

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

**Validierung und Targetidentifizierung von
differenziell exprimierten microRNAs in
Fernmetastasen des klarzelligen
Nierenzellkarzinoms**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2020

vorgelegt von: Robert Arne Schneeweiß

geb. am 24.03.1989 in Wiesbaden

Tag der Promotion: 21.12.2020

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

Berichterstatter: Prof. Dr. Kerstin Junker

Prof- Dr. Eckart Meese

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	4
2 Einleitung	9
2.1 Das Nierenzellkarzinom	9
2.1.1 Epidemiologie	9
2.1.2 Ätiologie	10
2.1.3 Histopathologische Klassifizierung der Nierenzelltumore	11
2.1.4 Genetik des klarzelligen NZK	13
2.1.5 TNM-Klassifikation, Malignitätsgrad und Prognose	13
2.1.6 Diagnostik	15
2.1.7 Therapie	16
2.2 MicroRNAs	20
2.2.1 Biogenese	20
2.2.2 Regulation der miRNA-Expression	22
2.2.3 Bedeutung von miRNAs in Tumorentstehung und Metastasierung	22
2.2.4 Bedeutung von miRNAs im NZK	24
3 Zielstellung	26
4 Material und Methodik	27
4.1 Biologische Materialien	27
4.2 Gewebeaufarbeitung	29
4.3 RNA-Isolation	29
4.4 Bestimmung der RNA-Konzentration und Reinheit	30
4.5 Quantitative Real-Time Polymerase Kettenreaktion	30
4.5.1 Reverse Transkription	31
4.5.2 qRT-PCR-Amplifikation	32
4.6 Zellkulturen	33
4.6.1 Auftauen der Zelllinie 786-O	34
4.6.2 Kultivierung der Zelllinie 786-O	34
4.7 Transiente Transfektion	34
4.7.1 Transfektion von miR-30c-2-3p und Ernten der Zellen	35
4.8 RNA-Isolation aus 786-O Zelllinie	36
4.9 Identifizierung der miRNA- <i>targets</i> durch 2D-Gelelektrophorese und Massenspektrometrie	36
4.10 Biostatistische Auswertung	38
4.10.1 Auswertung der miRNA Expression in FFPE-Proben	38
4.10.2 Auswertung der Transienten Transfektion	38

5 Ergebnisse	40
5.1 Vergleich der Expressionsmuster ausgewählter miRNAs in Primärtumoren und Metastasen mittels qRT-PCR.....	40
5.1.1 Bestimmung der Primereffizienzen	40
5.1.2 Quantifizierung der Expression von metastasierungsassoziierten miRNAs in Primärtumoren und Metastasen des klarzelligen NZK	41
5.1.3 Analyse der Expression von miR-375-3p in Metastasen des klarzelligen NZK.....	44
5.2 Transiente Transfektion von miR-30c-2-3p	45
5.2.1 Etablierung der transienten Transfektion von miR-30c-2-3p	45
5.2.2 Transiente Transfektion von miR-30c-2-3p.....	47
5.3 Identifizierung potentieller miRNA- <i>targets</i> durch 2D-DIGE und LC-MS/MS	48
6 Diskussion.....	52
7 Ausblick.....	58
8 Literaturverzeichnis	60
9 Anhang.....	72
10 Danksagungen	80
11 Lebenslauf.....	81

1 Zusammenfassung

Im klarzelligen Nierenzellkarzinom führt eine Metastasierung zu einer deutlichen Verschlechterung der Prognose. Es ist von zentraler Bedeutung, den Prozess der Metastasierung auf molekularbiologischer Ebene besser zu verstehen, um neue, spezifischere Therapiemöglichkeiten entwickeln zu können.

MicroRNAs sind einzelsträngige RNA-Moleküle, die eine wichtige regulative Rolle in der Expression von Genen einnehmen. In mehreren Studien konnten im klarzelligen Nierenzellkarzinom bereits Expressionsunterschiede zwischen Tumor- und Normalgewebe sowie zwischen metastasierten und nicht-metastasierten Primärtumoren nachgewiesen werden. Bisher ist jedoch wenig bekannt über die Expression in Metastasen des klarzelligen Nierenzellkarzinoms. Mittels *Microarray*-Analysen konnten Voruntersuchungen signifikante Unterschiede in der Expression diverser microRNAs in Primärtumoren und Metastasen in Lunge, Knochen und Gehirn aufzeigen. Unter anderem waren hier miR-30c-2-3p und miR-29c-5p signifikant dereguliert. Weiterhin wurden einzelne microRNAs detektiert, die spezifisch an einzelnen Metastasenorten einen Expressionsunterschied aufwiesen. So war die Expression von miR-375-3p speziell in Lungenmetastasen signifikant verändert. Die Ergebnisse der Expressionsunterschiede in der *Microarray*-Analyse von miR-30c-2-3p, miR-29c-5p und miR-375-3p sollen in dieser Arbeit mittels quantitativer *real-time* Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) validiert werden. Basierend auf den qRT-PCR-Ergebnissen wird der funktionelle Einfluss von miR-30c-2-3p mittels Identifizierung ihrer potenziellen Protein-*targets* untersucht.

Um die relative Genexpression von miR-30c-2-3p, miR-29c-5p und miR-375-3p durch eine qRT-PCR zu detektieren, wurde aus *formalin-fixed paraffin-embedded* (FFPE)-Proben total-RNA von nicht-metastasierten (n=15) und metastasieren Primärtumoren (n=10) sowie Fernmetastasen aus Lunge (n=8), Knochen (n=6) und Gehirn (n=7) isoliert.

Die Ergebnisse der Vorarbeiten für miR-30c-2-3p und miR-29c-5p im Vergleich nicht-metastasierter und metastasierter Primärtumoren konnten teilweise bestätigt werden. So waren miR-30c-2-3p und miR-29c-5p in metastasierten Primärtumoren weniger exprimiert als in nicht-metastasierten Primärtumoren, allerdings war der Unterschied nicht signifikant (miR-30c-2-3p: 1,7-fach; miR-29c-5p: 1,5-fach). Die Ergebnisse hinsichtlich der Expression in nicht-metastasierten Primärtumoren und Metastasen konnte vollständig bestätigt werden. Beide microRNAs waren signifikant herabreguliert in Metastasen der Lunge (miR-30c-2-3p: 4,3-fach, $p < 0,001$; miR-29c-5p: 1,8-fach, $p = 0,014$), Knochen (miR-30c-2-3p: 3-fach, $p = 0,006$; miR-29c-5p: 2,8-fach, $p = 0,001$) und des Gehirns (miR-30c-2-3p: 15,6-fach, $p < 0,001$; miR-29c-5p: 4,3-fach, $p < 0,001$). Nur teilweise bestätigt werden konnte die generell verminderte microRNA-Expression in den einzelnen Metastasenorten im Vergleich zu metastasierten

Primärtumoren. Für miR-30c-2-3p war dies in Lungenmetastasen (2,5-fach, $p=0,016$) und Hirnmetastasen (9-fach, $p=0,002$) möglich. Die Expression in Knochenmetastasen war tendenziell vermindert. MiR-29c-5p war in Hirnmetastasen 2,8-fach ($p=0,006$) weniger exprimiert. Für Lungen- und Knochenmetastasen war eine Tendenz festzustellen. In Zusammenschau der Ergebnisse fällt also auf, dass miR-30c-2-3p und miR-29c-5p zumindest tendenziell in metastasierten Primärtumoren niedriger exprimiert sind als in nicht-metastasierten Primärtumoren. Signifikant oder zumindest tendenziell sind sie in den Hauptmetastasierungsorten noch weiter herabreguliert. Die verminderte Expression der untersuchten microRNAs weist auf eine Beteiligung im Prozess der Metastasierung hin.

