

Aus der Klinik für Urologie und Kinderurologie
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar

**Validierung und Targetidentifizierung der
metastasierungsassoziierten microRNA-30a-3p und
microRNA-10b-5p zur Prognosebewertung beim
klarzelligen Nierenzellkarzinom**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2020

vorgelegt von: Madeleine Sylvie Arndt

geb. am 05.05.1992 in Neunkirchen (Saar)

Tag der Promotion: 17.11.2020

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Michael D.Menger

Berichterstatter: Prof. Kerstin Junker

Prof. Eckart Meese

1. Inhaltsverzeichnis	1
2. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	4
2.1. Abbildungsverzeichnis	4
2.2. Tabellenverzeichnis	6
3. Abkürzungsverzeichnis	7
4. Zusammenfassung	11
4.1. Summary	12
5. Einleitung	14
5.1. Das Nierenzellkarzinom	14
5.1.1. Epidemiologie	14
5.1.2. Ätiologie	15
5.1.3. Klassifikation des Nierenzellkarzinoms	15
5.1.4. Makroskopische und histologische Eigenschaften des Nierenzellkarzinoms	16
5.1.5. Genetik des Nierenzellkarzinoms	17
5.1.5.1. Sporadische Formen des Nierenzellkarzinoms	17
5.1.5.2. Sporadische Formen des papillären und chromophoben Nierenzellkarzinoms	18
5.1.5.3. Hereditäre Formen des Nierenzellkarzinoms	18
5.1.6. Symptomatik und Diagnostik	19
5.1.7. Stadieneinteilung und Malignitätsgrad	21
5.1.8. Prognosebewertung	23
5.1.9. Therapie	26
5.1.9.1. Therapie des nicht metastasierten Nierenzellkarzinoms	26
5.1.9.2. Therapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms	27
5.2. microRNA	29
5.2.1. Funktion der miRNA	30
5.2.2. Biogenese	30
5.2.3. Regulation der miRNA-Synthese	31
5.2.4. Bedeutung für die Entstehung und Progression von Tumoren	35
5.2.5. Bedeutung von miRNAs beim Nierenzellkarzinom	38
6. Zielsetzung	40
7. Materialien und Methodik	41
7.1. Geräte und Programme	41
7.2. Chemikalien und Kitsysteme	41
7.2.1. Gesamt-RNA-Isolierung, qRT-PCR	41
7.2.2. Zellkultur	41

7.2.3. Transfektion	42
7.3. Puffer und Lösungen zum Proteinnachweis	42
7.3.1. Zellernte	42
7.3.2. SDS-PAGE	43
7.3.3. Western Blot	44
7.3.4. Immundetektion	44
7.4. Biologische Materialien	45
7.5. Gewebeaufarbeitung	46
7.6. Isolierung der RNA	46
7.7. miRNA-Expressionsanalyse	47
7.7.1. Reverse Transkription	47
7.7.2. Amplifikation	49
7.7.3. Bestimmung der Effizienzen	51
7.8. Validierung der Targetproteine	52
7.8.1. Zellkultur	52
7.8.1.1. Kultivieren der Zellen	52
7.8.1.2. Passagieren der Zellen	53
7.8.1.3. Einfrieren der Zellen	54
7.8.1.4. Zählen der Zellen	54
7.8.2. Transiente Transfektion	54
7.8.2.1. Kontrolle der Transfektion	55
7.8.3. Vorbereiten der Zellen zur Targetanalyse	56
7.8.4. Targetanalyse mittels Western Blot	57
7.8.4.1. Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese	57
7.8.4.2. Semi-Dry Blot	58
7.8.4.3. Immundetektion	58
7.8.5. mRNA Expressionsanalyse in Bezug auf Cofilin	58
7.9. Relative Expression Software Tool (REST)-Programm	60
7.10. Statistical Package for the social science (SPSS)-Programm	60
8. Ergebnisse	62
8.1. Validierung der miR-30a-3p und der miR-10b-5p Expression im kzNZK	62
8.1.1. PCR-Effizienzen	62
8.1.2. Expressionsunterschiede der miR-30a-3p und miR-10b-5p	63
8.1.2.1. Expressionsergebnisse für miR-10b-5p	64
8.1.2.2. Expressionsergebnisse für miR-30a-3p	66
8.1.3. Assoziation mit der Metastasierung	67
8.2. Targetidentifizierung	72

8.2.1. Transfektion der miR-30a-3p	72
8.2.2. Western-Blot-Analyse	74
8.3. mRNA Expressionsanalyse	75
9. Diskussion	76
9.1. Diskussion der Expressionsergebnisse der miR-30a-3p und miR-10b-5p	76
9.2. Diskussion der Targetanalyse	79
10. Ausblick	83
11. Literatur	84
12. Publikationen	91
13. Danksagung	92

2. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

2.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Altersstandardisierte Neuerkrankungs- und Sterberaten im internationalen Vergleich, nach Geschlecht, ICD-10 C64, 2011-2012 je 100.000	14
Abbildung 2: Makroskopische Darstellung des Nierenzellkarzinoms	16
Abbildung 3: Histologische Darstellung des Nierenzellkarzinoms	17
Abbildung 4: Sonographie der Niere in zwei Ebenen	20
Abbildung 5: CT-Abdomen bei pT3a Nierenzellkarzinom mit Infiltration in Nierenvene und Vena cava inferior	20
Abbildung 6: Metastasenverteilung in Prozentangabe	23
Abbildung 7: Relative Überlebensraten bis 10 Jahre nach Erstdiagnose, nach Geschlecht, ICD-10 C64, Deutschland 2011-2012	24
Abbildung 8: Zusammenfassende Darstellung der miRNA-Synthese	31
Abbildung 9: Regulation der miRNA-Transkription durch spezifische Transkriptionsregulatoren wie p53, Myc, MyoD1 und ZEB ½	32
Abbildung 10: Regulation der Biosynthese über den Mikroprozessorkomplex Drosha/DGCR8	33
Abbildung 11: Modifikation der AGO-Proteine und die Konsequenz bezüglich der Effizienz der miRNA-Bindung an die Ziel-mRNA	34
Abbildung 12: Bedeutung der miRNAs für die Tumorgenese	36
Abbildung 13: Funktion der miRNAs für die Entstehung und Progression von Tumoren	37
Abbildung 14: Microarray Heatmap: Expressionsmuster der 14 differentiell exprimierten miRNAs in nicht metastasierten und metastasierten Primärtumoren sowie in Lungenmetastasen	39
Abbildung 15: Das Prinzip der Real-Time qRT-PCR in Teilschritten	49
Abbildung 16: Kurvendiagramm zur Auswertung der PCR-Analyse	51
Abbildung 17: Ergebnisse der Massenspektrometrie zur Targetidentifizierung der miR-30a-3p in Form einer Heatmap	52
Abbildung 18: Kultivierte Zelllinie 786-O	53
Abbildung 19: Reaktionsansatz in Triplikaten zur Transfektion der siRNA in die Zelllinie 786-O	55
Abbildung 20: Verdünnungsreihe der miR-30a-3p in den Verdünnungen 1:1, 1:10, 1:100 zur Ermittlung der PCR-Effizienzen	62

Abbildung 21: Darstellung der Expressionsunterschiede der miR-30a-3p in einer nicht metastasierten (grün) und einer metastasierten (rot) Probe anhand der Amplifikationskurven	63
Abbildung 22: Darstellung der Konzentrationsunterschiede der miR-10b-5p in einer nicht metastasierten (grün) und einer metastasierten (rot) Probe anhand der Amplifikationskurven	64
Abbildung 23: Relative Genexpression der miR-10b-5p in den drei analysierten Probengruppen	65
Abbildung 24: Relative Genexpression der miR-30a-3p in den drei analysierten Probengruppen	66
Abbildung 25: ROC-Kurvenanalyse	68
Abbildung 26: Metastasierungsfreies Überleben in Abhängigkeit der Expression der miR-30a-3p	69
Abbildung 27: Metastasierungsfreies Überleben in Abhängigkeit von der Expression der miR-10b-5p	70
Abbildung 28: Kaplan-Meier Kurven zum Einfluss der Expression der miR-10b-5p auf das Gesamtüberleben	71
Abbildung 29: Kaplan-Meier Kurven zum Einfluss der Expression der miR-30a-3p auf das Gesamtüberleben	71
Abbildung 30: Transfektionskontrolle der miR-30a-3p in biologischen Triplikaten	73
Abbildung 31: Transfektion fluoreszenzmarkierter cel-miR-67 (miRIDIAN Dy547-labeled miRNA)	73
Abbildung 32: Western Blot Analyse der Proteine Cofilin, NDK, Galektin und Vinculin sowie des Referenzproteins GAPDH nach Transfektion der synthetischen miR-30a-3p	74
Abbildung 33: Targetidentifizierung des Cofilins mittels Western Blot	75
Abbildung 34: mRNA Expression von Cofilin 1 in MIMIC (blau) und MOCK (gelb)	75
Abbildung 35: Funktion des Cofilins	79
Abbildung 36: Regulierung des Cofilins	80

2.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Histologische Einteilung des NZKs nach WHO mit relativen Häufigkeiten	15
Tabelle 2: Häufigste hereditäre Formen des NZKs und ihre Eigenschaften	18
Tabelle 3: Stadieneinteilung des Nierenzellkarzinoms	22
Tabelle 4: Relative 5-Jahres-Überlebensrate in Abhängigkeit der Stadien	24
Tabelle 5: Mayo Scoring System	25
Tabelle 6: Motzer Kriterien	26
Tabelle 7: Systemtherapieoptionen gemäß Risikoprofil in der Erstlinientherapie	28
Tabelle 8: Systemtherapieoptionen gemäß Vortherapie in der Zweitlinientherapie	29
Tabelle 9: Regulationsmechanismen und deren Effekt auf miRNAs	35
Tabelle 10: Auswahl an miRNAs mit ihren Targets und zugehörigen Tumorentitäten	37
Tabelle 11: Charakteristika des Patientenkollektivs	45
Tabelle 12: Komponenten des RT-Mastermixes und die jeweiligen Konzentrationsangaben pro Ansatz	48
Tabelle 13: Temperatur/Zeit-Programm für Reverse Transkription	48
Tabelle 14: Komponenten des PCR-Mastermixes mit den jeweiligen Konzentrationsangaben	50
Tabelle 15: Zeit-Temperatur-Programm für die Amplifikation der cDNA	50
Tabelle 16: Rezeptur des Trenngels (10 %) und des Sammelgels (5 %)	57
Tabelle 17: mRNA Primer Typisierung (primer_forward_sequence, primer_forward_tm, primer_reverse_sequence)	59
Tabelle 18: Rezeptur des RT-Reaktionsmastermixes	59
Tabelle 19: PCR-Effizienzen der Primer	63
Tabelle 20: <i>Fold change</i> der Konzentration der miR-10b-5p	65
Tabelle 21: <i>Fold change</i> der Konzentration der miR-30a-3p	66
Tabelle 22: Werte der ROC-Kurvenanalyse zur Analyse des metastasierungsfreien Überlebens	67
Tabelle 23: <i>Fold change</i> und p-Werte der miRNA-Expressionsänderung nach Transfektion unterschiedlicher Mengen an miRNA MIMIC	72

3. Abkürzungsverzeichnis

A/B	Acrylamid/Bisacrylamid
°C	Grad Celsius
µl	mikroliter
Abb.	Abbildung
Ac	Acetylierung
ADP	Adenosindiphosphat
AGO	Argonaut
APS	Amoniumpersulfat
AUC	<i>area under the curve</i>
Axl	GAS6 Rezeptor (<i>Growth-arrest-specific gene 6</i>)
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ccRCC	<i>clearcell renal cell carcinoma</i>
CD44	<i>Cluster of differentiation 44</i>
CDKN1C	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C</i>
cDNA	<i>copy desoxyribonucleic acid</i>
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
c-Myc	<i>Myelocytomatosis oncogene cellular homolog</i>
CP	<i>crossing point</i>
CRK	<i>CT10 regulator of kinase</i>
CT	Computertomographie
ct	<i>cycle threshold</i>
DGCR8	<i>DiGeorge syndrome chromosomal [or critical] region 8</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphaten
DTT	Dithiotriol
ELAV	<i>Embryonic Lethal, Abnormal Vision, Drosophila Like</i>
EMT	Epitheliale-mesenchymale Transition
EPO	Erythropoetin
ERK	<i>Extracellular-signal Regulated Kinase</i>
et al.	et alii
EZH2	<i>Enhancer of zeste homolog 2</i>

FFPE	Formalin-fixiert-Paraffin-eingebettet
FHIT	<i>Fragile Histidine Triad</i>
FKS	Fetales Kälberserum
g	gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
ggf.	gegebenenfalls
GSK3 β	Glykogen-Synthase-Kinase-3-beta
GTP	Guanosintriphosphat
H	Stunde
H ₂ O	Dihydrogeniumoxid (Wasser)
Hb	Hämoglobin
HDAC	Histone-Deacetylase
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
HLRCC	Hereditäre Leiomyomatose mit Nierenzellkarzinom
HMGA2	<i>High-mobility group AT-hook 2</i>
HOXD10	Homeobox D10
H-RAS	H- rat sarcoma
HRCA	<i>Hereditary Renal Cancer associated</i>
HuR	<i>human antigen R</i>
IRAK	<i>Interleukin-1 receptor-associated kinase 1</i>
kDa	kilo Dalton
K-RAS	K-rat sarcoma
kzNZK	klarzelliges Nierenzellkarzinom
MECP	methyl CpG binding protein 2
MEF2	<i>Myocyte enhancer factor 2</i>
Mei-P26	Meiotic-P26
MgCl ₂	Magnesiumdichlorid
min	Minuten
miRNA	microRNA
ml	mililiter
mM	miliMol
MMP	Matrixmetalloproteinasen
MRT	Magnetresonanztomographie
MSKCC	<i>Memorial Sloan-Kettering Cancer Center</i>
MÜZ	Mittlere Überlebenszeit
Myf-5	<i>Myogenic factor 5</i>
MyoD	<i>Myogenic determination factor</i>

NDK	Nucleosid-Diphosphat-Kinase
ng	nanogramm
NHL2	NHL2 Protein
Nm	nanometer
N-RAS	N-rat sarcoma
NRC	<i>Non-papillary Renal Carcinoma</i>
NZK	Nierenzellkarzinom
OGG	8-Oxoguanine DNA Glycosylase
P	Phosphorylierung
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PD-L1	<i>Programmed cell death 1 ligand 1</i>
PIK3R2	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit beta</i>
PKD buffer	<i>Proteinase K Digestion Puffer</i>
Prae-miRNA	Praekursor-microRNA
pri-miRNA	primäre microRNA
PUMA	<i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Q	Quencher
qRT-PCR	real-time quantitative PCR
R	Reporter
RAN	<i>ras-related nuclear protein</i>
REST	<i>Relative expression software tool</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
ROC	<i>Receiver-Operating-Characteristics</i>
ROCK	Rho-Kinase
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
RT	Reverse Transkription
S	sekunde
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfate (Natrium-Dodecylsulfat)
SMAD	<i>Contraction of Sma (small body size) and Mad (Mothers against decapentaplegic)</i>
SPRED1	<i>Sprouty-related, EVH1 (Ena/Vasp homology proteins) domain-containing protein 1</i>
SRF	<i>Serum Response Factor</i>
Tab.	Tabelle

TATA	Thymin-Adenin-Thymin-Adenin
TBS	<i>Tris (hydroxymethyl)-aminomethan-buffered saline</i>
TDP43	<i>Transactive response DNA binding protein 43 kDa</i>
TEMED	N,N,N'N'-Tetramethyl-ethylenediamine
TNM	Tumor-Nodus-Metastasen
TNSA	<i>total number of specific aberrations</i>
TRAF6 TNF	<i>tumor necrose factor receptor associated factor</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UICC	<i>Union Internationale Contre le Cancer</i>
UTR	<i>Untranslated Region</i>
VCAM	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factors</i>
VHL	Von Hippel Lindau
vs.	versus
WHO	<i>World Health Organisation</i>
ZEB	<i>Zinc Finger E-Box Binding Homeobox</i>

4. Zusammenfassung

Da das Nierenzellkarzinom (NZK) der Tumor mit der höchsten Letalität des Urogenitalsystems ist, ist es erstrebenswert, bereits zu einem frühen Zeitpunkt das Metastasierungsverhalten des Tumors und die Prognose des Patienten möglichst präzise individuell einschätzen zu können. Dabei können miRNAs als prognostische Marker eingesetzt werden. In dieser Arbeit wurde die Expression der miRNAs miR-30a-3p und miR-10b-5p in Tumorgewebeproben von 50 metastasierten und 50 nicht metastasierten klarzelligem NZK sowie 10 Normalgewebeproben untersucht. Zudem wurde die Auswirkung einer Überexpression der miR-30a-3p auf die Expression ausgewählter Targetproteine, die mit der Zellintegrität bzw. Zellmigration assoziiert sind, analysiert.

Die Isolation der Gesamt-RNA erfolgte mittels eines präzipitationsbasierten Kits aus Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten (FFPE) Gewebeproben. Die Expression von miR-30a-3p und miR-10b-5p wurde durch reverse Transkription (RT) mit spezifischen Primern und einer sich anschließenden Taqman-Sonden basierten Realtime-PCR analysiert. Unter Berücksichtigung des Follow-ups der Patienten wurde untersucht, ob die Expression der beiden miRNAs signifikant mit dem klinischen Verlauf (metastasenfreies Überleben, Gesamtüberleben) assoziiert ist. Im zweiten Teil der Arbeit wurde miR-30a-3p in der NZK-Zelllinie 786-O mittels transienter Transfektion überexprimiert sowie die Auswirkung dieser Überexpression auf die Expression des Targetproteins Cofilin mittels Westernblotanalyse untersucht.

Mit Zunahme der Malignität des Gewebes zeigte sich eine signifikant abnehmende Expression der beiden miRNAs. Eine verminderte Expression der miR-30a-3p war mit einem signifikant verkürzten metastasierungsfreien Überleben assoziiert ($p=0,02$). Als prognostischer Marker zur Vorhersage der Metastasierung erreichte miR-30a-3p eine Sensitivität von 60% und eine Spezifität von 70%. Eine verminderte Expression der miR-10b-5p ließ einen Trend bezüglich eines verkürzten metastasierungsfreien Überlebens erkennen ($p=0,107$). Im Bezug auf das Gesamtüberleben konnte keine statistisch signifikante Korrelation zur Expression der miR-30a-3p nachgewiesen werden, die miR-10b-5p sagte tendenziell ein verkürzteres Gesamtüberleben bei erniedrigter Expression voraus ($p=0,174$). Im zweiten Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine artifizielle Hochregulation von miR-30a-3p zu einer geringeren Expression des Targetproteins Cofilin führt, dies war jedoch nicht signifikant.

MiR-30a-3p und miR-10b-5p konnten in dieser Arbeit als prognostische Marker für das Nierenzellkarzinom bestätigt werden. Um jedoch eine ausreichend hohe Sensitivität und Spezifität in der Vorhersage einer Metastasierung erreichen zu können und hieraus auch Konsequenzen im Sinne einer intensiveren Nachsorge oder adjuvanten Therapie abzuleiten,

müssten vermutlich mehrere miRNAs kombiniert betrachtet werden. Da es mittlerweile mehr als 2000 identifizierte miRNAs gibt, die einen Einfluss auf Apoptose, Proliferation und Invasion von Zellen haben können, und die Metastasierung einen komplexen Prozess darstellt, liegt es nahe, dass nicht eine miRNA alleine für das gesamte Metastasierungsverhalten der Zellen und das Expressionsverhalten von Targetproteinen verantwortlich sein kann. Durch die Kombination verschiedener miRNAs soll in zukünftigen Arbeiten ein prognostischer Score entwickelt werden, der eine ausreichende Vorhersagekraft besitzt, um prospektiv in klinischen Studien überprüft zu werden.

4.1. Summary

Titel: Validation and target identification of miR-30a-3p and miR-10b-5p for prediction of metastatic risk in clear cell renal cell cancer

Because of the utmost lethality of the renal cell cancer in the urological system it is important to define the risk of metastasis and the prediction at an early date. By this assignment the prognostic value of the miR-30a-3p and miR-10b-5p was validated in an independent pool of patients (50 metastasised, 50 non metastasised ccRCC and 10 normal kidney tissue). Potential target-proteins for the miR-30a-3p were approved experimentally.

The total RNA was isolated from FFPE-tissue by using 50 non-metastatic and 50 metastatic RCC. The expression of miR-30a-3p and miR-10b-5p was quantified using specific TaqMan primers with qRT-PCR. The assoziation between the expression of the two miRNAs and the clinical outcome of the patients (progressionfree-survival and overall survival) was investigated. The target validation was effected in vitro in the cell line 786-O using transient overexpression of miR-30a-3p. The effect of the target protein Cofilin was verified with western blot analysis.

The increase of the malignancy is associated with the decreased expression of the two miRNAs. In metastatic RCC miR-30a-3p and miR-10b-5p are significantly deregulated ($p < 0,001$). A lower expression of miR-30a-3p significantly correlates with an abbreviated progression-free survival ($p = 0,02$; sensitivity 60%; specificity 70%). A lower expression of miR-10b-5p was associated with a abbreviated progression-free survival ($p = 0,107$). In relation to the overall survival no statistically significant correlation to the expression of miR-30a-3p exist. A lower expression of miR-10b tends to an abbreviated overall survival ($p = 0,174$).

The artificial overexpression of miR-30a-3p in vitro tends to result in a reduced concentration of the target Cofilin.

In conclusion miR-30a-3p and miR-10b-5p could serve as prognostic marker for the metastasis behavior in the clear cell renal cell carcinoma. The evaluation of an only one single miRNA seems not sufficient for a precise prognostic prediction because of more then

2000 identified miRNAs with an influence on apoptosis, proliferation and invasion of cells and because of the high complexity of metastatic processes. To reach a sensitive and specific prognosis with a use in the clinical aftercare and adjuvant therapy multiple miRNAs-combinations need to be investigated. The next step should include the development of a prognostic score that have to be tested in clinical trial.

5. Einleitung

5.1. Das Nierenzellkarzinom

5.1.1. Epidemiologie

Nierentumore umfassen circa 2-3% aller malignen Erkrankungen im Erwachsenenalter^{9,52}. Das NZK stellt mit 90% den häufigsten Nierentumortyp dar⁵⁷. Es ist der Tumor mit der höchsten Letalität im urologischen Bereich.

2013 wurde bei mehr als 350.000 Menschen weltweit ein NZK diagnostiziert. Bei Männern besteht eine höhere Inzidenz als bei Frauen, das Verhältnis beträgt 1,5:1^{12,67}. In Deutschland erkrankten 2012 9.500 Männer und 5.530 Frauen am NZK¹¹⁷. Der Altersgipfel liegt bei 60-70 Jahren^{12,67}. Die Sterblichkeit des NZKs hatte in Europa in den 90er Jahren ihren Höhepunkt. Die Mortalitätsrate lag bei 4,8 pro 100.000 Patienten. Im Laufe der Jahre konnten sowohl in Europa als auch in den USA eine Senkung der Sterblichkeit und eine Steigerung der relativen 5-Jahres-Überlebensrate erzielt werden. In den 2000er Jahren erreichte die relative 5-Jahres-Überlebensrate in den USA 73%^{12,97}. In Abbildung 1 sind die Inzidenz und Mortalität im internationalen Vergleich von den Jahren 2011-2012 dargestellt.

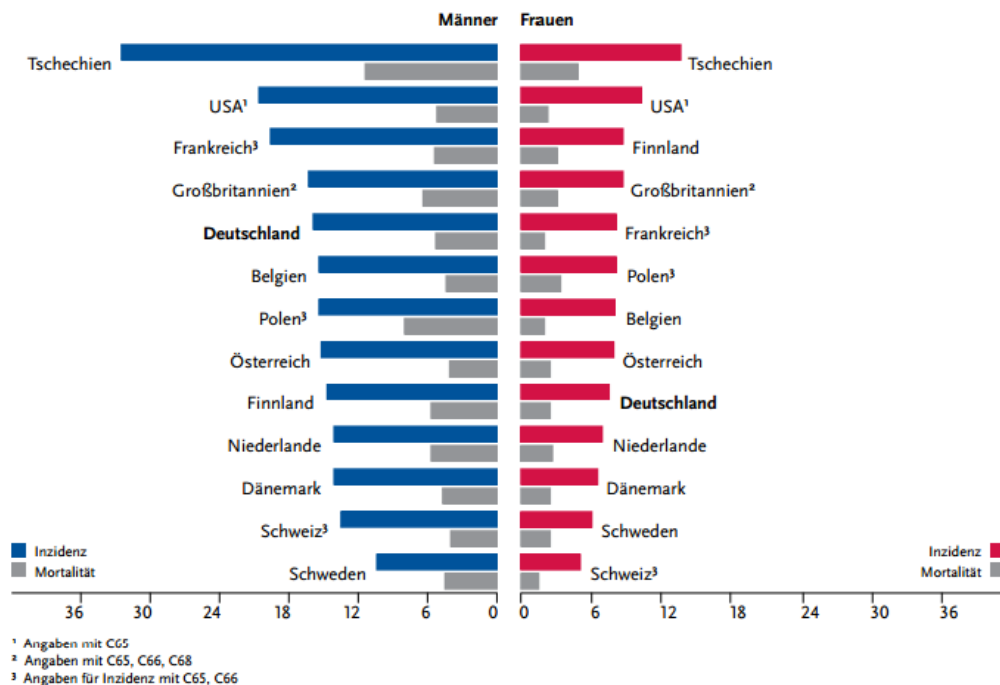


Abbildung 1: Altersstandardisierte Neuerkrankungs- und Sterberaten im internationalen Vergleich, nach Geschlecht, ICD-10 C64, 2011-2012 je 100.000¹¹⁷

5.1.2. Ätiologie

Das NZK kann sowohl sporadisch als auch hereditär auftreten. Beide Formen sind mit bestimmten Veränderungen auf verschiedenen Chromosomen assoziiert^{12,100}. Teilweise sind die mutierten Gene, die als genetischer Risikofaktor für die Entstehung des hereditären NZKs nachgewiesen wurden, auch für die sporadische Entwicklung des NZKs verantwortlich. Zu den vererbten Syndromen, die mit dem NZK assoziiert sind, gehören beispielsweise das von Hippel-Lindau-Syndrom, die tuberöse Sklerose, das Birt-Hogg-Dubé-Syndrom sowie die hereditäre Leiomyomatose mit Nierenzellkarzinom (HLRCC). Als weitere Risikofaktoren des NZKs gelten neben den genetischen sowohl interne als auch externe Faktoren. Grunderkrankungen wie arterielle Hypertonie^{12,17}, Adipositas^{12,17,36}, zystische Nierenerkrankung⁷³, chronische Niereninsuffizienz¹⁵ sowie terminale Niereninsuffizienz mit Transplantatnieren⁷¹ stellen ebenfalls Risikofaktoren dar. In manchen Kohortenstudien wird Diabetes mellitus ebenfalls als eigenständiger Risikofaktor vermutet^{12,17,119}. Zu den externen Risikofaktoren gehört in erster Linie das Rauchen^{12,17,103}. Eine berufliche Exposition mit halogenierten Kohlenwasserstoffen und Röntgenstrahlung über viele Jahre steigern ebenfalls das Risiko¹⁵. Weitere Studien lassen vermuten, dass Alkoholkonsum das Risiko, an einem Nierenzellkarzinom zu erkranken, reduziert^{12,17,54}.

5.1.3. Klassifikation des Nierenzellkarzinoms

In der aktuellen Klassifikation des NZKs nach WHO werden morphologische, genetische und prognostische Unterschiede beachtet.

Tabelle 1: Histologische Einteilung des NZKs nach WHO mit relativen Häufigkeiten^{2,27}

NZK	Häufigkeit
Klarzelliges Nierenzellkarzinom	75%
Papilläres Nierenzellkarzinom	10%
Chromophobes Nierenzellkarzinom	5%
Sammelrohrkarzinom/Ductus-Bellini-Karzinom	~1%
Medulläres Nierenzellkarzinom	<1%
NZK in Assoziation mit Xp11.2 Translokation/TFE-Fusion	<1% (meist bei Kindern und erst im Spätstadium entdeckt)
NZK in Assoziation mit Neuroblastom	<1%
Muzinös-tubuläres und spindelzelliges Nierenzellkarzinom	<1%
Nicht klassifizierbare Nierenzellkarzinome	4-7%

Mit 75% ist das klarzellige Nierenzellkarzinom (kzNZK) der häufigste Subtyp. Die Inaktivierung des Von-Hippel-Lindau (VHL) -Gens, überwiegend durch Mutationen, ist die häufigste Alteration (ca. 75%) dieses Subtyps⁵². Das VHL-Gen codiert für das VHL-Protein, welches den Abbau des Hypoxie-induzierten Faktors (HIF1alpha und HIF2alpha) beeinflusst und bei Verlust zu dessen Akkumulation führt. Dadurch wird die Bildung des *Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF)* und des Erythropoetins (EPO) überstimuliert, woraus eine unkontrollierte Angiogenese resultiert²⁷.

5.1.4. Makroskopische und histologische Eigenschaften des klarzelligen Nierenzellkarzinoms

Makroskopisch erscheinen NZKs als solitäre und zufällig verteilte kortikale Tumore. Sie sind häufig exophytische aus dem renalen Kortex hervorstehende kugelförmige Raumforderungen, meist im Bereich der Nierenpole. Es gibt jedoch auch endophytisch wachsende Tumore. Sie sind zum gesunden Nierenzellgewebe in der Regel deutlich durch eine Pseudokapsel abgegrenzt²⁷.



Abbildung 2: Makroskopische Darstellung des NZKs. A, B und C zeigen die unterschiedlichen Erscheinungen des NZKs²⁷

Das klarzellige Nierenzellkarzinom (kzNZK) setzt sich histologisch aus soliden, alveolären und azinären Anteilen zusammen. Typisch ist die reichhaltige Gefäßversorgung durch dünnwandige Blutgefäße. Das Zytoplasma ist reich an Lipiden und Glykogen. Letztere werden beim histopathologischen Aufarbeitungsprozess aus dem Gewebe gelöst, was dann zum typischen klarzelligen Erscheinungsbild führt.

