

Uro-Onkologie

MikroRNA und Prostatakrebs

Neue Hoffnungsträger für Diagnose, Prognose und Therapie

Jede Menge „Schrott“ glaubte man im menschlichen Erbgut gefunden zu haben, nachdem die Sequenzierung der genomischen DNA im Rahmen des Humangenomprojekts zur Jahrtausendwende für abgeschlossen erklärt wurde. Denn den mindestens 98 Prozent der DNA, die sich zwischen den Protein-kodierenden Genen befindet, kam keine erkennbare Funktion zu. Das hat sich in jüngerer Zeit so grundlegend geändert, dass der „Schrott“ im Jahr 2006 sogar mit dem Nobelpreis „vergoldet“ wurde. Die Laureaten Craig Mello und Andrew Fire, wie auch eine Reihe weiterer beteiligter Forscher, hatten erkannt, dass eine Vielzahl kleiner RNA-Moleküle (mikroRNA) in zahlreiche biologische Prozesse regulatorisch eingreift. Sie wechselwirken auf sequenzspezifische Weise mit Messenger (m)RNA und regulieren die Gen-Expression post-transkriptionell. Dieser Mechanismus, der auch als RNA-Interferenz bezeichnet wird, lässt sich experimentell heute schon dazu nutzen, Gene gezielt „stumm“ zu schalten. Die Schlüsselrolle der mikroRNA im Rahmen tumorassoziierter zellulärer Prozesse macht sie zu viel versprechenden Kandidaten für die Entwicklung diagnostischer und prognostischer Biomarker wie auch als Therapie-Targets.

Gene, die nur als RNA ausgeprägt werden

Ist von Genen die Rede, werden damit zumeist DNA-Abschnitte gemeint, die in RNA umgeschrieben und schließlich als Proteine ausgeprägt (exprimiert) werden. Doch beim Menschen machen die schätzungsweise etwa 30 000 derartiger Gene nur einen verschwindend kleinen Teil der gesamten Erbsubstanz von ca. drei Milliarden Basenpaaren aus. Den überwiegenden Teil der DNA qualifizierte man etwas voreilig als evolutionären Schrott ab und warf ihn – wie sich Molekularbiologen und Genetiker auszudrücken pflegen – kurzerhand in den Mülleimer. Im Hinterkopf rumorte aber immer die Frage, warum diese so genannte Junk-DNA dennoch großenteils in RNA umgeschrieben, d.h. in hohem Maße transkribiert wird.

Erst in kürzerer Zeit wurde erkannt, dass es zahlreiche Gene gibt, die zwar in RNA umgeschrieben (transkribiert), nicht aber in Peptide bzw. Proteine übersetzt (translatiert) werden. Fortschritte auf diesem Gebiet

verzögerten sich zunächst insofern, als man glaubte, nach eher größeren RNA-Molekülen suchen zu müssen. Erst als man sich RNA-Molekülen mit nur 22 bis 25 Nukleotiden zuwandte, nahm die Erforschung der „Nur-RNA-Gene“ richtig Fahrt auf. Man erkannte, welche wichtige Rolle solche kleinen RNA-Moleküle bei der Ausprägung des Phänotyps spielen. Zwischenzeitlich wurden bereits Hunderte solcher regulierenden kleinen RNA-Moleküle entdeckt, eine Vielzahl davon auch beim Menschen.

Zwei Klassen kleiner RNA-Moleküle

Von den Sequenz-spezifischen post-transkriptionellen Regulatoren der Gen-Expression wurden zwei Klassen kleiner RNA-Moleküle entdeckt: die small interfering RNA (siRNA) und die mikroRNA (miRNA). Die Biosynthese beider RNA-Formen, ihr Einbau in einen RNA-Proteinkomplex, und dessen Fähigkeit die Bildung bestimmter Proteinprodukte auf mRNA-Ebe-

Zahlreiche DNA-Abschnitte des Genoms werden zwar in RNA umgeschrieben, nicht aber in Peptide oder Proteine übersetzt

ne herunterzuregulieren sind in **Abbildung 1** dargestellt. Obwohl miRNA und siRNA unterschiedlichen Vorläufermolekülen entstammen, weisen sie identische biochemische Merkmale auf.

