Aus der Klinik und Poliklinik für Urologie
(Direktor Prof. Dr. med. M. Burchardt)
der Universitätsmedizin der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

Modulation der biologischen Wirkung von MikroRNA-1 mittels chemischer Modifikation des RNA-Moleküls

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Titels

Doktor der Medizin
(Dr. med.)

der

Universitätsmedizin

der

Ernst-Moritz-Arndt-Universität

Greifswald

2021

vorgelegt von:
Hannes Ahrend
geboren am 10.07.1983
in Neustrelitz

Dekan:	Professor Dr. med. Karlhans Endlich
1. Gutachter:	Privatdozent Dr. rer. med. Dr. rer. nat. Matthias Stope
2. Gutachter:	Privatdozent Dr. rer. nat. Patrick Ziegler
Ort, Raum:	Universitätsmedizin Greifswald,
	Seminarraum der Klinik für Innere Medizin A, Raum 7.0.15
Tag der Disputation:	24. Februar 2023

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS 3

ALPHABETISCHES ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 5

1. ZIELSETZUNG 7

2. EINLEITUNG 8

2.1. MIR IM ALLGEMEINEN 8
2.1.1. MIR EXPRESSION UND PROZESSIERUNG 9
2.1.2. REGULATORISCHE FUNKTIONEN VON MIR 10
2.2. MALIGNE ZELLEN UND DIE ROLLE DER MIR 11
2.3. MIR-1 13
2.4. MIR ALS EINE WEITERE THERAPEUTISCHE OPTION 14
2.5. DIE HERAUSFORDERUNGEN FÜR SYNTHETISCHE MIR IN DER FUNKTION ALS THERAPEUTIKUM 15
2.5.1. DIE HÜRDE DER NICHT-SELEKTIVEN, SYSTEMISCHEN ABGABEVERFAHREN 15
2.5.2. DAS PROBLEM DER OFF-TARGET EFFEKTE 16
2.6. DAS ZIEL DER MODIFIKATION AN DER MIR 17
2.6.1. BEISPIELE FÜR MÖGLICHE MODIFIKATION AN DER MIR 17
2.6.2. MODIFIKATION AN INTERNUKLEOTID-PHOSPHODIESTER-BINDUNGEN 17
2.6.3. ZUCKER-MODIFIKATIONEN DER MIR 19
2.6.4. 2'-O- METHYLGRUPPE-RNA-MODIFIKATION 20
2.6.5. 2'-FLUOR -RNA-MODIFIKATION 21
2.6.6. NUKLEOBASEN-MODIFIKATIONEN AN DER MIR 21
2.7. MIR-1 IM PROSTATAKARZINOM 22
2.8. DAS PROSTATAKARZINOM 23

3. MATERIAL UND METHODEN 26

3.1. MATERIAL 26
3.1.1. GERÄTE 26
3.1.2. VERBRAUCHSMATERIALIEN 27
3.1.3. CHEMIKALIEN 27
3.1.4. PUFFER UND LÖSUNGEN 28
3.1.5. KOMMERZIELLE LÖSUNGEN 28
3.1.6. ENZYME 28
3.1.7. PRIMER UND VEKTOREN 28
3.1.8. ZELLLINIEN 29
3.1.9. MEDIEN UND ZUSÄTZE FÜR DIE ZELLKULTUR 29
3.1.10. SOFTWARE 29

3.2. METHODEN **30**
3.2.1. ZELLBIOLOGISCHE METHODEN 30
3.2.2. KRYOKONSERVIERUNG UND AUFTAUEN VON LNCAP UND PC-3 ZELLEN 30
3.2.3. KULTIVIERUNG UND PASSAGIEREN VON PROSTATAKARZINOMZELLEN 31
3.2.4. ZELLZAHLBESTIMMUNG 32
3.2.5. TRANSIENTE TRANSFEKTION MITTELS SILENTFECT 32
3.2.6. TRANSFEKTION MITTELS ELEKTROPORATION 33
3.2.7. MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN 34
3.2.8. STATISTISCHE METHODEN 37

4. ERGEBNISSE **38**

4.1. SYNTHETISCH HERGESTELLTE CHEMISCH MODIFIZIERTE MIR-1-MOLEKÜLE **38**
4.2. NACHWEIS SYNTHETISCHER UND MODIFIZIERTER MIR1 MITTELS QUANTITATIVER RT-PCR **39**
4.3. LIPOSOMEN-BASIERTE TRANSFEKTION IN PC-3 ZELLEN MITTELS SILENTFECT **40**
4.4. WACHSTUMSKINETIK NACH TRANSFEKTION IN PC-3 ZELLEN MITTELS SILENTFECT **41**
4.5. TRANSFEKTION IN PC-3 ZELLEN MITTELS ELEKTROPORATION **42**

5. DISKUSSION **48**

6. ZUSAMMENFASSUNG **57**

7. LITERATURVERZEICHNIS **58**

8. ANHANG **67**

8.1. LEBENSLAUF **67**
8.2. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG **71**
8.3. DANKSAGUNG **72**

ALPHABETISCHES ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

2‘-F	2‘-Desoxyflouridin
2‘-OMe	2‘-Methyl-Nukleosid
3‘UTR	3‘ untranslatierte Region
5‘UTR	5‘ untranslatierte Region
A	Adenin
Ago2	Argonautenprotein 2
AR	Androgenrezeptor
C	Kohlenstoff
C4orf34	chromosome 4 open reading frame 34 gene
cDNA	komplementäre DNA
cm	centimeter
CO_2	Kohlendioxid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHT	Dihydrotestosteron
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinacid, Desoxyribonuklensäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DPBS	Dulbeccos’s phosphate-buffered saline
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
EGF	Epithelial Growth Factor
FCS	Fetales Kälberserum
FDA	Food and Drug Administration
FGD	Fibroblast Growth Factor
fM	femtomolar
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GnrH	Gonadotropinreleasing Hormon
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HIV	Humanes Immunifizienz Virus
kDA	kilo Dalton
LASS2	Longevity assurance homolog 2 of yeast
LH	Luteinisierendes Hormon
LNA	Locked Nucleic Acid
LNCaP	Lymph Node Carcinoma oft he Prostate
MIE	major immediate-early
min	Minute
miR	microRNA

ml	milliliter
mm	millimeter
mod	modifiziert
mRNA	messengerRNA
nmol	nanomol
nt	Nukleotide
p53	P53-Protein
PC-3	Humane Prostatakarzinomzelllinie
PCR	Polymerasekettenreaktion
pM	pikomolar
PNP	Purin-Nukleosid-Phpsphorylase
pre-miR	Vorläufer-Molekül der miR
pri-miR	primäre miR
PSA	Prostataspezifisches Antigen
R2D2	Protein bestehend aus 2 RNA-Bindungsmotive assoziert mit Dicer -2
Ran	Ras-related Nuclear protein
RBP	RNA-Bindungsproteine
RISC	RNA-induzierter Silencing-Komplex
RNA	Ribonukleinacid, Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
sec	Sekunde
siRNA	small interfering RNA
SNALP	Stabile Nukleinsäurelipidpartikel
STXBP4	Syntaxin Binding Protein 4
syn	synthetisiert
TAGLN2	Transgelin 2
U	units
U6	Referenzgen in miRNA-Studien
WDR78	WD Repeat Domain 78
µl	mikroliter

1. ZIELSETZUNG

In Krebszellen kommt es zu einer Dysregulation von miR. Dies scheint im weiteren Verlauf einen entscheidenden Einfluss auf die Proliferation, Metastasierung, Apoptose und Medikamentenresistenz von Tumorzellen zu haben.

Die Erforschung des therapeutischen Potenzials von miR-1 basiert auf der Beobachtung, dass miR-1 zahlreiche onkogene Signal- und Effektorkaskaden supprimieren kann [1]. Es zeigt sich, dass die verringerte Expression von miR-1 unmittelbaren Einfluss auf das verlängerte Tumorüberleben, die gesteigerte Proliferationsrate, verbesserte Angiogenese und Metastasierung von Tumorzellen hat [1, 2].

Dies lässt den Schluss zu, dass die medikamentöse Restauration der herabregulierten miR-1-Spiegel in Tumorzellen die tumorsuppressiven Eigenschaften von miR-1 wiederherstellen und somit einen vielversprechenden Ansatz für die Krebstherapie darstellen könnte. Zur biologischen Stabilisierung der synthetischen miR wäre der Einsatz chemisch modifizierter und damit biologisch stabilisierter miR ein innovativer Ansatz, um solche nukleinsäure-basierten miR in der Klinik einsetzen zu können.

Die vorliegende Arbeit zielt darauf ab, die miR-1 Re-Expressionstherapie zur Hemmung der Tumorprogression auf molekularer Ebene mit unterschiedlichen chemischen Modifikationen, d.h. unterschiedlichen Substituenten und in unterschiedlichen Prostatakarzinomzelllinien, zu überprüfen. Dabei soll untersucht werden, ob Position oder Anzahl an der synthetischen miR-1 sowie die unterschiedlichen Substituenten selbst einen Einfluss auf das Zellwachstum im Vergleich zur endogenen miR-1 und unmodifizierten synthetischen miR-1 haben.

2. EINLEITUNG

2.1. miR im Allgemeinen

In der Entwicklung von mehrzelligen Organismen ist die präzise räumliche und zeitliche Kontrolle der jeweiligen Zellentwicklungsphasen einschließlich der Zellteilung und -differenzierung von höchster Wichtigkeit. In jüngster Zeit zeichnet sich immer mehr ab, dass microRNA (miR), eine Klasse von nicht-kodierenden RNA-Molekülen, als Regulatoren der Genexpression in Eukaryoten eine entscheidende Rolle spielen [3]. Bereits 1993 wurde eine solche miR, lin-4, in *Caenorhabditis elegans* identifiziert. Damals wurde erstmalig gezeigt, dass über eine Antisense-RNA-RNA-Interaktion lin-4 die mRNA lin-14 Translation in *Caenorhabditis elegans* reguliert wird [4]. lin-14 bestimmt in der sich entwickelnden Larve die korrekte Abfolge der stadienspezifischen Programme. Zu diesen Ereignissen gehören u.a. spezifische Teilungsmuster, Zellzyklusprogression und Entwicklungsbindung in Vulva-Vorläuferzellen, Zellteilungen im Darm, neuronale Remodellierung und die entwicklungsspezifische Initiierung und Expression des Dauerlarven-Entwicklungsprogramms [5]. Es zeigte sich, dass die miR lin-4 nicht nur über den lin-14-Weg Einfluss auf die Larvenentwicklung von *Caenorhabditis elegans* ausübt, ebenso stellen let-7 und lin-28 Ziele von lin-4 dar. Funktionell übt lin-14 dabei eine Translationsrepression der mRNA aus und ermöglicht so den Übergang zum nächsten Entwicklungsstadium [6].

miR sind eine große Familie von ca. 21 Nukleotid langen RNA, welche sowohl bei Tieren und Pflanzen als auch einzelligen Eukaryonten vorhanden sind. Seit ihrer Entdeckung wurden bereits ca. 800 miR beim Menschen identifiziert. Die Anzahl der bekannten miR ist vergleichbar mit der Zahl an Transkriptionsfaktoren oder RNA-bindenden Proteinen. Es ist davon auszugehen, dass ca. 50 % aller proteinkodierenden Gene bei Säugetieren durch miR kontrolliert werden [7], womit miR zu den häufigsten Klassen von genregulatorischen Molekülen im Tierreich gehören [8].

Dabei zeichnet sich ab, dass miR einen großen Einfluss auf die Gestaltung von Transkriptom und Proteom haben. Dies erfolgt, indem sie den Abbau oder die Unterdrückung der Translation der Ziel-mRNA fördern. Die Expression von miR ist dabei sehr spezifisch reguliert. Dies betrifft sowohl das Gewebe als auch den Zelltyp und das Entwicklungsstadium. Die Regulation der zellulären mRNA Funktion erfolgt sowohl transkriptionell als auch

posttranskriptionell und ermöglicht eine sehr spezifische Feinabstimmung innerhalb der Zelle. Dies erfordert eine dynamische Regulierung der miR-Spiegel und ihrer Aktivität. Hierdurch kann die Zelle den erforderlichen Anpassungen in den Entwicklungsübergängen oder Veränderungen in der Umgebung sehr schnell gerecht werden. Gleichwohl ist der Einfluss von miR durch kombinatorische Effekte mit anderen miR oder RBP auf die Ziel-mRNA erheblich. Durch diese Interaktionen kann eine miR Einfluss auf mehrere hundert verschiedene mRNA nehmen [7]. miR beeinflussen die Kontrolle und Anzahl an proteincodierenden Genen. Dies beinhaltet Aspekte der Zelldifferenzierung, Proliferation und Apoptose. Veränderungen in der zellulären Expression von miR spiegeln sich bei vielen pathologischen Prozessen wider, wie bspw. neurologischen Störungen, Entstehung und Progression von Krebs und kardiovaskulären Komplikationen [9, 10].

2.1.1. miR Expression und Prozessierung

Die Synthese von reifer miR ist ein zweistufiger Prozess, in dem die Polymerase-III-Familie eine entscheidende Rolle spielt. Die meisten Gene für miR liegen auf den Introns der proteinkodierenden oder nicht-kodierenden Gene. Im ersten Schritt wird die primäre miR (pri-miR) durch die RNA Polymerase II transkribiert. Die pri-miR besteht aus mehrehren hundert Nukleotiden (nt) bis hin zu mehreren Kilobasen und bildet Haarnadelstrukturen. Diese werden im Zellkern durch Mitglieder der Ribonuklease-III-Familie erkannt und im Mikroprozessorkomplex gespalten. Drosha und sein Kofaktor Pasha sind Bestandteile einer ca. 500 kDa Multiproteinmaschinerie, welche pri-miR in pre-miR umwandelt [11]. Die entstandenen pre-miR ist mit ca. 70 nt schon deutlich kürzer, bildet aber ebenfalls eine Haarnadelstruktur. Die Besonderheit liegt im 2 nt langen 3' Überhang. Dieser stellt zum einen die Signatur für die weitere Ribonuklease III vermittelte Spaltung dar und ist zum anderen von Bedeutung für den Exportweg. Nach Spaltung durch Drosha, einem Mitglied der Ribunuklease-III-Familie, wird die pre-miR mithilfe eines RanGTP/Exportin 5 abhängigen Mechanismus aus dem Zellkern heraus in das Zytoplasma exportiert. Im Zytoplasma erfolgt der zweite Schritt der Prozessierung. Hierbei kommt das Enzym Dicer, ein weiteres Mitglied der Ribonuklease-III-Familie, zum Einsatz. Dicer ist ein 200 kDAa Multidomänenprotein und spaltet die pre-miR in der Nähe der Haarnadelstruktur am 2 nt langen 3' Überhang in die reife miR. Diese ist gekennzeichnet durch eine Länge von ca. 22 nt und bildet einen miR/miR* Duplex mit einem

2 nt Überhang am 3' Ende [7, 11, 12]. Im Anschluss wird die reife miR in den RNA-induzierten Silencing-Komplex (RISC) integriert. Hierbei wird in der Regel nur ein Strang des miR/miR* Duplex integriert. Welcher der beiden Stränge integriert und welcher abgebaut wird, hängt von der thermodynamischen Stabilität der miR-Enden ab. Das Schicksal des jeweiligen Duplex ist abhängig von der Stärke der Wasserstoffbindung am 5‘-Ende. Mit Hilfe von R2D2 bildet Dicer ein Heterodimer und bindet das miR/miR* Duplex. Das Heterodimer fungiert als Sensor für die thermodynamische Stabilität der miR-Enden. Der miR-Strang hat an seinem 5'-Ende das Nukleotid Uracil und ist somit durch ein Uracil- und Adenin-Basenpaar (zwei Wasserstoffbrückenbindungen) mit dem miR*-Strang verbunden. Im Gegensatz dazu ist das Nukleotid am 5’ Terminus des miR*-Stranges durch ein Cytosin- und Guanin-Basenpaar (drei Wasserstoffbrückenbindungen) mit dem miR-Strang verbunden. R2D2 bindet am stabileren Ende mit den drei Wasserstoffbrückenbindungen, während Dicer in der Regel stärker am weniger stabilen Ende mit dem Uracil- und Adenin-Basenpaar bindet. Das Entwinden des Duplex beginnt an diesem thermodynamisch weniger stabilen Ende. Der miR-Strang, dessen 5'-Terminus sich an diesem Ende befindet und weniger eng mit seinem Komplement gepaart ist, wird letztlich in den RISC-Komplex integriert. Der thermodynamisch stabilere miR*-Strang wird infolgedessen degradiert und abgebaut. Im nachfolgenden Schritt erfolgt der Austausch von R2D2 gegen Ago2. Anschließend werden weitere akzessorische Proteine eingebaut und Dicer dissoziiert vom Komplex. Die Folge der asymmetrischen Auswahl des zu integrierenden Stranges ist, dass bei den meisten miR nur ein Strang in der Lage ist, die Ziel-mRNA zu erkennen und mit dieser zu interagieren [13, 14].

2.1.2. Regulatorische Funktionen von miR

Im Allgemeinen bilden miR Watson-Crick-Basenpaarungen mit ihrer Ziel mRNA [15]. Der Grad der Komplementarität der Bindung zwischen miR und mRNA wurde als eine der wichtigsten Determinanten des Regulierungsmechanismus angesehen [16]. Es hat sich zum einen gezeigt, dass eine miR in der Lage ist viele mRNA zu beeinflussen, zum anderen jedoch, dass eine mRNA durch mehrere miR beeinflusst werden kann. Dabei kommt der Seed-Region in der miR eine besondere Stellung zu. Diese Region befindet sich bei miR in der Nähe des 5´-Endes, betrifft in den meisten Fällen die Nukleotide 2 bis 8 und ist zwischen 6 und 8 Nukleotide lang. Die Seed-Region ist selbst unter verschieden Arten hoch konservativ und selbst kleinste

Änderungen in ihrer Länge oder ihrer Nukleotide kann sich auf das Bindungsverhalten gegenüber ihren Zielgenen auswirken [10].

Negative post-transkriptionelle Regulationen üben miR aus, indem sie die 3’ untranslatierte Region (3’-UTR) und die 5’ untranslatierte Region (5’-UTR) der Ziel-mRNA binden. Viele miR enthalten hierzu eine signifikante Zahl an Interaktionsstellen an ihren 3’- bzw. 5’-Endsequenzen. Die Bindung kann an einem oder beiden Enden stattfinden. Dabei kann die Bindung an beiden Regionen zu synergetischen Effekten führen und infolgedessen zu einer verstärkten Regulation der Ziel-mRNA [17]. Die Paarung mit dem 5’-Ende der miR, insbesondere den Nukleotiden 2 - 8, scheint für die Zielerkennung am wichtigsten zu sein. Ursächlich hierfür könnte die tendenziell bessere Konservierung der 5’ Enden verwandter miR als der 3’ Enden sein. Resultierend daraus sind diese Segmente für die mRNA-Erkennung möglicherweise am kritischsten [18 – 20].

Für das Schicksal der translatierten mRNA ist die Bindung an die miR von wegweisender Bedeutung. Die Wirksamkeit der suppressiven Effekte auf die mRNA hängt von der komplementären Bindung mit der jeweiligen miR ab. Eine vollständig komplementäre Bindung erzielt dabei einen größeren supprimierenden Effekt als eine unvollständige Bindung [21].

Des Weiteren scheint die 3´ UTR der mRNA einen Hinweis darauf zu geben, an welchen zellulären Prozessen die miR beteiligt ist. mRNA mit längeren 3’ UTR scheinen in der Regel eine höhere Dichte an Bindungsstellen für miR aufzuweisen und hauptsächlich an Prozessen der Entwicklung von Zellen beteiligt zu sein. Hingegen haben die Ziel mRNA mit kürzeren 3’ UTR in der Regel eine geringere Dichte an Bindungsstellen und scheinen häufiger an grundlegenden zellulären Prozessen beteiligt zu sein [10]. Hierin findet sich möglicherweise ein Hinweis darauf, dass miR einen tiefgreifenden Einfluss auf die evolutionäre Entwicklung von 3’UTR der mRNA hatten. Ebenso zeigt sich, dass ca. 50% der konservierten 8-mer Blöcke in 3’UTRs komplementär zu bekannten miR sind [22].

2.2. Maligne Zellen und die Rolle der miR

Maligne Tumore haben gegenüber physiologischem Gewebe einen Wachstumsvorteil. Diesen generieren sie u.a. über Mechanismen wie gesteigerte Proliferation, gesteigerte Angiogenese, die Modulation verschiedener Komponenten der Immunabwehr, welche letztendlich

zusammenführend zur Unsterblichkeit dieser Zellen führen können [23]. Diese Immortalität ist oftmals Resultat fehlgeleiteter Regulationsmechanismen der einzelnen Zellen.

Die Aufklärung der Funktionalität von miR in tumorösen Geweben ermöglicht ein detaillierteres Verständnis der Tumorbiologie verschiedener maligner Entitäten [24, 25]. Gegenwärtig sind mehr als 45.000 miR-Bindungsstellen bekannt, welche die Aktivität von mehr als 60% aller menschlichen proteincodierenden Genprodukte regulieren [26]. Die hohe Anzahl an miR-Genen, die vielfältigen Expressionsmuster und die Fülle an potenziellen miR-Zielen deuten darauf hin, dass miR an einem breiten Spektrum menschlicher Krankheiten beteiligt sind [27].

Die Besonderheit jener kurzen, nicht-kodierenden RNA liegt in der Beeinflussung der Kanzerogenese. Posttranskritptionell sind sie in der Lage mittels spezifischer Bindung bis zu mehrere hundert mRNA-Arten zu modifizieren und daraus resultierend zentrale Prozesse einer Zelle zu steuern, indem sie bei ausreichender Komplementarität die mRNA-Spaltung katalysieren oder ihre Translation hemmen und so zu einer Inhibition in der Proteintranslation führen [28]. Auf diesem Wege üben miR einen spezifischen Einfluss auf die Zellentwicklung, -differenzierung und -kommunikation aus. Dies beinhaltet Zellproliferation, -metabolismus und -differenzierung, Zelltod, Hämatopoese, Neuronenentwicklung, humane Tumorgenese, DNA-Methylierung und Chromatinmodifikation [29]. Darüber hinaus können miR tumormodifizierende, extrinsische Faktoren, wie solche der Krebs-Immun-Interaktionen, Stroma-Zell-Interaktionen, Onkoviren und die Sensitivität auf Therapie modulieren. In Summe ist es die Balance zwischen diesen Prozessen, welche bestimmt, ob eine spezifische miR eine onkogene oder onkosupressive Wirkung erzeugt [30].

Im Allgemeinen können miR in zwei sich gegenüberstehende Gruppen eingeteilt werden: miR, die die Entstehung und das Wachstum von Tumoren unterdrücken – Tumorsuppressoren – oder solche, die onkogene Prozesse fördern können – Onkogene [25].

Etwa 5300 Gene des Menschen fungieren als Ziele für genregulierende miR.

Als Beispiel für eine miR, die je nach Kontext entweder als Onkogen oder als Tumorsuppressor fungieren kann ist miR-1, eine bedeutende krebsassoziierte miR. Studien in der Vergangenheit deuten sowohl auf ungleichmäßige, als auch auf zelltyp- und tumorstadienspezifische Funktionen hin. So zeigte sich eine erhöhte Expression von miR-1 im Ovarialkarzinom verglichen mit gesundem, nicht-malignem Gewebe [31]. Des Weiteren konnten auch in

Lebermetastasen eines Magenkarzinoms erhöhte Spiegel von miR-1 nachgewiesen werden [32]. Im Gegensatz dazu zeigte sich die Expression von miR-1 in einer Vielzahl diverser Karzinomentitäten wie dem Kolonkarzinom [33], Lungenkarzinom [34],
Blasenkarzinom [35], Leberzellkarzinom [36], Osteosarkom [37], Gallenblasenkarzinom [38] sowie Kopf-Hals-Tumoren [39] im Vergleich zu benachbartem gesundem Gewebe deutlich vermindert. Diese Ergebnisse deuten drauf hin, dass miR-1 in benannten Entitäten als Tumorsuppressor zu wirken scheint. Auch im Prostatakarzinom zeigt miR-1 eine tumorsupprimierende Wirkung, in dem es die Zellmotilität und somit die Proliferation des Tumors inhibiert und Apoptose fördert [40]. Tumorsuppressive miR werden während der Entstehung maligner Gewebe häufig herunterreguliert und verlieren ihren kontrollierenden Einfluss und begünstigen so die Entstehung und das Wachstum von malignen Zellen und haben Einfluss auf deren Motilität sowie Arzneimittelsensitivität.

