

Aus der Klinik für Urologie, Uro-Onkologie, spezielle urologische und
roboter-assistierte Chirurgie
der Universität zu Köln
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Dr. h.c. A. Heidenreich

**Verbesserte Differenzierung des Prostatakarzinoms:
VIM3, ATG7 und TP53 bilden einen Komplex
in Prostatakarzinomzellen und aktivieren die
MicroRNA-371a-3p**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Elena Katharina Nohl
aus Köln

promoviert am 25. August 2025

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink

1. Gutachterin: Privatdozentin Dr. rer. medic. M. Freifrau von Brandenstein
2. Gutachter: Privatdozent Dr. med. Y. Tolkach
3. Gutachter: Professor Dr. med. M. S. Michel

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Frau Privatdozentin Dr. rer. medic. M. Freifrau von Brandenstein
Herr Universitätsprofessor Dr. med. Dr. h.c. A. Heidenreich

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die Arbeit in der Zellkultur wurde von mir nach Einarbeitung durch Frau Köditz durchgeführt. Den siRNA-Knockdown und den EMSA führte ich in Zusammenarbeit mit Frau Dr. von Brandenstein durch. Die anderen dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch Frau Köditz und Frau Dr. von Brandenstein von mir selbst ausgeführt worden.

Die statistische Auswertung der Ergebnisse mittels GraphPad Prism 9 wurde von mir mit Unterstützung durch Frau Dr. von Brandenstein durchgeführt.

Das Manuskript für die Veröffentlichung habe ich verfasst und mit Hilfe von Frau Dr. von Brandenstein und Herrn Professor Heidenreich eingereicht.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 09.01.2025

Unterschrift:

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen danken, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben.

Mein besonderer Dank geht an meine Doktormutter Frau Dr. Melanie von Brandenstein, ohne die die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Ich möchte mich für die enorme Unterstützung und hervorragende Betreuung während des gesamten Prozesses bedanken. Auch für das Korrekturlesen und die hilfreichen Anmerkungen möchte ich meinen Dank aussprechen. Außerdem danke ich unserem Klinikdirektor, Herrn Professor Heidenreich, für seine konstruktiven Vorschläge und Anregungen zum Projekt und für die Unterstützung bei der Veröffentlichung des Manuskripts.

Nicht zuletzt möchte ich der gesamten Arbeitsgruppe und insbesondere Barbara Köditz, Jasmin Behring und Ersen Kameri für die tatkräftige Unterstützung und praktische Anleitung und Hilfe im Labor meinen Dank ausdrücken.

Ein großer Dank gilt auch meinem Vater, meinem Freund Julian und meinen Freundinnen Maike und Caro für ihre Geduld und Ermutigungen während der Arbeit an dieser Dissertation. Für die finanzielle Förderung durch das Köln Fortune Programm möchte ich mich ebenfalls ausdrücklich bedanken.

Für die Zusammenarbeit bei der Veröffentlichung des Manuskripts danke ich zusätzlich allen Beteiligten.

Für meine Eltern.

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	9
1. ZUSAMMENFASSUNG	12
2. EINLEITUNG	14
2.1. Die Prostata	14
2.2. Prostatakarzinom	14
2.2.1. Epidemiologie	14
2.2.2. Ätiologie	15
2.2.3. Diagnostik	15
2.2.3.1. Früherkennung: PSA & DRU	16
2.2.3.2. Prostatastanzbiopsie	17
2.2.4. Staging und Grading	18
2.2.4.1. Staging anhand von TNM- und UICC-Stadien	18
2.2.4.2. Staginguntersuchungen	19
2.2.4.3. Grading mittels Gleason-Score	20
2.2.5. Therapie	20
2.2.5.1. Kurative Therapieoptionen	21
2.2.5.2. Palliative Therapieoptionen	21
2.2.6. Problematik der Diagnostik und Prognoseparameter	22
2.3. Vimentin	23
2.3.1. VIM3	24
2.4. Endothelin-1	25
2.5. Withaferin A	26
2.6. TP53	27
2.7. ATG7	28
2.8. MicroRNA-371a-3p	28
2.9. Die Rolle des Androgenrezeptors beim Prostatakarzinom	29
2.10. Fragestellung und Ziel der Arbeit	31

3.	MATERIAL UND METHODEN	33
3.1.	Material	33
3.1.1.	Zellkultur	33
3.1.1.1.	Zelllinien	33
3.1.1.2.	Chemikalien und Lösungen für die Zellkultur	33
3.1.2.	Geräte	34
3.1.3.	Verbrauchsmaterialien	35
3.1.4.	Chemikalien und Lösungen	35
3.1.5.	Puffer und Lösungen	37
3.1.6.	Kits	38
3.1.7.	PCR	38
3.1.8.	Primer	39
3.1.9.	siRNA	39
3.1.10.	EMSA-Oligonukleotide	39
3.1.11.	Antikörper	40
3.1.11.1.	Primärantikörper	40
3.1.11.2.	Sekundärantikörper	41
3.1.12.	Molekulargewichtsmarker für DNA und Proteine	41
3.2.	Methoden	42
3.2.1.	Zellkultur	42
3.2.1.1.	Kulturbedingungen	42
3.2.1.2.	Zählen der Zellen	42
3.2.1.3.	Passagieren der Zellen	42
3.2.1.4.	Zellstimulation und VIM3-Knockdown	43
3.2.2.	Protein-basierte Methoden	44
3.2.2.1.	Totale Proteinextraktion	44
3.2.2.2.	Nukleäre Proteinextraktion	44
3.2.2.3.	Bradford-Test	45
3.2.2.4.	Immunfluoreszenzfärbung	45
3.2.2.5.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	46
3.2.2.6.	Western Blot	46
3.2.2.7.	Immunpräzipitation	47
3.2.3.	Nukleinsäure-basierte Methoden	47
3.2.3.1.	Polyacrylamid-Gel	47
3.2.3.2.	DNA-Isolation und VIM3-Pulldown – Interaktion mit der MicroRNA-371a-3p	48
3.2.3.3.	MicroRNA-Isolation	49
3.2.3.4.	cDNA-Synthese	49
3.2.3.5.	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR): Zielgenanalyse MicroRNA-371a-3p	49

3.2.4.	Elektrophoretischer Mobilitäts-Shift-Assay (EMSA)	50
3.2.5.	Kratz-Assay / Zellmigrations-Assay	51
3.2.6.	Agarose-Drop	52
3.2.7.	Statistik	53
4.	ERGEBNISSE	54
4.1.	Präsenz von VIM3, ATG7 und TP53 in den Prostatakarzinomzellen	54
4.2.	Komplexbildung von VIM3, ATG7 und TP53	55
4.3.	Einfluss der Stimulation mit ET-1 und WA auf die Expression der Komplexpartner	56
4.4.	Einfluss der Stimulation mit ET-1 und WA auf das Migrations- und Proliferationsverhalten der Zellen	60
4.5.	Mögliche Interaktion von VIM3 und der MicroRNA-371a-3p	63
4.5.1.	Darstellung einer Interaktion zwischen VIM3 und der MicroRNA-371a-3p	63
4.5.2.	Elektrophoretischer Mobilitäts-Shift-Assay (EMSA)	63
4.6.	Auswirkung der MicroRNA-371a-3p auf das Migrations- und Proliferationsverhalten der Zellen	64
4.7.	VIM3-Knockdown mittels siRNA gegen VIM3	65
4.7.1.	Migrations- und Proliferationsverhalten der Zellen nach VIM3-Knockdown	65
4.7.2.	MicroRNA-371a-3p-Expression nach VIM3-Knockdown	70
4.8.	Zusammenfassung der Ergebnisse	71
5.	DISKUSSION	72
5.1.	Existenz der Komplexpartner in den Prostatakarzinomzellen	72
5.2.	Translokation von ATG7, TP53 und VIM3 in den Zellkern	73
5.3.	Komplexformation von ATG7, TP53 und VIM3	74
5.4.	Stimulation mit ET-1 und WA	75
5.4.1.	Einfluss von ET-1 auf die Komplexpartner VIM3, ATG7 und TP53 sowie auf VIM-FL	75
5.4.2.	Verhalten der Proteine nach Stimulation mit WA - WA als möglicher therapeutischer Ansatzpunkt	78

5.5.	VIM3 als potenzieller Teil eines Transkriptionsfaktorkomplexes für die MicroRNA-371a-3p	81
5.6.	Migrationsverhalten der Zellen nach Stimulation mit der MicroRNA-371a-3p	82
5.7.	VIM3-Knockdown resultiert in reduzierter Migration der Prostatakarzinomzellen	83
5.8.	Auswirkungen des VIM3-Knockdowns auf die Prostatakarzinomzellen und die Expression der MicroRNA-371a-3p – Möglicher Mechanismus zur Hochregulation des Tumorsuppressorgens PTEN	85
5.9.	VIM3-Knockdown führt zur Hochregulation des Androgenrezeptors	86
5.10.	Zusammenfassung: Komplex als zukünftiger Malignitätsmarker	88
5.11.	Limitationen und Ausblick	89
6.	LITERATURVERZEICHNIS	91
7.	ANHANG	107
7.1.	Abbildungsverzeichnis	107
7.2.	Tabellenverzeichnis	108
7.3.	Ergänzendes Material	108
7.3.1.	Vimentin 3 Aminosäuresequenz (Homo sapiens)	108
7.3.2.	Nukleotide der GKH Aminosäuresequenz	109
8.	VORABVERÖFFENTLICHUNGEN VON ERGEBNISSEN	110

Abkürzungsverzeichnis

ADT	Androgendeprivationstherapie
Ago2	Protein Agronaut-2
APS	Ammoniumpersulfat
AR	Androgenrezeptor
ATCC	American Type Culture Collection
ATG7	Autophagy related 7
ATP	Adenosintriphosphat
BPH	Benigne Prostatahyperplasie
BSA	Bovines Serumalbumin
bp	Basenpaare
cm	Zentimeter
cDNA	Komplementäre DNA
CRPC	Kastrationsresistentes Prostatakarzinom
CT	Computertomographie
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
ddPCR	Droplet digital PCR
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dr.	Doktor
DRU	Digital-rektale Untersuchung
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
EAU	European Association of Urology
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EMSA	Elektrophoretischer Mobilitäts-Shift-Assay
EMT	Epitheliale mesenchymale Transdifferenzierung
ET-1	Endothelin-1
et al.	Et alii / et aliae / und andere
ETAR	Endothelin A Rezeptor
ETBR	Endothelin B Rezeptor
FBS	Fetales bovines Serum
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat

FOXC2	Forkhead Box C2 Protein
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GCT	Germinalzelltumor
HCl	Salzsäure
HRP	Meerrettichperoxidase
IgG	Immunglobulin G
kDa	Kilo Dalton
IFN	Interferon
IL	Interleukin
I κ B- α	NF-kappa-B Inhibitor alpha
l	Liter
M	Metastase
mA	Milliampere
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mRNA	Messenger RNA
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
N	Nodus
NaCl	Natriumchlorid
NF κ B	Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of activated B-Cells
ng	Nanogramm
OAT	Oligoasthenoteratozoospermiesyndrom
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDK1	Phosphoinositid-abhängige Kinase-1
PET	Positronen-Emissions-Tomografie
PIP2	Phosphatidylinositol-(4,5)-Bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-(3,4,5)-Triphosphat
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKC α	Proteinkinase C alpha
pN-Stadium	Beteiligung regionärer Lymphknoten
pri-MicroRNA	Primary MicroRNA
PSA	Prostata-spezifisches Antigen

PSMA	Prostata-spezifisches Membranantigen
pT-Stadium	Ausdehnung des Tumors
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog
qRT-PCR	Quantitative Echtzeit-PCR
RIPA	Radioimmunoprecipitation Assay
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
R-Status	Tumorbefall des Präparatstrands
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	Small interfering RNA
Src	Tyrosinkinase Src
T	Tumor
TBE	Tris-Borat EDTA
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TBST	Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit 0,05 % Tween 20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGF	Transforming Growth Factor
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TP53	Tumor Protein 53
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Units
UICC	Union International Contre Le Cancer
USA	United States of America
UTR	Untranslatierter Bereich
V	Volt
V/v	Volumenprozent
VIM3	Trunkierte Variante des Vimentins
VIM-FL	Volllängen Variante des Vimentins
w/v	Weight per Volume
WA	Withaferin A
μ	Mikro (10 ⁻⁶)

1. Zusammenfassung

Das Prostatakarzinom ist der häufigste diagnostizierte bösartige Tumor in mehr als der Hälfte aller Länder in der Welt. Auch in Deutschland ist es mit etwa einem Viertel aller Krebserkrankungen von Männern das häufigste Karzinom. Trotz signifikanten Fortschritten in der Detektion, neuen molekularen Ansatzpunkten und verbesserten Therapiemöglichkeiten bleibt das Prostatakarzinom die dritthäufigste Entität unter den Krebstodesursachen beim Mann. Allerdings konnte in den westlichen Ländern in den letzten Jahren ein Rückgang der Mortalität festgestellt werden. Die Kombination aus steigenden Fallzahlen, als Resultat einer größer werdenden Bevölkerung, und sinkender Mortalität verdeutlicht die Bedeutung des Prostatakarzinoms als gesellschaftliches und gesundheitliches Problem.

Die Früherkennung des Prostatakarzinoms wird bei Männern ab 45 Jahren durchgeführt und besteht aus der Bestimmung des prostataspezifischen Antigen-Werts (PSA-Wert) und gegebenenfalls einer digital-rektalen Untersuchung (DRU). Bei auffälligem Befund wird eine Stanzbiopsie in Kombination mit einer multiparametrischen Magnetresonanztomographie durchgeführt.

Da es sich bei dem Prostatakarzinom um eine äußerst heterogene Tumorentität mit sehr unterschiedlichen Verläufen handelt, reicht das Therapiespektrum von überwachenden Strategien bis zur radikalen Prostatektomie oder perkutanen Strahlentherapie. Um dem Patienten mögliche Nebenwirkungen der jeweiligen Therapie zu ersparen, ist es deshalb von hoher Bedeutung, das Prostatakarzinom möglichst genau zu differenzieren. Aktuell dienen der PSA-Wert, das klinische Stadium, der Gleason-Grad und die Tumorausdehnung in der Stanzbiopsie als präoperative Prognoseparameter. Postoperativ kommt noch das pT-Stadium (Tumorausdehnung) und das pN-Stadium (Lymphknotenbefall) sowie der R-Status (Tumorbefall des Präparatstrands) des Prostatektomiepräparats und der Gleason-Grad des Präparats hinzu. Auch wenn diese Parameter eine signifikante Assoziation zur Patientenprognose aufweisen, so unterliegen sie dennoch einigen Nachteilen.

Die veränderte Proteinexpression und Genetik des einzelnen Prostatakarzinoms finden bisher keine Berücksichtigung bei der Entscheidung nach der richtigen Therapie und der Differenzierung des Prostatakarzinoms. Es besteht die Notwendigkeit zur Identifikation neuer molekularer Marker, um eine bessere Differenzierung, Therapieplanung und Prognosevorhersage zu ermöglichen.

In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass VIM3, die am C-Terminus gespleißte Variante des Vimentins (VIM-FL), ein potenzieller neuer Marker für die Beurteilung von Prostatakarzinomen sein kann und einen Einfluss auf das Migrations- und Proliferationsverhalten von Karzinomzellen hat. Außerdem ist bekannt, dass Vimentin eine Bindungsstelle für das bekannte Tumorsuppressorgen TP53 aufweist und zudem eine Interaktion zwischen TP53 und dem Autophagiegen ATG7 besteht.

In der vorliegenden Arbeit wurde basierend auf bereits bekannten Informationen untersucht, ob VIM3, ATG7 und TP53 einen Komplex in Prostatakarzinomzellen bilden, als dieser im Zellkern vorliegen und dort verschiedene Gene beeinflussen können. Hierbei wurde die MicroRNA-371a-3p als mögliches Ziel des Komplexes untersucht. Die MicroRNA-371a-3p ist aktuell bereits ein anerkannter Marker zur Beurteilung von Germinalzelltumoren und kürzlich konnte auch gezeigt werden, dass eine erhöhte Expression der MicroRNA-371a-3p in aggressiven Prostatakarzinomen nachweisbar ist. Die MicroRNA-371a-3p führt zu einer verringerten Expression des Tumorsuppressorgens PTEN und es wird vermutet, dass eine höhere Expression der MicroRNA-371a-3p mit einer Herunterregulation der Androgenrezeptordichte korreliert.

In der vorliegenden Arbeit konnte zunächst mit Hilfe von Immunfluoreszenz und Immunpräzipitation gezeigt werden, dass VIM3, ATG7 und TP53 einen Komplex bilden, welcher im Zellkern vorliegt. Außerdem wurde mittels Western Blot bestätigt, dass die Komplexpartner in den Prostatakarzinomzellen signifikant überexprimiert sind. Zudem wurden die Effekte von Endothelin-1 (ET-1) und Withaferin A (WA) auf die Prostatakarzinomzellen untersucht. Die Stimulation mit ET-1 führte zu einer schnelleren Migration der Prostatakarzinomzellen, wohingegen die Stimulation mit WA einen verlangsamenden Effekt auf die Zellen ausübte. Mit Hilfe eines elektrophoretischen Mobilitäts-Shift-Assays (EMSAs) wurde bestätigt, dass der Komplex an die Promoterregion der pri-MicroRNA-371a-3p bindet und somit einen wichtigen Transkriptionsfaktor für die MicroRNA-371a-3p darstellen könnte. Zudem wurde gezeigt, dass ein Knockdown von VIM3 zu einer Reduktion der MicroRNA-371a-3p-Expression und einer verringerten Migration der Prostatakarzinomzellen führt.

Da bekannt ist, dass die MicroRNA-371a-3p mit ihrem direkten Effekt auf das Tumorsuppressorgen PTEN und die Expression des Androgenrezeptors den Krankheitsverlauf beeinflussen kann, stellt der hier präsentierte VIM3-Knockdown mit resultierender MicroRNA-371a-3p Reduktion und Wiederherstellung von PTEN und der Androgenrezeptor-Reexpression einen neuen möglichen therapeutischen Ansatzpunkt dar.

In Zukunft sollte das Vorhandensein des Komplexes in Patientengewebe untersucht werden, um zu evaluieren, ob eine Überexpression des Komplexes mit der Aggressivität des Karzinoms korreliert und inwieweit die Analyse des Komplexes zur besseren Differenzierung des Prostatakarzinoms und ein Knockdown von VIM3 als möglicher therapeutischer Ansatzpunkt genutzt werden kann.

2. Einleitung

2.1. Die Prostata

Die Prostata zählt zusammen mit den *Glandulae Vesiculosae* (Bläschendrüsen) und den *Glandulae Bulbourethrales* (Cowper-Drüsen) zu den akzessorischen Genitaldrüsen des Mannes¹.

Die Prostata befindet sich am Blasenausgang und umschließt die *Urethra*². Nach dorsal grenzt sie an die Vorderwand des Rektums und wird von diesem durch eine bindegewebige Faszia getrennt¹. Sie besteht aus 30 bis 50 tubuloalveolären Drüsen, welche über ungefähr 20 Ausführungsgänge in die *Pars prostatica* der *Urethra* münden¹. Ihre Funktion besteht in der Sekretproduktion, wobei das Prostatasekret circa 30 Prozent des Ejakulationsvolumens ausmacht^{1,2}. Es enthält essenzielle Stoffe für die Beweglichkeit der Spermien. Das Sekret ist leicht sauer mit einem pH-Wert von 6,4¹. Es ist farblos und dünnflüssig. Im Sekret enthalten ist zudem das prostataspezifische Antigen (PSA), welches beim Prostatakarzinom in erhöhter Konzentration im Blut zu finden ist^{1,3}.

Klinisch-histologisch unterteilt man die Prostata in 5 Zonen. Die periurethrale Zone legt sich manschettenförmig um das proximale Urethrasegment. Auf beiden Seiten angrenzend befindet sich die Transitionszone, welche nur 5 Prozent des Prostatagewebes ausmacht^{1,2}. Die zentrale Zone nimmt 25 Prozent des Prostatagewebes ein und befindet sich hinter der Transitionszone⁴. Durch sie zieht der *Ductus ejaculatorii* und der *Utriculus*⁵. Die periphere Zone befindet sich hinten, seitlich und kaudal und macht mit 70 Prozent den größten Anteil des Prostatagewebes aus. Ventral findet sich eine drüsenfreie Zone, die anteriore Zone^{1,6}.

2.2. Prostatakarzinom

2.2.1. Epidemiologie

Das Prostatakarzinom ist in mehr als der Hälfte aller Länder in der Welt der häufigste diagnostizierte bösartige Tumor⁷. Auch in Deutschland ist es der häufigste bösartige Tumor und stellt unter den karzinombedingten Todesursachen beim Mann die dritthäufigste Tumorentität dar⁸. Laut Robert Koch-Institut sind im Jahr 2020 circa 65 000 Männer neu an einem Prostatakarzinom erkrankt. Dies entspricht einer altersstandardisierten Inzidenz von 97,4 pro 100 000 Einwohner⁹. Weltweit zeigt sich eine unterschiedliche altersstandardisierte Inzidenz des Prostatakarzinoms, wobei sich die höchste Inzidenz in den USA und dort vor allem bei afro-amerikanischen Männern findet^{7,10}.

Allgemein steigt die Inzidenz mit zunehmendem Alter stark an. Das mittlere Erkrankungsalter liegt aktuell bei 71 Jahren⁹. In einer amerikanischen Studie aus dem Jahr 2022 wurde gezeigt, dass die Wahrscheinlichkeit an einem Prostatakarzinom zu erkranken von 1,8 Prozent bei Männern zwischen 60 und 69 Jahren auf 9 Prozent bei Männern über 70 Jahren ansteigt¹¹.

Zudem korreliert die Inzidenz mit dem sozioökonomischen Status eines Landes. Die Wahrscheinlichkeit an Prostatakrebs zu erkranken ist in Ländern mit einem niedrigen bis mittleren sozioökonomischen Status signifikant niedriger als in hoch entwickelten Ländern¹².

Man schätzt, dass bis zum Jahr 2050 der Anteil der über 60-Jährigen in der Bevölkerung auf circa 28 Millionen Männer ansteigen wird und somit doppelt so hoch sein wird wie heute⁸. Auf Basis dieser demographischen Entwicklung ist zu erwarten, dass die Inzidenz und die Prävalenz des Prostatakarzinoms in den nächsten Jahren weiter zunehmen werden⁸.

Dagegen hat die altersstandardisierte Sterberate bis zum Jahr 2007 kontinuierlich abgenommen und verläuft seitdem nahezu stabil⁹. Die genauen Gründe dafür sind unklar. Allerdings ist es wahrscheinlich, dass die verbesserten Früherkennungsmethoden und die damit einhergehende frühere Behandlung einen der Hauptgründe für diese Entwicklung darstellen¹³.

Die Kombination aus steigender Inzidenz und sinkender Mortalität macht das Prostatakarzinom zu einem bedeutenden gesundheitlichen Problem¹⁴.

2.2.2. Ätiologie

Die genauen Ursachen für die Entstehung von Prostatakarzinomen sind unbekannt¹⁵. Als gesicherte Faktoren, die die Entstehung von Prostatakarzinomen beeinflussen, gelten das Alter und die Genetik¹⁵.

Wie bereits zuvor erwähnt, steigt das Risiko an Prostatakrebs zu erkranken mit zunehmendem Alter stark an. Das mittlere Erkrankungsalter liegt aktuell bei 71 Jahren⁹. Die Wahrscheinlichkeit vor dem 44. Lebensjahr zu erkranken liegt bei nahezu 0 Prozent¹⁵.

Im Hinblick auf genetische Faktoren konnte man feststellen, dass Männer deren Brüder und/oder Väter an einem Prostatakarzinom erkrankt sind ein zweifach höheres Risiko dafür aufweisen, im Laufe ihres Lebens auch ein Prostatakarzinom zu entwickeln¹⁶.

Zudem gibt es weitere Risikofaktoren, welche allerdings von der Leitliniengruppe als nicht überzeugend genug angesehen wurden, um daraus eine Empfehlung ableiten zu können⁸.

Dazu zählen zum Beispiel sozioökonomische und ernährungsbedingte Faktoren⁸.

Global betrachtet nimmt die Inzidenz von Ost nach West zu und innerhalb Europas beobachtet man zusätzlich ein Nord-Süd-Gefälle zugunsten südeuropäischer Länder¹⁰. Metaanalysen über Kohorten- und Fall-Kontrollstudien konnten außerdem zeigen, dass Phytoöstrogene (insbesondere Soja) und eine lycopenenreichen Kost (vor allem in Tomaten enthalten) eine protektive Wirkung haben^{17,18}. Weitere Studien zeigten ein erhöhtes Risiko für das Auftreten des Prostatakarzinoms im Zusammenhang mit Retinoiden, Fetten und Vitamin C¹⁹.

2.2.3. Diagnostik

Die Diagnostik und Früherkennung von Prostatakarzinomen gestalteten sich in der Vergangenheit zunächst schwierig, da die meisten Karzinome in der peripheren Zone der Prostata wachsen und dabei meist keine Symptome verursachen⁴. Sind bei Diagnosestellung bereits

Symptome vorhanden, so weist dies auf ein fortgeschrittenes Tumorstadium mit schlechter Prognose hin²⁰. Zu den Symptomen zählen unter anderem Knochen- oder Beckenschmerzen, Miktionsbeschwerden und Impotenz²¹. Von den symptomatischen Patienten sind 30 Prozent bereits metastasiert und das mittlere Überleben beträgt dann weniger als drei Jahre²².

In den 1980er Jahren wurde ein Serumtest zur Bestimmung des prostataspezifischen Antigens (PSA) eingeführt, welcher entscheidend zur frühen Diagnosestellung beigetragen hat²³. Der PSA-Wert allein zeigt allerdings nur limitierte Effektivität zur Diagnostik, da er zum Beispiel durch Medikamente, Inflammation oder auch bei benigner Prostatahyperplasie (BPH) ansteigen kann²⁴.

Deshalb besteht die Diagnostik heutzutage neben einer ausführlichen Anamnese aus einer Kombination von digital-rektaler Untersuchung (DRU) und PSA-Serumtest. Bei auffälligen Voruntersuchungen folgt eine Prostatastanzbiopsie mit multiparametrischer Magnetresonanztomographie²³.

2.2.3.1. Früherkennung: PSA & DRU

Ab dem 45. Lebensjahr und einer Mindestlebenserwartung von 10 Jahren empfiehlt die S3-Leitlinie eine Vorsorgeuntersuchung zur Früherkennung des Prostatakarzinoms. Hierbei soll nach einer ausführlichen Aufklärung die Bestimmung des PSA-Werts angeboten werden und zusätzlich kann eine DRU durchgeführt werden⁸.

Das prostataspezifische Antigen wurde 1979 als Serummarker für das Prostatakarzinom entdeckt und ist heute der häufigste verwendete Marker für das Prostatakarzinomscreening²⁵.

Es handelt sich beim prostataspezifischen Antigen um ein Glykoprotein, welches ausschließlich im Prostatagewebe gebildet wird. Seine Aufgabe ist die Verflüssigung des Ejakulates²⁶.

Im klinischen Alltag wurde ein Schwellenwert von 4 ng/ml festgelegt. Unter 4 ng/ml gilt das Risiko für das Vorliegen eines Prostatakarzinoms als „niedrig“. PSA-Werte zwischen 4 ng/ml und 10 ng/ml werden als „mäßig“ und Werte über 10 ng/ml als „hoch“ bezüglich des Risikos für ein Prostatakarzinom eingestuft²⁷. Liegt der PSA-Wert oberhalb von 4 ng/ml, so besteht die Indikation zu einer Prostatastanzbiopsie²⁸.

Studien konnten allerdings zeigen, dass bei einem Schwellenwert von 4 ng/ml eine Sensitivität von 72 Prozent, eine Spezifität von 93 Prozent und ein positiver prädiktiver Wert von 25 Prozent vorliegen. Dementsprechend schließt ein Wert unter 4 ng/ml ein Prostatakarzinom nicht zwingend aus²⁹.

Bei Werten unter 10 ng/ml kommt es zudem zu einer Überschneidung von Patienten mit benigner Prostatahyperplasie (BPH) und denen mit Prostatakarzinom. So lässt sich bei Patienten mit BPH in bis zu 47 Prozent der Fälle ein PSA-Wert über 4 ng/ml detektieren²⁹. Man geht davon aus, dass bei drei Viertel der Patienten, die aufgrund eines erhöhten PSA-Werts eine Indikation zur Stanzbiopsie aufweisen, keine maligne Erkrankung vorliegt²⁹. Auch wenn der PSA-Wert also spezifisch für die Prostata ist, so wird er trotzdem durch andere Faktoren

wie Medikamente, Inflammation oder BPH beeinflusst und kann sein volles diagnostisches Potenzial somit nur in Kombination mit anderen Untersuchungen zeigen²³.

Die Frequenz der Vorsorgeuntersuchungen richtet sich nach dem PSA-Wert⁸. Liegt der PSA-Wert unter 2 ng/ml, so sollte die Vorsorge in einem Intervall von 2 Jahren erfolgen. Bei einem Wert, der kleiner als 1 ng/ml ist, sollte der Wert in 4 Jahren erneut kontrolliert werden. Bei Werten über 2 ng/ml sollte ein Untersuchungsintervall von einem Jahr oder individuell auch noch kürzer eingehalten werden^{8,30}.

Ergänzend zur Bestimmung des PSA-Werts kann eine DRU durchgeführt werden⁸. Mit der DRU lassen sich Form, Lage und Konsistenz der Prostata beurteilen⁸. Allerdings ist diese Untersuchung stark von der Erfahrung des Untersuchers abhängig und weist somit eine sehr hohe Subjektivität auf. Dies erklärt auch die sehr weit auseinanderweichenden Werte, die in der Literatur für die Sensitivität und Spezifität angegeben werden³¹. Trotzdem lassen sich durch diese Untersuchung circa ein Viertel der Karzinome, ohne PSA-Erhöhung, detektieren³¹. Als ergänzende bildgebende Diagnostik kann zudem eine transrektale Ultraschalluntersuchung eingesetzt werden⁸. Mit der transrektalen Ultraschalluntersuchung kann das Volumen der Prostata bestimmt werden. Dies ist wiederum hilfreich zur Bewertung des PSA-Werts^{8,32}. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass insbesondere die Kombination von DRU und Bestimmung des PSA-Werts gut geeignet ist, um das Risiko an Prostatakrebs erkrankt zu sein, zu bestimmen³³.

2.2.3.2. Prostatastanzbiopsie

Bei suspektem Tastbefund in der DRU, einem auffälligen PSA-Anstieg oder einem PSA-Wert über 4 ng/ml besteht die Indikation zur Stanzbiopsie³⁴. Sie gilt als Goldstandard für die Diagnosesicherung des Prostatakarzinoms⁸.

Die Durchführung erfolgt unter transrektal-sonographischer Kontrolle. Die Orte der Probenentnahmen orientieren sich an den bereits bekannten häufigsten Tumorregionen. Heutzutage ist die systematische Mehrfachbiopsie mit 10 bis 12 Biopsien das Standardverfahren⁸. Außerdem wird im Vorhinein eine multiparametrische Magnetresonanztomographie durchgeführt. Die dabei auffallenden karzinomsuspekten Areale sollen zusätzlich zur systematischen Mehrfachbiopsie gezielt biopsiert werden^{8,35}.

Auch wenn die Prostatastanzbiopsie im Allgemeinen als eine sehr sichere Untersuchung betrachtet wird, besteht immer das Risiko einer bakteriellen Infektion. Um dieses möglichst gering zu halten, wird die Stanzbiopsie nach prophylaktischer Antibiotikagabe durchgeführt³⁶.

2.2.4. Staging und Grading

Im Fall eines bioptisch gesicherten Prostatakarzinoms, erfolgt als nächster Schritt das Staging und das Grading.

Bei dem Staging wird der Befund mittels verschiedener Klassifikationssysteme in Stadien eingeteilt. Darauf basiert im weiteren Verlauf die Entscheidung, welche zusätzlichen Staginguntersuchungen durchgeführt werden sollen und wie das Prostatakarzinom therapiert werden soll³⁷.

Mit Hilfe des Gratings wird die Aggressivität des Tumors beschrieben. Dies ist wichtig, um Aussagen über die Prognose sowie zur Therapiewahl zu machen³⁸.

2.2.4.1. Staging anhand von TNM- und UICC-Stadien

Das Adenokarzinom der Prostata wird mit der sogenannten TNM-Klassifikation eingeteilt. Die Klassifikation erfolgt anhand der Größe und Ausdehnung des Tumors (T), der Beteiligung regionärer Lymphknoten (N) und dem Vorhandensein von Fernmetastasen (M). Die Zahlen hinter den Buchstaben geben jeweils Auskunft über die Ausdehnung des Tumors (T1 bis T4), die Anzahl und Lage der befallenen Lymphknoten (N0 und N1) und das Vorhandensein oder Fehlen von Fernmetastasen (M0 und M1)^{39,40}.

T: Tumorausdehnung

T1	Tumor ist weder tastbar noch per bildgebendem Verfahren sichtbar
	T1a: Tumor in weniger als 5 Prozent des Biopsiegewebes T1b: Tumor in mehr als 5 Prozent des Biopsiegewebes T1c: Tumor wurde nach erhöhtem PSA-Wert durch eine Stanzbiopsie diagnostiziert
T2	Tumor begrenzt auf Prostatakapsel (lokal begrenztes Karzinom)
	T2a: Tumor in weniger als 50 Prozent eines Seitenlappens T2b: Tumor in mehr als 50 Prozent eines Seitenlappens T2c: Tumor in beiden Seitenlappen
T3	Tumor wächst über Prostatakapsel hinaus (lokal fortgeschrittenes Karzinom)
	T3a: Tumorausbreitung ein- oder beidseitig über Prostatakapsel hinaus, Samenblasen tumorfrei T3b: Tumorausbreitung ein- oder beidseitig über Prostatakapsel hinaus und in Samenblasen
T4	Tumorausbreitung in Nachbarstrukturen oder nicht verschiebbar (fixiert)

Tabelle 1: Stadieneinteilung des primären Prostatakarzinoms (EAU Guidelines⁴⁰)

N: Lymphknoten

N0	Keine Metastasen in benachbarten (regionären) Lymphknoten (Beckenlymphknoten)
N1	Metastasen in benachbarten Lymphknoten

Tabelle 2: Stadieneinteilung von Lymphknotenmetastasen beim Prostatakarzinom (EAU Guidelines⁴⁰)

M: Metastasen

M0	Keine Fernmetastasen nachweisbar
M1	Fernmetastasen vorhanden
	M1a: Metastasen in nicht benachbarten Lymphknoten
	M1b: Knochenmetastasen
	M1c: Metastasen in anderen Organen und/oder Strukturen

Tabelle 3: Stadieneinteilung von Fernmetastasen beim Prostatakarzinom (EAU Guidelines⁴⁰)

Bei den Stadien T1 bis T2 N0 M0 spricht man von einem lokal begrenzten Prostatakarzinom⁴⁰. Lokal begrenzte Prostatakarzinome werden nach den D'Amico-Kriterien noch weiter unterteilt in Niedrig-Risiko-Tumore (Gleason-Score ≤ 6 , PSA maximal 10 ng/ml, klinisch maximal cT2a), Mittel-Risiko-Tumore (Gleason-Score 7a oder 7b, PSA 10 ng/ml bis 20 ng/ml, klinisch maximal cT2b) und Hoch-Risiko-Tumore (Gleason-Score 8 bis 10, PSA > 20 ng/ml, klinisch mindestens cT2c)⁴¹. Die Erklärung der Zusammensetzung des Gleason-Scores folgt in Abschnitt 2.2.4.3. Die Stadien T3 bis T4 N0 M0 beschreiben ein bereits lokal fortgeschrittenes Prostatakarzinom und Karzinome mit regionärem Lymphknotenbefall (N1) oder Fernmetastasierung (M1) sind laut Definition fortgeschrittene bzw. metastasierte Prostatakarzinome⁴¹.

Neben der TNM-Klassifikation, erfolgt zusätzlich eine Einteilung nach UICC (*Union internationale contre le cancer*). Diese Klassifikation fasst die TNM-Einstufungen in insgesamt 4 Stadien zusammen:

Stadium I	T1 bis T2a N0 M0
Stadium II	T2b bis T2c N0 M0
Stadium III	T3 N0 M0
Stadium IV	T4 N0 M0 oder T1 bis T4 N1 M0 oder T1 bis T4 N0 bis N1 M1

Tabelle 4: Stadieneinteilung nach UICC (EAU Guidelines⁴⁰)

2.2.4.2. Staginguntersuchungen

Für die Staginguntersuchungen stehen die Magnetresonanztomographie, eine Computertomographie, das PSMA-PET sowie eine Knochenszintigraphie zur Verfügung. Die durchzuführenden Untersuchungen orientieren sich dabei an der zuvor bestimmten Klassifikation des Tumors⁸. So sollen beispielsweise Patienten mit Tumorkategorie cT1 und Niedrig-Risiko-Tumoren keinen weiteren bildgebenden Untersuchungen unterzogen werden⁸. Patienten mit einem Gleason-Score ≥ 8 oder einem cT3/4 Tumor sollten eine Magnetresonanztomographie oder eine Computertomographie der Beckenorgane erhalten⁴². Patienten mit einem histologisch gesicherten Prostatakarzinom und einem PSA-Wert > 10 ng/ml, einem Gleason-Score ≥ 8 , einer T-Kategorie cT3/4 oder Knochenschmerzen sollten zudem eine Knochenszintigraphie erhalten⁴². Bei Patienten mit einem Hoch-Risiko-Prostatakarzinom kann alternativ ein PSMA-PET/CT zur Ausbreitungsdiagnostik eingesetzt werden⁴³. Das PSMA-

PET/CT weist bei der Detektion von Metastasen eine höhere Genauigkeit auf als die Kombination aus Computertomographie und Knochenszintigraphie^{8,43}.

2.2.4.3. Grading mittels Gleason-Score

Das Grading, also die Beurteilung der Bösartigkeit des Tumors, erfolgt mit dem Gleason-Score⁴⁴.

Der Gleason-Score wurde ursprünglich von dem Pathologen Dr. Donald Gleason entwickelt⁴⁴. Er stellte fest, dass die Krebszellen und die Architektur der Prostata eine hohe Heterogenität im Hinblick auf die Morphologie aufweisen können. Basierend auf dieser Erkenntnis entwickelte er ein System, welches eine Beurteilung der Malignität des Prostatakarzinoms erlaubt⁴⁴. Im Laufe der Zeit wurde es weiter modifiziert und ist heute das am weitesten verbreitete System zur Klassifikation der Aggressivität von Prostatakarzinomen^{45,46}.

Der Gleason-Score setzt sich aus der Summe von zwei Punktwerten zwischen 1 und 5 zusammen⁴⁷. Je höher der Wert, desto undifferenzierter ist das Tumoreal und desto höher ist folglich die Wachstumsrate und die Tendenz zur Metastasierung^{45,46}. Bei der Stanzbiopsie setzt sich der Gleason-Score aus dem häufigsten Gleason-Grad und dem schlechtesten Gleason-Grad zusammen, wohingegen der Gleason-Score bei Prostatektomien und transurethralen Resektaten aus den beiden größten Arealen des Tumors gebildet wird⁴⁷. Der Gleason-Score stellt sich dann zum Beispiel so dar: $2 + 3 = 5$, wobei die erste Zahl dem größeren der beiden betrachteten Tumoreale entspricht. Folglich ist ein Score von $2 + 3 = 5$ besser als ein Gleason-Score von $3 + 2 = 5$ ⁴⁵. Der kombinierte Grad reicht demnach von 2 bis 10.

Gleason	Histologische Kriterien
1	Scharf begrenzter Knoten, Drüsen gleichförmig, dicht gepackt und mittelgroß
2	Nicht ganz scharf begrenzter Knoten, Drüsen lockerer und ungleichmäßiger
3	Unscharfer Knoten, Drüsen klein und ungleichmäßig, eventuell kleine solide Bezirke, Tumorzellinfiltrate in das Stroma und in nicht neoplastische Drüsen
4	Tumorbereich unscharf, Drüsen meist ohne Innenraum, verschmolzene Drüsen, solide Bezirke
5	Tumorbereich unscharf, keine klaren Drüsen, solide Bezirke, zentrale Drüsennekrosen, umgeben von papillären, kribriformen oder soliden Tumormassen

Tabelle 5: Aktuelle Gleason-Graduierung, modifiziert durch die International Society of Urological Pathology (ISUP) Konsensus Konferenz 2004 und 2014^{45,46}

2.2.5. Therapie

Nach der stanzbiopsisch gesicherten, histologischen Diagnose des Prostatakarzinoms stellt sich die Frage nach der richtigen Therapie. Aufgrund des teils sehr günstigen Verlaufs reicht das Therapiespektrum von überwachenden Strategien (*Active Surveillance* oder *watchful*

waiting) bis zur radikalen Prostatektomie oder perkutanen Strahlentherapie mit ihren jeweiligen möglichen Nebenwirkungen⁴⁸.

Aktuell orientiert sich die Wahl der richtigen Therapie an dem klinischen Stadium des Karzinoms, sowie an dem Alter, möglichen Komorbiditäten und dem Wunsch des Patienten⁸.

Im Allgemeinen unterscheidet man zwischen kurativen und palliativen Therapieoptionen.

2.2.5.1. Kurative Therapieoptionen

Bei Patienten mit einem lokal begrenzten Karzinom (T1 bis T2 N0 M0) und Niedrig-Risiko-Tumor (Gleason-Score ≤ 6 , PSA maximal 10 ng/ml, klinisch maximal cT2a) besteht die Wahl zwischen einer aktiven Überwachung (*Active Surveillance*), einer radikalen Prostatektomie (gegebenenfalls mit Lymphadenektomie), einer externen Bestrahlung oder einer LDR-Brachytherapie mit Implantation von ¹²⁵Iod-Seeds^{8,49}.

Bei Patienten mit einem mittleren oder hohem Risikoprofil sowie bei lokal fortgeschrittenen Prostatakarzinomen (T3 bis T4 N0 M0) wird eine radikale Prostatektomie (meist mit Lymphadenektomie) oder eine externe Bestrahlung in Kombination mit einer Hormontherapie oder einer HDR-Brachytherapie empfohlen^{8,50}.