Die durch miRNA und siRNA programmierten RISC steuern unterschiedliche Ziele in der Zelle an. Die aus doppelsträngiger RNA gebildete siRNA wird bei Säugetieren einschließlich des Menschen offenbar nicht endogen gebildet. Eine ihrer grundlegenden Funktionen betrifft die Abwehr von Viren. Denn wenn virale doppelsträngige RNA zu siRNA „zerhackt“ wird, lässt

sich damit die Expression viraler Proteine unterdrücken. Allerdings antworten Viren auch mit Gegenstrategien. Durch sog. genetisches Engineering lässt sich doppelsträngige RNA in Zellen einschleusen und mit Hilfe der dann gebildeten siRNA die Überexpression bestimmter Gene unterdrücken. Hierdurch eröffnen sich unter Umständen zukünftige Therapieoptionen bei verschiedenen Krebserkrankungen. Andererseits haben etliche große Pharmafirmen nach Fehlschlägen bei siRNA-basierten Therapieansätzen diesbezügliche Projekte zumindest auf Eis gelegt.

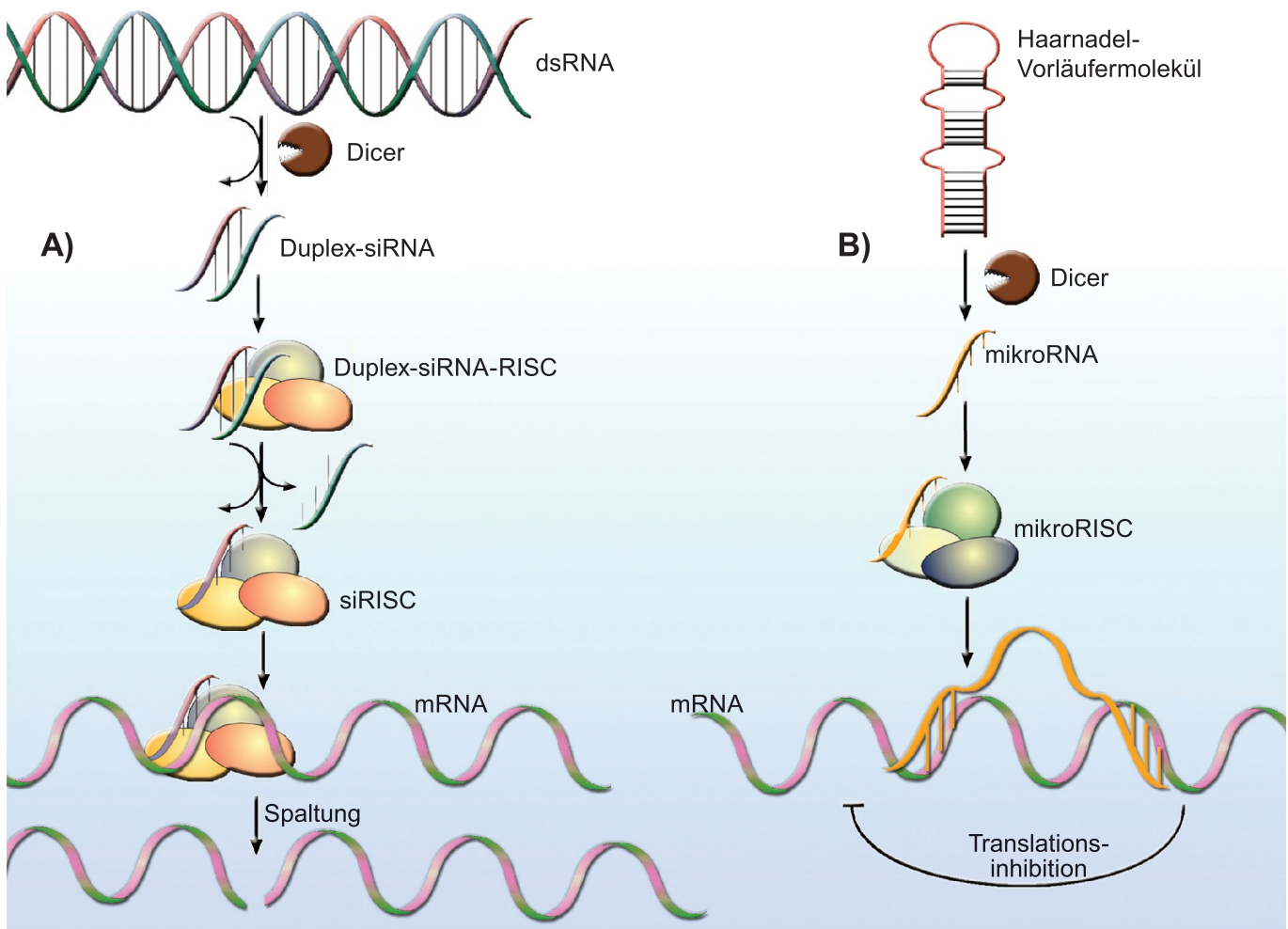


Abb. 1: Wege zur RNA-Interferenz:

A) siRNA-Interferenz

Lange doppelsträngige (ds)RNA wird durch einen „Würfelschneider“ (Dicer) zur Duplex siRNA gespalten und in einen RNA inducing silencing complex (RISC) inkorporiert. Es schließt sich das Entwinden der Duplex-siRNA an. Durch den einsträngigen Antisense-siRNA-Strang wird der RISC mit der komplementären messenger (m)RNA hybridisiert. Es resultiert die endonukleolytische Spaltung der mRNA.

B) mikro RNA-Interferenz

Haarnadel-Vorläufermoleküle werden durch den Dicer in mikroRNA mit ca. 22 Nukleotiden gespalten. Diese werden in einen mikroRNA-Proteinkomplex (mikroRISC) eingebaut. Dieser erkennt durch einen Sequenzabgleich die Ziel-mRNA. Die Hybridisierung der miRNA mit komplementärer mRNA führt zu einer Unterdrückung der Translation (mod. nach Dykxhoorn DM, et al. 2003, Nature Reviews 4:457-467.).