2.3. miR-1

miR-1 kontrolliert zentrale Signalkaskaden und hat einen vielfältigen Einfluss auf die Expressionsmuster von Genen. Dies beschränkt sich nicht nur auf die Regulierung von entwicklungsbiologischen Ereignissen, sondern hat auch regulatorische Wirkung auf physiologische Vorgänge von Zellen. Hierzu gehören Proliferation, Apoptose, Migration und Invasion sowie die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) [41 - 45].
Die änderliche Expression von miR-1 beeinflusst sowohl tumoröse als auch nicht-tumoröse Gewebe. In Letzterem hat miR-1 einen besonderen Stellenwert bei verschiedenen Herzerkrankungen, wie Hypertrophie, Herzinsuffizienz und Arrhythmien [43, 44]. Verglichen mit gesundem Myokard weist miR-1 reduzierte Expressionlevel in myokardialem Infarktgewebe auf [45].
Auch Lungenerkrankungen zeigen eine Veränderung in der mir-1 Expression - so wurden im Serum von Patienten mit chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (COPD) signifikant niedrigere miR-1 Spiegel nachgewiesen [46].
Tumorerkrankungen gehen häufig mit einer Dysregulation von miR einher. In einigen Fällen korrelieren die Abweichung der miR Expression sogar mit dem klinischen Status, wie dem Tumorstadium oder dem Patientenüberleben [47]. miR-1 ist bei verschiedenen Tumorentitäten dysreguliert, in kolorektalen Karzinomen beispielsweise signifikant verringert

[48]. Diese Dysregulation ist von großer Relevanz für die Kontrolle von molekularen Signalwegen und den Einfluss auf die maligne Zellantwort [49]. In der überwiegenden Mehrheit unterschiedlicher Tumorentitäten sind signifikant verringerte Level an intrazellulärem miR-1 nachzuweisen. Im Fall des kolorektalen Karzinoms bewirkt miR-1 durch den Verlust seiner tumorsuppressiven Eigenschaft eine gesteigerte Motilität der malignen Darmzellen, weswegen der Schluss nahe liegt, dass die Dysregulation von miR-1 zum metastatischen Verhalten von Dickdarmkrebszellen beitragen kann [50]. Ähnliche Ergebnisse ergaben Untersuchungen an Prostatakarzinom [51, 52], Lungenkrebs [53, 54], Blasenkrebs [55], Hepatokarzinom [56], Gallenblasenkarzinom [57] und Osteosarkom [58].

Für einige Tumorentitäten finden sich jedoch gegenteilige Beobachtungen, wie z.B. erhöhte miR-1-Spiegel in Ovarialkarzinomgewebe [62]. Darüber hinaus wurden auch bei Magenkarzinompatienten erhöhte miR-1 Expressionswerte nachgewiesen, welche tendenziell mit einer höheren Rate an Lebermetastasen in Verbindung gebracht werden können [63].

Literaturdaten weisen durchaus auf gegensätzliche Funktionen von miR-1 hin und machen eine differenzierte Betrachtung der miR-1-Funktionalität notwendig, da der Einfluss grundsätzlich sowohl zelltyp-, als auch eine stadienspezifisch zu sein scheint. Somit kann miR-1 vermutlich sowohl als Tumorsupressor als auch als Onkomir fungieren [64].

2.4. miR als eine weitere therapeutische Option

miR als endogene Regulatoren sind an der Steuerung zahlreicher, zellulärer, physiologischer Prozesse beteiligt. In der vergangenen Zeit hat sich ein großes Interesse an miR als klinischem Biomarker, diagnostischem Werkzeug [65] und Therapeutikum entwickelt. Die Gründe dafür liegen darin, dass das therapeutische Potenzial von miR bei der Behandlung vieler verschiedener und komplexer Krankheiten, wie beispielsweise Krebs [66, 67] und Infektionen [68], [69], nachgewiesen wurde. Im Vergleich zu herkömmlichen Arzneimitteln haben miR den Vorteil, dass sie hochwirksam und selektiv sind und auf Ziele wirken können, auf die gewöhnliche Medikamente keinen direkten Einfluss haben. Zu solchen Zielen gehören Proteine, denen eine enzymatische Funktion fehlt oder die eine Konformation aufweisen, die bisher für traditionelle Arzneimittelmoleküle unzugänglich sind. Zudem kann eine einzelne miR eine Vielzahl von krankheitsverursachenden Genen spezifisch und wirkungsvoll unterbinden [65, 70, 71]

Es hat sich gezeigt, dass die Expression vieler endogener miR bei verschiedenen Krankheiten verändert ist. Einige miR sind überexprimiert, während andere unterexprimiert sind. Die physiologische Wirkweise der endogenen miR legt dabei unterschiedliche therapeutische Ansätze nahe [72]. Dabei sind zum einen Therapeutika denkbar, welche als Inhibitoren von endogen miR fungieren und zum anderen solche, die pathologisch herunterregulierte endogene miR innerhalb einer Zelle exogen ersetzen. Im ersten Ansatz wirkt die synthetische, einzelsträngige RNA als Antagomir, um die endogene miR zu hemmen [73]. Zur Verringerung der entsprechenden miR-Spiegel muss die Antagomir komplementär an diese binden [72]. Beim Ersatz der endogenen miR werden synthetische miR verwendet, um die Funktion der endogenen miR nachzuahmen. Dies führt zur mRNA-Degradation oder Inhibition und erzeugt einen Gen-Silencing-Effekt [70, 74].

Synthetisch hergestellte und modifizierte miR als eine weitere und neuartige therapeutische Option bei komplexen Erkrankungen in der klinischen Anwendung haben ein enormes Potenzial, die Ära der personalisierten Medizin ein Stück mehr Realität werden zu lassen.

2.5. Die Herausforderungen für synthetische miR in der Funktion als Therapeutikum

2.5.1. Die Hürde der nicht-selektiven, systemischen Abgabeverfahren

Ein Problem in der klinischen Anwendung stellen die Abgabeverfahren für miR dar.

Es wurden zwar bereits erfolgreiche lokale Anwendungen, wie z.B. okulär bei der feuchten, altersbedingten Makuladegeneration und pulmonal zur Therapie der respiratorischen Syncytialvirusinfektion durchgeführt [70], jedoch haben nicht-selektive, systemische Abgabeverfahren weitere Hürden zu überwinden. So sind ungeschützte RNA, in ihrer unmodifizierten Form, nach systemischer Verabreichung in den Blutstrom, den dort vorhandenen Nukleasen und dem damit verbundenen schnellen Abbau und daraus resultierender kurzer Halbwertzeit ausgesetzt [65].

Des Weiteren kann die nicht-selektive, systemische Abgabe zu einer unspezifischen Verteilung der miR im gesamten Körper führen. Hierdurch kann es zu starken Unterschieden in der lokalen Konzentration kommen. Infolgedessen können im gewünschten Gewebe deutlich verringerte Konzentrationen der gewünschten miR akkumulieren und diese somit ohne signifikanten, therapeutischen Effekt bleiben. So würden größere Mengen miR für die gewünschten Effekte, wie bspw. das Gen-Silencing benötigt. Damit könnten durch das

erhöhte Vorhandensein von miR Toxizitäten induziert und zytotoxische Effekte, wie z. B. Immunantworten, ausgelöst werden [74].

Anforderungen an ein nicht-selektives, systemisches Abgabeverfahren wären u.a.

- Stabilität im Kreislaufsystem,
- Immuntoleranz gegenüber Modifikationen und Funktionalisierung,
- Überwindung biologischer Barrieren,
- eine hohe Zielgewebsspezifität,
- geringe Aggregationsneigung,
- keinen negativen Effekt auf die Gerinnungskaskade aufzuweisen,
- wasserlöslich oder kolloidal zu sein,
- eine ausreichende zirkulierende Halbwertszeit zur Erhöhung der Wirksamkeit sowie
- die sichere Abgabe des Wirkstoffes, in diesem Fall der miR, in die Zielzellen [75].

2.5.2. Das Problem der Off-target Effekte

Ein weiteres Problem stellen sogenannte Off-target Effekte dar. Dabei kommt es zu einer ungewollten Paarung der miR mit einer mRNA, die nicht der Zielposition entspricht. Oft liegt dies daran, dass der veränderte Abschnitt der Seedregion der miR nur wenige Basenpaare lang ist und eine große Ähnlichkeit mit der Zielregion unterschiedlicher mRNA aufweist. Durch diese ähnlichen Bindungsstellen und eine unvollkommene komplementäre Bindung der miR mit ihrer Ziel-mRNA kann dies zu einem unspezifischem Silencing und Off-Target-Effekten führen. Der überwiegende Teil der Off-Target-Effekte wird durch die Übereinstimmung der Seedregion innerhalb der miR mit der 3'-untranslatierten Region (UTR) der zellulären mRNA verursacht [74]. Es bleibt jedoch zu betonen, dass dieses Problem bei siRNA eine deutlich größere Rolle spielt. So zeigen Aimee L. Jackson et al., dass siRNA bei überlappenden Übereinstimmungen innerhalb einer Bindungsregion sogar über unterschiedliche Zelllinien hinweg zu Stummschaltung der entsprechenden Gene führen [76].

2.6. Das Ziel der Modifikation an der miR

Ziel ist es, miR durch Modifikationen resistenter gegenüber Nukleasen zu machen und so bis zum Erreichen ihres Wirkortes zu schützen sowie die Abgabe und Zellpenetration zu erleichtern ohne ihre Funktionalität zu beeinträchtigen [70]. Des Weiteren sollte durch die Modifikation eine erhöhte Bindungsaffinität für mRNA-Ziele erreicht werden, eine strukturelle Präferenz im Rahmen der Applikation geschaffen sowie das Immunsystem nur geringfügig oder nicht stimuliert werden. Dazu gehört, dass die modifizierten miR mit den endogenen Silencing-Pfaden kompatibel sind. Hierzu muss eine Reihe von Faktoren berücksichtigt werden, zu welchen die Position der Base, die Art der Modifikation und ihre Auswirkung auf die Ladung der miR zählen [65].

2.6.1. Beispiele für mögliche Modifikation an der miR

In der Literatur werden mehr als 100 chemisch unterschiedliche RNA-Modifikationen beschrieben. Diese Modifikationen können je nach chemischer Struktur, der Zielstelle auf dem RNA-Polymer und dem funktionellen Typ der RNA in mehrere Unterkategorien unterteilt werden [77].

Im Folgenden werden 3 Beispiele zur Modifikation in unterschiedlichen Bereichen der nicht codierenden RNAs vorgestellt. Hierbei handelt es sich um die Internukleotid-Bindungsmodifikationen, Zuckermodifikationen und Nukleobasen-Modifikationen.

2.6.2. Modifikation an Internukleotid-Phosphodiester-Bindungen

Die Internukleotid-Phosphodiester-Bindungen der RNA bildet das Rückgrat der natürlichen RNA. Endo- und Exonukleasen, die im Serum und im Zytoplasma vorkommen, können diese Bindungen jedoch leicht spalten. Zusätzlich behindert das polyanionische Phosphodiester-Rückgrat die zelluläre Aufnahme, was zu einer schlechten Pharmakokinetik führt [78]. Durch eine chemische Modifikation am Phosphatrückgrat kann es zu einer erheblichen Verbesserung der Resistenz gegenüber der Spaltung durch Nukleasen kommen (Beispiele für Modifikationen siehe Abb. 1). Folglich kann sich die biologische Aktivität und Bindungsaffinität für Zielsequenzen und die thermische Stabilität erhöhen sowie die zelluläre Aufnahme verbessern. Zudem lassen sich die Modifikationen an den Internukleotid-Phosphodiester-

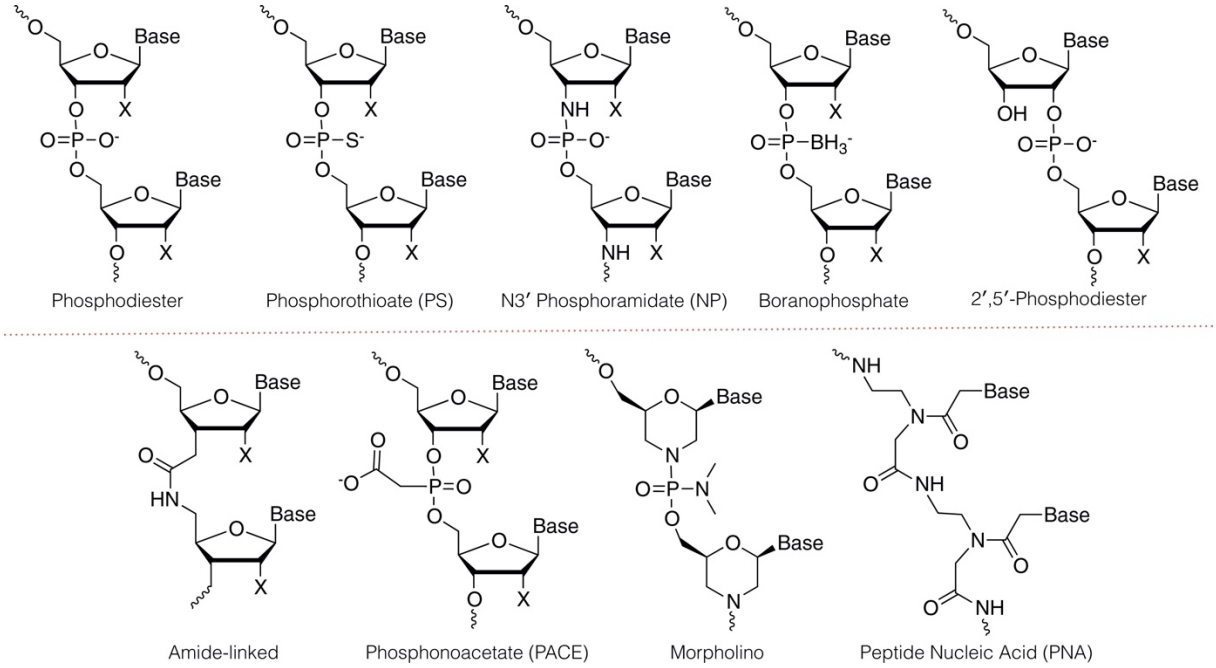

Abb.1 *Ausgewählte chemische Modifikationen von Internukleotid-Bindungen nach Deleavey et al. [79]*

Bindungen sehr gut mit Zuckermodifikationen kombinieren, wodurch weitere positive Synergien geschaffen werden können [79 – 81].

Ein bekanntes Beispiel für die Modifikation des Phosphatrückgrats der RNA ist die Phosphorothioat-Bindung. Bei dieser Modifikation wird ein nicht brückenbildender Sauerstoff durch ein Schwefelatom ersetzt. Diese Veränderung an der RNA verleiht ihr eine signifikante Resistenz gegenüber dem Abbau durch Nukleasen. Phosphorothioat-Bindungen in nicht codierenden RNA können die Affinität zur Bindung mit Serumalbumin erhöhen und infolgedessen die Zirkulationszeit und damit die Pharmakokinetik verlängern [79].

Diese Modifikation wurde bereits erfolgreich getestet und war ein Hauptbestandteil von Antisense-Therapiekandidaten der ersten Generation. Phosphorothioat-Modifikationen waren Bestandteil von Vitravene, auch bekannt als Fomivirsen.

Bei diesem Medikament handelt es sich um das erste Antisense-Oligonukleotid, das von der Food and Drug Administration (FDA) zur Vermarktung zugelassen wurde. Dieses 21 Nukleotid-Phosphorothioat-Oligodesoxynukleotid war für die Behandlung von HIV-Patienten mit Cytomegalievirus-Retinitis bestimmt. Ziel war es, die mRNA des humanen Cytomegalievirus mit einer komplementären Sequenz der major immediate-early (MIE) transkriptionalen Einheit zu blockieren und damit die Translation zu verhindern [82].

2.6.3. Zucker-Modifikationen der miR

Eine weitere Möglichkeit der chemischen Modifikation bietet die Ribose der nicht codierenden RNA. Veränderungen am Zucker des Nukleotids gehen mit einer erhöhten Präferenz für Faltungen des Nukleotidzuckers einher. Dabei ist die Faltung abhängig von der Temperatur, von der Nukleotidbasensequenz und den Zuckerringsubstituenten und resultiert letztlich in einer South- oder North-Konformation der Ribose (Abb. 2). Diese physikalische Eigenschaft steht in engem Zusammenhang mit der Bindungsaffinität [79, 83]. Es scheint, als sei die 2'-OH-Gruppe der Ribose sehr günstig für Modifikationen, da sie für den Eintritt in die RNAi-Maschinerie nicht essentiell anmutet und so die miR nicht in ihrer Funktion beeinträchtigt. Aus diesem Grund scheint diese Position für Modifikationen gut geeignet und ist als 2'-Modifikationen bekannt. Häufig genutzte Substituenten sind beispielsweise 2'-Methyl-Nukleosid- (2'-O-Me) und 2'-Deoxyfluoridin (2'-F). Neben der Modifikation mittels Substituenten gibt es eine weitere Möglichkeit der Modifikation an der 2'-Position mittels

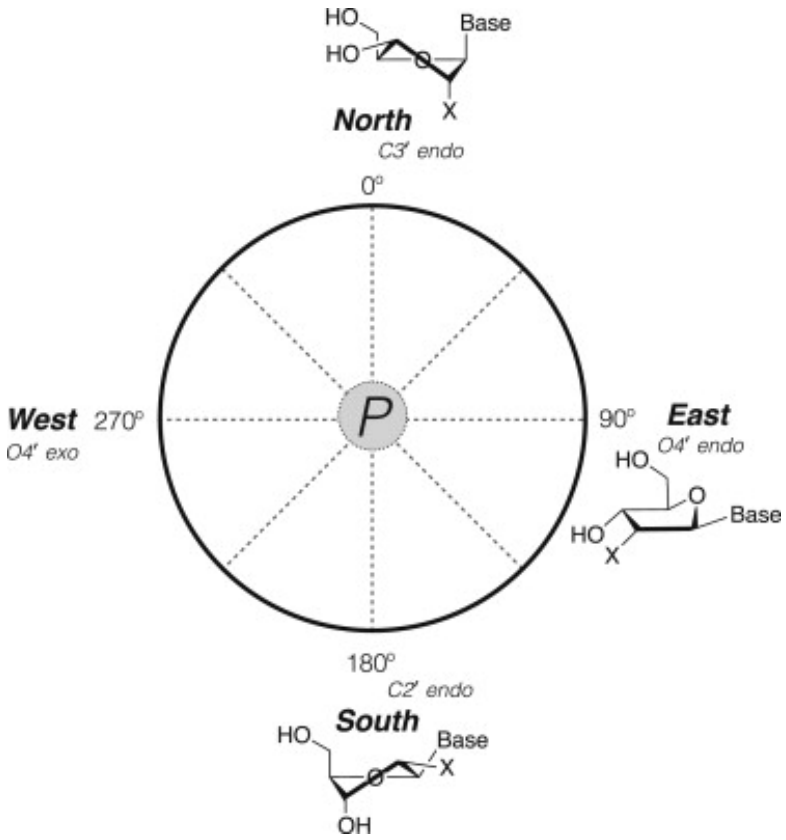

Abb 2. *Pseudorotationsrad und entsprechende Zuckerfaltungsformationen nach Deleavey et al. [79]*

Locked Nucleic Acids (LNAs) [70]. An der Ribose wird bei dieser Modifikation eine Methylenverknüpfung zwischen den 2’- und 4’-Positionen erzeugt. Diese Brücke verbindet an der Ribose das Sauerstoffatom am C-2´ mit dem 4´-Kohlenstoffatom (Abb. 3).

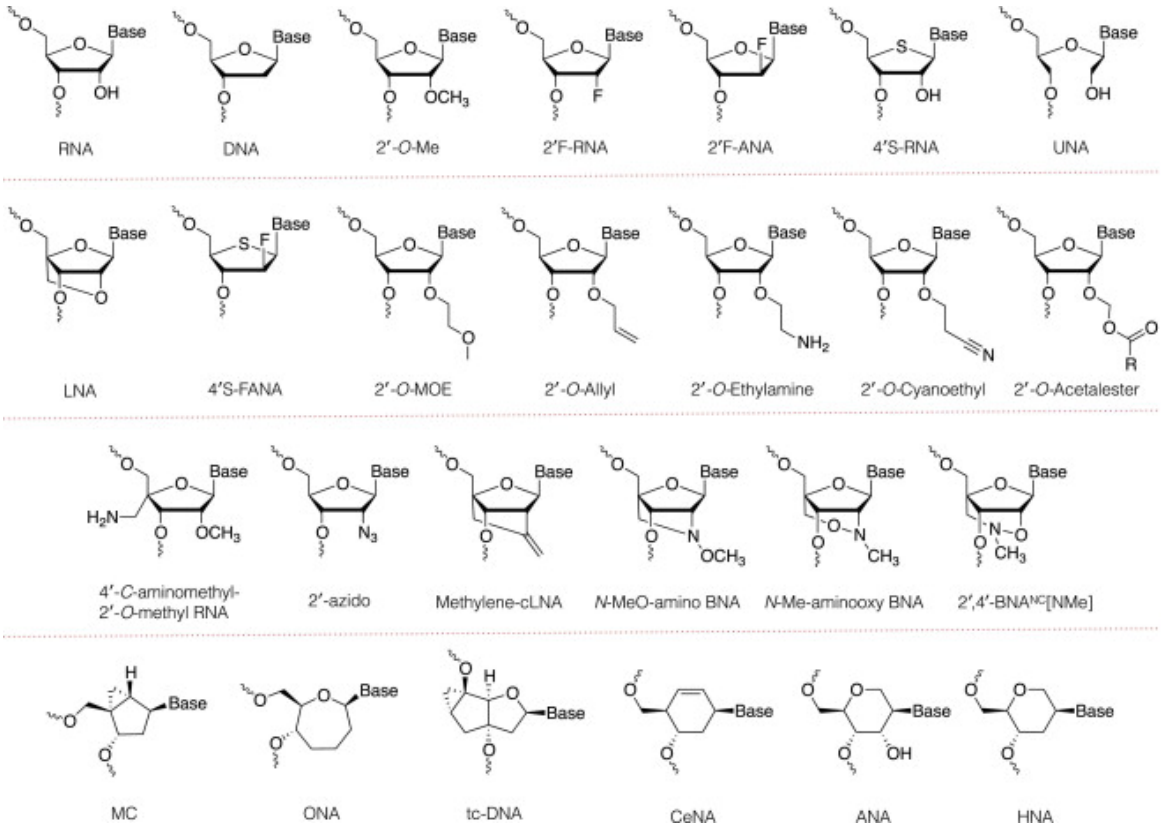

Abb. 3 *Mögliche Modifikationen am Zucker des Nukleotids nach Deleavey et al. [79]*

2.6.4. 2′-O- Methylgruppe-RNA-Modifikation

Eine der häufigsten Modifikationen am Zuckerring stellt die 2’-O-Methylgruppe dar [85]. Diese Modifikation verleiht unterschiedliche Grade erhöhter Bindungsaffinität für RNA-Komplemente und Nuklease-Stabilität. Zudem handelt es sich um ein natürlich vorkommendes Nukleotid in der ribosomalen RNA von Säugetieren, von dessen Verwendung bisher keine Toxizität berichtet wurde. Es konnte zwar bereits gezeigt werden, dass die Modifikation mittels 2’-O- Methylgruppe in einzelsträngigen RNA eine signifikante Stabilität gegenüber Endonukleaseangriffen bietet, jedoch weniger Resistenz vor dem Abbau durch Exonukleasen [86]. Eine weitere wichtige Eigenschaft der Modifikation zeigt sich in der nachweislichen Reduktion der immunstimulierenden Eigenschaften von siRNA [79].

Modifikationen mit 2’-O- Methylgruppen gelten im Allgemeinen als gut verträglich. Allerdings können umfangreiche oder vollständige Modifikationen zum Verlust der Silencing-Effizienz führen [65].

2.6.5. 2′-Fluor -RNA-Modifikation

Eine weitere, häufig genutzte, chemische Modifikation an der RNA, welche Erwähnung finden sollte, ist die 2’-Fluor-RNA-Modifikation. Diese zeichnet sich durch eine North-Konformation aus und wird zumindest teilweise durch Gaucheffekte hervorgerufen. Modifikationen mit 2’ Fluor an der RNA erhöhen ebenfalls die Bindungsaffinität für Ziel-RNA-Sequenzen und verstärken Basenpaarungs- sowie Stapelwechselwirkungen. Eine Erklärung dafür liegt in der Elektronegativität des Flour. 2’F-RNA-Modifikationen gelten ebenfalls als gut verträglich, allerdings geben sie keine signifikante Resistenz gegen Exonukleasen, obwohl 2’F-RNA eine Resistenz gegen pyrimidinreiche Sequenzen und Endonukleaseabbau verleiht [87].

2.6.6. Nukleobasen-Modifikationen an der miR

Eine weniger verbreitete Möglichkeit der chemischen Modifikation bilden die Nukleobasen. Das Ziel der Modifikation ist es, die Interaktion mit der Ziel-mRNA zu erhöhen, die thermische Stabilität zu verbessern und die Immunstimulation zu verringern. Unterdessen erhöht die Modifikation an den Nukleobasen die Fähigkeit des RISC, die mRNA zu erkennen und zu spalten. Zu den chemischen Eigenschaften, die durch die Modifikationen hervorgerufen werden, gehören hauptsächlich elektrostatische Wechselwirkung, Wasserstoffbrückenbindungen, Komplexbildung und insbesondere die generalisierte Säure-Base-Wechselwirkung. Beispiele für Modifikationen an den Nukleobasen umfassen die Adenin-Methylierung und -Deaminierung, Cytosin-Methylierung, Hydroxymethylierung und Carboxy-Substitution sowie Guanin-Oxidation. Durch die modifizierten Basen kommt es zur Veränderung der Struktur an den nicht codierenden RNA. Durch diese strukturellen Veränderungen verändern sich die Eigenschaften der funktionellen Gruppe und damit die funktionellen Eigenschaften [79, 85, 88].