Bei Lymphknotenbefall (N1) wird die operative Therapie oder die Strahlentherapie empfohlen. Systemisch kann eine hormonablativ Therapie durchgeführt werden^{8,51}.

2.2.5.2. Palliative Therapieoptionen

Bei der palliativen Therapie steht die Verbesserung der Lebensqualität sowie die Symptomkontrolle im Vordergrund. Zudem soll die Wachstumsgeschwindigkeit des Karzinoms reduziert werden⁸.

Wenn ein Patient mit einem nicht metastasierten Prostatakarzinom keine kurative Therapie wünscht oder sie aus anderen Gründen nicht in Frage kommt, so besteht die Therapiewahl zwischen dem sogenannten *watchful waiting* und einer Hormontherapie⁵². Im Rahmen des *watchful waiting* wird eine Therapie erst dann begonnen, wenn Symptome bereits aufgetreten sind⁸.

Weist ein Patient bereits Fernmetastasen auf, so ist die Therapie der Wahl bei Patienten in gutem Allgemeinzustand eine Kombination aus einer Androgendeprivationstherapie und einer Hormontherapie mit Apalutamid, Enzalutamid oder Abirateron (plus Prednisolon)⁵³⁻⁵⁵. Als Alternative zu den neuen Hormonsubstanzen soll eine Chemotherapie mit Docetaxel angeboten werden⁵⁶. Bei Patienten in gutem Allgemeinzustand, welche für eine Docetaxel Chemotherapie geeignet sind, kann die Chemotherapie beispielsweise auch mit einer Androgendeprivationstherapie sowie einer Hormontherapie mit Darolutamid kombiniert werden⁸. Patienten, welche nicht für eine solche Kombinationstherapie in Frage kommen, wird eine Androgenrezeptordeprivation empfohlen, welche medikamentös oder operativ durchgeführt werden kann^{8,57}. Patienten mit einem metastasierten, kastrationsresistenten oder

androgenunabhängigen Prostatakarzinom soll die Therapie mit Docetaxel, Enzalutamid oder Abirateron (plus Prednisolon) angeboten werden⁸. Nach Chemotherapie mit Docetaxel sowie Therapie mit Abirateron oder einem Androgenrezeptor-Inhibitor wie zum Beispiel Enzalutamid soll bei gutem Allgemeinzustand eine Therapie mit Cabazitaxel oder Lutetium Vipivotidtetra-xetan angeboten werden^{8,58,59}. Bei progredienter Erkrankung und reduziertem Allgemeinzustand soll die symptombezogene Therapie im Vordergrund stehen⁸.

2.2.6. Problematik der Diagnostik und Prognoseparameter

Als präoperative Prognoseparameter für das Prostatakarzinom stehen der PSA-Wert, das klinische Stadium, der Gleason-Grad und die Tumorausdehnung in den befallenen Prostatastanzylindern zur Verfügung⁶⁰. Postoperativ betrachtet man den Gleason-Grad am Prostektomie-Präparat, das pT- und das pN-Stadium sowie den R-Status⁶¹. Auch wenn diese Parameter alle eine statistisch signifikante Assoziation zur Patientenprognose ausweisen, so unterliegen sie dennoch substanziellen Nachteilen, vor allem im Hinblick auf die adäquate Differenzierung zwischen indolenten und aggressiven Tumoren^{62,63}.

Aktuell wird meist zunächst der PSA-Wert zum Screening eines Prostatakarzinoms eingesetzt¹³. Der PSA-Wert ist in vielerlei Hinsicht zur Beurteilung des Therapieerfolgs und der Verlaufskontrolle sowie zur Diagnostik hilfreich. Dennoch wird er durch viele verschiedene Faktoren beeinflusst, die eine hohe Rate an falsch-positiven Fällen zur Folge haben^{25,64,65}. Dies führt folglich zu einer hohen Rate an Über-Behandlung ohne jeglichen Überlebensvorteil⁶²⁻⁶⁴.

In den letzten Jahren konnte man einen Anstieg bei den Patienten beobachten, die unter einem lokal begrenzten Prostatakarzinom leiden und bei denen zunächst eine *Active Surveillance* durchgeführt wird⁶⁶. Allerdings ist die *Active Surveillance* assoziiert mit signifikant höheren Raten an Tumorprogression im Vergleich zu einer proaktiven Behandlung⁴⁹. Diese Beobachtung legt den Verdacht nahe, dass es einige Patienten gibt, die eine *Active Surveillance* erhalten, die aber eigentlich von radikaleren Therapiemöglichkeiten profitieren würden⁶⁷. Weitere Studien zeigten beispielsweise, dass bei Patienten, bei denen aufgrund der Tumoreigenschaften bzw. des Patientenwunsches zunächst eine *Active Surveillance* durchgeführt wird, in einem Drittel der Fälle nach 1 bis 3 Jahren trotzdem eine therapeutische Intervention notwendig ist^{66,68-70}.

Die enorme biologische Vielfalt des Prostatakarzinoms führt dazu, dass es Tumore gibt, welche über Jahre keine Progression zeigen und gleichzeitig gibt es Tumore, welche schnell lokal fortschreiten und ein großes Metastasierungspotenzial aufweisen^{71,72}. Dies verdeutlicht bereits die Bedeutung einer notwendigen verbesserten Differenzierung von Prostatakarzinomen, um jedem Patienten die exakt passende Therapie anzubieten und Überdiagnostik sowie Übertherapie zu vermeiden^{62,63,67}.

Betrachtet man den Gleason-Score als Prognoseparameter, so besteht ein großer Nachteil darin, dass die Unterscheidung der einzelnen Gleason-Score Kategorien einer hohen Interobserver-Varianz unterliegt⁷³. Vor allem die Unterscheidung zwischen Gleason-Stadium 3 und 4 zeigt eine hohe Interobserver-Variabilität. Dies ist besonders problematisch, da es große Unterschiede zwischen Gleason 3 + 4 und Gleason 4 + 3 Tumoren gibt, vor allem im Hinblick auf Prognose, Rezidivrate und die jeweils notwendige Therapie⁷⁴. Es ist daher notwendig, die Reproduzierbarkeit des Gleason-Scores mit neuen objektivierbaren Parametern zu verbessern⁷⁵.

Die veränderte Genetik und die damit einhergehend veränderte Proteinexpression, die zu allen Karzinomen dazugehört, findet bisher keinen ausreichenden Zugang in die Differenzierung des Prostatakarzinoms und die Entscheidung nach der richtigen Therapie.

Zudem wird für die Diagnostik des Tumors immer noch eine Biopsie als Goldstandard durchgeführt⁸. Eine Biopsie ist jedoch ein invasiver Eingriff, der mit Komplikationen wie Blutung, Infektionen oder Sepsis einhergehen kann⁷⁶.

Weltweit gibt es aktuell zahlreiche Forschungsprojekte, welche darauf abzielen, neue Biomarker oder Mutationen zu identifizieren, die mit dem Risiko einer Progression des Prostatakarzinoms korrelieren und somit die Differenzierung des Prostatakarzinoms verbessern können^{60,72}. Durch neue Biomarker könnte die Frage nach der richtigen Therapie bei Diagnosestellung unterstützt werden und die Prognose über den Verlauf der Krankheit verbessert werden⁶⁰.

Mit den aktuell verfügbaren Prognoseparametern wird die heterogene Tumorbilogie und dadurch insbesondere die unterschiedlich ausgeprägte Aggressivität des Prostatakarzinoms nicht ausreichend berücksichtigt⁶⁴. Es ist zurzeit nicht zuverlässig möglich, mit nicht invasiven Methoden zwischen hoch-aggressiven Tumoren, die eine aktive Behandlung benötigen, und klinisch insignifikanten Tumoren zu differenzieren. Eine Identifikation neuer Marker zur besseren Differenzierung von Prostatakarzinomen ist deshalb von großer Bedeutung.

2.3. Vimentin

Kürzlich konnte ein solcher Marker identifiziert werden. VIM3, die am C-Terminus gespleißte Variante des Vimentins, scheint einen Einfluss auf das Migrations- und Proliferationsverhalten von Prostatakarzinomen zu haben⁷⁷. Dieser mögliche Marker ist bisher relativ unerforscht.

Vimentin gehört zusammen mit Desmin zu den Intermediärfilamenten der Klasse 3, welche in Mesenchymal- und Muskelzellen vorkommen⁷⁸. Vimentin konnte neben Mesenchymalzellen auch in transformierten Zellen und verschiedenen Tumorgeweben nachgewiesen werden⁷⁹.

Mendez et al. gehen davon aus, dass die Expression von Vimentin eine hohe Bedeutung für die Mobilität der Zelle hat⁸⁰. Häufig wird die Expression von Vimentin als Marker für die epitheliale mesenchymale Transdifferenzierung (EMT) beschrieben, wobei die Epithelialzellen ihre Form verändern und den Zellverband verlassen⁸⁰.

Vimentin kann generell in drei Domänen unterteilt werden: 1. Kopf-Domäne (N-Terminus), 2. Rumpf-Domäne und 3. Schwanz-Domäne (C-Terminus). Die Kopf-Domäne ist zum Beispiel wichtig für die Interaktion mit dem Zytoskelett der Zelle sowie für die Verankerung von Mitochondrien in der Zelle⁸¹. Letzteres führt zur Einschränkung der mitochondrialen Mobilität, wodurch die Zellen fest verankert sind und in der Folge stark proliferieren, sich aus dem Zellverband lösen und metastasieren^{82,83}.

Die Schwanz-Domäne ist wichtig für die Verankerung vom Vimentin im Zytoplasma sowie für die Vernetzung und den Aufbau der Filamentstruktur⁸⁴. Das C-terminale Ende von Vimentin ist außerdem ein wichtiger Bindungspartner für TP53, ein Tumorsuppressorgen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass TP53 im Zytosol vorliegt, solange Vimentin in seiner Vollängenvariante (VIM-FL) vorliegt. Mithilfe von Trunkierungsexperimenten von Vimentin konnten Klotzsche et al. zeigen, dass das C-terminale Ende von Vimentin essenziell für die Lokalisation von mutiertem TP53 in den Zellkern ist⁸⁵.

2.3.1. VIM3

VIM3 ist die am C-Terminus gespleißte Variante von Vimentin-Volllänge (VIM-FL) und wurde im Jahr 2007 erstmals vom *Craig Venter Institute* identifiziert (PubMed Nummer ACA06103.1). Vier Jahre später konnte gezeigt werden, dass VIM3 in Gliomen vorhanden ist⁸⁶. Danach folgten allerdings vorerst keine weiteren Untersuchungen zur Bedeutung oder Funktion von VIM3.

Widersprüchliche Ergebnisse in der Literatur führten allerdings dazu, dass von Brandenstein et al. sich genauer mit dem Unterschied von VIM3 und VIM-FL auseinandergesetzt haben und 2015 eine detaillierte Beschreibung der unterschiedlichen Sequenzen von VIM3 und VIM-FL präsentieren konnten⁸⁷. Lange Zeit wurde die Vollängenvariante von Vimentin, VIM-FL, zur Differenzierung zwischen malignen Nierentumoren und benignen Onkozytomen verwendet⁸⁸. Je nachdem welcher Antikörper verwendet wurde, lieferten die Analysen allerdings deutlich andere Ergebnisse. In der Literatur wird häufig der Klon V9 verwendet, welcher an das C-terminale Ende von VIM-FL bindet. Dieses fehlt bei VIM3⁸⁸. In der Folge wird die Expression von VIM3 nicht detektiert. SP20 und 3B4 sind weitere verwendete Klone, welche nun aber in dem Bereich, der auch noch im VIM3 vorhanden ist, binden (Abbildung 1)⁸⁸. Dementsprechend war es nötig, zunächst einen Antikörper zu entwickeln, welcher spezifisch VIM3 detektieren kann. Dies gelang 2015 von Brandenstein et al.⁸⁸. Durch den Prozess des Spleißens ist VIM3 35 Aminosäuren kürzer als VIM-FL, wodurch auch das Molekulargewicht mit 47 kDa kleiner ist als das von VIM-FL mit 57 kDa⁸⁸. VIM3 endet anders als die Vollängenvariante nicht nach Exon 9, sondern bereits nach Exon 7 mit acht zusätzlichen Aminosäuren⁸⁸.

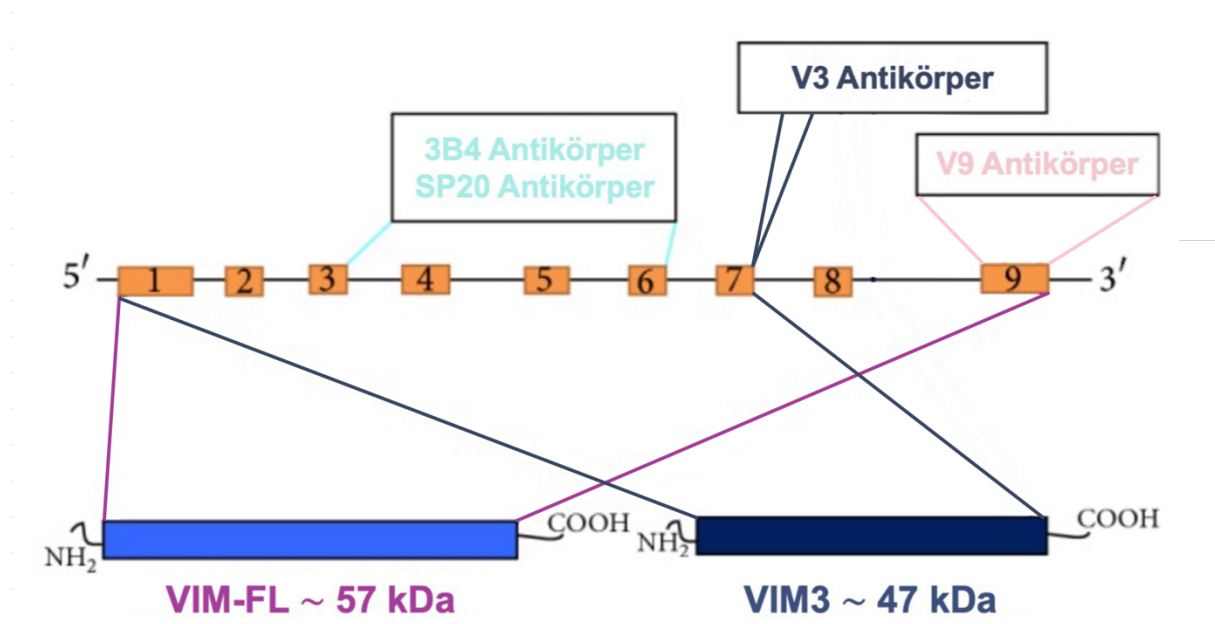


Abbildung 1: Schematische Darstellung der spezifischen Domänen gegen welche die Antikörper gegen VIM-FL und VIM3 gerichtet sind. Der Antikörperklon V9 (rosa) ist gegen Epitope im C-Terminus von VIM-FL gerichtet und detektiert somit nur die Vollängensvariante. Die 3B4 und SP20 Klone (hellblau) sind gegen Epitope in der Rumpf-Domäne gerichtet und detektieren so beide Varianten. Der trunkierte Antikörper gegen VIM3 (V3, dunkelblau) ist gegen das spezifische C-terminale Ende von VIM3 gerichtet und ist somit in der Lage nur VIM3 zu detektieren⁸⁸.

Von Brandenstein et al. konnten neben der Identifizierung der gespleißten Variante von Vimentin auch zeigen, dass VIM3 einen zuverlässigen Marker darstellt, um zwischen malignen klarzelligen Nierenkarzinomen und Onkozytomen zu differenzieren⁸⁸.

Weiterhin hat die Arbeitsgruppe analysiert wie die Trunkierung von Vimentin zustande kommt. Die Trunkierung von Vimentin wird durch Bindung der MicroRNA-498 an die komplementäre DNA-Sequenz und durch den dadurch resultierenden Transkriptionsstopp hervorgerufen. Der kürzere mRNA-Strang wird dann zu VIM3 translatiert⁸⁷.

VIM3 scheint allerdings nicht nur bei der Differenzierung von gut- und bösartigen Nierentumoren eine Rolle zu spielen. So konnte beispielsweise auch gezeigt werden, dass VIM3 zur Bestimmung der Spermienqualität einen wichtigen Marker darstellt⁸⁹. Funke et al. zeigten, dass VIM3 beim Oligoasthenoteratozoospermiesyndrom (OAT) signifikant herunterreguliert war im Vergleich zur Normozoospermie⁸⁹.

Im Hinblick auf die Risikoklassifikation des Prostatakarzinoms scheint VIM3 auch eine wichtige Rolle zu spielen. Es wurde bereits untersucht, inwieweit VIM3 mit der Aggressivität eines Tumors korreliert. Dabei konnte gezeigt werden, dass die VIM3-Expression mit dem Gleason-Score korreliert²⁴. VIM3 könnte also einen wichtigen Marker für die Beurteilung der Aggressivität des Prostatakarzinoms darstellen.

2.4. Endothelin-1

Es gibt verschiedene Faktoren, die bereits untersucht wurden, welche die Expression von VIM3 beeinflussen. Einer dieser Faktoren ist Endothelin-1 (ET-1). Es konnte gezeigt werden,

dass ET-1 in Prostatakarzinomzelllinien (PC3, DU145, LNCaP) verantwortlich für die Expression von VIM3 ist. Erhöhte ET-1 Spiegel korrelieren mit einer erhöhten VIM3-Konzentration⁷⁷. ET-1 wurde 1988 erstmals als ein vasokonstriktorisches Peptid beschrieben⁹⁰. Es wird hauptsächlich von Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Epithelzellen verschiedener Gewebe wie Lunge, Prostata und Endometrium produziert⁹⁰. Einige Studien konnten zeigen, dass ET-1 einen Einfluss auf die Entwicklung verschiedener Tumore, wie zum Beispiel Eierstock-, Brust- oder Prostatakrebs, haben kann. ET-1 bindet mittels zwei unabhängiger Rezeptoren A (ETAR) und B (ETBR) an die Zielzelle und spielt darüber hinaus eine Rolle auf transkriptioneller Ebene im Hinblick auf die Tumorprogression⁹⁰. Bindung von ET-1 an ETAR führt zur Zellproliferation, Angiogenese sowie Metastasierung und verhindert die Apoptose der Zellen⁷⁷. Die Bindung von ET-1 an ETBR führt über die sogenannte *Clearancefunktion* zu einer Eliminierung von ET-1 und Apoptose. Die beiden Rezeptoren können folglich als endogene Antagonisten bezeichnet werden⁷⁷.

ET-1 ist an verschiedenen Prozessen beteiligt, die die Aggressivität des Wachstumsverhaltens von Tumoren beeinflussen und die Tumorprogression fördern⁹¹. Im Hinblick auf Prostatakarzinome konnte bereits gezeigt werden, dass eine Überexpression von ET-1 mit einem erhöhten Metastasierungspotenzial korreliert⁹². Nelson et al. zeigten, dass es eine Vielzahl von Prostatakarzinomen gibt, in denen ETBR aufgrund von Methylierung des Promoters nicht vorhanden ist. Dies resultiert in einem erhöhten Migrationsverhalten der Prostatakarzinomzellen⁹³.

Zudem wurde durch Köditz et al. bereits demonstriert, dass eine durch ET-1 hervorgerufene erhöhte Expression von VIM3 zu einer Vermehrung von Mitochondrien und folglich zu einer erhöhten Mobilität der Tumorzellen führt⁷⁷. Im Hinblick auf die verstärkte Zellmigration und -proliferation scheint nur das Vorhandensein von VIM3 und nicht das von VIM-FL einen Einfluss zu haben, insbesondere nach Blockade von ETBR⁷⁷.

ET-1 hat also eine steigernde Wirkung auf die Proliferation und Migration von verschiedenen Karzinomen und führt zu einer verstärkten Expression von VIM3.

2.5. Withaferin A

Auf der anderen Seite gibt es auch Faktoren, welche hemmende Einflüsse auf die Proliferation und Migration haben und somit einen therapeutischen Nutzen aufweisen könnten. In diesem Zusammenhang wird in der vorliegenden Arbeit der Effekt von Withaferin A (WA) auf Prostatakarzinomzellen untersucht.

Es ist bereits bekannt, dass WA mit VIM-FL interagiert. In Brustkrebszellen induziert WA eine perinukleäre Vimentinakkumulation, welche mit einer rapiden Vimentindepolymerisation einhergeht⁹⁴. Nun soll untersucht werden, ob auch eine Interaktion zwischen VIM3 und WA besteht.

WA entstammt aus der Wurzel oder dem Blatt von *Withania somnifera*, welche zur Familie der Nachtschattengewächse (*Solanaceae*) gehört, und wird in verschiedenen traditionellen Systemen der Medizin verwendet, darunter Ayurveda, Unani, Siddha und Sowa-Ripga⁹⁵. Erste Anwendungen der Pflanze gab es in Indien bereits vor 3000 bis 5000 Jahren⁹⁵. Es handelt sich um ein steroidales Lacton, welches zum Beispiel bei Epilepsie, Depressionen, Arthritis, Diabetes oder auch in der Palliativmedizin zur Schmerzlinderung oder Regeneration eingesetzt wird⁹⁶.

Außerdem werden WA krebshemmende Effekte zugesprochen⁹⁷. 1992 wurde die Funktion von WA im Zusammenhang mit Krebs erstmals beschrieben⁹⁸. Es konnte gezeigt werden, dass WA einen hemmenden Einfluss auf das Wachstum neuer Krebszellen hat, reaktive Sauerstoffspezies zur Unterstützung vom programmierten Zelltod der Krebszellen generieren kann und in der Lage ist, Krebszellen anfälliger für Apoptose zu machen⁹⁹⁻¹⁰¹.

Viele Chemotherapeutika wie zum Beispiel Taxane, Camptothecin-derivate oder Vinca-Alkaloide wurden ursprünglich aus Pflanzen gewonnen¹⁰². Wie bereits in Abschnitt 2.2.2 beschrieben, hat wahrscheinlich auch die Ernährung einen Einfluss auf die Entstehung eines Prostatakarzinoms. Es ist deshalb essenziell, die Rolle von pflanzlichen Mitteln wie WA bei den verschiedenen Mechanismen der Entstehung des Prostatakarzinoms zu verstehen, um somit einen Nutzen für die Therapie daraus ziehen zu können¹⁰³.

2.6. TP53

Wie zuvor beschrieben, weist Vimentin am C-terminalen Ende eine Bindungsstelle für TP53 auf⁸⁵. TP53 ist ein Tumorsuppressorgen, dessen Mutation zur Folge hat, dass die benötigte Zeit für die Reparatur der DNA nicht mehr eingehalten werden kann. Dies führt zur Entstehung von Tumoren¹⁰⁴. Bei mutierten TP53 kann man häufig eine Translokation vom Zytoplasma in den Zellkern feststellen¹⁰⁴. 1998 konnte bereits von Klotzsche et al. gezeigt werden, dass TP53 im Zytosol vorliegt, solange Vimentin in seiner Vollängenvariante VIM-FL vorliegt. Mithilfe von Trunkierungsexperimenten wurde gezeigt, dass das C-terminale Ende von Vimentin essenziell für die Lokalisation von mutierten TP53 in den Zellkern ist⁸⁵.

Außerdem ist generell bekannt, dass Mutationen von TP53 die Entstehung von Metastasen fördern¹⁰⁵. Bei Prostatakarzinompatienten sind es Mutationen in Exon 7 und 8, die zur Tumorförderung führen¹⁰⁶.

Auch wenn bekannt ist, dass Vimentin eine Bindungsstelle für TP53 aufweist, so stellt sich die Frage, ob auch VIM3 eine solche Bindungsstelle zeigt. Yang et al. haben die Auswirkung des Komplexes aus TP53 und Vimentin auf synoviale Fibroblasten bei rheumatoider Arthritis untersucht und konnten zeigen, dass dieser Komplex die durch den *Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand* hervorgerufene Apoptose der Fibroblasten verstärkt¹⁰⁷. Allerdings zeigt die Auswertung der Immunpräzipitation, welche den Komplex aus Vimentin (VIM-FL) und TP53 bestätigt, eine zusätzliche Bande bei circa 47 kDa. Diese Bande entspricht

der trunkierten Variante, dem VIM3⁸⁸. Dadurch ergibt sich die Frage, ob VIM3 eine essenzielle Rolle bei der Komplexbildung spielt.

2.7. ATG7

Neben Vimentin ist ein weiterer bekannter Interaktionspartner von TP53 das Autophagiegen ATG7¹⁰⁸. Es ist allgemein bekannt, dass Autophagie einen wichtigen Einfluss auf die Karzinogenese hat¹⁰⁹. Karzinomzellen können sich mittels Autophagie an den metabolischen Stress adaptieren und dadurch die Chance ihres eigenen Überlebens erhöhen^{109,110}. Es wurde bereits untersucht, dass Defekte in einigen Autophagiegenen (ATG3, ATG5 oder ATG7) unter anderem zu einer Ansammlung von abnormalen Mitochondrien und zur Reduktion von intrazellulären Aminosäuren, ATP und Triglyzeriden führen können^{109,110}.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass TP53 und ATG7 einen Komplex bilden, und dass Karzinome mit einer erhöhten Expression von TP53 und ATG7 eine schlechtere Prognose aufweisen¹¹¹.

Gleichzeitig konnten Guo et al. demonstrieren, dass ein ATG7-Knockout bei kleinzelligen Lungentumoren mit onkozytären Eigenschaften einhergeht¹¹².

2.8. MicroRNA-371a-3p

In der vorliegenden Arbeit soll zunächst gezeigt werden, dass VIM3, TP53 und ATG7 einen Komplex in Prostatakarzinomzellen bilden. Neben der Frage nach den Auswirkungen des Komplexes auf das Migrations- und Proliferationsverhalten der Prostatakarzinomzellen stellt sich dann die Frage nach möglichen Zielgenen des Komplexes und den damit einhergehenden Effekten auf das Verhalten der Prostatakarzinomzellen. In dieser Arbeit wird die MicroRNA-371a-3p als mögliches Zielgen untersucht.

MicroRNAs sind kleine nicht-kodierende RNAs, welche eine wichtige Rolle bei verschiedenen biologischen Prozessen einnehmen und häufig in Krebszellen dysreguliert sind⁸⁷. Die Regulation der Genexpression erfolgt an der 3'-UTR durch Anlagerung an die sogenannte MicroRNA *seed-Sequenz*. Dies führt zu einer Gen-Stilllegung entweder durch mRNA-Spaltung, Destabilisierung der mRNA durch Verkürzung des Poly-A-Schwanzes oder Inhibierung der Translation⁸⁷.

Vor allem dem MicroRNA-371-Cluster wurde in verschiedenen Artikeln ein onkogenes Potenzial zugeschrieben^{113,114}. MicroRNAs werden in der Regel in Form von Multi-Protein-Komplexen in das Blut sekretiert¹¹⁵. Dies bietet einen Schutz gegen die Degradation durch die RNase, wodurch MicroRNAs im Vergleich zu zirkulierender DNA eine deutlich höhere Stabilität aufweisen und somit besser detektierbar sind¹¹⁵.

Voorhoeve et al. konnten bereits zeigen, dass die MicroRNA-371a-3p von mehr als 900 MicroRNAs insgesamt zu dem kleinen Anteil an MicroRNAs gehört, der in Zelllinien von humanen Germinalzelltumoren (GCT) überexprimiert ist¹¹⁶. Neben der generellen Über-

expression in GCT konnte auch demonstriert werden, dass die MicroRNA-371a-3p eine Korrelation zur Schwere der Erkrankung sowie zum Ansprechen auf die jeweilige Therapie aufweist^{117,118}.

Alhasan et al. konnten zeigen, dass eine erhöhte Konzentration der MicroRNA-371a-3p in aggressiven Prostatakarzinomen nachweisbar ist¹¹⁹. Außerdem gibt es bereits verschiedene Studien, die den Zusammenhang zwischen MicroRNAs und der Expression des Androgenrezeptors in Prostatakarzinomzellen demonstrieren^{120,121}. Es wird vermutet, dass die Expression der MicroRNA-371a-3p über Bindung an die 3'-UTR zu einer Herunterregulation der Androgenrezeptordichte führt¹²². Des Weiteren führt eine verstärkte Expression der MicroRNA-371a-3p zu einer verringerten Expression von PTEN^{114,123}. PTEN ist ein Tumorsuppressorgen, welches in verschiedenen Tumoren, unter anderem dem Prostatakarzinom, inaktiviert ist. In verschiedenen Studien wurden radikale Prostatektomiepräparate und Präparate von transurethralen Resektionen im Hinblick auf das Vorhandensein von PTEN untersucht. Ein PTEN-Verlust war dabei assoziiert mit dem Auftreten von Knochenmetastasen, Therapiere-sistenz und einer höheren Rezidivrate^{124,125}. Ein PTEN-Verlust führt zudem zu der Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs, welcher eine starke Assoziation zu ungünstigen Erkrankungsverläufen aufweist¹²⁶.

In dieser Arbeit soll demonstriert werden, dass VIM3 einen Transkriptionsfaktor für die MicroRNA-371a-3p darstellt und somit ein Knockdown von VIM3 zu einer Herunterregulation der MicroRNA-371a-3p führt. Folglich wäre die Expression von PTEN und die Androgenrezeptordichte erhöht, was mit einem günstigeren Krankheitsverlauf und einer besseren Prognose einhergehen würde.

2.9. Die Rolle des Androgenrezeptors beim Prostatakarzinom

Der Androgenrezeptor ist sowohl für die Funktion der Prostata als auch für die Karzinogenese und Kastrationsresistenz von großer Bedeutung¹²⁷.

Er gehört zu den intrazellulären Steroidrezeptoren und kann über die Transkription verschiedener Zielgene die Entwicklung, Differenzierung sowie das Wachstum von Prostata-gewebe regulieren und stellt somit einen hochinteressanten therapeutischen Ansatzpunkt dar¹²⁸. Der Androgenrezeptor wird hauptsächlich in den sekretorischen Prostatazellen exprimiert und das entsprechende Gen ist auf dem X-Chromosom in der Region Xq11-12 lokalisiert¹²⁹.

Man unterscheidet eine inaktive und eine aktive Form des Androgenrezeptors. Die inaktive Form liegt gebunden an Chaperon-Proteine im Zytosol vor, wohingegen bei der aktiven Form nach Ligandenbindung eine Konformationsänderung in ein aktives Homodimer erfolgt¹³⁰. Die wichtigsten Liganden, die den Rezeptor aktivieren, sind die Androgene Testosteron und Dihydrotestosteron^{128,131}. In der aktiven Form kommt es durch Bindung von Importin-alpha zur Translokation in den Zellkern. Dort erfolgt die Dimerisierung mit einem weiteren Homodimer

und die Bindung an das *androgen-responsive Element* der DNA. So agiert der Komplex als Transkriptionsfaktor und Regulator von androgensensitiven Zielgenen¹³¹.

Es ist bereits bekannt, dass es eine Korrelation zwischen der Androgenrezeptor-Expression und der Prognose des Prostatakarzinoms gibt. Das Prostatakarzinom wächst in 80 bis 90 Prozent der Fälle zunächst androgen-abhängig und eine erhöhte Androgenrezeptordichte ist mit einer früheren Rezidivneigung, einem aggressiveren Krankheitsverlauf und einem niedrigeren Überleben assoziiert¹³²⁻¹³⁴.

Mithilfe der in Abschnitt 2.2.5.1 und 2.2.5.2 beschriebenen antiandrogenen Behandlung kann das Tumorwachstum oft zunächst verhindert werden⁸. Durch die Androgendeprivations-therapie wird ein Hormonentzug mit nachfolgender Apoptose der Zellen hervorgerufen. Allerdings entwickeln viele Patienten nach durchschnittlich 2 bis 3 Jahren eine Resistenz gegenüber der Therapie, welche in der Entwicklung eines kastrationsresistenten Prostatakarzinoms (CRPC) resultiert¹³⁵. Der Hormonentzug ist nun unwirksam und der Androgenrezeptor wird im Verlauf der Therapie wieder vermehrt exprimiert. Verschiedene Mechanismen wie zum Beispiel Androgenrezeptor-Amplifikationen, -Hypersensitivierung, -Mutationen oder Mutationen in Koaktivatoren führen letztendlich zur Entstehung des CRPC und aktuell gibt es zahlreiche Untersuchungen zu möglichen therapeutischen Ansatzpunkten¹³⁶. Ein möglicher Ansatzpunkt ist die Reaktivierung der Androgenrezeptor-Expression. Studien konnten bereits zeigen, dass eine Androgenrezeptor-Reexpression in Androgenrezeptor-negativen-Zelllinien mit einer geringeren Zellproliferation, -migration und -invasion einhergeht¹³⁷. Allerdings müssen die genauen Effekte einer Androgenrezeptor-Reaktivierung sowie die exakten Mechanismen der Resistenzentwicklung noch weiter untersucht werden, um eine bestmögliche Therapie des CRPC zu ermöglichen¹³⁵.

2.10. Fragestellung und Ziel der Arbeit

Das Prostatakarzinom gehört zu den häufigsten bösartigen Tumoren der Welt und weist eine enorme Heterogenität im Hinblick auf die Tumoraggressivität auf²³. Wie zuvor beschrieben, werden der Gleason-Score, das klinische Stadium, die Tumorausdehnung sowie die Höhe des PSA-Werts seit vielen Jahren zur Risikoklassifikation des Prostatakarzinoms verwendet^{60,61,72}. Auch wenn die Fortschritte in der Diagnostik in den letzten Jahren bereits eine sehr hohe Detektionsrate ermöglichen, so ist die Biologie und damit insbesondere die Aggressivität des Prostatakarzinoms noch nicht ausreichend dargestellt. Zur sicheren Therapieplanung nach Diagnose und zur besseren Prognosebestimmung bedarf es deshalb einer verbesserten Differenzierung der Prostatakarzinoms. Eine bessere Differenzierung würde gleichzeitig zu einer Reduktion der Überdiagnostik und Übertherapie des Prostatakarzinoms führen^{62,63}.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, basierend auf den bereits bekannten Informationen, die Bedeutung von VIM3, ATG7 und TP53 in Prostatakarzinomzellen genauer zu untersuchen. Es soll die Frage geklärt werden, ob diese drei molekularen Marker einen Komplex bilden, welcher in den Zellkern migriert und in Prostatakarzinomzellen signifikant überexprimiert ist.

Ein weiteres Ziel besteht in der Untersuchung des Zusammenhangs des Komplexes und der MicroRNA-371a-3p als mögliches Zielgen. Konkret soll demonstriert werden, dass VIM3 an der Transkription der MicroRNA-371a-3p beteiligt ist. Zudem sollen die Konsequenzen eines Knockdowns von VIM3 auf die MicroRNA-371a-3p-Expression und auf das Migrations- und Proliferationsverhalten der Prostatakarzinomzellen untersucht werden. Es soll hierbei evaluiert werden, ob ein Knockdown von VIM3 zu einer geringeren MicroRNA-371a-3p-Expression führt und durch die daraus resultierende erhöhte Expression des Tumorsuppressorgens PTEN und der Androgenrezeptordichte als möglicher therapeutischer Ansatzpunkt genutzt werden könnte (Abbildung 2).

Weiterhin soll der Effekt von ET-1 und WA auf die Prostatakarzinomzellen untersucht werden. Dabei soll basierend auf bereits bekannten Informationen bestätigt werden, dass ET-1 einen steigernden Effekt auf die Migrations- und Proliferationsrate der Zellen sowie auf die Expression von VIM3 hat. Außerdem soll gezeigt werden, dass WA auch bei Prostatakarzinomen einen hemmenden Effekt auf die Migrations- und Proliferationsrate der Zellen hat und somit einen weiteren möglichen therapeutischen Ansatzpunkt darstellen könnte.

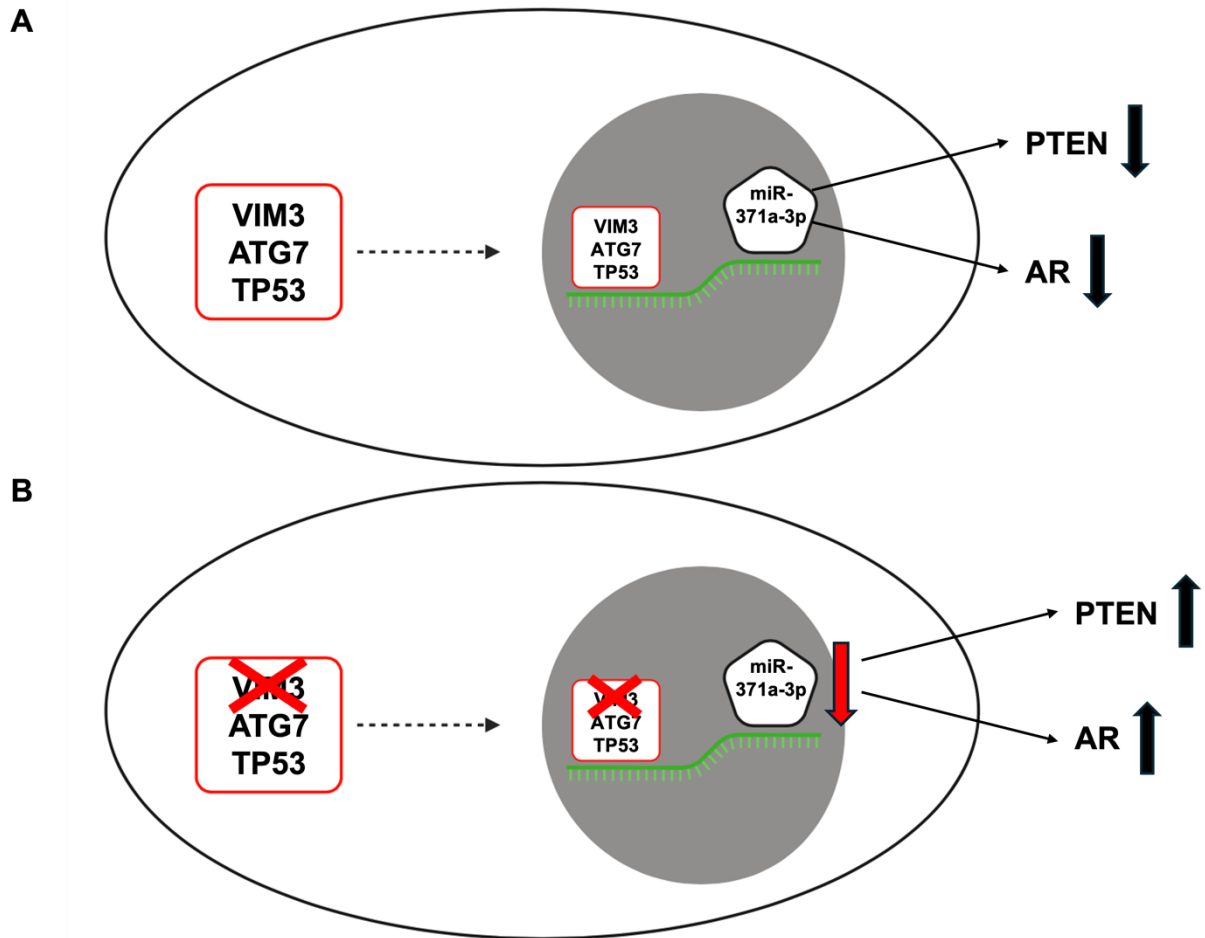


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Fragestellung der Arbeit. (A) Schema einer Prostatakarzinomzelle mit Zellkern. Das Ziel der Arbeit ist es zu zeigen, dass der Komplex bestehend aus VIM3, ATG7 und TP53 in Prostatakarzinomzellen vorliegt und als solcher in den Zellkern migriert. Außerdem soll demonstriert werden, dass der Komplex einen stimulierenden Effekt auf die Transkription der MicroRNA-371a-3p (miR-371a-3p) hat. Zudem ist bekannt, dass eine erhöhte Expression der MicroRNA-371a-3p zu einer verringerten Expression des Tumorsuppressorgens PTEN und zu einer Herunterregulation der Androgenrezeptordichte (AR) führt^{114,122,123}. (B) In einem weiteren Schritt soll gezeigt werden, dass ein Knockdown von VIM3 zu einer reduzierten Expression der MicroRNA-371a-3p führt. Durch die daraus resultierende erhöhte Expression des Tumorsuppressorgens PTEN sowie der Androgenrezeptordichte stellt ein VIM3-Knockdown einen potenziellen neuen therapeutischen Ansatzpunkt dar. Diese Abbildung wurde mit BioRender.com erstellt.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Zellkultur

3.1.1.1. Zelllinien

Zelllinie	Nummer	Ursprung	PSA-Expression	Hormon-sensitiv
BPH-1	DSMZ-Nr.: ACC 143	Epitheliale Prostatazelle eines 68-jährigen Manns mit BPH	Nein	Nein
DU145	ATCC-Nr.: HTB-81	Gehirnmetastase eines 69-jährigen kaukasischen Patienten mit Prostatakarzinom	Nein	Nein
LNCaP	ATCC-Nr.: CRL-1740	Supraklavikuläre Lymphknotenmetastase eines 50 Jahre alten kaukasischen Mannes	Ja	Ja
PC3	ATCC-Nr.: CRL-1435	Knochenmetastase eines 62-jährigen kaukasischen Mannes	Nein	Nein

Tabelle 6: Zelllinien

3.1.1.2. Chemikalien und Lösungen für die Zellkultur

Material	Hersteller	Hersteller-Nr.
DMEM-Medium (1x)	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford	11965126
DMSO	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach	P6036720100
Endothelin-1	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	102M4762V
FBS	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach	P161206, P170203
FCS	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	12133C
Lipofectamine 2000	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford	11668019
Transfektionsreagenz		
Mission® siRNA-Universal	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	WDAA1251
Negativkontrolle		
PBS	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach	394117
Penicillin/Streptomycin (10 000 U/mL)	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford	15140122
RPMI-Medium (1x)	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford	11875093

Material	Hersteller	Hersteller-Nr.
Trypanblau	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford	15250061
Trypsin-EDTA (0,25 %), Phenolrot	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford	2520056
Trypsin-EDTA (0,5 %), ohne Phenolrot	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford	1500054
Withaferin A	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	265237

Tabelle 7: Chemikalien und Lösungen für die Zellkultur

3.1.2. Geräte

Gerät	Hersteller
Analysewaage	Kern, Balingen
Chemostar PC ECL & Fluorescence Imager	Intas Science Imaging, Göttingen
Eismaschine	Scotsman, Sprockhövel
Elektrophoresekammer	Bio-Rad, München
Gefrierschrank -20 Grad Celsius	Liebherr, Biberach an der Riß
Gefrierschrank -80 Grad Celsius	Sanyo, Moriguchi, Japan
Gel Stromversorgung	Bio-Rad, München
Glasware	Duran Group GmbH, Wertheim
Mikroplattenabsorptionslesegerät	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford
Mikroskop	Olympus, Hamburg
Nano Drop One	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford
Neubauer Zählkammer	Bender and Hobein, Bruchsal
PCR-Thermocycler (Biometra)	Analytik Jena AG, Jena
pH-Meter	Hanna Instruments, Kehl
Pipetteboy	IBS Integra Biosciences, Fernwald
Pipetten (10 µl, 100 µl, 200 µl und 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Real Time Cyclor	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford
Schüttelplatte	IKA works, Inc. Staufen im Breisgau
Thermo-Heizblock	Grant Instruments, Cambridge UK
Zentrifuge Biofuge Primo	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford
Zentrifuge Fresco 21	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford

Tabelle 8: Geräte

3.1.3. Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Bradford 96-Well Platten	Brand GmbH, Hamburg
E-Gel EX 2% Agarose	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford
ELISA 96-Well-High-Binding-Platte	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Falcon konische Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford
Lab-Tek Chamber Slide	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford
MicroAMP Fast Optical 96-Well Reaktionsplatte	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford
Mikrozentrifugenröhrchen (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
PCR-Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Peha Nitrilhandschuhe, weiß	Paul Hartmann AG, Heidenheim
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Protran Nitrozellulose-Transfermembran	Whatman GmbH, Dassel
Serologische Pipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Corning Incorporated, New York
Whatmann Gel-Blot-Papier	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Zellkulturgefäße (3,5/10 cm Durchmesser, 6/12/24 oder 96 Wells)	Starlab GmbH (Cyto One), Hamburg
Zellkulturinkubator	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford
96-Well ELISA Mikroplatten	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim

Tabelle 9: Verbrauchsmaterialien

3.1.4. Chemikalien und Lösungen

Chemikalie	Hersteller	Hersteller-Nr.
Acrylamid/Bis-Acrylamid (29:1), 30 % Lösung	AppliChem GmbH, Darmstadt	A0951
Ammoniumpersulfat (APS)	AppliChem GmbH, Darmstadt	131138
Aurora (Western Blot Substrat)	Intas Science Imaging, Göttingen	HM29A-LB
Beta-Mercaptoethanol	AppliChem GmbH, Darmstadt	A1108
Laemmli-Ladepuffer 3x	Cell Signaling Technology, Frankfurt am Main	7722
Bradford-Lösung	AppliChem GmbH, Darmstadt	A6932
Bovines Serumalbumin (BSA)	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford	NC168682
Clarity Western ECL Substrat	Bio-Rad Laboratories, Inc., USA	1705060
DMSO	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach	P6036720100

Chemikalie	Hersteller	Hersteller-Nr.
Dithiothreitol (DTT) 30x	Cell Signaling Technology, Frankfurt am Main	7016
E-Gel 50 bp DNA-Leiter	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford	108099
Ethanol (99,85 %)	Honeywell, Bucharest Hungary	SZBG2090
ELISA Stopplösung	Bethyl Laboratories, Inc., Montgomery, USA	E115
Gefärbter Proteinmarker	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford	26620
Laemmli-Probenpuffer 4x	Bio-Rad, München	1610747
Methanol (99,85 %)	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen	25.6942610
Milchpulver	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	01724629
Isopropanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	048266899
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) 10x	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford	11594516
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	P1944
Pierce™ ECL Western Blot Substrat	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford	32109
QIAzol-Lysereagenz	Qiagen GmbH, Hilden	79306
RIPA-Lysepuffer	Rockland Immunochemicals, Pennsylvania	MB-030-0050
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem GmbH, Darmstadt	132363
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	AppliChem GmbH, Darmstadt	A1148
Tris-gepufferte Kochsalzlösung (TBS) 10x	Bio-Rad, München	1706435
Tween® 20	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	487263603
Xylene	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	057254048
1-Step™ Ultra TMB-ELISA Substratlösung	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford	34022
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Thermo Scientific, Schwerte	62248

Tabelle 10: Chemikalien und Lösungen

3.1.5. Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden mit destilliertem Wasser bis zur benötigten Menge aufgefüllt. pH-Wert-Anpassungen wurden mit Hilfe des pH-Meters durchgeführt und mit konzentriertem Chlorwasserstoff (HCl) oder Natriumchlorid (NaCl) korrigiert.

