Es konnten zahlreiche miRNAs, deren veränderte Expression im Prostatakarzinom bereits durch Szczyrba et al. als verändert beschrieben wurde, erneut als dereguliert identifiziert werden, darunter die miR-375, welche eine starke Induktion in den metastasierenden Tumoren zeigte. Bemerkenswerterweise zeigten einige miRNAs wie miR-200b, -200c oder -106a das gleiche Expressionsmuster. Diese miRNAs waren in den nicht metastasierenden pT3-Tumoren im Vergleich zu den pT3-Tumoren mit Lymphknotenmetastasen stärker induziert. Eine anschließende Zielgen-Analyse konnte einen Zusammenhang zwischen deregulierten miRNAs und Tumorprogression bzw. Metastasierung aufdecken. SEC23A, welches im Prostatatumor reprimiert ist, konnte als Zielgen der miR-200b identifiziert werden. Von großer Bedeutung war die Identifizierung von PHLPP1 bzw. PHLPP2 als Zielgene der miR-375 bzw. -15a. Die Reduktion von PHLPP geht einher mit einer Zunahme an phosphoryliertem AKT, welches durch Induktion der Proliferation zur Prostatakarzinogenese beiträgt. Darüber hinaus könnte die Inhibierung der miR-375 und -15a zur Therapie und die Detektion dieser miRNAs im Blut zur Diagnose und Prognose des Prostatakarzinoms herangezogen werden.

2. Summary

Although prostate cancer is the second most frequently diagnosed cancer in men worldwide, the molecular mechanisms of carcinogenesis and metastasis are poorly understood (Ferlay et al., 2010). Over the last few years, evidence has grown showing that microRNAs contribute strongly to the development, progression and metastasis of prostate cancer (PCa) (Maugeri-Sacca et al., 2012). A comparison of several different miRNA expression profiles of prostate carcinomas revealed that a conclusive signature of deregulated miRNAs is still missing (Maugeri-Sacca et al., 2012). A previously published miRNA expression profile of Szczyrba et al. comparing the miRNA expression of low grade prostate carcinoma to non-malignant prostate tissue was the basis of this thesis (Szczyrba et al., 2010).

As an extension of that study, the present thesis analysed the miRNA expression of organ-confined prostate tumors (pT2), prostate tumors with extra capsular growth (pT3, N0), and lymphnode metastasizing prostate tumors (pT3, N1) compared to the miRNA expression of non-malignant prostate tissue. Several of the previously identified deregulated miRNAs were found again to be aberrantly expressed, such as miR-375 that was further up-regulated in the lymphnode metastasizing prostate tumors. Remarkably, some miRNAs such as miR-200b, -200c or -106a showed the same expression pattern. These miRNAs were strongly up-regulated in the pT3 tumors without lymphnode metastasis and then showed reduced levels in the metastasizing tumors (pT3, N1). The subsequent functional target gene analysis revealed the impact of deregulated miRNAs on tumor progression and metastasis. SEC23A that is reduced in prostate cancer was identified as a target of induced miR-200b. Importantly, PHLPP1 and PHLPP2 were verified as target genes of miR-375 and miR-15a, respectively. The reduction of PHLPP is correlated with an increase of phosphorylated AKT contributing to prostate carcinogenesis by the induction of proliferation. Moreover the inhibition of miR-375 and -15a may represent a therapeutic strategy, while the detection of these miRNAs in blood could be used for diagnosis and prognosis of prostate cancer.

3. Einleitung

3.1. Die Prostata

Die Prostata, welche auch Vorsteherdrüse genannt wird, ist eine exokrine Drüse von der Größe einer Kastanie. Sie gehört neben den Hoden, den Nebenhoden, den Samenleitern, den Samenblasen und kleineren Drüsen zu den inneren Geschlechtsorganen des Mannes. Die Prostata liegt direkt unter der Harnblase auf dem Beckenboden auf, wobei ihre abgeflachte Hinterfläche dem Rektum zugewandt ist und den ersten Abschnitt der Harnröhre (Urethra) umschließt, die Pars prostatica urethrae. Eine unelastische Bindegewebskapsel umgibt die Vorsteherdrüse, deren inneres Drüsengewebe in drei Zonen, die Außenzone, die Innenzone und die periurethrale Zone eingeteilt wird (McNeal, 1988) (Abb.1). Die periurethrale Zone umgibt die Urethra und besteht aus Drüsen, die entwicklungsbiologisch aus Divertikeln der Harnröhre entstanden sind. Die Innenzone, die etwa 25% der Prostata ausmacht, besteht aus verzweigtem Drüsengewebe und umgibt die Ducti ejaculatorii. Die Außenzone (ca.75% der Prostata) beinhaltet etwa 30-50 tubuloaveoläre Drüsen, die in einen Drüsenkörper aus glatten Muskelzellen und elastischen Fasern eingebettet sind (Abb.1).

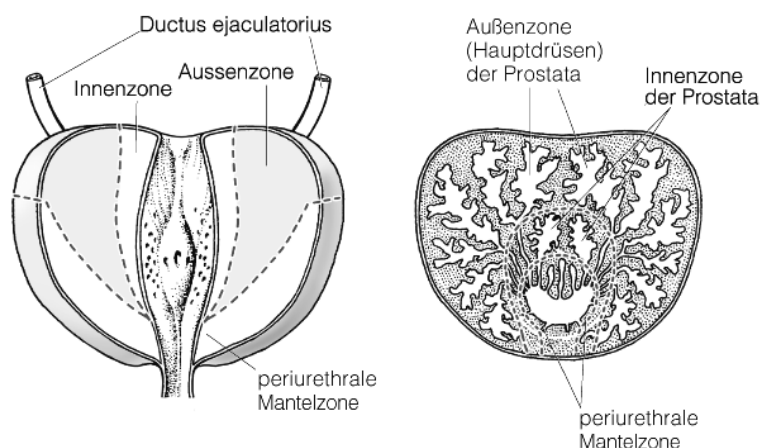


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Prostata

Hier dargestellt ist die schematische Gliederung der Prostata in drei Zonen (links), die periurethrale Zone, die Innenzone und die Außenzone, sowie ein Transversalschnitt durch die Prostata (rechts) (Quelle: (Schiebler, 2007)).

Die Produktion eines dünnflüssigen, leicht sauren Sekrets, welches während der Ejakulation durch Kontraktion der glatten Muskulatur durch 15-20 Ausführungsgänge in die Urethra abgegeben wird, stellt die Hauptfunktion der Prostata dar. Ungefähr 30% der Flüssigkeitsmenge des Ejakulates sind auf dieses Sekret zurückzuführen. Das Sekret der Prostata besteht aus Zink, Zitronensäure, Prostaglandinen, Spermin, Spermidin, Immunglobulinen, sauren Phosphatasen sowie Proteasen und besitzt einen pH-Wert von 6,4, welcher das Überleben der Spermien im sauren Milieu des Vaginaltrakts verlängert. Darüber hinaus verhindert die Prostata bei der Miktion das Eindringen von Urin, indem sie Samenleiter und Drüsengänge verschließt. Des Weiteren wird in der Prostata Testosteron in seine biologisch aktivste Form, das Dihydrotestosteron, umgewandelt, welches die Entwicklung und die Funktionalität der Prostata kontrolliert (Schiebler T. H., Korf H.-W.; Anatomie, 10. Auflage, 2007).

3.2. Das Prostatakarzinom

3.2.1. Epidemiologie und Risikofaktoren des Prostatakarzinoms

Im Verlauf der letzten Jahrzehnte wurde dem Prostatakarzinom weltweit eine stetig wachsende Bedeutung zu Teil. Im Jahr 2008 war Prostatakrebs die am häufigsten diagnostizierte Krebserkrankung in der männlichen Bevölkerung der westlichen Welt und die zweithäufigste krebsbedingte Todesursache (Bray et al., 2013). In Deutschland besaß das Prostatakarzinom im Jahr 2008 prozentual den größten Anteil an allen Krebsneuerkrankungen, noch vor Darm- und Lungenkrebs und den drittgrößten Anteil an allen Krebssterbefällen hinter Lungen- und Darmkrebs. In diesem Jahr lag die Zahl der Prostatakrebsneuerkrankungen laut Robert Koch-Institut bei 63440, was 25,7% aller neudiagnostizierten Krebserkrankungen entsprach. Darüber hinaus verstarben 12134 Patienten am Prostatakarzinom. Dies repräsentiert 10,5% aller krebsbedingten Todesursachen. Insgesamt haben sich die Überlebensraten für Krebs erheblich verbessert, so dass die 5-Jahres-Überlebensrate für Prostatakrebs mit 92% die zweithöchste Überlebensrate in Deutschland ist, direkt hinter Hodenkrebs mit 96%. Der Anstieg der Prostatakrebs-Inzidenz, sowie die gesteigerte 5-Jahres-Überlebensrate beruht auf der früheren Diagnosestellung durch den prostataspezifischen Antigen (PSA)-Test. Das Prostatakrebscreening hat auch

einen Einfluß auf die Stadienverteilung, so dass T₁- und T₂-Stadien zusammengefasst einen Anteil von 76% und T₄-Stadien von lediglich 3% besitzen (Robert-Koch-Institut, 2012).

Die genauen Ursachen für die Prostatakrebsentstehung und -progression sind bislang im Wesentlichen unverstanden. Die Risikofaktoren für diese Erkrankung können grob in endogene und exogene Risikofaktoren eingeteilt werden. Zu den endogenen Risikofaktoren zählen der Alterungsprozess, die Familiengeschichte, die Wirkung von Hormonen und die Rassenzugehörigkeit (Bostwick et al., 2004). Das Alter stellt einen wichtigen Hauptrisikofaktor dar. Das Risiko eines 40-jährigen Mannes innerhalb der nächsten zehn Jahre am Prostatakarzinom zu erkranken liegt bei 0,1%, wohingegen das Risiko eines 70-jährigen schon 6,6% beträgt. Daher gilt der Prostatakrebs als Erkrankung des älteren Mannes mit einem mittleren Erkrankungsalter von 70 Jahren (Lew and Garfinkel, 1990). Eine hereditäre Prädisposition für das Prostatakarzinom konnte bereits bestätigt werden, so dass Männer deren Väter oder Brüder an Prostatakrebs erkrankten ein etwa doppeltes Erkrankungsrisiko besitzen (Steinberg et al., 1990), wobei noch nicht vollkommen geklärt werden konnte, welche vererblichen Genveränderungen dafür verantwortlich sind. Neuste Erkenntnisse zeigen zum Beispiel, dass die G84E-Mutation im HOXB13-Gen das Risiko von Nordeuropäern steigert, ein Prostatakarzinom zu entwickeln (Chen et al., 2013; Stott-Miller et al., 2013). Hormone, wie die Gruppe der Androgene, sind in der Lage das Prostataatumorwachstum zu beeinflussen, wobei die Hormonniveaus von endogenen und auch exogenen Faktoren kontrolliert werden können (Bostwick et al., 2004). Abhängig von der Rassenzugehörigkeit ergeben sich verschiedene hohe Risiken an Prostatakrebs zu erkranken. Dabei spielen Faktoren, wie die unterschiedliche Ernährungsweise und der unterschiedliche genetische Hintergrund, eine Rolle, daher erkranken Amerikaner afrikanischer Abstammung häufiger an Prostatakrebs als Amerikaner mit europäischen Wurzeln (Crawford, 2009). Exogene Risikofaktoren sind zum einen die Ernährungsweise und zum anderen verschiedene Umwelteinflüsse. Unterschiedliche Diäten können die Prostatakrebsentstehung fördern oder davor schützen, z.B. steigt bei erhöhtem Fettkonsum die Wahrscheinlichkeit einen Prostataatumor zu entwickeln (Armstrong and Doll, 1975).

3.2.2. Histopathologie, Klassifikation und Diagnostik des Prostatakarzinoms

Das am häufigsten diagnostizierte Prostatakarzinom ist mit 95% das Adenokarzinom der Prostata. Die prostatistischen Adenokarzinome entstehen zu 85% im Drüsenepithel der peripheren Zone und zu 15% in den zentralen Innendrüsen. Ungefähr drei Prozent aller diagnostizierten Prostatatumore entstammen dem Übergangsgewebe zur Pars prostatica und sind somit urothelien Ursprungs. Darüber hinaus gibt es eine Reihe sehr seltener Prostatakarzinome, wie muzinöse, papillärduktale, adenoidzystische Karzinome, sowie Transitionalzell- und Plattenepithelkarzinome. Zu den wichtigsten Erkenntnissen der Prostatapathologie zählt die Entdeckung der prostatistischen intraepithelialen Neoplasie (PIN), welche durch dysplastische Veränderungen des sekretorischen Epithels der Drüsengänge der Prostata entsteht (Bostwick and Brawer, 1987). Je nach Grad der Dysplasie wird zwischen Low- und High-grade PIN unterschieden, wobei nach heutigem Kenntnisstand nur die High-grade PIN als Vorstufe des klinisch relevanten Prostatakarzinoms gilt (Bostwick and Cheng, 2012).

Zur Klassifikation und Einschätzung der Progression des Prostatakarzinoms werden zum einen die TNM-Klassifikation, welche die Ausbreitung des Prostatatumors charakterisiert und zum anderen das Gleason-Grading-System, welches den Differenzierungsgrad des Tumors beschreibt, herangezogen.

Die TNM-Klassifikation wurde zwischen 1943 und 1952 von Pierre Denoix entwickelt und wird seither von der *Union internationale contre le cancer* (UICC) in regelmäßigen Abständen aktualisiert (Harmer et al., 1970). Sie charakterisiert das Tumorstadium, indem die Größe, die lokale Ausbreitung und die Metastasierung des jeweiligen Tumors angegeben werden. Dabei steht „T“ für lokale Ausbreitung des Tumors, „N“ für den Befall von Lymphknoten und „M“ für das Auftreten sowie die Lokalisation von Fernmetastasen (Tab.1).

Tabelle 1: TNM-Klassifikation des Prostatakarzinoms (Sobin, 2009)

Stadium	Definition
Primärtumor	
Tx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	kein Anhalt für einen Primärtumor
T1	klinisch nicht fassbarer Tumor, nicht tastbar oder durch bildgebende Verfahren darstellbar
T1a	inzidentieller Tumor, histologisch <5% des rezidierten Gewebes
T1b	inzidentieller Tumor, histologisch >5% des rezidierten Gewebes
T1c	Tumor durch Nadelbiopsie diagnostiziert
T2	Tumor beschränkt sich auf Prostata
T2a	Tumor befällt die Hälfte eines Prostatalappens
T2b	Tumor befällt mehr als die Hälfte eines Prostatalappens
T2c	Tumor befällt beide Prostatalappen
T3	Tumor breitet sich über die Prostata kapsel hinaus aus
T3a	extrakapsuläre Ausbreitung (ein- oder beidseitig)
T3b	Tumor infiltriert Samenblasen
T4	Tumor befällt weitere Nachbarstrukturen außer den Samenblasen
Lymphknotenstatus	
Nx	regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	kein Anhalt für Lymphknotenmetastasen
N1	regionärer Lymphknotenbefall
Fernmetastasen	
Mx	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	kein Anhalt für Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen
M1a	extraregionärer Lymphknotenbefall
M1b	Knochenmetastasen
M1c	andere Manifestation

Zur histologischen Beurteilung des Differenzierungsgrades des Prostata tumors, welcher mit der Aggressivität korreliert, wird das Gleason-Grading-System verwendet. Dieses System wurde 1966 von Donald F. Gleason entwickelt (Gleason, 1966) und ist das einzige international akzeptierte Graduierungssystem, das als Referenz für therapeutische Maßnahmen herangezogen wird (Lopez-Beltran et al., 2006). Zur Einteilung nach Gleason wird das strukturelle Wachstumsmuster des Tumors unter Berücksichtigung der unterschiedlich differenzierten Drüsenstruktur herangezogen. Dabei werden die verschiedenen Muster mit Hilfe eines Punktesystems von 1 bis 5 bewertet. Stark differenzierte Drüsenstrukturen erhalten einen Punkt und sehr gering differenzierte fünf Punkte (Abb.2). Da Tumore häufig mehrere Wachstumsmuster beinhalten, werden nur die beiden Muster bewertet, die den größten und zweitgrößten Anteil des Tumors repräsentieren und ihre Punktezahlen addiert. Dadurch ergibt sich ein Bewertungssystem mit Ziffern von 2 (1+1) bis 10 (5+5), der sogenannte Gleason Score. Da die Prognose mit dem Gleason Score korreliert, gelten Prostatakarzinome mit einem Gleason Score von 8 bis 10 als Hochrisiko- und solche mit einem Score von ≤ 7 als Niedrigrisikotumore (Gleason, 1992; Thompson et al., 2007).

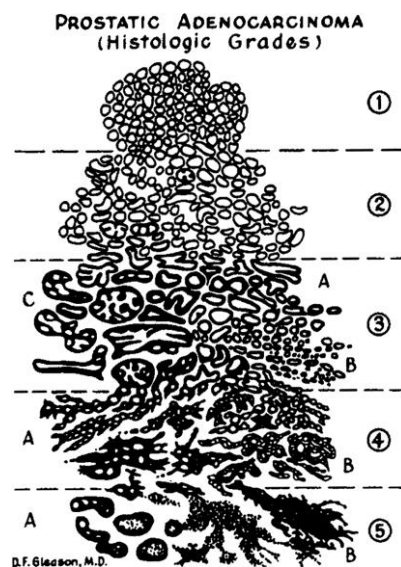


Abbildung 2: Einteilung der Drüsenmorphologie nach Gleason

Hier dargestellt ist die histopathologische Einteilung der prostatistischen Drüsenmorphologie nach D. F. Gleason (1 = sehr gut differenzierte Drüsenform, 2 = gut differenzierte Drüsenform, 3 = variable Drüsenform mit Invasion von Drüsenzellen in das Stroma, 4 = Drüsenform nicht mehr einzeln abgrenzbar, 5 = kein Drüsenmuster mehr zu erkennen) (Gleason, 1966).

Zur Früherkennung und Diagnose des Prostatakarzinoms stehen heute mehrere Verfahren, wie die digitale Rektaluntersuchung, der PSA-Test, die transrektale Ultraschalluntersuchung, die Prostatabiopsie und bildgebende Verfahren wie Computer- oder Magnetresonanztomographie zur Auswahl. Zur Prostatakrebsdiagnostik wurde Ende der 1980er Jahre der prostataspezifische Antigen Test (PSA) entwickelt (Baron et al., 1988), der mittlerweile zur Vorsorge eingesetzt wird. Das prostataspezifische Antigen ist eine Serinprotease, die als organspezifischer Marker fungiert, da es nur von Epithelzellen der Prostata drüsen sezerniert wird. Da die erhöhte PSA-Sekretion nicht nur bei Prostatakarzinomem, sondern auch bei benigner Prostatahyperplasie (BPH) auftritt, ist das PSA kein tumorspezifischer Marker (Armitage et al., 1988). Darüber hinaus konnten erhöhte PSA-Niveaus auch bei Harnretention, Prostatitis oder rektaler Palpation der Prostata gemessen werden. Da Karzinomgewebe aber etwa zehnmal mehr PSA sezerniert als Adenomgewebe, kann das PSA dennoch als Tumormarker verwendet werden (Jung et al., 1999; Lein et al., 1999). Der Grenzwert für einen Karzinomverdacht liegt bei einem 60-jährigen Patienten bei 4ng/ml. Daher wird der PSA-Test lediglich zur Vorsorgeuntersuchung eingesetzt, weil er nur einen Hinweis auf eine mögliche Entartung des Prostatagewebes liefert. Um eine

eindeutige Diagnose stellen zu können, wird inzwischen eine Kombination aus PSA-Test, digitaler Rektaluntersuchung und Biopsie eingesetzt, wobei die endgültige Bestätigung der Diagnose des Prostatakarzinoms erst nach anschließender, positiver histologischer Begutachtung der Stanzbiopsie erfolgt. Aufgrund der Tatsache, dass manche Prostatakarzinome nur sehr wenig PSA sezernieren (Frauscher et al., 2003), ist es notwendig zur Früherkennung neue, spezifische Biomarker zu entwickeln.

3.2.3. Entstehung des Prostatakarzinoms

Da Prostatakarzinome sich durch eine starke Heterogenität auszeichnen, sind die molekularen Ursachen der Tumorentstehung und -progression weitgehend unverstanden (Scardino, 2000). Es gilt als erwiesen, dass eine Vielzahl genetischer Veränderungen zur Entstehung des Prostatakarzinoms beitragen (Carter et al., 1990). Dazu gehören die Überexpression von Onkogenen, die Repression von Tumorsuppressoren, hereditäre Prädispositionen und durch Translokationen entstandene Genfusionen. Diese Tumorsuppressorgene und Onkogene sind in sehr instabilen Chromosomenregionen gelegen, welche häufig im Verlauf der Tumorphysion deletiert oder amplifiziert werden.

Mehrere Studien belegen, dass eine Vielzahl von Onkogenen wie c-MYC, BCL-2, STAT5, FOXA1 und EGFR im Prostatakarzinom durch Mutationen, Genamplifikationen oder verstärkte transkriptionelle Aktivierung durch Androgene oder andere Wachstumsfaktoren überexprimiert werden (Buttyan et al., 1987; Djakiew, 2000; Katoh et al., 2013; Kazansky et al., 2003; McDonnell et al., 1992; Perner et al., 2007). Eine Erhöhung der Kopienzahl des c-MYC-Onkogens ist zum Beispiel mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Tsuchiya et al., 2002) und tritt im verstärkten Maße bei Lymphknoten- und Fernmetastasen auf (Bubendorf et al., 1999).

Zusätzlich führt der Funktionsverlust von Tumorsuppressorgenen durch Mutationen, Deletionen oder epigenetische Veränderungen zur Entstehung und Progression von Prostatakarzinomen (Phillips et al., 1994). Die Expression der Tumorsuppressorgene p53, CDKN1B, Rb, NKX-3.1, PTEN, PHLPP1 und PHLPP2 ist im Prostatakarzinom erniedrigt (Brooks et al., 1995; Chen et al., 2002; Gao et al., 1997; Narla et al., 2001; Nelson et al., 2001; Sun et al., 1999). Durch Inhibition des Phosphatidylinositol-3-

Kinase (PI3K) Signalwegs, wirkt PTEN als Tumorsuppressor, da eine Aktivierung des PI3K-Signalwegs eine verstärkte Zellproliferation, -wachstum und ein besseres Überleben der Tumorzelle bewirkt (Sun et al., 1999; Vazquez and Sellers, 2000). Des Weiteren greifen auch PHLPP1 und PHLPP2 in den PI3K-Signalweg ein, indem sie verschiedene Isoformen von AKT dephosphorylieren und damit inaktivieren (O'Neill et al., 2013). Dies führt ebenfalls zu einer Inhibition dieses Pathways, so dass ein Verlust der PHLPP1/PHLPP2-Expression ebenso wie der Verlust von PTEN zu einer verstärkten Tumorzellproliferation und besserem Tumorzellüberleben führt (Molina et al., 2012). So entwickeln PTEN/PHLPP-Knockout Mäuse zum Beispiel verstärkt Prostatakarzinome (Chen et al., 2011).

Weniger als fünf Prozent aller Prostatakarzinome können mit einer hereditären Prädisposition in Verbindung gebracht werden (Carter et al., 1992; Carter et al., 1993). Dazu gehören Prostataatumoren mit Polymorphismen in den Genen ELAC2, RNASEL, MSR1, NSB1 und CHEK2 (Cybulski et al., 2004; Hughes et al., 2005; Rebbeck et al., 2000; Rennert et al., 2002; Xu et al., 2002). Eine Vielzahl dieser Gene ist sowohl in den hereditär als auch in den sporadisch auftretenden Karzinomen mutiert, wie zum Beispiel die Gene RNASEL, MSR1, NSB1 und CHEK2. Obwohl das Prostatakarzinom epidemiologisch in hereditäre und spontane Formen unterteilt wird, ist es bisher nicht möglich dies auf genetischer Ebene nachzuvollziehen.

Zu den genetischen Besonderheiten des Prostatakarzinoms zählen Genfusionen zwischen der Familie der onkogenen ETS-Transkriptionsfaktoren und dem androgensensitiven TMPRSS2-Gen, welche durch chromosomale Rearrangements wie Translokationen, Deletionen oder Inversionen ausgelöst werden (Tomlins et al., 2005). Durch diese Genfusion kommt es zur Überexpression der onkogenen ETS-Transkriptionsfaktoren (Iljin et al., 2006; Rubin and Chinnaiyan, 2006; Tomlins et al., 2006). Die am häufigsten identifizierte Fusionsart ist die TMPRSS2-ERG-Genfusion, welche in 50-70% aller Prostataatumoren nachgewiesen werden konnte (Park et al., 2010).

3.3. RNA-Interferenz

Im Jahre 1990 wurde die RNA-Interferenz (RNAi), ein Mechanismus zur posttranskriptionellen Regulation der Genexpression durch nichtkodierende RNA-Moleküle, zum ersten Mal in Pflanzen beobachtet, als Napoli et. al. versuchten, die Blütenfarbe von Petunien zu intensivieren. Dazu wurde eine zusätzliche Genkopie eines Schlüsselenzyms der Farbstoffsynthese in die Petunien eingebracht. Aber der erwartete Effekt, d.h. eine intensivere Blütenfärbung, blieb aus, wobei die manipulierten Pflanzen sogar schwächer gefärbte oder sogar weiße Blütenblätter entwickelten (Napoli et al., 1990). Etwa drei Jahre danach wurde bei entwicklungsbiologischen Studien an Entwicklungsmutanten von *C. elegans* entdeckt, dass das lin-4 Gen nicht für ein Protein, sondern für ein kleines 22 nt langes RNA-Molekül kodiert, welches eine Komplementarität zu mehreren Sequenzen in der 3'UTR der lin-14 mRNA aufweist. Die nichtkodierende lin-4-RNA war in der Lage durch Bindung an die lin-14 mRNA, dessen Proteinexpression zu inhibieren und so die Entwicklung des Nematoden zu beeinflussen (Lee et al., 1993; Wightman et al., 1993). Durch Studien an *C. elegans* konnten Graig Mello und Andrew Fire im Jahre 1998 zeigen, dass die Expression eines Nematodengens durch Einbringen entsprechender, spezifischer, doppelsträngiger RNAs negativ reguliert wird, wofür sie im Jahr 2006 den Medizin Nobelpreis erhielten (Fire et al., 1998). Nur ein Jahr später wiesen Andrew Hamilton und David Baulcombe nach, dass an der posttranskriptionellen Regulation der Proteinexpression 21-23 nt lange RNAs beteiligt waren, die den Abbau der Ziel-mRNA bewirkten (Hamilton and Baulcombe, 1999). Reinhart et al. entdeckten im Jahr 2000 eine weitere kleine RNA, welche vom let-7 Gen kodiert wird und die Expression des lin-41 Proteins steuert (Reinhart et al., 2000). Im Jahre 2001 wurden diese kleinen RNA-Moleküle erstmals als microRNAs bezeichnet (Ruvkun, 2001). Aufgrund der unterschiedlichen Prozessierung dieser kleinen RNAs werden sie in drei Klassen eingeteilt: siRNA (small interfering RNA), piRNA (piwi-interacting RNA) und miRNA (microRNA). Nach der Entschlüsselung der Wirkweise der RNA-Interferenz liegt nun der Fokus der Forschung auf der Identifizierung von Zielgenen dieser kleinen RNAs, um ihre Rolle in der Regulation physiologischer Prozesse näher zu ergründen.

3.4. microRNAs

Im Jahre 2001 entdeckten mehrere Arbeitsgruppen auf der Suche nach endogenen dsRNA-Molekülen, welche mRNA-Degradation vermitteln, neue microRNAs (Lagos-Quintana et al., 2001; Lau et al., 2001; Lee and Ambros, 2001). MicroRNAs besitzen eine zentrale Rolle bei der posttranskriptionellen Regulation der Genexpression und sind Teil eines großen genregulatorischen Netzwerks (Meister, 2007). Sie konnten bislang in vielen verschiedenen Organismen, darunter Vertebraten, Nematoden, Insekten und Pflanzen (Bartel, 2004), aber auch in Viren wie EBV, CMV, KSHV und SV40 nachgewiesen werden (Cai et al., 2006; Cullen, 2006; Pfeffer et al., 2005; Pfeffer et al., 2004; Sullivan et al., 2005). Dabei zeigte sich, dass die Sequenzen der microRNAs nicht nur zwischen eng verwandten, sondern auch zwischen weitläufig verwandten Arten hoch konserviert sind (Lim et al., 2003). Laut Definition sind microRNAs ~22 nt lange, endogene, nicht kodierende RNAs mit der Fähigkeit die Expression eines Gens sequenzspezifisch zu regulieren (Ambros et al., 2003). Bislang sind 1600 humane microRNA-Vorläufersequenzen und 2042 reife, humane microRNAs in der miRBase-Datenbank gelistet (Griffiths-Jones, 2004; Griffiths-Jones et al., 2006; Griffiths-Jones et al., 2008; Kozomara and Griffiths-Jones, 2011). Schätzungen zu Folge kodieren ca. 3% aller humanen Gene für microRNAs (Sen et al., 2009). Die Anordnung der microRNA-Gene ist sehr differentiell. Dabei können microRNAs sowohl einzeln als auch in Genclustern vorkommen, wobei manche microRNA-Gene in intergenischen Sequenzbereichen, welche als eigene unabhängige Transkriptionseinheiten funktionieren, kodiert sind (Lau et al., 2001). Der Hauptanteil aller microRNA-Gene liegt innerhalb von Introns oder Exons Proteinkodierender oder nicht-kodierender Gensequenzen (Rodriguez et al., 2004). Vermutungen zu Folge besitzen diese microRNA-Gene keine eigenen Promotoren, sondern werden aus den Introns bzw. Exons der Gensequenzen prozessiert in denen sie liegen (Aravin et al., 2003; Lai et al., 2003).

Die Biogenese der reifen microRNAs erfolgt über mehrere Prozessierungsschritte an denen wichtige Endonukleasen beteiligt sind (Abb.3)(Cordes et al., 2010). Die Transkription des miRNA-Gens erfolgt im Nukleus durch die RNA-Poymerase II (Lee et al., 2004; Zhou et al., 2007) und in seltenen Fällen durch die RNA-Polymerase III (Borchert et al., 2006). Dadurch entsteht ein mehrere Kilobasen langes miRNA-

Transkript, welches primäre microRNA (pri-miRNA) genannt wird. Die pri-miRNA besitzt eine typische Haarnadelstruktur und weist ähnlich einer mRNA am 5'-Ende eine 7-Methyl-Guanosin-Kappe und am 3'-Ende einen Poly(A)-Schwanz auf (Cai et al., 2004; Lee et al., 2004). Darauf erkennt ein Mikroprozessorkomplex aus dsRNA spezifischen RNase III Drosha und dem dsRNA bindenden Protein DGCR8 (Di-George syndrome critical region gene 8) die charakteristische Haarnadelstruktur der pri-miRNA und schneidet ihre 5'-und 3'-Überhänge ab (Gregory et al., 2006; Han et al., 2004). Dadurch entsteht ein ~60-100 nt lange Vorläufer-miRNA mit „stem-loop“-Struktur, welche auch als precursor-miRNA (pre-miRNA) bezeichnet wird. Diese Vorläufer-miRNA besitzt am 3'-Ende einen zwei Nukleotid langen Überhang (Zeng and Cullen, 2003). Neuste Studien beschreiben eine zweite Möglichkeit pre-miRNAs durch das direkte Spleißen sogenannter „Mirtrons“ aus Introns zu erzeugen, wobei die Prozessierung durch den Mikroprozessorkomplex umgangen wird (Berezikov et al., 2007; Ladewig et al., 2012; Sibley et al., 2012). Anschließend wird die pre-miRNA mittels Exportin 5 unter GTP-Verbrauch aktiv aus dem Nukleus ins Cytoplasma transportiert (Lund et al., 2004; Yi et al., 2003). Ein Komplex aus der RNase III Dicer und dem dsRNA bindenden Protein TRBP (immunodeficiency virus transactivating response RNA binding protein) prozessiert die pre-miRNA im Cytoplasma, indem in der Nähe der terminalen Schleife so geschnitten wird, dass ein ~22 nt langer, imperfekter miRNA-Duplex entsteht (Grishok et al., 2001; Hutvagner et al., 2001; Ketting et al., 2001). Nur die einzelsträngige, reife miRNA wird durch Ago2 rekrutiert und in den Ribonukleoproteinkomplex namens RISC (RNA induced silencing complex) integriert, wobei der zur reifen miRNA komplementäre Strang meist abgebaut wird. Dabei repräsentiert der Einzelstrang des miRNA-Duplex, welcher an seinem 5'-Ende die schwächere Basenpaar-Bindung besitzt, die reife miRNA (Khvorova et al., 2003; Schwarz et al., 2003; Wiemer, 2007). Darüber hinaus können in einigen Fällen auch beide miRNA-Stränge des miRNA-Duplex als reife miRNA fungieren und in den RISC-Komplex eingelagert werden (Okamura et al., 2008). Die wichtigsten Bestandteile des RISC-Komplex bilden die Argonaut-Proteine 1-4. Der Prozess der Zusammenlagerung des RISC-Komplex und die Funktionen der einzelnen Komponenten sind weitgehend unverstanden (Mourelatos et al., 2002). Nach der Einlagerung der reifen miRNA in den RISC-Komplex (miRISC-Komplex) gelangt dieser zur Ziel-mRNA und beeinflusst die Proteinexpression abhängig von der

Komplementarität der miRNA mit der Ziel-mRNA. Einerseits kommt es bei perfekter Komplementarität von miRNA und 3'UTR der Ziel-mRNA zur Degradierung der mRNA und andererseits bei imperfekter Komplementarität zur Repression der Translation (Bartel, 2004; Engels and Hutvagner, 2006). Da die meisten miRNAs nur teilweise komplementär zur 3'UTR der Ziel-mRNA sind, wobei hierbei die Nukleotide 2-8 der reifen miRNA, welche als Seed-Sequenz bezeichnet werden, die wichtigste Funktion besitzen, kommt es am häufigsten zu einer Repression der Translation (Lewis et al., 2005). Darüber hinaus sind manche miRNAs in der Lage die Translation der Ziel-mRNA auch durch Bindung an deren 5'UTR oder an Sequenzen im offenen Leserahmen zu regulieren (Lytle et al., 2007; Moretti et al., 2010; Qin et al., 2010) und was noch erstaunlicher ist, sogar die Proteintranslation in Zellen im Zellzyklusarrest zu induzieren (Vasudevan et al., 2007).

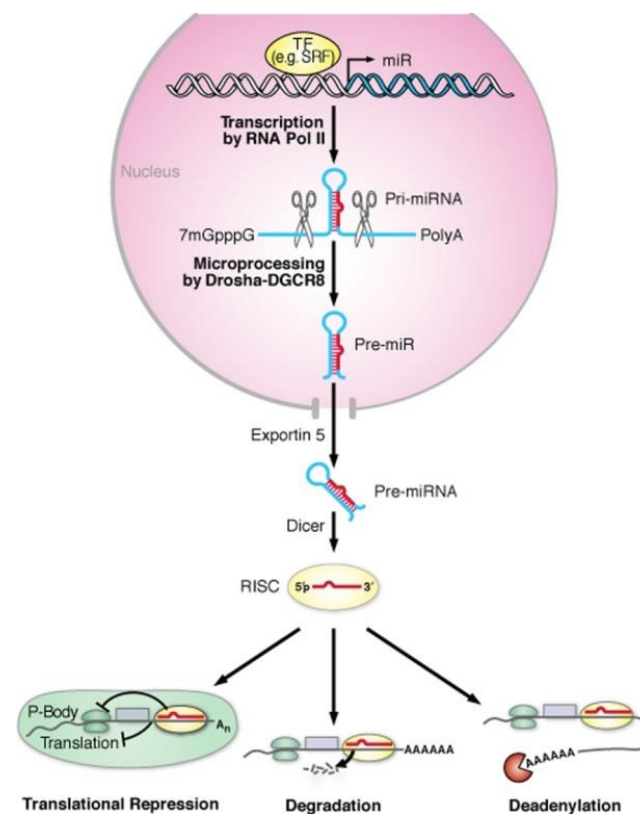


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Biogenese und Funktion humaner miRNAs (Cordes et al., 2010)

Zunächst erfolgt die Transkription der miRNA-Gene durch die RNA-Polymerase II im Nucleus. Darauf wird die entstandene pri-miRNA durch Drosha und DGCR8 zur pre-miRNA prozessiert und die GTP-abhängig mit Hilfe des Exportin 5 ins Cytoplasma transportiert. Dort erfolgt die Prozessierung der pre-miRNA durch Dicer in einen ~22 nt langen miRNA-Duplex, wobei der Strang mit der schwächsten Basenpaarung am 5'Ende die reife miRNA repräsentiert, welche in den RISC-Komplex integriert wird. Danach bewirkt der mit reifer miRNA beladene RISC-Komplex, entweder die Repression der Translation, den Abbau oder die Deadenylierung der Ziel-mRNA.

Bislang sind die Mechanismen der miRNA-vermittelten Translationskontrolle weitgehend unbekannt. Zurzeit werden verschiedene Hypothesen diskutiert und es wäre nicht unwahrscheinlich, dass mehrere Mechanismen daran beteiligt wären (Abb.4) (Carthew and Sontheimer, 2009; Fabian et al., 2010). Zu diesen Mechanismen zählt der Abbau der mRNA durch Bindung des miRISC-Komplex, wobei die Zahl, die Art und die Position von Basenfehlpaarungen im miRNA/mRNA-Duplex diesen zu begünstigen scheinen (Aleman et al., 2007). Eine zweite Hypothese besagt, dass durch die Anlagerung des RISC-Komplexes an eine bereits translatierte Ziel-mRNA die Translationselongation verlangsamt wird bis hin zu einem sogenannten „ribosomal drop-off“, wobei die Ribosome von der mRNA dissoziieren (Petersen et al., 2006). Eine weitere Möglichkeit wäre die Inhibierung der Initiation der Translation. Bis dato wurden zwei Modelle entwickelt. Dazu zählt zum einem die Inhibition der Bindung von eIF4F an die die 5'-Cap-Struktur der mRNA (Mathonnet et al., 2007), und zum anderen die Hemmung der Zusammenlagerung der 60S und 40S Ribosomenuntereinheiten durch Bindung von AGO2 an eIF6 und die 60S-Untereinheit (Chendrimada et al., 2007). Weiterhin könnte eine Deadenylierung der mRNA gefolgt von dem Entfernen der 5'-Cap-Struktur eine Zirkularisierung der mRNA zur effizienten Translation verhindern und zum Abbau führen (Carthew and Sontheimer, 2009).

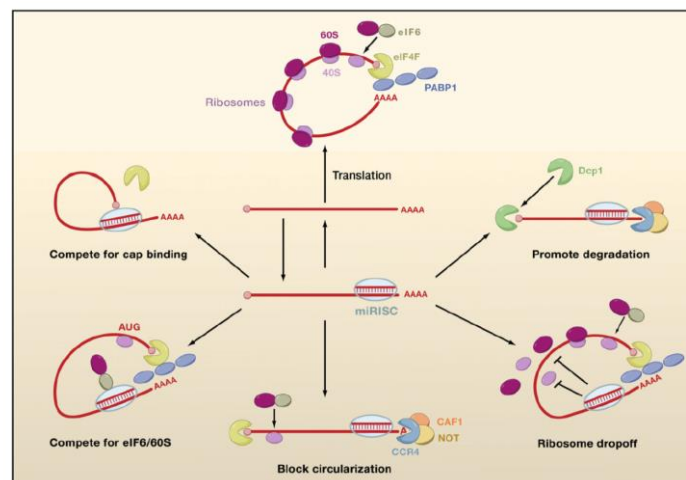


Abbildung 4: Modelle der miRNA-vermittelten Translationsregulation der Ziel-mRNA (Carthew and Sontheimer, 2009)

Einerseits könnte durch Anlagerung des miRISC-Komplex der Abbau der Ziel-mRNA erfolgen oder die Zirkularisierung des mRNA-Moleküls verhindert werden, andererseits könnte es zu einer Reprimierung der Translation durch Hemmung der 5'-Cap-Erkennung, Inhibition der Bildung des 80S Ribosomenkomplex, Verlangsamung der Elongation bis hin zu einem Ribosomen „drop-off“ kommen.

Darüber hinaus konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass mRNAs, deren Translation gehemmt wurde, in sogenannten P-Bodies (Processing Bodies) zwischengelagert werden (Liu et al., 2005) und diese, obwohl die P-Bodies Enzyme zur Degradierung von mRNA enthalten, wieder translatiert werden können (Bhattacharyya et al., 2006).

Nach neusten Erkenntnissen wird auch die Expression der miRNAs selbst durch zahlreiche Mechanismen auf Ebene der miRNA-Transkription und -Prozessierung reguliert (Ruegger and Grosshans, 2012). Des Weiteren gibt es Hinweise, dass sowohl die aktive Degradierung reifer miRNAs als auch die Stabilisierung von miRNAs durch Ziel-mRNAs einen wichtigen Beitrag zur miRNA-Homöostase liefern (Ruegger and Grosshans, 2012). Obwohl angenommen wird, dass miRNAs sehr stabile RNA-Moleküle darstellen, welche über mehrere Stunden bis hin zu einigen Tagen persistieren können, zeigen neuerliche Studien, dass ein Teil der reifen miRNAs auch degradiert werden kann (Baccarini et al., 2011; Gantier et al., 2011). Mehrere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass die Enzyme XRN1, RRP41 und PNPase^{old-35} am Abbau einiger miRNAs beteiligt sein könnten (Bail et al., 2010; Das et al., 2010). Nichtsdestotrotz bleibt die Regulation der miRNA-Homöostase weitgehend unverstanden und bedarf weiterer Forschung.

Die Vorhersage von miRNA-Zielgenen mit Hilfe bioinformatischer Programme wird dadurch erschwert, dass eine perfekte Komplementarität zwischen miRNA und 3'UTR des Zielgens äußerst selten vorliegt. Dadurch erzeugen diese bioinformatischen Vorhersageprogramme eine Vielzahl falsch positiver Ergebnisse, die eine experimentelle Validierung der vorhergesagten Zielgene erforderlich machen. Dabei können oft nur wenige der vorhergesagten Ziel-Gene als tatsächliche Zielgene bestätigt werden. Nach heutigen Schätzungen werden allerdings 30% aller humanen Gene durch miRNAs reguliert (Barbato et al., 2009), somit ist davon auszugehen, dass die Regulation vieler Zielgene entweder auf kooperative Effekte mehrerer miRNAs oder auf Effekte anderer Faktoren, wie RNA-bindender Proteine zurückzuführen ist (Rajewsky, 2006).

Die Beteiligung von miRNAs an der Kontrolle zahlreicher zellulärer Prozesse, wie Wachstum, Proliferation, Entwicklung, Differenzierung und Apoptose, konnte durch unzählige Studien innerhalb der letzten Jahre nachgewiesen werden (Garzon et al., 2006; Subramanian and Steer, 2010; Wiemer, 2007; Wienholds and Plasterk, 2005).

Dadurch kann eine pathologische Variation des miRNA-Expressionsmusters Einfluss auf die Regulation vieler biologischer Vorgänge nehmen, was zur Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen (Latronico and Condorelli, 2009), neurodegenerativen Krankheiten (Bushati and Cohen, 2008), Infektionen (Cullen, 2009, 2011) und Krebs (Coppola et al., 2010) führen kann.

3.5. microRNAs und Karzinogenese

Im Jahre 2002 zeigte eine Studie von Calin et al., dass der Verlust der miRNA-15a- und -16-1-Expression in chronischer B-Zell Leukämie auf eine chromosomale Deletion zurückzuführen war. Dies gab den ersten Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen aberranter miRNA-Expression und Karzinogenese (Calin et al., 2002). Nur zwei Jahre später konnten Croce und Kollegen nachweisen, dass viele miRNA-Gene in genomisch instabilen, mit der Krebsentstehung assoziierten Regionen lokalisiert sind, die sich besonders anfällig für Deletionen und Rekombinationen zeigen (Calin et al., 2004). Daher wurden in den darauffolgenden Jahren zahlreiche miRNA-Expressionsprofile unterschiedlicher Karzinome mit Hilfe von Microarray bzw. Sequenzieretechniken erstellt, um den Zusammenhang zwischen abnormer miRNA-Expression und Karzinogenese näher zu analysieren.

Zur Erhaltung der zellulären Homöostase ist es essentiell, die miRNA-Expression präzise zu regulieren, da die aberrante miRNA-Expression stark mit der Karzinogenese assoziiert ist. Bislang konnten zahlreiche Mechanismen, die zur Deregulation der miRNA-Expression führen, aufgeklärt werden (Abb.5) (Di Leva and Croce, 2010). Einige für die miRNA-Deregulation verantwortliche Mechanismen sind auf genomischer Ebene angesiedelt. Einerseits können chromosomale Rearrangements, Genamplifikationen, -deletionen oder -mutationen die Transkription von microRNA-Genen verändern (Di Leva and Croce, 2010). Eine großangelegte Studie konnte für Brust-, Eierstock- und Hautkrebs belegen, dass für 75% aller miRNA-Gene, welche durch Amplifikation induziert bzw. durch Deletion reprimiert vorlagen, eine Korrelation zwischen der miRNA-Expression und der Kopienzahl des miRNA-Gens existiert (Eickbush et al., 2008). Andererseits kann die Fehlexpression von miRNA-Genen durch epigenetische Veränderungen, wie DNA-Methylierung und posttranslationale Histonmodifikationen, hervorgerufen werden. Suh et al. fanden heraus, dass die miR-

145-Expression im Prostatakrebs durch Hypermethylierung ihres Promotors reprimiert wird (Suh et al., 2011). Zusätzlich kann die Überexpression von onkogenen Transkriptionsfaktoren zur Induktion von miRNA-Genen führen, wie zum Beispiel c-MYC-Überexpression die verstärkte Transkription des miRNA-17/92-Clusters bedingt (O'Donnell et al., 2005). Zusätzlich ist es möglich, dass Hormone die Transkription von miRNA-Genen beeinflussen, wie das Beispiel der miR-21-Überexpression durch die Aktivität des Androgenrezeptors im Prostatakarzinom belegt (Ribas et al., 2009). Ein weiterer genomischer Mechanismus zur miRNA-Fehlexpression sind Mutationen und Polymorphismen innerhalb einer pri-miRNA-Sequenz, die zur Fehlprozessierung der reifen miRNA führen, wie dies schon für miR-15a nachgewiesen wurde (Calin et al., 2005).

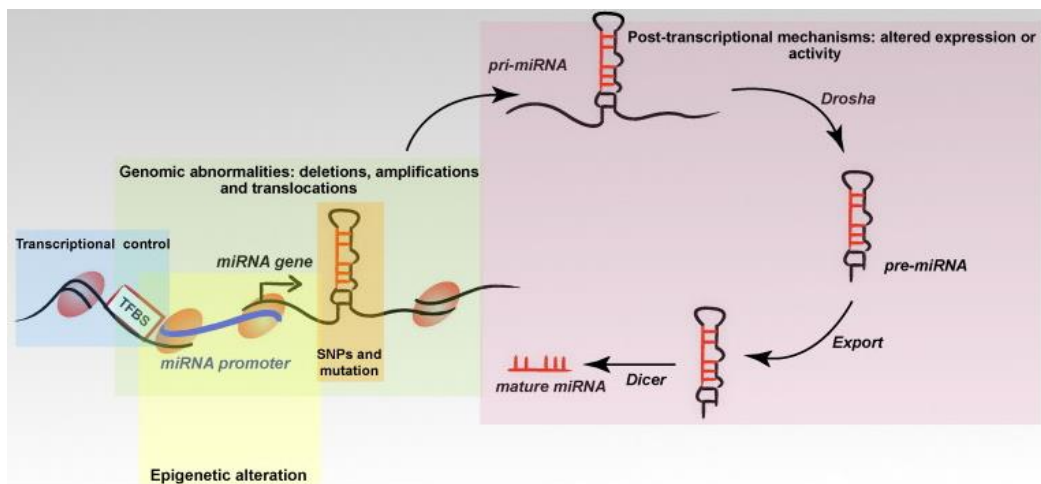


Abbildung 5: Mechanismen der Deregulation der miRNA-Expression in Karzinomen (Di Leva and Croce, 2010)

Die Mechanismen zur Deregulation der miRNA-Expression können auf verschiedenen zellulären Ebenen, der genomischen und der posttranskriptionellen Ebene, wirksam werden. Zur genomischen Ebene gehören Veränderungen des Genoms, wie Deletionen, Translokationen, Amplifikationen und Mutationen, und epigenetische Veränderungen. Zur posttranskriptionellen Ebene zählen Veränderungen in der miR-Prozessierung durch Drosha, DGCR8, Exportin 5, Dicer und TBRP.

Darüber hinaus können Fehler in der posttranskriptionellen Prozessierung von miRNAs für abnorme miRNA-Expression verantwortlich sein (Di Leva and Croce, 2010). Zum Beispiel führen Störungen in der pri-miRNA-Prozessierung durch Drosha zur Repression der miRNA-Expression in Primärtumoren (Thomson et al., 2006) oder die Überexpression von Dicer im Prostatakarzinom zu einer verstärkten miRNA-Prozessierung (Chiose et al., 2006).

Deregulierte miRNAs können einerseits wie Onkogene und andererseits wie Tumorsuppressoren fungieren, dabei ist ihre jeweilige Funktion abhängig von der Art ihres Zielgens und ihrem Expressionsniveau (Iorio and Croce, 2012). MiRNAs mit onkogener Wirkung reprimieren Tumorsuppressorgene, die ihrerseits Proliferation, Angiogenese oder Invasion inhibieren und werden im Karzinom überexprimiert (Schaefer et al., 2010a; Vrba et al., 2010). Daher werden solche miRNAs auch Oncomirs genannt. Ein Beispiel für eine Oncomir ist die miR-21, die in einer Vielzahl von Krebsarten überexprimiert wird (Budhu et al., 2010) und unter anderem den Tumorsuppressor PTEN reguliert (Meng et al., 2007a). Zudem werden miRNAs, die Onkogene regulieren als Tumorsuppressor-miRNAs bezeichnet. Diese tumorsuppressiv wirkenden miRNAs sind in Karzinomen häufig reprimiert (Schaefer et al., 2010a; Vrba et al., 2010). Die miR-145 ist ein Beispiel für eine Tumorsuppressor-miRNA, die in Karzinomen häufig reprimiert ist (Budhu et al., 2010) und c-MYC herunterreguliert (Sachdeva et al., 2009).

3.6. miRNAs und Prostatakarzinom

Aufgrund des Zusammenhangs zwischen abnormer miRNA-Expression und Tumorigenese wurden im Verlauf der letzten Jahre mehrere Studien auf Basis von Microarrays und Sequenzierungen durchgeführt, die die miRNA-Expression im gesunden Gewebe im Vergleich zur miRNA-Expression im Tumorgewebe analysierten. Dabei wurde auch die veränderte miRNA-Expression im Prostatakarzinom näher untersucht (Ozen et al., 2008; Porkka et al., 2007; Schaefer et al., 2010b; Szczyrba et al., 2010; Tong et al., 2009). Die Ergebnisse dieser Studien stimmten nur zum Teil überein, was auf die Heterogenität der untersuchten Prostatakarzinome und die Verwendung von unterschiedlichen Methoden zurückzuführen ist. In der Studie von Szczyrba et al., die sich auf eine 454-Sequenzierung von gesundem und niedermalignen Prostatagewebe stützte, wurden 33 deregulierte miRNAs gefunden. Zu den am stärksten induzierten miRNAs zählten miR-375, -148a, -200c, -106a und zu den am stärksten reprimierten miR-143, -145, -223, -30e. Mittlerweile besteht die Möglichkeit abnorm exprimierte miRNAs in Urin und Serum nachzuweisen (Hanke et al., 2009; Mitchell et al., 2008). Daher könnten solche miRNA-Expressionsprofile zur Bestimmung neuer diagnostischer Biomarker ver-

wendet werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die deregulierten miRNAs durch ihre Zielgene stark mit der Prostatakarcinogenese verknüpft sind (Lu et al., 2008; Musiyenko et al., 2008; Shi et al., 2007). So wurden zum Beispiel für die tumorsuppressiv wirkende, im Prostatakarzinom reprimierte miR-145 mehrere Zielgene bestätigt, darunter MYO6, welches an der Migration von Krebszellen beteiligt ist, sowie die Protoonkogene c-MYC und ERG (Hart et al., 1995; Hart et al., 2013; Sachdeva et al., 2009; Szczyrba et al., 2010). Des Weiteren konnten auch für die im Prostatakrebs induzierte Oncomir miR-21 einige Tumorsuppressoren wie PTEN, TMP1 und SERPINB5 als Zielgene identifiziert werden (Meng et al., 2007a; Zhu et al., 2008). Dies bestätigt den Zusammenhang zwischen Prostatakarcinogenese und deregulierter miRNA-Expression und zeigt aber auch, dass es zur Aufklärung der genauen Wirkweise von miRNAs bei der Karzinogenese und Tumorprogression weiterer intensiver Forschung bedarf.

3.7. Ausgangspunkt und Zielsetzung der Arbeit

Da das Prostatakarzinom die am häufigsten diagnostizierte Krebserkrankung in der männlichen Bevölkerung der westlichen Welt darstellt, repräsentiert es einen Schwerpunkt der aktuellen Krebsforschung (Bray et al., 2013). Dennoch sind die molekularen Ursachen der Prostatakrebsentstehung weitgehend unbekannt. Innerhalb der letzten Jahre lag ein Fokus der Prostatakrebsforschung auf der Untersuchung des Zusammenhangs zwischen veränderter miRNA-Expression, Prostatakarcinogenese und -progression. Daher analysierten mehrere Studien die miRNA-Expression im gesunden Prostatagewebe im Vergleich zur Expression im Karzinom (Ozen et al., 2008; Porkka et al., 2007; Schaefer et al., 2010b; Szczyrba et al., 2010; Tong et al., 2009). Dabei ergaben sich zum Teil unterschiedliche oder sogar gegensätzliche Ergebnisse möglicherweise aufgrund der Heterogenität des Prostatakarzinoms und der Verwendung unterschiedlicher Untersuchungsmethoden, wie Microarrays und Sequenzierungen. Die Grundlage der vorliegenden Arbeit bildete eine vorausgegangene 454-Sequenzierung von Dr. Jaroslaw Szczyrba, welche das miRNA-Expressionsprofil von niedermalignen Prostatakarzinomen untersuchte (Szczyrba et al., 2010). Daher sollte nun durch eine erneute Sequenzierung ein komparatives miRNA-Expressionsprofil zunehmend maligner Prostatakarzinome

erstellt werden, um mögliche Veränderungen des miRNA-Expressionsmusters im Verlauf der Prostata-Tumorprogression nachzuweisen. Anschließend sollten die Ergebnisse der Sequenzierung für ausgewählte deregulierte miRNAs zunächst mit Hilfe von Northern Blots in den zur Sequenzierung verwandten Prostatagewebepools und darauf folgend mittels quantitativer Realtime-PCR in einem unabhängigen Patientenkollektiv bestätigt werden. Darüber hinaus sollte durch die Identifizierung von Zielgenen stark deregulierter miRNAs der Zusammenhang zwischen abnormer miRNA-Expression, Prostatakarzinogenese und -progression untermauert werden.

4. Material

4.1. Geräte

Blotkammern	LKB 2005 Transphor Electro Blotting Unit Semi Dry Blotter (StarLab)
Durchflusszytometer	FACSCanton II (Becton Dickinson, BD)
Elektrophorese-Netzgeräte	Consort EV-231 (Consort bvba) Phero Stab. 300 (Biotec Fisher)
Hybridisierungsöfen	UM 400B Hyb (Fa. Bachhofer)
Luminometer	Lumat LB 9501 (Berthold Technologies)
PCR-Maschine	Peltier Thermal Cycler 200 (MJ Research)
Phosphoimager	Phosphoimager™-Typhoon (Molecular Dynamics /Amersham)
Photometer	Ultraspec 3000 (Pharmacia Biotech) NanoDrop™ 2000c (PEQLAB)
Ultraschallgerät	Bronson Sonifier 250
UV-Dokumentation	ChemiDoc™ XRS+ (Bio-Rad)
Zellzähl-Gerät	Fuchs-Rosenthal-Zählkammer (Carl Roth GMBH)
Zentrifugen	Heraeus Megafuge 1,0 R (mit Kühlung) Heraeus Picofuge (Tischzentrifuge ohne Kühlung) Sigma 202 MK (Tischzentrifuge mit Kühlung)

4.2. Chemikalien, Membranen, Filter, Säulen

Acrylamid	Serva (Heidelberg)
Agarose	Invitrogen (Karlsruhe)
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva
Ampicillin (Binotal™)	Bayer (Leverkusen)
Bisacrylamid	Serva
Bromphenolblau	Serva
Bovines Serumalbumin (BSA)	New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main)

cOmplete Mini (Protease Inhibitor)	Roche (Grenzach)
50x Denhardt's Solution	Sigma (Taufkirchen)
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Dual-Luciferase Reporter [®] Assay System	Promega (Mannheim)
EDC-Hydrochlorid	Sigma
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Serva
Ethanol	Roth (Karlsruhe)
Ethidiumbromid	Sigma
Fötale Kälberserum (FKS)	PAA Laboratories GmbH (Pasching)
Gamma- ³² P-UTP (3000 Ci/mmol)	Hartmann Analytic GmbH (Braunschweig)
Glycin	Serva
H ₂ O ₂	Sigma
HiPerFect Transfection Reagent	Qiagen (Hilden)
Hybond [™] -N-Membran	Amersham (Freiburg)
Hyperfilm ECL [™]	Amersham
Imidazol	Sigma
Isopropanol	Roth
Isopropylthiogalactosid (IPTG)	Novagen (Darmstadt)
jetPrime [™]	Polyplus-transfection (Illkirch, Frankreich)
LB-Agar (GIBCO)	Becton Dickinson (Heidelberg)
LB-Medium (Luria Broth Base (GIBCO))	Becton Dickinson
Magermilchpulver	Töpfer (Dietmannsried)
3-Mercapto-1,2-propanediol	Sigma
Nanofectin [™]	PAA Laboratories GmbH
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
Nitrocellulosemembran (Protran [™])	Schleicher&Schuell (Dassel)
Nicht essentielle Aminosäuren	Sigma
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Serva
NucleoSpin Extract [™]	Macherey-Nagel (Düren)

Nukleotide (dNTPs)	PEQLAB (Erlangen)
Nukleotide (NTPs)	Invitrogen
Paraformaldehyd	Sigma
PeqGOLD TriFast™	PEQLAB
Penicillin/ Streptavidin	PAA Laboratories GmbH
PonceauS™	Sigma
Röntgen-Entwickler-Konzentrat	ADEFO Chemie GmbH (Dietzenbach)
Röntgen-Fixier-Konzentrat	ADEFO Chemie GmbH
SequaGel® Sequencing System	National Diagnostics (Atlanta, USA)
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Serva
Triton X-100	Serva
Tween®20	Serva
X-Gal	Sigma
Zellulosefilter Whatman™ #1	Herolab (Wiesloch)

Alle sonstig verwendeten, hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt) und Roth (Karlsruhe) in analysereiner Form erworben.

4.3. Puffer und Lösungen

Bromphenolblau Ladepuffer (2x) :	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)

Crosslinkreagenz	:	Methylimidazol	245 µl
		EDC-Hydrochlorid	0,75 g
		ad 24 ml H ₂ O	
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	1,113 ml
		Lösung C	25ml
		ad 250 ml H ₂ O	
Ethidiumbromidlösung	:	Ethidiumbromid	10 mg/ml H ₂ O
FACS-Fix	:	Paraformaldehyd	2%
		in PBS-Puffer pH 7,5	
Hybridisierungspuffer (Northern Blot)	:	20xSSC	7,5 ml
		1 M Na ₂ HPO ₄	0,6 ml
		10%SDS	21,0 ml
		50xDenhardt's Solution	0,6 ml
		Blockreagenz	wenige mg

Lysispuffer (0,15M)	:	NaCl	0,1 %
		Igepal	0,1 %
		ad 1000 ml H ₂ O _{bidest.}	
		Zugabe von Proteaseinhibitoren direkt vor Gebrauch	
MgCl ₂	:	(2M) MgCl ₂ x 6H ₂ O	20,33 g (1M)
		MgSO ₄ x 7H ₂ O	24,65 g (1M)
		ad 100 ml H ₂ O _{bidest.} , sterilfiltrieren	
5x MSE		200 ml 1M MOPS	
		16,7 ml 0,3M NAAc	
		10 ml 0,5M EDTA	
		ad 1000 ml H ₂ O _{bidest.}	
PBS	:	NaCl	140 mM
		KCl	25 mM
		MgCl ₂	0,5 mM
		CaCl ₂	1 mM
		Na-K-Phosphat	10 mM
PBS (ohne Mg ₂₊ und Ca ₂₊)	:	NaCl	8,0 g/l
		KCl	0,2 g/l
		Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	2,9 g/l
		KH ₂ PO ₄	0,2 g/l
		ad pH 7,4	
Polymerase-Reaktionspuffer (10x)(Sigma)	:	KCl	500 mM
		Tris-HCl, pH 8,3	100 mM
		Gelatine	1 mg/ml

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 ₃ PO ₄	
Puffer N3	:	Tris	100 mM
		Ethanol	15% (v/v)
		KCl	1,15 M
		ad pH 6,3 mit H ₃ PO ₄	
Puffer N5	:	Tris	100 mM
		Ethanol	15% (v/v)
		KCl	1 M
		ad pH 8,5 mit H ₃ PO ₄	
RNA-Ladepuffer II	:	750 µl Formamid	
		150 µl 5x MSE	
		240 µl Formaldehyd	
		200 µl 50% Glycerol	
		Spatelspitze Bromphenolblau	
		Spatelspitze Xylen-Cyanol FF	
		160 µl Aqua bidest.	
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 pH 5,1	2,8 M
Sammelgelstock	:	Tris-HCl pH 6,8 SDS	0,5 M 0,4% (w/v)
Sample-Buffer (2x)	:	Tris HCL (pH6,8) SDS 3-Mercapto-1,2-propanediol Glycerol Bromphenolblau	130 mM 6% (w/v) 10% (v/v) 10% (w/v) 0,05% (w/v)
SDS-Laufpuffer	:	Tris/HCl SDS Glycin	0,025 M 0,1% (w/v) 0,2 M
SOB-Medium	:	Trypton Hefe-Extrakt NaCl KCl ad 1000 ml H ₂ O _{bidest.} , autoklaviert Zugabe von 20 mM MgCl ₂ direkt vor Gebrauch	20,0 g 5,0 g 0,6 g 0,5 g
SSC-Puffer (20x)	:	NaCl tri-Natriumcitrat-2-hydrat	3 M 0,3 M
STET-Puffer	:	Tris (pH 8,0) EDTA (pH 8,0) Triton X-100 Saccharose Zugabe von 0,5 mg/ml Lysozym direkt vor Gebrauch	10 mM 50 mM 0,5% (v/v) 8% (w/v)

Stripping-Puffer	:	Tris (pH 8,0)	0,05 mM
		EDTA (pH 8,0)	0,2 mM
		Na-Pyrophosphat	0,05% (v/v)
		Denhardt's Solution	0,1x
T4-Ligasepuffer (10x)	:	ATP	10 mM
		MgCl ₂	50 mM
		DTT	10 mM
		Tris/HCl (pH 7,5)	660 mM
TAE-Puffer (50x)	:	Tris	2 M
		Natriumacetat	25 mM
		EDTA	0,5 M
		ad pH 7,8 mit Essigsäure	
TBE-Puffer (10x)	:	Tris	89 mM
		Borsäure	89 mM
		EDTA	2 mM
TE-Puffer	:	Tris/HCL	10 mM
		EDTA	1 mM
		ad pH 7,6 mit Essigsäure	
Transferpuffer	:	Tris/HCl	25 mM
		Glycin	192 mM
		Methanol	20% (v/v)
		SDS	0,05% (w/v)

Transformations-Lösung 1	:	RbCl	0,10 M
		MnCl ₂ x 4H ₂ O	0,05 M
		CaCl ₂ x 2H ₂ O	0,01 M
		CH ₃ COOH (pH7)	0,03 M
		Glycerol	15,0% (v/v)
		ad 1000 ml H ₂ O _{bidest.} , sterilfiltriert	
		ad pH 5,8 mit 0,2 M CH ₃ COOH	
Transformations-Lösung 2	:	MOPS (pH 6,8)	0,500 M
		RbCl	0,010 M
		CaCl ₂ ·H ₂ O	0,075 M
		Glycerol	15% (v/v)
		ad 1000 ml H ₂ O _{bidest.} , sterilfiltriert	
Trenngelstock	:	Tris-HCl pH 8,8	1,5 M
		SDS	0,4% (w/v)
Hochsalzpuffer I	:	5x SSC	
		1% SDS	
Niedrigsalzpuffer II	:	1x SSC	
		1% SDS	

4.4. Enzyme

Alkalische Phosphatase	Roche
DNaseI (amplification grade)	Invitrogen
<i>Klenow</i> Fragment	Fermentas (St. Leon-Rot)
Lysozym aus Hühnereiweiß	Boehringer (Dortmund)
<i>Phusion</i> ® High-Fidelity-DNA-Polymerase	New England Biolabs (NEB)
Restriktionsendonukleasen	NEB
T4-DNA-Ligase	NEB
T7-RNA-Polymerase	NEB

<i>Taq</i> -Polymerase	Sigma
Trypsin/EDTA	PAA Laboratories GmbH

4.5. Größen- und Molekulargewichtsmarker

4.5.1. DNA-Größenstandard

Die Größenbestimmung doppelsträngiger, linearer, mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennter DNA-Fragmente erfolgte mit Hilfe des 1 kb Plus Markers (Invitrogen) (Abb.4). Diese 1 kb plus DNA-Leiter enthält folgende Fragmentgrößen: 12000, 11000, 10000, 9000, 8000, 7000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2000, 1650, 1000, 850, 650, 500, 400, 300, 200, 100 bp.