2.7. miR-1 im Prostatakarzinom

Die beiden Gene miR-1-1 und miR-1-2 kodieren für die identische, reife Form von miR-1. miR-1-1 und miR-1-2 befinden sich in zwei verschiedenen Chromosomen im menschlichen Genom, -20q13.33 und 18q11.2. Innerhalb der Zelle wird miR-1 als Vorläufer mit ca. 70 Nukleotiden transkribiert und anschließend vom Enzym Dicer zu Reifeprodukten mit einer Länge von ca. 22 Nukleotiden verarbeitet. Die reife Sequenz stammt vom 3p-Ende des miR-1-Vorläufers [89].

miR-1 gehört zu den sehr stark heruntergeregelten miR bei primären menschlichen Prostatatumoren [90]. Zielgene von miR-1 sind unter anderem Exportin 6 und A6/Twinfilin [91, 92]. Beide Gene regulieren die zelluläre Aktindynamik und beeinflussen die Motilität der Zelle [93]. Zu weiteren Ziel mRNA für miR-1, die ebenfalls bei dessen Fehlen in Prostatakrebszellen mit erhöhten Expressionsmustern auffallen, gehören Transgelin 2 (TAGLN2), WD Repeat Domain 78 (WDR78), chromosome 4 open reading frame 34 gene (C4orf34), Purin-Nukleosid-Phosphorylase (PNP), Longevity assurance homolog 2 of yeast LAG1 (LASS2) und Syntaxin Binding Protein 4 (STXBP4) [94]. Modulationen dieser Zielproteine deuten auf wichtige Schritte in der Onkogenese oder Progression beim Prostatakarzinom hin. Darüber hinaus hat miR-1 einen wesentlichen Einfluss auf die epithelial-mesenchymale Transition in Prostatakrebszellen. Hierbei handelt es sich um Programme, welche in Verbindung mit Gewebereparatur und pathologischen Belastungen aktiviert werden können, einschließlich solcher, die von Entzündungen und bei der Entstehung von Malignomen verursacht werden. Die epithelial-mesenchymale Transition stellt einen anerkannten Mechanismus dar, mit dem Zellen in Embryonen gesteuert, mesenchymale Zellen in verletzten Geweben gebildet und das invasive sowie metastatische Verhalten von epithelialen Krebsarten eingeleitet werden können [95]. Die miR-1-Expression unterstützt dabei die Hemmung der Progression von der gutartigen Prostatahyperplasie in das Prostata-Adenokarzinom [96].

Zusammenfassend zeigen genannte Beispiele, dass miR-1 im Prostatakarzinom als Tumorsuppressor wirkt, indem es Proliferation, Migration und Invasion unterdrückt, Einfluss auf DNA-Replikation/Reparatur, Apoptose und Aktindynamik in Prostatakrebszellen nimmt und somit mehrere krebsbezogene Prozesse beeinflusst [40, 89, 94].

2.8. Das Prostatakarzinom

Mit 25,4% aller diagnostizierten Krebserkrankung ist das Prostatakarzinom die häufigste Malignität des deutschen Mannes mit einem mittleren Erkrankungsalter von 69 Jahren [97]. Ursachen für die Entstehung von Prostatakarzinomen können vielfältig sein. Mit zunehmendem Alter steigt die Inzidenz. So konnte bei pathologischen Untersuchungen der Vorsteherdrüse bei 70-100% der über 90-jährigen Probanden ein Karzinom nachgewiesen werden. Ebenso wird eine familiäre Häufung beobachtet. Ätiologisch kann die Karzinomentwicklung auf Grundlage einer benignen Prostatahyperplasie beobachtet werden, allerdings kann eine Karzinomentwicklung durch eine morphologisch unauffällige Prostata nicht ausgeschlossen werden [98].

Neben Alter, familiärer Häufung und strukturellen Veränderungen der Prostata besteht außerdem ein hormoneller Einfluss auf die Entstehung von Prostatakarzinomen. Zur Ausübung ihrer Funktion ist die Prostata in einen hormonellen Regelkreis eingebettet, der in absteigender Hierarchie zwischen Hypothalamus, Hypophyse und Gonaden besteht. Dabei wird im Hypothalamus das Gonadotropinreleasing Hormon (GnRH) ausgeschüttet. Dieses wirkt stimulierend auf den Hypophysenvoderlappen, welcher reflektorisch das Follikelstimulierende Hormon (FSH) sowie das Luteinisierende Hormon (LH) produziert und in das venöse Gefäßsystem freisetzt. Auf diesem Weg kommen beide Gonadotropine über den Körperkreislauf zum Hoden und können dort ihre Funktion als Geschlechtshormone ausüben, indem sie an spezifische Rezeptoren binden. Die Stimulation der LH und FSH-Freisetzung erfolgt nicht kontinuierlich, sondern pulsatil. Dabei unterliegt das gesamte System einer komplexen Regulation durch negative und positive Rückkopplungs-Mechanismen [99].

Das LH regt die Leydigzellen zur Produktion von Testosteron an, welches durch die 5α-Reduktase in seinen wirksameren Metaboliten Dihydrotestosteron (DHT) umgewandelt wird [100]. DHT ist für die Entwicklung der Prostata von entscheidender Bedeutung. Kommt es zu Fehlern oder Abweichungen in diesem fein abgestimmten Regelkreis, macht sich dies in der fehlerhaften entwickelnden Prostata durch tiefgreifende Reduktion des Organwachstums und in der Morphogenese bemerkbar. Dies zeigt, dass systemisches Testosteron und seine nachfolgende Umwandlung in DHT ein wichtiger Vermittler der testikulären Androgensynthese während der prostatischen Entwicklung des Mannes ist [101]. Die prostatabedingten Entwicklungsstörungen des Mannes ohne 5α-Reduktase zeigen, dass DHT

ein entscheidender lokaler Mediator der testikulären Androgenwirkung ist. Patienten mit gestörter DHT-Funktion zeigten weibliche äußere Genitalien mit Klitoris oder Mikrophallus mit unterschiedlichem Hypospadiegrad [102]. Verglichen mit Testosteron hat DHT eine 10-fach höhere Affinität zum Androgen-Rezeptor (AR) der Prostatazellen. Die Aktivierung des AR führt zum Wachstum und zur Funktionssteigerung der Prostata [101]. Karzinomgewebe verfügt über eine erhöhte Anzahl an Androgenrezeptoren [103]. Der Großteil der Prostatakarzinome entsteht in der androgenabhängigen Außenzone. Diese wachsen von außen in die innen liegende Zone ein, können aber ebenso in der Innenzone ihren Ursprung finden [104].
In der Vergangenheit wurden Diskrepanzen zwischen der Diagnostik und der Diagnose eines Prostatakarzinoms beschrieben. Nicht jedes Prostatakarzinom stellt sich in der digital-rektalen Untersuchung oder sonografisch als Malignität dar. Andersrum zeigen sich jedoch in der Diagnostik malignitätsverdächtige Areale in der histopathologischen Aufarbeitung nicht als Karzinom [105].

Eine weitere wichtige Bedeutung in der Entwicklung der Prostata kommt den Stromazellen zu. Die wichtigsten Stromazellen in der menschlichen Prostata sind Fibroblasten und glatte Muskelzellen, die zur Synthese der extrazellulären Matrix beitragen. Zusammen bilden die Stromazellen und die extrazelluläre Matrix eine Mikroumgebung, die das Wachstum der benachbarten Epithelzellen reguliert. Ein Großteil dieser Aktivität wird vermutlich durch die Freisetzung von parakrinen Faktoren vermittelt, die unabhängig vom Vorhandensein von epithelialem AR sind. Dies geschieht durch die Synthese von Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel dem Fibroblast Growth Factor (FGF) oder dem Epithelial Growth Factor (EGF). Während der embryologischen Entwicklung der Prostata regen diese Stromazellen zusätzlich epitheliale Prostatazellen des Sinus urogenitalis zur Proliferation an, da diesem pränatal die Ausbildung eines AR fehlt [106].
Neben allen genannten sollten jedoch auch komplexe soziale, ökologische und verhaltensbedingte Gründe als wichtige Parameter in der Entstehung der Erkrankung nicht außer Acht gelassen werden [107]. Das Prostatakarzinom hat eine ausgeprägte Tendenz, in die perineuralen Räume einzudringen und sich entlang der innervierenden Nerven, sowie im fortgeschrittenen Verlauf in das umliegende Gewebe auszubreiten. Darüber hinaus wird eine Neigung zur lymphovaskulären Invasion mit Fortschreiten des Stadiums beschrieben [108].

Männer mit lokalisiertem Prostatakrebs weisen eine hohe 10-Jahres-Überlebensrate auf und können häufig kurativ behandelt werden. Einen besonderen Stellenwert hat die Metastasierungstendenz des Prostatakarzinoms. Männer mit metastasierendem, kastrationsresistenten Prostatakrebs haben jedoch trotz intensiver Therapie eine unheilbare Krankheit, die mit einer schlechten Überlebensrate verbunden ist. Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt in diesen Fällen nur etwa 30% und die mittlere Überlebensrate etwa 3 Jahre [109]. Dabei sind Lymphknotenmetastasen im Allgemeinen charakteristisch für das Prostatakarzinom, mit typischer Metastasierung in die Beckenlymphknoten [108]. Im fortgeschrittenem Prostatakrebs dominieren jedoch Knochenmetastasen das klinische Bild und sind eine wichtige Ursache für die krankheitsassoziierte Morbidität.

Dabei siedeln sich metastasierte Prostatakrebszellen bevorzugt in osteoblastenreichen Regionen des Knochens ab. Es wurde bereits von Kimura et al. [109] beschrieben, dass der physische Kontakt zwischen Prostatakrebszellen und Osteoblasten die Knochenstruktur stört und einen Zustand des gegenseitig verstärkten, ungeordneten Wachstums zwischen Prostatakrebszellen und Osteoblasten provoziert. Die resultierende gestörte Knochenmatrix kann dann die Entstehung und das Fortschreiten der Metastasierung von Prostatakrebs in den Knochen begünstigen.

Die vorhergehend genannten, vielfältigen Einflussfaktoren sowie die Entstehung aus benignem Gewebe birgt die Notwendigkeit, die Früherkennung zu optimieren und sowohl Resistenzmechanismen als auch Weiterentwicklung von nicht-medikamentösen und medikamentösen Behandlungsstrategien zu erforschen [24, 110].

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Material

3.1.1. Geräte

Geräte	Hersteller
Autoklav VX150	Systec, Wettenberg
Absaugvorrichtung Integra Vacusafe	Integra Biosciences (Zizers, Schweiz)
Absaugvorrichtung VACUSIP Integra	Biosciences (Zizers, Schweiz)
Brutschrank function line	Heraeus Instruments (Hanau)
CASY Model TT – Cell counter and Analyzer	Roche Diagnostics (Basel, Schweiz)
Eismaschine	Manitowoc, Manitiwoc
Elektroporator ECM 630 VWR, Leuven	Elektroporator ECM 630 VWR, Leuven
Feinwaage ABS 120-4	KERN & Sohn (Balingen-Frommern)
Inkubator NuaireTM	US Autoflow NuAire (Plymouth, USA)
Kühl-/Gefrierkombi Mediline LCexv 4010	Liebherr
Magnetrührer mit Heizplatte, RCT classic safety control	IKA®-Werke, Staufen
Mikroskop IT400+	VWR International (Darmstadt)
Mikrozentrifuge-Rotilabo®	Carl Roth (Karlsruhe)
pH-Meter FiveEasyTM FE20	Mettler-Toledo (Schwerzenbach, Schweiz)
PCR Cycler CFX96™ Real-Time System	Bio-Rad, München
Pipettensatz, 0,5-1000 µl	Biohit, Proline (Göttingen)
Pipettensatz, 0,5-1000 µl	Eppendorf (Hamburg)
Pipettierhilfe	peqMATE Peqlab (Erlangen) Pipetus, Hirschmann Laborgeräte, (Eberstadt)
Reinstwasseranlage Milli-Q	Millipore, Billerica, USA
Spektralphotometer NanoDrop 2000C	Thermo Scientific, Wilmington, USA
Sterilbank HERA safe	Heraeus Instruments (Hanau)
Sterilbank safe 2020	Thermo Fischer Scientific (Massachusetts, USA)
Sicherheitswerkbank Heraeus Herasafe HS 12	Thermo Scientific, Wilmington
Thermocycler T3000	Biometra, Göttingen
Tiefkälte-Lagerschränke KLS 7040 (-80°C)	KKA-Kälte Klima Anlagen, Martensdorf/Stralsund
UV-Transilluminator WiseUV WUV-M20	Witeg Labortechnik, Wertheim
Vortex Mixer peqTWIST	Peqlab (Erlangen)
Vortex Mixer RS-VA10	Phoenix Instrument (Garbsen)
Waage EMB 2000-2	KERN & Sohn (Balingen-Frommern)
Wasserbad W14	Grant Instruments (Cambridge, Großbritannien)
Zentrifuge Centrifuge 5417R	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifuge Centrifuge 5810	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifuge Mikro 120	Hettich Lab Technology (Tuttlingen)
Zentrifuge PerfectSpin P	Peqlab, Erlangen

3.1.2. Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
15ml Röhrchen	Sarstedt (Nümbrecht)
50ml Falcon BD	Biosiences (Heidelberg)
Electroporation Cuvettes 4mm	VWR, Leuven
Gewebekulturflasche 75 cm2	Sarstedt (Nümbrecht)
Glaspasteurpipette	VWR International (Darmstadt)
Klebefolie BZO Seal Film für PCR	Biozym, Wien
Kryo-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Microtiterplatte, 96-Well	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Nitrilhandschuhe Micro-Touch® Nitra-Tex®	Ansell Healthcare (Brüssel, Belgien)
PCR-96-Well TW-MT-Platte weiß	Biozym, Wien
Pipettenspitzen	Sarstedt (Nümbrecht)
Reagiergefäß 0,5ml	Sarstedt (Nümbrecht)
Reagiergefäß 1,0ml	Sarstedt (Nümbrecht)
Reagiergefäß 1,5ml	Sarstedt (Nümbrecht)
Reagiergefäß 2ml, SafeSeal	Sarstedt (Nümbrecht)
Schutzhandschuhe Sterling Nitrile KC300	Kimberly-Clark (Roswell, USA)
Serologische Pipette 1ml	Sarstedt (Nümbrecht)
Serologische Pipette 2ml	Sarstedt (Nümbrecht)
Serologische Pipette 5ml	Sarstedt (Nümbrecht)
Serologische Pipette 10ml	Sarstedt (Nümbrecht)
Serologische Pipette 25ml	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellkulturplatte CELL + 6 well	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellkulturplatte CELL + 24 well	Sarstedt (Nümbrecht)

3.1.3. Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
1-Brom-3-Chlorpropan	Sigma-Aldrich, Steinheim
2-Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Carl Roth, Karlsruhe
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Isopropanol Carl Roth, Karlsruhe	Carl Roth, Karlsruhe
Methanol Carl Roth, Karlsruhe	Carl Roth, Karlsruhe
Trizol peqGOLD Trifast^{M}	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
Wasserbadkonservierer	Carl Roth, Karlsruhe

3.1.4. Puffer und Lösungen

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung
CASY ton	154 mM NaCl 0,1 mM EDTA in A. demin
DEPC-Wasser	0,1% v/v DEPC autoklaviert
Elektroporationspuffer	21 mM HEPES 137 mM NaCl 5 mM KCl 0,7 mM Na2HPO4 6 mM D-Glucose In A.bidest, pH 7,15

3.1.5. Kommerzielle Lösungen

Produkt	Hersteller
dNTP-Mix	Fermentas, St. Leon-Rot
peqGOLD TriFast™	Peqlab, Erlangen
Sensimix SYBR™ Hi-ROX	Bioline, Luckenwalde

3.1.6. Enzyme

Produkt	Hersteller
RiboLock™ RNase Inhibitor (40U/µL)	Fermentas, St. Leon-Rot
SuperScript RT (200U/µL)	Invitrogen, Darmstadt

3.1.7. Primer und Vektoren

Oligonukleotide für rtPCR		Sequenz 5‘ --> 3‘
RT-PCR miR-1	miR-1 SLOOP	GTCTGATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTC GCACTGGATACGACATACAT
RT-PCR U6	U6 SLOOP	GTCATCCTTGCGCAGG
rtPCR miR-1	miR-1 FOR	GCCCGCTGGAATGTAAAGAAGTATG
rtPCR miR	Universal-miR REV	GTGCAGGGTCCGAGGT
rtPCR U6	U6_forward	CGCTTCGGCAGCACATATAC
rtPCR U6	U6_reverse	AGGGGCCATGCTAATCTTCT

3.1.8. Zelllinien

Zelllinie	Ursprung	Hersteller
LNCaP	Epithelzelle, Prostatakarzinom	CLS-Cell line service, Eppelheim
PC-3	Epithelzelle, Prostatakarzinom	CLS-Cell line service, Eppelheim

3.1.9. Medien und Zusätze für die Zellkultur

Produkt	Hersteller bzw. Zusammensetzung
Poly-L-Lysin Sigma-Aldrich, Steinheim	Poly-L-Lysin Sigma-Aldrich, Steinheim
DPBS	PAN Biotech, Aidenbach
2x Trypsin-EDTA	20% v/v 10x Trypsin/EDTAin DPBS
RPMI 1640 mit Phenolrot	PAN Biotech, Aidenbach
Fetales Kälberserum (FCS)	PAN Biotech, Aidenbach
Transfektionsmedium (RPMI-/-)	RPMI 1640 mit Phenolrot
Vollmedium (RPMI+/+)	RPMI 1640 mit Phenolrot 1% Penicillin/Streptomycin 10% FCS
Einfriermedium	70% v/v RPMI 1640 mit Phenolrot 20% v/v FCS 10% v/v DMSO
Konditioniertes Medium	80% RPMI 1640 mit Phenolrot 20% verbrauchtes Medium der jeweiligen Zelllinie

3.1.10. Software

- Microsoft Word 2010 (Dokumente)
- Microsoft Excel 2010 (Dokumentation und Analyse von Messdaten)
- Microsoft PowerPoint 2010 (grafische Darstellung zellulärer Vorgänge)
- NanoDrop 2000 (Bestimmung DNA-/RNA-Konzentration)
- Bio-Rad CFX Manager 2.0 (Analyse real time-PCR)
- BioEdit 7.0.5.3 (Alignment von Sequenzen)

3.2. Methoden

3.2.1. Zellbiologische Methoden

Für diese Arbeit standen für molekular- und zellbiologische Untersuchungen des Prostatakarzinoms zwei verschiedene Zelllinien zur Verfügung. Zum einen wurden LNCaP Zellen, zum anderen PC-3 Zellen verwendet, welche beim American Type Culture Collection (Manassas, VA) erworben wurden.

Die ausgewählten Zelllinien repräsentieren den Bereich des Übergangs vom androgensensitiven zum androgenunabhängig wachsenden Tumor [111].

LNCaP-Zellen sind eine humane Zelllinie, welche 1977 von einer linken supraklavikulären Lymphknotenmetastase eines 50-jährigen kaukasischen Patienten mit Prostatakarzinom isoliert wurden [112]. Diese Zellen exprimieren den Androgenrezeptor (AR) und das prostataspezifische Antigen (PSA). Ihr Wachstum ist von Androgen abhängig und wird durch dessen Entzug gehemmt. Diese Charakteristika sind dem humanen Prostata-Adenokarzinom sehr ähnlich [113]. Somit repräsentieren LNCaP-Zellen ein frühes, indolentes Stadium des fortgeschrittenen Prostatakarzinoms. Des Weiteren handelt es sich um adhärente Epithelzellen, die sowohl in Aggregaten als auch als Einzelzellen wachsen [112].

PC-3 Zellen wurden 1979 aus Knochenmetastasen eines 62-jährigen kaukasischen Mannes, der an Prostatakrebs erkrankt war, gewonnen. Diese Zellen exprimieren weder einen AR, noch PSA und ihre Proliferation ist unabhängig von Androgenen. Die Zelllinie repräsentiert ein kastrationsunabhängiges, fortgeschrittenes Prostatakarzinomstadium [113].

3.2.2. Kryokonservierung und Auftauen von LNCaP und PC-3 Zellen

Um eine dauerhafte Verwendung der Zellen gewährleisten zu können, wurden diese kryokonserviert. Dazu wurden jeweils frühere Passagen der Zelllinien in Einfriermedium eingefroren. In diese Suspension wurden in jedem Durchgang 3 Millionen Zellen pro Kryo-Röhrchen überführt. Um den Vorgang des Einfrierens für die Zellen so schonend wie möglich zu gestalten, wurden diese zunächst bei -80 °C für 24 h zwischengelagert. Im Anschluss daran wurden die Kryo- Röhrchen dann endgültig im Tiefkühlschrank mit einer Temperatur von -140 °C aufbewahrt.

Das Auftauen der Zellen erfolgte im Wasserbad bei 37 °C. Nachdem diese aufgetaut waren, wurden sie in 10 ml Vollmedium (RPMI 1640 Phenolrot 1% Penicillin/Streptomycin und 10%

FCS) überführt. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 1000 U/min zentrifugiert. Sowohl das Einfriermedium als auch das Vollmedium wurden abgesaugt und das Zellpellet in 20 ml frischem Vollmedium aufgenommen und bei 37 °C, 5 % CO_2 und gesättigter Luftfeuchtigkeit in einer T75 Zellkulturflasche kultiviert. Die Konfluenz im Kulturgefäß wurde täglich lichtmikroskopisch beurteilt. Erreichte diese 80 - 90 % der Oberfläche wurden abgestorbene Zellen und verbrauchtes Medium entfernt und vitale Zellen mit frischem Medium in eine neue Zellkulturflasche umgesetzt.

3.2.3. Kultivierung und Passagieren von Prostatakarzinomzellen

Da es sich bei den Prostatakarzinomzellen um Monolayer handelt, war es notwendig, diese regelmäßig enzymatisch zu vereinzeln und in entsprechender Verdünnung in eine neue Zellkulturflasche zu überführen. Dies erfolgte zweimal wöchentlich. Zunächst wurde dabei erneut die Konfluenz der Zellen in der Zellkulturflasche mit dem Lichtmikroskop beurteilt.

Betrug diese 80 – 90 % der Oberfläche wurde das Zellkulturmedium entfernt und der Zellrasen behutsam mit 10 ml Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS) gewaschen, um abgestorbene Zellen und nicht anhaftende Zellreste zu entfernen. Nachdem das DPBS behutsam abgesaugt wurde, folgte die Zugabe von 1 ml 2-fach Trypsin und eine anschließende Inkubationszeit von 3 Minuten bei 37°C Lufttemperatur. Dabei löste sich ein Teil der Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Kontakte vom Flaschenboden. Der verbliebene Rest konnte durch vorsichtiges Resuspendieren mit frischem Vollmedium gelöst werden. Im weiteren Verlauf galt es zu berücksichtigen, dass die beiden Zelllinien ein unterschiedliches Wachstumsverhalten zeigen.

Die androgensensitiven LNCaP Zellen mussten zunächst in der Zellsuspension für 5 Minuten bei 1000 U/min und Raumtemperatur zentrifugiert werden. Danach wurde der Zellüberstand entfernt und das Zellpellet anschließend mit frischem Vollmedium gelöst und die Zellen im Verhältnis 1:3 oder 1:6 in eine neue Zellkulturflasche überführt.

Die PC-3 Zellen wurden hingegen ohne den Zwischenschritt der Zentrifugation im Verhältnis von 1:4 bis 1:10 in Zellkulturflaschen umgesetzt. Beide Zelllinien wurden bei 37 °C, 5 % CO_2 und gesättigter Luftfeuchtigkeit kultiviert. Für die Experimente wurden nur Zellen im Alter von Passage 6 bis 30 verwendet.

3.2.4. Zellzahlbestimmung

Die Ermittlung der Zellzahl basiert auf der elektrischen Erfassung der Zellen mit Hilfe des CASY Cell Counter. Zunächst mussten dazu die Zellen, wie in Abschnitt 3.2.3 beschrieben, suspendiert werden. Zu 10 ml eines isotonischen Messpuffers (CASY-Ton) wurden 100 µL Zellsuspension gegeben. Das Messgerät führt eine dreimalige Messung mit jeweils 400 µL der Lösung durch und bestimmt so den Mittelwert der vitalen Zellen pro ml. Dazu wurde mit Hilfe zweier Platinelektroden ein elektrisches Feld erzeugt. Dieses ändert sich je nachdem ob es von lebenden Zellen, toten Zellen oder Zelltrümmern passiert wurde. Dabei senkt sich die elektrische Leitfähigkeit über den elektrischen Widerstand in Abhängigkeit von der Zellgröße und der Unversehrtheit der Zellmembran, wodurch lebende Zellen von toten und Zelltrümmern unterschieden werden konnten. Da sich die verschiedenen Zelllinien in ihrer Größe unterschieden, wurden diese Parameter für jede Zelllinie gesondert erhoben und für jede Messung berücksichtigt.