Puffer / Lösung	Zusammensetzung
Hybridisierungspuffer (Annealing Buffer) 10x (EMSA)	200 mM TRIS-HCl, pH 7,6 50 mM MgCl ₂ 0,1 mM EDTA 10 mM DTT
Ammoniumpersulfat (APS)	10 % (w/v) in Wasser Gelagert bei -20 Grad Celsius
Laemmli-Puffer, 10x (SDS-PAGE)	1 % (w/v) SDS 1,9 M (w/v) Glycin 250 mM (w/v) Tris
Polyacrylamid-Gel (12 %), Pulldown-Assay	6 µl TEMED 50 µl APS (10 %) 5 ml Acrylamid (30 %) 1 ml TBE 5,6 ml Wasser
SDS	10 % (w/v) SDS in Wasser
SDS-PAGE, 3 % (Sammelgel)	0,5 M Tris – HCl, pH 6,8 3 % (v/v) Acrylamid/Bis-Acrylamid (29:1) 0,1 % (v/v) SDS 0,5 % (v/v) APS 0,12 % (v/v) TEMED
SDS-PAGE, 10 % (Trenngel)	1 M Tris-HCl, pH 8,8 10 % (v/v) Acrylamid/Bis-Acrylamid (29:1) 0,1 % (v/v) SDS 0,5 % (v/v) APS 0,06 % (v/v) TEMED
TBE-Puffer 1x (EMSA)	0,13 M Tris, pH 7,6 45 mM Borsäure 2,5 mM EDTA
Towbin-Puffer 10x (Western Blot)	3,03 % (w/v) Tris 14,4 % (w/v) Glycin 1 % (v/v) SDS

Puffer / Lösung	Zusammensetzung
Tris	pH 6,8 0,5 M (w/v) pH 8,8 1,5 M (w/v)
Western Blot Blockierpuffer: TBST-Milch	1x TBST, pH 7,6 3 % (w/v) Milchpulver
Western Blot Puffer 4x	62,5 mM Tris – HCl, pH 6,8 10 % Glycerol 1 % LDS 0,005 % Bromphenolblau
Western Blot Puffer 3x	187,5 mM Tris-HCl (pH 6,8) 6 % (w/v) SDS 30 % Glycerol 0,03 % Bromphenolblau

Tabelle 11: Puffer und Lösungen

3.1.6. Kits

Kit	Hersteller	Katalog-Nr.
miRNeasy Micro Kit	Qiagen GmbH, Hilden	217084
miScript [®] II RT Kit	Qiagen GmbH, Hilden	218160
Nuclear Extract Kit	Active Motif, Rixensart	40010
QIAamp DNA Mini Kit (50)	Qiagen GmbH, Hilden	51304
RIPA Lysis Kit	Santa Cruz Technology, Heidelberg	Sc-24948
RNeasy Kit	Qiagen GmbH, Hilden	74104
SuperScript [™] III Reverse Transkriptase	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford	18080093

Tabelle 12: Kits

3.1.7. PCR

Reagenz	Hersteller	Katalog-Nr.
DTT (0,1 M)	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford	D1532
MystiCq Universal-PCR-Primer	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	MIRUP-500RXN
RNase-freies Wasser	Qiagen GmbH, Hilden	129112
SYBR [®] Green	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford	4364346
Universeller Primer	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford	831506

Tabelle 13: PCR

3.1.8. Primer

Ziel-DNA	Sequenz (5' → 3')	Annealing-temperatur	Hersteller
Beta-Actin	TTGGCAATGAGCGGTTCCGCTG	50	Thermo Fisher Scientific
MicroRNA-371a-3p	GUGCCGCCAUCUUUUGAG	50	Thermo Fisher Scientific
Promoterregion der pri-MicroRNA-371a-3p	Forward: GUGCCGCCAUCUUUUGAG Reverse: CCGCCCATAGCCTCCAGATGC	50	Thermo Fisher Scientific

Tabelle 14: Primer

3.1.9. siRNA

Zielgen	Sequenz (5' → 3')	Hersteller
siRNA VIM3 forward	GGGUAAGCAUUUUUAUUUCCCUUUAG	Sigma-Aldrich (HA15543136)

Tabelle 15: siRNA

3.1.10. EMSA-Oligonukleotide

Primer	Sequenz (5' → 3')	Hersteller	Lot-Nr.
MicroRNA-371a-3p VIM3 cold	TAGCTGGGACTACAGGCTTGAC CACTCCGCCCAGC	Eurofins Genomics	32538497
MicroRNA-371a-3p VIM3 hot	[CY5] TAGCTGGGACTACAGGCT TGACCACTCCGCCCAGC	Eurofins Genomics	32538496
MicroRNA-371a-3p VIM3 reverse	GCTGGGCGGAGTGGCTCAAGCC TGTAGTCCCAGCTA	Eurofins Genomics	32538498

Tabelle 16: EMSA-Oligonukleotide

3.1.11. Antikörper

3.1.11.1. Primärantikörper

Antikörper	Hersteller	Katalog-Nr.	Lot-Nr.	Verdünnung
alpha-Tubulin (H-300)	Santa Cruz Biotechnology Heidelberg	Sc-5546	G0511	1:250
ATG7 (B-9) HRP	Santa Cruz	Sc-376212	H0217	1:250
Maus monoklonal	Biotechnology Heidelberg	HRP		
ATG7 (B-9) Maus	Santa Cruz	Sc-376212	I2120	1:500
monoklonal IgG	Biotechnology Heidelberg			
Beta-Actin (1) Maus	Santa Cruz	Sc-130300	E2412	1:500
monoklonal IgG	Biotechnology Heidelberg			
GAPDH (0411)	Santa Cruz	Sc-47724	B2221	1:500
	Biotechnology Heidelberg			
Lamin B1 (B-10)	Santa Cruz	Sc-374015	L2817	1:250
HRP-konjugiert	Biotechnology Heidelberg	HRP		
Mitochondrien- Antikörper (Clone: MTC02)	NSJ Bioreagents	V2353- 20UG	V2353- 170206	1:500
Maus IgG _{1K}				
Protein-A/G- Agarose-Beads	Santa Cruz Biotechnology Heidelberg	Sc-2003	G0212	
TP53 (A-1) Maus	Santa Cruz	Sc-393031	F1521	1:500
monoklonal IgG	Biotechnology Heidelberg			(1:50 für IF)
TP53 (FL-393)	Santa Cruz	Sc-6243	B2013	1:500
Hase polyklonal IgG	Biotechnology Heidelberg			
VIM3 Klon 52	Davids Biolab	/	/	1:500
Maus monoklonal				
Vimentin (V9) Maus	Santa Cruz	Sc-6260	J0616	1:500
monoklonal IgG ₁	Biotechnology Heidelberg			

Tabelle 17: Primärantikörper

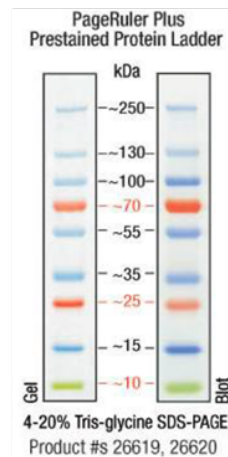
3.1.11.2. Sekundärantikörper

Antikörper	Hersteller	Katalog-Nr.	Lot-Nr.	Verdünnung
Ziege anti-Maus IgG, HRP-konjugiert	BIOZOL GmbH, Eching	HRP-112	HRP00315-002	1:5000
Anti-Hase IgG, HRP-konjugiert	Cell Signaling Technology	7074S	22	1:5000
Ziege anti-Hase IgG, FITC-konjugiert	Santa Cruz Biotechnology Heidelberg	Sc-2012	K0413	1:5000
Maus-IgG _K , Phycoerythrin-konjugiert	Santa Cruz Biotechnology Heidelberg	Sc-516141	J2219	1:500 für IF
Alexa Fluor 488 Ziege anti-Maus IgG	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford	A11001	1672559	1:500 für IF
Maus-IgG _K BP-FITC, FITC-konjugiert	Santa Cruz Biotechnology Heidelberg	Sc-516140	J1719	1:5000
Anti-Maus IgG, HRP-konjugiert	Cell Signaling Technology	7076S	36-200	1:1000

Tabelle 18: Sekundärantikörper

3.1.12. Molekulargewichtsmarker für DNA und Proteine

A



B

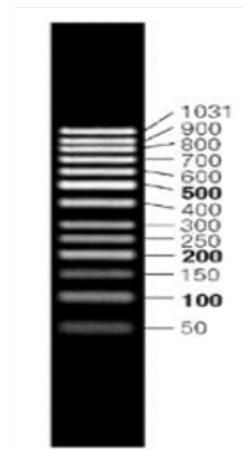


Abbildung 3: Molekulargewichtsmarker für Proteine und DNA. (A) SDS-PAGE Bandenleiter und vorgefärbte Proteinleiter geblottet in eine Membran aus einem vier- bis zwölfprozentigen Tris-Glycin-Gel (ThermoFisher Scientific Inc., Rockford). (B) 50 bp DNA-Leiter in zweiprozentigem Agarose-Gel (MBI Fermentas, Vilnius)

3.2. Methoden

3.2.1. Zellkultur

3.2.1.1. Kulturbedingungen

Alle Arbeitsschritte wurden in der Reinluftwerkbank unter sterilen Arbeitsbedingungen durchgeführt. In den Tabellen 3.1.1.1 und 3.1.1.2 sind alle dabei verwendeten Materialien aufgelistet. Die drei Prostatakarzinomzelllinien (DU145, LNCaP, PC3) und die Kontrollzelllinie (BPH-1) wurden in 100 mm Zellkulturplatten mit 10 ml Medium kultiviert.

Die Kontrollzelllinie BPH-1 wurde in RPMI-Medium, welches mit 20 Prozent FBS (v/v) und 1 Prozent Penicillin/Streptomycin supplementiert wurde, kultiviert.

Die Zelllinien LNCaP und PC3 wurden in RPMI-Medium, supplementiert mit 10 Prozent FBS (v/v) und 1 Prozent Penicillin/Streptomycin (v/v), kultiviert.

Die DU145-Zellen wurden in DMEM-Medium, supplementiert mit 10 Prozent FBS (v/v) und 1 Prozent Penicillin/Streptomycin (v/v), kultiviert.

Die Zellen wurden bei 37 Grad Celsius, 5 Prozent Kohlenstoffdioxid, 100 Prozent relative Luftfeuchte und 95 Prozent Luft inkubiert.

Die Kohlenstoffdioxidbegasung dient zusammen mit dem Hydrogenkarbonatpuffersystem des Mediums der Konstanthaltung des pH-Werts des Mediums. Die hohe Luftfeuchtigkeit verhindert die Verdampfung des Mediums.

3.2.1.2. Zählen der Zellen

Um die Zellen zu zählen, wurden sie zunächst mit Hilfe von 1 ml Trypsin vom Boden der Platte gelöst und dann in ein 15 ml Falcon überführt. Das Trypsin spaltet unter anderem die zur Zelladhäsion nötigen Proteine. Nachdem die Zellen für 5 Minuten bei 1500 g zentrifugiert wurden, wurde der Überstand abgenommen und das nun vorhandene Zellpellet in eine vorher definierte Menge an Medium gegeben. Für das eigentliche Zählen der Zellen wurden die Zellen im Verhältnis 1:2 mit Trypanblau verdünnt. Die lebendigen Zellen wurden dann in einer Neubauerkammer gezählt. Die Anzahl an Zellen pro ml wurde im Anschluss wie folgt berechnet:

$$\text{Zellen pro ml} = \text{Durchschnittliche Anzahl gezählter Zellen} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

3.2.1.3. Passagieren der Zellen

Bei einer Konfluenz von 70 bis 80 Prozent erfolgte das Passagieren der Zellen. Dazu wurde zunächst das alte Medium abgetragen. Dann wurden die Zellen zweimal mit 5 ml PBS gewaschen. Danach wurde 1 ml Trypsin hinzugegeben, um die Zellen zu lösen. Da die BPH-1-Zellen eine äußerst hohe Adhärenz aufwiesen, wurde hier das konzentriertere Trypsin-EDTA (0,5 Prozent) verwendet. Für die Prostatakarzinomzellen wurde Trypsin-EDTA (0,25 Prozent) verwendet. Die Zellkulturschalen wurden inkubiert, bis sich die Zellen vollständig vom Boden

gelöst hatten. Bei einem 1:2 Split wurde im Anschluss 3 ml Medium hinzugegeben. Für einen 1:3 Split erfolgte die Zugabe von 5 ml Medium. Anschließend wurde davon 2 ml in eine neue Zellkulturschale gegeben und noch 8 ml Medium hinzugefügt. Die Inaktivierung des Trypsins erfolgte durch das im Medium zugesetzte FCS und die Inkubation bei 37 Grad Celsius.

3.2.1.4. Zellstimulation und VIM3-Knockdown

Für die Zellstimulation wurden die Zellen in 35 mm Zellkulturschalen in 2 ml entsprechendem Medium kultiviert. Die Zellen wurden für 24 Stunden kultiviert, bis eine Konfluenz von mindestens 70 Prozent erreicht wurde. Nach 24 Stunden wurde das Medium entfernt, die Platten mit PBS gewaschen und anschließend durch Medium mit 0 Prozent FCS ersetzt. Durch das fehlende FCS wurden die Zellen in der G₀-Phase des Zellzyklus fixiert.

Nach einer weiteren Inkubationszeit von 24 Stunden wurden die Zellen mit ET-1, WA, MicroRNA-371a-3p und ET-1 und WA in Kombination stimuliert (Tabelle 19).

Der Knockdown von VIM3 in den Zelllinien erfolgte mittels *small interfering RNA* (siRNA). SiRNAs sind kleine doppelsträngige RNA-Moleküle mit einer Länge von meist 21 bis 23 Basenpaaren. Sie bestehen aus einem *passenger*- und einem *guide*-Strang, wobei der *passenger*-Strang verworfen wird¹³⁸. Der *guide*-Strang hat ein thermodynamisch instabileres 5'-Ende und bildet mit Proteinen der Agronauten-Familie (zum Beispiel Ago2) den *RNA induced silencing complex* (RISC)¹³⁹. Durch RNA-Interferenz erfolgt der Abbau der komplementären mRNA¹⁴⁰. Als Folge daraus wird das durch die mRNA kodierte Protein nicht mehr produziert. Der temporäre Knockdown von VIM3 bleibt bestehen, bis alle siRNA-Moleküle verbraucht sind.

Die siRNA kann dabei mit verschiedenen Methoden in die Zelle eingebracht werden. Hier wurde die Transfektion ausgewählt. Zur Vorbereitung wurden die Zellen in 6-Well Platten kultiviert, bis sie eine Dichte von 70 Prozent erreicht hatten. Dann wurde das Lipofectamine Transfektionsreagenz mit dem entsprechenden Medium jeder Zelllinie gemischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert (1:50). Im nächsten Schritt erfolgte die Zugabe der VIM3 siRNA oder der negativen siRNA. Danach folgte eine Inkubation von 20 Minuten. 500 µl dieses Gemischs wurden zu einem Well der 6-Well Platten jeder Zelllinie hinzugegeben. Im Anschluss folgte eine finale Inkubation von 72 Stunden. Da mit dem siRNA-Knockdown untersucht werden sollte, ob ein Knockdown von VIM3 mit einer verringerten Expression der MicroRNA-371-a-3p einhergeht, wurde in einem nächsten Schritt die MicroRNA wie in Abschnitt 3.2.3.3 beschrieben isoliert.

Die nachstehende Tabelle zeigt die verwendete Menge an Reagenz für die Stimulation und den Knockdown.

Reagenz	Stammlösung	Verdünnung	Finale Konzentration	µl/ml Medium
Endothelin-1	400 µM	1:8	50 nM	2,5 µl/ml
MicroRNA-371a-3p				0,5 µl/ml
Withaferin A	4000 µM	1:2000	2 nM	1 µl/ml

Tabelle 19: Liste der Reagenzien und des Verdünnungsschemas für die Stimulation der Prostatakarzinomzelllinien sowie der Kontrollzelllinie

	Medium	Lipofectamine	siRNA VIM3	siRNA Negativkontrolle
DMEM	4 ml	80 µl	6 µl	2 µl
RPMI (20%)	4 ml	80 µl	6 µl	2 µl
RPMI (10%)	8 ml	160 µl	12 µl	4 µl

Tabelle 20: Pipettierschema für den siRNA VIM3-Knockdown

Neben den VIM3-Knockdown-Zellen wurde zusätzlich eine Kontrolle mit dem leeren siRNA-Vektor angelegt. Die Knockdown-Zellen wurden zudem mit einer Kombination aus der VIM3 siRNA und ET-1 stimuliert. Dazu wurden die Zellen zunächst 48 Stunden mit ET-1 oder der siRNA inkubiert und anschließend wurde für die letzten 24 Stunden das jeweils andere Reagenz hinzugegeben.

3.2.2. Protein-basierte Methoden

3.2.2.1. Totale Proteinextraktion

Die Zellen wurden zunächst, wie in Abschnitt 3.2.1.4 beschrieben, stimuliert. Das Medium wurde abgenommen und anschließend wurden die Zellen zweimal mit 3 ml PBS gewaschen. Nach Zugabe von 2 ml PBS wurden die Zelle mit einem Zellschaber von der Zellkulturplatte gelöst und anschließend in ein 15 ml Falcon überführt und 5 Minuten bei 1500 g und 4 Grad Celsius zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und durch 500 µl RIPA-Puffer ersetzt. Danach wurden die Proben für 1 Stunde auf Eis gelagert und dabei regelmäßig gevortext. Anschließend wurden sie bei 4 Grad Celsius und 4000 g für 15 Minuten zentrifugiert. Der Zelldetritus hat sich dadurch als Pellet abgelagert und die Proteine, welche sich im Überstand befanden, konnten in ein neues zuvor gekühltes 1,5 ml Eppendorfgefäß umgefüllt werden. Die Lagerung erfolgte bei -80 Grad Celsius.

3.2.2.2. Nukleäre Proteinextraktion

Zur Extraktion der nukleären Proteine wurde das Nuclear Extract Kit von Active Motif verwendet. Die Extraktion erfolgte analog zum Protokoll des Herstellers. Es wurden frisch zubereitete Puffer verwendet und der gesamte Prozess wurde auf Eis durchgeführt. Die Prostatakarzinomzellen (DU145, LNCaP, PC3) und die BPH-1-Zellen wurden in 10 mm Zellkulturplatten kultiviert und für 24 Stunden mit ET-1 behandelt. Die unbehandelten Zellen

dienten als Kontrolle. Die isolierten Zellen wurden in zuvor gekühlten 15 ml Falcons gesammelt und bei 4 Grad Celsius und 1000 g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgetragen und das zurückgebliebene Zellpellet wurde in 1 ml eiskalten Phosphatase-Inhibitor-Puffer resuspendiert. Im Anschluss folgte eine Zentrifugation bei 4 Grad Celsius und 1000 g für 5 Minuten. Dann wurde nochmals der Überstand entfernt und das Zellpellet wurde in hypotonen Puffer resuspendiert mit einer anschließenden Inkubation von 15 Minuten auf Eis. Danach wurde zu jeder Probe ein Detergens hinzugefügt und die Mischung wurde bei 5500 g und 4 Grad Celsius für 5 Minuten zentrifugiert. Die Suspension enthielt nun die zytoplasmatische Fraktion, welche bei -80 Grad Celsius bis zur weiteren Verwendung gelagert wurde. Dann folgte eine Resuspension des Zellpellets in vollständigem Lysepuffer mit nachfolgender 30-minütiger Inkubation auf einer Schüttelplatte (150 g). Im Anschluss wurde auf höchster Stufe gevortext und es folgte eine Zentrifugation bei 14 000 g und 4 Grad Celsius für 10 Minuten. Die nun entstandene Suspension enthielt die nukleären Proteine. Die Proben wurden bei -80 Grad Celsius gelagert.

3.2.2.3. Bradford-Test

Zur Bestimmung der totalen Proteinmenge der behandelten Zellen wurde ein Bradford-Test durchgeführt. Der Bradford-Test beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums des Triphenylmethanfarbstoffs Coomassie-Brilliant-Blau G-250 von 470 nm nach 595 nm nach Proteinbindung in saurem Medium¹⁴¹. Zur Konzentrationsbestimmung eines Proteins wurde zunächst eine Kalibrierungsgerade mit Rinderserumalbumin (BSA) als Standard erstellt. Dazu wurde 1 µl, 2 µl, 4 µl, 6 µl, 8 µl und 10 µl BSA zu jeweils 200 µl Bradford-Lösung hinzugegeben und die Absorption bei 595 nm gemessen. Die Farbreaktion ist hierbei abhängig von der Menge an aromatischen und basischen Aminosäuren. Jeder Ansatz wurde in Triplikaten durchgeführt. Mit Hilfe von Excel wurde eine Tabelle mit den gemessenen Absorptionswerte erstellt, woraus die Standardkurve generiert werden konnte. Zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen wurden jeweils 3 µl der Proben zu 200 µl Bradford-Lösung hinzugefügt. Die jeweiligen Absorptionswerte der Proben wurden dann mittels ELISA bei 595 nm Wellenlänge analysiert. Der Bradford-Test wurde in Duplikaten durchgeführt, um zuverlässige Ergebnisse zu gewährleisten. Die gemessenen Absorptionswerte der unbekannten Proben wurden mit der BSA-Standardkurve verglichen. Mit Hilfe von linearer Regression wurde die totale Proteinkonzentration berechnet¹⁴².

3.2.2.4. Immunfluoreszenzfärbung

Mittels Immunfluoreszenz wurde die Lokalisation von VIM-FL, VIM3, TP53 und ATG7 bestimmt. Dazu wurden die Zellen zunächst mit jeweils 400 µl Medium pro Well und einer Dichte von circa 70 Prozent in Lab-Teks ausgesetzt. Am nächsten Tag wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit je 200 µl eiskaltem Aceton-Methanol für

1 Minute inkubiert. Durch diesen Schritt wurden die Zellen auf dem Objektträger fixiert. Nach 10 Minuten wurde der Primärantikörper hinzugegeben (Verdünnung 1:50 in Milch). Darauf folgte eine Inkubationszeit von 1 Stunde im Dunkeln. Anschließend wurden die Zellen wieder zweimal mit PBS gewaschen und der Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte Sekundärantikörper wurde appliziert. Nach einer weiteren Inkubation von 1 Stunde im Dunkeln folgte die Auswertung mit Hilfe eines Mikroskops. Durch Zugabe von DAPI wurde der Zellkern der Zellen angefärbt. Dies erlaubte die genaue Darstellung der Lokalisation der Marker in der Zelle.

3.2.2.5. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit der SDS-Gelelektrophorese lassen sich Proteine nach ihrem Molekulargewicht ladungs- und strukturabhängig auftrennen. Die Trennung im Gel basiert auf einer Anlagerung von SDS-Molekülen (1,4 g SDS / g Protein) an die Proteine proportional zum Molekulargewicht. Die Eigenladung der Proteine wird durch das negativ geladene SDS ausgeglichen und muss somit nicht weiter berücksichtigt werden¹⁴³.

Bei der durchgeführten SDS-PAGE lief der Prozess der Elektrophorese nach Einbringen des Gels in die Apparatur und Hinzugabe des Laemmli-Puffers für circa 30 Minuten bei 15 mA und dann für weitere 30 bis 60 Minuten bei 30 mA. Hierbei durchlief das Proteingemisch zunächst ein niederprozentiges Sammelgel und anschließend das höherprozentige Trenngel. Die genaue Zusammensetzung der Gele ist in Tabelle 3.1.5 aufgeführt. Das im Laemmli-Puffer enthaltene Bromphenolblau, welches vor der Proteinfrent lief, indiziert den Fortgang der Elektrophorese. Neben den Proteinproben wurde zusätzlich immer ein Molekulargewichtsmarker (Proteinleiter) beladen (Abbildung 3).

3.2.2.6. Western Blot

Mit dem Western Blot lassen sich Proteinbanden aus der SDS-PAGE mit spezifischen Antikörpern nachweisen. Dazu wurden die Proteine aus dem SDS-Gel auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen, das sogenannte „Blotten“.

Für die Durchführung des Western Blots wurde immer 25 µg Protein verwendet. Zu den Proben wurde 4 µl Laemmli-Probenpuffer hinzugegeben und danach wurden die Proben auf 20 µl mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Anschließend wurden die Proben für 5 Minuten bei 98 Grad Celsius erhitzt. Das im Laemmli-Ladepuffer enthaltene Reduktionsmittel beta-Mercaptoethanol führt beim Erhitzen dazu, dass intra- und intermolekulare Disulfidbrücken gespalten werden. Die Folge ist ein Verlust der räumlichen Proteinstruktur¹⁴⁴. Im nächsten Schritt wurde das Gel beladen. Neben den Proben wurde zusätzlich immer ein Molekulargewichtsmarker (Abbildung 3) aufgetragen. Dann erfolgte die SDS-PAGE. Nach der Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE wurde die eigentliche Western Blot Analyse durchgeführt.

Das „Sandwich“ für das Blotten bestand aus je zwei Whatman-Papieren oben und unten sowie dem Gel und der Nitrozellulosemembran in der Mitte. Die Membran und die Filterpapiere

wurden zuvor in 1x Towbin-Puffer + 20 Prozent Methanol getränkt. Der Blottingprozess wurde dann bei 360 mA für 1 Stunde auf Eis durchgeführt. Um freie Bindungsstellen abzusättigen, wurde die Nitrozellulosemembran nach dem Blotten für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf der Schüttelplatte in Blockierpuffer (3 Prozent Milchpulver in TBST) geschwenkt. Danach wurde der erste Antikörper appliziert und für 1 Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 Grad Celsius inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in TBST für 5 Minuten wurde der zweite Antikörper appliziert und wieder für 1 Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 Grad Celsius inkubiert. Nach erneutem Waschen mit TBST erfolgte die Applikation der Clarity Western Blot Lösung (Pierce™ ECL Western Blot Substrat). Im Anschluss wurde die Auswertung mit dem Intas Chemostar Reader durchgeführt.

Die für den Western Blot verwendeten Antikörpern sind in Abschnitt 3.1.11 aufgeführt.

3.2.2.7. Immunpräzipitation

Für die Immunpräzipitation wurde nach Bestimmung der totalen Proteinmenge mittels Bradford-Test 500 µg totales Protein von jeder Probe in ein neues Eppendorfgefäß gefüllt. Es wurde ein Mastermix bestehend aus dem jeweiligen Antikörper und A/G-Plus-Agarose-Beads angefertigt und dann zu den Proben dazugegeben. Danach folgte eine Inkubation für 1 Stunde auf Eis. Die Agarose-Beads sorgten für eine Beschwerung der Protein-Antikörper-Komplexe. Dann wurden die Proben für 5 Minuten bei 8000 g und 4 Grad Celsius zentrifugiert, wobei die Protein-Antikörper-Komplexe sich durch die Beschwerung vom Zelllysats abtrennten. Danach wurden die Proben einmal mit PBS gewaschen, nochmals 5 Minuten bei 8000 g und 4 Grad Celsius zentrifugiert und nochmals mit PBS gewaschen. Vor den Waschgängen wurde jeweils der Überschuss abpipettiert. Nach erneutem Zentrifugieren wurden die Proben in Laemmli-Probenpuffer (20 µl: 16 µl destilliertes Wasser + 4 µl Puffer) resuspendiert und dann für 5 Minuten bei 98 Grad Celsius erhitzt und anschließend zentrifugiert. Die Proteine wurden im Anschluss mittels SDS-PAGE analysiert.

3.2.3. Nukleinsäure-basierte Methoden

3.2.3.1. Polyacrylamid-Gel

Zur Visualisierung kleinerer PCR-Produkte, wie zum Beispiel von MicroRNAs, wurde ein zehn- bis zwölfprozentiges Polyacrylamid-Gel verwendet. Die Zusammensetzung ist in Tabelle 21 aufgeführt.

Das Gel lief zunächst für 30 Minuten bei 120 V, um eine Normalisierung zu generieren, welche durch das fehlende Isopropanol nicht wie beim SDS-Gel bereits geschehen ist. Nach Beladung der Proben lief das Gel für weitere 30 Minuten bei 120 V. Aufgrund des SYBR Greens in den PCR-Proben wurde dieser Teil im Dunkeln durchgeführt. Als Laufpuffer wurde TBE verwendet. Die Auswertung erfolgte mit dem Intas Chemostar Reader.

Benötigtes Volumen	Reagenz
6 µl	TEMED
50 µl	APS (10 %)
5 ml	Acrylamid (30 %)
1 ml	TBE
5,6 ml	Wasser

Tabelle 21: Zusammensetzung des zehnprozentigen Polyacrylamid-Gels

3.2.3.2. DNA-Isolation und VIM3-Pulldown – Interaktion mit der MicroRNA-371a-3p

Zur Darstellung der Interaktion zwischen VIM3 und der MicroRNA-371a-3p wurde ein VIM3-Pulldown durchgeführt. Dazu wurde der VIM3 Antikörper mit A/G-Plus-Agarose-Beads (1:10) für 1 Stunde auf Eis inkubiert. Parallel dazu wurden unbehandelte Zellen aller Zelllinien wie in Abschnitt 3.2.2.1 beschrieben isoliert. Anschließend wurden die Proben mit dem VIM3 Antikörper / A/G-Plus-Agarose-Beads Gemisch für 1 Stunde auf Eis inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 2000 g für 1 Minute bei 4 Grad Celsius. Nach zweimaligem Waschen mit PBS erfolgte eine weitere Zentrifugation unter gleichen Bedingungen. Nach Zugabe von 200 µl PBS wurde die eigentliche DNA-Isolation mit Hilfe des QIAamp DNA Mini Kit durchgeführt. Durch die Kopplung der Proben mit dem VIM3 / A/G-Plus-Agarose-Beads Gemisch konnte nun DNA isoliert werden, welche hauptsächlich an VIM3 gebunden vorliegt. Zur Kontrolle wurde auch DNA von Zellen ohne den vorherigen VIM3-Pulldown isoliert.

Für die DNA-Isolation wurde 20 µl Qiagen Proteinase K hinzugefügt. Außerdem wurde 200 µl Lysepuffer hinzugegeben. Das Gemisch wurde gevortext und im Anschluss für 10 Minuten bei 56 Grad Celsius inkubiert. Dann wurde 200 µl Ethanol (96 Prozent) hinzugefügt und das Gemisch wurde auf die im Kit enthaltenen QIAamp *Mini Spin Column* gegeben. Nachdem das Gemisch für 1 Minute bei 6000 g zentrifugiert wurde, wurde die QIAamp *Mini Spin Column* in ein neues 2 ml *Collection Tube* transferiert. Anschließend wurden ungebundene Moleküle von der Säulenmatrix in zwei aufeinander folgenden Schritten mit jeweils 500 µl AW1 bzw. AW2 Waschpuffer und erneuter Zentrifugation für 1 Minute bzw. 3 Minuten bei 6000 g entfernt. Die Säule mit der gebunden DNA wurde im letzten Schritt in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß gestellt und nach Zugabe von 200 µl Elutionspuffer AE erneut zentrifugiert (1 Minute, 6000 g). Im Anschluss folgte eine qRT-PCR mit Primern für die Promoterregion der pri-MicroRNA-371a-3p. Zur Visualisierung des PCR-Produkts der Promoterregion der pri-MicroRNA-371a-3p wurde ein zwölfprozentiges Polyacrylamid-Gel verwendet, welches für 40 Minuten bei 100 V lief. 1x TBE diente als Laufpuffer und ein 50 bp vorgefärbter DNA-Marker diente als Leiter. Fluoreszenzsignale wurden mit dem Intas Chemostar für grüne (488 nm) und blaue (625 nm) Kanäle detektiert.

3.2.3.3. MicroRNA-Isolation

Zur Isolation der MicroRNA-371a-3p wurde das miRNeasy Micro Kit von Qiagen verwendet. Die Arbeitsschritte wurden analog zu den Angaben im Protokoll des Herstellers durchgeführt. Zu Beginn wurden die Zellen im Pellet bei 300 g für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand wurde abpipettiert. Dann wurde mit 700 µl QIAzol Lysereagenz die Zellstruktur aufgebrochen. Die Zellen wurden im Anschluss 1 Minute gevortext und bei Raumtemperatur für 5 Minuten stehen gelassen. Hier fand eine Dissoziation der Nukleoproteinkomplexe statt. Dann wurde 140 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol hinzugefügt und durch mehrfaches Schwenken des Gefäßes über 15 Sekunden vermischt. Nach einer erneuten Ruhephase bei Raumtemperatur für 2 Minuten wurde eine Zentrifugation bei 12 000 g und 4 Grad Celsius für 15 Minuten durchgeführt. Die obere Phase der Lösung sollte nun die RNA enthalten und wurde in ein neues Eppendorfgefäß transferiert. Das 1,5-fache Volumen Ethanol wurde hinzugegeben. 700 µl davon wurden sofort auf die RNeasy *MinElute spin column* in ein 2 ml Röhrchen gegeben. Es folgte eine zweimalige Zentrifugation bei 8000 g für 15 Sekunden und der entstandene Überstand wurde verworfen. Dann wurde die Probe mit 700 µl RWT-Puffer und 500 µl RPE-Puffer gewaschen und für 15 Sekunden bei 8000 g zentrifugiert. Im Anschluss wurde 500 µl RNase-freies 80-prozentiges Ethanol auf die RNeasy *MinElute spin column* pipettiert und für 2 Minuten bei 8000 g zentrifugiert. Nach Zentrifugation mit geöffnetem Deckel bei 5 Minuten auf der höchsten Geschwindigkeit wurde die Säule in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und 14 µl RNase-freies Wasser auf die Säule gegeben. Es folgte eine letzte Zentrifugation mit geschlossenem Deckel bei höchster Geschwindigkeit für 1 Minute.

3.2.3.4. cDNA-Synthese

Mit dem miScript II RT Kit von Qiagen wurde die reverse Transkription der zuvor extrahierten MicroRNA zu cDNA durchgeführt. Zur Produktion der cDNA wurde 100 ng des MicroRNA-Extrakts verwendet. Die Schritte wurden analog zum Protokoll des Herstellers durchgeführt. Der Reverse-Transkriptase-Mastermix wurde nach Herstellerangaben angefertigt. Im Anschluss wurde dieser mit den Proben vermischt, zentrifugiert und auf Eis inkubiert. Es folgte eine Inkubation über 1 Stunde bei 37 Grad Celsius. Um den miScript Reverse-Transkriptase-Mix zu inaktivieren, folgte eine weitere Inkubation für 5 Minuten bei 95 Grad Celsius. Die fertigen Proben wurden dann entweder nach Herstellerangaben verdünnt und direkt für die qRT-PCR verwendet oder bei -20 Grad Celsius für spätere Analysen gelagert.

3.2.3.5. Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR):

Zielgenanalyse MicroRNA-371a-3p

Die PCR ermöglicht die exponentielle Vervielfältigung einer bestimmten Nukleinsäuresequenz. Dazu erfolgt zunächst die Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei 94 bis 96 Grad Celsius. Anschließend wird die Temperatur auf 55 bis 65 Grad Celsius gesenkt. Dies

erlaubt das sogenannte Annealing des spezifischen Primers an die DNA. Im dritten Schritt kommt es zur Elongation der DNA-Sequenz durch die thermostabile DNA-Polymerase bei 68 bis 72 Grad Celsius¹⁴⁵.

Mit der qRT-PCR lässt sich die Amplifikation des gewünschten DNA-Abschnittes in Echtzeit beobachten und so können Rückschlüsse auf die Ausgangsexpression des zu untersuchenden Gens gemacht werden. Die qRT-PCR kann entweder mittels TaqMan-Sonden oder SYBR Green-Sonden durchgeführt werden. Hier wurden SYBR Green-Sonden verwendet. SYBR Green-Sonden binden unspezifisch an beliebige doppelsträngige DNA und lösen dadurch ein Fluoreszenzsignal aus. Während der Amplifikation des betrachteten Gens nimmt die Fluoreszenz proportional mit der Menge des PCR-Produkts zu, wodurch die Bestimmung der Ausgangsmenge des Gens im Vergleich zu einer Referenzprobe ermöglicht wird¹⁴⁶.

Für die qRT-PCR wurden Twin.tec PCR-Platten 96 verwendet.

Für den Nachweis der Promoterregion der pri-MicroRNA-371a-3p (VIM3-Pulldown) wurde ein Mastermix bestehend aus 10 µl SYBR Green, 1 µl Primer (bestehend aus *forward* und *reverse* Primer) und 9 µl RNase-freiem Wasser angefertigt.

Für die MicroRNA-371a-3p Detektion bestand der Mastermix aus 10 µl SYBR Green, 1 µl Primer (*forward*), 0,4 µl MytiCq-Primer und 8,6 µl RNase-freiem Wasser pro Probe.

Dann wurde jeweils 1 µl der DNA- bzw. cDNA-Probe mit 19 µl des Mastermixes pipettiert. Die Proben wurden in Triplikaten angelegt. Für die Analyse der MicroRNA-371a-3p diente beta-Actin als Haushaltsgen. Die Daten wurde mittels relativer Quantifizierung mit Hilfe des Schwellenwertzyklus (Ct-Wert) analysiert. Die verwendete Formel lautet: $2^{-\Delta\Delta CT}$ ¹⁴⁷.