Weiterhin sollte überprüft werden, ob eine ortsspezifische Expression von miR-375-3p in Lungenmetastasen vorliegt. Die Ergebnisse der Vorarbeiten konnten vollständig bestätigt werden. miR-375-3p war in Lungenmetastasen sowohl im Vergleich zu nicht-metastasierten (19,6-fach, $p<0,001$) und metastasierten Primärtumoren (25,3-fach, $p=0,001$) als auch zu Hirnmetastasen (29,4-fach, $p=0,003$) und Knochenmetastasen (58,8-fach, $p=0,002$) überexprimiert. Diese Ergebnisse deuten auf differenzielle Prozesse in den verschiedenen Metastasenorten hin.

Basierend auf den Ergebnissen des ersten Teils der Arbeit wurde miR-30c-2-3p ausgewählt, um potenzielle Protein-*targets* zu identifizieren. Hierzu wurde miR-30c-2-3p mittels einer transienten Transfektion in der Zelllinie 786-O eines klarzelliges Nierenzellkarzinoms überexprimiert. Die *target*-Kandidaten wurden anschließend mittels zweidimensionaler differentieller Gelelektrophorese (2D-DIGE) und folgender *Liquid-Chromatographie-Massenspektrometrie/ Massenspektrometrie* (LC-MS/MS) ermittelt. Außerdem wurde darüber hinaus ein Abgleich der komplementären Nukleotidsequenzen von miR-30c-2-3p und den *messengerRNAs* der potenziellen *targets* durch das Programm miRWalk durchgeführt. Nach Analyse der Nukleotidsequenzen zeichnete sich einzig Cofilin als potenzielles *target* ab. Die *messengerRNAs* der übrigen Proteine waren nicht komplementär zu miR-30c-2-3p und können daher als direkte *targets* ausgeschlossen werden. Cofilin besitzt eine regulative Funktion auf die Dynamik des Zytoskeletts, indem es im Auf- und Abbau von Aktin beteiligt ist und somit das Migrationsverhalten von Zellen beeinflusst. Tumorzellen besitzen eine erhöhte Fähigkeit zur Migration, sodass die Ergebnisse darauf hindeuten, dass miR-30c-2-3p auf den Metastasierungsprozess des klarzelliges Nierenzellkarzinoms einen funktionellen Einfluss ausübt.

Abschließend lässt sich hervorheben, dass die Ergebnisse der vorliegenden Promotionsarbeit durch die Verifizierung der microRNA-Expression und Identifizierung potenzieller *targets* von miR-30c-2-3p einen Beitrag zum besseren Verständnis des Metastasierungsprozesses im klarzelliges Nierenzellkarzinom leisten. Basierend auf diesen Ergebnissen müssen weitere Studien klären, ob sich die erprobten microRNAs für neue

Therapieansätze oder Prognosemarker für Metastasen im klarzelligem Nierenzellkarzinom bewähren.

Abstract

The prognosis of clear cell renal cell carcinoma still depends significantly on the status of metastases. It is therefore essential for improving the therapeutic options to achieve a better understanding of the metastatic mechanisms on molecular base.

MicroRNAs are single-stranded RNA-molecules that play a central role in regulating the expression of genes. For clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) several studies could already demonstrate different microRNA-expression in primary tumors and normal kidney tissue as well as in non-metastatic and metastatic primary tumors. Nonetheless there exist few studies that examine the microRNA-expression in metastatic tissue. Previous microarray-analyses showed significant differences in the expression of several microRNAs comparing primary tumors and metastases of lung, bones and the brain in ccRCC. Among others miR-30c-2-3p and miR-29c-5p were significantly deregulated. Furthermore, some microRNAs showed specific alterations in specific metastasis locations. MiR-375-3p was characteristically alternated in metastasis of the lung. The present study intends to validate these results by *quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction* (qRT-PCR). Based on the results of the qRT-PCR the functional effect of miR-30c-2-3p has to be further investigated by identifying potential target-candidates on protein level.

To detect the relative gene expression of miR-30c-2-3p, miR-29c-5p and miR-375-3p via qRT-PCR total-RNA was extracted from formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) samples including 15 non-metastatic, and 10 metastatic, primary tumors as well as distant metastases of the lung (n=8), bones (n=6) and brain (n=7).

The results of the microarray-analyses for miR-30c-2-3p and miR-29c-5p in non-metastatic and metastatic primary tumors have been partly confirmed. Thus miR-30c-2-3p and miR-29c-5p were less expressed in metastatic primary tumors than in non-metastatic primary tumors. The difference here was not significant (miR-30c-2-3p: 1,7-fold; miR-29c-5p: 1,5-fold). With regard to their expression in non-metastatic primary tumors and metastases the results could completely be affirmed. The expression of both microRNAs was significantly decreased in metastases to the lung (miR-30c-2-3p: 4,3-fold, $p < 0,001$; miR-29c-5p: 1,8-fold, $p = 0,014$), bones (miR-30c-2-3p: 3-fold, $p = 0,006$; miR-29c-5p: 2,8-fold, $p = 0,001$) and brain (miR-30c-2-3p: 15,6-fold, $p < 0,001$; miR-29c-5p: 4,3-fold, $p < 0,001$). Partially confirmed was the overall decreased expression in the single metastatic sites compared to metastatic primary tumors. MiR-30c-2-3p was significantly decreased in metastases to the lung (2,5-fold, $p = 0,016$) and brain (9-fach, $p = 0,002$). In bone metastases miR-30c-2-3p showed a trend to lower expression. MiR-29c-5p was significantly decreased in brain metastases (2,8-fold, $p < 0,006$). MiR-29c-5p was not significantly down-regulated in metastases to the lung and bones. Nonetheless, a trend was shown. In conclusion, miR-30c-2-3p and miR-29c-5p

were at least partially down-regulated in metastatic primary tumors compared to non-metastatic primary tumors. Both were even more down-regulated in the main metastatic sites. This could be demonstrated either significantly or as a trend. Hence, the decreased expression point to a participation of the examined microRNAs in the metastasis process.