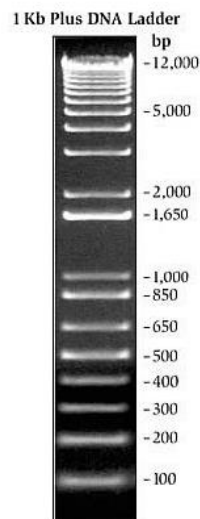


Abbildung 6: 1 kb Plus DNA-Leiter (Quelle: Invitrogen)

4.5.2. Protein-Molekulargewichtsmarker

Zur Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen bei der SDS-Page (Polyacrylamidgelelektrophorese) wurde die „ColorPlus Prestained Protein Ladder“ (NEB) eingesetzt, die aus einer Mischung aus zwölf rekombinanten Proteinen mit einem Molekulargewicht von 10-230 kDa besteht (Abb.7).

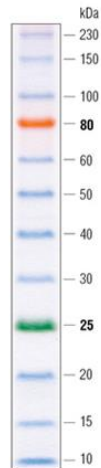


Abbildung 7: ColorPlus Prestained Protein Ladder (Quelle: NEB)

4.6. Antikörper

4.6.1. Primärantikörper

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Primärantikörper eingesetzt: anti-human-SEC23A 2H4-11 (monoklonal, Ratte) (Szczyrba et al., 2011), anti-human-PHLPP1 (polyklonal, Kaninchen, A300-660A, Bethyl Laboratories, Montgomery, Vereinigte Staaten von Amerika), anti-human-PHLPP2 (polyklonal, Kaninchen, A300-661A, Bethyl Laboratories), anti-human-GAPDH (monoklonal, Kaninchen, 14C10, Cell Signaling, Frankfurt a. M.). Die Primärantikörper wurden in 5% PBS-Milch entsprechend der Herstellerangaben verdünnt und die jeweiligen Verdünnungen sind in der Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle: 2 Übersicht der verwendeten Primärantikörper mit den entsprechenden Verdünnungen

Primärantikörper	Verdünnung
α -SEC23A	1:5
α -PHLPP1	1:150
α -PHLPP2	1:150
α -GAPDH	1:1000

4.6.2. Sekundärantikörper

Die Meerrettichperoxidase-gekoppelten Sekundärantikörper, α -Ratte- und α -Kaninchen-Pox wurden von der Firma Sigma bezogen und in der Regel in einer Verdünnung von 1:5000 eingesetzt.

4.7. Adhärenz Zelllinien

293-T: Diese Zelllinie stammt von der humanen embryonalen Nierenzelllinie HEK293 ab. Diese wurde durch Transformation mit dem humanen Adenovirus 5 immortalisiert (Graham et al., 1977). Zusätzlich wird in den HEK293-T konstitutiv das große T-Antigen des SV40 Virus exprimiert. Dadurch wird eine effiziente Expression von episomalen Plasmiden, die einen „SV40 origin of replication“ beinhalten, ermöglicht (Shein et al., 1962; Zur Hausen, 1967).

DU145: Diese Prostatakarzinomzelllinie geht aus einer Hirnmetastase eines 69 Jahre alten Prostatakrebspatienten hervor. Die DU145 Zellen sind nicht hormonsensitiv und exprimieren kein prostataspezifische Antigen (PSA) (Stone et al., 1978).

LNCaP: Diese humane, hormonsensitive Prostatakarzinomzelllinie wurde aus einer Lymphknotenmetastase eines 50 jährigen Prostatakarzinompatienten etabliert (Horoszewicz et al., 1983).

PNF: Diese Prostatafibroblastenzelllinie wurde aus humanem nicht malignem Prostatagewebe generiert und von Prof. Unteregger von der Klinik für Urologie und Kinderurologie (Homburg) zur Verfügung gestellt.

4.8. Bakterienstämme

*E.coli*pMOSBlue: Dieser *E.coli*-Stamm stammt aus dem „pMOSBlueT-Vektor“ Kit von Amersham. Diese Bakterien wurden einerseits zur Vermehrung rekombinanter DNA bei der Klonierung und andererseits zum Blue-White Screening bei der Klonierung rekombinanter DNA verwendet.

4.9. Nähr- und Kulturmedien

4.9.1. Kulturmedien für Säugerzellen

DMEM: Die Kultivierung der 293-T-Zelllinie erfolgte in „Dulbecco's Modified Eagle Medium“ (PAA), das zuvor mit 10% fötalem Kälberserum (FKS) und einem „4er Antibiotikum“, bestehend aus 40 U/ml Penicillin-G40, 10 U/ml Moronal, 10 µg/ml Neomycinsulfat und 50 µg/ml Streptomycinsulfat, versetzt wurde.

Die PNF-Zelllinie wurde ebenfalls in DMEM in Kultur gehalten, welches mit 10% FKS, Penicillin (100U/ml), Streptomycin (100 µg/ ml) (PAA) und 1% nicht essentiellen Aminosäuren (PAA) ergänzt wurde.

RPMI-1640: Die LNCaP und DU145 Zelllinien wurden in RPMI-1640 (Sigma) kultiviert, dem zuvor 10% FKS, Penicillin (100U/ml) und Streptomycin (100 µg/ ml) zugesetzt wurde.

4.9.2. Kulturmedium für Bakterien

Die *E.coli*pMOSBlue Bakterien wurden in zuvor autoklaviertem LB-Medium (Luria Broth Base (GIBCO)) kultiviert. Der Ausstrich der Bakterien erfolgte auf LB-Agarplatten. Bei der Herstellung der Agarplatten wurde zuvor autoklavierter 3,75%

(w/v) Luria's Agar (GIBCO), zur Selektion transformierter Bakterien mit Ampicillin (0,1% (w/v)) versetzt, in Petrischalen gegossen und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

4.10. Patientenmaterial

Diese Studie wurde durch die lokale Ethikkommission genehmigt und nach der Deklaration von Helsinki (World Medical Association Declaration of Helsinki, Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects) durchgeführt. Alle Prostatagewebe- und Prostatatumorproben wurden von der Gewebebank des University Cancer Centers (UCC) des Uniklinikums Erlangen von Dr. Tilman Rau zur Verfügung gestellt. Die Gewebeidentität, der Tumorzellgehalt von mehr als 70% beziehungsweise das Nichtvorhandensein von Tumorzellen im Normalgewebe wurde mittels Begutachtung aller Proben durch einen erfahrenen Uropathologen sichergestellt. In dieser Studie wurden zwei Patientenkollektive verwendet, wobei eines durch Illuminasequenzierung analysiert und das andere zur Validierung der Sequenzierung durch quantitative real-time Polymerasekettenreaktion herangezogen wurde.

Zur Illuminasequenzierung wurden fünf Prostatagewebepools eingesetzt. Ein Pool bestand aus fünf Gewebeproben gesunder Prostatae, die bei einer Zystektomie entnommen wurden. In einem zweiten Pool wurde das gesunde Prostatagewebe aus allen korrespondierenden Prostatatumoren zusammengefasst. Ein Dritter Gewebepool umfasste zehn pT2-Tumorproben ohne Lymphknotenmetastasen (N0) und ein Vierter sieben pT3-Tumorgewebe ebenfalls ohne Lymphknotenmetastasen (N0). Ein Fünfter Gewebepool mit Gewebe aus Prostatakarzinomen mit Lymphknotenmetastasen (N1) setzte sich aus drei Proben zusammen.

Das zweite Patientenkollektiv, das zur Validierung der Sequenzierungsergebnisse herangezogen wurde, bestand aus 40 kryokonservierten Prostatatumorproben mit korrespondierenden, nicht malignen Normalgeweben. Die Patientencharakteristika beider Kollektive einschließlich des Alters bei Diagnosestellung, dem Tumorgrad, der Gleasonsumme, dem Primär-Gleason, der Lymphknotenmetastasierung, der Zusammensetzung der Kollektive und dem Differenzierungsgrad beider Patientenkollektive sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Charakteristika der zur Sequenzierung und Validierung der Sequenzierung verwendeten Patientenkollektive

	Patientenkollektiv Sequenzierung (N=20)	Patientenkollektiv qRT-PCR (N=41)
Charakteristika	N (%)	N (%)
Alter (Jahren)		
Durchschnitt	68	67
Spanne	57-76	51-77
Tumorgrad		
pT2a	0 (0%)	1 (2,4%)
pT2b	0 (0%)	1 (2,4%)
pT2c	10 (50%)	17 (41,5%)
pT3a	6 (30%)	12 (29,3%)
pT3b	4 (20%)	8 (19,5%)
pT4	0 (0%)	4 (9,8%)
Gleasonsumme		
5	0 (0%)	1 (2,5%)
6	2 (10%)	6 (15%)
7	13 (65%)	25 (62,5%)
8	0 (0%)	2 (5%)
9	5 (25%)	6 (15%)
Primär-Gleason		
2	0 (0%)	1 (2,5%)
3	9 (45%)	24 (60%)
4	7 (35%)	11 (27,5%)
5	4 (20%)	4 (10%)
Lymphknotenmetastasen		
pN0	17 (85%)	25 (61%)
pN1	3 (15%)	5 (12,2%)
unbekannt	0 (0%)	11 (26,8%)
Zusammensetzung der Kollektive		
pT2 (pN0)	10 (50%)	10 (33,3%)
pT3 (pN0)	7 (35%)	15 (50%)
Lymphknoten metastasiert (pN1)	3 (15%)	5 (16,7%)
Differenzierungsgrad		
G2	10 (50%)	22 (55%)
G3	10 (50%)	18 (45%)
Anmerkung		
zusätzlich wurden 5 Prostatagewebeproben, die bei einer Zystektomie entnommen wurden, sequenziert		

4.11. Vektoren

4.11.1. pGEM-T

Zur Klonierung von PCR-Produkten wurde der pGEM-T® Vektor (Promega, Madison; USA) eingesetzt. Dieser linearisierte Vektor entsteht durch einen *EcoRV*-Restriktionsverdau des pGEM-5Zf(+) Vektors und anschließender Ligation mit je einem 3'-terminalem Thymidin. Die 3'-Thymidinüberhänge verhindern zum einen die Rezirkularisierung des Vektors und zum anderen erlauben sie die direkte Insertion von PCR-Produkten mit Adenosinüberhängen. Der pGEM-T® Vektor trägt eine Multiple-Cloning-Site (MCS), die von einem T7- und einem SP6-Promotor flankiert wird, sowie mehrere Erkennungssequenzen verschiedener Restriktionsendonukleasen beinhaltet und zur Ligation von PCR-Produkten ohne Adenosin-Überhänge verwendet werden kann. Da die MCS innerhalb der für das α -Peptid der β -Galaktosidase kodierenden Region liegt, wird durch Ligation eines PCR-Produkts das β -Galaktosidase-Gen zerstört. Somit ist es möglich positive Bakterienklone, die ein Insert enthalten von negativen Klonen ohne Insert mit Hilfe der Blau-Weiß-Selektion zu unterscheiden. Die Selektion erfolgreich transformierter Bakterien erfolgt über das Ampicillinresistenzgen des pGEM-T® Vektors (Abb.8).

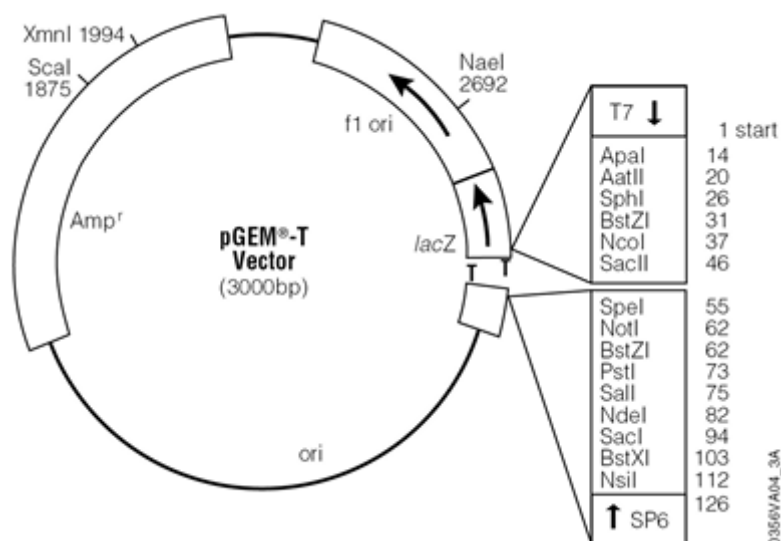


Abbildung 8: Vektorkarte des pGEM-T Vektor (Promega) zur direkten Klonierung von PCR-Produkten mit Adenosinüberhängen (Quelle: Promega)

4.11.2. pMIR-REPORT™

Der eukaryotische pMIR-REPORT™-Vektor (Ambion) dient zur Analyse von microRNA-Effekten auf die jeweiligen 3'UTR-Sequenzen ihrer Ziel-mRNAs (Abb.9). Zur Analyse dieser Effekte wird die betreffende 3'UTR der Ziel-mRNA hinter das im Vektor befindliche Firefly-Luciferase-Gen kloniert. In dieser Arbeit wurde nicht der Originalvektor pMIR-REPORT™, sondern ein durch die Arbeitsgruppe Meister (Max-Planck-Institut, Martinsried) modifiziertes Plasmid, pMIR-RNL-TK, verwendet, das zusätzlich das Renilla-Luciferase-Gen unter der Kontrolle eines TK-Promotors trägt. Diese Modifikation bietet die Möglichkeit bei der Untersuchung von microRNA-Effekten zur internen Normalisierung, welche Unterschiede in der Transfektions-effizienz verschiedener Ansätze ausgleicht.

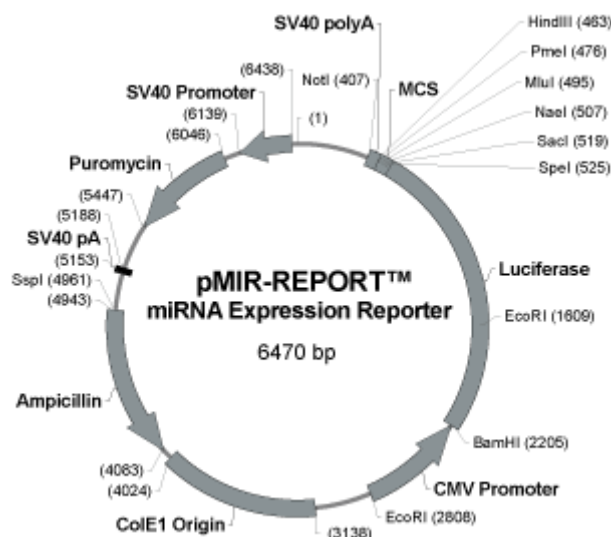


Abbildung 9: pMIR-REPORT™-Vektor (Ambion) zur Analyse von microRNA-Effekten auf 3'UTRs von Target-mRNAs (Quelle: Ambion)

4.11.3. pSG5

Der pSG5-Vektor der Firma Stratagene ist ein eukaryotisches, high-copy Expressionsplasmid, welches *in vivo*, aber auch *in vitro* hohe Expressionsraten ermöglicht. Zur effizienten *in vivo* Expression trägt dieses Plasmid ein β -Globin-Intron, ein SV40 Polyadenylierungssignal und einen SV40 Promotor. Darüber hinaus

kann ein T7 Promotor zur *in vitro* Transkription eines klonierten Inserts eingesetzt werden. Zur autonomen Replikation in prokaryotischen Systemen beinhaltet dieser Vektor einen prokaryotischen Replikationsursprung (pUC ori), sowie einen Replikationsursprung (f1 ori) aus dem filamentösen Phagen f1 zur Synthese von Einzelstrang-DNA. Die MCS dieses Plasmids besitzt Restriktionsschnittstellen für die Restriktionsenzyme *EcoRI*, *BamHI* und *BglII*. Zur Selektion von transformierten Bakterien dient ein Ampicillinresistenzgen.

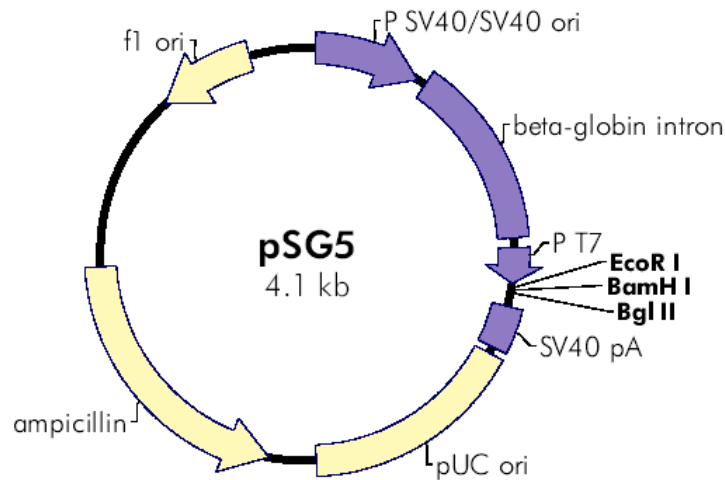


Abbildung 10: pSG5 Expressionsvektor der Firma Stratagene (Quelle:Stratagene)

4.11.4. microRNA-Expressionsplasmide

Zur Klonierung aller miRNA-Expressionsplasmide wurde aus humaner, genomischer DNA aus Blut die jeweilige humane miRNA-Vorläufer-Sequenz mit zusätzlich mindestens 100 bp up- und downstream dieser Sequenz amplifiziert, um eine korrekte Expression bzw. Prozessierung der reifen, humanen miRNAs sicherzustellen. Danach wurden die jeweiligen miRNA-Inserts über die passenden Restriktionsschnittstellen in den eukaryotischen Expressionsvektor pSG5 kloniert. Das miRNA-Expressionsplasmid der humanen miR-200b wurde im Rahmen dieser Arbeit kloniert. Alle weiteren in der Tabelle 4 aufgelisteten humanen miRNA-Expressionsplasmide waren bereits in der Arbeitsgruppe Grässer vorhanden. Die Größe der microRNA-Inserts sowie die zur Klonierung verwendeten Restriktionsschnittstellen sind ebenfalls in der Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4: Liste der verwendeten Expressionsplasmide

miRNA- Expressionsplasmide	Restriktions- schnittstellen	Größe des microRNA- Inserts
pSG5-miR-143	<i>EcoR</i> I / <i>Bam</i> H I	420 bp
pSG5-miR-145	<i>EcoR</i> I / <i>Bam</i> H I	350 bp
pSG5-miR-148a	<i>EcoR</i> I / <i>Bam</i> H I	490 bp
pSG5-miR-15a	<i>EcoR</i> I / <i>Bam</i> H I	440 bp
pSG5-miR-200b	<i>EcoR</i> I / <i>Bam</i> H I	380 bp
pSG5-miR-200c	<i>EcoR</i> I / <i>Bgl</i> II	340 bp
pSG5-miR-25	<i>EcoR</i> I / <i>Bam</i> H I	430 bp
pSG5-miR-375	<i>EcoR</i> I / <i>Bam</i> H I	460 bp

4.11.5. Reporterplasmide

Die pMIR-SEC23A 3'UTR-, den pMIR-SEC23A mut I-, den pMIR-SEC23A mut II-, und den pMIR-SEC23A mut I+II-Reportervektoren wurden von Dr. Jaroslaw Szczyrba kloniert (Szczyrba et al., 2011). Alle nachfolgend aufgelisteten Reporterplasmide wurden im Rahmen dieser Arbeit kloniert.

pMIR-ADIPOR2:

Die Nukleotide 420-2558 der ADIPOR2 3'UTR wurden über *Spe* I und *Nae* I hinter das Firefly-Luciferase-Gen des pMIR-RNL-TK Reportervektors kloniert. Die PCR-Amplifikation des 2138 bp langen Inserts erfolgte mit spezifischen Primern, wobei eine testis-cDNA als Matrize diente.

pMIR-NLK:

Nach der Amplifizierung des 1731bp langen Inserts aus testis-cDNA mit Hilfe spezifischer Primer wurde es über die Restriktionsschnittstellen von *Spe* I und

Sac I in die MCS des Reportervektors eingesetzt. Dieses Reporterkonstrukt trägt die komplette 3'UTR inklusive der letzten 38 bp der kodierenden Sequenz.

pMIR-MOB1A:

Mittels spezifischer Primer wurde aus testis-cDNA ein 832 bp langes Amplifikat synthetisiert, das neben der kompletten 3'UTR zusätzlich 391bp des ORF enthält. Dieses Insert wurde über *Sac* I und *Nae* I hinter das Firefly-Luciferase-Gen des pMIR-RNL-TK-Reportervektors kloniert.

pMIR-PHLPP1:

Die Nukleotide 38-896 der PHLPP1 3'UTR wurden mit spezifischen Primern aus testis-cDNA amplifiziert und über die *Spe* I- und *Sac* I-Schnittstellen hinter das Firefly-Luciferase-Gen des Reportervektors kloniert.

pMIR-PHLPP1 mut:

Durch zielgerichtete Mutagenese mit Hilfe von spezifischen Mutageneseprimern und dem pMIR-PHLPP1-Reporterplasmid als Template wurde die zur miR-375 komplementäre Sequenz (Nukleotide 269-276) in der PHLPP1 3'UTR durch eine *Pml* I-Restriktionsschnittstelle ersetzt.

pMIR-PHLPP2:

Die Amplifikation der Nukleotide 1-968 der PHLPP2 3'UTR erfolgte mit spezifischen Primern aus testis-cDNA. Das Amplifikat wurde über die Schnittstellen *Sac* I und *Nae* I in die MCS des pMIR-RNL-TK Vektors kloniert.

pMIR-PHLPP2 mut:

Der Austausch der zur miR-15a komplementären Sequenz in der PHLPP2 3'UTR gegen eine

Restriktionsschnittstelle für *Pml*-I erfolgte durch zielgerichtete Mutagenese mit spezifischen Mutageneseprimern und dem pMIR-PHLPP2 Reporterplasmid als Matrize.

pMIR-PLAU:

Zur Amplifizierung der kompletten PLAU 3'UTR mit testis-cDNA als Template wurden spezifische Primer verwendet. Das 861bp lange Amplifikat wurde über *Spe* I- und *Sac* I-Schnittstellen in den Reportervektor ligiert.

pMIR-SEC62:

Die Nukleotide 2248-2875 der SEC62 3'UTR wurde mit Hilfe spezifischer Primer und testis-cDNA als Matrize amplifiziert. Über die Restriktionsschnittstellen *Spe* I und *Sac* I wurde das 627 bp lange Insert hinter das Firefly-Luciferase-Gen des Reportervektors kloniert.

pMIR-SH3GLB1-TS1:

Das erste Teilstück der SH3GLB1 3'UTR (Nukleotide 1-1283) wurde mit spezifischen Primern aus testis-cDNA amplifiziert und über *Sac* I und *Nae* I in das pMIR-RNL-TK Reporterplasmid ligiert.

pMIR-SH3GLB1-TS2:

Die Amplifizierung des 1341bp langen, zweiten Teilstücks der SH3GLB1 3'UTR (Nukleotide 1750-3091) erfolgte mit spezifischen Primern aus testis-cDNA. Dieses Amplifikat wurde über die Restriktionsschnittstellen *Spe* I- und *Sac* I hinter das Firefly-Luciferase-Gen des Reportervektors kloniert.

4.12. Oligonukleotide

4.12.1. Oligonukleotidprimer

Die in der Tabelle 5 aufgelisteten Oligonukleotidprimer wurden zur Klonierung der oben aufgeführten Effektor- und Reporterplasmide verwendet und über die Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) bezogen.

Tabelle 5: Zur Klonierung verwendete Oligonukleotidprimer

Primername	Oligosequenz
Klonierungsprimer microRNA-Expressionsplasmide	
5'-miR-200b-EcoRI	5'-cggaattc <u>gatgctgtcctc</u> agtgcc-3'
3'-miR-200b-BamHI	5'-cg <u>cgatcc</u> gtctctgagatgctggtg-3'
Klonierungsprimer Reporterplasmide	
5'-ADIPOR2-SpeI	5'-ggactagtcgataaggggtgggagtg-3'
3'-ADIPOR2-NaeI	5'-g <u>ccggc</u> gggaaatcccacatcaatg-3'
5'-NLK-SpeI	5'-ggactagtgctcagccatctgagatgc-3'
3'-NLK-SacI	5'-cgagctcgtgaccagaaagtgtgccac-3'
5'-MOBKL1B-SacI	5'-cgagctcgtctgcaggtccgagatatg-3'
3'-MOBKL1B-NaeI	5'-g <u>ccggc</u> ccaatctgattgtgttattagg-3'
5'-PHLPP1-SpeI	5'-ggactagtgactgagttgcaagagtctcc-3'
3'-PHLPP1-SacI	5'-cgagctccaaccatgctgattgtggcag-3'
5'-PHLPP2-SacI	5'-cgagctcgagttcgacacagcactatgac-3'
3'-PHLPP2-NaeI	5'-g <u>ccggc</u> cctctctgcctatggatgaag-3'
5'-PLAU-SpeI	5'-gactagtgggtccccagggaggaaacg-3'
3'-PLAU-SacI	5'-cgagctccagtgtagcaggagtgggtcc-3'
5'-SEC62-SpeI	5'-gactagtcagaggctaagttcagatag-3'
3'-SEC62-SacI	5'-cgagctcggctgttgtgtgccttatg-3'
5'-SH3GLB1-TS1-SacI	5'-cgagctcgtaggtggactatggaaagg-3'
3'-SH3GLB1-TS1-NaeI	5'-g <u>ccggc</u> catcacaccacgaatcctac-3'
5'-SH3GLB1-TS2-SacI	5'-ggactagtggttctacagcctagagtacc-3'
3'-SH3GLB1-TS2-SpeI	5'-cgagctcctgtcagcatggaggtgagtg-3'
Mutagenese Primer (mutierte Sequenz in Großbuchstaben)	
5'-PHLPP1-mut	5'-gatatgtaaagacaaaCACGTGCaggtttaatatattac-3'
3'-PHLPP1-mut	5'-gtaatatattaaacctGCACGTGtttgtctttacatatc-3'
5'-PHLPP2-mut	5'-gattctctttactagtCACGTGCgatggatctctgtgac-3'
3'-PHLPP2-mut	5'-gtcacagagatccatcGCACGTGactagtaaagagaatc-3'

4.12.2. Northern Blot-Sonden

Die zur Sondenmarkierung im Northern Blot verwendeten DNA-Oligonukleotide der Firma Eurofins MWG Operon sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 6: Zur Sondenmarkierung verwendete DNA-Oligonukleotide

Northern Blot- Sonden	
microRNA-Sonde	Oligosequenz
Sonde let-7c	5'-tgaggtagtagggttgatgggttCCTGTCTC-3'
Sonde miR-143	5'-tgagatgaagcactgtagctcCCTGTCTC-3'
Sonde miR-145	5'-gtccagttttcccaggaatccctCCTGTCTC-3'
Sonde miR-148a	5'-aaagttctgagacactccgactCCTGTCTC-3'
Sonde miR-15a	5'-tagcagcacataatggtttggtgCCTGTCTC-3'
Sonde miR-20a	5'-taaagtgccttatagtgcaggtagCCTGTCTC-3'
Sonde miR-200b	5'-catcttactgggcagcattggaCCTGTCTC-3'
Sonde miR-375	5'-tttgttcgttcggctcgcgtgaCCTGTCTC-3'

4.12.3. Antisense Oligonukleotide

Alle verwendeten Antisense Oligonukleotide wurden von der Firma Qiagen bezogen und sind in Tabelle 7 aufgelistet. Die miScript Inhibitor Negative Control diente als Negativkontrolle. Diese besitzt keinerlei Homologien zu bisher bekannten Säugergenen und wurde eingesetzt, um auszuschließen, daß Änderungen des Phänotyps oder der Genexpression unspezifisch sind.

Tabelle 7: Liste der verwendeten Antisense Oligonukleotide

miScript miRNA Inhibitoren	
Name	Sequenz
miScript Inhibitor Negative Control	nicht bekannt
Anti-hsa-miR-375	5'-UUUGUUCGUUCGGCUCGCGUGA-3'
Anti-hsa-miR-15a-5p	5'-UAGCAGCACAUAAUGGUUUGUG-3'

4.13. Computersoftware

Zur Textverarbeitung wurde Microsoft Word 2010™ (Microsoft Corp.) und zur Datenverarbeitung Microsoft Excel 2010™ (Microsoft Corp.) eingesetzt. Alle Abbildungen wurden mit Hilfe von CorelDRAW 12.0™ (Corel Corp.) angefertigt oder bearbeitet. Der Nukleotid-Sequenzabgleich erfolgte über die Internetseite des *NCBI* (National Center Of Biotechnology Information: www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/). Die Quantifizierung der Western und Northern Blots leistete die Quantity One analysis Software der Firma Bio-Rad. Zur graphischen und statistischen Aufarbeitung der Quantifizierungen und der Luciferase-Assays wurde das Programm Sigma Plot 10.0 (Systat Software) benutzt. Die Auswertung des Zellproliferationsassays wurde mit FlowJo (TreeStar Inc., Ashland, USA) und GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA) durchgeführt. Zur Target-Vorhersage wurden die Onlineprogramme TargetScan (www.targetscan.org), microRNA.org (www.microrna.org), RNAhybrid (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid>) und miRecords (mirecords.umn.edu/miRecords/) herangezogen. Die Expressionsanalyse von microRNA-Zielgenen wurde mit Hilfe der Oncomine-Datenbank (www.oncomine.org) durchgeführt.

5. Methoden

Die in dieser Arbeit verwendeten Methoden entsprechen größtenteils denen in meiner Diplomarbeit „Regulation des ERG-Proteins im Prostatakarzinom durch microRNAs“ beschriebenen Methoden, da beide Arbeiten in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Friedrich Grässer angefertigt wurden und thematisch aufeinander aufbauen. Nach Absprache mit meinem Doktorvater Prof. Dr. Friedrich Grässer und dem Justitiariat des Uniklinikum des Saarlandes wurde beschlossen die Methoden der Diplomarbeit, die in dieser Arbeit unverändert angewandt wurden, wortwörtlich zu übernehmen und durch wissenschaftliche korrekte Zitate „(Hart, 2010)“ neben der Überschrift des jeweiligen Abschnitts zu kennzeichnen.

5.1. Bakterielle Zellkultur

5.1.1. Aufzucht und Lagerung von Bakterien (Hart, 2010)

Die Amplifizierung von Plasmiden erfolgte durch Transformation von Bakterien mit dem jeweiligen Plasmid, darauf folgender Selektion dieser Bakterien durch Ausplattieren auf einer LB-Agarplatte mit Ampicillin und deren anschließender Inkubation über Nacht bei 37°C. Am folgenden Tag wurden zur Analyse der Plasmid-DNA 2 ml LB-Medium plus Ampicillin (0,1% (w/v)) mit einer einzelnen Bakterienkolonie inokuliert und bei 37°C über Nacht auf einem Schüttler inkubiert (Mini-Präp). Zur Amplifizierung und Isolation größerer Mengen Plasmid-DNA wurden 50 ml LB-Medium plus Ampicillin (0,1% (w/v)) mit der zuvor analysierten Bakterienkolonie oder mit Bakterien aus einer DMSO-Stammhaltung angeimpft. Kurzfristig gelagert wurden die Bakterien in Form von Zellkolonien auf mit Parafilm abgedichteten Agarplatten bei 4°C. Zur Langzeitlagerung der Bakterien wurden 500 µl der Bakteriensuspension mit 20% (v/v) DMSO versetzt und bei -70°C eingefroren.

5.1.2. Herstellung kompetenter Bakterien (Hart, 2010)

(CaCl₂/RbCl-Methode; (Kushner, 1978))

E.coli-Bakterien sind normalerweise nicht in der Lage Fremd-DNA aufzunehmen, sondern versuchen sich sogar mittels speziell entwickelten Schutzmechanismen, wie z.B. durch Restriktionsenzyme, davor zu schützen. Um nun Plasmid-DNA effizient in Bakterien vermehren zu können, ist es nötig diese künstlich in die Bakterien einzuschleusen, d.h. die Bakterien müssen erst für die Aufnahme der Fremd-DNA kompetent gemacht werden. Diese Kompetenzinduktion kann mit Hilfe von Chemikalien durchgeführt werden. Nachfolgend wird die Herstellung kompetenter Bakterien durch die Rubidium-Methode beschrieben. Die Herstellung transformationskompetenter Bakterien beginnt damit, dass 30 ml SOB-Medium 1:100 mit einer 2 M MgCl₂-Lösung versetzt und mit 50 µl einer auf Eis aufgetauten *E.coli*-pMOS-Suspension inokuliert wurden. Danach wurde diese sog. Vorkultur auf einem Schüttler über Nacht bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden 200 ml SOB-Medium mit 8 ml der Vorkultur angeimpft und bei 37°C unter ständigem Schütteln solange kultiviert bis die Bakteriensuspension eine OD_{550nm} von ~0,3 erreicht hatte und die Bakterien sich somit in der exponentiellen Wachstumsphase befanden. Dann wurden die in vier 50 ml Falcons aliquotierte Bakteriensuspension für 15 min auf Eis inkubiert und danach 10 min bei 3000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Anschließend wurden die Bakterienpellets in je 16 ml Transformationspuffer 1 resuspendiert und erneut 15 min auf Eis gehalten. Nun folgte eine erneute, 10 minütige Zentrifugation der Bakteriensuspensionen bei 3000 rpm und 4°C. Die Bakterienpellets wurden jeweils in 4 ml Transformations-Lösung 2 resuspendiert, zu je 150 µl in Eppendorfgefäße aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der kompetenten Bakterien erfolgte bei -70°C.

5.1.3. Transformation kompetenter Bakterien (Hart, 2010)

(Lederberg and Cohen, 1974)

Das künstliche Einbringen von löslicher Plasmid-DNA in eine dafür kompetente Bakterienzelle wird als Transformation bezeichnet. Die am häufigsten verwendeten

Methoden sind Elektroporation und Hitzeschock-Transformation. Die in dieser Arbeit transformierten Bakterien wurden ausschließlich mittels der Hitzeschockmethode transformiert. Hierzu wurden entweder max. 1 µg Plasmid-DNA oder 5 µl eines Ligationsansatzes zu 50 µl einer zuvor auf Eis aufgetauten, kompetenten *E.coli*-pMOS-Suspension pipettiert. Dieser Ligationsansatz wurde 20 min lang auf Eis inkubiert was dazu führte, dass sich die DNA an der Bakterienzellwand anlagern konnte. Im nächsten Schritt erfolgte ein Hitzeschock für 90 sec bei 42°C. Der Mechanismus des Hitzeschocks ist noch ungeklärt, aber es scheint als verursache der rasche Temperaturanstieg eine Permeabilisierung der Bakterienzellwand, so dass die DNA ins Cytosol aufgenommen werden kann. Danach wird der Transformationsansatz sofort auf Eis abgekühlt und 100 µl antibiotikafreies LB-Medium hinzugegeben, um den durch den Hitzeschock gestressten Bakterien das Erlangen der exponentiellen Wachstumsphase zu erleichtern. Diese sogenannte Vorkultur wurde mindestens für 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend auf einer LB-Agarplatte ausplattiert oder zum Inokulieren einer LB-Flüssigkultur verwendet. Die Agarplatte oder Flüssigkultur wurde danach über Nacht bei 37°C über Kopf inkubiert bzw. geschüttelt. Die effiziente Selektion der erfolgreich transformierten Bakterien richtete sich nach dem jeweiligen, auf dem Plasmid kodierten Resistenzgen. Daher wurden alle in dieser Arbeit verwendeten LB-Agarplatten bzw. LB-Medien mit 0,1% (w/v) Ampicillin versetzt.

5.1.4. Blau-Weiß-Selektion (Hart, 2010)

Zum Nachweis einer erfolgreichen Ligation wurde die sogenannte Blau-Weiß-Selektion angewendet. Dieses Selektionsprinzip bedient sich einer enzymatischen Reaktion, bei der das künstliche Substrat X-Gal in Anwesenheit des Induktors IPTG (Isopropylthiogalatosid) durch das Enzym β -Galaktosidase zu einem blauen Farbstoff umgesetzt wird. Voraussetzung für die Anwendung dieser Methode ist, dass der verwendete Bakterienstamm β -Galaktosidase-defizient ist (z.B. pMOS) und der transformierte Vektor innerhalb seines β -Galaktosidase-Gens (*lacZ*) eine MCS aufweist. Vor dem Ausplattieren der Bakterien wurden IPTG und X-Gal auf der LB-Agarplatte ausgestrichen. Durch den erfolgreichen Einbau eines DNA-Inserts in die

multiple cloning site wurde das lacZ-Gen zerstört, so dass die mit diesem Plasmid transformierten Bakterien keine β -Galaktosidase mehr produzieren konnten und diese Kolonien weiß blieben. War die Ligation jedoch nicht erfolgreich, so blieb das β -Galaktosidase-Gen intakt und die enzymatische Umsetzung von X-Gal zu blauem Farbstoff konnte ablaufen, daher färbten sich Bakterien, die einen Vektor ohne Insert trugen, blau.

5.2. Eukaryotische Zellkultur

5.2.1. Kultivierung von adhärennten Monolayer-Zellkulturen (modifiziert nach (Hart, 2010))

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit den folgenden, adhärennt auf einer Unterlage wachsenden Monolayer-Zellkulturen gearbeitet: 293T, PNF, DU145, und LNCaP. Kultiviert wurden alle Zelllinien in Zellkulturflaschen (75 cm²) bei 37°C und 5% CO₂ in einem Brutschrank. Die entsprechenden Medien in denen diese Zelllinien kultiviert wurden sind oben aufgeführt. In der Regel wurden die 293T- und DU145-Zellen montags und freitags 1:10, die LNCaP-Zellen je nach Bedarf 1:2 und die PNF-Zelllinie je nach Bedarf 1:3 gesplittet. Dazu wurde der Zellrasen, nachdem das alte Kulturmedium steril abgenommen wurde, zunächst mit 1 ml Trypsin/EDTA zur vollständigen Entfernung aller Mediumreste gewaschen und die Zellen mit 1 ml Trypsin/EDTA wenige Minuten bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Das Enzym Trypsin ist eine Protease und ermöglicht das Ablösen der Zellen von der Flaschenoberfläche, sowie das Vereinzeln der Zellen, durch den enzymatischen Abbau der Zelloberflächenproteine. Die Trypsin-Reaktion wurde durch Zugabe des entsprechenden Mediums abgestoppt, ein entsprechender Teil dieser Suspension in eine neue Kulturflasche überführt und mit dem adäquaten Kulturmedium auf 20 ml Gesamtvolumen aufgefüllt.

5.2.2. Zellzahlbestimmung mittels Fuchs-Rosenthal-Zählkammer

Zur Zellzahlbestimmung mit Hilfe der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer (Carl Roth GmbH) wurde ein geschliffenes Deckglas auf die Kammer aufgebracht bis die Newton'schen Ringe sichtbar wurden. Danach wurde die Zählkammer mit einer 1:100 verdünnten Zellsuspension befüllt und abgewartet bis die Zellen sich abgesetzt hatten. Anschließend wurden drei Großquadrate mit jeweils 16 Mittelquadraten unter einem Mikroskop mit 40-facher Verdünnung ausgezählt und der Mittelwert der Zellzahl gebildet. Das Kammervolumen der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer beträgt 3,2 μl . Die Zellzahl pro Milliliter wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{gezählte Zellzahl} \times 312,5 \text{ (1000/Kammervolumen)} \times 100 \text{ (Verdünnungsfaktor)} = \text{Zellzahl / ml}$$

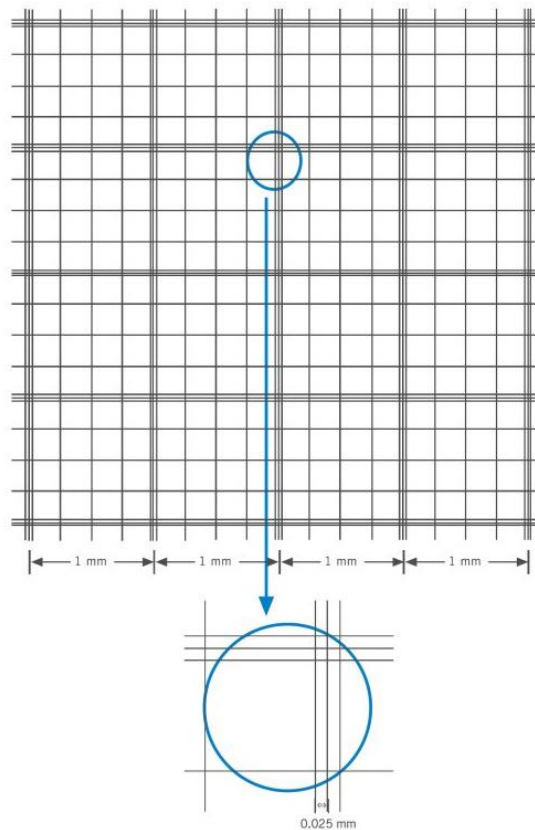


Abbildung 11: Fuchs-Rosenthal-Zählkammer (Quelle: rogosampaic.com)

5.2.3. Transfektion eukaryotischer Zellen mit Nanofectin™ (Hart, 2010)

Zur transienten Transfektion von 293-T Zellen wurde Nanofectin™ (PAA) verwendet. Nanofectin™ ist ein DNA-Transfektionsreagenz und wird durch die Anwesenheit von Serum während der Transfektion nicht beeinflusst. Dieses Transfektionsreagenz besitzt eine hohe Transfektionseffizienz, sowie eine geringe Zytotoxizität und besteht aus einem positiv geladenen Polymer, das von einem porösen Nanopartikel umgeben ist. Die positive Ladung des Polymers dient dazu, die zu transfizierende, negativ geladene DNA zu binden und so die Formierung eines Nanopartikel-Polymer-DNA-Komplexes sicherzustellen. Dieser Komplex wird von den eukaryotischen Zellen endozytotisch aufgenommen und der Nanopartikel-Komplex schützt dabei die DNA vor dem Abbau. Die eukaryotischen, adhärenen Zellen wurden laut Vorschrift ausgesät, bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, nach 24 h transfiziert und nach 48 h geerntet oder weiterverwendet.

5.2.4. Transfektion von PCa-Zelllinien mit JetPrime

Die transiente Transfektion von PCa-Zelllinien mit Plasmid-DNA erfolgte mit jetPrime™ (Polyplus-transfection, Illkirch, Frankreich). Dieses Transfektionsreagenz auf Basis eines nicht-liposomalen Moleküls ermöglicht die effiziente Transfektion von DNA und siRNA in eukaryotische Zellen. Zunächst wurden die Zellen laut Herstellerprotokoll ausgesät und 24 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Bei Transfektion der Zellen am nächsten Tag waren die Zellen zwischen 60-70% konfluent. Plasmid-DNA wurde im Verhältnis 1:2 zum Transfektionsreagenz eingesetzt, d.h. 2 µg Plasmid-DNA wurden unter der Sterilbank mit 200 µl jetPrime™-Puffer versetzt und danach 4 µl jetPrime™-Transfektionsreagenz hinzu pipettiert. Danach wurden die Transfektionsansätze 10 sec lang gevortext und anschließend bei RT 10 min inkubiert. Abschließend wurde der Transfektionsmix vorsichtig auf die Zellen aufgetropft und durch vorsichtiges Schwenken des Zellkulturgefäßes mit dem Medium vermischt. Bis zur Weiterverwendung wurden die Zellen bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert.

5.2.5. Transfektion von PCa-Zelllinien mit Antisense-Oligonukleotiden

Zur transienten Transfektion von miScript miRNA Inhibitoren (QIAGEN) bzw. der Negativkontrolle miScript Inhibitor Negative Control in DU145- bzw. in LNCaP-Zellen wurde das HiPerFect Transfection Reagent (QIAGEN) verwendet. Die Zusammensetzung von HiPerFect Transfection Reagent aus einem Gemisch kationischer und neutraler Lipide ermöglicht es miScript miRNA Inhibitoren in eukaryotische Zellen einzuschleusen. Die DU145- bzw. LNCaP-Zellen wurden laut Herstellerprotokoll in 6-Loch-Platten ausgesät, die FKS und Antibiotika versetztes RPMI-1640-Medium enthielten und bis zur Transfektion 24 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach 24 Stunden wurden 1,5 µg miScript miRNA Inhibitoren in 100 µl antibiotika- und serumfreien RPMI-Medium verdünnt und 12 µl HiPerFect Transfection Reagent dazugegeben und gevortext. Die Transfektionsansätze wurden 5-10 min lang bei Raumtemperatur inkubiert, damit sich die Transfektionskomplexe bilden konnten. Anschließend wurden die Transfektionsansätze tropfenweise zu den Zellen gegeben und die 6-well-Platte vorsichtig geschwenkt, was eine gleichmäßige Verteilung der Transfektionskomplexe bewirkte. Die transfizierten Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ bis zur Weiterverwendung inkubiert.

5.3. DNA-Techniken

5.3.1. Isolierung von Plasmid-DNA

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

(Hart, 2010) (modifiziert nach (Birnboim and Doly, 1979))

Diese sogenannte Boiling-Präparation ermöglicht die Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien zur Analyse in einem kleinen Maßstab. Dazu wurden 2 ml einer Ampicillin-haltigen LB-Flüssigkultur mit einer einzelnen Bakterienkolonie inokuliert und über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Bakteriensuspension in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt und 5 min bei 5000 rpm und 4°C in der Sigma Kryofuge 202MK abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 200 µl STET-Puffer resuspendiert und die Bakterien durch Zugabe von 1 µl Lysozym (0,5 mg/ml) lysiert. Danach wurde die Probe 10 min lang auf Eis inkubiert und

anschließend 45 sek lang bei 98,5°C im Wasserbad gekocht. Nun wurde die Probe kurz auf Eis abgekühlt und erneut bei 4°C, 13000 rpm, 15 min lang abzentrifugiert. Das entstandene Pellet aus Zelltrümmern und Proteinen wurde mit einem sterilen Zahnstocher entfernt und die DNA durch Zugabe von 200 µl Isopropanol, vortexen und abzentrifugieren (20min, 13000rpm, 4°C) gefällt. Im nächsten Schritt wurde das Pellet an der Luft getrocknet, in 20 µl S1-Puffer mit RNase A resuspendiert und die noch vorhandene RNA durch eine 10 minütige Inkubation bei 37°C verdaut. Zuletzt wurde die DNA 5 min bei 50°C gelöst.

5.3.1.2. Präparative Plasmid-DNA-Isolation mittels NucleoBond™ (Hart, 2010)

Zur Isolation großer Mengen an hochreiner Plasmid-DNA aus einer Bakterien-suspension, wurde der NUCLEOBOND™-Kit von Macherey Nagel benutzt. Nach Firmenprotokoll werden die Bakterien zunächst einer alkalischen Lyse unterzogen und das erhaltene Zelllysat mittels einer Anionentauschersäule aufgearbeitet. Die NUCLEOBOND™-AX 100-Säulen (Midi) ermöglichen eine Aufbereitung von bis zu 100 ml Bakterienkultur. Zunächst wurde eine 50 ml Übernachtskultur Bakterien, welche mit dem entsprechenden Plasmid transformiert wurden, 10 min bei 5000 rpm und 4°C mit Hilfe der Heraeus Megafuge 1.0 RF pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 4 ml Puffer S1 (+RNaseA) resuspendiert. Danach erfolgte die Zugabe von 4 ml Puffer S2, der Ansatz wurde gevortext und für maximal 5 min bei RT inkubiert. Der S2-Puffer enthält SDS, das die bakterielle Zellwand zerstört, so die Bakterien lysiert und zur Freisetzung der intrazellulären Zellbestandteile führt. Darüber hinaus enthält dieser Puffer NaOH, welches die chromosomale DNA, die Plasmid-DNA und die Proteine denaturiert. Im nächsten Schritt wurde die Suspension mit 4 ml Puffer S3 neutralisiert, durch mehrmaliges invertieren gemischt und darauf folgend 5 min auf Eis inkubiert. In diesem Zeitraum hybridisieren die beiden Stränge der wesentlich kleineren Plasmid-DNA wieder und verbleiben in Lösung, wohingegen die weitaus größere chromosomale DNA einzelsträngig bleibt und mit den ebenfalls denaturierten Proteinen ausfällt. Danach erfolgt erneut ein Zentrifugationsschritt (25 min, 6000rpm, 4°C) und der DNA-enhaltende Überstand wird auf die zuvor mit 4 ml Puffer N2 equilibrierte NUCLEOBOND™-AX 100-Säule gegeben und wegen der Salz- und pH-Bedingungen, die im Lysat herrschen, können

die stark negativ geladenen Nukleinsäuren an die Säulenmatrix binden und werden zurückgehalten. Danach wurde die Säule zur Entfernung der RNA und den übrigen Proteinen 2 x mit 5 ml Puffer N2 gewaschen und anschließend die Plasmid-DNA mit 5 ml Puffer N5 eluiert. Nun erfolgte die DNA-Fällung durch Zugabe von 3,6 ml Isopropanol und die Pelletierung der Plasmid-DNA durch Zentrifugation (30 min, 6000 rpm, 4°C). Abschließend wurde die DNA mit 2 ml Ethanol (70%) gewaschen, abhängig von der Größe des DNA-Pellets in einem entsprechenden Volumen TE-Puffer gelöst und der DNA-Gehalt, sowie der Reinheitsgrad photometrisch bestimmt.

5.3.2. Photometrische Konzentrationsbestimmung (Hart, 2010) (Maniatis, 1989) (Birnboim and Doly, 1979)

Zur Messung der Konzentration und des Reinheitsgrades von DNA und RNA wird mit Hilfe des Ultraspec 3000 Photometers bzw. des NanoDrop™ 2000c die Extinktion bei 260 nm bzw. 280 nm bestimmt. Da Nukleinsäuren Licht der Wellenlänge 260 nm 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 mit dem Hyperchromizitätseffekt begründet. Die Reinheit von Nukleinsäuren wurde über den Quotienten aus $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$ bestimmt. Da Proteine Licht der Wellenlänge 280 nm absorbieren, beschreibt der Quotient $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$ den Reinheitsgrad der DNA-/RNA-Probe. Dieser sollte bei reiner DNA bzw. RNA zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Tiefere Werte sind ein Hinweis auf Verunreinigungen mit Proteinen oder Phenolresten. Für die Messung mit dem Ultraspec 3000 Photometer wurde die DNA-/RNA-Lösung 1:100 mit H_2O_{bidest} auf ein Endvolumen von 400 μl verdünnt und die $OD_{260\text{ nm}}$ und $OD_{280\text{ nm}}$ gemessen. Bei Messungen am NanoDrop™ 2000c wurden 2 μl unverdünnte DNA-/RNA-Lösung eingesetzt. Als Referenz diente H_2O_{bidest} .

5.3.3. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) (Hart, 2010)

(Mullis et al., 1986)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) stellt ein enzymatisches *in vitro*-Verfahren zur selektiven Vermehrung von Nukleinsäuresequenzen definierter Länge aus einem Gemisch von Nukleinsäuremolekülen dar. Grundlage dieser Methode ist die Eigenschaft von DNA-Polymerasen ausgehend von einem freien 3'-Hydroxy-Ende einer einzelsträngigen DNA-Matrize (Template) den dazu komplementären DNA-Einzelstrang synthetisieren zu können. Am Anfang der PCR wird zunächst die doppelsträngige DNA-Matrize bei 94°C in zwei Einzelstränge denaturiert. Danach wird die Reaktion wieder abgekühlt, damit synthetische hergestellte Oligonukleotide (Primer), die jeweils zu einer spezifischen DNA-Sequenz der beiden Matrizen-einzelstränge komplementär sind, mit diesen hybridisieren können. Dieser Schritt wird als Annealing bezeichnet. Die dafür ausgewählte Annealing-Temperatur ist abhängig von Länge und Sequenz bzw. GC-Gehalt der verwendeten Primer. Die Annealing-Temperatur liegt meist zwischen 51°C und 65°C. Durch das Annealing der Primer an ihre komplementären Sequenzen in den einzelsträngigen Matrizensträngen steht nun der DNA-Polymerase ein freies 3'-Hydroxy-Ende zur Verfügung, das als Startpunkt für die Synthese eines zum Template komplementären Tochterstranges nicht definierter Länge dient. Dieser, als Elongation bezeichnete Schritt der PCR, läuft bei 72°C ab, dem Temperaturoptimum der Polymerase und benötigt zur Synthese der Tochterstränge freie dNTPs (Desoxyribonukleosidtriphosphate) im Reaktionsmix. Obwohl die im ersten Elongationszyklus synthetisierten Tochterstränge oft länger als der zu amplifizierende Sequenzbereich sind, besitzen sie jedoch durch die Primer festgelegte Startpunkte, die auf diese Weise den zu amplifizierenden Sequenzbereich genau bestimmen. Während des zweiten Reaktionszyklus, wobei ein Reaktionszyklus aus Denaturierung, Annealing und Elongation besteht, werden die zuvor neusynthetisierten DNA-Doppelstränge ebenfalls als Templates genutzt. Ab dem dritten Reaktionszyklus entstehen hauptsächlich Doppelstränge, die von Primern flankiert werden. Die zyklischen Wiederholungen von Denaturierung, Annealing und Elongation ermöglichen eine nahezu exponentielle Amplifikation der gewünschten Zielsequenz in denen alle neu synthetisierten Tochterstränge als Templates dienen können. Die am häufigsten in

PCRs eingesetzte DNA-Polymerase stammt aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* (*Taq*-Polymerase), deren Temperaturoptimum bei 72°C liegt und auch noch bei den 94°C heißen Denaturierungsschritten stabil bleibt. Beim Design der Oligonukleotid-Primer wurde darauf geachtet, dass beide Primer nahezu ähnliche Schmelztemperaturen aufweisen und sich keine Primerdimere durch Selbstkomplementarität bilden konnten. Alle verwendeten Primer wurden in lyophilisierter Form von der Firma Eurofins MWG Operon bezogen und vor der Verwendung in sterilem, DNase-freiem Wasser gelöst. In der nachfolgenden Tabelle 8 ist ein typisches Pipettierschema eines Standard-PCR-Ansatzes dargestellt.

Tabelle 8: Pipettierschema eines 50 µl Standard-PCR-Ansatzes

Komponente	Menge / Volumen	Endkonzentration
dNTP's	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 ₂ O _{bidest}	ad 50 µl	

Die PCR-Reaktionen wurden in einem Peltier Thermal Cycler 200 der Firma MJ Research durchgeführt. In der Tabelle 9 ist ein Standard-PCR-Programm dargestellt, dessen Annealing-Temperatur den jeweiligen Schmelztemperaturen der Primer und dessen Elongationszeit der jeweiligen Sequenzlänge des Amplifikats (0,5-1 min pro kb Sequenzlänge) angepasst wurde. Um eventuelle Kontaminationen ausschließen zu können, wurde bei jeder PCR eine Wasserkontrolle mitgeführt, welche alle Komponenten des PCR-Ansatzes bis auf das DNA-Template enthielt. Der letzte Schritt einer jeden PCR bestand aus einem stark verlängerten Elongationsschritt, der zum Auffüllen noch einzelsträngig vorliegender DNA-Stränge diente. Um zu überprüfen, ob die PCR erfolgreich ablief, wurden 25 µl eines PCR-Ansatzes gelelektrophoretisch aufgetrennt.

Tabelle 9: verwendetes Standard-PCR-Programm

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
Denaturierung	94°C	2 min
Denaturierung	94°C	1 min
Annealing	abhängig von Primern	1 min
Elongation	72°C	0,5 - 1 min
		} x 38
Letzte Elongation	72°C	10 min

5.3.4. Zielgerichtete Mutagenese (modifiziert nach(Hart, 2010))

Zur zielgerichteten Mutation von microRNA-Target-Sequenzen in der 3'UTR wurde das gleichnamige Verfahren der zielgerichteten Mutagenese (site-directed mutagenesis) verwendet. Zunächst erfolgte eine PCR mit dem Plasmid als Template, welches für die zu mutierende 3'UTR kodiert und mit zwei zueinander komplementären Primern, die die gewünschte Mutation trugen. In dieser PCR wurde die zu mutierende Plasmidsequenz mittels einer Proofreading-Polymerase (*Phusion*® High-Fidelity-DNA-Polymerase) amplifiziert (Tab.10).

Tabelle 10: Pipettierschema eines Standard-PCR-Ansatzes einer zielgerichteten Mutagenese

Komponente	Menge / Volumen	Endkonzentration
dNTP's	2 µl	je 100 mM
5xReaktionspuffer	10 µl	1x
5'-Mutagenese-Primer	1 µl	50 µM
3'-Mutagenese-Primer	1 µl	50 µM
Matrizen DNA	1 µl	100 ng
<i>Phusion</i> -Polymerase	0,5 µl	1 U
H ₂ O _{bidest}	ad 50 µl	

In der nachfolgenden Tabelle 11 ist das Mutagenese-PCR-Programm dargestellt.

Tabelle 11: Mutagenese-PCR-Programm

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
Denaturierung	98°C	2 min
Denaturierung Annealing Extension	98°C abhängig von Primern 72°C	50 s 1 min 0,5 - 1 min } x 38
Letzte Extension	72°C	10 min

Nach Reisolierung der amplifizierten DNA wurde die methylierte bzw. hemimethylierte parentale DNA durch das methylierungsspezifische Restriktionsenzym *DpnI* abgebaut, während die neu synthetisierte, nicht methylierte, mutierte DNA nicht abgebaut wurde. Nach Transformation der mutierten DNA in *E.coli*-pMOS, rezirkularisierte diese wieder zu einem Plasmid und wurde durch die Bakterien vermehrt. Um die Identifizierung der Klone, welche die Mutation trugen, zu erleichtern, wurde mittels der bei der PCR verwendeten Mutagenese-Primer eine spezifische, einzigartige Restriktionsschnittstelle in das mutierte Plasmid eingefügt und anhand eines Restriktionsverdau mit dem adäquaten Restriktionsenzym, die für die Mutation positiven Klone identifiziert.

5.3.5. Agarosegelelektrophorese (Hart, 2010)

(Maniatis, 1989)

Die Agarosegelelektrophorese ist eine molekularbiologische Methode zur Auftrennung von Nukleinsäuren, um DNA-Fragmente verschiedener Größen sichtbar zu machen. Aufgrund der negativen Ladung der DNA wandert diese im elektrischen Feld in Richtung der Anode. Dabei wirken die Agarosegele wie Molekularsiebe, wobei kleinere DNA-Fragmente schneller durch die Poren des Gels wandern als größere. Die Porengröße des Agarosegels wird durch die Agarosekonzentration des Gels bestimmt, daher richtet sich die eingesetzte Konzentration nach der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente (Tab.12). Mittels eines bekannten DNA-Molekulargewichtstandards kann die Größe der aufgetrennten DNA-Fragmente bestimmt werden.

Tabelle 12: Eingesetzte Agarosekonzentrationen je nach aufzutrennender Fragmentgröße

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

Zur Herstellung eines Agarosegels wurde die entsprechende Menge Agarose in 450 ml 1x TAE-Puffer durch aufkochen in einer Mikrowelle gelöst und nach dem Abkühlen mittels Magnetrührgerät auf etwa 60°C mit 25 µl Ethidiumbromid-Stammlösung (10 mg/ml in H₂O) versetzt. Danach wurde die Agaroselösung auf eine Glasplatte mit Messingrahmen (24,5 × 24,5 × 1 cm), der zuvor mit 1% Agaroselösung abgedichtet wurde und bereitgestellten Halterungen mit Messing-Kämmen, die zur Aussparung der ca. 35 µl fassenden Probetaschen dienten, gegossen. Nach dem Auspolymerisieren des Agarosegels wurden die Kämmen gezogen, das Gel in Klarsichtfolie verpackt und bis zur Verwendung bei 4°C zwischengelagert.

Um das Absinken der DNA-Proben in die Geltaschen gewährleisten zu können, wurden diese mit einem Fünftel ihres Gesamtvolumens an glycerolhaltigem Blaumarker versetzt und auf diese Weise konnte auch gleichzeitig, durch den im Blaumarker enthaltenen Farbstoff Bromphenolblau, die Lauffront der DNA-Proben im Gel sichtbar gemacht werden. Ein Gelstück mit der adäquaten Anzahl an Taschen wurde in eine mit 1x TAE-Puffer gefüllte Gelelektrophoresekammer verbracht. Zur Bestimmung der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente, wurde in die äußeren Taschen separat 10 µl eines Molekulargewichtstandards (1 kb-Plus Leiter, Invitrogen) aufgetragen. Danach wurden die mit Blaumarker versetzten DNA-Proben in die restlichen Geltaschen pipettiert. Abschließend wurden die DNA-Fragmente durch Anlegen eines elektrischen Feldes aufgetrennt (140V für ca. 1h). Durch die Zugabe des unter UV-Licht fluoreszierenden Ethidiumbromids, das in doppelsträngige DNA interkaliert, war es möglich, die DNA-Fragmente nach erfolgter Auftrennung unter UV-Licht bei 254 nm als fluoreszierende Banden zu

dokumentieren (ChemiDoc™ XRS+, Bio-Rad). Aber diese kurzwellige UV-Strahlung schädigt die DNA so stark, dass diese unbrauchbar für weitere gentechnische Arbeiten wird. Daher wurden DNA-Fragmente, die zur Klonierung weiterverwendet wurden, vor der Dokumentation des Gels mittels einer UV-Lampe bei einer Wellenlänge von 365 nm sichtbar gemacht und mit Hilfe eines sterilen Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten.

5.3.6. NucleoSpin-Gelextraktion von DNA (Hart, 2010)

Zur Gelextraktion von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel oder zur Aufreinigung einer DNA-Lösung (PCR-Clean-up) wurde das NucleoSpin-Extraktions Kit von Macherey-Nagel unter Verwendung des Firmenprotokolls benutzt. Dieses Verfahren beruht auf dem Prinzip der Ionenaustauschchromatographie, welchem die Bindung von DNA an eine silicahaltige Säule zu Grunde liegt. Danach wurden durch einen Waschschrift unspezifisch gebundene Moleküle von der Säule entfernt und anschließend die DNA mit einem Elutionspuffer und Zentrifugation von der Säule in ein frisches Eppendorfgefäß eluiert. Die auf diese Weise extrahierte DNA wurde nun entweder mit Restriktionsenzymen geschnitten oder zur direkten Ligation in den pGEM-T® Vektor benutzt.

5.3.7. Enzymatische Modifikation von DNA

5.3.7.1. Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen (Hart, 2010)

(Maniatis, 1989)

Die Restriktionsendonukleasen (Restriktionsenzyme) stammen aus Mikroorganismen und dienen dazu eigene DNA anhand von Methylierungsmustern von Fremd-DNA zu unterscheiden. Dabei wird die als fremd erkannte DNA abgebaut wird. Allgemein unterscheidet man drei Klassen von Restriktionsendonukleasen. Jedoch nur Restriktionsenzyme der Klasse II finden in der Molekularbiologie Verwendung. Diese Klasse von Endonukleasen erkennt spezifisch eine Sequenz von vier, sechs oder

acht Basenpaaren in doppelsträngiger DNA, wobei diese Sequenzen normalerweise auch die Schnittstelle selbst beinhalten. Diese Erkennungssequenzen sind meist palindromische Sequenzen. Die Restriktionsendonukleasen können zwei unterschiedliche Arten von Schnitten erzeugen. Einerseits können die Restriktionsenzyme direkt gegenüberliegende Basenpaare schneiden, so dass glatte Enden, sog. Blunt ends, entstehen. Andererseits können sie die DNA versetzt schneiden, wodurch überhängende Enden am 5'- oder am 3'-Ende, sog. Sticky ends, gebildet werden. Die Aktivität von Restriktionsenzymen ist durch die Enzymmenge definiert, die benötigt wird, um 1 µg DNA im optimalen Milieu bei optimaler Temperatur (meist 37°C) innerhalb von 60 min vollständig zu schneiden und wird in Units (u) angegeben.

In einem Restriktionsansatz wurden für analytische Zwecke 0,5-1 µg DNA und für präparative Zwecke bis zu 4 µg DNA eingesetzt. Die Anzahl der verwendeten Units betrug je nach Restriktionsenzym zwischen 2-10 U/g DNA. Der Restriktionsverdau erfolgte jeweils gemäß dem Herstellerprotokoll (Temperatur, Inkubationsdauer, Puffer) mit den mitgelieferten 10 x Puffern und falls benötigt 10 x BSA. Es besteht auch die Möglichkeit einen Doppelverdau durchzuführen, was bedeutet, dass die DNA mit zwei Restriktionsenzymen gleichzeitig geschnitten wird. Dabei muss darauf geachtet werden, dass ein entsprechender Puffer verwendet wird, in dem beide Enzyme eine angemessene Restriktionsaktivität besitzen. In der folgenden Tabelle 13 ist ein Standard-Restriktionsansatz abgebildet.

Tabelle 13: Standard-Restriktionsansatz

Komponente	Menge / Volumen
Restriktionsenzym	1 U
10 x Restriktionspuffer	2 µl
DNA	1-2 µl
H ₂ O _{bidest}	ad 20 µl

Vor der Zugabe der Enzyme, wurden die Restriktionsansätze gevortext, kurz abzentrifugiert, die Enzyme hinzupipettiert und für mindestens 2 h oder über Nacht bei 37°C inkubiert. Danach wurden sie mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, um einerseits den Erfolg des Restriktionsverdaus zu überprüfen und andererseits gleichzeitig die DNA von Restriktionspuffer und Enzymen zu reinigen.

5.3.7.2. Dephosphorylierung von Vektor-DNA (Hart, 2010)

(Bolivar, 1977; Chaconas, 1980)

Nach dem Restriktionsverdau von linearisierter Vektor-DNA, wurde unter Verwendung von alkalischer Phosphatase (CIP, calf intestinal phosphatase) die reaktive Phosphatgruppe am 5'-Ende entfernt, um eine Rezirkularisierung oder auch Konkatemisierung des Vektors zu verhindern. Wenn Vektoren mit zwei unterschiedlichen Restriktionsendonukleasen verdaut wurden, ist eine Rezirkularisierung eher unwahrscheinlich, jedoch eine Konkatemisierung, d.h. eine Verbindung mehrerer Vektoren miteinander, möglich. Daher wurde auch nach einem Doppelverdau der Vektor dephosphoryliert. Die Dephosphorylierung wurde nicht in einem separaten Schritt durchgeführt, sondern stattdessen wurde der Restriktionsansatz zusätzlich mit 1 µl CIP versetzt und mindestens für 2 h oder über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Dephosphorylierungs- und Restriktionsansatz mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, der Vektor aus dem Gel ausgeschnitten, über NUCLEOSPIN™-Säulen reisoliert und zur Ligation von DNA-Fragmenten weiter verwendet.

