

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Aus der Klinik und Poliklinik für Urologie

Institutsdirektorin Frau Prof. Dr. med. Margit Fisch

**Differentielle Micro-RNA-Expressionsmuster in histologisch unauffälligen
Prostatabiopsien von Prostatakarzinompatienten im Vergleich zu gesunden
Kontrollen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Yu-Mi Jessica Sylvester

aus Hamburg

Hamburg 2011

Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 26.03.2012

Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. med. H. Heinzer

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. med. T. Schlomm

Prüfungsausschuss, dritter Gutachter: PD Dr. rer. nat. R. Simon

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| 1. EINLEITUNG..... | 6 |
| 1.1. Epidemiologie..... | 6 |
| 1.2. Risikofaktoren für das Prostatakarzinom | 6 |
| 1.3. Diagnose des Prostatakarzinoms | 7 |
| 1.4. Histologie des Prostatakarzinoms | 8 |
| 1.5. Klinisch-pathologische Einteilung des Prostatakarzinoms | 9 |
| 1.6. Therapie des Prostatakarzinoms | 10 |
| 1.7. Molekulare Marker..... | 12 |
| 1.7.1. Field Cancerization und Tumor-Host-Interaktion..... | 12 |
| 1.8. Micro-RNA..... | 14 |
| 1.9. Micro-RNA Auswahl | 17 |
| 2. ARBEITSHYPOTHESE | 18 |
| 3. MATERIAL UND METHODEN | 20 |
| 3.1. Patientenkollektive..... | 20 |
| 3.2. Biopsiematerial..... | 21 |
| 3.3. RNA- und Micro-RNA-Isolierung | 23 |
| a) Materialien für die RNA- und Micro-RNA-Isolierung | 23 |
| b) Durchführung RNA- und Micro-RNA-Isolierung | 24 |
| 3.4. c-DNA Herstellung | 25 |
| a) Materialien für die c-DNA-Herstellung | 25 |
| b) Durchführung der c-DNA-Herstellung..... | 26 |

| | |
|--|-----------|
| 3.5. <i>Quantitative Real-Time-PCR mit Micro-RNA-Quantifizierungsassays von AB</i> | 26 |
| 3.6. <i>Quantitative Real-Time-PCR</i> | 28 |
| 3.7. <i>Relative Quantifizierung mittels delta-delta-CT-Methode</i> | 29 |
| 3.8. <i>Statistische Evaluation</i> | 31 |
| 4. ERGEBNISSE | 32 |
| 4.1. <i>Micro-RNAs miR-124, miR-146, miR-146b, miR-187</i> | 33 |
| 4.2. <i>Micro-RNAs let-7a, let-7b, miR-16, miR-185</i> | 36 |
| 5. DISKUSSION | 41 |
| 6. ZUSAMMENFASSUNG | 49 |
| 7. LITERATURVERZEICHNIS | 51 |
| 8. DANKSAGUNG | 61 |
| 9. LEBENSLAUF | 62 |
| 10. ERKLÄRUNG | 63 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------|--|
| PSA | Prostata-Spezifisches Antigen |
| PCA | Prostatakarzinom |
| tPSA | total PSA (Gesamt-PSA) |
| DRU | Digitale Rektale Untersuchung |
| TRUS | Transrektaler Ultraschall |
| CLL | Chronisch Lymphatische Leukämie |
| HE | Hämatoxylin-Eosin |
| cDNA | copy DNA |
| RT | Reverse Transkription |
| PCR | Polymerase chain reaction |
| dNTP | Desoxynucleotidtriphosphates (Nukleotide) |
| FRET | Fluorescence resonance energy transfer |
| Ct | Cycle threshold |
| HKG | House Keeping Gene |

1. Einleitung

1.1. Epidemiologie

Das Prostatakarzinom ist der häufigste Tumor des Mannes mit ca. 60.000 Neuerkrankungen in der BRD. Es steht an dritter Stelle der Tumormortalität und ist die 7. häufigste Todesursache des Mannes mit ca. 12.000 Todesfällen pro Jahr in der BRD (S3 Leitlinie Prostatakarzinom 2009, Robert-Koch-Institut 2010). Man verzeichnet einen rasanten Anstieg der Inzidenz seit den 90ern welche vor allem auf verbesserten diagnostischen Mitteln, z. B. PSA-Test, zurückzuführen ist (Noldus et al. 2000). Abb. 1 zeigt die Altersspezifische Inzidenz und Mortalität des PCA 2002 in der BRD.

1.2. Risikofaktoren für das Prostatakarzinom

Bekannte Risikofaktoren für das Prostatakarzinom (PCA) sind das Alter, Ernährungsgewohnheiten, erhöhter Testosteronspiegel und Familiarität. Da die Heilungschancen für den Patienten im Frühstadium am besten sind, ist eine möglichst frühe Diagnose des PCA von Bedeutung (Pound et al. 1997).

Alterspezifische Erkrankungsraten (Inzidenz) und Sterblichkeit (Mortalität) für Prostatakrebs in Deutschland 2002

Datenquelle: GEKID e.V. mit dem Robert Koch-Institut (2006); Statistisches Bundesamt [1, 51]

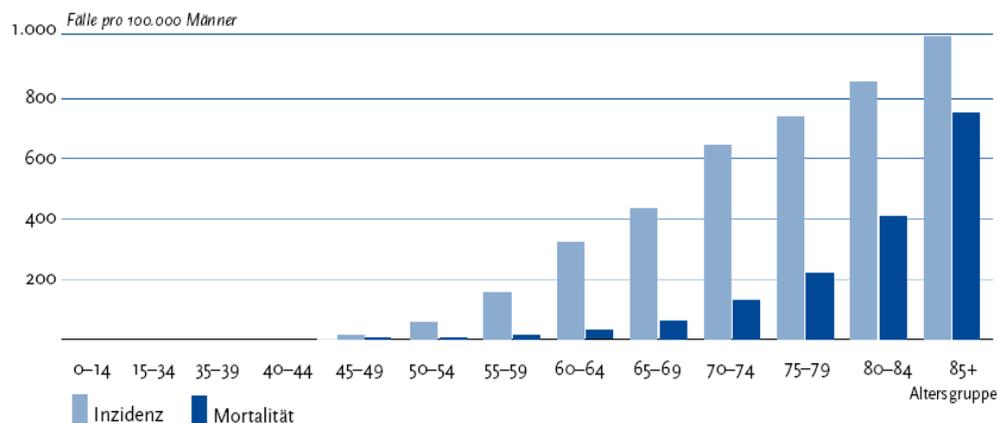


Abb. 1: Altersspezifische Inzidenz und Mortalität für Prostatakrebs in Deutschland 2002 (Quelle RKI)

1.3. Diagnose des Prostatakarzinom

Die Diagnose des PCA erfolgt z. Zt. durch eine Kombination verschiedener Verfahren. An erster Stelle stehen die regelmäßig durchzuführende digitale rektale Tastuntersuchung (DRU) sowie die Bestimmung des PSA-Wertes im Serum. Das PSA (Prostata-spezifische Antigen) wird in epithelialen Zellen der Prostatadrüsen gebildet und wird dem Ejakulat beigemischt, wo es der Verflüssigung des Spermas dient. Der physiologisch normale tPSA-Wert (total PSA) liegt zwischen 0,0 und 4,0 ng/ml (Hudson et al. 1990). Ausgehend von internationalen Studien hat sich in Europa dementsprechend ein Cut-off-Wert von 4 ng/ml für das tPSA im Blut von Patienten etabliert (Kleer und Oesterling 1993).

Das PSA ist kein karzinomspezifischer Marker, sondern ein organspezifischer Marker, daher sind erhöhte Konzentrationen im Blut bei verschiedenen Pathologien erhöht. Erhöhtes PSA kann ein Hinweis auf obstruktive Veränderungen in der Prostata aufgrund z.B. BPH oder Tumors sein, ebenso können mechanische Reize, z.B. DRU, Biopsien oder auch Entzündungen, z. B. Prostatitis erhöhte Werte hervorrufen. Studien zeigen, dass Werte zwischen 0.4 ng/ml und 10 ng/ml für das PCA einen positiv-prädiktiven Wert von 12- 32% aufweisen bei negativem Tastbefund, bei Werten über 10 ng/ml beträgt die Wahrscheinlichkeit für ein PCA über 50% (Cooner et al. 1990, Hammerer und Hulan 1994, Ellis et al 1994, Catalona et al. 1994).

Eine dritte diagnostische Methodik stellt der transrektale Ultraschall (TRUS) dar. Der TRUS dient dazu nähere Informationen zur lokalen Ausdehnung der Prostata bzw. eines vorhandenen PCA zu erhalten. Der TRUS ist jedoch nicht als Früherkennungsmethode der ersten Wahl anzusehen, sondern hat in Kombination mit DRU und PSA-Bestimmung als Basisdiagnostik zu erfolgen (Kuefer 2004).

Im Verdachtsfall kann ein PCA nur histopathologisch sicher diagnostiziert werden. Hierzu werden nach festen Schemata Biopsien (Hexantenbiopsien) genommen und feingeweblich untersucht. Ist trotz eines differentialdiagnostisch ungeklärt hohen PSA-Wertes kein tumoröses Gewebe zu finden, besteht die Möglichkeit sogenannte

Sättigungsbiopsien durchzuführen. Hierbei werden ca. 20-26 Stenzen entnommen, die weitgehend alle Areale der Prostata abdecken und somit die Wahrscheinlichkeit erhöhen, kleine, bislang okkulte Tumorfoci zu finden (Hautmann und Huland 2006). Ein sicherer Ausschluss eines PCA ist jedoch auch auf diese Weise nicht möglich. Dies stellt in der Diagnostik der Prostatakarzinoms ein Problem dar, da okkulte Karzinome, die sich durch Lage und Größe der Erkennung durch DRU und TRUS oder Biopsien entziehen, nicht früh entdeckt werden können und so die Wahrscheinlichkeit eines kurativen Therapieerfolgs erniedrigen.

1.4. Histologie des Prostatakarzinoms

Der größte Anteil der Karzinome der Prostata sind mit 97%, die Adenokarzinome. Andere Arten des PCA wie Plattenepithelkarzinome, endometroide, kleinzellige oder verschleimende Karzinome sind sehr selten. Das PCA entsteht in ca. 80% in den peripheren Zonen, ca. 20% entstehen da in der Transitionalzone der Prostata.

Zur histopathologischen Beurteilung von Adenokarzinomen der Prostata bewährt sich seit langem das Gleason-System, welches nach dem amerikanischen Arzt Dr. Donald Gleason benannt ist (Gleason und Mellinger 1974). Er spiegelt anhand der ansteigenden Grade die zunehmende Dedifferenzierung der Prostatadrüsenzellen im Verlauf der Tumorentwicklung und dessen maligner Entartung wieder (siehe Abb. 2).

Der Gleason-Score wird unterschieden in fünf verschiedene histologische Differenzierungs- und Wachstumsmuster. Der Gleason-Score setzt sich zusammen aus der Addition der Grade der zwei größten Tumoreale im Biopsiematerial (Urologie Pocket Guidelines 2007)

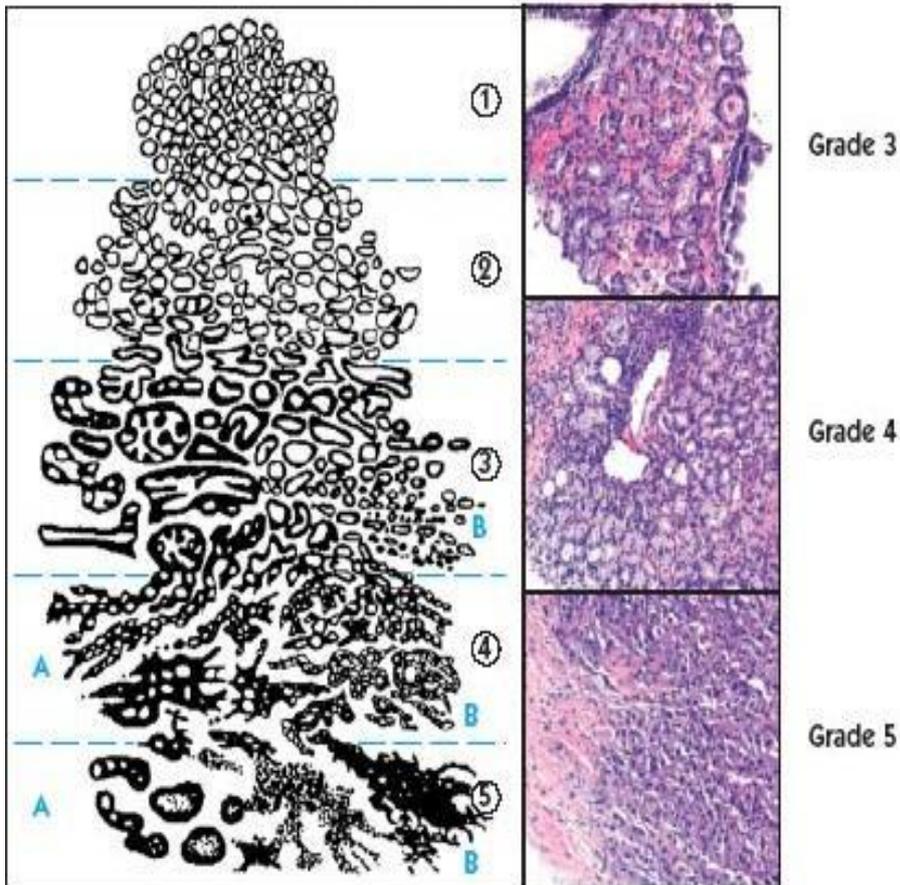


Abbildung 2: Differenzierungsgrad nach Gleason (Quelle: www.4urology.org/.../conditions/prostate/)

1.5. Klinisch-pathologische Einteilung des Prostatakarzinoms

Die Stadieneinteilung des PCA (Staging) entspricht der TNM-Klassifikation von 2002 (s. Tabelle 1).

Dabei werden Tumorausdehnung- und Größe, Lymphknotenbefall sowie Metastasen und deren Ausdehnung klassifiziert. Das Staging erfolgt durch klinische und bildgebende Verfahren vor einer Therapieeinleitung. Anhand der Stadieneinteilung kann man Therapieoptionen für den Tumor festlegen.

| | |
|-------------------------|---|
| T – Primärtumor | |
| TX | Primärtumor kann nicht beurteilt werden |
| T0 | Kein Anhalt für Primärtumor |
| T1 | Klinisch nicht erkennbarer Tumor der weder tastbar noch in bildgebenden Verfahren sichtbar ist |
| T1a | Tumor zufälliger histologischer Befund (incidental carcinoma) in 5 % oder weniger des resezierten Gewebes |
| T1b | Tumor zufälliger histologischer Befund (incidental carcinoma) in mehr als 5% des reseziertem Gewebes |
| T1c | Tumor durch Nadelbiopsie diagnostiziert |
| T2 | Tumor begrenzt auf Prostata |
| T2a | Tumor befällt maximal die Hälfte eines Prostatalappens |
| T2b | Tumor befällt mehr als die Hälfte eines Prostatalappens |
| T2c | Tumor befällt beide Prostatalappen |
| T3 | Tumor breitet sich durch die Prostatakapsel in extrakapsuläres Gewebe aus |
| T3a | Einseitige oder beidseitige extrakapsuläre Ausbreitung |
| T3b | Tumor infiltriert Samenblase |
| T4 | Tumor ist fixiert oder infiltriert andere benachbarte Strukturen als Samenblasen: Blasenhal, Sphinkter externus, Rektum, Levatormuskel, und/oder Beckenwand |
| N Lymphknoten | |
| NX | Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden |
| N0 | Keine regionalen Lymphknotenmetastasen |
| N1 | Regionale Lymphknotenmetastasen |
| M Fernmetastasen | |
| M0 | Keine Fernmetastasen |
| M1 | Fernmetastasen |
| M1a | Nicht regionale Lymphknoten |
| M1b | Knochen |
| M1c | Andere Lokalisationen |

Tabelle 1: TNM Staging Prostatakarzinom (Quelle Urologie Pocket Guidelines 2007)

1.6. Therapien

Operative Therapien

Die radikale Prostatektomie beinhaltet die Entfernung der gesamten Prostata mit Samenbläschen und der Denovillierschen Faszie. Die radikale operative Therapie ist vor

allem bei jüngeren Patienten (Lebenserwartung >10 Jahre) mit T1-2 Tumoren mit niedrigem Gleasongrad die Therapie der Wahl (S3-Leitlinien Prostatakarzinom 2009). Für den offenen, retropubischen Zugang sind exzellente onkologische Ergebnisse mit niedriger Komplikationsraten nachgewiesen worden (Hull et al. 2002, Augustin et al. 2003, Michl et al. 2003, Chun et al. 2006). Zu den weiteren operativen Möglichkeiten zählen neben dem offen-retropubischen Zugang noch der offen-perineale Zugang, der laparoskopische Ansatz (Stolzenburg et al. 2003) und die Roboter-assistierte Methode nach Da Vinci.