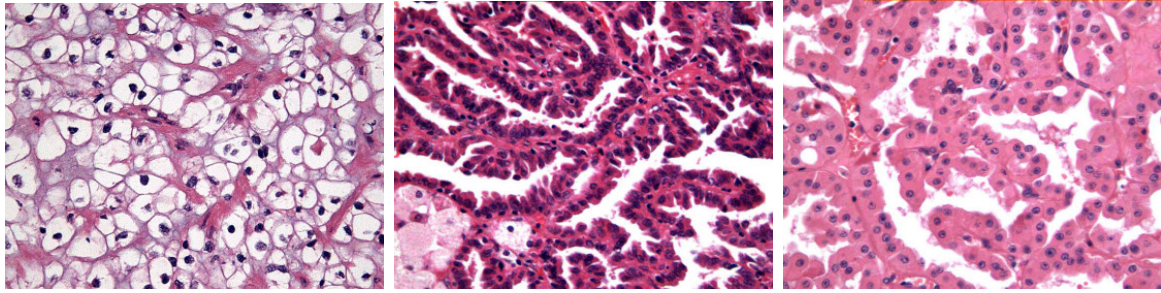


Abbildung 3: Histologische Darstellung des NZKs. In der ersten histologischen Darstellung ist das typisch alveoläre Bild des kzNZKs abgebildet. Darstellung 2 und 3 zeigen das histologische Präparat des papillären NZKs Typ und Typ 2²

5.1.5. Genetik des Nierenzellkarzinoms

5.1.5.1. Sporadische Formen des klarzelligen Nierenzellkarzinoms

Die Mehrheit der sporadischen Formen des kzNZKs ist durch eine 3p-Deletion charakterisiert. Hier wurden drei relevante Genloci gefunden: auf dem 3p25-26 Arm das *VHL*-Gen, auf dem 3p21-22 Arm das *RASSF1A* Tumorsuppressorgen, sowie in der 3p12-14.2 Region das *FHIT*-Gen. Mutationen des *VHL* Gens wurden in 34-56% der sporadischen kzNZK beschrieben. Eine epigenetische Inaktivierung durch Promoterhypermethylierung zeigte sich in 19% des kzNZKs. Daraus lässt sich schließen, dass die somatische Inaktivierung des *VHL*-Gens durch Allel-Deletion, Mutation oder durch epigenetische Alterationen erfolgt.

Weitere Tumorsuppressorgene, die sich auf 3p als verantwortlich für die Entstehung des kzNZKs erwiesen sind das *NRC-1*Gen auf dem 3p12 Locus, das *HRCA1*Gen auf 3p14.2 und das *OGG1*Gen auf 3p25.

Die komplette Inaktivierung der genannten Gene erfolgt entsprechend der „2-Hit-Hypothese“ in der Regel durch die Mutation auf einem Chromosom und die chromosomale Deletion auf dem anderen Chromosom.

Zudem wurden Zugewinne und Verluste von Chromosomen analysiert und mit der Prognose der Patienten korreliert. Der Verlust von Chromosom 9 scheint ein Zeichen einer schlechten Prognose zu sein. Der Verlust von Chromosom 14 korreliert mit einem höheren Grading (also einer stärkeren Entdifferenzierung der Tumorzellen) und hohem pathologischen T-Stadium. Neueste Arbeiten zeigen, dass nicht einzelne genetische Alterationen, sondern die Gesamtzahl spezifischer Alterationen (*total number of specific aberrations (TNSA)*) mit der Prognose korrelieren³⁹. Die *TNSA* ist signifikant mit dem Metastasenstatus bzw. dem Metastasenrisiko assoziiert und kann als Algorithmus zusammen mit der T-Kategorie zur Risikostratifizierung verwendet werden und so die Prognosevorhersage verbessern³⁹.

5.1.5.2. Sporadische Formen des papillären und chromophoben

Nierenzellkarzinoms

Im papillären Nierenzellkarzinom wurden Trisomie oder Tetrasomie der Chromosome 7 und 17 und der Verlust des Chromosoms Y als häufigste Veränderungen beschrieben. Trisomie 12, 16 und 20 werden in Beziehung zur Tumorprogression gesehen²⁷.

Das chromophobe NZK ist durch kombinierte Verluste der Chromosomen 1, 2, 6, 10, 13, 17 und 21 charakterisiert²⁷.

5.1.5.3. Hereditäre Formen des Nierenzellkarzinoms

Der Anteil hereditärer Formen des NZKs liegt bei 4%. Bei positiver Familienanamnese eines erst- oder zweitgradig Verwandten mit NZK besteht ein 2-4-fach erhöhtes Risiko, ebenfalls an einem NZK zu erkranken. Die häufigsten vier hereditären Syndrome, die ein erhöhtes Risiko für die Entstehung des NZKs tragen, sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Häufigste hereditäre Formen des NZKs und ihre Eigenschaften²⁷

<u>Hereditäre Formen</u>	<u>Eigenschaften</u>
Von Hippel-Lindau-Syndrom	<ul style="list-style-type: none">* Keimbahnmutation des <i>VHL</i>-Gens* Genlokus auf 3p25-26* > 70% NZK, meist klarzelliges NZK* Zusätzliches Auftreten von Hämangioblastomen des ZNS, Angiomen der Retina und Phäochromozytomen mit unvollständiger Penetranz
Birt-Hogg-Dubé-Syndrom	<ul style="list-style-type: none">* Mutation im Folliculin-Gen* Genlokus auf 17p11.2* Haut- und Haarveränderungen, Lungenzysten und Spontanpneumothoraces* 25% Nierentumore, meist chromophobes NZK und onkozytische Hybridformen
Hereditäres papilläres NZK	<ul style="list-style-type: none">* Keimbahnmutationen im <i>MET</i>-Proto-Onkogen* Genlokus auf 7q31* Papilläres NZK Typ1

Hereditäre Leiomyomatose mit Nierenzellkarzinom	<ul style="list-style-type: none"> * Mutation im Fumarat-Hydratase-Gen * Genlokus 1q42-43 * Auftreten von gutartigen Leiomyomen der Haut und des Uterus * Papilläres NZK Typ2
--	---

5.1.6. Symptomatik und Diagnostik

Über die Hälfte der Nierenzellkarzinome werden als Zufallsbefund bei unspezifischen Beschwerden meist sonographisch entdeckt. Nur 30% werden anhand ihrer Symptome diagnostiziert¹². Noch 2003 gehörte die klassische klinische Trias mit Hämaturie, Flankenschmerzen und Tastbefund zu den häufigsten Symptomen^{73,91}. Aktuell ist diese Kombination von Befunden mit 6-10% nur noch selten nachweisbar und deutet auf ein fortgeschrittenes Stadium hin^{62,73,91}. Bei metastasierten NZK gelten Knochenschmerzen durch Knochenbefall und Atembeschwerden durch Lungenherde als die häufigsten Symptome. Das Vorhandensein von Symptomen spricht für ein fortgeschrittenes Tumorstadium, Metastasen und eine schlechte Prognose. Lokale Symptome haben eine bessere Prognose als systemische^{86,90}.

Tritt ein unspezifisches Beschwerdebild auf, dienen Laborwerte wie Retentionsparameter, ein kleines Blutbild und Entzündungsparameter sowie ein Urinstatus als erste Hinweise⁷³. Ausschlaggebend für die weitere Diagnostik ist das Ergebnis der Sonographie. Hier stellt sich eine meist echoarme bis echogleiche Raumforderung dar. Regelmäßig ist ein zarter echofreier Randsaum im Sinne verdrängter Gefäße zu erkennen, der bei zusätzlicher Darstellung irregulärer Binnengefäße mittels Farbdoppler die Diagnose erhärtet⁹⁶. In Abb. 4 ist eine Sonographie der Niere mit exophytisch wachsendem NZK (pT1a) dargestellt.

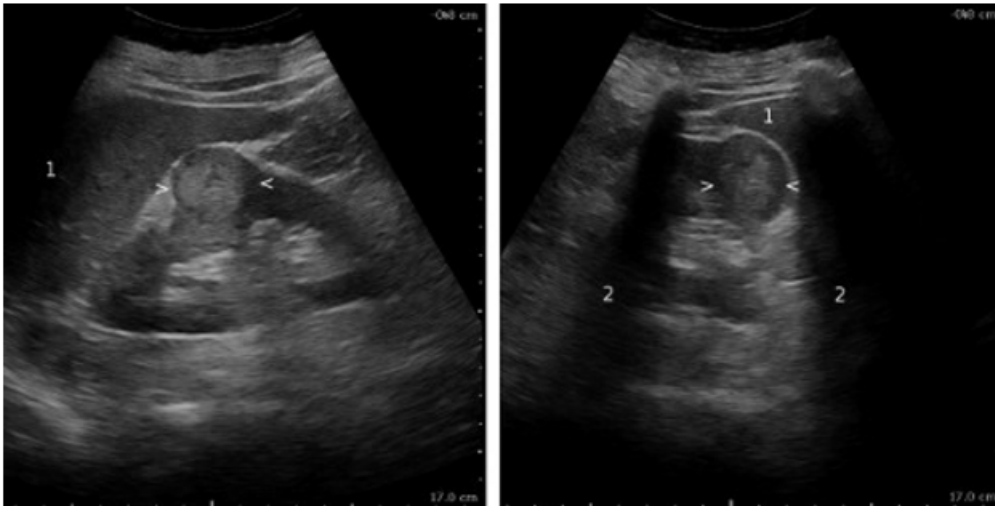


Abbildung 4: Sonographie der Niere in zwei Ebenen: kleines exophytisch wachsendes NZK pT1a; (1)Leber (2)Schallschatten der Rippen, die Pfeile markieren das Karzinom⁷⁵

Zur endgültigen Sicherung der Verdachtsdiagnose und Planung des weiteren Vorgehens werden radiologische Untersuchungen wie CT und MRT ergänzt⁷³. Das CT gibt Informationen über die Funktion und Morphologie der betroffenen, aber auch der kontralateralen Niere sowie über die Ausbreitung des Tumors (Lokalisation in Bezug zur Niere, Infiltration der Nierenvene, ggf. auffällige hiläre Lymphknoten). Durch Verwendung von Kontrastmittel kann die vaskuläre Versorgung der Niere sowie die Differenzierung zwischen Malignität und Benignität besser beurteilt werden⁷³. Die Abb. 5 zeigt ein CT des Abdomens mit Darstellung eines lokal fortgeschrittenen NZKs.

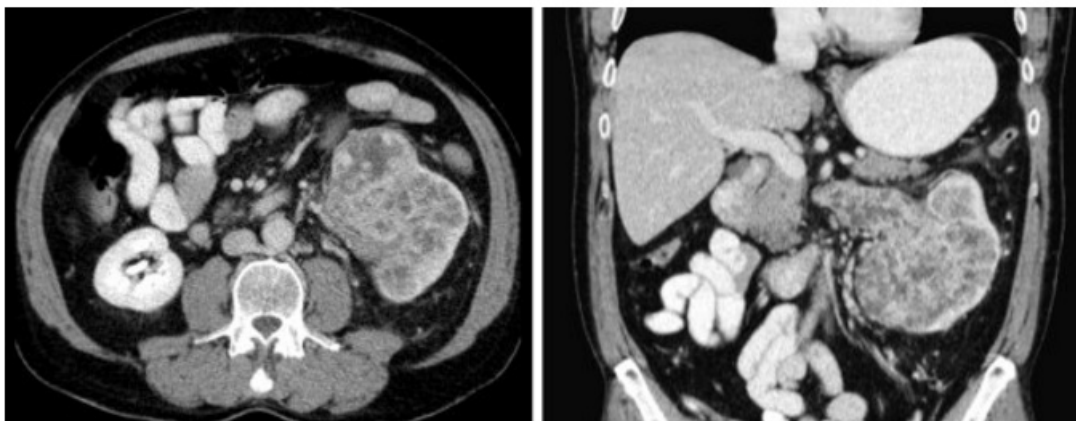


Abbildung 5: CT-Abdomen bei pT3a NZK mit Infiltration in Nierenvene und Vena cava inferior; Transversales Schnittbild (links) und koronare Rekonstruktion (rechts)⁷⁵

Bei unklarem CT-Befund zur Ergänzung von Informationen über die lokale Ausbreitung des Tumors und zur exakteren Beurteilung der venösen Thrombosierung wird das MRT angewandt. Die endgültige Diagnose erfolgt nach histologischer Aufarbeitung sowie bildgebender Staginguntersuchungen mittels TMN-Klassifikation, welche für das

Therapiekonzept entscheidend ist⁷¹. Weitere Diagnostik schließt sich je nach klinischen oder laborchemischen Befunden an. Dazu zählen die Knochenszintigraphie bei Verdacht auf Knochenmetastasen sowie das Schädel-CT bei Verdacht auf Hirnmetastasen²⁹.

Eine Empfehlung zur Biopsie vor Therapieentscheidung besteht nach der S3 Leitlinie Nierenzellkarzinom 2017, wenn sich in Abhängigkeit des Ergebnisses eine therapeutische Konsequenz ergibt, vor ablativer Therapie (Radiofrequenzablation, Kryoablation) sowie bei metastasierten Nierenzellkarzinomen zur histopathologischen Sicherung vor einer systemischen Therapie⁶⁶. In Zukunft könnte der Einsatz von molekularen Markern, die anhand des biopsierten Gewebes bestimmt werden, einerseits zur Diagnosesicherung, andererseits zur Vorhersage von Prognose und Therapieansprechen und damit zur Therapieentscheidung beitragen. Die unbefriedigende Aussagekraft der Biopsie bezüglich des Gratings und des sich daran orientierenden Therapieansatzes könnte hierdurch potentiell objektivierbarer und präziser werden⁶⁶.

5.1.7. Stadieneinteilung und Malignitätsgrad

Die Prognose des NZKs ist von anatomischen, histologischen, klinischen und laborchemischen Faktoren abhängig⁷¹. Zur klinischen und pathologischen Stadieneinteilung wird die TNM-Klassifikation der UICC angewandt. Dabei werden die Größe und lokale Ausdehnung des Tumors, der Lymphknotenbefall sowie die Fernmetastasierung berücksichtigt (Tab. 3).

Tabelle 3: Stadieneinteilung des NZKs: 6.TNM-Klassifikation und Gruppierung der Stadien nach TNM bzw. Robson⁵¹

6. TNM-Klassifikation		Gruppierung der Stadien nach TNM I–IV	Gruppierung der Stadien nach Robson I–IV
T-Kategorie	Definition		
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden		
T0	kein Anhalt für Primärtumor		
T1	Tumor bis 7 cm in größter Ausdehnung, begrenzt auf die Niere	I	I
T1a	Tumor bis 4 cm in größter Ausdehnung, begrenzt auf die Niere		
T1b	Tumor > 4–7 cm in größter Ausdehnung, begrenzt auf die Niere		
T2	Tumor > 7 cm in größter Ausdehnung, begrenzt auf die Niere	II	
T3	Tumor breitet sich in größeren Venen aus oder infiltriert Nebenniere oder perirenales Gewebe, jedoch nicht jenseits der Gerota-Faszie	III	II oder III
T3a	Tumor infiltriert Nebenniere oder perirenales Gewebe, jedoch nicht jenseits der Gerota-Faszie		II
T3b	Tumor mit makroskopischer Ausbreitung in Nierenvene(n) oder V. cava unterhalb des Zwerchfells		IIIa
T3c	Tumor mit makroskopischer Ausbreitung in V. cava oberhalb des Zwerchfells		
T4	Tumor infiltriert über die Gerota-Faszie hinaus	IV	IVa (bei M0)
N-Kategorie	Definition		
NX	regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden		
N0	keine regionären Lymphknotenmetastasen		
N1	Metastase(n) in einem regionären Lymphknoten	III (bei T1–3 und M0)	IIIb
N2	Metastasen in mehr als einem regionären Lymphknoten	IV	
M-Kategorie	Definition		
MX	Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden		
M0	keine Fernmetastasen		
M1	Fernmetastasen	IV	IVb

Die Einteilung des Tumorgades erfolgte bis 2016 nach Fuhrmann und ab 2016 nach dem Grading der *World Health Organization-International Society of Urological Pathology* (WHO-ISUP²⁴). Dabei sollten chromophobe NZK nicht graduiert werden und die papillären in Typ I und II unterteilt werden. Die Gradeinteilung nach Fuhrmann betrachtet die Kerngröße, die Kernform, das Chromatin und die Nukleolen und lässt sich in 4 Grade (I-IV) gut, mäßig, schlecht differenziert sowie undifferenziert kategorisieren. Die Grading Einteilung nach ISUP beurteilt nur die Nukleolen⁷⁹.

5.1.8. Prognosebewertung

Tumoren mit einem Durchmesser ≤ 4 cm sind mit einem Tumor spezifischen 5-Jahres-Überleben von mehr als 90% assoziiert²⁵. Bei Bestehen von Fernmetastasen fällt die 5-Jahresüberlebensrate stark ab.

Bereits bei 17% der Patienten sind zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits Metastasen vorhanden (synchrone Metastasierung)^{13,18}. 30% der Patienten entwickeln bei primär organbegrenztem Befund im weiteren klinischen Verlauf Metastasen (metachrone Metastasierung). Die häufigsten Metastasierungsorte des kzNZKs sind die Lunge, das Skelettsystem sowie Lymphknoten und Leber (Abb. 6)¹⁸.

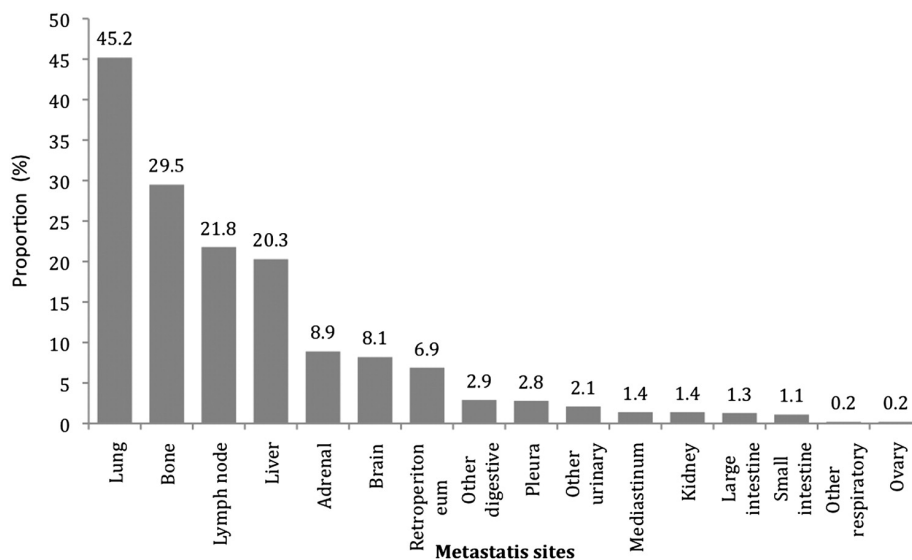


Abbildung 6: Metastasenverteilung in Prozentangabe^{5,18}

Die relative 5-Jahres-Überlebensrate für die Diagnose C64 nach ICD 10 in Deutschland im Jahr 2012 liegt bei 76% bei Männern und 78% bei Frauen¹¹⁷. Die relative 10-Jahres-Überlebensrate liegt bei 68% bzw. 71% (Abb.7)¹¹⁷.

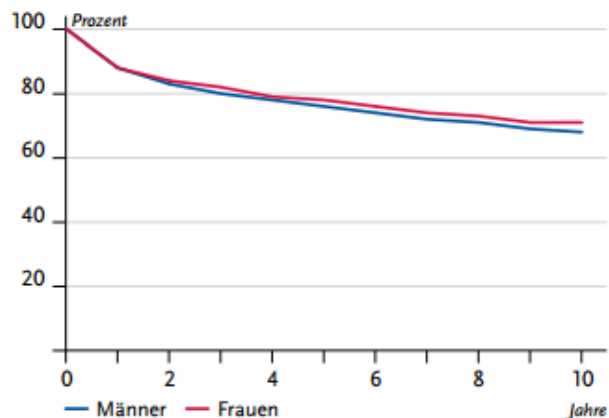


Abbildung 7: Relative Überlebensraten bis 10 Jahre nach Erstdiagnose, nach Geschlecht, ICD-10 C64, Deutschland 2011-2012¹¹⁷

Wird die 5 Jahres-Überlebensrate stadienabhängig betrachtet, stellt sich eine deutlich schlechtere Überlebensrate beim Vorliegen von Fernmetastasen dar.

Tabelle 4: Relative 5-Jahres-Überlebensrate in Abhängigkeit der Stadien⁶⁶

TNM-Kategorie	Klinisches Stadium	5-Jahres-Überlebensrate
T1	I	97%
T2	II	87%
T3, N1 bei T1-3 und M0	III	69%
T4, N2, M1	IV	14%

Die Metastasierungswahrscheinlichkeit wird unter anderem durch das Mayo-Score-System beurteilt, das von Leibovich et al. entwickelt und 2012 von Pichler et al. validiert und ergänzt wurde (Tab. 5)^{64,65,93}.

Tabelle 5: Mayo Scoring System^{64,76}

Risikofaktor	Punkte
<i>T-Stadium</i>	
T1a	0
T1b	2
T2	3
T3–4	4
<i>Tumorgröße</i>	
<10 cm	0
>10 cm	1
<i>Lymphknotenstatus</i>	
pNx/pN0	0
pN1–2	1
<i>Grading</i>	
1–2	0
3	1
4	3
<i>Tumornekrosen</i>	
keine Nekrosen	0
Nekrosen	1

Bei metastasierten Patienten werden zur Prognosebeurteilung die MSKCC- oder Motzer-Kriterien angewandt, welche unter Betrachtung klinischer Faktoren und Laborparametern die Mittlere-Überlebenszeit (MÜZ) einschätzen. Diese Kriterien und die hieraus abgeleitete MÜZ sind in Tab. 6 dargestellt.

Tabelle 6: Motzer Kriterien^{46,76}

Risikofaktor	Grenzwert
niedriger Karnofsky-Index	< 80 %
hohe <u>LDH</u>	> 1,5fache der Norm
niedriges Hb	< unterer Normwert
hohes korrigiertes Kalzium	> 10 mg/dl
Zeit von Tumornephrektomie zur Metastasenentstehung	< 1 Jahr
<p>Niedriges Risiko (0 Risikofaktoren): MÜZ von 30 Monaten. Mittleres Risiko (1–2 Risikofaktoren): MÜZ von 14 Monaten. Hohes Risiko (3 und mehr Risikofaktoren): MÜZ von 5 Monaten.</p>	

5.1.9. Therapie

5.1.9.1. Therapie des nicht metastasierten NZKs

Der aktuelle Standard der Therapie eines organbegrenzten NZKs ist die offene partielle Nephrektomie^{102,104}. Bezüglich des Gesamt- und tumorspezifischen Überlebens sind im Vergleich offene vs. Laparoskopische Verfahren keine Unterschiede festgestellt worden. Dennoch treten bei der laparoskopischen Technik ein geringerer operativer Blutverlust, ein kürzerer Krankenhausaufenthalt und eine kürzere Genesungszeit auf. Nach der S3 Leitlinie Nierenzellkarzinom 2017 kann daher bei ausreichender Erfahrung auch der minimalinvasive Eingriff angewandt werden. Für Empfehlungen zur roboterassistierten (partiellen) Nephrektomie ist die Datenlage noch nicht ausreichend.

Je nach Größe und Lage des Tumors muss auf die radikale Tumornephrektomie zurückgegriffen werden. Zur besseren Einschätzung, welche operative Vorgehensweise für den individuellen Patienten am geeignetsten erscheint, stehen drei anatomische Scores zur Verfügung: PADUA³⁴, RENAL⁶¹ und C-index^{98,12}.

Die Entfernung der regionären Lymphknoten im Rahmen der chirurgischen Therapie organbegrenzter Nierenzellkarzinome wird kontrovers diskutiert. Obwohl damit ein verlässlicher Lymphknotenstatus bestimmt werden kann, wird in mehreren Studien kein

Überlebensvorteil erreicht^{6,12}. Laut der S3 Leitlinie Nierenzellkarzinom 2017 soll eine Lymphknotendissektion durchgeführt werden, wenn klinisch eine Lymphknotenbeteiligung nachgewiesen wurde⁴. Liegt bildmorphologisch und intraoperativ kein Anhalt für Lymphknotenbeteiligung vor, kann auf eine Lymphadenektomie verzichtet werden⁶⁶.

Bei 10% der Patienten wird eine Tumorthrombosierung der Nierenvene bis hin zur Vena cava inferior festgestellt, deren operative Entfernung einen besseren Überlebensvorteil zeigt^{12,42}.

Die fokale ablativ Therapie des NZKs in Form von Kryoablation und Radiofrequenzablation kann bei kleinen Nierentumoren und hoher Komorbidität bzw. geringer Lebenserwartung angeboten werden. Bei ablativen Verfahren sollte immer eine histologische Diagnosesicherung mittels perkutaner Nierentumorbiopsie vorausgehen.⁶⁶ Das Prinzip dieser Technologien besteht darin, durch Kryoverfahren oder mit ionischer Oszillation erzeugte Friktionswärme bei der Radiofrequenzablation den Zelltod zu indizieren^{12,47,20}. Die Nephron-sparende Chirurgie und die Kryoablation führen zu einem signifikant längeren metastasierungsfreiem Überleben als die radiofrequente Ablation^{12,104}.

Neben der klassisch chirurgischen und fokal-ablativen Therapie des NZKs stellt die Active Surveillance eine konservative Option für ausgewählte Patienten mit kleinen Nierentumoren dar. Die S3 Leitlinie Nierenzellkarzinom 2017 empfiehlt konsensbasiert Tumorgöße, Komorbiditäten und Patientenwunsch zu berücksichtigen sowie eine Biopsie durchzuführen, um die *Active Surveillance* als adäquate Therapieoption abzuklären. Zudem sollte über das Risiko zur Tumorprogression, das Fehlen der kurativen Salvagetherapie bei Auftreten von Metastasen, den möglichen Verlust der Option einer organerhaltenden Tumortherapie und die Limitation der aktuellen Datenlage im Hinblick auf Langzeitergebnisse einer aktiven Überwachung aufgeklärt werden⁶⁶.

5.1.9.2. Therapie des metastasierten NZKs

Bei singulären oder wenigen, chirurgisch komplett resezierbaren Metastasen stellt die Metastasen Chirurgie beim Nierenzellkarzinom einen etablierten und potenziell kurativen Therapieansatz dar. Im letzten Jahrzehnt stieg die Anzahl der operativen Metastasenresektionen^{5,18}. Sowohl bei synchroner als auch bei metachroner Metastasierung zeigte sich durch vollständige Resektion der Metastasen ein verbessertes Gesamt- und progressionsfreies Überleben^{18,19}.

Bei nicht vollständig resezierbaren Metastasen ist eine systemische Behandlung notwendig. Dabei stehen verschiedene Ansätze zur Verfügung. In der Erstlinientherapie bei niedrigem oder intermediären Risiko werden Sunitinib (NCT00098657 Studie⁸¹, COMPARZ Studie⁸⁰),

Pazopanib (VEG105192 Studie¹⁰¹, COMPARZ Studie⁸⁰), Tivozanib (TIVO1 Studie⁸²) oder Bevacizumab plus Interferon alpha (AVOREN Studie²⁸) angewandt. Cabozantinib ist zur first-line Therapie bei intermediärem oder hohem Risiko nach IMDC zugelassen (CABOSUN Studie¹⁶). Sunitinib, Pazopanib und Tivozanib gehören zu den Tyrosinkinaseinhibitoren und wirken vor allem über den VEGF-Rezeptor sowohl in Endothelzellen als auch in Tumorzellen wachstumshemmend. Cabozantinib ist ebenfalls ein Tyrosinkinaseinhibitor, der aber neben der VEGFR-Tyrosinkinase auch Met und Axl hemmt und damit wichtige Resistenzmechanismen gegenüber der ersten Generation von Tyrosinkinaseinhibitoren berücksichtigt. Bevacizumab ist ein monoklonaler Antikörper, der vor allem in Kombination mit dem Immunmodulator Interferon alpha zur Tumorsuppression und Erhöhung des progressionsfreien Überlebens führt. Bei ungünstigem Risikoprofil wird neben Cabozantinib auch Temsirolimus (ARCC Studie^{50,116}) eingesetzt, eine Substanz, die über die Hemmung des mTOR-Signalweges zytostatische und antiproliferative Effekte verursacht⁷². In der Zweitlinien-Therapie sollen Cabozantinib oder Nivolumab (Check Mate-025 Studie³⁰) angewandt werden. Nivolumab gehört zur Substanzklasse der sogenannten Checkpoint-Inhibitoren. Es handelt sich um einen monoklonalen Antikörper, der durch Bindung an die *Programmed Death* (PD)1 Rezeptoren auf T-Zellen einen immunstimulierenden Effekt hervorruft. In aktuellen Studien haben sich sowohl Cabozantinib als auch Nivolumab gegenüber dem bisherigen Zweitlinien-Therapeutikum Everolimus hinsichtlich des progressionsfreien Überlebens und auch der Verträglichkeit als überlegen erwiesen^{22,66}.

Tabelle 7: Systemtherapieoptionen gemäß Risikoprofil in der Erstlinientherapie⁶⁶

Therapielinie	Risikoprofil	Standard	Option
Erstlinie	Gut/intermediär	Bevacizumab + IFN α Pazopanib Sunitinib Tivozanib Cabozantinib (nur intermediär)	hochdosiertes IL-2
	Ungünstig	Temsirolimus Cabozantinib	Pazopanib Sunitinib

Tabelle 8: Systemtherapieoptionen gemäß Vortherapie in der Zweitlinientherapie⁶⁶

Therapielinie	Vortherapie	Standard	Option
Zweitlinie	nach Zytokinen	Axitinib	Pazopanib Sorafenib
	nach VEGF- Versagen	Cabozantinib Nivolumab	Axitinib (nach Sunitinib) Everolimus Lenvatinib+Everolimus
	nach Temsirolimus	Axitinib Cabozantinib Pazopanib Sorafenib Sunitinib	

Eine adjuvante alleinige Immuntherapie oder Vakzinierungstherapie sollte laut S3 Leitlinie Nierenzellkarzinom 2017 nicht durchgeführt werden. Eine adjuvante Target-Therapie wird nur in Studien empfohlen⁶⁶.

Eine adjuvante Therapie mit Tyrosinkinaseinhibitoren zeigte in einzelnen Studien zwar einen Vorteil hinsichtlich des progressionsfreien Überlebens^{41,94}, wird aber in Leitlinien nicht empfohlen⁶⁶. Die Effektivität einer adjuvanten Immuntherapie nach chirurgischer Entfernung eines Hochrisiko-Nierenzellkarzinoms wird gegenwärtig in klinischen Studien untersucht (z.B. IMmotion010 mit dem PD-L1 Inhibitor Atezolizumab¹⁰⁶).