3.2.5. Transiente Transfektion mittels siLentFect

Um die Proliferation in Zellen beeinflussen zu können, musste die syntehetische miR mittels Transfektion in die Zellen eingeschleust werden. In den Zellen konnte sie dann über direkte Bindung der Ziel mRNA ihren proliferationshemmenden Effekt ausüben. Dazu wurden die dafür vorgesehenen Zellen am Vortag in Kulturschalen ausgesät. Für den Versuch wurden zwei unterschiedliche Ansätze genutzt - zum einen ein 24-Well-Ansatz zur Bestimmung des Wachstums über die Zeit, zum anderen ein 6-Well-Ansatz zum Nachweis der erfolgreichen Transfektion. Dabei wurden $7 \cdot 10^4$ Zellen in 9,5 cm^2 und 2000 Zellen in 2 cm^2 Kulturschalen ausgesät. Nach regelrechter Adhäsion der Zellen konnte am Folgetag der Kulturüberstand abgenommen und durch 1250 µl Transfektionsmedium im 6-Well-Ansatz und 200 µl Transfektionsmedium im 24-Well- Ansatz ersetzt werden. Anschließend wurde der Master-Mix vorbereitet. Es wurden 10 nmol miR in jedes Well gegeben. Pro Versuchsansatz gab es jeweils einen miR-Master-Mix und einen siLentFect-Master-Mix, bei denen jeweils miR und siLentFect dem Transfektionsmedium angepasst wurden, um der miR Konzentration von 10 nmol pro Well gerecht zu werden. Der siLentFect-Mix wurde im Verhältnis von 10 nmol miR : 0,75 µl siLentFect angefertigt. Dabei wurde der jeweilige Mix im 6-Well-Versuch auf 125 µl Transfektionsmedium und im 24-Well-Versuch auf 50 µl Transfektionsmedium

vorbereitet. Beide Master-Mixe wurden für 5 Minuten einzeln inkubiert, dann wurde der siLentFect-Mastermix in den miR-Mix überführt. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 20 Minuten bei Raumtemperatur wurde der jeweilige Ansatz tropfenweise auf die vorbereiteten Kulturschalen gegeben, so dass letztlich ein gesamtes Volumen im 6-Well-Versuch von 1500 µl pro Well, und im 24-Well-Ansatz von 250 µl pro Well vorlag. Für den im 24-Well-Ansatz durchgeführten Versuch zur Bestimmung des Wachstums der Zellen über die Zeit wurde nach 24 Stunden 750 µl Wachstumsmedium pro Well hinzugefügt.

3.2.6. Transfektion mittels Elektroporation

Bei der Transfektion wurde synthetisch hergestellte miR in die eukaryotischen PC-Zellen eingeschleust. Dies geschah unter der Verwendung der Elektroporationsmethode.

Dazu wurden die Zellen zunächst, wie in 3.2.3 geschildert, in eine Suspension gebracht. Für jeden Elektroporationsansatz wurden $3{,}5 \cdot 10^6$ Zellen und 6 µl synthetische miR verwendet. Vor der Elektroporation wurde die Suspension für 5 Minuten bei 1000 U/min und Raumtemperatur zentrifugiert, anschließend das Medium- und Trypsinreste entfernt und das Zellpellet mit DPBS gewaschen. Danach wurde der Ansatz erneut für 5 Minuten bei 1000 U/min und Raumtemperatur zentrifugiert und nachfolgend das DPBS entfernt. Des Weiteren wurden die Zellen im Elektroporationspuffer re-suspendiert und die gewünschte synthetische miR hinzugegeben. Im nachfolgenden Schritt wurde der komplette Ansatz in eine Elektroporationsküvette überführt. Daran schloss sich die Transfektion an, welche im Elektroporationsgerät mit dem individuellen Programm für die entsprechende Zelllinie erfolgte. Anschließend wurde dem Ansatz sofort 37 °C warmes Fetales Kälberserum (FCS) im Verhältnis 1:2 hinzugegeben und die gesamte Suspension in konditioniertes Medium überführt. Im letzten Schritt wurden die elektroporierten Zellen in die gewünschten Zellkulturschalen ausgesät und bei 37 °C, 5 % CO_2 und gesättigter Luftfeuchtigkeit kultiviert. Für jede Elektroporation wurde ein Kontrolldurchgang unter Verwendung der entsprechenden Kontroll-miR durchgeführt. Für die Elektroporation wurden zum einen die Einstellung 300 V und 1500 µF für PC-3 Zellen und zum anderen die Parameter 250 V und 1600 µF für LNCaP Zellen im Elektroporationsgerät verwendet.

3.2.7. Molekularbiologische Methoden

RNA Extraktion aus Zellen mit Trifast

Während der Präperation wurden die endogene und die synthetische miR-1 aus den zuvor transient transfizierten und sich in Kultur befindlichen Prostatakarzinomzellen gewonnen. Das Verfahren wurde gleichermaßen für LNCaP- sowie PC-3-Zellen verwendet. TriFast ist ein gebrauchsfertiges Reagenz, welches die gleichzeitige Extraktion von RNA, DNA und Proteinen aus Zellen ermöglicht. Dadurch ist es möglich, aus den verwendeten Prostatakarzinomzellen die gesamte RNA zu isolieren. Die Methodik folgt dem Prinzip der Phasentrennung in eine polare und eine unpolare Phase, welche während der Präparation und Aufreinigung von organischen Verbindungen entstehen. Letztlich entstehen drei Phasen während der Phasentrennung.

In der obersten, wässrigen Phase, befindet sich die RNA. Hingegen lagern sich die Proteine in der unteren, phenolhaltigen, Phase ab. In der mittleren Phase sammelt sich die DNA als weißer Niederschlag.

Im ersten Schritt wurde das Zellkulturmedium abgesaugt. Im Anschluss folgte die Phase der Reinigung. Dazu wurden die Zellen 2-fach mit 2 ml 1x PBS gespült. Anschließend wurden die gereinigten Zellen mit 500 µl TriFast für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Darauffolgend konnten die Zellen mittels Zellschaber in der TriFast-Suspension vom Boden gelöst werden. Zur weiteren Verarbeitung wurden die gelösten Zellen samt der Suspension in 1,5 ml-Reagiergefäße überführt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 50 µl 1-Bromo-3-Chloropropan sowie ein 15-sekündiger Vortexvorgang und eine 5-minütige Invertierung bei Raumtemperatur. Nach Beendigung des Invertierens wurden die Proben für 15 min bei 11000 U/min und 4 °C zentrifugiert.

An diesem Punkt zeigte sich in den Proben die einleitend geschilderte Auftrennung in drei Phasen. Durch die Phasenauftrennung wurde es dann möglich, die wässrige, oberste RNA-Fraktion in 1,5 ml-Reagiergefäße zu überführen. Nach Zugabe von 250 µl Isopropanol und erneutem, kurzen Invertieren wurden die Proben für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die verbliebenen Protein- und DNA-Fraktionen wurden verworfen. Nach anschließender Zentrifugation der RNA-Proben für 10 min bei 11000 U/min und 4 °C wurde der Überstand entfernt und das extrahierte RNA-Pellet gewaschen. Dies erfolgte schrittweise in 3 Durchgängen mit jeweils 500 µl 75 % Ethanol und anschließender Zentrifugation mit 9000

U/min für 5 min bei 4 °C. Der Überstand wurde jeweils nach jeder Zentrifugation verworfen. Abschließend wurde das RNA-Pellet für 10 min luftgetrocknet und anschließend in 32 µl DEPC-Wasser gelöst. Für die nachfolgende Analyse mittels PCR wurde die RNA-Konzentration mit Hilfe des Spektralphotometers Nano-Drop 2000^{TM} bestimmt. Das verwendete DEPC-Wasser, in dem das RNA-Pellet gelöst wurde, galt für die Konzentrationsbestimmung als Referenzwert. Anschließend konnten die Proben bei -20 °C gelagert werden.

Stem-Loop Reverse Transkription von miR

Das Protokoll der real-time PCR entspricht einem etablierten Verfahren zur Erstellung einer cDNA-Matritze aus reifer miR.

Um eine Quantifizierung der synthetischen und modifizierten sowie der endogen miR mittels rtPCR zu ermöglichen, musste diese zu einer komplementären DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Dies ist notwendig, weil die verwendete DNA-Polymerase DNA-abhängig ist. Im Rahmen der Stem-loop RT-PCR wurden nur miR-1 und die Referenz-RNA U6 umgeschrieben. Die verwandten Primer zeichneten sich dadurch aus, dass sie durch ihre hairpin-Struktur die miR mit einer hohen Präzision, Effizienz und Spezifität binden [29].

Um eine präzise Quantifizierung zu gewährleisten, wurde jede Probe mit einer Konzentration von 100 ng Gesamt-RNA umgeschrieben. Die Konzentration der RNA wurde mit dem Spektralphotometer Nano-Drop 2000c bestimmt.

Jeder Probenansatz enthielt ein Gesamtvolumen von 7,5 µL. Dieser setzte sich aus 1 µL Probe mit 100 ng RNA, 1 µL der beiden Sloop-Primer miR-1 und U6 mit jeweils einer Konzentration von 0,4 µM, 1 µL 0,25 mM dNTP, 0,05 µL des RNase-Inhibitors RiboLock 40 U/µL, und 0,2 µL des Enzyms SuperScript RT 200 U/µL.

Der Probenansatz mit einem Volumen von 7,5 µL wurde im Thermocycler 3000 zur cDNA umgeschrieben. Dabei setzte sich das PCR-Programm zur Umschreibung folgendermaßen zusammen: 30 min bei 16 °C Annealing, 30 min bei 42 °C Elongation, und 5 min bei 85 °C Denaturierung. Anschließend wurde die fertige cDNA mit Millipore-Wasser auf ein Gesamtprobenvolumen von 20 µL verdünnt. So konnte der Probenansatz auf Eis oder bei -20 °C bis zur Durchführung der sich anschließenden Analyse mittels rtPCR zwischengelagert werden.

Real-time Polymerasekettenreaktion (rtPCR)

Nachdem die miR-Sequenz in cDNA umgeschrieben wurde, konnte diese durch eine Polymerase-Ketten- Reaktion (PCR) vervielfältigt werden.

Das Protokoll der rtPCR bestand aus 45 Zyklen. Jeder Zyklus beinhaltet die drei Schritte Denaturierung, Annealing und Elongation. In der Denaturierung werden die Wasserstoffbrückenbindungen sowohl der doppelsträngigen Bereiche der cDNA, als auch der doppelsträngigen PCR-Produkte aufgetrennt. Im nächsten Schritt lagern sich spezifische Primer an die komplementären Sequenzen der Matrix-DNA an (Annealing). Abschließend wird im letzten Schritt durch die DNA-Polymerase der zur Matrix-DNA komplementäre Strang mit Nukleotiden aufgefüllt und so neu synthetisiert (Elongation), wodurch nun wieder ein doppelsträngiges PCR-Produkt vorliegt und der Zyklus erneut beginnen kann. Die in den Proben enthaltenen Mengen an PCR-Produkten wurde durch Fluoreszenz-Messungen quantifiziert. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Dazu wird das Fluoreszenzsignal am Ende eines Laufes, der aus mehreren Zyklen besteht, in der exponentiellen Phase, gemessen. Das Fluoreszenzsignal und dessen Anstieg steht dabei in einer direkten Beziehung zur exponentiellen Zunahme der DNA-Matrix pro Zyklus und wird in Echtzeit detektiert. Die in jedem Zyklus herrschenden Reaktionsbedingungen sind bis zum Abbruch der Reaktion, durch z.B. verbrauchte Reagenzien, identisch.

An das amplifizierte PCR-Produkt lagert sich das im SensiMix SYBR Hi-ROX enthaltene SYBR-Green I an. Diese Substanz fluoresziert mit einer Wellenlänge von 521 nm (grün), wenn sie mit einer Wellenlänge von 494 nm (blau) angeregt wird.

Der Anstieg dieses Fluoreszenzsignales ist dabei proportional zur exponentiellen Zunahme der DNA pro Zyklus. Sind die Reaktionskomponenten verbraucht, erreicht das Signal ein Sättigungsplateau. Da die Reaktionsbedingungen in jedem Zyklus gleich sind, kann über die Signalstärke in diesem Bereich eine Quantifizierung des entstehenden Produktes, in diesem Fall der Ausgangs-cDNA und somit der synmiR-1 und miR-1, erfolgen. Zur relativen Quantifizierung wird das Verhältnis zwischen der Expression der Zielsequenz zu einer Referenzsequenz gebildet. In diesem Fall entspricht die externe Referenz-RNAU6. Dabei wird vorausgesetzt, dass die Expression von U6 als Standard durch die Versuchsparameter nicht reguliert oder verändert wird. Zur Überprüfung der Spezifität wird nach abgeschlossener PCR

eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Hier werden unspezifische PCR-Produkte mit abweichender Länge detektiert. Dabei macht man sich zunutze, dass die DNA von spezifischen PCR-Produkten einen höheren Schmelzpunkt besitzt als unspezifisch entstandene Primerdimere.

Der für die rtPCR gewählte Probenansatz setzte sich wie folgt zusammen: 2,6 µl Millipore H_2O, 0,2 µl Primer FOR, 0,2 µl Primer REV, 4 µl SensiMix SYBR Hi-ROX und 1 µl des RT-Produktes (cDNA). Das Programm, mit dem die rtPCR im CFX96TM Real-Time System von Bio-Rad durchgeführt wurde, enthielt eine initiale Denaturierung der Proben bei 95°C für 5 min. Daran schloss sich ein 45-mal wiederholter Zyklus an, dessen Temperaturführung folgende Schritte beinhaltete: Denaturierung bei 95°C für 30 sec, Annealing bei 65°C für 20 sec und die Elongation bei 72°C für 10 sec.

3.2.8. Statistische Methoden

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten wurde mit der Software Microsoft Excel 2010 durchgeführt. In den gezeigten Abbildungen stellen die Ergebnisse die Mittelwerte mit der dazugehörigen Standardabweichung dar. Die Auswertung der experimentell erhobenen Daten erfolgte mit dem t-Test für ungepaarte Stichproben. Dieser überprüft, ob sich die Mittelwerte zweier unabhängiger Gruppen signifikant voneinander unterscheiden. Die Interpretation erfolgt mit der Unterteilung der Signifikanzen. Diese stellen sich wie folgt dar:

Wahrscheinlichkeit	Signifikanz
$p \leq 0{,}05$	*
$p \leq 0{,}01$	**
$p \leq 0{,}001$	***

4. ERGEBNISSE

4.1. synthetisch hergestellte chemisch modifizierte miR-1-Moleküle

Um den Einfluss chemischer Modifikationen bei synthetischen miR-1-Molekülen auf das Tumorwachstum zu untersuchen, sollten modifizierte synthetische miR-1-Varianten mittels Transfektion in Prostatakrebszellen eingebracht und die anti-proliferative Wirkung der miR mittels Wachstumskinetiken verglichen werden.

Die chemische Modifikation soll die synthetischen miR-1-Varianten vor enzymatischem Abbau schützen und damit die biologische Stabilität erhöhen. Weiterhin führt eine Substituierung der Hydroxygruppe am 2'-C-Atom der Ribose (Abb. 4) zu einer verringerten Beweglichkeit des Zucker-Phosphat-Rückgrats der miR, was die Ausbildung stabilerer miR-1-mRNA-Hybride begünstigt. Beide Effekte führen infolgedessen zu einer verstärkten biologischen Aktivität der synthetischen miR-1 und somit zur Inhibition des Tumorzellwachstums.

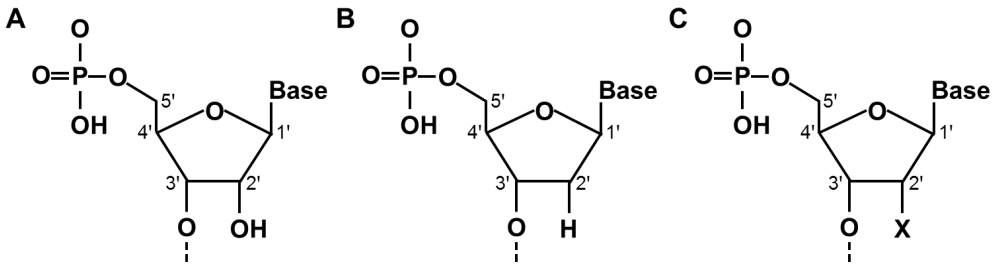

Abb. 4 *RNA-Nukleotid (A), DNA-Nukleotid (B) und ein an der 2'-Position chemisch modifiziertes RNA-Nukleotid (C)*

Für die Untersuchungen in dieser Arbeit wurden im Institut für Biochemie - Arbeitskreis Bioorganische Chemie (Prof. Dr. Sabine Müller) - synthetische reife miR-1-Moleküle hergestellt, die neben der nicht-modifizierten Form 10 weitere chemische Modifikationen aufwiesen (Tabelle 1). Diese Modifikationen beschränkten sich auf die letzten drei Nukleotide des 3'-Endes der miR (UAU). Hierbei wurden zur Synthese Nukleotide verwendet, bei denen die jeweilige C2'-Hydroxygruppe mit Fluor oder Methoxy substituiert wurden. Insgesamt wurden die in Abb. 3 dargestellten 10 modifizierten Varianten hergestellt und in experimentellen Ansätzen mit der nicht-modifizierten synthetischen miR-1 verglichen.

Tabelle 1 *Varianten der chemischen Modifikationen der synthetischen miR-1*

RNA	C2' Substituent	Position (Sequence 5' → 3')		
miR-1^{syn}	-	UGG AAU GUA AAG AAG UAU G**U**	**A**	**U**
miR-1^{mod1}	F	UGG AAU GUA AAG AAG UAU G**U**	**A**	**U**$^{2'F}$
miR-1^{mod2}	F	UGG AAU GUA AAG AAG UAU G**U**$^{2'F}$	**A**$^{2'F}$	**U**
miR-1^{mod3}	F	UGG AAU GUA AAG AAG UAU G**U**$^{2'F}$	**A**	**U**
miR-1^{mod4}	OCH_3	UGG AAU GUA AAG AAG UAU G**U**	**A**$^{2'OCH3}$	**U**
miR-1^{mod5}	OCH_3	UGG AAU GUA AAG AAG UAU G**U**$^{2'OCH3}$	**A**$^{2'OCH3}$	**U**
miR-1^{mod6}	OCH_3	UGG AAU GUA AAG AAG UAU G**U**$^{2'OCH3}$	**A**	**U**
miR-1^{mod7}	OCH_3	UGG AAU GUA AAG AAG UAU G**U**	**A**	**U**$^{2'OCH3}$
miR-1^{mod8}	OCH_3	UGG AAU GUA AAG AAG UAU G**U**	**A**$^{2'OCH3}$	**U**$^{2'OCH3}$
miR-1^{mod9}	OCH_3	UGG AAU GUA AAG AAG UAU G**U**$^{2'OCH3}$	**A**	**U**$^{2'OCH3}$
miR-1^{mod10}	OCH_3	UGG AAU GUA AAG AAG UAU G**U**$^{2'OCH3}$	**A**$^{2'OCH3}$	**U**$^{2'OCH3}$

4.2. Nachweis synthetischer und modifizierter miR1 mittels quantitativer RT-PCR

Für den Nachweis der modifizierten miR1 mittels quantitativer RT-PCR wurde eine 1:10 Verdünnung von 1 nM bis 100 aM hergestellt. Für diesen Test wurden unmodifizierte miR-1^{syn} sowie die drei modifizierten Formen miR-1^{mod1}, miR-1^{mod5} und miR-1^{mod6} herangezogen. Die Bildung von PCR-Produkten über 45 Zyklen zeigte für alle vier getesteten miR sehr vergleichbare Verläufe und wies für die höheren Konzentrationen der Verdünnungsreihen die

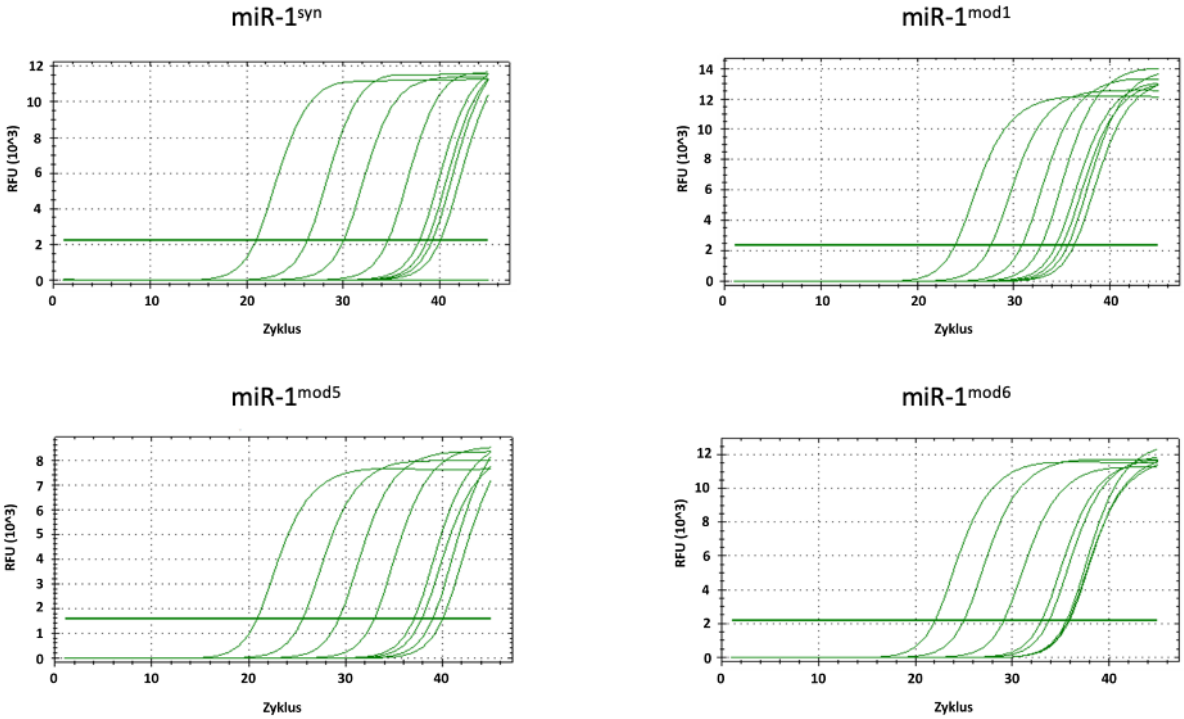

Abb. 5 *Synthetische und modifizierte miR-1 Verdünnungsreihen und deren Nachweis mittels RT-PCR*

erwarteten Abstände der Amplifikationskurven auf. Bei Verdopplung in jedem Zyklus der PCR entspricht ein zehnfacher Konzentrationsunterschied 2,5 Zyklen. Ab einer Konzentration von 100 femtomolar (fM) zeigten sich jedoch immer geringere Unterschiede der Amplifikationskurven, so dass die exakte Quantifizierung der miR-1 Moleküle nur bis zu einem Konzentrationsbereich von etwa 1 pikomolar (pM) möglich erschien (Abb. 5).

4.3. Liposomen-basierte Transfektion in PC-3 Zellen mittels SilentFect

Um die biologische Wirkung der synthetischen miR allgemein, aber vor allem um den Einfluss der unterschiedlichen chemischen Modifikationen bezüglich dieser Effekte abschätzen zu können, wurden die miR mittels Transfektion in PC-3 Zellen eingebracht. Hierzu standen prinzipiell 2 Methoden zur Verfügung, die hinsichtlich ihrer Effizienz überprüft werden sollten. Mit liposomen-basierter, chemischer Transfektion können Nukleinsäuren die Zellmembran durchdringen und innerhalb der Zellen ihre biologische Wirkung entfalten. Hingegen wird bei der Elektroporation die Zellmembran durch das Anlegen sehr hoher Spannungen für

niedermolekulare Substanzen durchlässig, wodurch miR, aber auch deutlich größere DNA-Moleküle wie Plasmide, in die Zellen eingeschleust werden können.

Die liposomen-basierte Transfektion wurde mit dem Reagenz SilentFect durchgeführt. Nach Transfektion mit den miR miR-1^{syn}, miR-1^{mod3} und miR-1^{mod4} wurden die Konzentrationen der chemisch synthetisierten miR über einen Zeitraum von 144h mittels quantitativer RT-PCR bestimmt. Die Messungen zeigten eine 10- bis zu 1000-fache Konzentration der miR verglichen mit miR-1^{endo} der Kontoll-transfizierten Zellen. Dabei zeigten sich auffallend hohe

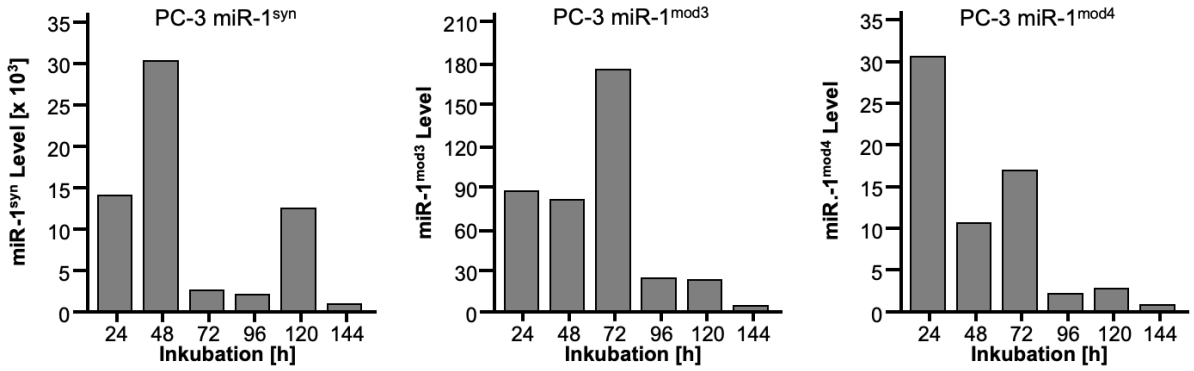

Abb. 6 *Transfektion von miR-1^{syn}, miR-1^{mod3} und miR-1^{mod4} mittels siLentFect in PC-3-Zellen, normierte Grafik*

Konzentrationen der miR während der ersten 72h der Inkubation, die dann wieder abfielen. Zudem waren in miR-1^{syn} deutlich höhere Konzentrationen zu messen als in miR-1^{mod3} und miR-1^{mod4} (Abb. 6).