Another aim of the present work was to validate the expression of miR-375-3p that was specifically up-regulated in lung metastases. The results of the previous work could completely be affirmed. Not only was miR-375-3p significantly up-regulated in lung metastases compared to non-metastatic (19,6-fold, $p < 0,001$) and metastatic (25,3-fold, $p = 0,001$) primary tumors but also to bone (58,8-fold, $p = 0,002$) and brain (29,4-fold, $p = 0,003$) metastases. These results indicate specific molecular processes depending on the metastatic site.

Based on the findings of the first part miR-30c-2-3p was elected to investigate its potential target candidates. Thus, miR-30c-2-3p was up-regulated in the cell line 786-O of a clear cell renal cell carcinoma by transient transfection. The target-candidates were thereafter detected by two dimensional gel electrophoresis and liquid-chromotography mass spectrometry/mass-spectrometry. Moreover, a comparison of the nucleotide sequences of miR-30c-2-3p and complementary messengerRNA of the detected proteins was made by the software miRWalk. After matching the nucleotide sequences cofilin remained as the only potential target. All other detected proteins did not show a sufficient complementary between the nucleotide sequence of their messengerRNAs and miR-30c-2-3p and hence can be excluded. Cofilin is an actor in the dynamics of the cytoskeleton regulating the assembling and degrading of actin. Thus, it determines the ability of cells to migrate. Tumor cells tend to possess an increased activity of migration. Therefore, the results of the present work point to a functional role of miR-30c-2-3p in the metastasis process.

In conclusion, the results of this study lead to a better understanding of the metastasis process in ccRCC by verifying microRNA expression and identifying potential targets of miR-30c-2-3p. Based on these results further research needs to be conducted to clarify the potential of the investigated microRNAs as therapeutic options or as prognostic markers.

2 Einleitung

2.1 Das Nierenzellkarzinom

2.1.1 Epidemiologie

Das Nierenzellkarzinom (NZK) macht circa 2-3 % aller Tumorerkrankungen bei Erwachsenen in Industrieländern aus. 2018 stand das NZK an 16. Stelle der weltweit häufigsten Krebsneuerkrankungen (Bray *et al.*, 2018; Ferlay *et al.*, 2018). Etwa 90 % aller Nierentumore sind NZK. Seit 2008 ist bei beiden Geschlechtern in Deutschland ein Rückgang der Erkrankungsrate zu beobachten. Das mittlere Erkrankungsalter liegt deutschlandweit bei Männern bei 68 Jahren und bei Frauen bei 72 Jahren. In Deutschland waren es 2016 etwa 9280 Männer und 5360 Frauen, die neu an einem NZK erkrankt sind. Die Sterblichkeitsrate in Deutschland ist seit 1990 ebenso leicht rückgängig. 2016 waren es 3280 Männer und 2074 Frauen, die am NZK und seinen Folgen gestorben sind. In Abbildung 1 sind die altersstandardisierten Erkrankungs- und Sterberaten pro 100.000 Einwohnern von 1999 bis 2016 in Deutschland gezeigt (Robert-Koch-Institut 2019).

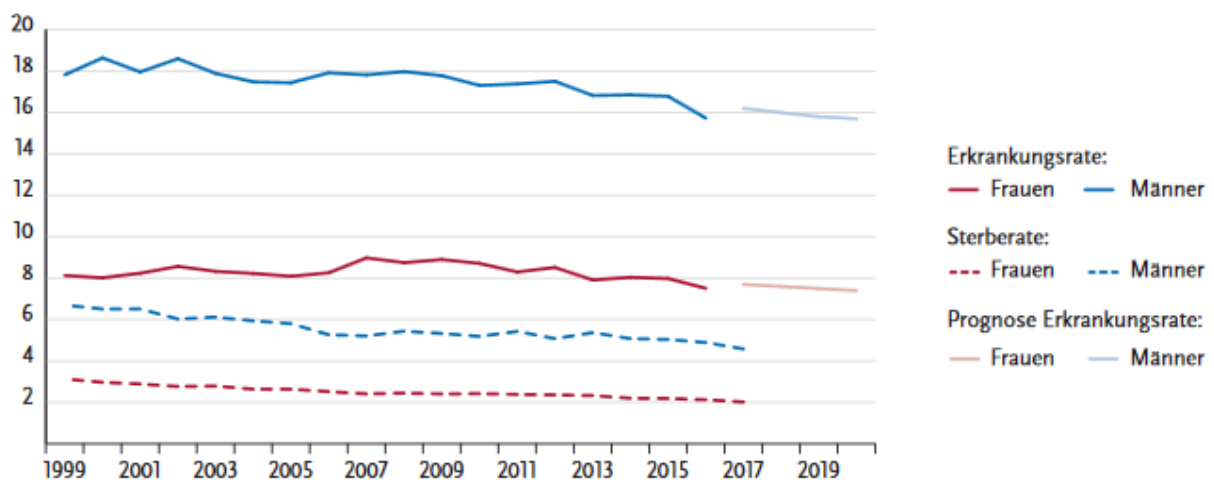


Abbildung 1 - Altersstandardisierte Erkrankungs- und Sterberaten nach Geschlecht (pro 100.000) in Deutschland 2015/2016 (Robert-Koch-Institut 2019)

2.1.2 Ätiologie

Da die genaue Entstehung des NZK noch nicht geklärt ist, wird in der Literatur eine Reihe von Risikofaktoren diskutiert, die das Auftreten von NZK begünstigen.

Tabakkonsum ist einer der Hauptrisikofaktoren für das NZK. Das Risiko steigt dabei mit der Menge an konsumierten Zigaretten (Hunt *et al.*, 2005). Auch Passiv- und gelegentliches Rauchen führt zu einem vermehrten Auftreten (Theis *et al.*, 2008). Nach mindestens 10 Jahren Abstinenz wird ein Rückgang des Risikos gemessen, nach 20-30 Jahren nähert es sich dem eines Nichtraucher an (Parker *et al.*, 2003; Hunt *et al.*, 2005). Mit Blick auf den histologischen Subtyp des NZK konnte ebenso eine signifikante Assoziation mit Rauchen festgestellt werden. Es ergab sich, dass 23 % der Patienten, welche an einem klarzelligen NZK erkrankten, aktive Raucher waren, beim papillären NZK lag der Anteil bei 26 %, dagegen nur bei 6 % beim chromophoben NZK (Patel *et al.*, 2015).