5.2. microRNA

MicroRNAs (miRNAs) sind kurze nicht-kodierende, einzelsträngige RNAs, die aus 19-25 Nukleotiden bestehen⁴⁰. Sie binden an komplementäre Nukleotidsequenzen der mRNA und regulieren entweder durch Inhibierung der Translation oder durch die Spaltung des Zieltranskripts die Genexpression und Proteinsynthese^{45,49}. Über diesen Mechanismus werden grundlegende biologische zelluläre Prozesse wie Proliferation, Migration und Apoptose in den verschiedenen Geweben gesteuert.

5.2.1. Funktion der miRNA

Die erste miRNA, lin4, wurde 1993 im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* entdeckt. Damals wurde beschrieben, dass lin4 für die embryonale Entwicklung verantwortlich ist und über Steuerung wichtiger Signalwege die Lebensdauer der Zellen beeinflusst⁶³. 2001 wurden miRNAs erstmals im Menschen beschrieben⁹⁵. Es folgten zahlreiche Arbeiten, in denen weitere Funktionen der miRNAs entdeckt wurden: beispielsweise konnte im Modell der Fruchtfliege die Beteiligung der miRNAs am programmierten Zelltod⁸ und an der Differenzierung von Neuronen und Immunzellen⁷ festgestellt werden. MiRNAs sind nicht nur an den physiologischen Zellprozessen wie Proliferation, Erhaltung, Differenzierung und Apoptose, sondern auch an pathologischen Prozessen der Zelle beteiligt. 2002 wurde in einer Studie von Calin et al. bei chronisch lymphatischer Leukämie erstmals festgestellt, dass miRNAs eine Funktion in der Entwicklung von Neoplasien haben¹¹. 2006 konnten Yanaihara et al. bei Lungentumoren eine wichtige Beziehung zwischen miRNA-Expressions-Signaturen und dem Überleben der Patienten darlegen^{59,112}.

Je nach Gewebe und Ziel-mRNA können miRNAs als Onkogene oder Tumorsuppressorgene fungieren. Beispielsweise ist miR-155 bei Krebserkrankungen wie Leukämien oder Lymphomen erhöht exprimiert und wirkt als Onkogen. Bei endokrinen Tumoren liegt miR-155 in geringer Expression vor und wirkt als Tumorsuppressor⁸⁵.

5.2.2. Biogenese

In Abb. 8 wird die Biogenese der miRNAs veranschaulicht. MiRNAs werden sowohl aus Introns, als auch aus Exons transkribiert. Der Großteil der miRNA-Gene wird durch die RNA-Polymerase II im Zellkern transkribiert. Die primären miRNA Transkripte (pri-miRNA) bestehen aus mehreren Kilobasen, einem terminalen *Loop*, sowie Polyadenylierungen am 3'- und Cap-Strukturen am 5'-Ende. Im Reifungsprozess der pri-miRNA wird zunächst durch den Mikroprozessorkomplex, bestehend aus dem RNase III Enzym Drosha und dem Kofaktor DGCR8, die charakteristische Haarnadelstruktur so gespalten, dass eine Praekursor-miRNA (prae-miRNA) von 65 Nukleotiden Länge mit eingeschlossener miRNA Sequenz entsteht.

Durch einen Transportkomplex, bestehend aus Exportin-5, GTP-bindendem Kernprotein RAN und GTP, wird diese prae-miRNA in das Zytoplasma exportiert. Dort schneidet das Enzym Dicer die Haarnadelstruktur nahe des terminalen Loops durch, wodurch ein 19-25 Basenpaare langer miRNA-Doppelstrang entsteht^{26,40}. Im nächsten Schritt lagern sich Argonaut-Proteine (AGO-Protein) und der Ribonukleinprotein-Komplex an den stabileren miRNA-Führungsstrang, wodurch der *RNA-induced silencing complex (RISC)* entsteht. Der RISC-Komplex wird durch die Bindung der miRNA an ihre Ziel-mRNA erweitert^{26,85}. Diese

Bindung erfolgt hauptsächlich an der untranslatierten 3'-Region der mRNA komplementär zur Seed-Sequenz der miRNA, den ersten 2-8 Nukleotiden am 5'-Ende. Diese Region ist wichtig für die Targeterkennung²⁶. Ist die Bindung zwischen miRNA und mRNA nicht vollständig komplementär, wird die Translation der mRNA unterdrückt. Besteht eine vollständige Komplementarität, wird die mRNA durch die Endonukleaseeigenschaft des AGO-Proteins abgebaut. Es kommt zur Inhibierung der Genexpression auf posttranskriptioneller Ebene, wodurch zelluläre Prozesse wie Apoptose, Zellwachstum, Migrations- und Invasionsverhalten, sowie Proliferation und Angiogenese beeinflusst werden³³. Dabei kann eine miRNA unterschiedliche mRNA-Targets haben, was die organ- und gewebsspezifische Wirkungsweise der miRNA erklärt und Ursache für ihre Karzinomspezifität ist.

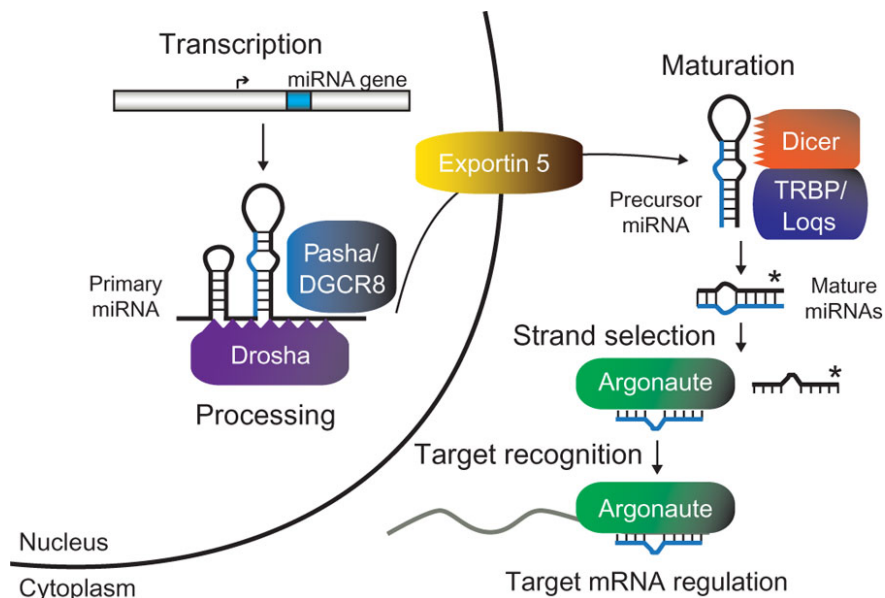


Abbildung 8: Zusammenfassende Darstellung der miRNA-Synthese⁵³. Im ersten Schritt erfolgt die Transkription der miRNA, danach folgt der Reifungsprozess zunächst im Zellkern durch das Enzym Drosha/DGCR8 und nach Transport mittels Exportin 5 ins Zytoplasma durch das Enzym Dicer. Die reife miRNA lagert sich dann unterstützt von Argonaute-Proteinen an die mRNA an und kann diese regulieren.

5.2.3. Regulation der miRNA Synthese

Die Regulation der miRNA-Expression ist entscheidend für ihre nachfolgende Funktion. Sie beginnt bereits auf Gen-Ebene. Durch Amplifikation resultiert häufig eine Überexpression der miRNA, bei Deletion wird die miRNA erniedrigt exprimiert. Mutationen verändern die Zusammensetzung der miRNA und führen zur fehlerhaften Reifung oder Anlagerung an die mRNA. Die miR-Gene liegen häufig auf fragilen chromosomalen Abschnitten, sogenannten

fragile sites, an denen es häufig zu Brüchen, Deletionen und Amplifikationen, besonders in malignem Gewebe, kommt¹⁰.

Weiterhin beeinflussen spezifische Transkriptionsfaktoren den ersten Schritt in der Biogenese der miRNAs (Abb. 9). MiRNAs haben eigenständige Promotoren mit TATA-Box-Sequenzen und CpG-Inseln, worüber die Regulation durch Transkriptionsfaktoren stattfindet. Je nachdem, um welche miRNA und welchen Promotor es sich handelt, wirken unterschiedliche Transkriptionsfaktoren. Zu den Regulatoren gehören unter anderem c-Myc, p53, MYOD1 und ZEB1/2 (Abb.2). Beispielsweise bewirkt c-Myc, ein Protoonkogen, über die Bindung an den entsprechenden Promotor eine Aktivierung der Transkription des miR-17-92-Clusters. Zusätzlich führt c-Myc zur geringeren Expression von Tumorsuppressor miRNA-Genen der miR-15a, -29, -34 und let-7-Familie²⁰.

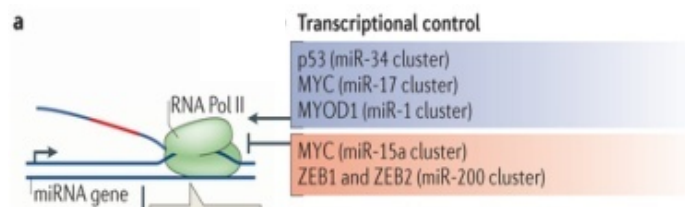


Abbildung 9: Regulation der miRNA-Transkription durch spezifische Transkriptionsregulatoren wie p53, Myc, Myod1 und ZEB 1/2.

Die Transkription des miR-34 Clusters wird durch p53, der miR-1 Cluster durch MYOD1 aktiviert, eine Hemmung der Transkription des miR-200-cluster erfolgt durch ZEB1 und ZEB2. Myc aktiviert die Transkription des miR-17-Clusters und hemmt die Transkription des miR-15a-Cluster⁴⁰.

Im nächsten Schritt der Biogenese wird durch Regulation des Mikroprozessor-Komplexes die Reifung der miRNA beeinflusst. Zum einen erfolgt dies durch Autoregulation zwischen Drosha und DGCR8, zum anderen wird das Drosha-Enzym mittels Phosphorylierung durch Glykogen-Synthase-Kinase-3-beta (GSK3 β) und Acetylierung unbekannter Enzyme in seiner Lokalisation und Stabilität beeinflusst. DGCR8 wird per Deacetylierung durch Histone-Deacetylase 1 (HDAC1) in seiner Affinität zur pri-miRNA gestärkt und durch Phosphorylierung mittels *Extracellular-signal Regulated Kinase* (ERK) stabilisiert. Zudem werden sie durch weitere Proteine wie beispielsweise MECP2, p68, p72 sowie SMAD reguliert⁴⁰. In Abb. 10 werden die einzelnen Regulatoren und ihre Wirkung veranschaulicht.

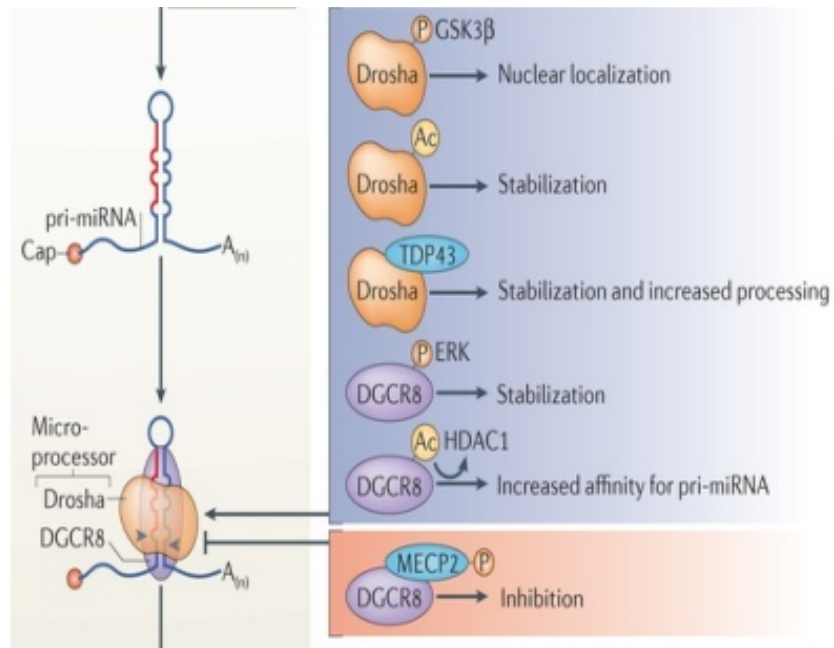


Abbildung 10: Regulation der Biosynthese über den Mikroprozessorkomplex Drosha/DGCR8. Die Phosphorylierung (P) des Droshas durch GSK3 β und die Acetylierung (Ac) führt zur Stabilisierung und Festigung der Lokalisation des Enzyms im Zellkern. Ebenfalls zur Stabilisation führt die Regulation von TDP43 (Transactive response DNA binding protein 43 kDa). Das Co-Enzym DGCR8 wird durch Phosphorylierung durch ERK stabilisiert. Die Deacetylierung des DGCR8 durch HDAC1 bewirkt eine gesteigerte Affinität zur pri-miRNA. Durch MECP2 wird das Enzym DGCR8 gehemmt⁴⁰.

Im Zytoplasma erfolgt die Regulation des RISC-Komplexes durch RNA-bindende-Proteine, beispielsweise dead-end 1 oder HuR (ELAV1) sowie die Modifikation der Argonaut-Proteine⁸⁹. Durch Beeinflussung der Argonaut-Proteine wird die Effizienz der miRNA-Bindung an die mRNA reguliert. Die verschiedenen Mechanismen der Regulation der Ago-Proteine sind in der Abb. 11 dargestellt.

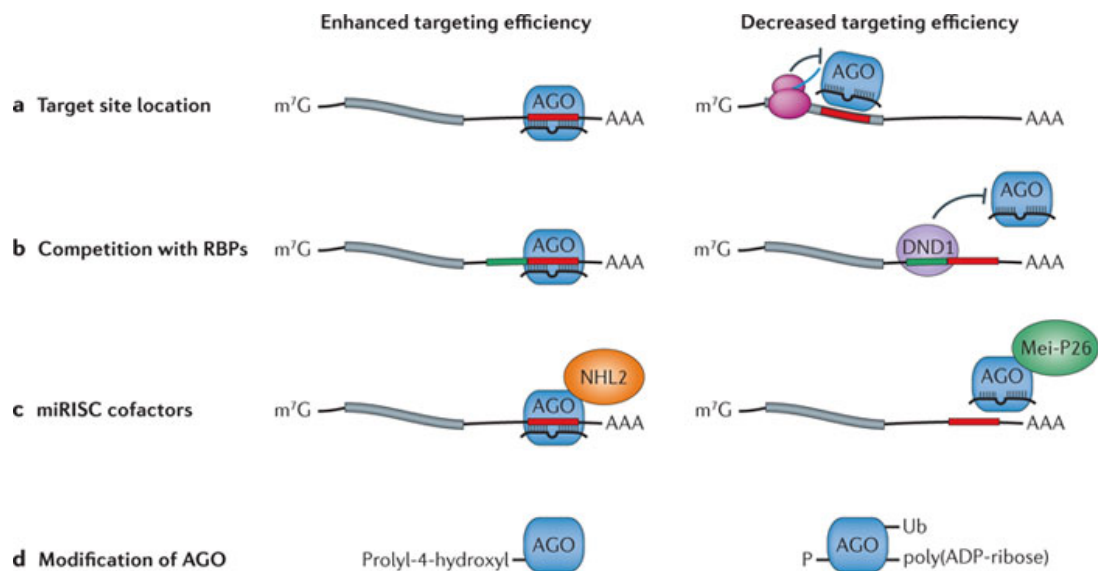


Abbildung 11: Modifikation der AGO-Proteine und die Konsequenz bezüglich der Effizienz der miRNA Bindung an die Ziel-mRNA. a) Die Lokalisation der Bindungsstelle beeinflusst die Effizienz. Durch Bindung am 3'UTR-Ende ist die Wirkung der miRNA auf die mRNA effizienter als durch die Bindung an der kodierenden Region b) RNA bindende Proteine wie DND1 verhindern die Anbindung des RISC/AGO-Komplexes und führen zur ineffizienteren Bindung zwischen miRNA und mRNA c) Verschiedene Kofaktoren des RISC-Komplexes beeinflussen die Effizienz. NHL2 führt zur höheren, Mei-P26 zur geringeren Effizienz d) Durch Stabilisieren des AGO-Proteins mittels Prolyl-4-hydroxylierung wird die Bindung und Regulation der miRNA gegenüber ihrer Target-mRNA effizienter, durch Phosphorylierung, Ubiquitinierung und Poly-ADP-Ribosylierung des AGO-Proteins wird das Protein instabil und in seiner Bindungsfähigkeit beeinträchtigt, woraus eine schlechtere Bindung der miRNA an die mRNA resultiert⁸⁹.

Je nachdem in welchem Gewebe die miRNA wirkt, werden die Regulationsmechanismen durch gewebsspezifische Regulationsfaktoren gesteuert. Beispielsweise beeinflusst im Skelett- und Herzmuskel der Serumreaktionsfaktor (SRF) und der Myozytenverstärkungsfaktor 2 (MEF2) sowie Myf-5, MyoD und Myogenin die Funktion der miRNA²⁰.

Die Tab. 9 fasst die essentiellen Regulationsmechanismen und ihren Effekt auf die miRNAs nochmals zusammen.

Tabelle 9: Regulationsmechanismen und deren Effekt auf miRNAs⁹⁵

Mechanismus der Deregulation	Effekt auf miRNA
1. Genomische Veränderungen Deletion, Amplifikation, Translokation	Erhöhte oder erniedrigte Expression
2. Mutation/Polymorphismus der miRNA-Gene	Erhöhte oder erniedrigte Expression, veränderte Bindungskapazität
3. Mutation/Polymorphismus der miRNA-Bindungsstelle in der mRNA des Zielgens	Veränderte Bindungskapazität
4. Mutation im 3'-UTR-Bereich eines Nicht-Zielgens	Mögliche Bindung an eine Nicht-Zielgen-mRNA
5. Mutationen des Biogeneseapparats - Hochregulation von Drosha - Reduktion von Dicer	Unvollständige Prozessierung
6. Epigenetische Mechanismen - Methylierung der miRNA-Promotorregion - Histonmodifikation	Verminderte Synthese

5.2.4. Bedeutung für die Entstehung und Progression von Tumoren

MiRNAs beeinflussen ca. 30 % der proteinkodierenden Gene⁹⁹. Wie im Kapitel 5.2.3. beschrieben, regulieren miRNAs unter anderem die Differenzierung, Proliferation und Apoptose. Diese Prozesse sind auch bei der Tumorgenese entscheidend. So können miRNAs je nachdem, welche Ziel-mRNA sie regulieren, sowohl onkogene als auch tumorsuppressive Eigenschaften haben. Sind onkogene miRNAs hochreguliert, führt dies zur Unterdrückung des Tumorsuppressor-Proteins und zur Förderung der Tumorentstehung. Liegen tumorsuppressive miRNAs in geringer Expression vor, wird dadurch die Wirkung der Onko-Proteine verstärkt. In Abb. 12 werden diese Abläufe verdeutlicht. Die Regulationsprozesse, die die Expression und somit die Funktion der miRNA verändern, wurden in Kapitel 5.2.3. erläutert.

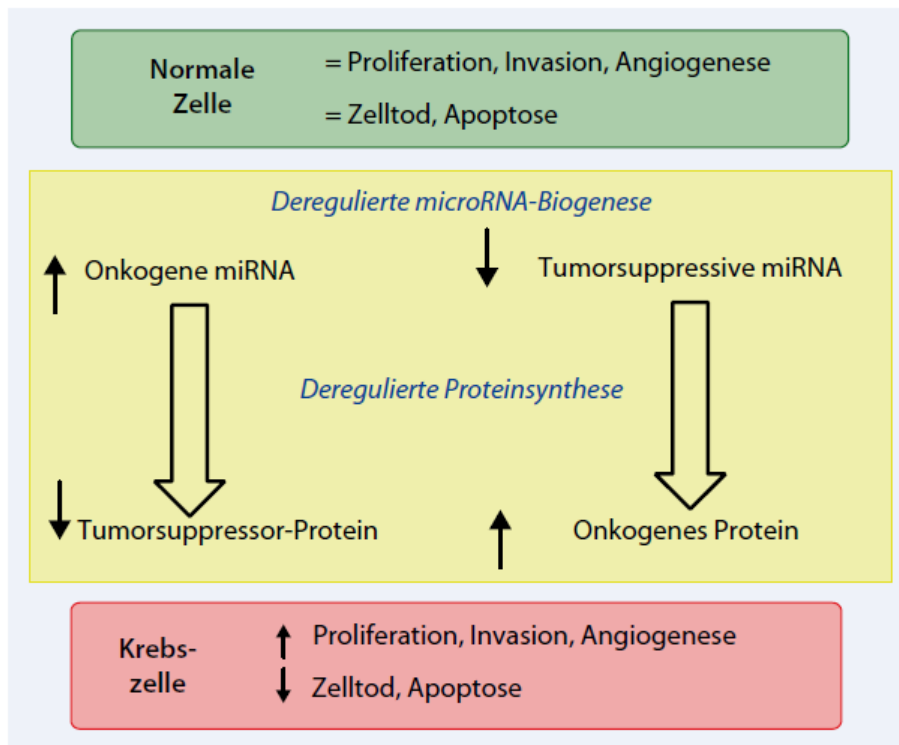
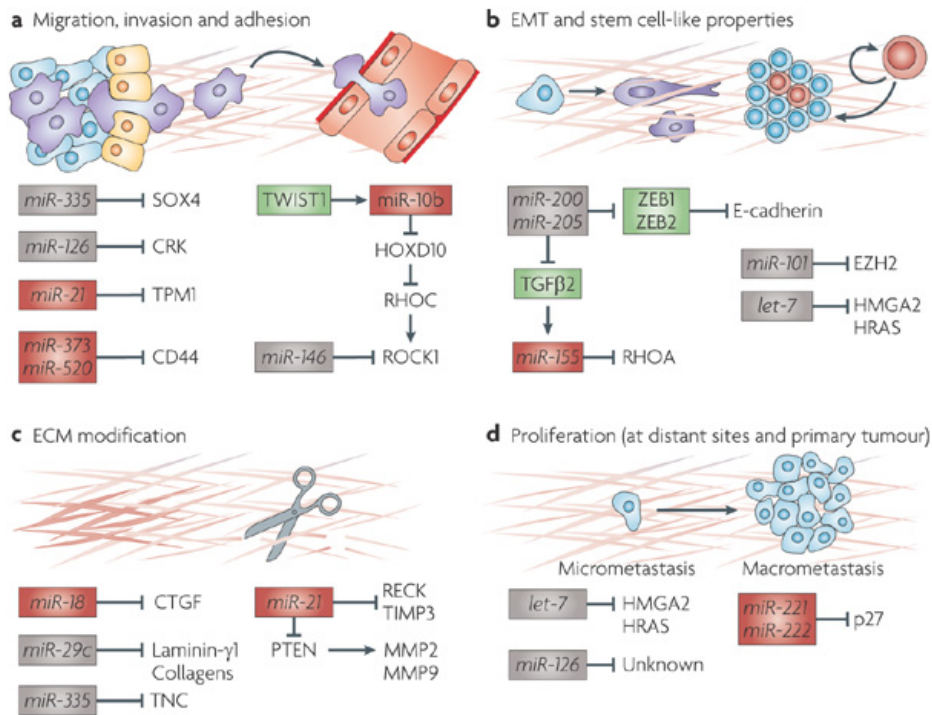


Abbildung 12: Bedeutung der miRNAs für die Tumorgenese⁹⁵

Neben der Beeinflussung der Tumorentstehung regulieren miRNAs auch die Tumorprogression über verschiedene Wege. In Abb. 13 werden die vier wichtigsten aufgeführt.

Zum einen regulieren miRNAs Prozesse wie Migration, Invasion und Adhäsion. Die Migrationsfähigkeit wird durch Lockerung der Verankerungsmechanismen der Zelle erreicht (Abb. 13a). Dies geschieht einerseits durch Auflockerung der extrazellulären Matrix, beispielsweise durch Unterdrückung von CD44 bei erhöhter Expression der miR-373 und miR-520. Andererseits wird durch Hemmung des CRK-Adapters wie etwa bei Verlust der miR-126 das Aktingerüst aufgelöst. Auch die Regulierung von Matrixmetalloproteinasen (MMPs) durch miRNAs, die eine Erhöhung von prometastatischen Matrixproteinen wie Laminin γ 1, Kollagene und Tenascin bewirken, trägt unter anderem zur Remodellierung der extrazellulären Matrix und somit zur Migration und Invasionsfähigkeit der Zelle bei (Abb. 13c). Die Regulation von ROCK 1 durch Verlust der miR-146 beeinflusst pro-migratorische Signale, die Stimulation der miR-10b-5p durch TWIST fördert die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) und begünstigt dadurch ebenfalls die Migration (Abb. 13a). Die EMT sowie das Erlangen von Stammzeleigenschaften werden bei Verlust von let-7 durch Hemmung von H-RAS und HMGA2 sowie bei Verlust der miR-101 durch Hemmung von EZH2 beeinflusst (Abb. 13b). Dadurch erlangt die Zelle die Fähigkeit zur Zellwanderung und zur unbegrenzten Zellteilung, was die Metastasenentstehung und Schwierigkeit den Karzinomprogress aufzuhalten, erklärt. Die Proliferation im Primärtumor und in Fernmetastasen wird ebenfalls

durch Verlust der let-7-Familie mit Hemmung von HMGA2 und HRAS beschrieben. Ebenso trägt eine erhöhte Expression der miR-221 und miR-222 sowie die Hemmung von p27 zur Metastasierung bei (Abb. 13c)⁸⁵.



Nature Reviews | Cancer

Abbildung 13: Funktion der miRNAs für die Entstehung und Progression von Tumoren⁸⁵

Das Expressionsmuster der miRNA ist gewebe- und tumorspezifisch⁸⁵ und korreliert mit klinischen und biologischen Eigenschaften von verschiedenen Tumoren einschließlich ihres Wachstums, ihres Metastasierungsverhaltens sowie ihres Ansprechens auf Therapie⁴⁵.

In Tab. 10 sind die im Kapitel erwähnten miRNAs mit einer Auswahl ihrer Targets und ihrer zugehörigen Tumorentität dargestellt.

Tabelle 10: Auswahl an miRNAs mit ihren Targets und zugehörigen Tumorentitäten^{23,35,85}

miRNA	Target	Tumorentität
miR-373	CD44	Seminom, Nicht-Seminom, Mammakarzinom
miR-520	CD44	Mammakarzinom
miR-126	CRK1, PIK3R2, SPRED1, VCAM1	Mammakarzinom, Lungenkarzinom
miR-146	ROCK1, IRAK1, TRAF6	Hormonrefraktäres Prostatakarzinom, papilläres Schilddrüsenkarzinom

miR-10b	HOXD10	Mammakarzinom
let-7-family	HMGA2, HRAS, KRAS, NRAS	Lungenkarzinom, Mammakarzinom
miR-101	EZH2	Prostata-,Lungen-, Mamma-, Ovarial- und Kolonkarzinom
miR-221/222	p27, CDKN1C/p57, PUMA	Pankreas-, Mamma-, Lungen-, Leberzellkarzinom, Glioblastom

5.2.5. Bedeutung von miRNAs beim Nierenzellkarzinom

In verschiedenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass miRNAs eine große Bedeutung für die Entstehung und Progression des NZKs haben.

Zum einen wurden in einigen Arbeiten die Expressionsunterschiede verschiedener miRNAs in sowohl benignen Nierentumoren wie dem Onkozytom, als auch in malignen Tumoren der Niere wie dem kzNZK festgestellt. Je nach miRNA lag sowohl eine erniedrigte, als auch eine erhöhte Expression im Tumorgewebe gegenüber dem Normalgewebe vor³¹.

Darüberhinaus wurden die Auswirkungen des Expressionsmusters auf das Tumorverhalten und das Überleben des Patienten betrachtet. In aktuellen Studien wurde die inverse Korrelation zwischen erhöhter Expression einzelner miRNAs und der Proliferation, Migration und Invasion des kzNZK beschrieben. Bei erniedrigter Expression konnte die Förderung dieser Prozesse festgestellt werden^{70,87,88}. In weiteren Arbeiten wurde eine signifikant höhere Expression von miRNAs im Patientenserum mit NZK im Vergleich zu Probanden ohne NZK festgestellt. Auch postoperativ zeigte sich eine geringere Konzentration im Vergleich zu präoperativ¹¹⁸.

Zum anderen gibt es für die zweit- und dritthäufigsten Subtypen des NZKs, dem papillären und chromophoben Typ Daten, die eine unterschiedliche Expression von verschiedenen miRNAs im Tumorgewebe verglichen zum Normalgewebe zeigen. Ebenso besteht auch in diesen Tumorentitäten eine Korrelation zur Prognose der Patienten^{37,48}.

Außerdem konnten signifikante Expressionsunterschiede einer miRNA-Signatur in den drei verschiedenen Subtypen, chromophob, papillär und klarzellig sowie dem benignen Onkozytom dargelegt werden¹¹⁵.

Zudem wurden für einige miRNAs eine erniedrigte Expression im metastasierten Primärtumorgewebe gegenüber nicht metastasiertem und Normalgewebe beschrieben⁴⁵. Weiter konnte bei Vergleich der verschiedenen Tumorstadien eine signifikant geringere Konzentration in den Stadien III/IV gegenüber den Stadien I/II dargestellt werden. Außerdem bestätigte sich eine Korrelation zum Gesamtüberleben⁵⁶.

Die Arbeit von Heinzemann et al. diente als Vorarbeit für diese Dissertation. Hier wurde die miRNA-Expression in metastasierten Primärtumoren im Vergleich zu der miRNA-Expression in nicht metastasierten Primärtumoren sowie in Fernmetastasen analysiert. Eine Signatur von 14 miRNAs konnte identifiziert werden, 13 miRNAs waren in metastasierten Primärtumoren und Lungenmetastasen erniedrigt exprimiert, eine miRNA, miR-1246 lag in geringer Konzentration im nicht-metastasierten Primärtumor vor⁴⁵. Die folgende *miRNA microarray heatmap* (Abb.14) stellt die statistisch signifikant unterschiedlich exprimierten miRNAs in den untersuchten Gewebearten dar.