4.4. Wachstumskinetik nach Transfektion in PC-3 Zellen mittels SilentFect

Nachdem die verschiedenen synthetischen miR in den PC-3-Zellen mittels quantitativer rtPCR erfolgreich nachgewiesen werden konnten und erste Unterschiede hinsichtlich der Konzentrationen sichtbar wurden, wurden exemplarisch zwei modifizierte miR ausgewählt um ihr Wachstumsverhalten im Rahmen von Kinetiken über einen Zeitraum von 240h darzustellen und sowohl mit der synthetischen miR-1, als auch der Kontroll-RNA vergleichen zu können.

Zwar zeigten sowohl die Kontroll-RNA transfizierten PC-3 Zellen als auch die miR-1^{syn}-Zellen und die modifizierten miR miR-1^{mod3} und miR-1^{mod4} einen über die gesamte Zeit von 240h

kontinuierlichen Wachstumsanstieg, jedoch waren keine Veränderungen im Wachstum der miR-1^{mod3} und miR-1^{mod4}-Zellen gegenüber den miR-1^{syn}-Zellen und nur ein gering vermindertes Wachstum im Vergleich zu den Kontroll-RNA transfizierten PC-3 Zellen nachzuweisen (Abb. 7).

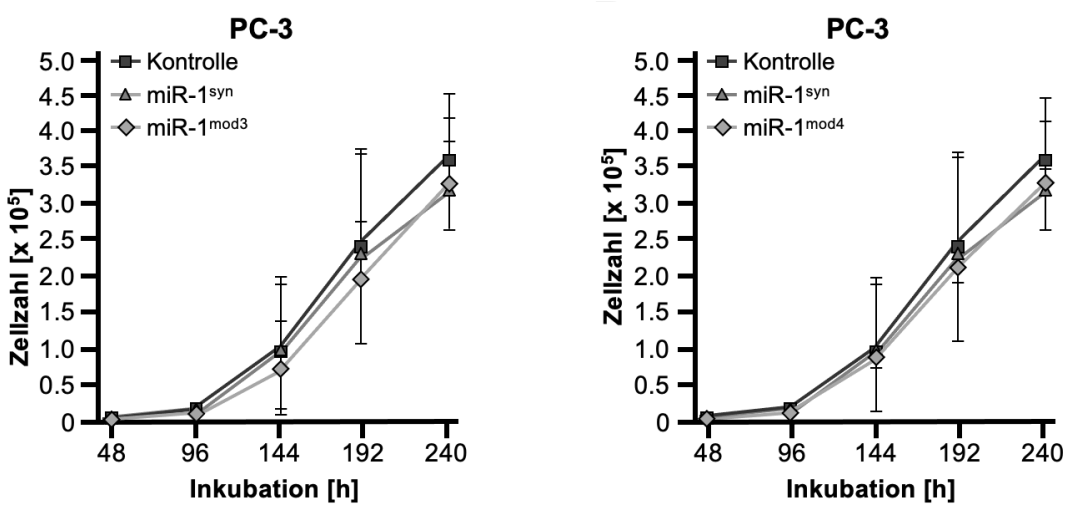

Abb. 7 *Wachstumskinetik miR-1^{mod3}, miR-1^{syn} und Kontrolle (A) und miR-1^{mod4}, miR-1^{syn} und Kontrolle (B) in PC-3- Zellen*

4.5. Transfektion in PC-3 Zellen mittels Elektroporation

Unter Berücksichtigung der vorangegangenen Ergebnisse wurde eine weitere Methode zur Transfektion angewandt. Statt der bisherigen chemischen, liposomen-basierten transienten Transfektion handelte es sich hierbei um die physikalische transiente Transfektion mittels Elektroporation.

In einem Zeitraum über 144h wurden die erreichten Level von miR-1^{syn}, miR-1^{mod4} und miR-1^{mod6} in den PC-3-Zellen alle 24h mittels rtPCR detektiert. Hierbei zeigte sich für alle miRNA-Level unabhängig der Modifikation eine Abnahme der Konzentration der detektierten miR-1 Spiegel über die Zeit (Abb. 8). Der wohl deutlichste Konzentrationsverlust ist für miR-1^{syn} zu verzeichnen, deren initiales Level nach 48h beinahe nur noch 1/6 der ursprünglichen Konzentration betrug. Ähnlich der Konzentrationsunterschiede der zuvor analysierten Konzentrationen von miR-1^{mod3} und miR-1^{mod4}, mittels siLentFect in die PC-3-Zellen transfiziert, zeigte sich auch bei der Transfektion mittels Elektroporation für miR-1^{mod4} die

geringsten Konzentrationslevel, dafür jedoch auch der moderateste Konzentrationsabfall für den Zeitraum von 144h verglichen mit miR-1^{syn} und miR-1^{mod6}.

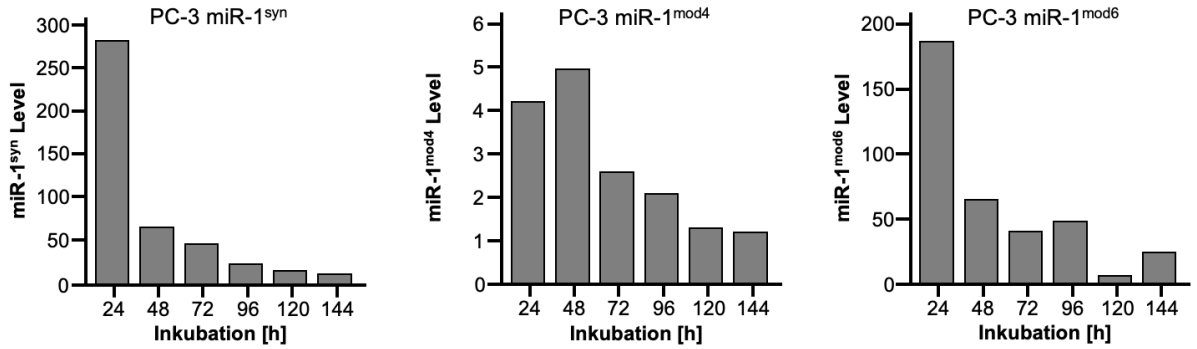

Abb. 8 *144h-Kinetik von mittels Elektroporation transient transfizierten PC-3-Zellen, synthetisch miR-1syn, die zusätzlich modifizierten miR-1^{mod4}, miR-1^{mod6} und einer Kontroll-RNA, normierte Grafik*

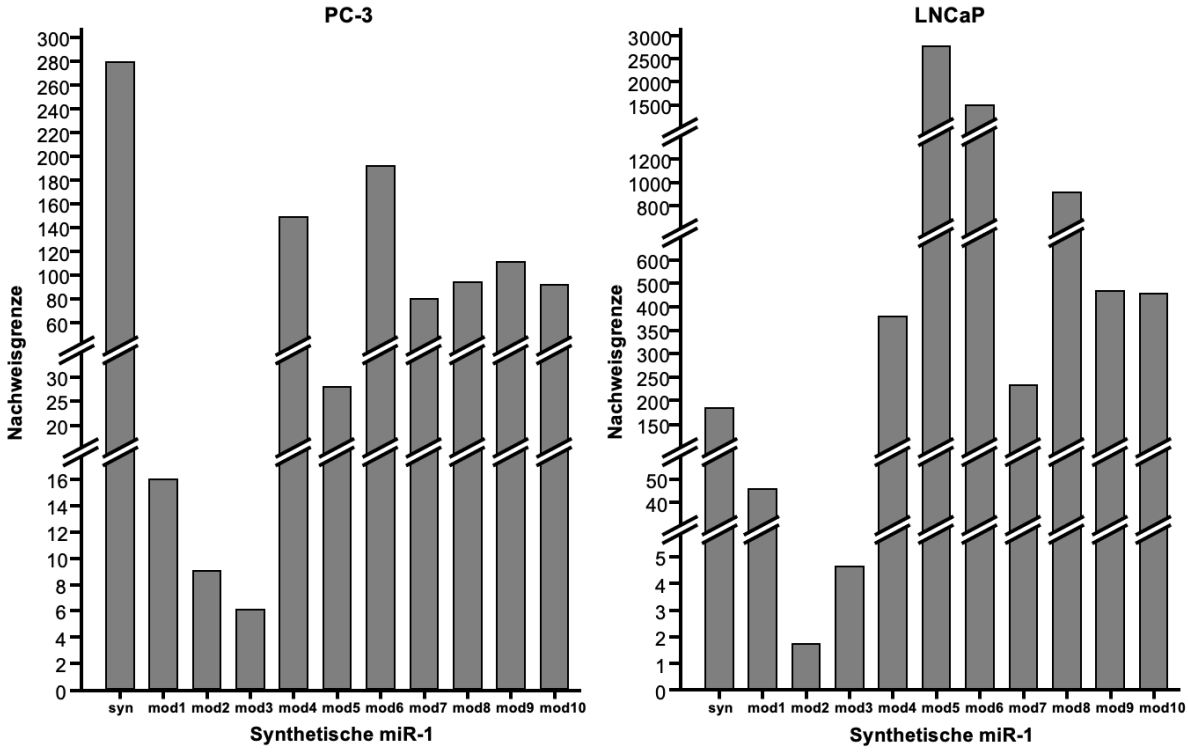

Abb. 9 *Transfektion mittels Elektroporation, normierte Grafik*

Im Folgenden wurden sowohl LNCaP Zellen als auch PC-3 Zellen unter Zuhilfenahme von Elektroporation miR-1^{syn}, die Modifikationen miR-1^{mod1} bis miR-1^{mod10} und eine Kontroll-RNA transient transfiziert. Die nach 24h mittels rtPCR erhobenen Ergebnisse zeigen deutliche Unterschiede in den erreichten Leveln (Abb. 9). Dabei wurden sowohl in LNCaP als auch in PC-

3 Zellen durchweg höhere Nachweisgrenzen erreicht, wenn die Modifikationen der synthetischen miR-1 Methoxygruppen enthielten und niedrigere Level, wenn sie Fluor enthielten. Deutlich darstellbar wurde dieser Sachverhalt in PC-3-Zellen im Fall von miR-1^{mod4} und miR-1^{mod6} und in LNCaP-Zellen für miR-1^{mod5} und miR-1^{mod6}.

Folgend der Nachweise der Konzentrationslevel der verschiedenen synthetischen miR in den beiden Zelllinien wurden LNCaP Zellen mit den unterschiedlichen, synthetisch hergestellten und modifizierten miR-1 mittels Elektroporation transient transfiziert. Über einen Zeitraum von 240h wurden alle 48h die Zellzahl ermittelt. Dabei wurde das Wachstum der Zellen mit den unterschiedlichen synthetisch modifizierten miR-1 sowohl mit einer Kontroll-RNA als auch mit der synthetischen miR-1^{syn} verglichen.

Hierbei zeigte sich für den Großteil der synthetisch modifizierten miR eine signifikante Hemmung des Zellwachstums gegenüber der Kontroll-RNA und der synthetischen miR-1^{syn}.

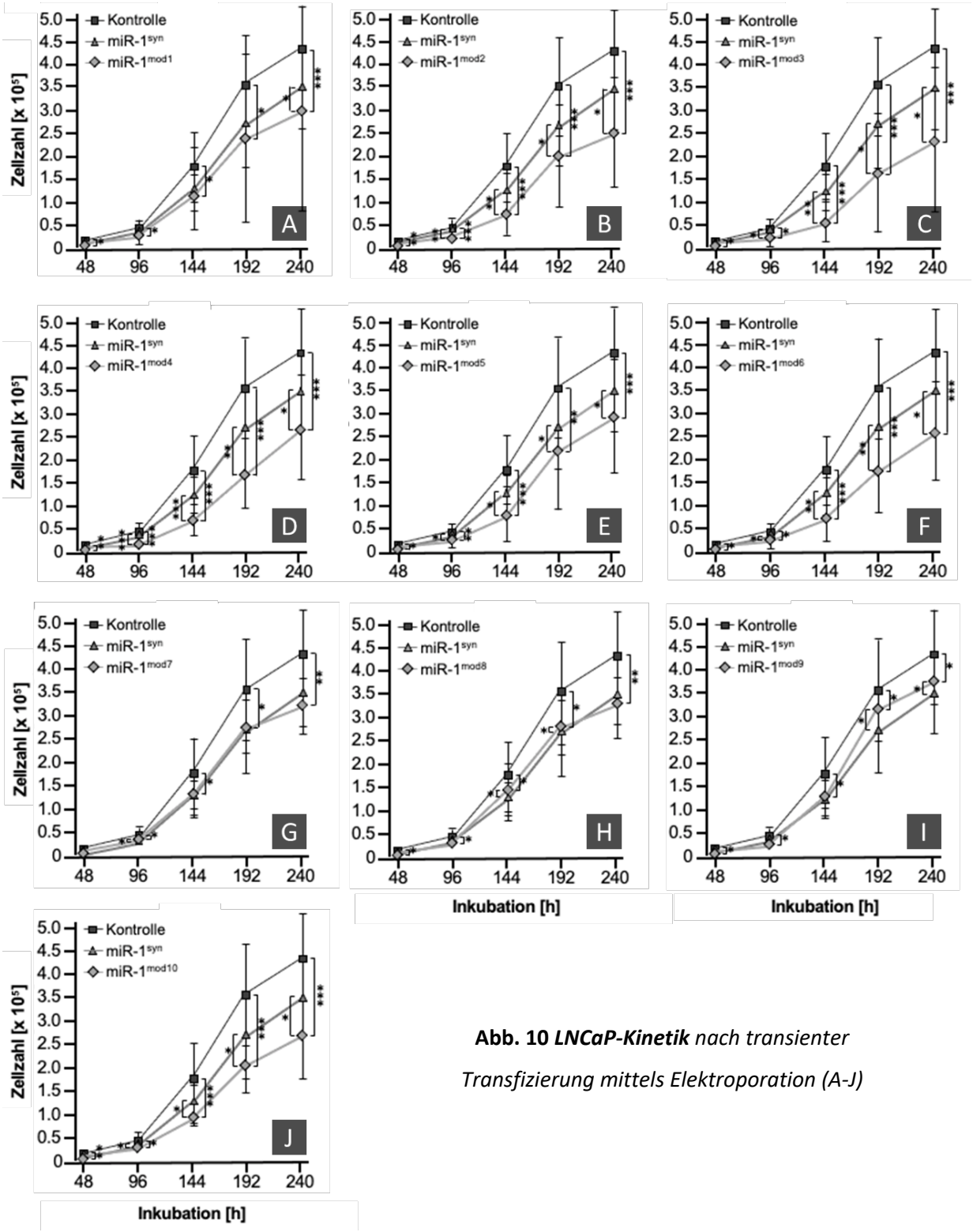

Abb. 10 *LNCaP-Kinetik* *nach transienter Transfizierung mittels Elektroporation (A-J)*

Dies zeigte sich im Fall von miR-1^{mod2}, miR-1^{mod3}, miR-1^{mod4}, miR-1^{mod5}, miR-1^{mod6} und miR-1^{mod10} (Abb. 10 B; C; D; E; F; und J). Das Wachstum der synthetisch hergestellten und modifizierten miR-1^{mod1}, miR-1^{mod7}, miR-1^{mod8}, miR-1^{mod9} wies hingegen keinen relevanten Unterschied auf (Abb. 10 A; G; H; und I).

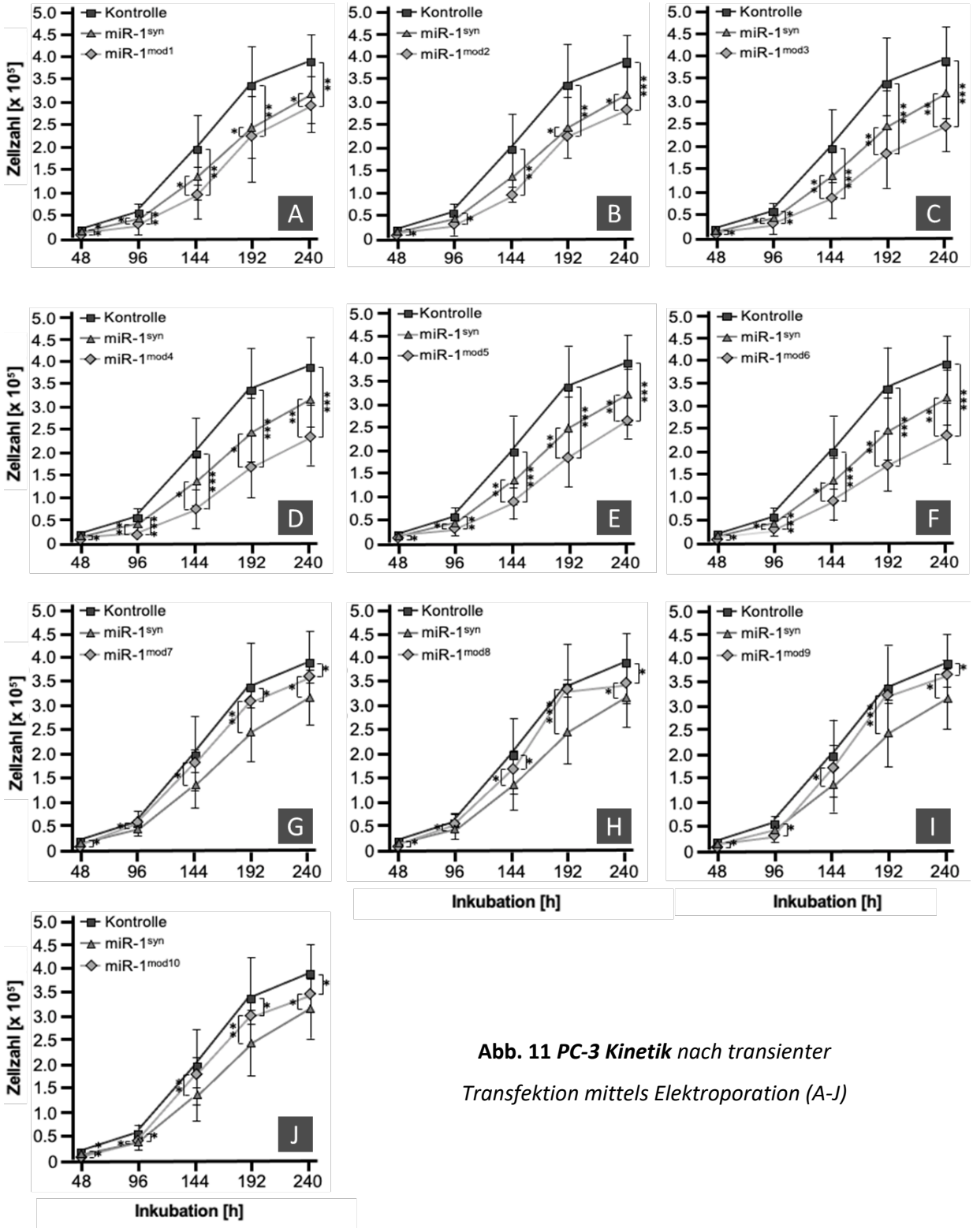

Abb. 11 ***PC-3 Kinetik*** *nach transienter Transfektion mittels Elektroporation (A-J)*

Das Verfahren der transienten Transfektion mittels Elektroporation und anschließender Durchführung einer Wachstumskinetik wurde ebenfalls für die Zellen der PC-3-Zelllinie angewandt. Dabei wurden die Kontroll-RNA sowie die synthetischen miR miR-1^{syn},

miR-1$^{mod1 - mod10}$ in die Zellen eingebracht und die Zellzahl anschließend über einen Zeitraum von 240h alle 48h gemessen. Verglichen wurde das Wachstum der Zellen mit synthetischer und modifizierter miR-1, zum einen mit der Kontroll-RNA und zum anderen mit der nicht-modifizierten synthetischen miR-1^{syn}. Ähnlich den LNCaP-Zellen zeigten sich in den Kinetiken mit PC-3-Zellen signifikante Unterschiede im Wachstum bei den Transfektionen mit miR-1^{mod3}, miR-1^{mod4}, miR-1^{mod5} und miR-1^{mod6} (Abb. 11 C; D; E; und F). Hingegen ergab sich kein Unterschied zwischen der synthetischen und den modifizierten Varianten miR-1^{mod1} und miR-1^{mod2} (Abb. 11 A; und B), sowie eine Aufhebung des Tumor-supprimierenden Effektes der synthetischen und modifizierten miR-1^{mod7}, miR-1^{mod8}, miR-1^{mod9} und miR-1^{mod10} (Abb. 11 G; H; I; und J).

5. DISKUSSION

Der Einsatz synthetischer Oligonukleotide zur Kontrolle der Expression spezifischer Gene geht auf die späten 1970er Jahre zurück. Zamecnik und Stephenson zeigten zum ersten Mal ein gezieltes Gen-Silencing unter Verwendung kurzer synthetischer Oligonukleotide. Dabei verfolgten die Autoren die Antisense-Strategie für Gen-Silencing. Hierbei wurde ein synthetisches Antisense-Oligonukleotid genutzt, welches komplementär zu einer Ziel-mRNA war. Dieses wurde in die Zellen eines infizierten Kükenembryo-Fibroblasten eingebracht, um die Genexpression des Rous-Sarkom-Virus zu blockieren [114]. Seitdem wurde eine Vielzahl von chemischen Modifikationen entwickelt, um der schlechten extra- und intrazellulären Stabilität synthetischer Oligonukleotide entgegenzuwirken und die Affinität zu einem spezifischen Ziel zu erhöhen, um somit die biologische Wirksamkeit zu steigern.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst der Transfektionserfolg und die Nachweisbarkeit der modifizierten miR-1 mittels quantitativer RT-PCR geprüft.

Die Bildung von PCR-Produkten zeigte für alle vier getesteten miR sehr vergleichbare Verläufe. In höheren Konzentrationen der Verdünnungsreihen zeigten sich die erwarteten Abstände der Amplifikationskurven. Bei Verdopplung in jedem Zyklus der PCR entspricht ein zehnfacher Konzentrationsunterschied 2,5 Zyklen. Ab einer Konzentration von 100 fm zeigten sich jedoch immer geringere Unterschiede der Amplifikationskurven, so dass die exakte Quantifizierung der miR-1 Moleküle nur bis zu einem Konzentrationsbereich von etwa 1 pikomolar (pm) möglich erschien. Dies ließ die Schlussfolgerung zu, dass das Fluoreszenzsignal nur über einen bestimmten Bereich linear zur eingesetzten Konzentration ist. Jenseits dieser entspricht das Signal nicht mehr den tatsächlichen Konzentrationen der komplementären DNA und kann nicht zur Quantifizierung der modifizierten miR-1 herangezogen werden. Diese Ergebnisse entsprechen den Nachweisgrenzen, welche für SYBR Green im Bereich von nm liegen [115].

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen vermuten, dass sich die subzelluläre Lokalisation der verwendeten miR von der chemischen zur physikalischen Transfektion unterscheiden. Trotz erfolgreichem, chemischen Transfektionsnachweis mittels siLentfect konnte kein hemmender Effekt auf das Wachstum der PC-3 Zellen belegt werden.

Bereits M. Overhoff et al. [116] vermuteten, dass die Suppression der Zielgene von der Konzentration der verwendeten siRNA abhängig sei. Sie zeigten, dass bei physikalisch aufgenommener siRNA trotz niedriger Konzentrationen eine moderate Suppression des

Zielgens erfolgte, wohingegen mittels Vesikel gestützter Transfektion zwar eine hohe intrazelluläre Konzentration der siRNA nachgewiesen werden konnte, welche jedoch nur eine vergleichsweise geringe Suppression der Zielgene zur Folge hatte. Die Autoren postulierten, dass die begrenzten supprimierenden Effekte ihre Ursache in der Freisetzung der siRNA aus den Vesikeln hatte. Es ist anzunehmen, dass der Weg zum endoplasmatischen Retikulum bzw. aus den Zellkompartimenten heraus einen kritischen Schritt für das Einschleusen von miR darstellt [116].

Im Gegensatz zur chemischen Transfektion ist die Elektroporation hingegen ein sehr effizientes, physikalisches Einschleusungsverfahren für Nukleinsäuren, welches unabhängig von zellulären Organellen, insbesondere nicht auf einen Vesikeltransport angewiesen, ist [117, 118].
Für eine erfolgreiche RNA-Interferenz (RNAi) scheint der RISC-Komplex perinukleär zu liegen. Zum einen muss die miR in diese Regionen vordringen, um eine Interaktion mit RISC zu induzieren [119], zum anderen ist eine erhöhte intrazelluläre Freisetzung und Bioverfügbarkeit der miR Voraussetzung für eine effektive RNAi [120].
Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass eine chemische Transfektion mittels Vesikeltransport keine nennenswerten Wachstumshemmungen ausübte, während die physikalische Einschleusung von miR einen signifikanten, hemmenden Effekt auf das Wachstum der PC-3 Zellen hatte. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die physikalische Transfektion möglicherweise einen einfacheren Zugang zur RNAi-Maschinerie und ihren Komponenten hat.

Wichtige Eigenschaften der synthetischen Oligonukleotide umfassen sowohl die Bindungsaffinität für die Ziel mRNA als auch die Stabilität gegenüber Nukleasen sowie immunostimulatorischen Faktoren. Im Allgemeinen können chemische Modifikationen von Nukleinsäuren in drei verschiedene Kategorien eingeteilt werden: Zuckermodifikationen, Nukleinbasenmodifikationen und Internukleotid - Verknüpfungsmodifikationen.