Die miRNA-Profile verschiedener Gewebe sind häufig aussagekräftiger als die entsprechenden mRNA-Signaturen

Forschung und Industrie konzentrieren sich heute im Wesentlichen auf die miRNA. Diese hat eine erhebliche Bedeutung bei Tumorerkrankungen. Über miRNA wird die Gen-Expression reguliert, so dass sie bei Wachstums- und Differenzierungsprozessen eines Organismus Schlüsselfunktionen innehat. Etwa die Hälfte der miRNA-Gene ist in tumorassoziierten Regionen des Genoms oder in „Fragile Sites“ lokalisiert. miRNA-Signaturen von Krebsgeweben lassen sich analog zu mRNA-Signaturen mithilfe von miRNA-Mikroassays erhalten. Ihre Aussagekraft ist für verschiedene Gewebe der von mRNA-Profilen überlegen. Als Diagnoseinstrument haben sie ihre Fähigkeit bei schlecht differenzierten Tumoren ungewisser Herkunft unter Beweis gestellt. In einigen Fällen war es möglich, den Primärtumor anhand des miRNA-Profils zu identifizieren.

miRNA in Diagnose und Prognose bei Prostatakrebs

Das Spektrum der Behandlungsmöglichkeiten bei Prostatakrebs umfasst im Wesentlichen die engmaschige Überwachung (active surveillance) die

Strahlentherapie, die radikale Prostatektomie und die Androgendeprivationstherapie (ADT). Chemotherapien sind erst bei kastrationsresistentem Prostatakrebs indiziert. Bei lokalisierter Krankheit in einem frühen Stadium erfolgt die radikale Prostatektomie in kurativer Absicht. Andererseits ist Prostatakrebs oft relativ indolent, so dass die Überlegungen insbesondere bei Männern im fortgeschrittenen Alter dahin gehen, dass eine Progression der Krankheit innerhalb der Lebenserwartung des Patienten eher unwahrscheinlich ist. Um in solchen Fällen eine Überbehandlung zu vermeiden, bei der Nebenwirkungen die Lebensqualität in nicht unerheblichem Maße einschränken können, lässt sich die Therapie unter Umständen unter engmaschiger Überwachung aufschieben oder gar überflüssig machen.