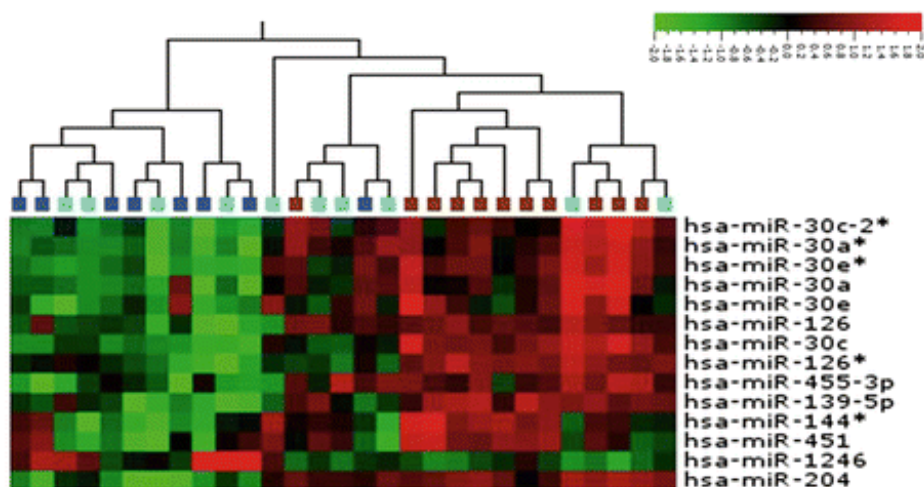


Abbildung 14: Microarray Heatmap: Expressionsmuster der 14 differentiell exprimierten miRNAs in nicht metastasierten und metastasierten Primärtumoren sowie in Lungenmetastasen⁴⁵.

Die nicht metastasierten Primärtumore sind braun, die metastasierten hellblau und die Lungenmetastasen dunkelblau gekennzeichnet. Eine geringe Konzentration der miRNAs ist durch grün, eine erhöhte Konzentration durch rot dargestellt. Bis auf miR-1246 liegen diese miRNAs in metastasiertem Gewebe in geringerer Konzentration vor.

Die meisten Arbeiten, die sich mit der Bedeutung der miRNAs im NZK beschäftigen, basieren auf Microarray-Analysen und Validierungen in kleinen Probenzahlen mittels qRT-PCR. Validierungen der Ergebnisse der identifizierten miRNAs an einem größeren Patientenpool liegen nur wenige vor. Da miRNAs jedoch einen bedeutenden Einfluss auf die Tumorgenese zu haben scheinen, sollten weitere Arbeiten -so auch diese- zur Bestätigung der Ergebnisse aufgenommen werden.

6. Zielsetzung

Das NZK ist der Tumor mit der höchsten Letalität des Urogenitalsystems. Ist ein kuratives Therapiekonzept möglich, besteht eine 5-Jahres Überlebensrate von 76%. Liegen jedoch Metastasen vor, ergibt sich eine 5-Jahres-Überlebensrate von nur ca. 10%. Daher ist es essentiell, bereits zu einem frühen Zeitpunkt das Metastasierungsrisiko sicher vorherzusagen, um frühzeitig der Metastasenbildung durch adjuvante Therapiekonzepte entgegenzuwirken oder diese durch entsprechend engmaschige Nachsorgekonzepte frühzeitig zu erkennen.

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe wurden 14 miRNAs identifiziert, die signifikant mit der Metastasierung des kzNZKs assoziiert waren. Das Ziel dieser Dissertation war es, an einem unabhängigen größeren Patientenkollektiv die prognostische Wertigkeit von zwei der in den Vorarbeiten identifizierten miRNAs, miRNA-30a-3p und miRNA-10b-5p, zu validieren. In einem zweiten Teil galt es, basierend auf Vorarbeiten, den direkten Einfluss der miR-30a-3p auf potentielle miRNA-Targets durch Western Blot Analysen zu überprüfen. Dabei sollten die folgenden Fragestellungen beantwortet werden:

1. Sind signifikante Expressionsunterschiede der miR-30a-3p und miR-10b-5p im metastasierten kzNZK im Vergleich zum nicht metastasierten kzNZK nachweisbar?
2. Kann eine Vorhersage bezüglich des metastasierungsfreien und Gesamt- Überlebens anhand des Expressionslevels der beiden miRNAs getroffen werden?
3. Welche Target-Proteine werden von miR-30a-3p beeinflusst und inwieweit können Rückschlüsse auf regulierte Metastasierungsprozesse des NZKs gezogen werden?

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen als Teil eines großen Projekts zusammen mit Arbeiten weiterer miRNAs Voraussetzungen dafür schaffen, eine zuverlässige Vorhersage des individuellen Metastasierungsrisikos mithilfe einer miRNA-Signatur treffen zu können. Durch frühzeitige Selektion der Patienten mit schlechter Prognose soll es möglich sein, individuell eine engmaschige Nachsorge durchzuführen und eventuell adjuvante Therapiekonzepte anzuwenden und die Überlebenswahrscheinlichkeit hierdurch zu verbessern. Der zweite Teil der Arbeit kann Voraussetzungen für die Entwicklung neuer Therapieansätze durch die Identifizierung relevanter Signalwege schaffen.

7. Material und Methoden

7.1. Geräte und Programme

Luna™ Automated Cell Counter	Logo Biosystems; San Francisco; USA
NanoDrop™ Spektrophotometer ND-1000	NanoDrop Technologies; Wilmington; USA
REST 2008 Software	M.W. Pfaffl; München; Deutschland
StepOnePlus™ qPCR System	Applied Biosystems; Foster City; USA
Typhoon 9410 Western Blot Scanner	HealthCare GmbH; Freiburg; Deutschland
Software ImageJ 1.48v	NIH; Bethesda; USA

7.2. Chemikalien und Kitsysteme

7.2.1. Gesamt-RNA-Isolierung, qRT-PCR

Ethanol 96%	Sigma-Aldrich; St.Louis; USA
miRNeasy FFPE Kit	Qiagen; Hilden; Deutschland
miRNeasy Mini Isolationskit	Qiagen; Hilden; Deutschland
Nukleasefreies H ₂ O	Qiagen; Hilden; Deutschland
TaqMan® Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems; Foster City; USA
TaqMan® MicroRNA Assay	Applied Biosystems; Foster City; USA
TaqMan® MicroRNA	Applied Biosystems; Foster City; USA
Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems; Foster City; USA
TaqMan® qPCR Primer	Applied Biosystems; Foster City; USA
Xylool	Zentrales Chemikalienlager UdS

7.2.2. Zellkultur

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich; St.Louis; USA
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Sigma-Aldrich; St.Louis; USA
Fetales Kälberserum (FKS)	Sigma-Aldrich; St.Louis; USA
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Sigma-Aldrich; St.Louis; USA
Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI)	Sigma-Aldrich; St.Louis; USA

Trypsin	Sigma-Aldrich; St.Louis; USA
Trypanblau	Sigma-Aldrich; St.Louis; USA

7.2.3. Transfektion

DharmaFECT 2 TransfectionReagent	Dharmacon™ GElifesciences
OptiMEM®	Life Technologies; USA
Syn-hsa-miR-30a-3p miScript miRNA	Promega Corporation, Fitchburg, WI, USA
GoScript™ 5x Reaktionspuffer	Promega Corporation, Fitchburg, WI, USA
MgCl ₂ (1,5-5,0 mM)	Promega Corporation, Fitchburg, WI, USA
PCR Nukleotidmix	Promega Corporation, Fitchburg, WI, USA
RekombinatesRNasin®Ribonuklease Inhibitor	Promega Corporation, Fitchburg, WI, USA
GoScript™ ReverseTranskriptase	Promega Corporation, Fitchburg, WI, USA
GoTaq®qPCR Master Mix	Promega Corporation, Fitchburg, WI, USA
Primer forward&reverse Cofilin 1, Cofilin 2, NDKB, Referenz GAPDH	Promega Corporation, Fitchburg, WI, USA
CXR Reference Dye	Promega Corporation, Fitchburg, WI, USA

7.3. Puffer und Lösungen zum Proteinnachweis

7.3.1. Zellernte

CHAPS Lysepuffer	Tris (pH=7,5)	50 mM	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
	NaCl	150 mM	
	MgCl ₂	1 mM	
	CHAPS	2% (m/v)	
Protease Inhibitor	100x		SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland

7.3.2. SDS-PAGE

4x Trenngelpuffer	Tris (pH= 8,8)	1,5 M	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
4x Sammelgelpuffer	Tris (pH = 6,8)	0,5 M	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
10x Laufpuffer	Tris	250 mM	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
	Glycin	1,92 M	
	SDS	0,1%	
6x Probenpuffer (reduzierend)	Glycerin	30%	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
	SDS	1%	
	Dithiotriol (DTT)	600 mM	
	Bromphenolblau	1 Spatelspitze	
Mit 4x Trenngelpuffer auf Endvolumen auffüllen			
6x Probenpuffer (nicht reduzierend)	Glycerin	30%	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
	SDS	1%	
	Bromphenolblau	1x Spatelspitze	
	Mit 4x Trenngelpuffer auf Endvolumen auffüllen		
Acrylamid/Bisacrylamid (A/B)	Acrylamide/Bis Solution, 37 5:1		SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
10% APS	Amoniumpersulfat 10% (m/v)		SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
TEMED	N,N,N'N'-Tetramethyl- ethylenediamine		SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Proteinstandard	Dual Color Protein Standard III		SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland

7.3.3. Western Blot

Transferpuffer	Tris	48 mM	Cell Signaling Technology; Danvers; USA
	Glycin	39 mM	
	Methanol	15% (v/v)	
	SDS	0,01%	

7.3.4. Immundetektion

10x TBS-Tween	Tris	248 mM	Cell Signaling Technology; Danvers; USA
	NaCl	1,37 M	
	Tween 20 (pH = 7,6)	1% (v/v)	
BSA-Blocklösung	TBS-Tween	1x	Cell Signaling Technology; Danvers; USA
	BSA	5%	
Antikörper	Cofilin(D3F9) XP™ RabbitmAb		Cell Signaling Technology; Danvers; USA
	GAPDH (14C10) RabbitmAb		Cell Signaling Technology; Danvers; USA
	NDK (D18F10) RabbitmAb		Cell Signaling Technology; Danvers; USA
	Vinculin(E1E9V) XP® RabbitmAb		Cell Signaling Technology; Danvers; USA
	Galectin-1(D608T) RabbitmAb		Cell Signaling Technology; Danvers; USA
	α-Rabbit-IgG-Alexa488		Dianova GmbH; Hamburg, Deutschland

7.4. Biologische Materialien

Zur Verwendung der Gewebeproben lag von den Patienten der Kliniken für Urologie und Kinderurologie des Universitätsklinikums Saarland und des Universitätsklinikums Jena eine entsprechende Einverständniserklärung vor. Es wurden nur kzNZK verwendet. Für den Probenanteil des normalen Nierengewebes musste ein Sicherheitsabstand zum Tumorgewebe von mindestens 2 cm gewährleistet werden. Die TNM-Klassifikation erfolgte nach WHO-Klassifikation 2004. Die Patienten, die primär nicht metastasiert waren, wurden mindestens 5 Jahre nachbeobachtet. Die wesentlichen Charakteristika des Patientenkollektivs sind in Tab. 11 dargestellt.

Tabelle 11: Charakteristika des Patientenkollektivs

Gesamtzahl Patienten	92
Alter (in Jahren) Mittelwert/Median (Verteilung)	61/62 (38-82)
Geschlecht (m/w)	65/28
T-Stadium T1 T2 T3 T4	50 9 30 3
Tumorgröße (in cm) Mittelwert/Median (Verteilung)	5,9/5,2 (0,7-13,5)
Grading (nach Fuhrman) G1 G2 G3 G4	7 69 13 1
Metastasen (ja/nein)	48/44
Tod (ja/nein)	22/70
Nachbeobachtungszeitraum (in Monaten) Mittelwert/Median (Verteilung)	49/52 (0-126)

7.5. Gewebeaufarbeitung

Von den FFPE-Proben wurden HE-Schnitte angefertigt. Mikroskopisch wurden die Bereiche festgestellt, die einen Tumoranteil > 85 %, wenig Gefäßanschnitte und keine Nekroseanteile enthielten und markiert. Anschließend wurden von dem Paraffinblock 10 Schnitte à 7 µm mit dem Mikrotom geschnitten, die ausgewählten Bereiche makrodisseziert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Von diesem Material ausgehend erfolgte die Isolierung der RNA.

7.6. Isolierung der RNA

Zu den FFPE-Gewebeproben wurde zunächst 1 ml 99,9%iges Ethanol hinzugefügt, um das überflüssige H₂O zu entfernen. Nach 10 s Durchmischen und 2 min Zentrifugieren bei 12000 g wurde der ethanolhaltige Überstand mit einer 10 µl Pipette entfernt. Im nächsten Schritt wurde 1 ml Xylol hinzugegeben, um nun das Paraffin aufzulösen. Der Überstand wurde nach 10 s Durchmischen und 2 min Zentrifugieren bei 12000 g mit einer 10 µl Pipette entfernt. Um das Xylol komplett zu entfernen, wurde das gleiche Verfahren nochmals mit 99,9%igem Ethanol durchgeführt. Nun wurde das vorbereitete Gewebe für 10 min bei 37°C erhitzt. War der Rest des Alkohols verdampft und das Gewebe trocken, wurden nach den Herstellerangaben des *miRNeasy FFPE Kit (Qiagen)* 240 µl *Buffer PKD* sowie 10 µl Proteinase K hinzugegeben, um die im Gewebe enthaltenen Proteine zu zerstören. Zur Aktivierung der Proteinase K wurde die Probe nach dem Durchmischen zunächst für 15 min bei 56°C, dann für 15 min bei 80°C inkubiert. Es ist zu beachten, dass die Probe erst nach vollständigem Aufheizen in das Heizgerät gestellt wurde. Anschließend wurde die Probe für 3 min auf Eis gegeben und anschließend für 15 min bei 20000 g zentrifugiert. Aus dem daraus resultierenden Überstand wurden 250 µl in ein 5 ml Reaktionsgefäß überführt. Es folgte die Zugabe von 25 µl *DNase Booster Buffer* und 10 µl DNase. Dies diente der Zersetzung der DNA des Gewebes. Nach vorsichtigem Vermischen inkubierte die Probe bei Raumtemperatur für 10 min. Im Anschluss wurden 500 µl des *RBC Buffers* hinzugefügt, wodurch die hydrophilen Bindungen zwischen H₂O und RNA aufgelöst wurden. Im nächsten Schritt wurden 1750 µl 99,9%iges Ethanol hinzugegeben und gründlich vermischt. Danach wurden 700 µl der Lösung auf spezielle Filter gegeben und bei 8000 g für 15 s zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Der Vorgang wurde wiederholt bis die gesamte Probe filtriert war. Anschließend folgten zwei Waschschrte mit 500 µl RPE Puffer. Im ersten Waschgang wurde der Filter mit 15 s bei 8000 g zentrifugiert, im zweiten für 2 min bei 8000 g. Das Filtrat wurde jeweils verworfen. Anschließend wurde die gebundene Gesamt-RNA durch 14-30 µl RNase freies H₂O durch maximale Zentrifugation (12000 g) für 1 min

eluiert. Das Eluat mit der enthaltenen RNA wurde bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C aufbewahrt.

Die Konzentration der RNA und die Reinheit der Probe wurden mittels Spektrophotometer (*Nanodrop™ Spektrophotometer ND-1000, NanoDrop Technologies, Wilmington, USA*) gemessen. Dies erfolgt durch Bestimmung verschiedener Wellenlängen. Die Konzentration der RNA wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Die Verunreinigung durch Proteine wurde durch die Absorption bei Wellenlängen von 280 nm gemessen, die Verunreinigung durch Lösungsmittel bei 230 nm. Zur Eignung der Probe wurde das Verhältnis zwischen der Konzentration der RNA und der Verunreinigung betrachtet. Lag das 260/280 Verhältnis zwischen 1,5 und 2,1 sowie das 260/230 Verhältnis über 1, konnte die Probe weiterverwendet werden.

7.7. MiRNA-Expressionsanalyse

7.7.1. Reverse Transkription

Die miRNA-Expressionsanalyse wurde mittels quantitativer Polymerase-Ketten-Reaktion (qPCR) durchgeführt. Es musste zunächst eine Umschreibung von RNA in cDNA durch Reverse Transkription (RT) erfolgen. Ein miRNA-spezifischer, *stem-loop Reverse-Transkriptase Primer* hybridisiert mit der Target-Sequenz der miRNA. In dieser Arbeit wurde die Expression von miR-30a-3p und miR-10b-5p untersucht. Dafür stand das *TaqMan® Reverse Transcriptions Kit (Applied Biosystem)* zur Verfügung. Für die Durchführung der RT wurden pro Ansatz 7 µl Mastermix plus 5 µl Probe sowie 3 µl des Primer-Pools angesetzt. Der Primer-Pool bestand aus dem Primer der miR-10b-5p, der miR-30a-3p sowie der Referenz-RNU48. Da die Konzentration pro RT-Primer das 0,05 fache des Gesamtvolumens des Primer-Pools betragen sollte, wurden bei einer Gesamtmenge von 200 µl 2 µl Primer verwendet, die mit 194 µl H₂O aufgefüllt wurden. Als Referenzwert wurde stets RNU48 mitgeführt, da sie in Nierengewebe konstant exprimiert wird¹⁴.

Der Mastermix wurde aus nukleasefreiem H₂O, Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs), Reverse Transkriptase (RT) Puffer, RNase Inhibitor und *Multiscribe RT* hergestellt.

In Tab. 12 sind die einzelnen Komponenten des Mastermixes mit Mengenangaben für einen Reaktionsansatz aufgeführt.

Tabelle 12: Komponenten des RT-Mastermixes und die jeweiligen Konzentrationsangaben pro Ansatz

Komponente	Volumen in $\mu\text{l}/15 \mu\text{l}$ Reaktion
100 mM dNTPs (mit dTTP)	0,15
MultiScribeReverseTranskriptase (50 U/ μl)	1,00
10x Reverse TranskriptionsBuffer	1,50
RNAse Inhibitor 20 U/ μl	0,19
Nucleasefreies H ₂ O	4,16
Total	7,00

In 0,2 ml Reaktionsgefäße wurden dann 5 μl Probe, 7 μl Mastermix und 3 μl der Gesamt-RNA (33,3 ng/ μl) gegeben. Das Gesamtvolumen für die Reverse Transkription betrug demnach 15 μl . Nach gründlichem Durchmischen, Zentrifugieren und 5 min Inkubation auf Eis erfolgte die RT in einem Thermocycler (Uno II, Biometra®). Das Temperatur/Zeit-Programm ist in der Tab. 13 zusammengefasst.

Tabelle 13: Temperatur/Zeit-Programm für Reverse Transkription

Schritt	Zeit (min)	T°C
Primerhybridisierung	30	16
Elongation	30	42
Denaturierung	5	85
Ende/Konservierung	∞	4

7.7.2. Amplifikation

Nach Umwandlung der RNA in cDNA wurde im nächsten Schritt die Quantifizierung mittels Real Time qPCR durchgeführt. Die Methode der Real Time qPCR erfolgte nach dem TaqMan Prinzip. Zur Reaktion wurden eine *TaqMan*-Sonde, die sich an die zu analysierende Stelle der cDNA anlagert, sowie die *TaqDNA* Polymerase benötigt. Die *TaqMan*-Sonde besteht aus einem fluoreszenzmarkierten 5'Ende, der Fluoreszenzfarbstoff wird als Reporter bezeichnet. Er emittiert Licht einer bestimmten Wellenlänge, die jedoch vom Quencher am 3'Ende der Sonde absorbiert wird. Nach Spaltung der Sonde durch die 5'Endonukleaseaktivität der *TaqDNA* Polymerase kommt es zur Trennung von Reporter und Quencher, so dass das Licht ohne Absorption vom Reporter emittiert werden kann. Je mehr DNA synthetisiert wird, desto mehr Reporter-Moleküle werden freigesetzt und umso stärker ist das Signal. Das Prinzip der Real Time qPCR nach dem TaqMan Prinzip ist in Abb. 15 veranschaulicht.

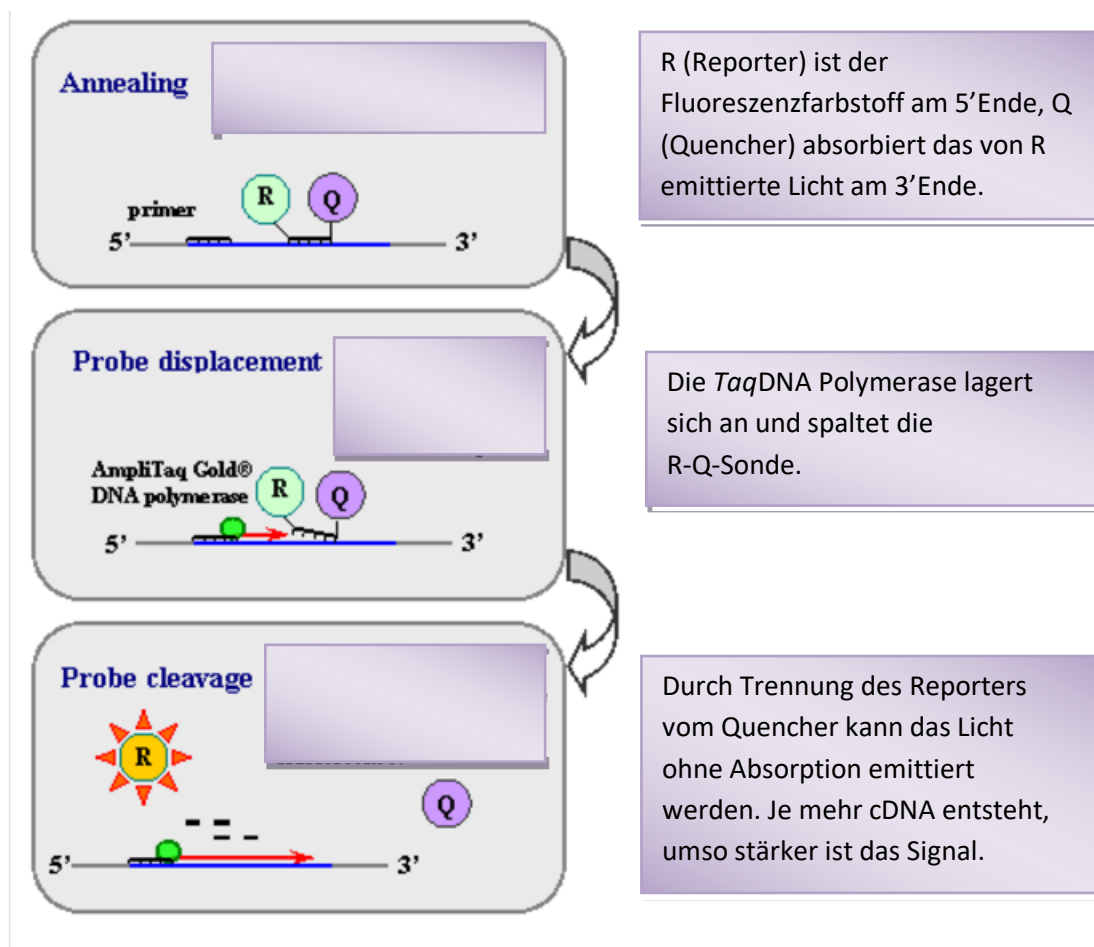


Abbildung 15: Das Prinzip der Real-Time qRT-PCR in Teilschritten⁸³

Zur Durchführung der qPCR wurde ein PCR-Masteransatz aus dem *TaqMan MicroRNA Assay Primer*, einem *TaqMan Gene Expression Mastermix* sowie H₂O angefertigt. Die Mengenangaben der einzelnen Komponenten im PCR-Mastermix Ansatz sind in Tab. 14 aufgeführt. In je einem Well einer 96-Well-Platte wurden 1 µl der cDNA und 9 µl des PCR-Mastermix hinzugegeben. Die Probe wurde dabei in 3 technischen Replikaten analysiert. Weiterhin wurde eine Kontrolle bestehend aus 1 µl H₂O und 9 µl PCR-Masteransatz mitgeführt. Nach Zentrifugation von 1 min bei 218 g wurde die 96-Well Platte in das *StepOnePlus™ System (Applied Biosystems)* eingebracht und in diesem die eigentliche qPCR durchgeführt. In Tab. 15 sind deren Teilschritte mit der jeweiligen Zeitdauer angegeben.

Tabelle 14: Komponenten des PCR-Mastermixes mit den jeweiligen Konzentrationsangaben

Komponente	Volumen in 10 µl Reaktion
TaqMan MiRNA Assay Primer (20x)	0,5 µl
TaqMan Gene Mastermix	5,0 µl
Nukleasefreies H ₂ O	3,5 µl
Total	9 µl

Tabelle 15: Zeit-Temperatur-Programm für die Amplifikation der cDNA

Schritt	Zeit	T in °C
Enzymaktivierung	10 min	95
Denaturierung (40 Zyklen)	15 s	95
Annealing+Extension (40 Zyklen)	60 s	60

Zur quantitativen Auswertung betrachtet man den ct-Punkt (*cycle threshold*). Der ct-Punkt ist der PCR-Zyklus, bei dem sich das Fluoreszenzsignal deutlich von der Hintergrundfluoreszenz unterscheidet. Man orientierte sich dabei an der für jede miRNA festgelegten *threshold* Linie. Befindet sich eine geringe Menge an miRNA in der Probe, benötigt es mehr Amplifikationszyklen bis sich das Fluoreszenzsignal vom Hintergrund abhebt, der ct-Punkt ist entsprechend größer. Enthält die Probe bereits viel miRNA, sind

weniger Amplifikationen für eine Detektion notwendig, der ct-Punkt ist kleiner. In der Abb. 16 ist der *Amplification Plot* einer qRT-PCR-Analyse schematisch dargestellt.

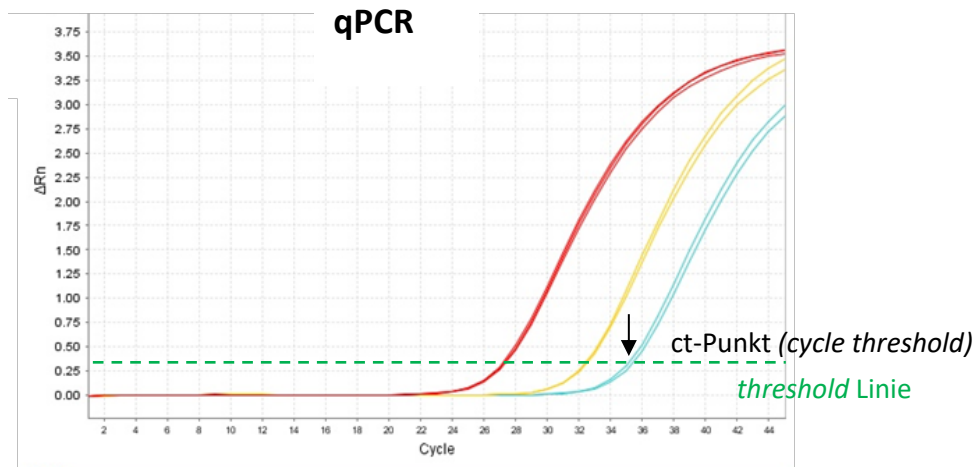


Abbildung 16: Kurvendiagramm zur Auswertung der PCR-Analyse. Auf der x-Achse sind die Anzahl der Amplifikationszyklen angegeben, auf der y-Achse die Stärke des Fluoreszenzsignals. Die drei Kurven stellen beispielhaft drei Proben unterschiedlicher Gewebeart mit unterschiedlichen ct-Punkten und somit unterschiedlichen Konzentrationen der cDNA dar. Die gestrichelte grüne Linie, die *threshold*-Linie, wurde für die jeweiligen miRNAs, miR30a-3p, miR-10b-5p und miRNU48 individuell festgelegt. Der *threshold* für die miR-30a-3p wurde mit 0,3, für miR-10b-5p mit 0,2 und für miRNU48 mit 0,25 bestimmt. In dieser Abb. ist beispielhaft die *threshold*-Linie für die miR30a-3p dargestellt.

7.7.3. Bestimmung der PCR-Effizienzen

Für eine valide Auswertung der Konzentrationsunterschiede der miRNAs werden die Effizienzen der beiden miRNAs benötigt. Effizienzen stehen für die Vervielfältigung der DNA pro Zyklus. Zur Bestimmung wurde eine Verdünnungsreihe (1:1, 1:10 und 1:100) angefertigt, mit qRT-PCR analysiert und mittels REST-Software ausgewertet. Bei optimalen Reaktionsbedingungen und -abläufen würde die Amplifikationseffizienz der PCR-Reaktion 2 betragen (also eine genaue Verdopplung der cDNA pro Zyklus).

7.8. Validierung der Targetproteine

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe wurden durch 2D-Gelelektrophorese und Massenspektrometrie Targetproteine der miR-30a-3p identifiziert (siehe Abb. 17).

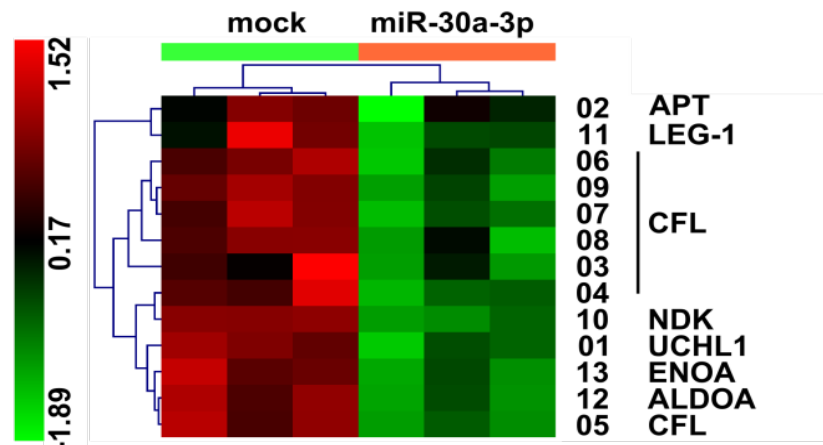


Abbildung 17: Ergebnisse der Massenspektrometrie zur Targetidentifizierung der miR-30a-3p in Form einer Heatmap

In dieser Arbeit sollte nun die Validierung der Targetproteine, vor allem des Cofilins, mittels Western Blot Analyse erfolgen. Dabei wurden zunächst die Zellen der Zelllinie 786-0 kultiviert, anschließend mit einer synthetischen miR-30a-3p transfiziert und schließlich über Western Blot analysiert, inwieweit die Proteine durch Erhöhung der intrazellulären miRNA-Konzentration beeinflusst werden. Die einzelnen Schritte werden in den folgenden Kapiteln erläutert.