5.3.7.3. Ligation von DNA-Fragmenten (Hart, 2010)

(Dugaiczky et al., 1975; Sgaramella et al., 1970)

Mit Hilfe der T4-DNA-Ligase, welche aus mit dem Bakteriophagen T4 infizierten *E.coli*-Bakterien isoliert wurde, erfolgt während einer Ligation die enzymatische Verknüpfung von zueinander passenden DNA-Fragmenten. Dieses Enzym katalysiert *in vitro* unter ATP-Verbrauch die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten 3'-Hydroxy- und 5'-Phosphatenden in doppelsträngiger DNA und ermöglicht somit die Bildung einer intakten, rekombinanten ds-Plasmid-DNA. Dabei können die beiden Enden der zu ligierenden Nukleinsäuremoleküle entweder überhängend oder stumpf sein. Um eine effektive Ligation von zwei Nukleinsäuremolekülen zu gewährleisten, wurden die Konzentrationen der eingesetzten Vektor- und Insert-DNA so gewählt, dass beide im Reaktionsansatz äquimolar vorlagen. Die nachfolgende Tabelle 14 zeigt einen typischen Ligationsansatz.

Tabelle 14: Standard-Ligationsansatz

Komponente	Volumen
Insert	4-7 μ l
dephosphorylierter Vektor	1-4 μ l
10 x T4-Ligase-Puffer	1 μ l
T4-Ligase (1U/ μ l)	1 μ l

Die Inkubation des Ligationsansatzes erfolgte über Nacht bei 4°C. Zur anschließenden Transformation kompetenter Bakterien, wurden 5 μ l eines Ligationsansatzes verwendet. Zur Überprüfung der erfolgreichen Dephosphorylierung des Vektors, wurde bei jeder Ligation ein Ligationsansatz ohne Insert als Kontrolle mitgeführt.

5.3.7.4. Ligation von PCR-Fragmenten in pGEM[®]-T (Hart, 2010)

Die Ligation von PCR-Fragmenten in den pGEM[®]-T Vektor (Promega) ist eine Methode zur direkten Klonierung von PCR-Produkten ohne vorherige Restriktion. Während der PCR werden durch die *Taq*-Polymerase an das 3'-Ende des Amplifikats Adenin-Überhänge angeknüpft, welche die direkte Ligation des PCR-Produktes in den pGEM[®]-T Vektor mit 3'-T-Überhang ermöglichen. Durch die Blau-Weiß-Selektion (3.1.4.) können nach der Transformation des Ligationsansatzes in kompetente *E.coli*/pMOS-Bakterien, positive, weiße Kolonien von negativen, blauen Kolonien unterschieden werden. Dieser Ligationsansatz wurde mindestens 3 h bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert. In der nachfolgenden Tabelle 15 ist ein Standard-Ligationsansatz dargestellt.

Tabelle 9: Standard-Ligationsansatz pGEM[®]-T-Vektor

Komponente	Volumen
Insert	3 μ l
pGEM [®] -T Vektor	1 μ l
2 x Ligationspuffer	5 μ l
T4-Ligase (1U/ μ l)	1 μ l

5.4. RNA-Techniken

5.4.1. RNA-Isolation (Hart, 2010)

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen, wurde das peqGOLD TriFast™-Reagenz (PEQLAB) nach einem modifizierten Protokoll verwendet. Hierbei handelt es sich um eine optimierte Guanidinisothiocyanat/Phenol-Methode zur gleichzeitigen Extraktion von RNA, DNA und Proteinen. Um RNA aus Monolayer-Zellkulturen zu extrahieren, wurde zuerst das Zellkulturmedium aus den Kulturschalen entfernt. Nun wurde 1 ml peqGOLD TriFast™ pro 10 cm² Oberfläche auf den Zellrasen pipettiert, die Zellen lysiert, abgeschabt und die Zell-TriFast-Suspension für eine 5 minütige Inkubation in ein Falcon überführt, um die Dissoziation der Nukleotidkomplexe sicherzustellen. Nach der Inkubation wurde pro verwendeten ml TriFast™ 0,2 ml Chloroform zur Suspension pipettiert, die Proben 15 sek geschüttelt und wieder 10 min lang bei RT inkubiert. Darauf erfolgte ein Zentrifugationsschritt (30 min, 6000 rpm, 4°C), um eine Phasentrennung des Homogenats zu erreichen. Dabei trennte sich das Homogenat in drei Phasen, in eine untere rot gefärbte Phenol-Chloroform-Phase, eine weiße Interphase und in eine obere, wässrige Phase, die ausschließlich die RNA enthielt. Die wässrige Phase wurde darauf in ein frisches Falcon überführt. Zur Fällung der RNA wurden pro ml eingesetzten TriFast 0,5 ml Isopropanol hinzugegeben, gevortext und die Lösung 15 min auf Eis gehalten. Nun erfolgte wieder ein 30-60 minütiger Zentrifugationsschritt bei 4°C und 6000 rpm, um die gefällte RNA zu pelletieren. Das RNA-Pellet wurde kurz an der Luft getrocknet und danach in 100-200 µl DEPC-Wasser bei 4°C über Nacht gelöst.

5.4.2. Northern Blot (Hart, 2010)

Die Methode des Northern Blots diente zur Auftrennung und Identifikation von einzelsträngigen RNA-Molekülen. Zunächst wurde die Gesamt-RNA mittels einer Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt, die RNA-Fragmente auf eine Nylonmembran geblottet und fixiert. Danach wurde das entsprechende Fragment

durch Hybridisierung mit einer spezifisch markierten Sonde, die aus einzelsträngiger DNA oder RNA besteht und an das fixierte RNA-Fragment mittels homologer Basenpaarung bindet, nachgewiesen. Die Sonde kann sowohl mit radioaktiven Molekülen oder nicht-radioaktiven Bestandteilen, wie z.B. Digoxigenin oder Biotin, markiert sein.

5.4.2.1. Herstellung des Polyacrylamidgels und Gelelektrophorese

(modifiziert nach (Hart, 2010))

Für die Herstellung der 12%igen Polyacrylamidgele, die ausschließlich im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, wurde das SequaGel[®] Kit (National Diagnostics) verwendet. Das Kit besteht aus drei Komponenten: SequaGel-Konzentrat, -Verdünner und -Puffer. Die Lösungen enthalten neben Acrylamid und Bisacrylamid auch Harnstoff (7M) zur Denaturierung der RNA und Auflösung ihrer Sekundärstrukturen. Die Auftrennung der RNA-Proben im Polyacrylamidgel erfolgt durch das Anlegen eines elektrischen Feldes, wobei die negativ geladene RNA in Richtung der Anode wandert. Wegen der Vernetzung des Gels wandern größere RNA-Moleküle langsamer durch das Gel als kürzere. In der folgenden Tabelle 15 ist die Zusammensetzung eines 12%igen Polyacrylamidgels gezeigt.

Tabelle 15: Zusammensetzung eines 12%igen Polyacrylamidgels

Komponente	Volumen
Sequagel-Konzentrat	24 ml
Sequagel-Verdünner	21 ml
Sequagel-Puffer	5 ml
APS (10%)	400 µl
TEMED	20 µl

Nach dem Zusammenpipettieren aller Komponenten wurde das noch flüssige Gel zum Auspolymerisieren zwischen zwei, durch Spacer getrennte und zuvor mit 1%iger Agarose abgedichtete, Glasplatten (24 cm x 16,5 cm) gegossen und ein Kamm für 16 Taschen zwischen die Platten geschoben. Zur Probenvorbereitung wurden 20 µg RNA für die miR-Expressionskontrollen, sowie für die Northern Blots der PCa-

Zelllinien und 5 µg RNA der Prostatagewebepools mit 5-10 µl RNA-Ladepuffer II versetzt. Anschließend wurden die so vorbereiteten Proben in die Taschen des Polyacrylamidgels pipettiert. Die Auftrennung der RNA-Proben erfolgte für ~3 h bei 15 Watt. Danach wurde der Erfolg der Elektrophorese nach Anfärben der RNA in einem Ethidiumbromidbad (10 µl Ethidiumbromid-Stammlösung (10mg/ml) in 100 ml 1x TBE) mit dem Geldokumentationssystem (ChemiDoc™ XRS+, Bio-Rad) bei einer Wellenlänge von 254 nm dokumentiert.

5.4.2.2. RNA Transfer (Hart, 2010)

Nach der Dokumentation des Polyacrylamidgels, erfolgt der RNA-Transfer auf eine neutrale Nylonmembran (Hybond™-N+, Amersham) mit Hilfe einer Semi-dry-blotting-Apparatur (StarLab). Zum Blotten werden fünf Lagen in H₂O_{bidest} getränkte Whatman Filterpapiere auf die Anode gelegt, darauf die Nylonmembran, gefolgt von dem Polyacrylamidgel und fünf weiteren Lagen H₂O_{bidest} getränkter Filterpapiere. Danach wurde die Kathode aufgelegt und die RNA für 30 min bei 15 V auf die Nylonmembran geblottet. Zur Fixierung der besonders kleinen microRNA-Moleküle auf der Nylonmembran, wurde diese auf drei Whatman Filterpapiere, die mit einem chemischen Crosslinkreagenz (Pall and Hamilton, 2008) getränkt waren, aufgelegt, in Klarsichtfolie luftdicht verpackt und für 1-2 h bei 55°C in einem Hybridisierungsöfen inkubiert.

5.4.2.3. Herstellung einer radioaktiv markierten Sonde (Hart, 2010)

Zum Nachweis von RNA-Molekülen auf einer Nylonmembran, wurden radioaktiv markierte, einzelsträngige RNA-Sonden benutzt. Die Herstellung der radioaktiv markierten Sonden erfolgte mit Hilfe des mirVana™ miRNA Probe Construction-Kit von Ambion. Die zur Synthese der RNA-Sonde benötigten DNA-Oligonukleotide, deren Sequenzen der nachzuweisenden microRNA-Sequenzen entsprachen, enthielten am 3'-Ende zusätzlich eine 8 nt lange Sequenz (5'-CCTGTCTC-3'), welche mit dem T7-Promotorprimer hybridisieren kann. Dadurch konnte durch Hybridisierung des Templates mit dem T7-Promotorprimer mit Hilfe des Exo-Klenow

Enzyms ein doppelsträngiges DNA-Template synthetisiert werden. Der Hybridisierungsmix bestand aus 2 µl T7-Promotor-Primer (100 µM), 6 µl Hybridisierungspuffer und 2 µl Oligonukleotid-Template (100 µM). Dieser Hybridisierungsmix wurde zur Hybridisierung von Template und Primer zuerst 5 min bei 70°C und anschließend ebenfalls 5 min bei RT inkubiert. Zu den hybridisierten Oligonukleotiden wurde der folgende Reaktionsmix aus 2 µl 10x Klenow Reaction Buffer, 2 µl 10x dNTP Mix, 4 µl Nuklease-freiem Wasser und 2 µl Exo-Klenow pipettiert und dieser Ansatz 30 min bei 37°C inkubiert. Das so hergestellte dsDNA-Template konnte nun entweder bei -20°C gelagert oder für die *in vitro* Transkription mit radioaktiv markierten UTPs mittels der T7-RNA-Polymerase eingesetzt werden. Der *in vitro* Transkriptionsmix wurde aus folgenden Komponenten zusammenpipettiert: 1 µl dsDNA Template, 2 µl 10x Transkriptions-Puffer, 1 µl ATP, 1 µl CTP, 1 µl GTP, 5 µl gelabeltes UTP (³²P), 2 µl T7-RNA-Polymerase, 7 µl Nuklease-freies Wasser. Dieser Ansatz wurde gevortext, kurz abzentrifugiert und 10 min lang bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurde das noch vorhandene dsDNA-Template durch Inkubation des Ansatzes bei 37°C für 10 min mit 1 µl DNaseI entfernt. Die so hergestellte, radioaktiv markierte Sonde wurde danach sofort im Northern Blot eingesetzt.

5.4.2.4. Spezifischer Nachweis von RNA (Hart, 2010)

Nach dem chemischen Crosslinken der RNA mit der Nylonmembran, wurde diese in eine Hybridisierungsröhre aus Glas transferiert und 30 min bei 50°C mit Hybridisierungspuffer auf dem Drehrad eines Hybridisierungsofens prähybridisiert. Im nächsten Schritt wurde, die zuvor hergestellte radioaktiv markierte Sonde, welche spezifisch die nachzuweisende RNA-Sequenz binden kann, in den Hybridisierungspuffer pipettiert und die Membran über Nacht bei 50°C auf dem Drehrad eines Hybridisierungsofens inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurde der Hybridisierungspuffer mit der Sonde entfernt. Danach wurde der Blot zuerst zweimal 15 min mit jeweils 30 ml Hochsalzpuffer (5x SSC/1% SDS) bei 50°C auf dem Drehrad des Hybridisierungsofens gewaschen und darauf wiederum zweimal 15 min mit jeweils 30 ml Niedrigsalzpuffer (1x SSC/1% SDS) bei 50°C inkubiert. Zum Abschluss wurde der Blot in Klarsichtfolie verpackt und über Nacht auf einem Phospho-Imager-Screen

exponiert und am nächsten Tag mit einem Phosphoimager™-Typhoon (Molecular Dynamics) gescannt.

5.4.2.5. Stripping der Nylonmembran

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zur Validierung der Sequenzierungsergebnisse Northern Blots mit RNA aus den zur Sequenzierung eingesetzten Prostatagewebepools durchgeführt. Daher war die Menge der RNA aus den Gewebepools extrem beschränkt, was zur Folge hatte, dass diese Northern Blot-Membranen mit mehreren Sonden aufeinanderfolgend inkubiert werden mussten. Um die Signale der verschiedenen Sonden unabhängig voneinander detektieren zu können, wurden die Nylonmembranen zwischen den einzelnen Hybridisierungsschritten gestrippt, um die zuvor gebundene Sonde komplett zu entfernen. Dazu wurden die Membranen nach der Detektion der jeweiligen Sonde mit ca. 30 ml eines Stripping-Puffers bei 70°C für 2-3 h auf dem Drehrad des Hybridisierungsofens inkubiert. Danach konnte die von der vorherigen Sonde befreite Membran erneut zur Hybridisierung mit einer neuen Sonde verwendet werden.

5.5. Dual-Luciferase® Reporter Assay (Hart, 2010)

Reportergenassays, wie z.B. die Luciferase-Assays, ermöglichen es Genexpression und intrazelluläre Mechanismen zu untersuchen. Die Fähigkeit der Firefly- bzw. der Renilla-Luciferase, die Umsetzung von Luciferin in Anwesenheit von ATP und Mg^{2+} bzw. Coelenterazine unter O_2 -Verbrauch zu katalysieren bei der Licht in Form eines Photons emittiert wird, bildet die Grundlage des Luciferase-Assays. Der Dual-Luciferase Reporter Assay besitzt den Vorteil, dass in einem einzigen Assay die Aktivität der Firefly- und der Renilla-Luciferase gemessen werden kann. Zunächst wird die Aktivität der Firefly-Luciferase in einem Zellextrakt durch Zugabe des Firefly-spezifischen Substrats gemessen. Nachdem die Lichtemission mittels eines Luminometers gemessen wurde, wird die Reaktion abgestoppt, gleichzeitig das spezifische Substrat der Renilla-Luciferase mit der „Stop & Glo“-Lösung hinzugegeben und abschließend erneut die Lichtemission gemessen. Für die Dual-Luciferase-Assays, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden, wurde der pMIR-RNL-

TK Vektor verwendet. Dieser Reportervektor ermöglicht es eine spezifische DNA-Sequenz direkt hinter das Gen der Firefly-Luciferase zu klonieren und somit einen Effekt auf die einklonierte Sequenz durch die Messung der Firefly-Luciferase-Aktivität indirekt zu untersuchen. Ein weiterer Vorteil dieses Vektors ist, dass er zusätzlich für das Gen der Renilla-Luciferase kodiert. Die Expression der Renilla-Luciferase ist allerdings stets unabhängig von der einklonierten Sequenz und daher kann die Renilla-Luciferase-Aktivität zur Normalisierung innerhalb des Experimentes herangezogen werden.

Zu Beginn des Experimentes wurden 1×10^5 293T-Zellen in einer 24 well-Platte ausgesät. Nach eintägiger Inkubation der 24 well-Platte bei 37°C und 5% CO₂ wurden die 293T-Zellen mittels der Nanofectin-Methode laut Herstellerprotokoll transfiziert. Es wurden jeweils 0,8 µg pSG5-basiertes Effektorplasmid und 0,2 µg Reporterplasmid transfiziert. Nach 48-stündiger Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurden die 293T-Zellen laut Herstellerprotokoll des Dual-Luciferase[®] Reporter Assays (Promega) lysiert. Die Zelllysate wurden abweichend vom Herstellerprotokoll zusätzlich 1:100 mit 1x PLB verdünnt. Kurz vor der Messung wurden 50 µl des LARII-Substrates in die Luminometer-Röhrchen vorgelegt, bevor 10 µl Zelllysate hinzugegeben wurden. Danach wurde umgehend die Lichtemission der Firefly-Luciferase mit Hilfe eines Luminometers (Berthold Technologies GmbH & Co.KG) 10 sek lang gemessen. Darauf wurde sofort 50 µl „Stop & Glo“-Lösung hinzugegeben. „Stop & Glo“-Reagenz inhibiert direkt die Firefly-Luciferase-Aktivität und enthält gleichzeitig das Substrat der Renilla-Luciferase, deren Aktivität direkt in der darauffolgenden, 10 sek langen Messung bestimmt wurde. Zu Beginn der Auswertung der Luciferase-Assays wurde die Aktivität der Firefly- mit der Renilla-Luciferase-Aktivität normalisiert. Danach wurden die zu vergleichenden Werte zueinander in Bezug gesetzt. Die Auswertung der Daten erfolgte zunächst mit Microsoft Excel 2010™. Die spätere statistische Auswertung wurde mittels Sigma Plot 10.0 durchgeführt, wobei die Signifikanz der Abweichungen durch den integrierten t-Test überprüft und p-Werte < 0,05 als statistisch signifikant erachtet wurden.

5.6. Proteintechniken

5.6.1. Herstellung von Proteinextrakten unter reduzierenden Bedingungen aus eukaryotischen Zellen (Hart, 2010) (Maniatis, 1989)

Die Gesamtzellextrakte aus adhärennten Monolayerzelllinien, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, wurden unter Verwendung eines 2x Sample-Buffers hergestellt. Der 2x Sample-Buffer enthält einerseits 3-Mercapto-1,2-propanediol, das Disulfidbrücken reduziert und dadurch die Tertiärstrukturen von Proteinen aufspaltet, und andererseits SDS, welches Sekundär- und Tertiärstrukturen von Proteinen löst und bei allen Proteinen für ein gleiches Masse-/Ladungsverhältnis sorgt. Daher ist das Laufverhalten der Proteine in der SDS-Gelelektrophorese nicht mehr abhängig von ihrer Ladung, sondern nur noch von ihrer Größe. Zur Herstellung von Proteinextrakten aus adhärennten Monolayerzelllinien wurde das Kulturmedium abgenommen, der Zellrasen mit PBS abgespült, die Zellen durch Zentrifugation für 10 min bei 1200 rpm bei 4°C pelletiert und nochmals zweimal mit PBS gewaschen. Das erhaltene Pellet wurde zunächst auf Eis mit einer definierten Menge 2x SDS-Sample-Buffer resuspendiert. Anschließend erfolgte eine 3 x 5 sek lange Sonifizierung der Zellen, darauf die Denaturierung der Proteine für 5-10 min bei 98,5°C im Wasserbad und ein 10 minütiger Zentrifugationsschritt bei 13000 rpm und 4°C zur Sedimentierung nicht löslicher Zellbestandteile. Da in dieser Arbeit 2x Sample-Buffer ohne Bromphenolblau benutzt wurde, konnte der Proteingehalt einer 1:100 Verdünnung der Gesamtzellextrakte in 0,1 M NaOH photometrisch durch Messung der OD_{280nm} bestimmt werden. Die Berechnung der Proteinmenge, die in der Gelelektrophorese eingesetzt werden soll, erfolgte nach folgender Formel:

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

Das Ergebnis dieser Formel stimmt mit der Proteinextraktmenge (in μl) überein, die 30 μg Protein entspricht. Bis zur Verwendung wurden die Proteinextrakte bei -20°C gelagert.

5.6.2. Herstellung von nativen Proteinextrakten aus eukaryotischen Zellen

Bei dieser Methode verbleiben die Proteine nativ, da ein 0,15 M Lysispuffer verwendet wurde, der kein 3-Mercapto-1,2-Propandiol und SDS beinhaltet. Zunächst wurde das Kulturmedium von den adhärennten Monolayerzelllinien entfernt, die Zellen in PBS abgeschabt, durch Zentrifugation für 10 min bei 1200 rpm bei 4°C pelletiert und nochmals zweimal mit PBS gewaschen. Danach wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet kurz über Kopf getrocknet, bevor es mit einer definierten Menge 0,15 M Lysepuffer versetzt und für 15 min auf Eis gehalten wurde. Darauf folgte eine 3 x 5 sek lange Sonifizierung des Zellpellets und eine Zentrifugation (13000 rpm, 4°C, 10 min) zur Entfernung der Zelltrümmer. Der proteinhaltige Überstand wurde abgenommen und bei -20°C bis zur Verwendung zwischengelagert.

5.6.3. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) (Hart, 2010)

(Laemmli, 1970), Maniatis, 1989)

Die SDS-PAGE ist eine Methode zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht, ihrer Gesamtladung oder ihrer dreidimensionalen Struktur. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Auftrennung der Proteinextrakte ausschließlich unter denaturierenden Bedingungen, da der verwendete Laufpuffer, das Polyacrylamidgel und der 2x Sample Buffer, das negativ geladene Detergenz SDS im Überschuss enthielten. Dieses Detergenz lagerte sich an die hydrophoben Regionen der Proteine an und zwar ein SDS-Molekül an je zwei Aminosäurereste. Dadurch wurden nahezu alle nichtkovalenten Wechselwirkungen innerhalb der Proteine gelöst und das Protein war proportional zu seiner Masse negativ geladen, wodurch die Eigenladung des Proteins vernachlässigbar wurde. Darüber hinaus wurden alle Disulfidbrücken im Protein durch das 3-Mercapto-1,2-propanediol des 2x Sample Buffers gespalten und die Proteine hauptsächlich wegen ihres unterschiedlichen Molekulargewichts aufgetrennt. Aufgrund der negativen Ladungen erfolgte nach Anlegen eines elektrischen Feldes eine Wanderung der Proteine hin zur Anode. Bei der Herstellung von Polyacrylamidgelen kommt es zur Polymerisation

von Acrylamid, welches über N,N'-Methyl-Bisacrylamid quervernetzt wird. Die Polymerisationsreaktion wird durch Ammoniumpersulfat (APS) gestartet und durch N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) katalysiert. Die Laufstrecke der Proteine in einem Polyacrylamidgel mit geeigneter Porengröße ist proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichtes. Das Mischungsverhältnis aus Acrylamid und Bisacrylamid bestimmt die Porengröße der Gelmatrix. Zur Erhöhung der Auflösung bei der Auftrennung der Proteine, wurde in dieser Arbeit ausschließlich eine diskontinuierliche Gelelektrophorese eingesetzt, die in zwei Gelsystemen mit unterschiedlicher Porengröße und unterschiedlichen pH-Werten durchgeführt wurde. Zuerst müssen die Proteine ein grobporiges Sammelgel (Uppergel) passieren, um eine einheitliche Lauffront zu bilden, bevor sie in einem feinporigen Trenngel (Bottomgel) aufgetrennt werden. Um das relative Molekulargewicht der zu untersuchenden Proteine bestimmen zu können, wurde parallel zu diesen ein Molekulargewichtsmarker mit aufgetrennt, der aus Proteinen bekannter Molekulargewichte bestand.

5.6.4. Herstellung eines SDS-Polyacrylamidgels und Gelelektrophorese

(modifiziert nach (Hart, 2010))

Zur Herstellung eines SDS-Polyacrylamidgels wurden zwei Glasplatten (14,5 x 16,5 cm), die zuvor mit 70%igem Ethanol gereinigt wurden, durch Teflon-Abstandshalter voneinander getrennt und mit 1%iger Agaroselösung abgedichtet. Danach wurde zunächst das Trenngel in den Zwischenraum zwischen den zwei Glasplatten gegossen und mit H_2O_{bidest} überschichtet. Nachdem das Trenngel auspolymerisiert war, wurde das Wasser abgegossen und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Zur Aussparung der Taschen im Sammelgel, in die später die Proteinproben pipettiert wurden, musste ein Teflonkamm eingesetzt werden. Der Teflonkamm und der unterste Teflon-Spacer wurden entfernt, sobald das Sammelgel auspolymerisiert war und danach wurde das Gel senkrecht in eine Gelelektrophoresekammer eingespannt. Die obere und untere Kammer der Gelelektrophoreseapparatur wurde mit SDS-Laufpuffer und die Geltaschen entweder mit 10 μl eines Molekulargewichtsmarkers oder Proteinproben befüllt. Die elektrophoretische Auf-

trennung der Proteinproben erfolgte im Sammelgel bei 25 mA und im Trenngel bei 35 mA für ~2 h. Der nachfolgenden Tabelle 16 sind die Volumina der einzelnen Komponenten des Sammel- und des Trenngels zur Herstellung eines 8,75%igen Polyacrylamidgels zu entnehmen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich 8,75%ige Polyacrylamidgele verwendet.

Tabelle 16: Komponenten für ein 8,75%iges Polyacrylamidgel

Komponenten	Sammelgel	Trenngel (8,75%)
Sammel-/Trenngelstock	1,25 ml	4,0 ml
Acrylamid (30%)	750 µl	4,65 ml
Bisacrylamid (2%)	300 µl	1,86 ml
H ₂ O _{bidest}	2,7 ml	5,49 ml
APS (10%)	50 µl	140 µl
TEMED	20 µl	14 µl

5.6.5. Western Blot (Hart, 2010)

Mit Hilfe der Methode des Western Blots, werden die zuvor in der SDS-Gel-elektrophorese aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen und bei niedriger Ionenstärke über hydrophobe Wechselwirkungen auf dieser Membran immobilisiert. Dabei behalten die aufgetrennten und immobilisierten Proteine weitgehend ihre funktionelle Aktivität und Immunreaktivität. Dadurch wird es möglich einzelne Proteine durch spezifische Antikörper immunologisch nachzuweisen (Immunoblot). Gebundene Antikörper können entweder radioaktiv oder durch Chemilumineszenz detektiert werden. Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden die Proteine und die daran gebundenen Antikörper ausschließlich mittels Chemilumineszenz nachgewiesen. Der Western Blot wurde in einer mit Transferpuffer gefüllten Plastikwanne luftblasenfrei zusammengebaut, unter Verwendung eines zusammensteckbaren PVC-Gitters. Die zum Aufbau benötigten Komponenten wurden im PVC-Gitter in folgender Reihenfolge zusammengefügt: ein Wattetuch, zwei Whatman-Filterpapiere, das Polyacrylamidgel, die Protran™-Nitrocellulose-

Membran (Schleicher & Schuell), zwei Filterpapiere und zum Abschluss wieder ein Wattetuch. Der Transfer der Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf die Nitrocellulose-Membran erfolgte in einer mit Transferpuffer gefüllten Kammer (LKB 2005 Transphor Electro Blotting Unit) für 1,5 -2 h bei 350 mA. Nach dem Western blotting wurden die auf der Membran fixierten Proteine unspezifisch mittels PonceauS™ (Sigma-Aldrich) angefärbt, die Markerspuren mit einem Skalpell abgeschnitten. Zum Absättigen der unspezifischen Bindungsstellen der übrigen Membran, wurde diese zunächst 30 min bei RT in 5%iger PBS-Milch geblockt und darauffolgend mit dem entsprechenden Primär-Antikörpern in 2-5 ml PBS-Milch (5%) luftblasenfrei in eine Klarsichthülle eingeschweißt. Die mit dem Primär-Antikörper eingeschweißte Membran wurde über Nacht bei 4°C auf einem Taumler inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Membran 3 x 15 min in PBS auf einem Schüttler gewaschen, um unspezifisch gebundene Primärantikörper zu entfernen. Zum Nachweis der gebundenen Primärantikörper erfolgte nun eine Inkubation mit dem Sekundär-Antikörper, der gegen den primären Antikörper gerichtet und mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt war. Der Sekundärantikörper wurde 1:5000 in 5%iger PBS-Milch verdünnt und 1 h lang bei 4°C auf einem Taumler inkubiert. Danach wurde die Membran erneut 3 x 15 min in PBS-Puffer gewaschen und anschließend die mit Antikörpern markierten Proteine mittels einer enzymkatalysierten ECL-Lichtreaktion (Enhanced Chemoluminescence) detektiert. Nach Zugabe von 5 µl H₂O₂ und 10 ml ECL-Reagenz auf die Membran erfolgte eine Peroxidase-katalysierte Reduktion von H₂O₂ und gleichzeitige Oxidation von Luminol, was eine Lichtemission der Wellenlänge $\lambda=428$ nm bewirkte, die durch Auflegen eines blaulichtempfindlichen ECL™-Films (Hyperfilm ECL™, Amersham) auf die Membran dokumentiert wurde. Danach wurde dieser Film entwickelt, fixiert und getrocknet. Eine Quantifizierung der Bandenschwärzung der einzelnen Banden eines Western Blots erfolgte mit der Quantity One analysis Software der Firma Bio-Rad.

5.7. Zellproliferationsassay

Um den Einfluss von ektopisch exprimierten microRNAs bzw. von microRNA-Inhibitoren auf die Zellproliferation von PCa-Zelllinien zu untersuchen, wurde ein Zellproliferationsassay durchgeführt. Zunächst wurden 2×10^5 DU145- bzw. LNCaP-

Zellen in die Wells von 6-Lochplatten ausgesät. Am darauf folgenden Tag wurden die DU145- bzw. LNCaP-Zellen mit 4 µg Kontroll- bzw. 2 µg miR-Expressionsplasmiden und 2 µg Kontrollplasmid mittels JetPrime-Transfektionsreagenz laut Herstellerangaben oder DU145-Zellen mit 1,5 µg Kontroll- bzw. miR-Inhibitoren mittels HiPerFect-Transfektionsreagenz laut Herstellerangaben transfiziert. Zusätzlich wurden Zellen mit 400 µl pro Well abtrypsiniert, mit 1000 µl Medium abgespült und 100 µl der Zellsuspension mit 200 µl FACS-Fix fixiert. Diese 0 h Werte wurden bei 4°C, im Dunkeln bis zur Messung aufbewahrt. Danach wurden 24, 48 und 72 h nach Transfektion die restlichen FACS-Proben aller jeweiligen Transfektionen gesammelt, um später die Zellzahl in den einzelnen Proben durchflußzytometrisch im FACSCanto II (Becton Dickinson, BD) zu bestimmen.

5.8. Bestimmung der Zellzahl mittels Durchflußzytometrie

Die Methode der Durchflußzytometrie, die auch als FACS-Analyse (Fluorescence Activated Cell Sorting) bezeichnet wird, bietet die Möglichkeit einzelne Zellen aufgrund ihrer Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften zu analysieren. Mittels der hydrodynamischen Fokussierung werden die in Suspension befindlichen Zellen in einer Kapillare beschleunigt und vereinzelt. Dadurch passierten nur vereinzelt Zellen die Messkammer in der mit Hilfe eines Lasers die Zellen angeregt wurden Licht zu emittieren. Dabei wurde gleichzeitig die Emission des Vorwärtsstreulichts, das mit der Größe der Zellen korreliert und des Seitwärtsstreulichts, das die Granularität der Zellen beschreibt, gemessen. In dieser Arbeit diente die Durchflußzytometrie der Bestimmung der Zellzahl in den jeweiligen Proben des Zellproliferationsassays. Nach erfolgter FACS-Messung konnten die intakten Zellen mit Hilfe der FlowJo Software (TreeStar Inc., Ashland, USA) von der Zelldebris unterschieden und die Zahl der intakten Zellen bestimmt werden. Zur Auswertung der Zellzahlen der jeweiligen Proben der einzelnen Zeitpunkte diente GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA)

5.9. Illumina-Sequenzierung von fünf cDNA-Banken aus humanen Prostatageweben

Bis auf die Analyse der Roh-Sequenzdaten wurden alle Schritte der Illumina-Sequenzierung durch die Firma vertis Biotechnologie AG (Freising) durchgeführt und werden im Folgenden nur kurz beschrieben.

5.9.1. Zusammensetzung der Prostatagewebepools

Der erste Gewebepool bestand aus zehn pT2-Tumorproben ohne Lymphknotenmetastasen (N0). Im zweiten Pool wurden sieben pT3-Tumorgewebe ebenfalls ohne Lymphknotenmetastasen (N0) und im Dritten drei Gewebe aus Prostatakarzinomen mit Lymphknotenmetastasen (N1) zusammengefasst. Im vierten Pool wurde das gesunde Prostatagewebe aller korrespondierenden Prostatatumore vereinigt. Der fünfte Pool beinhaltete fünf Gewebeprobe gesunder Prostatae, die bei Zystektomien entnommen wurden.

5.9.2. Isolierung der kleinen RNA-Fraktion und Aufreinigung der microRNAs

Die Gewebe wurden, wie oben beschrieben, gepoolt und mit Hilfe des mirVana RNA isolation kit (Ambion) die RNA-Fraktion <500 nt isoliert. Danach wurden die kleinen RNA-Fractionen der einzelnen Pools in einem denaturierenden 15%igen Polyacrylamidgel (PAA) aufgetrennt und mit SYBRgreenII angefärbt. Im Anschluss wurden die RNAs mit einer Länge von 19-29 Nukleotiden durch passive Elution aus dem Gel gewonnen. Die eluierten RNAs wurden danach mit Ethanol gefällt und in Wasser gelöst.

5.9.3. cDNA-Synthese

An die isolierten miRNAs mit einer Größe zwischen 19-29 nt wurde durch eine Poly(A)-Polymerase ein 3'-Poly(A)-Schwanz ansynthetisiert und an ihrem 5'-Phosphatrest mit einem RNA-Adapter versehen. Die darauf folgende Erststrang-synthese wurde mit spezifischen Oligo(dt)-Adapter-Primern mittels der M-MLV-Reversen-Transkriptase durchgeführt. Die daraus entstandenen cDNAs wurden in einer abschließenden PCR mit einer High-fidelity-DNA-Polymerase bis zu einer Konzentration von ca. 30 ng/µl amplifiziert. Die so hergestellte cDNA-Inserts wurde von folgenden Adaptersequenzen mit einer Länge von 146 Basen flankiert, was einer Gesamtlänge von 165-176 bp entsprach:

TrueSeq_Sense_primer

5'- AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCT-3'

TrueSeq_Antisense_ NNNNNN_primer Barcode

5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT-

NNNNNNGTACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT

Die Identifikationssequenz (Barcodesequenzen) zur späteren Identifizierung der Sequenzen aus den verschiedenen Gewebepools befanden sich somit an den 5'-Enden der cDNAs und sind in Tabelle 17 aufgelistet.

Tabelle 17: verwendete Barcodesequenzen zur Identifizierung der jeweiligen cDNA-Banken

cDNA-Bank	Barcode
Pool 1 (pT2)	GTGGCC
Pool 2 (pT3)	GTTTCG
Pool 3 (metastasiert)	CGTACG
Pool 4 (gesund)	GAGTGG
Pool 5 (gesund (Zystektomie))	GGTAGC

5.9.4. Sequenzierung des cDNA-Pools

Für die Illumina-Sequenzierung wurden gleichen Mengen der einzelnen cDNAs in einem cDNA-Pool zusammengefasst und der cDNA-Pool mit Hilfe des Illumina-HiSeq-2000-Systems sequenziert.

5.9.5. Auswertung der Sequenzdaten

Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte ebenfalls durch die Firma vertis Biotechnologie AG. Dabei wurden die Sequenzdaten mit der miRBase V.17-Datenbank abgeglichen und die Rohsequenzdaten wurden in Form einer Excel-Tabelle bereitgestellt. Daher wurden diese Rohsequenzdaten im Rahmen dieser Arbeit ausgewertet. Dazu wurde zunächst die relative Expression jeder gefundenen microRNA in den einzelnen Pools berechnet, indem die Anzahl der jeweiligen Reads für eine spezifische miRNA durch die Anzahl der Gesamtreads des entsprechenden Pools dividiert wurde. Danach wurden alle miRNAs mit einer relativen Expression $< 0,1$ manuell aus der Excel-Liste gelöscht. Um die Veränderungen der miR-Expression in den Tumorgewebepools zu analysieren, wurden die relativen Expressionen einer jeden miRNA in den Tumorpoolen durch die entsprechende relative Expression dieser miRNA im gesunden Prostatagewebe, welches bei Zystektomien entnommen wurde, dividiert und miRNAs die zumindest 1,5-fach verändert waren in zwei Tabellen zusammengefasst. Es wurde je eine Tabelle für die induzierten und eine Tabelle für die reprimierten miRNAs erstellt. Zur Verbesserung der Anschaulichkeit wurden alle Werte der Tabellen in zwei Histogrammen dargestellt.

6. Ergebnisse

6.1. Fragestellung

Die am häufigsten diagnostizierte Krebserkrankung des Mannes in den westlichen Industrienationen ist das Prostatakarzinom. Daher stellt es ein Hauptaugenmerk der heutigen Krebsforschung dar (Bray et al., 2013). Dennoch sind die molekularen Mechanismen, die zur Entstehung und Progression des Prostatakarzinoms beitragen, weitgehend unverstanden. Im Verlauf der letzten Jahre lag ein Schwerpunkt der Prostatakarzinomforschung auf der Analyse der Korrelation zwischen abnormer miRNA-Expression und Prostataumorigenese und -progression. Mehrere Analysen der miRNA-Expression in gesunden Prostatagewebe im Vergleich zu tumorösen Gewebe ergaben zum Teil unterschiedliche oder sogar gegensätzliche Ergebnisse (Ozen et al., 2008; Porkka et al., 2007; Schaefer et al., 2010b; Szczyrba et al., 2010; Tong et al., 2009). Dies könnte zum einen auf die Heterogenität des Prostatakrebs und zum anderen auf die unterschiedlichen Analysemethoden, wie Microarrays und Sequenzierungen zurückgeführt werden. Die Basis der hier vorgestellten Arbeit stellte eine vorherige 454-Sequenzierung von Dr. Jaroslaw Szczyrba dar, welche die miRNA-Expression im gesunden Prostatagewebe im Vergleich zu nierdrigmalignen Tumorgewebe analysierte (Szczyrba et al., 2010). Aufgrund dessen sollte nun ein komparatives miRNA-Expressionsprofil zunehmend maligner Prostatakarzinome durch eine neuerliche Sequenzierung erstellt werden. Dadurch sollten mögliche Änderungen der miRNA-Expression im Verlauf der Progression des Prostatakarzinoms aufgedeckt werden. Darauffolgend sollten die Ergebnisse der Sequenzierung für ausgesuchte deregulierte miRNAs einerseits mittels Northern Blots in den zur Sequenzierung eingesetzten Prostatagewebepools und andererseits mit Hilfe der quantitativen Realtime-PCR in einem unabhängigen Patientenkollektiv validiert werden. Des Weiteren sollten zur Bestätigung des Zusammenhangs zwischen veränderter miRNA-Expression Prostatakarzinogenese und -progression durch Luciferase-Reportergen-Analysen Zielgene deregulierter miRNAs identifiziert werden, wobei die Ergebnisse der Luciferase-Reportergen-Assays auf Proteinniveau durch Western Blots in verschiedenen PCa-Zelllinien bestätigt werden sollten.

6.2. Illumina-Sequenzierung von fünf cDNA-Banken aus humanen Prostatageweben

6.2.1. Herstellung von fünf cDNA-Banken aus humanen Prostatageweben

Die Herstellung der fünf cDNA-Banken aus humanen Prostatageweben erfolgte durch die Firma vertis Biotechnologie AG. Die humanen Prostatagewebe, die zur Herstellung der fünf cDNA-Banken dienten, wurden von der Gewebebank des University Cancer Centers (UCC) des Uniklinikums Erlangen von Dr. Tilman Rau zur Verfügung gestellt. Zunächst wurden fünf Prostatagewebepools erstellt und zur Herstellung der fünf cDNA-Banken eingesetzt. Die Prostatagewebepools setzten sich wie folgt zusammen: Pool 1 aus zehn pT2- Prostatatumorgeweben ohne Lymphknotenmetastasen (N0), Pool 2 aus sieben pT3-Prostatatumorgeweben ohne Lymphknotenmetastasen (N0), Pool 3 aus drei Prostatatumorgeweben mit Lymphknotenmetastasen (N1), Pool 4 aus dem kompletten gesunden Prostatagewebe aller korrespondierenden Prostatatumore und Pool 5 aus fünf gesunden Prostatageweben, die bei Zystektomien entnommen wurden. Danach wurde aus den Gewebepools die RNA-Fraktion mit einer Fragmentlänge von weniger als 500 Nukleotiden mittels des mirVana RNA isolation kit (Ambion) isoliert und in einem 15%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach dieser Auftrennung zeigten sich distinkte Banden der aufgereinigten kleinen RNA-Fractionen (Abb.12).

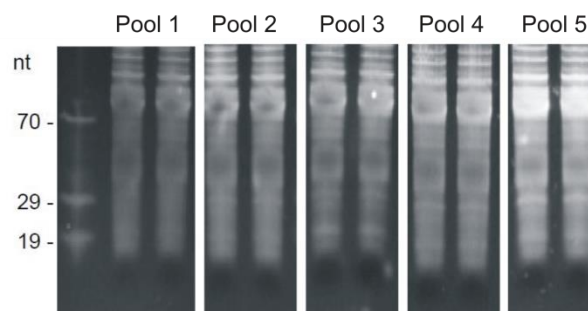


Abbildung 12: Gelelektrophoretische Auftrennung der kleinen RNA-Fraktion zur Elution der miRNA-Fraktion (Quelle: vertis Biotechnologie AG)

Die kleinen RNA-Fractionen unter 500 nt der jeweiligen Pools wurden nach der Isolierung mit dem mirVana RNA isolation kit in einem 15%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit SYBRgreenII angefärbt.

Nach der passiven Elution der microRNA-Fractionen der einzelnen Pools mit der Länge von 19-29 nt aus dem Polyacrylamidgel, erfolgte das Anhängen der Poly(A)-Schwänze, die Ligation von Adaptersequenzen einschließlich der Identifikationssequenzen und die reverse Transkription der modifizierten microRNAs der jeweiligen Pools in fünf cDNA-Banken. Darauf wurden die cDNAs der fünf Pools in einer abschließenden PCR amplifiziert, wodurch cDNAs mit einer Fragmentlänge von 165-176 bp entstanden. Der Erfolg der abschließenden PCR-Amplifizierung der cDNAs wurde mit Hilfe des Shimadzu MultiNA microchip electrophoresis system überprüft und die cDNAs mittels des Agentcourt AMPure XP kit (Beckman Coulter Genomics) aufgereinigt. Die Abbildung 13 zeigt die amplifizierten cDNAs mit der erwarteten Größe von 165-176 bp. Gleiche Mengen der fünf cDNA-Banken wurden gepoolt und durch das Illumina-HiSeq-2000-System sequenziert.

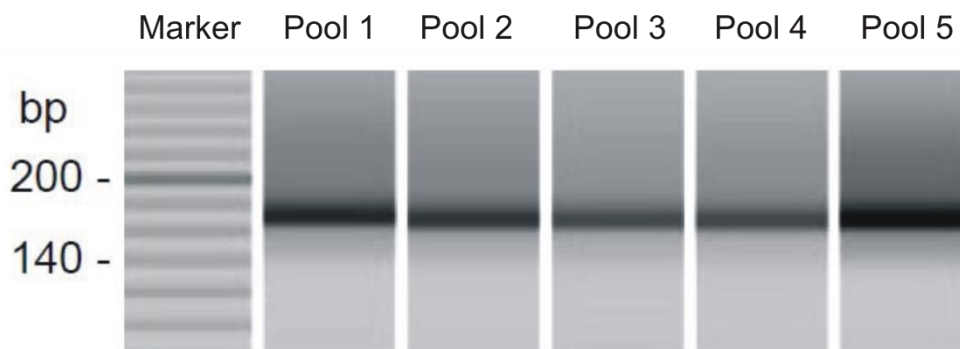


Abbildung 13: Qualitätskontrolle der amplifizierten cDNAs der jeweiligen Gewebepools (Quelle: vertis Biotechnologie AG)

Die Qualität der amplifizierten cDNAs der jeweiligen Pools wurde mittels des Shimadzu MultiNA microchip electrophoresis system analysiert und zeigte die erwartete Länge von 165-176 bp. Der eingesetzte DNA-Größenstandard ist eine 20 bp Ladder.

6.2.2. Sequenzanalyse der fünf cDNA-Banken aus humanen Prostatageweben

Die bioinformatische Sequenzanalyse der fünf cDNA-Banken aus humanen Prostatageweben wurde ebenfalls durch die Firma vertis Biotechnologie AG durchgeführt, indem die Sequenzdaten mit der miRBase V.17-Datenbank abgeglichen wurde. Insgesamt wurden 82.941.527 Reads generiert. Die Aufteilung der Gesamt-Reads auf die fünf sequenzierten Pools ist in Tabelle 18 dargestellt.

Tabelle 18: Aufteilung der Gesamtreads auf die Gewebepools

cDNA-Bank	Reads
Pool 1 (pT2)	15.362.735
Pool 2 (pT3)	17.517.579
Pool 3 (metastasiert)	16.816.056
Pool 4 (gesund)	15.369.335
Pool 5 (gesund (Zystektomie))	15.610.091

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Rohsequenzdaten, die von der Firma vertis Biotechnologie AG in Form einer Excel-Tabelle bereitgestellt wurden, analysiert. Zunächst wurde die relative Expression jeder gefundenen microRNA in den einzelnen Pools berechnet, indem die Anzahl der Reads für eine bestimmte microRNA durch die Anzahl der Gesamtreads des jeweiligen Gewebepools geteilt wurde. Anschließend wurden alle microRNAs, deren relative Expression unter 0,1 lag, manuell aus der Excel-Tabelle entfernt. Im Anhang sind alle relativen Expressionen > 0,1 und die dazugehörigen Gesamt-Reads einer jeden gefundenen miRNA in allen Prostatagewebepools in Tabelle 22 zusammengefasst.

6.2.2.1. Vergleich der miRNA-Expression in den gesunden Gewebepools

Um entscheiden zu können welcher gesunde Gewebepool zum Vergleich mit den drei Prostatatumorgewebepools zunehmender Malignitätsgrade dienen sollte, wurden die relativen Expressionen der 20 am stärksten exprimierten miRNAs in beiden Pools gegenübergestellt (Tab.19). Des Weiteren wurde in beiden gesunden Gewebepools eine Überrepräsentierung der miR-143 entdeckt.

Tabelle 19: Vergleich der am stärksten exprimierten miRs in den gesunden Prostatageweben

Pool 5 gesundes Prostatagewebe (Zystektomie)		Pool 4 gesundes Prostatagewebe (korrespondierende Tumore)	
miRNA	relative Expression [%]	miRNA	relative Expression [%]
hsa-miR-143	49,25	hsa-miR-143	42,00
hsa-miR-16	3,19	hsa-miR-26a	3,75
hsa-miR-29a	2,88	hsa-miR-16	3,45
hsa-miR-26a	2,80	hsa-miR-98	3,34
hsa-miR-27b	2,73	hsa-miR-27b	3,22
hsa-miR-99a	2,42	hsa-miR-29a	3,18
hsa-miR-22	2,12	hsa-miR-141	2,87
hsa-let-7a	1,80	hsa-miR-24	2,01
hsa-miR-141	1,77	hsa-miR-22	1,93
hsa-miR-199a-3p+199b-3p	1,76	hsa-let-7a	1,88
hsa-miR-21	1,74	hsa-miR-199a-3p+199b-3p	1,79
hsa-miR-23b	1,69	hsa-miR-26b	1,74
hsa-miR-24	1,63	hsa-miR-23b	1,71
hsa-miR-26b	1,47	hsa-miR-21	1,43
hsa-miR-145	1,47	hsa-let-7b	1,40
hsa-let-7f	1,42	hsa-let-7f	1,33
hsa-let-7b	1,28	hsa-let-7c	1,24
hsa-let-7g	1,17	hsa-let-7g	1,23
hsa-let-7c	0,94	hsa-miR-145	1,22
hsa-miR-103a	0,76	hsa-miR-103a	0,91

Durch den Vergleich der 20 am stärksten exprimierten miRNAs der gesunden Gewebepools stellte sich heraus, dass unter den 20 am stärksten exprimierten miRNAs 19 miRNAs übereinstimmend in beiden Gewebepools gefunden wurden. Dazu zählten die let-7a, let-7b, let-7c, let-7f, let-7g, miR-103a, miR-141, miR-143, miR-145, miR-16, miR-199a-3p+199b-3p, miR-21, miR-22, miR-23b, miR-24, miR-26a, miR-27b und miR-29a. In Pool 5 war die miR-98 nicht unter den 20 am stärksten exprimierten miRNAs vertreten und in Pool 4 die miR-99a. Darüber hinaus war die Varianz in der relativen Expression der übereinstimmenden miRNAs sehr gering. Somit zeigten beide gesunden Prostatagewebe ein vergleichbares miRNA-Expressionsmuster. Da davon auszugehen ist, dass die gesunden Prostatagewebe,

welche bei Zystektomien entnommen wurden, zu 100% frei von Tumorzellen und Neoplasien sind, wurde dieser Gewebepool zum Vergleich mit der miR-Expression der drei Prostatatumorgewebepools zunehmender Malignitätsgrade herangezogen.

6.2.2.2. Vergleich der miRNA-Expression zwischen gesundem Prostatagewebe und den Prostatatumorpoolen mit zunehmender Malignität

Nachdem zuvor alle miRNAs, deren relative Expression unter 0,1 lag, aus der Exzelliste entfernt wurden, sollte nun die Veränderung der miRNA-Expression in den zunehmend malignen Prostatatumorgewebepools im Vergleich zu gesunden Prostatageweben, welche bei Zystektomien entnommen wurden, analysiert werden. Dazu wurden die relativen Expressionen einer jeden miRNA in den Tumorpoolen durch ihre entsprechende relative Expression im gesunden Gewebe dividiert und alle miRNAs, welche zumindest 1,5-fach verändert waren, in zwei Tabellen zusammengefasst. Im Vergleich zur miRNA-Expression im gesunden Gewebe war die Expression von 40 miRNAs in den Prostatakarzinomen verschiedener Malignitätsgrade verändert, dabei waren 29 miRNAs induziert und 11 miRNAs reprimiert. Darüber hinaus wurde eine Überrepräsentierung der miR-143 festgestellt.

Die exakten Expressionsveränderungen, sowie die relativen Expressionswerte der induzierten miRNAs, sind in Tabelle 20 und die der reprimierten miRNAs in Tabelle 21 zusammengefasst.

Tabelle 20: Induzierte miRNAs in Prostatakarzinomen verschiedener Malignitätsgrade

induzierte miRNAs						
miRNA	pT2		pT3 (pN0)		Lymphknoten- metastasen (pN1)	
	relative Expression [%]	Veränderung [x-fach]	relative Expression [%]	Veränderung [x-fach]	relative Expression [%]	Veränderung [x-fach]
hsa-miR106a	0,08	1,81	0,11	2,59	0,08	1,78
hsa-miR106b	0,14	2,57	0,25	4,68	0,27	5,06
hsa-miR10a	0,07	1,45	0,10	1,98	0,06	1,18
hsa-miR141	3,89	2,73	3,47	2,43	3,98	2,79
hsa-miR148a	0,94	3,30	1,20	4,23	1,22	4,29
hsa-miR148b	0,07	1,76	0,08	2,20	0,12	3,06
hsa-miR15a	0,94	1,77	0,89	1,69	0,89	1,67
hsa-miR17	0,30	1,79	0,44	2,58	0,25	1,47
hsa-miR186	0,16	1,40	0,17	1,51	0,17	1,48
hsa-miR18a	0,08	1,19	0,13	1,89	0,07	1,00
hsa-miR191	0,53	1,35	0,72	1,85	0,51	1,31
hsa-miR195	0,48	1,61	0,57	1,94	0,52	1,76
hsa-miR196b	0,09	1,98	0,11	2,23	0,10	2,08
hsa-miR199b	0,26	1,40	0,30	1,67	0,37	2,01
hsa-miR200a	0,31	2,81	0,30	2,75	0,28	2,59
hsa-miR200b	0,20	3,00	0,32	4,71	0,18	2,71
hsa-miR200c	0,55	1,82	0,90	2,99	0,46	1,54
hsa-miR20a	0,89	1,60	1,12	2,01	0,54	0,97
hsa-miR20b	0,19	1,31	0,28	1,94	0,11	0,76
hsa-miR21	2,00	1,45	2,52	1,84	4,86	3,54
hsa-miR23a	0,65	1,01	0,81	1,26	0,98	1,52
hsa-miR25	0,18	1,93	0,28	2,90	0,19	2,00
hsa-miR30d	0,20	1,42	0,24	1,68	0,20	1,38
hsa-miR30e	0,13	1,59	0,12	1,46	0,08	0,97
hsa-miR363	0,27	1,61	0,34	2,06	0,25	1,49
hsa-miR375	1,13	3,09	1,03	2,80	2,17	5,93
hsa-miR92a-1	0,15	1,54	0,17	1,67	0,11	1,15
hsa-miR92a-2	0,12	1,40	0,13	1,52	0,10	1,09
hsa-miR93	0,39	1,37	0,71	2,49	0,29	1,02

Tabelle 21: Reprimierte miRNAs in Prostatakarzinomen verschiedener Malignitätsgrade

reprimierte miRNAs						
miRNA	pT2		pT3 (pN0)		Lymphknoten- metastasen (pN1)	
	relative Expression [%]	Veränderung [x-fach]	relative Expression [%]	Veränderung [x-fach]	relative Expression [%]	Veränderung [x-fach]
hsa-let7b	1,19	1,02	1,41	1,22	0,71	0,62
hsa-let7c	0,71	0,81	1,00	1,15	0,54	0,62
hsa-let7e	0,04	0,29	0,07	0,51	0,03	0,21
hsa-miR100	0,47	0,78	0,63	1,03	0,41	0,67
hsa-miR130a	0,17	0,75	0,12	0,56	0,21	0,96
hsa-miR143	31,61	0,79	25,82	0,64	25,95	0,65
hsa-miR145	1,27	0,86	1,00	0,68	0,73	0,49
hsa-miR205	0,16	0,72	0,15	0,71	0,09	0,41
hsa-miR320a	0,10	0,82	0,12	0,99	0,06	0,52
hsa-miR424	0,24	0,84	0,19	0,68	0,17	0,61
hsa-miR451	0,20	1,07	0,11	0,58	0,13	0,68

Um die Expressionsänderungen der deregulierten miRNAs anschaulicher darzustellen, wurden die Werte beider Tabellen in Histogrammen dargestellt. Die Abbildung 14 zeigt das Histogramm der in zunehmend malignen Prostatakarzinomen induzierten miRNAs. Zu den am stärksten induzierten miRNAs zählten die miR-375, miR-106b und miR-148a.

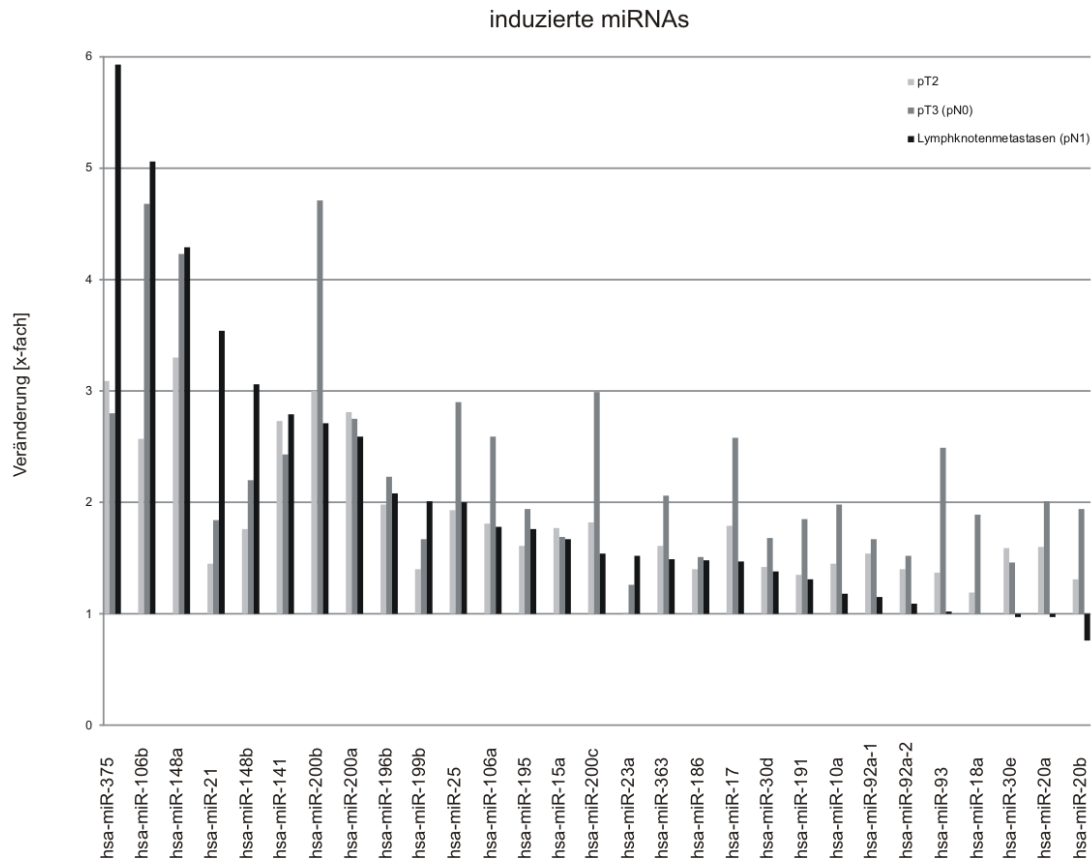


Abbildung 14: Induzierte miRNAs in Prostatakarzinomen zunehmender Malignitätsgrade

Dargestellt ist die Änderung der relativen Expression von 29 induzierten miRNAs, welche in den drei Prostata Tumorgewebepools mindestens 1,5-fach im Vergleich zum gesunden Prostatagewebe verändert waren. Die Expression der miRNAs im gesunden Gewebe wurde auf eins gesetzt. Die hellgrauen Säulen repräsentieren die Änderung der miRNA-Expression im niedrigmalignen, nicht metastasierten Prostata Tumoren, die dunkelgrauen Säulen die Änderung der miRNA-Expression im hochmalignen, nichtmetastasierten Tumorgewebe und die schwarzen Säulen die Änderung der miRNA-Expression in der hochmalignen Entität mit Lymphknotenmetastasen.

Das Histogramm der in Prostatakarzinomen verschiedener Malignitätsgrade reprimierten miRNAs ist in Abbildung 15 dargestellt. Die am stärksten reprimierten miRNAs waren let-7e, miR-205 und miR-145.

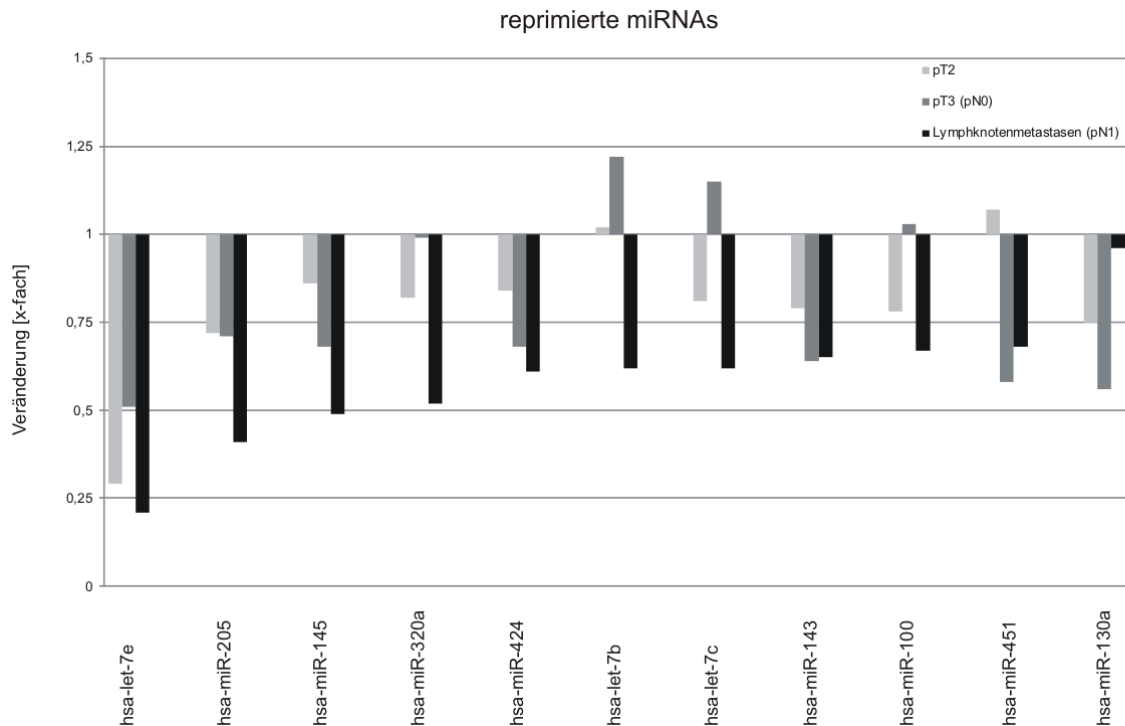


Abbildung 15: Reprimierte miRNAs in Prostatakarzinomen zunehmender Malignitätsgrade

Dargestellt ist die Änderung der relativen Expression von elf reprimierten miRNAs, welche in den drei Prostata Tumorgewebepools mindestens 1,5-fach im Vergleich zum gesunden Prostatagewebe verändert waren. Die Expression der miRNAs im gesunden Gewebe wurde auf eins gesetzt. Die hellgrauen Säulen repräsentieren die Änderung der miRNA-Expression im niedrigmalignen, nicht metastasierten Prostata Tumoren, die dunkelgrauen Säulen die Änderung der miRNA-Expression im hochmalignen, nichtmetastasierten Tumorgewebe und die schwarzen Säulen die Änderung der miRNA-Expression in der hochmalignen Entität mit Lymphknotenmetastasen.

6.3. Analyse der Expression deregulierter microRNAs zur Validierung der Illumina-Sequenzierung

Zur Bestätigung der Sequenzierungsergebnisse wurde die Expression von acht deregulierten miRNAs genauer analysiert. Dazu zählten die induzierten miRNAs, miR-375, miR-148a, miR-200b, miR-20a, miR-15a und die reprimierten miRNAs, let-7c, miR-145, miR-143. Einerseits wurden die Expressionsmuster dieser miRNAs durch Nachweis der miRNAs in den zur Sequenzierung eingesetzten Prostatagewebepools mit Hilfe von Northern Blots validiert. Andererseits wurde die Expression dieser miRNAs durch quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) in einem unabhängigen Patientenkollektiv, welches in seiner Zusammensetzung den zur Sequenzierung eingesetzten Gewebepools ähnelte, nachvollzogen.

6.3.1. Validierung der Sequenzierungsergebnisse durch Northern Blots

Die miRNA-Expression von acht deregulierten miRNAs, darunter die induzierten miRNAs miR-375, miR-148a, miR-200b, miR-20a, miR-15a und die reprimierten miRNAs, let-7c, miR-145, miR-143, wurde in den zur Sequenzierung verwendeten Prostatagewebepools mit Hilfe von Northern Blots untersucht. Die Detektion der miRNA-Expression in den einzelnen Gewebepools erfolgte durch spezifische, radioaktiv markierte Sonden. In Abbildung 16 sind die Northern Blots dieser acht deregulierten miRNAs dargestellt.