Die prinzipielle Frage ist aber nach wie vor ungeklärt: Wie ist ein früher Prostatakrebs der der Extirpation bedarf, von einem Prostatakrebs sicher zu unterscheiden, der sich für die engmaschige Überwachung eignet? Der PSA-Spiegel und/oder der Gleason Score sind keine zuverlässigen Indikatoren für die Aggressivität eines Tumors. Bessere Ergebnisse werden von miRNA-Signaturen erhofft.

Eine Reihe von Untersuchern hat bereits miRNA-Vergleiche in gesundem und malignem Prostatagewebe anhand von Mikroarray-Analysen vorgenommen. Allerdings sind die Ergebnisse bislang eher ernüchternd. Verschiedene Autoren sind sich bei zahlreichen miRNA uneinig, ob sie im Prostatakrebsgewebe herauf oder herunterreguliert sind (Übersicht in [1]). Hierfür kommen in erster Linie technische Ursachen in Frage. Das reicht von der Selektion der Patientenpopulation mit unterschiedlichen Tumorstadien und Differenzierungsgraden wie auch Behandlungseinflüssen über die Präparation und Behandlung des Ausgangsmaterials bis hin zur Verwendung von Gesamt-RNA oder angereicherter kleiner RNA. Alles in allem sind es noch etliche weitere Details, die beachtet und stan-

dardisiert werden müssen, um die Vergleichbarkeit von Mikroarray-Analysen sicherzustellen.

In einer jüngeren Analyse von Virologen an der Universität des Saarlands in Homburg/Saar wurden miRNA-Profile von Prostatakarzinomen mittels „deep sequencing“ erhalten. Das Team identifizierte 33 miRNA, die entweder um das 1,5-fache herauf- oder herunterreguliert waren. Die De-regulierung selektionierter miRNA wurde durch Northern-Blotting und quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion in etablierten Prostatakrebs-Zelllinien und klinischen Gewebeproben bestätigt. Weitere Recherchen ergaben, dass miR-143 und miR-145, deren Spiegel in Tumorproben verringert sind, offenbar die Expression von Myosin-VI-mRNA (MYO6) regulieren und hierüber möglicherweise bei der Entstehung von Prostatakrebs eine Rolle spielen. Die vermehrte Expression von Myosin VI bei Prostatakrebs war bereits immunhistochemisch nachgewiesen worden und bestätigte sich in der aktuellen Studie durch erhöhte Spiegel an MYO6-mRNA in den Gewebeproben von primären Prostatakarzinomen [2].

Für die Klinik könnte es sich als bedeutsam erweisen, dass sich miRNA auch im Blut in bemerkenswert stabiler Form finden. In zwei aktuell publizierten Arbeiten der Universität Bonn und des Deutschen Krebsforschungszentrums in Heidelberg wurde der diagnostische und prädiktive Wert zirkulierender miRNA bei Prostatakrebs bewertet:

In Prostatakrebsproben waren miR-375 und miR-141 vermehrt exprimiert und ihre Freisetzung ins Blut stieg mit fortgeschrittenem Krankheitsstadium an [3].

In einer kleinen Fallzahl wurden Korrelationen zwischen miRNA und kliniko-pathologischen Merkmalen bei Prostatakrebs ermittelt: miR-16 und miR-195 wie auch miR-26a waren signifikant mit positiven Schnittträndern assoziiert und miR-195 sowie miR-let7i korrelierten mit dem Gleason Score [4].