Alternative Therapiemöglichkeiten

Die Strahlentherapie stellt eine alternative Therapieoption für Patienten dar für die eine operative Therapie aus verschiedenen Gründen nicht in Frage kommt oder diese ablehnen. (u.a. Narkoseunverträglichkeit, fortgeschrittenes Alter, erhöhtes Narkoserisiko durch schlechter Allgemeinzustand, schwerwiegende Herz-Kreislaferkrankungen)

Eine weitere alternative konservative Option ist die der Aktiven Überwachung - "Active Surveillance". Diese Therapie ist vor allem für ältere Patienten über 70 Jahre geeignet, deren Lebenserwartung noch ca. 10-15 Jahre beträgt und für die eine geringe Wahrscheinlichkeit besteht, an ihrer Krebserkrankung ursächlich zu versterben (Adolfsson et al. 2007).

Ebenso als weitere Alternative steht noch die medikamentöse Therapie zur Verfügung. Mittels einer Hormonentzugstherapie kann das Wachstum des Tumors über einen längeren Zeitraum aufgehalten und kontrolliert werden – eine Heilung ist auf diese Weise jedoch nicht möglich (Ebert et al. 2001).

1.7. Molekulare Marker

Wie bereits erwähnt, ist eine sichere Diagnose entscheidend für eine rechtzeitige und somit erfolgreiche kurative Therapie. Bisher hat man sich auf subjektive, interpretativ variable Methoden wie DRU und TRUS sowie auf den relativ unspezifischen PSA-Serumwert und auf die Biopsie gestützt, wobei diese selbst wiederholt negativ sein können, da kleine Tumoren nicht unbedingt durch die Biopsie getroffen werden.

In dieser Hinsicht könnten jedoch molekulare Prozesse, die an der Entwicklung von Tumoren und an Entartungsprozessen im Gewebe beteiligt sind, hilfreiche zusätzliche Hinweise geben. Zellen entarten im Zuge einer Reihe molekularpathologischer Veränderungen. Diese Alterationen finden sich auf genetischer Ebene (chromosomale Aberrationen, Mutationen), auf der Ebene der molekularen Strukturelemente und Katalysatoren (der Proteine) und im Bereich der Genaktivität und ihrer Regulation, also der Transkription (Hanahan und Weinberg 2000). Anfangs bleiben diese Veränderungen histologisch unsichtbar.

1.7.1. Field Cancerization und Tumor-Host-Interaktion

Es gibt Konzepte, die die Veränderungen auf molekularer Ebene während der Tumorgenese beschreiben. Eines davon ist das Konzept der Tumor-Host-Interaktion. Diese These besagt, dass das Tumorstadium und Metastasierung auf einem komplexen Zwischenspiel zwischen Tumor und dem benachbarten "Host"-Gewebe beruht. Die Micro-Umwelt („Microenvironment“) und Interaktionen von Tumorzellen und Zellen im Stromagewebe spielen hierbei eine große Rolle (Le Bitoux und Stamenkovic 2008).

Bei Tumordurchbruch in die Basalmembran kommt es zu einem Kontakt des Tumors mit seinem Host-Stromagewebe und es folgt eine Inflammationsreaktion in welcher das Stromagewebe mit Rekrutierung und Aktivierung von Zellen reagiert (u.a. mesenchymalen Stammzellen, Endothelialzellen, Fibroblasten, lymphatischen Zellen).

Diese Zellen sezernieren Wachstumsfaktoren, Chemokine, Zytokine, und proteolytische Enzyme und können so beisteuern zum Umbau und Abbau von Gewebe sowie Gewebsneubildung, z. B. Angiogenese und Neubildung einer extrazellulären Matrix (Le Bitoux und Stamenkovic 2008, Olumi et al. 1999, Hussain und Harris 2007).

Ein weiteres Konzept beruht auf der Feldkanzerisierung „Field Cancerization“.

Field Cancerization wurde zuerst 1953 von Slaughter beschrieben für Tumoren im Kopf/Hals-Bereich um das Auftreten von mikroskopisch verändertem Gewebe, welches aber makroskopisch normal erschien, zu erklären sowie um das Auftreten von multifokalen Tumoren zu erklären (Slaughter et al. 1953, Nonn et al. 2009).

Mittlerweile kann man den Begriff Field Cancerization auf molekularer Ebene anwenden, da man molekulare Veränderungen in histologisch unauffälligen Arealen, welche benachbart zu einem Tumor liegen nachweisen kann (Nonn et al. 2009, Haaland et al. 2009). Das Konzept der Field Cancerization konnte bereits für mehrere Organsysteme nachgewiesen werden, z.B. Kolon (Jothy et al. 1996), Lunge (Franklin et al. 1997), Blase (Takahashi et al. 1998), Ösophagus (Prevo et al. 1999). Der genaue Mechanismus ist unklar, wahrscheinlich führt eine Akkumulation von genetischen Veränderungen z. B. durch einen exogenen Reiz, zu einer Mutation von einer normalen Zelle zu einer Tumorzelle (Nonn et al. 2009, Braakhuis et al. 2009). Hierbei formt sich eine Läsion mit einer genetisch veränderten Stammzelle und bildet mit mutierten Tochterzellen eine größere Zellansammlung („Patch“), welche sich wiederum zu einem größeren Feld ausweiten kann. Dieses könnte auch das Wiederkehren eines Tumors nach chirurgischer Resektion erklären (Braakhuis et al. 2009).

Hieraus ergibt sich die Hypothese, dass histologisch unauffällige Areale bereits tumorspezifische Veränderungen auf der molekularen Ebene aufweisen. Die Feststellung solcher Veränderungen in histologisch normal erscheinenden Gewebeproben würde einen starken Hinweis auf eine maligne Entartung in der Prostata liefern, selbst wenn der Tumor an sich nicht von der Biopsie getroffen worden wäre. Tatsächlich wurden kürzlich Transkriptionssignaturen beschrieben, die histologisch normal erscheinendes Prostatagewebe aus PCA-Patienten von gesunden Prostaten

differenzieren (Schlomm und Hellwinkel et al. 2009).

Neben mRNAs beschrieben könnten auch Micro-RNAs potentielle molekulare Marker für ein PCA darstellen. Es handelt sich hierbei um kurze RNAs, welche in die Regulation vieler zellulärer Differenzierungs- und Proliferationsprozesse (s.u.) involviert sind.

1.8. Micro-RNA

Micro-RNAs sind kurze RNAs von ca. 19 - 24 Nukleotiden-Länge, die aufgrund ihrer geringen Größe lange als für die Zellbiologie irrelevant betrachtet wurden. Erstmals wurden Micro-RNAs 1993 in der Nematode *C. elegans*, einem Wurm, beschrieben (Lee et al. 1993).

Die Ursprungsgene der meisten Micro-RNAs befinden sich innerhalb von Introns proteinkodierender oder nicht-kodierender Gene (Esquela-Kerscher und Slack 2006, Kim 2007, Rodriguez et al. 2004). Erst seit wenigen Jahren ist bekannt, dass Micro-RNAs offenbar Schlüsselprozesse während der Entwicklung eines Organismus steuern (Pasquinelli et al. 2000). Sie konnten mittlerweile in fast allen Organismen nachgewiesen werden, z.B. Viren (Sullivan et al. 2006), Pflanzen (Mallory et al. 2006) und Tiere (Stefani und Slack 2008).

Die reife funktionsfähige Micro-RNA entsteht aus mehreren Vorstufen (s. Abb 3.). Das primäre Transkript nennt sich pri-Micro-RNA. Aus diesem wird im Nukleus durch einen Multiproteinkomplex, der aus einer Polymerase III (Drosha) und DGCR8 (double stranded RNA binding domain protein) besteht, eine in sich selbst haarnadelartig hybridisierende pre-Micro RNA gebildet. Diese wird dann durch ein Transportprotein, das Exportin-5, in das Zytoplasma transferiert. Hier kommt es zur Abspaltung der Ringstruktur in der Micro-RNA durch die Polymerase III Dicer. Es resultiert eine vollhomologe Doppelstrang-Micro-RNA, dessen Anti-sense-Strang sich an das Argonauten-Protein Ago2 bindet, während der komplementäre Strang degradiert wird.

Die Antisense-Micro-RNA und Ago2 bilden zusammen den RISC (RNA-induced silencing complex). Der Komplex bindet unvollständig komplementär an homologe Bereiche im 3' Ende der untranslatierten Region (UTR) ihrer Ziel-mRNAs und hemmt entweder die Translation oder destabilisiert diese (durch Deadenylierung), was deren Abbau auslöst (Schmittgen 2008, Lee et al. 2004, Lee et al. 2003, Pillai et al. 2005, Winter et al. 2009).

Die Expression der Ziel-Proteine wird somit auf Translationsebene durch Micro-RNAs negativ gesteuert.

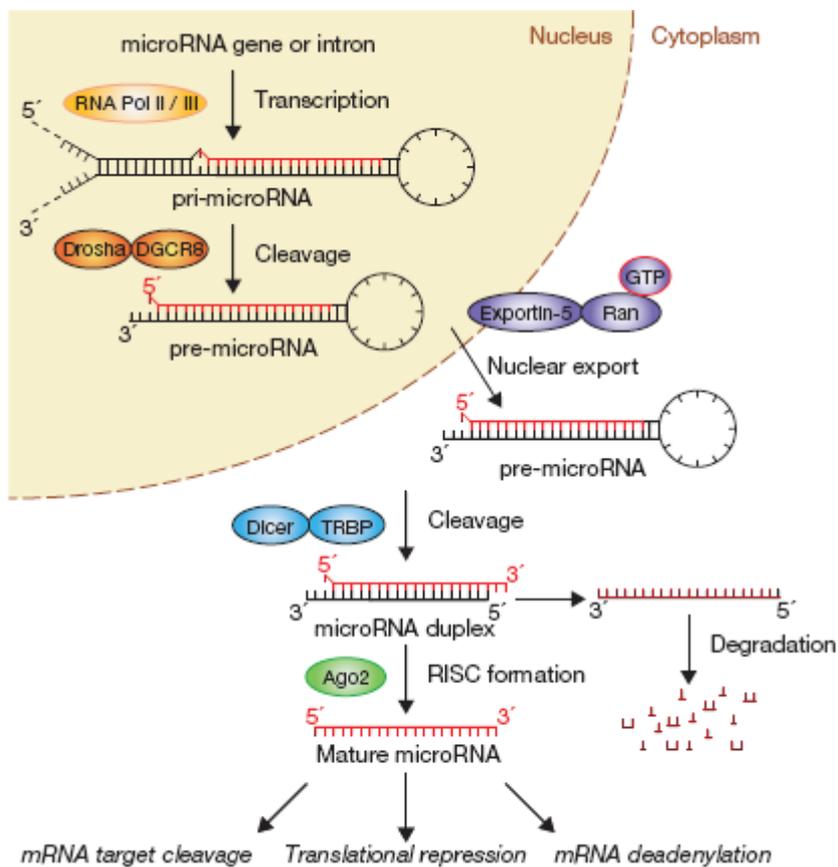


Abb. 3: Entstehung MicroRNA und deren Funktionsweise (Quelle: Winter et al. 2009 “Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation.”)

Laut Datenbank microrna.sanger.ac.uk/sequences/ sind bisher ca. 6500 Micro-RNAs bekannt, davon ca. 700 im menschlichen Genom. Dies entspricht 1-4% aller exprimierten menschlichen Gene. Somit stellen sie unter den Genregulatoren die größte bekannte Gruppe dar. Eine einzige Micro-RNA kann an 200 verschiedenen Transkripten

binden und sie in ihrer Expression beeinflussen – darunter Transkriptionsfaktoren, Sekretionsfaktoren, Rezeptoren und Transporter (Esquela-Kerscher und Slack 2006, Wang und Lee 2009).

Micro-RNAs greifen entsprechend in verschiedenste Zellprozesse wie der Apoptose, Zelldifferenzierung und auch in Stoffwechselprozesse ein und regulieren diese (Cheng et al. 2005, Chan et al. 2005, Liao et al. 2008, Tang et al. 2009). Es steht somit außer Frage, dass Micro-RNAs auch in der Kanzerogenese eine Rolle spielen. Eine Veränderung der Micro-RNA- Expression auf molekularer Ebene wurde in Tumoren bereits vielfach nachgewiesen: Für das CLL konnte gezeigt werden, dass bestimmte Micro-RNA-Spiegel verändert sind und mit dem Krankheitsverlauf korrelieren (Calin et al. 2005). Zusätzlich gibt es zahlreiche Arbeiten an anderen Tumorentitäten, welche die Bedeutung der Micro-RNAs für die Tumorbiologie unterstreichen, wie z.B. über Diagnostik und Verlauf von Lungenkarzinome, hepatozellulärer Karzinome, Colonadenocarcinome etc. (Takamizawa et al. 2004, Yanaihara et al. 2006, Budhu et al. 2008, Schetter et al. 2008).

Aufgrund ihrer gewichtigen Rolle in der grundlegenden (und tumorrelevanten) Zellbiologie könnte die Expression vieler Micro-RNAs somit eine Markerfunktion in Tumoren aufweisen, welche auch für eine molekulare PCA-Früherkennung bedeutsam wäre.

Zudem könnten sich diverse Eigenschaften dieser RNAs in methodischer Hinsicht als nützlich erweisen. Aufgrund ihrer geringe Größe können sie leicht aus den Zellen ins Interzellulärraum der Gewebe diffundieren und sind somit prinzipiell auch weiträumiger detektierbar. Sie reagieren somit auch auf Formalinfixierung und natürliche Degenerationsvorgänge in Geweben - insbesondere der RNA-Degradation durch RNA-spaltende Enzyme (RNAsen) - weniger empfindlich (Nelson et al. 2004, Lu et al. 2005).

1.9. Micro-RNA Auswahl

Im Vorfeld dieser Dissertationsarbeit wurden 157 Micro-RNAs hinsichtlich ihrer grundsätzlichen Expression in Gewebe von gesunden Kontrollen untersucht (Hellwinkel et al.; Manuskript eingereicht). Von diesen zeigten 94 Micro-RNAs reproduzierbar eine Expression in Prostatagewebe.

Für diese Micro-RNAs erfolgte in einem zweiten Schritt eine Selektion mittels online-Datenbanksuchen bei Pubmed und der Miró microRNA data base unter folgenden Kriterien: Assoziation mit PCA, experimentelle Validierung, Publikationen über Tumorgenese/maligne Transformation.

Unter den Micro-RNAs, die diese Kriterien erfüllten, wurden folgende Micro-RNAs für die nachfolgende Untersuchung ausgewählt: miR-124a, mir-146a, mir-146b, miR-185 miR-16, let -7a und let-7b.

MiR-187 erfüllte die o.g. Kriterien nicht, wurde aber für Kontrollzwecke als Negativkontrolle in die Untersuchungen mit eingeschlossen.

2. Arbeitshypothese

Es wird angenommen, dass Tumorfoci von Regionen mit zwar noch histologisch unauffälligen, aber bereits auf molekularer Ebene veränderten Prostatazellen umgeben werden (Field Cancerization).

Ebenso könnten diese Bereiche durch benachbarte Tumoren molekularbiologisch verändert worden sein (Tumor-Host Interaktion).

Das Konzept der Tumor-Host-Interaktion besagt, dass das Tumorstadium auf eine komplexe Interaktion zwischen dem Tumor und seinem benachbartem Gewebe („Host“) beruht. Die Umgebung („Microenvironment“) und deren Reaktion auf den Tumor spielen dabei eine besondere Rolle, da die Interaktionen von Tumorzellen mit Stromagewebe und dessen Zellen wie z. B. Fibroblasten, Endothelialzellen, lymphatische Zellen sich gegenseitig beeinflussen und somit Wachstum, Ausbreitung und Metastasierung eines Tumors begünstigen (Le Bitoux und Stamenkovic 2008, Tlsty und Coussens 2006)

Das Konzept der Field Cancerization wurde von Slaughter 1953 bezüglich Tumore im Kopf/Halsbereich erwähnt, um das Auftreten von multifokalen Tumoren in einem Organsystem zu erklären. Es zeigen sich genetische Veränderungen, welche makroskopisch nicht ersichtlich sind. Diese Veränderungen basieren auf genetisch veränderten Zellen, welche sich zu größeren Feldern ausdehnen können (Haaland et al. 2009, Braakhuis et al. 2003)

Dies könnte sich in veränderten Expressionsmustern von Micro-RNAs - wichtigen Expressionsregulatoren - widerspiegeln.

Die vorliegende Dissertation überprüft diese Hypothese anhand der Messung der Expression ausgewählter Micro-RNAs in einem Kollektiv aus histologisch unauffälligen Prostatabiopsien von PCA-Patienten im Vergleich zu zwei

Kontrollkollektiven aus Prostatabiopsien tumornegativer Individuen mit erhöhtem bzw. normalem PSA.

Medizinisch bedeutsam ist, dass veränderte Micro-RNA-Expressionsmuster als Tumormarker für die Frühdiagnose des PCA in histologisch unauffälligem Biopsiematerial in Betracht kämen. Dies käme vor allem Patienten mit erhöhtem PSA aber histologisch negativem Biopsiebefund zugute.