3.8.1. Zellkultur

3.8.1.1. Kultivieren der Zellen

Zunächst wurde die Zelllinie 786-O, eine Zelllinie eines metastasierten kZNZKs, kultiviert und vervielfältigt (siehe Abb. 18). Bei der Zelllinie 786-O handelt es sich um epitheliale adhären wachsende Zellen, die eine Verdopplungszeit von 45 h aufweisen und gut für Transfektionen geeignet sind¹¹⁰.

Dabei wurden 500 ml Nährmedium aus 225 ml *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), 225 ml *Roswell Park Memorial Institute Medium* (RPMI) und 50 ml *Fetalem Kälberserum* (FKS 10 %) angesetzt, davon 5 ml in eine 25 cm²-Zellkulturflasche gefüllt und die Zellen der

Zelllinie 786-O hinzugefügt. Die Kultivierung erfolgte -wie alle nachfolgenden- bei 37°C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂. Zur optimalen Kultivierung wurden die Zellen alle 2-3 Tage passagiert. Der Zustand der Zellen wurde stets per Mikroskop kontrolliert (siehe Abb. 18).

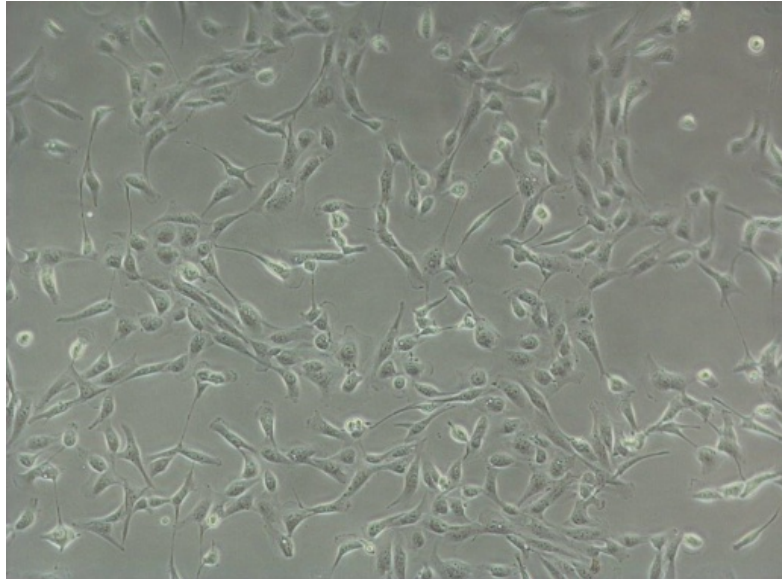


Abbildung 18: Kultivierte Zelllinie 786-O. Die Abbildung zeigt die Zelllinie 786-O nach Kultivierung in optimalem Umgebungsmilieu. Es sind sowohl einzelne Zellen als auch Zellen im Teilungsprozess zu erkennen.

7.8.1.2. Passagieren der Zellen

Im ersten Schritt wurde das Nährmedium abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen mit 2 ml PBS (Phosphatpufferter Salzlösung) zum Entfernen des Zellmediums gewaschen. Dabei war immer darauf zu achten, die Flüssigkeiten am Rand in die Kulturflasche zu geben, um so wenig wie möglich Zellschaden zu verursachen. Nun konnte nach Absaugen des PBSⁱ und Zellmediums das Ablösen der Zellen vom Flaschenboden durch die Zugabe von 0,5 ml Trypsin erfolgen. Um für das Trypsin optimale Bedingungen zu schaffen, wurde die Kulturflasche bei 37°C für 10 min inkubiert. Nach dem Ablösen wurden die Zellen in 5 ml Zellkulturmedium aufgenommen. Anschließend wurde die gesamte Zellsuspension in ein 10 ml Reaktionsgefäß überführt. Es folgte eine Zentrifugation für 3 min bei 218 g. Der Überstand wurde entfernt und erneut 2 ml Medium unter Resuspension hinzugegeben. Abhängig von der Dichte der Zellen und der anschließenden Kultivierungsdauer wurde eine 1:3 Verdünnung gewählt und somit 0,6 ml der Zelllösung in eine Kulturflasche mit 3,9 ml Medium hinzugefügt und im Brutschrank bis zum nächsten Passagieren der Zellen bei 37°C kultiviert.

7.8.1.3. Einfrieren der Zellen

Für spätere Analysen können die kultivierten Zellen durch Lagerung in flüssigen Stickstoff für einen längeren Zeitraum aufbewahrt werden. Dafür wurden die Zellen, wie auch bei der Zell-Passagierung, abtrypsiniert. Das gewonnene Zellpellet wurde mit 5 ml Kulturmedium resuspendiert und für 3 min. bei 218 g zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt. Das Zellpellet wurde zügig mit 2 ml Einfriermedium (DMEM inkl. 10 % FKS + 10 % DMSO) resuspendiert und in *Cryocaps* überführt. Danach wurden die *Cryocaps* im -80°C Gefrierschrank für mindestens 24 h und anschließend im Stickstofftank aufbewahrt.

7.8.1.4. Zählen der Zellen

Die Auszählung der Zellen erfolgte durch den *Luna™ Automated Cell Counter* (Logos Biosystems).

7.8.2. Transiente Transfektion

Im nächsten Schritt wurde synthetische miRNA-30a-3p in die Zellen transfiziert, um anschließend die durch Erhöhung der miRNA-Konzentration verursachten Veränderungen der Targetproteine zu detektieren.

Die transiente Transfektion fand in 6-Well-Platten statt. In jedes Well wurden 30.000 Zellen in 2 ml Zellkulturmedium gegeben. In drei Wells wurde die synthetische siRNA transfiziert (MIMIC), in den anderen drei Wells erfolgte keine Transfektion (MOCK). Die Durchführung fand stets in biologischen Triplikaten statt.

Für einen Reaktionsansatz wurde zunächst ein 500 µl Reaktionsgefäß mit 1 µl siRNA (Syn-hsa-miR-30a-3p miScript miRNA MIMIC 5nmol) und 199 µl des Transfektionsmediums *OptiMEM®* (*Life Technologies*) gegeben und für 5 min inkubiert. In zwei weitere 2 ml Reaktionsgefäße wurden jeweils 1 µl des Transfektionsreagenz' *DharmaFECT2 Transfection Reagent* (*Dharmacon™; GE lifesciences*) und 199 µl des Transfektionsmediums *OptiMEM®* (*Life Technologies*) hinzugefügt und ebenfalls für 5 min inkubiert. Nach 5 min wurde in das eine 2 ml Reagenzgefäß, welches als Kontrolle (MOCK) diente, 200 µl des Transfektionsmediums *OptiMEM®* (*Life Technologies*) gefüllt, um die gleiche Menge an Flüssigkeit herzustellen. In das andere 2 ml Reagenzgefäß wurde der Inhalt des 500 µl Reaktionsgefäßes mit der synthetischen miRNA (MIMIC) hinzugegeben. Nach 20 min Inkubationszeit wurde in beide Reaktionsgefäße jeweils 1600 µl Zellkulturmedium gegeben. Der Reaktionsansatz wurde für drei technische Replikate verdreifacht. Die Abb. 19 veranschaulicht den Vorgang mit Berücksichtigung der Triplikate.

Nach Absaugen des Zellkulturmediums in der 6 Well-Platte wurde in die drei oberen Wells der 6-Well-Platte jeweils 2 ml Transfektionsansatz mit miRNA-MIMIC hinzugefügt, in die drei unteren Wells jeweils 2 ml Transfektionsansatz ohne miRNA (MOCK). Innerhalb von 24 h erfolgte ein Medienwechsel mit unbehandeltem Kulturmedium, da das Transfektionsmedium einen zytotoxischen Effekt hat. Nach weiteren 48 h wurde mittels qRT-PCR beurteilt, ob die Transfektion erfolgreich war und - sofern dies der Fall war - die Proteinanalyse durchgeführt.

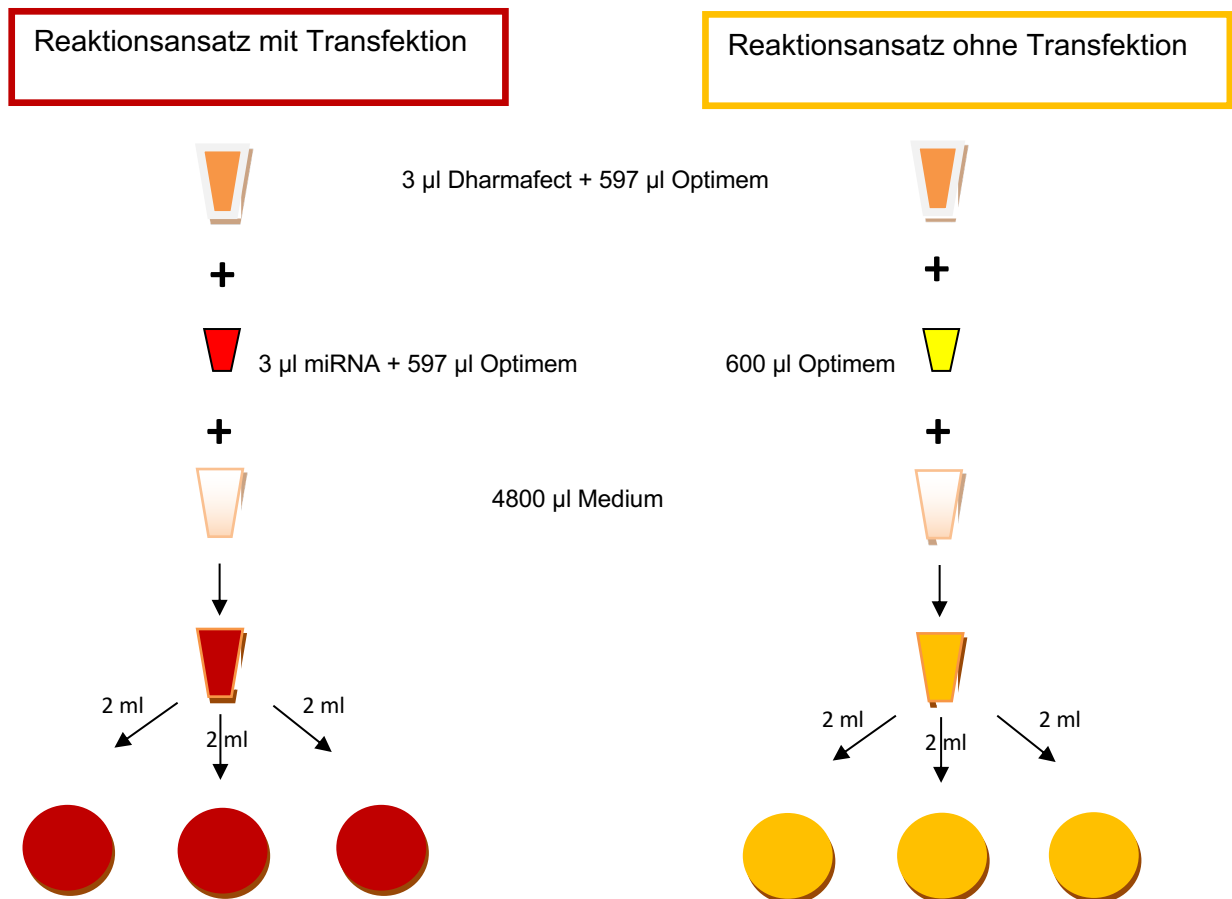


Abbildung 19: Reaktionsansatz in Triplikaten zur Transfektion der siRNA in die Zelllinie 786-O

7.8.2.1. Kontrolle der Transfektion

Zur Kontrolle einer erfolgreichen miRNA-Transfektion erfolgte nach 48 h Transfektionszeit einerseits eine Fluoreszenzmessung. Bei dieser Kontrollvariante wurde eine fluoreszenzmarkierte miRNA nach dem in Kapitel 7.8.2. geschilderten Procedere in die Zellen transfiziert und mit dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt, ob in den Zellen ein Fluoreszenzsignal messbar ist.

Zum anderen wurde durch RT-qPCR überprüft, ob die transfizierte miRNA in erhöhter Expression in den Zellen vorlag. Um festzustellen, wie viel miRNA (250 ng/µl verdünnt auf

100 µl) ausreichend ist, um einen signifikanten Expressionsunterschied in der qRT-PCR zu erfassen, wurden die 6 Wells mit 1 µl, 3 µl und 5 µl in Triplikaten angesetzt. Nach 48 h Transfektionszeit wurden die Zellen jedes Wells geerntet. Hierfür erfolgte das Absaugen des Mediums, das Waschen mit 1 ml PBS sowie die Hinzugabe von 500 µl Trypsin in jedes einzelne Well. Nach Inkubation bei 37°C für 5-10 min wurde durch Hinzufügen von 500 µl Medium die Reaktion des Trypsins gestoppt. Nach Zugabe von weiteren 500 µl Medium wurde die Zellsuspension jedes Wells in je ein Reaktionsgefäß gefüllt. Bei 218 g erfolgte die Zentrifugation der Reaktionsgefäße für 3 min. Anschließend wurde das Medium vorsichtig entfernt und mit PBS gewaschen. Nun fand die Isolierung der miRNA mittels *miRNeasyMinisolationkit (Qiagen)* statt. In die Reaktionsgefäße wurden zunächst je 700 µl *Qiazol Lysis Reagent* hinzugefügt, durchmischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Versetzen mit 140 µl Chloroform und 15 s Durchmischen wurde die Probe erneut bei Raumtemperatur für 2-3 min inkubiert und anschließend für 15 min bei 12000 g und 4°C zentrifugiert. Der 350 µl Überstand wurde in ein weiteres Reaktionsgefäß überführt und unter Resuspension mit 525 µl 100%-Ethanol versetzt. Daraus wurden 700 µl entnommen, in spezielle 2 ml Filter-Reaktionsgefäße gefüllt und bei 8000 g für 15 s zentrifugiert. Dieser Schritt wurde solange wiederholt, bis die Probe vollständig filtriert war. Nun wurde 700 µl *Buffer RWT* hinzugefügt und mit 8000 g für 15 s zentrifugiert. Der gleiche Vorgang erfolgte zweimal mit 500 µl *Buffer RPE* - erst für 15 s, dann für 2 min. Danach wurde der Filter in einem neuen Reaktionsgefäß für 1 min bei *fullspeed* (12000 g) zentrifugiert, um die restliche Flüssigkeit daraus zu entfernen. Im letzten Schritt wurden 30 µl RNase-freies H₂O hinzugefügt und für 1 min bei 8000 g zentrifugiert. Das Eluat inklusive der darin enthaltenen miRNA konnte für die qPCR-Analyse verwendet werden.

Nach Isolierung der miRNA erfolgte als Vorbereitung für die Quantifizierung mittels qPCR (siehe Kapitel 7.7.2.) die Umschreibung in cDNA mittels Reverser Transkription.

7.8.3. Vorbereiten der Zellen zur Targetanalyse

Für die 6 Well-Platte wurden 6 µl Protease und 600 µl Lysepuffer in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, durchmischt und auf Eis gestellt. Aus jedem Well wurde das Medium einzeln abgesaugt, mit 2 ml PBS gewaschen und mit je 100 µl der Protease-Lysepuffer-Suspension versetzt. Die Platte wurde auf Eis gestellt. Die Zellen in den 6 Wells wurden jeweils mit einem Spatel abgelöst, mit einer 200 µl Pipette aufgenommen und in ein vorgekühltes Reaktionsgefäß überführt.

7.8.4. Targetanalyse mittels Western Blot

7.8.4.1. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Im ersten Teilschritt erfolgte das Auftrennen der Proteine nach ihrem Molekulargewicht. Dafür wurde ein 1 Gefäß mit Trenngel (10 %) und 1 Gefäß mit Sammelgel (5 %) vorbereitet (siehe Tab. 16).

Tabelle 16: Rezeptur des Trenngels (10 %) und des Sammelgels (5 %).

Zutat	Trenngel (10 %)	Sammelgel (5 %)
30% A/B	3,30ml	420 µl
ddH ₂ O	4,00 ml	1,4 ml
TGP/SGP	2,50 ml	625 µl
10%SDS	100 µl	25 µl
TEMED	15 µl	3,75 µl
10% APS	60 µl	16 µl

Das Trenngel wurde dann zwischen zwei gründlich mit 70%-Ethanol gereinigten Glasplatten gefüllt und mit Isopropanol abgedichtet. Nach 15 min wurde dieses abgeschüttet, durch Sammelgel ersetzt und durch einen Taschenkamm abgeschlossen.

Die Zentrifugation der vorbereiteten Zelllysate (siehe Kapitel 7.8.3) fand für 7 min bei 20000 g und 4°C statt. Bei Verwendung von 10 µl Probe pro Gel wurden sie mit 6x Probenpuffer (siehe Chemikalienliste) versetzt und für 5 min auf 80°C erhitzt. In die Gelelektrophorese-Apparatur wurde 1x Laufpuffer (siehe Chemikalienliste) hinzugefügt und die Taschen mit den Zelllösungen sowie einem Kontrollmarker (Dual Color Protein Standard III) befüllt. Die Apparatur wurde mit den Elektroden verbunden, so dass ein elektrisches Feld entstand, welches eine Wanderung der Ionen ermöglichte.

7.8.4.2. Semi-DryBlot

Beim Semi-DryBlot erfolgte der Proteintransfer vom Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran. Das Gel wurde nach Elektrophorese für 10 min mit einem Transferpuffer (siehe Chemikalienliste) equilibriert. Die PVDF-Membran und das Filterpapier wurden für 15 min in Methanol aktiviert und ebenfalls im Transferpuffer equilibriert. Nach Equilibrieren wurden auf die Anode Filterpapier, Membran, Gel und nochmals Filterpapier möglichst ohne Luftblasen geschichtet und mit der Kathode abgedeckt. Das Stromversorgungsgerät wurde mit 2 mA/cm² für 30-60 min angeschlossen.

7.8.4.3. Immundetektion

Der Proteinnachweis erfolgte auf der PVDF-Membran über die Darstellung der Proteine mittels Antikörperreaktion und Fluoreszenzmessung. Zur Detektion ausgewählt wurden die Proteine Vinculin (75 kDa), Cofilin (19 kDa), NDK (16,18 kDa), Galektin (15 kDa) sowie GAPDH (37 kDa) als Referenzprotein. Nach dem Semi-DryBlot wurde die PVDF-Membran zugeschnitten und mit einer BSA-Blocklösung (siehe Chemikalienliste) versetzt. Durch Inkubation bei Raumtemperatur für 1 h erfolgte die Blockierung unspezifischer Proteinbindungsstellen. Daraufhin wurde die Membran mit den Primärantikörpern für die ausgewählten Proteine bei Raumtemperatur für 1 h inkubiert und gründlich mit TBS-Tween (siehe Chemikalienliste) gewaschen (3x5 min). Anschließend erfolgte das gleiche Procedere mit einem ebenfalls mit Blocklösung versetzten Sekundärantikörper (anti-Rabbit-IgG-AlexaG88). Mittels des *Typoon 9410 Scanners (Health Care GmbH; Freiburg; Deutschland)* wurden die Banden über Fluoreszenzmessung detektiert und quantifiziert.

7.8.5. mRNA-Expressionsanalyse in Bezug auf Cofilin

Zur Analyse der Expression des möglichen Zielgens Cofilin wurde das GoScript™ Reverse Transkriptions System verwendet, um zunächst die aus der Zelllinie gewonnene RNA in cDNA umzuschreiben. Dabei wurde ein RT-Reaktionsmix aus GoSkript™ Reaktionspuffer, MgCl₂, Nukleotid Mix, RNase Inhibitor, Reverse Transkriptase und nukleasefreiem H₂O angesetzt. Die Proben enthielten 500 ng Gesamt-RNA der Zelllinie 786-O mit je 1 µl Primer für Cofilin 1, Cofilin 2, NDKB und das Referenzgen GAPDH. Die Primer sind in Tab. 17 aufgeführt. 5 µl der Proben für MIMIC und MOCK wurden mit 15 µl des Reaktionsmix vermischt (siehe Tab. 18) Anschließend erfolgte die RT mit dem dafür vorgesehenen Gerät und ausgewählten Programm. Die Anlagerung der Primer verlief bei

25°C für 5 min und die Elongation bei 42 °C für 60 min. Die Analyse des Expressionslevels wurde mittels qPCR durchgeführt. Dabei wurde ein PCR Master Mix aus GoTaq®qPCR Master Mix, Primer forward&reverse, CXR Reference Dye und nukleasefreiem H₂O angesetzt. Zu 8 µl PCR Mastermix wurden 2 µl cDNA bzw. 2 µl H₂O als Negativkontrolle gegeben und auf der 96-Well-Platte im PCR Programm analysiert.

Tabelle 17: mRNA Primer Typisierung (primer_forward_sequence, primer_forward_tm, primer_reverse_sequence)

Primer	primer_fw_sequence	primer_fw_Tm	primer_rev_sequence
Cofilin-1	AGGAGAGCAAGAAGGAGGATCTG	61,565	TGCAATTCATGCTTGATCCCTGTC
Cofilin-2	CTTGGTGGGTGACATTGGTGATAC	62	ATCGGCAATCATTGAGAGGTAGC
NDKB	TCACCAAAGGGAGCTTGTTTGC	62,213	AGATTAGGCCTGTCATCGACCTG

Tabelle 18: Rezeptur des RT-Reaktionsmastermixes

Komponente	Volumen
GoScript™ 5x Reaktionspuffer	4,0 µl
MgCl ₂ (Endkonzentration 1,5-5,0 mM)	1,2-6,4 µl
PCR Nukleotidmix	1,0 µl
RekombinatesRNasin®Ribonuklease Inhibitor	20 units
GoScript™ ReverseTranskriptase	1,0 µl
nukleasefreies H ₂ O	X µl bis Endvolumen von 15 µl

7.9. Relative Expression Software Tool (REST) –Programm

Das REST-Programm 2008 (M.W. Pfaffl; München; Deutschland) diente dazu das Expressionsverhältnis zu ermitteln⁹².

In dieser Arbeit wurde das Expressionsverhalten der beiden miRNAs im jeweiligen Zielgewebe relativ zum Vergleichsgewebe analysiert sowie auch im Vergleich zur Referenz-RNA RNU48. Durch das REST-Programm konnte festgestellt werden, wie vielfach die Konzentration in den Geweben verändert war. Dies erfolgte über die Angabe des *fold changes*. Ebenso konnte ermittelt werden, mit welcher Signifikanz ein Unterschied vorlag, dies gelang über den p-Wert. Die Berechnung erfolgte durch Anwendung der nachstehenden Formel:

$$\text{Normalisierter CP-Wert}^{92} = \frac{\text{Effizienz der Ziel-RNA}^{\text{CP-Wert der Ziel RNA}}}{\text{Effizienz von RNU48}^{\text{CP-Wert von RNU48}}}$$

Das REST-Programm wurde auch bei der Transfektionsanalyse verwendet, um den Erfolg der Transfektion nachzuweisen, indem der Unterschied der Konzentration der miR-30a-3p zwischen MIMIC und MOCK ermittelt wurde.

7.10. „Statistical Package for the social science“(SPSS)-Programm

Das SPSS Programm wurde zur statistischen Analyse der verschiedensten Daten herangezogen.

Zunächst konnte die Häufigkeitsverteilung der verschiedenen Kategorien wie Alter, Geschlecht, T-Klassifikation, Grading, Metastasierung, Tod und Beobachtungszeitraum deskriptiv zusammengefasst sowie der Median, der Mittelwert, die Varianz, die Standardabweichung und der Standardfehler berechnet werden.

Die miRNA-Expressionsverteilung in den Proben Gruppen wurde mittels Boxplot graphisch dargestellt. Die Signifikanz der Expressionsunterschiede wurde bei normal verteilten Proben Gruppen mithilfe des T-Tests bzw. bei nicht normal verteilten Gruppen mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests analysiert. Signifikante Expressionsunterschiede wurden mit einem p-Wert < 0,05 definiert¹⁰⁵. Der Vorteil des Boxplots ist die eindimensionale Ausdehnung, so dass mehrere Datensätze auf derselben Skala verglichen werden konnten.

Mit Hilfe von ROC-Analysen (Receiver-Operating-Characteristics-Kurve) wurden für jede miRNA *CutOff Values* festgelegt, die mit möglichst hoher Sensitivität und Spezifität

metastasierte von nicht metastasierten Proben unterscheiden. Als Qualitätsmaß wurde hierfür der AUC (*area under the curve*)-Wert angegeben. Dieser Wert dient als weiteres Qualitätskriterium für den *Cut-Off*-Wert. Ein Wert $> 0,9$ ist exzellent, $> 0,8$ ist gut, $> 0,7$ ist ordentlich und $> 0,6$ ist schlecht, aber noch akzeptabel⁵⁵.

Zur Analyse der Überlebenszeiten wurden Kaplan-Meier-Verfahren angewandt. Basierend auf der ROC-Kurve wurde in den Kaplan-Meier-Kurven die Wahrscheinlichkeit dargestellt, ob ein Ereignis in dem bestimmten Beobachtungszeitraum eintritt oder nicht. Durch den Log-Rank-Test konnten verschiedene Kaplan-Meier-Kurven miteinander verglichen werden. Signifikante Unterschiede wurden mit einem p-Wert $< 0,05$ definiert.

Der Chi-Quadrat-Test wird auch als Kontingenzanalyse bezeichnet. Zum einen kann bei univariaten Regressionsanalysen geprüft werden, ob ein Merkmal auf bestimmte Art und Weise verteilt ist und die Nullhypothese bestätigt wird. Zum anderen wird bei multivariaten Regressionsanalysen festgestellt, ob die zwei Merkmale statistisch voneinander unabhängig sind¹⁰⁵. Im Homogenitätstest wird stichprobenartig geprüft, ob die Merkmale derselben Verteilung entstammen.

8. Ergebnisse

8.1. Validierung der miR-30a-3p und der miR-10b-5p Expression im klarzelligen Nierenzellkarzinom

Im ersten Teil der Arbeit wurden zunächst die Expressionsunterschiede der miR-30a-3p und der miR-10b-5p in den drei verschiedenen Probengruppen ausgewertet sowie in Bezug zum Metastasierungsrisiko und zur Prognose der Patienten gesetzt.

8.1.1. PCR-Effizienzen

Die exakte Auswertung der relativen Expressionsunterschiede der beiden miRNAs durch Normalisierung der ct-Werte basiert auf den miRNA-spezifischen PCR-Effizienzen. Diese Effizienzen wurden durch Verdünnungsreihen mittels qRT-PCR bestimmt (siehe Abb. 20). Die PCR-Effizienzen wurden zur validen Berechnung der *fold changes* und der p-Werte in die Formel der REST-Software (Kapitel 7.9.) eingesetzt. In Tabelle 19 sind die Effizienzen für die jeweiligen Primer aufgeführt.

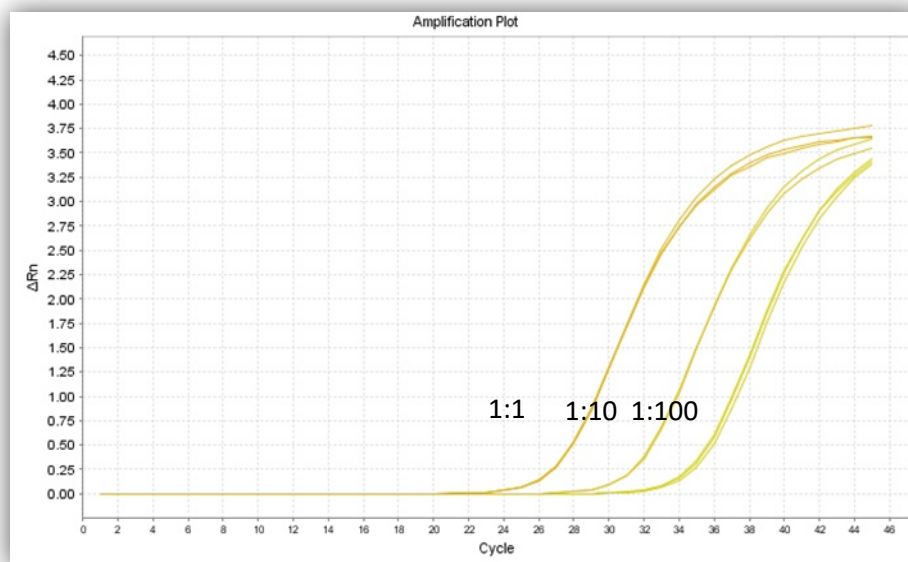


Abbildung 20: Verdünnungsreihe der miR-30a-3p in den Verdünnungen 1:1, 1:10, 1:100 zur Ermittlung der PCR-Effizienzen.

Tabelle 19: PCR-Effizienzen der Primer

Primer	Effizienz
miR-30a-3p	1,83
miR-10b-5p	1,925
RNU48	1,931

8.1.2. Expressionsunterschiede der miR-30a-3p und miR-10b-5p

Zunächst wurden die Konzentrationsunterschiede der miR-10b-5p und der miR-30a-3p in Gewebeproben von metastasierten und nicht metastasierten Nierenzellkarzinomen sowie von normalem Nierengewebe ausgewertet. Für beide miRNAs konnte eine signifikant unterschiedliche Expression in den verschiedenen Gewebearten festgestellt werden. Dies wurde bereits anhand der ct-Werte bei der Auswertung der qRT-PCR ersichtlich und ist in den Abb. 21+22 beispielhaft für miR-30a-3p und miR-10b-5p in einer metastasierten und einer nicht metastierten Probe aufgeführt. Je höher der ct-Wert ist, desto weniger miRNA ist in der Probe enthalten.