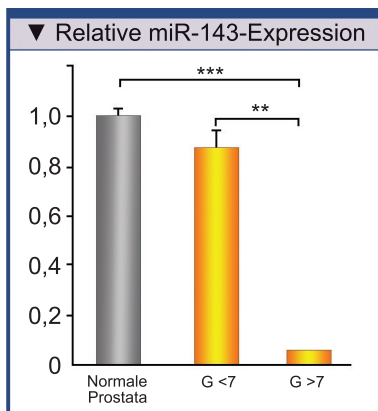


Abb. 2: Relative Expression von miR-143 in Prostatakrebsgewebe mit einem Gleason Score <7 bzw. >7 gegenüber normalem Prostatagewebe. ** p<0,01; *** p<0,001, Clapé C, et al. 2011.

miRNA-Kandidaten für Prostatakrebstherapien

Es gibt Indizien, dass *miR-15a* und *miR-16* im Prostatakrebszellen als Tumorsuppressorgene wirksam sind [5]. Sie supprimieren die Expression des antiapoptotischen Proteins BCL2, von CCND1 (kodiert für Zyklin D1) und von WNT3A, die Überleben, Proliferation und Invasion von Prostatakrebs fördern. In den Zellen von fortgeschrittenen Prostatakarzinomen waren die Spiegel an *miR-15a* und *miR-16* signifikant erniedrigt und die Expression von BCL2, CCND1 und WNT3A deutlich erhöht. In Xenotransplantaten bei Mäusen wurden nach Rekonstitution der Expression von *miR-15a* und *miR-16* ein Wachstumsstopp, Apoptose und eine deutliche Regression des Tumors beobachtet.

Durch *miR-34a* werden Prostatakrebs-Stammzellen und die Metastasierung durch direkte Repression von CD44 inhibiert [6]. Das Oberflächen-Adhäsionsmolekül CD44 wird von zahlreichen Krebsstammzellen überexprimiert. Es spielt eine Rolle bei der Förderung des Tumorwachstums und insbesondere auch bei der Metastasierung. Die Regulierung von Krebsstammzellen – wie auch die von normalen Stammzellen – erfolgt durch miRNA. Prostatakrebs-Stammzellen mit erhöhter Fähigkeit zur klonalen Expansion, Tumorinitiation und Metastasierung finden sich vermehrt in der CD44⁺-Zellpopulation. Aktuell wurde anhand von Expressionsanalysen nachgewiesen, dass *miR-34a* in CD44⁺-Prostatakrebszellen vermindert exprimiert war. Durch erzwungene Expression von *miR-34a* in CD44⁺-Prostatakrebszellen wurden die klonale Expansion, die Tumoregeneration und die Metastasierung unterdrückt.

Als potenzielles Ziel für die Prostatakrebstherapie gilt auch *miR-143*. Seine Konzentration in Prostatakrebszellen ist umso geringer, je fortgeschrittener das Krankheitsstadium ist (Abb. 2). Nach Einbringen von *miR-143* in Prostatakrebszellen durch

Elektroporation in vivo bei Mäusen kam es zum Stillstand der Zellproliferation und des Tumorwachstums. Mithilfe von Bioinformatics-Analysen wurde ERK5 als ein potenzielles Ziel von *miR-143* identifiziert. ERK5 fördert das Zellwachstum und die Zellproliferation als Reaktion auf Zellwachstumssignale und die Aktivierung von Tyrosinkinase. Es zeigte sich, dass ERK5 in Prostatakrebsgewebe verglichen mit normalem Prostatagewebe deutlich vermehrt exprimiert wurde (Abb. 3) [7].

Durch miRNA, die über die lange 3'-untranslatierte Region (3'UTR) des Androgenrezeptor (AR)-Gens dessen Expression regulieren, lassen sich unter Umständen therapeutische Strategien entwickeln, die AR-Funktion und damit Androgenabhängiges Wachstum zu inhibieren. Bei der Analyse klinischer Prostatakarzinome ergab sich eine negative Korrelation insbesondere zwischen *miR-34a* wie auch *miR-34c* und den AR-Spiegeln [8].

Fazit

Die Schlüsselrolle der miRNA im Rahmen tumorassoziierter zellulärer Prozesse macht sie zu viel versprechenden Kandidaten für die Entwicklung diagnostischer und prognostischer Biomarker wie auch als Therapie-Targets. Auch wenn die Suche nach miRNA-Signaturen, anhand derer die Aggressivität von Prostatakrebs abzulesen wäre, noch in den Kinderschuhen steckt, ist die „miRNA-Gemeinde“ doch guter Zuversicht, dieses Ziel in nicht allzu ferner Zukunft erreichen zu können.