Das Programm lief wie in der nachfolgenden Tabelle dargestellt:

Anzahl der Zyklen	Zeit in Sekunden	Temperatur in Grad Celsius
1	20	95
45	15	95
	30	50
	30	72
	15	70
1		

Tabelle 22: Standardablauf qRT-PCR

3.2.4. Elektrophoretischer Mobilitäts-Shift-Assay (EMSA)

Um die Interaktion von VIM3 mit dem Promotorbereich der MicroRNA-371a-3p darzustellen, wurde ein EMSA durchgeführt. Dieser Assay stellt eine Affinitätselektrophorese dar und basiert darauf, dass die elektrophoretische Mobilität eines Protein-Nukleinsäurekomplexes langsamer ist als die einer freien Nukleinsäure¹⁴⁸.

Zunächst wurde nukleäres Protein der Zellen isoliert und der Proteingehalt der Proben wurde, wie in Abschnitt 3.2.2.3 beschrieben, mittels Bradford-Test bestimmt. Palindromische Oligonukleotide von der Firma Eurofins Genomics wurden so entworfen, dass sie die vermutete

Promoterregion der pri-MicroRNA-371a-3p binden und das 5'-Ende wurde mit Cytidin (Cy5) markiert.

Für die Detektion der möglichen Bindung wurden die Proben auf ein achtprozentiges nicht-denaturierendes Polyacrylamid-Gel aufgetragen und in 1x TBE-Puffer bei 80 V für 2 Stunden aufgetrennt. Das Gel befand sich zuvor für mindestens 30 Minuten in 1x TBE-Puffer bei 290 V, um eine geordnete Orientierung der Acrylamidmoleküle im Gel zu erzielen. Zur Sichtbarmachung der Banden wurde das Gel mit dem Intas Chemostar Reader ausgelesen (660 nm). Die Vorbereitung der Proben lief wie folgt:

Zur Vorbereitung der *hot* Proben (Bindungsreaktion) wurde 1 µl der Cy5-markierten Oligonukleotide (1 pmol) zusammen mit 2 µl 10x Annealing-Puffer und 6 µl destilliertem Wasser bei 70 Grad Celsius für 10 Minuten inkubiert. Danach erfolgte eine weitere Inkubation bei Raumtemperatur für 30 Minuten. Anschließend wurde 20 µg Protein zur Oligonukleotidmischung hinzugegeben und für weitere 30 Minuten auf Eis inkubiert.

Um die Spezifität der Bindung zu analysieren, wurden 1 µl unbekannte palindromische Oligonukleotide (1 pmol) und markierte Oligonukleotide zur Sättigung der Bindestellen verwendet. Nach Zugabe von 20 µg Protein und einer Inkubation von 30 Minuten auf Eis wurden diese *cold* Proben zu den zuvor vorbereiteten *hot* Proben gegeben.

In der Zeit, in der sich die *cold* und *hot* Proben vermischten, sollten alle Bindestellen gesättigt sein, da die *cold* Oligonukleotide eine höhere Konzentration aufweisen. Diese Probe repräsentierte die Negativkontrolle. Wenn bei der Negativkontrolle keine oder nur sehr schwache Banden im Vergleich zu den *hot* Proben sichtbar sind, kann man schlussfolgern, dass die Bindung der Oligonukleotide an das Protein von Interesse spezifisch ist.

Für den Supershift-Assay wurde 20 µg Protein mit 5 µl VIM3 Antikörper für 1 Stunde auf Eis inkubiert. Dieser Mix wurde danach mit den *hot* Proben inkubiert. Der Supershift beruht darauf, dass DNA-Protein-Antikörper-Komplexe langsamer wandern als DNA-Protein-Komplexe, welche wiederum langsamer wandern als ungebundene DNA.

3.2.5. Kratz-Assay / Zellmigrations-Assay

Mithilfe des Kratz-Assays wurde das Migrationsverhalten der Tumorzellen untersucht. Die drei Prostatakarzinomzelllinien DU145, LNCaP und PC3 und die Kontrollzelllinie BPH-1 wurden in je 1 ml Medium in einer 6-Well Platte ausgesät. Nach 24 Stunden wurde das Medium abgenommen und durch FCS-freies Medium ersetzt. Dadurch wurden proliferative Effekte durch das Medium auf die Zellen vermieden und somit die Zellen alle im selben Zellzyklus fixiert. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen wie in Abschnitt 3.2.1.4 beschrieben stimuliert. Im Anschluss wurde mit einer 200 µl Pipettenspitze unter sterilen Zellkulturbedingungen jeweils ein Kreuz oder ein Strich in den Zellrasen gekratzt. Dieser Vorgang wurde so ebenfalls für die Knockdown-Zellen durchgeführt. Nach 0, 3, 6 und 24 Stunden wurde dann das Migra-

tionsverhalten mit Hilfe des Mikroskops dokumentiert. Für die Knockdown-Zellen erfolgte die Dokumentation des Migrationsverhaltens nach 0, 12, 24, 36, 48 und 72 Stunden.

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe von Adobe Photoshop. Hierbei wurde der Kratzer bei 0 Stunden abgezeichnet und dann als Vorlage über die anderen Bilder gelegt. Nach farblicher Markierung der einzelnen Zellen wurden diese manuell ausgezählt (Abbildung 4). Jede Auszählung wurde dreimal durchgeführt und anschließend wurde der Mittelwert bestimmt. Die errechneten Mittelwerte und die dazugehörigen Standardabweichungen wurden im Anschluss graphisch dargestellt und auf Signifikanz geprüft.

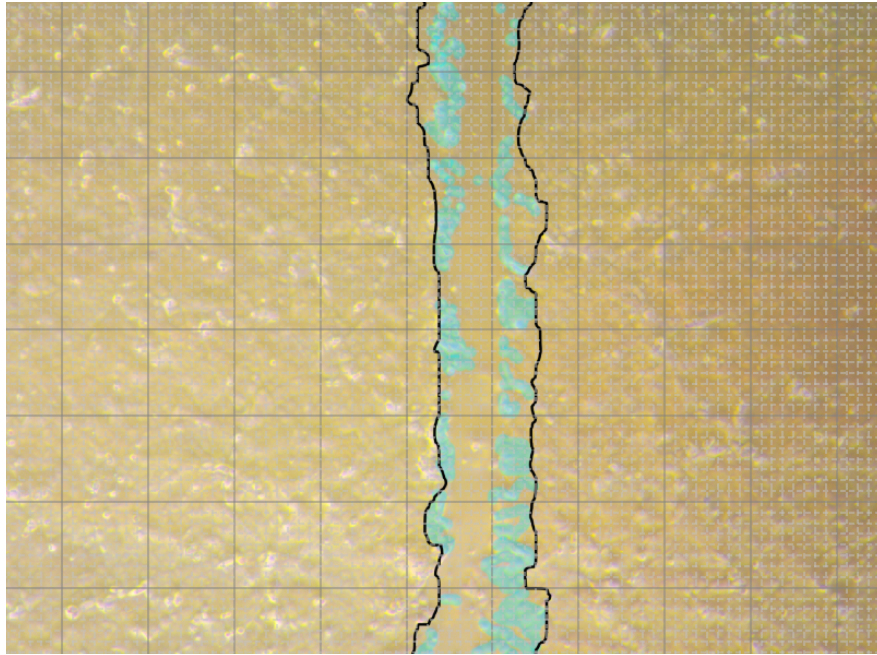


Abbildung 4: Photoshop-Screenshot zur beispielhaften Demonstration der Kratz-Assay Auswertungen.

Das Foto des Kratzers bei 0 Stunden wurde als Vorlage für die anderen Zeitpunkte genutzt, indem der Kratzer abgezeichnet wurde und dann mit den Fotos der Kratzer der späteren Zeitpunkte überlagert wurde. Die Zellen wurden farblich markiert und manuell ausgezählt. Die Auszählung der Zellen erfolgte in Triplikaten mit anschließender Bestimmung des Mittelwerts. Die graphische Auswertung erfolgte mit Hilfe von Adobe Photoshop.

3.2.6. Agarose-Drop

Zur Visualisierung des Migrationsverhaltens wurde zusätzlich ein Agarose-Drop durchgeführt. Dazu wurde 0,2 g Agarose-Pulver mit 5 ml PBS gemischt und dann für 15 bis 30 Sekunden bei 800 Watt in der Mikrowelle erwärmt. Die flüssige Agarose musste dann auf Handtemperatur abkühlen.

Es wurden jeweils die Zellen einer Zelllinie von vier großen Platten geerntet und in gerade so viel Medium resuspendiert, dass das Zellpellet bedeckt war. Anschließend wurde 30 µl der handwarmen Agarose hinzugegeben und das Zellpellet wurde darin resuspendiert. Dann wurde jeweils 5 µl des Agarose-Zellen-Gemischs auf eine 24-Well Platte aufgetragen. Der Agarose-Drop wurde daraufhin für 15 Minuten bei 4 Grad Celsius ausgehärtet. Anschließend wurde 200 µl Medium mit der MicroRNA-371a-3p als Stimulanz hinzugegeben. Nun wurde das Migrationsverhalten beobachtet, indem nach 0, 24 und 48 Stunden Fotos gemacht wurden.

3.2.7. Statistik

Die Auswertung der Western Blots erfolgte mit Image J. Dabei wurde mit der Rechteckfunktion ein Rahmen um die größte Bande gelegt. Mithilfe dieses Rahmens wurde dann die Intensität jeder einzelnen Bande gemessen. Da auch der Hintergrund niemals komplett weiß ist, wurde zu jeder Bande auch die Intensität des Hintergrunds gemessen. Die Differenz aus dem Wert für den Hintergrund und die Bande wurde gebildet und der Wert der jeweiligen Kontrolle (GAPDH) wurde als 100 Prozent definiert. Die Quantifizierung spiegelt die relative Menge jedes Proteins im Vergleich mit der Ladekontrolle wider. In den Experimenten, in denen die Zellen unter Stimulation untersucht wurden, wurde der Wert für die unstimulierten Zellen (Kontrolle) als 100 Prozent definiert. Die graphische Darstellung und Testung auf Signifikanz erfolgte mittels GraphPad Prism 9. Die Western Blots bei denen ein Vergleich der mit ET-1 oder WA stimulierten Zellen mit den unstimulierten Zellen erfolgte, wurden mit Hilfe eines t-Tests für unverbundene Stichproben auf Signifikanz geprüft. Der Vergleich aller Prostatakarzinomzelllinien mit der Kontrollzelllinie BPH-1 wurde mit einem ANOVA-Test durchgeführt. Dieser erlaubt den Vergleich von Mittelwerten mehrerer Gruppen bzw. hier mehrerer Zelllinien. Alle Western Blots wurden in Triplikaten durchgeführt. In den Abbildungen sind die jeweiligen Mittelwerte mit den entsprechenden Standardabweichungen aufgeführt.

Die Proben für die qRT-PCR wurden in Triplikaten angelegt und die jeweiligen Ergebnisse mit GraphPad Prism 9 analysiert.

Die Auswertung der Zellmigrations-Assays erfolgte manuell und mit Hilfe von Adobe Photoshop wie in Abschnitt 3.2.5 beschrieben. Die statistische Auswertung erfolgte ebenfalls mit t-Tests für unverbundene Stichproben.

Die Signifikanz ist in den jeweiligen Abbildungen wie folgt gekennzeichnet:

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$.

4. Ergebnisse

4.1. Präsenz von VIM3, ATG7 und TP53 in den Prostatakarzinomzellen

Um das Vorhandensein der vermuteten Komplexbpartner VIM3, ATG7 und TP53 in den Prostatakarzinom- und Kontrollzelllinien zu demonstrieren, wurde ein Western Blot mit unstimulierten Zellen der vier Zelllinien (BPH-1, DU145, PC3, LNCaP) im Vergleich angefertigt. Hierbei wurden die Komplexbpartner mit den jeweiligen Antikörpern nachgewiesen und die Expression dieser innerhalb der verschiedenen Zelllinien verglichen. Der Western Blot wurde wie in Abschnitt 3.2.2.5 und 3.2.2.6 beschrieben durchgeführt und die verwendeten Antikörper finden sich in Abschnitt 3.1.11. Als Referenzkontrolle diente GAPDH. Die gemessene Intensität der GAPDH-Bande wurde als äquivalent zu 100 Prozent definiert und die Berechnung der Intensität der anderen Banden erfolgte in Relation dazu. Die visuellen und graphischen Ergebnisse sind in Abbildung 5 dargestellt.

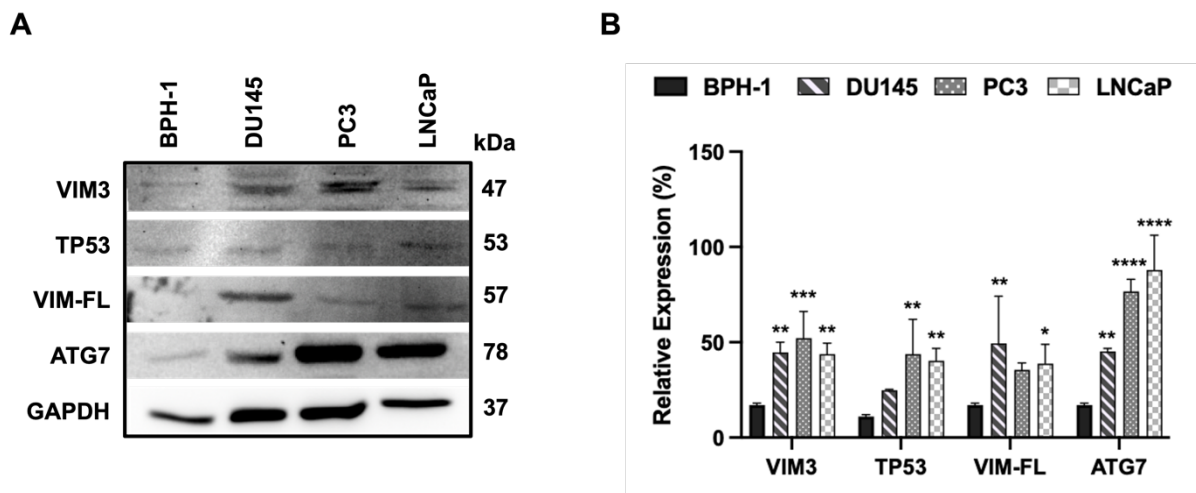


Abbildung 5: Western Blot von 25 µg Protein von BPH-1-, DU145-, PC3- und LNCaP-Zellen. (A) Western Blot Visualisierung des totalen Proteins der Komplexbpartner, sowie VIM-FL mit spezifischen Antikörpern. GAPDH diente als Referenz. (B) Für die graphische Darstellung wurde zunächst die Intensität der Banden mittels ImageJ ermittelt und dann in Relation zu GAPDH gesetzt. Die Unterschiede in der Expression der Komplexbpartner wurden dann zwischen den BPH-1-Zellen und den Prostatakarzinomzellen verglichen und auf Signifikanz geprüft. Der Graph und die statistische Auswertung wurden mit GraphPad Prism 9 erstellt.

Das Vorhandensein von VIM3, TP53, VIM-FL und ATG7 kann in allen Zelllinien mit Hilfe des Western Blots nachgewiesen werden. Alle betrachteten Proteine sind in den drei Prostatakarzinomzellen stärker exprimiert als in der Kontrollzelllinie BPH-1. Allerdings unterscheiden sich die Proteinkonzentrationen der einzelnen Komplexbpartner in den verschiedenen Zelllinien. Betrachtet man die Expression von VIM3 in den vier verschiedenen Zelllinien, so fällt auf, dass VIM3 im Vergleich zur Kontrollzelllinie in allen Prostatakarzinomzellen signifikant überexprimiert ist. Die Expression von VIM3 ist in den PC3-Zellen am höchsten.

Das Tumorsuppressorgen TP53 ist auch in allen drei Prostatakarzinomzellen höher exprimiert als in der Kontrollzelllinie. Die stärkere Expression ist allerdings nur für PC3-Zellen und

LNCaP-Zellen signifikant. Im Hinblick auf ATG7 fällt auf, dass der Unterschied zur Kontrollzelllinie hier am größten ist. ATG7 ist besonders stark in den PC3- und LNCaP-Zellen exprimiert. Anders sieht es mit dem Vorhandensein von VIM-FL in den drei Prostatakarzinomzelllinien aus. Die PC3-Zellen zeigen im Gegensatz zu den anderen beiden Prostatakarzinomzelllinien keine signifikante Überexpression von VIM-FL. Die Expression von VIM-FL ist in den DU145-Zellen am höchsten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass alle vermuteten Komplexpартner in den Prostatakarzinomzellen im Vergleich zur Kontrollzelllinie eine höhere Expression aufweisen.

Da eine Translokalisierung des Komplexes in den Zellkern vermutet wird, wurde die genaue Lokalisation der vermuteten Komplexpартner weiter mittels Immunfluoreszenz untersucht.

Dazu wurden die Komplexpартner mit FITC-konjugierten Antikörpern jeweils rot bzw. grün angefärbt. Der Zellkern wurde durch Färbung mit DAPI dargestellt. Nach Überlagerung der Fotos mithilfe von Adobe Photoshop, sieht man, dass sich die vermuteten Komplexpартner VIM3, ATG7 und TP53 vor allem im Zellkern aufhalten (Abbildung 6). Exemplarisch erfolgte der direkte Vergleich der Lokalisation von VIM-FL und VIM3 in den DU145-Zellen. VIM3 scheint im Vergleich zu VIM-FL vermehrt im Zellkern exprimiert zu sein.

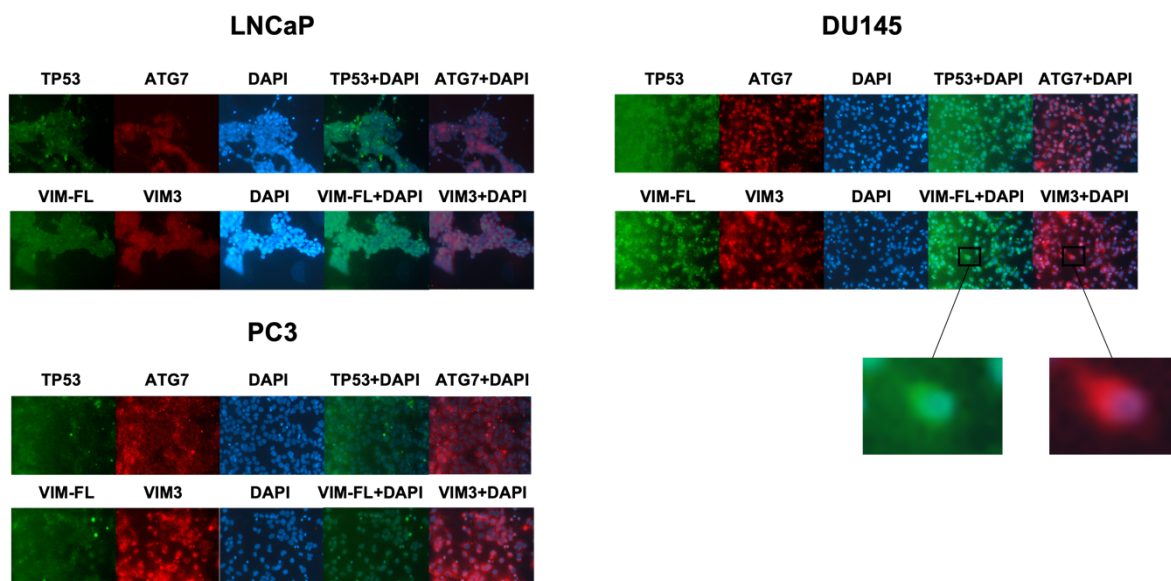


Abbildung 6: Darstellung der Komplexpартner im Zellkern der drei Prostatakarzinomzellen mittels Immunfluoreszenz. Färbung von TP53, ATG7, VIM-FL und VIM3 in allen Zelllinien mittels rot- oder grün-markierten Sekundärantikörpern. Die Bilder wurden mit Hilfe von Adobe Photoshop mit dem Bild der DAPI-Färbung fusioniert, um so die Lokalisation im Zellkern darzustellen. Die Vergrößerung bei den DU145-Zellen zeigt den direkten Vergleich der Lokalisation von VIM-FL (grün) und VIM3 (rot).

4.2. Komplexbildung von VIM3, ATG7 und TP53

Nachdem das generelle Vorhandensein der Komplexpартner in den betrachteten Zelllinien mittels Western Blot gezeigt wurde, sollte nun die vermutete Komplexbildung demonstriert werden. Der Nachweis des Komplexes bestehend aus VIM3, ATG7 und TP53 erfolgte mittels Immunpräzipitation. Dafür wurde je 500 µg totales Protein der stimulierten Prostatakarzinomzellen und der BPH-1-Zellen verwendet. Eine sichtbare Bande bestätigt die Interaktion der

untersuchten Komplexpartner. Der genaue Ablauf ist in Abschnitt 3.2.2.7 beschrieben. Um die Interaktion aller Komplexpartner zu zeigen, wurden alle Kombinationen mittels Immunpräzipitation untersucht. Abbildung 7 zeigt die Analysen der Komplexbildungen. Zunächst wurde das totale Protein der Zellen jeder Zelllinie mit dem TP53-Mastermix, bestehend aus Agarose-Beads und TP53 Antikörper, inkubiert. Anschließend sollten ATG7 und VIM3 in dem nun an TP53 gekoppelten Protein mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen werden. Das gleiche wurde mit dem VIM3- und ATG7-Mastermix durchgeführt. Dort erfolgte dann jeweils der Nachweis von ATG7 und TP53 bzw. VIM3 und TP53 mittels spezifischer Antikörper. In der Kontrollzelllinie sowie in den drei Prostatakarzinomzelllinien kann bei allen möglichen Kombinationen jeweils eine Bande detektiert werden.

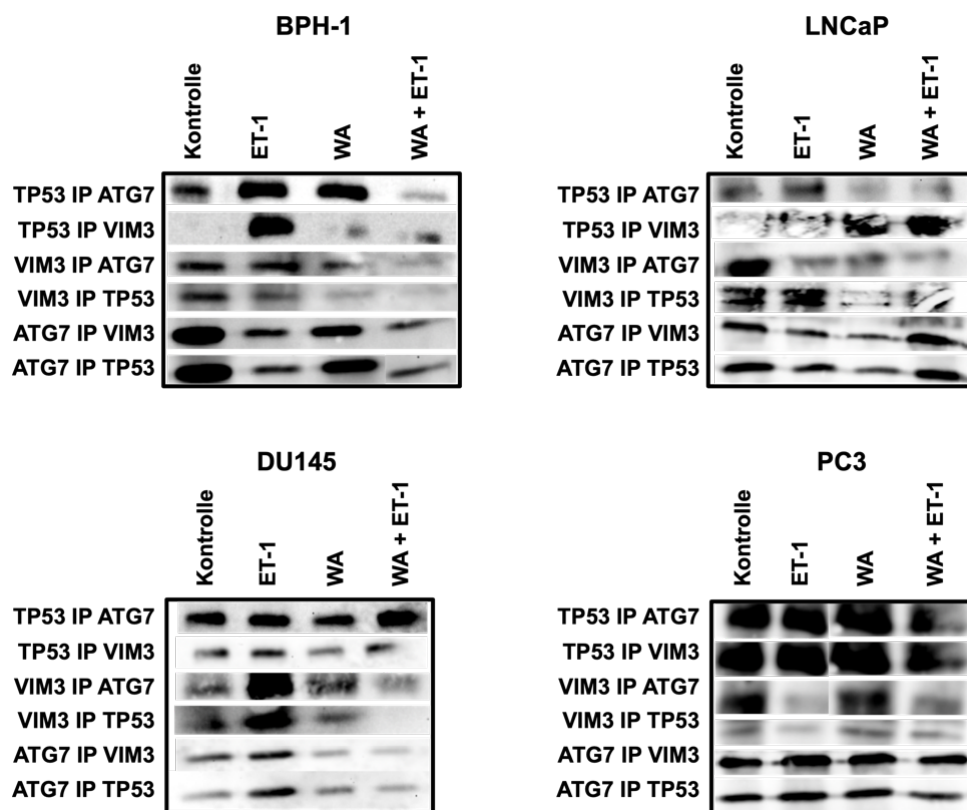


Abbildung 7: Darstellung der Immunpräzipitation mit 500 µg totalem Protein der Kontrollzelllinie BPH-1 und der Prostatakarzinomzelllinien. TP53 IP ATG7 heißt beispielsweise, dass zunächst ein Mastermix bestehend aus TP53 Antikörper und Agarose-Beads angefertigt wurde, welcher dann mit 500 µg totalem Protein der Zellen der jeweiligen Zelllinie inkubiert wurde. Der Nachweis von ATG7 erfolgte mittels Western Blot mit dem jeweiligen Antikörper. Eine vorhandene Bande indiziert, dass TP53 und ATG7 im Komplex vorliegen. Dies wurde für alle möglichen Kombinationen in allen Zelllinien durchgeführt.

4.3. Einfluss der Stimulation mit ET-1 und WA auf die Expression der Komplexpartner

Um den Effekt von ET-1 und WA auf die Prostatakarzinomzellen und die BPH-1-Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen wie in Abschnitt 3.2.1.4 beschrieben mit ET-1, WA und WA + ET-1 stimuliert. Die Auswirkung auf die Proteinkonzentrationen der Komplexpartner wurde mittels Western Blot bestimmt. Der Western Blot wurde wie in Abschnitt 3.2.2.5 und 3.2.2.6 beschrieben durchgeführt. Als Referenzkontrolle diente GAPDH.

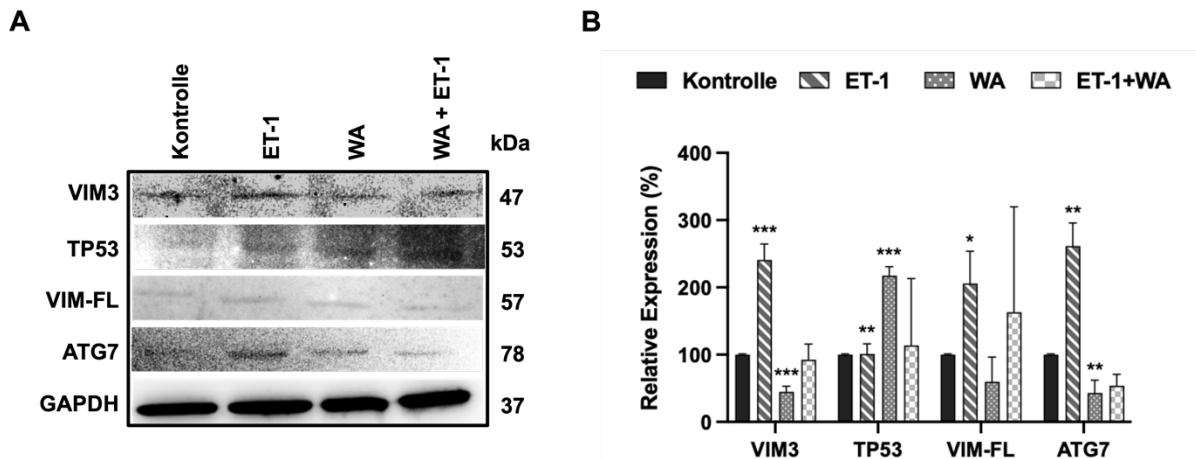


Abbildung 8: Western Blot von 25 µg Protein von stimulierten LNCaP-Zellen. (A) Western Blot von 25 µg totalem Protein mit Nachweis der Komplexpartner und VIM-FL mit den jeweiligen Antikörpern. (B) Der Graph wurde mit GraphPad Prism 9 erstellt und basiert auf der Analyse der Bandenintensitäten mit ImageJ. Die relative Menge von VIM3, VIM-FL, TP53 und ATG7 wurde in Relation zu GAPDH berechnet. Die Expression der Komplexpartner in den stimulierten Zellen wurde mit den unstimulierten Zellen verglichen und auf Signifikanz geprüft.

Abbildung 8 zeigt die Veränderung der Proteinexpression von VIM3, VIM-FL, TP53 und ATG7 nach oben beschriebener Stimulation der LNCaP-Zellen. Die Behandlung mit ET-1 führt zu einer signifikanten Steigerung der Proteinexpression von VIM3, TP53, VIM-FL und ATG7. Der stärkste Effekt wird hier bei VIM3 beobachtet. Auf der anderen Seite führt die Behandlung mit WA bei den Komplexpartnern VIM3, TP53 und ATG7 zu einer signifikanten Reduktion der Proteinexpression. Die kombinierte Stimulation mit ET-1 und WA führt bei VIM3 und VIM-FL in etwa zur selben Proteinkonzentration wie bei den unstimulierten Zellen, wohingegen die kombinierte Stimulation bei TP53 und ATG7 zu einer leichten Reduktion der Proteinkonzentration führt.

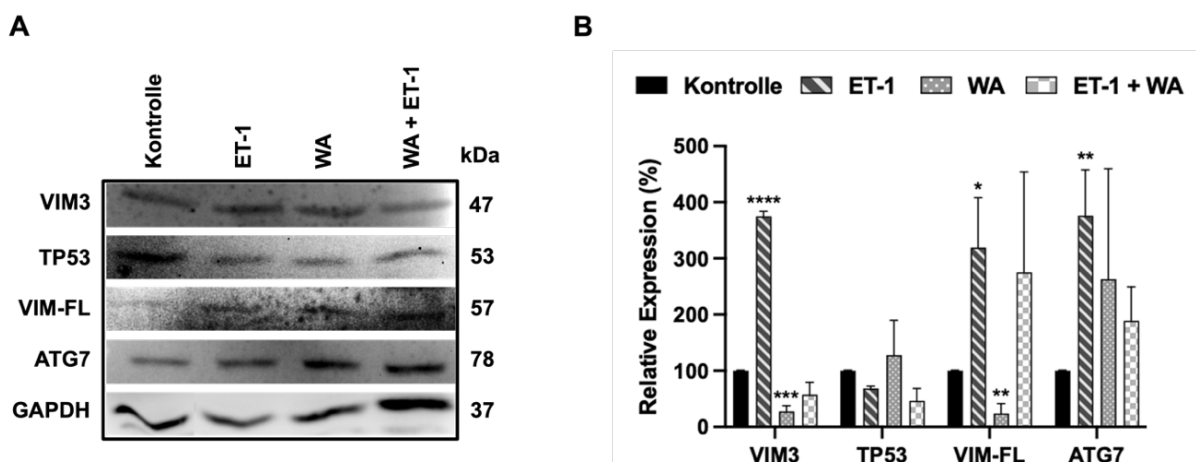


Abbildung 9: Western Blot von 25 µg Protein von stimulierten PC3-Zellen. (A) Western Blot von 25 µg totalem Protein mit Nachweis der Komplexpartner und VIM-FL mit den jeweiligen Antikörpern. (B) Der Graph wurde mit GraphPad Prism 9 erstellt und basiert auf der Analyse der Bandenintensitäten mit ImageJ. Die relative Menge von VIM3, VIM-FL, TP53 und ATG7 wurde bezogen auf GAPDH berechnet. Die Expression der Komplexpartner in den stimulierten Zellen wurde mit den unstimulierten verglichen und auf Signifikanz geprüft.

Abbildung 9 zeigt die Proteinexpression von VIM3, VIM-FL, TP53 und ATG7 nach Stimulation mit ET-1 und WA in PC3-Zellen. Die Stimulation mit ET-1 führt zu einer signifikanten Erhöhung der Proteinexpression von VIM3, VIM-FL und ATG7. Auch hier ist der Effekt der ET-1

Stimulation wie schon bei den LNCaP-Zellen am stärksten bei VIM3 ausgeprägt. Ein signifikanter Effekt kann für TP53 nicht beobachtet werden. Stimulation mit ET-1 führt hier zu einer Reduktion von TP53. Die Behandlung mit WA führt bei VIM3 und VIM-FL zu einer signifikanten Reduktion der Proteinexpression. Die Expression von TP53 und ATG7 nimmt nach Stimulation mit WA hingegen zu. Für die kombinierte Stimulation mit ET-1 und WA zeigt sich keine klare Tendenz. Die Behandlung führt bei VIM3 und TP53 zu einer leichten Reduktion der Proteinexpression. Auf der anderen Seite führt sie bei VIM-FL und ATG7 zu einer deutlichen Steigerung der Proteinexpression im Vergleich zu den unbehandelten Zellen.

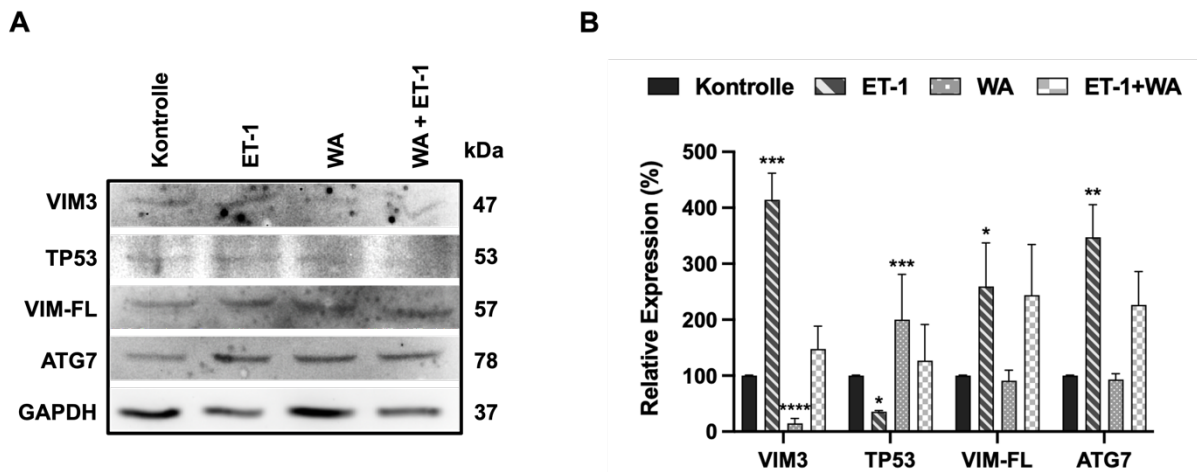


Abbildung 10: Western Blot von 25 µg Protein von stimulierten DU145-Zellen. (A) Western Blot von 25 µg totalem Protein mit Nachweis der Komplexpartner und VIM-FL mit den jeweiligen Antikörpern. (B) Der Graph wurde mit GraphPad Prism 9 erstellt und basiert auf der Analyse der Bandenintensitäten mit ImageJ. Die relative Menge von VIM3, VIM-FL, TP53 und ATG7 wurde bezogen auf GAPDH berechnet. Die Expression der Komplexpartner in den stimulierten Zellen wurde mit den unstimulierten Zellen verglichen und auf Signifikanz geprüft.

Abbildung 10 zeigt die Proteinexpression von VIM3, VIM-FL, TP53 und ATG7 nach Stimulation mit ET-1 und WA in DU145-Zellen. Auch hier zeigen sich ähnliche Ergebnisse wie bei den vorherigen beiden betrachteten Prostatakarzinomzelllinien. Stimulation mit ET-1 führt bei VIM3, VIM-FL und ATG7 zu einer erhöhten Expression. Wie auch bei den anderen beiden Prostatakarzinomzelllinien, ist dieser Effekt am stärksten bei VIM3 ausgeprägt. Stimulation mit ET-1 führt bei TP53 allerdings zu einer signifikanten Reduktion der Proteinexpression. Auch die Behandlung mit WA führt bei den DU145-Zellen zu einer Reduktion der Proteinexpression von VIM3, VIM-FL und ATG7. Allerdings ist hier der Effekt auf VIM-FL und ATG7 deutlich geringer ausgeprägt als auf VIM3. Für TP53 hingegen beobachtet man einen signifikanten Anstieg der TP53-Expression nach Behandlung mit WA. Die kombinierte Stimulation mit ET-1 und WA führt hier bei allen Proteinen zu einem Anstieg der Proteinexpression im Vergleich zu den unstimulierten Zellen.

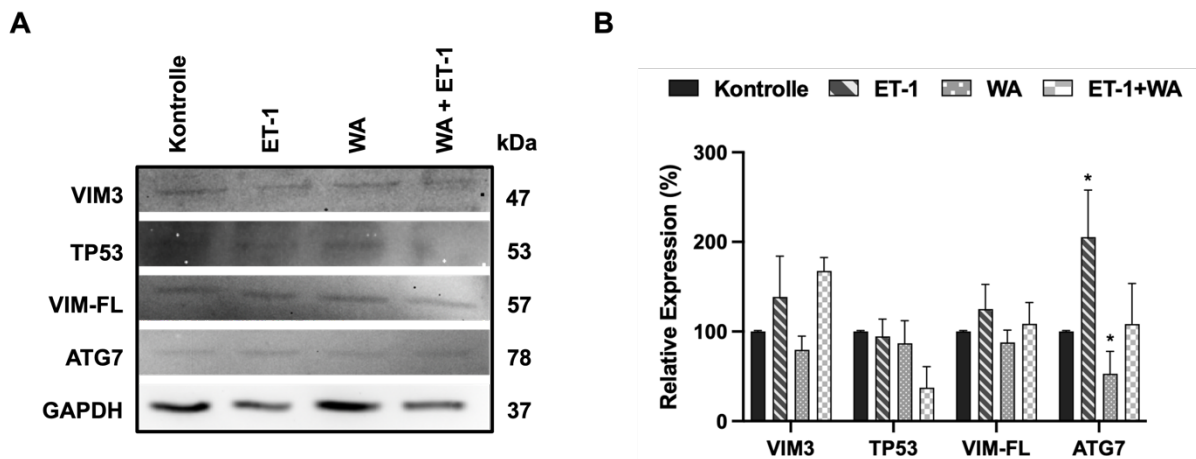


Abbildung 11: Western Blot von 25 µg Protein von stimulierten BPH-1-Zellen. (A) Western Blot von 25 µg totalem Protein mit Nachweis der Komplexpartner und VIM-FL mit den jeweiligen Antikörpern. (B) Der Graph wurde mit GraphPad Prism 9 erstellt und basiert auf der Analyse der Bandenintensität mit ImageJ. Die relative Menge von VIM3, VIM-FL, TP53 und ATG7 bezogen auf GAPDH wurde berechnet. Die Expression der Komplexpartner in den stimulierten Zellen wurde mit den unstimulierten Zellen verglichen und auf Signifikanz geprüft.

Abbildung 11 zeigt abschließend einen Western Blot der Kontrollzelllinie BPH-1 nach Stimulation mit den bekannten Reagenzien. Hier erkennt man zwar auch einen leichten steigenden Effekt von ET-1 auf VIM3, VIM-FL und ATG7 sowie eine Verminderung der Proteinexpression durch Behandlung mit WA, allerdings sind die Effekte hier im Gegensatz zu den Effekten in den Prostatakarzinomzellen nicht signifikant. Die einzige Ausnahme stellt ATG7 dar. Hier beobachtet man einen signifikanten Effekt sowohl durch Stimulation mit ET-1 als auch mit WA. Die kombinierte Stimulation mit ET-1 und WA führt bei VIM3, VIM-FL und ATG7 jeweils zu einem leichten Anstieg der Proteinexpression im Vergleich zu den unstimulierten Zellen und bei TP53 zu einer Reduktion der Proteinexpression. Der zuvor beobachtete Effekt von ET-1 und WA in den Prostatakarzinomzellen kann also in der Kontrollzelllinie nur bedingt nachgewiesen werden.

Es lässt sich festhalten, dass die Stimulation mit ET-1 bei allen Prostatakarzinomzelllinien zu einer signifikant erhöhten Expression von VIM3, VIM-FL und ATG7 führt. Die Stimulation mit ET-1 führt bei den LNCaP-Zellen zu einer erhöhten TP53-Expression, wohingegen sie in den DU145- und PC3-Zellen eine verminderte TP53-Expression hervorruft.

Die Behandlung mit WA führt bei allen Zelllinien zu einer Reduktion von VIM3 und VIM-FL. In den DU145- und PC3-Zellen führt die Stimulation mit WA zu einer erhöhten TP53-Expression. Bei den LNCaP-Zellen hingegen sinkt die TP53-Expression unter Stimulation mit WA.

Die ATG7-Expression wird in den DU145-Zellen durch die Stimulation mit WA nicht signifikant beeinflusst. In den PC3-Zellen ist die ATG7-Expression nach Stimulation mit WA erhöht, wohingegen sich in den LNCaP-Zellen eine verminderte ATG7-Expression zeigt.

4.4. Einfluss der Stimulation mit ET-1 und WA auf das Migrations- und Proliferationsverhalten der Zellen

Zur weiteren Analyse des Einflusses der Stimulantien ET-1 und WA auf das Migrations- und Proliferationsverhalten der Zellen wurden Kratz-Assays für die vier Zelllinien durchgeführt. Die genaue Versuchsdurchführung ist in Abschnitt 3.2.5 beschrieben. Zunächst wurde dem vollen Zellrasen ein Kratzer mit einer Pipettenspitze zugefügt. Nach 0 Stunden sowie nach 3, 6 und 24 Stunden wurde das Migrationsverhalten mit dem Mikroskop dokumentiert und anschließend graphisch und statistisch mit Hilfe von GraphPad Prism 9 ausgewertet.