3. Material und Methoden

3.1. Patientenkollektive

Für diese Arbeit wurde histologisch **tumorfrees** Gewebe aus einer Patientengruppe mit nachgewiesenem PCA und aus zwei karzinomnegativen Gruppen mit entweder normalen oder erhöhten PSA genutzt. (s. Tabelle 2).

| | Prostatabiopsien mit normalen, tumorfreien Gewebe (30% bis 50% Epithelgewebe) | | |
|-------------------------------|--|--|--|
| Gruppen | Gesunde Männer (tumornegativ) | Gesunde Männer (mit initialem Tumorverdacht bei hohem PSA, aber tumornegativ) | PCA-Patienten (nachgewiesenes PCA) |
| Anzahl Patienten | n = 17 | n = 14 | n = 31 |
| Alter | 51 bis 64 | 54 bis 75 | 54 bis 66 |
| Diagnostik | Negativer Palpationsbefund negative Biopsie | Negativer oder unklarer Tastbefund, Mehrfache negative Biopsie | Unklarer oder positiver Tastbefund, \geq eine positive Biopsie |
| | Niedriges PSA (Mittelwert 0.78 ng/ml [\pm 0.26 SD]) | Erhöhtes PSA (Mittelwert 6.44 ng/ml [\pm 4.82 SD]) | Erhöhtes PSA (Mittelwert 7.97 ng/ml [\pm 5.21 SD]) |
| Bezeichnung der Gruppe | Tumor Negativ / niedriges PSA-Gruppe (TN-\downarrowPSA Gruppe) | Tumor Negativ/hohes PSA-Gruppe (TN-\uparrowPSA-Gruppe) | Tumor-Positiv-Gruppe (TP-Gruppe) |
| | | Diese zwei Gruppen beinhalten Patienten mit erhöhten PSA, die klinisch üblicherweise als PCA-verdächtig definiert und in der weiteren diagnostischen Routine Biopsien unterzogen werden. | |

Tabelle 2: Untersuchte Patientengruppen und klinische Daten

Klinisch bedeutsam ist vor allem der Vergleich der TN- \uparrow PSA-Gruppe und der TP-Gruppe, da diese bei negativem Biopsiefund diagnostisch nur schwer zu unterscheiden sind.

3.2. Biopsiematerial

Das Gewebe für diese Arbeit wurde durch Biopsien aus der peripheren Zone der Prostaten mithilfe von DRU und TRUS gewonnen und sofort in RNAlater (Qiagen, Cat. Nr. 76104, Hilden, Germany) fixiert.

Die Proben aus dem gewonnenen Biopsiematerial wurden longitudinal in Kryoschnitten einer HE-Färbung unterzogen. Dabei wurde histologisch die Präsenz von Tumorfoci ausgeschlossen, zudem wurden nur Proben, welche 30-50 % Epithelgewebe beinhalten, in diese Studie übernommen. Aus den in die Studie eingeschlossenen ungefärbten Biopsieresten wurde Micro-RNA gewonnen (s.u.).

Alle Patienten der 62 Proben sind vergleichbaren Alters.

Die Untersuchungen wurden von der zuständigen Ethikkommission genehmigt. Alle Patienten haben eine Einverständniserklärung für die Verwendung gegeben.

Die histopathologische Daten sind zusammengefasst in der folgenden Tabelle:

| ID | Alter | Malignität | Gruppe | PSA [ng/ml] | Fries PSA [%] | Tumor-stadium (pathol) | Gleason-score (pathol) |
|---------|-------|---------------|---------------|-------------|---------------|------------------------|------------------------|
| BBN-12 | 58 | Tumor negativ | TN↓PSA-Gruppe | 0,2 | 30 | | |
| BB-N13 | 56 | Tumor negativ | TN↓PSA-Gruppe | 0,35 | 25,71 | | |
| BB-N15 | 57 | Tumor negativ | TN↓PSA-Gruppe | 0,49 | 30,61 | | |
| BB-N16 | 54 | Tumor negativ | TN↓PSA-Gruppe | NA | NA | | |
| BB-N17 | 64 | Tumor negativ | TN↓PSA-Gruppe | 0,75 | 24 | | |
| BB-N18 | 48 | Tumor negativ | TN↓PSA-Gruppe | 0,84 | 29,76 | | |
| BB-N19 | 50 | Tumor negativ | TN↓PSA-Gruppe | 0,8 | 38,75 | | |
| BBN-32R | 57 | Tumor negativ | TN↓PSA-Gruppe | 1,12 | 31,25 | | |
| BBN-33L | 55 | Tumor negativ | TN↓PSA-Gruppe | 0,81 | 24,69 | | |
| BBN-34R | 56 | Tumor negativ | TN↓PSA-Gruppe | 0,42 | 35,71 | | |
| BBN-35L | 52 | Tumor negativ | TN↓PSA-Gruppe | 0,63 | 49,21 | | |
| BBN-36L | 57 | Tumor negativ | TN↓PSA-Gruppe | 0,82 | 21,95 | | |
| BBN-37L | 55 | Tumor negativ | TN↓PSA-Gruppe | 0,83 | 24,1 | | |
| BBN-38R | 65 | Tumor negativ | TN↓PSA-Gruppe | 0,5 | NA | | |
| BBN-39L | 63 | Tumor negativ | TN↓PSA-Gruppe | 0,69 | 34,78 | | |
| BBN-4 | 51 | Tumor negativ | TN↓PSA-Gruppe | 0,45 | 37,87 | | |

| | | | | | | | |
|----------|----|----------------|---------------|-------|-------|------|-----|
| BBN-40L | 64 | Tumor negativ | TN↓PSA-Gruppe | 0,86 | 27,91 | | |
| BBN-41L | 55 | Tumor negativ | TN↓PSA-Gruppe | 1,1 | 25,45 | | |
| SBN-109L | 80 | Tumor negativ | TN↑PSA-Gruppe | 20,54 | 12,37 | | |
| SBN-112L | 64 | Tumor negativ | TN↑PSA-Gruppe | NA | NA | | |
| SBN-125R | 53 | Tumor negativ | TN↑PSA-Gruppe | 6,04 | 10,6 | | |
| SBN-143L | 65 | Tumor negativ | TN↑PSA-Gruppe | 3,52 | 26,14 | | |
| SBN-181R | 52 | Tumor negativ | TN↑PSA-Gruppe | 8,15 | 18,53 | | |
| SBN-192L | 66 | Tumor negativ | TN↑PSA-Gruppe | 6,28 | 30,89 | | |
| SBN-198L | 65 | Tumor negativ | TN↑PSA-Gruppe | 13,39 | 29,42 | | |
| SBN-203R | 65 | Tumor negativ | TN↑PSA-Gruppe | 3,05 | 31,15 | | |
| SBN-205L | 57 | Tumor negativ | TN↑PSA-Gruppe | 5,32 | 22,37 | | |
| SBN-206R | 77 | Tumor negativ | TN↑PSA-Gruppe | NA | NA | | |
| SBN-51 | 71 | Tumor negativ | TN↑PSA-Gruppe | 3,05 | 9,18 | | |
| SBN-66 | 70 | Tumor negativ | TN↑PSA-Gruppe | 7,52 | 23,94 | | |
| SBN-74 | 71 | Tumor negativ | TN↑PSA-Gruppe | 10,46 | 18,36 | | |
| SBN-77 | 60 | Tumor negativ | TN↑PSA-Gruppe | 6,4 | 19,69 | | |
| SBN-79 | 60 | Tumor negativ | TN↑PSA-Gruppe | 6,36 | 17,45 | | |
| SBN-91R | 57 | Tumor negativ | TN↑PSA-Gruppe | 6,48 | 16,67 | | |
| SBN-94L | 68 | Tumor negativ | TN↑PSA-Gruppe | 20,63 | 13,62 | | |
| CBN-114R | 64 | Tumor positiv | TP-Gruppe | NA | NA | pT2c | 3+4 |
| CBN-117R | 65 | Tumor positiv | TP-Gruppe | 6,02 | 10,3 | pT3a | 3+4 |
| CBN-128R | 60 | Tumor positiv | TP-Gruppe | NA | NA | pT2c | 3+4 |
| CBN-140R | 52 | Tumor positiv | TP-Gruppe | 8,77 | 8,32 | pT2c | 3+4 |
| CBN-143L | ? | Tumor positiv | TP-Gruppe | 3,34 | 15,27 | pT3a | 3+3 |
| CBN-145L | 57 | Tumor positive | TP-Gruppe | 5,46 | 20,88 | pT2c | 3+3 |
| CBN-148L | 53 | Tumor positiv | TP-Gruppe | 3,04 | 15,46 | pT2c | 3+4 |
| CBN-149R | 62 | Tumor positiv | TP-Gruppe | 9,11 | 9,77 | pT2c | 3+3 |
| CBN-152R | 63 | Tumor positiv | TP-Gruppe | 9,38 | 6,18 | pT2c | 3+3 |
| CBN-154R | 66 | Tumor positiv | TP-Gruppe | 12,27 | 14,83 | pT3b | 3+4 |
| CBN-155R | 57 | Tumor positiv | TP-Gruppe | 24,17 | 28,71 | pT2c | 3+3 |
| CBN-156R | 66 | Tumor positiv | TP-Gruppe | 3,7 | 12,16 | pT2c | 3+4 |
| CBN-157R | 65 | Tumor positiv | TP-Gruppe | 6,2 | 4,52 | pT2c | 3+4 |
| CBN-161L | 54 | Tumor positiv | TP-Gruppe | 9,53 | 5,14 | pT2a | 4+3 |
| CBN-162R | 58 | Tumor positiv | TP-Gruppe | 17,98 | 13,24 | pT3a | 4+3 |
| CBN-164L | 53 | Tumor positiv | TP-Gruppe | 5,52 | 13,22 | pT2c | 3+4 |
| CBN-166L | 62 | Tumor positiv | TP-Gruppe | 4,48 | 7,81 | pT2a | 3+4 |
| CBN-167R | 70 | Tumor positiv | TP-Gruppe | 3,56 | 18,82 | pT2c | 3+3 |
| CBN-171R | 58 | Tumor positiv | TP-Gruppe | 6,48 | 6,48 | pT2c | 3+4 |
| CBN-175R | 65 | Tumor positiv | TP-Gruppe | 16,71 | 6,1 | pT2a | 4+4 |
| CBN-176L | 71 | Tumor positiv | TP-Gruppe | 6,19 | 16,16 | pT2c | 3+3 |
| CBN-178L | 54 | Tumor positiv | TP-Gruppe | 7,31 | 7,8 | pT2c | 3+4 |
| CBN-40R | 64 | Tumor positiv | TP-Gruppe | 18,22 | 9,22 | NA | NA |
| CBN-46R | 64 | Tumor positiv | TP-Gruppe | 7,97 | 7,28 | pT2c | 4+3 |

| | | | | | | | |
|---------|----|---------------|-----------|-------|-------|------|-----|
| CBN-53L | 69 | Tumor positiv | TP-Gruppe | 4,68 | 22,86 | pT3b | 3+4 |
| CBN-59L | 62 | Tumor positiv | TP-Gruppe | 7,85 | 6,62 | pT2c | 3+4 |
| CBN-65L | 64 | Tumor positiv | TP-Gruppe | 5,75 | 9,91 | pT2c | 3+3 |
| CBN-70L | 62 | Tumor positiv | TP-Gruppe | 6,45 | 7,91 | pT2c | 3+4 |
| CBN-73R | 47 | Tumor positiv | TP-Gruppe | NA | NA | pT2c | 3+4 |
| CBN-74R | 65 | Tumor positiv | TP-Gruppe | 4,02 | 16,92 | pT2c | 3+4 |
| CBN-75L | 62 | Tumor positiv | TP-Gruppe | 9,82 | 9,06 | pT2c | 3+4 |
| CBN-86L | 55 | Tumor positiv | TP-Gruppe | 8,39 | 7,63 | pT2c | 3+3 |
| CBN-87R | 59 | Tumor positiv | TP-Gruppe | 10,62 | 10,73 | pT2c | 3+4 |
| CBN-88L | 66 | Tumor positiv | TP-Gruppe | 13,99 | 14,51 | pT2c | 3+4 |

Tabelle 3: Proben mit histopathologischen Daten
(NA = nicht analysiert; Tumorstadium bei Nachweis von Tumor in Biopsien und nachfolgend durch Prostatektomie histopathologisch bestimmt)

3.3. RNA und Micro-RNA-Isolierung

a) Material für die RNA- und Micro-RNA-Isolierung

Benötigte Chemikalien:

- RNase Zap (Sigma, München, Deutschland, Mat. Nr. R2020-250 ml),
- 70% EthOH (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- 100% EthOH (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Proteinase K (20mg/ml) (Qiagen, Hilden, Deutschland, Mat. Nr. 19131)

Kits

- RNeasy mini Kit (Qiagen, Hilden, Mat. Nr. 74103) mit Protokoll RNeasy mini protocol for Isolation of Total RNA from Heart, Muscle and Skin Tissue
- DNase I-Set (RNase frei) (Qiagen, Hilden, Deutschland, Mat. Nr. 79254)
- RNA 6000 Pico Kit, Agilent Technologies Böblingen, Deutschland, Mat. Nr. 5067-1513

Inhalt: Mikrochips, Spritzenset, Elektrodenreiniger, Reagenzien-Set (bestehend aus RNA 6000 Pico Dye Concentrate, RNA 6000 Pico Marker, RNA 6000 Pico Conditioning Solution, RNA 6000 Pico Gel Matrix, RNA 6000 Pico Ladder)

Materialien

- RNeasy Minelute Spin Column, Qiagen Hilden Mat. Nr. 74204
- Omnitips (autoklaviert), Eppendorf
- 50 ml Falcon Röhrchen
- RNase-freie autoklavierte 1,5 ml Eppis, Eppendorf 0030120086
- RNase-freie autoklavierte 2 ml Eppis, Eppendorf 0030120094
- Sterile Pinzetten
- Sterile 5-ml Kryoröhrchen, Nunc
- RNasefreier Zellstoff
- Becherglas mit Aqua bid.
- Eisbad
- Wasserbad

Geräte

- Agilent 2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland
- Rotorstator Omni TH International TH220

b) Durchführung der RNA- und Micro-RNA Isolierung

Alle Arbeitsflächen und Pipettenschäfte werden vor mit RNase Zap gereinigt und der Rotorstator wird mit 70% EthOH gereinigt. Die Proteinkinase wird ins Eisbad gestellt und das Wasserbad auf 55°C vorgewärmt. Der Zellstoff wird vier Stunden in einem Backofen bei 180°C backen und wird somit RNasefrei.

Die Elution der Gesamt-RNA erfolgte nach dem Manual RNeasy micro Handbook von Qiagen (04/2003). Zur Isolierung von Micro-RNA wird der Durchfluss der ersten Zentrifugation der RNeasy-Säulchen aufbewahrt, mit 3xVol EthOH abs. versetzt, in ein neues Säulchen appliziert und dann nach Herstellerangaben zentrifugiert. Die weitere Aufreinigung und schlussendliche Elution der Micro-RNA erfolgt dann auf dieselbe Weise wie für Gesamt-RNA vom Hersteller beschrieben.

Jeweils ein Microliter der auf Eis gekühlten Eluate werden zur Messung der

gewonnenen Gesamt-Micro-RNA Gelelektrophoresen mit dem Agilent RNA 6000 Pico Kit (Agilent Technologies, Mat. Nr. 5067-1513) (s. Manual von Agilent Technologies.) unterzogen. Die eluierte Micro-RNA wird bei – 80°C tiefgefroren.

3.4. c-DNA Herstellung

a) Material für die c-DNA Herstellung

- High-Capacity cDNA archive Kit (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland Mat. Nummer 4368813)
- Micro-RNA-spezifische RT-Primer (Auswahl der μ RNAs s. u.; Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) aus folgenden Sets:
 - -TaqMan MicroRNA Assay hsa-miR-187 Part.No.:4373111
 - TaqMan MicroRNA Assay hsa-miR-185Part.No.:4373181
 - TaqMan MicroRNA Assay RNU 44 Part.No.:4373384
 - -TaqMan MicroRNA Assay RNU 48 Part.No.:4373383
 - TaqMan MicroRNA Assay hsa-miR-124a Part.No.:4373150
 - TaqMan MicroRNA Assay hsa-miR-146b Part.No.:4373178
 - TaqMan MicroRNA Assay hsa-let-7b Part.No.:4373168
 - TaqMan MicroRNA Assay hsa-miR-16 Part.No.:4373121
 - TaqMan MicroRNA Assay hsa-miR-146b Part.No.:4373132
 - TaqMan MicroRNA Assay hsa-let-7a Part.No.:4373169
- Eppendorf-Caps (2 ml), Eppendorf, Mat. Nummer 0030120094
- Thermocycler PTC 100 MJ Research
- Micro-RNA aus dem oben genannten Protokoll

b) Durchführung der c-DNA-Herstellung

Micro-RNA wurde per Reverser Transkription mit spezifischen Primern für ausgewählte Micro-RNAs (s. u.) quantitativ in copy-DNA (cDNA) übersetzt. Der c-DNA-Synthesemix wird auf Eis unter Verwendung des High-Capacity cDNA archive Kits und den jeweiligen RT-Primern (s.o.) angefertigt. 15µl-Einzelansätze werden wie folgt zusammengestellt:

- 1,5µl RT-Puffer
- 0,15 µl dNTPs(100mM)
- 1µl MultiScribe RT Enzym (50 U/µl)
- 0.188µl RNase-Inhibitor (20 U/µl)
- 4,162 µl DEPC-Wasser
- 3µl µRNA-spez. RT Primer

Dann wird pro Ansatz jeweils 5µl Micro-RNA hinzugefügt.