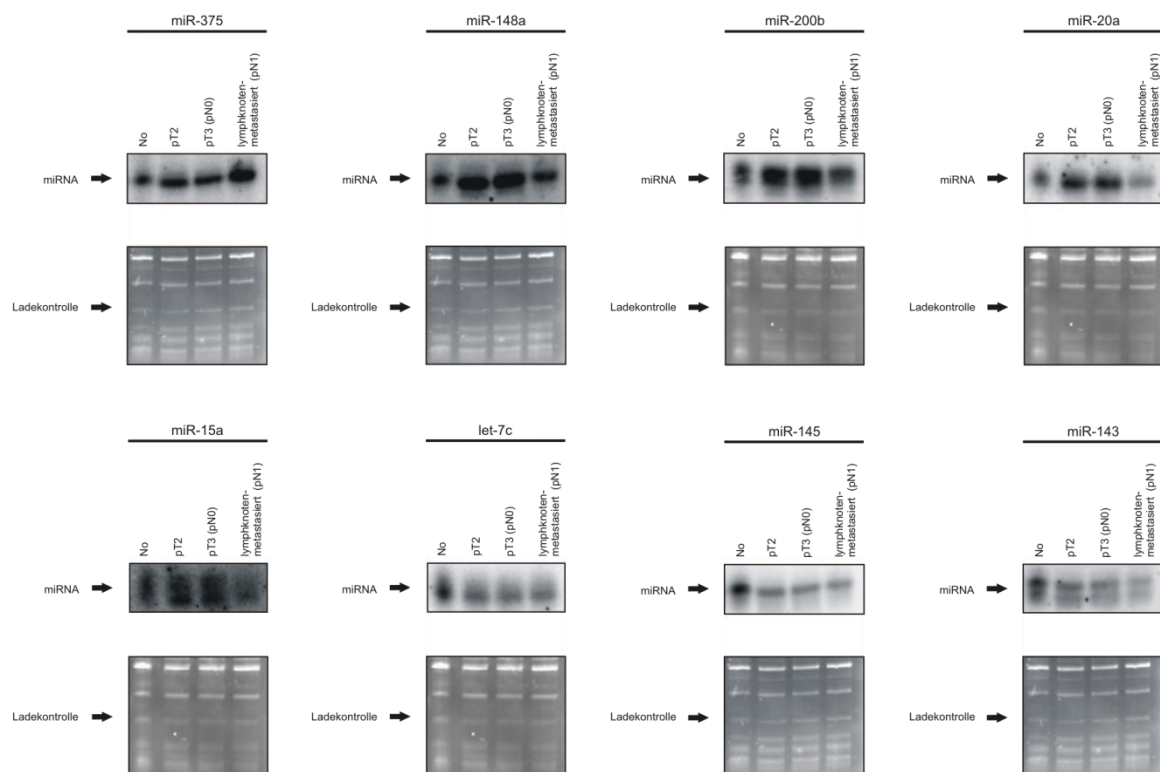


Abbildung 16: Northern Blots zur Validierung der Sequenzierungsergebnisse in den zur Sequenzierung verwendeten Prostatagewebepools

Je 5 µg Gesamt-RNA aus gesundem Prostatagewebe aus Zystektomien (No), niedrigmalignem Prostatatumorgewebe (pT2) ohne Lymphknotenmetastasen (N0), hochmalignem, nichtmetastasierten (N0) Prostatatumoren (pT3) und hochmalignen Prostatakarzinomen mit Lymphknotenmetastasen (N1) wurden in einem 12,5%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran geblottet. Der Nachweis der miRNAs erfolgte mit spezifischen, radioaktiv markierten RNA-Sonden, welche komplementär zu jeweilig nachzuweisenden miRNA-Sequenz waren. Übereinstimmend mit den Ergebnissen der Sequenzierung konnte nachgewiesen werden, dass die miRNAs miR-375, miR-148a, miR-200b, miR-20a, und miR-15a in den verschiedenen Tumorentitäten induziert und die miRNAs let-7c, miR-145 und miR-143 reprimiert waren.

Mit Hilfe spezifischer Sonden konnten die miRNAs miR-375, miR-148a, miR-200b, miR-20a, miR-15a, let-7c, miR-145 und miR-143 in allen Gewebepools nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass miR-375, miR-148a, miR-200b, miR-20a und miR-15a übereinstimmend mit den Sequenzierungsergebnissen in den verschiedenen Prostatatumorentitäten induziert waren und die miRNAs let-7c, miR-145 und miR-143 reprimiert waren.

Um eine Aussage über das Expressionsmuster der jeweiligen miRNAs in den einzelnen Entitäten treffen zu können, wurden anschließend die Stärke der jeweiligen, detektierten Signale mit Hilfe der Quantity One analysis Software der Firma Bio-Rad quantifiziert. Dazu wurde die Bandenstärke der miRNAs mit Hilfe der entsprechenden tRNA-Banden normalisiert und darauf die Stärke der Banden in den Prostatatumorgewebepools ins Verhältnis zur Bandenstärke im gesunden Prostatagewebe, welches bei Zystektomien entnommen wurde, gesetzt. Die Abbildung 17 zeigt die Quantifizierungen der Northern Blots der miRNAs miR-375, miR-148a, miR-200b, miR-20a, miR-15a, let-7c, miR-145 und miR-143.

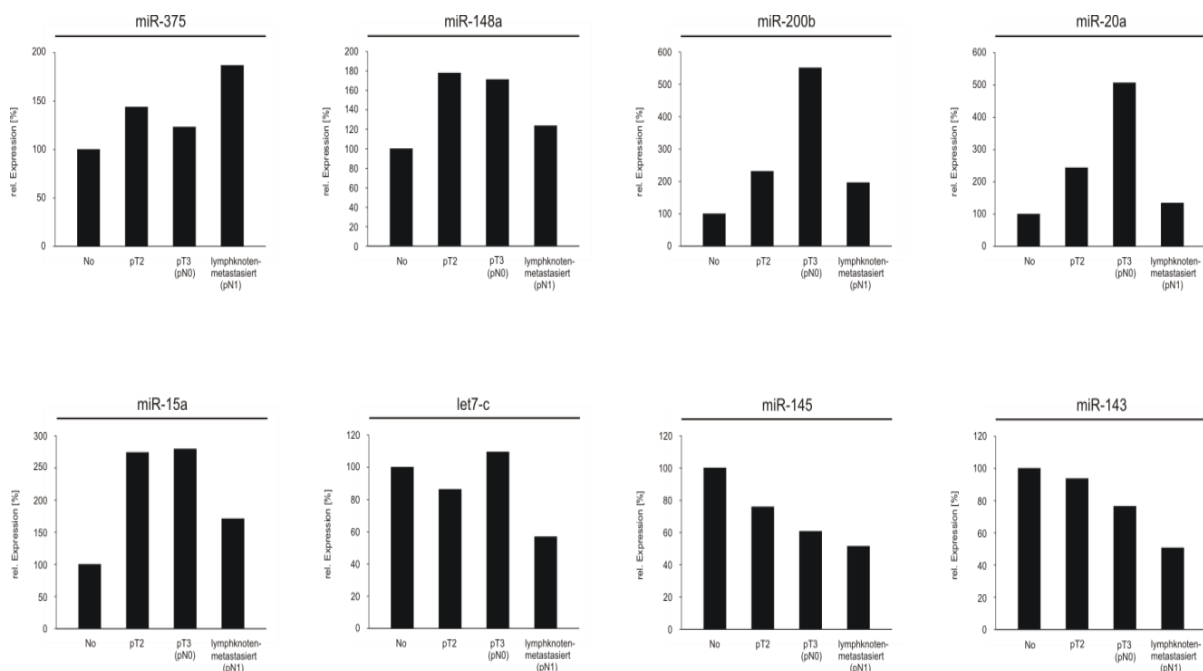


Abbildung 17: Quantifizierung der Northern Blots zur Validierung der Sequenzierungsergebnisse in den zur Sequenzierung verwendeten Prostatagewebepools

Die Signale der jeweiligen miRNAs wurden mittels der der Quantity One analysis Software (Bio-Rad) quantifiziert. Zunächst wurden die Signale der einzelnen miRNA-Banden gegen ihre entsprechenden tRNA-Signale normalisiert. Danach wurden die Signale der einzelnen miRNAs in niedrigmalignem Prostatatumorgewebe (pT2) ohne Lymphknotenmetastasen (N0), hochmalignem, nichtmetastasierten (N0) Prostatatumoren (pT3) und hochmalignen Prostatakarzinomen mit Lymphknotenmetastasen (N1) in Relation zum gesunden Prostatagewebe aus Zystektomien (No) gesetzt.

Nach der Quantifizierung der Northern Blots mit denen die miRNA-Expression der miR-375, -148a, -200b, -20a, -15a, let-7c, -145, und -143 in den zur Sequenzierung verwendeten Prostatagewebepools untersucht wurde, konnte gezeigt werden, dass die Expressionsmuster dieser miRNAs nahezu identisch mit den Expressionsmustern der jeweiligen miRNAs in der Sequenzierung waren. Die Expressionen der miR-375, -200b, -20a, -145 und let-7c zeigten exakt das gleiche Muster wie in den Sequenzierungen. Die Muster der miR-148a, -15a und -143 wiesen tendenziell große Übereinstimmungen zu denen der Sequenzierung auf.

6.3.2. Validierung der Sequenzierungsergebnisse durch quantitative Real-Time-PCRs in einem unabhängigen Patientenkollektiv

Zusätzlich zur Validierung durch Northern Blots in den zur Sequenzierung eingesetzten Prostatagewebepools wurden die Sequenzierungsergebnisse in einem unabhängigen Patientenkollektiv durch qRT-PCRs bestätigt. Die qRT-PCRs wurden am Institut für molekulare Urologie des Universitätsklinikums Erlangen von Dr. rer. nat. Elke Nolte durchgeführt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Hierbei wurde die Expression der miRNAs miR-375, -148a, -200b, -20a, -15a, let-7c, -145, und -143 in 41 Prostatatumorproben mit korrespondierenden Normalgeweben durch qRT-PCR analysiert und die Tumorproben anhand ihrer Patientencharakteristika in drei Entitäten (pT2 (N0), pT3 (N0), N1), eingeteilt, die den drei Prostatatumorpoolen der Sequenzierung entsprachen. Die Ergebnisse der qRT-PCRs sind in Abbildung 18 dargestellt.

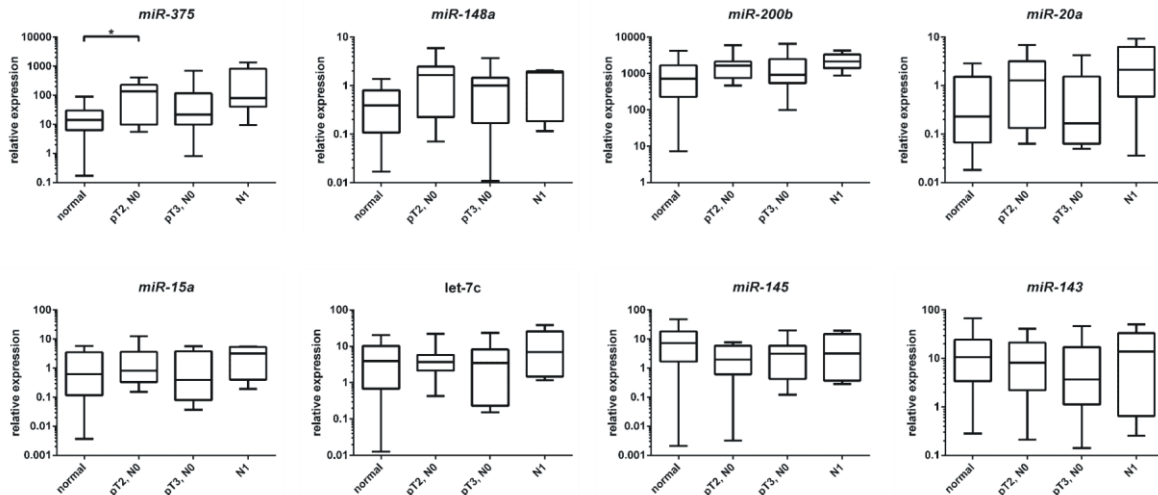


Abbildung 18: Validierung der Sequenzierungsergebnisse durch qRT-PCR in einem unabhängigen Patientenkollektiv

Die relative Expression der miRNAs miR-375, -148a, -200b, -20a, -15a, -145, -143 und let-7c wurde in einem unabhängigen Patientenkollektiv von 40 Tumorseiten und korrespondierendes Normalgewebe mit Hilfe von qRT-PCR bestimmt. Danach wurden die relativen Expressionen der jeweiligen miRs in den Tumorseiten anhand der Patientencharakteristika drei Tumorentitäten, pT2 N0, pT3 N0 und N1 zugeordnet, welche denen der Sequenzierung entsprachen. Die miRNAs miR-375, -148a, -200b, -20a, und -15a waren tendenziell induziert und die miRNAs let-7c, miR-145, und -143 tendenziell reprimiert.

Die Expressionsmuster der miRNAs miR-375 und miR-145 stimmten mit den korrespondierenden Expressionsmustern der Sequenzierung überein. Die miR-148a ($p < 0,0001$), -200b ($p < 0,0185$), -20a ($p < 0,0191$), -15a waren im unabhängigen Patientenkollektiv tendenziell induziert und die miRNAs let-7c, sowie miR-143 ($p < 0,007$) tendenziell reprimiert.

6.4. Analyse deregulierter miRNAs in Prostatakarzinomzelllinien

Zuvor wurden die PCa-Zelllinien DU145 und LNCaP von Dr. Jaroslaw Szczyrba als geeignete Zellsysteme zur Analyse deregulierter miRNAs beschrieben, nachdem er die Expressionen der miRNAs miR-200c, -375, -143 und -145 in beiden Zelllinien evaluiert hatte (Szczyrba et al., 2010; Szczyrba et al., 2011). Die Resultate von Szczyrba et al. standen im Einklang mit den Ergebnissen dieser Sequenzierung. Um erneut zu Verifizieren, dass die LNCaP- und DU145-Zellen als Zellsysteme zur funktionellen Untersuchung der differentiell exprimierten miRNAs und ihrer Zielgene geeignet sind, wurden die Expressionen der miR-200b und -15a in beiden Zelllinien und der PNF-Zelllinie als Kontrollzelllinie, durch Northern Blots untersucht. Zunächst

wurden 20 µg Gesamt-RNA der entsprechenden Zelllinie in einem 12,5%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach dem Blotten des Polyacrylamidgels erfolgte der Nachweis der miRNAs mit spezifischen radioaktiv markierten RNA-Sonden.

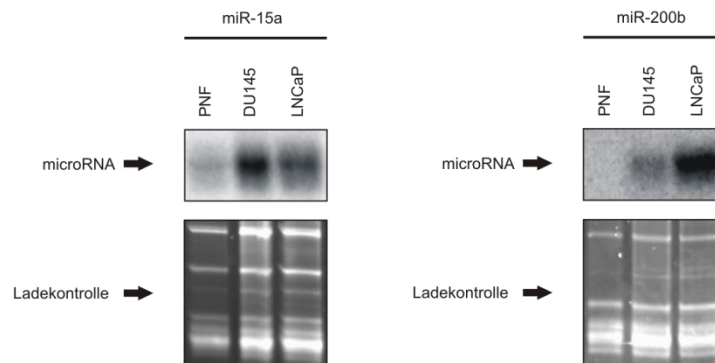


Abbildung 19: Expression der miR-15a und -200b in den PCa-Zelllinien

20 µg Gesamt-RNA jeder Zelllinie wurden in einem 12,5%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt, danach die RNA auf eine Nylonmembran geblottet und die miR-15a bzw.-200b mittels spezifischer radioaktiv markierter RNA-Sonden im Northern Blot nachgewiesen. Dabei konnte gezeigt werden, dass beide miRNAs in den PCa-Zelllinien im Vergleich zur PNF-Zelllinie induziert waren. Dies entsprach auch den Ergebnissen der Sequenzierung, in der beide miRNAs ebenfalls induziert waren.

Für die miR-15a konnte in der PNF-Zelllinie nur eine schwache Bande detektiert werden, wohingegen in den DU145- und LNCaP-Zellen stärkere Signale nachgewiesen werden konnten. Die PNFs zeigten keinerlei Signale für miR-200b. In den DU145-Zellen hingegen konnte eine schwache Expression und in den LNCaP-Zellen eine starke Expression der miR-200b gemessen werden. Diese Ergebnisse stimmen mit dem Ergebnissen der Sequenzierung überein, da auch in beiden PCa-Zelllinien eine Induktion der miR-15a und -200b nachgewiesen werden konnte. Somit konnten die DU145- und LNCaP-Zellen erneut als Zellsystem für die funktionelle Untersuchung der Effekte deregulierter miRNAs verifiziert werden.

6.5. Identifizierung von Zielgenen deregulierter miRNAs in zunehmend malignen Prostatakarzinomen

Zur Analyse der Funktionalität deregulierter miRNAs bei der Karzinogenese und Metastasierung von Prostata Tumoren sollten Zielgene differentiell exprimierter miRNAs identifiziert werden. Zunächst wurde mittels miRecords, einer Online-Datenbank, die elf verschiedene Algorithmen zur Vorhersage von miRNA-Zielgenen

zusammenfasst, nach Zielgenen deregulierter miRNAs gesucht. Da die *in silico*-Vorhersage von miRNA-Zielgenen in der Regel relativ ungenau ist, da für eine deregulierte miRNA mehrere Hundert Zielgene vorhergesagt werden, wurden die vorhergesagten Ziel-Gene mit ihren entsprechenden Expressionsdaten in der Oncomine-Datenbank abgeglichen. Die Oncomine-Datenbank beinhaltet mehrere veröffentlichte mRNA-Expressionsstudien auf der Basis von Microarrays (Lapointe et al., 2004; LaTulippe et al., 2002; Liu et al., 2006; Singh et al., 2002; Taylor et al., 2010), die zur verbesserten Zielgen-Vorhersage verwendet wurden. Auf diese Weise wurde die Zahl der potentiellen Ziel-Gene eingegrenzt. Anschließend wurden die 3'UTRs der potentiellen Zielgene in Luciferase-Reportervektoren kloniert, um den Einfluss der deregulierten miRNAs auf ihre potentiellen Zielgene in Luciferase-Assays analysieren zu können. Zu diesem Zweck wurden die 3'UTRs von ADIPOR2, NLK, MOB1A, PHLPP1, PHLPP2, PLAU, SEC23A, SEC62 und SH3GLB1 in Luciferase-Reportervektoren kloniert.

6.5.1. Potentielle Zielgene deregulierter miRNAs in zunehmend malignen Prostatakarzinomen

Das ADIPOR2 (adiponectin-receptor 2)-Gen kodiert für den Adiponectin-Rezeptor 2. Es konnte gezeigt werden, dass Adiponectin die Zellproliferation und Apoptose über die Bindung an seine Rezeptoren moduliert und das ADIPOR2 in PCa-Zelllinien herunterreguliert ist (Mistry et al., 2006). ADIPOR2 wurde als Zielgen für die in Prostatakarzinomen mit zunehmenden Malignitätsgrade induzierten miRNAs miR-200b, -200c und -375 vorhergesagt.

NLK (Nemo-like kinase) gehört zur Superfamilie von Serin/Threonin-Kinasen (Brott et al., 1998). NLK induziert die Apoptose in PCa-Zelllinien und die NLK-mRNA-Expression ist im Prostatakarzinom reprimiert (Emami et al., 2009). In der NLK-3'UTR wurden putative Bindestellen für die induzierten miRNAs miR-25, -148a und -375 durch Vorhersage-Algorithmen gefunden.

MOB1A (MOB kinase activator 1A) aktiviert LATS1/2 im Hippo-Signalweg (Bothos et al., 2005) und fungiert als Tumorsuppressor, indem die Zellproliferation gehemmt

und die Apoptose gefördert wird (Chow et al., 2010). Die Vorhersage-Algorithmen lieferten MOB1A als Zielgen der induzierten miR-375.

In der PHLPP1-3'UTR wurde eine Bindestelle für die in Prostatakarzinomen mit zunehmenden Malignitätsgraden induzierte miR-375 vorhergesagt. PHLPP1 (PH domain leucine-rich repeat protein phosphatase 1) gehört zu einer Familie von Serin/Threonin-Phosphatasen, die durch Inaktivierung von AKT, S6K, PKC sowie durch Aktivierung von proapoptotischen MST-1 als Tumorsuppressoren wirken, indem die Zellproliferation gehemmt und Apoptose induziert wird (Gao et al., 2005). PHLPP1-Proteinniveaus sind in Prostatakrebs und einer Vielzahl von Krebsarten herunterreguliert, darunter Darm-, Magen-, Bauchspeicheldrüsen- und Brustkrebs (O'Neill et al., 2013).

PHLPP2 (PH domain leucine-rich repeat protein phosphatase 2) gehört ebenfalls zur Familie von Serin/Threonin-Phosphatasen, die als Tumorsuppressoren die Zellproliferation hemmen und Apoptose fördern (Gao et al., 2005). Die PHLPP2-Proteinexpression ist in 45% aller Prostata Tumoren reprimiert und der Verlust der PHLPP1- und PHLPP2-Expression geht einher mit dem Verlust von PTEN und p53 in metastasierten Prostatakarzinomen (Chen et al., 2011). PHLPP2 war als Zielgen für miR-15a vorhergesagt worden.

Das PLAU-(plasminogen activator, urokinase)-Gen spielt eine Rolle bei der Invasion, dem Überleben und der Metastasierung in einer Mehrzahl von Krebsarten, darunter auch Prostatakrebs. Darüber hinaus ist PLAU im Prostatakarzinom im Vergleich zum gesunden Prostatagewebe überexprimiert (Li and Cozzi, 2007). In der PLAU-3'UTR wurde durch Vorhersage-Algorithmen eine Bindestelle für die reprimierte miRNA-143 gefunden.

SEC23A (SEC23 homolog A) ist im Prostatakarzinom reprimiert. Des Weiteren ist bekannt, dass die SEC23A-3'UTR durch die miRNAs miR-200c und -375 reguliert wird und eine Reduktion des Sec23A-Proteinniveaus zur Induktion der Zellmigration, zur Induktion der Zellproliferation, sowie zur Repression der Zellkolonisierung führt (Korpál et al., 2011; Szczyrba et al., 2011). SEC23A wurde als Zielgen der induzierten miRNA-200b vorhergesagt.

Eine Bindestelle für die in Prostatakarzinomen zunehmender Malignitätsgrade reprimierte miRNA-145 wurde durch Vorhersage-Algorithmen in der SEC62-3'UTR gefunden. SEC62 (SEC62 homolog) wird im Prostatakarzinom als überexprimiert

beschrieben und diese Überexpression verstärkt die Zellmigration und die Invasivität der PCa-Zelllinie PC3 (Greiner et al., 2011a; Greiner et al., 2011b).

Die SH3GLB1-3'UTR beinhaltet drei vorhergesagte Bindestellen für die induzierte miRNA-375. Die Expression von SH3GLB1 (SH3-domain GRB2-like endophilin B1) ist in Prostata- (Coppola et al., 2008b) und Pankreastumoren (Coppola et al., 2011) reprimiert. Der Verlust von SH3GLB1 reprimiert die Apoptose und fördert die Tumorigenese (Coppola et al., 2008a).

6.5.2. Herstellung des miRNA-200b-Expressionsplasmids

Zur experimentellen Analyse des Einflusses deregulierter miRNAs auf die 3'UTRs von ADIPOR2, NLK, MOB1A, PHLPP1, PHLPP2, PLAU, SEC23A, SEC62 und SH3GLB1 durch ektopische Expression dieser miRNAs, wurde die miRNA-200b in den eukaryotischen Expressionsvektor pSG5 kloniert. Die restlichen, zur Analyse nötigen miR-Expressionsplasmide waren bereits in der Arbeitsgruppe Grässer vorhanden. Zur Klonierung der miRNA-200b in den pSG5-Expressionsvektor wurde die miRNA-Vorläufer-Sequenz der miR-200b mit zusätzlich 150 bp up- und downstream dieser Sequenz aus humaner, genomischer DNA amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *EcoR* I und *BamH* I in den pSG5-Vektor ligiert. Nach transienter Transfektion des pSG5-miR-200b-Plasmid in 293-T-Zellen wurde die korrekte Prozessierung der miR-200b durch einen Northern Blot mit einer für die miR-200b spezifischen, radioaktiv markierten Sonde kontrolliert. Die Abbildung 20 zeigt den Northern Blot zur Expressionskontrolle des miR-200b-Expressionsvektors.

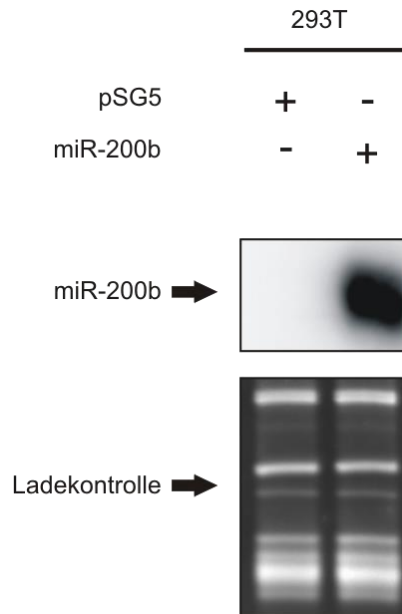


Abbildung 20: Expressionskontrolle des pSG5-miR-200b-Expressionsvektors

293-T-Zellen wurden mit leeren pSG5-Vektor bzw. mit pSG5-miR-200b-Expressionsplasmid transfiziert. Nach 48 h wurde aus den Zellen beider Transfektionsansätze die Gesamt-RNA isoliert. Danach wurden 20 µg der Gesamt-RNA beider Transfektionsansätze in einem 12,5%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und nach Dokumentation, der als Ladekontrolle Ethidiumbromid-gefärbten tRNA, auf eine Nylonmembran geblottet. Der Nachweis der korrektprozessierten miR-200b erfolgte durch eine zur miR-200b komplementären, radioaktiv markierten RNA-Sonde.

Nach Transfektion von 293-T-Zellen mit leeren pSG5-Vektor bzw. mit dem pSG5-miR-200b-Expressionsplasmid wurde ausschließlich in den mit miR-200b transfizierten Zellen die miR-200b nachgewiesen.

6.5.3. Analyse der Auswirkung der Expression verschiedener miRNAs auf die 3'UTRs von ADIPOR2, NLK, MOB1A, PLAU, SEC62 und SH3GLB1

Zur Analyse der Effekte der deregulierten miRNAs auf die 3'UTRs der vorhergesagten Zielgene wurden Dual-Luciferase-Assays durchgeführt. Daher wurden die 3'UTRs von ADIPOR2, NLK, MOB1A, PLAU, SEC62 und SH3GLB1 hinter das Firefly-Luciferase-Gen des Reportervektors pMIR-RNL-TK kloniert. Danach wurden 293-T-Zellen mit 0,8 µg miR-Expressions- sowie 0,2 µg Reportervektor transfiziert und laut Herstellerprotokoll des Dual-Luciferase® Reporter-Assay-Systems 48 h nach Transfektion lysiert. Abschließend wurde die Luciferase-Aktivität in den Zelllysaten mit Hilfe eines Luminometers detektiert. Bei Bindung der kotransfizierten miRNA an

ihre vorhergesagte Bindestelle in der 3'UTR sollte dies eine Translationshemmung der Firefly-Luciferase-mRNA bewirken. Dadurch sinkt die Menge der Firefly-Luciferase was zu einer Abnahme der Luciferase-Aktivität führt. Zuerst wurde der Effekt der miRNAs miR-200b, -200c und -375 auf die ADIPOR2-3'UTR analysiert. In Abbildung 21 ist die ADIPOR2-3'UTR mit den für diese miRNAs vorhergesagten Bindestellen dargestellt.

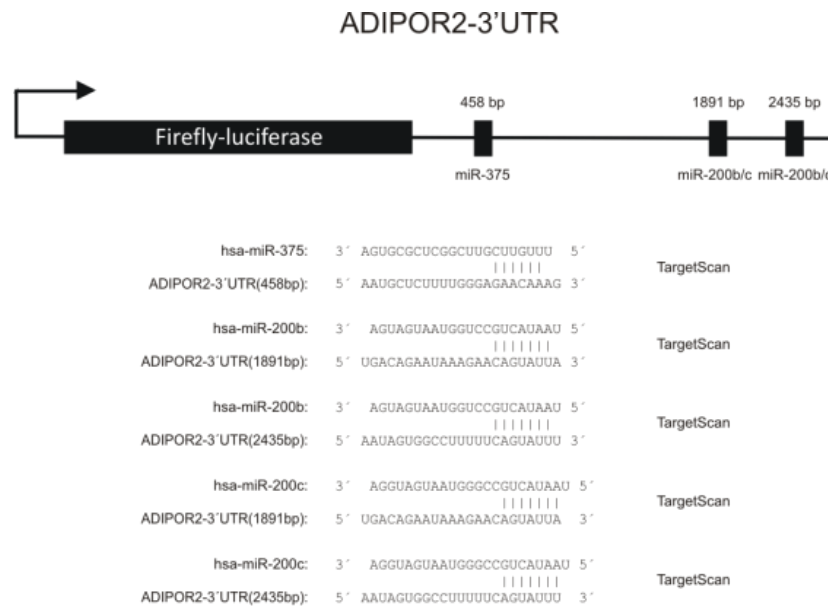


Abbildung 21: Schematische Darstellung der ADIPOR2-3'UTR mit den vorhergesagten Bindestellen für miR-200b, -200c und -375

Hier dargestellt ist eine schematische Übersicht des ADIPOR2-3'UTR-Reportergenkonstrukts inklusive der Bindestellen der miRNAs miR-200b,-200c und -375, die durch TargetScan vorhergesagt wurden.

Die Abbildung 22 zeigt die Ergebnisse des Dual-Luciferase-Assays mit der ADIPOR2-3'UTR und den miRNAs miR-200b, -200c und -375. Dargestellt sind die mittleren Luciferase-Aktivitäten mit ihrem entsprechenden Standardfehler aus vier unabhängigen Experimenten, die in Doppelansätzen durchgeführt wurden. Die Luciferase-Aktivität in denen mit leerem Expressionsplasmid transfizierten Ansätzen wurde auf 100% und die Luciferase-Aktivität der mit miR-Expressionsplasmiden transfizierten Ansätze dazu ins Verhältnis gesetzt.

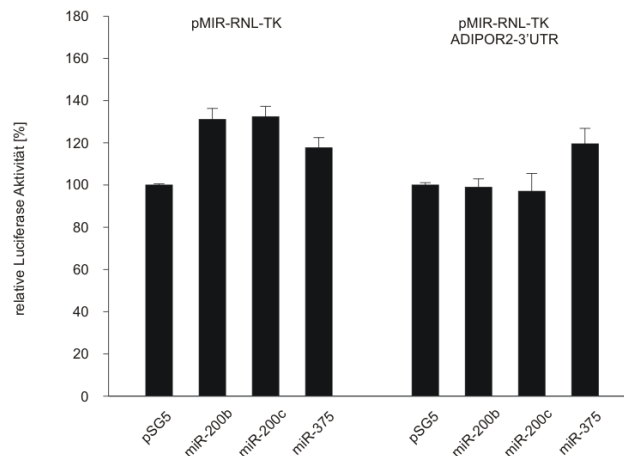


Abbildung 22: Effekte der miRNAs miR-200b, -200c und -375 auf die ADIPOR2-3'UTR

Zunächst wurden 293-T-Zellen mit 0,2 µg Reporterplasmid und 0,8 µg Effektorplasmid gemäß den in der Abbildung angegebenen Kombinationen transfiziert und nach 48 h die Luciferase-Aktivität in den jeweiligen Zelllysaten detektiert. Die Ergebnisse repräsentieren die Mittelwerte aus vier unabhängigen Experimenten mit dazugehörigen Standardfehlern. Die Luciferase-Aktivität in den mit leerem pSG5-Expressionsplasmid transfizierten Ansätzen wurde auf 100% gesetzt. Die Kofunktion von ADIPOR2-3'UTR mit den miRs-200b, 200c oder -375 hatte keine Auswirkungen auf die Luciferase-Aktivität in den jeweiligen Ansätzen.

Die Auswertung der Luciferase-Assays mit der ADIPOR2-3'UTR und den miR-Expressionsplasmiden für miR-200b, -200c und -375 zeigte, dass die miRNAs miR-200b und -200c keinerlei Effekt auf diese 3'UTR haben und die miRNA-375 eine induzierende Wirkung besitzt. Daher konnte ADIPOR2 nicht wie vorhergesagt als Zielgen für die miRNAs miR-200b, -200c und -375 bestätigt werden.

Anschließend wurde der Einfluss der miRNAs miR-25, -148a und -375 auf die NLK-3'UTR analysiert. Die Abbildung 23 zeigt schematisch die Bindestellen der miR-25, -148a und -375 in der NLK-3'UTR.

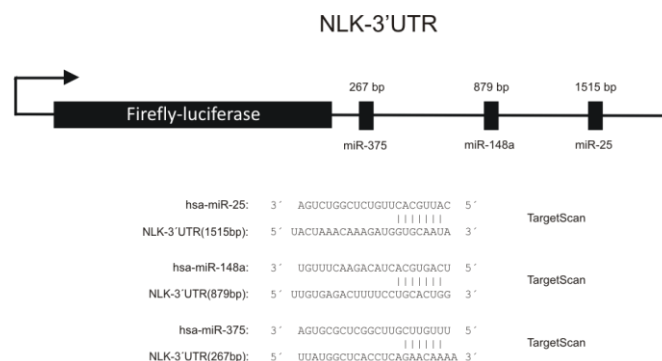


Abbildung 23: Schematische Übersicht über die NLK-3'UTR mit den vorhergesagten Bindestellen der miR-25, -148a und -375

Dargestellt ist die Lage der für miR-25, -148a und -375 vorhergesagten Bindestellen in der NLK-3'UTR des Reportergenkonstrukts.

Die mittleren Luciferase-Aktivitäten inklusive der Standardfehler aus vier unabhängigen Experimenten mit jeweils doppelten Ansätzen sind in Abbildung 24 gezeigt, wobei die mittlere Luciferase-Aktivität der Kontrollansätze, welche mit leerem pSG5-Expressionsvektor transfiziert wurden, auf 100% gesetzt wurde. Die Luciferase-Aktivität der mit dem miR-Expressionsplasmiden transfizierten Ansätze wurde auf die Aktivität der Kontrollansätze bezogen.

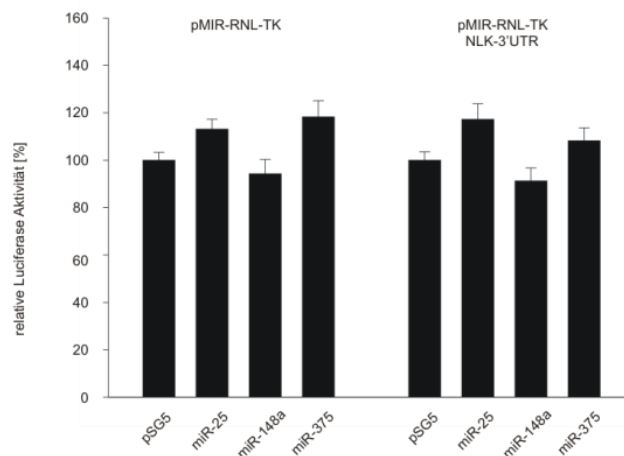


Abbildung 24: Einfluss der miR-25, -148a und -375 auf die 3'UTR von NLK

Die Transfektion von 293-T-Zellen erfolgte entsprechend der in der Abbildung gezeigten Kombinationen mit jeweils 0,2 µg Reporterplasmid und 0,8 µg Effektorplasmid pro Ansatz. Nach 48 h wurde die Luciferase-Aktivität der jeweiligen Ansätze gemessen. Hier gezeigt sind die Mittelwerte aus vier unabhängigen Experimenten mit Standardfehlern, wobei die Luciferase-Aktivität in den Kontrollansätzen 100% entsprach. Die ektopische Expression der miR-25, -148a und -375 führte zu keiner signifikanten Reduktion der Luciferase-Aktivität.

Dabei zeigte sich, dass die ektopische Expression der miR-25 und -375 sowohl eine Induktion der Luciferase-Aktivität des leeren Reportervektors als auch des NLK-3'UTR-Reportervektors zur Folge hatte. Die Expression der miR-148a hingegen führte zu einer nicht signifikanten Reduktion der Luciferase-Aktivität des leeren Reportervektors auf 94% ($p=0,423$) als auch des NLK-3'UTR-Reportervektors auf 91% ($p=0,199$). Deshalb konnte die Bindung der miRNAs an ihre vorhergesagten Bindestellen in der NLK-3'UTR nicht nachgewiesen werden.

Darauf wurde der Effekt der miRNA-375 auf die MOB1A-3'UTR untersucht. Die MOB1A-3'UTR mit der vorhergesagten Bindestelle der miR-375 ist schematisch in Abbildung 25 dargestellt.

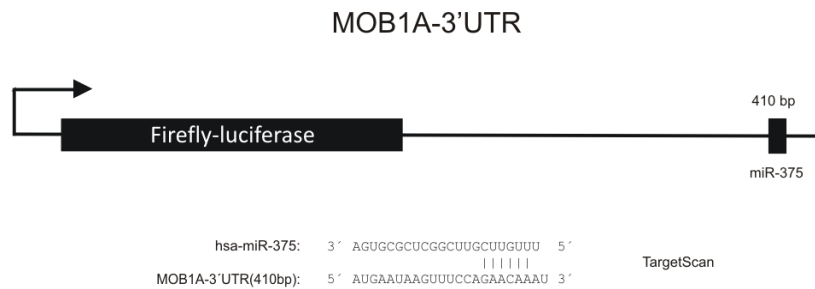


Abbildung 25: Schema der MOB1A-3'UTR mit vorhergesagter Bindestelle für miRNA-375

Hier gezeigt ist die schematische Lage der vorhergesagten Bindestelle der miR-375 innerhalb der MOB1A-3'UTR.

Zur Auswertung des Luciferase-Assays wurden die mittleren Luciferase-Aktivitäten inklusive der Standardfehler aus vier unabhängigen Experimenten in Duplikaten ermittelt und die Luciferase-Aktivität in den Kontrollansätzen mit den leeren Expressionsvektoren auf 100% gesetzt. Danach wurden die Luciferase-Aktivitäten der Ansätze, welche mit miRNA-375-Expressionsplasmid transfiziert wurden, auf die Aktivitäten in den Kontrollansätzen bezogen. Die Ergebnisse des Luciferase-Assays der MOB1A-3'UTR mit der miR-375 sind in Abbildung 26 gezeigt.

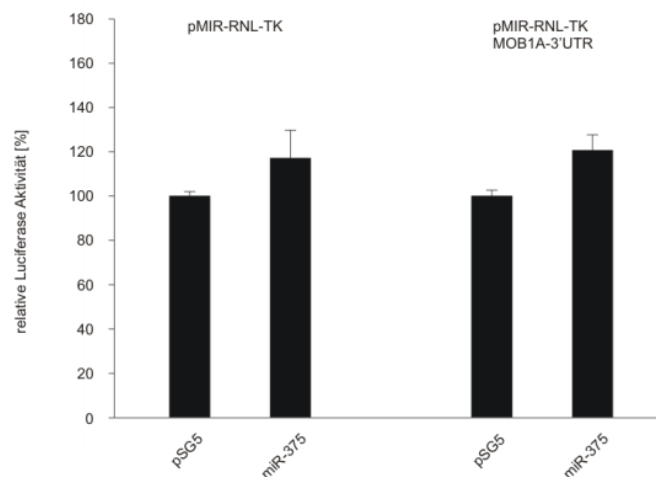


Abbildung 26: Auswirkung der Expression der miR-375 auf die MOB1A-3'UTR

293-T-Zellen wurden gemäß den in der Abbildung gezeigten Kombinationen mit 0,2 µg Reportervektor und 0,8 µg Effektorvektor transfiziert und 48 h nach Transfektion lysiert. Darauf wurden die mittleren Luciferase-Aktivitäten mit Standardfehlern der jeweiligen Ansätze aus vier unabhängigen Experimenten mit Duplikaten auf die Aktivitäten der Kontrollansätze bezogen, welche zuvor auf 100% gesetzt wurden. Die ektopische Expression der miR-375 mit dem MOB1A-Reporterplasmid führte zu keiner Reduktion der Luciferase-Aktivität.

Der Vergleich der Luciferase-Aktivitäten der Kontrollansätze mit den Aktivitäten der Kotransfektionen von leerem bzw. MOB1A-Reportervektor mit der miRNA-375 zeigte, dass die miR-375-Expression zu einer Induktion der Luciferase-Aktivität beider Reportervektoren führte. Daher kann eine posttranskriptionelle Regulation der MOB1-3'UTR durch die miR-375 ausgeschlossen werden.

Im Anschluss wurde die Auswirkung der ektopischen Expression der miRNA-143 auf die PLAU-3'UTR analysiert. Die Abbildung 27 repräsentiert die schematische Übersicht der PLAU-3'UTR mit der vorhergesagten Bindestelle der miR-143.

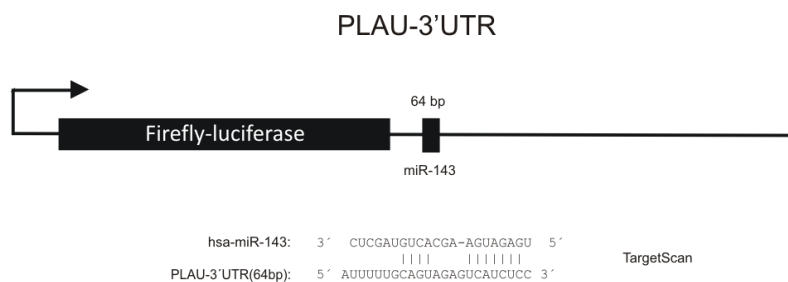


Abbildung 27: schematische Darstellung der PLAU-3'UTR mit der vorhergesagten Bindestelle der miRNA-143

Diese Darstellung zeigt die Lage der vorhergesagten miR-143-Bindestelle in der PLAU-3'UTR.

Die Ergebnisse des Luciferase-Assays der PLAU-3'UTR mit der miRNA-143 sind in Abbildung 28 dargestellt. Dabei wurden die mittleren Luciferase-Aktivitäten mit Standardfehlern aus sechs unabhängigen Experimenten in Duplikaten der mit miR-Expressionsplasmiden transfizierten Ansätze ins Verhältnis zu den Aktivitäten der Kontrollansätze gesetzt. Die Aktivität der Luciferase in den Kontrollansätzen entsprach 100%.

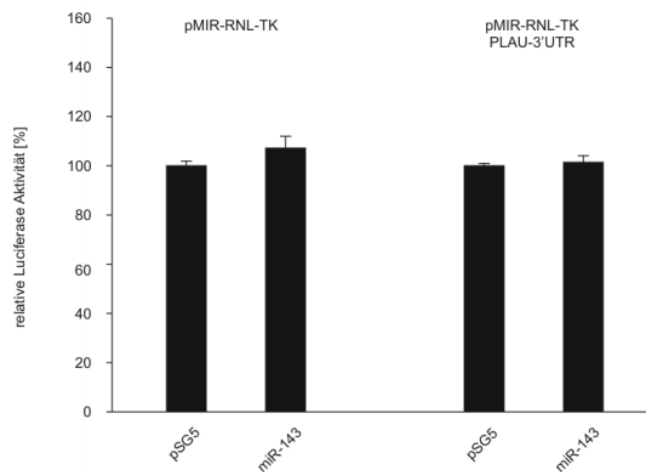


Abbildung 28: Regulation der PLAU-3'UTR durch miRNA-143

Zunächst erfolgte die Transfektion von 293-T-Zellen mit 0,2 µg Reporterplasmid und 0,8 µg Effektorplasmid entsprechend der in der Abbildung gezeigten Kombinationen. Nach 48 h wurden die Luciferase-Aktivitäten in den Zellysaten der jeweiligen Ansätze detektiert. Danach wurden die mittleren Luciferase-Aktivitäten mit dazugehörigen Standardfehlern aus sechs unabhängigen Experimenten in diesem Diagramm dargestellt. Die Luciferase-Aktivitäten der Kontrollansätze wurden auf 100% und die Aktivitäten der mit miR-Expressionsplasmiden transfizierten Ansätze ins Verhältnis zu den Aktivitäten in den Kontrollansätzen gesetzt. Die Expression der miRNA-143 zeigte keinen Effekt auf die PLAU-3'UTR.

Da die Expression der miR-143 keinen Einfluss auf die PLAU-3'UTR hatte, konnte gezeigt werden, dass die miR-143 nicht an die vorhergesagte Bindestelle in der PLAU-3'UTR bindet und somit PLAU kein Zielgen der miR-143 ist.

Danach wurde der Effekt der ektoptischen miR-145-Expression auf die SEC62-3'UTR untersucht. Die Abbildung 29 repräsentiert die schematische Übersicht der SEC62-3'UTR inklusive der Lage der für miR-145 vorhergesagten Bindestelle.

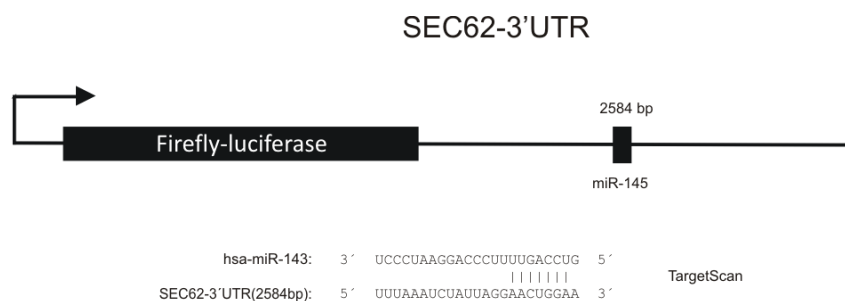


Abbildung 29: Schema der SEC62-3'UTR mit vorhergesagter Bindestelle für miR-145

Hier dargestellt ist die schematische Übersicht der SEC62-3'UTR inklusive der Lage der Bindestelle der miR-145 in der 3'UTR.

Zur Analyse des Effekts der miR-145-Expression auf den SEC62-3'UTR-Reportervektor wurden die Mittelwerte der Luciferase-Aktivitäten mit Standardfehlern der mit miR-145-Expressionsplasmid transfizierten Ansätze aus sechs unabhängigen Experimenten mit den Luciferase-Aktivitäten der Kontrollansätze, die auf 100% gesetzt wurden, verglichen (Abb. 30).

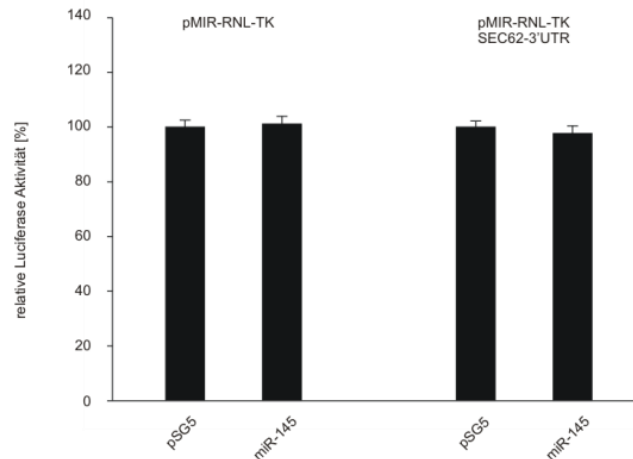


Abbildung 30: Effekte der miR-145 auf die SEC62-3'UTR

Durch Transfektion von 293-T-Zellen mit 0,2 µg Reporterplasmid und 0,8 µg Effektorplasmid entsprechend der in der Abbildung gezeigten Kombinationen wurde der Einfluss der miR-145-Expression auf die SEC62-3'UTR analysiert, indem 48 h nach Transfektion die Luciferase-Aktivität der jeweiligen Ansätze gemessen wurde. Zunächst wurde die Luciferase-Aktivität der Kontrollansätze auf 100% und die Aktivität der mit miR-145 und leerem bzw. SEC62-3'UTR-Reporterplasmid transfizierten Ansätze ins Verhältnis zur Aktivität der jeweiligen Kontrollansätze gesetzt. Die Koexpression der miR-145 mit der SEC62-3'UTR führte in sechs unabhängigen Experimenten zu einer nicht signifikanten Reduktion der Luciferase-Aktivität auf 97% ($p=0,515$).

Die Expression der miR-145 mit der SEC62-3'UTR führte lediglich zu einer nicht signifikanten Abnahme der Luciferase-Aktivität auf 97%, daher konnte die vorhergesagte miR-145-Bindestelle in der SEC62-3'UTR nicht als Bindestelle bestätigt werden. Somit ist SEC62 kein Zielgen der miRNA-145.

Nachfolgend wurde getestet, ob die SH3GLB1-3'UTR durch die miRNA-375 reguliert wird. Die SH3GLB1-3'UTR mit den drei vorhergesagten Bindestellen der miR-375 ist schematisch in Abbildung 31 dargestellt. Aufgrund der Größe der SH3GLB1-3'UTR von 4949 bp wurden zwei Teilstücke kloniert, wobei das erste Teilstück die erste vorhergesagte miR-375-Bindestelle enthielt und das zweite Teilstück die beiden übrigen Bindestellen.

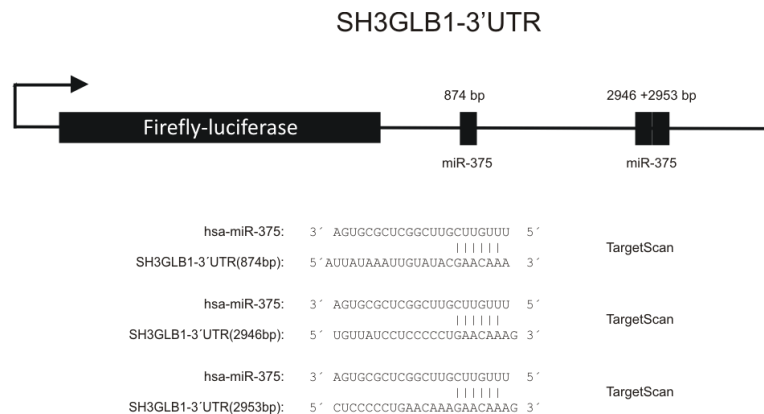


Abbildung 31: Schematische Übersicht der SH3GLB1-3'UTR mit den miR-375-Bindestellen

Diese Abbildung zeigt schematisch die Lage der vorhergesagten Bindestellen für miR-375 in der SH3GLB1-3'UTR.

In Abbildung 37 sind die Mittelwerte der Luciferase-Aktivitäten mit den entsprechenden Standardfehlern aus drei unabhängigen Experimenten in Doppelansätzen gezeigt. Die mittleren Luciferase-Aktivitäten der Kontrollansätze, welche mit leerem pSG5-Expressionsvektor und dem jeweiligen Reportervektor transfiziert wurden, entsprachen 100%. Die Luciferase-Aktivität in den mit miR-375-Expressionsplasmid transfizierten Ansätzen wurde auf die Aktivität der Kontrollansätze bezogen.

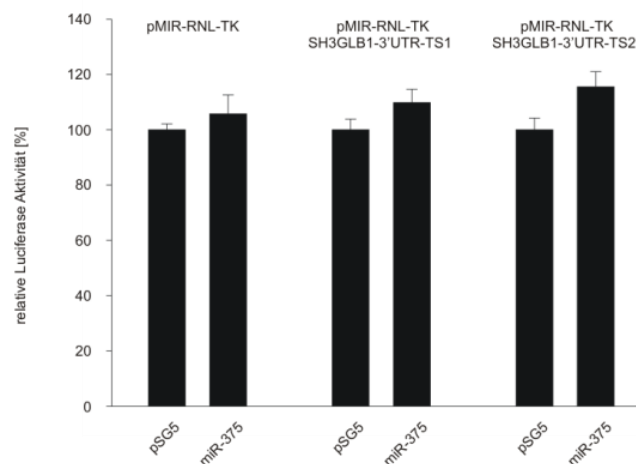


Abbildung 32: Auswirkung der miR-375-Expression auf die SH3GLB1-3'UTR

Die Transfektion von 293-T-Zellen wurde entsprechend der in der Abbildung gezeigten Kombinationen mit jeweils 0,2 µg Reporterplasmid und 0,8 µg Effektorplasmid pro Ansatz durchgeführt. Nach 48 h wurde die Luciferase-Aktivität in den Zelllysaten der jeweiligen Ansätze detektiert. Hier dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit den entsprechenden Standardfehlern. Die Luciferase-Aktivität in den Kontrollansätzen entsprach 100% und die Aktivität der Ansätze mit miR-375-Expressionsvektor wurde ins Verhältnis zur Aktivität der Kontrollansätze gesetzt. Die Expression der miRNA-143 führte zu einer Induktion der Luciferase-Aktivität beider Teilstücke der SH3GLB1-3'UTR.

Nach Auswertung des Luciferase-Assays zeigte sich, dass die ektopische Expression der miR-375 sowohl eine Induktion der Luciferase-Aktivität des leeren Reportervektors als auch der zwei Teilstücke des SH3GLB1-Reportervektors bewirkte. Daher konnte SH3GLB1 nicht als Zielgen der miR-375 validiert werden.

6.5.4. SEC23A als Zielgen der miRNA-200b

6.5.4.1. Posttranskriptionelle Regulation der SEC23A-3'UTR durch miR-200b

Zur Analyse des Einflusses der ektopischen miR-200b-Expression auf die SEC23A-3'UTR wurde 48 h nach transienter Transfektion von 293-T-Zellen mit 0,8 µg Effektorplasmid und 0,2 µg Reporterplasmid wurde die Luciferase-Aktivität in den jeweiligen Ansätzen detektiert. Die Abbildung 33 zeigt die Mittelwerte der Luciferase-Aktivität mit Standardfehlern aus vier unabhängigen Experimenten. Hierzu wurde die Luciferase-Aktivität der mit leerem pSG5-Expressionsplasmid transfizierten Ansätze auf 100% und die Luciferase-Aktivität der Ansätze mit miR-200b-Expressionsplasmid dazu ins Verhältnis gesetzt.

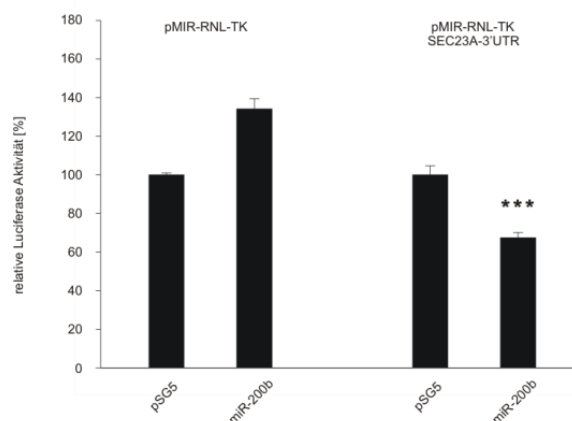


Abbildung 33: Effekt der miRNA-200b-Expression auf die SEC23A-3'UTR

Zunächst wurden 293-T-Zellen jeweils 0,2 µg Reporterplasmid und 0,8 µg Effektorplasmid entsprechend der in Abbildung 33 gezeigten Kombinationen transfiziert und nach 48 h die Luciferase-Aktivität der Zelllysate der jeweiligen Ansätze detektiert. Die mittlere Luciferase-Aktivität aus vier unabhängigen Experimenten in Duplikaten mit Standardfehler der Ansätze mit miR-200b-Expressionsvektor wurde ins Verhältnis zur Luciferase-Aktivität der Kontrollansätze mit leerem pSG5-Expressionsplasmid gesetzt, wobei die Luciferase-Aktivität in den Kontrollansätzen 100% entsprach. Die Kofransfektion des miR-200b-Expressionsplasmid mit dem SEC23A-Reportervektor führte zu einer signifikanten Reduktion der relativen Luciferase-Aktivität auf 67% ($p=0,00002$).

Die ektopische Expression der miR-200b mit leerem Reporterkonstrukt führte zur einer Induktion der Luciferase-Aktivität. Die Kotransfektion der miR-200b mit der SEC23A-3'UTR hingegen bewirkte eine signifikante Abnahme der relativen Luciferase-Aktivität um 33% ($p=0,00002$). Dieser spezifische Effekt der miR-200b auf die SEC23A-3'UTR sollte nun genauer untersucht werden. Dazu wurden die beiden potentiellen Bindestellen der miR-200b innerhalb der SEC23A-3'UTR mit Hilfe zielgerichteter Mutagenese durch einzigartige Restriktionsschnittstellen ersetzt, welche nicht komplementär zur Seed-Sequenz der miR-200b waren. Zur Identifizierung der funktionellen Bindestelle der miR-200b wurden einerseits zwei Einzelmutanten hergestellt, die jeweils nur eine mutierte Bindestelle trugen und andererseits eine Doppelmutante, bei der beide Bindestellen mutiert wurden. In Abbildung 34 ist schematisch die Lage der für miR-200b vorhergesagten Bindestellen in der SEC23A-3'UTR und die Sequenz der mutierten Bindestellen dargestellt.

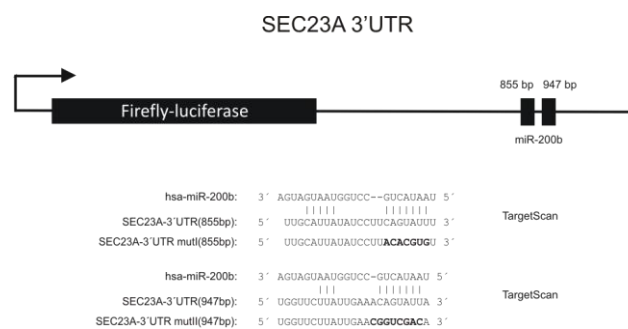


Abbildung 34: Schematische Darstellung der vorhergesagten miR-200b-Bindestellen in der SEC23A-3'UTR

Hier abgebildet ist die Lage der beiden für miR-200b vorhergesagten Bindestellen in der SEC23A-3'UTR. Die zur Identifizierung der funktionellen Bindestelle der miR-200b mutierten Nukleotide sind hervorgehoben.

Um zu analysieren welche der beiden miR-200b-Bindestellen in der SEC23A-3'UTR funktionell ist, wurden erneut Luciferase-Assays mit den drei mutierten Reporterplasmiden der SEC23A-3'UTR, pMIR-RNL-TK-SEC23A-mut I, pMIR-RNL-TK-SEC23A-mut II, pMIR-RNL-TK-SEC23A-mut I & II und der miR-200b durchgeführt. Die Ergebnisse dieses Luciferase-Assays sind in Abbildung 35 gezeigt. Die Mittelwerte der relativen Luciferase-Aktivitäten des Kontrollansatzes mit ihren Standardfehlern aus vier unabhängigen Experimenten in Duplikaten wurden auf 100% und die Aktivitäten der mit miR-200b transfizierten Ansätze dazu in Bezug gesetzt.

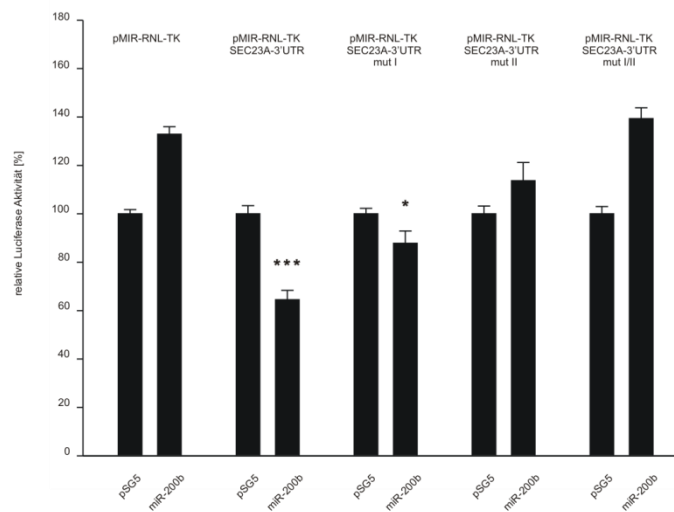


Abbildung 35: Identifizierung der funktionellen miR-200b-Bindestelle in der SEC23A-3'UTR

Die Luciferase-Aktivität der jeweiligen Ansätze wurde 48 h nach Transfektion von 0,2 µg Reportervektor und 0,8 µg Effektorvektor entsprechend der in der Abbildung angegebenen Kombinationen in 293-T-Zellen detektiert. Dargestellt sind die Ergebnisse von vier unabhängigen Experimenten in Doppelansätzen mit dazugehörigen Standardfehlern. Die mittlere Luciferase-Aktivität der Kotransfektion von jeweiligen Reporterplasmid mit dem leeren pSG5-Expressionsvektor wurden auf 100% und die Luciferase-Aktivität der Kotransfektionen der jeweiligen Reportervektoren mit dem miR-200b-Expressionsplasmid dazu ins Verhältnis gesetzt. Die Kotransfektion der wildtyp SEC23A-3'UTR mit der miRNA-200b führte wie zuvor zu einer signifikanten Reduktion der Luciferase-Aktivität auf 64% ($p=0,000006$). Die Koexpression des Reportervektors pMIR-RNL-TK-Sec23A-3'UTR mut I mit der miR-200b bewirkte ebenfalls eine signifikante Abnahme der Luciferase-Aktivität auf 87% ($p=0,04$). Die Expression der miR-200b mit der zweiten bzw. der Doppelmutante hatte einen induzierenden Effekt auf die mutierten 3'UTRs, ähnlich der Wirkung der miR-200b auf den leeren Reportervektor.

Die Koexpression der wildtyp SEC23A-3'UTR mit der miR-200b hatte wie bereits zuvor eine signifikante Abnahme der relativen Luciferase-Aktivität diesmal auf 64% zur Folge ($p=0,000006$). Auch die Kotransfektion des Reporterkonstrukts pMIR-RNL-TK-SEC23A mut I mit der miR-200b führte zu einer statistisch signifikanten Abnahme der Luciferase-Aktivität um 13% ($p=0,04$). Bei Mutante II und der Doppelmutante hatte die Expression der miR-200b einen induzierenden Effekt auf die Luciferase-Aktivität. Da die Expression der miR-200b noch einen Effekt auf die Mutante I, aber auf die Mutante II keinerlei Auswirkung besitzt, kann die erste Bindestelle als funktionelle Bindestelle ausgeschlossen werden. Somit konnte die zweite für miR-200b vorhergesagte Bindestelle in der SEC23A-3'UTR als funktionelle Bindestelle identifiziert und gezeigt werden, dass die Translation der SEC23A-mRNA posttranskriptionell durch Bindung der miR-200b an die zweite Bindestelle in der SEC23A-3'UTR reguliert wird.

6.5.4.2. Regulation des endogenen SEC23A-Proteinniveaus durch Expression der miR-200b in Prostatakarzinomzelllinien

Zur Verifizierung der posttranskriptionellen Regulation der SEC23A-mRNA durch miR-200b sollte die Reduktion der endogenen SEC23A-Proteinmenge in Prostatakarzinomzelllinien durch ektoische Expression der miR-200b nachgewiesen werden. Dazu wurden LNCaP- bzw. DU145-Zellen in 6-Lochplatten mit Hilfe des jetPrime™-Transfektionsreagenz laut Herstellerprotokoll entweder mit leerem pSG5-Expressionsplasmid oder mit dem miR-200b-Expressionsplasmid transfiziert. Nach 48 h wurde aus den Ansätzen das Gesamtprotein extrahiert und je Ansatz 30 µg Protein in einem 8,75%igem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Der Nachweis von SEC23A bzw. von GAPDH als Ladekontrolle erfolgte im Western Blot mittels spezifischer Antikörper (SEC23A 2H4-11; GAPDH 14C10). In Abbildung 36 ist ein repräsentativer Western Blot für jede Zelllinie aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt.

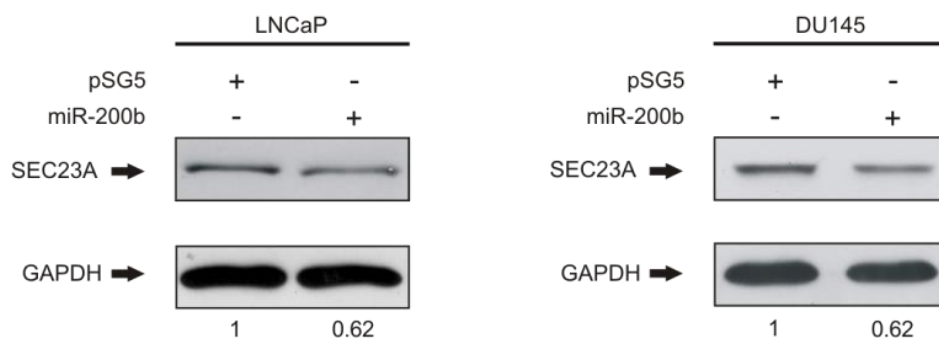


Abbildung 36: Reduktion von SEC23A durch Expression der miR-200b in PCa-Zelllinien

LNCaP bzw. DU145-Zellen wurden entweder mit 0,2 µg leerem pSG5-Expressionsvektor oder miR-200b-Expressionsplasmid transfiziert und 48 h nach der Transfektion wurden je Ansatz das Gesamtprotein extrahiert. Danach wurden 30 µg des Gesamtproteins pro Ansatz in einem 8,75%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und das SEC23A-Protein bzw. das GAPDH-Protein, welches als Ladekontrolle diente mit spezifischen Antikörpern im Western Blot detektiert. Anschließend wurden die Banden aller drei unabhängigen Experimente mittels der Quantity One analysis Software quantifiziert. Dazu wurde die SEC23A-Expression auf die GAPDH-Expression normiert und die SEC23A-Expression in den mit miR-200b transfizierten Zellen ins Verhältnis zur Expression in den mit leerem pSG5-Expressionsvektor transfizierten Zellen gesetzt. Durch die ektoische Expression der miR-200b wurde die SEC23A-Proteinmenge in beiden Zelllinien auf 62% reduziert.

Die SEC23A- bzw. GAPDH-Banden aller drei Western Blots wurden mittels der Quantity One analysis Software quantifiziert. Dabei wurde die SEC23A-Expression zunächst auf die GAPDH-Expression normiert und die SEC23A-Expression in den

mit miR-200b transfizierten Zellen ins Verhältnis zur Expression der kontrolltransfizierten Zellen gesetzt. Die ektopische Überexpression der miRNA-200b führte zu einer signifikanten Abnahme der SEC23A-Proteinmenge zu 62,6% in den LNCaP- ($p=0,0425$) bzw. 62,3% in den DU145-Zellen ($p=0,0001$). Daher konnte die posttranskriptionelle Regulation der SEC23A-mRNA durch Bindung der miR-200b an die SEC23A-3'UTR auf Proteinniveau bestätigt werden.

6.5.4.3. Analyse der Korrelation zwischen der Sec23A-mRNA-Expression und der Expression miR-200b in Prostatatumoren mit zunehmenden Malignitätsgraden

Um eine Korrelation zwischen der SEC23A-mRNA-Expression und der miR-200b-Expression zu untersuchen, wurde deren Expression in den zunehmend malignen Prostatatumoren (pT2 (N0), pT3 (N0), N1) des unabhängigen Patientenkollektivs durch qRT-PCRs nachgewiesen. Die qRT-PCRs wurden am Institut für molekulare Urologie des Universitätsklinikums Erlangen von Dr. rer. nat. Elke Nolte durchgeführt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Ergebnisse der qRT-PCRs sind in Abbildung 37 dargestellt.