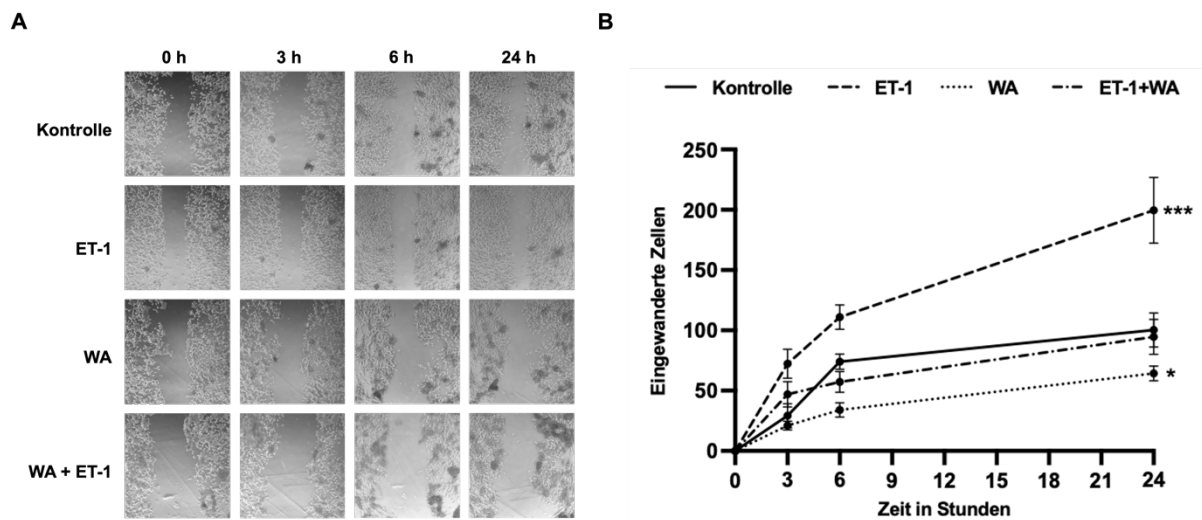
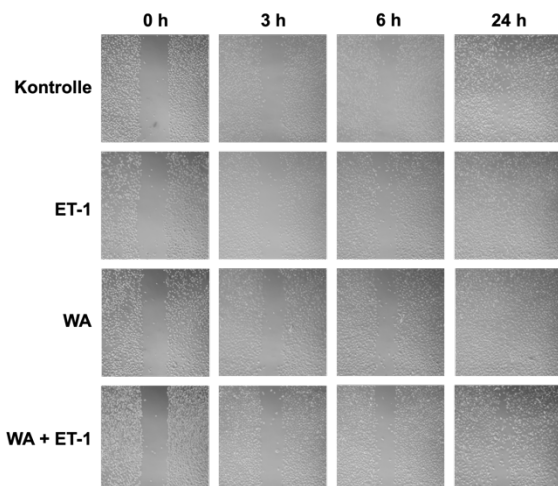


Abbildung 12: Kratz-Assay von LNCaP-Zellen nach Stimulation mit ET-1 und WA. (A) zeigt die Einwanderung der Zellen nach jeweils 0, 3, 6 und 24 Stunden (h). Die Fotos wurden mit dem Mikroskop erstellt. In (B) ist diese Einwanderung graphisch dargestellt, indem die eingewanderten Zellen zu den jeweiligen Zeitpunkten manuell ausgezählt wurden. Das genaue Vorgehen ist in Abschnitt 3.2.5 beschrieben. Weiterhin wurde zum Zeitpunkt $t = 24$ Stunden überprüft, ob sich die Anzahl der eingewanderten Zellen nach Stimulation mit ET-1 bzw. WA signifikant von der Anzahl der unstimulierten Zellen unterscheidet.

Zunächst wird das Migrationsverhalten der LNCaP-Zellen untersucht (Abbildung 12). Vergleicht man die Anzahl der eingewanderten Zellen nach 24 Stunden, so zeigt sich, dass die mit ET-1 stimulierten Zellen deutlich schneller migrieren. Nach 24 Stunden sind signifikant mehr Zellen eingewandert im Vergleich zu den Kontrollzellen. Auf der anderen Seite beobachtet man eine verringerte Migrationsrate bei den Zellen, welche zu Beginn mit WA behandelt wurden. Hier sind nach 24 Stunden signifikant weniger Zellen eingewandert im Vergleich zu den nicht stimulierten Zellen. Die Zellen, welche sowohl mit ET-1 als auch mit WA stimuliert wurden, verhalten sich ähnlich wie die unstimulierten Zellen. Sie migrieren etwas langsamer als die Kontrollzellen, jedoch stellt dies keinen signifikanten Unterschied dar.

A



B

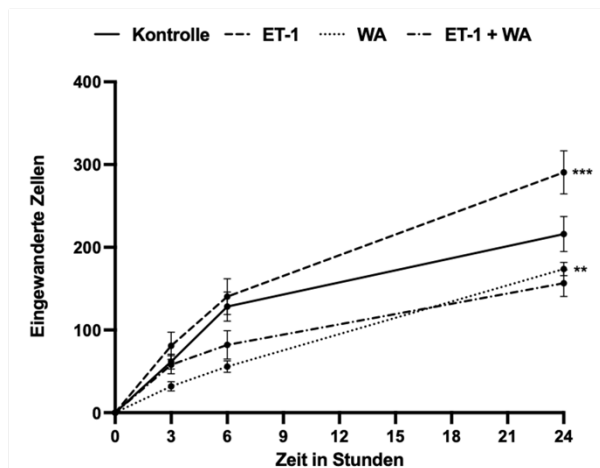
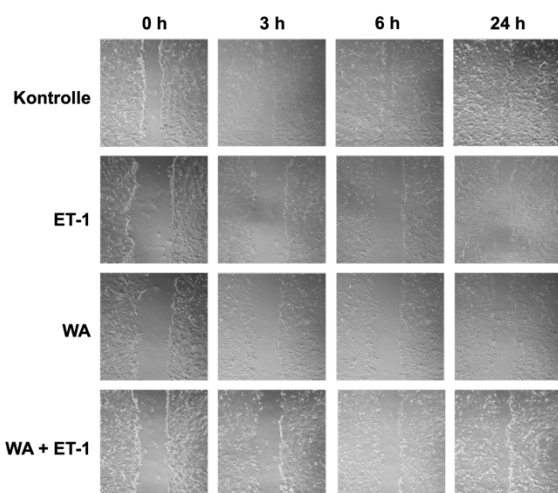


Abbildung 13: Kratz-Assay von PC3-Zellen nach Stimulation mit ET-1 und WA. (A) zeigt die Einwanderung der Zellen nach jeweils 0, 3, 6 und 24 Stunden. Die Fotos wurden mit dem Mikroskop erstellt. In (B) ist diese Einwanderung graphisch dargestellt, indem die eingewanderten Zellen zu den jeweiligen Zeitpunkten manuell ausgezählt wurden. Das genaue Vorgehen ist in Abschnitt 3.2.5 beschrieben. Weiterhin wurde zum Zeitpunkt $t = 24$ Stunden überprüft, ob sich die Anzahl der eingewanderten Zellen nach Stimulation mit ET-1 bzw. WA signifikant von der Anzahl der unstimulierten Zellen unterscheidet.

Bei den PC3-Zellen erfolgt die stärkste Migration der Zellen unter Stimulation mit ET-1 (Abbildung 13). Nach 24 Stunden sind signifikant mehr ET-1 stimulierte Zellen eingewandert, verglichen mit unstimulierten Zellen. Die Migration der Zellen unter Stimulation mit WA ist bis circa 20 Stunden nach Stimulation geringer als unter der kombinierten Stimulation mit WA + ET-1. Danach liegen die beiden ungefähr gleich auf. Auch die mit WA stimulierten Zellen sind nach 24 Stunden signifikant langsamer eingewandert als die unstimulierten Zellen.

A



B

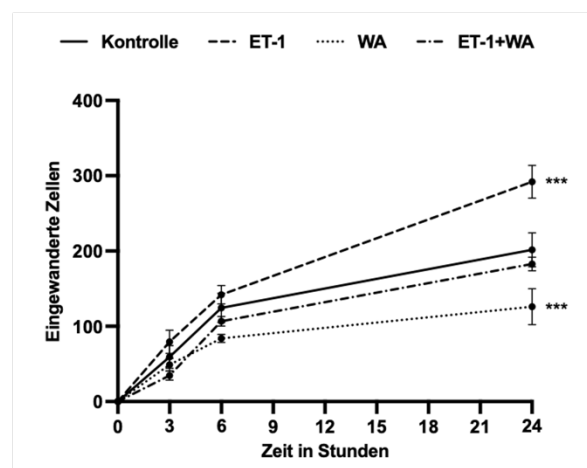


Abbildung 14: Kratz-Assay von DU145-Zellen nach Stimulation mit ET-1 und WA. (A) zeigt die Einwanderung der Zellen nach jeweils 0, 3, 6 und 24 Stunden. Die Fotos wurden mit dem Mikroskop erstellt. In (B) ist diese Einwanderung graphisch dargestellt, indem die eingewanderten Zellen zu den jeweiligen Zeitpunkten manuell ausgezählt wurden. Das genaue Vorgehen ist in Abschnitt 3.2.5 beschrieben. Weiterhin wurde zum Zeitpunkt $t = 24$ Stunden überprüft, ob sich die Anzahl der eingewanderten Zellen nach Stimulation mit ET-1 bzw. WA signifikant von der Anzahl der unstimulierten Zellen unterscheidet.

Die DU145-Zellen verhalten sich ähnlich wie die PC3- und LNCaP-Zellen (Abbildung 14). Die mit ET-1 stimulierten Zellen migrieren deutlich schneller als die unstimulierten Zellen. Nach 24 Stunden sind signifikant mehr stimulierte Zellen eingewandert im Vergleich zu den Kontrollzellen. Nach Stimulation mit WA verläuft die Zellmigration deutlich langsamer und wie bereits bei den anderen Prostatakarzinomzellen sind auch hier nach 24 Stunden signifikant weniger Zellen eingewandert im Vergleich zu den unstimulierten Zellen. Die Zellen, welche sowohl mit ET-1 als auch mit WA stimuliert wurden, migrieren schneller als die Zellen unter alleiniger WA Stimulation aber immer noch langsamer als die unstimulierten Zellen.

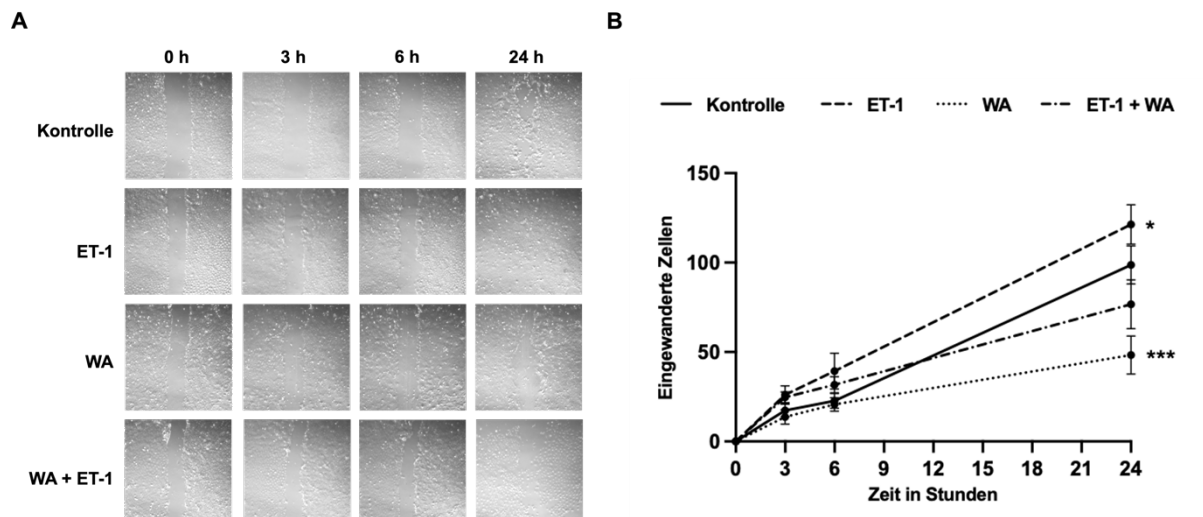


Abbildung 15: Kratz-Assay von BPH-1-Zellen nach Stimulation mit ET-1 und WA. (A) zeigt die Einwanderung der Zellen nach jeweils 0, 3, 6 und 24 Stunden. Die Fotos wurden mit dem Mikroskop erstellt. In (B) ist diese Einwanderung graphisch dargestellt, indem die eingewanderten Zellen zu den jeweiligen Zeitpunkten manuell ausgezählt wurden. Das genaue Vorgehen ist in Abschnitt 3.2.5 beschrieben. Weiterhin wurde zum Zeitpunkt $t = 24$ Stunden überprüft, ob sich die Anzahl der eingewanderten Zellen nach Stimulation mit ET-1 bzw. WA signifikant von der Anzahl der unstimulierten Zellen unterscheidet.

Die BPH-1-Zellen dienen als Kontrollzelllinie (Abbildung 15). Allerdings lassen sich auch hier die zuvor beschriebenen Effekte beobachten. ET-1 hat einen verstärkenden Effekt auf die Zellmigration und nach 24 Stunden sind signifikant mehr Zellen eingewandert als bei den unstimulierten Zellen. Die Behandlung mit WA bremst die Migration signifikant und die kombinierte Stimulation führt zu einer etwas verringerten Migration im Vergleich zur Kontrolle.

Vergleicht man nun abschließend die Zellen untereinander, so lässt sich zusammenfassend festhalten, dass ET-1 auf alle Prostatakarzinomzelllinien sowie auf die Kontrollzelllinie einen verstärkenden Effekt auf die Migration der Zellen hat, wohingegen die Behandlung mit WA die Migration bremst. Die kombinierte Behandlung mit WA + ET-1 führt in allen Fällen zu einer etwas verringerten Migration im Vergleich zu den nicht stimulierten Zellen.

Im Allgemeinen migrieren die BPH-1-Zellen deutlich langsamer als die Prostatakarzinomzellen. Unter den drei Prostatakarzinomzellen wandern die LNCaP-Zellen im Vergleich am langsamsten ein.

4.5. Mögliche Interaktion von VIM3 und der MicroRNA-371a-3p

4.5.1. Darstellung einer Interaktion zwischen VIM3 und der MicroRNA-371a-3p

Eine weitere Hypothese in der vorliegenden Arbeit ist, dass die MicroRNA-371a-3p ein mögliches Zielgen des Komplexes bestehend aus VIM3, ATG7 und TP53 darstellt. Um die Interaktion zu bestätigen, wurde ein VIM3-Pulldown mit nachfolgender PCR und anschließendem Polyacrylamid-Gel (12 %) zur Visualisierung des PCR-Produkts für die Promoterregion der pri-MicroRNA-371a-3p durchgeführt. Der VIM3 Antikörper wurde an Agarose-Beads gekoppelt und dann mit der zuvor isolierten DNA inkubiert (Abschnitt 3.2.3.1 und 3.2.3.2). Nach der VIM3 Immunpräzipitation folgte eine PCR-Analyse mit einem spezifischen Primer für die Promoterregion der pri-MicroRNA-371a-3p. Durch die Kopplung von VIM3 an Agarose-Beads konnte mit der nachfolgenden PCR DNA analysiert werden, welche hauptsächlich an VIM3 gebunden ist. Zur Kontrolle wurde auch DNA verwendet, welche nicht mit dem VIM3 Antikörper / Agarose-Beads Mastermix inkubiert wurde.

Sowohl bei der an VIM3-gekoppelten DNA als auch bei der „normalen“ DNA der Prostatakarzinomzellen kann ein PCR-Produkt nachgewiesen werden. Eine Interaktion von VIM3 und der MicroRNA-371a-3p kann also bestätigt werden.



Abbildung 16: Visualisierung des PCR-Produkts für die Promoterregion der pri-MicroRNA-371a-3p. Für den VIM3-Pulldown wurde der VIM3 Antikörper zunächst an Agarose-Beads gekoppelt (1:10) und anschließend mit den Proben aller Zelllinien inkubiert. Danach folgte die DNA-Isolation dieser Proben (VIM3-Pulldown) sowie der Proben ohne vorherigen VIM3-Pulldown (Kontrolle). Im Anschluss an die DNA-Extraktion wurde eine PCR-Analyse mit einem spezifischen Primer für die Promoterregion der pri-MicroRNA-371a-3p durchgeführt. Zur Visualisierung des PCR-Produkts wurde ein zwölfprozentiges Polyacrylamid-Gel verwendet, welches für 40 Minuten bei 100 V lief. 1x TBE diente als Laufpuffer und ein 50 bp vorgefärbter DNA-Marker diente als Leiter. Fluoreszenzsignale wurden mit dem Intas Chemostar Reader für grüne (488 nm) und blaue (625 nm) Kanäle detektiert.

4.5.2. Elektrophoretischer Mobilitäts-Shift-Assay (EMSA)

Um die Interaktion zwischen VIM3 und der Promoterregion der pri-MicroRNA-371a-3p weiter zu analysieren, wurde ein elektrophoretischer Mobilitäts-Shift-Assay (EMSA) durchgeführt. Hierbei wurden speziell entworfene und Cy5-gelabelte Oligonukleotide, welche die Promoterregion der pri-MicroRNA-371a-3p als Zielgen haben, verwendet. Die Bindung des VIM3 Antikörper an den VIM3-gelabelten Probenkomplex führt zur Bildung eines Komplexes, welcher größer ist und somit eine verminderte elektrophoretische Mobilität aufweist. Dieser Umstand wird mit der sogenannten „Supershift“-Bande dargestellt. Die Supershift-Formation bestätigt demnach die Bindung von VIM3 an die gelabelten DNA-Oligonukleotide

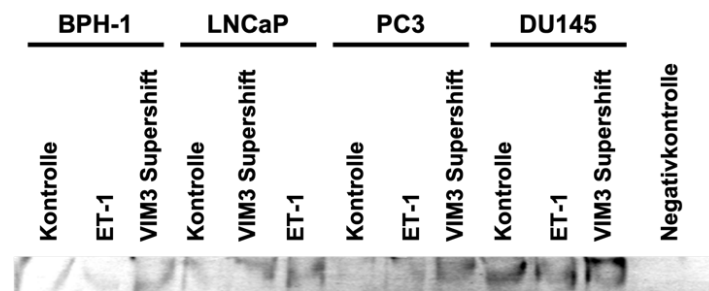


Abbildung 17: Pri-MicroRNA-371a-3p Promoterregion EMSA für die verschiedenen Prostatakarzinomzelllinien und die BPH-1-Zelllinie. Der VIM3 Antikörper wurde für den Supershift verwendet. 20 µg Proteinextrakt der Prostatakarzinomzellen wurden für den Supershift mit 5 µg VIM3 Antikörper inkubiert und anschließend mit Cy5-markierten Oligonukleotiden, welche spezifisch für die vermutete Promoterregion der pri-MicroRNA-371a-3p sind, inkubiert. Für die Detektion der möglichen Bindung wurden die Proben auf ein achtprozentiges nicht-denaturierendes Polyacrylamid-Gel aufgetragen und in 1x TBE-Puffer bei 80 V für 2 Stunden aufgetrennt. Zur Sichtbarmachung der Banden wurde das Gel mit dem Intas Chemostar Reader ausgelesen (660 nm).

4.6. Auswirkung der MicroRNA-371a-3p auf das Migrations- und Proliferationsverhalten der Zellen

Die PCR, in der die VIM3-gekoppelte DNA auf eine Interaktion mit der MicroRNA-371a-3p untersucht wurde, zeigte im Polyacrylamid-Gel ein PCR-Produkt. In einem weiteren Schritt sollte deshalb der Einfluss der MicroRNA-371a-3p auf das Migrationsverhalten der Zellen untersucht werden. Dies wurde mittels Agarose-Drop wie in Abschnitt 3.2.6 beschrieben durchgeführt. Die in den Agarosetropfen ausgesetzten Zellen wurden direkt zu Beginn, nach 24 Stunden und nochmals nach 48 Stunden fotografiert (Abbildung 18).

Vergleicht man die unstimulierten Zellen mit den Zellen, welche mit der MicroRNA-371a-3p stimuliert wurden, so zeigt sich für die PC3- und DU145-Zellen eine verstärkte Zellmigration unter Transfektion mit der MicroRNA-371a-3p. Der Effekt scheint bei den PC3-Zellen größer zu sein als bei den DU145-Zellen. Bei den DU145-Zellen zeigt sich der Effekt erst nach 48h, wohingegen bei den PC3-Zellen bereits ein Unterschied in der Zellmigration nach 24 Stunden beobachtet werden kann.

Aufgrund mangelnder Adhärenz der LNCaP-Agarose-Drops kann die Zellmigration hier nicht sicher beurteilt werden.

Ähnlich wie die PC3- und DU145-Zellen zeigen auch die BPH-1-Zellen unter Transfektion mit der MicroRNA-371a-3p eine verstärkte Zellmigration. Auch hier kann ein Effekt bereits nach 24 Stunden beobachtet werden. Vergleicht man die migrierten Zellen nach 24 Stunden und nach 48 Stunden, so fällt auf, dass die Zunahme der Migration nach 24 Stunden geringer ist als bei den PC3-Zellen.

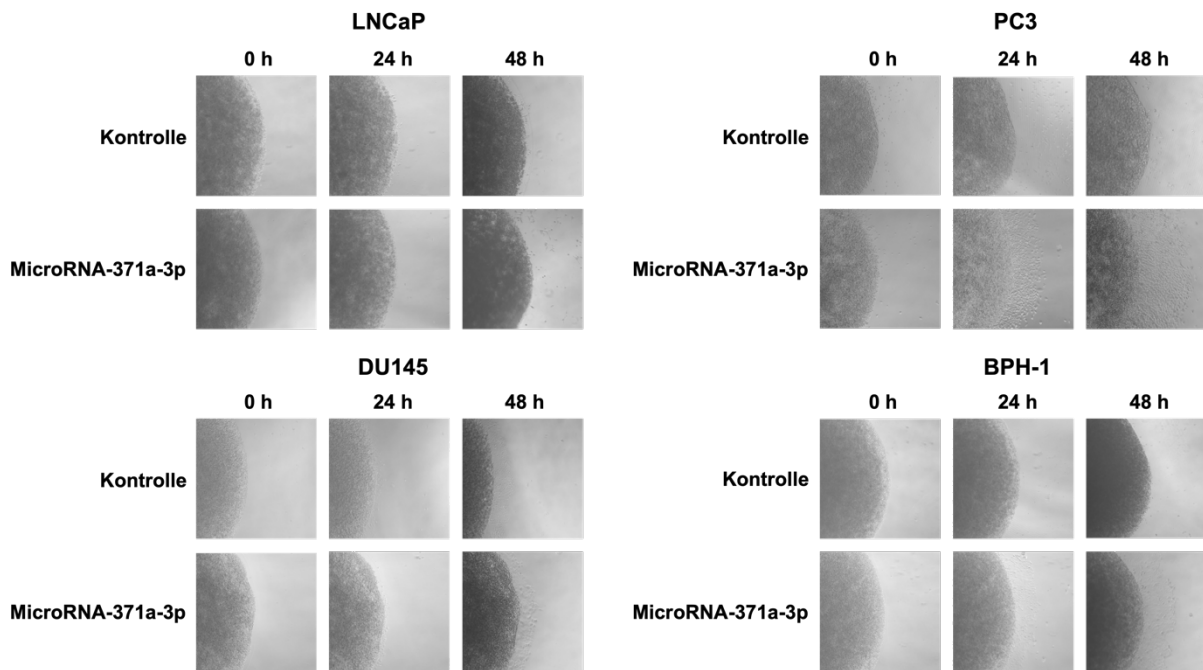


Abbildung 18: Agarose-Drop der Prostatakarzinomzellen und der BPH-1-Zellen. Mit dem Agarose-Drop wurde der Effekt einer Transfektion mit der MicroRNA-371a-3p auf die Migration der Zellen untersucht. Hierbei erfolgte ein Vergleich mit unstimulierten Zellen (Kontrolle). Mit dem Mikroskop wurden Bilder direkt zu Beginn, nach 24 Stunden (h) und nach 48 Stunden (h) angefertigt. Die Agarose-Drops wurden in Triplikaten angelegt.

4.7. VIM3-Knockdown mittels siRNA gegen VIM3

Da in dieser Arbeit vermutet wird, dass VIM3 eine essenzielle Rolle für die Entwicklung und Progression des Prostatakarzinoms darstellt, sollte nun die Auswirkung eines VIM3-Knockdowns auf den Komplex und die Prostatakarzinomzellen untersucht werden. Dazu wurden die verschiedenen Zellen zunächst mit der siRNA VIM3 für 72 Stunden inkubiert. Der genaue Prozess ist in Abschnitt 3.2.1.4 beschrieben.

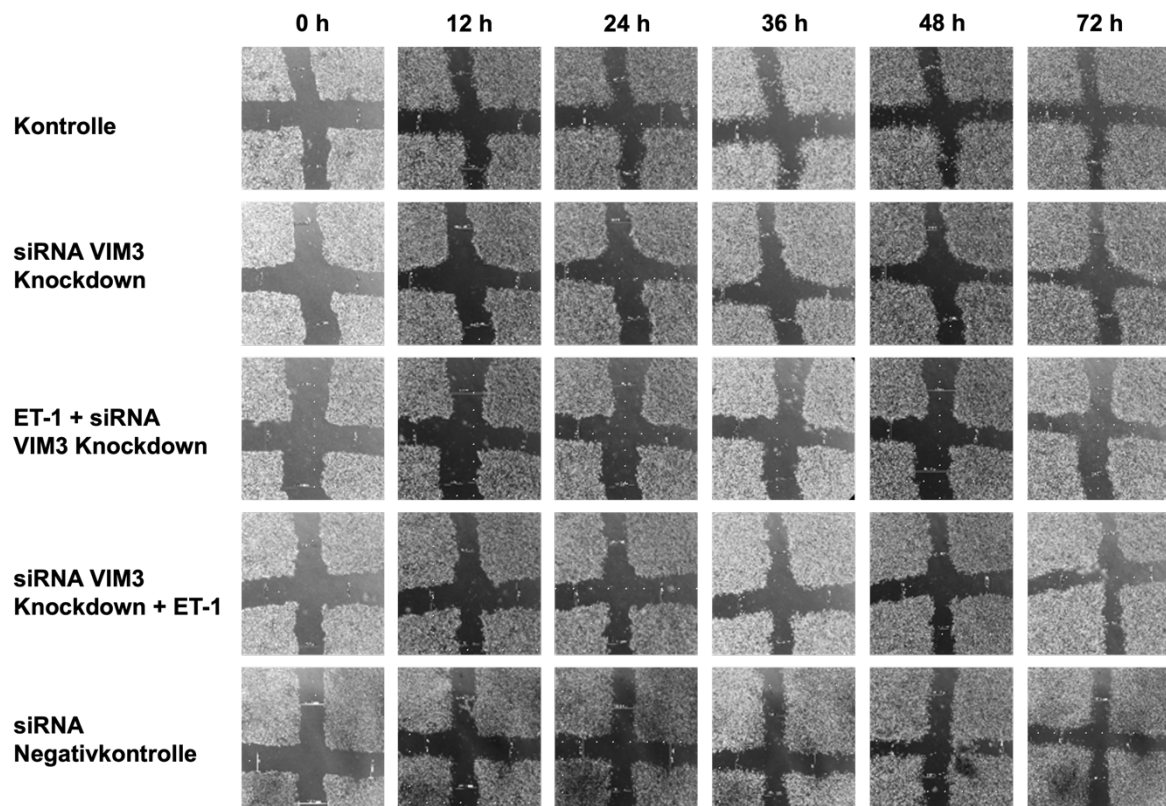
4.7.1. Migrations- und Proliferationsverhalten der Zellen nach VIM3-Knockdown

Zur Analyse des Migrationsverhaltens der Prostatakarzinomzellen und der Kontrollzellen wurde ein Kratz-Assay durchgeführt. Die Durchführung erfolgte analog zu den vorherigen Kratz-Assays.

In Abbildung 19 ist das Migrationsverhalten der LNCaP-Zellen nach siRNA VIM3-Knockdown dargestellt. Die verschiedenen Stimulationskombinationen sind Abschnitt 3.2.1.4 zu entnehmen. Man kann beobachten, dass die Zellen, die mit ET-1 und der siRNA behandelt wurden, am schnellsten migrieren. Hierbei ist die Migration im direkten Vergleich bei den Zellen leicht erhöht, welche erst die Behandlung mit ET-1 erhielten und im Anschluss mit der siRNA VIM3 behandelt wurden. Nach 72 Stunden zeigt sich zudem eine signifikant langsamere Migration der Zellen, welche mit der siRNA VIM3 behandelt wurden und der Kontrollzellen im Vergleich zu den Zellen, welche mit ET-1 und der siRNA behandelt wurden. Die Behandlung

mit der siRNA VIM3 allein resultiert in einer leichten Reduktion der Migration verglichen mit den unstimulierten Zellen.

A



B

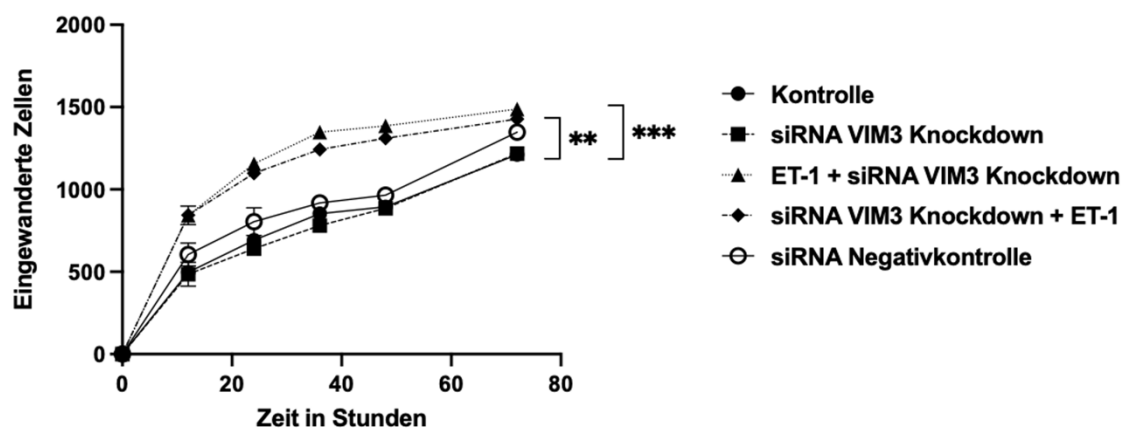
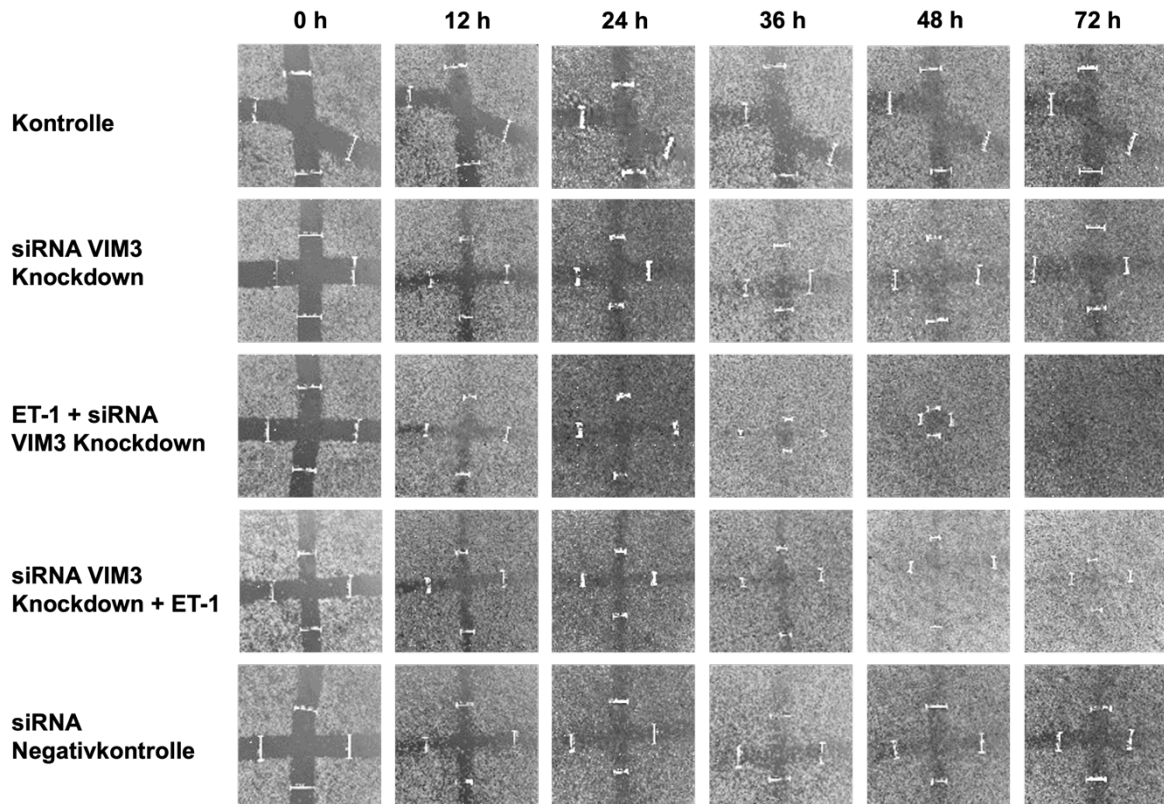


Abbildung 19: Kratz-Assay von LNCaP-Zellen nach siRNA VIM3-Knockdown und ET-1 Stimulation nach 0, 12, 24, 36, 48 und 72 Stunden (h). (A) zeigt die Einwanderung der Zellen nach jeweils 0, 12, 24, 36, 48 und 72 Stunden (h). Die Fotos wurden mit dem Mikroskop erstellt. In (B) ist diese Einwanderung graphisch dargestellt, indem die eingewanderten Zellen zu den jeweiligen Zeitpunkten manuell ausgezählt wurden. Das genaue Vorgehen ist in Abschnitt 3.2.5 beschrieben. Weiterhin wurde zum Zeitpunkt $t = 72$ Stunden überprüft, ob sich die Anzahl der eingewanderten Zellen je nach Stimulation signifikant unterscheidet.

Für die PC3-Zellen kann man beobachten, dass eine Stimulation mit ET-1 und der siRNA VIM3, unabhängig von der Reihenfolge der Zugabe der Stimulantien zu einer signifikanten Zunahme der Migration im Vergleich zu den siRNA VIM3-Knockdown-Zellen führt (Abbildung 20). Im Gegensatz zu den LNCaP-Zellen zeigt sich hier ein leichter Anstieg der Migration nach

der siRNA VIM3 Behandlung im Vergleich zu den unstimulierten Zellen. Vergleicht man die siRNA VIM3 behandelten Zellen mit den Zellen, die mit der Negativkontrolle behandelt wurden, so zeigt sich eine Reduktion der Migration.

A



B

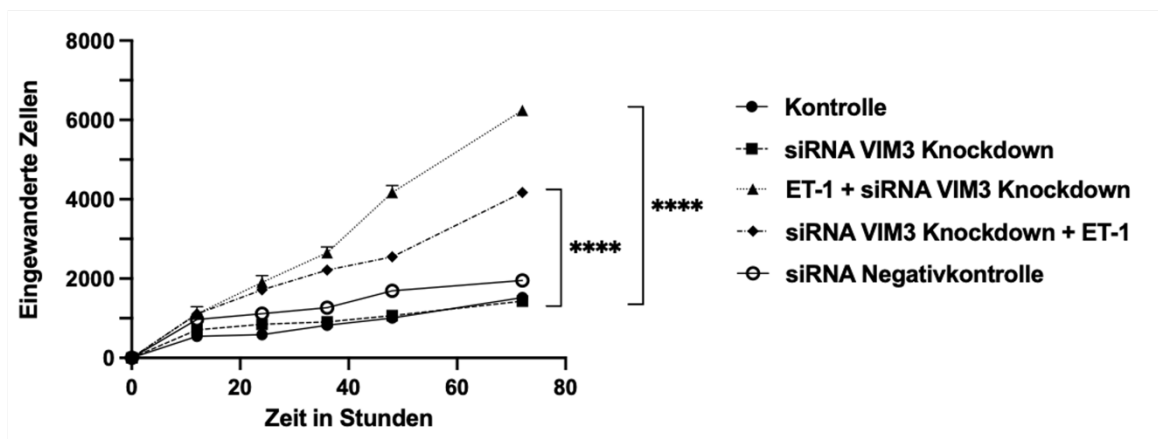
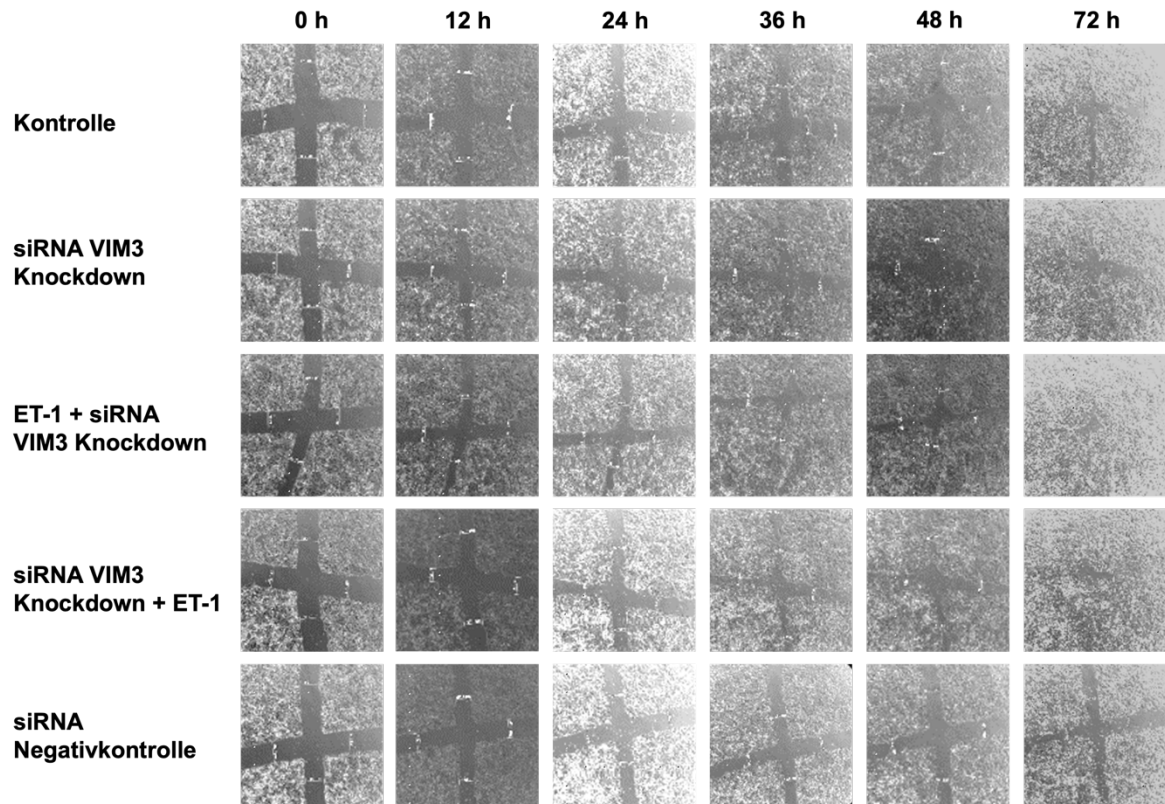


Abbildung 20: Kratz-Assay von PC3-Zellen nach siRNA VIM3-Knockdown und ET-1 Stimulation nach 0, 12, 24, 36, 48 und 72 Stunden (h). (A) zeigt die Einwanderung der Zellen nach jeweils 0, 12, 24, 36, 48 und 72 Stunden. Die Fotos wurden mit dem Mikroskop erstellt. In (B) ist diese Einwanderung graphisch dargestellt, indem die eingewanderten Zellen zu den jeweiligen Zeitpunkten manuell ausgezählt wurden. Das genaue Vorgehen ist in Abschnitt 3.2.5 beschrieben. Weiterhin wurde zum Zeitpunkt $t = 72$ Stunden überprüft, ob sich die Anzahl der eingewanderten Zellen je nach Stimulation signifikant unterscheidet.

Abbildung 21 zeigt das Migrationsverhalten der DU145-Zellen. Es zeigt sich ein ähnliches Bild, wie bereits bei den LNCaP- und PC3-Zellen. Die mit ET-1 und der siRNA stimulierten Zellen migrieren signifikant schneller als die Kontrollzellen und die Zellen, die nur mit der siRNA VIM3

behandelt wurden. Eine alleinige Stimulation mit der siRNA VIM3 führt zu einer signifikanten Reduktion der Migration. Auch in den DU145-Zellen kann kein Unterschied zwischen den unstimulierten Zellen und der Negativkontrolle festgestellt werden.