Die Ansätze ruhen 5 Minuten bei 4°C. Im Thermocycler PTC 100 MJ Research werden die Ansätze erst in 30 Minuten bei 16°C, dann 30 Minuten bei 42°C und dann 5 Minuten bei 85°C inkubiert und auf 4°C heruntergekühlt.

Die Ansätze können bis zur Verwendung bei -20° gelagert werden.

3.5. Durchführung der Quantitative Real-Time - PCR mit Micro-RNA-Quantifizierungs-Assays von AB

Zur Quantifizierung revers transkribierter Micro-RNAs mittels Real-Time-PCR wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen;

Es werden pro zu quantifizierender Micro-RNA jeweils 20µl PCR-Ansätze mit folgender Zusammensetzung hergestellt:

- 2,5µl cDNA aus Micro-RNA-RT
- 10µl TaqMan Universal PCR Master Mix Applied Biosystems Part.No. 4324018
- 2µl TaqMan Quantifizierungsassays aus den jeweiligen folgenden Assays (Applied Biosystems, Darmstadt)

- TaqMan MicroRNA Assay hsa-miR-187 Part.No.:4373111
- TaqMan MicroRNA Assay hsa-miR-185Part.No.:4373181
- TaqMan MicroRNA Assay RNU 44 Part.No.:4373384
- TaqMan MicroRNA Assay RNU 48 Part.No.:4373383
- TaqMan MicroRNA Assay hsa-miR-124a Part.No.:4373150
- TaqMan MicroRNA Assay hsa-miR-146b Part.No.:4373178
- TaqMan MicroRNA Assay hsa-let-7b Part.No.:4373168
- TaqMan MicroRNA Assay hsa-miR-16 Part.No.:4373121
- TaqMan MicroRNA Assay hsa-miR-146b Part.No.:4373132
- TaqMan MicroRNA Assay hsa-let-7a Part.No.:4373169
- 5,5µl Aqua bidest

Die PCR erfolgte auf dem Real-Time PCR Gerät HT 7900 von Applied Biosystems

Laufbedingungen:

- Taq-DNA-Polymerase Aktivierung bei 95 °C (10 Minuten), dann:
- 40 Cyclen der folgenden Routine:
- 95°C; 15 Sekunden
- 60°C; 1 Minute
- Messung
- Abschließend Abkühlung auf 4°C

3.6. Quantitative Real Time PCR

Die Real-Time PCR visualisiert in Echtzeit den Vorgang der Amplifikation spezifischer DNA-Bereiche mittels Polymerasekettenreaktion (PCR). Dies ermöglicht deren Quantifizierung. In der vorliegenden Arbeit kam zur Real-Time-PCR das Taq-Man-Prinzip von Applied Biosystems zur Anwendung, das im Folgenden kurz beschrieben wird (siehe auch Abbildung 3).

Neben der Taq-DNA-Polymerase, Reaktionspuffer, dNTPs (Nukleotide = desoxynucleotidetriphosphates) und den Primern, welche den zu amplifizierenden DNA-Bereich flankieren, befinden sich fluoreszenzmarkierte Sonden in den Ansätzen, die innerhalb des zu amplifizierenden DNA-Bereichs binden. Die Taqman-Sonde besitzt ein Fluorochrom am 5'-Ende (Reporter) und ein Fluorochrom am 3'-Ende (Quencher).

Der Reporter wird durch eine Lichtquelle im Cycler angeregt - die Fluoreszenz wird jedoch zunächst von dem in der Nähe befindlichen Quencher aufgenommen (dieses Prinzip nennt man Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)). Die reaktive Abgabe eines Lichtsignals (Fluoreszenz) wird somit unterbunden.

Bei jeder Polymerisationsphase des PCR-Zyklus werden die Primer durch die Taq-DNA-Polymerase elongiert und die 3'-wärts des Primers gelegene, spezifisch bindende Sonde (Quencher) hydrolytisch abgebaut.

Durch den Abbau und die zunehmende Entfernung des Reporters zum Quencher werden die Fluoreszenzsignale des Reporters nun freigesetzt, die dann in Echtzeit von einem optischen Messinstrument im Gerät gemessen werden können.

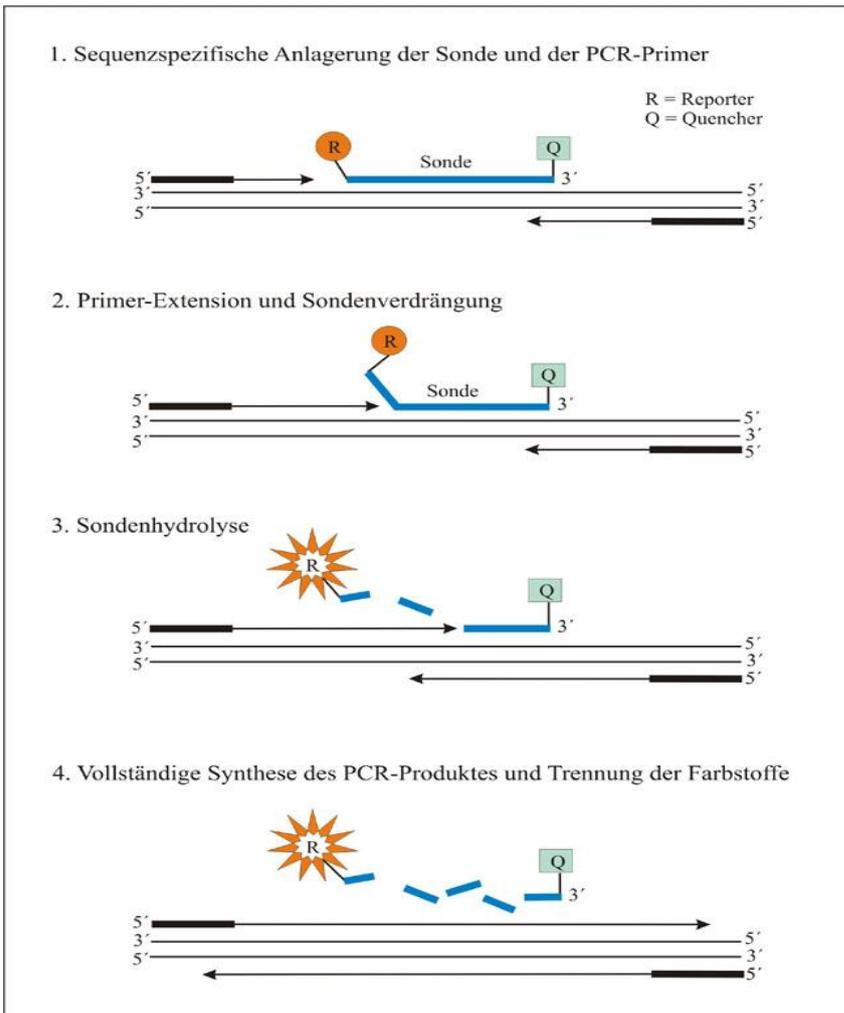


Abb. 4: Schematische Darstellung Real-Time-PCR (Quelle: edoc.hu-berlin.de/.../jacob_html_m30da979.jpg)

3.7. Relative Quantifizierung mittels delta-delta-Ct-Methode

Bei der relativen Quantifizierung werden nicht die absoluten Startkopiezahlen oder Konzentrationen bestimmt, sondern die Expression des zu untersuchenden (Micro-RNA-) Transkripts bezogen auf ein oder mehrere andere, physiologisch grundlegende und daher gleichmäßig exprimierte, möglichst unregulierte Transkripte (oft auch als Housekeeping-Gene [HKG] bezeichnet). In dieser Arbeit wurden RNU 44 und RNU 48 als HKG herangezogen.

Der Vorteil dieser Methode ist die Reduzierung der Varianz der Expressionsergebnisse, weil Gewebe und Matrixeffekte sowie Fehler der Reversen Transkription innerhalb einer experimentellen Probe gleichermaßen Zieltranskript und HKG betreffen.

Der Ct-Wert (Cycle threshold) stellt den frühesten Zyklus dar, ab dem eine zweifelsfreie Fluoreszenzzunahme feststellbar ist. Zu diesem Zeitpunkt (in der exponentiellen Phase der PCR) herrschen annähernd optimale PCR-Bedingungen; Substrate und Primer liegen in optimalen Konzentrationen vor und die Taq-DNA-Polymerase ist voll funktionstüchtig (Pfaffl, <http://pathmicro.med.sc.edu/pcr/realtime-home.htm>). Dies ist der Punkt, an der sich der Amplifikationsvorgang der idealen Funktion 2^n annähert. Die Funktion 2^n (wobei n = PCR-Zykluszahl) beschreibt mathematisch die Verdopplung des amplifizierten DNA-Fragments mit jedem PCR-Zyklus. In dieser Phase ist eine korrekte Quantifizierung möglich.

In der vorliegenden Arbeit wird die delta-delta-Ct-Methode für die Auswertung angewendet. Hierbei bildet man für jedes Micro-RNA-Transkript zunächst die Differenz der jeweiligen Ct-Werte von denen der internen Kontrollen RNU 44 und 48. Diese ergeben zunächst delta-Ct Werte.

Diese Werte werden anschließend auf die entsprechende Delta-Ct-Mediane der gesunden Kontrollgruppe (TN-↓PSA-Gruppe) durch Subtraktion normalisiert und ergeben den delta-delta-Ct-Wert. In die PCR-Funktion eingesetzt ($2^{(\text{delta-delta-Ct})}$), ergibt sich somit in den jeweiligen Gewebeproben für jede Micro-RNA die x-fache Expression im Vergleich zur medianen Expression in der gesunden Kontrollgruppe (TN-↓PSA Gruppe).

3.8. Statistische Evaluation

Jedes Experiment wurde in Duplikaten erstellt. Aufgrund weitgehender nichtparametrischer Verteilungsmuster der Ergebnisse wurden nichtparametrische statistische Tests angewendet. Zur Untersuchung, inwiefern Expressionsunterschiede der untersuchten Micro-RNAs zwischen den Kollektiven signifikant waren, wurden Mann-Whitney-U-tests (bei zwei-Gruppen-Vergleichen) bzw. and Kruskal-Wallis-Tests (bei drei-Gruppen-Vergleichen) angewendet. Als Signifikanzgrenze wurde $p < 0,05$ gesetzt.

Die statistischen Berechnungen wurden EDV-gestützt unter Verwendung der Programme Microsoft Excel (Microsoft) und SPSS durchgeführt.

4. Ergebnisse

Micro-RNA-Expression

Zusammenfassend zeigten sich signifikante Expressionsunterschiede bei sieben untersuchten Micro-RNAs (miR-124a, miR-146a und b, miR-185, miR-16 and let-7a und b) zwischen Tumorpositivem und den beiden tumornegativen Kollektiven. Allein die Expression von miR-187 zeigte keine signifikanten Unterschiede.

Beim diagnostisch relevanten Vergleich der TP-Gruppe mit der TN \uparrow PSA-Gruppe zeigten sich bei vier Micro-RNAs signifikante Expressionsunterschiede: miR-185, miR-16, let-7a und let-7b (s. Abb. 9 bis 12). Hier zeigt sich eine deutliche Herunterregulierung in der TP-Gruppe im Vergleich zu der TN- \uparrow PSA-Gruppe.

Im Folgenden werden tabellarisch die Werte zusammenfassend in 2 Gruppen dargestellt. In der ersten Gruppe werden die Micro-RNAs dargestellt, die in den diagnostisch relevanten Vergleichsgruppen TN \uparrow -PSA und TP-Gruppe keine signifikanten Expressionsunterschiede aufzeigen. In der zweiten Gruppe werden die Micro-RNAs gezeigt, welche in den diagnostisch relevanten Gruppen Expressionsunterschiede aufweisen. Dargestellt sind in den folgenden Tabellen und Abbildungen die einzelnen RQ-Werte Micro- RNAs.

Die RQ-Werte (Relative Quantification) sind zu verstehen als die x-fache Expression im Vergleich zu der Expression der TN- \downarrow PSA Gruppe.

4.1. Micro-RNAs miR-124a, miR-146a, miR-146b, miR-187

Die Expressionsergebnisse werden im Folgenden in den Boxplots dargestellt. Die einzelnen Werte sowie die Ausreißerwerte der Boxplots kann man der Tabelle 4 durch die entsprechende Nummerierung entnehmen. Einen zusammenfassenden Überblick gibt Tabelle 5. Die diagnostisch relevante TN \uparrow -PSA und TP-Gruppe werden von einer roten Umrahmung markiert.

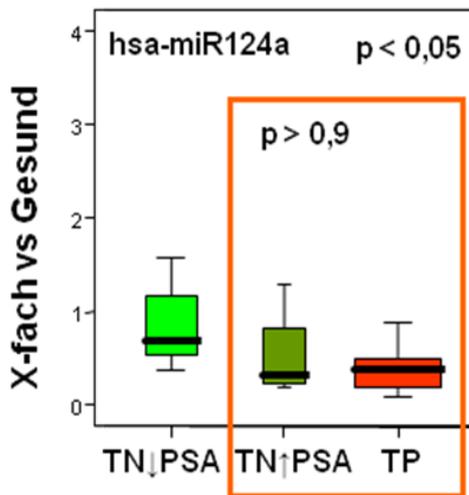


Abb.5: miR-124a

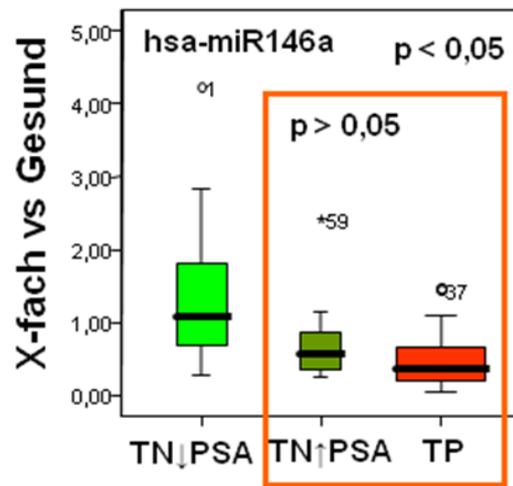


Abb. 6: miR-146a

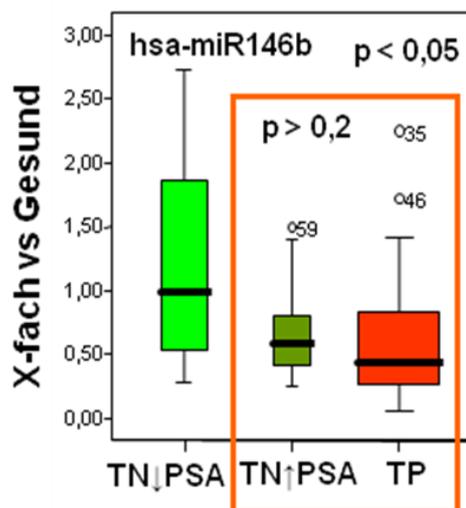


Abb. 7: miR-146b

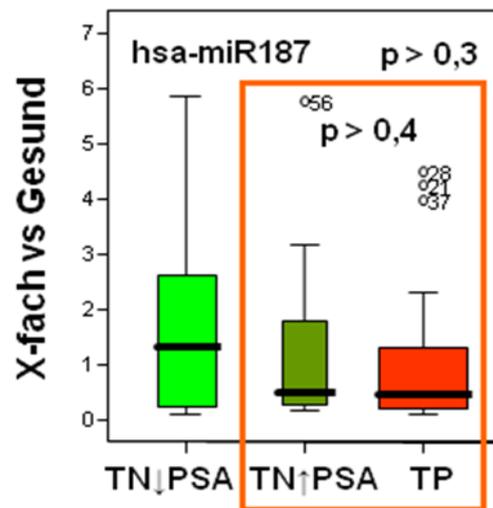


Abb. 8: miR-187

Die Abbildungen 5 – 12 stellen die Herabregulierung der Micro-RNAs dar im Vergleich der tumorpositiven Gruppe zu den tumornegativen Kollektiven. Im direkten Vergleich der diagnostisch relevanten Kollektive (s. roter Markierung) zeigen sich in Abb. 5 - 7 keine signifikanten Unterschiede. Abb. 8 zeigt die Expression von mir-187. Die folgende Tabelle zeigt die einzelnen RQ-Werte.