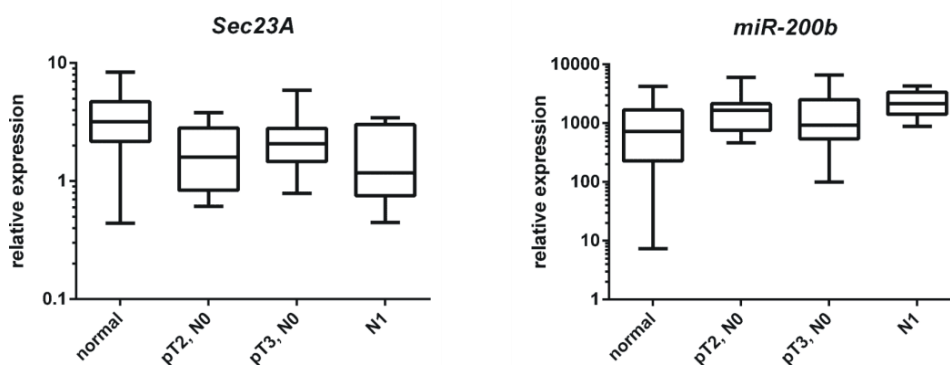


Abbildung 37: Korrelation zwischen der SEC23A-mRNA-Expression und der miR200b-Expression

Die Expression von SEC23A-mRNA und miR-200b wurde mittels qRT-PCR in einem Patientenkollektiv von 40 Prostatatumorproben und korrespondierenden Normalgeweben nachgewiesen, wobei die Tumoren in drei Tumorentitäten, pT2 N0, pT3 N0 und N1, welche den Entitäten der Sequenzierung entsprachen eingeteilt wurden. Nach dem Vergleich der SEC23A-mRNA-Expression mit der korrespondierenden miR-200b-Expression zeigte sich eine negative Korrelation zwischen mRNA- und miR-Expression in allen drei Tumorentitäten.

Durch den Vergleich der SEC23A-mRNA- mit der miR-200b-Expression in allen drei Prostatatumorentitäten konnte eine negative Korrelation zwischen der mRNA- und miR-Expression nachgewiesen werden. Dies ist ein weiterer Beleg für die posttranskriptionelle Regulation von SEC23A durch miR-200b.

6.5.5. PHLPP1 als Zielgen der miRNA-375

6.5.5.1. Posttranskriptionelle Regulation der PHLPP1-3'UTR durch miR-375

Zum Nachweis der Auswirkung der Überexpression der miR-375 auf die PHLPP1-3'UTR wurden duale Luciferase-Assays durchgeführt. Zunächst wurden 293-T-Zellen mit 0,8 µg Effektorplasmid und 0,2 µg Reporterplasmid transfiziert und nach 48 h die Luciferase-Aktivität in den jeweiligen Zelllysaten bestimmt. In Abbildung 38 ist die mittlere Luciferase-Aktivität mit Standardfehler der jeweiligen Ansätze aus vier unabhängigen Experimenten in Duplikaten dargestellt. Dabei wurde die Luciferase-Aktivität der mit miR-375-Expressionsplasmid transfizierten Ansätze ins Verhältnis zur Aktivität in den mit leerem pSG5-Expressionsvektor transfizierten Kontrollansätze gesetzt, wobei die Luciferase-Aktivität in den Kontrollansätzen 100% entsprach.

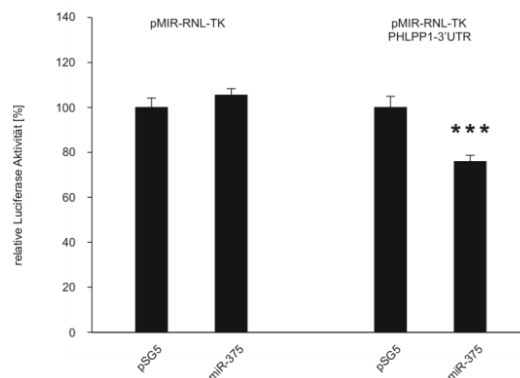


Abbildung 38: Auswirkung der miR-375-Überexpression auf die PHLPP1-3'UTR

293-T-Zellen wurden entsprechend der in der Abbildung dargestellten Kombinationen mit 0,8 µg Effektorplasmid und 0,2 µg Reporterplasmid transfiziert und nach 48 h wurde die Luciferase-Aktivität der jeweiligen Ansätze bestimmt. Die Luciferase-Aktivität der mit leerem pSG5-Expressionsplasmid transfizierten Kontrollansätze aus vier unabhängigen Experimenten mit entsprechenden Standardfehlern wurde auf 100% und die Aktivität der mit miR-375-Expressionsvektor transfizierten Ansätze dazu ins Verhältnis gesetzt. Bei Kotransfektion des PHLPP1-Reporterkonstrukts mit dem miR-375-Expressionsplasmid konnte eine signifikante Reduktion ($p=0,0007$) der Luciferase-Aktivität auf 75% nachgewiesen werden.

Auf den leeren pMIR-RNL-TK-Reportervektor hatte die Expression der miR-375 eine leicht induzierende Wirkung. Die Koexpression des PHLPP1-3'UTR-Reporterplasmid mit der miR-375 führte hingegen zu einer signifikanten Abnahme der Luciferase-Aktivität auf 75% ($p=0,0007$). Zur Validierung der Ergebnisse des ersten Luciferase-Assays wurde mit Hilfe zielgerichteter Mutagenese die Bindestelle der miR-375 in der PHLPP1-3'UTR durch eine einzigartige Restriktionsschnittstelle ersetzt, welche keinerlei Komplementarität zur Seedsequenz der miR-375 zeigte. In Abbildung 39 ist eine schematische Übersicht der PHLPP1-3'UTR und die Sequenzen der wildtyp sowie der mutierten PHLPP1-3'UTR gezeigt.

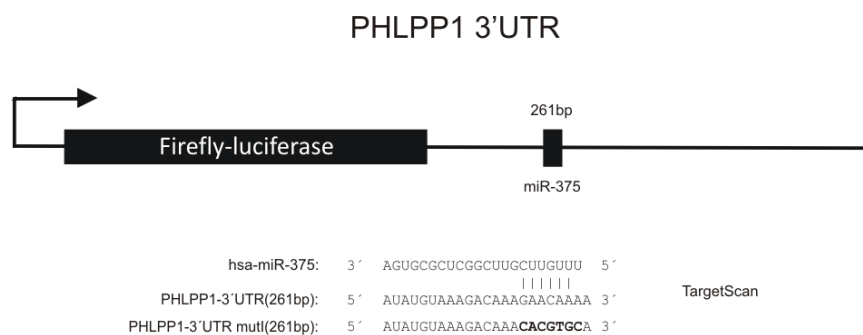


Abbildung 39: Schematische Übersicht der PHLPP1-3'UTR mit Bindestelle der miR-375

Hier gezeigt ist die schematische Darstellung der PHLPP1-3'UTR inklusive der vorhergesagten Bindestelle der miR-375. Darüber hinaus ist die Sequenz der wildtyp PHLPP1-3'UTR, welche die Bindestelle der miR-375 beinhaltet, sowie die Sequenz der mutierten PHLPP1-3'UTR, wobei die mutierten Nukleotide hervorgehoben sind, gezeigt.

Danach wurde erneut ein Luciferase-Assay durchgeführt, diesmal mit wildtyp PHLPP1-3'UTR als Positivkontrolle und mit der mutierten PHLPP1-3'UTR. Die Abbildung 40 repräsentiert die Ergebnisse dieses Luciferase-Assays. Die mittleren Luciferase-Aktivitäten des Kontrollansatzes mit ihren Standardfehlern aus vier unabhängigen Experimenten mit doppelten Ansätzen wurde auf 100% gesetzt und die Luciferase-Aktivitäten der Positivkontrolle als auch die Aktivität in den mit miR-375 und mutierten PHLPP1-3'UTR-Reportervektor transfizierten Ansätze darauf bezogen.

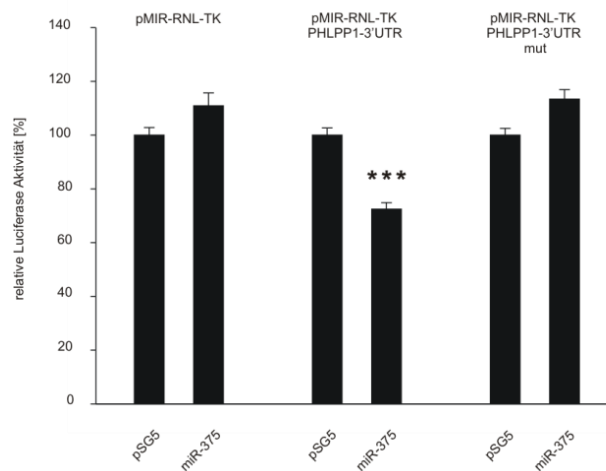


Abbildung 40: Verifizierung der Regulation der PHLPP1-3'UTR durch miR-375

Zunächst wurden 293-T-Zellen mit 0,2 µg Reportervektor und 0,8 µg Effektorplasmid entsprechend der in der Abbildung dargestellten Kombinationen transfiziert und 48 h danach die Luciferase-Aktivität der jeweiligen Ansätze detektiert. Hier gezeigt sind die Resultate aus vier unabhängigen Experimenten in Duplikaten mit entsprechenden Standardfehlern. Die Mittelwerte der Luciferase-Aktivitäten der Kofunktions des miR-375-Expressionsplasmids mit dem leeren pMIR-RNL-TK-Reportervektor der wildtyp PHLPP1-3'UTR und der mutierten PHLPP1-3'UTR wurden ins Verhältnis zu den Aktivitäten der Kontrollansätze mit leerem pSG5-Expressionsplasmid gebracht. Zuvor wurde die Luciferase-Aktivität in den Kontrollansätzen auf 100% gesetzt. Die Transfektion der wildtyp PHLPP1-3'UTR mit dem miR-375-Expressionsplasmid führte wie schon zuvor zu einer signifikanten Abnahme der Luciferase-Aktivität diesmal um 28% ($p=0,000002$), wobei die miR-375 Expression den gleichen induzierenden Effekt auf die mutierte PHLPP1-3'UTR zeigte wie auf den leeren pMIR-RNL-TK-Vektor.

Die ektopische Expression der miR-375 führte wiederum zu einer signifikanten Reduktion der Luciferase-Aktivität des wildtypen PHLPP1-3'UTR-Reporterkonstrukts auf 72% ($p=0,000002$), wohingegen die Luciferase-Aktivität des mutierten Konstrukts auf ähnliche Werte, wie in der Kontrolle mit leerem pMIR-RNL-TK Reportervektor, anstieg. Somit konnte die Bindestelle der miR-375 in der PHLPP1-3'UTR verifiziert werden und damit auch die posttranskriptionelle Regulation der PHLPP1-3'UTR durch miR-375.

6.5.5.2. Effekt der miR-375-Überexpression in Prostatakarzinomzelllinien auf das endogene PHLPP1-Proteinniveau

Zur Bestätigung von PHLPP1 als Zielgen der miR-375 sollte die Abnahme der endogenen PHLPP1-Proteinmenge in Prostatakarzinomzelllinien durch Überexpression der miR-375 nachgewiesen werden. Daher wurden LNCaP- bzw. DU145-Zellen in 6-

Lochplatten ausgesät und entweder mit leerem pSG5-Expressionsplasmid oder mit miR-375-Expressionsvektor transfiziert. Nach 48 h wurde aus den jeweiligen Ansätzen native Proteinextrakte hergestellt und pro Ansatz 30 µg Gesamtprotein in einem 8,75%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Danach wurden mit Hilfe von spezifischen Antikörpern das PHLPP1- sowie das GAPDH-Protein im Western Blot nachgewiesen (PHLPP1 A300-660A; GAPDH 14C10). Die Abbildung 41 zeigt repräsentative Western Blots für jede Zelllinie aus drei unabhängigen Experimenten.

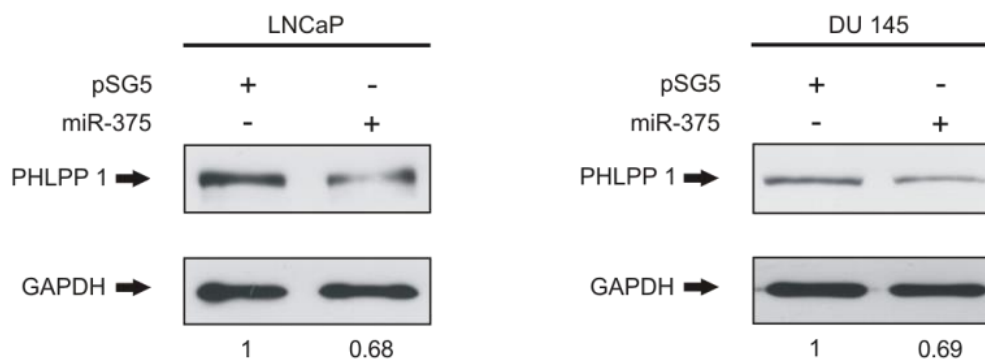


Abbildung 41: Regulation der PHLPP1-Proteinmenge durch miR-375 in PCa-Zelllinien

48 h nach Transfektion der LNCaP- bzw. DU145-Zellen mit 0,2 µg leerem pSG5-Expressionsplasmid oder miR-375-Expressionsvektor wurde das Gesamtprotein beider Ansätze extrahiert und 30 µg Proteinextrakt pro Ansatz in einem 8,75%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Anschließend wurde das PHLPP1- und das GAPDH-Protein mittels spezifischer Antikörper im Western Blot nachgewiesen und die Banden aller drei unabhängigen Experimente mit Hilfe der Quantity One analysis Software quantifiziert. Die Expression des PHLPP1-Proteins wurde auf die Expression des GAPDH-Proteins normiert und die PHLPP1-Expression in den mit miR-375 transfizierten Ansätzen ins Verhältnis zur PHLPP1-Expression in den mit pSG5-Leervektor transfizierten Ansätze gesetzt. Die Expression der miR-375 führte zu einer Reduktion der PHLPP1-Proteinmenge auf 68% ($p=0,01$) in den LNCaP- und auf 69% ($p=0,001$) in den DU145-Zellen.

Mit Hilfe der Quantity One analysis Software wurden die Banden des PHLPP1- bzw. GAPDH-Proteins aus drei unabhängigen Experimenten quantifiziert. Zunächst wurde die PHLPP1-Expression auf die GAPDH-Expression normiert und die PHLPP1-Expression in den mit miR-375 transfizierten Zellen ins Verhältnis zur Expression in den mit Leervektor transfizierten Zellen gesetzt. Dabei zeigte sich, dass die Überexpression der miR-375 zu einer signifikanten Reduktion der PHLPP1-Proteinmenge auf 68% ($p=0,01$) in den LNCaP- und auf 69% ($p=0,001$) in den DU145-Zellen. Somit konnte die Regulation der endogenen PHLPP1-Proteinmenge durch miR-375 verifiziert werden.

6.5.6. PHLPP2 als Zielgen der miRNA-15a

Zur Verifizierung von PHLPP2 als Zielgen der miR-15a wurden Luciferase-Assays durchgeführt, indem 293-T-Zellen mit 0,2 µg Reportervektor und mit 0,8 µg Effektorplasmid transfiziert wurden und 48 h nach Transfektion die Luciferase-Aktivität in den jeweiligen Ansätzen bestimmt. Dabei wurde die Luciferase-Aktivität in den mit leerem pSG5-Expressionsvektor transfizierten Ansätzen auf 100% gesetzt und die Luciferase-Aktivität in den mit miR-15a transfizierten Ansätzen damit verglichen. Die Abbildung 42 zeigt die Mittelwerte der Luciferase-Aktivitäten mit Standardfehlern der jeweiligen Ansätze aus vier unabhängigen Experimenten mit doppelten Ansätzen.

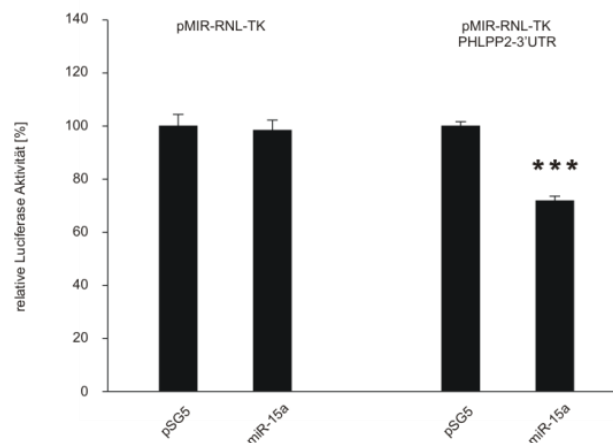


Abbildung 42: Effekt der Überexpression der miR-15a auf die PHLPP2-3'UTR

Nach Transfektion von 293-T-Zellen mit 0,8 µg Effektorvektor und 0,2 µg Reporterplasmid gemäß den in der Abbildung gezeigten Plasmidkombinationen wurde 48 h später die Luciferase-Aktivität der einzelnen Ansätze gemessen. Nachdem die Luciferase-Aktivität in den mit leerem pSG5-Vektor transfizierten Ansätzen auf 100% gesetzt wurde, wurde die Luciferase-Aktivität in den mit miR-15a transfizierten Ansätzen damit verglichen. Gezeigt sind die mittleren Luciferase-Aktivitäten inklusive der entsprechenden Standardfehler aus vier unabhängigen Experimenten. Durch die Expression der miR-15a sank die Luciferase-Aktivität des PHLPP2-3'UTR-Reporterkonstrukts auf 71% ($p=0,000000119$).

Die Luciferase-Aktivität des leeren pMIR-RNL-TK-Reportervektors wurde durch die Expression der miR-15a nur leicht reprimiert, wohingegen die Luciferase-Aktivität des PHLPP2-Reporterkonstrukts durch die miR-15a-Expression signifikant auf 71% ($p=0,000000119$) reduziert wurde. Um die Bindung der miR-15a an ihre vorhergesagte Bindestelle in der PHLPP2-3'UTR zu bestätigen, wurde mittels zielgerichteter Mutagenese die Sequenz der miR-15a-Bindestelle durch eine Restriktionschnittstelle ersetzt, welche nicht komplementär zur Seed-Sequenz der miR-15a war. Eine

schematische Übersicht über die PHLPP2-3'UTR, sowie die Sequenzen der miR-15a-Bindestelle in der wildtyp und der mutierten PHLPP2-3'UTR sind in Abbildung 43 dargestellt

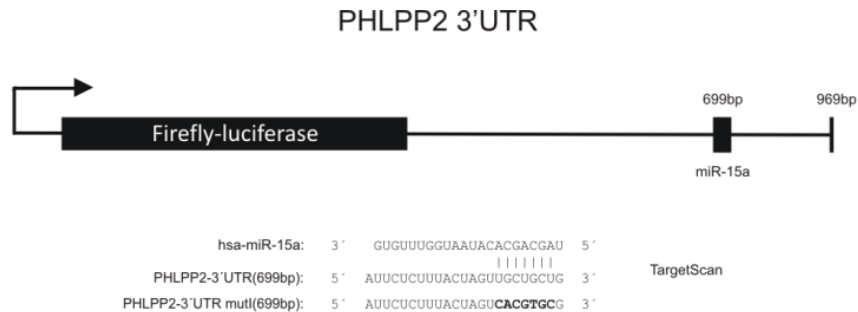


Abbildung 43: Schematische Darstellung der PHLPP2-3'UTR mit miR-15a-Bindestelle

Dargestellt ist eine schematische Übersicht über die PHLPP2-3'UTR inklusive der für miR-15a vorhergesagten Bindestelle und über die Sequenzen der zur Seed-Sequenz komplementären wildtyp PHLPP2-3'UTR, sowie der neu eingesetzten Sequenz der mutierten PHLPP2-3'UTR, welche hervorgehoben ist.

Die Ergebnisse des Luciferase-Assays mit dem mutierten PHLPP2-Reporterkonstrukt aus vier unabhängigen Experimenten mit zugehörigen Standardfehlern der jeweiligen Ansätze sind in Abbildung 44 gezeigt. Die mittleren Luciferase-Aktivitäten der mit miR-15a-Expressionsvektor transfizierten Ansätze wurden auf die mittleren Luciferase-Aktivitäten der Kontrollansätze mit leerem pSG5-Vektor bezogen, nachdem diese auf 100% gesetzt wurden.

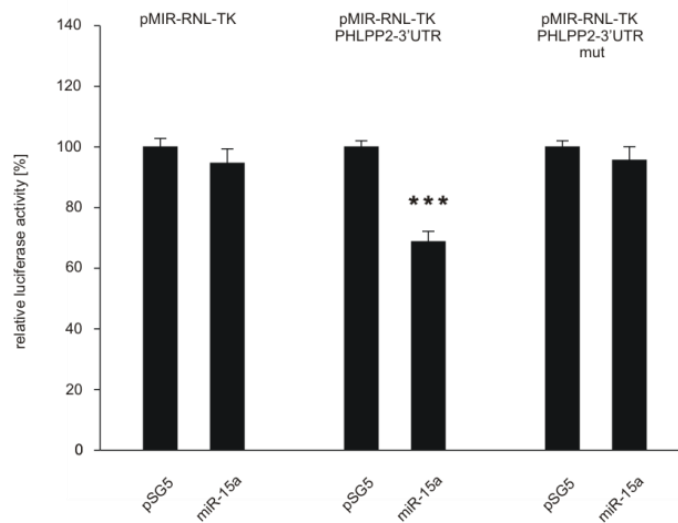


Abbildung 44: Identifizierung der Bindestelle der miR-15a in der PHLPP2-3'UTR

293-T-Zellen wurden entsprechend der in der Abbildung angegebenen Kombinationen mit 0,2 µg Reportervektor und 0,8 µg Effektorplasmid transfiziert und nach 48 h die Luciferase-Aktivität in den jeweiligen Zelllysaten detektiert. Hier dargestellt sind die mittleren Luciferase-Aktivitäten aus vier unabhängigen Experimenten mit Standardfehlern, wobei die Luciferase-Aktivität in den mit leerem pSG5-Expressionsplasmid transfizierten Ansätzen auf 100% und die Aktivität in den Zelllysaten mit miR-15a-Expressionsvektor dazu ins Verhältnis gesetzt wurde. Die Koexpression der wildtyp PHLPP2-3'UTR mit der miR-15a führte zu einer signifikanten Abnahme der Luciferase-Aktivität auf 68% ($p=0,0000018$), wohingegen die miR-15a-Expression den gleichen Effekt auf die Luciferase-Aktivität der mutierten PHLPP2-3'UTR hatte wie auf den leeren pMIR-RNL-TK-Vektor.

Die Luciferase-Aktivität des wildtyp PHLPP2-Reportervektors wurde durch die Expression der miR-15a signifikant auf 68% ($p=0,0000018$) reduziert. Dahingegen hat die ektopische miR-15a-Expression die gleiche Auswirkung auf die mutierte PHLPP2-3'UTR wie auf den leeren pMIR-RNL-TK-Reportervektor. Dies bestätigte die Annahme, dass PHLPP2 posttranskriptionell durch miR-15a reguliert wird.

6.5.6.1. Auswirkung der ektopischen Expression der miRNA-375 auf die endogene PHLPP2-Proteinmenge in Prostatakarzinomzelllinien

Zur Verifizierung von PHLPP2 als Zielgen der miR-15a auf Proteinniveau sollte die Reduktion der endogenen PHLPP2-Proteinmenge in zwei Prostatakarzinomzelllinien durch ektopische Expression der miR-15a nachgewiesen werden. Dazu wurden LNCaP- bzw. DU145-Zellen entweder mit leerem pSG5-Expressionsvektor oder mit miR-15a-Expressionsplasmid transfiziert und 48 h danach aus den jeweiligen Ansätzen native Proteinextrakte hergestellt. Darauf wurden 30 µg Gesamtprotein pro

Ansatz in einem 8,75%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Hilfe spezifischer Antikörper das PHLPP2- bzw. das GAPDH-Protein, als Ladekontrolle, im Western Blot nachgewiesen (PHLPP2 A300-661A; GAPDH 14C10). In Abbildung 45 ist ein repräsentativer Western Blot für jede Zelllinie aus drei unabhängigen Experimenten gezeigt.

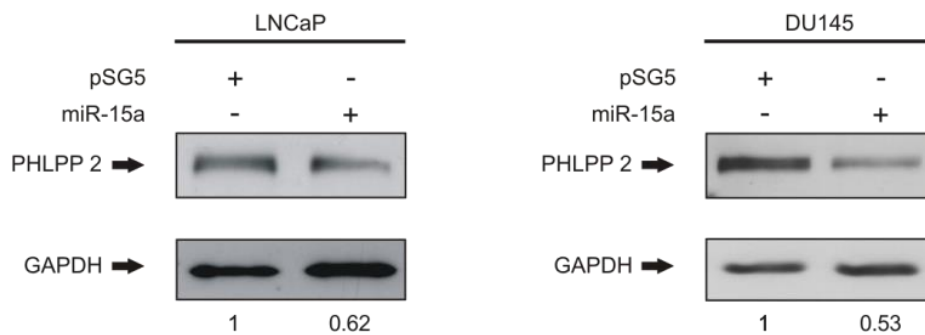


Abbildung 45: Effekt der miR-15a-Expression auf den PHLPP2-Proteinniveau in PCa-Zelllinien

LNCaP- bzw. DU145-Zellen wurden mit 0,2 µg leerem pSG5-Expressionsvektor oder miR-375-Expressionsplasmid transfiziert und aus den jeweiligen Ansätzen nach 48 h Proteinextrakte hergestellt. Danach wurden 30 µg Gesamtprotein pro Ansatz in einem 8,75%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und das PHLPP2- bzw. das GAPDH-Protein mit spezifischen Antikörpern im Western Blot detektiert. Die Banden aller drei unabhängigen Experimente wurden mit Hilfe der Quantity One analysis Software quantifiziert, die PHLPP2-Expression auf die GAPDH-Expression normiert und die PHLPP2-Expression in denen mit miR-15a transfizierten Ansätzen ins Verhältnis zur Expression der Kontrollansätze gesetzt. Durch die ektopische Expression der miR-15a wurde die PHLPP2-Proteinmenge signifikant auf 62% ($p=0,0037$) in den LNCaP- und auf 53% ($p=0,046$) in den DU145-Zellen reduziert.

Zunächst wurden die PHLPP2- bzw. die GAPDH-Banden mittels der Quantity One analysis Software quantifiziert, die PHLPP2-Expression auf die Expression der GAPDH-Ladekontrolle normiert und die PHLPP2-Expression in den mit miR-15a transfizierten Zellen in Bezug zu der PHLPP2-Proteinmenge der kontrolltransfizierten Zellen gesetzt. Die ektopische Expression der miR-15a bewirkte eine signifikante Abnahme der PHLPP2-Proteinmenge auf auf 62% ($p=0,0037$) in den LNCaP- und auf 53% ($p=0,046$) in den DU145-Zellen. Damit konnte bestätigt werden, dass die endogene PHLPP2-Proteinmenge von der Expression der miR-15a abhängt und somit PHLPP2 ein Zielgen der miR-15a ist.

6.5.6.2. Untersuchung der Korrelation zwischen der PHLPP1- und PHLPP2-mRNA-Expression und der Expression der miRNAs miR-375 und -15a in primären Prostatatumoren zunehmender Malignitätsgrade

Zur Analyse einer möglichen Korrelation zwischen der PHLPP1-mRNA-Expression und der miR-375-Expression bzw. der PHLPP2-mRNA-Expression und der miR-15a-Expression in primären Prostatakarcinomen zunehmender Malignitätsgrade wurde deren Expression durch quantitative Real-Time-PCRs in einem Patientenkollektiv aus Normalgeweben und drei Tumorentitäten (pT2 (N0), pT3 (N0), N1), detektiert. Die qRT-PCRs wurden am Institut für molekulare Urologie des Universitätsklinikums Erlangen von Dr. rer. nat. Elke Nolte durchgeführt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Resultate der qRT-PCRs sind in Abbildung 46 gezeigt.

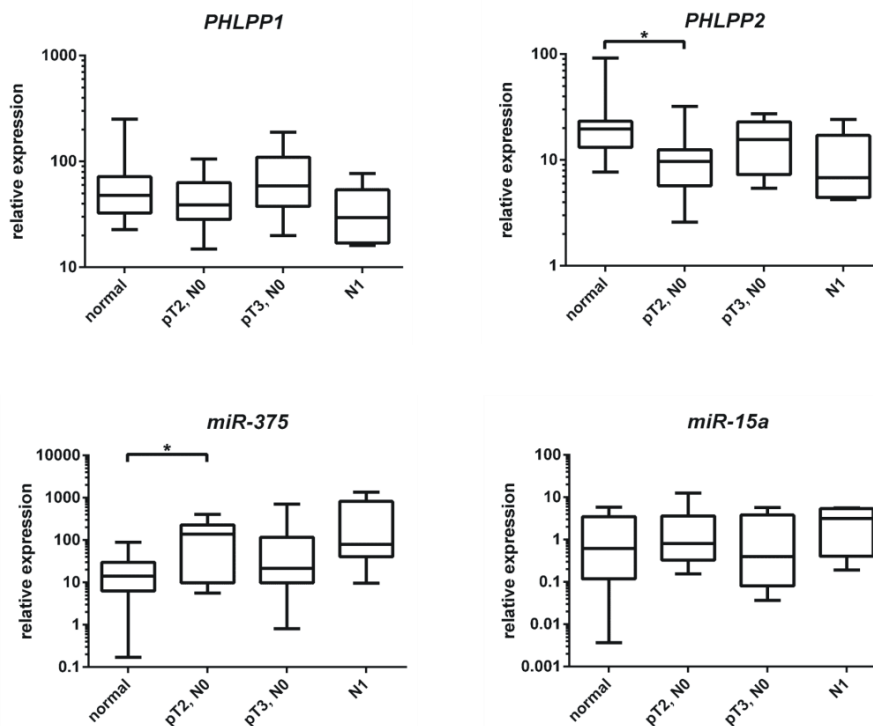


Abbildung 46: Korrelation der PHLPP1-mRNA-Expression mit der miR-375-Expression bzw. der PHLPP2-mRNA-Expression mit der miR-15a-Expression

In einem Patientenkollektiv von 40 Tumورproben und korrespondierenden Normalgeweben wurde mit Hilfe von qRT-PCR die Expression der PHLPP1- bzw. PHLPP2-mRNA und die Expression der miR-375 und -15a nachgewiesen. Darauf wurden die relativen Expressionen der jeweiligen mRNAs bzw. miRs in den Tumورproben anhand der Patientencharakteristika den drei Tumorentitäten pT2 N0, pT3 N0 und N1 zugeteilt. Durch den Vergleich der jeweiligen mRNA-Expression mit der korrespondierenden miR-Expression konnte eine negative Korrelation zwischen der PHLPP1-mRNA- und miR-375-Expression bzw. der PHLPP2-mRNA- und miR-15a-Expression in allen drei Prostatatumorentitäten gezeigt werden.

Die Ergebnisse der qRT-PCRs bestätigen durch Vergleich der jeweiligen mRNA-Expression mit der korrespondierenden miR-Expression in den drei Tumorentitäten, dass eine negative Korrelation zwischen der PHLPP1-mRNA- und miR-375-Expression bzw. der PHLPP2-mRNA- und miR-15a-Expression in allen drei Entitäten besteht. Diese negative Korrelation ist ein weiterer Beleg für die Regulation von PHLPP1 durch miR-375 bzw. von PHLPP2 durch miR-15a.

6.5.6.3. Effekt der ektopischen Expression der miR-375 und -15a auf die Zellproliferation von Prostatakarzinomzelllinien

Zur Analyse des Einflusses der Überexpression der miR-375 und -15a auf die Zellproliferation der PCa-Zelllinien LNCaP und DU145 wurden diese Zelllinien entweder mit leerem pSG5-Kontrollvektor, miR-375-, miR-15a-Expressionsplasmid oder mit der Kombination beider miRNA-Expressionsvektoren transfiziert. Darauf erfolgte die Bestimmung der Zellzahl nach 24, 48 und 72 h. Die Ergebnisse der Zellproliferationsassays der LNCaP- bzw. der DU145-Zellen sind in Abbildung 47 dargestellt.

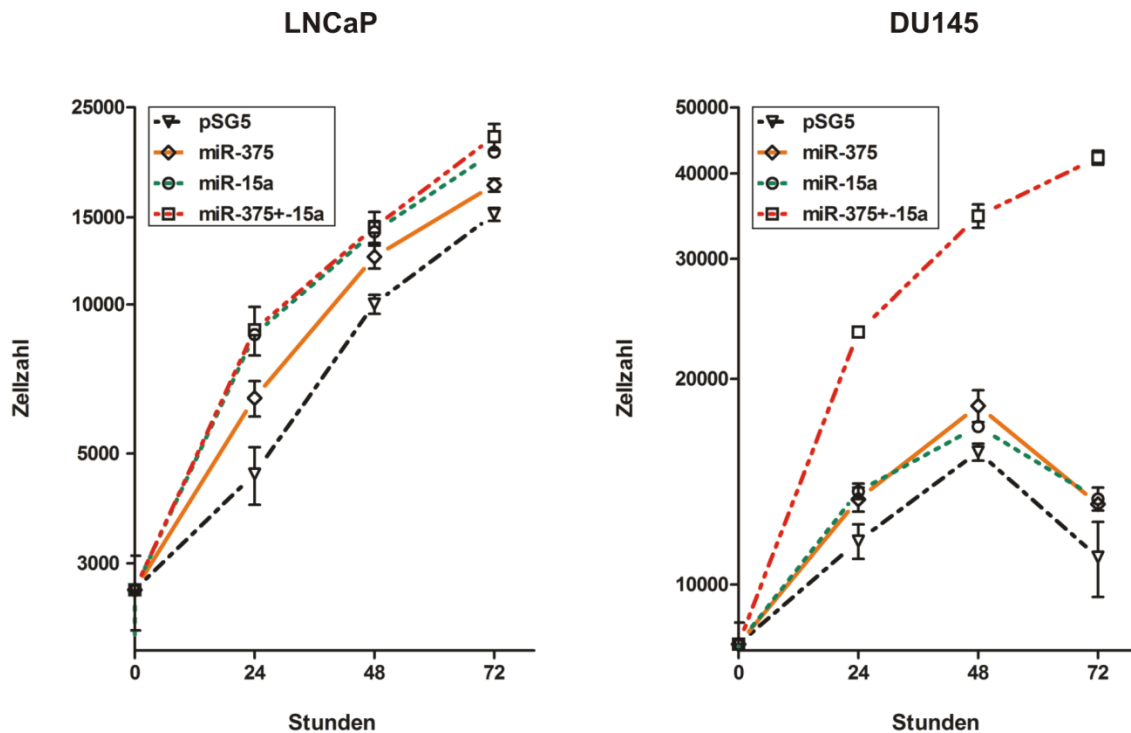


Abbildung 47: Auswirkung der Überexpression der miR-375 und -15a auf die Zellproliferation der PCa-Zelllinien LNCaP und DU145

2×10^5 DU145- bzw. LNCaP-Zellen wurden in 6-Loch-Platten ausgesät. Nach 24 h wurde der Nullstunden-Zeitpunkt geerntet und die restlichen Wells entweder mit $4 \mu\text{g}$ pSG5-Kontrollplasmid, $2 \mu\text{g}$ miR-375 bzw. -15a-Expressionsvektor und $2 \mu\text{g}$ Kontrollvektor oder mit $2 \mu\text{g}$ miR-375- und $2 \mu\text{g}$ miR-15a-Expressionsplasmid transfiziert. 24, 48 und 72 h nach Transfektion wurden die restlichen Zeitpunkte geerntet und die Zellzahl der Ansätze der jeweiligen Zeitpunkte durchflusszytometrisch bestimmt. Dabei zeigte sich, dass die Transfektion der miRNAs alleine nur zu einer leichten Steigerung der Zellproliferation führte. Die Kotransfektion beider miRNA-Expressionsplasmide bewirkte die stärkste Induktion der Zellproliferation in beiden Zelllinien.

Die Ergebnisse des Zellproliferationsassays mit den LNCaP-Zellen zeigen, dass die ektopische Expression der miR-375 zu einer leichten Steigerung der Zellproliferation führte. Wohingegen die Überexpression der miR-15a, sowie der Kombination beider miRNAs eine stärkere Induktion der Zellproliferation bewirkte, wobei die Kombination aber den ausgeprägtesten Effekt hatte. In den DU145-Zellen führte die Überexpression der einzelnen miRNAs nur zu einem geringen Anstieg der Zellproliferation. Die Kotransfektion der miR-375 mit der miR-15a rief den stärksten induzierenden Effekt auf die Zellproliferation hervor.

6.5.6.4. Auswirkung der Expression von miR-375- und -15a-Inhibitoren auf die Zellproliferation von Prostatakarzinomzelllinien

Zur Verifizierung der Ergebnisse der Zellproliferationsassays wurde ein Gegenexperiment durchgeführt. Dazu wurde mit Hilfe von miR-375- bzw. -15a-Inhibitoren die Funktionen der endogen exprimierten miR-375 und -15a in den DU145-Zellen lahmgelegt. Dieses Experiment wurde nur in DU145-Zellen durchgeführt, da LNCaP-Zellen nur sehr wenig miR-375 exprimieren. Zu diesem Zweck wurden DU145-Zellen entweder mit Kontrollinhibitor, miR-375-, miR-15a-Inhibitor oder mit der Kombination beider miRNA-Inhibitoren transfiziert und nach 24, 48 und 72 h die Zellzahl detektiert. Die Abbildung 48 zeigt das Ergebnis dieses Inhibitor-Zellproliferationsassays.

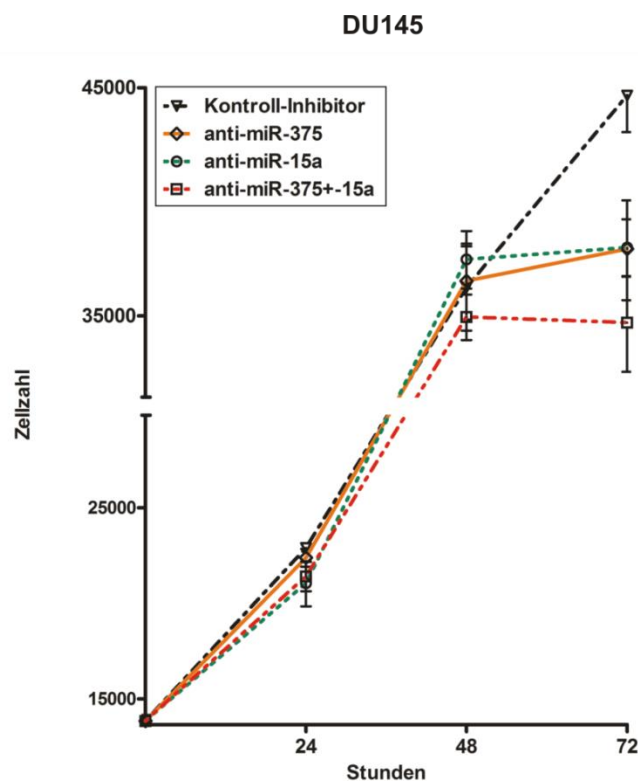


Abbildung 48: Effekt der Expression von miR-375 bzw. -15a-Inhibitoren auf die Zellproliferation von DU145-Zellen

24 h nach der Aussaat von 2×10^5 DU145-Zellen in 6-Loch-Platten wurde der Nullstunden-Zeitpunkt geerntet und die restlichen Wells entweder mit 1,5 μg Kontroll-Inhibitor, 1,5 μg miR-375 bzw. -15a-Inhibitor oder mit je 0,75 μg miR-375- bzw. miR-15a-Inhibitor transfiziert. Darauf wurden 24, 48 und 72 h nach Transfektion die einzelnen Zeitpunkt geerntet und mittels Durchflusszytometrie die Zellzahl gemessen. Erst nach 48 h konnte in den mit miR-Inhibitoren transfizierten Zellen eine Reduktion der Zellproliferation festgestellt werden. Die Kotretransfektion beider miR-Inhibitoren bewirkte die stärkste Abnahme der Zellproliferation.

Nach 48 h rief die Transfektion mit dem miR-375- bzw. 15a-Inhibitor eine leichte Abnahme der Zellproliferation der DU145-Zellen hervor. Die Kotransfektion mit beiden miRNA-Inhibitoren führte zur stärksten Reduktion der Zellproliferation. Dieses Ergebnis bestätigt die Ergebnisse der vorangegangenen Zellproliferationsassays, da die Reduktionen der Zellproliferation der jeweiligen Ansätze negativ zu den Induktionen der entsprechenden Ansätze des vorhergegangenen Experimentes korreliert sind.

7. Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin ein komparatives miRNA-Expressionsprofil zunehmend maligner Prostatakarzinome zu erstellen. Dazu wurden zunächst fünf cDNA-Banken aus fünf verschiedenen Prostatagewebepools hergestellt, wobei im ersten Pool zehn pT2-Tumoren ohne Lymphknotenmetastasen (N0), im zweiten Pool sieben pT3-Tumoren ohne Lymphknotenmetastasen (N0), im dritten Pool drei pT3-Tumoren mit Lymphknotenmetastasen (N1), im vierten Pool das gesunde Prostatagewebe aller korrespondierenden Tumoren und im fünften fünf Gewebepollen gesunder Prostatae, die bei Zystektomien entnommen wurden, zusammengefasst wurden. Anschließend wurden die fünf cDNA-Banken mit Hilfe der Illumina-Sequenzierung sequenziert und bioinformatisch analysiert. Beim Vergleich der miRNA-Expressionsprofile von Normalgewebe aus Zystektomien mit den drei zunehmend malignen Tumorgeweben zeigten sich deutliche Unterschiede und Expressionsmuster. Anschließend konnten die Ergebnisse der Sequenzierung für acht ausgewählte, deregulierte miRNAs in den zur Sequenzierung eingesetzten Gewebepools durch Northern Blots bestätigt werden. Darüber hinaus war es möglich diese Ergebnisse ebenfalls tendenziell in einem unabhängigen, größeren Patientenkollektiv zu validieren, d.h. durch die Zusammenfassung aller drei Tumorentitäten konnte gezeigt werden, dass die Expressionen der jeweiligen miRNAs entsprechend den Ergebnissen der Sequenzierung signifikant verändert waren.

Zur Analyse des Zusammenhangs zwischen abnormer miRNA-Expression und Prostatakarzinogenese bzw. -tumorprogression konnten drei Zielgene von im Prostatakarzinom induzierter miRNAs identifiziert werden. Zunächst wurde SEC23A als Target der miRNA-200b bestätigt. Des Weiteren gelang es Zielgene mit Bezug zum PIK3/AKT-Signalweg zu identifizieren, der mit der Prostatakarzinogenese in Verbindung gebracht wird (Taylor et al., 2010). Dabei konnte PHLPP1 als Zielgen für miRNA-375, die erstmals von Szczyrba et al. in Zusammenhang mit der Krebsentstehung gebracht wurde (Szczyrba et al., 2011), bestätigt und PHLPP2 als Zielgen für miR-15a verifiziert werden, wobei beide PHLPPs die Aktivität verschiedener Isoformen des AKT, einer Schlüsselkomponente des PIK3/AKT-Signalweg, regulieren.

7.1. Illumina-Sequenzierung von fünf cDNA-Banken aus humanen Prostatageweben

7.1.1. Herstellung der fünf cDNA-Banken aus humanen Prostatageweben

Die zur Herstellung der cDNA-Banken durch die Firma vertis Biotechnologie AG eingesetzten fünf Prostatagewebepools wurden von der Gewebebank des University Cancer Centers (UCC) des Uniklinikums Erlangen von Dr. Tilman Rau ausgewählt und zur Verfügung gestellt. Ein erfahrener Uropathologe stellte durch vorherige Begutachtung der Proben sicher, dass die Tumorproben mindestens 70% Tumorzellen beinhalteten bzw. die Normalgewebe frei von Tumorzellen waren. Insgesamt 20 Tumorproben wurden anhand ihrer TNM-Klassifizierung in drei Gewebepools eingeteilt. Ein Tumorpool enthielt zehn weniger aggressive pT2c Tumoren, was dem Befall von beiden Prostatalappen entspricht. Der zweite Tumorpool beinhaltete sieben aggressive Tumoren, wobei sechs die Klassifikation pT3a und eine pT3b zeigten. Daher bestand dieser Pool aus sechs Tumoren, die eine extrakapsuläre Ausbreitung und einem, der eine Infiltration der Samenblase zeigte, aber bei denen bis dato keine Lymphknotenmetastasen nachgewiesen werden konnten. Der dritte Pool fasste drei aggressive pT3b-Tumoren, die bereits in die regionären Lymphknoten gestreut hatten, zusammen. Als Vergleichsgewebe dienten zwei Gewebepools. Ein Pool umfasste die gesamten gesunden Prostatagewebeprobe aus allen korrespondierenden Tumoren und der zweite fünf Gewebeprobe aus gesunden Prostatae, welche bei Zystektomien entnommen wurden. Bei der Aufarbeitung der Gewebepools konnte genügend RNA isoliert werden (Abb.12, S.80), welche zur Herstellung der fünf-cDNA-Banken benutzt wurde. Nach der erfolgreichen Qualitätskontrolle der amplifizierten cDNAs der jeweiligen Gewebepools mit der erwarteten Länge von 165-176 bp unter Verwendung des Shimadzu MultiNA microchip electrophoresis system (Abb.13, S.81) wurden die fünf cDNA-Banken gepoolt und auf dem Illumina-HiSeq-2000-System sequenziert.

7.1.2. Sequenzanalyse der fünf cDNA-Banken aus humanen Prostatageweben

Die Sequenzierung der fünf cDNA-Banken auf dem Illumina-HiSeq-2000-System verlief erfolgreich, so dass die Firma vertis Biotechnologie AG in der Lage war die bioinformatische Sequenzanalyse der cDNA-Banken durchzuführen. Die Rohsequenzdaten wurden im Rahmen dieser Arbeit analysiert, indem die relative Expression jeder gefundenen microRNA berechnet und diejenigen miRNAs eliminiert wurden, deren relative Expression unter 0,1 lag (Tab.22, S.177). Somit konnte erfolgreich die Expression von insgesamt 1056 verschiedenen miRNAs im Prostatanormalgewebe und -karzinom nachgewiesen werden.

7.1.2.1. Vergleich der miRNA-Expression in den gesunden Gewebepools

Die relative Expression der 20 am stärksten exprimierten miRNAs in beiden Normalgewebepools wurde gegenübergestellt, um entscheiden zu können welcher der Pools zum Vergleich mit den Prostatatumorpoolen herangezogen werden sollte (Tab.19, S.83). Dabei zeigte sich, dass unter den 20 am stärksten exprimierten miRNAs 19 miRNAs in beiden Normalgewebepools exprimiert wurden und die quantitativen Unterschiede sehr gering ausfielen. Bislang existieren keinerlei Studien, welche Aussagen über die quantitative miRNA-Expression in gesunden Prostatageweben getroffen haben. Wohingegen einige Publikationen stabile miRNA-Expressionsmuster in Hautzellen bzw. Magengewebe nachweisen konnten (Holst et al., 2010; Ribeiro-dos-Santos et al., 2010). Im Jahre 2007 wurde ein sogenannter Expressionsatlas von Landgraf et al. publiziert, welcher das normale Expressionsmuster verschiedener Gewebe, darunter auch Prostatagewebe, beschreibt (Landgraf et al., 2007). Beim Vergleich der 20 am stärksten exprimierten miRNAs in beiden Normalgewebepools dieser Sequenzierung mit den miRNA-Expressionsdaten für normales Prostatagewebe von Landgraf et al. zeigte sich, dass alle 20 am stärksten exprimierten miRNAs der Normalgewebe dieser Sequenzierung auch im Expressionsatlas zu finden waren. Darüber hinaus sind 15 der 20 am stärksten exprimierten miRNAs dieser Sequenzierung ebenfalls unter den 20 am stärksten exprimierten miRNAs bei Landgraf et al. zu finden. Des Weiteren konnten alle 20 am stärksten exprimierten miRNAs dieser Sequenzierung ebenfalls in den

Expressionsdaten der Normalgewebe der Sequenzierung von Szczyrba et al. gefunden werden, wobei 11 der 20 am stärksten exprimierten miRNAs dieser Sequenzierung ebenfalls unter den 20 am stärksten exprimierten miRNAs bei Szczyrba et al. vorkamen (Szczyrba et al., 2010). Aufgrund dessen sind die miRNA-Expressionsdaten dieser Sequenzierung konsistent und vergleichbar mit denen der Sequenzierung von Szczyrba et al. Darüber hinaus zeigte sich, dass nach der Auswahl der Normalgewebe durch die uropathologische Begutachtung sichergestellt werden konnte, dass die Normalgewebe aller korrespondierenden Prostatatumoren frei von Tumorzellen waren. Trotzdem wurde zum Vergleich mit der miR-Expression der drei Prostatatumorgewebepools mit zunehmender Malignität der Normalgewebepool mit gesunden Prostatae, welche bei Zystektomien entnommen wurde, verwandt, da diese Gewebe zu 100% frei von Tumorzellen und auch etwaigen Neoplasien waren.

7.1.2.2. Vergleich der miRNA-Expression zwischen gesundem Prostatagewebe und den Prostatatumorpool mit zunehmender Malignität

Zur Identifizierung von deregulierten miRNAs in den drei Prostatatumorentitäten wurden die entsprechenden miRNA-Expressionsmuster mit dem des gesunden Prostatagewebes verglichen. Im Normalgewebepool wurden 674 unterschiedliche miRNAs, im pT2 (N0)-Pool 677 miRNAs, im pT3 (N0)-Pool 702 miRNAs und im pT3-Pool mit Lymphknotenmetastasen (N1) 682 miRNAs exprimiert. Eine mögliche Erklärung dafür, dass in den pT3-Tumoren ohne Lymphknotenmetastasen mehr miRNAs exprimiert werden als im Normal- und den beiden anderen Tumorgeweben, könnte in einer Art Tumorevolution begründet sein, wobei durch eine gesteigerte Anzahl exprimierter miRNAs verbesserte Voraussetzungen zur Metastasierung geschaffen werden.

Nach dem Vergleich der miRNA-Expression im gesundem Gewebe mit der miRNA-Expression der drei Prostatatumorgewebepools konnten 40 miRNAs identifiziert werden, deren Expression im Vergleich zum Normalgewebe mindestens 1,5-fach verändert war. Dazu zählten 29 induzierte und 11 reprimierte miRNAs (Tab.20 & 21, S.85/86). Die Beobachtung, dass die Mehrzahl der miRNAs in den drei Prostatatumorentitäten induziert sind, geht einher mit den Ergebnissen früherer

Studien von Volinia et al. und Ambs et al. (Ambs et al., 2008; Volinia et al., 2006). Darüber hinaus zeigte eine bioinformatische Studie von Sun et al., dass eine Reihe putativer miRNA-Zielgene im Prostatakarzinom reprimiert sind (Sun et al., 2009). Dennoch wird die überdurchschnittlich häufige Induktion von miRNAs im Prostatakarzinom kontrovers diskutiert. Mehrere andere miRNA-Expressionsstudien konnten nachweisen, dass die Mehrzahl der miRNAs im Prostatakarzinom reprimiert waren (Lu et al., 2005; Ozen et al., 2008; Porkka et al., 2007). Diese gegensätzlichen Ergebnisse sind Unterschieden im Aufbau der Studie, der Verwendung verschieden sensitiver bzw. verschieden spezifischer Nachweismethoden, Unterschieden bei der Probenauswahl und Kontaminationen der Proben mit nicht neoplastischen Zellen geschuldet (Coppola et al., 2010).

Gründe für die Deregulation der miRNA-Expression sind zum einem auf genomischer Ebene zu finden und zum anderen auf Fehler bei der miRNA-Prozessierung zurückzuführen. Croce und Kollegen konnten nachweisen, dass 50% aller miRNA-Gene in chromosomal instabilen Regionen lokalisiert sind, was häufig zu Rearrangements, Amplifikationen, Deletionen oder Mutationen führt (Di Leva and Croce, 2010, Calin et al., 2004). Damit einher gehen die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Zhang et al., welche demonstrieren, dass bei 75% aller miRNA-Gene, welche entweder durch Amplifikation induziert oder durch Deletion reprimiert werden, eine Verbindung zwischen der miRNA-Expression und der Anzahl der Kopien des miRNA-Gens besteht (Zhang et al., 2008). Weitere genomische Ursachen für die Deregulierung von miRNAs sind epigenetische Modifikationen wie Hyper- bzw. Hypomethylierung der Promotorregion von miRNA-Genen oder Histonmodifikationen (Lim et al., 2010). Ein Beispiel für eine epigenetisch begründete Repression einer miRNA, ist die Hypermethylierung der Promotorregion der miRNA-145 im Prostatakarzinom (Suh et al., 2011). Des Weiteren kann die Überexpression von onkogenen Transkriptionsfaktoren zur verstärkten Expression einer miRNA führen, wie zum Beispiel die Überexpression von c-MYC die Induktion des miRNA-17/92-Cluster verursacht (O'Donnell et al., 2005). Weitere Ursachen für eine veränderte miRNA-Expression beruhen auf einer fehlerhaften Prozessierung der miRNAs. Einerseits können Tumorsuppressoren wie p53, p63 und p73 durch Interaktion mit der miRNA-Prozessierungsmaschinerie die Prozessierung von pre-miRNAs zu reifen miRNAs beschleunigen (Boominathan, 2010; Suzuki et al., 2009). Andererseits kann die

Bindung von RNA-bindenden Molekülen an pri-miRNAs deren korrekte Prozessierung durch Drosha zu pre-MiRNAs verhindern (Newman et al., 2008; Viswanathan et al., 2008) oder eine Überexpression von Dicer zu einer Induktion von miRNAs führen (Chiosea et al., 2006).

Bei der näheren Untersuchung der Expression einzelner miRNAs der miRNA-Cluster miR-17-92 (miR-17, -18a, -19a, -20a, -19b-1, -92a-1) und der miR-200-Cluster (miR-200b, -200a, -429; miR-200c, -141) zeigte sich, dass die miRNAs eines Clusters alle identifiziert werden konnten, aber verschieden stark exprimiert wurden. So zum Beispiel waren die miRNAs miR-200a und -200b in den drei Prostatatumorentitäten unterschiedlich stark exprimiert und miR-429 nur sehr schwach. Ebenfalls unterschiedlich stark exprimiert wurden die geclusterten miRNAs miR-141 und -200c, wobei die miR-141, die am stärksten exprimierte miRNA unter allen induzierten miRNAs war. Auch die miRNAs des miRNA-Cluster miR-17-92 zeigten differentielle Expressionsmuster in den drei Tumorentitäten, wobei auf die miR-19b-1 nur wenige Reads entfielen. Dies bestätigt eine Studie von Yu et al., der dieses Phänomen in Leukämiezellen beobachtete (Yu et al., 2006). Eine Erklärung für die unterschiedlich starke Expression bietet eine Publikation von Song et al., die zeigt, dass miRNAs innerhalb eines Clusters unabhängig voneinander transkribiert und reguliert werden können (Song and Wang, 2008).

Darüber hinaus wurde eine Überrepräsentierung der miR-143 festgestellt, wobei zum Beispiel über 30% aller gefundenen miR-Sequenzen im Normalgewebe der miR 143 zugeordnet werden konnten. Dies lässt sich durch einen sogenannten Klonierungsbias erklären, wobei während der cDNA-Synthese manche miRNAs aufgrund ihres 5'-RNA-Adapters effizienter amplifiziert werden. Dieses Phänomen konnte aber in allen Prostatagewebepools beobachtet werden, so dass nach Auswertung der Sequenzdaten eine Repression der miR-143 einhergehend mit dem Expressionsprofil von Szczyrba et al. bestätigt werden konnte (Szczyrba et al., 2010).

Zusammenfassend betrachtet, erbrachten die Ergebnisse dieser Sequenzierung den Nachweis, dass das miRNA-Expressionsmuster mit fortschreitender Prostatatumorprogression stetigen Änderungen unterliegt und dieses miRNA-Expressionsmuster möglicherweise zur Unterscheidung verschiedener Malignitätsgrade des Prostatakarzinoms herangezogen werden kann. Dies bekräftigt die Studien von Neves et al.

und Wang et al., die zeigen konnten, dass aggressivere Tumorstadien eine deutlich veränderte miRNA-Expression aufweisen (Neves et al., 2010; Wang et al., 2009).

7.1.2.3. In zunehmend malignen Prostatakarzinomen induzierte miRNAs

Durch die Analyse der mindestens 1,5-fach veränderten miRNA-Expression zunehmend maligner Prostatatumorentitäten konnten 29 induzierte miRNAs identifiziert werden (Tab.20, S.85). Im Vergleich zum miRNA-Expressionsprofil von Szczyrba et al., welches mittels einer 454-Sequenzierung erstellt wurde und in hauptsächlich niedermalignen Prostatakarzinomen 16 induzierte miRNAs nachwies, konnten in dieser Sequenzierung insgesamt mehr induzierte miRNAs gefunden werden (Szczyrba et al., 2010). Dies könnte zum einem auf den höheren Malignitätsgrad der hier sequenzierten Prostatatumorentitäten und zum anderen auf die Verwendung einer fortschrittlicheren Sequenzierungsmethode zurückzuführen sein. Darüber hinaus waren acht miRNAs, übereinstimmend mit der Sequenzierung von Szczyrba et al., ebenfalls induziert. Dazu zählten die miRNAs miR-375, -148a, -200c, -106a, -106b, -25, -21 und -20a. Andere miRNAs, die eine Induktion bei Szczyrba et al. zeigten, wie zum Beispiel let-7a und -7f, waren in der hier vorgestellten Sequenzierung unverändert. Aufgrund der großen Zahl der induzierten miRNAs kann hier nur auf einige ausgewählte miRNAs näher eingegangen werden.

Die stärkste Induktion wurde für miR-375 in den metastasierenden pT3-Prostatatumoren beobachtet, wobei ihre Expression in dieser Entität im Vergleich zu den beiden anderen nochmal um das Doppelte anstieg, obwohl sie auch in den pT2 und pT3-Tumoren ohne Lymphknotenmetastasen bereits stark induziert war. Dies bestätigt die Ergebnisse der Sequenzierung von Szczyrba et al., welche die miR-375 erstmals im Prostatakarzinom als überexprimiert beschrieb. Bekräftigt wird diese Beobachtung durch die Studien von Martens-Uzunova et al. und Schaefer et al. die ebenfalls eine Induktion der miR-375 im Prostatakarzinom fanden. (Martens-Uzunova et al., 2012; Schaefer et al., 2010b). In anderen Krebsarten wie Mundhöhlen- und Speiseröhrenkrebs wird die miRNA-375 als putative Tumorsuppressor-miRNA beschrieben (Isozaki et al., 2012; Jung et al., 2013), wohingegen sie im Prostatakarzinom eher die Rolle einer Oncomir spielt. Darüber hinaus konnte auch auf Proteinebene gezeigt werden, dass manche Proteine abhängig von der

Krebsart entweder als Onkogene oder als Tumorsuppressoren fungieren, so zum Beispiel p21WAF1 (Warfel and El-Deiry, 2013). Die Funktion der miR-375 als Oncomir wird durch die Ergebnisse von Szczyrba et al. unterstützt, welche demonstrieren, dass SEC23A ein Zielgen der miR-375 ist. SEC23A ist im Prostatakarzinom reprimiert und ein Verlust von SEC23A geht einher mit verstärkter Zellmigration und -proliferation (Szczyrba et al., 2011). Neuste Studien zeigen, dass eine Überexpression der miR-375, häufig in Verbindung mit der Überexpression der miR-141, in Seren von Prostatakrebspatienten nachgewiesen werden kann und eine starke Assoziation der Induktion beider miRNAs mit der Metastasierung des Prostatakarzinoms (Brase et al., 2011; Bryant et al., 2012; Nguyen et al., 2013; Selth et al., 2012). Dies wird auf Ebene des Tumors durch die Ergebnisse dieser Sequenzierung bestätigt, da sowohl miR-375 als auch miR-141 in der metastasierenden pT3-Entität stark überexprimiert waren.

Des Weiteren zeigen die Ergebnisse der Sequenzierung, dass die miR-21 in allen drei Tumorentitäten überexprimiert war, wobei sie ähnlich zur miR-375 in den pT3-Tumoren mit Lymphknotenmetastasen sehr stark induziert wurde. Dies steht im Einklang mit der Sequenzierung von Szczyrba et al., die ebenfalls eine Induktion der miR-21 zeigte (Szczyrba et al., 2010). Nach heutigem Kenntnisstand ist die miR-21 in einer Vielzahl von Krebsarten überexprimiert und als onkogene miRNA beschrieben (Asangani et al., 2008; Budhu et al., 2010; Folini et al., 2010; Ribas et al., 2009). Die hier gezeigte Überexpression der miR-21 steht auch im Prostatakarzinom im engen Zusammenhang mit der Karzinogenese und der Metastasierung durch die Regulation von Zielgenen wie PTEN und BTG2, wodurch die Zellproliferation verstärkt, die Apoptose verhindert und die epitheliale-mesenchymale Transition vorangetrieben wird (Coppola et al., 2013; Meng et al., 2007a). Die Resultate dieser Sequenzierung untermauern eine Studie von Yaman-Agaoglu et al., welche die Induktion der miRNAs miR-21 und -141 im Blutplasma von Patienten mit nicht metastasierten bzw. eine nochmals verstärkte Induktion dieser beiden miRNAs in metastasierten Prostatakarzinomen belegte (Yaman-Agaoglu et al., 2011).

Die miRNAs miR-17, -18a, -20a, -20b, -93, -106a und -106b, welche allesamt in zumindest einer der Prostatatumorentitäten induziert waren, gehören zur miR-17-Familie. Mehrere Studien konnten zeigen, dass die miRNAs miR-17, -20a, -93, -106a

und -106b das Tumorsuppressor-Protein ZBTB4, welches im Prostatakarzinom reprimiert ist, regulieren (Kim et al., 2012a; Kim et al., 2012b). Durch die in dieser Sequenzierung bestätigte Überexpression dieser onkogenen miRNAs könnte es daher über die sogenannte „miR-17-92/ZBTB4-Achse“ zu einer Steigerung der Zellproliferation und -invasion kommen, was zur Karzinogenese beiträgt. Darüber hinaus fanden Hudson und Kollegen heraus, dass CASP7 ein Zielgen der miR-106b ist und in primären aber auch in metastasierenden Prostatatumoren herunterreguliert ist (Hudson et al., 2012). In der hier vorgestellten Sequenzierung war die miR-106b die am zweit stärksten induzierte miRNA und in den pT3-Prostatatumoren mit und ohne Lymphknotenmetastasen doppelt so stark exprimiert wie in der pT2-Entität. Auf diese Weise könnte die Überexpression der miR-106b über die Inhibierung der Apoptose durch Repression von CASP7 zur Prostatatumorprogression führen.

Die induzierte miR148a zeigt die drittgrößte Expressionsänderung in dieser Sequenzierung, was durch die Analyse von Szczyrba et al. bestätigt wird. Die hier gezeigte Überexpression der miR-148a könnte über die Repression ihrer Zielgene CAND1 und PIK3IP1, was zur Induktion der Zellproliferation führt, die Prostatakarzinogenese mit beeinflussen (Jalava et al., 2012; Murata et al., 2010).

Wie auch schon in der Sequenzierung von Szczyrba et al. konnte gezeigt werden, dass die miR-200c im Prostatakarzinom überexprimiert wird. Darüber hinaus waren alle miRNAs des miR-200b-Clusters bzw. des miR-200c-Clusters, wozu die miRNAs miR-200b, -200a, und -429 bzw. miR-200c und -141 zählen, im Vergleich zum Normalgewebe überexprimiert. Dieses Ergebnis steht allerdings im Widerspruch zu zahlreichen Veröffentlichungen, die zeigen konnten, dass die miR-200-Familie die epitheliale-mesenchymale Transition, über die Regulation von ZEB1 und ZEB2 kontrolliert (Ahmad et al., 2011; Kong et al., 2009). Die Reprimierung der miR-200-Familie bewirkt eine Induktion von ZEB1 und ZEB2. Dadurch kommt es zu einem Verlust von epithelialen Markern wie E-cadherin, CRB3, EpCAM und F11R, was zu einer erhöhten Zellmigration und -invasion führt (Kong et al., 2009). Dagegen konnten Yu und Kollegen zeigen, dass die Überexpression von miR-200c zu einer verstärkten Zellproliferation führt (Yu et al., 2010). Dies wurde durch eine Studie von Szczyrba et al. bestätigt, die SEC23A als Zielgen der im Prostatakrebs induzierten miRNAs miR-200c und -375 identifizierte, da eine Reduktion der SEC23A Proteinmenge eine Erhöhung der Zellproliferation und -migration auslöst (Szczyrba

et al., 2011). Eine mögliche Erklärung für die Überexpression der miR-200-Familie im Prostatakarzinom bietet eine erst kürzlich erschienene Publikation von Paterson et al. über kolorektale Karzinome. Paterson et al. waren in der Lage zu zeigen, dass die miR-200-Familie ausschließlich in der invasiven Front des kolorektalen Karzinoms reprimiert ist, wohingegen im Kern des Tumors eine Überexpression der miR-200-Familie zu finden war. Darüber hinaus wurde in Lymphknotenmetastasen des kolorektalen Karzinoms ein erneuter Anstieg der miR-200 beobachtet, was möglicherweise ein Anwachsen der metastasierten Tumorzellen durch eine mesenchymale-epitheliale Transition begünstigt (Paterson et al., 2013). Diese Hypothese wird durch eine zweite Publikation von van Kempen et al. gestützt, welche die Reprimierung der miRNAs miR-200a und -200c in der invasiven Front des kutanen Melanoms beschreibt (van Kempen et al., 2012).