Ein weiterer Risikofaktor ist Adipositas, bei der eine Korrelation zwischen steigendem *Body-Mass-Index* (BMI) und Risiko einer Erkrankung an einem NZK beschrieben wird (Oh *et al.*, 2005; Pischon *et al.*, 2006). Jedoch zeigen einzelne Publikationen ein längeres Überleben übergewichtiger Patienten (Kamat *et al.*, 2004). Neben Adipositas führt arterielle Hypertonie ebenfalls zu einem signifikanten Anstieg des Erkrankungsrisikos (Shen *et al.*, 2015).

Im dialysepflichtigen Endstadium einer chronischen Niereninsuffizienz kommt es mit Dauer der Dialyse zu einem Risikoanstieg (Nouh *et al.*, 2010). Außerdem treten vermehrt erworbene, zystische Nierenerkrankungen auf, die bis zu einem 50-fachen Anstieg des Risikos führen (Kabaria *et al.*, 2016).

Weitere Risikofaktoren sind die Exposition mit Stoffen wie Trichlorethen, Cadmium, Blei oder Asbest (Pesch *et al.*, 2000; Moore *et al.*, 2010).

Neben externen Faktoren gibt es auch hereditäre Prädispositionen, die das Erkrankungsrisiko erhöhen. Bei Patienten familiärer Vorbelastung tritt das NZK mit doppelter Wahrscheinlichkeit auf (Clague *et al.*, 2009). Des Weiteren existieren autosomal-dominant vererbte Erkrankungen, die mit einem NZK einhergehen können. Das von-Hippel-Lindau-Syndrom (VHL) ist hervorzuheben, was in 40-50 % der Fälle mit einem NZK korreliert. Weitere erbliche Formen sind das hereditäre papilläre NZK, die familiäre Leiomyomatose, das Birt-Hogg-Dubé-Syndrom sowie die tuberöse Sklerose (Richard *et al.*, 2004; Verine *et al.*, 2010).

2.1.3 Histopathologische Klassifizierung der Nierenzelltumore

Erstmals wurde das NZK 1883 durch Paul Grawitz beschrieben, der makroskopische Ähnlichkeiten zwischen Nebenniere und Tumor feststellte. Bezeichnungen wie „Hypernephrom“ sind heutzutage jedoch obsolet, da 1960 der epitheliale Ursprung nachgewiesen wurde (Oberling *et al.*, 1960). Auf Thoenes *et al.* basierenden Ergebnissen wurde das NZK durch die Mainz-Klassifikation in histologische Subtypen unterteilt (Thoenes *et al.*, 1986). Die *World Health Organization* (WHO) veröffentlichte 2016 die neueste Klassifikation der Tumoren des Urogenitaltrakts (Moch *et al.*, 2016). Die drei häufigsten Subtypen sind das klarzellige, das papilläre (Typ 1 und 2) und das chromophobe NZK. Weitere Subtypen sind in Tabelle 1 aufgeführt (Moch *et al.*, 2016). In der Vancouver-Klassifikation der Internationalen Gesellschaft für Urologische Pathologie (ISUP) von 2013 wurden zusätzliche Tumortypen hinzugefügt. Dies sind insbesondere Entitäten epithelialen Ursprungs, wie das tubulozystische NZK, das mit einer erworbenen, zystischen Nierenerkrankung assoziierte NZK, das klarzellige, (tubulo-) papilläre NZK, das translokations-assoziierte NZK (speziell t(6:11)) und das mit einer hereditären Leiomyomatose assoziierte NZK (Srigley *et al.*, 2013).

Tabelle 1 - Subtypen in absteigender Häufigkeit des NZK (Moch *et al.*, 2016)
 NZK = Nierenzellkarzinom, TFE = *transcription factor e*

Maligne	Benigne
Klarzelliges NZK	Papilläres Adenom
Papilläres NZK	Onkozytom
Chromophobes NZK	
multilokäres zystisches NZK	
Sammelrohrkarzinom	
NZK in Assoziation mit Xp11.2 Translokation/ TFE-Fusion	
Muzinös-tubuläres und spindelzelliges Karzinom	
Nierenmarkkarzinom	
NZK in Assoziation mit Neuroblastom	
Unklassifizierte NZK	

Die vorliegende Arbeit bezieht sich auf das klarzellige NZK, weswegen die Histologie anderer Subtypen zur Abgrenzung nur kurz genannt wird. Klarzellige NZK kommen als solitäre Tumore in gleicher Häufigkeit in rechter und linker Nierenrinde vor (Jacobs *et al.*,

1980). Makroskopisch stellt sich der Tumor knotig dar mit einer aufgrund des Lipidgehalts meist gelben Schnittfläche. Er kann aber auch graue oder weiße Anteile enthalten sowie Kalzifikationen und Nekrosen. Der Tumor ist oft von einer fibrösen Pseudokapsel umgeben, kann aber auch infiltrativ wachsen (Storkel 1999; Eble *et al.*, 2004). Histopathologisch zeigen sich sowohl solide als auch alveoläre und azinäre Anteile, die Zysten ausbilden können. Intrazellulär enthaltene Lipide und Glykogen werden bei der histologischen Färbung ausgewaschen, wodurch die mikroskopisch klarzellige Darstellung entsteht. Charakteristischerweise enthalten die Karzinome ein geordnetes Netzwerk aus kleinen, dünnwandigen Blutgefäßen. Die Zellkerne sind zumeist rund mit feiner Granula und gleichmäßig verteiltem Chromatin (Renshaw 2002; Hammerschmied *et al.*, 2008). In Abbildung 2 sind Histologie und Makroskopie des NZKs dargestellt.

Typ 1 und Typ 2 des papillären NZK besitzen mikroskopisch papilläre und tubuläre Strukturen. Die Tumorpapillen enthalten oftmals Ansammlungen von Makrophagen und Cholesterinkristallen. Morphologisch besitzt Typ 1 Papillen, die mit einer einzelnen Schicht aus hellen Zellen bedeckt sind, Typ 2 besitzt dagegen größere, eosinophile Zellen (Delahunt and Eble 1997).

Das chromophobe NZK besteht aus großen, polygonalen Zellen mit feinretikulärem, eosinophilem Zytoplasma. Gut unterscheiden kann man es vom klarzelligen NZK durch die dickwandigen Blutgefäße (Renshaw 2002; Eble *et al.*, 2004).

Das Onkozytom besteht histologisch aus kompakten Zellaggregationen, Azini, Tubuli oder Mikrozysten. Die vorherrschenden, namensgebenden Zellen (englisch „*oncocyte*“) sind rund bis polygonal mit dichtem, granulärem Zytoplasma und zentralem Zellkern (Eble *et al.*, 2004).