| | Gruppe | ID | miR-124a | miR-146a | miR-146b | miR-187 |
|----|----------------|----------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 1 | TN-↓PSA Gruppe | BBN-12 | | 4,223745639 | 2,730776794 | 2,129859133 |
| 2 | TN-↓PSA Gruppe | BBN-13 | 0,371362626 | 0,364695728 | 0,374090996 | 2,576187795 |
| 3 | TN-↓PSA Gruppe | BBN-15 | | 1,217786906 | 0,834374023 | 2,187745265 |
| 4 | TN-↓PSA Gruppe | BBN-16 | 0,58485151 | 0,706581291 | 0,539401858 | 1,167196542 |
| 5 | TN-↓PSA Gruppe | BBN-17 | 11,71059956 | 1,076354048 | 0,977165035 | 4,504449385 |
| 6 | TN-↓PSA Gruppe | BBN-18 | 0,678238594 | 2,494548045 | 1,858767593 | 0,216847019 |
| 7 | TN-↓PSA Gruppe | BBN-19 | | 0,370960622 | 0,509730257 | 0,178512687 |
| 8 | TN-↓PSA Gruppe | BBN-32R | | 0,386872733 | 0,455115428 | 0,157003814 |
| 9 | TN-↓PSA Gruppe | BBN-33L | | 0,703719773 | 1,010369782 | 0,312845556 |
| 10 | TN-↓PSA Gruppe | BBN-34R | 0,785977291 | 1,809043634 | 2,394539355 | 0,095677816 |
| 11 | TN-↓PSA Gruppe | BBN-36L | | 1,279329782 | 1,138527112 | 18,37815792 |
| 12 | TN-↓PSA Gruppe | BBN-37L | 0,469381061 | 1,898918787 | 1,574903189 | 5,852738273 |
| 13 | TN-↓PSA Gruppe | BBN-38R | 1,5712996 | 0,679080004 | 0,892022742 | 1,325791138 |
| 14 | TN-↓PSA Gruppe | BBN-39L | | 2,837171687 | 2,617555083 | 5,796688717 |
| 15 | TN-↓PSA Gruppe | BBN-4 | | 0,286160997 | 0,289711508 | 0,941624338 |
| 16 | TN-↓PSA Gruppe | BBN-40L | | 1,264361014 | 2,0791054 | 0,472490267 |
| 17 | TN-↓PSA Gruppe | BBN-41L | | 0,908174671 | 0,846047546 | 0,236825488 |
| 18 | TP-Gruppe | CBN-114R | | 0,174358724 | 0,299707252 | 1,518077048 |
| 19 | TP-Gruppe | CBN-117R | | 0,358897606 | 0,253291689 | 1,071485825 |
| 20 | TP-Gruppe | CBN-128R | | 0,32845718 | 0,229664639 | 0,603983802 |
| 21 | TP-Gruppe | CBN-140R | 0,081112259 | 1,463767538 | 1,143583649 | 4,267533607 |
| 22 | TP-Gruppe | CBN-143L | | 0,393069875 | 0,420015114 | 0,089058787 |
| 23 | TP-Gruppe | CBN-145L | | 0,186450388 | 0,239220536 | 0,07892733 |
| 24 | TP-Gruppe | CBN-148L | 0,18530411 | 0,350225238 | 0,349366552 | 0,279667306 |
| 25 | TP-Gruppe | CBN149R | 0,466265886 | 0,120185642 | 0,266773339 | 0,181087016 |
| 26 | TP-Gruppe | CBN-152R | | 0,351056758 | 0,3479831 | 0,101374188 |
| 27 | TP-Gruppe | CBN-154R | 0,338422709 | 0,244890796 | 0,847526508 | 0,466561289 |
| 28 | TP-Gruppe | CBN-155R | | 0,472668689 | 0,667031661 | 4,507205611 |
| 29 | TP-Gruppe | CBN-156R | | 0,278738503 | 0,370949229 | 0,688613689 |
| 30 | TP-Gruppe | CBN-157R | 0,372635825 | 0,298199441 | 0,498132656 | 1,192702321 |
| 31 | TP-Gruppe | CBN-161L | 0,746570825 | 0,051331392 | 0,060668739 | |
| 32 | TP-Gruppe | CBN-162R | | 0,409528555 | 0,707132708 | 0,343380023 |
| 33 | TP-Gruppe | CBN-166L | 0,105871544 | 0,999118329 | 1,147787364 | 0,105665551 |
| 34 | TP-Gruppe | CBN-171R | 0,374461755 | 0,501083506 | 0,535502196 | 0,298959718 |
| 35 | TP-Gruppe | CBN-175R | | 1,474202751 | 2,252569153 | 0,198989197 |
| 36 | TP-Gruppe | CBN-178L | | 0,720409048 | 0,826844618 | 0,213599291 |
| 37 | TP-Gruppe | CBN-40R | 0,394976654 | 1,439262713 | 0,876820174 | 3,971414694 |
| 38 | TP-Gruppe | CBN-46R | | 0,264691992 | 0,316710674 | 0,716408577 |
| 39 | TP-Gruppe | CBN-47L | 0,498417381 | 0,255316195 | 0,585248768 | 2,308222046 |

| | | | | | | |
|----|----------------|----------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 40 | TP-Gruppe | CBN-53L | | 0,205609304 | 0,333027195 | 1,444315592 |
| 41 | TP-Gruppe | CBN-59L | | 0,185579751 | 0,260473976 | 0,728812326 |
| 42 | TP-Gruppe | CBN-65L | 0,564113468 | 0,966453654 | 1,147578144 | 0,194741534 |
| 43 | TP-Gruppe | CBN-73R | 0,878682755 | 0,191051628 | 0,1664071 | 0,195679837 |
| 44 | TP-Gruppe | CBN-74R | 0,304237846 | 1,061972719 | 1,413401796 | 0,258395216 |
| 45 | TP-Gruppe | CBN-75L | | 0,149219006 | 0,156269664 | 0,197940367 |
| 46 | TP-Gruppe | CBN-86L | | 1,10239191 | 1,723190435 | 0,424468313 |
| 47 | TP-Gruppe | CBN-87R | | 0,596782839 | 0,531457745 | 1,39978962 |
| 48 | TP-Gruppe | CBN-88L | 0,12234184 | 0,212056257 | 0,204797342 | 1,307653687 |
| 49 | TN-↑PSA-Gruppe | SBN-109L | | 0,488370075 | 0,431295224 | 0,682586726 |
| 50 | TN-↑PSA-Gruppe | SBN-112L | | 0,627180433 | 0,41322871 | 0,320530493 |
| 51 | TN-↑PSA-Gruppe | SBN-125R | | 0,3629783 | 0,463319288 | 0,289381333 |
| 52 | TN-↑PSA-Gruppe | SBN-181R | 0,188111315 | 0,666811646 | 0,38489615 | 1,044095564 |
| 53 | TN-↑PSA-Gruppe | SBN-192L | 0,331634335 | 0,344556375 | 0,342641047 | 1,789808227 |
| 54 | TN-↑PSA-Gruppe | SBN-198L | | 1,148274015 | 1,404643868 | 3,161158809 |
| 55 | TN-↑PSA-Gruppe | SBN-203R | | 0,355523531 | 0,591096219 | 2,910048131 |
| 56 | TN-↑PSA-Gruppe | SBN-206R | | 0,501468751 | 0,814173769 | 5,786444953 |
| 57 | TN-↑PSA-Gruppe | SBN-51 | 0,272215012 | 0,867337989 | 0,699688239 | 0,263856744 |
| 58 | TN-↑PSA-Gruppe | SBN-66 | | 0,293739606 | 0,245632037 | 0,174456864 |
| 59 | TN-↑PSA-Gruppe | SBN-74 | | 2,413199947 | 1,495735313 | 0,216839729 |
| 60 | TN-↑PSA-Gruppe | SBN-77 | 1,292524866 | 0,693578559 | 0,916718471 | 0,362418063 |
| 61 | TN-↑PSA-Gruppe | SBN-79 | | 0,886322078 | 0,783802129 | 0,567468224 |
| 62 | TN-↑PSA-Gruppe | SBN-91R | | 0,256192688 | 0,561298126 | 0,36339734 |

Tabelle 4: RQ-Werte miR-124a, miR-146a, miR-146b und miR-187

Eine zusammenfassende Tabelle wird folgend dargestellt.

N zeigt die Anzahl der Proben mit vorhandenen Expressionswerten.

| Zusammenfassung [RQ-Werte] | | | miR-124a | miR-146a | miR-146b | miR-187 |
|----------------------------|-------------------|---------|----------|----------|----------|---------|
| TN-↓PSA Gruppe | N | Gültig | 7 | 17 | 17 | 17 |
| | | Fehlend | 10 | 0 | 0 | 0 |
| | Median | | 0,6782 | 1,0764 | 0,9772 | 1,1672 |
| | Varianz | | 17,337 | 1,116 | 0,657 | 19,937 |
| | Spannweite | | 11,34 | 3,94 | 2,44 | 18,28 |
| TN-↑PSA-Gruppe | N | Gültig | 4 | 14 | 14 | 14 |
| | | Fehlend | 10 | 0 | 0 | 0 |
| | Median | | 0,3019 | 0,5643 | 0,5762 | 0,4654 |
| | Varianz | | 0,268 | 0,308 | 0,144 | 2,666 |
| | Spannweite | | 1,10 | 2,16 | 1,25 | 5,61 |
| TP-Gruppe | N | Gültig | 14 | 31 | 31 | 30 |
| | | Fehlend | 17 | 0 | 0 | 1 |
| | Median | | 0,3735 | 0,3502 | 0,4200 | 0,4455 |
| | Varianz | | 0,055 | 0,179 | 0,255 | 1,532 |
| | Spannweite | | 0,80 | 1,42 | 2,19 | 4,43 |

Tabelle 5: Zusammenfassung miR-124a, miR-146a, miR-146b und miR-187

4.2. Micro-RNAs let-7a, let-7b, miR-16, miR-185

Die folgenden Boxplots stellen Expressionswerte der Micro-RNAs aus Tabelle 6 auf einen Blick dar. Die rote Umrandung zeigt die diagnostisch relevanten Gruppen TN \uparrow -PSA und TP-Gruppe. Auch in dieser Darstellung kann man die Ausreißerwerte der Nummerierung in Tabelle 6 folgen.

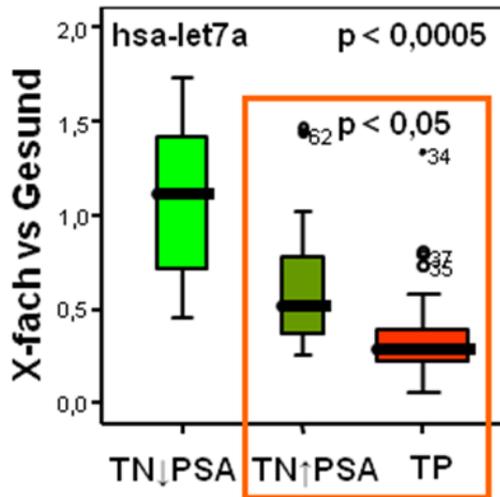


Abb. 9: let-7a

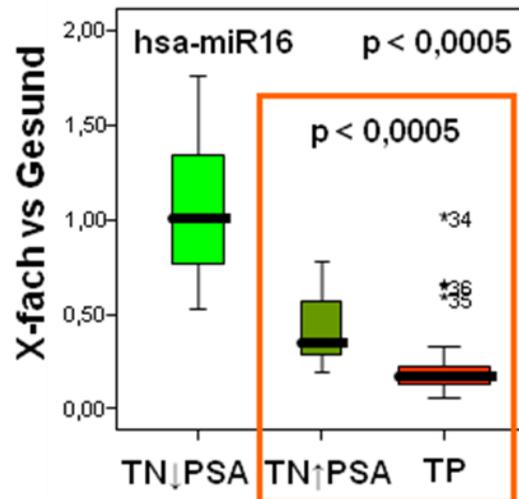


Abb. 10: miR-16

In den Abbildungen 9 – 12 zeigen sich die Micro-RNAs, die bei dem Vergleich der diagnostisch relevanten Gruppen (rote Markierung) eine unterschiedliche Expression vorweisen.

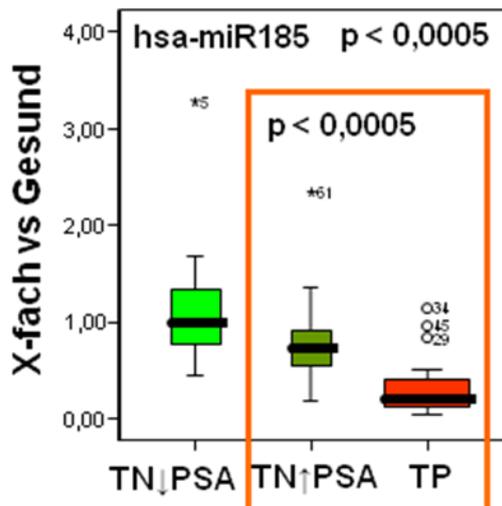


Abb. 11: miR-185

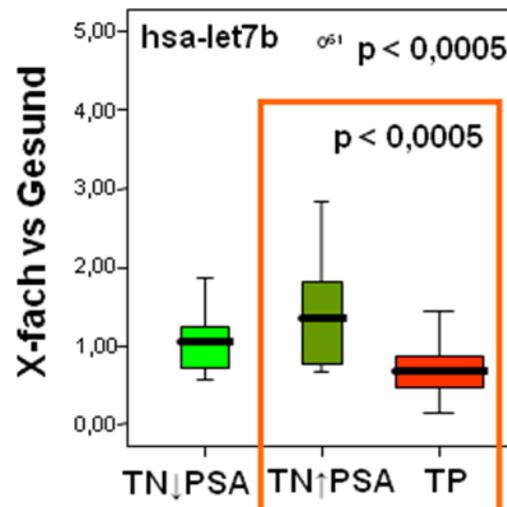


Abb.12: let-7b

Die folgende Tabelle 6 zeigt die RQ-Werte der Micro-RNAs let-7a, let-7b, miR-16, miR-185.

| | Gruppe | ID | let-7a | let-7b | miR-16 | miR-185 |
|----|----------------|-----------|---------------|---------------|---------------|----------------|
| 1 | TN-↓PSA Gruppe | BBN-12 | 1,733917563 | 1,865057377 | 1,562646761 | 1,354886403 |
| 2 | TN-↓PSA Gruppe | BBN-13 | 0,803047961 | 1,041580803 | 1,324255904 | 0,737197021 |
| 3 | TN-↓PSA Gruppe | BBN-15 | 0,718778449 | 0,557265121 | 0,944476261 | 0,910105468 |
| 4 | TN-↓PSA Gruppe | BBN-16 | 0,574018369 | 0,658586806 | 0,789391118 | 0,973098935 |
| 5 | TN-↓PSA Gruppe | BBN-17 | 0,912665473 | 0,969562809 | 1,602586736 | 3,272473812 |
| 6 | TN-↓PSA Gruppe | BBN-18 | 0,624215163 | 0,607507875 | 0,713906573 | 0,447382862 |
| 7 | TN-↓PSA Gruppe | BBN-19 | 0,699786049 | 0,704191645 | 0,638063623 | 0,752830455 |
| 8 | TN-↓PSA Gruppe | BBN-32R | 1,458284604 | 1,463885296 | 0,5272356 | 0,435461294 |
| 9 | TN-↓PSA Gruppe | BBN-33L | 1,589232618 | 1,585464434 | 1,006246448 | 1,116880936 |
| 10 | TN-↓PSA Gruppe | BBN-34R | 0,977502338 | 1,087748302 | 0,7669516 | 0,521416682 |
| 11 | TN-↓PSA Gruppe | BBN-36L | 1,243989285 | 1,228923631 | 1,385546319 | 1,322488472 |
| 12 | TN-↓PSA Gruppe | BBN-37L | 1,28247665 | 0,82466939 | 1,749927244 | 0,887033285 |
| 13 | TN-↓PSA Gruppe | BBN-38R | 1,421955985 | 1,157864166 | 1,034208589 | 1,320548599 |
| 14 | TN-↓PSA Gruppe | BBN-39L | 1,44165735 | 0,93414442 | 1,334202538 | 0,982635589 |
| 15 | TN-↓PSA Gruppe | BBN-4 | 0,453449505 | 0,657111235 | 0,620752121 | 1,216785104 |
| 16 | TN-↓PSA Gruppe | BBN-40L | 1,165275278 | 1,660425524 | 1,048046836 | 1,306659641 |
| 17 | TN-↓PSA Gruppe | BBN-41L | 1,115266551 | 1,119939473 | 1,002559556 | 1,671151058 |
| 18 | TP-Gruppe | CBN-114R | 0,271796128 | 0,145140044 | 0,281342457 | 0,13281918 |
| 19 | TP-Gruppe | CBN-117R | 0,124089853 | 0,418341859 | 0,080410011 | 0,137747271 |
| 20 | TP-Gruppe | CBN-128R | 0,313821491 | 0,450970124 | 0,132880558 | 0,170059634 |
| 21 | TP-Gruppe | CBN-140R | 0,28254211 | 0,794928779 | 0,172086961 | 0,290412186 |
| 22 | TP-Gruppe | CBN-143L | 0,198267423 | 0,549156123 | 0,085104159 | 0,077472475 |
| 23 | TP-Gruppe | CBN-145L | 0,207691425 | 0,479174907 | 0,116645167 | 0,077869094 |
| 24 | TP-Gruppe | CBN-148L | 0,16068819 | 0,478242422 | 0,141170807 | 0,022516953 |
| 25 | TP-Gruppe | CBN149R | 0,050412133 | 0,726035257 | 0,061717062 | 0,204904617 |
| 26 | TP-Gruppe | CBN-152R | 0,147505899 | 0,890148083 | 0,087367889 | 0,397085792 |
| 27 | TP-Gruppe | CBN-154R | 0,239167342 | 0,548211317 | 0,122809127 | 0,154582017 |
| 28 | TP-Gruppe | CBN-155R | 0,387199383 | 0,932593814 | 0,325964993 | 0,121321752 |
| 29 | TP-Gruppe | CBN-156R | 0,388043706 | 0,210325221 | 0,215224085 | 0,843604471 |
| 30 | TP-Gruppe | CBN-157R | 0,402992476 | 0,843755563 | 0,258885522 | 0,307526555 |
| 31 | TP-Gruppe | CBN-161L | 0,312571156 | 0,965428127 | 0,122710911 | 0,273495433 |
| 32 | TP-Gruppe | CBN-162R | 0,27026429 | 0,519574314 | 0,143319288 | |
| 33 | TP-Gruppe | CBN-166L | 0,803206477 | 0,625922097 | 0,659111154 | |
| 34 | TP-Gruppe | CBN-171R | 1,336544904 | 1,441075592 | 1,017761619 | 1,142882349 |
| 35 | TP-Gruppe | CBN-175R | 0,73539247 | 0,773205612 | 0,594050379 | 0,482667769 |
| 36 | TP-Gruppe | CBN-178L | 0,578859071 | 0,663325211 | 0,649004075 | 0,112766046 |
| 37 | TP-Gruppe | CBN-40R | 0,791325585 | 0,766348498 | 0,200358163 | 0,220048035 |
| 38 | TP-Gruppe | CBN-46R | 0,321257226 | 0,944031572 | 0,189066897 | 0,124967201 |
| 39 | TP-Gruppe | CBN-47L | 0,288932983 | 0,142349419 | 0,226941238 | 0,328971361 |
| 40 | TP-Gruppe | CBN-53L | 0,289222322 | 0,633696088 | 0,139880251 | 0,301892725 |
| 41 | TP-Gruppe | CBN-59L | 0,438936169 | 1,138876859 | 0,221512795 | 0,135708138 |
| 42 | TP-Gruppe | CBN-65L | 0,236803007 | 0,660177793 | 0,132957512 | 0,113727054 |
| 43 | TP-Gruppe | CBN-73R | 0,331447163 | 1,017102809 | 0,148171531 | 0,424426575 |
| 44 | TP-Gruppe | CBN-74R | 0,291897459 | 0,835943456 | 0,210067945 | 0,439461488 |

