

- **Dr. med. Thomas Worst**

Fördernummer: WoT1/FE-14

Heimatklinik: Klinik für Urologie, Universitätsmedizin Mannheim

Gastlabor: Abteilung Signalwege und Funktionelle Genomik, Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg

Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Michael Boutros

Projekt: „ Exosomale miRNA – Neue Biomarker beim Prostatakarzinom durch Next Generation Sequencing“

Projektbeschreibung (Zusammenfassung):

Das Prostatakarzinom ist mit steigender Inzidenz die weltweit zweithäufigste Tumorentität bei Männern. Insbesondere die Stratifizierung von Patienten mit Prostatakarzinom entsprechend ihrem Risiko für einen aggressiven Erkrankungsverlauf ist nach wie vor eine große Herausforderung. Einziger Biomarker mit weiter Verbreitung ist das in seinem Wert umstrittene Prostataspezifische Antigen (PSA). Minimalinvasiv bestimmbare, sensitive und spezifische Biomarker für Primärdiagnostik, Risikostratifizierung, Verlaufsbeobachtung und Therapiemonitoring sind aktuell Gegenstand intensiver Forschung. Einen vielversprechenden Ansatz bietet die Untersuchung nicht-kodierender RNA, wie z.B. miRNA. Sie spielen aufgrund ihrer Fähigkeit mRNA zu inaktivieren v.a. in der post-transkriptionellen Genregulation eine bedeutende Rolle. Sowohl Interaktionen mit Tumorsuppressoren als auch mit Onkogenen sind beschrieben. Viele der im Gewebe exprimierten miRNA sind auch im Blut nachweisbar. Ihr potenzieller Nutzen als Biomarker für das Prostatakarzinom wurde in den vergangenen Jahren mehrfach gezeigt. Ebenfalls im Blut, wie auch in anderen Körperflüssigkeiten zu finden sind Exosomen. Diese zwischen 30 und 100 nm durchmessenden, membranumhüllten Vesikel werden in vermehrtem Maße von Tumorzellen gebildet und enthalten neben Proteinen auch Nukleinsäuren. Markant ist ein, verglichen mit Zellen, höherer Anteil an miRNA. Exosomen sind sowohl in verschiedene physiologische als auch in zahlreiche tumorbiologische Prozesse involviert. Sie sind z.B. an der Zell-Zell-Kommunikation über weite Strecken beteiligt. Zellkulturmodelle zeigen, dass Exosomen in den Kulturüberstand abgeben und von Zellen anderer Zelllinien aufgenommen werden. Exosomale Bestandteile wie miRNA können so Effekte auf Signalwege und Metabolismus der aufnehmenden Zellen ausüben, was auch in vivo bestätigt werden konnte. In präklinischen Mausmodellen wurden eine starke Beeinflussung der Fernmetastasierung und die Modulierung des Tumormikroenvironment gezeigt. Zahlreiche Aspekte bezüglich der Zusammensetzung und der Funktion von Exosomen, sowie der Funktion der in ihnen transportierten miRNAs sind im Prostatakarzinom noch nicht ausreichend verstanden. Erste Entschlüsselungsansätze zur globalen Analyse mittels Next Generation Sequencing der exosomalen Nukleinsäurebestandteile bieten jedoch hoffnungsvolle Ansätze.

Hiervon ausgehend sollen im vorliegenden Projekt aus standardisiert gewonnenem Blutplasma von prospektiv an der Klinik für Urologie der Universitätsmedizin Mannheim rekrutierten Patienten mit Prostatakarzinom in verschiedenen Erkrankungsstadien (n=160) und gesunden Probanden (n=40) Exosomen isoliert werden. Nach entsprechenden Qualitätskontrollen werden die hierin enthaltenen kurzkettigen RNA-Moleküle extrahiert. Ein

Teil der Proben (n=85) wird anschließend mittels Next-Generation-Sequencing (Illumina High-Seq Plattform) in Zusammenarbeit mit der Core Facility des DKFZ sequenziert. Die hieraus resultierenden Rohdaten werden dann mit dem Ziel der Identifizierung differentiell exprimierter miRNA ausgewertet. Potenzielle Biomarker-miRNA sollen an den verbleibenden unabhängigen Patientenproben mittels qRT-PCR validiert werden. Langfristiges Ziel der Sequenzierungs- und Validierungsexperimente soll einerseits die Generierung eines verlässlichen, sensitiven und aussagekräftigen qRT-PCR-Assays zur Analyse einer überschaubaren Anzahl exosomaler miRNA sein. Mit solch einem Assay ließen sich rasch aus kleinen Blutvolumina quantitative Aussagen über relevante miRNA treffen. Diese könnten bedeutende Mehrinformation für klinische Fragestellungen, insbesondere im Bereich der Risikostratifizierung, bereithalten. Andererseits sollen die Ergebnisse, mit dem Ziel eines tiefergehenden Verständnisses für exosomen-vermittelte tumorbiologische Effekte im Prostatakarzinom, auch Ansatzpunkte zur weiteren funktionellen Charakterisierung tumorbiologisch relevanter miRNA bieten.

Das Labor von Prof. Boutros besitzt ausgewiesene Expertise sowohl in der Aufreinigung und Analyse von Exosomen als auch in High Throughput-Techniken und globalen RNA-Analysen. Weiterhin wurden Vorarbeiten zur Analyse von Prostataexosomen geleistet, die eine differentielle Expression distinkter miRNA in der exosomalen RNA-Fraktion nahelegen.