Bei der Betrachtung des Histogramms, welches die Änderungen der miRNA-Expression in den drei Prostatatumorentitäten illustriert, erkennt man spezifische Expressionsmuster bestimmter microRNAs (Abb.14, S.87). Die microRNAs miR-375, -148b und -21 waren am stärksten überexprimiert in den pT3-Tumoren mit Lymphknotenmetastasen, wobei die Expression in der metastasierenden Entität doppelt so hoch wie in der eher niedermalignen pT2-Entität war. Die extrem verstärkte Expression der miRNAs miR-375, -148b und -21 in der metastasierenden pT3-Tumorentität könnte durch verstärkte Reprimierung der Zielgene SEC23A, DNMT1, PTEN, BTG2 und der damit verbundenen gesteigerten Zellproliferation, Zellmigration und Inhibierung der Apoptose zur Metastasierung führen (Coppola et al., 2013; Meng et al., 2007a; Szczyrba et al., 2011; Yaqinuddin et al., 2009). Darüber hinaus zeigen die miRNAs miR-200b, -25, -106a, -200c, -17, -93 ein bemerkenswertes Expressionsmuster. Diese miRNAs waren in der nicht metastasierenden pT3-Tumorentität etwa doppelt so stark induziert als in den beiden anderen Entitäten. Die verstärkte Reprimierung der Zielgene SEC23A, ZEB1, ZEB2, BTB4, CASP7 in den pT3-Tumoren ohne Lymphknotenmetastasen bewirkt eine verstärkte Zellproliferation und Inhibierung der Apoptose (Hudson et al., 2012; Kim et al., 2012a; Kong et al., 2009; Szczyrba et al., 2011). Eine verstärkte Herunterregulation von ZEB1 und ZEB2 durch miR-200 bedingt eigentlich eine Aufrechterhaltung des epithelialen Charakters der Tumorzellen und wirkt durch Verhinderung der epithelialen-mesenchymalen Transition der Metastasierung

entgegen. Zum jetzigen Zeitpunkt ist es aber noch völlig unklar, ob es nicht zu einer lokalen Reprimierung der miR-200 in der invasiven Front des Prostata Tumors kommt, was eine epitheliale-mesenchymale Transition in dieser Zone bewirken könnte, wie es schon für das kolorektale Karzinom gezeigt wurde (Paterson et al., 2013). Alternativ dazu könnte aber auch erst die Reduktion der oben genannten miRNAs in den bereits metastasierten pT3-Tumoren eine gesteigerte Invasivität des Prostatakarzinoms auslösen.

Da das Serum-PSA-Niveau und das Gleason-Grading keine verlässlichen Prognosen über die Progression individueller Tumore erlauben, ist es notwendig neue, hochgradig spezifische Biomarker zu identifizieren, die eine Einschätzung der Aggressivität eines Prostatakarzinoms ermöglichen und eine Unterscheidung zwischen hochmalignen und indolenten Formen des Prostatakarzinoms zulassen (Coppola et al., 2010; Selth et al., 2012). Eine Vielzahl neuster Studien betonen das Potential von im Blutserum bzw. -plasma zirkulierenden miRNAs als neue, nicht invasive Biomarker zur Diagnostik, Prognose und Therapiemonitoring von Prostatakarzinomen (Selth et al., 2012). Einige miRNAs sind sowohl im Prostata Tumor als auch im Blut erhöht, was dafür spricht, dass diese aus dem malignen Gewebe stammen. Im Hinblick auf diese Sequenzierung könnte sich ein Set von miRNAs, die mit der Metastasierung in Verbindung gebracht werden, wie zum Beispiel die miRNAs miR-375, -200c, -200b, -141, -21 und -106a zur Diagnose eines aggressiven Prostata Tumors eignen. Bekräftigt wird dies durch zahlreiche Studien die bereits erhöhte Spiegel von miR-375, -141, -200b und -21 in Blutserum bzw. -plasma von Prostatakarzinompatienten nachweisen konnten (Brase et al., 2011; Bryant et al., 2012; Mitchell et al., 2008; Selth et al., 2012; Yaman Agaoglu et al., 2011; Zhang et al., 2011). Bis zur klinischen Anwendung der zirkulierenden miRNAs als prognostische Biomarker müssen allerdings noch einige Probleme gelöst werden. Dazu zählen beispielsweise die Standardisierung der miRNA-Isolierung aus dem Blut, die Verwendung einer standardisierten Detektionsmethode und die Normalisierung der miRNA-Konzentrationen durch interne Referenzen.

7.1.2.4. In zunehmend malignen Prostatakarzinomen reprimierte miRNAs

In den drei zunehmend malignen Prostatatumorentitäten konnten elf reprimierte miRNAs nachgewiesen werden (Tab.21, S.86). Im Vergleich zu dem miRNA-Expressionsprofil niedermaligner Prostatatumore von Szczyrba wurden weniger reprimierte miRNAs gefunden. Davon konnten nur vier miRNAs übereinstimmend identifiziert werden. Dazu gehörten miRNA miR-143, -145, -320 und -424. Des Weiteren wurde zum Beispiel die von Szczyrba et al. als reprimierte miRNA miR-30e, in dieser Sequenzierung als überexprimiert identifiziert (Szczyrba et al., 2010). Eine mögliche Erklärung dafür könnte zum einen die Verwendung einer anderen Sequenzierungstechnik oder zum anderen die höheren Malignitätsgrade der hier sequenzierten Prostatatumore bieten.

Die am stärksten reprimierte miRNA war let-7e, wobei die größte Reduktion in der pT3-Prostatatumorentität mit Lymphknotenmetastasen detektiert wurde. MicroRNA let-7e ist eine Tumorsuppressor-microRNA, welche in einer Vielzahl von Krebsarten wie dem Medulloblastom oder dem Mamakarzinom herunterreguliert ist und die reduzierte Expression mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist (Boyerinas et al., 2010; Mitra et al., 2011; Wang et al., 2012). Zu den Zielgenen von let-7e gehören die Onkogene RAS, NF2, HMGA2 und c-MYC (Johnson et al., 2005; Lee and Dutta, 2007; Meng et al., 2007b; Sampson et al., 2007). Die Überexpression dieser Zielgene führt zur verstärkten Zellproliferation der Tumorzellen, was auch zur Prostatakarzinogenese beitragen könnte.

Die microRNA miR-205 zeigte die zweitstärkste Repression in der metastasierenden pT3-Prostatatumorentität. Dies wird bestätigt durch eine Studie von Hagman et al., die zeigen konnte, dass die Entstehung von Metastasen im Prostatakarzinom negativ mit der Expression der miR-205 korreliert ist und der Androgenrezeptor durch miR-205 reguliert wird (Hagman et al., 2013). Darüber hinaus konnten Tucci und Kollegen nachweisen, dass der Verlust der p63/miR-205-Achse eine Steigerung der Zellmigration und der Metastasierung von Prostatatumoren bewirkt (Tucci et al., 2012). Szczyrba et al. waren in der Lage hnRNP-K als Zielgen der miR-205 zu identifizieren (Szczyrba et al., 2013). Dies wird bekräftigt durch eine Studie von Barboro et al., die demonstriert, dass die Überexpression von hnRNP-K in Prostatatumoren zu einer schlechteren Prognose führt (Barboro et al., 2009).

Die Tumorsuppressor-microRNAs miR-145 und -143, welche in einem Cluster kodiert werden, waren reprimiert. Die Stärke der Repression war mit dem Malignitätsgrad der Prostata Tumoren negativ korreliert, d.h. je aggressiver die Tumoren waren, umso weniger miR-145 bzw. -143 wurde exprimiert. Die auch hier gezeigte Repression dieser miRNAs führt über gesteigerte Zellproliferation und Migration zur Prostata Tumorumprogression, -invasion und -metastasierung, da diese miRNAs wichtige Zielgene wie HEF1, MYO6, ERG, c-MYC und KRAS regulieren, (Guo et al., 2013; Hart et al., 2013; Sachdeva et al., 2009; Szczyrba et al., 2010; Xu et al., 2011).

Eine weitere miRNA, welche mit zunehmender Malignität der Prostata Tumoren verstärkt reprimiert wurde, repräsentiert die Tumorsuppressor-microRNA miR-424. Einhergehend mit der hier gefundenen Repression, ist die miR-424-Expression auch im Osteosarkom oder Cervixkarzinom reduziert (Long et al., 2013; Xu et al., 2013b). Die miR-424 reguliert FASN, welches seinerseits die Zellproliferation, -invasion und -migration kontrolliert (Long et al., 2013). Des Weiteren konnten Imig et al. zeigen, dass das onkogene c-MYC posttranskriptionell durch miR-424 reguliert wird (Imig et al., 2011).

Einige miRNAs zeigen ein ähnliches Expressionsmuster, wobei diese miRNAs sämtliche stark in den metastasierenden pT3-Prostata Tumoren am stärksten reprimiert und in den beiden anderen Entitäten entweder unverändert oder überexprimiert wurden (Abb.15, S.88). Dazu gehörten die miRNAs miR-320a, -100, sowie let-7b, let-7c, welche allesamt mit Metastasierung und Invasion in Verbindung gebracht werden, sowie im hochmalignen Prostata Tumoren reprimiert sind. zum Beispiel fungiert let-7c als Metastasensuppressor im colorektalen Karzinom durch Regulation von MMP11 und PBX3, während microRNA-320 den Prostata-Stammzellcharakter durch Regulation des WNT/ β -catenin-Signalwegs unterdrückt (Han et al., 2012; Nadiminty et al., 2012a; Nadiminty et al., 2012b). Durch Regulation vom mTOR kontrolliert die miR-100 die Zellmotilität und ist eng mit der Metastasierung des urothelialen Blasenkarzinoms verbunden (Xu et al., 2013a). Die Reduktion der tumorsuppressiven miRNA let-7b ist im Mamakarzinom mit der Lymphknotenmetastasierung assoziiert (Hu et al., 2013). Somit könnte die Reduktion der Expression dieser miRNAs in den pT3-Prostata Tumoren die Metastasierung der hochmalignen Prostatakarzinome vorantreiben.

Diese Ergebnisse werden durch eine Studie von Chen et al. untermauert, die eine Repression von let-7c und let-7e im Blutplasma von Prostatakarzinompatienten entdeckte (Chen et al., 2012). Zusätzlich konnten zwei weitere Arbeitsgruppen eine verminderte Menge an im Blut zirkulierender miR-145 nachweisen. Daher könnte zur Diagnose und Prognose hoch aggressiver Prostatatumoren ein Biomarkerset zirkulierender miRNAs eingesetzt werden, zu denen neben induzierten miRNAs auch reprimierte gehören, wie zum Beispiel die miRNAs miR-375, -200c, -200b, -141, -21, -106a, -145, let-7c und 7e (Heneghan et al., 2010; Shen et al., 2012).

7.1.3. Vergleich dieses miRNA-Expressionsprofils mit anderen publizierten miRNA-Expressionsprofilen des Prostatakarzinoms

Aktuell existieren zahlreiche Publikationen, welche das miRNA-Expressionsprofil des Prostatakarzinoms analysieren. Maugeri-Saccà et al. verglichen die Ergebnisse dieser Studien in einem Review, wobei sie alle miRNAs, die in mindestens drei Arbeiten konsistent dereguliert waren, in einer Tabelle zusammenfassten. Ein Ausschnitt dieser Tabelle, welcher die neun Publikationen mit den meisten Übereinstimmungen zeigt, ist in der Abbildung 49 dargestellt.

	Volinia et al ¹⁶	Ambros et al ¹⁷	Porkka et al ¹⁸	Ozen et al ¹⁹	Tong et al ²⁰	Schaefer et al ²¹	Szczyrba et al ²²	Martens-Uzunova et al ²³	Watahiki et al ²⁴
let-7b		Down	Down	Down					
miR-125b			Down	Down	Down	Down			
miR-143			Down		Down			Down	
miR-145		Down	Down		Down	Down	Down	Down	Down
miR-16	Up		Down	Down		Down		Down	Down
miR-182		Up				Up		Up	
miR-183						Up		Up	
miR-205		Down	Down		Down	Down			Down
miR-20a	Up				Up		Up		
miR-221		Down	Down		Down	Down	Down	Down	
miR-222			Down		Down	Down		Down	
miR-23b			Down		Down				
miR-25	Up	Up			Up		Up	Up	
miR-29	Up		Down	Down			Down		Down
miR-375						Up		Up	
miR-93	Up	Up						Up	
miR-96						Up		Up	

Abbildung 49: Gegenüberstellung mehrerer miRNA-Expressionsprofile des Prostatakarzinoms (Maugeri-Sacca et al., 2012)

Hier dargestellt ist ein Ausschnitt aus dem von Maugeri-Saccà und Kollegen publizierten Vergleich mehrerer miRNA-Expressionsprofile des Prostatakarzinoms, wobei alle in dieser Tabelle zusammengefassten miRNAs zumindest in drei Publikationen übereinstimmend dereguliert sein mussten. Watahiki et al. analysierten metastasierte Prostatatumoren versus primäre Prostatatumoren.

Beim Vergleich dieser miRNA-Expressionsprofile konnte festgestellt werden, dass die verschiedenen Arbeiten in ihren Ergebnissen variieren und daher eine beweiskräftige miRNA-Signatur des Prostatakarzinoms noch nicht erstellt werden konnte. Dies begründet sich in der Verschiedenheit der Studiendesigns, der unterschiedlichen Sensitivität und Spezifität der verwendeten Analysemethoden, der Heterogenität des Probenmaterials, den unklaren Einflüssen von bereits angewandten Patiententherapien auf das Probenmaterial und dem Vorhandensein von nicht epithelialen Zellen in den einzelnen Proben (Coppola et al., 2010). So werden zum Beispiel im Review verschiedenste Microarrays (Ambs et al., 2008; Lu et al., 2005; Ozen et al., 2008; Porkka et al., 2007; Tong et al., 2009; Volinia et al., 2006) mit verschiedenen Sequenzierungsmethoden (Martens-Uzunova et al., 2012; Schaefer et al., 2010b; Szczyrba et al., 2010) verglichen. Bisher konnten mehrere Publikationen nachweisen, dass Ergebnisse von Microarrays verschiedener Hersteller im Vergleich zueinander deutliche Abweichungen zeigten und oftmals schlecht miteinander verglichen werden konnten (Git et al., 2010; Pradervand et al., 2010). Ähnliches gilt für den Vergleich verschiedener Microarray-Ergebnissen mit Sequenzierungsergebnissen, wobei die Schwankungen hier weniger ins Gewicht fallen (Willenbrock et al., 2009). Darüber hinaus könnten lokale genetische Effekte Einfluss auf das miRNA-Expressionsprofil des Prostatakarzinoms besitzen. Nichtsdestotrotz konnten einige deregulierte microRNAs in dieser Arbeit übereinstimmend mit den verschiedenen miRNA-Expressionsprofilen identifiziert werden. Dazu gehörten die miRNAs miR-143, -145, -205, -20a, -25, -375, -93 und let-7b. Die größten Übereinstimmungen konnten mit den Profilen von Ambs et al., Tong et al., Szczyrba et al. und Martens-Uzunova et al. erzielt werden. Interessanterweise konnte eine Überexpression der miR-375 nur in dieser Arbeit und in den Profilen von Schaefer et al., Martens-Uzunova und Szczyrba et al. nachgewiesen werden, welche hauptsächlich durch Sequenzierungen erstellt wurden. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte in der unzureichenden Sensitivität der Sonden für miR-375 der verschiedenen Microarrays begründet sein. Eine generelle Repression der miR-145 im Prostatakarzinom konnte in dieser Arbeit und in sieben der neun durch Maugeri-Saccà verglichenen miRNA-Expressionsprofile nachgewiesen werden. Somit könnte die generelle Reduktion der miR-145-Expression ein erster Baustein einer allgemeingültigen miRNA-Signatur des Prostatakarzinoms sein.

7.2. Expressionsanalyse deregulierter miRNAs zur Validierung der Illumina-Sequenzierung

7.2.1. Validierung der Illumina-Sequenzierung durch Northern Blots

Zur Validierung der Ergebnisse der Illumina-Sequenzierung wurde die Expression von acht deregulierten miRNAs in den zur Sequenzierung eingesetzten Prostatagewebepools mittels spezifischer Sonden im Northern Blot mit Hilfe einer anschließenden Quantifizierung der Northern Blots analysiert. Dabei wurde die Expression der induzierten miRNAs, miR-375, miR-148a, miR-200b, miR-20a, miR-15a und der reprimierten miRNAs, let-7c, miR-145, miR-143 näher untersucht (Abb.16, S.89). Zum besseren Vergleich der Expressionsmuster der miRNAs in den einzelnen Entitäten mit den Expressionsmustern dieser miRNAs in der Sequenzierung erfolgte eine Quantifizierung der Northern Blots (Abb.17, S.90). Nach diesem Vergleich konnte gezeigt werden, dass die Expressionsmuster nahezu identisch waren, wobei die Expressionen der miRNAs miR-375, -200b, -145, -20a und let-7c in den Northern Blots exakt mit den Mustern der Sequenzierung übereinstimmten. Lediglich die Expressionsmuster der miRNAs miR-148a, -15a und -143 in den Northern Blots wiesen leichte Unterschiede zu denen der Sequenzierung auf. Dies könnte zum einem auf das „Stripping“ der Northern Blot-Membranen zurückgeführt werden, da aufgrund der begrenzten Menge der zur Validierung eingesetzten RNA-Pools die Membranen aufeinanderfolgend mit mehreren verschiedenen miRNA-Sonden inkubiert werden mussten. Zum anderen könnte die Verwendung unterschiedlicher Methoden zur miRNA-Detektion diese leichten Unterschiede verursacht haben. Die Detektion von miRNAs durch die Illumina-Sequenzierung ist eine artifizellere Methode, als der miR-Nachweis durch Northern blotting, da Manipulationen an der reifen miRNA vorgenommen werden müssen. Daher kam es auch zu einer Überrepräsentierung der miR-143 durch einen sogenannten Klonierungsbias in der Sequenzierung, weil diese miRNA aufgrund ihres 5'-Adapters während der cDNA-Synthese effizienter amplifiziert wurde. Ein weiteres Problem der Illumina-Sequenzierung ist das Ansynthetisieren eines 3'Poly(A)-Schwanzes an die reife miRNA, da bei der bioinformatischen Auswertung der Sequenzen eine gewisse Fehlertoleranz zugelassen werden muss, damit miRNAs mit einem Adenin am 3'-

Ende erkannt werden können. Da die Unterschiede zwischen den Expressionsmustern der miRNAs miR-148a, -15a und -143 in Sequenzierung und Northern Blot nichts an der eigentlichen Expressionstendenz verändern, sind diese Unterschiede durchaus vernachlässigbar. Daher konnten die miR-Expressionsmuster der miRNAs miR-375, miR-148a, miR-200b, miR-20a, miR-15a, miR-143, miR-145 und let-7c der Sequenzierung durch eine zweite unabhängige Methode, das Northern blotting, bestätigt werden.

7.2.2. Validierung der Illumina-Sequenzierung durch quantitative Real-Time-PCRs in einem unabhängigen Patientenkollektiv

Außerdem wurden die Ergebnisse dieser Sequenzierung zusätzlich in einem unabhängigen Patientenkollektiv durch Analyse der Expression, der schon zuvor im Northern Blot analysierten miRNAs miR-375, miR-148a, miR-200b, miR-20a, miR-15a, miR-143, miR-145 und let-7c mit Hilfe der quantitativen Real-Time-PCR, validiert (Abb.18, S.92). Dabei bestand das Patientenkollektiv aus 41 Prostata-tumorproben mit korrespondierenden Normalgeweben. Diese Validierung wurde von unserer Kooperationspartnerin Dr. rer. nat. Elke Nolte aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wullich (Uniklinikum Erlangen), durchgeführt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Dazu wurden die Prostata-tumoren dieses unabhängigen Patientenkollektivs anhand ihrer Charakteristika in Tumor-pools in pT2- und pT3-Tumore ohne Lymphknotenmetastasen, sowie in pT3-Tumore mit Lymphknotenmetastasen eingeteilt. Die Expressionsmuster der miRNAs miR-375 und miR-145 der Sequenzierung konnte mit Hilfe der qRT-PCR exakt bestätigt werden, wohingegen die Expressionmuster der miRNAs miR-148a, miR-200b, miR-20a, miR-15a, miR-143 und let-7c nur tendenzielle Übereinstimmungen zeigten. Dabei konnte demonstriert werden, dass die miRNAs miR-148a, miR-200b, miR-20a, miR-15a in der Zusammenfassung aller Prostata-tumoren überexprimiert wurden und die miRNAs let-7c, sowie miR-143 reprimiert waren. Eine mögliche Erklärung dieser Ergebnisse ist in den unterschiedlichen pathologischen Charakteristika und den höheren Fallzahlen des zur zweiten Validierung eingesetzten Patientenkollektivs begründet (Tab.3, S.36). Dieses Patientenkollektiv war laut TNM-Klassifikation viel heterogener als das

zur Sequenzierung eingesetzte Kollektiv, da beispielsweise auch pT4-Tumoren inkludiert waren. Darüber hinaus gab es Abweichungen im Gleason Score. Aber viel schwerwiegender war die geringe Anzahl der zur Sequenzierung sowie zur Validierung eingesetzten pT3-Prostatatumoren mit Lymphknotenmetastasen, da aufgrund des PSA-Screenings der Prostatakrebs bereits in frühen Stadien erkannt wird und daher nur selten pT3 (N1) Tumoren operativ entfernt werden müssen. Des Weiteren könnten auch Unterschiede im Tumorgehalt der einzelnen Gewebepreparationen die Ergebnisse verfälschen. Außerdem konnten Wu et al. nachweisen, dass die Analyse von miRNA-Expressionen durch unterschiedliche Methoden Ergebnisse produziert, die sich nur zum Teil decken (Wu et al., 2009). Trotzdem zeigt sich, dass die Expressionsmuster der miRNAs miR-375 und -145 sowohl in den Northern Blots und durch die qRT-PCRs reproduzierbar waren, was für eine Eignung dieser beiden miRNAs als Biomarker spricht.

7.3. Untersuchung deregulierter miRNAs in Prostatakarzinomzelllinien

Durch die Analyse der Expression der miRNAs miR-200c, -375, -143 und -145 konnten Szczyrba et al. die Eignung der Prostatakarzinomzelllinien DU145 und LNCaP für die *in vitro* Analyse deregulierter miRNAs demonstrieren (Szczyrba et al., 2010; Szczyrba et al., 2011). Da diese Ergebnisse mit dieser Sequenzierung übereinstimmten, wurde auf eine erneute Analyse der Expression dieser miRNAs in den Prostatakarzinomzelllinien verzichtet und stattdessen zusätzlich die Expression der miR-200b und -15a untersucht (Abb.19, S.93). Einhergehend mit den Ergebnissen dieser Sequenzierung konnte eine unterschiedlich starke Überexpression der miRNAs miR-200b und -15a in den PCa-Zelllinien DU145 bzw. LNCaP im Vergleich zu Prostatanormalfibroblasten im Northern Blot nachgewiesen werden. Dies könnte durch Unterschiede im Ursprung und genetischem Hintergrund dieser PCa-Zelllinien bedingt sein, wobei die DU145-Zellen aus einer Hirnmetastase eines 69-jährigen Kaukasiers und die LNCaP-Zellen aus einer supraklavikulären Lymphknotenmetastase eines 50-jährigen Kaukasiers stammen (Horoszewicz et al., 1980; Stone et al., 1978). Durch die Abstammung aus Metastasen unterscheiden sich diese Zelllinien per se vom primären Prostatatumor. Darüber hinaus ändert sich auch das Karyogramm der Zelllinien durch chromosomale Aberrationen, welche

durch häufiges Passagieren der Zellen auftreten. Da die miR-Expression dieser beiden Zelllinien eine Übereinstimmung mit den miR-Expressionsmustern dieser Sequenzierung zeigt, stellen sie ein gutes *in vitro* Modellsystem für funktionelle miRNA-Studien dar.

7.4. Identifizierung von Zielgenen differentiell exprimierter miRNAs in zunehmend malignen Prostatakarzinomen

Die Identifizierung von Zielgenen deregulierter miRNAs gestaltet sich bislang als schwieriges und zeitaufwändiges Unterfangen, da *in silico*-Vorhersagen von miRNA-Zielgenen mehrere Hundert Ziel-mRNAs für eine deregulierte miRNA liefern. Dabei ist ein Großteil der vorhergesagten Zielgene auf falsch-positive Vorhersagen zurückzuführen. Zur Erhöhung der Wahrscheinlichkeit einer richtigen Vorhersage wurden die potentiellen Zielgene einer deregulierten miRNA durch Abgleich der mRNA-Targetliste mit den Expressionsdaten des jeweiligen Zielgens in der Oncomine-Datenbank eingegrenzt (Barbato et al., 2009). Im Anschluss wurde der Einfluss der deregulierten miRNAs auf ihre potentiellen Zielgene in Luciferase-Assays analysiert. Dabei waren ADIPOR2, NLK, MOB1A, PHLPP1, PHLPP2, SEC23A, SH3GLB1 als Zielgene induzierter und PLAU, sowie SEC62 als Zielgene reprimierter miRNAs vorhergesagt.

7.4.1. Potentielle Zielgene differentiell exprimierter miRNAs in zunehmend malignen Prostatakarzinomen

Obwohl die ADIPOR2 als Zielgen für die induzierten miRNAs miR-200b, -200c und -375 vorhergesagt wurde, hatte die ektopische Expression dieser miRNAs zusammen mit dem ADIPOR2-Reporterplasmid keinen reprimierenden bzw. einen induzierenden Effekt (Abb.22, S.99). Auch die Expression der miRNAs miR-25, -148a und -375 führte zu keiner Reduktion der Luciferase-Aktivität des NLK-Reporters (Abb.24, S.100), ebenso wie die Expression von miR-375 keinen reprimierenden Effekt auf den MOB1A-Reporter zeigte (Abb.26, S.101). Des Weiteren konnte auch PLAU nicht als Zielgen der miR-143 bestätigt werden, sowie SEC62 kein Zielgen der miR-145 ist

(Abb.28 & 30, S.103/104). Außerdem führte auch die ektopische Expression der miR-375 nicht zu einer Reduktion der Luciferase-Aktivität des SH3GLB1-Reporterplasmids (Abb.32, S.105). Diese Luciferase-Assays konnten zeigen, dass trotz Abgleich der Zielgenlisten deregulierter miRNAs mit den entsprechenden Expressionsdaten der Zielgene in der Oncomine-Datenbank ein Großteil der vorhergesagten Zielgene auf falsch-positive Vorhersagen zurückzuführen waren. Die Fehlexpression dieser Zielgene im Prostatakarzinom muss nicht zwangsläufig von der Deregulation einer miRNA bedingt sein. Es besteht zum einem die Möglichkeit, dass diese Zielgene durch kooperative Effekte mehrerer miRNAs reguliert werden (Rajewsky, 2006). Zum anderen können chromosomale Aberrationen, wie Deletionen, Translokation und Duplikationen oder Transaktivierung oder Repression des Zielgenpromotors durch Onkogene die Deregulation des potentiellen Zielgens bewirken (Tomlins et al., 2005).

7.4.2. Posttranskriptionelle Regulation von SEC23A durch miR-200b

SEC23A konnte bereits durch Szczyrba et al. als Zielgen der miRNAs miR-200c und -375 identifiziert werden (Szczyrba et al., 2011). Laut Target-Scan-Vorhersage sollte die SEC23A-3'UTR außerdem durch miR-200b reguliert werden, welche die identische Seed-Sequenz der miR-200c besitzt, aber auf einem anderen Chromosom kodiert wird. In der Sequenzierung von Szczyrba et al. war die Expression der miR-200b unverändert und deshalb wurde ein möglicher Einfluss dieser miRNA auf die SEC23A-3'UTR erst gar nicht untersucht (Szczyrba et al., 2011). Wohingegen in dieser Sequenzierung die Überexpression der miRNAs miR-200b, -200c und -375 nachgewiesen werden konnte. Darüber hinaus zeigten die miRNAs miR-200b und -200c sogar ein identisches Expressionsmuster in allen drei Prostatatumorentitäten auf. Daher wurde zunächst der Einfluss der ektopischen Expression von miR-200b auf die SEC23A-3'UTR mit Hilfe von Luciferase-Assays untersucht. Die Überexpression der miR-200b bewirkte eine Reduktion der Luciferase-Aktivität des SEC23A-Reportervektors um 33% (Abb.33, S.106). Durch die Mutagenese der für miR-200b vorhergesagten Bindestellen in der SEC23A-3'UTR und anschließenden Luciferase-Assays mit den mutierten Reporterkonstrukten konnte die zweite für miR-

200b vorhergesagte Bindestelle in der SEC23A-3'UTR als funktionell identifiziert werden (Abb.35, S.108). Zur Verifizierung der posttranskriptionellen Regulation von SEC23A durch miR-200b auf Proteinebene wurden die PCa-Zelllinien LNCaP und DU145 entweder mit pSG5-Leervektor oder mit miR-200b-Expressionsplasmid transfiziert. Dabei führte die ektopische Expression von miR-200b in den LNCaP und DU145 Zellen zu einer Abnahme der SEC23A-Proteinmenge auf 62% (Abb.36, S.109). Dadurch konnte SEC23A auch auf Proteinniveau als Zielgen der miR-200b bestätigt werden. Abschließend wurde die SEC23A-mRNA- sowie die miR-200b-Expression in den zunehmend malignen Prostatatumoren (pT2 (N0), pT3 (N0), N1) des unabhängigen Patientenkollektivs analysiert. Dabei zeigte sich eine negative Korrelation zwischen der SEC23A-mRNA- und der miR-200b-Expression in allen drei Entitäten (Abb.37, S.110). Dies untermauerte die posttranskriptionelle Regulation von SEC23A durch miR-200b. Zusätzlich könnte diese negative Korrelation einen Hinweis auf den Mechanismus der Regulation liefern, wobei die Bindung der miR-200b an die SEC23A-3'UTR nicht zu einer Translationsinhibition, sondern zum Abbau der SEC23A-mRNA, führt.

Mehrere Studien konnten zeigen, dass SEC23A als eine Komponente der COPII-Vesikel an der Entstehung dieser Vesikel an der endoplasmatischen Membran beteiligt ist und dabei eine Art Sortierung der Cargo-Proteine bei der Vesikelbildung mit beeinflusst (Aridor et al., 1998; Fromme et al., 2008; Paccaud et al., 1996; Townley et al., 2008). Durch eine Reduktion von SEC23A könnte es zu einer Verminderung der COPII-Vesikelbildung und damit zu einer Abnahme des Proteintransports von ER zum Golgi-Apparat kommen. Eine Studie von Cho et al. konnte nachweisen, dass MHC I-Moleküle SEC23/SEC24-abhängig von COP II-Vesikeln zum Golgi-Apparat gebracht werden und so zur Zelloberfläche gelangen (Cho et al., 2011). Dabei könnte eine Reduktion der SEC23A-Proteinmenge zu einer Abnahme der MHC I-Komplexe auf der Zelloberfläche führen. Damit könnte es den cytotoxischen T-Zellen des Immunsystems erschwert werden eine entartete Prostatatumorzelle zu erkennen und zu eliminieren. Diese Hypothese wird unterstützt durch eine Publikation von Seliger et al., die eine verminderte MHC I-Expression im Prostatakarzinom nachweisen konnten (Seliger et al., 2010). Im Jahr 2011 waren Szczyrba et al. bereits in der Lage SEC23A als Zielgen der miR-200c und -375 zu bestätigen. In dieser Publikation konnte durch Wundheilungsassays demonstriert

werden, dass eine Reduktion der SEC23A-Proteinmenge eine gesteigerte Zellproliferation und Zellmigration bewirkt (Szczyrba et al., 2011). Daher könnte die Inhibierung von SEC23A durch die Induktion der miR-200b im Prostatakarzinom in Kooperation mit den ebenfalls induzierten miRNAs miR-200c und -375 die Tumorprogression verstärkt vorantreiben. Des Weiteren konnten Jin und Kollegen zeigen, dass COPII-Vesikel Prokollagen transportieren und dass eine Funktionsstörung der COPII-Vesikel zu Störungen in der Kollagenablagerung führt (Jin et al., 2012). Da Kollagen ein Bestandteil der extrazellulären Matrix ist, könnte eine Reduktion der SEC23A-Proteinmenge eine Abnahme des COPII-vermittelten Prokollagentransports bewirken. Dies könnte möglicherweise Veränderungen in der extrazellulären Matrix auslösen, welche die Metastasierung des Prostata Tumors begünstigen könnten.

7.4.3. PHLPP1 als Zielgen der miR-375

Die PHLPP1-3'UTR sollte entsprechend der Target-Scan-Vorhersage eine mögliche Bindestelle für die im Prostatakarzinom induzierte miR-375 beinhalten. Der Effekt der ektoptischen Expression der miR-375 auf die PHLPP1-3'UTR wurde in anschließenden Luciferase-Assays analysiert. Dabei kam es durch die Expression der miR-375 zu einer Reduktion der Luciferase-Aktivität des PHLPP-Reporterkonstrukts auf 75%, was auf eine posttranskriptionelle Regulation von PHLPP1 durch miR-375 hindeutete (Abb.38, S.111). Bestätigt wurde dies durch Mutagenese der miR-375 Bindestelle in der PHLPP1-3'UTR und darauffolgenden Luciferase-Assays mit dem mutierten PHLPP1-Reportervektor (Abb.40, S.113). Im nächsten Schritt erfolgte die Verifizierung der Regulation von PHLPP1 durch miR-375 auf Proteinniveau durch Transfektion der PCa-Zelllinien LNCaP und DU145 entweder mit pSG5-Leervektor oder mit miR-375-Expressionsplasmid. Die ektoptische Expression der miR-375 in den LNCaP- bzw. DU145-Zellen, die zu einer Reduktion der PHLPP1-Proteinmenge auf 68 bzw. 69% führte, verifizierte PHLPP1 als Zielgen der miR-375 (Abb.41, S.114). Zum Abschluss erfolgte eine Analyse der PHLPP1-mRNA- und miR-375-Expression in einem unabhängigen Patientenkollektiv aus zunehmend malignen Prostata Tumoren (pT2 (N0), pT3 (N0), N1), wobei eine inverse Korrelation zwischen

der PHLPP1-mRNA- und miR-375-Expression nachgewiesen werden konnte (Abb.46, S.119). Diese Ergebnisse stützten die Bestätigung von PHLPP1 als Zielgen der miR-375 und weisen auf eine PHLPP1-mRNA-Degradierung als Regulationsmechanismus hin.

Bislang beschreiben zahlreiche Veröffentlichungen eine Reduktion von PHLPP1 in einer Vielzahl von Krebsarten, wie Brust-, Dickdarm-, Leber-, Bauchspeicheldrüsen-, Magen- und auch Prostatakrebs (Chen et al., 2011; Karnoub et al., 2007; Liu et al., 2009; Qiao et al., 2010). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass PTEN/PHLPP-Knock-out-Mäuse verstärkt Prostatakarzinome entwickeln und das PHLPP1 stark in hochmalignen Prostatatumoren reprimiert ist (Chen et al., 2011; Hellwinkel et al., 2008). Eine Studie von Taylor et al. fand eine Reduktion von PHLPP1 in 11% der primären Prostatatumoren und in 37% aller Metastasen (Taylor et al., 2010). Des Weiteren beschreibt eine erst kürzlich erschienene Publikation von Warfel et al., dass PHLPP1 in hochgradig metastasierenden Prostatatumoren entweder deletiert oder herunterreguliert ist (Warfel and Newton, 2012). Die Reduktion von PHLPP1 in metastasierenden Prostatakarzinomen bestätigt daher eine mögliche Repression von PHLPP1 durch eine starke Induktion der miR-375.

Das PHLPP1-Protein gehört zu einer Familie von Phosphatasen, welche AKT-Proteinkinasen und die ribosomale S6-Kinase negativ regulieren (Newton, 2003; O'Neill et al., 2013). PHLPP1 wird als Tumorsuppressor angesehen, da über die negative Regulation der Proteinkinasen AKT2/3, PKC sowie der ribosomalen S6-Kinase (S6K) die Zellproliferation inhibiert und über die Aktivierung des proapoptotischen MST1-Proteins die Apoptose gefördert werden kann (O'Neill et al., 2013; Qiao et al., 2010). Daher könnte die Reduktion des PHLPP1-Proteinniveaus durch die im metastasierenden Prostatakarzinom stark induzierte miR-375 eine verstärkte Aktivierung von AKT, PKC sowie S6K und eine geringere Aktivität des proapoptotischen MST1 bewirken. Dadurch würde dies zu einer verstärkten Proliferation, einem gesteigerten Wachstum und einem besseren Überleben der Prostata-tumorzelle führen, was wiederum zur Metastasierung beitragen könnte.

Des Weiteren ist PHLPP1 ebenfalls in der Lage den Ras-MAPK-Signalweg durch Repression der ERK1/ERK2-Aktivierung negativ zu regulieren (Shimizu et al., 2003). Eine Aktivierung des Ras-MAPK-Signalwegs durch Wachstumsfaktoren führt über eine Kinase-Kaskade zur Aktivierung von ERK1/ERK2, was eine Verstärkung des

Zellwachstums und der Zellproliferation zur Folge hat (Garnett and Marais, 2004). Darüber hinaus ist dieser Signalweg in mehr als 30% aller Krebsarten hyperaktiviert (Hoshino et al., 1999). Die durch die starke Induktion der miR-375 in der metastasierten pT3-Prostatatumorentität bedingte Reduktion der PHLPP1-Proteinmenge könnte in diesem Zusammenhang eine stärkere Aktivierung des Ras-MAPK-Signalwegs durch die Abnahme der PHLPP1-bedingten Repression von ERK1/ERK2 zu lassen. Die dadurch bedingte Induktion des Wachstums und der Proliferation der Tumorzelle könnte die Metastasierung beeinflussen.

Zusammenfassend könnte die miR-375 vermittelte Reduktion der PHLPP1-Proteinmenge durch eine verstärkte Aktivierung der krebsassoziierten PI3K/AKT- und Ras-MAPK-Signalwege und der damit einhergehenden gesteigerten Zellproliferation, verstärkten Zellwachstum sowie verminderten Apoptose zur Metastasierung des Prostatakarzinoms beitragen.

7.4.4. miR-15a reguliert posttranskriptionell die Expression von PHLPP2

Gemäß einer Target-Scan-Suche wurde für PHLPP2 eine potentielle Bindestelle der induzierten miR-15a vorhergesagt. Daher wurde der Einfluss der miR-15a-Überexpression auf die PHLPP2-3'UTR durch Luciferaseassays untersucht. Ein erster Hinweis auf die posttranskriptionelle Regulation von PHLPP2 durch miR-15a konnte durch die Koexpression des PHLPP2-Reporterplasmids mit der miR-15a erbracht werden, welche eine Abnahme der Luciferase-Aktivität des PHLPP2-Reporterplasmids auf 71% bewirkte (Abb.42, S.115). Durch Mutagenese der miR-15a-Bindestelle in der PHLPP2-3'UTR konnte in anschließenden Luciferase-Assays mit dem mutierten PHLPP2-Reportervektor die posttranskriptionelle Regulation von PHLPP2 durch miR-15a verifiziert werden (Abb.44, S.117). Durch die Überexpression der miR-15a in LNCaP- bzw. DU145-Zellen erfolgte eine Reduktion der PHLPP2-Proteinmenge auf 62% bzw. 53% (Abb.45, S.118). Damit konnte auch auf Proteinniveau bestätigt werden, dass PHLPP2 ein Zielgen der miR-15a ist. Zuletzt wurde die PHLPP2-mRNA- sowie die miR-15a-Expression in einer Patientenkohorte aus zunehmend malignen Prostatakarzinomen (pT2 (N0), pT3 (N0), N1) untersucht (Abb.46, S.119). Dabei untermauerte die Detektion einer negativen

Korrelation zwischen der PHLPP2-mRNA und der miR-15a-Expression in allen drei Tumorentitäten die posttranskriptionelle Regulation von PHLPP2 durch Bindung der miR-15a an die 3'UTR und deutet auf einen anschließenden Abbau der PHLPP2-mRNA hin.

Die Phosphatasen PHLPP2 und PHLPP1 zeigen einen nahezu identischen Aufbau und beinhalten deshalb auch hochkonservierte regulatorische Domänen (O'Neill et al., 2013). Daher besitzen sie auch die gleichen biologischen Funktionen und sind in den gleichen Zellkompartimenten, im Cytosol und Zellkern, lokalisiert (Brognard and Newton, 2008). Auch die Reduktion der PHLPP2-Expression wurde in zahlreichen Krebsarten, wie Dickdarm-, Speiseröhren und Prostatakrebs nachgewiesen (Chen et al., 2011; Hao et al., 2006; Sabates-Bellver et al., 2007). Chen und Kollegen konnten zeigen, dass die PHLPP2-Expression in 45% aller Prostatatumoren reprimiert war (Chen et al., 2011). Zur dieser Repression der PHLPP2-Expression könnte die posttranskriptionelle Regulation von PHLPP2 durch miR-15a beitragen.

Ebenso wie PHLPP1 gehört PHLPP2 auch zu einer Familie von Phosphatasen, welche AKT-Proteinkinasen durch Phosphorylierung inaktivieren, wobei preferentiell AKT1 und AKT3 phosphoryliert werden. PHLPP2 wird daher auch als Tumorsuppressor angesehen (Brognard et al., 2007; Gao et al., 2005). Darüber hinaus ist auch PHLPP2 in der Lage PKC und S6K negativ zu regulieren und proapoptotisches MST1 zu aktivieren (Gao et al., 2008; Jang et al., 2007; Liu et al., 2011). Deshalb könnte die Reduktion von PHLPP2 durch miR-15a in Kooperation mit der Reduktion von PHLPP1 durch miR-375 zu einer noch stärkeren Induktion der Proliferation und des Wachstums sowie zu einer gesteigerten Inhibition der Apoptose der Tumorzelle führen. Da die MST1-Inhibition von einer Phosphorylierung, welche durch AKT katalysiert wird, abhängig ist, bedeutet eine größere Menge aktives AKT und eine geringere Menge an PHLPPs eine noch effizientere Blockade der Apoptose der Tumorzelle (Jang et al., 2007). Auf diese Weise könnte die Reduktion der Proteinmengen von PHLPP1 und PHLPP2 durch die induzierten miRNAs miR-375 und -15a erheblich zur Prostatakarzinogenese und Metastasierung beitragen.

Darüber hinaus beschreibt eine Studie von Qiao et al., dass PHLPP1 und PHLPP2 offenbar auch die Zellmigration inhibieren, wobei die genauen Mechanismen noch unklar sind (Qiao et al., 2007; Qiao et al., 2010). Auf diese Weise könnte die miRNA-

375 bzw. -15a-vermittelte Reduktion von PHLPP1 und PHLPP2 auch durch eine gesteigerte Motilität der Tumorzellen zur Metastasierung führen.

Zusammengenommen könnte die Reduktion von PHLPP1 bzw. PHLPP2 durch die induzierten miRNAs miR-375 bzw. -15a über eine Induktion der Zellproliferation, des Zellwachstums sowie der Zellmigration und über die Inhibierung der Apoptose die Progression und Metastasierung des Prostatakarzinoms begünstigen. Deshalb wäre es möglich auch PHLPP1 und PHLPP2 als neue prognostische Biomarker eines aggressiven Prostatakarzinoms einzusetzen.

7.4.5. Auswirkungen der ektopischen Expression der miR-375 und -15a auf die Zellproliferation von Prostatakarzinomzelllinien

Um die Auswirkungen der Überexpression der miR-375 und -15a durch eine Reduktion der PHLPP1- und PHLPP2-Proteinmenge auf die Zellproliferation der PCa-Zelllinien LNCaP bzw. DU145 zu untersuchen, wurden diese Zelllinien zunächst entweder mit leerem pSG5-Kontrollvektor, miR-375-, miR-15a-Expressionsplasmid oder mit der Kombination beider miRNA-Expressionsvektoren transfiziert. Darauf wurde die Zellzahl der einzelnen Ansätze nach 24, 48 und 72 h durchflusszytometrisch bestimmt. Dabei zeigte sich, dass in beiden PCa-Zelllinien die Kotransfektion von miR-375 mit miR-15a die stärkste Induktion der Zellproliferation bewirkte. Wohingegen die Transfektion der einzelnen miRNAs einen nur leicht induzierenden Effekt auf die Zellproliferation hatte (Abb.47, S.121). Dadurch zeigte sich, dass beide miRNAs möglicherweise als Oncomirs durch Regulation von PHLPP1 und PHLPP2 kooperativ die Zellproliferation beeinflussen und auf diese Weise zur Tumorprogression und –metastasierung beitragen. Darüber hinaus bewirkt die Überexpression der miR-375 zusätzlich eine Repression von SEC23A, die ebenfalls eine Induktion der Zellproliferation und -migration bedingt (Szczyrba et al., 2011). Die Abbildung 50 demonstriert, inwiefern die Überexpression der miRNAs miR-375 und -15a Einfluss auf den PI3K/AKT-Signalweg haben könnte.

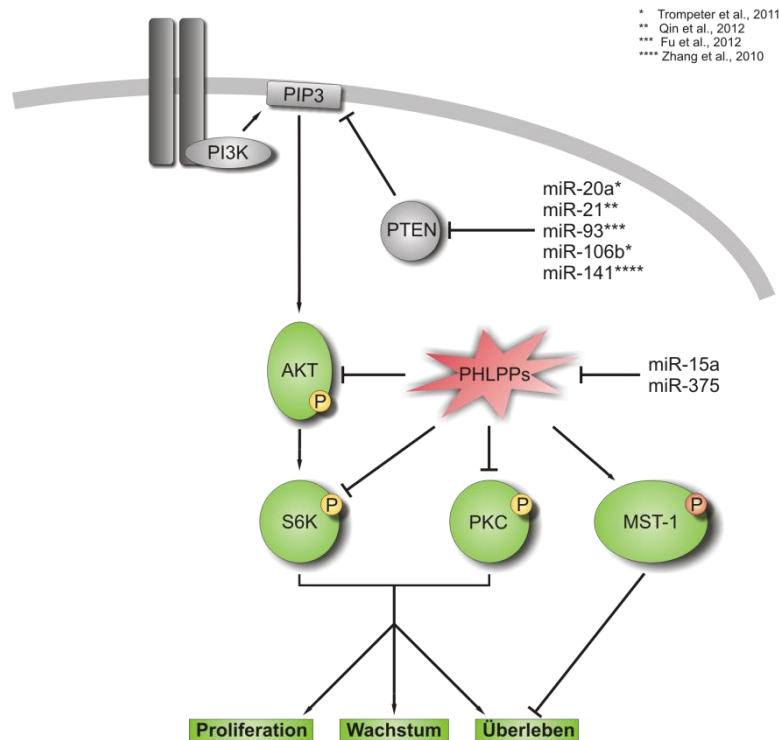


Abbildung 50: Auswirkungen der Überexpression der miRNAs miR-375 und miR-15a auf den PI3K/AKT-Signalweg

Die Induktion der miRNAs miR-375 bzw. miR-15a im Prostatakarzinom bedingte eine Abnahme der PHLPP1- bzw. der PHLPP2-Proteinmenge. Daher kommt es zu einer Zunahme der Menge an aktiven Formen von AKT, S6K und PKC, was wiederum zu einer Steigerung der Proliferation und des Wachstums sowie zu einem verbesserten Überleben der Tumorzelle führt. Darüber hinaus wurde PTEN als Zielgen der im Prostatakarzinom induzierten miRNAs miR-20a, -21, -93, -106b und -141 identifiziert, was ebenfalls eine Induktion der Zellproliferation und des Zellwachstums bewirkt (Fu et al., 2012; Qin et al., 2012; Trompeter et al., 2011; Zhang et al., 2010).

Die Überexpression der miRNAs miR-375 bzw. miR-15a führt zu einer Reduktion der PHLPP1 bzw. der PHLPP2-Proteinmenge. Dies wiederum bedingt eine Zunahme von onkogenem, aktivierten AKT, S6K sowie PKC und eine Abnahme von proapoptotischem MST1, was zu einer gesteigerten Proliferation, einem verstärktem Wachstum und besseren Überleben der Tumorzelle führt. Des Weiteren könnte die Reduktion der PHLPPs durch die im Prostatakarzinom induzierten miRNAs miR-375 bzw. miR-15a in Kooperation mit der Reduktion von PTEN durch die ebenfalls in dieser Sequenzierung induzierten miRNAs miR-20a, -21, -93, -106b und -141 die Prostatakarzinogenese beschleunigen (Fu et al., 2012; Qin et al., 2012; Trompeter et al., 2011; Zhang et al., 2010). Dies wird durch eine Publikation von Chen et al. unterstützt, die zeigt, dass PTEN/PHLPP-Knock-out-Mäuse verstärkt Prostata-tumoren entwickeln und dass niedrige PTEN/PHLPP-Niveau ein Wiederauftreten des

Prostatakarzinoms besser vorhersagen können, als die Klassifizierung nach Gleason (Chen et al., 2011). Darüber hinaus demonstrierten Martens-Uzunova und Kollegen, dass manche Prostatatumoren mit einem niedrigen Gleason Score von 6 dennoch einen aggressiven Krankheitsverlauf hatten, wohingegen Prostatatumoren mit einem hohen Gleason-Score von 8 mildere Krankheitsverläufe bedingten (Martens-Uzunova et al., 2012). Daher könnten zur Diagnose und Prognose von Prostatakarzinomen neben den zirkulierenden miRNAs wie miR-375, -200c, -200b, -141, -21, -106a und -145 auch PTEN, PHLPP1 und PHLPP2 als Biomarker eingesetzt werden.

7.4.6. Einfluss der Expression von miR-375 und -15a-Inhibitoren auf die Zellproliferation von Prostatakarzinomzelllinien

Um die Induktion der Zellproliferation in Prostatakarzinomzelllinien durch ektopische Expression der miRNAs miR-375 und -15a zu bestätigen, wurden miR-375 bzw. -15a Inhibitoren zur Repression der endogenen miR-375 und -15a in DU145 transfiziert. Dieses Experiment wurde nur in DU145-Zellen durchgeführt, da LNCaP-Zellen nur sehr wenig miR-375 exprimieren (Szczyrba et al., 2011). Damit konnten die Ergebnisse der Proliferationsassays bestätigt werden, da wie erwartet die Transfektion der Kombination beider miRNA-Inhibitoren die stärkste Reduktion der Zellproliferation nach 72 h hervorrief (Abb.48, S.122). Somit konnte gezeigt werden, dass die miRNAs miR-375 und -15a im Prostatakarzinom durch Induktion der Zellproliferation als Oncomirs wirken und das Einbringen von Inhibitoren dieser miRNAs in Tumorzellen einen möglichen Therapieansatz für die Behandlung des Prostatakarzinoms darstellen könnte.

8. Literaturverzeichnis

Ahmad, A., Aboukameel, A., Kong, D., Wang, Z., Sethi, S., Chen, W., Sarkar, F.H., Raz, A., 2011. Phosphoglucose isomerase/autocrine motility factor mediates epithelial-mesenchymal transition regulated by miR-200 in breast cancer cells. *Cancer research* 71, 3400-3409.

Aleman, L.M., Doench, J., Sharp, P.A., 2007. Comparison of siRNA-induced off-target RNA and protein effects. *RNA (New York, N.Y)* 13, 385-395.

Ambros, V., Bartel, B., Bartel, D.P., Burge, C.B., Carrington, J.C., Chen, X., Dreyfuss, G., Eddy, S.R., Griffiths-Jones, S., Marshall, M., Matzke, M., Ruvkun, G., Tuschl, T., 2003. A uniform system for microRNA annotation. *RNA (New York, N.Y)* 9, 277-279.

Ambs, S., Prueitt, R.L., Yi, M., Hudson, R.S., Howe, T.M., Petrocca, F., Wallace, T.A., Liu, C.G., Volinia, S., Calin, G.A., Yfantis, H.G., Stephens, R.M., Croce, C.M., 2008. Genomic profiling of microRNA and messenger RNA reveals deregulated microRNA expression in prostate cancer. *Cancer research* 68, 6162-6170.

Aravin, A.A., Lagos-Quintana, M., Yalcin, A., Zavolan, M., Marks, D., Snyder, B., Gaasterland, T., Meyer, J., Tuschl, T., 2003. The small RNA profile during *Drosophila melanogaster* development. *Developmental cell* 5, 337-350.

Aridor, M., Weissman, J., Bannykh, S., Nuoffer, C., Balch, W.E., 1998. Cargo selection by the COPII budding machinery during export from the ER. *The Journal of cell biology* 141, 61-70.

Armitage, T.G., Cooper, E.H., Newling, D.W., Robinson, M.R., Appleyard, I., 1988. The value of the measurement of serum prostate specific antigen in patients with benign prostatic hyperplasia and untreated prostate cancer. *British journal of urology* 62, 584-589.

Armstrong, B., Doll, R., 1975. Environmental factors and cancer incidence and mortality in different countries, with special reference to dietary practices. *International journal of cancer* 15, 617-631.

Asangani, I.A., Rasheed, S.A., Nikolova, D.A., Leupold, J.H., Colburn, N.H., Post, S., Allgayer, H., 2008. MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene* 27, 2128-2136.

Baccarini, A., Chauhan, H., Gardner, T.J., Jayaprakash, A.D., Sachidanandam, R., Brown, B.D., 2011. Kinetic analysis reveals the fate of a microRNA following target regulation in mammalian cells. *Current biology : CB* 21, 369-376.

Bail, S., Swerdel, M., Liu, H., Jiao, X., Goff, L.A., Hart, R.P., Kiledjian, M., 2010. Differential regulation of microRNA stability. *RNA (New York, N.Y)* 16, 1032-1039.

- Barbato, C., Arisi, I., Frizzo, M.E., Brandi, R., Da Sacco, L., Masotti, A., 2009. Computational challenges in miRNA target predictions: to be or not to be a true target? *Journal of biomedicine & biotechnology* 2009, 803069.
- Barboro, P., Repaci, E., Rubagotti, A., Salvi, S., Boccardo, S., Spina, B., Truini, M., Introini, C., Puppo, P., Ferrari, N., Carmignani, G., Boccardo, F., Balbi, C., 2009. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K: altered pattern of expression associated with diagnosis and prognosis of prostate cancer. *British journal of cancer* 100, 1608-1616.
- Baron, J.C., Peyret, C., Leroy, M., Teillac, P., Najean, Y., Le Duc, A., 1988. Prostate-specific antigen in prostatic cancer. *American journal of clinical oncology* 11 Suppl 2, S75-76.
- Bartel, D.P., 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281-297.
- Berezikov, E., Chung, W.J., Willis, J., Cuppen, E., Lai, E.C., 2007. Mammalian mirtron genes. *Molecular cell* 28, 328-336.
- Bhattacharyya, S.N., Habermacher, R., Martine, U., Closs, E.I., Filipowicz, W., 2006. Stress-induced reversal of microRNA repression and mRNA P-body localization in human cells. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 71, 513-521.
- Birnboim, H.C., Doly, J., 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research* 7, 1513-1523.
- Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Greene, P., Betlach, C. Heynecker, H.L., Boyer, H.W., Crosa, J.K.H. and Falkow, S., 1977. Construction and characterization of new cloning vesicles II. A multipurpose cloning system. *Gene* 2, 95-101.
- Boominathan, L., 2010. The tumor suppressors p53, p63, and p73 are regulators of microRNA processing complex. *PLoS one* 5, e10615.
- Borchert, G.M., Lanier, W., Davidson, B.L., 2006. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nature structural & molecular biology* 13, 1097-1101.
- Bostwick, D.G., Brawer, M.K., 1987. Prostatic intra-epithelial neoplasia and early invasion in prostate cancer. *Cancer* 59, 788-794.
- Bostwick, D.G., Burke, H.B., Djakiew, D., Euling, S., Ho, S.M., Landolph, J., Morrison, H., Sonawane, B., Shifflett, T., Waters, D.J., Timms, B., 2004. Human prostate cancer risk factors. *Cancer* 101, 2371-2490.
- Bostwick, D.G., Cheng, L., 2012. Precursors of prostate cancer. *Histopathology* 60, 4-27.
- Bothos, J., Tuttle, R.L., Ottey, M., Luca, F.C., Halazonetis, T.D., 2005. Human LATS1 is a mitotic exit network kinase. *Cancer research* 65, 6568-6575.
- Boyerinas, B., Park, S.M., Hau, A., Murmann, A.E., Peter, M.E., 2010. The role of let-7 in cell differentiation and cancer. *Endocrine-related cancer* 17, F19-36.

- Brase, J.C., Johannes, M., Schlomm, T., Falth, M., Haese, A., Steuber, T., Beissbarth, T., Kuner, R., Sultmann, H., 2011. Circulating miRNAs are correlated with tumor progression in prostate cancer. *International journal of cancer* 128, 608-616.
- Bray, F., Ren, J.S., Masuyer, E., Ferlay, J., 2013. Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *International journal of cancer* 132, 1133-1145.
- Brognard, J., Newton, A.C., 2008. PHLiPPing the switch on Akt and protein kinase C signaling. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 19, 223-230.
- Brognard, J., Sierecki, E., Gao, T., Newton, A.C., 2007. PHLPP and a second isoform, PHLPP2, differentially attenuate the amplitude of Akt signaling by regulating distinct Akt isoforms. *Molecular cell* 25, 917-931.
- Brooks, J.D., Bova, G.S., Isaacs, W.B., 1995. Allelic loss of the retinoblastoma gene in primary human prostatic adenocarcinomas. *The Prostate* 26, 35-39.
- Brott, B.K., Pinsky, B.A., Erikson, R.L., 1998. Nlk is a murine protein kinase related to Erk/MAP kinases and localized in the nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 963-968.
- Bryant, R.J., Pawlowski, T., Catto, J.W., Marsden, G., Vessella, R.L., Rhee, B., Kuslich, C., Visakorpi, T., Hamdy, F.C., 2012. Changes in circulating microRNA levels associated with prostate cancer. *British journal of cancer* 106, 768-774.
- Bubendorf, L., Kononen, J., Koivisto, P., Schraml, P., Moch, H., Gasser, T.C., Willi, N., Mihatsch, M.J., Sauter, G., Kallioniemi, O.P., 1999. Survey of gene amplifications during prostate cancer progression by high-throughout fluorescence in situ hybridization on tissue microarrays. *Cancer research* 59, 803-806.
- Budhu, A., Ji, J., Wang, X.W., 2010. The clinical potential of microRNAs. *Journal of hematology & oncology* 3, 37.
- Bushati, N., Cohen, S.M., 2008. MicroRNAs in neurodegeneration. *Current opinion in neurobiology* 18, 292-296.
- Buttayan, R., Sawczuk, I.S., Benson, M.C., Siegal, J.D., Olsson, C.A., 1987. Enhanced expression of the c-myc protooncogene in high-grade human prostate cancers. *The Prostate* 11, 327-337.
- Cai, X., Hagedorn, C.H., Cullen, B.R., 2004. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA (New York, N.Y)* 10, 1957-1966.
- Cai, X., Schafer, A., Lu, S., Bilello, J.P., Desrosiers, R.C., Edwards, R., Raab-Traub, N., Cullen, B.R., 2006. Epstein-Barr virus microRNAs are evolutionarily conserved and differentially expressed. *PLoS pathogens* 2, e23.
- Calin, G.A., Dumitru, C.D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K., Rassenti, L., Kipps, T., Negrini, M., Bullrich, F.,

- Croce, C.M., 2002. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 15524-15529.
- Calin, G.A., Ferracin, M., Cimmino, A., Di Leva, G., Shimizu, M., Wojcik, S.E., Iorio, M.V., Visone, R., Sever, N.I., Fabbri, M., Iuliano, R., Palumbo, T., Pichiorri, F., Roldo, C., Garzon, R., Sevignani, C., Rassenti, L., Alder, H., Volinia, S., Liu, C.G., Kipps, T.J., Negrini, M., Croce, C.M., 2005. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine* 353, 1793-1801.
- Calin, G.A., Sevignani, C., Dumitru, C.D., Hyslop, T., Noch, E., Yendamuri, S., Shimizu, M., Rattan, S., Bullrich, F., Negrini, M., Croce, C.M., 2004. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 2999-3004.
- Carter, B.S., Beaty, T.H., Steinberg, G.D., Childs, B., Walsh, P.C., 1992. Mendelian inheritance of familial prostate cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 3367-3371.
- Carter, B.S., Bova, G.S., Beaty, T.H., Steinberg, G.D., Childs, B., Isaacs, W.B., Walsh, P.C., 1993. Hereditary prostate cancer: epidemiologic and clinical features. *The Journal of urology* 150, 797-802.
- Carter, H.B., Piantadosi, S., Isaacs, J.T., 1990. Clinical evidence for and implications of the multistep development of prostate cancer. *The Journal of urology* 143, 742-746.
- Carthew, R.W., Sontheimer, E.J., 2009. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 136, 642-655.
- Chaconas, G., van de Sande, J.H., 1980. Labelling of RNA and DNA restriction fragments. *Enzymol.* 65, 75-85.
- Chen, H., Nandi, A.K., Li, X., Bieberich, C.J., 2002. NKX-3.1 interacts with prostate-derived Ets factor and regulates the activity of the PSA promoter. *Cancer research* 62, 338-340.
- Chen, M., Pratt, C.P., Zeeman, M.E., Schultz, N., Taylor, B.S., O'Neill, A., Castillo-Martin, M., Nowak, D.G., Naguib, A., Grace, D.M., Murn, J., Navin, N., Atwal, G.S., Sander, C., Gerald, W.L., Cordon-Cardo, C., Newton, A.C., Carver, B.S., Trotman, L.C., 2011. Identification of PHLPP1 as a tumor suppressor reveals the role of feedback activation in PTEN-mutant prostate cancer progression. *Cancer cell* 20, 173-186.
- Chen, Z., Greenwood, C., Isaacs, W.B., Foulkes, W.D., Sun, J., Zheng, S.L., Condreay, L.D., Xu, J., 2013. The G84E mutation of HOXB13 is associated with increased risk for prostate cancer: results from the REDUCE trial. *Carcinogenesis*.

- Chen, Z.H., Zhang, G.L., Li, H.R., Luo, J.D., Li, Z.X., Chen, G.M., Yang, J., 2012. A panel of five circulating microRNAs as potential biomarkers for prostate cancer. *The Prostate* 72, 1443-1452.
- Chendrimada, T.P., Finn, K.J., Ji, X., Baillat, D., Gregory, R.I., Liebhaber, S.A., Pasquinelli, A.E., Shiekhattar, R., 2007. MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. *Nature* 447, 823-828.
- Chiosea, S., Jelezcova, E., Chandran, U., Acquafondata, M., McHale, T., Sobol, R.W., Dhir, R., 2006. Up-regulation of dicer, a component of the MicroRNA machinery, in prostate adenocarcinoma. *The American journal of pathology* 169, 1812-1820.
- Cho, S., Ryoo, J., Jun, Y., Ahn, K., 2011. Receptor-mediated ER export of human MHC class I molecules is regulated by the C-terminal single amino acid. *Traffic* 12, 42-55.
- Chow, A., Hao, Y., Yang, X., 2010. Molecular characterization of human homologs of yeast MOB1. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 126, 2079-2089.
- Coppola, D., Helm, J., Ghayouri, M., Malafa, M.P., Wang, H.G., 2011. Down-regulation of Bax-interacting factor 1 in human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreas* 40, 433-437.
- Coppola, D., Khalil, F., Eschrich, S.A., Boulware, D., Yeatman, T., Wang, H.G., 2008a. Down-regulation of Bax-interacting factor-1 in colorectal adenocarcinoma. *Cancer* 113, 2665-2670.
- Coppola, D., Oliveri, C., Sayegh, Z., Boulware, D., Takahashi, Y., Pow-Sang, J., Djeu, J.Y., Wang, H.G., 2008b. Bax-interacting factor-1 expression in prostate cancer. *Clinical genitourinary cancer* 6, 117-121.
- Coppola, V., De Maria, R., Bonci, D., 2010. MicroRNAs and prostate cancer. *Endocrine-related cancer* 17, F1-17.
- Coppola, V., Musumeci, M., Patrizii, M., Cannistraci, A., Addario, A., Maugeri-Sacca, M., Biffoni, M., Francescangeli, F., Cordenonsi, M., Piccolo, S., Memeo, L., Pagliuca, A., Muto, G., Zeuner, A., De Maria, R., Bonci, D., 2013. BTG2 loss and miR-21 upregulation contribute to prostate cell transformation by inducing luminal markers expression and epithelial-mesenchymal transition. *Oncogene* 32, 1843-1853.
- Cordes, K.R., Srivastava, D., Ivey, K.N., 2010. MicroRNAs in cardiac development. *Pediatric cardiology* 31, 349-356.
- Crawford, E.D., 2009. Understanding the epidemiology, natural history, and key pathways involved in prostate cancer. *Urology* 73, S4-10.
- Cullen, B.R., 2006. Viruses and microRNAs. *Nature genetics* 38 Suppl, S25-30.
- Cullen, B.R., 2009. Viral and cellular messenger RNA targets of viral microRNAs. *Nature* 457, 421-425.