| | | | | | | |
|----|----------------|----------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 45 | TP-Gruppe | CBN-75L | 0,259535998 | 1,032503566 | 0,162899597 | 0,958780284 |
| 46 | TP-Gruppe | CBN-86L | 0,376422967 | 0,510473603 | 0,179251605 | 0,501270295 |
| 47 | TP-Gruppe | CBN-87R | 0,207380523 | 0,426013045 | 0,139775624 | 0,093778622 |
| 48 | TP-Gruppe | CBN-88L | 0,162657394 | 0,239166381 | 0,232942808 | 0,126031031 |
| 49 | TN-↑PSA-Gruppe | SBN-109L | 0,50748587 | 2,82783661 | 0,246586794 | |
| 50 | TN-↑PSA-Gruppe | SBN-112L | 0,355736351 | 1,102312298 | 0,325019389 | 0,545469675 |
| 51 | TN-↑PSA-Gruppe | SBN-125R | 0,513698426 | 0,66221875 | 0,610823063 | 0,733250039 |
| 52 | TN-↑PSA-Gruppe | SBN-181R | 0,672798577 | 0,952999105 | 0,304739716 | 0,376975102 |
| 53 | TN-↑PSA-Gruppe | SBN-192L | 0,320544333 | 0,679343205 | 0,280278637 | 0,179020834 |
| 54 | TN-↑PSA-Gruppe | SBN-198L | 0,513326024 | 1,781811246 | 0,384714921 | 0,765134562 |
| 55 | TN-↑PSA-Gruppe | SBN-203R | 1,012894776 | 1,867394857 | 0,759465688 | 0,998468208 |
| 56 | TN-↑PSA-Gruppe | SBN-206R | 0,776022861 | 1,827513755 | 0,777872409 | 0,901028501 |
| 57 | TN-↑PSA-Gruppe | SBN-51 | 0,439722591 | 0,712510789 | 0,213113655 | 0,678378639 |
| 58 | TN-↑PSA-Gruppe | SBN-66 | 0,565780774 | 1,74370715 | 0,320353674 | 1,356476587 |
| 59 | TN-↑PSA-Gruppe | SBN-74 | 0,257453236 | 0,758985124 | 0,193560126 | 0,310230922 |
| 60 | TN-↑PSA-Gruppe | SBN-77 | 0,369874196 | 1,274507855 | 0,37418508 | 0,790459607 |
| 61 | TN-↑PSA-Gruppe | SBN-79 | 1,467782609 | 4,881916145 | 0,56681219 | 2,330241367 |
| 62 | TN-↑PSA-Gruppe | SBN-91R | 1,442168823 | 1,394249028 | 0,3915234 | 0,530532908 |

Tabelle 6: RQ-Werte let-7a, let-7b, miR-16, miR-185

In der folgenden Tabelle sind die zusammenfassenden Werte der Tabelle 6 dargestellt.

| Zusammenfassung [RQ-Werte] | | let-7a | miR-16 | miR-185 | let-7b | |
|----------------------------|------------|---------|--------|---------|--------|----|
| TN-↓PSA Gruppe | N | Gültig | 17 | 17 | 17 | 17 |
| | | Fehlend | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Median | 1,1153 | 1,0062 | 0,9826 | 1,0416 | |
| | Varianz | 0,15 | 0,139 | 0,426 | 0,155 | |
| | Spannweite | 1,28 | 1,22 | 2,84 | 1,31 | |
| TN-↑PSA-Gruppe | N | Gültig | 14 | 14 | 13 | 14 |
| | | Fehlend | 0 | 0 | 1 | 0 |
| | Median | 0,5135 | 0,3496 | 0,7333 | 1,3344 | |
| | Varianz | 0,152 | 0,037 | 0,305 | 1,269 | |
| | Spannweite | 1,21 | 0,58 | 2,15 | 4,22 | |
| TP-Gruppe | N | Gültig | 31 | 31 | 29 | 31 |
| | | Fehlend | 0 | 0 | 2 | 0 |
| | Median | 0,2892 | 0,1721 | 0,2049 | 0,6602 | |
| | Varianz | 0,066 | 0,044 | 0,074 | ,091 | |
| | Spannweite | 1,29 | 0,96 | 1,12 | 1,30 | |

Tabelle 7: Zusammenfassung let-7a, let-7b, miR-16, miR-185

Die Referenzgene RNU 44/48 zeigen analoges Expressionsmuster in allen drei Vergleichsgruppen. Dies weist auf vergleichbare Gesamt-RNA-Mengen und -Qualitäten in den Kollektiven hin. Somit ist die Verwendung der Referenzgene zur Normalisierung statthaft.

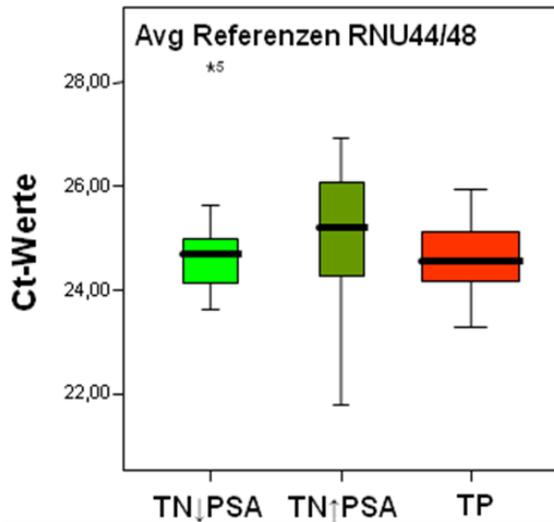


Abb.13: Referenzgene RNU 44/48

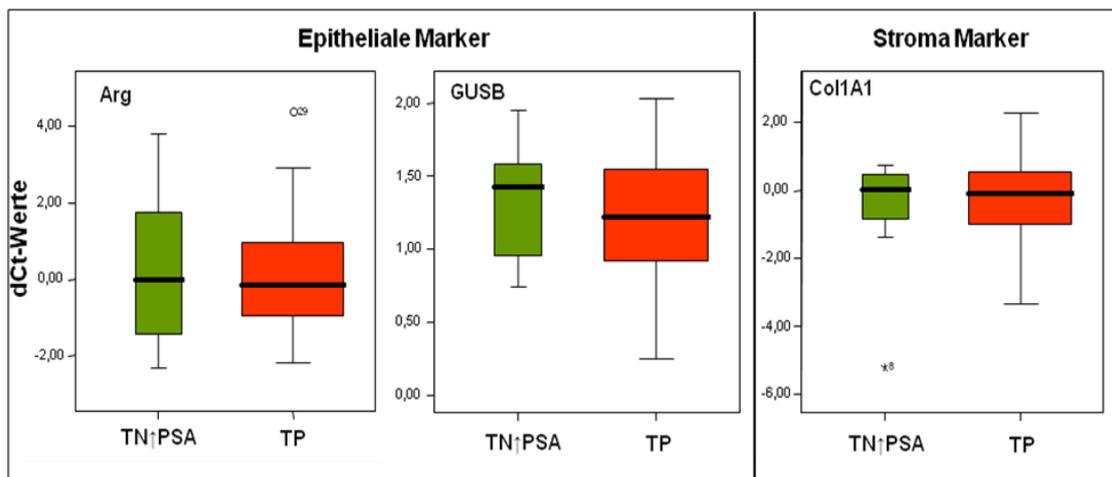


Abb. 14: Genmarker für Epithelialgewebe und Stroma zwischen den Vergleichsgruppen

Die Quantifizierung von Transkripten von Markern für Epithelialgewebe (ARG und GUSB) sowie für Stroma (COL1A1) zeigen keine signifikanten Genexpressionsdifferenzen zwischen der diagnostisch relevanten TN↑PSA-Gruppe und der TP-Gruppe. Dies bedeutet, dass die Verhältnisse von Epithelgewebe und Stroma in

den Biopsien der verglichenen Gruppen ähnlich sind. Die in den Abbildungen 5 bis 12 gezeigten Unterschiede in der Micro-RNA-Expression sind somit nicht auf variierende Anteile dieser Gewebekompartimente zurückzuführen.

5. Diskussion

In dieser Arbeit wurden in histologisch unauffälligen Prostatageweben von Personen mit PCA im Vergleich zu Tumor-negativen bzw. gesunden Personen signifikante Expressionsunterschiede aller Micro-RNAs festgestellt, die durch die in Kapitel 1.9. beschriebene Selektionsroutine ausgewählt worden waren.

Die hohe Trefferquote des Auswahlprozesses weist darauf hin, dass ein unerwartet großer Teil des Micro-Transkriptoms tumorrelevant sein könnte¹.

Den Micro-RNAs wurde lange nur eine untergeordnete biologische Bedeutung zugesprochen. Erst seit Lee und Ambros 1993 das *lin-4* Micro-RNA-Gen in der Nematode *C. elegans* entdeckt und diesem eine bedeutende Rolle in der Zelldifferenzierung zugeordnet haben, wurde auch in anderen Spezies nach Micro-RNAs geforscht (Lee et al. 1993). Seitdem wird zunehmend klar, dass Micro-RNAs speziesübergreifend (von Pflanzen bis Tieren) evolutionär konserviert sind und grundsätzlich eine bedeutende Rolle in der Zellphysiologie spielen müssen (Esquela-Kerscher und Slack 2006).

Tatsächlich steuern Micro-RNAs zahlreiche u.a. auch tumorrelevante Funktionen wie Differenzierung, Apoptose und Metabolismus (Subramanian und Steer 2010, Cheng et al. 2005, Chan et al. 2005, Liao et al. 2008, Chen et al. 2004, Tang et al. 2009). Demzufolge müssen Micro-RNAs eine bedeutsame Rolle in der Molekularbiologie der Tumorentstehung spielen. Das eröffnet die Möglichkeit, Tumoren durch die Messung der Expressionsmuster einzelner oder mehrerer tumorrelevanter Micro-RNAs zu klassifizieren und in Ihrem Verlauf zu charakterisieren.

¹ In diesem Falle wären die meisten Micro-RNAs durch die restriktive Selektionsroutine für die weiteren Untersuchungen ausgeschlossen worden. Es empfehlen sich somit eigene Array-Untersuchungen über das gesamte bekannte Micro-Transkriptom um umfassende Informationen über die Implikation der Micro-RNAs in die frühe Tumorgenese und eventuelle präkanzerotische Feldeffekte zu erhalten.

Micro-RNAs sind ca. 17 bis 24 Basen lange RNAs, die an annähernd komplementäre Sequenzen in Transkripten (meist in der 3'-untranslatierten Region) binden und deren Translation hemmen. Insofern hat praktisch jede Micro-RNA eine wichtige regulative Funktion bei der Expression zahlreicher Zielgene (Breving und Esquela-Kerscher 2010). Zudem kann eine Micro-RNA in unterschiedlichen Zellen unterschiedliche Funktion innehaben. Die Micro-RNA-Datenbank [Microrna.sanger.ac.uk](http://microrna.sanger.ac.uk) hat mehr als 700 menschliche MRs katalogisiert, vermutlich existieren aber mehr als 1000. Mithilfe von Micro-RNA-Microarrays ist es nun möglich, großangelegte Profiling-Studien durchzuführen, welche bereits zeigen konnten, dass Micro-RNAs in normalen Geweben und Tumorproben unterschiedlich exprimiert werden (Calin und Croce 2006). In weiterführenden Studien konnte eine Beziehung zwischen der Expressionsrate einzelner Micro-RNAs und Tumoren aufgewiesen werden, so sind z. B. miR-15 und 16 in mehr als 65 % der untersuchten chronischen lymphatischen Leukämien (CLL) und bei 80 % aller PCAs herunterreguliert (Garzon et al. 2006).

Interessant dabei ist, dass 50 % aller Micro-RNAs an sogenannten leicht brüchigen Regionen der DNA („fragile sites“), LOH oder Breakpoint Cluster Regionen gefunden werden, also in Regionen die instabil und anfällig für chromosomale Aberrationen sind (Calin et al. 2004), wie sie häufig schon in der frühen Kanzerogenese auftreten. Somit sollte die Micro-RNA-Expression häufig bereits frühen, noch nicht histopathologisch sichtbaren Phasen der Tumorentstehung Veränderungen aufweisen.

Es existiert eine These, nach der Onkogene regulierende Micro-RNAs selbst als Tumorsuppressoren aufzufassen sind, während Micro-RNAs, welche die Expression von Tumorsuppressoren hemmen in der Konsequenz eine onkogene Funktion zugewiesen werden kann (Garzon et al. 2006). Interessanterweise ist die Expression des größeren Teils der bislang bekannten Micro-RNAs in malignen Tumoren herunterreguliert - die verantwortlichen Mechanismen für die verminderte Expression sind bislang nicht bekannt (Lu et al. 2005). Das führt zur Annahme, dass die Funktion der bekannten Micro-RNAs hauptsächlich darin besteht, die Zellteilung herabzuregulieren und eine terminale Differenzierung zu fördern.

Tatsächlich bestätigen mittlerweile mehrere funktionelle Studien am Menschen, dass verschiedene Micro-RNAs Prozesse des Zellwachstum beeinflussen, so üben z. B. miR-125-b und let-7 eine Kontrolle der Zellproliferation aus, während miR-15 und -16 das Überleben von B-Zellen steuern (Calin et al. 2006). Bei *C. elegans* kontrollieren lin-4 und let-7 das Timing der Zelldifferenzierung und Proliferation. Mutationen in diesen Micro-RNAs führen zu Veränderungen der Evasion aus dem Zellzyklus und zu Veränderungen der terminalen Differenzierung, wie sie für entartete Zellen charakteristisch sind.

In dieser Dissertation wurde eine unterschiedliche Expression von sieben Micro-RNAs (miR-124, miR-146a, miR-146b, let-7a let-7b, miR-16 sowie miR-185) in histologisch unauffälligem Gewebe der drei Vergleichsgruppen gezeigt. Vier dieser Micro-RNAs, let-7a und let-7b, miR-16 und miR-185 sind dabei im isolierten Vergleich zwischen den beiden diagnostisch relevanten Gruppen, nämlich der TP-Gruppe und der klinisch tumorsuspekten TN \uparrow PSA-Gruppe (mit ebenfalls erhöhtem PSA-Wert), differenziell exprimiert. Alle sind in der TP-Gruppe herabreguliert. Diese Ergebnisse könnten auf eine funktionelle biologische Relevanz dieser Micro-RNAs bereits zu einem frühen Zeitpunkt der Kanzerogenese hinweisen.

In den letzten Jahren wurden tatsächlich zunehmend direkte Belege für die Bedeutung dieser Micro-RNAs bei der Kanzerogenese gefunden.

So weiß man, dass Micro-RNA Let-7-Familie die Onkogene MYC und RAS und der Micro-RNA-Cluster 15 und 16 das Onkogen BCL-2 regulieren (Cimmino et al. 2005, Schultz et al. 2008).

MYC ist ein evolutionär konserviertes nukleares Protein, das in Zellproliferationskontrolle und Differenzierung involviert ist. In normalen Zellen sind MYC-Proteinmengen während Zellwachstum vorübergehend erhöht, verringern sich dann aber auf ein niedriges Niveau wenn die Zelle aus dem Zellzyklus austritt oder abstirbt. Das MYC-Onkogen, zuerst beschrieben in 1982 von Vennstrom et al., ist als key transforming oncogenic agent bei vielen menschlichen Tumoren bekannt, z. B.