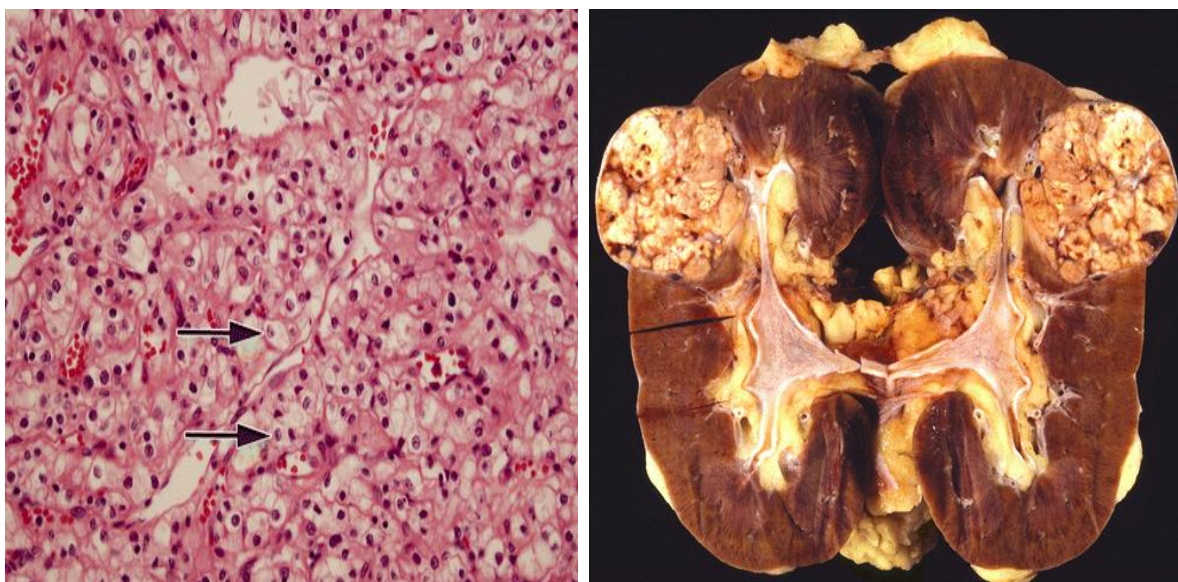


Abbildung 2 - A. Histologie (Hämatoxylin-Eosin-Färbung, Pfeile auf Zellkerne); B. Makroskopie (in der Mitte geteilte Niere mit Tumor am oberen Pol) des klarzelligen NZK (Lin *et al.*, 2007)

2.1.4 Genetik des klarzelligen NZK

Einige der wichtigsten Genveränderungen finden sich auf Chromosom 3p, insbesondere auf Lokus 3p25-26, welcher das VHL-Gen kodiert (Latif *et al.*, 1993). Es handelt sich um ein Tumorsuppressor-Gen, welches physiologisch den Abbau der Transkriptionsfaktoren *hypoxia-inducible-factors* (HIF1 α , HIF2 α , HIF2 β) fördert. Vor allem HIF2 α fördert die Produktion des *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und eine vermehrte Ausschüttung von Erythropoetin (Seizinger *et al.*, 1988; Raval *et al.*, 2005). Bei einer Mutation des VHL-Gens und Inaktivierung des 2. Allels führt der Verlust seiner Funktion zu einer Akkumulation von HIF2 α , folglich zu stärkerem Zellwachstum und Angiogenese (Kim and Kaelin 2004; Kaelin 2008). Dieser sogenannte *loss of heterozygosity* (LOH), also der Verlust eines Allels des VHL-Gens, kann in 90 % der klarzelligen NZKs beobachtet werden (Kondo *et al.*, 2002). Weitere oft veränderte Genloki auf 3p sind 3p21-22 und 3p13-14, welche im familiär auftretenden NZK die chromosomalen Translokationspunkte markieren (van den Berg *et al.*, 1996; Velickovic *et al.*, 1999). Häufig von Mutationen betroffen und ebenso auf Chromosom 3p lokalisiert sind die Gene von *Breast Cancer Associated Protein 1* (BAP1), *SET domain containing protein 2* (SETD2) und *Polybromo-1* (PBRM1) (Pena-Llopis *et al.*, 2012; Sato *et al.*, 2013). Neben den Veränderungen auf Chromosom 3p konnten viele Studien auch andere chromosomale Regionen aufzeigen, die im klarzelligen NZK regelmäßig verändert waren. DNA-Zugewinne wurden auf 1q, 2q, 5q, 7q, 8q, 12p, 17p/q und 20q beobachtet, Verluste hingegen auf 1p, 4q, 6q, 8p, 9p, 13q, 14, 18 sowie Xq (Moch *et al.*, 1996; Bissig *et al.*, 1999; Jiang *et al.*, 2000; Junker *et al.*, 2003; Beroukhim *et al.*, 2009). DNA-Verluste auf den Chromosomen 9, 14 und 18 sowie DNA-Gewinne auf 7 und 20 scheinen außerdem mit Metastasierung assoziiert zu sein (Junker *et al.*, 2003; Sanjmyatav *et al.*, 2011).

Spezifische, genetische Veränderungen existieren auch in anderen Subtypen des NZK.

2.1.5 TNM-Klassifikation, Malignitätsgrad und Prognose

Das System der *Tumor-Node-Metastasis*-(TNM)-Klassifikation ermöglicht die Stadieneinteilung von malignen Tumoren. Berücksichtigt werden die lokale Ausbreitung des Primärtumors sowie das Vorkommen von regionären Lymphknotenmetastasen und Fernmetastasen. In Tabelle 2 ist die aktuellste Klassifikation der *International Union Against Cancer* (UICC) mit Ergänzungen von 2012 ersichtlich. Zur Einteilung der regionären Lymphknoten werden diese unabhängig von der Seite hilär, abdominal-paraaortal und parakaval beurteilt (Sobin *et al.*, 2009; Wittekind *et al.*, 2012).

NZK metastasieren vorwiegend hämatogen, jedoch auch lymphogen. Fernmetastasen finden sich am häufigsten in Lunge und Mediastinum (55 %), regionären Lymphknoten (34 %),

Leber (33 %), Skelettsystem (32 %), kontralateraler Niere (11 %) und ZNS (6 %) (Keller 2010).