- Cullen, B.R., 2011. Viruses and microRNAs: RISCy interactions with serious consequences. *Genes & development* 25, 1881-1894.
- Cybulski, C., Gorski, B., Debniak, T., Gliniewicz, B., Mierzejewski, M., Masojc, B., Jakubowska, A., Matyjasik, J., Zlowocka, E., Sikorski, A., Narod, S.A., Lubinski, J., 2004. NBS1 is a prostate cancer susceptibility gene. *Cancer research* 64, 1215-1219.
- Das, S.K., Sokhi, U.K., Bhutia, S.K., Azab, B., Su, Z.Z., Sarkar, D., Fisher, P.B., 2010. Human polynucleotide phosphorylase selectively and preferentially degrades microRNA-221 in human melanoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 11948-11953.
- Di Leva, G., Croce, C.M., 2010. Roles of small RNAs in tumor formation. *Trends in molecular medicine* 16, 257-267.
- Djakiew, D., 2000. Dysregulated expression of growth factors and their receptors in the development of prostate cancer. *The Prostate* 42, 150-160.
- Dugaiczyk, A., Boyer, H.W., Goodman, H.M., 1975. Ligation of EcoRI endonuclease-generated DNA fragments into linear and circular structures. *Journal of molecular biology* 96, 171-184.
- Eickbush, D.G., Ye, J., Zhang, X., Burke, W.D., Eickbush, T.H., 2008. Epigenetic regulation of retrotransposons within the nucleolus of *Drosophila*. *Molecular and cellular biology* 28, 6452-6461.
- Emami, K.H., Brown, L.G., Pitts, T.E., Sun, X., Vessella, R.L., Corey, E., 2009. Nemo-like kinase induces apoptosis and inhibits androgen receptor signaling in prostate cancer cells. *The Prostate* 69, 1481-1492.
- Engels, B.M., Hutvagner, G., 2006. Principles and effects of microRNA-mediated post-transcriptional gene regulation. *Oncogene* 25, 6163-6169.
- Fabian, M.R., Sonenberg, N., Filipowicz, W., 2010. Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annual review of biochemistry* 79, 351-379.
- Ferlay, J., Shin, H.R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., Parkin, D.M., 2010. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International journal of cancer* 127, 2893-2917.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C., 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811.
- 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., Zaffaroni, N., 2010. miR-21: an oncomir on strike in prostate cancer. *Molecular cancer* 9, 12.
- Frauscher, F., Klauser, A., Berger, A.P., Halpern, E.J., Feuchtner, G., Koppelstaetter, F., Pallwein, L., Pinggera, G.M., Weirich, H., Horninger, W., Bartsch, G., zur Nedden,

- D., 2003. [The value of ultrasound (US) in the diagnosis of prostate cancer]. *Der Radiologe* 43, 455-463.
- Fromme, J.C., Orci, L., Schekman, R., 2008. Coordination of COPII vesicle trafficking by Sec23. *Trends in cell biology* 18, 330-336.
- Fu, X., Tian, J., Zhang, L., Chen, Y., Hao, Q., 2012. Involvement of microRNA-93, a new regulator of PTEN/Akt signaling pathway, in regulation of chemotherapeutic drug cisplatin chemosensitivity in ovarian cancer cells. *FEBS letters* 586, 1279-1286.
- Gantier, M.P., McCoy, C.E., Rusinova, I., Saulep, D., Wang, D., Xu, D., Irving, A.T., Behlke, M.A., Hertzog, P.J., Mackay, F., Williams, B.R., 2011. Analysis of microRNA turnover in mammalian cells following Dicer1 ablation. *Nucleic acids research* 39, 5692-5703.
- Gao, T., Brognard, J., Newton, A.C., 2008. The phosphatase PHLPP controls the cellular levels of protein kinase C. *The Journal of biological chemistry* 283, 6300-6311.
- Gao, T., Furnari, F., Newton, A.C., 2005. PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth. *Molecular cell* 18, 13-24.
- Gao, X., Porter, A.T., Grignon, D.J., Pontes, J.E., Honn, K.V., 1997. Diagnostic and prognostic markers for human prostate cancer. *The Prostate* 31, 264-281.
- Garnett, M.J., Marais, R., 2004. Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. *Cancer cell* 6, 313-319.
- Garzon, R., Fabbri, M., Cimmino, A., Calin, G.A., Croce, C.M., 2006. MicroRNA expression and function in cancer. *Trends in molecular medicine* 12, 580-587.
- Git, A., Dvinge, H., Salmon-Divon, M., Osborne, M., Kutter, C., Hadfield, J., Bertone, P., Caldas, C., 2010. Systematic comparison of microarray profiling, real-time PCR, and next-generation sequencing technologies for measuring differential microRNA expression. *RNA (New York, N.Y)* 16, 991-1006.
- Gleason, D.F., 1966. Classification of prostatic carcinomas. *Cancer chemotherapy reports. Part 1* 50, 125-128.
- Gleason, D.F., 1992. Histologic grading of prostate cancer: a perspective. *Human pathology* 23, 273-279.
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C., Nairn, R., 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *The Journal of general virology* 36, 59-74.
- Gregory, R.I., Chendrimada, T.P., Shiekhattar, R., 2006. MicroRNA biogenesis: isolation and characterization of the microprocessor complex. *Methods Mol Biol* 342, 33-47.

- Greiner, M., Kreutzer, B., Jung, V., Grobholz, R., Hasenfus, A., Stohr, R.F., Tornillo, L., Dudek, J., Stockle, M., Unteregger, G., Kamradt, J., Wullich, B., Zimmermann, R., 2011a. Silencing of the SEC62 gene inhibits migratory and invasive potential of various tumor cells. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 128, 2284-2295.
- Greiner, M., Kreutzer, B., Lang, S., Jung, V., Cavalie, A., Unteregger, G., Zimmermann, R., Wullich, B., 2011b. Sec62 protein level is crucial for the ER stress tolerance of prostate cancer. *The Prostate*.
- Griffiths-Jones, S., 2004. The microRNA Registry. *Nucleic acids research* 32, D109-111.
- Griffiths-Jones, S., Grocock, R.J., van Dongen, S., Bateman, A., Enright, A.J., 2006. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic acids research* 34, D140-144.
- Griffiths-Jones, S., Saini, H.K., van Dongen, S., Enright, A.J., 2008. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic acids research* 36, D154-158.
- Grishok, A., Pasquinelli, A.E., Conte, D., Li, N., Parrish, S., Ha, I., Baillie, D.L., Fire, A., Ruvkun, G., 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, 23-34.
- Guo, W., Ren, D., Chen, X., Tu, X., Huang, S., Wang, M., Song, L., Zou, X., Peng, X., 2013. HEF1 promotes epithelial mesenchymal transition and bone invasion in prostate cancer under the regulation of microRNA-145. *Journal of cellular biochemistry*.
- Hagman, Z., Hafliðadóttir, B.S., Ceder, J.A., Larne, O., Bjartell, A., Lilja, H., Edsjo, A., Ceder, Y., 2013. miR-205 negatively regulates the androgen receptor and is associated with adverse outcome of prostate cancer patients. *British journal of cancer*.
- Han, H.B., Gu, J., Zuo, H.J., Chen, Z.G., Zhao, W., Li, M., Ji, D.B., Lu, Y.Y., Zhang, Z.Q., 2012. Let-7c functions as a metastasis suppressor by targeting MMP11 and PBX3 in colorectal cancer. *The Journal of pathology* 226, 544-555.
- Han, J., Lee, Y., Yeom, K.H., Kim, Y.K., Jin, H., Kim, V.N., 2004. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes & development* 18, 3016-3027.
- Hanke, M., Hoefig, K., Merz, H., Feller, A.C., Kausch, I., Jocham, D., Warnecke, J.M., Sczakiel, G., 2009. A robust methodology to study urine microRNA as tumor marker: microRNA-126 and microRNA-182 are related to urinary bladder cancer. *Urologic oncology*.
- Hao, Y., Triadafilopoulos, G., Sahbaie, P., Young, H.S., Omary, M.B., Lowe, A.W., 2006. Gene expression profiling reveals stromal genes expressed in common between Barrett's esophagus and adenocarcinoma. *Gastroenterology* 131, 925-933.

- Harmer, M., Denoix, P., Hamperl, H., 1970. The TNM-system. Aktuelle Probleme in der Chirurgie 14, 25-36.
- Hart, A.H., Corrick, C.M., Tymms, M.J., Hertzog, P.J., Kola, I., 1995. Human ERG is a proto-oncogene with mitogenic and transforming activity. *Oncogene* 10, 1423-1430.
- Hart, M., 2010. Regulation des ERG-Proteins im Prostatakarzinom durch microRNAs. Diplomarbeit.
- Hart, M., Wach, S., Nolte, E., Szczyrba, J., Menon, R., Taubert, H., Hartmann, A., Stoehr, R., Wieland, W., Grasser, F.A., Wullich, B., 2013. The proto-oncogene ERG is a target of microRNA miR-145 in prostate cancer. *The FEBS journal*.
- Hellwinkel, O.J., Rogmann, J.P., Asong, L.E., Luebke, A.M., Eichelberg, C., Ahyai, S., Isbarn, H., Graefen, M., Huland, H., Schlomm, T., 2008. A comprehensive analysis of transcript signatures of the phosphatidylinositol-3 kinase/protein kinase B signal-transduction pathway in prostate cancer. *BJU international* 101, 1454-1460.
- Heneghan, H.M., Miller, N., Kelly, R., Newell, J., Kerin, M.J., 2010. Systemic miRNA-195 differentiates breast cancer from other malignancies and is a potential biomarker for detecting noninvasive and early stage disease. *The oncologist* 15, 673-682.
- Holst, L.M., Kaczkowski, B., Gniadecki, R., 2010. Reproducible pattern of microRNA in normal human skin. *Experimental dermatology* 19, e201-205.
- Horoszewicz, J.S., Leong, S.S., Chu, T.M., Wajzman, Z.L., Friedman, M., Papsidero, L., Kim, U., Chai, L.S., Kakati, S., Arya, S.K., Sandberg, A.A., 1980. The LNCaP cell line--a new model for studies on human prostatic carcinoma. *Progress in clinical and biological research* 37, 115-132.
- Horoszewicz, J.S., Leong, S.S., Kawinski, E., Karr, J.P., Rosenthal, H., Chu, T.M., Mirand, E.A., Murphy, G.P., 1983. LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer research* 43, 1809-1818.
- Hoshino, R., Chatani, Y., Yamori, T., Tsuruo, T., Oka, H., Yoshida, O., Shimada, Y., Ari-i, S., Wada, H., Fujimoto, J., Kohno, M., 1999. Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors. *Oncogene* 18, 813-822.
- Hu, X., Guo, J., Zheng, L., Li, C., Zheng, T.M., Tanyi, J.L., Liang, S., Benedetto, C., Mitidieri, M., Katsaros, D., Zhao, X., Zhang, Y., Huang, Q., Zhang, L., 2013. The Heterochronic microRNA let-7 Inhibits Cell Motility by Regulating the Genes in the Actin Cytoskeleton Pathway in Breast Cancer. *Mol Cancer Res* 11, 240-250.
- Hudson, R.S., Yi, M., Esposito, D., Glynn, S.A., Starks, A.M., Yang, Y., Schetter, A.J., Watkins, S.K., Hurwitz, A.A., Dorsey, T.H., Stephens, R.M., Croce, C.M., Ambis, S., 2012. MicroRNA-106b-25 cluster expression is associated with early disease recurrence and targets caspase-7 and focal adhesion in human prostate cancer. *Oncogene*.

- Hughes, C., Murphy, A., Martin, C., Sheils, O., O'Leary, J., 2005. Molecular pathology of prostate cancer. *Journal of clinical pathology* 58, 673-684.
- Hutvagner, G., McLachlan, J., Pasquinelli, A.E., Balint, E., Tuschl, T., Zamore, P.D., 2001. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science (New York, N.Y)* 293, 834-838.
- Ilijin, K., Wolf, M., Edgren, H., Gupta, S., Kilpinen, S., Skotheim, R.I., Peltola, M., Smit, F., Verhaegh, G., Schalken, J., Nees, M., Kallioniemi, O., 2006. TMPRSS2 fusions with oncogenic ETS factors in prostate cancer involve unbalanced genomic rearrangements and are associated with HDAC1 and epigenetic reprogramming. *Cancer research* 66, 10242-10246.
- Imig, J., Motsch, N., Zhu, J.Y., Barth, S., Okoniewski, M., Reineke, T., Tinguely, M., Faggioni, A., Trivedi, P., Meister, G., Renner, C., Grasser, F.A., 2011. microRNA profiling in Epstein-Barr virus-associated B-cell lymphoma. *Nucleic acids research* 39, 1880-1893.
- Iorio, M.V., Croce, C.M., 2012. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO molecular medicine* 4, 143-159.
- Isozaki, Y., Hoshino, I., Nohata, N., Kinoshita, T., Akutsu, Y., Hanari, N., Mori, M., Yoneyama, Y., Akanuma, N., Takeshita, N., Maruyama, T., Seki, N., Nishino, N., Yoshida, M., Matsubara, H., 2012. Identification of novel molecular targets regulated by tumor suppressive miR-375 induced by histone acetylation in esophageal squamous cell carcinoma. *International journal of oncology* 41, 985-994.
- Jalava, S.E., Urbanucci, A., Latonen, L., Waltering, K.K., Sahu, B., Janne, O.A., Seppala, J., Lahdesmaki, H., Tammela, T.L., Visakorpi, T., 2012. Androgen-regulated miR-32 targets BTG2 and is overexpressed in castration-resistant prostate cancer. *Oncogene* 31, 4460-4471.
- Jang, S.W., Yang, S.J., Srinivasan, S., Ye, K., 2007. Akt phosphorylates Mst1 and prevents its proteolytic activation, blocking FOXO3 phosphorylation and nuclear translocation. *The Journal of biological chemistry* 282, 30836-30844.
- Jin, L., Pahuja, K.B., Wickliffe, K.E., Gorur, A., Baumgartel, C., Schekman, R., Rape, M., 2012. Ubiquitin-dependent regulation of COPII coat size and function. *Nature* 482, 495-500.
- Johnson, S.M., Grosshans, H., Shingara, J., Byrom, M., Jarvis, R., Cheng, A., Labourier, E., Reinert, K.L., Brown, D., Slack, F.J., 2005. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* 120, 635-647.
- Jung, H.M., Patel, R.S., Phillips, B.L., Wang, H., Cohen, D.M., Reinhold, W.C., Chang, L.J., Yang, L.J., Chan, E.K., 2013. Tumor suppressor miR-375 regulates MYC expression via repression of CIP2A coding sequence through multiple miRNA-mRNA interaction. *Molecular biology of the cell*.

Jung, K., Brux, B., Knabich, A., Lein, M., Sinha, P., Schnorr, D., Loening, S.A., 1999. A gap between total prostate-specific antigen and the sum of free prostate-specific antigen plus alpha1-antichymotrypsin-prostate-specific antigen in patients with prostate carcinoma but not in those with benign prostate hyperplasia. *Clinical chemistry* 45, 422-424.

Karnoub, A.E., Dash, A.B., Vo, A.P., Sullivan, A., Brooks, M.W., Bell, G.W., Richardson, A.L., Polyak, K., Tubo, R., Weinberg, R.A., 2007. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* 449, 557-563.

Katoh, M., Igarashi, M., Fukuda, H., Nakagama, H., 2013. Cancer genetics and genomics of human FOX family genes. *Cancer letters* 328, 198-206.

Kazansky, A.V., Spencer, D.M., Greenberg, N.M., 2003. Activation of signal transducer and activator of transcription 5 is required for progression of autochthonous prostate cancer: evidence from the transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate system. *Cancer research* 63, 8757-8762.

Ketting, R.F., Fischer, S.E., Bernstein, E., Sijen, T., Hannon, G.J., Plasterk, R.H., 2001. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes & development* 15, 2654-2659.

Khvorova, A., Reynolds, A., Jayasena, S.D., 2003. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 115, 209-216.

Kim, K., Chadalapaka, G., Lee, S.O., Yamada, D., Sastre-Garau, X., Defossez, P.A., Park, Y.Y., Lee, J.S., Safe, S., 2012a. Identification of oncogenic microRNA-17-92/ZBTB4/specificity protein axis in breast cancer. *Oncogene* 31, 1034-1044.

Kim, K., Chadalapaka, G., Pathi, S.S., Jin, U.H., Lee, J.S., Park, Y.Y., Cho, S.G., Chintharlapalli, S., Safe, S., 2012b. Induction of the transcriptional repressor ZBTB4 in prostate cancer cells by drug-induced targeting of microRNA-17-92/106b-25 clusters. *Molecular cancer therapeutics* 11, 1852-1862.

Kong, D., Li, Y., Wang, Z., Banerjee, S., Ahmad, A., Kim, H.R., Sarkar, F.H., 2009. miR-200 regulates PDGF-D-mediated epithelial-mesenchymal transition, adhesion, and invasion of prostate cancer cells. *Stem Cells* 27, 1712-1721.

Korpai, M., Ell, B.J., Buffa, F.M., Ibrahim, T., Blanco, M.A., Celia-Terrassa, T., Mercatali, L., Khan, Z., Goodarzi, H., Hua, Y., Wei, Y., Hu, G., Garcia, B.A., Ragoussis, J., Amadori, D., Harris, A.L., Kang, Y., 2011. Direct targeting of Sec23a by miR-200s influences cancer cell secretome and promotes metastatic colonization. *Nature medicine* 17, 1101-1108.

Kozomara, A., Griffiths-Jones, S., 2011. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic acids research* 39, D152-157.

Kushner, S., 1978. An improved method for transformation of *Escherichia coli* with coli-derived plasmids. *Genetic Engineering*, ed. Boyer Nicosia, Amsterdam, Elsevier.

- Ladewig, E., Okamura, K., Flynt, A.S., Westholm, J.O., Lai, E.C., 2012. Discovery of hundreds of mirtrons in mouse and human small RNA data. *Genome research* 22, 1634-1645.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., Tuschl, T., 2001. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science (New York, N.Y)* 294, 853-858.
- Lai, E.C., Tomancak, P., Williams, R.W., Rubin, G.M., 2003. Computational identification of *Drosophila* microRNA genes. *Genome biology* 4, R42.
- 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., Tuschl, T., 2007. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell* 129, 1401-1414.
- 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., Pollack, J.R., 2004. Gene expression profiling identifies clinically relevant subtypes of prostate cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 811-816.
- Latronico, M.V., Condorelli, G., 2009. MicroRNAs and cardiac pathology. *Nature reviews. Cardiology* 6, 419-429.
- LaTulippe, E., Satagopan, J., Smith, A., Scher, H., Scardino, P., Reuter, V., Gerald, W.L., 2002. Comprehensive gene expression analysis of prostate cancer reveals distinct transcriptional programs associated with metastatic disease. *Cancer research* 62, 4499-4506.
- Lau, N.C., Lim, L.P., Weinstein, E.G., Bartel, D.P., 2001. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science (New York, N.Y)* 294, 858-862.
- Lederberg, E.M., Cohen, S.N., 1974. Transformation of *Salmonella typhimurium* by plasmid deoxyribonucleic acid. *J Bacteriol* 119, 1072-1074.
- Lee, R.C., Ambros, V., 2001. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science (New York, N.Y)* 294, 862-864.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L., Ambros, V., 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843-854.

- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.H., Lee, S., Baek, S.H., Kim, V.N., 2004. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO journal* 23, 4051-4060.
- Lee, Y.S., Dutta, A., 2007. The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene. *Genes & development* 21, 1025-1030.
- Lein, M., Jung, K., Brux, B., Knabich, A., Sinha, P., Schnorr, D., Loening, S.A., 1999. Re: Free and complexed prostate specific antigen in the differentiation of benign prostatic hyperplasia and prostate cancer: studies in serum and plasma samples. *The Journal of urology* 162, 502-503.
- Lew, E.A., Garfinkel, L., 1990. Mortality at ages 75 and older in the Cancer Prevention Study (CPS I). *CA: a cancer journal for clinicians* 40, 210-224.
- Lewis, B.P., Burge, C.B., Bartel, D.P., 2005. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120, 15-20.
- Li, Y., Cozzi, P.J., 2007. Targeting uPA/uPAR in prostate cancer. *Cancer treatment reviews* 33, 521-527.
- Lim, L.P., Glasner, M.E., Yekta, S., Burge, C.B., Bartel, D.P., 2003. Vertebrate microRNA genes. *Science (New York, N.Y)* 299, 1540.
- Lim, S., Metzger, E., Schule, R., Kirfel, J., Buettner, R., 2010. Epigenetic regulation of cancer growth by histone demethylases. *International journal of cancer* 127, 1991-1998.
- Liu, J., Stevens, P.D., Li, X., Schmidt, M.D., Gao, T., 2011. PHLPP-mediated dephosphorylation of S6K1 inhibits protein translation and cell growth. *Molecular and cellular biology* 31, 4917-4927.
- Liu, J., Valencia-Sanchez, M.A., Hannon, G.J., Parker, R., 2005. MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nature cell biology* 7, 719-723.
- Liu, J., Weiss, H.L., Rychahou, P., Jackson, L.N., Evers, B.M., Gao, T., 2009. Loss of PHLPP expression in colon cancer: role in proliferation and tumorigenesis. *Oncogene* 28, 994-1004.
- Liu, P., Ramachandran, S., Ali Seyed, M., Scharer, C.D., Laycock, N., Dalton, W.B., Williams, H., Karanam, S., Datta, M.W., Jaye, D.L., Moreno, C.S., 2006. Sex-determining region Y box 4 is a transforming oncogene in human prostate cancer cells. *Cancer research* 66, 4011-4019.
- Long, X.H., Mao, J.H., Peng, A.F., Zhou, Y., Huang, S.H., Liu, Z.L., 2013. Tumor suppressive microRNA-424 inhibits osteosarcoma cell migration and invasion via targeting fatty acid synthase. *Experimental and therapeutic medicine* 5, 1048-1052.

- Lopez-Beltran, A., Mikuz, G., Luque, R.J., Mazzucchelli, R., Montironi, R., 2006. Current practice of Gleason grading of prostate carcinoma. *Virchows Arch* 448, 111-118.
- 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., Golub, T.R., 2005. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435, 834-838.
- Lu, Z., Liu, M., Stribinskis, V., Klinge, C.M., Ramos, K.S., Colburn, N.H., Li, Y., 2008. MicroRNA-21 promotes cell transformation by targeting the programmed cell death 4 gene. *Oncogene* 27, 4373-4379.
- Lund, E., Guttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J.E., Kutay, U., 2004. Nuclear export of microRNA precursors. *Science (New York, N.Y)* 303, 95-98.
- Lytle, J.R., Yario, T.A., Steitz, J.A., 2007. Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 9667-9672.
- Maniatis, T., Sambrook J. and Fritsch E.F., 1989. *Molecular Cloning*, a laboratory manual 2nd ed. Cold Spring Harbor, Laboratory Press 1-3.
- Martens-Uzunova, E.S., Jalava, S.E., Dits, N.F., van Leenders, G.J., Moller, S., Trapman, J., Bangma, C.H., Litman, T., Visakorpi, T., Jenster, G., 2012. Diagnostic and prognostic signatures from the small non-coding RNA transcriptome in prostate cancer. *Oncogene* 31, 978-991.
- Mathonnet, G., Fabian, M.R., Svitkin, Y.V., Parsyan, A., Huck, L., Murata, T., Biffo, S., Merrick, W.C., Darzynkiewicz, E., Pillai, R.S., Filipowicz, W., Duchaine, T.F., Sonenberg, N., 2007. MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. *Science (New York, N.Y)* 317, 1764-1767.
- Maugeri-Sacca, M., Coppola, V., Bonci, D., De Maria, R., 2012. MicroRNAs and prostate cancer: from preclinical research to translational oncology. *Cancer J* 18, 253-261.
- McDonnell, T.J., Troncso, P., Brisbay, S.M., Logothetis, C., Chung, L.W., Hsieh, J.T., Tu, S.M., Campbell, M.L., 1992. Expression of the protooncogene bcl-2 in the prostate and its association with emergence of androgen-independent prostate cancer. *Cancer research* 52, 6940-6944.
- McNeal, J.E., 1988. Normal histology of the prostate. *The American journal of surgical pathology* 12, 619-633.
- Meister, G., 2007. miRNAs get an early start on translational silencing. *Cell* 131, 25-28.
- Meng, F., Henson, R., Wehbe-Janek, H., Ghoshal, K., Jacob, S.T., Patel, T., 2007a. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology* 133, 647-658.

- Meng, F., Henson, R., Wehbe-Janek, H., Smith, H., Ueno, Y., Patel, T., 2007b. The MicroRNA let-7a modulates interleukin-6-dependent STAT-3 survival signaling in malignant human cholangiocytes. *The Journal of biological chemistry* 282, 8256-8264.
- Mistry, T., Digby, J.E., Chen, J., Desai, K.M., Randeve, H.S., 2006. The regulation of adiponectin receptors in human prostate cancer cell lines. *Biochemical and biophysical research communications* 348, 832-838.
- Mitchell, P.S., Parkin, R.K., Kroh, E.M., Fritz, B.R., Wyman, S.K., Pogosova-Agadjanyan, E.L., Peterson, A., Noteboom, J., O'Briant, K.C., Allen, A., Lin, D.W., Urban, N., Drescher, C.W., Knudsen, B.S., Stirewalt, D.L., Gentleman, R., Vessella, R.L., Nelson, P.S., Martin, D.B., Tewari, M., 2008. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 10513-10518.
- Mitra, D., Das, P.M., Huynh, F.C., Jones, F.E., 2011. Jumonji/ARID1 B (JARID1B) protein promotes breast tumor cell cycle progression through epigenetic repression of microRNA let-7e. *The Journal of biological chemistry* 286, 40531-40535.
- Molina, J.R., Agarwal, N.K., Morales, F.C., Hayashi, Y., Aldape, K.D., Cote, G., Georgescu, M.M., 2012. PTEN, NHERF1 and PHLPP form a tumor suppressor network that is disabled in glioblastoma. *Oncogene* 31, 1264-1274.
- Moretti, F., Thermann, R., Hentze, M.W., 2010. Mechanism of translational regulation by miR-2 from sites in the 5' untranslated region or the open reading frame. *RNA (New York, N.Y)* 16, 2493-2502.
- Mourelatos, Z., Dostie, J., Paushkin, S., Sharma, A., Charroux, B., Abel, L., Rappsilber, J., Mann, M., Dreyfuss, G., 2002. miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes & development* 16, 720-728.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H., 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 51 Pt 1, 263-273.
- 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., Inoue, S., 2010. miR-148a is an androgen-responsive microRNA that promotes LNCaP prostate cell growth by repressing its target CAND1 expression. *Prostate cancer and prostatic diseases* 13, 356-361.
- Musiyenko, A., Bitko, V., Barik, S., 2008. Ectopic expression of miR-126*, an intronic product of the vascular endothelial EGF-like 7 gene, regulates protein translation and invasiveness of prostate cancer LNCaP cells. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 86, 313-322.
- Nadiminty, N., Tummala, R., Lou, W., Zhu, Y., Shi, X.B., Zou, J.X., Chen, H., Zhang, J., Chen, X., Luo, J., deVere White, R.W., Kung, H.J., Evans, C.P., Gao, A.C.,

- 2012a. MicroRNA let-7c is downregulated in prostate cancer and suppresses prostate cancer growth. *PloS one* 7, e32832.
- Nadiminty, N., Tummala, R., Lou, W., Zhu, Y., Zhang, J., Chen, X., eVere White, R.W., Kung, H.J., Evans, C.P., Gao, A.C., 2012b. MicroRNA let-7c suppresses androgen receptor expression and activity via regulation of Myc expression in prostate cancer cells. *The Journal of biological chemistry* 287, 1527-1537.
- Napoli, C., Lemieux, C., Jorgensen, R., 1990. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *The Plant cell* 2, 279-289.
- Narla, G., Heath, K.E., Reeves, H.L., Li, D., Giono, L.E., Kimmelman, A.C., Glucksman, M.J., Narla, J., Eng, F.J., Chan, A.M., Ferrari, A.C., Martignetti, J.A., Friedman, S.L., 2001. KLF6, a candidate tumor suppressor gene mutated in prostate cancer. *Science (New York, N.Y)* 294, 2563-2566.
- Nelson, W.G., De Marzo, A.M., Deweese, T.L., Lin, X., Brooks, J.D., Putzi, M.J., Nelson, C.P., Groopman, J.D., Kensler, T.W., 2001. Preneoplastic prostate lesions: an opportunity for prostate cancer prevention. *Annals of the New York Academy of Sciences* 952, 135-144.
- Neves, R., Scheel, C., Weinhold, S., Honisch, E., Iwaniuk, K.M., Trompeter, H.I., Niederacher, D., Wernet, P., Santourlidis, S., Uhrberg, M., 2010. Role of DNA methylation in miR-200c/141 cluster silencing in invasive breast cancer cells. *BMC research notes* 3, 219.
- Newman, M.A., Thomson, J.M., Hammond, S.M., 2008. Lin-28 interaction with the Let-7 precursor loop mediates regulated microRNA processing. *RNA (New York, N.Y)* 14, 1539-1549.
- Newton, A.C., 2003. Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm. *The Biochemical journal* 370, 361-371.
- Nguyen, H.C., Xie, W., Yang, M., Hsieh, C.L., Drouin, S., Lee, G.S., Kantoff, P.W., 2013. Expression differences of circulating microRNAs in metastatic castration resistant prostate cancer and low-risk, localized prostate cancer. *The Prostate* 73, 346-354.
- O'Neill, A.K., Niederst, M.J., Newton, A.C., 2013. Suppression of survival signalling pathways by the phosphatase PHLPP. *The FEBS journal* 280, 572-583.
- Okamura, K., Chung, W.J., Lai, E.C., 2008. The long and short of inverted repeat genes in animals: microRNAs, mirtrons and hairpin RNAs. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 7, 2840-2845.
- Ozen, M., Creighton, C.J., Ozdemir, M., Ittmann, M., 2008. Widespread deregulation of microRNA expression in human prostate cancer. *Oncogene* 27, 1788-1793.

- Paccaud, J.P., Reith, W., Carpentier, J.L., Ravazzola, M., Amherdt, M., Schekman, R., Orci, L., 1996. Cloning and functional characterization of mammalian homologues of the COPII component Sec23. *Molecular biology of the cell* 7, 1535-1546.
- Pall, G.S., Hamilton, A.J., 2008. Improved northern blot method for enhanced detection of small RNA. *Nature protocols* 3, 1077-1084.
- 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., Rubin, M.A., 2010. Antibody-based detection of ERG rearrangement-positive prostate cancer. *Neoplasia (New York, N.Y)* 12, 590-598.
- Paterson, E.L., Kazenwadel, J., Bert, A.G., Khew-Goodall, Y., Ruzskiewicz, A., Goodall, G.J., 2013. Down-regulation of the miRNA-200 family at the invasive front of colorectal cancers with degraded basement membrane indicates EMT is involved in cancer progression. *Neoplasia (New York, N.Y)* 15, 180-191.
- Perner, S., Mosquera, J.M., Demichelis, F., Hofer, M.D., Paris, P.L., Simko, J., Collins, C., Bismar, T.A., Chinnaiyan, A.M., De Marzo, A.M., Rubin, M.A., 2007. TMPRSS2-ERG fusion prostate cancer: an early molecular event associated with invasion. *The American journal of surgical pathology* 31, 882-888.
- Petersen, C.P., Bordeleau, M.E., Pelletier, J., Sharp, P.A., 2006. Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Molecular cell* 21, 533-542.
- Pfeffer, S., Sewer, A., Lagos-Quintana, M., Sheridan, R., Sander, C., Grasser, F.A., van Dyk, L.F., Ho, C.K., Shuman, S., Chien, M., Russo, J.J., Ju, J., Randall, G., Lindenbach, B.D., Rice, C.M., Simon, V., Ho, D.D., Zavolan, M., Tuschl, T., 2005. Identification of microRNAs of the herpesvirus family. *Nature methods* 2, 269-276.
- Pfeffer, S., Zavolan, M., Grasser, F.A., Chien, M., Russo, J.J., Ju, J., John, B., Enright, A.J., Marks, D., Sander, C., Tuschl, T., 2004. Identification of virus-encoded microRNAs. *Science (New York, N.Y)* 304, 734-736.
- Porkka, K.P., Pfeiffer, M.J., Waltering, K.K., Vessella, R.L., Tammela, T.L., Visakorpi, T., 2007. MicroRNA expression profiling in prostate cancer. *Cancer research* 67, 6130-6135.
- Pradervand, S., Weber, J., Lemoine, F., Consales, F., Paillusson, A., Dupasquier, M., Thomas, J., Richter, H., Kaessmann, H., Beaudoin, E., Hagenbuchle, O., Harshman, K., 2010. Concordance among digital gene expression, microarrays, and qPCR when measuring differential expression of microRNAs. *BioTechniques* 48, 219-222.
- Qiao, M., Iglehart, J.D., Pardee, A.B., 2007. Metastatic potential of 21T human breast cancer cells depends on Akt/protein kinase B activation. *Cancer research* 67, 5293-5299.

- Qiao, M., Wang, Y., Xu, X., Lu, J., Dong, Y., Tao, W., Stein, J., Stein, G.S., Iglehart, J.D., Shi, Q., Pardee, A.B., 2010. Mst1 is an interacting protein that mediates PHLPPs' induced apoptosis. *Molecular cell* 38, 512-523.
- Qin, W., Shi, Y., Zhao, B., Yao, C., Jin, L., Ma, J., Jin, Y., 2010. miR-24 regulates apoptosis by targeting the open reading frame (ORF) region of FAF1 in cancer cells. *PLoS one* 5, e9429.
- Qin, X., Yan, L., Zhao, X., Li, C., Fu, Y., 2012. microRNA-21 overexpression contributes to cell proliferation by targeting PTEN in endometrioid endometrial cancer. *Oncology letters* 4, 1290-1296.
- Rajewsky, N., 2006. L(ou)sy miRNA targets? *Nature structural & molecular biology* 13, 754-755.
- Rebbeck, T.R., Walker, A.H., Zeigler-Johnson, C., Weisburg, S., Martin, A.M., Nathanson, K.L., Wein, A.J., Malkowicz, S.B., 2000. Association of HPC2/ELAC2 genotypes and prostate cancer. *American journal of human genetics* 67, 1014-1019.
- Reinhart, B.J., Slack, F.J., Basson, M., Pasquinelli, A.E., Bettinger, J.C., Rougvie, A.E., Horvitz, H.R., Ruvkun, G., 2000. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403, 901-906.
- Rennert, H., Bercovich, D., Hubert, A., Abeliovich, D., Rozovsky, U., Bar-Shira, A., Solovioy, S., Schreiber, L., Matzkin, H., Rennert, G., Kadouri, L., Peretz, T., Yaron, Y., Orr-Urtreger, A., 2002. A novel founder mutation in the RNASEL gene, 471delAAAG, is associated with prostate cancer in Ashkenazi Jews. *American journal of human genetics* 71, 981-984.
- 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., Lupold, S.E., 2009. miR-21: an androgen receptor-regulated microRNA that promotes hormone-dependent and hormone-independent prostate cancer growth. *Cancer research* 69, 7165-7169.
- 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., Darnet, S., 2010. Ultra-deep sequencing reveals the microRNA expression pattern of the human stomach. *PLoS one* 5, e13205.
- Robert-Koch-Institut, 2012. Krebs in Deutschland 2007/2008. Zentrum für Krebsregisterdaten 8. Ausgabe.
- Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J.L., Bradley, A., 2004. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome research* 14, 1902-1910.
- Rubin, M.A., Chinnaiyan, A.M., 2006. Bioinformatics approach leads to the discovery of the TMPRSS2:ETS gene fusion in prostate cancer. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 86, 1099-1102.

- Ruegger, S., Grosshans, H., 2012. MicroRNA turnover: when, how, and why. *Trends in biochemical sciences* 37, 436-446.
- Ruvkun, G., 2001. Molecular biology. Glimpses of a tiny RNA world. *Science (New York, N.Y)* 294, 797-799.
- Sabates-Bellver, J., Van der Flier, L.G., de Palo, M., Cattaneo, E., Maake, C., Rehrauer, H., Laczko, E., Kurowski, M.A., Bujnicki, J.M., Menigatti, M., Luz, J., Ranalli, T.V., Gomes, V., Pastorelli, A., Faggiani, R., Anti, M., Jiricny, J., Clevers, H., Marra, G., 2007. Transcriptome profile of human colorectal adenomas. *Mol Cancer Res* 5, 1263-1275.
- Sachdeva, M., Zhu, S., Wu, F., Wu, H., Walia, V., Kumar, S., Elble, R., Watabe, K., Mo, Y.Y., 2009. p53 represses c-Myc through induction of the tumor suppressor miR-145. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 3207-3212.
- Sampson, V.B., Rong, N.H., Han, J., Yang, Q., Aris, V., Soteropoulos, P., Petrelli, N.J., Dunn, S.P., Krueger, L.J., 2007. MicroRNA let-7a down-regulates MYC and reverts MYC-induced growth in Burkitt lymphoma cells. *Cancer research* 67, 9762-9770.
- Scardino, P.T., 2000. The Gordon Wilson Lecture. Natural history and treatment of early stage prostate cancer. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association* 111, 201-241.
- Schaefer, A., Jung, M., Kristiansen, G., Lein, M., Schrader, M., Miller, K., Stephan, C., Jung, K., 2010a. MicroRNAs and cancer: current state and future perspectives in urologic oncology. *Urologic oncology* 28, 4-13.
- Schaefer, A., Jung, M., Mollenkopf, H.J., Wagner, I., Stephan, C., Jentzmik, F., Miller, K., Lein, M., Kristiansen, G., Jung, K., 2010b. Diagnostic and prognostic implications of microRNA profiling in prostate carcinoma. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 126, 1166-1176.
- Schiebler, K., 2007. Anatomie. Steinkopff.
- Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., Zamore, P.D., 2003. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115, 199-208.
- Seliger, B., Stoehr, R., Handke, D., Mueller, A., Ferrone, S., Wullich, B., Tannapfel, A., Hofstaedter, F., Hartmann, A., 2010. Association of HLA class I antigen abnormalities with disease progression and early recurrence in prostate cancer. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 59, 529-540.
- Selth, L.A., Townley, S., Gillis, J.L., Ochnik, A.M., Murti, K., Macfarlane, R.J., Chi, K.N., Marshall, V.R., Tilley, W.D., Butler, L.M., 2012. Discovery of circulating microRNAs associated with human prostate cancer using a mouse model of disease. *International journal of cancer* 131, 652-661.

- Sen, C.K., Gordillo, G.M., Khanna, S., Roy, S., 2009. Micromanaging vascular biology: tiny microRNAs play big band. *Journal of vascular research* 46, 527-540.
- Sgaramella, V., Van de Sande, J.H., Khorana, H.G., 1970. Studies on polynucleotides, C. A novel joining reaction catalyzed by the T4-polynucleotide ligase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 67, 1468-1475.
- Shein, H.M., Enders, J.F., Levinthal, J.D., 1962. Transformation induced by simian virus 40 in human renal cell cultures. II. Cell-virus relationships. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 48, 1350-1357.
- Shen, J., Hruby, G.W., McKiernan, J.M., Gurvich, I., Lipsky, M.J., Benson, M.C., Santella, R.M., 2012. Dysregulation of circulating microRNAs and prediction of aggressive prostate cancer. *The Prostate* 72, 1469-1477.
- Shi, X.B., Xue, L., Yang, J., Ma, A.H., Zhao, J., Xu, M., Tepper, C.G., Evans, C.P., Kung, H.J., deVere White, R.W., 2007. An androgen-regulated miRNA suppresses Bak1 expression and induces androgen-independent growth of prostate cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 19983-19988.
- Shimizu, K., Okada, M., Nagai, K., Fukada, Y., 2003. Suprachiasmatic nucleus circadian oscillatory protein, a novel binding partner of K-Ras in the membrane rafts, negatively regulates MAPK pathway. *The Journal of biological chemistry* 278, 14920-14925.
- Sibley, C.R., Seow, Y., Saayman, S., Dijkstra, K.K., El Andaloussi, S., Weinberg, M.S., Wood, M.J., 2012. The biogenesis and characterization of mammalian microRNAs of mirtron origin. *Nucleic acids research* 40, 438-448.
- Singh, D., Febbo, P.G., Ross, K., Jackson, D.G., Manola, J., Ladd, C., Tamayo, P., Renshaw, A.A., D'Amico, A.V., Richie, J.P., Lander, E.S., Loda, M., Kantoff, P.W., Golub, T.R., Sellers, W.R., 2002. Gene expression correlates of clinical prostate cancer behavior. *Cancer cell* 1, 203-209.
- Sobin, L.H.T.c.o.m.t.A.O.W.-B., 2009. TNM classification of malignant tumours. Wiley-Blackwell, Oxford.
- Song, G., Wang, L., 2008. MiR-433 and miR-127 arise from independent overlapping primary transcripts encoded by the miR-433-127 locus. *PloS one* 3, e3574.
- Steinberg, G.D., Carter, B.S., Beaty, T.H., Childs, B., Walsh, P.C., 1990. Family history and the risk of prostate cancer. *The Prostate* 17, 337-347.
- Stone, K.R., Mickey, D.D., Wunderli, H., Mickey, G.H., Paulson, D.F., 1978. Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). *International journal of cancer* 21, 274-281.

- Stott-Miller, M., Karyadi, D.M., Smith, T., Kwon, E.M., Kolb, S., Stanford, J.L., Ostrander, E.A., 2013. HOXB13 mutations in a population-based, case-control study of prostate cancer. *The Prostate* 73, 634-641.
- Subramanian, S., Steer, C.J., 2010. MicroRNAs as gatekeepers of apoptosis. *Journal of cellular physiology* 223, 289-298.
- Suh, S.O., Chen, Y., Zaman, M.S., Hirata, H., Yamamura, S., Shahryari, V., Liu, J., Tabatabai, Z.L., Kakar, S., Deng, G., Tanaka, Y., Dahiya, R., 2011. MicroRNA-145 is regulated by DNA methylation and p53 gene mutation in prostate cancer. *Carcinogenesis* 32, 772-778.
- Sullivan, C.S., Grundhoff, A.T., Tevethia, S., Pipas, J.M., Ganem, D., 2005. SV40-encoded microRNAs regulate viral gene expression and reduce susceptibility to cytotoxic T cells. *Nature* 435, 682-686.
- Sun, H., Lesche, R., Li, D.M., Liliental, J., Zhang, H., Gao, J., Gavrilova, N., Mueller, B., Liu, X., Wu, H., 1999. PTEN modulates cell cycle progression and cell survival by regulating phosphatidylinositol 3,4,5,-trisphosphate and Akt/protein kinase B signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 6199-6204.
- Sun, R., Fu, X., Li, Y., Xie, Y., Mao, Y., 2009. Global gene expression analysis reveals reduced abundance of putative microRNA targets in human prostate tumours. *BMC genomics* 10, 93.
- Suzuki, H.I., Yamagata, K., Sugimoto, K., Iwamoto, T., Kato, S., Miyazono, K., 2009. Modulation of microRNA processing by p53. *Nature* 460, 529-533.
- Szczyrba, J., Loprich, E., Wach, S., Jung, V., Unteregger, G., Barth, S., Grobholz, R., Wieland, W., Stohr, R., Hartmann, A., Wullich, B., Grasser, F., 2010. The microRNA profile of prostate carcinoma obtained by deep sequencing. *Molecular cancer research : MCR* 8, 529-538.
- Szczyrba, J., Nolte, E., Hart, M., Doll, C., Wach, S., Taubert, H., Keck, B., Kremmer, E., Stohr, R., Hartmann, A., Wieland, W., Wullich, B., Grasser, F.A., 2013. Identification of ZNF217, hnRNP-K, VEGF-A and IPO7 as targets for microRNAs that are downregulated in prostate carcinoma. *International journal of cancer* 132, 775-784.
- Szczyrba, J., Nolte, E., Wach, S., Kremmer, E., Stohr, R., Hartmann, A., Wieland, W., Wullich, B., Grasser, F.A., 2011. Downregulation of Sec23A protein by miRNA-375 in prostate carcinoma. *Molecular cancer research : MCR* 9, 791-800.
- Taylor, B.S., Schultz, N., Hieronymus, H., Gopalan, A., Xiao, Y., Carver, B.S., Arora, V.K., Kaushik, P., Cerami, E., Reva, B., Antipin, Y., Mitsiades, N., Landers, T., Dolgalev, I., Major, J.E., Wilson, M., Socci, N.D., Lash, A.E., Heguy, A., Eastham, J.A., Scher, H.I., Reuter, V.E., Scardino, P.T., Sander, C., Sawyers, C.L., Gerald, W.L., 2010. Integrative genomic profiling of human prostate cancer. *Cancer cell* 18, 11-22.

Thompson, I., Thrasher, J.B., Aus, G., Burnett, A.L., Canby-Hagino, E.D., Cookson, M.S., D'Amico, A.V., Dmochowski, R.R., Eton, D.T., Forman, J.D., Goldenberg, S.L., Hernandez, J., Higano, C.S., Kraus, S.R., Moul, J.W., Tangen, C.M., 2007. Guideline for the management of clinically localized prostate cancer: 2007 update. *The Journal of urology* 177, 2106-2131.

Thomson, J.M., Newman, M., Parker, J.S., Morin-Kensicki, E.M., Wright, T., Hammond, S.M., 2006. Extensive post-transcriptional regulation of microRNAs and its implications for cancer. *Genes & development* 20, 2202-2207.

Tomlins, S.A., Mehra, R., Rhodes, D.R., Smith, L.R., Roulston, D., Helgeson, B.E., Cao, X., Wei, J.T., Rubin, M.A., Shah, R.B., Chinnaiyan, A.M., 2006. TMPRSS2:ETV4 gene fusions define a third molecular subtype of prostate cancer. *Cancer research* 66, 3396-3400.

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., Chinnaiyan, A.M., 2005. Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science (New York, N.Y)* 310, 644-648.

Tong, A.W., Fulgham, P., Jay, C., Chen, P., Khalil, I., Liu, S., Senzer, N., Eklund, A.C., Han, J., Nemunaitis, J., 2009. MicroRNA profile analysis of human prostate cancers. *Cancer gene therapy* 16, 206-216.

Townley, A.K., Feng, Y., Schmidt, K., Carter, D.A., Porter, R., Verkade, P., Stephens, D.J., 2008. Efficient coupling of Sec23-Sec24 to Sec13-Sec31 drives COPII-dependent collagen secretion and is essential for normal craniofacial development. *Journal of cell science* 121, 3025-3034.

Trompeter, H.I., Abbad, H., Iwaniuk, K.M., Hafner, M., Renwick, N., Tuschl, T., Schira, J., Muller, H.W., Wernet, P., 2011. MicroRNAs MiR-17, MiR-20a, and MiR-106b act in concert to modulate E2F activity on cell cycle arrest during neuronal lineage differentiation of USSC. *PLoS one* 6, e16138.

Tsuchiya, N., Slezak, J.M., Lieber, M.M., Bergstralh, E.J., Jenkins, R.B., 2002. Clinical significance of alterations of chromosome 8 detected by fluorescence in situ hybridization analysis in pathologic organ-confined prostate cancer. *Genes, chromosomes & cancer* 34, 363-371.

Tucci, P., Agostini, M., Grespi, F., Markert, E.K., Terrinoni, A., Vousden, K.H., Muller, P.A., Dotsch, V., Kehrlöesser, S., Sayan, B.S., Giaccone, G., Lowe, S.W., Takahashi, N., Vandenabeele, P., Knight, R.A., Levine, A.J., Melino, G., 2012. Loss of p63 and its microRNA-205 target results in enhanced cell migration and metastasis in prostate cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 15312-15317.

van Kempen, L.C., van den Hurk, K., Lazar, V., Michiels, S., Winnepenninckx, V., Stas, M., Spatz, A., van den Oord, J.J., 2012. Loss of microRNA-200a and c, and microRNA-203 expression at the invasive front of primary cutaneous melanoma is

associated with increased thickness and disease progression. *Virchows Arch* 461, 441-448.

Vasudevan, S., Tong, Y., Steitz, J.A., 2007. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science (New York, N.Y)* 318, 1931-1934.

Vazquez, F., Sellers, W.R., 2000. The PTEN tumor suppressor protein: an antagonist of phosphoinositide 3-kinase signaling. *Biochimica et biophysica acta* 1470, M21-35.

Viswanathan, S.R., Daley, G.Q., Gregory, R.I., 2008. Selective blockade of microRNA processing by Lin28. *Science (New York, N.Y)* 320, 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., Croce, C.M., 2006. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 2257-2261.

Vrba, L., Jensen, T.J., Garbe, J.C., Heimark, R.L., Cress, A.E., Dickinson, S., Stampfer, M.R., Futscher, B.W., 2010. Role for DNA methylation in the regulation of miR-200c and miR-141 expression in normal and cancer cells. *PloS one* 5, e8697.

Wang, L., Tang, H., Thayanithy, V., Subramanian, S., Oberg, A.L., Cunningham, J.M., Cerhan, J.R., Steer, C.J., Thibodeau, S.N., 2009. Gene networks and microRNAs implicated in aggressive prostate cancer. *Cancer research* 69, 9490-9497.

Wang, Y., Hu, X., Greshock, J., Shen, L., Yang, X., Shao, Z., Liang, S., Tanyi, J.L., Sood, A.K., Zhang, L., 2012. Genomic DNA copy-number alterations of the let-7 family in human cancers. *PloS one* 7, e44399.

Warfel, N.A., El-Deiry, W.S., 2013. p21WAF1 and tumourigenesis: 20 years after. *Current opinion in oncology* 25, 52-58.

Warfel, N.A., Newton, A.C., 2012. Pleckstrin homology domain leucine-rich repeat protein phosphatase (PHLPP): a new player in cell signaling. *The Journal of biological chemistry* 287, 3610-3616.

Wiemer, E.A., 2007. The role of microRNAs in cancer: no small matter. *Eur J Cancer* 43, 1529-1544.

Wienholds, E., Plasterk, R.H., 2005. MicroRNA function in animal development. *FEBS letters* 579, 5911-5922.

Wightman, B., Ha, I., Ruvkun, G., 1993. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75, 855-862.

Willenbrock, H., Salomon, J., Sokilde, R., Barken, K.B., Hansen, T.N., Nielsen, F.C., Moller, S., Litman, T., 2009. Quantitative miRNA expression analysis: comparing microarrays with next-generation sequencing. *RNA (New York, N.Y)* 15, 2028-2034.

Wu, F., Zhu, S., Ding, Y., Beck, W.T., Mo, Y.Y., 2009. MicroRNA-mediated regulation of Ubc9 expression in cancer cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 15, 1550-1557.

Xu, B., Niu, X., Zhang, X., Tao, J., Wu, D., Wang, Z., Li, P., Zhang, W., Wu, H., Feng, N., Hua, L., Wang, X., 2011. miR-143 decreases prostate cancer cells proliferation and migration and enhances their sensitivity to docetaxel through suppression of KRAS. *Molecular and cellular biochemistry* 350, 207-213.

Xu, C., Zeng, Q., Xu, W., Jiao, L., Chen, Y., Zhang, Z., Wu, C., Jin, T., Pan, A., Wei, R., Yang, B., Sun, Y., 2013a. miRNA-100 inhibits human bladder urothelial carcinogenesis by directly targeting mTOR. *Molecular cancer therapeutics* 12, 207-219.

Xu, J., Li, Y., Wang, F., Wang, X., Cheng, B., Ye, F., Xie, X., Zhou, C., Lu, W., 2013b. Suppressed miR-424 expression via upregulation of target gene Chk1 contributes to the progression of cervical cancer. *Oncogene* 32, 976-987.

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., Meyers, D.A., 2002. Germline mutations and sequence variants of the macrophage scavenger receptor 1 gene are associated with prostate cancer risk. *Nature genetics* 32, 321-325.

Yaman Agaoglu, F., Kovancilar, M., Dizdar, Y., Darendeliler, E., Holdenrieder, S., Dalay, N., Gezer, U., 2011. Investigation of miR-21, miR-141, and miR-221 in blood circulation of patients with prostate cancer. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 32, 583-588.

Yaqinuddin, A., Qureshi, S.A., Qazi, R., Farooq, S., Abbas, F., 2009. DNMT1 silencing affects locus specific DNA methylation and increases prostate cancer derived PC3 cell invasiveness. *The Journal of urology* 182, 756-761.

Yi, R., Qin, Y., Macara, I.G., Cullen, B.R., 2003. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes & development* 17, 3011-3016.

Yu, J., Ohuchida, K., Mizumoto, K., Sato, N., Kayashima, T., Fujita, H., Nakata, K., 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. *Molecular cancer* 9, 169.

Yu, J., Wang, F., Yang, G.H., Wang, F.L., Ma, Y.N., Du, Z.W., Zhang, J.W., 2006. Human microRNA clusters: genomic organization and expression profile in leukemia cell lines. *Biochemical and biophysical research communications* 349, 59-68.

Zeng, Y., Cullen, B.R., 2003. Sequence requirements for micro RNA processing and function in human cells. *RNA (New York, N.Y)* 9, 112-123.

- Zhang, H.L., Yang, L.F., Zhu, Y., Yao, X.D., Zhang, S.L., Dai, B., Zhu, Y.P., Shen, Y.J., Shi, G.H., Ye, D.W., 2011. Serum miRNA-21: elevated levels in patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer and potential predictive factor for the efficacy of docetaxel-based chemotherapy. *The Prostate* 71, 326-331.
- Zhang, L., Deng, T., Li, X., Liu, H., Zhou, H., Ma, J., Wu, M., Zhou, M., Shen, S., Niu, Z., Zhang, W., Shi, L., Xiang, B., Lu, J., Wang, L., Li, D., Tang, H., Li, G., 2010. microRNA-141 is involved in a nasopharyngeal carcinoma-related genes network. *Carcinogenesis* 31, 559-566.
- Zhang, L., Volinia, S., Bonome, T., Calin, G.A., Greshock, J., Yang, N., Liu, C.G., Giannakakis, A., Alexiou, P., Hasegawa, K., Johnstone, C.N., Megraw, M.S., Adams, S., Lassus, H., Huang, J., Kaur, S., Liang, S., Sethupathy, P., Leminen, A., Simossis, V.A., Sandaltzopoulos, R., Naomoto, Y., Katsaros, D., Gimotty, P.A., DeMichele, A., Huang, Q., Butzow, R., Rustgi, A.K., Weber, B.L., Birrer, M.J., Hatzigeorgiou, A.G., Croce, C.M., Coukos, G., 2008. Genomic and epigenetic alterations deregulate microRNA expression in human epithelial ovarian cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 7004-7009.
- Zhou, X., Ruan, J., Wang, G., Zhang, W., 2007. Characterization and identification of microRNA core promoters in four model species. *PLoS computational biology* 3, e37.
- Zhu, S., Wu, H., Wu, F., Nie, D., Sheng, S., Mo, Y.Y., 2008. MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis. *Cell research* 18, 350-359.
- Zur Hausen, H., 1967. Induction of specific chromosomal aberrations by adenovirus type 12 in human embryonic kidney cells. *Journal of virology* 1, 1174-1185.

9. Anhang

9.1. Rohsequenzdaten der Illumina-Sequenzierung

Tabelle 22: Rohsequenzdaten der Illumina-Sequenzierung

microRNA	gesunde Prostata (Tumor)		gesunde Prostata (Zystektomien)		pT2		pT3 (pN0)		lymphknoten-metastasiert (pN1)	
	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.
let-7a-1	95634	0,62	92802	0,59	102529	0,67	153517	0,88	103576	0,62
let-7a-2	94632	0,62	92090	0,59	101154	0,66	151714	0,87	103119	0,61
let-7a-3	94728	0,62	92137	0,59	101240	0,66	151835	0,87	103200	0,61
let-7b	189058	1,23	181071	1,16	182163	1,19	247394	1,41	120182	0,71
let-7c	174257	1,13	136088	0,87	108457	0,71	175334	1,00	90697	0,54
let-7d	18639	0,12	20380	0,13	16966	0,11	25729	0,15	18966	0,11
let-7e	9678	0,06	20482	0,13	5920	0,04	11690	0,07	4549	0,03
let-7f-1	96584	0,63	104586	0,67	94132	0,61	140971	0,80	94692	0,56
let-7f-2	102477	0,67	109665	0,70	101681	0,66	152296	0,87	101037	0,60
let-7g	172757	1,12	167577	1,07	173741	1,13	228061	1,30	173660	1,03
let-7i	88542	0,58	89592	0,57	79886	0,52	105154	0,60	93755	0,56
mir-1-1	35316	0,23	53512	0,34	34848	0,23	32680	0,19	17761	0,11
mir-1-2	36657	0,24	55332	0,35	36170	0,24	34059	0,19	18392	0,11
mir-100	97726	0,64	94895	0,61	72697	0,47	109778	0,63	68120	0,41
mir-101-1	4370	0,03	2870	0,02	5612	0,04	5108	0,03	7251	0,04
mir-101-2	4356	0,03	2853	0,02	5576	0,04	5076	0,03	7213	0,04
mir-103a-1	68686	0,45	56987	0,37	56265	0,37	66587	0,38	66276	0,39
mir-103a-2	68663	0,45	56988	0,37	56238	0,37	66574	0,38	66261	0,39
mir-105-1	7	0,00	0	0,00	2	0,00	9	0,00	0	0,00
mir-105-2	9	0,00	1	0,00	1	0,00	8	0,00	0	0,00
mir-106a	11502	0,07	6721	0,04	11960	0,08	19564	0,11	12884	0,08
mir-106b	14757	0,10	8237	0,05	20830	0,14	43298	0,25	44874	0,27
mir-107	3046	0,02	2645	0,02	2296	0,01	2308	0,01	4166	0,02
mir-10a	7074	0,05	7574	0,05	10843	0,07	16823	0,10	9612	0,06
mir-10b	28332	0,18	38088	0,24	40438	0,26	41815	0,24	48531	0,29
mir-1179	36	0,00	30	0,00	21	0,00	22	0,00	24	0,00
mir-1180	1231	0,01	1353	0,01	1095	0,01	1294	0,01	1250	0,01
mir-1181	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-1183	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-1185-1	22	0,00	20	0,00	11	0,00	12	0,00	25	0,00
mir-1185-2	22	0,00	21	0,00	11	0,00	12	0,00	25	0,00
mir-1197	0	0,00	1	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-122	11	0,00	8	0,00	12	0,00	21	0,00	11	0,00
mir-1224	5	0,00	2	0,00	2	0,00	1	0,00	7	0,00
mir-1225	0	0,00	2	0,00	0	0,00	0	0,00	3	0,00

microRNA	gesunde Prostata (Tumor)		gesunde Prostata (Zystektomien)		pT2		pT3 (pN0)		lymphknoten-metastasiert (pN1)	
	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.
mir-1226	52	0,00	31	0,00	32	0,00	33	0,00	35	0,00
mir-1227	0	0,00	3	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00
mir-1228	1	0,00	8	0,00	8	0,00	3	0,00	8	0,00
mir-1229	1	0,00	4	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-1233-1	1	0,00	3	0,00	2	0,00	1	0,00	1	0,00
mir-1233-2	0	0,00	1	0,00	1	0,00	2	0,00	0	0,00
mir-1234	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-1236	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-1237	0	0,00	1	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00
mir-124-1	14	0,00	6	0,00	25	0,00	12	0,00	43	0,00
mir-124-2	14	0,00	4	0,00	23	0,00	12	0,00	43	0,00
mir-124-3	17	0,00	6	0,00	23	0,00	16	0,00	45	0,00
mir-1243	0	0,00	1	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-1244-1	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-1244-2	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-1244-3	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-1245	5	0,00	2	0,00	5	0,00	4	0,00	14	0,00
mir-1245b	1	0,00	0	0,00	1	0,00	1	0,00	1	0,00
mir-1246	8	0,00	11	0,00	13	0,00	44	0,00	19	0,00
mir-1247	103	0,00	185	0,00	154	0,00	161	0,00	196	0,00
mir-1248	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-1249	4	0,00	11	0,00	14	0,00	13	0,00	1	0,00
mir-1250	1	0,00	2	0,00	0	0,00	3	0,00	1	0,00
mir-1251	2	0,00	3	0,00	6	0,00	10	0,00	4	0,00
mir-1252	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-1254	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00
mir-1254-2	0	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-1255a	1	0,00	0	0,00	3	0,00	4	0,00	0	0,00
mir-1256	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-1258	0	0,00	1	0,00	1	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-125a	52208	0,34	41712	0,27	42397	0,28	57813	0,33	47097	0,28
mir-125b-1	58504	0,38	41561	0,27	44076	0,29	58738	0,34	43892	0,26
mir-125b-2	58340	0,38	41445	0,27	43927	0,29	58477	0,33	43760	0,26
mir-126	61368	0,40	56963	0,36	70086	0,46	76010	0,43	81625	0,49
mir-1260	428	0,00	480	0,00	1119	0,01	1214	0,01	908	0,01
mir-1260b	493	0,00	571	0,00	1229	0,01	1314	0,01	961	0,01
mir-1261	1	0,00	3	0,00	2	0,00	0	0,00	8	0,00
mir-1262	9	0,00	13	0,00	8	0,00	11	0,00	0	0,00
mir-1263	0	0,00	0	0,00	1	0,00	2	0,00	0	0,00
mir-1264	31	0,00	5	0,00	24	0,00	114	0,00	40	0,00
mir-1265	0	0,00	1	0,00	1	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-1266	1	0,00	2	0,00	5	0,00	8	0,00	4	0,00

microRNA	gesunde Prostata (Tumor)		gesunde Prostata (Zystektomien)		pT2		pT3 (pN0)		lymphknoten-metastasiert (pN1)	
	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.
mir-1267	5	0,00	1	0,00	3	0,00	9	0,00	4	0,00
mir-1268	22	0,00	77	0,00	50	0,00	35	0,00	25	0,00
mir-1268b	4	0,00	7	0,00	5	0,00	3	0,00	3	0,00
mir-1269	14	0,00	7	0,00	25	0,00	588	0,00	29	0,00
mir-1269b	12	0,00	2	0,00	27	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-127	466	0,00	392	0,00	370	0,00	224	0,00	722	0,00
mir-1270-1	14	0,00	16	0,00	14	0,00	8	0,00	3	0,00
mir-1270-2	14	0,00	17	0,00	14	0,00	11	0,00	6	0,00
mir-1271	119	0,00	100	0,00	92	0,00	68	0,00	72	0,00
mir-1273	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-1273c	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-1273d	1	0,00	0	0,00	2	0,00	1	0,00	0	0,00
mir-1273e	0	0,00	0	0,00	0	0,00	3	0,00	0	0,00
mir-1273f	0	0,00	1	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-1273g	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-1275	141	0,00	146	0,00	462	0,00	524	0,00	473	0,00
mir-1276	3	0,00	1	0,00	0	0,00	3	0,00	0	0,00
mir-1277	137	0,00	87	0,00	167	0,00	84	0,00	287	0,00
mir-128-1	580	0,00	521	0,00	964	0,01	1482	0,01	1394	0,01
mir-128-2	344	0,00	326	0,00	567	0,00	817	0,00	862	0,01
mir-1280	67	0,00	104	0,00	158	0,00	185	0,00	176	0,00
mir-1283-1	3	0,00	2	0,00	10	0,00	14	0,00	21	0,00
mir-1283-2	5	0,00	2	0,00	10	0,00	17	0,00	25	0,00
mir-1284	0	0,00	0	0,00	1	0,00	5	0,00	0	0,00
mir-1285-1	22	0,00	14	0,00	19	0,00	34	0,00	34	0,00
mir-1285-2	14	0,00	11	0,00	8	0,00	18	0,00	15	0,00
mir-1286	0	0,00	0	0,00	1	0,00	1	0,00	0	0,00
mir-1287	121	0,00	106	0,00	110	0,00	80	0,00	223	0,00
mir-1288	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00
mir-1289-1	0	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-1289-2	0	0,00	0	0,00	1	0,00	1	0,00	1	0,00
mir-129-1	7	0,00	3	0,00	3	0,00	7	0,00	15	0,00
mir-129-2	6	0,00	3	0,00	5	0,00	8	0,00	15	0,00
mir-1290	1	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,00	1	0,00
mir-1291	0	0,00	0	0,00	4	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-1292	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00
mir-1294	24	0,00	16	0,00	15	0,00	16	0,00	7	0,00
mir-1295	7	0,00	5	0,00	2	0,00	6	0,00	11	0,00
mir-1296	144	0,00	115	0,00	145	0,00	165	0,00	136	0,00
mir-1297	59	0,00	28	0,00	49	0,00	67	0,00	36	0,00
mir-1298	165	0,00	9	0,00	92	0,00	983	0,01	276	0,00
mir-1299	47	0,00	28	0,00	19	0,00	54	0,00	39	0,00

microRNA	gesunde Prostata (Tumor)		gesunde Prostata (Zystektomien)		pT2		pT3 (pN0)		lymphknoten-metastasiert (pN1)	
	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.
mir-1301	251	0,00	216	0,00	265	0,00	372	0,00	368	0,00
mir-1302-1	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-1302-10	1	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-1302-11	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-1302-2	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-1302-3	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-1302-4	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-1302-5	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-1302-6	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-1302-7	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-1302-8	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-1302-9	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-1303	40	0,00	42	0,00	76	0,00	57	0,00	69	0,00
mir-1304	0	0,00	1	0,00	0	0,00	2	0,00	3	0,00
mir-1305	2	0,00	8	0,00	3	0,00	0	0,00	7	0,00
mir-1306	0	0,00	1	0,00	1	0,00	2	0,00	1	0,00
mir-1307	248	0,00	302	0,00	239	0,00	220	0,00	313	0,00
mir-130a	35511	0,23	34382	0,22	25530	0,17	21796	0,12	35482	0,21
mir-130b	1231	0,01	1298	0,01	1542	0,01	1442	0,01	2412	0,01
mir-132	1512	0,01	1774	0,01	1486	0,01	2407	0,01	2295	0,01
mir-1322	0	0,00	0	0,00	1	0,00	1	0,00	0	0,00
mir-1323	2	0,00	4	0,00	3	0,00	14	0,00	6	0,00
mir-133a-1	2036	0,01	3234	0,02	1990	0,01	1193	0,01	905	0,01
mir-133a-2	2044	0,01	3245	0,02	1991	0,01	1190	0,01	906	0,01
mir-133b	32	0,00	58	0,00	36	0,00	15	0,00	9	0,00
mir-134	258	0,00	251	0,00	194	0,00	220	0,00	277	0,00
mir-1343	6	0,00	8	0,00	13	0,00	9	0,00	8	0,00
mir-135a-1	4413	0,03	2408	0,02	7158	0,05	10973	0,06	5515	0,03
mir-135a-2	4410	0,03	2410	0,02	7170	0,05	10987	0,06	5508	0,03
mir-135b	351	0,00	230	0,00	212	0,00	396	0,00	152	0,00
mir-136	13	0,00	13	0,00	15	0,00	5	0,00	17	0,00
mir-137	355	0,00	174	0,00	715	0,00	8416	0,05	2671	0,02
mir-138-1	57	0,00	28	0,00	113	0,00	27	0,00	35	0,00
mir-138-2	36	0,00	23	0,00	77	0,00	21	0,00	32	0,00
mir-139	632	0,00	702	0,00	730	0,00	1106	0,01	900	0,01
mir-140	2716	0,02	2758	0,02	3744	0,02	4223	0,02	5027	0,03
mir-141	350522	2,28	222491	1,43	598343	3,89	607836	3,47	669277	3,98
mir-142	1613	0,01	1503	0,01	1785	0,01	1644	0,01	1599	0,01
mir-143	5200810	33,84	6266204	40,14	4855639	31,61	4523573	25,82	4363751	25,95
mir-144	264	0,00	546	0,00	703	0,00	266	0,00	603	0,00
mir-145	189748	1,23	229841	1,47	194923	1,27	174627	1,00	122175	0,73
mir-1468	21	0,00	12	0,00	27	0,00	23	0,00	25	0,00