In der vorliegenden Arbeit wurden Zuckermodifikationen am chemisch synthetisierten C2' des miR-1-Zuckermoleküls durchgeführt. Dabei ist eine Vielzahl an möglichen Substituenten

bekannt [79]. Hierbei wurde sich für die Experimente dieser Arbeit für die Modifikation mittels 2'-OMe- Nukleosidanalogon und 2’-F- Nukleosidanalogon entschieden.

Das 2'-OMe- Nukleosidanalogon ist eine der am häufigsten verwendeten Modifikation. Grundlegend für diese Modifikation ist die nachweislich verbesserte Stabilität von synthetischen RNA mit 2'-OMe -Modifikationen im Serum sowie der verzögerte Abbau durch Nukleasen ohne signifikanten Verlust der RNA-Interferenzaktivität [121, 122]. Zudem zeichnen sich 2'-OMe -Modifikationen dadurch aus, dass das Problem der immunstimulierenden Aktivität vollständig aufgehoben wird [123 – 125]. Eine Eigenschaft, die für anschließende in vivo Experimente essentiell ist.
Das 2’-F- Nukleosidanalogon ist eine weitere gängige chemische Modifikation in der RNA-Forschung, zu deren wichtigsten Eigenschaften gehört, dass sie zwar keine signifikante Stabilität gegen Exonukleasen [126], jedoch gegen Endonukleaseabbau vermittelt [79]. Zudem werden 2’-F-Modifikationen gegenüber ihren nicht modifizierten Varianten mit erhöhter, thermischer Stabilität, verbesserten Eigenschaften in der Plasmastabilität sowie in der Interaktion mit der Ziel-mRNA beschrieben [127, 128].
In der vorliegenden Arbeit wurde eine Reihe von chemisch synthetisierten C2' OMe- und C2' F-substituierten miR-1-Molekülen auf ihr anti-onkogenes Potenzial zur Verzögerung des PC-Zellwachstums untersucht. Die Ergebnisse lieferten den Nachweis einer effektiven Einschleusung modifizierter miR-1 in Krebszellen und einer antiproliferativen Wirksamkeit.
Hierbei wiesen 2'-OMe-substituierte miR-1-Moleküle eine höhere Transfektionseffizienz als 2'-F-substituierte miR-1-Moleküle auf.

Bislang ist über den Einfluss von Substituenten auf die Transfektionseffizienz wenig bekannt, jedoch kann die Beobachtung der vorliegenden Untersuchung darauf hinweisen, dass die Transfektionseffizienz durch die Art des C2'-Substituenten der modifizierten miR-1-Moleküle beeinflusst wird. Die Wirkung von miR-1 als Tumorsuppressor konnte durch chemische Modifikation der C2'-Position mehrerer modifizierter Varianten im Vergleich zu unverändertem synthetischem miR-1^{syn} signifikant erhöht werden. Die antiproliferativen Effekte modifizierter miR-1 reichten von sehr geringen wachstumshemmenden Effekten, bis hin zu 155% reduziertem Zellwachstum gegenüber der Wirksamkeit der unmodifizierten miR-1^{syn}.

Bei modifizierten miR miR-1^{mod9}, die in LNCaP-Zellen transfiziert wurde und miR-1^{mod7}, miR-1^{mod8}, miR-1^{mod9} und miR-1^{mod10}, welche in PC-3-Zellen transfiziert wurde, waren die wachstumshemmenden Effekte geringer als bei unveränderter miR-1^{syn}. Mit Ausnahme von miR-1^{mod7} enthielten alle miR mindestens 2 C2'-substituierte Nukleotide. Vergleichbare zelluläre Effekte auf die Proliferation wurden von Noguchi et al. in Melanomzellen beschrieben [125]. Die Autoren beobachteten, dass die Zugabe von aromatischen Benzol-Pyridin-Analoga zum 3' Terminus der synthetischen miR-205 zu einem vollständigen Verlust der Tumorsuppressionsfunktionen führte.

Diese Ergebnisse weisen auf ein kritisches Thema im Zusammenhang mit RNA-basierten Therapien hin. Es ist durchaus denkbar, dass ungeeignete Substituenten und Substitutionspositionen die krebshemmende Wirkung von tumorsuppressiven miR aufheben können.

Ein bekanntes Beispiel für die Auswirkungen funktioneller Verluste in der Wirkung eines Tumorsuppressors stellt der Transkriptionsfaktor p53 dar, dessen Verlust u.a. zur Entwicklung von Prostatakrebs beiträgt. Dieser maligne Prozess erfordert genetische und epigenetische Veränderungen kritischer zellulärer Komponenten. Dabei unterstützt die Mutation des Transkriptionsfaktors p53 die Entwicklung von Zellen mit einem abweichenden Wachstum. Der p53-Transkriptionsfaktor ist ein entscheidender Faktor für die Fähigkeit der Zelle, den Zellzyklus und seine Reaktion auf DNA-Schäden zu regulieren. Mutationen innerhalb der DNA-Bindungsdomäne von p53 verhindern jedoch, dass dieser Proteinkomplex mit Zielgenpromotoren assoziieren kann. Ohne einen funktionellen p53- Signalweg könnte die Zelle möglicherweise durch die DNA-Replikation fortschreiten und den Zellzyklus im Falle einer DNA-Beschädigung nicht stoppen. Dies führt zu mehr und möglicherweise zur Verlängerung des Überlebens von Tumorzellen [126].

So deuten auch die Daten dieser Arbeit darauf hin, dass die Modifikation an einer ungeeigneten Position eines miR-1-Moleküls einen Verlust der tumorsuppressiven Wirkung und einen daraus resultierenden Überlebensvorteil für die Krebszellen mit sich bringen sowie weitere Mutationen innerhalb des malignen Gewebes begünstigen kann. Dies könnte mit dem voranschreitenden Wachstum über die Zeit noch mehr an Bedeutung gewinnen.

Im Gegensatz dazu zeigten die 2'-OM-substituierten (miR-1^{mod4}, miR-1^{mod5}, miR-1^{mod6}) und 2'-F-substituierten (miR-1^{mod2}, miR-1^{mod3}) miR-1-Moleküle mit C2'-Modifikationen an

entsprechenden Positionen der Baasen 20 und/oder 21 ähnlich wachstumshemmende Eigenschaften.

Für die drei 2'-F-substituierten miR wurden niedrigere intrazelluläre Konzentrationen in transfizierten Zellen nachgewiesen. Dies könnte auf eine geringere Transfektionseffizienz oder auf die Tatsache zurückzuführen sein, dass 2'-F-substituierte RNA im Vergleich zu 2'-OMe-RNAs eine geringere Exonukleasestabilität aufweisen [122]. Dennoch wurden zellwachstumshemmende Effekte, die mit denen von 2'-OMe miR vergleichbar sind, mit 2'-F-substituierten miR erreicht, die auf die hohe antiproliferative Wirkung von tumorsuppressiven miR wie miR-1 hinweisen. Es ist möglich, dass die Effizienz von biologisch aktiven Molekülen wie miR nicht in gleichem Maße von der Konzentration abhängt wie pharmakologische Inhibitoren. Weiterhin ist ein Vergleich von OMe und F Substituenten in dieser Arbeit nur sehr eingeschränkt möglich, da 7 2'-OMe-Substituenten, jedoch nur 3 2'-F-substituierte miR getestet wurden.

Interessanterweise gibt es einige zelllinienabhängige Unterschiede zwischen LNCaP- und PC-3-Zellen, die mit miR-1^{mod7}, miR-1^{mod8} und miR-1^{mod10} transfiziert wurden. In LNCaP-Zellen verursachten die drei modifizierten miR ein vermindertes Zellwachstum im Vergleich zu unveränderten miR-1^{syn} transfizierten Zellen, während in PC-3-Zellen nur eine geringe oder gar keine Wachstumsdämpfung nachweisbar war. Insgesamt deuten vorliegende Transfektionsexperimente darauf hin, dass LNCaP-Zellen empfindlicher auf chemisch modifizierte miR-1 reagieren als PC-3-Zellen. Von den 10 chemisch modifizierten miR-1-Spezies hemmten 7 Varianten das LNCaP-Zellwachstum, aber nur 4 Varianten hatten eine ähnliche Wirkung auf PC-3-Zellen. Darüber hinaus zeigten 2'-F-substituierte miR-1-Gene durchweg einen signifikant, hemmenden Einfluss auf das Wachstum auf LNCaP-Zellen, jedoch nur in einem von den gezeigten drei Versuchen auf das Wachstum der PC-3- Zellen. Einschränkend sei hier erwähnt, dass die Versuche mit weniger Varianten der 2'-F-substituierten Modifikation durchgeführt wurden.

Die beschriebenen Effekte sind vermutlich auf bekannte zelluläre und molekulare Unterschiede zwischen beiden Zelllinien zurück zu führen. LNCaP-Zellen zeichnen sich im Gegensatz zu PC-3-Zellen durch die Expression des Androgenrezeptors, einem Östrogenrezeptor und einem intakten p53-Protein aus [87, 127]. Ausserdem werden sie als unempfindlicher gegenüber äußeren Einflüssen angesehen [128 – 131]. Darüber hinaus kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch die Transfektionseffizienz durch die Verwendung

chemisch modifizierter miR-1-Moleküle für die Transfektion von LNCaP- und PC-3-Zellen variiert. Zudem konnte in Studien bereits gezeigt werden, dass Mutationen und Polymorphismen spezifische miR Bindungsstellen ändern und somit die Funktionalität der miR unterdrückt werden kann [132 – 134].

Umgekehrt können aber auch neue miR-1-Bindungsstellen entstehen, was eine Änderung der miR-1-Wirksamkeit zur Folge haben kann [135]. Es ist zu vermuten, dass auch in LNCaP und PC-3 Zellen unterschiedliche Zielstrukturen für die modifizierten miR vorhanden sind und daraus eine unterschiedliche Wirkung auf das Wachstumsverhalten resultiert. So postulierten Alexander A. Svoronos et al. bereits, dass aufgrund der genetischen Heterogenität vieler Tumore die Möglichkeit einer gegensätzlichen Effektausübung von miR in verschiedenen Regionen eines einzelnen Tumors bestünde [30].

Besonders das Prostatakarzinom, mit seinen bis zu 30 Subtypen, stellt eine sehr heterogene und mehrstufige Erkrankung, sowohl auf klinischer als auch auf histologischer Ebene, dar [128].

Im Gegensatz zu ähnlichen wachstumshemmenden Eigenschaften von 2'-OMe- und 2'-F-substituierten miR zeigen vorliegende Ergebnisse einen Einfluss der Substituentenpositionen auf die antionkogene Eigenschaft von miR-1 im Sinne einer möglichen Verstärkung. Die Substitutionen auf Position 20 und 21 führten in erster Linie zu einer Steigerung der tumorsuppressiven Eigenschaften der modifizierten miR-1. Die Substitution des Nukleotids 22 hingegen konnte, mit einer Ausnahme, die antionkogene Aktivität von miR-1 nicht erhöhen. Dies lässt vermuten, dass das terminale Nukleotid 22 eine kritische Position für die molekulare Wirkungsweise von miR-1 darstellen könnte und nicht chemisch modifiziert werden sollte.

Die vorliegenden Ergebnisse werden unterstützt durch Resultate einer jüngsten Studie, die die Aufnahme von einzelsträngigen miR in den RNA-induzierten Silencing-Komplex (RISC) gezeigt haben. Ein Schlüsselschritt bei der RNAi ist der Zusammenbau des RISC, des Protein-siRNA-Komplexes, der die Ziel-RNA-Spaltung vermittelt [136].

Nach dem Prozessierungsschritt mithilfe des RNase III- Enzyms Dicer und seiner Kofaktoren entsteht ein 22 Nukleotid langer miR-Doppelstrang. Dabei sind nicht beide Stränge des miR-Duplexes gleichermaßen für die Inkorporation in den RISC geeignet. Vielmehr bestimmen zum einen die absolute und zum anderen die relative Stabilität der Basenpaare an den 5'-Enden der beiden miR-Stränge den Grad der Beteiligung jeden Stranges [13]. Die Verknüpfung der Nukleotide 2 - 8, scheint für die Zielerkennung der miR von besonderer Wichtigkeit zu sein

[19]. Hingegen stellt der 3’ Teil eine ungünstige Struktur dar, um vor der ersten Erkennung eine Basenpaarung durchzuführen [13, 14], jedoch scheint die Stabilität reifer miR durch das miR 3’ Ende reguliert werden zu können [7].

In den RISC-Komplex wird der miR - Doppelstrang mit der schwächeren Wasserstoffbindung am 5‘-Ende aufgenommen. Er wird in dem Komplex selektiv eingebaut und kann seiner genregulatorischen Funktion nachgehen, wohingegen der Gegenstrang aus dem RISC-Komplex freigegeben und degradiert wird. Dies ist ein notwendiger Schritt zur Aktivierung des Komplexes. Ein aktivierter RISC ist ein Ribonukleoprotein-Komplex. Dieser besteht aus seinem Kern, aus einem Argonauten-Protein und einer einzelsträngigen miR, die als Leitfaden für komplementäre Sequenzen in mRNA dient. In Abhängigkeit vom Argonauten-Protein und der komplementären Bindung zwischen der miR und der Zielsequenz kann die Assoziation von humanem RISC mit mRNA zu unterschiedlichen Gen-Stilllegungsmodi führen. Diese Stilllegungsmodi umfassen endonukleolytische Spaltung, translationale Repression, Deadenylierung und Bindung in P-Bodie-Kompartimente, wodurch die Translation der mRNA und somit die Bildung des Genproduktes verhindert wird [13, 14].

Die vorliegenden Daten weisen auf die zentrale Rolle des Nukleotid 22 hin. Diese könnte möglicherweise damit zusammenhängen, dass dieses endständige Nukleotid essentiell ist für die Interaktion der RNA mit den anderen Komponenten des RISC.

Eine weitere Klasse kleiner RNA-Moleküle bildet die small interfering RNA (siRNA). Hierbei handelt es sich um eine 21 - 25 Nukleotid lange und doppelsträngige RNA. Diese spielt ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Genregulation mittels Gen-Silencing, welche über den RNAi-Mechanismus vermittelt wird [137]. Im Vergleich der beiden RNA-Typen weisen siRNA und miR einige Gemeinsamkeiten auf. Bei beiden handelt es sich um kurze RNA, die ihren Einfluss auf die mRNA durch post-transkriptionelle Effekt ausübt. Des Weiteren werden sowohl siRNA als auch miR durch das RNAse-III-Enzym Dicer in doppelsträngige Fragmente geschnitten. In dessen Anschluss üben sie über den RISC-Komplex regulatorische Funktionen auf mRNA mittels RNAi aus. Hier zeigen sich jedoch die Unterschiede. Beide RNA-Typen unterscheiden sich darin, dass reife siRNA doppelsträngig und reife miR einzelsträngig sind. siRNA zeigen eine komplementäre Bindung mit dem Leitstrang und damit eine hochspezifische Interaktion mit einer mRNA [138 – 140]. miR hingegen können auf zwei Wegen die Aktivität des Zielgens beeinflussen - zum einen über eine partielle komplementäre Basenpaarung mit der Folge, dass das Stilllegen des Zielgens durch translationale Repression

und/oder Degradation erfolgt, zum anderen über perfekte oder nahezu perfekte komplementäre Bindung mit der Ziel-mRNA. In diesem Fall folgt die Spaltung der mRNA [141 – 144].

Solche miR könnten eine ortsspezifische Spaltung der mRNA auslösen, nachdem sie in einen funktionellen RISC-ähnlichen Komplex integriert wurden. In einer solchen Situation verhalten sich mRNA wie siRNA [145]. Die Paarung zwischen miR und der mRNA erfolgt in der unübersetzten Region (UTR) 3' und der Seed-Region, welche die Nukleotide 2 bis 7 vom 5' Ende aus beinhaltet [146, 147].

siRNA sind durch ihre spezifischen Eigenschaften gut geeignet, einen gezielten Knock down eines Gens zu erzielen, jedoch haben sie ebenfalls das kritische Potential unvorhergesehene Gene herunterregulieren zu können. Dies scheint sowohl konzentrationsabhängig zu sein als auch von einer ungenauen Übereinstimmung in der Basenpaarung. Dies kann zu einer translationalen Repression einer Reihe von Off-Target-Genen führen, welche wiederum die therapeutische Wirkung und Spezifität beeinträchtigen und sogar zum Zelltod führen können [148 – 150].

miR hingegen können durch Ihre Fähigkeit mehrere hundert Gene zu beeinflussen einen Vorteil gegenüber siRNA als Therapeutika für Krebserkrankungen aufweisen. Durch Kombination mit anderen miR könnte die regulatorische Wirkung auf die Expression von tausenden von mRNA ansteigen [147, 151]. Zudem ist das Problem der Off-Target-Effekte bei den miR durch diese natürliche Eigenschaft weniger problematisch als bei den siRNA.

Krebserkrankungen sind komplexe Mehrgenerationenkrankheiten, welche eine Modulation mehrerer Wege für eine effektive Behandlung erfordern. So haben miR die Fähigkeit mehrere onkogene Signalwege parallel oder zeitlich versetzt zu beeinflussen, welche bei Krebszellen dereguliert sind. Es ist also denkbar, dass eine Reihe von Zielgenen beeinflusst werden könnten, die als Netzwerk innerhalb derselben zellulären Signalkaskade zusammenarbeiten. Mittels kaskadierender Effekte könnte somit ein höheres therapeutisches Potential erzielt werden.

Des Weiteren ist es denkbar, dass zusätzliche Krebserkrankungen und Metastasen durch eine einzige miR in ihrer Progression beeinflusst oder therapiert werden könnten [152]. Betroffene Gewebe weisen in fortgeschrittenen Stadien oft Aberrationen vieler Gene, einschließlich miR, auf. Es erscheint sinnvoll, therapeutische Ansätze zu verfolgen, bei denen einzelne Moleküle zur Modulation einer Vielfalt von Genen verwendet werden. Im Gegensatz dazu scheint es

sehr schwierig, komplexe Krankheiten mit einer einzigen siRNA entscheidend zu modulieren und so zu therapieren, da diese meist nur für ein Gen spezifisch ist [63, 153].

Mit dem Potenzial, dutzende oder sogar hunderte von verschiedenen mRNA anzusprechen, können einzelne miR die Expression von Proteinen in einer Zelle koordinieren oder verfeinern und eignen sich damit als Therapeutikum [7].

miR kontrollieren zelluläre Prozesse wie Proliferation, Wachstum, Apoptose, Inflammation und Entwicklung. Das antisense-RNA (asRNA)-Regulierungssystem stellt dabei einen Mechanismus zur sequenzbezogenen Erkennung eines bestimmten Transkripts dar. asRNA-Genkontrollmechanismen können auf diese Weise über RNA-Regulationssysteme die Ziel-mRNA auf der posttranskriptionellen Ebene beeinflussen. Dies kann über den asRNA vermittelten Abbau der Ziel-mRNA, die Veränderung in der mRNA-Verarbeitung und/oder die Beeinflussung der mRNA-Transkription geschehen. Gleiches gilt für künstliche asRNA [154]. Neben Hormontherapie, der Zytostatikatherapie und chirurgischen Interventionen, kann mittels molekularer Veränderung synthetischer, tumorsuppressiver miR eine neue Klasse von Nukleotid-basierten Medikamenten für die Krebstherapie eröffnet werden.

Herausforderungen für miR-basierte therapeutische Strategien ist allerdings die Anfälligkeit von RNA gegenüber Degradation durch RNasen im Serum oder im endozytischen Kompartiment der Zellen. Um das Problem der miR-Instabilität zu beheben, wurden zwei Strategien untersucht. Zum einen wurde die miR chemisch modifiziert, um ihre Stabilität gegenüber RNasen zu erhöhen. Zum anderen besteht eine zweite Strategie darin, Transportvehikel zu entwickeln, die die miR zum Schutz einkapseln und ein endosomales Entweichen aus dem Vehikel zu ermöglichen [155]. Hierzu gehört beispielsweise die Entwicklung von liposomalen Transportvehikeln (SNALP, stabile Nukleinsäure-Lipidpartikel), viralen Partikeln und kationischen Polymeren, wie Polyethylenimin (PEI). [156]. Diese innovativen Transportvehikel schirmen die miR vor RNA-abbauenden Enzymen ab, transportieren sie durch die Zytoplasmamembran in die Zielzellen und reduzieren potenziell toxische und Off-Target Effekte.

6. ZUSAMMENFASSUNG

In vielen Malignitäten kann eine Dysregulation von miR beobachtet werden. Die reduzierte Expression dieser kleinen, nicht-codierenden RNA resultiert in verlängertem Tumorüberleben, einer gesteigerten Proliferationsrate, verbesserter Angiogenese und Metastasierung von Tumorzellen [1, 2]. Da miR-1 in ihrer Funktion als Tumorsuppressor mehrere onkogene Signal- und Effektorkaskaden supprimieren kann, ist die Erforschung ihres therapeutischen Potenzials von gesteigertem Interesse [1]. Dies zu realisieren eignen sich Prostatakarzinomzellen in besonderem Maße, da dort endogene miR-1 enorm herunterreguliert ist [157].

Die vorliegende Arbeit untersuchte die miR-1 Re-Expressionstherapie zur Hemmung der Tumorprogression auf molekularer Ebene an Prostatakarzinomzellen mit synthetischen miR-1 Molekülen. Darüber hinaus wurde die synthetische miR-1 durch unterschiedliche Substituenten modifiziert, um zu evaluieren ob diese Modifikationen Einfluss auf die biologische Wirkung auf die untersuchten Prostatakarzinomzelllinien haben. Ein weiterer Fokus lag dabei auf der Fragestellung, ob die Position und die chemischen Eigenschaften der Substituenten selbst einen Einfluss auf die miR-1 Effekte ausüben.

Es konnte gezeigt werden, dass die Wiederherstellung der intrazellulären miR-1 Spiegel durch die unmodifizierte, synthetische miR-1 bereits einen hemmenden Effekt auf das Tumorwachstum hatte. Ausserdem deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die chemisch synthetisierte und modifizierte miR-1, der unveränderten, synthetischen miR-1 in ihrer tumorsupprimierenden Funktion überlegen sein kann.

Die antiproliferative Wirksamkeit der modifizierten miR-1 Moleküle hing jedoch eher von der Position, als von der Art des modifizierten Nukleotids ab. Es konnte gezeigt werden, dass, unabhängig vom Substituenten, Modifikationen an vermutlich kritischen Positionen sogar ein gesteigertes Tumorwachstum zur Folge hatten. Substituenten an ungünstigen Positionen konnten zu Reduktion der antiproliferativen Effekte von miR-1-Molekülen und somit sogar zu vermehrten Tumorwachstum führen. Dies bietet die Möglichkeit, durch die Auswahl gut charakterisierter miR mit hohem antiproliferativem Potenzial maßgeschneiderte, synthetisch modifizierte miR für die zukünftige, individualisierte Therapie verschiedener Krebsentitäten zu entwickeln.

7. LITERATURVERZEICHNIS

[1] C. Han, Z. Yu, Z. Duan, and Q. Kan, “Role of MicroRNA-1 in Human Cancer and Its Therapeutic Potentials,” *BioMed Research International*, vol. 2014, pp. 1–11, 2014, doi: 10.1155/2014/428371.

[2] S. Giglio and A. Vecchione, “c-Met and miRs in Cancer,” *Biomedicines*, vol. 3, no. 1, pp. 32–44, Jan. 2015, doi: 10.3390/biomedicines3010032.

[3] B. J. Reinhart, E. G. Weinstein, M. W. Rhoades, B. Bartel, and D. P. Bartel, “MicroRNAs in plants.,” *Genes & development*, vol. 16, no. 13, pp. 1616–26, Jul. 2002, doi: 10.1101/gad.1004402.

[4] S. Bagga *et al.*, “Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation.,” *Cell*, vol. 122, no. 4, pp. 553–63, Aug. 2005, doi: 10.1016/j.cell.2005.07.031.

[5] Y. Hong, R. C. Lee, and V. Ambros, “Structure and function analysis of LIN-14, a temporal regulator of postembryonic developmental events in Caenorhabditis elegans.,” *Molecular and cellular biology*, vol. 20, no. 6, pp. 2285–95, Mar. 2000, doi: 10.1128/mcb.20.6.2285-2295.2000.

[6] L. P. Lim *et al.*, “The microRNAs of Caenorhabditis elegans.,” *Genes & development*, vol. 17, no. 8, pp. 991–1008, Apr. 2003, doi: 10.1101/gad.1074403.

[7] J. Krol, I. Loedige, and W. Filipowicz, “The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay.,” *Nature reviews. Genetics*, vol. 11, no. 9, pp. 597–610, Sep. 2010, doi: 10.1038/nrg2843.

[8] H. Siomi and M. C. Siomi, “Posttranscriptional regulation of microRNA biogenesis in animals.,” *Molecular cell*, vol. 38, no. 3, pp. 323–32, May 2010, doi: 10.1016/j.molcel.2010.03.013.

[9] E. F. Finnegan and A. E. Pasquinelli, “MicroRNA biogenesis: regulating the regulators.,” *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, vol. 48, no. 1, pp. 51–68, doi: 10.3109/10409238.2012.738643.

[10] Y. Cai, X. Yu, S. Hu, and J. Yu, “A brief review on the mechanisms of miRNA regulation.,” *Genomics, proteomics & bioinformatics*, vol. 7, no. 4, pp. 147–54, Dec. 2009, doi: 10.1016/S1672-0229(08)60044-3.

[11] A. M. Denli, B. B. J. Tops, R. H. A. Plasterk, R. F. Ketting, and G. J. Hannon, “Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex.,” *Nature*, vol. 432, no. 7014, pp. 231–5, Nov. 2004, doi: 10.1038/nature03049.