Tabelle 2 - TNM-Klassifikation (Sobin *et al.*, 2009; Wittekind *et al.*, 2012)

T = *tumor*, N=*node*, M = *metastasis*

T - Primärtumor	
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	kein Anhalt für Primärtumor
T1	Primärtumor <7cm in größter Ausdehnung, begrenzt auf die Niere
T1a	Tumor <4 cm in größter Ausdehnung, begrenzt auf die Niere
T1b	Tumor >4 cm aber <7 cm in größter Ausdehnung
T2	Tumor >7 cm in größter Ausdehnung, begrenzt auf die Niere
T2a	Tumor >7 cm aber <10 cm in größter Ausdehnung
T2b	Tumor >10 cm, begrenzt auf die Niere
T3	Tumor breitet sich in große Venen oder perirenales Gewebe aus, nicht in ipsilaterale Nebenniere oder über <i>Gerota-Faszie</i> hinaus
T3a	Tumor infiltriert makroskopisch Nierenvene oder deren Segmentäste (muskulaturenhaltend) oder perirenales und/oder Fettgewebe des Nierensinus, nicht über <i>Gerota-Faszie</i> hinaus
T3b	Tumor mit makroskopischer Ausbreitung in <i>Vena cava</i> unterhalb des Zwerchfells
T3c	Tumor mit makroskopischer Ausbreitung in <i>Vena cava</i> oberhalb des Zwerchfells oder Wandbefall der <i>V. cava</i>
T4	Tumor infiltriert über <i>Gerota-Faszie</i> hinaus (einschließlich kontinuierliche Ausbreitung in ipsilaterale Nebenniere)
N - regionäre Lymphknoten	
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine Metastasen in regionären Lymphknoten
N1	Metastasen in einzelner regionären Lymphknoten
M - Fernmetastasen	
M0	keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Zur Einschätzung der Malignität des NZK wird eine histologische Beurteilung von Zellkern, sarkomatoider und rhabdoider Differenzierung, Ausmaß der Gefäßinvasion und Nekroseggrad vorgenommen (Delahunt *et al.*, 2013). Für eine bessere Objektivierbarkeit wurde das lange verwendete *Grading* nach Fuhrman von den Kriterien der ISUP ersetzt, die das klarzellige und papilläre NZK in Grad 1-4 einteilt. Das chromophobe NZK wird aufgrund unzureichender Evidenz nicht gegradet. Für Grad 1-3 wird nur die Größe des Zellkerns beurteilt. Grad 4 beinhaltet zusätzlich die Form des Zellkerns, sarkomatoide und/oder rhabdoide Differenzierung sowie die Anwesenheit von Tumorroiesenzellen (Moch *et al.*, 2016).

Für die Einschätzung der Prognose existieren verschiedene Modelle. Beurteilt werden die TNM-Klassifikation, histologische Faktoren wie der Subtyp und der Malignitätsgrad, der körperliche Zustand des Patienten und weitere klinische Faktoren wie beispielsweise

lokalisierte Symptome oder Tumorkachexie (Kim *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2011). Molekulare Marker sind bisher nicht klinisch relevant. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass Tumore mit einer Mutation des Genes BPA1 eine schlechtere Prognose haben als Tumore mit einer PBRM1-Mutation (Ljungberg *et al.*, 2019). Weiterhin scheinen DNA-Zugewinne auf den Chromosomen-Regionen 7q, 8q und 20 q sowie DNA-Verluste auf den Chromosomen 9p/q und 14q mit einer schlechteren Prognose assoziiert zu sein (Kohn *et al.*, 2015). Für lokalisierte Tumorstadien existieren der Leibovich-Prognose-Score und das *University of California Integrated Staging System* (UISS) (Zisman *et al.*, 2002; Leibovich *et al.*, 2003). Für metastasierte Tumore existierte lange das *Memorial Sloan-Kettering Cancer Centre* (MSKCC) Prognosemodell, welches durch das des *International Metastatic Renal Cell Carcinoma Database Consortiums* (IMDC) abgelöst wurde (Motzer *et al.*, 1999; Heng *et al.*, 2013). In Tabelle 3 sind die TNM-Stadien und die zugehörige 5-Jahres Überlebensrate aufgeführt (Ljungberg 2004).

Tabelle 3 - Stadieneinteilung des NZK und 5-Jahres Überlebensrate (Ljungberg 2004)
T = *Tumor*, N = *Node*, M= *Metastasis*

Stadium	T	N	M	5-Jahres Überlebensrate
Organbegrenzt	1a	0	0	80 – 100 %
	1b	0	0	85 – 96 %
	2	0	0	75 – 85 %
Invasion perirenaln Fettgewebes, Nebenniere	3a	0	0	45 - 78 %
Gefäßinvasion	3b-c	0	0	40-60 %
Lymphknotenmetastasen	jedes T	1	0	30 – 50 %
Fernmetastasen	jedes T	jedes N	1	0 – 10 %

2.1.6 Diagnostik

Mehr als 50 % der NZKs werden zufällig durch bildgebende Diagnostik des Abdomens entdeckt (Jayson and Sanders 1998). Die klassische Trias bei fortgeschrittenem Stadium aus Flankenschmerz, Makrohämaturie und palpablem, abdominalem Tumor ist heutzutage selten (6-10 %) (Lee *et al.*, 2002). Paraneoplastische Symptome wie Hyperkalzämie, Hyperglykämie, Renin- oder Prolaktinproduktion, Anämie, Polyzythämie, hepatische Syndrome (Stauffer-Syndrom) und neuromuskuläre Syndrome kommen in 10–40 % der Fälle vor (Moreira *et al.*, 2016).

In der Labordiagnostik werden Blutbild, Serumkreatinin und Glomeruläre Filtrationsrate (GFR), Leberenzyme, Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG), Alkalische Phosphatase, Laktatdehydrogenase (LDH), Serumkalzium, Gerinnungsparameter sowie der Urin zur

Beurteilung einer Hämaturie kontrolliert (Magera *et al.*, 2008; Leitlinienprogramm-Onkologie 2020).

In der bildgebenden Diagnostik finden sich NZK häufig per Zufallsbefund im Ultraschall. Kleine Tumore sind oft mit Ultraschallkontrastmittel besser zu beurteilen (Jamis-Dow *et al.*, 1996; Fan *et al.*, 2008). Zur Beurteilung renaler Tumore wird eine Computertomographie (CT) mit intravenöser Kontrastmittelgabe durchgeführt. Bestehen hierfür Kontraindikationen, kann eine Magnetresonanztomographie (MRT) durchgeführt werden (Krestin *et al.*, 1992; Leitlinienprogramm-Onkologie 2020). Die Kontrastmittel-Sonographie durch einen erfahrenen Untersucher besitzt eine ähnliche Sensitivität wie die CT, wohingegen sie bei der Spezifität mit 79 % besser abschneidet (Flamm *et al.*, 2013). Zum *Screening* nach Fernmetastasen stehen routinemäßig ein Röntgenbild des Thorax sowie ein Thorax-CT zur Verfügung. Bei klinischem Verdacht auf entsprechende Metastasen wird eine Knochenszintigraphie oder Bildgebung des Gehirns durchgeführt (Bechtold and Zagoria 1997; Heidenreich and Ravery 2004).

Eine CT- oder ultraschallkontrollierte Tumorbioptie sollte nur durchgeführt werden, wenn dies die Wahl der Therapie beeinflusst, etwa vor einer ablativen Behandlung kleinerer Tumore (Shannon *et al.*, 2008). Zur endgültigen Verifizierung sollte immer eine postoperative, histologische Beurteilung erfolgen.