Lymphomen, Glioblastomen, Osteosarkomen, Zervix- und Mammakarzinom (Sampson et al. 2007, Mendell 2005, Chang et al. 2008, Bui und Mendell 2010). Die Let-7a Überexpression senkt bekanntermaßen die MYC-Protein-Expression herab (Sampson et al. 2007).

Gut untersucht ist auch die Beziehung zwischen RAS und der let-7 Familie. Let-7 korreliert invers mit der Expression des RAS-Onkogens in humanen Lungentumorzellen (Johnson et al. 2005); d. h. die Let-7 Expression ist in Lungentumoren geringer als in normalem Lungengewebe, während RAS verstärkt exprimiert wird. (Takamizawa et al. 2004, Johnson et al. 2005, Schultz et al. 2008). Besonders interessant ist dabei der Zusammenhang, dass herabgesenkte let-7a Expressionsraten mit verkürztem postoperativem Überleben bei Lungenkarzinom assoziiert sind (Takamizawa et al. 2004). Ähnliche Ergebnisse fand man auch bei dem Mammakarzinom (Iorio et al. 2005).

Auch für das maligne Melanom gibt es Hinweise, dass die Mitglieder der let-7 Familie als Tumorsuppressoren eine Rolle spielen. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass eine transiente Transfektion von let-7b in Melanomzelllinien in vitro eine Herabregulation verschiedener Cycline, welche mit Tumorprogression korrelieren, zur Folge hat. Ebenso zeigte sich eine signifikante Reduktion von der Zellzahl in der S-Phase, parallel zu einem Anstieg der Zellzahl in G0-G1-Phase). Ähnliche Ergebnisse wurden für Lungen und Kolon-Ca gefunden (Schultz et al. 2008).

Die Überexpression von Micro-RNA let-7a in humanen Adeno-Ca Linien hemmt die Zellproliferation. Dies indiziert, dass eine artifizielle Erhöhung der let-7a-Expression in Karzinomen mit schwacher let-7a Expression einen therapeutischen Ansatz darstellen könnte. So hat man in einem In-Vitro Versuch gezeigt, dass die Überexpression von let-7a in Tumorzellen eine RAS- Herabregulierung zur Folge hat durch die Bindung von let-7a an die 3'UTR Sequenz von RAS (Schultz et al. 2008, Johnson et al. 2005)

Besonders gut sind Micro-RNAs in Hinblick auf das CLL erforscht, wo ein direkter Zusammenhang zwischen den Expressionsraten von miR-15 und -16 und BCL2 nachgewiesen worden ist. Die Micro-RNAs miR- 15 und 16 sind herunterreguliert,

während die BCL2-Expression heraufreguliert ist (Cimmino et al. 2005). Das Protein des Onkogens BCL-2 inhibiert die Apoptose und trägt maßgeblich zur Entstehung des B-Zell CLLs bei, zudem wird es auch in anderen menschlichen Tumoren, z. B. Leukämien, Lymphomen und Karzinomen überexprimiert (Sanchez-Beato et al. 2003).

Das BCL2-Transkript stellt ein wichtiges Target posttranskriptionaler Repression durch miR-15 und miR-16 dar. Somit erscheint die Herabregulation von miR-15a und 16 als entscheidende Ursache der BCL-2 Überexpression (Cimmino et al. 2005) Interessanterweise gibt es im humanen Genom vier Mitglieder der MR-15/MR-16 Familie, denen allen eine BCL-2 komplementäre Sequenz gemeinsam ist.

Dies deutet darauf hin, dass die BCL-2-Regulation einen funktionellen Schwerpunkt dieser Micro-RNA-Familie darstellt; entsprechend wahrscheinlich ist es, dass dieser Mechanismus auch bei anderen Tumoren eine Rolle spielt (Cimmino et al. 2005, Calin et al. 2008.) Tatsächlich wurde bereits gezeigt, dass die miR-16 Expression in mehr als 80% aller untersuchten PCAs verändert sind (Calin et al 2008).

MiR-185 scheint ebenfalls in den Zellzyklus einzugreifen und eine Rolle bei Tumorsuppression zu spielen. In einer Studie mit nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom-Zelllinien wurde gezeigt, dass miR-185 in der G1-Phase den Zellzyklus stoppt (Takahashi et al. 2009). Der tumorsupprimierende Effekt ist geringer als der von z.B. let-7, und wahrscheinlich hat diese Micro-RNA in anderen Zelllinien andere Funktionen, wie z. B. Zelldifferenzierung in der Erythrozytopoese (Takahashi et al. 2009, Choong et al. 2007).

In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass miR-185 an die 3'UTR-Region des Six1 Transkripts bindet und so dessen Translation unterdrückt (Imam 2010). MiR-185 Überexpression in embryonalen Nierenzellkulturen (Zelllinie HEK-293) zeigt eine reduzierte Zellproliferation, während die Inhibierung von miR-185 erhöhtes Zellwachstum zeigt (Imam et al. 2010).

Das Six1-Protein wird u.a. exprimiert während der Organogenese des Nervensystems und Urogenitalsystems und spielt hierbei bei der Zelldifferenzierung eine wichtige Rolle. (Xu et al. 2003, Jeong und Oh 2010). Die Six1-Expression ist in verschiedenen Tumoren wie dem Ovarialkarzinom, dem hepatozellulären Karzinom, Rhabdomyosarkom, und in Wilms-Tumoren erhöht (Behbahkt et al. 2007, Ng et al. 2006, Li et al. 2002, Yu et al. 2004) und induziert auch eine maligne Transformation von epithelialen Mammazellen (Coletta et al. 2008).

Alle diese Mechanismen unterstreichen die Rolle der Micro-RNAs bei Zellproliferation, Zelldifferenzierung und somit auch in der Kanzerogenese und bieten eine biologisch-funktionelle Erklärung für die in dieser Arbeit beschriebene Herabregulation der Micro-RNAs let-7a, let-7b, miR-16 und miR-185 in Geweben, die zwar histologisch unauffällig, aber manifesten Tumorfoci benachbart sind.

Prostatatumoren entstehen vermutlich nicht spontan aus gesundem Gewebe, sondern wahrscheinlich aus größeren Arealen mit präkanzerösen Gewebeanteilen, die histopathologisch von gesundem Gewebe nur schwer oder gar nicht abzugrenzen sind, aber bereits molekulare Veränderungen aufweisen (Schlomm et al. 2009). Die Herabregulation der untersuchten Micro-RNAs könnte diesen Alterationen zuzurechnen sein.

Es gibt Hinweise, dass das Konzept der Field cancerization auch auf die Prostata zutreffen könnte. In einer Studie wurden Unterschiede in der Genexpression von Proliferations- assoziierten Genen wie z.B. ERG-1, Jun B, Jun D, zwischen tumorfreien, aber tumorbenachbartem Gewebe und tumorfreiem Gewebe von gesunden Spendern nachgewiesen (Chandran et al. 2005).

Als Hinweis auf Field cancerization des Prostatakarzinoms zeigt eine weitere Studie von Haaland et al., dass die Expression von Protein EGR-1, GDF-15, c-Fos signifikant höher ist in Gewebeproben, welche 1 cm Abstand ab Tumorrand exzidiert wurden, sowie auch im Tumor im Vergleich zu tumorfreiem Prostatagewebe. Diese Studien

zeigen molekulare Veränderungen auf genetischer Ebene in histologisch normal erscheinendem Gewebe in der Nähe des Tumors (Haaland et al. 2009).

Die Diagnostik des PCAs beruht nun bislang vor allem auf der rein histopathologischen Untersuchung von örtlich normiert gesetzten Stanzbiopsien. Hierbei besteht die Gefahr, dass die Biopsien kleine bzw. junge Tumoren, die noch kurativ behandelbar wären, verfehlen können. Molekulare Veränderungen in diesen Bereichen bleiben unerkannt, falsch negative Diagnosen sind das Ergebnis.

Die hier beschriebenen Micro-RNA-Expressionsunterschiede eröffnen nun die Möglichkeit einer molekulardiagnostischen Beurteilung scheinbar (histologisch) negativer Biopsieserien. Histologisch unauffällige Biopsien müssten hierzu auf die Präsenz des tumorindikativem Micro-RNA-Expressionsprofils hin überprüft werden. Ein positives Ergebnis würde eine intensiviertere histopathologische Diagnostik rechtfertigen und die Chance der Detektion früher Tumoren erhöhen, während ein negatives Ergebnis dem Patienten wiederholte Biopsieserien ersparen könnte.

Es sind bereits zahlreiche Gene bekannt, die mit diagnostisch relevanten klinischen Parametern korrelieren, jedoch hat sich bislang keiner als robuster, in der Klinik diagnostisch nutzbarer Marker erweisen (Lu et al. 2005, Schlomm et al 2009). Dies ist v.a. auf fehlende oder statistisch unzureichende Studien zur Validierung dieser potentiellen Marker zurückzuführen. Entsprechend wichtig ist eine Überprüfung der Ergebnisse dieser Arbeit in großangelegten Kohortenstudien zur Abschätzung der Sensitivität und Spezifität des gefundenen Micro-RNA-Profiles in einem klinischen Szenario. Zudem sollten breiter angelegte Studien auch zur Klärung der funktionellen Mechanismen beitragen, sofern nicht nur die Micro-RNA-Profile selbst, sondern auch die Transkriptionsmuster der potentiellen Targets untersucht werden.

Ferner könnten sich auch Therapieansätze aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ergeben. Hier käme eine Transfektion der Tumoren mit denselben Micro-RNAs, die darin herabreguliert sind, in Betracht, um somit neu eine Expressionshemmung der Zielonkogene zu erwirken. Allerdings ist hier Vorsicht geboten, da eine Fehltransfektion

dieser ubiquitär exprimierten Micro-RNAs in normalem Gewebe die gesunde Zellphysiologie negativ beeinflussen könnte. Unerwünschte Nebenwirkungen könnten die Folge sein. Dies zu prüfen wäre ein wichtiger Gegenstand präklinischer Studien.

Abschließend sind die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ermutigend genug, um die oben skizzierten weiterführenden Untersuchungen anzuregen. Sie spornen auch zur systematischen Überprüfung anderer Micro-RNAs auf Ihre Eignung als diagnostische Marker an.

Die junge Forschung an Micro-RNAs bietet im Umfeld der Diagnostik und Therapie des Prostatakarzinoms viel Potential. Es gilt, diese Möglichkeiten zum Wohle des Patienten voll auszuschöpfen.

6. Zusammenfassung

Das PCA ist der häufigsten Tumor der männlichen Bevölkerung mit ca. 60 000 Neuerkrankungen pro Jahr (Robert-Koch-Institut 2010). Die Diagnostik beruht hauptsächlich auf einer Kombination von teilweise subjektiv variablen und unspezifischen Tests, wie die digitale rektale Untersuchung, PSA-Test und transrektaler Ultraschall. Bei V.a. PCA werden Stanzbiopsien entnommen, um eine histopathologisch gesicherte Diagnose zu stellen. Trotz dieser diagnostischen Möglichkeiten ist es erschwert kleine Tumore zu diagnostizieren, da diese auch wiederholten Biopsien entgehen können. Dieses stellt ein Problem dar, da eine sichere Diagnose für eine rechtzeitige und erfolgreiche kurative Therapie entscheidend ist.

Für eine sichere Diagnose könnten molekulare Prozesse im tumorumgebenden Prostatagewebe, einen Hinweis auf maligne Entartung im Organ geben. Molekulare Marker können bereits im benachbarten Gewebe eines Tumors verändert sein, ohne dass man den Tumor durch eine Biopsie nachweist. Es wurden bereits genetische Transkriptionssignaturen beschrieben, die histologisch normal imponierendes Prostatagewebe von Karzinompatienten von normalem gesundem Prostatagewebe differenzieren (Schlomm und Hellwinkel et al. 2009). Potentielle Marker auf molekularer Ebene könnten Micro-RNAs darstellen, kurze RNAs, welche viele zellulärer Differenzierungs- und Proliferationsprozesse regulieren und damit auch in der Kanzerogenese eine Rolle spielen (Esquela-Kerscher und Slack 2006). Zusätzlich sind sie methodisch interessant, da sie durch ihre kleine Größe gut in den Interzellulärraum diffundieren können und weiträumig nachweisbar sind sowie unempfindlich auf Formalinfixierung und Degradation durch RNAsen reagieren (Nelson et al. 2004, Lu et al. 2005).

In dieser Arbeit wurden Micro-RNA-Expressionsmuster untersucht anhand eines Kollektivs aus histologisch unauffälligem Prostatagewebe von Prostatakarzinompatienten im Vergleich zu zwei Kontrollgruppen, ein Kollektiv von Patienten mit erhöhtem PSA ohne Karzinomnachweis (mit wiederholt negativen Biopsieserien) und ein Kollektiv von gesunden Kontrollen mit normalem PSA.

Besonders relevant ist der Vergleich mit dem Kollektiv aus Patienten ohne Karzinomnachweis mit erhöhtem PSA, da diese klinisch schwierig zu differenzieren sind. Hier könnte ein unterschiedliches Expressionsmuster medizinisch relevant sein um eine sichere Frühdiagnose zu stellen.

In einer vorangehenden Arbeit wurde eine Micro-RNA- Selektion ausgeführt durch Prüfung grundsätzlicher Expression von Micro-RNAs in Prostatagewebe sowie durch eine Literaturrecherche mit entsprechender Tumorassoziation (Hellwinkel et al.; Manuskript eingereicht). Ausgewählt wurden acht Micro-RNAs (miR-124a, miR-146a und miR-146b, miR-185, miR-187 miR-16 und let-7a und let-7b). Nach Micro-RNA Isolierung wurde die Expression durch Real-Time-PCR gemessen und für die Quantifizierung die delta-delta-CT-Methode angewendet.

Gezeigt werden konnte, dass sieben Micro-RNAs (miR-124a, miR-146a und miR-126b, miR-185, miR-16 und let-7a und let-7b) eine unterschiedliche Expression zwischen dem histologisch unauffälligen Gewebe von Prostatakarzinompatienten und den tumornegativen Kollektiven aufweisen. Vier Micro-RNAs (miR-185, miR-16 und let-7a und let-7b) zeigten einen signifikanten Expressionsunterschied im direkten Vergleich zwischen dem histologisch unauffälligen Gewebe von Prostatakarzinompatienten und den tumornegativen Kollektiv mit erhöhtem PSA. Diese vier Micro-RNAs werden in der Literatur als Regulatoren von Onkogenen in verschiedenen Tumoren beschrieben und dies weist darauf hin, dass eine unterschiedliche Expression ein molekularer Hinweis auf Entartung sein könnte.