[12] T. W. Nilsen, “Mechanisms of microRNA-mediated gene regulation in animal cells.,” *Trends in genetics : TIG*, vol. 23, no. 5, pp. 243–9, May 2007, doi: 10.1016/j.tig.2007.02.011.

[13] D. S. Schwarz, G. Hutvágner, T. Du, Z. Xu, N. Aronin, and P. D. Zamore, “Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex.,” *Cell*, vol. 115, no. 2, pp. 199–208, Oct. 2003, doi: 10.1016/s0092-8674(03)00759-1.

[14] S. L. Ameres, J. Martinez, and R. Schroeder, “Molecular basis for target RNA recognition and cleavage by human RISC.,” *Cell*, vol. 130, no. 1, pp. 101–12, Jul. 2007, doi: 10.1016/j.cell.2007.04.037.

[15] W. Filipowicz, S. N. Bhattacharyya, and N. Sonenberg, “Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?,” *Nature reviews. Genetics*, vol. 9, no. 2, pp. 102–14, Feb. 2008, doi: 10.1038/nrg2290.

[16] X. Liu, K. Fortin, and Z. Mourelatos, “MicroRNAs: biogenesis and molecular functions.,” *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*, vol. 18, no. 1, pp. 113–21, Jan. 2008, doi: 10.1111/j.1750-3639.2007.00121.x.

[17] W. Wongfieng, A. Jumnainsong, Y. Chamgramol, B. Sripa, and C. Leelayuwat, “5’-UTR and 3’-UTR Regulation of MICB Expression in Human Cancer Cells by Novel microRNAs.,” *Genes*, vol. 8, no. 9, Aug. 2017, doi: 10.3390/genes8090213.

[18] I. Lee *et al.*, “New class of microRNA targets containing simultaneous 5’-UTR and 3’-UTR interaction sites.,” *Genome research*, vol. 19, no. 7, pp. 1175–83, Jul. 2009, doi: 10.1101/gr.089367.108.

[19] B. P. Lewis, I. Shih, M. W. Jones-Rhoades, D. P. Bartel, and C. B. Burge, “Prediction of mammalian microRNA targets.,” *Cell*, vol. 115, no. 7, pp. 787–98, Dec. 2003, doi: 10.1016/s0092-8674(03)01018-3.

[20] N. S. Sokol and V. Ambros, “Mesodermally expressed Drosophila microRNA-1 is regulated by Twist and is required in muscles during larval growth.,” *Genes & development*, vol. 19, no. 19, pp. 2343–54, Oct. 2005, doi: 10.1101/gad.1356105.

[21] H. Himmelreich, A. Mathys, A. Wodnar-Filipowicz, and C. P. Kalberer, “Post-transcriptional regulation of ULBP1 ligand for the activating immunoreceptor NKG2D involves 3’ untranslated region.,” *Human immunology*, vol. 72, no. 6, pp. 470–8, Jun. 2011, doi: 10.1016/j.humimm.2011.03.005.

[22] A. Stark, J. Brennecke, N. Bushati, R. B. Russell, and S. M. Cohen, “Animal MicroRNAs confer robustness to gene expression and have a significant impact on 3’UTR evolution.,” *Cell*, vol. 123, no. 6, pp. 1133–46, Dec. 2005, doi: 10.1016/j.cell.2005.11.023.

[23] H. Ahrend *et al.*, “MicroRNA-1 and MicroRNA-21 Individually Regulate Cellular Growth of Non-malignant and Malignant Renal Cells.,” *In vivo (Athens, Greece)*, vol. 31, no. 4, pp. 625–630, doi: 10.21873/invivo.11103.

[24] D. Vanacore *et al.*, “Micrornas in prostate cancer: an overview.,” *Oncotarget*, vol. 8, no. 30, pp. 50240–50251, Jul. 2017, doi: 10.18632/oncotarget.16933.

[25] H. N. Luu *et al.*, “miRNAs associated with prostate cancer risk and progression.,” *BMC urology*, vol. 17, no. 1, p. 18, Mar. 2017, doi: 10.1186/s12894-017-0206-6.

[26] R. C. Friedman, K. K.-H. Farh, C. B. Burge, and D. P. Bartel, “Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs.,” *Genome research*, vol. 19, no. 1, pp. 92–105, Jan. 2009, doi: 10.1101/gr.082701.108.

[27] E. Wienholds and R. H. A. Plasterk, “MicroRNA function in animal development,” *FEBS Letters*, vol. 579, no. 26, pp. 5911–5922, Oct. 2005, doi: 10.1016/j.febslet.2005.07.070.

[28] S. K. Shenouda and S. K. Alahari, “MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor?,” *Cancer and Metastasis Reviews*, vol. 28, no. 3–4, pp. 369–378, Dec. 2009, doi: 10.1007/s10555-009-9188-5.

[29] C. Chen, “Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR,” *Nucleic Acids Research*, vol. 33, no. 20, pp. e179–e179, Nov. 2005, doi: 10.1093/nar/gni178.

[30] A. A. Svoronos, D. M. Engelman, and F. J. Slack, “OncomiR or Tumor Suppressor? The Duplicity of MicroRNAs in Cancer.,” *Cancer research*, vol. 76, no. 13, pp. 3666–70, 2016, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-0359.

[31] “Expression pattern of the microRNA miR-1 in ovarian cancer cell lines and tumor tissue samples implies a loss of miR-1’s tumor suppressor properties,” *RNA & DISEASE*, Oct. 2014, doi: 10.14800/rd.348.

[32] D. Huang *et al.*, “miRNA27a is a biomarker for predicting chemosensitivity and prognosis in metastatic or recurrent gastric cancer.,” *Journal of cellular biochemistry*, vol. 115, no. 3, pp. 549–56, Mar. 2014, doi: 10.1002/jcb.24689.

[33] C. Migliore *et al.*, “MiR-1 Downregulation Cooperates with MACC1 in Promoting MET Overexpression in Human Colon Cancer,” *Clinical Cancer Research*, vol. 18, no. 3, pp. 737–747, Feb. 2012, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-1699.

[34] T. Melkamu, X. Zhang, J. Tan, Y. Zeng, and F. Kassie, “Alteration of microRNA expression in vinyl carbamate-induced mouse lung tumors and modulation by the chemopreventive agent indole-3-carbinol.,” *Carcinogenesis*, vol. 31, no. 2, pp. 252–8, Feb. 2010, doi: 10.1093/carcin/bgp208.

[35] G. Pignot *et al.*, “microRNA expression profile in a large series of bladder tumors: Identification of a 3-miRNA signature associated with aggressiveness of muscle-invasive bladder cancer,” *International Journal of Cancer*, vol. 132, no. 11, pp. 2479–2491, Jun. 2013, doi: 10.1002/ijc.27949.

[36] J. Datta *et al.*, “Methylation Mediated Silencing of MicroRNA-1 Gene and Its Role in Hepatocellular Carcinogenesis,” *Cancer Research*, vol. 68, no. 13, pp. 5049–5058, Jul. 2008, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6655.

[37] C. Novello *et al.*, “miRNA expression profile in human osteosarcoma: role of miR-1 and miR-133b in proliferation and cell cycle control.,” *International journal of oncology*, vol. 42, no. 2, pp. 667–75, Feb. 2013, doi: 10.3892/ijo.2012.1717.

[38] P. Letelier *et al.*, “miR-1 and miR-145 act as tumor suppressor microRNAs in gallbladder cancer.,” *International journal of clinical and experimental pathology*, vol. 7, no. 5, pp. 1849–67, 2014.

[39] N. Nohata *et al.*, “Caveolin-1 mediates tumor cell migration and invasion and its regulation by miR-133a in head and neck squamous cell carcinoma.,” *International journal of oncology*, vol. 38, no. 1, pp. 209–17, Jan. 2011.

[40] M. Weiss, L.-O. Brandenburg, M. Burchardt, and M. B. Stope, “MicroRNA-1 properties in cancer regulatory networks and tumor biology.,” *Critical reviews in oncology/hematology*, vol. 104, pp. 71–7, Aug. 2016, doi: 10.1016/j.critrevonc.2016.05.014.

[41] H.-W. Hwang and J. T. Mendell, “MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis,” *British Journal of Cancer*, vol. 94, no. 6, Mar. 2006, doi: 10.1038/sj.bjc.6603023.

[42] S. Baranwal and S. K. Alahari, “miRNA control of tumor cell invasion and metastasis,” *International Journal of Cancer*, 2010, doi: 10.1002/ijc.25014.

[43] A. E. Belevych *et al.*, “MicroRNA-1 and -133 Increase Arrhythmogenesis in Heart Failure by Dissociating Phosphatase Activity from RyR2 Complex,” *PLoS ONE*, vol. 6, no. 12, Dec. 2011, doi: 10.1371/journal.pone.0028324.

[44] R. Kumarswamy *et al.*, “SERCA2a gene therapy restores microRNA-1 expression in heart failure via an Akt/FoxO3A-dependent pathway,” *European Heart Journal*, vol. 33, no. 9, May 2012, doi: 10.1093/eurheartj/ehs043.

[45] E. Boštjančič, N. Zidar, D. Štajer, and D. Glavač, “MicroRNAs miR-1, miR-133a, miR-133b and miR-208 Are Dysregulated in Human Myocardial Infarction,” *Cardiology*, vol. 115, no. 3, 2010, doi: 10.1159/000268088.

[46] A. Lewis *et al.*, “Downregulation of the serum response factor/miR-1 axis in the quadriceps of patients with COPD,” *Thorax*, vol. 67, no. 1, Jan. 2012, doi: 10.1136/thoraxjnl-2011-200309.

[47] C. Han, Z. Yu, Z. Duan, and Q. Kan, “Role of MicroRNA-1 in Human Cancer and Its Therapeutic Potentials,” *BioMed Research International*, vol. 2014, 2014, doi: 10.1155/2014/428371.

[48] C. Migliore *et al.*, “MiR-1 Downregulation Cooperates with MACC1 in Promoting *MET* Overexpression in Human Colon Cancer,” *Clinical Cancer Research*, vol. 18, no. 3, Feb. 2012, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-1699.

[49] C. Han, Z. Yu, Z. Duan, and Q. Kan, “Role of MicroRNA-1 in Human Cancer and Its Therapeutic Potentials,” *BioMed Research International*, vol. 2014, 2014, doi: 10.1155/2014/428371.

[50] C. Migliore *et al.*, “MiR-1 Downregulation Cooperates with MACC1 in Promoting *MET* Overexpression in Human Colon Cancer,” *Clinical Cancer Research*, vol. 18, no. 3, Feb. 2012, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-1699.

[51] R. S. Hudson *et al.*, “MicroRNA-1 is a candidate tumor suppressor and prognostic marker in human prostate cancer,” *Nucleic Acids Research*, vol. 40, no. 8, Apr. 2012, doi: 10.1093/nar/gkr1222.

[52] O. F. Karatas *et al.*, “miR-1 and miR-133b Are Differentially Expressed in Patients with Recurrent Prostate Cancer,” *PLoS ONE*, vol. 9, no. 6, Jun. 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0098675.

[53] T. Melkamu, X. Zhang, J. Tan, Y. Zeng, and F. Kassie, “Alteration of microRNA expression in vinyl carbamate-induced mouse lung tumors and modulation by the chemopreventive agent indole-3-carbinol,” *Carcinogenesis*, vol. 31, no. 2, Feb. 2010, doi: 10.1093/carcin/bgp208.

[54] Q. Zhao *et al.*, “Correlation between the expression levels of miR-1 and PIK3CA in non-small-cell lung cancer and their relationship with clinical characteristics and prognosis,” *Future Oncology*, vol. 10, no. 1, Jan. 2014, doi: 10.2217/fon.13.242.

[55] G. Pignot *et al.*, “microRNA expression profile in a large series of bladder tumors: Identification of a 3-miRNA signature associated with aggressiveness of muscle-invasive bladder cancer,” *International Journal of Cancer*, vol. 132, no. 11, Jun. 2013, doi: 10.1002/ijc.27949.

[56] J. Datta *et al.*, "Methylation Mediated Silencing of MicroRNA-1 Gene and Its Role in Hepatocellular Carcinogenesis," *Cancer Research*, vol. 68, no. 13, Jul. 2008, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6655.

[57] P. Letelier *et al.*, "miR-1 and miR-145 act as tumor suppressor microRNAs in gallbladder cancer," 2014. [Online]. Available: www.ijcep.com/

[58] C. NOVELLO *et al.*, "miRNA expression profile in human osteosarcoma: Role of miR-1 and miR-133b in proliferation and cell cycle control," *International Journal of Oncology*, vol. 42, no. 2, Feb. 2013, doi: 10.3892/ijo.2012.1717.

[59] "Expression pattern of the microRNA miR-1 in ovarian cancer cell lines and tumor tissue samples implies a loss of miR-1's tumor suppressor properties," *RNA & DISEASE*, Oct. 2014, doi: 10.14800/rd.348.

[60] D. Huang *et al.*, "miRNA27a Is a Biomarker for Predicting Chemosensitivity and Prognosis in Metastatic or Recurrent Gastric Cancer," *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 115, no. 3, Mar. 2014, doi: 10.1002/jcb.24689.

[61] M. Weiss, L.-O. Brandenburg, M. Burchardt, and M. B. Stope, "MicroRNA-1 properties in cancer regulatory networks and tumor biology," *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, vol. 104, Aug. 2016, doi: 10.1016/j.critrevonc.2016.05.014.

[62] J. K. W. Lam, M. Y. T. Chow, Y. Zhang, and S. W. S. Leung, "siRNA Versus miRNA as Therapeutics for Gene Silencing," *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, vol. 4, p. e252, 2015, doi: 10.1038/mtna.2015.23.

[63] P. P. Medina, M. Nolde, and F. J. Slack, "OncomiR addiction in an in vivo model of microRNA-21-induced pre-B-cell lymphoma.," *Nature*, vol. 467, no. 7311, pp. 86–90, Sep. 2010, doi: 10.1038/nature09284.

[64] A. G. Bader, D. Brown, J. Stoudemire, and P. Lammers, "Developing therapeutic microRNAs for cancer.," *Gene therapy*, vol. 18, no. 12, pp. 1121–6, Dec. 2011, doi: 10.1038/gt.2011.79.

[65] J. DeVincenzo *et al.*, "A randomized, double-blind, placebo-controlled study of an RNAi-based therapy directed against respiratory syncytial virus.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 107, no. 19, pp. 8800–5, May 2010, doi: 10.1073/pnas.0912186107.

[66] D. V Morrissey *et al.*, "Potent and persistent in vivo anti-HBV activity of chemically modified siRNAs.," *Nature biotechnology*, vol. 23, no. 8, pp. 1002–7, Aug. 2005, doi: 10.1038/nbt1122.

[67] A. Daka and D. Peer, "RNAi-based nanomedicines for targeted personalized therapy," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 64, no. 13, pp. 1508–1521, Oct. 2012, doi: 10.1016/j.addr.2012.08.014.

[68] L. Aagaard and J. J. Rossi, "RNAi therapeutics: Principles, prospects and challenges," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 59, no. 2–3, pp. 75–86, Mar. 2007, doi: 10.1016/j.addr.2007.03.005.

[69] A. Christopher, R. Kaur, G. Kaur, A. Kaur, V. Gupta, and P. Bansal, "MicroRNA therapeutics: Discovering novel targets and developing specific therapy," *Perspectives in Clinical Research*, vol. 7, no. 2, p. 68, 2016, doi: 10.4103/2229-3485.179431.

[70] J. Krützfeldt *et al.*, "Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs,'" *Nature*, vol. 438, no. 7068, pp. 685–689, Dec. 2005, doi: 10.1038/nature04303.

[71] S.-S. Kim, H. Garg, A. Joshi, and N. Manjunath, "Strategies for targeted nonviral delivery of siRNAs in vivo," *Trends in Molecular Medicine*, vol. 15, no. 11, pp. 491–500, Nov. 2009, doi: 10.1016/j.molmed.2009.09.001.

[72] S. Weinstein and D. Peer, "RNAi nanomedicines: challenges and opportunities within the immune system," *Nanotechnology*, vol. 21, no. 23, p. 232001, Jun. 2010, doi: 10.1088/0957-4484/21/23/232001.

[73] A. L. Jackson, "Widespread siRNA 'off-target' transcript silencing mediated by seed region sequence complementarity," *RNA*, vol. 12, no. 7, pp. 1179–1187, May 2006, doi: 10.1261/rna.25706.

[74] S. B. Shelton, C. Reinsborough, and B. Xhemalce, “Who Watches the Watchmen: Roles of RNA Modifications in the RNA Interference Pathway,” *PLOS Genetics*, vol. 12, no. 7, p. e1006139, Jul. 2016, doi: 10.1371/journal.pgen.1006139.

[75] G. F. Deleavey, J. K. Watts, and M. J. Damha, “Chemical Modification of siRNA,” *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*, vol. 39, no. 1, Dec. 2009, doi: 10.1002/0471142700.nc1603s39.

[76] G. F. Deleavey and M. J. Damha, “Designing Chemically Modified Oligonucleotides for Targeted Gene Silencing,” *Chemistry & Biology*, vol. 19, no. 8, pp. 937–954, Aug. 2012, doi: 10.1016/j.chembiol.2012.07.011.

[77] L. Wang, S. Jiang, Z. Deng, P. C. Dedon, and S. Chen, “DNA phosphorothioate modification—a new multi-functional epigenetic system in bacteria,” *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 43, no. 2, pp. 109–122, Mar. 2019, doi: 10.1093/femsre/fuy036.

[78] A. De Mesmaeker, K.-H. Altmann, A. Waldner, and S. Wendeborn, “Backbone modifications in oligonucleotides and peptide nucleic acid systems,” *Current Opinion in Structural Biology*, vol. 5, no. 3, pp. 343–355, Jun. 1995, doi: 10.1016/0959-440X(95)80096-4.

[79] K. P. Anderson, M. C. Fox, V. Brown-Driver, M. J. Martin, and R. F. Azad, “Inhibition of human cytomegalovirus immediate-early gene expression by an antisense oligonucleotide complementary to immediate-early RNA.,” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 40, no. 9, pp. 2004–2011, Sep. 1996, doi: 10.1128/AAC.40.9.2004.

[80] M. Evich, A. M. Spring-Connell, and M. W. Germann, “Impact of modified ribose sugars on nucleic acid conformation and function,” *Heterocyclic Communications*, vol. 23, no. 3, pp. 155–165, Jun. 2017, doi: 10.1515/hc-2017-0056.

[81] H. Kaur, A. Arora, J. Wengel, and S. Maiti, “Thermodynamic, Counterion, and Hydration Effects for the Incorporation of Locked Nucleic Acid Nucleotides into DNA Duplexes †,” *Biochemistry*, vol. 45, no. 23, pp. 7347–7355, Jun. 2006, doi: 10.1021/bi060307w.

[82] Y. Sun, Y. Zhao, X. Zhao, R. J. Lee, L. Teng, and C. Zhou, “Enhancing the Therapeutic Delivery of Oligonucleotides by Chemical Modification and Nanoparticle Encapsulation,” *Molecules*, vol. 22, no. 10, p. 1724, Oct. 2017, doi: 10.3390/molecules22101724.

[83] G. R. Rettig and M. A. Behlke, “Progress Toward In Vivo Use of siRNAs-II,” *Molecular Therapy*, vol. 20, no. 3, pp. 483–512, Mar. 2012, doi: 10.1038/mt.2011.263.

[84] K. R. Gore, S. Harikrishna, and P. I. Pradeepkumar, “Influence of 2′-Fluoro versus 2′- O -Methyl Substituent on the Sugar Puckering of 4′- C -Aminomethyluridine,” *The Journal of Organic Chemistry*, vol. 78, no. 19, pp. 9956–9962, Oct. 2013, doi: 10.1021/jo4012333.

[85] H. Peacock, A. Kannan, P. A. Beal, and C. J. Burrows, “Chemical Modification of siRNA Bases To Probe and Enhance RNA Interference,” *The Journal of Organic Chemistry*, vol. 76, no. 18, pp. 7295–7300, Sep. 2011, doi: 10.1021/jo2012225.

[86] C. Han, Z. Yu, Z. Duan, and Q. Kan, “Role of MicroRNA-1 in Human Cancer and Its Therapeutic Potentials,” *BioMed Research International*, vol. 2014, pp. 1–11, 2014, doi: 10.1155/2014/428371.

[87] R. S. Hudson *et al.*, “MicroRNA-1 is a candidate tumor suppressor and prognostic marker in human prostate cancer.,” *Nucleic acids research*, vol. 40, no. 8, pp. 3689–703, Apr. 2012, doi: 10.1093/nar/gkr1222.

[88] S. Ambs *et al.*, “Genomic Profiling of MicroRNA and Messenger RNA Reveals Deregulated MicroRNA Expression in Prostate Cancer,” *Cancer Research*, vol. 68, no. 15, pp. 6162–6170, Aug. 2008, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0144.

[89] T. Stuven, “Exportin 6: a novel nuclear export receptor that is specific for profilin{middle dot}actin complexes,” *The EMBO Journal*, vol. 22, no. 21, pp. 5928–5940, Nov. 2003, doi: 10.1093/emboj/cdg565.

[90] M. Vartiainen, P. J. Ojala, P. Auvinen, J. Peränen, and P. Lappalainen, “Mouse A6/Twinfilin Is an Actin Monomer-Binding Protein That Localizes to the Regions of Rapid Actin Dynamics,” *Molecular and Cellular Biology*, vol. 20, no. 5, pp. 1772–1783, Mar. 2000, doi: 10.1128/MCB.20.5.1772-1783.2000.

[91] S. Kojima *et al.*, "Tumour suppressors miR-1 and miR-133a target the oncogenic function of purine nucleoside phosphorylase (PNP) in prostate cancer," *British Journal of Cancer*, vol. 106, no. 2, pp. 405–413, Jan. 2012, doi: 10.1038/bjc.2011.462.
[92] R. Kalluri and R. A. Weinberg, "The basics of epithelial-mesenchymal transition," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 119, no. 6, pp. 1420–1428, Jun. 2009, doi: 10.1172/JCI39104.
[93] Y.-N. Liu *et al.*, "MiR-1 and miR-200 inhibit EMT via Slug-dependent and tumorigenesis via Slug-independent mechanisms," *Oncogene*, vol. 32, no. 3, pp. 296–306, Jan. 2013, doi: 10.1038/onc.2012.58.
[94] "Krebs in Deutschland für 2013/2014," 1th ed. Berlin, 2017.
[95] W. Böcker, H. Denk, P. U. Heitz, H. Och, G. Höfler, and H. Kreipe, *Pathologie*, 5. Auflage. Elsevier.
[96] S. Offermanns, "Hypothalamus-Hypophysen-System," 2012, pp. 523–534. doi: 10.1007/978-3-642-12354-2_48.
[97] F. Azzouni and J. Mohler, "Role of 5α-reductase inhibitors in prostate cancer prevention and treatment.," *Urology*, vol. 79, no. 6, pp. 1197–205, Jun. 2012, doi: 10.1016/j.urology.2012.01.024.
[98] P. C. Marker, A. A. Donjacour, R. Dahiya, and G. R. Cunha, "Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development," *Developmental Biology*, vol. 253, no. 2, pp. 165–174, Jan. 2003, doi: 10.1016/S0012-1606(02)00031-3.
[99] M. Bahceci, A. R. Ersay, A. Tuzcu, O. Hiort, A. Richter-Unruh, and D. Gokalp, "A novel missense mutation of 5-alpha reductase type 2 gene (SRD5A2) leads to severe male pseudohermaphroditism in a Turkish family.," *Urology*, vol. 66, no. 2, pp. 407–10, Aug. 2005, doi: 10.1016/j.urology.2005.02.021.
[100] C. A. Heinlein and C. Chang, "Androgen Receptor in Prostate Cancer," *Endocrine Reviews*, vol. 25, no. 2, pp. 276–308, Apr. 2004, doi: 10.1210/er.2002-0032.
[101] J. A. Sinnott *et al.*, "Molecular differences in transition zone and peripheral zone prostate tumors," *Carcinogenesis*, vol. 36, no. 6, pp. 632–638, Jun. 2015, doi: 10.1093/carcin/bgv051.
[102] R. C. Flanigan *et al.*, "Accuracy of Digital Rectal Examination and Transrectal Ultrasonography in Localizing Prostate Cancer," *Journal of Urology*, vol. 152, no. 5 Part 1, pp. 1506–1509, Nov. 1994, doi: 10.1016/S0022-5347(17)32457-6.
[103] R. C. Flanigan *et al.*, "Accuracy of digital rectal examination and transrectal ultrasonography in localizing prostate cancer.," *The Journal of urology*, vol. 152, no. 5 Pt 1, pp. 1506–9, 1994.
[104] P. Dasgupta, P. D. Baade, J. F. Aitken, N. Ralph, S. K. Chambers, and J. Dunn, "Geographical Variations in Prostate Cancer Outcomes: A Systematic Review of International Evidence," *Frontiers in Oncology*, vol. 9, Apr. 2019, doi: 10.3389/fonc.2019.00238.
[105] S. B. Shappell *et al.*, "Prostate Pathology of Genetically Engineered Mice: Definitions and Classification. The Consensus Report from the Bar Harbor Meeting of the Mouse Models of Human Cancer Consortium Prostate Pathology Committee," *Cancer Research*, vol. 64, no. 6, pp. 2270–2305, Mar. 2004, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-03-0946.
[106] C. Logothetis, M. J. Morris, R. Den, and R. E. Coleman, "Current perspectives on bone metastases in castrate-resistant prostate cancer," *Cancer and Metastasis Reviews*, vol. 37, no. 1, pp. 189–196, Mar. 2018, doi: 10.1007/s10555-017-9719-4.
[107] M. Quinn and P. Babb, "Patterns and trends in prostate cancer incidence, survival, prevalence and mortality. Part I: international comparisons," *BJU International*, vol. 90, no. 2, pp. 162–173, Jun. 2002, doi: 10.1046/j.1464-410X.2002.2822.x.
[108] M. B. Stope *et al.*, "Effect of the heat shock protein HSP27 on androgen receptor expression and function in prostate cancer cells," *World Journal of Urology*, vol. 30, no. 3, pp. 327–331, Jun. 2012, doi: 10.1007/s00345-012-0843-z.
[109] J. S. Horoszewicz *et al.*, "LNCaP model of human prostatic carcinoma.," *Cancer research*, vol. 43, no. 4, pp. 1809–18, Apr. 1983.
[110] S. Tai *et al.*, "PC3 is a cell line characteristic of prostatic small cell carcinoma," *The Prostate*, vol. 71, no. 15, pp. 1668–1679, Nov. 2011, doi: 10.1002/pros.21383.