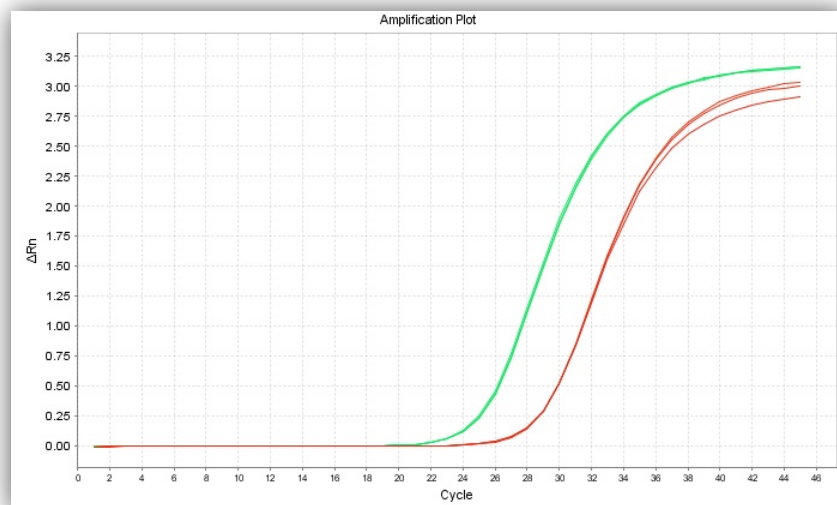


Abbildung 21: Darstellung der Expressionsunterschiede der miR-30a-3p in einer nicht metastasierten (grün) und einer metastasierten (rot) Probe anhand der Amplifikationskurven.

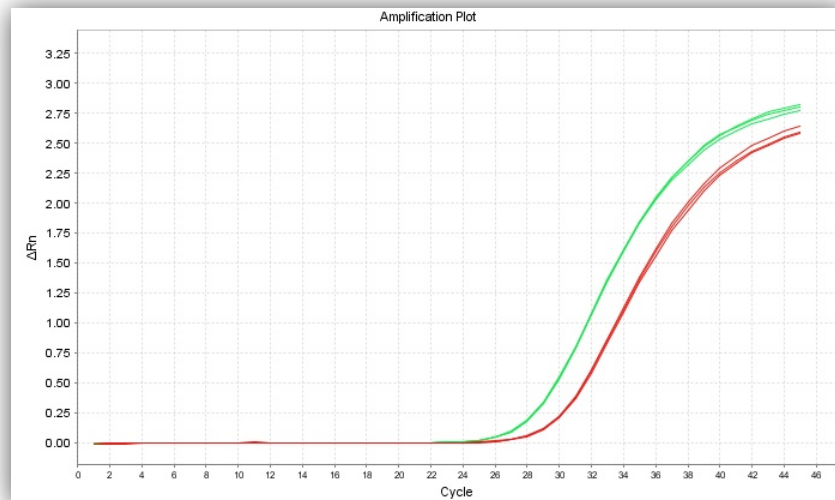


Abbildung 22: Darstellung der Konzentrationsunterschiede der miR-10b-5p in einer nicht metastasierten (grün) und einer metastasierten (rot) Probe anhand der Amplifikationskurven.

Die Normalisierung der ct-Werte durch Bezug der beiden miRNAs auf die Referenz RNU48 erfolgte mittels REST-Software. Darüber konnte der Expressionsunterschied (*fold change*) berechnet werden. Die Signifikanz der Expressionsunterschiede (p-Wert) wurde durch den Mann Whitney U Test ermittelt.

8.1.2.1. Expressionsergebnisse für miR-10b-5p

Für miR-10b-5p zeigte sich eine signifikant geringere Expression in metastasierten Primärtumoren gegenüber den nicht metastasierten Primärtumoren und den Normalgeweben. Die Expression in metastasierten Primärtumoren war um das 1,5 fache geringer als in nicht metastasierten Primärtumoren ($p=0,007$) und um das 2,4-fache geringer als im Normalgewebe ($p<0,0001$). Die Expression in nicht metastasierten Primärtumoren im Vergleich zu Normalgewebe war um das 1,5-fache vermindert ($p=0,004$). Die Expressionsunterschiede mit den jeweiligen p-Werten sind in Boxplots veranschaulicht (siehe Abb.23), der *fold change* ist in der Tab. 20 aufgeführt.

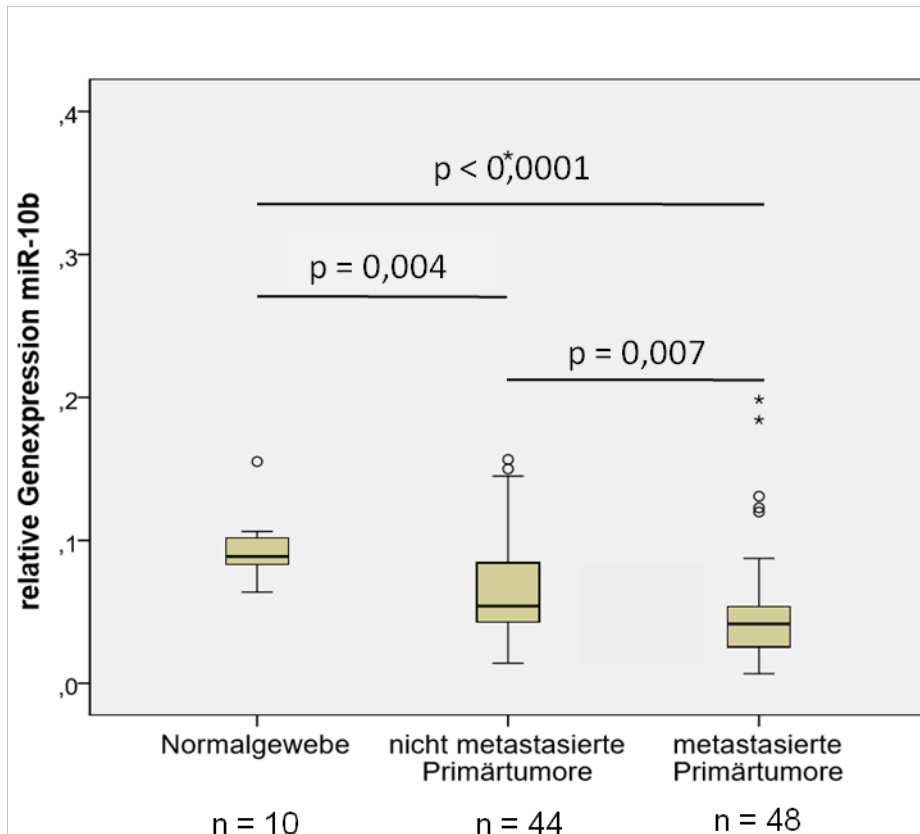


Abbildung 23: Relative Genexpression der miR-10b-5p in den drei analysierten Proben Gruppen

Tabelle 20: *Fold change* der Konzentration der miR-10b-5p

miR-10b-5p	<i>fold change</i>
Metastasierte vs. nicht metastasierte Primärtumore	- 1,5
Metastasierte Primärtumore vs. Normalgewebe	- 2,4
Nicht metastasierte Primärtumore vs. Normalgewebe	- 1,5

8.1.2.2. Expressionsergebnisse für miR-30a-3p

Die Expression der miR-30a-3p war in metastasierten Tumoren gegenüber nicht metastasierten Tumoren um das 1,7-fache geringer ($p=0,001$). Im Vergleich zum Normalgewebe war die Expression um das 3-fache vermindert ($p<0,0001$) in metastasierten Tumoren. In nicht metastasierten Primärtumoren hatte miR-30a-3p eine 1,8-fach geringere Expression als im Normalgewebe ($p=0,001$). Im Boxplot sind die Ergebnisse mit den jeweiligen p-Werten veranschaulicht (siehe Abb. 24), die Tab. 21 gibt die *fold changes* an.

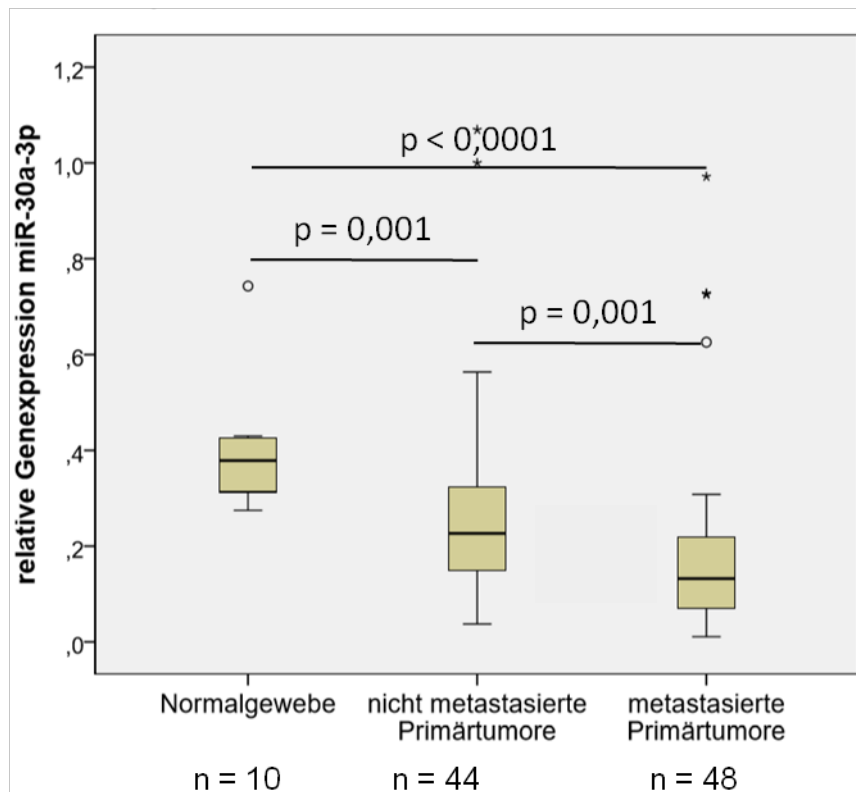


Abbildung 24: Relative Genexpression der miR-30a-3p in den drei analysierten Probengruppen

Tabelle 21: *Fold change* der Konzentration der miR-30a-3p

miR-30a-3p	<i>fold change</i>
Metastasierte vs. nicht metastasierte Primärtumore	-1,7
Metastasierte Primärtumore vs. Normalgewebe	-3,0
Nicht metastasierte Primärtumore vs. Normalgewebe	-1,8

8.1.3. Assoziation mit der Metastasierung

Nach Auswertung der Expressionsunterschiede wurde untersucht, ob eine Korrelation zum Metastasierungsrisiko und somit zur Prognose besteht.

Zunächst wurden für miR-30a-3p und miR-10b-5p *CutOff Values* festgelegt, die mit möglichst hoher Sensitivität und Spezifität metastasierte von nicht metastasierten Proben unterscheiden. Dabei wurden zunächst alle Proben (synchron und metachron metastasierte Tumore) betrachtet. In Tab. 22 sind die Cut off Werte zur Unterscheidung in metastasierte und nicht metastasierte NZK, die *area under the curve* (AUC) sowie ihre Spezifität und Sensitivität aufgeführt. Die ROC-Kurve veranschaulicht die Werte (siehe Abb. 25).

Tabelle 22: Werte der ROC-Kurvenanalyse zur Analyse des metastasierungsfreien Überlebens

	Cut off Wert	Sensitivität	Spezifität	AUC
RNU48/miR-30a-3p	0,168	60%	70%	0,749
RNU48/miR-10b-5p	0,055	77%	61%	0,712

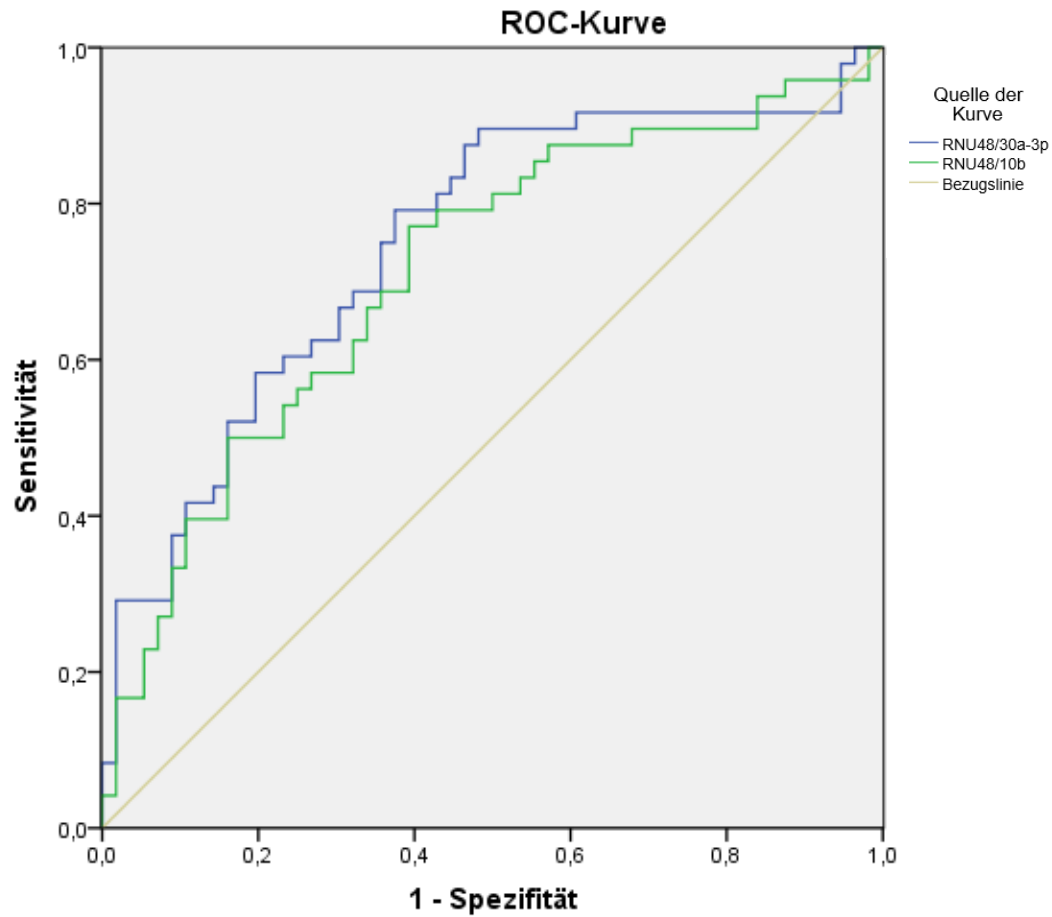


Abbildung 25: ROC-Kurvenanalyse

Anschließend wurde der Zusammenhang zwischen der Expression der beiden miRNAs zum metastasierungsfreien Überleben untersucht. Dabei wurden nur die metachron metastasierten Tumore betrachtet.

Die Expression der miR-30a-3p korrelierte signifikant mit dem metastasierungsfreien Überleben ($p=0,02$). Bei einer erhöhten Expression von miR-30a-3p war die Metastasierungswahrscheinlichkeit in dem Nachbeobachtungszeitraum von 126 Monaten signifikant geringer. Bei erniedrigter Expression lag die Wahrscheinlichkeit Metastasen im Verlauf zu entwickeln höher (siehe Abb. 26).

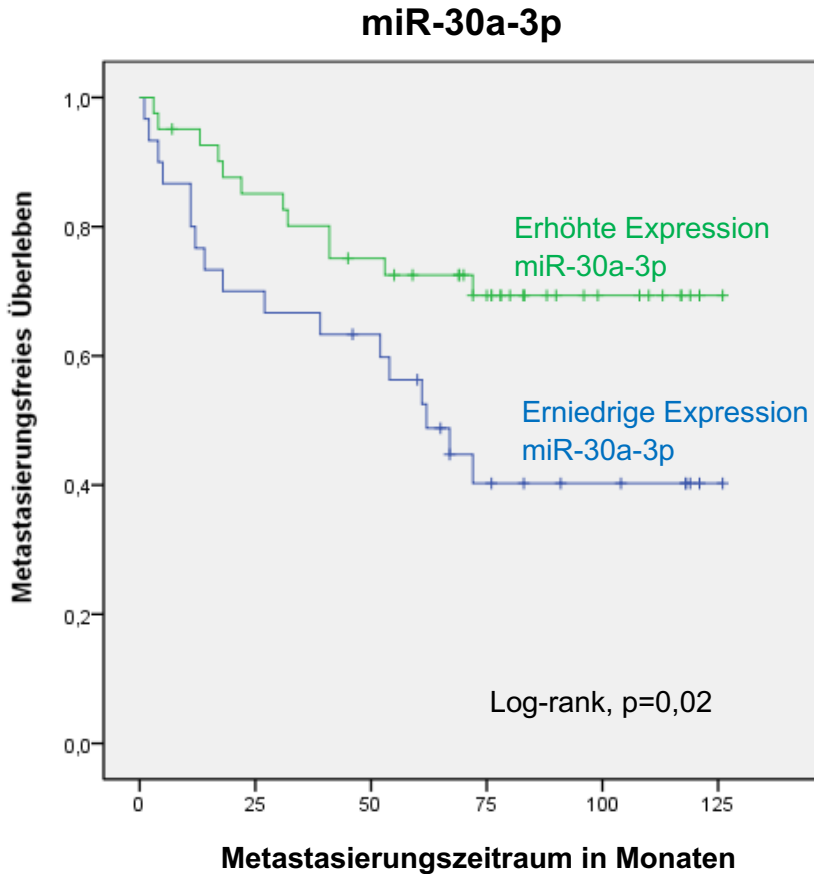


Abbildung 26: Metastasierungsfreies Überleben in Abhängigkeit der Expression der miR-30a-3p

Nach 2 Jahren lag das geschätzte metastasierungsfreie Überleben bei erhöhter Expression der miR-30a-3p bei ca. 86%, bei erniedrigter Expression bei ca.68%. Betrachtet man die Wahrscheinlichkeit des metastasierungsfreien Überlebens nach 5 Jahren bestand eine ca. 70%ige Wahrscheinlichkeit bei erhöhter miR-30a-3p-Expression keine Metastasen zu entwickeln, bei erniedrigter Expression eine ca. 55%ige Wahrscheinlichkeit.

Für die miR-10b-5p ließ sich in der Aussage über das metastasierungsfreie Überleben ein Trend erkennen ($p=0,107$). Bei erhöhter Expression war die Wahrscheinlichkeit für ein metastasierungsfreies Überleben im Beobachtungszeitraum von 126 Monaten tendenziell höher als bei erniedrigter Expression (siehe Abb. 27).

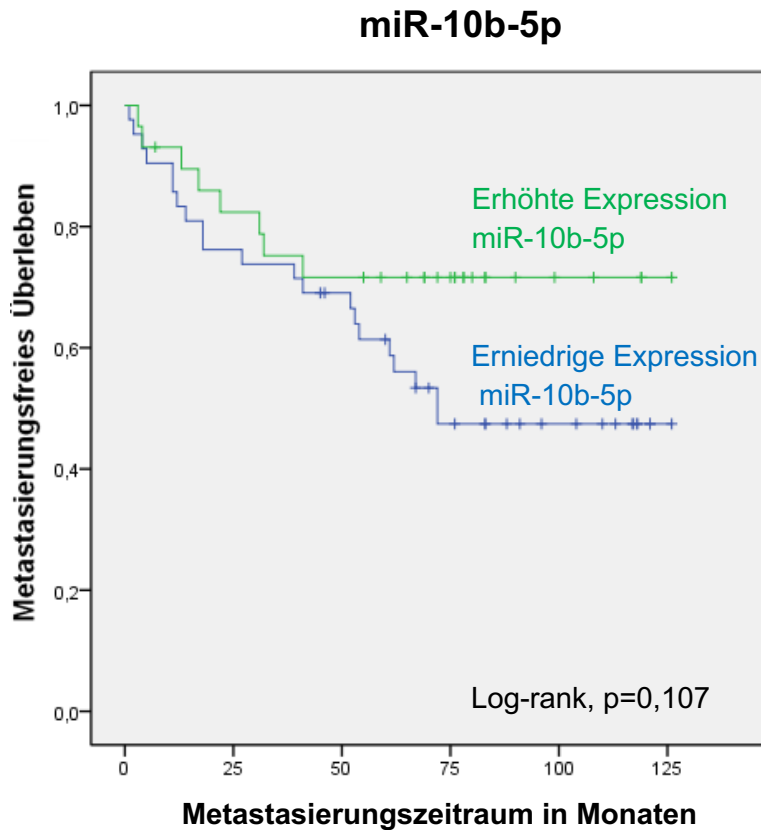


Abbildung 27: Metastasierungsfreies Überleben in Abhängigkeit von der Expression der miR-10b-5p

Nach 2 Jahren lag die Wahrscheinlichkeit des metastasierungsfreien Überlebens bei erhöhter miR-10b-5p-Expression bei ca. 81%, bei erniedrigter Expression bei ca. 75%. Die geschätzte Wahrscheinlichkeit, dass nach 5 Jahren keine Metastasen vorliegen, lag bei erhöhter Expression der miR-10b-5p bei ca. 70%, bei erniedrigter Konzentration bei ca. 60%.

Die Analyse der Expression von miR-10b-5p und miR-30a-3p verglichen zum Gesamtüberleben der Patienten ergab keine statistisch signifikante Korrelation. Ein Trend, dass bei erniedrigter Expression die Wahrscheinlichkeit für ein kürzeres Gesamtüberleben vorliegt, war für die miR-10b-5p jedoch zu erkennen (siehe Abb. 28 u.29).

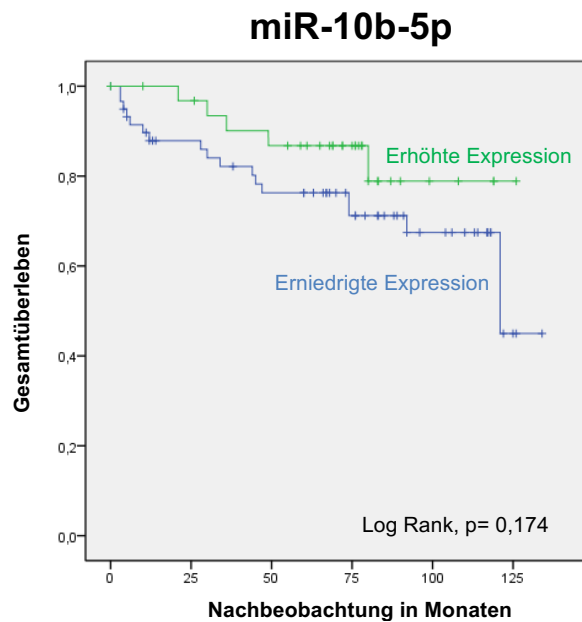


Abbildung 28: Kaplan-Meier Kurven zum Einfluss der Expression der miR-10b-5p auf das Gesamtüberleben

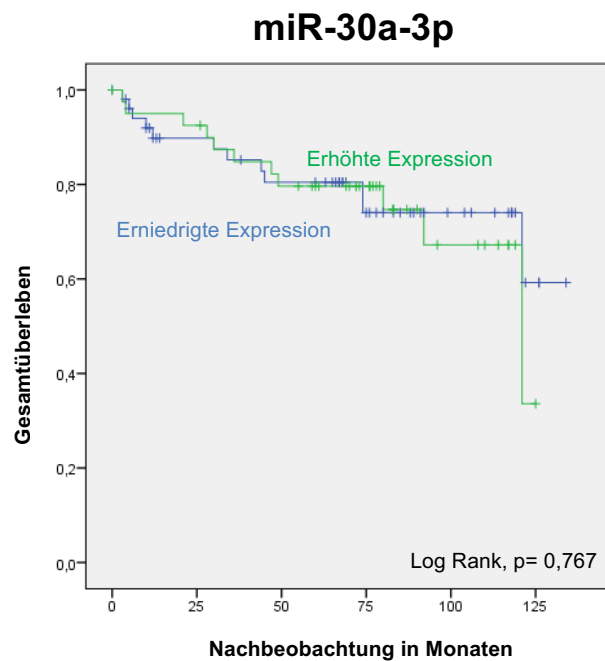


Abbildung 29: Kaplan-Meier Kurven zum Einfluss der Expression der miR-30a-3p auf das Gesamtüberleben

8.2. Targetidentifizierung

Da die miR-30a-3p eine signifikant geringere Expression in metastasierten Tumoren aufwies, wurden potentielle Targets dieser miRNA mit Hilfe von Western Blot Analysen validiert. Mögliche Targetproteine wurden mittels 2-D-Gelelektrophorese und Massenspektrometrie in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe identifiziert. Dabei wurde Cofilin als Protein detektiert, welches bei erhöhter miR-30a-3p Expression in deutlich verminderter Konzentration vorlag. Neben Cofilin wurden auch andere an Migrationsprozessen der Zelle beteiligten Proteine wie Vinculin, Galectin und NDK analysiert. Als Referenzprotein wurde GAPDH verwendet.

8.2.1. Transfektion der miR-30a-3p

Zur Vorbereitung der Western Blot Analyse wurde miR-30a-3p in eine metastasierte kzNKZ-Linie 786-O transfiziert, um eine Erhöhung der Konzentration der miRNA zu initiieren und die Auswirkungen auf die potentiellen Targetproteine zu überprüfen. Zunächst wurden verschiedene Mengen an miRNA MIMIC (25 ng/μl) getestet, um eine ausreichende Konzentrationserhöhung zu initiieren. Tab. 24 zeigt, dass bereits 1 μl miR-30a-3p (25 ng/μl) genügt, um die intrazelluläre miRNA-Konzentration deutlich zu erhöhen. Daher wurden die Proben, die für die weitere Western Blot Analyse verwendet wurden, mit 1 μl miRNA MIMIC (25 ng/μl) transfiziert. Eine erhöhte Konzentration der miRNA stellt sich in geringeren ct-Werten dar (siehe Abb. 30).

Tabelle 23: *Fold change* und p-Werte der miRNA-Expressionsänderung nach Transfektion unterschiedlicher Mengen an miRNA MIMIC

MIMIC/MOCK	<i>fold change</i>	p-Wert
25 ng	886fach	< 0,0001
75 ng	821fach	< 0,0001
125 ng	985fach	<0,0001

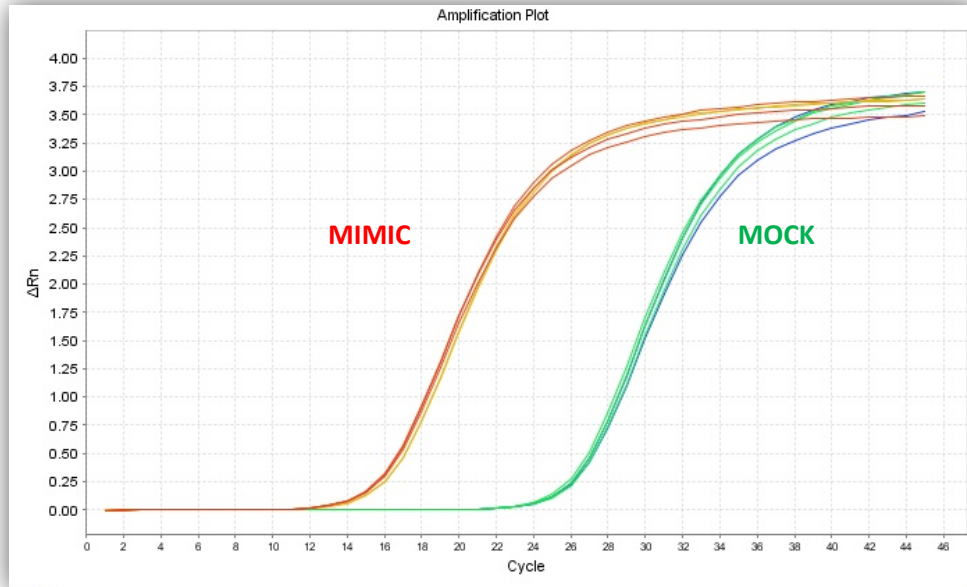


Abbildung 30: Transfektionskontrolle der miR-30a-3p in biologischen Triplikaten. Die Expressionsunterschiede wurden mit qRT-PCR bestimmt. Die roten Kurven stellen die transfizierten 786-O Zellen, die grünen Kurven die 786-O Zellen ohne Transfektion dar.

Zusätzlich wurde zum Nachweis einer erfolgreichen Transfektion in einer separaten Durchführung eine fluoreszenzmarkierte miRNA (*cel-miR-67*, *miRIDIAN Dy547-labeled miRNA*) in die 786-O Zellen transfiziert. In der Abb. 31 ist die transfizierte miRNA, die sich innerhalb der Zellen befindet, unter dem Mikroskop dargestellt.

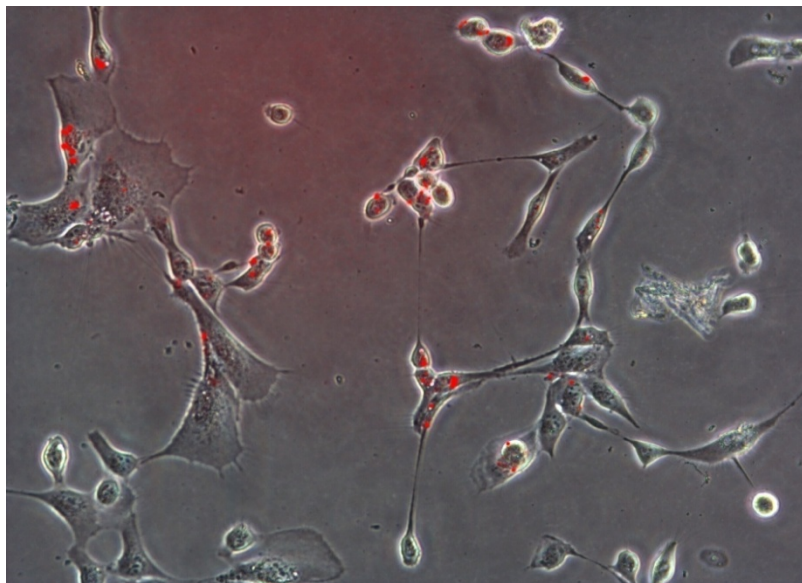


Abbildung 31: Transfektion fluoreszenzmarkierter *cel-miR-67* (*miRIDIAN Dy547-labeled miRNA*). Erfolgreich transfizierte fluoreszenzmarkierte *cel-miR-67* (rot) in den Zellen der Zelllinie 786-O.

8.2.2. Western Blot Analyse

In der Western Blot Analyse bestätigte sich, dass Cofilin durch Konzentrationsveränderungen der miR-30a-3p reguliert wird. Auf eine erhöhte Konzentration der miR-30a-3p folgte eine erniedrigte Konzentration des Cofilins. Dies war in der schwächeren Bande der transfizierten Probe (MIMIC) mit erhöhter Konzentration der miR-30a-3p gegenüber der nicht transfizierten Probe (MOCK) ersichtlich.