7. Literaturverzeichnis

- Adolfsson J, Tribukati B, Levitt S. "The 20-YR outcome in patients with well- or moderately differentiated clinically localized prostate cancer diagnosed in the pre-PSA era: the prognostic value of tumour ploidy and comorbidity." *Eur. Urol.* 2007 Oct; 52(4):1028-35
- Augustin, H., P. Hammerer, Graefen M, Palisaar J, Noldus J, Fernandez S, Huland H. (2003). "Intraoperative and perioperative morbidity of contemporary radical retropubic prostatectomy in a consecutive series of 1243 patients: results of a single center between 1999 and 2002." *Eur Urol* 43(2): 113-8
- Behbakht K, Qamar L, Aldrige CS, Coletta RD, Davidson SA, Thorburn A. "Six1 overexpression in ovarian carcinoma causes resistance to TRAIL-mediated apoptosis and is associated with poor survival." *Cancer Res.* 2007 67: 3036-3042
- Braakhuis BJ, Tabor MP, Kummer JA, Leemans CR, Brakenhoff RH. "A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications." *Cancer Res.* 2003 Apr 15;63(8):1727-30.
- Brevig K, Esquela-Kerscher A. "The complexities of microRNA regulation: mirandering around the rules." *Int J Biochem Cell Biol.* 2010 Aug; 42(8):1316-29
- Budhu A, Jia HL, Forgues M, Liu CG, Goldstein D, Lam A, Zanetti KA, Ye QH, Qin LX, Croce CM, Tang ZY, Wang XW. "Identification of metastasis-related microRNAs in hepatocellular carcinoma." *Hepatology.* 2008 Mar;47(3):897-907
- Bui TV, Mendell JT. "Myc: Maestro of MicroRNAs." *Genes Cancer.* 2010 Jun 1;1(6):568-575.
- Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. "Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers." *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Mar 2;101(9):2999-3004

- Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, Iorio MV, Visone R, Sever NI, Fabbri M, Iuliano R, Palumbo T, Pichiorri F, Roldo C, Garzon R, Sevignani C, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM. "A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia." *N Engl J Med.* 2005 Oct 27;353(17):1793-801.
- Calin GA, Croce CM. "MicroRNA-cancer connection: the beginning of a new tale." *Cancer Res.* 2006 Aug 1;66(15):7390.
- Calin GA, Cimmino A, Fabbri M, Ferracin M, Wojcik SE, Shimizu M, Taccioli C, Zanesi N, Garzon R, Aqeilan RI, Alder H, Volinia S, Rassenti L, Liu X, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM. "MiR-15a and miR-16-1 cluster functions in human leukemia." *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Apr 1;105(13):5166-71.
- Catalona WJ, Smith DS, Ratliff TL, Basler JW. "Detection of organ-confined prostate cancer is increased through prostate-specific antigen-based screening." *JAMA.* 1993 Aug 25; 270(8):948-54.
- Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. "MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells." *Cancer Res.* 2005 Jul 15;65(14):6029-33.
- Chandran UR, Dhir R, Ma C, Michalopoulos G, Becich M, Gilbertson J. "Differences in gene expression in prostate cancer, normal appearing prostate tissue adjacent to cancer and prostate tissue from cancer free organ donors." *BMC Cancer.* 2005 May 13;5:45.
- Chang TC, Yu D, Lee YS, Wentzel EA, Arking DE, West KM, Dang CV, Thomas-Tikhonenko A, Mendell JT. "Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis." *Nat Genet.* 2008 Jan;40(1):43-50.
- Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP. "MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation." *Science.* 2004 Jan 2;303(5654):83-6

- Cheng AM, Byrom MW, Shelton J, Ford LP. "Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis." *Nucleic Acids Res.* 2005 Mar 1;33(4):1290-7.
- Choong ML, Yang HH, McNiece I. "MicroRNA expression profiling during human cord blood-derived CD34 cell erythropoiesis." *Exp Hematol.* 2007 Apr;35(4):551-64.
- Chun FK, Graefen M, Zacharias M, Haese A, Steuber T, Schlomm T, Walz J, Karakiewicz PI, Huland H. "Anatomic radical retropubic prostatectomy-long-term recurrence-free survival rates for localized prostate cancer." *World J Urol* 2006 24(3): 273-80.
- Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, Wojcik SE, Aqeilan RI, Zupo S, Dono M, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM. "miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2." *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Sep 27;102(39):13944-9. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Feb 14;103(7):2464.
- Coletta RD, Christensen KL, Micalizzi DS, Jedlicka P, Varella-Garcia M, Ford HL. "Six1 overexpression in mammary cells induces genomic instability and is sufficient for malignant transformation." *Cancer Res.* 2008 Apr 1;68(7):2204-13.
- Cooner WH, Mosley BR, Rutherford CL Jr, Beard JH, Pond HS, Terry WJ, Igel TC, Kidd DD. "Prostate cancer detection in a clinical urological practice by ultrasonography, digital rectal examination and prostate specific antigen." *J Urol.* 1990 Jun;143(6):1146-52; discussion 1152-4.
- Ebert T, Altwein, JE, Wirth M. "Primäre Hormontherapie beim fortgeschrittenen Prostatakarzinom." *Dtsch Arztebl* 2001; 98(5): A-255 / B-201 / C-189.
- Ellis WJ, Chetner MP, Preston SD, Brawer MK. "Diagnosis of prostatic carcinoma: the yield of serum prostate specific antigen, digital rectal examination and transrectal ultrasonography." *J Urol.* 1994 Nov;152(5 Pt 1):1520-5.

- Esquela-Kerscher A, Slack FJ. "Oncomirs - microRNAs with a role in cancer." *Nat Rev Cancer*. 2006 Apr;6(4):259-69.
- Franklin WA, Gazdar AF, Haney J, Wistuba II, La Rosa FG, Kennedy T, Ritchey DM, Miller YE. "Widely dispersed p53 mutation in respiratory epithelium. A novel mechanism for field carcinogenesis." *J Clin Invest*. 1997 Oct 15;100(8):2133-7. Erratum in: *J Clin Invest* 1997 Nov 15;100(10):2639.
- Garzon R, Fabbri M, Cimmino A, Calin GA, Croce CM. "MicroRNA expression and function in cancer." *Trends Mol Med*. 2006 Dec; 12(12):580-7.
- Gleason DF, Mellinger GT. "Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging." *J Urol* 1974 Jan; 111(1): 58-64.
- Haaland CM, Heaphy CM, Butler KS, Fischer EG, Griffith JK, Bisoffi M. "Differential gene expression in tumor adjacent histologically normal prostatic tissue indicates field cancerization." *Int J Oncol*. 2009 Sep;35(3):537-46.
- Hanahan D, Weinberg RA. "The hallmarks of cancer." *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):57-70
- Hammerer P, Huland H. "Systematic sextant biopsies in 651 patients referred for prostate evaluation." *J Urol*. 1994 Jan; 151(1):99-102.
- Hautmann, Huland *Lehrbuch Urologie* S. 82-83. Auflage 2006 Springer Verlag
- Hudson MA, Bahnson RR, Catalona WJ. "Clinical use of prostate specific antigen in patients with prostate cancer." *Urol*. 1990 Jun;143(6):1174-7.
- Hull GW, Rabbani F, Abbas F, Wheeler TM, Kattan MW, Scardino PT. "Cancer control with radical prostatectomy alone in 1,000 consecutive patients." *J Urol* 167(2 Pt 1): 528-34.
- Hussain SP, Harris CC. "Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials." *Int J Cancer*. 2007 Dec 1;121(11):2373-80.

- Imam JS, Buddavarapu K, Lee-Chang JS, Ganapathy S, Camosy C, Chen Y, Rao MK. "MicroRNA-185 suppresses tumor growth and progression by targeting the Six1 oncogene in human cancers." *Oncogene*. 2010 Sep 2;29(35):4971-9.
- Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, Magri E, Pedriali M, Fabbri M, Campiglio M, Ménard S, Palazzo JP, Rosenberg A, Musiani P, Volinia S, Nenci I, Calin GA, Querzoli P, Negrini M, Croce CM. "MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer." *Cancer Res*. 2005 Aug 15;65(16):7065-70.
- Jeong Y, Oh S. "Identification of an evolutionarily conserved, functional noncoding element regulated by Six1 homeoprotein." *Genes Genet Syst*. 2010;85(3):233-40.
- Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, Labourier E, Reinert KL, Brown D, Slack FJ. "RAS is regulated by the let-7 microRNA family." *Cell*. 2005 Mar 11;120(5):635-47.
- Jothy S, Slesak B, Harłodzińska A, Lapińska J, Adamiak J, Rabczyński J. "Field effect of human colon carcinoma on normal mucosa: relevance of carcinoembryonic antigen expression." *Tumour Biol*. 1996;17(1):58-64.
- Kim YK, Kim VN. "Processing of intronic microRNAs." *EMBO J*. 2007 Feb 7;26(3):775-83.
- Kleer E, Oesterling JE. "PSA and staging of localized prostate cancer." *Urol Clin North Am* 1993 Nov;20(4): 695-704.
- Kuefer R. "Tastuntersuchung, PSA und transrektaler Ultraschall. Rationale Diagnostik beim Prostatakarzinom." *Klinikerzt* 2004; 33(5): 127-132.
- Le Bitoux MA, Stamenkovic I. "Tumor-host interactions: the role of inflammation." *Histochem Cell Biol*. 2008 Dec;130(6):1079-90

- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. "The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*." *Cell*. 1993 Dec 3;75(5):843-54.
- Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Rådmark O, Kim S, Kim VN. "The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing." *Nature*. 2003 Sep 25;425(6956):415-9.
- Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN. "MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II." *EMBO J*. 2004 Oct 13;23(20):4051-60.
- Li CM, Guo M, Borczuk A, Powell CA, Wei M, Thaker HM, Friedman R, Klein U, Tycko B. "Gene expression in Wilms' tumor mimics the earliest committed stage in the metanephric mesenchymal-epithelial transition." *Am J Pathol*. 2002 Jun;160(6):2181-90.
- Liao R, Sun J, Zhang L, Lou G, Chen M, Zhou D, Chen Z, Zhang S. "MicroRNAs play a role in the development of human hematopoietic stem cells." *J Cell Biochem*. 2008 Jun 1;104(3):805-17.
- Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR. "MicroRNA expression profiles classify human cancers." *Nature*. 2005 Jun 9;435(7043):834-8.
- Mallory AC, Vaucheret H. "Functions of microRNAs and related small RNAs in plants." *Nat Genet*. 2006 Jun;38 Suppl:S31-6. Review. Erratum in: *Nat Genet*. 2006 Jul;38(7):850.
- Mendell JT. "MicroRNAs: critical regulators of development, cellular physiology and malignancy." *Cell Cycle*. 2005 Sep;4(9):1179-84.
- Michl U, Graefen M, Noldus J, Eggert T, Huland H. "Functional results of various surgical techniques for radical prostatectomy." *Urologe A* 2003 Sep ;42(9): 1196-202

- Nelson PT, Baldwin DA, Scearce LM, Oberholtzer JC, Tobias JW, Mourelatos Z. "Microarray-based, high-throughput gene expression profiling of microRNAs." *Nat Methods*. 2004 Nov;1(2):155-61. Epub 2004 Oct 21.
- Ng KT, Man K, Sun CK, Lee TK, Poon RT, Lo CM, Fan ST. "Clinicopathological significance of homeoprotein Six1 in hepatocellular carcinoma." *Br J Cancer*. 2006 Oct 23;95(8):1050-5.
- Noldus J, Graefen M, Haese A, Henke RP, Hammerer P, Huland H. "Stage migration in clinically localized prostate cancer." *Eur Urol* 2000 Jul; 38(1): 74-8.
- Nonn L, Ananthanarayanan V, Gann PH. "Evidence for field cancerization of the prostate." *Prostate*. 2009 Sep 15;69(13):1470-9.
- Olumi AF, Grossfeld GD, Hayward SW, Carroll PR, Tlsty TD, Cunha GR. "Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium." *Cancer Res*. 1999 Oct 1;59(19):5002-11.
- Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, Hayward DC, Ball EE, Degan B, Müller P, Spring J, Srinivasan A, Fishman M, Finnerty J, Corbo J, Levine M, Leahy P, Davidson E, Ruvkun G. "Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA." *Nature*. 2000 Nov 2;408(6808):86-9.
- Pillai RS, Bhattacharyya SN, Artus CG, Zoller T, Cougot N, Basyuk E, Bertrand E, Filipowicz W. "Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells." *Science*. 2005 Sep 2;309(5740):1573-6..
- Pocket guidelines Urologie 2007, S. 21-35, European Association of Urology
- Pound CR, Partin AW, Epstein JI, Walsh PC. "Prostate-specific antigen after anatomic radical retropubic prostatectomy. Patterns of recurrence and cancer control." *Urol Clin North Am* 1997 May; 24(2): 395-406.
- Prevo LJ, Sanchez CA, Galipeau PC, Reid BJ. "p53-mutant clones and field effects in Barrett's esophagus." *Cancer Res*. 1999 Oct 1;59(19):4784-7.

- Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. "Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units." *Genome Res.* 2004 Oct;14(10A):1902-10.
- Sampson VB, Rong NH, Han J, Yang Q, Aris V, Soteropoulos P, Petrelli NJ, Dunn SP, Krueger LJ. "MicroRNA let-7a down-regulates MYC and reverts MYC-induced growth in Burkitt lymphoma cells." *Cancer Res.* 2007 Oct 15;67(20):9762-70.
- Sánchez-Beato M, Sánchez-Aguilera A, Piris MA. "Cell cycle deregulation in B-cell lymphomas." *Blood.* 2003 Feb 15;101(4):1220-35.
- Schetter AJ, Leung SY, Sohn JJ, Zanetti KA, Bowman ED, Yanaihara N, Yuen ST, Chan TL, Kwong DL, Au GK, Liu CG, Calin GA, Croce CM, Harris CC. "MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma." *JAMA.* 2008 Jan 30;299(4):425-36.
- Schlomm T, Hellwinkel OJ, Buness A, Ruschhaupt M, Lübke AM, Chun FK, Simon R, Budäus L, Erbersdobler A, Graefen M, Huland H, Poustka A, Sültmann H. "Molecular cancer phenotype in normal prostate tissue." *Eur Urol.* 2009 Apr;55(4):885-90.
- Schmittgen TD. "Regulation of microRNA processing in development, differentiation and cancer." *Cell Mol Med.* 2008 Oct; 12(5B): 1811-1819
- Schultz J, Lorenz P, Gross G, Ibrahim S, Kunz M. "MicroRNA let 7b targets important cell cycle molecules in malignant melanoma cells and interferes with anchorage-independent growth." *Cell Res.* 2008 May;18(5):549-57.
- Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. "Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin." *Cancer.* 1953 Sep;6(5):963-8.
- Stefani G, Slack FJ. "Small non-coding RNAs in animal development." *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008 Mar;9(3):219-30.

- Stolzenburg JU, Truss MC, Do M, Rabenalt R, Pfeiffer H, Dunzinger M, Aedtner B, Stief CG, Jonas U, Dorschner W. "Evolution of endoscopic extraperitoneal radical prostatectomy (EERPE)--technical improvements and development of a nerve-sparing, potency-preserving approach." *World J Urol.* 2003 Aug;21(3):147-52.
- Subramanian S, Steer CJ. "MicroRNAs as gatekeepers of apoptosis." *J Cell Physiol.* 2010 May;223(2):289-98.
- Sullivan CS, Grundhoff A, Tevethia S, Treisman R, Pipas JM, Ganem D. "Expression and function of microRNAs in viruses great and small." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2006;71:351-6.
- Takahashi T, Habuchi T, Kakehi Y, Mitsumori K, Akao T, Terachi T, Yoshida O. "Clonal and chronological genetic analysis of multifocal cancers of the bladder and upper urinary tract." *Cancer Res.* 1998 Dec 15;58(24):5835-41.
- Takahashi Y, Forrest AR, Maeno E, Hashimoto T, Daub CO, Yasuda J. "MiR-107 and MiR-185 can induce cell cycle arrest in human non small cell lung cancer cell lines." *PLoS One.* 2009 Aug 18;4(8):e6677
- Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H, Harano T, Yatabe Y, Nagino M, Nimura Y, Mitsudomi T, Takahashi T. "Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival." *Cancer Res.* 2004 Jun 1;64(11):3753-6.
- Tang X, Muniappan L, Tang G, Ozcan S. "Identification of glucose-regulated miRNAs from pancreatic {beta} cells reveals a role for miR-30d in insulin transcription." *RNA.* 2009 Feb;15(2):287-93.
- Tlsty TD, Coussens LM. "Tumor stroma and regulation of cancer development." *Annu Rev Pathol.* 2006;1:119-50.

Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, Seike M, Kumamoto K, Yi M, Stephens RM, Okamoto A, Yokota J, Tanaka T, Calin GA, Liu CG, Croce CM, Harris CC. "Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis." *Cancer Cell*. 2006 Mar;9(3):189-98.

Vennstrom B, Sheiness D, Zabielski J, Bishop JM. "Isolation and characterization of c-myc, a cellular homolog of the oncogene (v-myc) of avian myelocytomatosis virus strain 29." *J Virol*. 1982 Jun;42(3):773-9.

Wang Y, Lee CG. "MicroRNA and cancer--focus on apoptosis." *J Cell Mol Med*. 2009 Jan;13(1):12-23.

Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. "Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation." *Nat Cell Biol*. 2009 Mar;11(3):228-34.

Xu PX, Zheng W, Huang L, Maire P, Laclef C, Silvius D. "Six1 is required for the early organogenesis of mammalian kidney." *Development*. 2003 Jul;130(14):3085-94.

Yu Y, Khan J, Khanna C, Helman L, Meltzer PS, Merlino G. "Expression profiling identifies the cytoskeletal organizer ezrin and the developmental homeoprotein Six-1 as key metastatic regulators." *Nat Med*. 2004 Feb;10(2):175-81.

Robert-Koch Institut „ Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends.“ RKI 2010 www.rki.de

Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms; Deutsche Gesellschaft für Urologie 2009

Micro RNA Datenbank www.microrna.sanger.ac.uk

Pfaffl, <http://pathmicro.med.sc.edu/pcr/realtime-home.htm>

Miró MicroRNA data base <http://ferrolab.dmi.unict.it/miro>
www.pubmed.com

8. Danksagung

Ich danke vor allem meinem Doktorvater Prof. Heinzer für die Überlassung dieses Themas sowie Korrektur und Betreuung dieser Dissertation.

Ein großes Dankeschön gilt Dr. Olaf Hellwinkel für die Grundideen, die großartige Unterstützung, die vielen Anregungen und Korrektur dieser Arbeit.

Ich danke ebenso Prof. Thorsten Schlomm für progressive Ideen und Korrektur der Dissertation.

Ein besonderer Dank gilt Karin Beutel, Anne Bildhauer, Petra Dase, Hannelore Ellinghausen, Hannelore Suck und insbesondere Andrea Speckmann für die exzellente technische Unterstützung dieser Arbeit.

Meinen Freunden danke ich für ihre Motivation auch in arbeitsreichen schwierigen Zeiten, vor allem Salvatore Tomasello für Nachsicht und Geduld an den vielen Wochenenden, die ich in der Klinik oder am Schreibtisch verbracht habe und Dr. Berenike Schröder, die trotz Fachfremdheit als Geisteswissenschaftlerin sich der orthographischen Korrektur dieser Dissertation gewidmet hat.

Zuletzt danke ich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, für ihre Unterstützung jederzeit und überall während meines Studiums und der Fertigstellung dieser Dissertation.

Meinen Eltern, die mir so vieles in meinem Leben ermöglicht haben, widme ich diese Arbeit.

10. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift:

(Yu-Mi Jessica Sylvester)