2.1.7 Therapie

Die Therapieempfehlungen von NZKs hängen von mehreren Faktoren ab, wie dem Metastasierungsstatus sowie Tumorgröße und -position, renaler Funktion und Komorbiditäten des Patienten.

Die wichtigste Therapieoption beim NZK ist die operative Therapie. Die *European Association of Urology* (EAU) empfiehlt generell eine nierenerhaltende Operation bei einem lokalen Tumorstadium bis T1b, während nach den deutschen Leitlinien ein nierenerhaltendes Verfahren bis Stadium T2 möglich ist (Leitlinienprogramm-Onkologie 2020). Die laparoskopische Operation ist das Verfahren der Wahl (Badalato *et al.*, 2012; Sprenkle *et al.*, 2012). Im T1a-Stadium zeigt eine nierenerhaltende Operation ein besseres *Outcome* der Patienten als eine radikale Nephrektomie (MacLennan *et al.*, 2012; Capitanio *et al.*, 2015). Im Stadium T1b sollte ebenso die partielle einer radikalen Nephrektomie vorgezogen werden, sofern es Lokalisation des Tumors und körperlicher Zustand des Patienten zulassen. Ist das lokale Tumorwachstum bereits fortgeschritten, sollte radikal operiert werden (Leitlinienprogramm-Onkologie 2020). Zum ablativen Verfahren der Radiofrequenztherapie existiert zum aktuellen Zeitpunkt eine Studie, die im Vergleich zu operativen Verfahren im T1a-Stadium die gleichen Überlebensraten dokumentieren konnte (Alam *et al.*, 2019). Die Operation bleibt aber das Mittel der Wahl. Die Kryotherapie existiert

als weiteres ablatives Verfahren. Hierzu lassen sich aufgrund unzureichender Datenlage keine definitiven Aussagen bezüglich Morbidität und *Outcome* treffen (Zargar *et al.*, 2016). Bei singulären oder vereinzelt Metastasen führt die operative Entfernung zu einer Verlängerung der Lebenszeit, sofern der Allgemeinzustand des Patienten dies zulässt (Dabestani *et al.*, 2016). Das NZK selbst ist nicht strahlensensibel, jedoch kommt eine Bestrahlung für Patienten mit Hirn- und Knochenmetastasen in Frage und kann zur Symptomverbesserung beitragen (Fokas *et al.*, 2010; Hunter *et al.*, 2012). Ist aufgrund Anzahl und Lokalisation der Metastasen eine operative Entfernung nicht möglich, ist eine systemische Therapie indiziert. Diese greifen gezielt in Signalkaskaden der Zellen ein (*targeted therapeutica*). Zur Verfügung stehen zum heutigen Zeitpunkt die Immuntherapeutika (sog. Immun-*checkpoint*-Inhibitoren) Pembrolizumab (Keytruda®), Avelumab (Bavencio®), Nivolumab (Opdivo®), Ipilimumab (Yervoy®), Interferon- α (IFN- α) und Interleukin-2 (IL-2) (Bedke *et al.*, 2016). Hinzu kommen außerdem Bevacizumab (Avastin®), Sunitinib (Sutent®), Sorafenib (Nexavar®), Pazopanib (Votrient®), Axitinib (Inlyta®), Cabozantinib (Cometriq®), Lenvatinib (Lenvima®), Tivozanib (Fotivda®), Temsirolimus (Torisel®) und Everolimus (Afinitor®). Diese setzen vor allem am VHL-HIF-Signalweg an, was in Abbildung 3 schematisch dargestellt ist. Chemotherapie wird in der Therapie des NZK nicht eingesetzt. 5-Fluoruracil zeigt in Kombination mit IFN- α oder IL-2 zwar eine moderate Effektivität, wird jedoch nicht empfohlen (Stadler *et al.*, 2003).

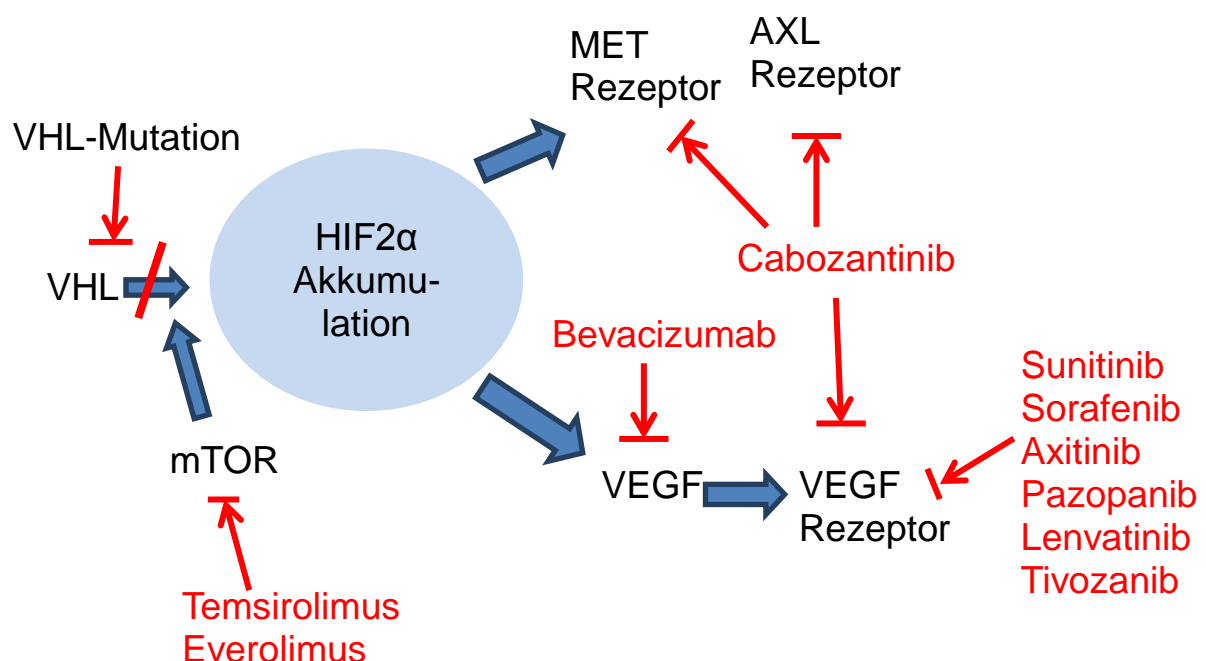


Abbildung 3 - schematische Darstellung des VHL-HIF-Signalweges und Angriffspunkte der „*targeted therapeutica*“

AXL = AXL receptor tyrosine kinase, HIF = Hypoxie induzierter Faktor, MET = hepatocyte growth factor receptor, mTOR = mechanistic target of rapamycin, VEGF = vascular endothelial growth factor, VHL = Von-Hippel-Lindau