A



B

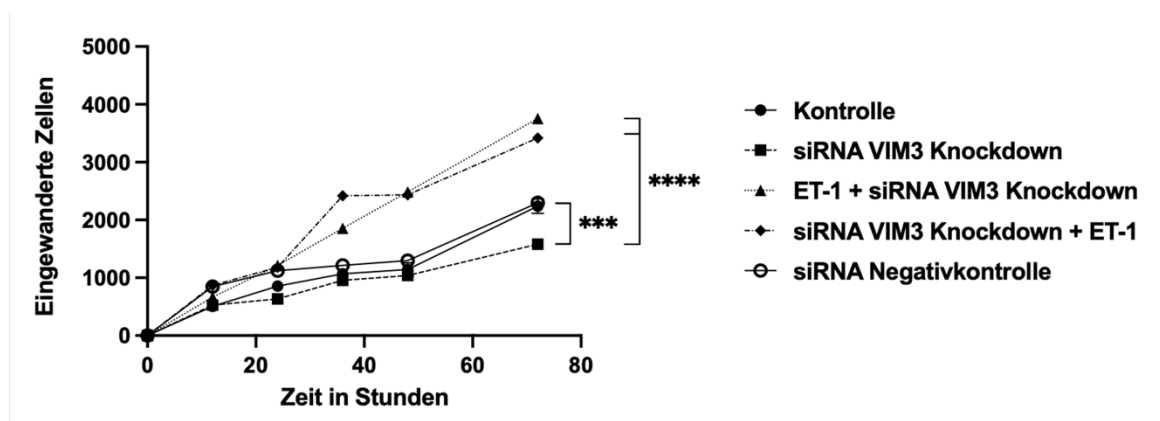
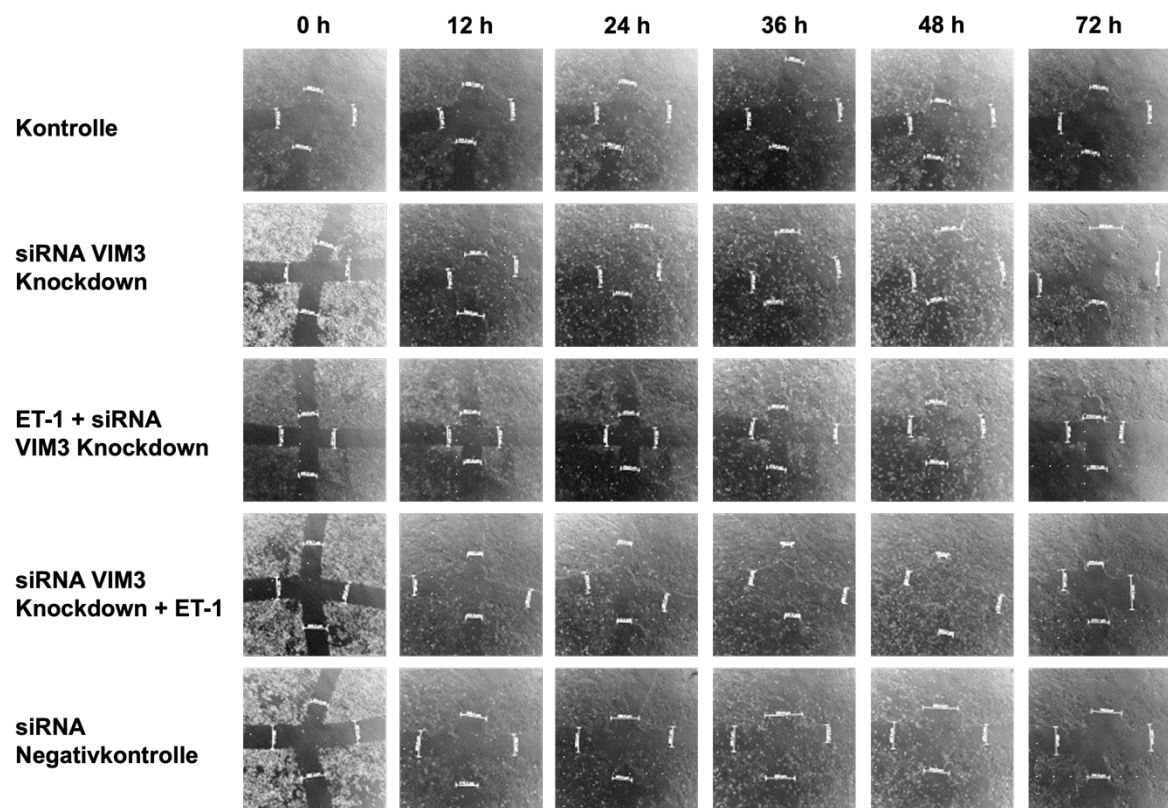


Abbildung 21: Kratz-Assay von DU145-Zellen nach siRNA VIM3-Knockdown und ET-1 Stimulation nach 0, 12, 24, 36, 48 und 72 Stunden (h). (A) zeigt die Einwanderung der Zellen nach jeweils 0, 12, 24, 36, 48 und 72 Stunden. Die Fotos wurden mit dem Mikroskop erstellt. In (B) ist diese Einwanderung graphisch dargestellt, indem die eingewanderten Zellen zu den jeweiligen Zeitpunkten manuell ausgezählt wurden. Das genaue Vorgehen ist in Abschnitt 3.2.5 beschrieben. Weiterhin wurde zum Zeitpunkt $t = 72$ Stunden überprüft, ob sich die Anzahl der eingewanderten Zellen je nach Stimulation signifikant unterscheidet.

Die Ergebnisse des Kratz-Assays der BPH-1-Zellen nach siRNA VIM3-Knockdown sind in Abbildung 22 dargestellt. Auch hier wurden nach 72 Stunden die Unterschiede in der Anzahl migrierter Zellen auf Signifikanz überprüft. Es zeigt sich, dass die Zellen, die vor dem siRNA

VIM3-Knockdown mit ET-1 stimuliert wurden signifikant schneller eingewandert sind als die nicht stimulierten Zellen. Die gleichen Beobachtungen können für die Zellen, die erst mit dem siRNA Transfektionsreagenz und dann mit ET-1 behandelt wurden, gemacht werden. Die siRNA VIM3-Knockdown-Zellen zeigen eine reduzierte Migrationsrate im Vergleich zu den unstimulierten Zellen. Die unstimulierten Zellen und die Zellen, die mit der universellen Negativkontrolle behandelt wurden, zeigen keinen signifikanten Unterschied in der Migration.

A



B

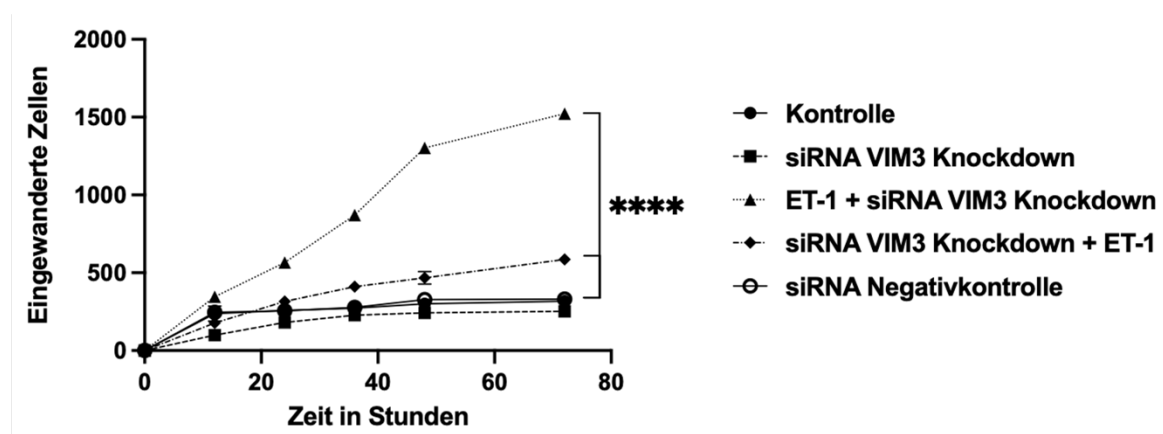


Abbildung 22: Kratz-Assay von BPH-1-Zellen nach siRNA VIM3-Knockdown und ET-1 Stimulation nach 0, 12, 24, 36, 48 und 72 Stunden (h). (A) zeigt die Einwanderung der Zellen nach jeweils 0, 12, 24, 36, 48 und 72 Stunden. Die Fotos wurden mit dem Mikroskop erstellt. In (B) ist diese Einwanderung graphisch dargestellt, indem die eingewanderten Zellen zu den jeweiligen Zeitpunkten manuell ausgezählt wurden. Das genaue Vorgehen ist in Abschnitt 3.2.5 beschrieben. Weiterhin wurde zum Zeitpunkt $t = 72$ Stunden überprüft, ob sich die Anzahl der eingewanderten Zellen je nach Stimulation signifikant unterscheidet.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine kombinierte Stimulation mit ET-1 und dem siRNA Transfektionsreagenz mit einer erhöhten Zellmigration einhergeht im Vergleich zu den unstimulierten Zellen. Ein Knockdown von VIM3 resultiert in einer verlangsamten Migration der Zellen verglichen mit den unstimulierten Zellen und der Negativkontrolle.

4.7.2. MicroRNA-371a-3p-Expression nach VIM3-Knockdown

In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass der Komplex bestehend aus VIM3, ATG7 und TP53 an der Transkription der MicroRNA-371a-3p beteiligt ist. Außerdem ist bekannt, dass eine Hochregulation der MicroRNA-371a-3p zu einer verminderten Expression des Tumorsuppressorgens PTEN führt. Nun sollte untersucht werden, ob ein VIM3-Knockdown zu einer verminderten Expression der MicroRNA-371a-3p führt und somit eine erhöhte PTEN-Expression zur Folge haben könnte. Um den Effekt des VIM3-Knockdowns auf die MicroRNA-371a-3p zu analysieren, wurde die MicroRNA-371a-3p zunächst aus den Zellen isoliert und nach anschließender cDNA-Synthese wurde eine qRT-PCR durchgeführt (Abbildung 23). Für alle Prostatakarzinomzelllinien und für die Kontrollzelllinie zeigt sich eine signifikante Reduktion der MicroRNA-371a-3p in den siRNA-Knockdown-Zellen verglichen mit den Zellen, welche mit ET-1 behandelt wurden. Für die BPH-1- und PC3-Zellen zeigt sich auch eine verringerte Expression der MicroRNA-371a-3p in den siRNA-Knockdown-Zellen im Vergleich zu den Zellen, die mit der siRNA und ET-1 behandelt wurden.

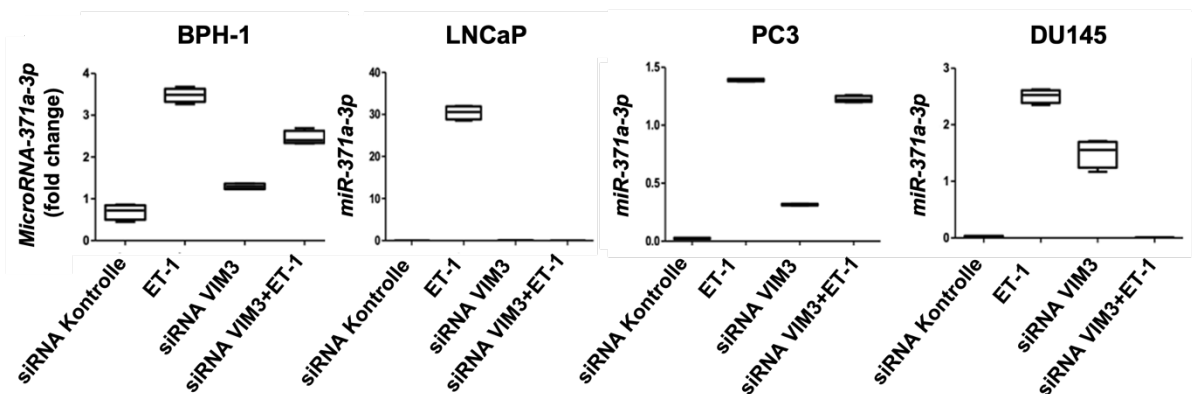


Abbildung 23: qRT-PCR Ergebnisse der MicroRNA-371a-3p-Expression nach VIM3 siRNA Behandlung der verschiedenen Zelllinien. Die Zellen wurden entweder mit dem leeren siRNA Vektor, ET-1, der VIM3 siRNA oder mit einer Kombination aus siRNA und ET-1 behandelt. Nach der Behandlung wurde die MicroRNA-371a-3p aus den Zellen isoliert. Nach der cDNA-Synthese (RT-PCR) folgte die qRT-PCR. Die Veränderungen waren alle signifikant ($p < 0,0001$). Da bekannt ist, dass ET-1 die Expression von VIM3 induziert, diente ET-1 hier als high control. Beta-Actin diente als Haushaltsgen. Die Daten wurden mittels relativer Quantifizierung mit Hilfe des Schwellenwertzyklus (Ct-Wert) analysiert. Die verwendete Formel lautet: $2^{-\Delta\Delta CT}$.

4.8. Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wird das Vorhandensein von ATG7, VIM3, TP53 und VIM-FL in den drei Prostatakarzinomzelllinien (PC3, LNCaP, DU145) sowie der Kontrollzelllinie (BPH-1) bestätigt. Die Komplexpartner sind in den Prostatakarzinomzellen im Vergleich zu den Kontrollzellen signifikant überexprimiert. Weiterhin wird nachgewiesen, dass VIM3, ATG7 und TP53 als Komplex im Zellkern der Prostatakarzinomzellen und der Kontrollzellen vorliegen.

Es wird gezeigt, dass die Behandlung mit ET-1 zu einer vermehrten Expression von VIM3 und ATG7 in allen betrachteten Zelllinien führt. Stimulation mit ET-1 führt zu einer vermehrten Expression von TP53 in LNCaP-Zellen und zu einer TP53-Reduktion in den PC3- und DU145-Zellen sowie in der Kontrollzelllinie. Die Behandlung mit WA führt zu einer Reduktion der Komplexpartner in den LNCaP-Zellen. Für die DU145- und PC3-Zellen zeigt sich ebenfalls eine Reduktion der VIM3-Expression nach Behandlung mit WA. Für TP53 und ATG7 beobachtet man hier allerdings eine Zunahme der Expression.

Außerdem wird gezeigt, dass eine Stimulation mit ET-1 zu einer höheren Migrationsrate der Prostatakarzinom- sowie der Kontrollzellen führt. Die Behandlung mit WA führt hingegen zu einer langsameren Einwanderung der Zellen.

Es wird bestätigt, dass der Komplex bestehend aus VIM3, ATG7 und TP53 im Zusammenhang mit der MicroRNA-371a-3p steht. Der Komplex bindet an die MicroRNA-371a-3p und ist somit wahrscheinlich an der Transkription der MicroRNA-371a-3p beteiligt. Die Transfektion mit der MicroRNA-371a-3p führt zu einer verstärkten Migration der Prostatakarzinom- sowie auch der Kontrollzellen.

Ein Knockdown von VIM3 führt zu einer signifikant verringerten Expression der MicroRNA-371a-3p in den drei Prostatakarzinomzelllinien und in der Kontrollzelllinie im Vergleich zu den Zellen, welche mit ET-1 behandelt wurden. Der VIM3-Knockdown hat zudem eine verringerte Migrationsrate der Prostatakarzinomzellen zur Folge.

5. Diskussion

Das Ziel der Arbeit besteht in der Identifikation eines Komplexes aus VIM3, ATG7 und TP53 in den untersuchten Prostatakarzinomzellen (DU145, PC3, LNCaP). Es sollte gezeigt werden, dass dieser Komplex im Zellkern der untersuchten Zellen vorliegt und somit an verschiedenen regulatorischen Vorgängen beteiligt sein könnte. In diesem Zusammenhang wurde untersucht, ob der Komplex an der Transkription der MicroRNA-371a-3p beteiligt sein könnte. Mit einem siRNA VIM3-Knockdown wurde der Komplex weiterführend als möglicher therapeutischer Ansatzpunkt untersucht.

Außerdem wurde der Einfluss von ET-1 und WA auf die Komplexpartner betrachtet. Es ist bereits bekannt das ET-1 proliferationsfördernde Effekte auf Prostatakarzinomzellen hat. Für WA ist aktuell keine Verbindung zum Prostatakarzinom bekannt.

5.1. Existenz der Komplexpartner in den Prostatakarzinomzellen

Mithilfe von Western Blots konnten die Komplexpartner VIM3, ATG7 und TP53 sowie VIM-FL in den Prostatakarzinomzelllinien DU145, PC3 und LNCaP nachgewiesen werden (Abbildung 5). Im Vergleich zur Kontrollzelllinie, BPH-1, waren die Komplexpartner mit Ausnahme der Expression von TP53 in den DU145-Zellen signifikant überexprimiert. Betrachtet man die Expression von VIM3, so zeigte sich, dass diese in den PC3-Zellen am höchsten war. Danach folgten die LNCaP- und DU145-Zellen mit ähnlich hohen Expressionsleveln von VIM3. Die im Vergleich zu den anderen Prostatakarzinomzellen erhöhte Expression von VIM3 in den PC3-Zellen geht mit der Information in der Literatur einher, welche die PC3-Zelllinie als aggressiver im Vergleich zu den anderen Prostatakarzinomzellen beschreibt¹⁴⁹. Unsere Arbeitsgruppe konnte in einer früheren Studie VIM3 bereits als Malignitätsmarker für das Prostatakarzinom identifizieren, wobei eine erhöhte Expression von VIM3 mit einer höheren Aggressivität der Zellen korreliert⁷⁷.

Das Tumorsuppressorgen TP53 war in den PC3- und LNCaP-Zellen signifikant überexprimiert verglichen mit der Expression in der Kontrollzelllinie BPH-1. Auch für die DU145-Zellen konnte eine Überexpression von TP53 beobachtet werden, welche sich allerdings als nicht signifikant herausstellte. Wan et al. haben bereits die Expression von TP53 in Prostatakarzinomzellen untersucht¹⁵⁰. Sie konnten ebenfalls eine Überexpression von TP53 in den Prostatakarzinomzellen bestätigen und zeigten weiterhin, dass ein siRNA TP53-Knockdown in DU145-Zellen zu einer signifikanten Reduktion der Zellproliferation und -migration führt. Hierbei wurde der fokale Adhäsionskinase-Src-MAPK Signalweg als äußerst wichtig identifiziert¹⁵⁰. Die Ergebnisse von Wan et al. zusammen mit den hier gezeigten Resultaten der Western Blot Analyse zeigen, dass TP53 bzw. ein siRNA TP53-Knockdown gegebenenfalls einen interessanten Ansatzpunkt zur Reduktion der malignen Proliferation von Prostatakarzinomzellen und für neue therapeutische Strategien darstellen könnte.

Die Expression des dritten Komplexpartners ATG7 war in allen untersuchten Prostatakarzinomzellen signifikant erhöht. Interessanterweise war die Expression des Autophagiegens ATG7 in den LNCaP-Zellen am höchsten. Diese sind laut Literaturangaben weniger aggressiv und sensitiv für eine Androgerezeptorthherapie¹⁵¹. Aktuell ist die Bedeutung der Androgene im Prozess der Autophagie noch nicht ausreichend verstanden. Man beobachtet zum Beispiel ein erhöhtes Aufkommen von Autophagosomen als Folge einer Androgendeprivation¹⁵². Li et al. konnten zeigen, dass eine pharmakologische Inhibition der Autophagie zu einer verlangsamten Proliferation der LNCaP-Zellen führt¹⁵². Des Weiteren sind LNCaP-Zellen in der Lage über den Autophagieweg auch unter Androgendeprivation zu überleben¹⁵².

Auch VIM-FL war in den Prostatakarzinomzellen überexprimiert. Ein direkter Vergleich zwischen VIM-FL und VIM3 zeigte jedoch, dass VIM3 stärker exprimiert war als VIM-FL. Dies stützt die Hypothese dieser Arbeit, dass VIM3 als Malignitätsmarker für das Prostatakarzinom dienen könnte und nicht die Volllängenvariante VIM-FL. Es gibt allerdings auch einige Studien, welche die Expression von VIM-FL in Karzinomen untersucht haben und gezeigt haben, dass VIM-FL mit erhöhter Malignität und schlecht differenzierten Prostatakarzinomen assoziiert ist¹⁵³. Allerdings ist die Verwertbarkeit dieser Ergebnisse aufgrund der zuvor beschriebenen Antikörperproblematik fraglich (Abbildung 1). Da in vorherigen Studien Antikörper verwendet wurden, die sowohl die Volllängenvariante VIM-FL als auch VIM3 detektiert haben, ist eine genaue Differenzierung hier nicht möglich und die beobachteten Ergebnisse sind, in Anbetracht des Wissens um die verkürzte Variante VIM3, mit Vorsicht zu interpretieren.

Zusammenfassend konnten alle Komplexpartner in den Prostatakarzinomzellen und in der Kontrollzelllinie nachgewiesen werden. Bis auf die Expression von TP53 in den DU145-Zellen waren die Komplexpartner in den Prostatakarzinomzelllinien alle signifikant überexprimiert und könnten somit in Zukunft als möglicher Malignitätsmarker dienen.

5.2. Translokation von ATG7, TP53 und VIM3 in den Zellkern

Die Lokalisation der Komplexpartner in den Prostatakarzinomzellen wurde mittels Immunfluoreszenz visualisiert. Abbildung 6 zeigt, dass alle Komplexpartner im Zellkern lokalisiert sind. Ein direkter Vergleich der Lokalisation von VIM3 und VIM-FL in den DU145-Zellen zeigte, dass VIM3 vermehrt im Zellkern konzentriert ist. Dies geht einher mit unseren Vorergebnissen, welche ebenfalls zeigten, dass VIM3 im Zellkern lokalisiert ist.

Es ist bereits bekannt, dass die Expression von VIM3 einen Einfluss auf Prostatakarzinomzellen hat⁷⁷. Aggressivere Tumore korrelieren mit höheren Leveln von VIM3²⁴. Die genauen Mechanismen sind allerdings bisher noch ungeklärt. Der Zusammenhang zwischen der Expression von VIM3 und der Aggressivität eines Tumors ist darauf zurückzuführen, dass Vimentin mit einer höheren Malignität der Krebszellen und einer größeren Präsenz in schlecht differenzierten Prostatakarzinomen assoziiert ist¹⁵³. Mit seiner Lokalisation im Zellkern könnte

VIM3 also an verschiedenen regulatorischen Prozessen beteiligt sein und ein wichtiger Einflussfaktor im Hinblick auf die Charakteristik eines Prostatakarzinoms sein.

Die Regulation der Lokalisation von TP53 in der Zelle ist hochkomplex und bis heute nicht vollständig verstanden. In der Regel liegt TP53 aufgrund von ständigem Abbau nur in geringer Konzentration in der Zelle vor^{154,155}. Verschiedene Situationen wie zum Beispiel Hypoxie, Verlust des Zell-Zell-Kontakts oder wie hier maligne Geschehen führen allerdings zur Umwandlung des TP53 in das aktivierte funktionelle TP53¹⁵⁶. Diese Aktivierung kann über verschiedene Wege geschehen^{157,158}. Einer davon ist die Translokation von TP53 vom Zytoplasma in den Zellkern¹⁵⁷. Die Lokalisation von TP53 im Zellkern von Prostatakarzinomzellen korreliert also mit den Angaben in der Literatur. TP53 liegt vor allem bei schnell wachsenden oder transformierten Zellen im Zellkern vor^{159,160}.

Da bekannt ist, dass es einen Zusammenhang zwischen TP53 und ATG7 gibt, sollte untersucht werden, ob auch ATG7 im Zellkern lokalisiert ist. In der Regel findet Autophagie im Zytosol statt und die sogenannte nukleäre Autophagie ist bis heute noch nicht ausreichend verstanden¹⁶¹. In der hier vorliegenden Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass neben TP53 und VIM3 auch ATG7 im Zellkern vorliegt und somit eine Beteiligung an verschiedenen regulatorischen Vorgängen wahrscheinlich ist¹⁶².

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die beobachtete Lokalisation aller Komplexpartner im Zellkern mit den Informationen der Literatur übereinstimmt und die Hypothese dieser Arbeit bestätigt, dass eine Translokation des Komplexes in den Zellkern stattfindet. Dies ermöglicht weitere Experimente hinsichtlich möglicher Zielgene des Komplexes.

5.3. Komplexformation von ATG7, TP53 und VIM3

Wie zuvor beschrieben, ist ein Ziel dieser Arbeit die Komplexidentifikation bestehend aus ATG7, TP53 und VIM3. Für alle Kombinationen der Komplexpartner konnten Banden in der Immunpräzipitation nachgewiesen werden (Abbildung 7), woraus sich schlussfolgern lässt, dass der vermutete Komplex in der Tat in den drei Prostatakarzinomzelllinien sowie in der Kontrollzelllinie BPH-1 vorhanden ist.

Hierbei muss erwähnt werden, dass die Intensität der Banden keinerlei Aussage über die vorhandene Menge der Komplexpartner macht, da es sich bei der Immunpräzipitation um eine semi-quantitative Methode handelt¹⁶³. Es ist nur relevant, ob eine Bande vorhanden ist oder nicht.

Dies erklärt auch die nachgewiesene Komplexformation in der Kontrollzelllinie BPH-1. Es ist wahrscheinlich, dass die vorhandene Menge der Komplexpartner in der benignen Zelllinie deutlich niedriger ist als bei den malignen Prostatakarzinomzellen. Dies konnte durch die Quantifizierung der Proteinmenge mittels Western Blot bestätigt werden.

Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass Vimentin eine Bindungsstelle für TP53 hat und dass das C-terminale Ende von Vimentin essenziell für die Lokalisation von mutiertem TP53 in den

Zellkern ist⁸⁵. Wie jedoch zu Beginn bereits erwähnt, ist die Interpretation solcher Daten aufgrund der Antikörperproblematik (Abbildung 1) und der Kenntnis von VIM3 mit Vorsicht zu betrachten. In den Untersuchungen von Yang et al. zu den Auswirkungen von Vimentin und TP53 auf synoviale Fibroblasten bei rheumatoider Arthritis konnte gezeigt werden, dass der Komplex aus Vimentin und TP53 die durch den *Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand* hervorgerufene Apoptose der Fibroblasten verstärkt¹⁰⁷. In der Analyse der Interaktion zwischen TP53 und Vimentin zeigte sich neben der Bande auf Höhe der Vimentin-Volllänge, VIM-FL, zusätzliche eine Bande bei 47 kDa¹⁰⁷. Diese entspricht der trunkierten Variante von Vimentin, VIM3¹⁰⁷. Mit dem von unserer Arbeitsgruppe entwickelten Antikörper, welcher spezifisch VIM3 bindet, konnten wir zeigen, dass es auch zu einer Komplexbildung zwischen VIM3 und TP53 kommt (Abbildung 7). Dies wirft die Frage auf, ob in vielen Experimenten zu Vimentin eigentlich VIM3 verantwortlich für die jeweiligen analysierten Prozesse ist.

Der Komplex bestehend aus ATG7 und TP53 ist bereits aus der Literatur bekannt und konnte hier bestätigt werden. Karzinome mit einer erhöhten Expression von TP53 und ATG7 weisen eine schlechtere Prognose auf^{108,111}.

Auch wenn also bereits eine Interaktion zwischen TP53 und VIM-FL sowie zwischen ATG7 und TP53 bekannt war, so konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass VIM3 ebenfalls mit ATG7 und TP53 einen Komplex bildet und alle drei Komplexpartner gemeinsam in den Zellkern migrieren.

5.4. Stimulation mit ET-1 und WA

5.4.1. Einfluss von ET-1 auf die Komplexpartner VIM3, ATG7 und TP53 sowie auf VIM-FL

Um den Einfluss von ET-1 und WA auf die betrachteten Komplexpartner ATG7, TP53 und VIM3 zu analysieren, wurden die Zellen nach 24 Stunden Kultivierung in FCS-freiem Medium für weitere 24 Stunden mit ET-1 bzw. WA, wie in Abschnitt 3.2.1.4 beschrieben, stimuliert. Abbildungen 8 bis 15 zeigen die Effekte einer Stimulation mit ET-1 und WA auf die Expression der Komplexpartner in den drei Prostatakarzinomzelllinien sowie auf das Migrationsverhalten der Prostatakarzinomzellen.

Die gesteigerte Expression der Komplexpartner und die erhöhte Migrationsrate der Prostatakarzinomzellen nach Behandlung mit ET-1 bestätigt die bereits bekannten Informationen aus der Literatur. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass ET-1 einen Einfluss auf unterschiedliche Tumorentitäten hat, wie zum Beispiel Lungen-, Eierstock- oder Prostatakrebs¹⁶⁴⁻¹⁶⁷. ET-1 bindet mittels zwei unabhängiger Rezeptoren A (ETAR) und B (ETBR) an die Zielzelle und kann über Beeinflussung der Transkription die Tumorprogression steuern⁹⁰. Bindung von ET-1 an ETAR führt zur Zellproliferation, Angiogenese, Metastasierung und

verhindert die Apoptose der Zellen. Anders führt die Bindung von ET-1 an ETBR zu einer reduzierten Expression von ET-1 und zur Apoptose⁷⁷.

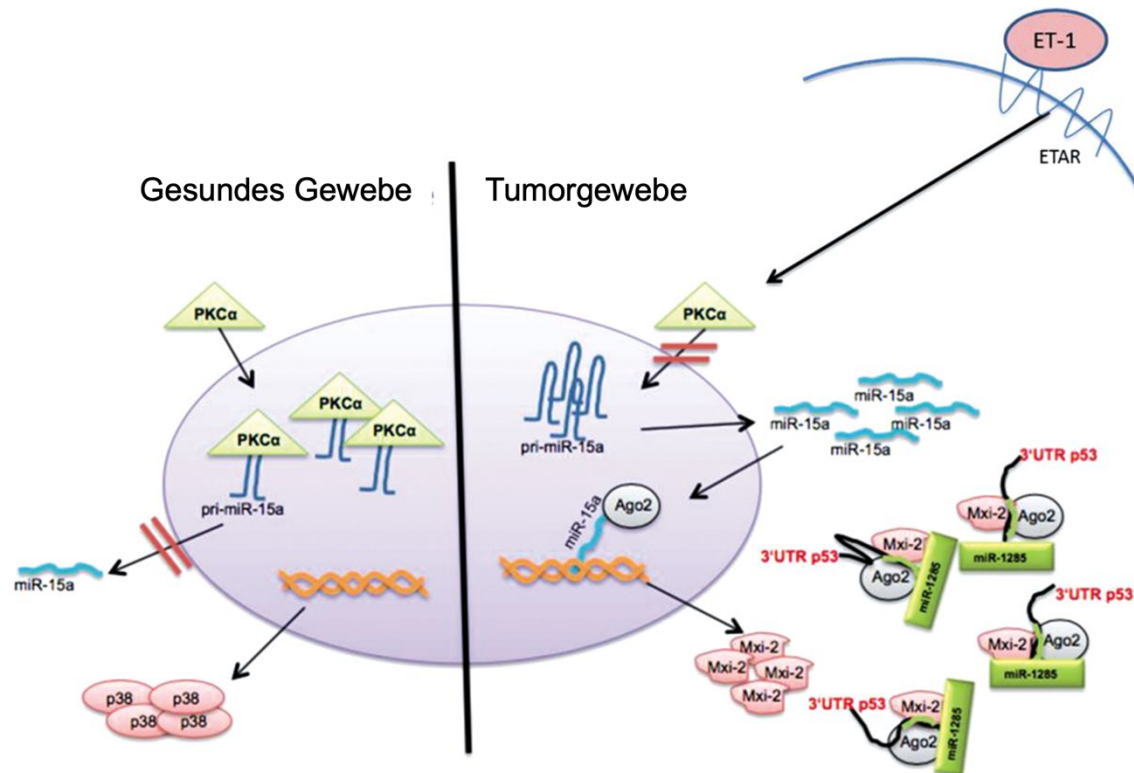
Nelson et al. zeigten, dass es eine Vielzahl von Prostatakarzinomen gibt, in denen ETBR aufgrund von Methylierung des Promoters nicht vorhanden ist⁹³. Das bedeutet, dass der durch ET-1 hervorgerufene Signalweg hauptsächlich über den ETAR abläuft. Dies resultiert wiederum in einem erhöhten Migrationsverhalten der Zellen, welches in der vorliegenden Arbeit anhand einer Kratz-Assay Analyse demonstriert werden konnte (Abbildung 12 bis 14). Betrachtet man nun die Expression der Komplexpartner und VIM-FL nach Stimulation mit ET-1, so fällt auf, dass VIM3 stärker auf die Stimulation reagiert als VIM-FL. Auch dieses Ergebnis korreliert mit der Information aus der Literatur und der Hypothese dieser Arbeit⁷⁷. Eine durch ET-1 hervorgerufene erhöhte Expression von VIM3 führt zu einer Vermehrung von Mitochondrien und folglich zu einer erhöhten Mobilität der Tumorzellen^{88,89,168}. Es konnte gezeigt werden, dass im Hinblick auf verstärkte Zellmigration und -proliferation nur das Vorhandensein von VIM3 und nicht das von VIM-FL einen Einfluss zu haben scheint, insbesondere nach Blockade von ETBR⁷⁷.

Neben VIM3 und VIM-FL führte die Stimulation mit ET-1 auch zu einer erhöhten ATG7-Expression in allen drei Prostatakarzinomzelllinien. Auch wenn allgemein bekannt ist, dass Autophagie einen wichtigen Einfluss auf die Karzinogenese hat, so ist die Beziehung zwischen Autophagiegenen und ET-1 noch nicht geklärt^{109,110}. In einer Studie von Yang et al. wurde untersucht, ob die Stimulation mit ET-1 zu einer erhöhten Autophagieaktivität von ligamentären Fibroblasten im Rahmen der osteogenetischen Differenzierung führt. Diese Hypothese konnte allerdings nicht sicher bestätigt werden¹⁶⁹.

Die vorliegende Arbeit zeigt also erstmals, dass eine Stimulation mit ET-1 zu einer erhöhten Expression von ATG7 in Prostatakarzinomzellen führt. Weitere Untersuchungen sind in Zukunft nötig, um die genauen Mechanismen dahinter zu verstehen.

Anders als zu ATG7, gibt es zum Zusammenhang zwischen ET-1 und TP53 bereits einige Studien. Selvarajah et al. konnten bereits zeigen, dass ET-1 ein transkriptionelles Ziel des Tumorsuppressorgens TP53 ist¹⁷⁰. Eine weitere Studie, die einen Zusammenhang zwischen TP53 und ET-1 in epidermalen Keratinozyten präsentiert hat, legt den Verdacht nahe, dass TP53 in der Lage ist, die Transkription von ET-1 direkt zu regulieren¹⁷¹. Unsere Arbeitsgruppe lieferte 2020 eine Erklärung für die Regulation von TP53 durch ET-1. An dem identifizierten Signalweg sind unter anderem Mxi-2, Ago2 und die MicroRNA-1285 beteiligt (Abbildung 24)¹⁷². Die MicroRNA-1285 bindet an die 3'-UTR der mRNA von TP53, was zu einer Herunterregulation von TP53 führt¹⁷³. In Prostatakarzinomzellen inhibiert ET-1 die Migration von PKC α , einem Mitglied der Proteinkinasefamilie, in den Zellkern, wodurch die Reifung der MicroRNA-15a ermöglicht wird¹⁷⁴. In gesundem Gewebe kann die PKC α mit Hilfe eines Transkriptions-

Die MicroRNA-15a reguliert die Expression des C-terminal trunkierten Proteins Mxi2 durch Bindung an eine Intron-Region der MAPK p38 α und Induktion eines Stopcodons. Mxi2 bildet einen Komplex mit Ago2. Dieser Komplex interagiert mit der MicroRNA-1285, welche wie zuvor beschrieben essenziell für die Bindung der 3'-UTR von TP53 ist. Die Komplexformation führt zu einer Herunterregulation des Tumorsuppressorgens TP53 (Abbildung 24)^{87,172}. Die Reduktion von TP53 durch Stimulation mit ET-1 konnte in der vorliegenden Arbeit für die PC3 und DU145-Zellen bestätigt werden. Interessanterweise führte eine ET-1 Stimulation in den LNCaP-Zellen allerdings zu einer erhöhten TP53-Expression. Dies könnte z.B. auf unterschiedliche Mxi2-Spiegel oder niedrigere MicroRNA-1285-Level in den LNCaP-Zellen zurückzuführen sein. Diese Hypothesen sollten in Zukunft in weiteren Experimenten untersucht werden.



77

5.4.2. Verhalten der Proteine nach Stimulation mit WA - WA als möglicher therapeutischer Ansatzpunkt

Da WA als pflanzliches Medikament bereits bei verschiedenen Tumorentitäten Zugang in die Therapie gefunden hat, sollte in dieser Arbeit der Effekt von WA auf den hier beschriebenen Komplex und insbesondere auf VIM3 untersucht werden^{95,103,175,176}. Es konnte gezeigt werden, dass WA sowohl die Expression der Komplexpartner beeinflusst (Abschnitt 4.3) als auch einen verlangsamenden Effekt auf die Migration der Zellen (Abschnitt 4.4) ausübt.

In der Literatur werden verschiedene Wege beschrieben, wie WA in das Proliferations- und Migrationsverhalten von Zellen eingreifen kann¹⁷⁷. WA hemmt die Zellproliferation, indem es den Zellzyklus in der G2/M-Phase zum Stillstand bringt. Dies geschieht beispielsweise über die Hochregulation von p21, Phosphorylierung von wee1, Phosphorylierung der Histone H3 oder Herunterregulation der Cycline A2, B1 und E2^{177,178}.

WA macht Prostatakarzinomzellen außerdem anfälliger gegenüber Apoptose, indem es durch Erhöhung des *Prostate Apoptosis Response-4* Proteins das proapoptotische Signaling in Prostatakarzinomzellen erhöht¹⁷⁹.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass WA die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität des 26S Proteasoms in PC3-Zellen inhibiert, was zu einer Ansammlung von einigen Proteasomzielproteinen wie zum Beispiel p27, Bax und I κ B- α führt. Dies resultiert wiederum in der Apoptose der Prostatakarzinomzellen¹⁸⁰.

Des Weiteren wird beschrieben, dass WA einen größeren zytotoxischen Effekt bei den androgen-resistenten, Androgenrezeptor-negativen-Zelllinien PC3 und DU145 hat als bei den androgen-sensitiven, Androgenrezeptor-positiven LNCaP-Zellen¹⁸¹.

In der hier vorliegenden Arbeit konnte der hemmende Effekt von WA auf das Migrations- und Proliferationsverhalten aller Prostatakarzinomzellen bestätigt werden.

In weiteren Studien konnte außerdem gezeigt werden, dass eine Behandlung mit WA zu einer Aktivierung von natürlichen Killerzellen führt¹⁸². Diese sind wichtig für die initiale Immunantwort auf den Tumor und dienen der Elimination früher neoplastischer Zellen¹⁸². Des Weiteren induziert eine Behandlung mit WA die Aktivierung von Th1-Zellen und eine Zunahme von IFN- γ und IL-12, welche mit einer Suppression des Tumors verbunden sind. Gleichzeitig reduziert eine Behandlung mit WA unter anderem IL-4, IL-10 und TGF- β -Zytokine, welche mit Th2-Zellen assoziiert sind und das Tumorwachstum fördern¹⁸³. Die Induktion der Th1-Zell-Antwort und die Aktivierung natürlicher Killerzellen durch WA legt die Idee nahe, dass WA im Rahmen von immunmodulatorischen Therapien eingesetzt werden könnte. Das Prostatakarzinom mit seinem teilweise langsamen Wachstum stellt hierbei vor allem in frühen Stadien der Krankheit einen idealen Kandidaten für eine solche Therapie dar. WA könnte im Hinblick auf Chemotherapie-induzierte Fatigue, Krebsprävention und Verbesserung der therapeutischen Effizienz von großem Nutzen sein¹⁰³.

Im Hinblick auf die Expression der einzelnen Komplexpartner führte eine Behandlung mit WA bei allen drei Prostatakarzinomzellen zu einer signifikanten Reduktion der VIM3-Expression (Abbildung 8 bis 10). Somit konnte in dieser Arbeit erstmals der hemmende Effekt von WA auf die Expression von VIM3 gezeigt werden. Auch die Expression der Volllängenvariante VIM-FL wurde durch Behandlung mit WA reduziert. Allerdings war die Veränderung hier nur in den PC3-Zellen signifikant. Aus der Literatur ist bekannt, dass WA über verschiedene Mechanismen zu einer Zerstörung des Vimentinzytoskeletts führt¹⁸⁴. WA ist in der Lage, Vimentin direkt zu binden und zerstört den Zusammenbau des Vimentinzytoskeletts durch kovalente Modifikation des Cystein 328 in der konservierten Vimentin α -helikalen Coiled-Coil-2B-Domäne¹⁸⁴. Für Brustkrebszelllinien konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit WA eine perinukleäre Vimentinakkumulation induziert, gefolgt von einer raschen Vimentindepolymerisation⁹⁴. Außerdem wurde in diesem Zusammenhang eine ser56 Phosphorylierung beobachtet, welche mit einer Zerstörung des Vimentinzytoskeletts zusammenhängt⁹⁴.

Da die Expression von VIM-FL bzw. VIM3 mit der Entstehung von Metastasen, der Überlebensdauer und der allgemeinen Aggressivität des Tumors korreliert, sollten die genauen Auswirkungen einer Behandlung mit WA auf VIM3 bzw. VIM-FL in Prostatakarzinomen in Zukunft weiter untersucht werden.

Betrachtet man die Expression von ATG7 nach Behandlung mit WA, so führte diese in den LNCaP-Zellen zu einer signifikanten Reduktion und in den DU145-Zellen zu einer minimalen Reduktion der Expression. Die PC3-Zellen wiesen hingegen einen Anstieg der ATG7-Expression nach Behandlung mit WA auf. Ein allgemeiner Trend konnte also nicht beobachtet werden. Autophagie kann zwei Funktionen in Karzinomen haben: Einerseits wirkt es durch die Elimination onkogener Proteinsubstrate, toxischer Proteine und geschädigter Organellen tumorsuppressiv. Andererseits kann Autophagie das Tumorwachstum durch Autophagie-gesteuertes intrazelluläres Recycling fördern, indem es Substrate für den Metabolismus bereitstellt und somit auch die Mitochondrienfunktion aufrechterhält¹⁸⁵. Die Auswirkungen von Autophagie mit den jeweiligen kontext-spezifischen Funktionen in Karzinomen ist komplex und muss deshalb weiter untersucht werden. Vor allem die Studienlage zum Zusammenhang zwischen WA und Autophagie ist sehr begrenzt. Jung et al. konnten zeigen, dass eine Stimulation mit WA bei Zellen von kolorektalen Karzinomen zu einer Vermehrung von Autophagosomen und einer erhöhten Expression von Autophagiemarkern wie ATG7 und Beclin-1 führt¹⁸⁶. Eine andere Studie hat den Effekt von WA auf die Prostatakarzinomzelllinien LNCaP, PC3 und 22Rv1 untersucht^{187,188}. Auch sie zeigte, dass eine Stimulation mit WA zu einer erhöhten Expression von Autophagiemarkern in allen Zelllinien führt, was mit einem zytoprotektiven Effekt einherging. In dieser Studie konnte außerdem gezeigt werden, dass eine Behandlung mit WA mit einer vermehrten Expression der Proteine HSPA8 und HSP90AA1 einhergeht. Diese Proteine regulieren die Chaperon-gesteuerte Autophagie, weshalb die

Arbeitsgruppe die Chaperon-gesteuerte Autophagie verantwortlich für den WA vermittelten zytoprotektiven und Autophagie-verstärkenden Effekt gemacht hat^{187,188}. Diese Studien zeigen also eher die protektiven Funktionen von Autophagiemechanismen auf.