microRNA	gesunde Prostata (Tumor)		gesunde Prostata (Zystektomien)		pT2		pT3 (pN0)		lymphknoten-metastasiert (pN1)	
	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.
mir-146a	13079	0,09	8028	0,05	10928	0,07	13574	0,08	11828	0,07
mir-146b	12174	0,08	11833	0,08	10712	0,07	11822	0,07	10956	0,07
mir-147b	15	0,00	14	0,00	41	0,00	34	0,00	91	0,00
mir-148a	72100	0,47	44461	0,28	144183	0,94	210924	1,20	205709	1,22
mir-148b	7733	0,05	5967	0,04	10321	0,07	14708	0,08	19678	0,12
mir-149	1245	0,01	868	0,01	970	0,01	885	0,01	3468	0,02
mir-150	12505	0,08	8054	0,05	10595	0,07	11700	0,07	8693	0,05
mir-151	39218	0,26	39416	0,25	44923	0,29	56080	0,32	42555	0,25
mir-151b	3844	0,03	3580	0,02	3821	0,02	4753	0,03	3609	0,02
mir-152	14784	0,10	10409	0,07	11249	0,07	13547	0,08	16411	0,10
mir-153-1	164	0,00	128	0,00	681	0,00	922	0,01	737	0,00
mir-153-2	165	0,00	131	0,00	684	0,00	925	0,01	735	0,00
mir-1537	39	0,00	39	0,00	43	0,00	20	0,00	41	0,00
mir-1538	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-154	2384	0,02	1810	0,01	1587	0,01	1369	0,01	2168	0,01
mir-155	5463	0,04	4970	0,03	3527	0,02	3565	0,02	1364	0,01
mir-15a	122443	0,80	82846	0,53	144571	0,94	156664	0,89	149001	0,89
mir-15b	6733	0,04	6307	0,04	8866	0,06	13574	0,08	11862	0,07
mir-16-1	226375	1,47	214014	1,37	209734	1,37	288163	1,64	218335	1,30
mir-16-2	221140	1,44	210196	1,35	203369	1,32	279970	1,60	213798	1,27
mir-17	33075	0,22	26502	0,17	46803	0,30	76707	0,44	41984	0,25
mir-181a-1	24343	0,16	15356	0,10	14642	0,10	17022	0,10	16371	0,10
mir-181a-2	24340	0,16	15383	0,10	14645	0,10	17025	0,10	16371	0,10
mir-181b-1	4142	0,03	2669	0,02	2417	0,02	3076	0,02	2005	0,01
mir-181b-2	5105	0,03	3093	0,02	3079	0,02	3805	0,02	2236	0,01
mir-181c	9291	0,06	5976	0,04	8471	0,06	8209	0,05	13498	0,08
mir-181d	2052	0,01	1423	0,01	1940	0,01	2263	0,01	2319	0,01
mir-182	1089	0,01	547	0,00	2646	0,02	6281	0,04	4833	0,03
mir-1827	1	0,00	3	0,00	0	0,00	2	0,00	6	0,00
mir-183	1008	0,01	599	0,00	2339	0,02	6061	0,03	6191	0,04
mir-184	19	0,00	20	0,00	5	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-185	4893	0,03	3058	0,02	3837	0,02	4687	0,03	6148	0,04
mir-186	25045	0,16	17756	0,11	24441	0,16	30051	0,17	28275	0,17
mir-187	3656	0,02	4757	0,03	880	0,01	447	0,00	362	0,00
mir-188	172	0,00	80	0,00	88	0,00	68	0,00	236	0,00
mir-18a	9043	0,06	10757	0,07	12551	0,08	22808	0,13	11618	0,07
mir-18b	3602	0,02	2561	0,02	4788	0,03	8385	0,05	3831	0,02
mir-190	3922	0,03	2765	0,02	4992	0,03	6354	0,04	5776	0,03
mir-1908	3	0,00	6	0,00	0	0,00	4	0,00	6	0,00
mir-1909	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,00
mir-190b	105	0,00	73	0,00	472	0,00	1077	0,01	360	0,00
mir-191	65265	0,42	61092	0,39	81332	0,53	126770	0,72	86107	0,51

microRNA	gesunde Prostata (Tumor)		gesunde Prostata (Zystektomien)		pT2		pT3 (pN0)		lymphknoten-metastasiert (pN1)	
	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.
mir-1910	0	0,00	1	0,00	2	0,00	1	0,00	0	0,00
mir-1911	28	0,00	6	0,00	14	0,00	116	0,00	24	0,00
mir-1912	38	0,00	3	0,00	34	0,00	238	0,00	46	0,00
mir-1913	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-1914	0	0,00	0	0,00	2	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-192	58	0,00	55	0,00	98	0,00	104	0,00	114	0,00
mir-193a	1068	0,01	1483	0,01	847	0,01	1330	0,01	617	0,00
mir-193b	547	0,00	665	0,00	532	0,00	576	0,00	363	0,00
mir-194-1	1233	0,01	1186	0,01	1725	0,01	2575	0,01	4127	0,02
mir-194-2	1234	0,01	1185	0,01	1721	0,01	2581	0,01	4112	0,02
mir-195	59677	0,39	46150	0,30	73151	0,48	100535	0,57	87730	0,52
mir-196a-1	48	0,00	64	0,00	101	0,00	93	0,00	115	0,00
mir-196a-2	47	0,00	69	0,00	106	0,00	93	0,00	115	0,00
mir-196b	10141	0,07	7406	0,05	14419	0,09	18550	0,11	16559	0,10
mir-197	45	0,00	101	0,00	100	0,00	85	0,00	32	0,00
mir-1972-1	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-1972-2	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-1973	6	0,00	7	0,00	7	0,00	14	0,00	31	0,00
mir-1976	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-198	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-199a-1	12723	0,08	11200	0,07	13207	0,09	14419	0,08	17841	0,11
mir-199a-2	12722	0,08	11201	0,07	13211	0,09	14417	0,08	17840	0,11
mir-199b	43499	0,28	28481	0,18	39201	0,26	53413	0,30	61793	0,37
mir-19a	101	0,00	99	0,00	202	0,00	162	0,00	121	0,00
mir-19b-1	384	0,00	443	0,00	767	0,00	446	0,00	373	0,00
mir-19b-2	388	0,00	445	0,00	766	0,00	459	0,00	373	0,00
mir-200a	34325	0,22	17049	0,11	47171	0,31	52604	0,30	47655	0,28
mir-200b	19216	0,13	10538	0,07	31098	0,20	55680	0,32	30809	0,18
mir-200c	46681	0,30	46836	0,30	83734	0,55	157285	0,90	77832	0,46
mir-202	0	0,00	3	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-203	6951	0,05	5876	0,04	5960	0,04	9198	0,05	4324	0,03
mir-204	342	0,00	345	0,00	298	0,00	359	0,00	144	0,00
mir-205	47686	0,31	33939	0,22	24163	0,16	27090	0,15	15118	0,09
mir-206	42	0,00	15	0,00	322	0,00	30	0,00	4	0,00
mir-208a	117	0,00	133	0,00	51	0,00	9	0,00	4	0,00
mir-208b	49	0,00	10	0,00	305	0,00	17	0,00	3	0,00
mir-20a	93412	0,61	86900	0,56	137256	0,89	195769	1,12	91125	0,54
mir-20b	29032	0,19	22604	0,14	29180	0,19	49146	0,28	18538	0,11
mir-21	173553	1,13	214355	1,37	306871	2,00	441424	2,52	817748	4,86
mir-210	971	0,01	1246	0,01	1234	0,01	4133	0,02	1830	0,01
mir-211	0	0,00	0	0,00	0	0,00	2	0,00	0	0,00
mir-2110	362	0,00	477	0,00	377	0,00	475	0,00	195	0,00

microRNA	gesunde Prostata (Tumor)		gesunde Prostata (Zystektomien)		pT2		pT3 (pN0)		lymphknoten-metastasiert (pN1)	
	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.
mir-2114	0	0,00	1	0,00	2	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-2115	0	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-2116	0	0,00	1	0,00	3	0,00	3	0,00	5	0,00
mir-212	110	0,00	152	0,00	89	0,00	118	0,00	59	0,00
mir-214	42012	0,27	36866	0,24	31915	0,21	37331	0,21	56694	0,34
mir-215	0	0,00	0	0,00	3	0,00	3	0,00	1	0,00
mir-216a	2	0,00	3	0,00	7	0,00	5	0,00	16	0,00
mir-216b	4	0,00	2	0,00	2	0,00	6	0,00	3	0,00
mir-217	58	0,00	47	0,00	87	0,00	73	0,00	131	0,00
mir-218-1	2019	0,01	1401	0,01	2345	0,02	2373	0,01	2413	0,01
mir-218-2	2016	0,01	1399	0,01	2348	0,02	2371	0,01	2416	0,01
mir-219-1	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-22	232230	1,51	259255	1,66	268063	1,74	268540	1,53	324631	1,93
mir-221	71723	0,47	36352	0,23	40816	0,27	33300	0,19	52431	0,31
mir-222	4456	0,03	3832	0,02	3145	0,02	2560	0,01	2541	0,02
mir-223	5342	0,03	8294	0,05	5401	0,04	6940	0,04	3138	0,02
mir-224	2718	0,02	2329	0,01	2518	0,02	2249	0,01	1466	0,01
mir-2276	12	0,00	8	0,00	4	0,00	6	0,00	5	0,00
mir-2277	3	0,00	1	0,00	2	0,00	1	0,00	1	0,00
mir-2278	3	0,00	11	0,00	7	0,00	15	0,00	8	0,00
mir-2355	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	3	0,00
mir-23a	105536	0,69	100616	0,64	99790	0,65	142228	0,81	164501	0,98
mir-23b	191207	1,24	191978	1,23	147089	0,96	204165	1,17	197745	1,18
mir-23c	26	0,00	25	0,00	13	0,00	23	0,00	29	0,00
mir-24-1	128682	0,84	105853	0,68	84415	0,55	123796	0,71	126603	0,75
mir-24-2	128946	0,84	106036	0,68	84594	0,55	124020	0,71	126762	0,75
mir-2467	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-25	18439	0,12	14900	0,10	28374	0,18	48451	0,28	32108	0,19
mir-2681	20	0,00	25	0,00	4	0,00	1	0,00	16	0,00
mir-2682	0	0,00	1	0,00	1	0,00	34	0,00	9	0,00
mir-26a-1	266691	1,74	207888	1,33	247581	1,61	348238	1,99	244321	1,45
mir-26a-2	266688	1,74	207880	1,33	247579	1,61	348228	1,99	244313	1,45
mir-26b	204678	1,33	176647	1,13	187289	1,22	265410	1,52	179555	1,07
mir-27a	174168	1,13	159002	1,02	176844	1,15	229797	1,31	229855	1,37
mir-27b	497838	3,24	430535	2,76	367751	2,39	490919	2,80	540328	3,21
mir-28	21304	0,14	24012	0,15	23037	0,15	34357	0,20	21997	0,13
mir-2861	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-296	3	0,00	9	0,00	1	0,00	1	0,00	4	0,00
mir-2964a	0	0,00	2	0,00	2	0,00	1	0,00	1	0,00
mir-297	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-298	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-299	219	0,00	250	0,00	176	0,00	220	0,00	280	0,00

microRNA	gesunde Prostata (Tumor)		gesunde Prostata (Zystektomien)		pT2		pT3 (pN0)		lymphknoten-metastasiert (pN1)	
	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.
mir-29a	407273	2,65	374711	2,40	413575	2,69	427069	2,44	371447	2,21
mir-29b-1	156203	1,02	153266	0,98	162549	1,06	127954	0,73	156446	0,93
mir-29b-2	159651	1,04	155984	1,00	167305	1,09	130235	0,74	160173	0,95
mir-29c	42940	0,28	45186	0,29	71680	0,47	56869	0,32	44232	0,26
mir-301a	2555	0,02	2249	0,01	2606	0,02	2399	0,01	2806	0,02
mir-301b	32	0,00	20	0,00	25	0,00	46	0,00	62	0,00
mir-302a	2	0,00	0	0,00	2	0,00	1	0,00	0	0,00
mir-302b	1	0,00	0	0,00	1	0,00	3	0,00	1	0,00
mir-302d	2	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00
mir-3064	15	0,00	10	0,00	8	0,00	13	0,00	11	0,00
mir-3065	50	0,00	22	0,00	65	0,00	64	0,00	50	0,00
mir-3074	0	0,00	0	0,00	6	0,00	2	0,00	10	0,00
mir-30a	49231	0,32	37789	0,24	43538	0,28	50649	0,29	42213	0,25
mir-30b	5938	0,04	5632	0,04	8567	0,06	7924	0,05	4649	0,03
mir-30c-1	3134	0,02	3061	0,02	3354	0,02	3351	0,02	1657	0,01
mir-30c-2	3132	0,02	3054	0,02	3354	0,02	3351	0,02	1654	0,01
mir-30d	23687	0,15	22223	0,14	30978	0,20	41979	0,24	32992	0,20
mir-30e	17010	0,11	13039	0,08	20383	0,13	21323	0,12	13672	0,08
mir-31	3730	0,02	4416	0,03	2138	0,01	4576	0,03	1962	0,01
mir-3115	4	0,00	7	0,00	8	0,00	27	0,00	4	0,00
mir-3116-1	1	0,00	1	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-3116-2	0	0,00	2	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-3117	0	0,00	1	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-3118-1	0	0,00	1	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,00
mir-3118-2	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-3118-3	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-3118-4	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-3118-5	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-3118-6	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-3120	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-3121	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-3122	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-3124	1	0,00	5	0,00	0	0,00	1	0,00	1	0,00
mir-3125	1	0,00	0	0,00	0	0,00	2	0,00	1	0,00
mir-3126	5	0,00	7	0,00	5	0,00	5	0,00	6	0,00
mir-3127	4	0,00	2	0,00	1	0,00	1	0,00	0	0,00
mir-3128	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00
mir-3129	1	0,00	3	0,00	1	0,00	1	0,00	0	0,00
mir-3130-1	1	0,00	2	0,00	1	0,00	3	0,00	6	0,00
mir-3130-2	4	0,00	0	0,00	3	0,00	6	0,00	4	0,00
mir-3131	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,00	2	0,00
mir-3132	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00

microRNA	gesunde Prostata (Tumor)		gesunde Prostata (Zystektomien)		pT2		pT3 (pN0)		lymphknoten-metastasiert (pN1)	
	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.
mir-3133	1	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-3134	1	0,00	2	0,00	1	0,00	1	0,00	1	0,00
mir-3135	1	0,00	1	0,00	1	0,00	0	0,00	1	0,00
mir-3135b	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-3136	5	0,00	3	0,00	0	0,00	3	0,00	3	0,00
mir-3138	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-3139	0	0,00	1	0,00	1	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-3140	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-3143	1	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-3144	1	0,00	1	0,00	2	0,00	0	0,00	1	0,00
mir-3145	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-3146	2	0,00	1	0,00	1	0,00	4	0,00	1	0,00
mir-3149	2	0,00	5	0,00	1	0,00	2	0,00	4	0,00
mir-3150a	1	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,00
mir-3150b	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-3152	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-3154	30	0,00	32	0,00	11	0,00	11	0,00	5	0,00
mir-3155	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,00
mir-3157	18	0,00	20	0,00	18	0,00	18	0,00	16	0,00
mir-3158-1	17	0,00	12	0,00	14	0,00	17	0,00	18	0,00
mir-3158-2	3	0,00	1	0,00	3	0,00	9	0,00	7	0,00
mir-3159	0	0,00	0	0,00	0	0,00	2	0,00	0	0,00
mir-3160-2	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-3163	0	0,00	1	0,00	0	0,00	2	0,00	0	0,00
mir-3164	2	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,00	1	0,00
mir-3166	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-3170	1	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00
mir-3171	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-3173	0	0,00	0	0,00	2	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-3174	3	0,00	0	0,00	1	0,00	8	0,00	2	0,00
mir-3175	0	0,00	0	0,00	0	0,00	2	0,00	0	0,00
mir-3176	0	0,00	0	0,00	1	0,00	3	0,00	0	0,00
mir-3177	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,00	3	0,00
mir-3178	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-3179-1	0	0,00	1	0,00	2	0,00	1	0,00	0	0,00
mir-3179-2	1	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00
mir-3179-3	0	0,00	1	0,00	0	0,00	3	0,00	0	0,00
mir-3180-1	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-3180-2	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-3180-3	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00
mir-3180-4	2	0,00	2	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00
mir-3180-5	0	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00	0	0,00

microRNA	gesunde Prostata (Tumor)		gesunde Prostata (Zystektomien)		pT2		pT3 (pN0)		lymphknoten-metastasiert (pN1)	
	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.
mir-3181	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-3182	1	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-3183	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,00	1	0,00
mir-3184	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,00
mir-3185	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,00
mir-3187	0	0,00	1	0,00	0	0,00	1	0,00	2	0,00
mir-3188	5	0,00	2	0,00	0	0,00	4	0,00	3	0,00
mir-3189	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-3190	0	0,00	2	0,00	1	0,00	1	0,00	0	0,00
mir-3191	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-3192	2	0,00	1	0,00	3	0,00	2	0,00	0	0,00
mir-3195	55	0,00	52	0,00	60	0,00	56	0,00	40	0,00
mir-3196	1	0,00	5	0,00	1	0,00	3	0,00	12	0,00
mir-3197	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-3199-1	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-3199-2	0	0,00	1	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-32	72	0,00	104	0,00	225	0,00	209	0,00	226	0,00
mir-3200	2	0,00	9	0,00	3	0,00	0	0,00	1	0,00
mir-3202-1	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-3202-2	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,00
mir-320a	18659	0,12	18743	0,12	15042	0,10	20767	0,12	10441	0,06
mir-320b-1	111	0,00	112	0,00	73	0,00	133	0,00	62	0,00
mir-320b-2	105	0,00	102	0,00	75	0,00	127	0,00	61	0,00
mir-320c-1	149	0,00	165	0,00	100	0,00	191	0,00	66	0,00
mir-320c-2	148	0,00	172	0,00	109	0,00	214	0,00	73	0,00
mir-320d-1	103	0,00	94	0,00	65	0,00	159	0,00	76	0,00
mir-320d-2	105	0,00	94	0,00	63	0,00	156	0,00	79	0,00
mir-320e	5	0,00	7	0,00	2	0,00	3	0,00	8	0,00
mir-323	3	0,00	0	0,00	3	0,00	2	0,00	1	0,00
mir-323b	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	2	0,00
mir-324	20271	0,13	16839	0,11	16160	0,11	19955	0,11	17354	0,10
mir-326	37	0,00	43	0,00	37	0,00	26	0,00	27	0,00
mir-328	144	0,00	234	0,00	192	0,00	147	0,00	63	0,00
mir-329-1	12	0,00	11	0,00	16	0,00	13	0,00	13	0,00
mir-329-2	17	0,00	12	0,00	17	0,00	15	0,00	15	0,00
mir-330	255	0,00	265	0,00	264	0,00	276	0,00	362	0,00
mir-331	242	0,00	285	0,00	309	0,00	401	0,00	451	0,00
mir-335	20646	0,13	16586	0,11	18184	0,12	27138	0,15	22534	0,13
mir-337	628	0,00	763	0,00	441	0,00	440	0,00	463	0,00
mir-338	52	0,00	45	0,00	72	0,00	67	0,00	103	0,00
mir-339	348	0,00	214	0,00	281	0,00	328	0,00	459	0,00
mir-33a	19	0,00	7	0,00	21	0,00	7	0,00	17	0,00

microRNA	gesunde Prostata (Tumor)		gesunde Prostata (Zystektomien)		pT2		pT3 (pN0)		lymphknoten-metastasiert (pN1)	
	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.
mir-33b	0	0,00	4	0,00	8	0,00	8	0,00	3	0,00
mir-340	9594	0,06	9462	0,06	9796	0,06	12813	0,07	11333	0,07
mir-342	67	0,00	73	0,00	52	0,00	72	0,00	39	0,00
mir-345	382	0,00	260	0,00	336	0,00	472	0,00	654	0,00
mir-346	6	0,00	4	0,00	5	0,00	7	0,00	4	0,00
mir-34a	53317	0,35	27905	0,18	36510	0,24	34770	0,20	43348	0,26
mir-34b	2	0,00	0	0,00	3	0,00	0	0,00	2	0,00
mir-34c	58	0,00	41	0,00	49	0,00	35	0,00	133	0,00
mir-3545	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-3591	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	2	0,00
mir-3605	7	0,00	14	0,00	9	0,00	17	0,00	9	0,00
mir-3606	32	0,00	31	0,00	36	0,00	29	0,00	61	0,00
mir-3607	5	0,00	5	0,00	6	0,00	5	0,00	6	0,00
mir-3609	4	0,00	0	0,00	1	0,00	3	0,00	3	0,00
mir-361	7154	0,05	8100	0,05	7748	0,05	10784	0,06	7738	0,05
mir-3610	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-3611	167	0,00	131	0,00	205	0,00	239	0,00	161	0,00
mir-3612	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-3613	1750	0,01	1373	0,01	2248	0,01	2675	0,02	2762	0,02
mir-3614	0	0,00	1	0,00	0	0,00	2	0,00	1	0,00
mir-3615	50	0,00	49	0,00	37	0,00	45	0,00	57	0,00
mir-3616	15	0,00	9	0,00	5	0,00	14	0,00	9	0,00
mir-3617	97	0,00	218	0,00	45	0,00	41	0,00	12	0,00
mir-3618	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-3619	2	0,00	2	0,00	2	0,00	6	0,00	13	0,00
mir-362	3930	0,03	2464	0,02	2574	0,02	3030	0,02	1707	0,01
mir-3620	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00
mir-3622a	10	0,00	14	0,00	14	0,00	9	0,00	6	0,00
mir-3622b	2	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-363	38959	0,25	26021	0,17	41253	0,27	60026	0,34	41646	0,25
mir-3646	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-3647	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,00
mir-3648	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-365-1	1739	0,01	3269	0,02	1942	0,01	2785	0,02	955	0,01
mir-365-2	1730	0,01	3259	0,02	1942	0,01	2785	0,02	945	0,01
mir-3651	1	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	2	0,00
mir-3652	1	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-3653	0	0,00	2	0,00	2	0,00	6	0,00	6	0,00
mir-3654	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-3655	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-3656	22	0,00	72	0,00	47	0,00	29	0,00	31	0,00
mir-3657	2	0,00	0	0,00	1	0,00	3	0,00	0	0,00

microRNA	gesunde Prostata (Tumor)		gesunde Prostata (Zystektomien)		pT2		pT3 (pN0)		lymphknoten-metastasiert (pN1)	
	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.
mir-3659	9	0,00	9	0,00	3	0,00	4	0,00	2	0,00
mir-3660	0	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-3661	1	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-3664	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-3665	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-3667	0	0,00	2	0,00	0	0,00	8	0,00	0	0,00
mir-3676	2	0,00	2	0,00	7	0,00	6	0,00	0	0,00
mir-3677	2	0,00	1	0,00	1	0,00	0	0,00	4	0,00
mir-3679	0	0,00	1	0,00	0	0,00	2	0,00	1	0,00
mir-3680	1	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-3682	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-3683	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-3684	3	0,00	4	0,00	3	0,00	8	0,00	3	0,00
mir-3687	1	0,00	0	0,00	1	0,00	6	0,00	5	0,00
mir-3688-1	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-3688-2	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-369	25	0,00	25	0,00	14	0,00	22	0,00	20	0,00
mir-3690	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,00
mir-3691	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00
mir-370	100	0,00	70	0,00	61	0,00	82	0,00	201	0,00
mir-371	3	0,00	2	0,00	1	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-371b	0	0,00	1	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00
mir-372	5	0,00	4	0,00	6	0,00	1	0,00	0	0,00
mir-373	0	0,00	4	0,00	1	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-374a	3094	0,02	2742	0,02	4319	0,03	5211	0,03	3081	0,02
mir-374b	2386	0,02	1978	0,01	3937	0,03	3991	0,02	4929	0,03
mir-374c	1	0,00	1	0,00	5	0,00	2	0,00	13	0,00
mir-375	62864	0,41	57157	0,37	173764	1,13	179580	1,03	364858	2,17
mir-376a-1	3049	0,02	2823	0,02	2116	0,01	1822	0,01	2952	0,02
mir-376a-2	3055	0,02	2824	0,02	2120	0,01	1826	0,01	2953	0,02
mir-376b	767	0,00	960	0,01	673	0,00	445	0,00	1417	0,01
mir-376c	16732	0,11	17573	0,11	11820	0,08	13731	0,08	14095	0,08
mir-377	127	0,00	141	0,00	107	0,00	95	0,00	112	0,00
mir-378	8253	0,05	6657	0,04	7298	0,05	8172	0,05	11250	0,07
mir-378b	0	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-378c	0	0,00	1	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,00
mir-378d-1	1	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,00	4	0,00
mir-378d-2	2	0,00	2	0,00	2	0,00	1	0,00	2	0,00
mir-378e	62	0,00	70	0,00	59	0,00	45	0,00	104	0,00
mir-378f	3	0,00	0	0,00	2	0,00	0	0,00	2	0,00
mir-378g	15	0,00	13	0,00	11	0,00	12	0,00	10	0,00
mir-378h	0	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00	0	0,00

microRNA	gesunde Prostata (Tumor)		gesunde Prostata (Zystektomien)		pT2		pT3 (pN0)		lymphknoten-metastasiert (pN1)	
	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.
mir-378i	117	0,00	82	0,00	99	0,00	94	0,00	115	0,00
mir-379	439	0,00	455	0,00	289	0,00	417	0,00	358	0,00
mir-380	9	0,00	10	0,00	12	0,00	2	0,00	13	0,00
mir-381	2471	0,02	2406	0,02	1771	0,01	1758	0,01	2444	0,01
mir-382	412	0,00	554	0,00	302	0,00	426	0,00	482	0,00
mir-383	0	0,00	1	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-3907	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-3908	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-3909	53	0,00	36	0,00	33	0,00	46	0,00	34	0,00
mir-3910-1	0	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-3910-2	1	0,00	1	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-3912	44	0,00	37	0,00	56	0,00	67	0,00	57	0,00
mir-3913-1	87	0,00	51	0,00	73	0,00	68	0,00	58	0,00
mir-3913-2	87	0,00	52	0,00	73	0,00	67	0,00	60	0,00
mir-3914-1	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00
mir-3914-2	0	0,00	1	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-3915	0	0,00	1	0,00	1	0,00	3	0,00	1	0,00
mir-3916	0	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-3917	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-3918	1	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-3919	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-3921	1	0,00	1	0,00	1	0,00	1	0,00	1	0,00
mir-3922	1	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-3923	1	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,00
mir-3926-1	0	0,00	2	0,00	1	0,00	2	0,00	1	0,00
mir-3926-2	1	0,00	2	0,00	1	0,00	1	0,00	1	0,00
mir-3927	0	0,00	1	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-3928	0	0,00	2	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,00
mir-3929	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-3934	0	0,00	0	0,00	2	0,00	1	0,00	5	0,00
mir-3935	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00
mir-3936	3	0,00	2	0,00	4	0,00	2	0,00	0	0,00
mir-3938	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00
mir-3939	0	0,00	0	0,00	0	0,00	4	0,00	0	0,00
mir-3940	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-3941	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-3942	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-3943	6	0,00	3	0,00	3	0,00	10	0,00	5	0,00
mir-3944	1	0,00	0	0,00	3	0,00	4	0,00	2	0,00
mir-3945	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-3960	9	0,00	10	0,00	8	0,00	15	0,00	5	0,00
mir-409	33	0,00	44	0,00	24	0,00	30	0,00	56	0,00

microRNA	gesunde Prostata (Tumor)		gesunde Prostata (Zystektomien)		pT2		pT3 (pN0)		lymphknoten-metastasiert (pN1)	
	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.
mir-410	71	0,00	109	0,00	70	0,00	81	0,00	65	0,00
mir-411	2730	0,02	3403	0,02	2456	0,02	2703	0,02	3143	0,02
mir-412	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-421	896	0,01	1004	0,01	950	0,01	1270	0,01	1057	0,01
mir-422a	2	0,00	4	0,00	0	0,00	6	0,00	2	0,00
mir-423	9409	0,06	7422	0,05	9621	0,06	11329	0,06	8053	0,05
mir-424	49755	0,32	43600	0,28	36164	0,24	33220	0,19	28716	0,17
mir-425	2789	0,02	2733	0,02	5118	0,03	7040	0,04	3183	0,02
mir-4284	1	0,00	0	0,00	0	0,00	3	0,00	2	0,00
mir-4286	14	0,00	29	0,00	15	0,00	17	0,00	12	0,00
mir-429	9508	0,06	5804	0,04	13623	0,09	25738	0,15	11975	0,07
mir-4290	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4298	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4301	1	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4306	1	0,00	2	0,00	1	0,00	3	0,00	2	0,00
mir-431	11	0,00	31	0,00	15	0,00	40	0,00	45	0,00
mir-4313	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4317	0	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-432	419	0,00	785	0,01	323	0,00	407	0,00	236	0,00
mir-4323	0	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4324	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	2	0,00
mir-4326	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-433	161	0,00	312	0,00	144	0,00	192	0,00	139	0,00
mir-4417	1	0,00	0	0,00	2	0,00	4	0,00	4	0,00
mir-4419a	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4419b	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4421	2	0,00	2	0,00	4	0,00	0	0,00	1	0,00
mir-4422	4	0,00	4	0,00	2	0,00	1	0,00	6	0,00
mir-4423	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4424	0	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4425	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,00
mir-4426	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,00
mir-4429	2	0,00	2	0,00	1	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4430	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4431	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4433	0	0,00	7	0,00	1	0,00	3	0,00	2	0,00
mir-4434	1	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4435-1	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4435-2	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00
mir-4440	0	0,00	0	0,00	0	0,00	2	0,00	0	0,00
mir-4441	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4442	1	0,00	0	0,00	0	0,00	2	0,00	4	0,00

microRNA	gesunde Prostata (Tumor)		gesunde Prostata (Zystektomien)		pT2		pT3 (pN0)		lymphknoten-metastasiert (pN1)	
	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.
mir-4443	83	0,00	212	0,00	126	0,00	117	0,00	97	0,00
mir-4444	1	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4446	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4448	1	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4449	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,00	1	0,00
mir-4451	0	0,00	1	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00
mir-4452	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4453	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4454	50	0,00	56	0,00	108	0,00	41	0,00	48	0,00
mir-4455	0	0,00	2	0,00	2	0,00	1	0,00	0	0,00
mir-4457	0	0,00	3	0,00	0	0,00	0	0,00	2	0,00
mir-4459	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4460	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00
mir-4461	1	0,00	0	0,00	0	0,00	2	0,00	0	0,00
mir-4465	0	0,00	0	0,00	0	0,00	2	0,00	0	0,00
mir-4466	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00
mir-4467	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4469	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4470	1	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4472-2	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4473	22	0,00	18	0,00	24	0,00	34	0,00	26	0,00
mir-4474	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4477a	0	0,00	2	0,00	0	0,00	1	0,00	2	0,00
mir-4477b	3	0,00	1	0,00	1	0,00	5	0,00	1	0,00
mir-4478	3	0,00	1	0,00	1	0,00	1	0,00	3	0,00
mir-4479	0	0,00	1	0,00	0	0,00	0	0,00	2	0,00
mir-448	1	0,00	0	0,00	0	0,00	7	0,00	1	0,00
mir-4482	0	0,00	2	0,00	1	0,00	1	0,00	1	0,00
mir-4484	14	0,00	14	0,00	29	0,00	20	0,00	18	0,00
mir-4485	9	0,00	3	0,00	28	0,00	32	0,00	6	0,00
mir-4487	0	0,00	1	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4488	10	0,00	8	0,00	5	0,00	13	0,00	31	0,00
mir-4489	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00
mir-4491	0	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4492	4	0,00	4	0,00	5	0,00	4	0,00	10	0,00
mir-4497	29	0,00	25	0,00	30	0,00	37	0,00	67	0,00
mir-4498	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00
mir-449a	11	0,00	2	0,00	115	0,00	70	0,00	539	0,00
mir-449b	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	4	0,00
mir-449c	1	0,00	1	0,00	24	0,00	14	0,00	43	0,00
mir-4500	8	0,00	5	0,00	3	0,00	5	0,00	8	0,00
mir-4501	0	0,00	0	0,00	0	0,00	3	0,00	0	0,00

microRNA	gesunde Prostata (Tumor)		gesunde Prostata (Zystektomien)		pT2		pT3 (pN0)		lymphknoten-metastasiert (pN1)	
	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.
mir-4504	0	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4506	1	0,00	1	0,00	1	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4507	1	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00	1	0,00
mir-4508	9	0,00	20	0,00	14	0,00	10	0,00	32	0,00
mir-450a-1	2486	0,02	1684	0,01	1481	0,01	1430	0,01	1441	0,01
mir-450a-2	2496	0,02	1699	0,01	1490	0,01	1432	0,01	1445	0,01
mir-450b	51	0,00	43	0,00	65	0,00	54	0,00	44	0,00
mir-451	13328	0,09	29076	0,19	30585	0,20	19026	0,11	21208	0,13
mir-4510	27	0,00	27	0,00	22	0,00	28	0,00	11	0,00
mir-4512	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4516	14	0,00	55	0,00	45	0,00	55	0,00	42	0,00
mir-4519	0	0,00	1	0,00	0	0,00	2	0,00	0	0,00
mir-452	2202	0,01	1530	0,01	1746	0,01	2270	0,01	1412	0,01
mir-4520a	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4520b	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4521	41	0,00	31	0,00	33	0,00	13	0,00	40	0,00
mir-4522	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4523	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4524	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4525	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4529	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4530	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4532	39	0,00	38	0,00	30	0,00	24	0,00	50	0,00
mir-4536	0	0,00	1	0,00	2	0,00	2	0,00	1	0,00
mir-454	4265	0,03	4675	0,03	3856	0,03	5636	0,03	3584	0,02
mir-455	1966	0,01	1171	0,01	1457	0,01	1206	0,01	1226	0,01
mir-4633	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4634	1	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4635	0	0,00	0	0,00	1	0,00	3	0,00	1	0,00
mir-4636	4	0,00	5	0,00	10	0,00	9	0,00	8	0,00
mir-4637	0	0,00	0	0,00	0	0,00	4	0,00	0	0,00
mir-4638	0	0,00	1	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4639	4	0,00	5	0,00	1	0,00	9	0,00	5	0,00
mir-4640	0	0,00	0	0,00	2	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4645	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4646	0	0,00	1	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4647	0	0,00	1	0,00	1	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4648	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4649	0	0,00	1	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,00
mir-4651	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4653	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,00
mir-4654	0	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00	0	0,00

microRNA	gesunde Prostata (Tumor)		gesunde Prostata (Zystektomien)		pT2		pT3 (pN0)		lymphknoten-metastasiert (pN1)	
	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.
mir-4657	0	0,00	2	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4659a	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4659b	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-466	0	0,00	1	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4660	0	0,00	0	0,00	1	0,00	1	0,00	1	0,00
mir-4661	0	0,00	2	0,00	1	0,00	0	0,00	1	0,00
mir-4662a	7	0,00	7	0,00	6	0,00	11	0,00	12	0,00
mir-4662b	2	0,00	0	0,00	1	0,00	1	0,00	0	0,00
mir-4664	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00
mir-4665	3	0,00	4	0,00	0	0,00	2	0,00	0	0,00
mir-4667	2	0,00	5	0,00	2	0,00	4	0,00	2	0,00
mir-4670	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00
mir-4671	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4672	0	0,00	2	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4677	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4679-1	4	0,00	3	0,00	0	0,00	2	0,00	9	0,00
mir-4679-2	1	0,00	0	0,00	1	0,00	2	0,00	9	0,00
mir-4680	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4682	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4683	3	0,00	6	0,00	5	0,00	4	0,00	12	0,00
mir-4684	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4685	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4687	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4688	0	0,00	0	0,00	0	0,00	2	0,00	0	0,00
mir-4689	1	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4690	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4691	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4692	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4695	0	0,00	1	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4696	0	0,00	1	0,00	1	0,00	1	0,00	1	0,00
mir-4699	0	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4700	0	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00	1	0,00
mir-4701	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4703	3	0,00	0	0,00	1	0,00	1	0,00	1	0,00
mir-4704	0	0,00	0	0,00	0	0,00	3	0,00	5	0,00
mir-4705	27	0,00	33	0,00	28	0,00	18	0,00	33	0,00
mir-4707	1	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00	1	0,00
mir-4708	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,00
mir-4709	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,00
mir-4710	0	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4714	1	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00	1	0,00
mir-4715	0	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00	0	0,00

microRNA	gesunde Prostata (Tumor)		gesunde Prostata (Zystektomien)		pT2		pT3 (pN0)		lymphknoten-metastasiert (pN1)	
	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.
mir-4716	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4717	1	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4719	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4720	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4723	1	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,00
mir-4724	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4725	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4726	0	0,00	1	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4727	3	0,00	0	0,00	2	0,00	2	0,00	0	0,00
mir-4728	1	0,00	1	0,00	1	0,00	2	0,00	0	0,00
mir-4729	0	0,00	0	0,00	2	0,00	0	0,00	1	0,00
mir-4730	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	2	0,00
mir-4731	12	0,00	15	0,00	9	0,00	13	0,00	2	0,00
mir-4732	1	0,00	1	0,00	2	0,00	1	0,00	0	0,00
mir-4733	0	0,00	0	0,00	0	0,00	2	0,00	1	0,00
mir-4735	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4738	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4740	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4741	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4742	6	0,00	3	0,00	4	0,00	3	0,00	7	0,00
mir-4743	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00
mir-4744	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,00
mir-4745	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4748	1	0,00	2	0,00	1	0,00	3	0,00	1	0,00
mir-4749	0	0,00	1	0,00	1	0,00	1	0,00	3	0,00
mir-4750	5	0,00	7	0,00	3	0,00	7	0,00	2	0,00
mir-4753	0	0,00	1	0,00	1	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4754	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,00
mir-4755	1	0,00	0	0,00	2	0,00	3	0,00	0	0,00
mir-4756	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4757	1	0,00	1	0,00	0	0,00	1	0,00	1	0,00
mir-4758	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4760	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	3	0,00
mir-4762	1	0,00	4	0,00	1	0,00	3	0,00	4	0,00
mir-4763	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4765	0	0,00	2	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4766	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,00
mir-4767	2	0,00	2	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4768	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4772	2	0,00	2	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,00
mir-4773-1	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4773-2	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00

microRNA	gesunde Prostata (Tumor)		gesunde Prostata (Zystektomien)		pT2		pT3 (pN0)		lymphknoten-metastasiert (pN1)	
	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.
mir-4775	3	0,00	1	0,00	0	0,00	1	0,00	2	0,00
mir-4776-1	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4776-2	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4777	1	0,00	1	0,00	0	0,00	3	0,00	2	0,00
mir-4778	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4779	0	0,00	1	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4781	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4783	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4784	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00
mir-4785	1	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00
mir-4786	0	0,00	1	0,00	0	0,00	1	0,00	1	0,00
mir-4787	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4789	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,00
mir-4790	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4791	3	0,00	3	0,00	9	0,00	10	0,00	8	0,00
mir-4792	1	0,00	2	0,00	1	0,00	0	0,00	2	0,00
mir-4794	0	0,00	1	0,00	1	0,00	1	0,00	0	0,00
mir-4795	0	0,00	0	0,00	0	0,00	2	0,00	2	0,00
mir-4796	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4797	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4798	0	0,00	1	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4799	1	0,00	1	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00
mir-4800	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-4802	82	0,00	47	0,00	125	0,00	102	0,00	123	0,00
mir-4803	6	0,00	6	0,00	12	0,00	2	0,00	1	0,00
mir-4804	8	0,00	12	0,00	6	0,00	9	0,00	1	0,00
mir-483	12	0,00	10	0,00	0	0,00	4	0,00	1	0,00
mir-484	2962	0,02	3809	0,02	4648	0,03	5890	0,03	5557	0,03
mir-485	30	0,00	36	0,00	36	0,00	35	0,00	20	0,00
mir-486	189	0,00	369	0,00	356	0,00	272	0,00	265	0,00
mir-487a	248	0,00	413	0,00	225	0,00	298	0,00	300	0,00
mir-487b	1349	0,01	1702	0,01	1015	0,01	1339	0,01	1419	0,01
mir-488	60	0,00	78	0,00	127	0,00	84	0,00	88	0,00
mir-489	15	0,00	15	0,00	9	0,00	8	0,00	17	0,00
mir-490	72	0,00	176	0,00	11	0,00	1	0,00	3	0,00
mir-491	75	0,00	62	0,00	63	0,00	48	0,00	88	0,00
mir-493	281	0,00	298	0,00	189	0,00	208	0,00	281	0,00
mir-494	1556	0,01	1713	0,01	1077	0,01	1412	0,01	1216	0,01
mir-495	456	0,00	576	0,00	326	0,00	295	0,00	248	0,00
mir-496	1	0,00	6	0,00	1	0,00	2	0,00	5	0,00
mir-497	96579	0,63	64405	0,41	108295	0,70	88986	0,51	205893	1,22
mir-498	6	0,00	7	0,00	3	0,00	6	0,00	4	0,00

microRNA	gesunde Prostata (Tumor)		gesunde Prostata (Zystektomien)		pT2		pT3 (pN0)		lymphknoten-metastasiert (pN1)	
	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.
mir-499	1115	0,01	715	0,00	1169	0,01	1134	0,01	741	0,00
mir-499a	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,00
mir-500a	2171	0,01	1293	0,01	1313	0,01	1470	0,01	1319	0,01
mir-500b	47	0,00	32	0,00	24	0,00	21	0,00	16	0,00
mir-501	430	0,00	272	0,00	273	0,00	331	0,00	292	0,00
mir-502	287	0,00	172	0,00	217	0,00	243	0,00	152	0,00
mir-503	997	0,01	788	0,01	495	0,00	465	0,00	620	0,00
mir-504	1	0,00	4	0,00	3	0,00	1	0,00	4	0,00
mir-5047	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-505	343	0,00	357	0,00	329	0,00	338	0,00	194	0,00
mir-506	1	0,00	1	0,00	0	0,00	3	0,00	0	0,00
mir-507	0	0,00	3	0,00	0	0,00	2	0,00	3	0,00
mir-508	1	0,00	10	0,00	1	0,00	5	0,00	0	0,00
mir-509-1	3	0,00	1	0,00	1	0,00	1	0,00	1	0,00
mir-509-2	4	0,00	3	0,00	0	0,00	2	0,00	0	0,00
mir-509-3	10	0,00	23	0,00	10	0,00	15	0,00	8	0,00
mir-5095	0	0,00	0	0,00	1	0,00	2	0,00	0	0,00
mir-5096	0	0,00	2	0,00	1	0,00	3	0,00	2	0,00
mir-510	1	0,00	6	0,00	2	0,00	0	0,00	3	0,00
mir-511-1	6	0,00	7	0,00	5	0,00	7	0,00	7	0,00
mir-511-2	6	0,00	6	0,00	6	0,00	6	0,00	5	0,00
mir-512-1	2	0,00	1	0,00	3	0,00	5	0,00	1	0,00
mir-512-2	0	0,00	1	0,00	3	0,00	6	0,00	3	0,00
mir-513a-1	1	0,00	5	0,00	3	0,00	2	0,00	2	0,00
mir-513a-2	0	0,00	3	0,00	4	0,00	1	0,00	3	0,00
mir-513b	5	0,00	4	0,00	2	0,00	6	0,00	2	0,00
mir-513c	15	0,00	35	0,00	10	0,00	25	0,00	6	0,00
mir-514-1	5	0,00	12	0,00	4	0,00	10	0,00	3	0,00
mir-514-2	7	0,00	9	0,00	3	0,00	10	0,00	4	0,00
mir-514-3	5	0,00	9	0,00	3	0,00	10	0,00	5	0,00
mir-514b	5	0,00	4	0,00	1	0,00	4	0,00	0	0,00
mir-515-1	3	0,00	3	0,00	5	0,00	9	0,00	3	0,00
mir-515-2	1	0,00	1	0,00	4	0,00	6	0,00	4	0,00
mir-516a-1	5	0,00	5	0,00	15	0,00	18	0,00	31	0,00
mir-516a-2	6	0,00	2	0,00	15	0,00	16	0,00	31	0,00
mir-516b-1	4	0,00	4	0,00	0	0,00	1	0,00	2	0,00
mir-516b-2	0	0,00	0	0,00	1	0,00	1	0,00	0	0,00
mir-517a	18	0,00	10	0,00	12	0,00	34	0,00	24	0,00
mir-517b	1	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-517c	6	0,00	2	0,00	4	0,00	5	0,00	0	0,00
mir-518a-1	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-518a-2	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00

microRNA	gesunde Prostata (Tumor)		gesunde Prostata (Zystektomien)		pT2		pT3 (pN0)		lymphknoten-metastasiert (pN1)	
	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.
mir-518b	16	0,00	7	0,00	14	0,00	18	0,00	19	0,00
mir-518c	18	0,00	13	0,00	16	0,00	13	0,00	10	0,00
mir-518d	1	0,00	1	0,00	0	0,00	0	0,00	2	0,00
mir-518e	2	0,00	2	0,00	3	0,00	1	0,00	4	0,00
mir-518f	3	0,00	3	0,00	8	0,00	12	0,00	14	0,00
mir-519a-1	16	0,00	8	0,00	51	0,00	56	0,00	92	0,00
mir-519a-2	14	0,00	9	0,00	53	0,00	53	0,00	94	0,00
mir-519b	5	0,00	3	0,00	3	0,00	3	0,00	7	0,00
mir-519c	5	0,00	3	0,00	5	0,00	5	0,00	7	0,00
mir-519d	35	0,00	17	0,00	20	0,00	45	0,00	28	0,00
mir-519e	0	0,00	3	0,00	6	0,00	4	0,00	1	0,00
mir-520a	6	0,00	6	0,00	8	0,00	8	0,00	13	0,00
mir-520b	0	0,00	0	0,00	0	0,00	5	0,00	2	0,00
mir-520c	0	0,00	0	0,00	1	0,00	1	0,00	1	0,00
mir-520d	2	0,00	1	0,00	1	0,00	4	0,00	6	0,00
mir-520e	0	0,00	1	0,00	1	0,00	0	0,00	1	0,00
mir-520f	1	0,00	0	0,00	1	0,00	4	0,00	3	0,00
mir-520g	11	0,00	2	0,00	5	0,00	16	0,00	5	0,00
mir-520h	2	0,00	4	0,00	0	0,00	6	0,00	4	0,00
mir-521-1	0	0,00	0	0,00	1	0,00	2	0,00	0	0,00
mir-521-2	0	0,00	0	0,00	0	0,00	2	0,00	1	0,00
mir-522	8	0,00	2	0,00	12	0,00	20	0,00	32	0,00
mir-523	1	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,00	2	0,00
mir-524	7	0,00	6	0,00	5	0,00	18	0,00	9	0,00
mir-525	5	0,00	2	0,00	3	0,00	4	0,00	3	0,00
mir-526a-1	1	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,00
mir-526a-2	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	2	0,00
mir-526b	13	0,00	5	0,00	12	0,00	26	0,00	26	0,00
mir-527	1	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-532	11359	0,07	9261	0,06	8426	0,05	9734	0,06	7884	0,05
mir-539	9	0,00	14	0,00	7	0,00	11	0,00	12	0,00
mir-542	3	0,00	1	0,00	1	0,00	0	0,00	3	0,00
mir-543	58	0,00	93	0,00	45	0,00	48	0,00	67	0,00
mir-544	0	0,00	2	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-544b	4	0,00	0	0,00	4	0,00	4	0,00	17	0,00
mir-545	78	0,00	60	0,00	115	0,00	104	0,00	110	0,00
mir-548a-1	4	0,00	4	0,00	3	0,00	5	0,00	1	0,00
mir-548a-2	3	0,00	4	0,00	2	0,00	2	0,00	2	0,00
mir-548a-3	1	0,00	1	0,00	1	0,00	0	0,00	4	0,00
mir-548aa-1	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-548aa-2	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-548ab	7	0,00	3	0,00	6	0,00	8	0,00	7	0,00

microRNA	gesunde Prostata (Tumor)		gesunde Prostata (Zystektomien)		pT2		pT3 (pN0)		lymphknoten-metastasiert (pN1)	
	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.
mir-548ac	1	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-548ad	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-548ae-2	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-548ag-1	1	0,00	1	0,00	2	0,00	2	0,00	1	0,00
mir-548ag-2	1	0,00	0	0,00	2	0,00	0	0,00	1	0,00
mir-548ah	0	0,00	1	0,00	3	0,00	2	0,00	1	0,00
mir-548ai	85	0,00	46	0,00	77	0,00	70	0,00	52	0,00
mir-548aj-1	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-548aj-2	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-548ak	25	0,00	13	0,00	8	0,00	20	0,00	18	0,00
mir-548al	0	0,00	1	0,00	1	0,00	1	0,00	0	0,00
mir-548am	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00
mir-548an	0	0,00	0	0,00	1	0,00	2	0,00	3	0,00
mir-548b	23	0,00	26	0,00	11	0,00	30	0,00	31	0,00
mir-548c	41	0,00	50	0,00	48	0,00	66	0,00	63	0,00
mir-548d-1	49	0,00	46	0,00	60	0,00	79	0,00	64	0,00
mir-548d-2	50	0,00	48	0,00	57	0,00	79	0,00	62	0,00
mir-548e	1	0,00	2	0,00	2	0,00	3	0,00	2	0,00
mir-548f-1	0	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-548f-2	1	0,00	1	0,00	2	0,00	0	0,00	1	0,00
mir-548f-3	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-548f-4	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-548f-5	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-548g	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-548h-1	4	0,00	5	0,00	3	0,00	7	0,00	3	0,00
mir-548h-2	5	0,00	2	0,00	0	0,00	4	0,00	4	0,00
mir-548h-3	2	0,00	3	0,00	1	0,00	3	0,00	3	0,00
mir-548h-4	4	0,00	1	0,00	3	0,00	5	0,00	2	0,00
mir-548h-5	4	0,00	2	0,00	3	0,00	7	0,00	2	0,00
mir-548i-1	3	0,00	1	0,00	2	0,00	1	0,00	3	0,00
mir-548i-2	2	0,00	1	0,00	2	0,00	2	0,00	2	0,00
mir-548i-3	4	0,00	0	0,00	1	0,00	2	0,00	0	0,00
mir-548i-4	1	0,00	0	0,00	1	0,00	2	0,00	0	0,00
mir-548j	7	0,00	6	0,00	4	0,00	5	0,00	2	0,00
mir-548k	27	0,00	22	0,00	33	0,00	72	0,00	51	0,00
mir-548l	4	0,00	2	0,00	4	0,00	6	0,00	4	0,00
mir-548m	6	0,00	2	0,00	2	0,00	2	0,00	5	0,00
mir-548n	8	0,00	7	0,00	10	0,00	11	0,00	7	0,00
mir-548o	1	0,00	1	0,00	1	0,00	1	0,00	1	0,00
mir-548o-2	1	0,00	1	0,00	1	0,00	1	0,00	1	0,00
mir-548p	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-548q	33	0,00	24	0,00	20	0,00	22	0,00	21	0,00

microRNA	gesunde Prostata (Tumor)		gesunde Prostata (Zystektomien)		pT2		pT3 (pN0)		lymphknoten-metastasiert (pN1)	
	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.
mir-548s	0	0,00	3	0,00	2	0,00	4	0,00	6	0,00
mir-548t	2	0,00	2	0,00	5	0,00	14	0,00	31	0,00
mir-548u	0	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00	1	0,00
mir-548v	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,00
mir-548w	42	0,00	28	0,00	40	0,00	25	0,00	20	0,00
mir-548x	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-548x-2	0	0,00	0	0,00	0	0,00	2	0,00	0	0,00
mir-548y	0	0,00	1	0,00	1	0,00	0	0,00	1	0,00
mir-548z	4	0,00	2	0,00	2	0,00	2	0,00	2	0,00
mir-549	2	0,00	2	0,00	2	0,00	0	0,00	2	0,00
mir-550a-1	14	0,00	8	0,00	6	0,00	14	0,00	8	0,00
mir-550a-2	13	0,00	6	0,00	6	0,00	14	0,00	7	0,00
mir-550a-3	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-550b-1	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-550b-2	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-551b	2	0,00	11	0,00	2	0,00	0	0,00	1	0,00
mir-552	1	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,00
mir-556	6	0,00	3	0,00	22	0,00	20	0,00	23	0,00
mir-558	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-559	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-561	1	0,00	2	0,00	7	0,00	3	0,00	4	0,00
mir-564	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-566	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,00
mir-570	17	0,00	12	0,00	34	0,00	12	0,00	6	0,00
mir-574	1452	0,01	1438	0,01	1594	0,01	1682	0,01	847	0,01
mir-576	60	0,00	58	0,00	62	0,00	96	0,00	47	0,00
mir-577	2	0,00	2	0,00	0	0,00	13	0,00	2	0,00
mir-578	0	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00	1	0,00
mir-579	9	0,00	2	0,00	7	0,00	13	0,00	8	0,00
mir-580	6	0,00	10	0,00	5	0,00	6	0,00	5	0,00
mir-581	3	0,00	2	0,00	4	0,00	3	0,00	3	0,00
mir-582	233	0,00	219	0,00	487	0,00	404	0,00	208	0,00
mir-584	4	0,00	15	0,00	10	0,00	25	0,00	15	0,00
mir-585	84	0,00	97	0,00	41	0,00	28	0,00	45	0,00
mir-588	1	0,00	1	0,00	1	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-589	181	0,00	145	0,00	177	0,00	219	0,00	238	0,00
mir-590	98	0,00	101	0,00	149	0,00	129	0,00	118	0,00
mir-592	61	0,00	50	0,00	61	0,00	141	0,00	531	0,00
mir-593	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-597	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-598	904	0,01	961	0,01	1381	0,01	1569	0,01	1811	0,01
mir-599	1	0,00	0	0,00	2	0,00	0	0,00	1	0,00

microRNA	gesunde Prostata (Tumor)		gesunde Prostata (Zystektomien)		pT2		pT3 (pN0)		lymphknoten-metastasiert (pN1)	
	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.
mir-600	2	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,00	3	0,00
mir-603	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-605	1	0,00	3	0,00	2	0,00	1	0,00	3	0,00
mir-606	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-608	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-609	1	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-612	0	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-615	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-616	3	0,00	5	0,00	8	0,00	7	0,00	2	0,00
mir-617	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00
mir-618	1	0,00	0	0,00	4	0,00	3	0,00	4	0,00
mir-619	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-622	0	0,00	1	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00
mir-624	3	0,00	2	0,00	3	0,00	4	0,00	4	0,00
mir-625	460	0,00	490	0,00	351	0,00	407	0,00	301	0,00
mir-627	245	0,00	233	0,00	273	0,00	403	0,00	171	0,00
mir-628	175	0,00	115	0,00	172	0,00	173	0,00	127	0,00
mir-629	391	0,00	178	0,00	487	0,00	798	0,00	637	0,00
mir-632	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-636	1	0,00	1	0,00	2	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-639	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-641	87	0,00	91	0,00	75	0,00	115	0,00	61	0,00
mir-642a	21	0,00	14	0,00	14	0,00	14	0,00	9	0,00
mir-642b	1	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-643	14	0,00	14	0,00	23	0,00	21	0,00	30	0,00
mir-651	262	0,00	175	0,00	348	0,00	481	0,00	377	0,00
mir-652	9821	0,06	10795	0,07	8672	0,06	13040	0,07	9687	0,06
mir-653	0	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-654	18	0,00	26	0,00	6	0,00	11	0,00	11	0,00
mir-655	47	0,00	35	0,00	25	0,00	29	0,00	22	0,00
mir-656	18	0,00	15	0,00	18	0,00	10	0,00	13	0,00
mir-657	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-658	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-659	3	0,00	1	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-660	15501	0,10	9743	0,06	11499	0,07	14459	0,08	12155	0,07
mir-663	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-663b	3	0,00	5	0,00	2	0,00	3	0,00	1	0,00
mir-664	318	0,00	639	0,00	473	0,00	489	0,00	215	0,00
mir-665	7	0,00	10	0,00	7	0,00	4	0,00	17	0,00
mir-668	6	0,00	6	0,00	2	0,00	5	0,00	7	0,00
mir-670	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00
mir-671	168	0,00	98	0,00	182	0,00	255	0,00	275	0,00

microRNA	gesunde Prostata (Tumor)		gesunde Prostata (Zystektomien)		pT2		pT3 (pN0)		lymphknoten-metastasiert (pN1)	
	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.
mir-675	36	0,00	37	0,00	13	0,00	11	0,00	8	0,00
mir-676	40	0,00	25	0,00	27	0,00	56	0,00	28	0,00
mir-7-1	150	0,00	92	0,00	253	0,00	522	0,00	150	0,00
mir-7-2	144	0,00	91	0,00	240	0,00	491	0,00	143	0,00
mir-7-3	144	0,00	92	0,00	236	0,00	483	0,00	145	0,00
mir-708	1918	0,01	1835	0,01	3248	0,02	4716	0,03	7499	0,04
mir-720	209	0,00	342	0,00	415	0,00	523	0,00	604	0,00
mir-744	1155	0,01	1200	0,01	1170	0,01	1089	0,01	1823	0,01
mir-758	2	0,00	7	0,00	1	0,00	3	0,00	4	0,00
mir-760	1	0,00	3	0,00	1	0,00	3	0,00	4	0,00
mir-765	6	0,00	7	0,00	0	0,00	2	0,00	2	0,00
mir-766	10	0,00	15	0,00	21	0,00	10	0,00	13	0,00
mir-767	10	0,00	2	0,00	7	0,00	6	0,00	5	0,00
mir-769	384	0,00	259	0,00	423	0,00	382	0,00	916	0,01
mir-770	7	0,00	4	0,00	8	0,00	1	0,00	8	0,00
mir-802	0	0,00	0	0,00	1	0,00	1	0,00	0	0,00
mir-873	39	0,00	10	0,00	19	0,00	5	0,00	5	0,00
mir-874	304	0,00	299	0,00	285	0,00	389	0,00	714	0,00
mir-875	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-876	2	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-877	43	0,00	96	0,00	60	0,00	69	0,00	34	0,00
mir-885	0	0,00	3	0,00	2	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-887	796	0,01	1006	0,01	636	0,00	696	0,00	890	0,01
mir-888	4	0,00	3	0,00	8	0,00	9	0,00	2	0,00
mir-889	296	0,00	400	0,00	188	0,00	275	0,00	245	0,00
mir-890	4	0,00	3	0,00	4	0,00	7	0,00	3	0,00
mir-891a	7	0,00	1	0,00	5	0,00	9	0,00	2	0,00
mir-891b	0	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-892a	0	0,00	0	0,00	1	0,00	1	0,00	1	0,00
mir-892b	1	0,00	0	0,00	2	0,00	1	0,00	1	0,00
mir-9-1	480	0,00	455	0,00	1071	0,01	1442	0,01	1208	0,01
mir-9-2	477	0,00	454	0,00	1077	0,01	1446	0,01	1214	0,01
mir-9-3	478	0,00	455	0,00	1073	0,01	1444	0,01	1213	0,01
mir-922	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-92a-1	16973	0,11	15631	0,10	23683	0,15	29364	0,17	19301	0,11
mir-92a-2	14453	0,09	13662	0,09	18759	0,12	23245	0,13	16051	0,10
mir-92b	2429	0,02	3141	0,02	3323	0,02	3538	0,02	2219	0,01
mir-93	43519	0,28	44254	0,28	59782	0,39	123732	0,71	48754	0,29
mir-933	2	0,00	0	0,00	3	0,00	0	0,00	4	0,00
mir-934	0	0,00	1	0,00	0	0,00	2	0,00	1	0,00
mir-935	2	0,00	1	0,00	5	0,00	0	0,00	17	0,00
mir-937	3	0,00	1	0,00	0	0,00	1	0,00	2	0,00

microRNA	gesunde Prostata (Tumor)		gesunde Prostata (Zystektomien)		pT2		pT3 (pN0)		lymphknoten-metastasiert (pN1)	
	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.	reads	rel. expr.
mir-938	0	0,00	1	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
mir-939	1	0,00	3	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00
mir-940	6	0,00	8	0,00	3	0,00	2	0,00	4	0,00
mir-941-1	38	0,00	36	0,00	32	0,00	47	0,00	54	0,00
mir-941-2	38	0,00	39	0,00	28	0,00	47	0,00	53	0,00
mir-941-3	39	0,00	37	0,00	32	0,00	45	0,00	51	0,00
mir-941-4	39	0,00	36	0,00	27	0,00	46	0,00	51	0,00
mir-942	19	0,00	26	0,00	24	0,00	47	0,00	33	0,00
mir-943	0	0,00	1	0,00	0	0,00	0	0,00	3	0,00
mir-944	66	0,00	52	0,00	44	0,00	31	0,00	22	0,00
mir-95	1172	0,01	1199	0,01	1894	0,01	1901	0,01	2131	0,01
mir-96	295	0,00	192	0,00	843	0,01	1330	0,01	1195	0,01
mir-98	8478	0,06	9233	0,06	7941	0,05	12382	0,07	8150	0,05
mir-99a	671011	4,37	502774	3,22	524655	3,42	661372	3,78	658891	3,92
mir-99b	8300	0,05	9030	0,06	7838	0,05	8612	0,05	8075	0,05

9.2. Publikationen und Vorträge

9.2.1. Publikationen

Szczyrba, J.*, Nolte, E.*, **Hart, M.**, Doll, C., Wach, S., Taubert, H., Keck, B., Kremmer, E., Stohr, R., Hartmann, A., Wieland, W., Wullich, B., Grasser, F.A., 2013. Identification of ZNF217, hnRNP-K, VEGF-A and IPO7 as targets for microRNAs that are downregulated in prostate carcinoma. International journal of cancer 132, 775-784.

Hart, M.*, Wach, S.*, Nolte, E., Szczyrba, J., Menon, R., Taubert, H., Hartmann, A., Stoehr, R., Wieland, W., Grasser, F.A., Wullich, B., 2013. The proto-oncogene ERG is a target of microRNA miR-145 in prostate cancer. The FEBS journal

Hart, M.*; Nolte, E.*; Wach, S., Szczyrba, J., Taubert, H., Rau, T., Hartmann, A., Grasser, F.A., Wullich, B., 2013. Comparative microRNA profiling of prostate carcinomas with increasing tumor stage by deep-sequencing. (in Molecular Cancer Research zur Veröffentlichung eingereicht)

* diese Autoren trugen gleichermaßen zur Publikation bei

9.2.2. Vorträge

12/2013 **Hart, M.***, Wach, S.*, Nolte, E., Szczyrba, J., Menon, R., Taubert, H., Hartmann, A., Stoehr, R., Wieland, W., Grasser, F.A., Wullich, B. „Regulation des ERG-Proteins im Prostatakarzinom durch microRNAs“ 8. Jahrestagung des Deutschen Prostatakarzinomkonsortiums, Otzenhausen, 10.-11. Dezember 2010

03/2013 **Hart, M.***; Nolte, E.*; Wach, S., Szczyrba, J., Taubert, H., Rau, T., Hartmann, A., Grasser, F.A., Wullich, B., 2013. „Comparative microRNA profiling of prostate carcinomas with increasing tumor stage by deep-sequencing” 10. Jahrestagung des Deutschen Prostatakarzinomkonsortiums, Otzenhausen, 1.-2. März 2013

9.2.3. Poster

04/2011 AACR 102nd Annual Meeting 2011, Orlando (USA):
The ERG 3'-UTR is a target of miR-145 and expression patterns of ERG isoforms are altered in prostate cancer

9.3. Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Friedrich Grässer für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, für das Überlassen des interessanten Themas, sein Vertrauen hinsichtlich des eigenverantwortlichen Arbeitens sowie für seine Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Unseren Kooperationspartnern Prof. Dr. med. Bernd Wullich, Prof. Dr. Helge Taubert, Dr. Elke Nolte und Dr. Sven Wach danke ich für die gute und erfolgreiche Zusammenarbeit sowie ihre stete Diskussionsbereitschaft.

Ganz besonders bedanke ich mich bei Dr. Henrik Gross und Frau Dipl. Biologin Julia Alles für ihre Hilfsbereitschaft, ihre Diskussionsbereitschaft, die Unterstützung im Laboralltag und vor allem ihre Freundschaft.

Dr. Jaroslaw Szczyrba danke ich für die Überlassung der SEC23A-Reporterplasmide seine Hilfsbereitschaft, seine Ratschläge und Diskussionsbereitschaft.

Mein weiterer Dank gilt Frau Ruth Nord, Dr. Stephanie Barth, allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Grässer für ihre Ratschläge und Hilfsbereitschaft bei Fragen rund um den Laboralltag.

Allen Mitarbeitern der Virologie danke ich für ein sehr angenehmes Arbeitsklima. Insbesondere danke ich Frau Barbara Best für ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft bei Problemen bezüglich der Laborarbeit.

Meinen Freunden danke ich für die Motivation und die kurzweiligen Momente während meines Studiums und dieser Arbeit.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie für ihre Unterstützung und ihr Vertrauen in mich. Von ganzem Herzen danke ich Nadine Dönnemeier dafür, dass sie mich stets motiviert, immer an mich geglaubt und nie ihre Geduld verloren hat.

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

Nalbach, Mai 2013

(Martin Hart)