[111] P. C. Zamecnik and M. L. Stephenson, “Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide.,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 75, no. 1, pp. 280–284, Jan. 1978, doi: 10.1073/pnas.75.1.280.

[112] H. Zipper, H. Brunner, J. Bernhagen, and F. Vitzthum, “Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications.,” *Nucleic acids research*, vol. 32, no. 12, p. e103, Jul. 2004, doi: 10.1093/nar/gnh101.

[113] M. Overhoff and G. Sczakiel, “Phosphorothioate-stimulated uptake of short interfering RNA by human cells.,” *EMBO reports*, vol. 6, no. 12, pp. 1176–81, Dec. 2005, doi: 10.1038/sj.embor.7400535.

[114] Y. Akaneya, B. Jiang, and T. Tsumoto, “RNAi-induced gene silencing by local electroporation in targeting brain region.,” *Journal of neurophysiology*, vol. 93, no. 1, pp. 594–602, Jan. 2005, doi: 10.1152/jn.00161.2004.

[115] R. A. Bejjani, C. Andrieu, C. Bloquel, M. Berdugo, D. BenEzra, and F. Behar-Cohen, “Electrically assisted ocular gene therapy.,” *Survey of ophthalmology*, vol. 52, no. 2, pp. 196–208, doi: 10.1016/j.survophthal.2006.12.005.

[116] Y.-L. Chiu, A. Ali, C.-Y. Chu, H. Cao, and T. M. Rana, “Visualizing a correlation between siRNA localization, cellular uptake, and RNAi in living cells.,” *Chemistry & biology*, vol. 11, no. 8, pp. 1165–75, Aug. 2004, doi: 10.1016/j.chembiol.2004.06.006.

[117] A. Detzer *et al.*, “Increased RNAi is related to intracellular release of siRNA via a covalently attached signal peptide.,” *RNA (New York, N.Y.)*, vol. 15, no. 4, pp. 627–36, Apr. 2009, doi: 10.1261/rna.1305209.

[118] F. Czauderna *et al.*, “Structural variations and stabilising modifications of synthetic siRNAs in mammalian cells.,” *Nucleic acids research*, vol. 31, no. 11, pp. 2705–16, Jun. 2003, doi: 10.1093/nar/gkg393.

[119] G. R. Rettig and M. A. Behlke, “Progress toward in vivo use of siRNAs-II.,” *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, vol. 20, no. 3, pp. 483–512, Mar. 2012, doi: 10.1038/mt.2011.263.

[120] A. D. Judge, G. Bola, A. C. H. Lee, and I. MacLachlan, “Design of noninflammatory synthetic siRNA mediating potent gene silencing in vivo.,” *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, vol. 13, no. 3, pp. 494–505, Mar. 2006, doi: 10.1016/j.ymthe.2005.11.002.

[121] T. X. Lu and M. E. Rothenberg, “MicroRNA.,” *The Journal of allergy and clinical immunology*, vol. 141, no. 4, pp. 1202–1207, 2018, doi: 10.1016/j.jaci.2017.08.034.

[122] K. A. Whitehead, J. E. Dahlman, R. S. Langer, and D. G. Anderson, “Silencing or Stimulation? siRNA Delivery and the Immune System,” *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, vol. 2, no. 1, pp. 77–96, Jul. 2011, doi: 10.1146/annurev-chembioeng-061010-114133.

[123] M. Manoharan, “2’-Carbohydrate modifications in antisense oligonucleotide therapy: importance of conformation, configuration and conjugation,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, vol. 1489, no. 1, pp. 117–130, Dec. 1999, doi: 10.1016/S0167-4781(99)00138-4.

[124] C. R. Allerson *et al.*, “Fully 2’-modified oligonucleotide duplexes with improved in vitro potency and stability compared to unmodified small interfering RNA.,” *Journal of medicinal chemistry*, vol. 48, no. 4, pp. 901–4, Feb. 2005, doi: 10.1021/jm049167j.

[125] A. M. Kawasaki *et al.*, “Uniformly modified 2’-deoxy-2’-fluoro phosphorothioate oligonucleotides as nuclease-resistant antisense compounds with high affinity and specificity for RNA targets.,” *Journal of medicinal chemistry*, vol. 36, no. 7, pp. 831–41, Apr. 1993, doi: 10.1021/jm00059a007.

[126] S. Noguchi *et al.*, “Chemically Modified Synthetic microRNA-205 Inhibits the Growth of Melanoma Cells In Vitro and In Vivo,” *Molecular Therapy*, vol. 21, no. 6, pp. 1204–1211, Jun. 2013, doi: 10.1038/mt.2013.70.

[127] W. H. Chappell, B. D. Lehmann, D. M. Terrian, S. L. Abrams, L. S. Steelman, and J. A. McCubrey, “p53 expression controls prostate cancer sensitivity to chemotherapy and the MDM2 inhibitor Nutlin-3.,” *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, vol. 11, no. 24, pp. 4579–88, Dec. 2012, doi: 10.4161/cc.22852.

[128] A. G. Carroll, H. J. Voeller, L. Sugars, and E. P. Gelmann, “p53 oncogene mutations in three human prostate cancer cell lines,” *The Prostate*, vol. 23, no. 2, pp. 123–134, 1993, doi: 10.1002/pros.2990230206.

[129] A. van Bokhoven *et al.*, “Molecular characterization of human prostate carcinoma cell lines.,” *The Prostate*, vol. 57, no. 3, pp. 205–25, Nov. 2003, doi: 10.1002/pros.10290.

[130] M. M. Centenera *et al.*, “Evidence for Efficacy of New Hsp90 Inhibitors Revealed by Ex Vivo Culture of Human Prostate Tumors,” *Clinical Cancer Research*, vol. 18, no. 13, pp. 3562–3570, Jul. 2012, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-0782.

[131] K. Z. Masoodi *et al.*, “Inhibition of Androgen Receptor Nuclear Localization and Castration-Resistant Prostate Tumor Growth by Pyrroloimidazole-based Small Molecules,” *Molecular Cancer Therapeutics*, vol. 16, no. 10, pp. 2120–2129, Oct. 2017, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-17-0176.

[132] H. GROSSEBRUMMEL *et al.*, “Cytochrome P450 17A1 inhibitor abiraterone attenuates cellular growth of prostate cancer cells independently from androgen receptor signaling by modulation of oncogenic and apoptotic pathways,” *International Journal of Oncology*, vol. 48, no. 2, pp. 793–800, Feb. 2016, doi: 10.3892/ijo.2015.3274.

[133] L. J. Chin *et al.*, “A SNP in a let-7 microRNA complementary site in the KRAS 3’ untranslated region increases non-small cell lung cancer risk.,” *Cancer research*, vol. 68, no. 20, pp. 8535–40, Oct. 2008, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2129.

[134] B. D. Adams, H. Furneaux, and B. A. White, “The micro-ribonucleic acid (miRNA) miR-206 targets the human estrogen receptor-alpha (ERalpha) and represses ERalpha messenger RNA and protein expression in breast cancer cell lines.,” *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, vol. 21, no. 5, pp. 1132–47, May 2007, doi: 10.1210/me.2007-0022.

[135] P. Saetrom *et al.*, “A risk variant in an miR-125b binding site in BMPR1B is associated with breast cancer pathogenesis.,” *Cancer research*, vol. 69, no. 18, pp. 7459–65, Sep. 2009, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1201.

[136] G. Ramsingh *et al.*, “Complete characterization of the microRNAome in a patient with acute myeloid leukemia.,” *Blood*, vol. 116, no. 24, pp. 5316–26, Dec. 2010, doi: 10.1182/blood-2010-05-285395.

[137] J. Martinez, A. Patkaniowska, H. Urlaub, R. Lührmann, and T. Tuschl, “Single-Stranded Antisense siRNAs Guide Target RNA Cleavage in RNAi,” *Cell*, vol. 110, no. 5, pp. 563–574, Sep. 2002, doi: 10.1016/S0092-8674(02)00908-X.

[138] C. Selvam, D. Mutisya, S. Prakash, K. Ranganna, and R. Thilagavathi, “Therapeutic potential of chemically modified siRNA: Recent trends.,” *Chemical biology & drug design*, vol. 90, no. 5, pp. 665–678, Nov. 2017, doi: 10.1111/cbdd.12993.

[139] N. Agrawal, P. V. N. Dasaradhi, A. Mohmmed, P. Malhotra, R. K. Bhatnagar, and S. K. Mukherjee, “RNA interference: biology, mechanism, and applications.,” *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, vol. 67, no. 4, pp. 657–85, Dec. 2003, doi: 10.1128/mmbr.67.4.657-685.2003.

[140] C. V Pecot, G. A. Calin, R. L. Coleman, G. Lopez-Berestein, and A. K. Sood, “RNA interference in the clinic: challenges and future directions.,” *Nature reviews. Cancer*, vol. 11, no. 1, pp. 59–67, Jan. 2011, doi: 10.1038/nrc2966.

[141] M. A. Valencia-Sanchez, J. Liu, G. J. Hannon, and R. Parker, “Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs.,” *Genes & development*, vol. 20, no. 5, pp. 515–24, Mar. 2006, doi: 10.1101/gad.1399806.

[142] D. H. Kim and J. J. Rossi, “Strategies for silencing human disease using RNA interference.,” *Nature reviews. Genetics*, vol. 8, no. 3, pp. 173–84, Mar. 2007, doi: 10.1038/nrg2006.

[143] A. Vishnoi and S. Rani, “MiRNA Biogenesis and Regulation of Diseases: An Overview.,” *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, vol. 1509, pp. 1–10, 2017, doi: 10.1007/978-1-4939-6524-3_1.
[144] M. Ha and V. N. Kim, “Regulation of microRNA biogenesis.,” *Nature reviews. Molecular cell biology*, vol. 15, no. 8, pp. 509–24, Aug. 2014, doi: 10.1038/nrm3838.
[145] E. Wienholds and R. H. A. Plasterk, “MicroRNA function in animal development.,” *FEBS letters*, vol. 579, no. 26, pp. 5911–22, Oct. 2005, doi: 10.1016/j.febslet.2005.07.070.
[146] C. Llave, K. D. Kasschau, and J. C. Carrington, “Virus-encoded suppressor of posttranscriptional gene silencing targets a maintenance step in the silencing pathway.,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 97, no. 24, pp. 13401–6, Nov. 2000, doi: 10.1073/pnas.230334397.
[147] D. P. Bartel, “MicroRNAs: target recognition and regulatory functions.,” *Cell*, vol. 136, no. 2, pp. 215–33, Jan. 2009, doi: 10.1016/j.cell.2009.01.002.
[148] L. P. Lim *et al.*, “Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs.,” *Nature*, vol. 433, no. 7027, pp. 769–73, Feb. 2005, doi: 10.1038/nature03315.
[149] Y. Fedorov *et al.*, “Off-target effects by siRNA can induce toxic phenotype.,” *RNA (New York, N.Y.)*, vol. 12, no. 7, pp. 1188–96, Jul. 2006, doi: 10.1261/rna.28106.
[150] X. Lin *et al.*, “siRNA-mediated off-target gene silencing triggered by a 7 nt complementation.,” *Nucleic acids research*, vol. 33, no. 14, pp. 4527–35, 2005, doi: 10.1093/nar/gki762.
[151] J. G. Doench, C. P. Petersen, and P. A. Sharp, “siRNAs can function as miRNAs.,” *Genes & development*, vol. 17, no. 4, pp. 438–42, Feb. 2003, doi: 10.1101/gad.1064703.
[152] D. P. Bartel and C.-Z. Chen, “Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNAs.,” *Nature reviews. Genetics*, vol. 5, no. 5, pp. 396–400, May 2004, doi: 10.1038/nrg1328.
[153] E. Junn and M. M. Mouradian, “MicroRNAs in neurodegenerative diseases and their therapeutic potential,” *Pharmacology & Therapeutics*, vol. 133, no. 2, pp. 142–150, Feb. 2012, doi: 10.1016/j.pharmthera.2011.10.002.
[154] G. S. Mack, “Erratum: MicroRNA gets down to business,” *Nature Biotechnology*, vol. 29, no. 5, pp. 459–459, May 2011, doi: 10.1038/nbt0511-459a.
[155] F. Saberi, M. Kamali, A. Najafi, A. Yazdanparast, and M. M. Moghaddam, “Natural antisense RNAs as mRNA regulatory elements in bacteria: a review on function and applications.,” *Cellular & molecular biology letters*, vol. 21, p. 6, 2016, doi: 10.1186/s11658-016-0007-z.
[156] R. Rupaimoole and F. J. Slack, “MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases,” *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 16, no. 3, pp. 203–222, Mar. 2017, doi: 10.1038/nrd.2016.246.
[157] V. Baumann and J. Winkler, “miRNA-based therapies: strategies and delivery platforms for oligonucleotide and non-oligonucleotide agents,” *Future Medicinal Chemistry*, vol. 6, no. 17, pp. 1967–1984, Nov. 2014, doi: 10.4155/fmc.14.116.
[158] R. S. Hudson *et al.*, “MicroRNA-1 is a candidate tumor suppressor and prognostic marker in human prostate cancer,” *Nucleic Acids Research*, vol. 40, no. 8, pp. 3689–3703, Apr. 2012, doi: 10.1093/nar/gkr1222.

8. ANHANG

8.1. Lebenslauf

Persönliche Daten	geboren am 10.07.1983 in Neustrelitz

Promotion

04/2015 – voraussichtlich Mitte/Ende 2021	Promotionsstudent im Urologischen Forschungslabor der Universitätsmedizin Greifswald, Thema: *Modulation der biologischen Wirkung von MikroRNA-1 mittels chemischer Modifikation des RNA-Moleküls.* (Betreuer PD Dr. Dr. M. Stope)

Beruflicher Werdegang

06/2021 - heute	Arzt in Weiterbildung zum Facharzt für Innere Medizin, Israelitisches Krankenhaus Hamburg
09/2019 – 05/2021	Arzt in Weiterbildung zum Facharzt für Innere Medizin, I. Medizinische Klinik, UKE Hamburg
03/2019 – 08/2019	Arzt in Weiterbildung zum Facharzt für Innere Medizin, Städtisches Klinikum Dresden Friedrichstadt
03/2013 – 10/2018	Fachkrankenpfleger für Anästhesie und Intensivmedizin in Teilzeit, internistische ITS, Universitätsmedizin Greifswald
11/2008 – 11/2010	Weiterbildung zum Fachpfleger für Anästhesie und Intensivmedizin, Gesundheitsakademie Charité Berlin
02/2005 – 10/2011	Examinierter Krankenpfleger, Universitätsmedizin Charité Berlin
07/2004 – 01/2005	Examinierter Krankenpfleger, St. Marin Krankenhaus Berlin
09/2003 – 06/2004	Zivildienst Häusliche Krankenpflege, Caritas Sozialstation Neustrelitz
09/2000 – 08/2003	Ausbildung zum staatlich examinierten Krankenpfleger, DRK Krankenhaus Mecklenburg- Strelitz

Akademische Ausbildung und Schulbildung

10/2015 – 12/2019	Studium Biomedical Science, Ernst-Moritz-Arndt Universität Greifswald, B. Sc.
10/2011 – 12/2018	Studium der Humanmedizin, Ernst-Moritz-Arndt Universität Greifswald und Universität Cardiff (Wales)
08/2007 – 06/2011	Allgemeine Hochschulreife, Abendgymnasium Prenzlauer Berg, Berlin

Studienbegleitende Tätigkeiten

01/2015 – 11/2018	Studentische Hilfskraft im urologischen Forschungslabor, Universitätsmedizin Greifswald, Arbeitsgruppe PD Dr. Dr. Stope
11/2016 – 03/2017	Tutor Untersuchungskurs Innere Medizin A, Anamneseerhebung und klinische Untersuchung (Schwerpunkt abdominelle Erkrankungen), Leitung Frau Prof. Dr. Stracke, Universitätsmedizin Greifswald
10/2014 – 03/2016	Tutor Institut für Medizinische Biometrie

Stipendien und Zertifikate

05/2020	Grundlagenkurs für Prüfer/Stellvertreter und Mitglieder einer Prüfgruppe bei klinischen Prüfungen nach dem AMG, CTC North Hamburg
03/2018 – 05/2018	Erasmus Aufenthalt an der Universität Cardiff, Schwerpunkt Viszeralchirurgie, Wales

Mitbetreute Studien

1. Regenerate 747-303, Eudra CT Nr. 2015-002560-16, NASH
2. Reverse INT 747-304, Eudra CT Nr. 2017-000474-11, NASH
3. Aurora 3152-301-002, Eudra CT Nr. Aurora 3152-301-002, NASH
4. Nut-3, Eudra CT Nr. 2018-003443-31, NASH
5. Preciosa, Eudra CT Nr. 2016-001789-28, Zirrhose
6. NUC-5/PSC, Eudra CT Nr. 2016-003367-19, PSC
7. REEF-1, Eudra CT Nr. 2019-000622-22, HBV
8. REEF-2, Eudra CT Nr. 2019-002674-31, HBV

Publikationsverzeichnis

1. Ahrend H, Appel V, Jung L, Brandenburg LO, Burchardt M, Müller S, Stope MB (2019) *Improved anti-prostate cancer activity of chemically synthesized microRNA-1 molecules substituted at the C2' positions of varying ribose residues.* Scientific reports, under review
2. Rottach AM, Ahrend H, Martin B, Walther R, Zimmermann U, Burchardt M, Stope MB (2019) *Cabazitaxel inhibits prostate cancer cell growth by inhibition of androgen receptor and heat shock protein expression*. World J Urol, im Druck
3. Ahrend H, Daeschlein G, Grove E, Paditz M, Mustea A, Burchardt M, Stope MB (2019) *MicroRNA-20a-3p and microRNA-20a-5p exhibit anti-proliferative activities in a melanoma in vitro model.* SDRP J Cell Mol Physiol 3, pp. 1-7
4. Gelbrich N, Ahrend H (geteilte Erstautorenschaft), Kaul A, Brandenburg LO, Zimmermann U, Mustea A, Burchardt M, Gümbel D, Stope MB. (2017) *Different cytokine and chemokine expression patterns in malignant compared to non-malignant renal cells.* Anall Cell Pathol 2017:7190546
5. Mandelkow R, Gümbel D, Ahrend H, Kaul A, Zimmermann U, Burchardt M, Stope MB. (2017) *Detection and quantification of nuclear morphology changes in apoptotic cells by fluorescence microscopy and subsequent analysis of visualized fluorescent signals.* Anticancer Res.; 37
6. Ahrend H, Kaul A (geteilte Erstautorenschaft), Ziegler S, Brandenburg LO, Zimmermann U, Mustea A, Burchardt M, Ziegler P, Stope MB. (2017) *MicroRNA-1 and microRNA-21 individually regulate cellular growth of non-malignant and malignant renal cells.* In Vivo 31: 625-630
7. Weiss M, Ahrend H, Grossebrummel H, Ziegler P, Brandenburg LO, Walther R, Zimmermann U, Burchardt M, Stope MB. (2016) *Cytochrome P450 17A1 Inhibitor Abiraterone Acetate Counteracts the Heat Shock Protein 27's Cell Survival Properties in Prostate Cancer Cells.* Urol Int. 97(1)

Tagungsbeiträge

1. Ahrend H, Appel B, Zimmermann U, Burchardt M, Müller S, Stope MB (2018) *Neue Wirkstoffe für die Krebstherapie - synthetische, chemisch modifizierte RNA-Moleküle hemmen das Wachstum von Prostatakarzinomzellen.* 70. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Urologie
2. Ahrend H, Gelbrich N, Kaul A, Brandenburg LO, Zimmermann U, Mustea A, Burchardt M, Gümbel D, Stope MB (2017*) Zytokin-Expression im Nierenzellkarzinom - Vergleich maligner Zelllinien mit einer nicht-malignen Zelllinie*. 11. Nordkongress Vereinigung Norddeutscher Urologen
3. Grove E, Ahrend H, Zimmermann U, Burchardt M, Stope MB (2017) *Ein neuer Biomarker für alte Probleme? Die regulatorische RNA miR-20a ist ein Tumorsuppressor in Prostatakarzinomzellen.* 11. Nordkongress Vereinigung Norddeutscher Urologen
4. Ahrend H, Gelbrich N, Kaul A, Brandenburg LO, Zimmermann U, Mustea A, Burchardt M, Gümbel D, Stope MB*. Zytokinexpression im Nierenzellkarzinom.* (2017) Tag der Wissenschaft Universitätsmedizin Greifswald
5. Ahrend H, Gelbrich N, Kaul A, Brandenburg LO, Zimmermann U, Mustea A, Burchardt M, Gümbel D, Stope MB. *Modulation der biologischen Wirkung von MikroRNA-1 mittels chemischer Modifikation des RNA-Moleküls.* (2016) Tag der Wissenschaft Universitätsmedizin Greifswald
6. Ahrend H, Saupe M, Peters S, Schubert T, Zimmermann U, Burchardt M, Stope MB (2015) *Cellular properties of the tumor suppressor microRNA-1 and the oncogene microRNA-21 in prostate cancer cell chemoresistance.* 16. Symposium der Griechisch-Deutschen Gesellschaft für Urologie
7. Ahrend H, Zimmermann U, Burchardt M, Stope MB. *MicroRNAs miR-1 and miR-21 functionality in prostate cancer cells.* (2015) Tag der Wissenschaft Universitätsmedizin Greifswald

8.2. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät, keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

_____ _____

Datum, Ort Unterschrift

8.3. Danksagung

Diese Promotion entstand im Forschungslabor der Klinik und Poliklinik für Urologie der Universitätsmedizin Greifswald unter Leitung von Prof. Martin Burchhardt und Betreuung von PD Dr. rer. nat. Dr. rer. med. habil. Matthias Stope. Mein Dank gilt allen voran Prof. Martin Burchhardt für die Möglichkeit meine Promotion im molekular-urologischen Forschungslabor der Klinik und Poliklinik für Urologie der Universitätsmedizin Greifswald durchzuführen. Zudem bedanke ich mich bei Ihm dafür, dass er mich seinem Laborleiter und ehemaligem Mitarbeiter PD Dr. rer. nat. Dr. rer. med. habil. Matthias Stope vorgestellt und damit den Grundstein für diese Arbeit gelegt hat. Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Burchhardt für seine freundliche Betreuung und anregenden und wertvollen Hinweise, vor allem im Rahmen der Forschungsseminare.

Ein besonderer Dank gilt PD Dr. rer. nat. Dr. rer. med. habil. Matthias Stope für die Vergabe dieses interessanten Forschungsthemas und damit der Erschließung neuer, noch unbekannter Entdeckungen. Er sorgte immer wieder durch sein kritisches Hinterfragen für wertvolle Hinweise und Anregungen. Darüber hinaus schuf er als Führungskraft ein freundliches, harmonisches und produktives Arbeitsklima. Ferner waren seine Hilfestellungen, Kommentare und Hartnäckigkeit während des Schreibprozesses und Erstellung dieser Arbeit von unschätzbarem Wert. Er hat Vieles schnell und unkompliziert ermöglicht und zeichnete sich durch sein ausgeprägtes, zielgerichtetes Engagement, seine Einsatzbereitschaft und Leidensfähigkeit als Laborleiter und Betreuer aus.

Ein herzlicher Dank gilt dabei besonders den Technischen Angestellten Madleine Paditz und Karoline Diesing, welche mir die notwendigen Laborfähig- und Fertigkeiten beigebracht haben und mir stets als Ansprechpartnerinnen hilfsbereit bei Problemlösungen zur Seite standen.

Ein besonderer Dank gilt auch meiner Partnerin Dr. med. Anne Kaul. Sie war während der gesamten Zeit eine seelische und moralische Stütze sowie Ansporn und Vorbild gleichermaßen. Ich danke Dir für all die Geduld, die Du für mich aufgebracht hast.

Abschließend möchte ich mich bei PD Dr. rer. nat. Dr. rer. med. habil. Matthias Stope und Dr. med. Anne Kaul insbesondere für die uneingeschränkte Unterstützung und damit die Verwirklichung meines Lebensweges bedanken. Ihr habt stets an mich geglaubt, immer ein offenes Ohr für mich gehabt und mir bis zum Schluss mit Rat und Tat zur Seite gestanden.

Ohne Euch wäre ich nicht so weit gekommen. Dafür sind Worte nicht genug Dank!