Auf der anderen Seite gibt es diverse Studien, die zeigen, dass ein ATG7-Knockout bzw. eine ATG7-Defizienz mit einem verbesserten Überleben korreliert^{110,112}. Guo et al. zeigten beispielsweise, dass ein Knockout von ATG7 bei Lungentumoren zu einer Umwandlung in ein benignes Onkozytom führt¹¹². In einer Studie zur Auswirkung des Vorhandenseins von ATG7 im Prostatakarzinom konnte gezeigt werden, dass eine ATG7-Defizienz zu einem verzögerten PTEN-Verlust und somit zu einer verlangsamen Tumorprogression führte¹¹¹. Dieselbe Arbeitsgruppe zeigte außerdem, dass Prostatakarzinome mit Gleason-Score 9 höhere Level an Autophagiemarkern aufweisen als Karzinome mit Gleason-Score 7¹⁸⁹. In diesen Studien korrelierte das Vorhandensein von Autophagiemarkern also eher mit schlechteren Krankheitsverläufen. Die Rolle von Autophagie beim Prostatakarzinom muss in Zukunft weiter untersucht werden, um gegebenenfalls neue therapeutische Ansatzpunkte zu identifizieren. Weitere Untersuchungen zum Effekt von WA auf Autophagiemarker in Prostatakarzinomzellen sind nötig, um die Mechanismen, vor allem in den verschiedenen Zelllinien, besser zu verstehen. Es ist fraglich, ob die Wirkung von WA unabhängig von der Zelllinie ist oder ob Aspekte wie Androgensensitivität und Aggressivität der Zelllinie den Effekt beeinflussen.

In der vorliegenden Arbeit wurde außerdem der Effekt einer Behandlung mit WA auf das Tumorsuppressorgen TP53 in den drei Prostatakarzinomzelllinien untersucht. In den LNCaP-Zellen konnte eine Reduktion der TP53-Expression beobachtet werden, wohingegen die Stimulation mit WA in den PC3- und DU145-Zellen zu einer erhöhten TP53-Expression geführt hat. Studien haben gezeigt, dass WA in der Lage ist, durch Aktivierung von TP53 Apoptose zu induzieren, was dann in einem Stopp des Zellzyklus mit nachfolgendem Absterben der Krebszelle resultiert¹⁷⁸. Weitere Studien bestätigten eine erhöhte TP53-Expression nach Behandlung mit WA und eine damit einhergehende Phosphorylierung von TP53 am Serinrest 315¹⁷⁸. Für Zervixkarzinomzelllinien konnte gezeigt werden, dass WA die Expression von TP53 und seinen Zielgenen p21 und Bax erhöht, indem es die Expression der HPV Onkoproteine E6 und E7 vermindert, welche normalerweise TP53 hemmen¹⁹⁰. Auch in Bronchialkarzinomzellen führte eine Behandlung mit WA zu einer vermehrte Expression proapoptotischer Moleküle wie TP53 und Bax, wohingegen die Expression von anti-apoptotischen Molekülen wie Bcl-2 nach Behandlung mit WA herunterreguliert wurde. WA scheint hier also für die Induktion der intrinsischen Apoptose der Bronchialkarzinomzellen verantwortlich zu sein¹⁹¹. Insgesamt zeigen die meisten Studien zu anderen Tumorentitäten eine erhöhte Expression von TP53 nach Behandlung mit WA und einen damit verbundenen Abbau von Karzinomzellen^{178,190,191}. Bis auf die Experimente in dieser Arbeit, wurden bisher keine Untersuchungen zur Expression von TP53 nach Behandlung mit WA in Prostatakarzinomzellen unternommen. In der vorliegenden Arbeit

konnte der verstärkende Effekt von WA auf die TP53-Expression nur für die PC3- und DU145-Zellen gezeigt werden. Der Zusammenhang zwischen TP53 und WA in Prostatakarzinomzellen sollte weiter untersucht werden, um die genauen Regulationsmechanismen und Auswirkungen der TP53-Expression zu analysieren.

Nach Analyse der Auswirkungen von WA auf das allgemeine Migrations- und Proliferationsverhalten sowie auf die Expression der einzelnen Komplexpartner wird deutlich, dass WA als kostengünstiges, natürliches Mittel mit wenigen Nebenwirkungen und anti-kanzerogenen Effekten über verschiedene molekulare Signalwege in Zukunft Einzug als ergänzendes Medikament in die Therapie des Prostatakarzinoms finden könnte¹⁹².

5.5. VIM3 als potenzieller Teil eines Transkriptionsfaktorkomplexes für die MicroRNA-371a-3p

Da unsere Arbeitsgruppe sich insbesondere mit der trunkierten Variante von Vimentin, dem sogenannten VIM3, beschäftigt, ist ein Ziel dieser Arbeit herauszufinden, ob VIM3 als möglicher Bestandteil eines Transkriptionsfaktors für die MicroRNA-371a-3p dienen könnte. Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine erhöhte Konzentration von VIM3 in den Prostatakarzinomzellen vorhanden ist und gleichzeitig ist bekannt, dass die MicroRNA-371a-3p in verschiedenen aggressiveren Prostatakarzinomen nachweisbar ist¹¹⁹. Basierend auf diesen Informationen wurde hier untersucht, ob eine Interaktion zwischen VIM3 und der MicroRNA-371a-3p besteht.

Die GKH Aminosäuresequenz, welche einen Teil des C-terminalen Endes von VIM3 ausmacht (Aminosäure 426 bis 428, siehe Anhang), ist in der Lage, an die TGAGCCA Nukleotidsequenz zu binden¹⁹³. Mithilfe der TATA-Box-Methode konnte die potenzielle Promoterregion der pri-MicroRNA-371a-3p identifiziert werden¹⁹⁴. Interessanterweise besteht die identifizierte Promoterregion aus TGAGCCA Nukleotiden (siehe Anhang), weshalb angenommen werden kann, dass das C-terminale Ende von VIM3 an die vermutete Promoterregion der pri-MicroRNA-371a-3p bindet. Dadurch ist VIM3 in der Lage, die Expression der MicroRNA-371a-3p zu regulieren. Um diese Hypothese zu beweisen, wurde ein VIM3-Pulldown durchgeführt, der es ermöglicht hat, DNA zu analysieren, welche an VIM3 gebunden vorliegt. Durch eine PCR-Analyse mit dem spezifischen Primer für die Promoterregion der pri-MicroRNA-371a-3p und nachfolgender Elektrophorese in einem zwölfprozentigem Polyacrylamid-Gel wurde das PCR-Produkt sichtbar gemacht. Hierbei konnte eine deutliche VIM3 Co-Immunpräzipitation mit der DNA dargestellt werden (Abbildung 16). Die ermittelte Basenpaar-Größe korreliert mit dem berechneten PCR-Produkt, sodass man schlussfolgern kann, dass VIM3 an die Promoterregion der pri-MicroRNA-371a-3p bindet.

Um die Interaktion von VIM3 mit der Promoterregion und die damit verbundene Aktivität weiter zu analysieren, wurde ein EMSA durchgeführt. Der durchgeführte Supershift mit VIM3

bestätigt die Ergebnisse. Hierzu wurden Cy5-markierte Primer, welche spezifisch an die Promoterregion der pri-MicroRNA-371a-3p binden, designiert. Mithilfe des EMSAs wurde die Interaktion zwischen VIM3 und der hypothetischen DNA-Bindungsstelle am MicroRNA-371a-3p-Promoter nachgewiesen. Die Bindung konnte anhand des Supershifts im Polyacrylamid-Gel bestätigt werden (Abbildung 17). Der sogenannte Supershift kommt zustande, wenn der Komplex aufgrund der Interaktion mit dem Antikörper größer und somit schwerer wird. Folglich wandert der Komplex dadurch langsamer durch das Gel. Die Supershiftformation konnte also die vermutete Interaktion bestätigen und zeigt, dass VIM3 in den Zellkern migriert und dort als Teil eines DNA-bindenden Transkriptionsfaktorkomplexes fungieren kann. VIM3 bindet hierbei an die Promoterregion der pri-MicroRNA-371a-3p und reguliert somit die Expression der pri-MicroRNA-371a-3p-kodierenden Gene. VIM3 ist demnach für die Expression der pri-MicroRNA-371a-3p mit verantwortlich.

5.6. Migrationsverhalten der Zellen nach Stimulation mit der MicroRNA-371a-3p

Nachdem in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass der Komplex bestehend aus VIM3, ATG7 und TP53 einen Einfluss auf die Transkription der pri-MicroRNA-371a-3p hat, sollten die Auswirkungen der MicroRNA-371a-3p auf die Prostatakarzinomzellen genauer analysiert werden. Hierzu wurden die Zellen mit der MicroRNA-371a-3p stimuliert und im Anschluss wurde das Migrationsverhalten der Zellen mittels Agarose-Drop analysiert. Aufgrund mangelnder Adhärenz der LNCaP-Zellen konnten diese hierbei nicht beachtet werden. Für die DU145- und PC3-Zellen, sowie die Kontrollzelllinie BPH-1 zeigte sich allerdings ein erhöhtes Migrationsverhalten der Zellen nach Transfektion mit der MicroRNA-371a-3p verglichen mit den unstimulierten Zellen (Abbildung 18).

MicroRNAs wurden lange Zeit nur als sogenannte *junk* RNA betrachtet¹⁹⁵. Seit einigen Jahren weiß man allerdings, dass sie an vielen biochemischen und physiologischen Prozessen beteiligt sind und häufig in Karzinomen dysreguliert sind¹⁹⁶. MicroRNAs scheinen eine Korrelation zum Tumorstadium, der Größe des Tumors sowie zur Tumoraggressivität aufzuweisen und traten so in den letzten Jahren immer mehr in den Fokus als Kandidaten für neue Biomarker zur Verbesserung von Diagnostik, Therapie und Prognosegenauigkeit¹⁹⁷. MicroRNAs sind in der Lage, die Expression von Genen zu regulieren, indem sie an die komplementäre Sequenz an die 3'-UTR der Ziel-mRNA binden und so die Translation verhindern können⁸⁷. Wie bereits erwähnt, sind sie an einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt, wie zum Beispiel an der Zelldifferenzierung, Apoptose, dem Metabolismus oder der Zellproliferation^{195,197,198}. In der Literatur sind verschiedene Wege beschrieben, wie einige MicroRNAs die Zellproliferation beeinflussen können¹⁹⁸. Hierbei nehmen sie Einfluss auf wichtige Regulatoren wie RAS, ABL, den Retinoblastomsignalweg, den Cyclin-CDK-Komplex oder auf

den PI3K/PTEN-Signalweg¹⁹⁸. Für letzteren fand man beispielsweise heraus, dass die MicroRNA-126 direkten Einfluss auf die regulatorische Untereinheit p85beta der PI3K nehmen kann¹⁹⁸. In Kolontumoren führt zum Beispiel eine MicroRNA-126 Herunterregulation zu einer erhöhten Expression der p85beta Untereinheit^{198,199}. PTEN wirkt der Aktivität der PI3K entgegen und wird durch die MicroRNA-214, die durch Bindung an die 3'-UTR zu einer direkten Hemmung der PTEN-Translation und folgenden Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs führt, reguliert^{198,199}. Weiterhin ist bekannt, dass die MicroRNA-21 und die MicroRNA-17-92 die PTEN-Expression in hepatozellulären Karzinomen hemmen können und so eine erhöhte Tumorzellproliferation und -migration hervorrufen^{198,200}. Da Alhasan et al. zeigen konnten, dass die MicroRNA-371a-3p auch in aggressiven Prostatakarzinomen nachweisbar ist, wird ihre Bedeutung in der vorliegenden Arbeit weiter analysiert¹¹⁹. Es wird vermutet, dass die Expression der MicroRNA-371a-3p über Bindung an die 3'-UTR des Androgenrezeptors zu einer Herunterregulation der Androgenrezeptordichte führt¹²². Es ist außerdem bereits bekannt, dass die MicroRNA-371a-3p in Magentumoren über Regulation des Tumorsuppressorgens TOB1 zu einer erhöhten Zellproliferation führt²⁰¹. Des Weiteren führt eine verstärkte Expression der MicroRNA-371a-3p zu einer verringerten Expression des Tumorsuppressorgens PTEN, welches in einigen Prostatakarzinomen inaktiviert ist und mit dem Auftreten von Knochenmetastasen, Therapieresistenz und einer höheren Rezidivrate korreliert^{114,123-125}. Der genaue Mechanismus wie die MicroRNA-371a-3p die Zellproliferation erhöht, muss allerdings noch weiter untersucht werden.

Durch die hier dargestellte Bindung von VIM3 an die Promoterregion der pri-MicroRNA-371a-3p und den proliferationsfördernden Effekt der MicroRNA-371a-3p auf die Prostatakarzinomzellen, erscheint ein Knockdown von VIM3 als eine neue attraktive Therapiemöglichkeit des Prostatakarzinoms.

Da MicroRNAs in Gewebeproben und Körperflüssigkeit gut detektiert werden können und mit einer hohen Stabilität, eingeschlossen in extrazelluläre Vesikel, zirkulieren, können mögliche Veränderungen von MicroRNA-Expressionsleveln einfach erkannt werden und so möglicherweise zur Verbesserung von Diagnostik und Prognose beitragen²⁰²⁻²⁰⁴. MicroRNAs stellen einen vielversprechenden klinischen Biomarker dar und müssen in Zukunft weiter untersucht werden^{202,203}.

5.7. VIM3-Knockdown resultiert in reduzierter Migration der Prostatakarzinomzellen

Um VIM3 und den hier identifizierten Komplex bestehend aus ATG7, TP53 und VIM3 weiter als therapeutischen Ansatzpunkt zu untersuchen, wurde ein Knockdown von VIM3 mittels siRNA wie in Abschnitt 3.2.1.4 beschrieben durchgeführt. Mittels Kratz-Assay sollten die Auswirkungen auf das Migrations- und Proliferationsverhalten untersucht werden (Abbildung 19

bis 22). In allen Zellen konnte eine Reduktion der Migration nach siRNA VIM3-Knockdown festgestellt werden, insbesondere im Vergleich zu den Zellen, die mit ET-1 und dem Transfektionsreagenz allein (Kontrolle) behandelt wurden. Durch den siRNA-Knockdown kann kein bzw. nur noch wenig VIM3 produziert werden und so kann VIM3 seine transkriptionelle Wirkung auf die pri-MicroRNA-371a-3p im Zellkern nicht entfalten. Für die DU145-Zellen war der Effekt des VIM3-Knockdowns am stärksten. Hier war die Migration der Knockdown-Zellen auch im Vergleich zu den Kontrollzellen signifikant reduziert. Diese Beobachtungen stützen die Hypothese dieser Arbeit, dass VIM3 eine wichtige Rolle in der Tumorzellproliferation und -migration spielt.

Wie zuvor beschrieben, wurden die Zellen nicht nur mit dem Transfektionsreagenz behandelt, sondern auch mit einer Kombination aus ET-1 und der siRNA. Hier zeigte sich in Abhängigkeit von der Reihenfolge der hinzugegebenen Stimulantien ein Unterschied in der Migrationsrate der Zellen. Eine vorherige Stimulation mit ET-1 für 48 Stunden vor der Zugabe der siRNA für die letzten 24 Stunden führte zu einer Steigerung der Zellmigration in allen Zelllinien im Vergleich zu den Zellen, welche erst mit der siRNA und dann mit ET-1 behandelt wurden. Diese Beobachtung lässt sich dadurch erklären, dass in den Zellen, die erst mit ET-1 stimuliert wurden, die ET-1 Stimulation zu einer erhöhten VIM3-Expression führte⁷⁷. Die erhöhten Level von VIM3 entfalten ihre Wirkungen im Zellkern, wo sie zum Beispiel eine Überexpression der MicroRNA-371a-3p hervorrufen können, welche unter anderem für die gesteigerte Migration der Zellen verantwortlich ist. Die Zellen, die zuerst mit der VIM3 siRNA und dann mit ET-1 behandelt wurden, zeigten im Vergleich eine reduzierte Migrationsrate. Hier konnte durch die VIM3 siRNA eine Herunterregulation von VIM3 erfolgen, bevor die ET-1 Behandlung erhöhte VIM3-Spiegel produzieren konnte. Da jedoch auch hier die Bindung von ET-1 an ETAR eine erhöhte VIM3-Expression hervorruft, wird im Laufe der Zeit mehr mRNA produziert. Zu einem gewissen Zeitpunkt sind die siRNA Level niedriger als die Menge an VIM3 mRNA. Aufgrund dessen kann die VIM3-Expression nicht weiter ausgeschaltet werden und die Zellmigration nimmt, ähnlich wie die der zuerst mit ET-1 stimulierten Zellen, wieder zu.

Es lässt sich festhalten, dass der Kratz-Assay der Knockdown-Zellen die Bedeutung von VIM3 als möglichen therapeutischen Ansatzpunkt weiter bestätigt hat. Da ein Knockdown von VIM3 mit einer reduzierten Migrationsrate der Prostatakarzinomzellen einhergeht, sollte dies in Zukunft weiter untersucht werden, um zu evaluieren, ob ein VIM3-Knockdown auch *in vivo* mit einem reduzierten Proliferationsverhalten und somit einer besseren Prognose einhergehen könnte.

5.8. Auswirkungen des VIM3-Knockdowns auf die Prostatakarzinomzellen und die Expression der MicroRNA-371a-3p – Möglicher Mechanismus zur Hochregulation des Tumorsuppressorgens PTEN

Es gibt viele verschiedene Mechanismen, die an der Entstehung von Prostatakarzinomen und dem Fortschreiten der Erkrankung beteiligt sind. Eine Schlüsselrolle insbesondere bei aggressiven, schwer behandelbaren Tumoren scheint jedoch ein Verlust des Tumorsuppressorgens PTEN zu sein^{67,123,124,126,205}. In 40 bis 60 Prozent aller Patienten mit metastasiertem kastrationsresistentem Prostatakarzinom liegt ein Verlust von PTEN vor, der mit einer Hyperaktivierung des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs einhergeht^{206,207}. Unter gesunden physiologischen Bedingungen antagonisiert PTEN die Funktion der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), indem es Phosphatidylinositol-(3,4,5)-Triphosphat (PIP3), welches durch die PI3K produziert wird, zurück zu Phosphatidylinositol-(4,5)-Bisphosphat (PIP2) konvertiert^{123,205}. Folglich hemmt PTEN die über PIP3 vermittelten Signalwege inkl. der Phosphoinositid-abhängigen Kinase-1 (PDK1) und der Proteinkinase B (Pkb/Akt), welche unter anderem an der Regulation von mTOR beteiligt ist, einem Ziel von Rapamycin^{123,205}. Ein Verlust von PTEN führt zu einer Akkumulation von PIP3 und dadurch zu einer unregulierten PIP3-Aktivierung, welche mit onkogenen zellulären Ereignissen, wie Zellproliferation, -überleben und -migration einhergeht²⁰⁵. Außerdem ist PTEN in der Lage, durch direkte Proteininteraktionen im Zellkern verschiedene zelluläre Ereignisse, wie die Zellbeweglichkeit, die Chromosomenstabilität, die Antwort auf DNA-Schäden und die Regulation des Zellzyklus zu beeinflussen⁶⁷. In einer Vielzahl von Studien konnte ein PTEN-Verlust bereits als wichtiger Treiber der Prostatakarzinombildung identifiziert werden. Der Verlust von PTEN korreliert mit dem Auftreten von Knochenmetastasen, Therapieresistenz und einer höheren Rezidivrate^{114,123-125}. Aktuell gibt es verschiedene therapeutische Ansatzpunkte für Prostatakarzinome mit PTEN-Verlust. Dazu zählt zum Beispiel die klassische Inhibierung des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs. Es gibt jedoch auch neuere Ansätze, wie zum Beispiel die Wiederherstellung der PTEN-Funktion oder Ansätze, die den Effekt der PTEN-Regulation auf die Chromosomenstabilität, DNA-Reparaturmechanismen oder das Tumormikromilieu untersuchen⁶⁷. Einige MicroRNAs haben bekannterweise die Fähigkeit die PTEN-Expression zu reduzieren. Der aktuell vielversprechendste Kandidat hierbei ist die MicroRNA-21^{208,209}. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression der MicroRNA-21 mittels anti-MicroRNA Oligonukleotiden in anderen Tumorentitäten reduziert werden kann und somit die PTEN-Expression steigern kann^{208,209}.

Aus der Literatur ist bekannt, dass eine verstärkte Expression der MicroRNA-371a-3p zu einer verringerten Expression des Tumorsuppressorgens PTEN führt¹¹⁴. Deshalb könnte eine Herunterregulation der MicroRNA-371a-3p mit folgender Erhöhung der PTEN-Expression einen neuen therapeutischen Ansatzpunkt darstellen. Da in dieser Arbeit bereits gezeigt wurde, dass der Komplexpartner VIM3 an der Transkription der MicroRNA-371a-3p beteiligt

ist, wurden nun die Auswirkungen eines VIM3-Knockdowns auf die MicroRNA-371a-3p-Expression mittels VIM3 siRNA untersucht. Hierbei zeigte sich für alle Prostatakarzinomzelllinien und für die Kontrollzelllinie (BPH-1) eine signifikante Reduktion der MicroRNA-371a-3p-Expression in den VIM3 siRNA-Knockdown-Zellen verglichen mit den Zellen, die mit ET-1 als *high control* stimuliert wurden (Abbildung 23). Eine Hypothese der vorliegenden Arbeit ist, dass im Zuge der MicroRNA-371a-3p Reduktion die PTEN-Expression ansteigt und somit die durch den PTEN-Verlust ausgelösten negativen Auswirkungen auf Tumoraggressivität und Krankheitsprognose aufheben könnte. Wir vermuten, dass die PTEN-Funktion durch einen VIM3 siRNA-Knockdown wiederhergestellt werden könnte. Dies müsste in Zukunft jedoch noch experimentell gesichert werden. Die hier hypothetisierte Hochregulation von PTEN durch Herunterregulation der MicroRNA-371a-3p über einen VIM3-Knockdown stellt einen attraktiven neuen therapeutischen Ansatzpunkt dar. Die Vertiefung des Verständnisses über die Auswirkungen eines PTEN-Verlusts auf das Prostatakarzinom und die Therapieresistenz wird in zukünftigen Studien von großer Bedeutung sein, um neue therapeutische Ansatzpunkte zu definieren und ultimativ die Behandlung der Patienten verbessern. Da ein siRNA-Knockdown nicht die komplette Elimination von VIM3 garantieren kann, sollte der nächste Schritt die Durchführung eines kompletten VIM3-Knockouts sein.

5.9. VIM3-Knockdown führt zur Hochregulation des Androgenrezeptors

Eine weitere Hypothese dieser Arbeit ist es, dass die Expression der MicroRNA-371a-3p zu einer Herunterregulation des Androgenrezeptors führt. Es wird vermutet, dass die MicroRNA-371a-3p durch Bindung an die 3'-UTR des Androgenrezeptors eine Reduktion der Androgenrezeptordichte bewirken kann¹²¹. Da zuvor bereits gezeigt werden konnte, dass der Komplexpartner VIM3 an der Transkription der MicroRNA-371a-3p beteiligt ist und ein siRNA VIM3-Knockdown zu einer signifikanten Reduktion der MicroRNA-371a-3p-Expression führt, könnte ein damit verbundener Anstieg des Androgenrezeptors einen weiteren therapeutischen Ansatzpunkt darstellen.

Der Androgenrezeptor-Signalweg ist schon seit vielen Jahren ein therapeutischer Ansatzpunkt der Prostatakarzinomtherapie¹³²⁻¹³⁴. Da das Prostatakarzinom zunächst androgenabhängig wächst, wurden in der Vergangenheit bereits wirksame Inhibitoren der Androgensynthese entwickelt und erfolgreich in die klinische Praxis übernommen. Allerdings führt die anti-androgene Behandlung (ADT) nach anfänglichem Therapieerfolg nach circa zwei bis drei Jahren meist zu einer Resistenzentwicklung, die sich in einer Zunahme von kastrations-resistenten Prostatakarzinomen (CRPC) zeigt. Dieser Vorgang korreliert mit einer schlechten Prognose¹³²⁻¹³⁵.

Die erfolgreiche Behandlung des CRPC ist Gegenstand aktueller Forschung und es gibt verschiedenen Ansatzpunkte zur Verbesserung der Therapie. Einer dieser möglichen therapeutischen Ansatzpunkte ist die Reaktivierung der Androgenrezeptorexpression¹³⁵. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass neuere effektive Androgenrezeptorinhibitoren

einen klinischen Erfolg bei Patienten mit einem CRPC zeigen^{127,135}. Dies macht deutlich, dass das CRPC von der Aktivierung des Androgenrezeptor-Signalwegs abhängig bleibt und eine therapeutische Reexpression des Androgenrezeptors einen Ansatzpunkt mit großem Potenzial darstellt^{135,210}. Es konnte zum Beispiel bereits gezeigt werden, dass ein Ausschalten der Gene, die an der ursprünglichen Umwandlung in ein CRPC beteiligt sind, wie zum Beispiel SOX2 als wichtiger Transkriptionsfaktor der Zellplastizität, eine Reexpression des Androgenrezeptors hervorrufen kann²¹¹. Eine andere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass das Forkhead Box C2 Protein (FOXC2) an der Modulation des Androgenrezeptors beteiligt ist. Eine Reduktion des FOXC2 führte zu einer starken Reexpression des Androgenrezeptors in DU145-Zellen²¹². In DU145-Zellen führte eine Transduktion des Androgenrezeptor-Gens in Androgenrezeptor-negative Prostatakarzinomzellen zu einer Hochregulation des PSA-Werts und einer massiv reduzierten Zellmigration und -invasion. Dieser Effekt beruht wahrscheinlich auf einer Expression von Genen, die an der Zell-Zell- und Extrazellulärmatrix-Interaktion beteiligt sind, wie zum Beispiel Integrine und Chemokinrezeptoren²¹³⁻²¹⁵. Eine Androgenrezeptor-Reexpression führte zudem über Inhibition des MAPK-p38-Signalwegs zu einer Sensitivierung der DU145-Zellen gegenüber Enzalutamid²¹².

In den letzten Jahrzehnten gab es also bereits verschiedene Experimente, deren Ziel eine Reaktivierung der Androgenrezeptor-Expression in Prostatakarzinomzellen war. Auch wenn nur wenige dieser Experimente die Konsequenzen der neu gewonnenen Androgenrezeptor-Expression untersuchen, so sind die generellen Ergebnisse übereinstimmend. Eine Androgenrezeptor-Reexpression scheint mit reduzierten Leveln von Transkriptionsfaktoren, die an der ursprünglichen Reduktion des Androgenrezeptors beteiligt waren, einherzugehen¹³⁵. Die aktuelle Datenlage suggeriert, dass eine Androgenrezeptor-Reexpression in Androgenrezeptor-negativen-Zelllinien eine tumorsuppressive Funktion hat und zu einer reduzierten Zellproliferation, -migration und -invasion führt. Allerdings sind einige dieser Studien nicht komplett und geben nur vorläufige Einblicke in diesen Therapieansatz ohne zuverlässige *in vivo* Experimente, die die Beobachtungen bestätigen¹³⁵.

In Zukunft sollten mehr klinisch relevante Untersuchungen basierend auf Patientenmaterial durchgeführt werden, um die Variationen von Androgenrezeptor-negativen Erkrankungen besser erfassen zu können. Hierbei sollte auch ein VIM3-Knockdown mit anschließender Reduktion der MicroRNA-371a-3p-Expression und darauffolgender Androgenrezeptor-Reexpression weiter untersucht werden. Die Wiederherstellung der Androgenrezeptor-Expression mit nachfolgendem Einsatz von Inhibitoren des Androgenrezeptor-Signalwegs muss als möglicher therapeutischer Ansatzpunkt in weiteren Experimenten genauer analysiert werden, um bessere Behandlungsmöglichkeiten für diese fatale Erkrankung zu entwickeln.

5.10. Zusammenfassung: Komplex als zukünftiger Malignitätsmarker

Die Bedeutung einer verbesserten Differenzierung des Prostatakarzinoms mit möglichst wenig invasiven Methoden wurde zu Beginn dieser Arbeit dargelegt. Die aktuell verfügbaren Parameter zur Differenzierung des Prostatakarzinoms sind nicht ausreichend, um die enorme biologische Vielfalt des Prostatakarzinoms zu erfassen und allen Patienten die richtige Therapie anzubieten sowie Überdiagnostik und Übertherapie zu vermeiden. Das übergeordnete Ziel dieser Arbeit bestand in der Identifikation eines Komplexes zur besseren Differenzierung des Prostatakarzinoms sowie zur Darstellung neuer therapeutischer Ansatzpunkte.

In der vorliegenden Arbeit konnte ein Komplex bestehend aus VIM3, ATG7 und TP53 identifiziert werden, welcher in Prostatakarzinomzellen überexprimiert ist und dessen Vorhandensein mit einer höheren Proliferationsrate der Karzinomzellen korrelierte. Durch seine Lokalisation im Zellkern ist eine Beteiligung an verschiedenen regulatorischen Prozessen möglich, wobei hier zunächst die Beteiligung an der Transkription der MicroRNA-371a-3p im Fokus stand. Es konnte zudem gezeigt werden, dass die MicroRNA-371a-3p eine starke proliferationsfördernde Wirkung auf die Zellen hat. Mit ihrem direkten Effekt auf das Tumorsuppressorgen PTEN und die Expression des Androgenrezeptors macht sie den identifizierten Komplex zu einem interessanten therapeutischen Ansatzpunkt. Eine Detektion des Komplexes könnte in Zukunft zur besseren Differenzierung des Prostatakarzinoms beitragen. Neben einer verbesserten Differenzierung bietet der hier identifizierte Komplex gleichzeitig auch neue therapeutische Ansatzpunkte für das Prostatakarzinom.

Es wurde demonstriert, dass ein Knockdown von VIM3 eine verringerte Expression der MicroRNA-371a-3p zur Folge hat. Wir vermuten, dass dies mit einer potenziellen Wiederherstellung von PTEN und einer Androgenrezeptor-Reexpression einhergehen könnte. Ein VIM3-Knockdown könnte so einen günstigen Einfluss auf den Krankheitsverlauf und insbesondere auf die Tumorzellmigration und -proliferation haben.

Ein weiterer in dieser Arbeit identifizierter möglicher therapeutischer Ansatzpunkt ist die ergänzende Therapie mit WA. Die Behandlung mit WA führte zu einer Abnahme der Expression von VIM3 sowie einem langsameren Migrationsverhalten der Prostatakarzinomzellen. Dadurch könnte WA als kostengünstiges, natürliches Mittel mit wenigen Nebenwirkungen und antikanzerogenen Effekten in Zukunft Einzug als ergänzendes Medikament in die Therapie des Prostatakarzinoms finden¹⁹². Zudem konnte der proliferationsfördernde Effekt einer Behandlung mit ET-1 auf die Prostatakarzinomzellen bestätigt werden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass in der vorliegenden Arbeit mehrere therapeutische Ansatzpunkte und Möglichkeiten zur besseren Differenzierung von Prostatakarzinomen identifiziert wurden, die in Zukunft weiter validiert werden müssen. Neben der Überexpression des identifizierten Komplexes in Prostatakarzinomzellen und dem VIM3-

Knockdown als Hauptansatzpunkt, sollte auch der Effekt einer zusätzlichen Behandlung der Patienten mit WA genauer analysiert werden.

5.11. Limitationen und Ausblick

Neben vielversprechenden Ergebnissen weist dieses Projekt auch einige Limitationen auf, welche jedoch gleichzeitig die Basis für weitere Experimente darstellen.

Selbstverständlich muss zunächst betont werden, dass es sich bei den vorliegenden Ergebnissen um Daten handelt, welche auf Zellbasis generiert wurden. Eine sichere Übertragung der Ergebnisse auf den Patienten ist daher nicht gegeben. In einem weiteren Schritt müssten die Ergebnisse in Material von Prostatakarzinompatienten validiert werden. Es sollte gezeigt werden, dass auch hier der Komplex nachgewiesen werden kann. Die einzelnen Komplexpartner können beispielsweise im Patientenblut oder Urin mittels ELISA analysiert werden. Hierbei sollten auch unterschiedliche Patientengruppen verglichen werden, um zu zeigen, dass das Vorhandensein des Komplexes mit einer höheren Tumoraggressivität korreliert.

An dieser Stelle sollte auch auf mögliche Fehlerquellen der hier durchgeführten Experimente hingewiesen werden. Eine experimentelle Arbeit bietet immer die Gefahr von Messungenauigkeiten, Pipettierfehlern oder Zählfehlern. Auch in der vorliegenden Arbeit kann nicht garantiert werden, dass alle Experimente ohne solche Fehler abgelaufen sind. Es ist deshalb wichtig in Zukunft die Ergebnisse in weiteren Studien zu validieren.

Ferner bieten die hier verwendeten Methoden noch Potenzial zur Verbesserung. Mittels PCR und EMSA konnte bereits gezeigt werden, dass es eine Verbindung zwischen dem Komplex und der MicroRNA-371a-3p gibt. Man könnte zur weiteren Analyse noch einen Luciferase Assay durchführen, womit bestimmt werden kann, ob ein Protein ein bestimmtes Zielgen aktiviert oder dessen Aktivierung verhindert. Außerdem sollten weitere Zielgene des Komplexes untersucht werden. Zudem sollte die durch einen VIM3-Knockdown hervorgerufene Reexpression des Androgenrezeptors über Herunterregulation der MicroRNA-371a-3p weiter analysiert werden.

Generell ist außerdem bekannt, dass eine der Hauptlimitation von vielen Studien zu neuen Biomarkern des Prostatakarzinoms die mangelnde Vergleichbarkeit mit den klinischen Goldstandard-Variablen und -Methoden ist. Dadurch wird eine Translation der Biomarker in den klinischen Alltag erschwert und es bleibt unklar, ob eine erhöhte MicroRNA-Expression beispielsweise mehr Informationen liefern kann als der PSA-Wert. Dies gilt auch für die vorliegende Arbeit. Obwohl die hier präsentierten Ergebnisse mit der Überexpression des Komplexes in Prostatakarzinomzellen und dem direkten Einfluss von VIM3 auf die Transkription der MicroRNA-371a-3p einen vielversprechenden Ansatz darstellen, so kann man zum jetzigen Zeitpunkt nicht sicher sagen, ob dieser Komplex die Differenzierung des Prostatakarzinoms signifikant verbessern kann. Im Zusammenhang hiermit gibt es jedoch bereits

einige Studien, die den Vorteil einer Kombination verschiedener Marker zur Differenzierung von Prostatakarzinomen aufzeigen²¹⁶⁻²¹⁸. Es muss jedoch auch beachtet werden, dass der Nachweis von MicroRNAs schwierig, sehr teuer und zeitaufwendig ist.

Es ist wahrscheinlich, dass auch eine Bestimmung des hier identifizierten Komplexes mit seinen Auswirkungen auf die MicroRNA-371a-3p nicht in der Lage sein wird, die Bestimmung des PSA-Werts zu ersetzen. Allerdings ist es vorstellbar, dass der Komplex eine gute Ergänzung zur verbesserten Differenzierung und zu den aktuellen Therapiemöglichkeiten darstellen könnte.

6. Literaturverzeichnis

1. Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Voll M, Wesker K. Prometheus LernAtlas der Anatomie Innere Organe. 5. ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag: S. 336-337; 2018.
2. Ittmann M. Anatomy and Histology of the Human and Murine Prostate. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2018; **8**(5).
3. Schieble TH. Anatomie: Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie. 9. ed. Berlin: Springer: S. 624; 2005.
4. McNeal JE. The zonal anatomy of the prostate. *Prostate* 1981; **2**(1): 35-49.
5. Nguyen HT, Etzell J, Turek PJ. Normal human ejaculatory duct anatomy: a study of cadaveric and surgical specimens. *J Urol* 1996; **155**(5): 1639-1642.
6. McNeal JE. Normal histology of the prostate. *Am J Surg Pathol* 1988; **12**(8): 619-633.
7. Bergengren O, Pekala KR, Matsoukas K, et al. 2022 Update on Prostate Cancer Epidemiology and Risk Factors-A Systematic Review. *Eur Urol* 2023; **84**(2): 191-206.
8. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft DK, AWMF). S3-Leitlinie Prostatakarzinom, Langversion 7.0, AWMF Registernummer: 043/022OL. 2024. https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Prostatakarzinom/Version_7/LL_Prostatakarzinom_Langversion_7.0.pdf (letzter Zugriff 27.12.2024)
9. Krebs in Deutschland für 2019/2020. 14. ed. Berlin: Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.; 2023.
10. Haas GP, Delongchamps N, Brawley OW, Wang CY, de la Roza G. The worldwide epidemiology of prostate cancer: perspectives from autopsy studies. *Can J Urol* 2008; **15**(1): 3866-3871.
11. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer statistics, 2022. *CA Cancer J Clin* 2022; **72**(1): 7-33.
12. Fitzmaurice C, Allen C, Barber RM, et al. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncol* 2017; **3**(4): 524-548.
13. Chu KC, Tarone RE, Freeman HP. Trends in prostate cancer mortality among black men and white men in the United States. *Cancer* 2003; **97**(6): 1507-1516.
14. Plata Bello A, Concepcion Masip T. Prostate cancer epidemiology. *Arch Esp Urol* 2014; **67**(5): 373-382.
15. Grozescu T, Popa F. Prostate cancer between prognosis and adequate/proper therapy. *J Med Life* 2017; **10**(1): 5-12.
16. Johns LE, Houlston RS. A systematic review and meta-analysis of familial prostate cancer risk. *BJU Int* 2003; **91**(9): 789-794.

17. Etminan M, Takkouche B, Caamaño-Isorna F. The role of tomato products and lycopene in the prevention of prostate cancer: a meta-analysis of observational studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; **13**(3): 340-245.
18. Ozasa K, Nakao M, Watanabe Y, et al. Serum phytoestrogens and prostate cancer risk in a nested case-control study among Japanese men. *Cancer Sci* 2004; **95**(1): 65-71.
19. Graham S, Haughey B, Marshall J, et al. Diet in the epidemiology of carcinoma of the prostate gland. *J Natl Cancer Inst* 1983; **70**(4): 687-692.
20. Heidenreich A. Tumordiagnostik „state of the art“: Screening, Diagnostik und Staging des Prostatakarzinoms“. *Im Fokus Onkologie* 2007; **3**: 54-61.
21. Müller-Lisse UL, Hofstetter A. [Urological diagnosis of prostate carcinoma]. *Radiologe* 2003; **43**(6): 432-440.
22. Kirby R, Christmas T, Brawer M. Screening of prostate cancer. 2. ed. London: Mosby; 2001.
23. Schlemmer HP. Prostatakarzinom. *Der Radiologe* 2008; **48**(1): 45-51.
24. Köditz B, Stog A, Göbel H, et al. A new Prostate Cancer Surrogate Marker - Vimentin3? *Open Access Journal of Oncology and Medicine* 2021; **4**(3): 402-408.
25. Ayyıldız SN, Ayyıldız A. PSA, PSA derivatives, proPSA and prostate health index in the diagnosis of prostate cancer. *Turk J Urol* 2014; **40**(2): 82-88.
26. Lilja H, Oldbring J, Rannevik G, Laurell CB. Seminal vesicle-secreted proteins and their reactions during gelation and liquefaction of human semen. *J Clin Invest* 1987; **80**(2): 281-285.
27. Jocham D, Miller K. Praxis der Urologie. 3. ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag: S.128-192; 2007.
28. Stephan C. Diagnostik und Risikoeinschätzung beim Prostatakarzinom. Bremen: UNI-MED Verlag AG; 2014.
29. Mistry K, Cable G. Meta-analysis of prostate-specific antigen and digital rectal examination as screening tests for prostate carcinoma. *J Am Board Fam Pract* 2003; **16**(2): 95-101.
30. Lilja H, Cronin AM, Dahlin A, et al. Prediction of significant prostate cancer diagnosed 20 to 30 years later with a single measure of prostate-specific antigen at or before age 50. *Cancer* 2011; **117**(6): 1210-1219.
31. Kuefer R. Tastuntersuchung, PSA und transrektaler Ultraschall - Rationale Diagnostik beim Prostatakarzinom. *Der Klinikarzt* 2004; **33**(5): 127-132.
32. Sedelaar JP, Vijverberg PL, De Reijke TM, et al. Transrectal ultrasound in the diagnosis of prostate cancer: state of the art and perspectives. *Eur Urol* 2001; **40**(3): 275-284.

33. Catalona WJ, Richie JP, Ahmann FR, et al. Comparison of Digital Rectal Examination and Serum Prostate Specific Antigen in the Early Detection of Prostate Cancer: Results of a Multicenter Clinical Trial of 6,630 Men. *J Urol* 2017; **197**(2S): 200-207.
34. Harris R, Lohr KN. Screening for prostate cancer: an update of the evidence for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med* 2002; **137**(11): 917-929.
35. Rinnab L, Küfer R, Hautmann RE, et al. Innovative Diagnostik in der Früherkennung und beim Staging der lokalisierten Prostatakarzinoms. *Der Urologe* 2005; **11**: 1264.
36. Ashby EC, Rees M, Dowding CH. Prophylaxis against systemic infection after transrectal biopsy for suspected prostatic carcinoma. *Br Med J* 1978; **2**(6147): 1263-1264.
37. Cheng L, Montironi R, Bostwick DG, Lopez-Beltran A, Berney DM. Staging of prostate cancer. *Histopathology* 2012; **60**(1): 87-117.
38. Kweldam CF, van Leenders GJ, van der Kwast T. Grading of prostate cancer: a work in progress. *Histopathology* 2019; **74**(1): 146-160.
39. Bedke J, Gratzke C, Miller K. Klassifikation des Krankheitsstadiums. 2021. <https://www.krebsgesellschaft.de/onko-internetportal/basis-informationen-krebs/krebsarten/prostatakrebs/klassifikation-des-krankheitsstadiums.html> (letzter Zugriff 27.12.2024).
40. *EAU Guidelines. Edn presented at the EAU Annual Congress Amsterdam 2022.* Arnhem, Niederlande: EAU Guidelines Office.
41. D'Amico AV, Whittington R, Malkowicz SB, et al. Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer. *Jama* 1998; **280**(11): 969-974.
42. Abuzallouf S, Dayes I, Lukka H. Baseline staging of newly diagnosed prostate cancer: a summary of the literature. *J Urol* 2004; **171**(6 Pt 1): 2122-2127.
43. Hofman MS, Lawrentschuk N, Francis RJ, et al. Prostate-specific membrane antigen PET-CT in patients with high-risk prostate cancer before curative-intent surgery or radiotherapy (proPSMA): a prospective, randomised, multicentre study. *Lancet* 2020; **395**(10231): 1208-1216.
44. Gleason DF, Mellinger GT. Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *J Urol* 1974; **111**(1): 58-64.
45. Epstein JI, Egevad L, Amin MB, Delahunt B, Srigley JR, Humphrey PA. The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma: Definition of Grading Patterns and Proposal for a New Grading System. *Am J Surg Pathol* 2016; **40**(2): 244-252.
46. Epstein JI, Allsbrook WC, Jr., Amin MB, Egevad LL. The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2005; **29**(9): 1228-1242.