Für die drei anderen untersuchten Proteine Vinculin, NDK und Galectin-1 stellte sich kein Unterschied zwischen MOCK und MIMIC heraus. In Abb. 32 sind die Ergebnisse der Western Blot Analyse für die vier Proteine und das Referenzprotein dargestellt.

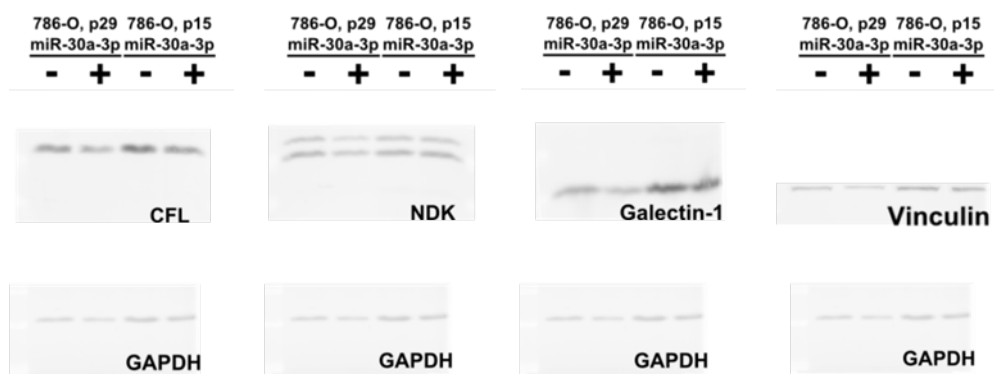


Abbildung 32: Western Blot Analyse der Proteine Cofilin, NDK, Galectin und Vinculin sowie des Referenzproteins GAPDH nach Transfektion der synthetischen miR-30a-3p. Es wurden zwei zu unterschiedlichen Zeitpunkten passagierte Zellreihen betrachtet (786-0 p29 und 786-0 p15). Plus und Minus stehen für die Probe mit Transfektion der miR-30a-3p (MIMIC/+) und ohne Transfektion (MOCK/-).

Zur Quantifizierung der Ergebnisse des Cofilins wurde die relative Expression ermittelt und durch Boxplot dargestellt. Eine erhöhte Konzentration der miR-30a-3p führte tendenziell zu einer geringeren Expression des Cofilins ($p=0,2$). Die Abb. 33 stellt die relative Expression von Cofilin und die durch Immundetektion sichtbaren Banden des Cofilins und des Vergleichsproteins GAPDH dar. Zu erkennen ist eine Abschwächung der Farbintensität der Bande bei erhöhter miRNA-Konzentration.

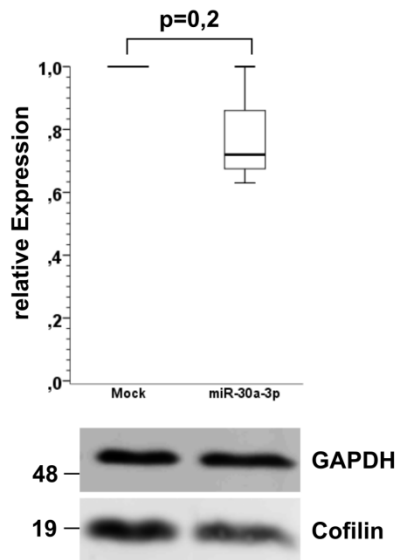


Abbildung 33: Targetidentifizierung des Cofilins mittels Western Blot

8.3. mRNA-Expressionsanalyse

Zusätzlich zur Identifizierung des Targets auf Proteinebene wurde analysiert, ob auch auf mRNA-Ebene ein Expressionsunterschied von Cofilin sowie von NDK bei Veränderung der miR-30a-3p Konzentration festzustellen ist.

In der Auswertung mittels REST-Software konnte kein Expressionsunterschied nachgewiesen werden. Abb. 34 veranschaulicht dies beispielhaft an der Amplifikationskurve des Cofilins.

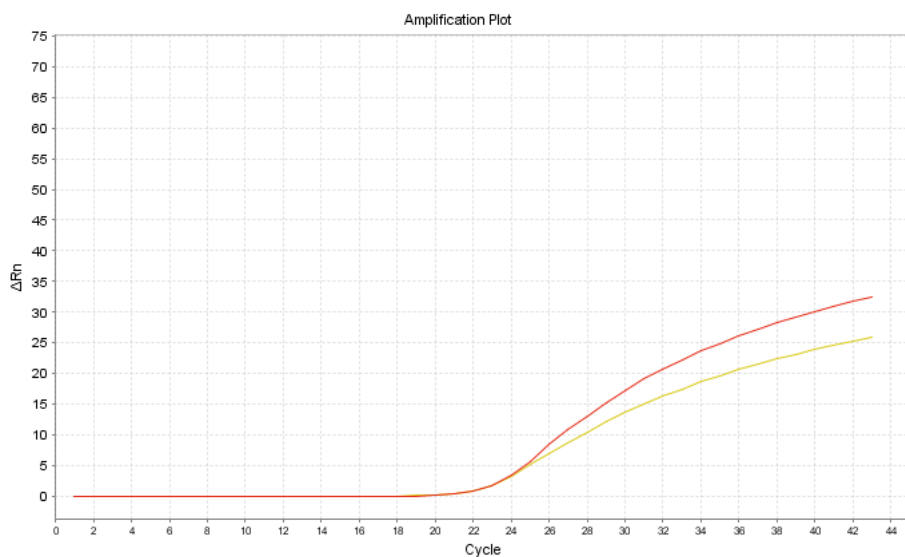


Abbildung 34: mRNA Expression von Cofilin in MIMIC (rot) und MOCK (gelb)

9. Diskussion

9.1. Diskussion der Expressionsergebnisse der miR-30a-3p und

miR-10b-5p

Das NZK ist der dritthäufigste urologische Tumor und zeigt die höchste Letalität der Tumore des Urogenitalsystems. Bei metastasiertem Befund sinkt die 5 Jahres-Überlebensrate unter 10%. Die systemischen Therapien, die bei dem metastasierten Stadium eingesetzt werden, haben bislang nur wenig Erfolg. Gerade bei den metachron metastasierten Patienten, die einen Anteil von 30% -weiter steigend- ausmachen¹⁸, ist es wichtig bereits frühzeitig vorhersagen zu können, ob der Primärtumor die Fähigkeit zur Metastasenbildung besitzt oder nicht. Bei Patienten mit einem hohen Metastasierungsrisiko könnte die Nachbeobachtungszeit engmaschiger durchgeführt oder bereits frühzeitig eine systemische Therapie eingeleitet werden. Für diese Prognosevorhersage sind miRNAs als molekulare Biomarker geeignet, da ihre Gewinnung aus Tumorgewebe, Blut und Urin aufgrund der hohen Stabilität relative einfach und schnell möglich ist und sie die Metastasierungsprozesse beeinflussen. Außerdem sind sie teilweise sehr spezifisch in Tumoren dereguliert, so dass die Aussage hinsichtlich der Prognose tumorspezifisch getroffen werden kann.

In unserer Arbeitsgruppe wurden mittels Microarray-Analysen 14 miRNAs identifiziert, die mögliche Biomarker zur Metastasierungs vorhersage im Primärtumor darstellen. Die Expression zwei dieser miRNAs, miR-30a-3p und miR-10b-5p, wurden in dieser Arbeit analysiert und validiert. Es wurde darauf geachtet, Störfaktoren für die Analyse auszuschließen. Bei der Auswahl des Gewebes wurde nekrotisches Gewebe ausgeschlossen, um verfälschte Signale durch andere miRNA-Muster in nekrotischen Zellen zu vermeiden. Des Weiteren wurde die RNA-Isolierung verblindet durchgeführt. Die Proben, welche eine zu hohe Verunreinigung durch Proteine oder Lösungsmittel aufwiesen und so die Auswertung verfälscht hätten, wurden eliminiert. Zudem erfolgte die Durchführung der PCR-Analyse in Triplikaten, um Abweichungen der Messwerte durch persönliche Fehlerquellen zu identifizieren.

In der Auswertung konnte für beide miRNAs ein signifikanter Expressionsunterschied zwischen metastasierten und nicht metastasierten Tumoren nachgewiesen werden. In den unterschiedlichen Gewebegruppen, normales Nierenzellgewebe, nicht metastasiertes und metastasiertes Gewebe, zeigte sich eine signifikante Abnahme der Konzentration der miRNAs vom gesunden zum metastasierten Gewebe. Zum Expressionsverhalten der beiden miRNAs im kzNZK gibt es einige Arbeiten, die mit den Ergebnissen dieser Arbeit übereinstimmen. Eine Studie von Mathew et al. wies durch Microarrayanalysen eine verminderte Expression der miR-30a-3p im kzNKZ im Vergleich zum Normalgewebe nach. Die Inhibierung der miR-30a-3p-Expression resultierte in einem Anstieg des HIF2 α -Levels

und führte damit zu einer Verstärkung der zellulären Proliferation, Angiogenese und Tumorwachstum⁷⁷. Die Studie von Khella et al. zeigt vergleichbar mit der vorliegenden Arbeit einen Abfall der Konzentration der miR-10b von normalem Nierengewebe zu nicht metastasiertem und metastasiertem NZK. Weiter verglich die Arbeitsgruppe die Expression der miR-10b in den vier Tumorstadien. Dabei stellte sich in den fortgeschrittenen Stadien III/IV eine geringere Konzentration als in den Stadien I/II dar⁵⁸. Bezüglich des progressionsfreien Überlebens wies die Studie von Khella et al. eine signifikante Korrelation zu einer verminderten Expression der miR-10b nach⁵⁸. In der vorliegenden Arbeit wurde trotz der statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der Expression in metastasierten und nicht metastasierten Tumoren für miR-10b-5p nur eine Tendenz in der Vorhersagegenauigkeit des metastasierungsfreien Überlebens festgestellt. Ursächlich dafür könnte die geringere Probenzahl sein. In der Studie von Khella et al. wurden 250 Proben analysiert, in der vorliegenden Arbeit 92 Proben. Ein weiterer Mehrwert in der Arbeit von Khella et al. besteht darin, dass gepaarte Proben analysiert wurden, wodurch die Expression der miRNA der Tumorproben mit der Expression im Normalgewebe der gleichen Niere verglichen und damit mögliche Patienten-spezifische Expressionsunterschiede berücksichtigt wurden⁵⁸. Ebenso wurde für eine noch differenziertere Aussage der Konzentrationsunterschiede das Expressionsverhalten der miRNA in den einzelnen Tumorstadien betrachtet. Im Hinblick auf die Nutzung der miRNAs in der Diagnostik und Prognosevorhersage für den Patienten kann dadurch der Expressionsunterschied genauer beurteilt werden.

Bezüglich der Prognosevorhersage konnte mithilfe der miR-30a-3p eine signifikante Aussage über das metastasierungsfreie Überleben innerhalb eines Beobachtungszeitraums von 10 Jahren getroffen werden. Eine erniedrigte Konzentration der miR-30a-3p korrelierte signifikant mit einem verkürzten metastasierungsfreien Überleben. Die Aussage ist bei gutem AUC-Wert, jedoch aufgrund einer geringen Sensitivität und Spezifität als kritisch zu betrachten. Am ehesten zu begründen ist dies durch eine zu geringe Patientenzahl. Zudem besteht die These, dass eine miRNA alleine nicht für die komplexen Metastasierungsvorgänge verantwortlich sein kann. In unserer Arbeitsgruppe wurden 9 miRNAs identifiziert, die das Metastasierungsverhalten vorhersagen können, davon 8 miRNAs signifikant. Aus diesen 9 miRNAs wurde eine miRNA-Signatur von 4 miRNAs (miR-30a-3p, miR-30c-5p, miR-139-5p, miR-144-5p) definiert, die die stärkste Vorhersage zum Metastasierungsrisiko mit einer Sensitivität von 91% und einer Spezifität von 81% treffen kann. Interessanterweise ist unter dieser Signatur die miR-30c-5p, die als einzelne miRNA nicht signifikant die Metastasierungswahrscheinlichkeit voraussagt⁴⁴. Dies unterstreicht die Tatsache umso deutlicher, dass eine einzelne miRNA nicht allein für die Metastasierungsprozesse verantwortlich ist. Des Weiteren zeigte die Arbeit von Heinzemann

et al., dass die miRNA-Signatur eine stärker Aussagekraft bezüglich des Metastasierungsrisikos verglichen mit dem Lymphknotenstatus und der T-Kategorie hat sowie eine präzisere Vorhersage zum Metastasierungsrisiko treffen kann wie prognostische Scores⁴⁴. Kowalik et al. identifizierte ebenfalls eine miRNA-Signatur, die mit einer Sensitivität von 93,8% und einer Spezifität von 92,9% das Metastasierungsrisiko vorhersagt⁶⁰. Weitere vor allem für die klinische Anwendung wichtige Erkenntnisse der Arbeit von Kowalik et al. sind, dass nicht nur im Nephrektomiepräparat eine Korrelation der Expression der miRNAs zum progressionsfreien Überleben besteht, sondern auch im Biopsiepräparat⁶⁰. So kann in der Praxis bereits durch minimalen Eingriff eine Prognosevorhersage getroffen werden. Ganz ohne jeglichen Eingriff gibt es auch die Möglichkeit miRNAs aus dem Urin zu gewinnen. Dies zeigt die Arbeitsgruppe von Baumgart et al., die durch Isolierung von Exosomen aus dem Urin die Expression der miRNAs im muskelinvasiven und nicht muskelinvasiven Urothelkarzinom analysierten³.

Betrachtet man die Auswirkungen der Expressionsunterschiede der beiden miRNAs auf das Gesamtüberleben über den Zeitraum von 126 Monaten, bestand keine Korrelation zum Expressionslevel der beiden miRNAs. Erklärbar könnte dies dadurch sein, dass die Patienten aufgrund einer anderen Todesursache aus der Analyse ausschieden. Ein weiterer wichtiger Grund liegt darin, dass das Gesamtüberleben von der Wirksamkeit und Verträglichkeit der Therapie des metastasierten NZKs abhängt. Die miRNAs sind jedoch keine Prädiktoren des Therapieansprechens, sondern Biomarker zur Prognosevorhersage, daher ist eine signifikante Korrelation zum Gesamtüberleben nicht zu erwarten.

Auch in anderen Tumorentitäten können miRNAs zur Vorhersage von Metastasierungsprozessen beitragen. Die miR-30a-3p zeigt auch in anderen bisher untersuchten Tumorentitäten wie beispielsweise dem hepatozellulären Karzinom, dem kolorektalen Karzinom und dem Mammakarzinom eine erniedrigte Expression. Für miR-10b-5p liegt jedoch, im Gegensatz zur erniedrigten Konzentration im NZK, eine erhöhte tumorspezifische Expression beispielsweise im Mammakarzinom⁷⁴ und hepatozellulärem Karzinom¹¹¹ vor. Auch in metastasierten Zellen des hepatozellulären Karzinoms fand sich eine erhöhte Konzentration der miR-10b. Vermutlich ist der Unterschied der Expression auf die Regulierung zellspezifischer Targetproteine und somit verschiedener Signalwege in den verschiedenen Tumorentitäten zurückzuführen. Im hepatozellulären Karzinom beeinflusst miR-10b die Invasion und Metastasierung durch Regulierung des Adhäsionsmoleküls CADM^{58,68}. Die Metastasierung des Mammakarzinoms wird durch Regulation von E-Cadherin und Syndecan1 begünstigt⁵⁸. Beim Magenkarzinom wird die Migration und Invasion durch Regulierung der HOXD-10 durch die miR-10b gesteuert^{58,108}. Die spezifischen Targetproteine und Signalwege, die beim NZK durch miR-10b reguliert werden, sind noch nicht vollständig erforscht. Li et al. wiesen bei Verlust von miR-10b-5p einen Anstieg der Expression des

onkogenen Transkriptionsfaktors CREB (cAMP responsive element binding protein) nach⁶⁹. Neueste Arbeiten von He et al. zeigen, dass miR-10b die Zellinvasion und Metastasierung durch Regulation des Targetproteins HOXA3 über den FAK/YAP Signalweg beeinflusst⁴³. Neben der Analyse des Expressionsverhaltens im Primärtumor sollte in weiteren Arbeiten auch das Expressionsverhalten und das Beeinflussen von Targetproteinen durch miRNAs in den Metastasen selbst untersucht werden. In den Vorarbeiten von Heinzemann et al. konnte bereits eine Korrelation zwischen der Expression von 14 miRNAs und Lungenmetastasen beim kzNZK nachgewiesen werden⁴⁵.

9.2. Diskussion der Targetanalyse

MiRNAs regulieren die Expression bestimmter Proteine und beeinflussen dadurch verschiedene Signalwege. Die Kenntnis, welche Proteine durch welche miRNAs in welcher Art und Weise reguliert werden, kann das Verständnis über die Metastasierungsmechanismen erweitern. Der zweite Teil dieser Arbeit sollte die Targetproteine der miR-30a-3p validieren, um Rückschlüsse auf regulierte Metastasierungsprozesse zu ziehen. Das Protein, welches in der Western Blot Analyse am besten von den getesteten Proteinen durch miR-30a-3p reguliert wurde, war Cofilin.

Cofilin gehört zu den Aktin-bindenden Proteinen, die zur Regulation der Dynamik der Aktinfilamente und somit zur Dynamik der Zelle beitragen. Durch den Abbau von F-Aktin und die Steigerung der zellulären G-Aktin-Konzentration sorgt es für den Umbau der Aktinfilamente und die Bewegung der Zelle²¹. Die Abb. 35 veranschaulicht die Funktion des Cofilins.

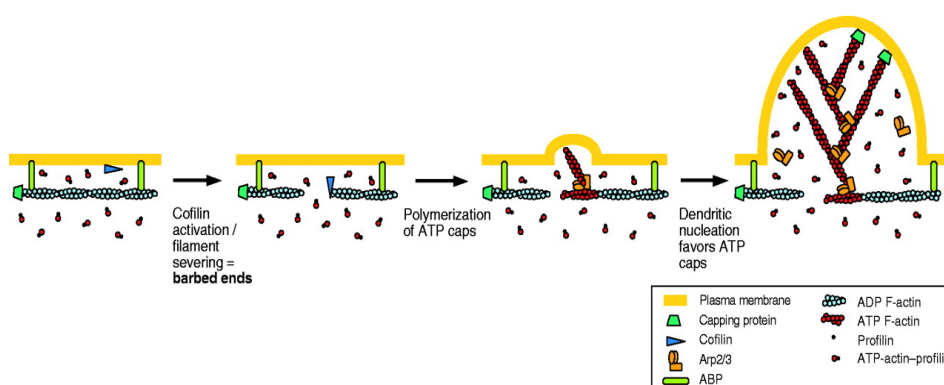


Abbildung 35: Funktion des Cofilins²¹

MiR-30a-3p wurde ausgewählt, da sie im ersten Teil der Arbeit eine bessere Prognosevorhersage erzielte als miR-10b-5p und durch Massenspektrometrie und 2D-Gel-Elektrophorese in Vorarbeiten als Regulator des Cofilins identifiziert werden konnte.

In dieser Arbeit konnte für miR-30a-3p nur auf Proteinebene nachgewiesen werden, dass bei Erhöhung der Konzentration der miR-30a-3p eine erniedrigte Konzentration des Cofilins vorliegt.

Die Erhöhung der Konzentration der miR-30a-3p erfolgte durch Transfektion der miR-30a-3p in eine metastasierte NZK-Zelllinie, die aufgrund ihrer Stabilität ausgewählt wurde. Bei der metastasierten Zelllinie wurde von einer erniedrigten Konzentration der miR-30a-3p ausgegangen. Weiterführende Untersuchungen müssten die miR-30a-3p-Expression auch in nicht metastasierten NZK-Zellenlinien untersuchen. Bei der Transfektion wurde miR-30a-3p ohne Plasmide als Vektoren in die Zelle transfiziert, um möglichst reelle Bedingungen zu gewährleisten, auch wenn sie als Stabilisatoren dienen und die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Transfektion erhöhen. Die Transfektionseffektivität wurde in dieser Arbeit zum einen durch Fluoreszenz zum anderen durch PCR überprüft. Weiterhin wurden Effizienzen bestimmt, welche Menge an transfizierter miRNA notwendig ist, um in der Zelle gemessen werden zu können.

Andere Arbeiten wie die Studie von Mizuno et al. zeigten, dass miRNAs die Aktivierungs- und Inaktivierungsvorgänge des Cofilins beeinflussen. In phosphorylierter Form ist Cofilin inaktiv, in desphosphorylierter Form aktiv. Die LIM-Kinase und TES-Kinase phosphorylieren Cofilin; SSH sowie CIN und PP1/PP2A dephosphorylieren Cofilin. Die Aktivierung der LIM Kinase erfolgt über die MAP-Kinase⁷⁸. Mizuno et al. beschreiben, dass die miR-134 die Translation der LIM-Kinase inhibiert und somit eine Desphosphorylierung von Cofilin nach sich zieht⁷⁸. Die Abb. 36 verdeutlicht die Aktivierungs- und Deaktivierungsprozesse.

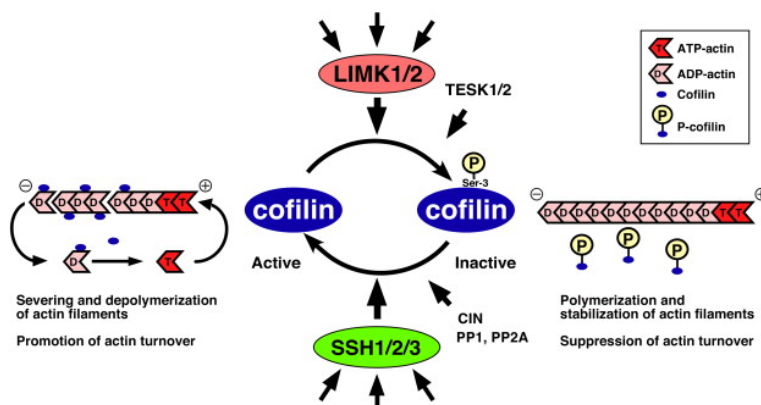


Abbildung 36: Regulierung des Cofilins⁷⁸

Dies zeigt, dass miRNAs an verschiedenen Stellen ganze Regulationskaskaden beeinflussen und daher die Untersuchung eines einzigen Proteins nicht ausreichend ist, um die Auswirkung auf das Metastasierungsverhalten einer Zelle zu eruieren. Die Analyse der Proteine, die im Signalweg das Cofilin beeinflussen, wäre zur Erschließung der Regulationsprozesse notwendig.

Da an den Metastasierungsprozessen nicht nur unterschiedliche Proteine, sondern auch unterschiedliche miRNAs beteiligt sind, ist davon auszugehen, dass eine miRNA alleine keinen Einfluss auf einen kompletten Metastasierungsprozess haben kann. Daher untersuchte die Arbeitsgruppe Hölters et al. miR-30a, c und e. Durch die Überexpression aller drei miRNAs konnte nach Western Blot Analyse eine signifikant erniedrigte Konzentration des Cofilins festgestellt werden. Dies zeigt, dass eine erniedrigte Konzentration der miR30er Familie, wie sie im metastasierten Gewebe vorliegt, zur erhöhten Konzentration des Cofilins und somit aufgrund seiner Funktion zur vermehrten Zellbewegung führt. Weitere Arbeiten beschreiben ebenfalls einen Zusammenhang mit Metastasierungsprozessen. Beispielsweise sehen Neely et al. Cofilin als potentiellen Marker im späten Stadium des kZNZKs⁸⁴.

Beim Blasenkarzinom wird in der Studie von Wang et al. aufgeführt, dass eine Überexpression des Cofilins zu einer Steigerung von Proliferation, Migration und Invasion von Tumorzellen führt, eine geringere Konzentration des Cofilins diese Prozesse inhibiert¹⁰⁷. Neben dem Cofilin wurden in dieser Arbeit weitere Proteine betrachtet, die auch Targetproteine der miR-30a-3p sind, jedoch andere Funktionen im Metastasierungsprozess haben.

Ein weiteres untersuchtes Targetprotein ist das Vinculin. Vinculin ist ein intrazelluläres Protein, welches für die Adhäsion der Zellen zuständig ist und somit auch eine Funktion in der Migration der Zelle hat. In der Arbeit von Ai et al. wird es als prognostischer Biomarker für das fortgeschrittene Prostatakarzinom (PCA) beschrieben. In PC3 Zellen liegt das Protein erhöht vor, die DNA und mRNA des Proteins sind amplifiziert und hochreguliert. Zudem zeigt die Unterdrückung der Genexpression eine Inhibition der Migration von PCA Zellen¹. Da miRNAs die Genexpression beeinflussen ist davon auszugehen, dass eine Regulation des Vinculin-Proteinlevel auf Genexpressionsebene durch miRNA stattfindet. Für miR-30a-3p konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch keine signifikante Korrelation zur Expression des Vinculins bestätigt werden.

Neben den am Strukturgerüst und der Stabilisierung beteiligten Proteinen der Zellen betrachtete diese Arbeit auch die Nucleosid-Diphosphat-Kinase als mögliches Target der miR-30a-3p.

Die Nucleosid-Diphosphat-Kinase ist an der Phosphorylierung und Dephosphorylierung wichtiger Energietransporter und an Schlüsselstellen wichtiger Zellmechanismen maßgeblich beteiligt. Sie wird durch die Nm23 Gen-Familie codiert. Das NM23-H1 Gen wirkt als Metastasen-Suppressor und inhibiert das Migrations- und Invasionspotential von Karzinomzellen. Eine erniedrigte Konzentration dieses Gens konnte in einigen metastasierten Tumoren wie Mamma- und Kolonkarzinom, Hepatozellulärem Karzinom sowie dem Melanom identifiziert werden. Zudem gibt es eine positive Korrelation hinsichtlich

der Expression und des Tumorwachstums³². Eine Regulation durch miR-30a-3p konnte in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden.

Ein weiteres Protein, das am Metastasierungsprozess beteiligt ist und als Targetprotein untersucht wurde, ist das Galectin-1.

Galectin-1 gehört zu den β -Galaktosid-bindenden Proteinen und moduliert Zellproliferation, -adhäsion und -migration. Weiterhin trägt es zur Interaktion der Tumorzellen untereinander und mit der Tumorumgebung bei. Im HCC konnte es bereits als Marker einer schlechten Prognose identifiziert werden¹¹³. You et al. konnten eine signifikant negative Korrelation bezüglich der Expression von Galectin und miR-22 bestätigen. Der Nachweis erfolgte durch Transfektion von wt-galectin-1/mut-galectin-1 Vektor und Plasmid/Mimic miR-22 und Messung der Luciferase Aktivität¹¹⁴. Die Arbeit von White et al. wies eine negativ signifikante Korrelation zwischen miR-22 und Galectin in NZK nach¹⁰⁹. Eine Korrelation mit miR-30a-3p in der vorliegenden Arbeit konnte nicht festgestellt werden.

Neben der Identifizierung des Targets auf Proteinebene wurde auf mRNA-Ebene die Expression von Cofilin und NDK bei Veränderung der miR-30a-3p-Konzentration analysiert. Hier konnte jedoch kein Expressionsunterschied festgestellt werden.

10. Ausblick

Die vorliegende Arbeit bestätigt, dass miR-30a-3p und miR-10b-5p im metastasierten NZK eine signifikant niedrigere Konzentration aufweisen als im nicht metastasierten NZK und im gesunden Nierengewebe. Ebenso zeigen die Analysen, dass die Expression der miR-30a-3p signifikant das metastasierungsfreie Überleben vorhersagen kann und somit als potentieller prognostischer Biomarker dient. Jedoch liegt eine zu geringe Sensitivität und Spezifität vor, um eine sichere Prognosevorhersage treffen zu können.

Daher ist es notwendig weitere klinische Studien durchzuführen, die prospektiv die erniedrigte Expression der miR-30a-3p in gewonnenem Nierengewebe bestätigen. Die Gewinnung des Nierengewebes sollte dabei zum einen durch Nierenbiopsie zum anderen durch operativ entferntes Material erfolgen. Dadurch kann zusätzlich verglichen werden, wie viel Gewebe ausreichend ist, um eine signifikante Aussage zu treffen. Des Weiteren sollte eine höhere Patientenzahl betrachtet werden.

Da jedoch eine miRNA alleine nicht an den komplexen Metastasierungsprozessen beteiligt sein kann, wurden bereits in der Arbeitsgruppe von Heinzlmann et al. vier miRNAs, unter anderem miR-30a-3p, zu einer miRNA-Signatur zusammengefasst. Diese miRNA-Signatur konnte eine hoch spezifische und sensitive Vorhersage des metastasierungsfreien Überlebens treffen. Es gilt durch klinische Studien und die Analyse der Expression der miRNA-Signatur miRNAs als prognostische Marker in die klinische Praxis zu integrieren, um so frühzeitig die Metastasierungswahrscheinlichkeit des NZKs vorherzusagen. Dadurch kann für den Patienten die Behandlung angepasst werden, bei hoher Metastasierungswahrscheinlichkeit eine engmaschige Nachsorge erfolgen oder eine adjuvante Therapie angestrebt werden. Darüber hinaus könnten miRNAs auch zur Optimierung der Targettherapie herangezogen werden. Ist bekannt auf welches Targetprotein die veränderte miRNA wirkt, kann potenziell speziell dieses Targetprotein oder Signalwege, die dieses Targetprotein regulieren, beeinflusst werden, um den Metastasierungsprozess zu stoppen.