Eine Reihe von miRNA mit Prostatakrebs-spezifischer Expression und unterschiedlichen Targets wurde identifiziert. In In-vitro- und in Tierexperimenten wurde die Beeinflussung von Prostatakrebswachstum durch Wiederherstellung der Funktion von miRNA bereits erfolgreich getestet. Andererseits dürfte das Einbringen von miRNA, miRNA-Agonisten oder miRNA-Antagonisten in Prostatakrebszellen am Patienten noch

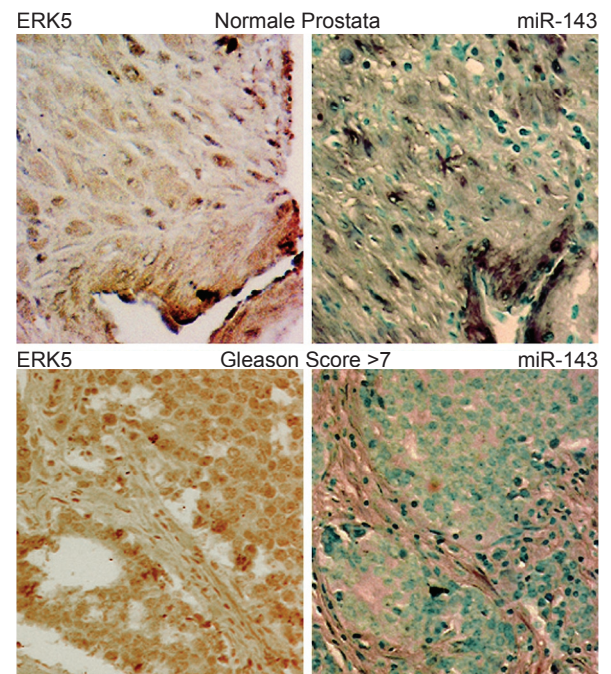


Abb. 3: Repräsentative immunohistochemische Färbung von ERK5 und In-situ-Hybridisierung von *miR-143* in Gewebeschnitten des high-density Gewebe-Array (Clapé C, et al. 2011).

eine erhebliche Hürde auf dem Weg zu erfolgreichen miRNA-basierten Therapiestrategien darstellen.

jfs ◀

Literatur

- [1] Coppola V, De Maria R, Bonci D, et al. 2010. MicroRNAs and prostate cancer. *Endocrine Related Cancer* 17:F1-F17.
- [2] Szczyrba J, Löprich E, Jung WS, et al. 2010. The microRNA profile of prostate carcinoma obtained by deep sequencing. *Mol Cancer Res* 8:529-538.
- [3] Brase JC, Johannes M, Schlomm T, et al. 2011. Circulating miRNAs are correlated with tumor progression in prostate cancer. *Int J Cancer* 128:608-616.
- [4] Mahn R, Heukamp LC, Rogenhofer S, et al. 2011. Circulating microRNAs (miRNAs) in serum of patients with prostate cancer. *Urology* 77:1265.e9-e16.
- [5] Bonci D, Coppola V, Mesumeci M, Addario A, 2008. The *miR-15a-miR-16-1* cluster controls prostate cancer by targeting multiple oncogenic activities. *Nat Med* 14:1271-1277.
- [6] Liu C, Kelnar K, Liu B, et al. 2011. The microRNA *miR-34a* inhibits prostate cancer stem cells and metastasis by directly repressing CD44. *Nat Med* 17:211-215.
- [7] Clapé C, Fritz V, Henriquet C, et al. 2011. *miR-143* interferes with ERK5 signalling, and abrogates prostate cancer progression in mice. *PLoS ONE* 4:e7542.
- [8] Östling P, Leivonen SK, Aakula A, et al. 2011. Systematic analysis of microRNAs targeting the androgen receptor in prostate cancer cells. *Cancer Res* 71:1956-1967.