47. Humphrey PA. Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate. *Mod Pathol* 2004; **17**(3): 292-306.
48. D'Amico AV, Whittington R, Malkowicz SB, et al. Biochemical outcome after radical prostatectomy or external beam radiation therapy for patients with clinically localized prostate carcinoma in the prostate specific antigen era. *Cancer* 2002; **95**(2): 281-286.
49. Hamdy FC, Donovan JL, Lane JA, et al. 10-Year Outcomes after Monitoring, Surgery, or Radiotherapy for Localized Prostate Cancer. *N Engl J Med* 2016; **375**(15): 1415-1424.
50. Akakura K, Suzuki H, Ichikawa T, et al. A randomized trial comparing radical prostatectomy plus endocrine therapy versus external beam radiotherapy plus endocrine therapy for locally advanced prostate cancer: results at median follow-up of 102 months. *Jpn J Clin Oncol* 2006; **36**(12): 789-793.
51. Swanson GP, Thompson IM, Basler J. Treatment options in lymph node-positive prostate cancer. *Cancer* 2006; **106**(12): 2531-2539.
52. Studer UE, Whelan P, Albrecht W, et al. Immediate or deferred androgen deprivation for patients with prostate cancer not suitable for local treatment with curative intent: European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC) Trial 30891. *J Clin Oncol* 2006; **24**(12): 1868-1876.
53. Agarwal N, McQuarrie K, Bjartell A, et al. Health-related quality of life after apalutamide treatment in patients with metastatic castration-sensitive prostate cancer (TITAN): a randomised, placebo-controlled, phase 3 study. *Lancet Oncol* 2019; **20**(11): 1518-1530.
54. Armstrong AJ, Szmulewitz RZ, Petrylak DP, et al. ARCHES: A Randomized, Phase III Study of Androgen Deprivation Therapy With Enzalutamide or Placebo in Men With Metastatic Hormone-Sensitive Prostate Cancer. *J Clin Oncol* 2019; **37**(32): 2974-2986.
55. Fizazi K, Tran N, Fein L, et al. Abiraterone acetate plus prednisone in patients with newly diagnosed high-risk metastatic castration-sensitive prostate cancer (LATITUDE): final overall survival analysis of a randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2019; **20**(5): 686-700.
56. James ND, Sydes MR, Clarke NW, et al. Addition of docetaxel, zoledronic acid, or both to first-line long-term hormone therapy in prostate cancer (STAMPEDE): survival results from an adaptive, multiarm, multistage, platform randomised controlled trial. *Lancet* 2016; **387**(10024): 1163-1177.
57. Kunath F, Jensen K, Pinart M, et al. Early versus deferred standard androgen suppression therapy for advanced hormone-sensitive prostate cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2019; **6**(6): Cd003506.
58. Sartor O, de Bono J, Chi KN, et al. Lutetium-177-PSMA-617 for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *N Engl J Med* 2021; **385**(12): 1091-1103.

59. de Bono JS, Oudard S, Ozguroglu M, et al. Prednisone plus cabazitaxel or mitoxantrone for metastatic castration-resistant prostate cancer progressing after docetaxel treatment: a randomised open-label trial. *Lancet* 2010; **376**(9747): 1147-1154.
60. Yan Y, Yeon SY, Qian C, You S, Yang W. On the Road to Accurate Protein Biomarkers in Prostate Cancer Diagnosis and Prognosis: Current Status and Future Advances. *Int J Mol Sci* 2021; **22**(24): 13537.
61. Martin NE, Mucci LA, Loda M, Depinho RA. Prognostic determinants in prostate cancer. *Cancer J* 2011; **17**(6): 429-437.
62. Etzioni R, Penson DF, Legler JM, et al. Overdiagnosis due to prostate-specific antigen screening: lessons from U.S. prostate cancer incidence trends. *J Natl Cancer Inst* 2002; **94**(13): 981-990.
63. Loeb S, Bjurlin MA, Nicholson J, et al. Overdiagnosis and overtreatment of prostate cancer. *Eur Urol* 2014; **65**(6): 1046-1055.
64. Wang G, Zhao D, Spring DJ, DePinho RA. Genetics and biology of prostate cancer. *Genes Dev* 2018; **32**(17-18): 1105-1140.
65. Sadi MV. PSA screening for prostate cancer. *Rev Assoc Med Bras (1992)* 2017; **63**(8): 722-725.
66. Cooperberg MR, Carroll PR, Klotz L. Active surveillance for prostate cancer: progress and promise. *J Clin Oncol* 2011; **29**(27): 3669-2676.
67. Turnham DJ, Bullock N, Dass MS, Staffurth JN, Pearson HB. The PTEN Conundrum: How to Target PTEN-Deficient Prostate Cancer. *Cells* 2020; **9**(11).
68. Soloway MS, Soloway CT, Eldefrawy A, Acosta K, Kava B, Manoharan M. Careful selection and close monitoring of low-risk prostate cancer patients on active surveillance minimizes the need for treatment. *Eur Urol* 2010; **58**(6): 831-835.
69. van As NJ, Norman AR, Thomas K, et al. Predicting the probability of deferred radical treatment for localised prostate cancer managed by active surveillance. *Eur Urol* 2008; **54**(6): 1297-1305.
70. van den Bergh RC, Roemeling S, Roobol MJ, et al. Outcomes of men with screen-detected prostate cancer eligible for active surveillance who were managed expectantly. *Eur Urol* 2009; **55**(1): 1-8.
71. Schatten H. Brief Overview of Prostate Cancer Statistics, Grading, Diagnosis and Treatment Strategies. *Adv Exp Med Biol* 2018; **1095**: 1-14.
72. Kretschmer A, Tilki D. Biomarkers in prostate cancer - Current clinical utility and future perspectives. *Crit Rev Oncol Hematol* 2017; **120**: 180-193.
73. Egevad L, Ahmad AS, Algaba F, et al. Standardization of Gleason grading among 337 European pathologists. *Histopathology* 2013; **62**(2): 247-256.

74. Kane CJ, Eggener SE, Shindel AW, Andriole GL. Variability in Outcomes for Patients with Intermediate-risk Prostate Cancer (Gleason Score 7, International Society of Urological Pathology Gleason Group 2-3) and Implications for Risk Stratification: A Systematic Review. *Eur Urol Focus* 2017; **3**(4-5): 487-497.
75. Hoogland AM, Kweldam CF, van Leenders GJ. Prognostic histopathological and molecular markers on prostate cancer needle-biopsies: a review. *Biomed Res Int* 2014; **2014**: 341324.
76. Loeb S, Vellekoop A, Ahmed HU, et al. Systematic review of complications of prostate biopsy. *Eur Urol* 2013; **64**(6): 876-892.
77. KÖditz B, Stog A, Göbel H, et al. Vimentin 3 Expression in Prostate Cancer Cells. *Anticancer Res* 2021; **41**(1): 169-174.
78. Green KJ, Böhringer M, Gocken T, Jones JC. Intermediate filament associated proteins. *Adv Protein Chem* 2005; **70**: 143-202.
79. Osborn M, Weber K. Tumor diagnosis by intermediate filament typing: a novel tool for surgical pathology. *Lab Invest* 1983; **48**(4): 372-394.
80. Mendez MG, Kojima S, Goldman RD. Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition. *Faseb j* 2010; **24**(6): 1838-1851.
81. Dave JM, Bayless KJ. Vimentin as an integral regulator of cell adhesion and endothelial sprouting. *Microcirculation* 2014; **21**(4): 333-344.
82. Osborn M, Caselitz J, Püschel K, Weber K. Intermediate filament expression in human vascular smooth muscle and in arteriosclerotic plaques. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1987; **411**(5): 449-458.
83. Shapovalov Y, Hoffman D, Zuch D, de Mesy Bentley KL, Eliseev RA. Mitochondrial dysfunction in cancer cells due to aberrant mitochondrial replication. *J Biol Chem* 2011; **286**(25): 22331-22338.
84. McCormick MB, Kouklis P, Syder A, Fuchs E. The roles of the rod end and the tail in vimentin IF assembly and IF network formation. *J Cell Biol* 1993; **122**(2): 395-407.
85. Klotzsche O, Etzrodt D, Hohenberg H, Bohn W, Deppert W. Cytoplasmic retention of mutant tsp53 is dependent on an intermediate filament protein (Vimentin) scaffold. *Oncogene* 1998; **16**(26): 3423-3434.
86. Thakkar D, Shervington L, Shervington A. Proteomic studies coupled with RNAi methodologies can shed further light on the downstream effects of telomerase in glioma. *Cancer Invest* 2011; **29**(2): 113-122.
87. von Brandenstein M, Bernhart SH, Pansky A, et al. Beyond the 3'UTR binding-microRNA-induced protein truncation via DNA binding. *Oncotarget* 2018; **9**(67): 32855-32867.

88. von Brandenstein M, Puetz K, Schlosser M, et al. Vimentin 3, the new hope, differentiating RCC versus oncocytoma. *Dis Markers* 2015; **2015**(368534): 1-8.
89. Funke T, von Brandenstein M, Paffenholz P, et al. Vimentin 3 Allows Differentiation between Normozoospermia and Oligoasthenoteratozoospermia. *Dis Markers* 2019; **2019**: 9803498.
90. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Goto K, Masaki T. A novel peptide vasoconstrictor, endothelin, is produced by vascular endothelium and modulates smooth muscle Ca²⁺ channels. *J Hypertens Suppl* 1988; **6**(4): 188-191.
91. Tapia JC, Niechi I. Endothelin-converting enzyme-1 in cancer aggressiveness. *Cancer Lett* 2019; **452**: 152-157.
92. Papanikolaou S, Bravou V, Papadaki H, Gyftopoulos K. The role of the endothelin axis in promoting epithelial to mesenchymal transition and lymph node metastasis in prostate adenocarcinoma. *Urol Ann* 2017; **9**(4): 372-379.
93. Nelson JB, Udan MS, Guruli G, Pflug BR. Endothelin-1 inhibits apoptosis in prostate cancer. *Neoplasia* 2005; **7**(7): 631-637.
94. Thaiparambil JT, Bender L, Ganesh T, et al. Withaferin A inhibits breast cancer invasion and metastasis at sub-cytotoxic doses by inducing vimentin disassembly and serine 56 phosphorylation. *Int J Cancer* 2011; **129**(11): 2744-2755.
95. Singh N, Yadav SS, Rao AS, et al. Review on anticancerous therapeutic potential of *Withania somnifera* (L.) Dunal. *J Ethnopharmacol* 2021; **270**: 113704.
96. Dutta R, Khalil R, Green R, Mohapatra SS, Mohapatra S. *Withania Somnifera* (Ashwagandha) and Withaferin A: Potential in Integrative Oncology. *Int J Mol Sci* 2019; **20**(21).
97. Hahm ER, Kim SH, Singh KB, Singh K, Singh SV. A Comprehensive Review and Perspective on Anticancer Mechanisms of Withaferin A in Breast Cancer. *Cancer Prev Res (Phila)* 2020; **13**(9): 721-734.
98. Devi PU, Sharada AC, Solomon FE, Kamath MS. In vivo growth inhibitory effect of *Withania somnifera* (Ashwagandha) on a transplantable mouse tumor, Sarcoma 180. *Indian J Exp Biol* 1992; **30**(3): 169-172.
99. Vanden Berghe W, Sabbe L, Kaileh M, Haegeman G, Heyninck K. Molecular insight in the multifunctional activities of Withaferin A. *Biochem Pharmacol* 2012; **84**(10): 1282-1291.
100. Scartezzini P, Speroni E. Review on some plants of Indian traditional medicine with antioxidant activity. *J Ethnopharmacol* 2000; **71**(1-2): 23-43.
101. Devi PU. *Withania somnifera* Dunal (Ashwagandha): potential plant source of a promising drug for cancer chemotherapy and radiosensitization. *Indian J Exp Biol* 1996; **34**(10): 927-932.

102. Newman DJ, Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *J Nat Prod* 2020; **83**(3): 770-803.
103. Dubey S, Singh M, Nelson A, Karan D. A Perspective on *Withania somnifera* Modulating Antitumor Immunity in Targeting Prostate Cancer. *J Immunol Res* 2021; **2021**: 9483433.
104. Eastham JA, Stapleton AM, Gousse AE, et al. Association of p53 mutations with metastatic prostate cancer. *Clin Cancer Res* 1995; **1**(10): 1111-1118.
105. Muller PA, Vousden KH. p53 mutations in cancer. *Nat Cell Biol* 2013; **15**(1): 2-8.
106. Ecke TH, Schlechte HH, Schiemenz K, et al. TP53 gene mutations in prostate cancer progression. *Anticancer Res* 2010; **30**(5): 1579-1586.
107. Yang X, Wang J, Liu C, et al. Cleavage of p53-vimentin complex enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Am J Pathol* 2005; **167**(3): 705-719.
108. Yang Y, Karsli-Uzunbas G, Poillet-Perez L, et al. Autophagy promotes mammalian survival by suppressing oxidative stress and p53. *Genes Dev* 2020; **34**(9-10): 688-700.
109. White EJ, Martin V, Liu JL, et al. Autophagy regulation in cancer development and therapy. *Am J Cancer Res* 2011; **1**(3): 362-372.
110. White E, Karp C, Strohecker AM, Guo Y, Mathew R. Role of autophagy in suppression of inflammation and cancer. *Curr Opin Cell Biol* 2010; **22**(2): 212-217.
111. Santanam U, Banach-Petrosky W, Abate-Shen C, Shen MM, White E, DiPaola RS. Atg7 cooperates with Pten loss to drive prostate cancer tumor growth. *Genes Dev* 2016; **30**(4): 399-407.
112. Guo JY, Karsli-Uzunbas G, Mathew R, et al. Autophagy suppresses progression of K-ras-induced lung tumors to oncocytomas and maintains lipid homeostasis. *Genes Dev* 2013; **27**(13): 1447-1461.
113. Shah JA, Khattak S, Rauf MA, Cai Y, Jin J. Potential Biomarkers of miR-371-373 Gene Cluster in Tumorigenesis. *Life (Basel)* 2021; **11**(9).
114. Wang H, Zhao Y, Chen T, Liu G, He N, Hu H. MiR-371 promotes proliferation and metastasis in hepatocellular carcinoma by targeting PTEN. *BMB Rep* 2019; **52**(5): 312-317.
115. Li L, Zhu D, Huang L, et al. Argonaute 2 complexes selectively protect the circulating microRNAs in cell-secreted microvesicles. *PLoS One* 2012; **7**(10): e46957.
116. Voorhoeve PM, le Sage C, Schrier M, et al. A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors. *Cell* 2006; **124**(6): 1169-1181.
117. Murray MJ, Halsall DJ, Hook CE, Williams DM, Nicholson JC, Coleman N. Identification of microRNAs From the miR-371~373 and miR-302 clusters as potential serum biomarkers of malignant germ cell tumors. *Am J Clin Pathol* 2011; **135**(1): 119-125.

118. Duffy MJ. Clinical uses of tumor markers: a critical review. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2001; **38**(3): 225-262.
119. Alhasan AH, Scott AW, Wu JJ, et al. Circulating microRNA signature for the diagnosis of very high-risk prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016; **113**(38): 10655-10660.
120. Östling P, Leivonen SK, Aakula A, et al. Systematic analysis of microRNAs targeting the androgen receptor in prostate cancer cells. *Cancer Res* 2011; **71**(5): 1956-1967.
121. ChunJiao S, Huan C, ChaoYang X, GuoMei R. Uncovering the roles of miRNAs and their relationship with androgen receptor in prostate cancer. *IUBMB Life* 2014; **66**(6): 379-386.
122. Leite KR, Morais DR, Florez MG, et al. The role of microRNAs 371 and 34a in androgen receptor control influencing prostate cancer behavior. *Urol Oncol* 2015; **33**(6): 267.15-22.
123. Wise HM, Hermida MA, Leslie NR. Prostate cancer, PI3K, PTEN and prognosis. *Clin Sci (Lond)* 2017; **131**(3): 197-210.
124. Cuzick J, Yang ZH, Fisher G, et al. Prognostic value of PTEN loss in men with conservatively managed localised prostate cancer. *Br J Cancer* 2013; **108**(12): 2582-2589.
125. Uzoh CC, Perks CM, Bahl A, Holly JM, Sugiono M, Persad RA. PTEN-mediated pathways and their association with treatment-resistant prostate cancer. *BJU Int* 2009; **104**(4): 556-561.
126. Jamaspishvili T, Berman DM, Ross AE, et al. Clinical implications of PTEN loss in prostate cancer. *Nat Rev Urol* 2018; **15**(4): 222-234.
127. Aurilio G, Cimadamore A, Mazzucchelli R, et al. Androgen Receptor Signaling Pathway in Prostate Cancer: From Genetics to Clinical Applications. *Cells* 2020; **9**(12): 1-8.
128. Heinlein CA, Chang C. Androgen receptor in prostate cancer. *Endocr Rev* 2004; **25**(2): 276-308.
129. Sar M, Lubahn DB, French FS, Wilson EM. Immunohistochemical localization of the androgen receptor in rat and human tissues. *Endocrinology* 1990; **127**(6): 3180-3186.
130. Brinkmann AO, Klaasen P, Kuiper GG, et al. Structure and function of the androgen receptor. *Urol Res* 1989; **17**(2): 87-93.
131. Heinlein CA, Chang C. Androgen receptor (AR) coregulators: an overview. *Endocr Rev* 2002; **23**(2): 175-200.
132. Rosner IL, Ravindranath L, Furusato B, et al. Higher tumor to benign ratio of the androgen receptor mRNA expression associates with prostate cancer progression after radical prostatectomy. *Urology* 2007; **70**(6): 1225-1229.
133. Li R, Wheeler T, Dai H, Frolov A, Thompson T, Ayala G. High level of androgen receptor is associated with aggressive clinicopathologic features and decreased biochemical

- recurrence-free survival in prostate: cancer patients treated with radical prostatectomy. *Am J Surg Pathol* 2004; **28**(7): 928-934.
134. Donovan MJ, Osman I, Khan FM, et al. Androgen receptor expression is associated with prostate cancer-specific survival in castrate patients with metastatic disease. *BJU Int* 2010; **105**(4): 462-467.
 135. Formaggio N, Rubin MA, Theurillat JP. Loss and revival of androgen receptor signaling in advanced prostate cancer. *Oncogene* 2021; **40**(7): 1205-1216.
 136. Chandrasekar T, Yang JC, Gao AC, Evans CP. Mechanisms of resistance in castration-resistant prostate cancer (CRPC). *Transl Androl Urol* 2015; **4**(3): 365-380.
 137. Gao S, Gao Y, He HH, et al. Androgen Receptor Tumor Suppressor Function Is Mediated by Recruitment of Retinoblastoma Protein. *Cell Rep* 2016; **17**(4): 966-976.
 138. Bantounas I, Phylactou LA, Uney JB. RNA interference and the use of small interfering RNA to study gene function in mammalian systems. *J Mol Endocrinol* 2004; **33**(3): 545-557.
 139. Kawamata T, Tomari Y. Making RISC. *Trends Biochem Sci* 2010; **35**(7): 368-376.
 140. Meister G, Landthaler M, Patkaniowska A, Dorsett Y, Teng G, Tuschl T. Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell* 2004; **15**(2): 185-197.
 141. Compton SJ, Jones CG. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal Biochem* 1985; **151**(2): 369-374.
 142. Kielkopf CL, Bauer W, Urbatsch IL. Bradford Assay for Determining Protein Concentration. *Cold Spring Harb Protoc* 2020; **2020**(4): 102269.
 143. Reynolds JA, Tanford C. Binding of dodecyl sulfate to proteins at high binding ratios. Possible implications for the state of proteins in biological membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1970; **66**(3): 1002-1007.
 144. Schägger H, von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 1987; **166**(2): 368-379.
 145. Erlich HA, Gelfand D, Sninsky JJ. Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science* 1991; **252**(5013): 1643-1651.
 146. Nurmi J, Wikman T, Karp M, Lövgren T. High-performance real-time quantitative RT-PCR using lanthanide probes and a dual-temperature hybridization assay. *Anal Chem* 2002; **74**(14): 3525-3532.
 147. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; **72**: 248-254.

148. Garner MM, Revzin A. A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the Escherichia coli lactose operon regulatory system. *Nucleic Acids Res* 1981; **9**(13): 3047-3060.
149. Ravenna L, Principessa L, Verdina A, Salvatori L, Russo MA, Petrangeli E. Distinct phenotypes of human prostate cancer cells associate with different adaptation to hypoxia and pro-inflammatory gene expression. *PLoS One* 2014; **9**(5): e96250.
150. Wan J, Zhang J. Expression of p53 and its mechanism in prostate cancer. *Oncol Lett* 2018; **16**(1): 378-382.
151. Yu SQ, Lai KP, Xia SJ, Chang HC, Chang C, Yeh S. The diverse and contrasting effects of using human prostate cancer cell lines to study androgen receptor roles in prostate cancer. *Asian J Androl* 2009; **11**(1): 39-48.
152. Li M, Jiang X, Liu D, Na Y, Gao GF, Xi Z. Autophagy protects LNCaP cells under androgen deprivation conditions. *Autophagy* 2008; **4**(1): 54-60.
153. Satelli A, Li S. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell Mol Life Sci* 2011; **68**(18): 3033-3046.
154. Lane D. Awakening angels. *Nature* 1998; **394**(6694): 616-617.
155. Hupp TR. Regulation of p53 protein function through alterations in protein-folding pathways. *Cell Mol Life Sci* 1999; **55**(1): 88-95.
156. Prives C, Hall PA. The p53 pathway. *J Pathol* 1999; **187**(1): 112-126.
157. Liang SH, Clarke MF. Regulation of p53 localization. *Eur J Biochem* 2001; **268**(10): 2779-2773.
158. Wang H, Guo M, Wei H, Chen Y. Targeting p53 pathways: mechanisms, structures, and advances in therapy. *Signal Transduct Target Ther* 2023; **8**(1): 92.
159. Dippold WG, Jay G, DeLeo AB, Khoury G, Old LJ. p53 transformation-related protein: detection by monoclonal antibody in mouse and human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; **78**(3): 1695-1699.
160. Rotter V, Abutbul H, Ben-Ze'ev A. P53 transformation-related protein accumulates in the nucleus of transformed fibroblasts in association with the chromatin and is found in the cytoplasm of non-transformed fibroblasts. *Embo j* 1983; **2**(7): 1041-1047.
161. Wang L, Xu C, Johansen T, Berger SL, Dou Z. SIRT1 - a new mammalian substrate of nuclear autophagy. *Autophagy* 2021; **17**(2): 593-595.
162. Sebti S, Prébois C, Pérez-Gracia E, et al. BAT3 modulates p300-dependent acetylation of p53 and autophagy-related protein 7 (ATG7) during autophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; **111**(11): 4115-4120.
163. Burckhardt CJ, Minna JD, Danuser G. Co-immunoprecipitation and semi-quantitative immunoblotting for the analysis of protein-protein interactions. *STAR Protoc* 2021; **2**(3): 100644.

164. Rosanò L, Spinella F, Bagnato A. Endothelin 1 in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* 2013; **13**(9): 637-651.
165. Tocci P, Rosanò L, Bagnato A. Targeting Endothelin-1 Receptor/ β -Arrestin-1 Axis in Ovarian Cancer: From Basic Research to a Therapeutic Approach. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2019; **10**: 609.
166. Torres MJ, López-Moncada F, Herrera D, et al. Endothelin-1 induces changes in the expression levels of steroidogenic enzymes and increases androgen receptor and testosterone production in the PC3 prostate cancer cell line. *Oncol Rep* 2021; **46**(2).
167. Zhang ZY, Chen LL, Xu W, Sigdel K, Jiang XT. Effects of silencing endothelin-1 on invasion and vascular formation in lung cancer. *Oncol Lett* 2017; **13**(6): 4390-4396.
168. Nekrasova OE, Mendez MG, Chernov Ivanenko IS, et al. Vimentin intermediate filaments modulate the motility of mitochondria. *Mol Biol Cell* 2011; **22**(13): 2282-2289.
169. Yang Y, Lin Z, Cheng J, et al. The roles of autophagy in osteogenic differentiation in rat ligamentum fibroblasts: Evidence and possible implications. *Faseb j* 2020; **34**(7): 8876-8886.
170. Selvarajah J, Nathawat K, Moumen A, Ashcroft M, Carroll VA. Chemotherapy-mediated p53-dependent DNA damage response in clear cell renal cell carcinoma: role of the mTORC1/2 and hypoxia-inducible factor pathways. *Cell Death Dis* 2013; **4**(10): e865.
171. Hyter S, Coleman DJ, Ganguli-Indra G, et al. Endothelin-1 is a transcriptional target of p53 in epidermal keratinocytes and regulates ultraviolet-induced melanocyte homeostasis. *Pigment Cell Melanoma Res* 2013; **26**(2): 247-258.
172. KÖditz B, Fries JWU, Göbel H, et al. Mxi-2 Dependent Regulation of p53 in Prostate Cancer. *Anticancer Res* 2020; **40**(10): 5539-5544.
173. Tian S, Huang S, Wu S, Guo W, Li J, He X. MicroRNA-1285 inhibits the expression of p53 by directly targeting its 3' untranslated region. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; **396**(2): 435-439.
174. Youmell M, Park SJ, Basu S, Price BD. Regulation of the p53 protein by protein kinase C alpha and protein kinase C zeta. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; **245**(2): 514-518.
175. Sultana T, Okla MK, Ahmed M, et al. Withaferin A: From Ancient Remedy to Potential Drug Candidate. *Molecules* 2021; **26**(24): 7696.
176. Shuaib M, Prajapati KS, Gupta S, Kumar S. Natural Steroidal Lactone Induces G1/S Phase Cell Cycle Arrest and Intrinsic Apoptotic Pathway by Up-Regulating Tumor Suppressive miRNA in Triple-Negative Breast Cancer Cells. *Metabolites* 2022; **13**(1): 29.
177. Roy RV, Suman S, Das TP, Luevano JE, Damodaran C. Withaferin A, a steroidal lactone from *Withania somnifera*, induces mitotic catastrophe and growth arrest in prostate cancer cells. *J Nat Prod* 2013; **76**(10): 1909-1915.

178. Lee IC, Choi BY. Withaferin-A--A Natural Anticancer Agent with Pleiotropic Mechanisms of Action. *Int J Mol Sci* 2016; **17**(3): 290.
179. Srinivasan S, Ranga RS, Burikhanov R, Han SS, Chendil D. Par-4-dependent apoptosis by the dietary compound withaferin A in prostate cancer cells. *Cancer Res* 2007; **67**(1): 246-253.
180. Yang H, Shi G, Dou QP. The tumor proteasome is a primary target for the natural anticancer compound Withaferin A isolated from "Indian winter cherry". *Mol Pharmacol* 2007; **71**(2): 426-437.
181. Nishikawa Y, Okuzaki D, Fukushima K, et al. Withaferin A Induces Cell Death Selectively in Androgen-Independent Prostate Cancer Cells but Not in Normal Fibroblast Cells. *PLoS One* 2015; **10**(7): e0134137.
182. Barua A, Bradaric MJ, Bitterman P, et al. Dietary supplementation of Ashwagandha (*Withania somnifera*, Dunal) enhances NK cell function in ovarian tumors in the laying hen model of spontaneous ovarian cancer. *Am J Reprod Immunol* 2013; **70**(6): 538-550.
183. Malik F, Kumar A, Bhushan S, et al. Immune modulation and apoptosis induction: Two sides of antitumoural activity of a standardised herbal formulation of *Withania somnifera*. *Eur J Cancer* 2009; **45**(8): 1494-1509.
184. Bargagna-Mohan P, Hamza A, Kim YE, et al. The tumor inhibitor and antiangiogenic agent withaferin A targets the intermediate filament protein vimentin. *Chem Biol* 2007; **14**(6): 623-634.
185. White E. Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer* 2012; **12**(6): 401-410.
186. Jung YY, Um JY, Chinnathambi A, et al. Withanolide modulates the potential crosstalk between apoptosis and autophagy in different colorectal cancer cell lines. *Eur J Pharmacol* 2022; **928**: 175113.
187. Pajares M, Rojo AI, Arias E, Díaz-Carretero A, Cuervo AM, Cuadrado A. Transcription factor NFE2L2/NRF2 modulates chaperone-mediated autophagy through the regulation of LAMP2A. *Autophagy* 2018; **14**(8): 1310-1322.
188. Hahm ER, Singh SV. Cytoprotective autophagy induction by withaferin A in prostate cancer cells involves GABARAP1. *Mol Carcinog* 2020; **59**(10): 1105-1115.
189. Saleem A, Dvorzhinski D, Santanam U, et al. Effect of dual inhibition of apoptosis and autophagy in prostate cancer. *Prostate* 2012; **72**(12): 1374-1381.
190. Munagala R, Kausar H, Munjal C, Gupta RC. Withaferin A induces p53-dependent apoptosis by repression of HPV oncogenes and upregulation of tumor suppressor proteins in human cervical cancer cells. *Carcinogenesis* 2011; **32**(11): 1697-1705.

191. Lin CC, Yang TY, Lu HJ, Wan CK, Hsu SL, Wu CC. Attenuating role of withaferin A in the proliferation and migration of lung cancer cells via a p53-miR-27a/miR-10b pathway. *Oncol Lett* 2021; **21**(3): 232.
192. Singh P, Guleri R, Singh V, et al. Biotechnological interventions in *Withania somnifera* (L.) Dunal. *Biotechnol Genet Eng Rev* 2015; **31**(1-2): 1-20.
193. Harford C, Narindrasorasak S, Sarkar B. The designed protein M(II)-Gly-Lys-His-Fos(138-211) specifically cleaves the AP-1 binding site containing DNA. *Biochemistry* 1996; **35**(14): 4271-4278.
194. Zhao Y, Wang F, Chen S, Wan J, Wang G. Methods of MicroRNA Promoter Prediction and Transcription Factor Mediated Regulatory Network. *Biomed Res Int* 2017; **2017**: 7049406.
195. Ratti M, Lampis A, Ghidini M, et al. MicroRNAs (miRNAs) and Long Non-Coding RNAs (lncRNAs) as New Tools for Cancer Therapy: First Steps from Bench to Bedside. *Target Oncol* 2020; **15**(3): 261-278.
196. Iorio MV, Croce CM. MicroRNAs in cancer: small molecules with a huge impact. *J Clin Oncol* 2009; **27**(34): 5848-5856.
197. Fendler A, Stephan C, Yousef GM, Kristiansen G, Jung K. The translational potential of microRNAs as biofluid markers of urological tumours. *Nat Rev Urol* 2016; **13**(12): 734-752.
198. Bueno MJ, Pérez de Castro I, Malumbres M. Control of cell proliferation pathways by microRNAs. *Cell Cycle* 2008; **7**(20): 3143-3148.
199. Guo C, Sah JF, Beard L, Willson JK, Markowitz SD, Guda K. The noncoding RNA, miR-126, suppresses the growth of neoplastic cells by targeting phosphatidylinositol 3-kinase signaling and is frequently lost in colon cancers. *Genes Chromosomes Cancer* 2008; **47**(11): 939-946.
200. Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, Ghoshal K, Jacob ST, Patel T. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology* 2007; **133**(2): 647-658.
201. Guo H, Ji F, Zhao X, et al. MicroRNA-371a-3p promotes progression of gastric cancer by targeting TOB1. *Cancer Lett* 2019; **443**: 179-188.
202. Constâncio V, Tavares NT, Henrique R, Jerónimo C, Lobo J. MiRNA biomarkers in cancers of the male reproductive system: Are we approaching clinical application? *Andrology* 2023; **11**(4): 651-667.
203. Boerrigter E, Groen LN, Van Erp NP, Verhaegh GW, Schalken JA. Clinical utility of emerging biomarkers in prostate cancer liquid biopsies. *Expert Rev Mol Diagn* 2020; **20**(2): 219-230.

204. Urabe F, Matsuzaki J, Yamamoto Y, et al. Large-scale Circulating microRNA Profiling for the Liquid Biopsy of Prostate Cancer. *Clin Cancer Res* 2019; **25**(10): 3016-3025.
205. Papa A, Pandolfi PP. The PTEN-PI3K Axis in Cancer. *Biomolecules* 2019; **9**(4).
206. Taylor BS, Schultz N, Hieronymus H, et al. Integrative genomic profiling of human prostate cancer. *Cancer Cell* 2010; **18**(1): 11-22.
207. Robinson D, Van Allen EM, Wu YM, et al. Integrative clinical genomics of advanced prostate cancer. *Cell* 2015; **161**(5): 1215-1228.
208. Griveau A, Bejaud J, Anthiya S, Avril S, Autret D, Garcion E. Silencing of miR-21 by locked nucleic acid-lipid nanocapsule complexes sensitize human glioblastoma cells to radiation-induced cell death. *Int J Pharm* 2013; **454**(2): 765-774.
209. Ding T, Cui P, Zhou Y, et al. Antisense Oligonucleotides against miR-21 Inhibit the Growth and Metastasis of Colorectal Carcinoma via the DUSP8 Pathway. *Mol Ther Nucleic Acids* 2018; **13**: 244-255.
210. Hussain M, Fizazi K, Saad F, et al. Enzalutamide in Men with Nonmetastatic, Castration-Resistant Prostate Cancer. *N Engl J Med* 2018; **378**(26): 2465-2474.
211. Mu P, Zhang Z, Benelli M, et al. SOX2 promotes lineage plasticity and antiandrogen resistance in TP53- and RB1-deficient prostate cancer. *Science* 2017; **355**(6320): 84-88.
212. Paranjape AN, Soundararajan R, Werden SJ, et al. Inhibition of FOXC2 restores epithelial phenotype and drug sensitivity in prostate cancer cells with stem-cell properties. *Oncogene* 2016; **35**(46): 5963-5976.
213. Scaccianoce E, Festuccia C, Dondi D, et al. Characterization of prostate cancer DU145 cells expressing the recombinant androgen receptor. *Oncol Res* 2003; **14**(2): 101-112.
214. Nagakawa O, Akashi T, Hayakawa Y, et al. Differential expression of integrin subunits in DU-145/AR prostate cancer cells. *Oncol Rep* 2004; **12**(4): 837-841.
215. Akashi T, Koizumi K, Nagakawa O, Fuse H, Saiki I. Androgen receptor negatively influences the expression of chemokine receptors (CXCR4, CCR1) and ligand-mediated migration in prostate cancer DU-145. *Oncol Rep* 2006; **16**(4): 831-836.
216. Gao Y, Guo Y, Wang Z, et al. Analysis of circulating miRNAs 21 and 375 as potential biomarkers for early diagnosis of prostate cancer. *Neoplasma* 2016; **63**(4): 623-628.
217. Mello-Grand M, Gregnanin I, Sacchetto L, et al. Circulating microRNAs combined with PSA for accurate and non-invasive prostate cancer detection. *Carcinogenesis* 2019; **40**(2): 246-253.
218. Giglio S, De Nunzio C, Cirombella R, et al. A preliminary study of micro-RNAs as minimally invasive biomarkers for the diagnosis of prostate cancer patients. *J Exp Clin Cancer Res* 2021; **40**(1): 79.

219. Nohl EK, Behring J, Kameri E, et al. Improved Analysis of Prostate Cancer: VIM3, ATG7 and P53 Form a Complex and Activate miRNA 371a-3p. *Anticancer Res* 2023; **43**(6): 2407-2416.

7. Anhang

7.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der spezifischen Domänen gegen welche die Antikörper gegen VIM-FL und VIM3 gerichtet sind.	25
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Fragestellung der Arbeit.	32
Abbildung 3: Molekulargewichtsmarker für Proteine und DNA.	41
Abbildung 4: Photoshop-Screenshot zur beispielhaften Demonstration der Kratz-Assay Auswertungen.	52
Abbildung 5: Western Blot von 25 µg Protein von BPH-1-, DU145-, PC3- und LNCaP-Zellen.	54
Abbildung 6: Darstellung der Komplexpartner im Zellkern der drei Prostatakarzinomzellen mittels Immunfluoreszenz.	55
Abbildung 7: Darstellung der Immunpräzipitation mit 500 µg totalem Protein der Kontrollzelllinie BPH-1 und der Prostatakarzinomzelllinien.	56
Abbildung 8: Western Blot von 25 µg Protein von stimulierten LNCaP-Zellen.	57
Abbildung 9: Western Blot von 25 µg Protein von stimulierten PC3-Zellen.	57
Abbildung 10: Western Blot von 25 µg Protein von stimulierten DU145-Zellen.	58
Abbildung 11: Western Blot von 25 µg Protein von stimulierten BPH-1-Zellen.	59
Abbildung 12: Kratz-Assay von LNCaP-Zellen nach Stimulation mit ET-1 und WA.	60
Abbildung 13: Kratz-Assay von PC3-Zellen nach Stimulation mit ET-1 und WA.	61
Abbildung 14: Kratz-Assay von DU145-Zellen nach Stimulation mit ET-1 und WA.	61
Abbildung 15: Kratz-Assay von BPH-1-Zellen nach Stimulation mit ET-1 und WA.	62
Abbildung 16: Visualisierung des PCR-Produkts für die Promoterregion der pri-MicroRNA-371a-3p.	63
Abbildung 17: Pri-MicroRNA-371a-3p Promoterregion EMSA für die verschiedenen Prostatakarzinomzelllinien und die BPH-1-Zelllinie.	64
Abbildung 18: Agarose-Drop der Prostatakarzinomzellen und der BPH-1-Zellen.	65
Abbildung 19: Kratz-Assay von LNCaP-Zellen nach siRNA VIM3-Knockdown und ET-1 Stimulation nach 0, 12, 24, 36, 48 und 72 Stunden (h).	66
Abbildung 20: Kratz-Assay von PC3-Zellen nach siRNA VIM3-Knockdown und ET-1 Stimulation nach 0, 12, 24, 36, 48 und 72 Stunden (h).	67
Abbildung 21: Kratz-Assay von DU145-Zellen nach siRNA VIM3-Knockdown und ET-1 Stimulation nach 0, 12, 24, 36, 48 und 72 Stunden (h).	68
Abbildung 22: Kratz-Assay von BPH-1-Zellen nach siRNA VIM3-Knockdown und ET-1 Stimulation nach 0, 12, 24, 36, 48 und 72 Stunden (h).	69

Abbildung 23: qRT-PCR Ergebnisse der MicroRNA-371a-3p-Expression nach VIM3 siRNA Behandlung der verschiedenen Zelllinien.....	70
Abbildung 24: Überblick über die Mxi-2-abhängige Regulation von TP53 – Vergleich von gesundem Gewebe mit kanzerogenem Gewebe.....	77

7.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Stadieneinteilung des primären Prostatakarzinoms	18
Tabelle 2: Stadieneinteilung von Lymphknotenmetastasen beim Prostatakarzinom	18
Tabelle 3: Stadieneinteilung von Fernmetastasen beim Prostatakarzinom.....	19
Tabelle 4: Stadieneinteilung nach UICC.....	19
Tabelle 5: Aktuelle Gleason-Graduierung, modifiziert durch die International Society of Urological Pathology (ISUP).....	20
Tabelle 6: Zelllinien.....	33
Tabelle 7: Chemikalien und Lösungen für die Zellkultur.....	34
Tabelle 8: Geräte.....	34
Tabelle 9: Verbrauchsmaterialien.....	35
Tabelle 10: Chemikalien und Lösungen.....	36
Tabelle 11: Puffer und Lösungen	38
Tabelle 12: Kits.....	38
Tabelle 13: PCR.....	38
Tabelle 14: Primer.....	39
Tabelle 15: siRNA	39
Tabelle 16: EMSA-Oligonukleotide	39
Tabelle 17: Primärantikörper.....	40
Tabelle 18: Sekundärantikörper	41
Tabelle 19: Liste der Reagenzien und des Verdünnungsschemas für die Stimulation der Prostatakarzinomzelllinien sowie der Kontrollzelllinie.....	44
Tabelle 20: Pipettierschema für den siRNA VIM3-Knockdown	44
Tabelle 21: Zusammensetzung des zehnprozentigen Polyacrylamid-Gels	48
Tabelle 22: Standardablauf qRT-PCR	50

7.3. Ergänzendes Material

7.3.1. Vimentin 3 Aminosäuresequenz (Homo sapiens)

In rot markiert ist die GKH Aminosäuresequenz, die einen Teil des C-terminalen Endes ausmacht, welcher mit der vermuteten pri-MicroRNA-371a-3p Promoterregion interagiert

1 mstrsvssss yrrmfgpggt asrpssrsy vttstrtysl gsalrpstsr slyasspggv

61 yatrssavrl rsvpgvrll qdsvdslad aintefkntr tnekvelqel ndrfanyidk
121 vrfleqqnki llaeleqlkg qgksrlgdly eeemrelrrq vdqltndkar veverdnlae
181 dimrlreklq eemlqreeae ntlqsfrqdv dnaslarldl erkveslqee iaflkklhee
241 eiqelqaqiq eqhvqidvdv skpdltaarl dvrqqyesva aknlqaeew ysksfadlse
301 aanrnndalr qakqesteyr rqvqsltcev dalkgtneal erqmremeen faveaanyqd
361 tigrldqeiq nmkeemarhl reyqdlInvk maldieiaty rklegeesr islpnpfss
421 Inlrghfis I

7.3.2. Nukleotide der GKH Aminosäuresequenz

ggt aag cat

G K H

8. Vorabveröffentlichungen von Ergebnissen

Das dieser Dissertation zugrunde liegende Manuskript wurde bereits am 01.06.2023 in Anticancer Research veröffentlicht²¹⁹.