11. Literatur

1. Ai J, Jin T, Yang L, Wei Q, Yang Y, Li H, Zhu Y (2017) Vinculin and filamin-C are two potential prognostic biomarkers and therapeutic targets for prostate cancer cell migration. *Oncotarget* 8 (47): 82430-82436
2. Algaba F, Akaza H, López-Beltrán A, Martignoni G, Moch H, Montironi R, Reuter V (2011) Current pathology keys of renal cell carcinoma *Eur Urol.* 60(4): 634-43
3. Baumgart S, Hölters S, Ohlmann CH, Bohle R, Stöckle M, Ostefeld MS, Dyrskjøt L, Junker K, Heinzlmann J (2017) Exosomes of invasive urothelial carcinoma cells are characterized by a specific miRNA expression signature. *Oncotarget* 8(35):58278-58291
4. Bellmunt J, Puente J, Garcia de Muro J, Lainez N, Rodríguez C, Duran I, Spanish Society for Medical Oncology (2014) SEOM clinical guidelines for the treatment of renal cell carcinoma. *Clin Transl Oncol.* 16:1043-50
5. Bianchi M, Sun M, Jeldres C, Shariat SF, Trinh QD, Briganti A, Tian Z, Schmitges J, Graefen M, Perrotte P, Menon M, Montorsi F, Karakiewicz PI (2012) Distribution of metastatic sites in renal cell carcinoma: a population-based analysis. *Ann Oncology* 23(4):973-80
6. Blom JH, van Poppel H, Maréchal JM, Jacqmin D, Schröder FH, de Prijck L, Sylvester R, EORTC Genitourinary Tract Cancer Group (2009) Radical nephrectomy with and without lymph-node dissection: final results of European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) randomized phase 3 trial 30881, *Eur Urol.* 55(1):28-34
7. Bracht JR, Van Wynsberghe PM, Mondol V, Pasquinelli AE (2010) Regulation of lin-4 miRNA expression, organismal growth and development by a conserved RNA binding protein in *C. elegans*. *Dev Biol.* 348(2):210-21
8. Brennecke J, Hipfner DR, Stark A, Russell RB, Cohen SM (2003) bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene *hid* in *Drosophila*. *Cell.* 113(1):25-36
9. Büttner F, Winter S, Rausch S, Reustle A, Kruck S, Junker K, Stenzl A, Agaimy A, Hartmann A, Bedke J, Schwab M, Schaeffeler E (2015) Survival Prediction of Clear Cell Renal Cell Carcinoma Based on Gene Expression Similarity to the Proximal Tubule of the Nephron. *Eur Urol.* 68:1016-1020
10. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM (2004) Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(9):2999-3004
11. Calin G, Dumitru C, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM (2002) Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:15524-9
12. Capitanio U, Montorsi F (2016) Renal cancer. *Lancet* 387:894-906
13. Chen F, Liu X, Cheng Q, Zhu S, Bai J, Zheng J (2016) RUNX3 regulates renal cell carcinoma metastasis via targeting miR-6780a-5p/E-cadherin/EMT signaling axis. *Oncotarget*
14. Chen L, Jin Y, Wang L, Sun F, Yang X, Shi M, Zhan C, Shi Y, Wang Q (2017) Identification of reference genes and miRNAs for qRT-PCR in human esophageal squamous cell carcinoma. *Med Oncol.* 34(1):2
15. Cho E, Adami HO, Lindblad P (2011) Epidemiology of renal cell cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 25:651-665
16. Choueiri TK, Hessel C, Halabi S, Sanford B, Michaelson MD, Hahn O, Walsh M, Olencki T, Picus J, Small EJ, Dakhil S, Feldman DR, Mangeshkar M, Scheffold C, George D, Morris MJ (2018) Cabozantinib versus sunitinib as initial therapy for metastatic renal cell carcinoma of intermediate or poor risk (Alliance A031203 CABOSUN randomised trial): Progression-free survival by independent review and overall survival update. *Eur J Cancer.* 94:115–125
17. Chow WH, Dong LM, Devesa SS (2010) Epidemiology and risk factors for kidney cancer. *Nat Rev Urol.* 7 (5):245-257

18. Dabestani, S, Marconi L, Bex A (2016) Metastasis therapies for renal cancer. *Current Opinion in Urology* 26 (6):566-572
19. Dabestani S, Marconi L, Hofmann F, Stewart F, Lam TB, Canfield SE, Staehler M, Powles T, Ljungberg B, Bex A (2014) Local treatments for metastases of renal cell carcinoma: a systematic review. *Lancet Oncology* 15(12):e549-61
20. Davis BN, Hata A (2009) Regulation of MicroRNA Biogenesis: A miRiad of mechanisms. *Cell Communication & Signaling* 7:18
21. DesMarais V, Ghosh M, Eddy R, Condeelis J (2005) Cofilin takes the lead. *Journal of Cell Science* 118 (1):19-26
22. DGHO Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und medizinische Onkologie [online im Internet: [https://www.dgho.de/publikationen/stellungnahmen/fruehe-nutzenbewertung/"substaniname"-nierenzellkarzinom-dgho-dgu-stellungnahme-20180222.pdf](https://www.dgho.de/publikationen/stellungnahmen/fruehe-nutzenbewertung/); Stand 04.01.2019 15:00]]
23. Di Leva G, Garofalo M, Croce CM (2014) microRNAs in cancer *Annu Rev Pathol.* 9: 287–314.:
24. Doehn C, Grünwald V, Steiner T, Follmann M, Rexer H, Krege S (2016) Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Nierenzellkarzinoms. *Dtsch Arztebl Int* 113:590-6
25. Doehn C, Jocham D (2004) Immunotherapy of renal cell carcinoma: Results From Current Phase-III-Trails. *Aktuelle Urologie* 35 (2):21- 129
26. Doench JG, Sharp PA (2004) Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes & Development* 18 (5):504-511
27. Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn (2004) World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. Lyon: IARC Press.
28. Escudier B, Pluzanska A, Koralewski P, Ravaud A, Bracarda S, Szczylik C, Chevreau C, Filipek M, Melichar B, Bajetta E, Gorbunova V, Bay JO, Bodrogi I, Jagiello-Gruszfeld A, Moore N; AVOREN Trial investigators (2007) Bevacizumab plus interferon alfa-2a for treatment of metastatic renal cell carcinoma: a randomised, double-blind phase III trial. *Lancet.* 370(9605):2103-11.
29. Escudier B, Porta C, Schmidinger M, Algaba F, Patard JJ, Khoo V, Eisen T, Horwich A, ESMO Guidelines Working Group (2014) Renal cell carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology* 25 (3):49-56
30. Escudier B, Sharma P, McDermott DF, George S, Hammers HJ, Srinivas S, Tykodi SS, Sosman JA, Procopio G, Plimack ER, Castellano D, Gurney H, Donskov F, Peltola K, Wagstaff J, Gauler TC, Ueda T, Zhao H, Waxman IM, Motzer RJ; CheckMate 025 investigators (2017) CheckMate 025 Randomized Phase 3 Study: Outcomes by Key Baseline Factors and Prior Therapy for Nivolumab Versus Everolimus in Advanced Renal Cell Carcinoma. *Eur Urol.*: 72(6):962-971
31. Esquela-Kerscher A, Slack FJ (2006) Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*: 6(4):259-69
32. Farkas Z, Fancsalszky L, Saskóí É, Gráf A, Tárnok K, Mehta A, Takács-Vellai K (2017) The dosage-dependent effect exerted by the NM23-H1/H2 homolog NDK-1 on distal tip cell migration in *C. elegans* *Lab Invest.*
33. Fedorko M, Pacik D, Wasserbauer R, Juracek J, Varga G, Ghazal M, Nussir MI (2016)MicroRNAs in the pathogenesis of renal cell carcinoma and their diagnostic and prognostic utility as cancer biomarkers. *Int J Biol Markers* 31 (1):26-37
34. Ficarra V, Novara G, Secco S, et al. (2009) Preoperative aspects and dimensions used for an anatomical (PADUA) classification of renal tumours in patients who are candidates for nephron-sparing surgery. *Eur Urol* 56:786–793
35. Garofalo M, Croce CM (2013) MicroRNAs as therapeutic targets in chemoresistance *Drug Resist* 16(0):10.1016
36. Gati A, Kouidhi S, Marrakchi R, El Gaaied A, Kourda N, Derouiche A, Chebil M, Caignard A, Perier A (2014) Obesity and renal cancer: Role of adipokines in the tumor-immune system conflict. *Oncolimmunology* 3:e27810

37. Ge YZ, Xin H, Lu TZ, Xu Z, Yu P, Zhao YC, Li MH, Zhao Y, Zhong B, Xu X, Zhou LH, Wu R, Xu LW, Wu JP, Li WC, Zhu JG, Jia RP (2015) MicroRNA expression profiles predict clinical phenotypes and prognosis in chromophobe renal cell carcinoma. *Sci Rep* 5:10328
38. Gervais DA, McGovern FJ, Arellano RS, McDougal WS, Mueller PR (2005) Radiofrequency ablation of renal cell carcinoma: part 1, Indications, results, and role in patient management over a 6-year period and ablation of 100 tumors *AJR Am J Roentgenol* 185
39. Grimm J, Zeuschner P, Janssen M, Wagenpfeil S, Hartmann A, Stöhr C, Keck B, Kahlmeyer A, Stöckle M, Junker K (2019) Metastatic risk stratification of clear cell renal cell carcinoma patients based on genomic aberrations. *Genes Chromosomes Cancer* 58(9):612-618
40. Ha M, Kim VN (2014) Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 15(8):509-24
41. Haas NB, Manola J, Uzzo RG, et al. (2016) Adjuvant sunitinib or sorafenib for high-risk, non-metastatic renal-cell carcinoma (ECOG-ACRIN E2805): a double-blind, placebo-controlled, randomised, phase 3 trial. *Lancet* 387:2008-16
42. Haferkamp A, Bastian PJ, Jakobi H, Pritsch M, Pfitzenmaier J, Albers P, Hallscheidt P, Müller SC, Hohenfellner M (2007) Renal cell carcinoma with tumor thrombus extension into the vena cava: prospective long-term followup. *J Urol.* 177(5):1703-1708
43. He C, Chen ZY, Li Y, Yang ZQ, Zeng F, Cui Y, He Y, Chen JB, Chen HQ (2019) miR-10b suppresses cell invasion and metastasis through targeting HOXA3 regulated by FAK/YAP signaling pathway in clear-cell renal cell carcinoma. *BMC Nephrol.* 20 (1):127
44. Heinzelmann J, Arndt M, Pleyers R, Fehlmann T, Hoelters S, Zeuschner P, Vogt A, Pryalukhin A, Schaeffeler E, Bohle RM, Gajda M, Janssen M, Stoeckle M, Junker K (2019) 4-miRNA Score Predicts the Individual Metastatic Risk of Renal Cell Carcinoma Patients. *Ann Surg Oncol* 26(11):3765-3773
45. Heinzelmann J, Unrein A, Wickmann U, Baumgart S, Stapf M, Szendroi A, Grimm MO, Gajda MR, Wunderlich H, Junker K (2014) MicroRNAs with prognostic potential for metastasis in clear cell renal cell carcinoma: a comparison of primary tumors and distant metastases. *Ann Surg Oncol* 21 (3):1046–1054
46. Heng DY, Xie W, Regan MM, et al. (2013) External validation and comparison with other models of the International Metastatic Renal-Cell Carcinoma Database Consortium prognostic model: a population-based study. *Lancet Oncol* 14:141–148
47. Hoffmann NE, Bischof JC (2002) The cryobiology of cryosurgical injury. *Urology*, 60 (1): 40–49:
48. Huang C, Yuan N, Wu L, Wang X, Dai J, Song P, Li F, Xu C, Zhao X (2017) An integrated analysis for long noncoding RNAs and microRNAs with the mediated competing endogenous RNA network in papillary renal cell carcinoma. *Onco Targets Ther* 10:4037-4050
49. Huang ZM, Yang J, Shen XY, Zhang XY, Meng FS, Xu JT, Zhang BF, Gao HJ (2009) MicroRNA expression profile in non-cancerous colonic tissue associated with lymph node metastasis of colon cancer. *Journal of Digestive Diseases* 10 (3):188-194
50. Hudes G, Carducci M, Tomczak P, Dutcher J, Figlin R, Kapoor A, Staroslawska E, Sosman J, McDermott D, Bodrogi I, Kovacevic Z, Lesovoy V, Schmidt-Wolf IG, Barbarash O, Gokmen E, O’Toole T, Lustgarten S, Moore L, Motzer RJ; Global ARCC Trial (2007) emsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma. *N Engl J Med.* 31;356(22):2271-81
51. Jocham D, Miller K (2007) *Praxis der Urologie-Band II.* 3. Auflage Thieme Verlag Stuttgart, New York
52. Junker K, Ficarra V, Kwon ED, Leibovich BC, Thompson RH, Oosterwijk E (2013) Potential role of genetic markers in the management of kidney cancer. *European Urology* 63(2):333-340
53. Kai ZS, Pasquinelli AE (2010) MicroRNA assassins: factors that regulate the disappearance of miRNAs. *Nature structural & molecular biology* 17 (1):5-10
54. Karami S, Daugherty SE, Purdue MP (2015) A prospective study of alcohol consumption and renal cell carcinoma risk. *Int J Cancer* 137:238–242
55. Keller T (2017) ROC-Kurven-Analyse. ACOMED-statisitk, Leipzig [online im Internet: <http://www.medi-learn.de/humanmedizin/medizinstudium-vorklinik/artikel/ROC-Kurven-Analyse-Seite1.php> [Stand: 16.07.2017 15:30]

56. Khella HW, Scorilas A, Mozes R, Mirham L, Lianidou E, Krylov SN, Lee JY, Ordon M, Stewart R, Jewett MA, Yousef GM (2015) Low expression of miR-126 is a prognostic marker for metastatic clear cell renal cell carcinoma. *Am J Pathol.* 185(3):693-703
57. Khella HW, White NM, Faragalla H, Gabril M, Boazak M, Dorian D, Khalil B, Antonios H, Bao TT, Pasic MD, Honey RJ, Stewart R, Pace KT, Bjarnason GA, Jewett MA, Yousef GM (2012) Exploring the role of miRNAs in renal cell carcinoma progression and metastasis through bioinformatic and experimental analyses. *Tumour Biology* 33:131-140
58. Khella HWZ, Daniel N, Youssef L, Scorilas A, Nofech-Mozes R, Mirham L, Krylov SN, Liandeau E, Krizova A, Finelli A, Cheng Y, Yousef GM (2017) miR-10b is a prognostic marker in clear cell renal cell carcinoma. *J Clin Pathol.* 70(10):854-859
59. Kloosterman WP, Plasterk RH (2006) The diverse functions of microRNAs in animal development and disease. *Developmental Cell* 11 (4):441-50
60. Kowalik CG, Palmer DA, Sullivan TB, Teebagy PA, Dugan JM, Libertino JA, Burks EJ, Canes D, Rieger-Christ KM (2017) Profiling microRNA from nephrectomy and biopsy specimens predicts progression and survival in clear cell renal cell carcinoma. *BJU Int.* 120(3):428-440
61. Kutikov A, Uzzo RG (2009) The R.E.N.A.L. nephrometry score: a comprehensive standardized system for quantitating renal tumor size, location and depth- *J Urol* 182:844–853
62. Lee CT, Katz J, Fearn PA, et al. (2002) Mode of presentation of renal cell carcinoma provides prognostic information. *Urol Oncol* 7(4):135-40
63. Lee R, Feinbaum R, Ambros V. (1993)The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75 :843-54
64. Leibovich BC, Blute ML, Chevillie JC, Lohse CM, Frank I, Kwon ED, Weaver AL, Parker AS, Zincke H (2003) Prediction of progression after radical nephrectomy for patients with clear cell renal cell carcinoma: a stratification tool for prospective clinical trials. *Cancer* 97(7):1663-1671
65. Leibovich BC, Chevillie JC, Lohse CM, Zincke H, Frank I, Kwon ED, Merchan JR, Blute ML (2005) A scoring algorithm to predict survival for patients with metastatic clear cell renal cell carcinoma: a stratification tool for prospective clinical trials. *The Journal of Urology* 174(5):1759-63
66. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Nierenzellkarzinoms, Langversion 1.2 (2017) AWMF Registernummer: 043/017OL [online im Internet] http://leitlinienprogramm-onkologie.de/uploads/tx_sbdownloader/LL_Nierenzell_Langversion_1.2.pdf [Stand: 20.06.2017 12:30]
67. Levi F, Ferlay J, Galeone C, et al. (2008) The changing pattern of kidney cancer incidence and mortality in Europe: *BJU Int* 101:949–958
68. Li QJ, Zhou L, Yang F, Wang GX, Zheng H, Wang DS, He Y, Dou KF (2012) MicroRNA-10b promotes migration and invasion through *CADM1* in human hepatocellular carcinoma cells. *Tumour Biol.* 33(5):1455-65
69. Li Y, Chen D, Li Y, Jin L, Liu J, Su Z, Qi Z, Shi M, Jiang Z, Ni L, Yang S, Gui Y, Mao X, Chen Y, Lai Y (2016) Oncogenic cAMP responsive element binding protein 1 is overexpressed upon loss of tumor suppressive miR-10b-5p and miR-363-3p in renal cancer. *Oncol Rep.* 35(4):1967-78
70. Liu F, Wu L, Wang A, Xu Y, Luo X, Liu X, Hua Y, Zhang D, Wu S, Lin T, He D, Wei G, Chen S (2017) MicroRNA-138 attenuates epithelial-to-mesenchymal transition by targeting *SOX4* in clear cell renal cell carcinoma. *Am J Transl Res* 9(8):3611-3622
71. Ljungberga B, Bensalah K, Canfieldc S, Dabestani S, Hofmanne F, Horaf M, Kuczykg M A, Lamh T, Marconii L, Merseburgerg A S, Muldersj P, Powlesk T, Staehlerl M, Volpem A, Bexn A (2015) EAU Guidelines on Renal Cell Carcinoma: 2014 Update. *European Urology* 67:913-924
72. Ljungberg B, Albiges L, Bensalah K, Bex A, Giles R.H, Hora M, Kuczyk M.A, Lam T, Marconi L, Merseburger A.S, T. Powles, Staehler M, Volpe A Guidelines Associates: Dabestani S, Fernandez-Pello Montes D, Hofmann F, Tahbaz R (2016) Renal Cell Carcinoma. *European Association of Urology* [online im internet: <https://uroweb.org/guideline/renal-cell-carcinoma/> Stand: 20.06.17 12:00]

73. Ljungberg B, Cowan NC, Hanbury DC, Hora M, Kuczyk MA, Merseburger AS, Patard JJ, Mulders PF, Sinescu IC; European Association of Urology Guideline Group (2010), *European Urology* 58: 398-406
74. Mangolini A, Ferracin M, Zanzi MV, Saccenti E, Ebnaof SO, Poma VV, Sanz JM, Passaro A, Pedriali M, Frassoldati A, Querzoli P, Sabbioni S, Carcoforo P, Hollingsworth A, Negrini M (2015) Diagnostic and prognostic microRNAs in the serum of breast cancer patients measured by droplet digital PCR. *Biomark Res.* 3:12
75. Manski D (2017) *Urologielehrbuch.de Das Nierenzellkarzinom/Diagnostik Ausgabe 2017* Stadtbergen
76. Manski D (2017) *Urologielehrbuch.de Therapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms/Prognose/Motzer Kriterien Ausgabe 2017*, Stadtbergen
77. Mathew LK, Lee SS, Skuli N, Rao S, Keith B, Nathanson KL, Lal P, Simon MC (2014) Restricted expression of miR-30c-2-3p and miR-30a-3p in clear cell renal cell carcinomas enhances HIF2 α activity. *Cancer Discov.* 4(1):53-60
78. Mizuno K (2013) Signaling mechanisms and functional roles of cofilin phosphorylation and dephosphorylation. *Cell Signal.* 25(2):457-69
79. Moch H (2016) WHO-ISUP-Graduierungssystem für Nierenkarzinome. *Der Pathologe Ausgabe 4/2016* [online im Internet: <https://www.springermedizin.de/nierenkarzinom/pathologie/who-isup-graduierungssystem-fuer-nierenkarzinome/10239142>. Stand: 15.09.2019 21:10]
80. Motzer RJ, Hutson TE, McCann L, Deen K, Choueiri TK (2014) Overall survival in renal-cell carcinoma with pazopanib versus sunitinib. *N Engl J Med.* 370 (18):1769-70
81. Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, Michaelson MD, Bukowski RM, Rixe O, Oudard S, Negrier S, Szczylik C, Kim ST, Chen I, Bycott PW, Baum CM, Figlin RA (2007) Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *N Engl J Med.* 356(2):115-24
82. Motzer RJ, Nosov D, Eisen T, Bondarenko I, Lesovoy V, Lipatov O, Tomczak P, Lyulko O, Alyasova A, Harza M, Kogan M, Alekseev BY, Sternberg CN, Szczylik C, Cella D, Ivanescu C, Krivoschik A, Strahs A, Esteves B, Berkenblit A, Hutson TE (2013) Tivozanib versus sorafenib as initial targeted therapy for patients with metastatic renal cell carcinoma: results from a phase III trial. *J Clin Oncol.* 31(30):3791-9
83. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine (2015) Real-Time qRT-PCR [online im Internet: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techqpcr> [Stand: 04.07.2017 17:30]]
84. Neely BA, Wilkins CE, Marlow LA, Malyarenko D, Kim Y, Ignatchenko A, Sasinowska H, Sasinowski M, Nyalwidhe JO, Kislinger T, Copland JA, Drake RR (2016) Proteotranscriptomic Analysis Reveals Stage Specific Changes in the Molecular Landscape of Clear-Cell Renal Cell Carcinoma. *PLoS ONE* 11(4):e0154074
85. Nicoloso MS, Spizzo R, Shimizu M, Rossi S, Calin GA (2009) MicroRNAs—the micro steering wheel of tumour metastases. *Nat Rev Cancer* 9:293–302
86. Palsdottir HB, Hardarson S, Petursdottir V, Jonsson A, Jonsson E, Sigurdsson MI, Einarsson GV, Gudbjartsson T (2012) Incidental detection of renal cell carcinoma is an independent prognostic marker: results of a long-term, whole population study. *J Urol.* 187(1):48-53
87. Pan W, Pang LJ, Cai HL, Wu Y, Zhang W, Fang JC (2019) MiR-1294 acts as a tumor suppressor in clear cell renal cell carcinoma through targeting HOXA6. *Eur Rev Med Pharmacol Sci:* 23(9):3719-3725
88. Pan X, Zhao L, Quan J, Liu K, Lai Y, Li Z, Zhang Z, Xu J, Xu W, Guan X, Li H, Yang S, Gui Y, Chen Y, Lai Y (2019) MiR-378a-5p acts as a tumor suppressor in renal cell carcinoma and is associated with the good prognosis of patients. *Am J Transl Res.* 15;11(4):2207-2218
89. Pasquinelli AE (2012) MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nature Reviews Genetics* 13:271-282
90. Patard JJ, Leray E, Cindolo L, Ficarra V, Rodriguez A, De La Taille A, Tostain J, Artibani W, Abbou CC, Guillé F, Chopin DK, Lobel B (2004) Multi-institutional validation of a symptom based classification for renal cell carcinoma. *The Journal of Urology* 172(3):858-862

91. Patard JJ, Leray E, Rodriguez A, Rioux-Leclercq N, Guillé F, Lobel B (2003) Correlation between symptom graduation, tumor characteristics and survival in renal cell carcinoma. *European Urology* 44 (2):226–232
92. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L (2002) Relative Expression Software Tool (REST©) for group wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research* 30(9):E36
93. Pichler M, Hutterer GC, Chromecki TF, Jesche J, Groselj-Strele A, Kampel-Kettner K, Pummer K, Zigeuner R (2012) Prognostic Value of the Leibovich Prognosis Score Supplemented by Vascular Invasion for Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *The Journal of Urology* 187(3):834-839
94. Ravaud A, Motzer RJ, Pandha HS, et al (2016) Adjuvant Sunitinib in High-Risk Renal-Cell Carcinoma after Nephrectomy. *N Engl J Med* 375(23):2246-2254
95. Schaefer A, Jung M, Kristiansen G, Lein M, Schrader M, Miller K, Erbersdobler A, Stephan C, Jung K (2009) Mikro-RNA in der Uroonkologie Neue Hoffnungen für die Diagnostik und Therapie von Tumoren? *Der Urologe* 48(8):877-85
96. Schmidt G (2002) Sonographische Differentialdiagnose- Lehratlas zur systematischen Bildanalyse mit über 2500 Befundbeispielen Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York
97. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A (2014) Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 64(1):9–29
98. Simmons MN, Ching CB, Samplaski MK, Park CH, Gill IS (2010) Kidney tumor location measurement using the C index method. *J Urol*, 183:1708–1713
99. Sioud M, Cekaite L (2010) Profiling of miRNA expression and prediction of target genes. *Methods Mol Biol* 629:257-71
100. Srinivasan R, Ricketts CJ, Sourbier C, Linehan WM (2015) New strategies in renal cell carcinoma: targeting the genetic and metabolic basis of disease. *Clin Cancer Res* 21:10–17
101. Sternberg CN, Hawkins RE, Wagstaff J, Salman P, Mardiak J, Barrios CH, Zarba JJ, Gladkov OA, Lee E, Szczylik C, McCann L, Rubin SD, Chen M, Davis ID (2013) A randomised, double-blind phase III study of pazopanib in patients with advanced and/or metastatic renal cell carcinoma: final overall survival results and safety update. *Eur J Cancer*. 49(6):1287-96
102. Sun M, Abdollah F, Bianchi M, Trinh QD, Jeldres C, Thuret R, Tian Z, Shariat SF, Montorsi F, Perrotte P, Karakiewicz PI (2012) Treatment management of small renal masses in the 21st century: a paradigm shift. *Ann Surg Oncol*. 19(7):2380-2387
103. Theis RP, Dolwick Grieb SM, Burr D, Siddiqui T, Asal NR (2008) Smoking, environmental tobacco smoke, and risk of renal cell cancer: a population-based case-control study. *BMC Cancer* 8:387
104. Thompson RH, Leibovich BC, Lohse CM, Zincke H, Blute ML (2005) Complications of contemporary open nephron sparing surgery: a single institution experience, *J Urol*. 174(3):855-858
105. Universität Zürich (2016) Methodenberatung/Mann-Whitney-U-Test [online im Internet: <http://www.methodenberatung.uzh.ch/de/datenanalyse/unterschiede/zentral/mann.html> [Stand: 17.07.2017 12:30]]
106. Uzzo R, Bex A, Rini BI, Albiges L, Suarez C, Donaldson F, Asakawa T, Schiff C, Pal SK (2017) A phase III study of atezolizumab (atezo) vs placebo as adjuvant therapy in renal cell carcinoma (RCC) patients (pts) at high risk of recurrence following resection (IMmotion010). *Journal of Clinical Oncology* 35
107. Wang F, Wu D, Fu H, He F, Xu C, Zhou J, Li D, Li G, Xu J, Wu Q, Chen J, Su L, Wang W, Zhang S (2017) Cofilin 1 promotes bladder cancer and is regulated by TCF7L2. *Oncotarget* 8(54):92043-92054
108. Wang W, Lin H, Zhou L, Zhu Q, Gao S, Xie H, Liu Z, Xu Z, Wei J, Huang X, Zheng S (2014) MicroRNA-30a-3p inhibits tumor proliferation, invasiveness and metastasis and is downregulated in hepatocellular carcinoma. *Eur J Surg Oncol*. 40(11):1586-94:
109. White N M A, Masui O, Newsted D, Scorilas A, Romaschin A D, Bjarnason G A, Siu K W M, Yousef G M (2014) Galectin-1 has potential prognostic significance and is implicated in clear cell renal cell carcinoma progression through the HIF/mTOR signaling axis. *Br J Cancer* 110(5):1250-1259

110. Williams RD, Elliott AY, Stein N, Fraley EE (1978) In vitro cultivation of human renal cell cancer. II. Characterization of cell lines. *In Vitro* 14(9):779-786
111. Wojcicka A, Swierniak M, Kornasiewicz O, Gierlikowski W, Maciag M, Kolanowska M, Kotlarek M, Gornicka B, Koperski L, Niewinski G, Krawczyk M, Jazdzewski K (2014) Next generation sequencing reveals microRNA isoforms in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Int J Biochem Cell Biol.* 53:208-217
112. Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, Seike M, Kumamoto K, Yi M, Stephens RM, Okamoto A, Yokota J, Tanaka T, et al. (2006) Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis *Cancer Cell* 9:189-198
113. Yeh CC, Hsu CH, Shao YY, Ho WC, Tsai MH, Feng WC, Chow LP *Mol Cell Proteomics* (2015) Integrated Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture (SILAC) and Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation (iTRAQ) Quantitative Proteomic Analysis Identifies Galectin-1 as a Potential Biomarker for Predicting Sorafenib Resistance in Liver Cancer. *Mol Cell Proteomics* 14(6):1527-45
114. You Y, Tan JX, Dai HS, Chen HW, Xu XJ, Yang AG, Zhang YJ, Bai LH, Bie P (2016) MiRNA-22 inhibits oncogene galectin-1 in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* 7 (35): 57099-57116:
115. Youssef YM, White NM, Grigull J, Krizova A, Samy C, Mejia-Guerrero S, Evans A, Yousef GM (2011) Accurate molecular classification of kidney cancer subtypes using microRNA signature. *Eur Urol* 59(5):721-30
116. Zanardi E, Verzoni E, Grassi P, Necchi A, Giannatempo P, Raggi D, De Braud F, Procopio G (2015) Clinical experience with temsirolimus in the treatment of advanced renal cell carcinoma. *Ther Adv Urol.* 2015 Jun; 7(3):152–161
117. Zentrum für Krebsregisterdaten (2015) Robert-Koch-Institut [online im internet: http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Nierenkrebs/nierenkrebs_node.html] [Stand 04.01.17 17:45]
118. Zhang W1, Ni M2, Su Y3, Wang H1, Zhu S1, Zhao A4, Li G5 (2016) MicroRNAs in Serum Exosomes as Potential Biomarkers in Clear-cell Renal Cell Carcinoma. *Eur Urol Focus* S2405-4569(16):30144-4
119. Zucchetto A, Dal Maso L, Tavani A, et al. (2007) History of treated hypertension and diabetes mellitus and risk of renal cell cancer. *Ann Oncol* 18:596–600

12. Publikation

Die Ergebnisse der Doktorarbeit sind veröffentlicht in dem Paper von Joana Heinzelmann „4-miRNA Score Predicts the Individual Metastatic Risk of Renal Cell Carcinoma Patients“ im Journal Ann Surgical Oncology im Juli 2019 (impact factor: 3.857).

13. Danksagung

Ein besonderer Dank gilt dem gesamten Laborteam der Klinik für Urologie und Kinderurologie für die tatkräftige Unterstützung. Insbesondere hervorzuheben sind Alexander Vogt, Sophie Baumgart, Sebastian Hölters sowie meine Betreuerin Joana Heinzelmann und meine Doktormutter Frau Prof. Junker.

Ein weiteres Dankeschön an all diejenigen, die die Arbeit Korrektur gelesen haben. Vielen Dank an Johannes Linxweiler, Jan Philipp Kühn und Marie Lisa Eich.

Vielen Dank auch an meine Familie und Freunde, die mich auf dem Weg bis zur Fertigstellung dieser Arbeit in jeglicher Hinsicht begleitet und unterstützt haben.