Bei Pembrolizumab und Nivolumab handelt sich es um monoklonale Antikörper, die den *programmed death 1* (PD-1)-Rezeptor von körpereigenen zytotoxischen T-Zellen binden und somit die Interaktion zwischen dem von Tumorzellen sezernierten Liganden *programmed death ligand 1* sowie *programmed death ligand 2* (PD-L1/PD-L2) hemmen. Eine von Tumorzellen ausgehende Immunsuppression wird dadurch vermindert (McDermott and Atkins 2013). Avelumab greift ebenso in diese Interaktion ein, indem es PD-L1 bindet (Boyerinas *et al.*, 2015). Eine Kombination von Pembrolizumab und Avelumab mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Axitinib wird empfohlen (Motzer *et al.*, 2019; Rini *et al.*, 2019). Ipilimumab bindet *cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4* (CTLA-4), ein Rezeptor auf der Oberfläche von dendritischen Zellen, und vermindert dadurch dessen hemmende Wirkung auf zytotoxische T-Zellen. Die Wirkung der T-Zellen auf Tumorzellen wird somit verstärkt (Tarhini and Iqbal 2010). Zur Erhöhung der Effektivität wird die Kombination von Nivolumab mit Ipilimumab empfohlen (Hammers *et al.*, 2017; Motzer *et al.*, 2018).

Bevacizumab ist ein monoklonaler Antikörper, der freies VEGF bindet und damit Angiogenese sowie Tumorwachstum hemmt und in Kombination mit IFN- α eingesetzt wird (Bedke *et al.*, 2016). Als sogenannte Multityrosinkinase-Inhibitoren werden Sunitinib, Sorafenib, Pazopanib, Axitinib, Cabozantinib, Lenvatinib und Tivozanib bezeichnet, die alle mehrere Rezeptor-Tyrosinkinasen hemmen. Temsirolimus und Everolimus sind spezifische Inhibitoren des Proteins *mechanistic target of rapamycin* (mTOR), was in der Regulation von Zellwachstum, Motilität, Angiogenese und Apoptose beteiligt ist (Fingar *et al.*, 2004).

Zur Entscheidung des Therapieregimes wird zunächst das Patientenrisiko eingeschätzt. Hierfür existieren verschiedene Modelle. Im Leitlinienprogramm der Deutschen Krebsgesellschaft wird das Modell des *International Metastatic Renal Cell Carcinoma Database Consortium* (IMDC) empfohlen (Heng *et al.*, 2013). Die Kriterien sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4 - IDMC-Kriterien (Heng *et al.*, 2013)
IDMC = *International Metastatic Renal Cell Carcinoma Database Consortium*

Risikofaktor	Cut-off Punkt
Karnofsky-Index	< 80 %
Zeit zwischen Diagnose und Therapiebeginn	< 12 Monaten
Hämoglobin	< unterer Normwert
Kalzium im Serum	> 10,0 mg/dl (2,4 mmol/l)
Absolute Neutrophilenzahl	> Normwert
Absolute Thrombozytenzahl	> Normwert

Je nach ermitteltem Wert wird das Risiko in niedriges (keine Risikofaktoren), intermediäres (1-2 Risikofaktoren) und hohes Risiko (3-6 Risikofaktoren) eingeteilt.

Bei der systemischen Behandlung mit Tyrosinkinase-Inhibitoren (z. B. Sunitinib, Pazopanib oder Axitinib) ist bei circa 30% der Patienten eine primäre Resistenz zu beobachten. Im Mittel zeigt der Tumor außerdem nach 10-12 Monaten wieder Wachstum (Buczek *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2016). Bei einer Resistenz unter Sunitinib wird eine vermehrte Ausbildung der metastasenfördernden Rezeptor-Tyrosinkinasen *hepatocyte growth factor receptor* (MET) sowie AXL beobachtet (Zhou *et al.*, 2016). Cabozantinib als Multi-Tyrosinkinase Inhibitor hemmt unter anderem die Aktivität von VEGFR, MET und AXL. Der Tumor zeigt somit ein besseres Ansprechen auf die Therapie mit Cabozantinib als auf Sunitinib (Choueiri *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2016). Sowohl Nivolumab als auch Cabozantinib zeigen sich bei VEGF-Resistenz überlegen im Vergleich zu mTOR-Inhibitoren wie Everolimus (Choueiri *et al.*, 2015; Motzer *et al.*, 2015).

Basierend auf dem Risikoprofil des Patienten sind in Tabelle 5 die aktuellen Erstlinien-Therapieempfehlungen der Deutschen Krebsgesellschaft für die systemische Therapie des klarzelligen, metastasierten NZK aufgeführt (Leitlinienprogramm-Onkologie 2020).

Tabelle 5 - Algorithmus der systemischen Erstlinientherapie des klarzelligen, metastasierten NZK (Leitlinienprogramm-Onkologie 2020)

IMDC= *International Metastatic Renal-Cell Carcinoma Database Consortium*, IL-2=Interleukin-2

Risiko nach IMDC	Standard	Option
niedrig	Pembrolizumab+Axitinib	Bevacizumab+Interferon Pazopanib Sunitinib Tivozanib hochdosiertes IL-2
intermediär	Pembrolizumab+Axitinib Ipilimumab+Nivolumab	Cabozantinib
ungünstig	Pembrolizumab+Axitinib Ipilimumab+Nivolumab	Cabozantinib Temsirolimus

Gemäß der aktuellen Studienlage ist davon auszugehen, dass zukünftig neben der Kombination von Pembrolizumab und Axitinib auch die Kombination von Avelumab und Axitinib als Standardtherapie empfohlen wird (Grimm *et al.*, 2020).

2.2 MicroRNAs

MicroRNAs (miRNA) sind einzelsträngige, circa 22 Nukleotide lange, nicht-kodierende RNA-Moleküle, die eine wichtige Rolle bei der posttranskriptionellen Genregulation spielen, indem sie *messenger RNA* (mRNA) binden und somit die Proteinexpression steuern. Abhängig vom Ausmaß der Bindung von miRNA an mRNA wird entweder die Translation gehemmt oder die mRNA abgebaut. Diese Art der Genregulation wird deshalb auch zu einer Form des natürlichen *RNA-silencing* gezählt. Nach der Entdeckung 1993 von Lee *et al.* im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* wurde im Laufe der Zeit deutlich, dass miRNAs in nahezu allen Eukaryoten vorkommen (Lee *et al.*, 1993). Es wird angenommen, dass miRNAs auf 1-5 % des menschlichen Genoms kodiert sind und sie etwa 30 % der proteinkodierenden Gene regulieren (Rajewsky 2006). Bisher wurden über 4690 (Stand 02.2020) für miRNAs kodierende Sequenzen im Menschen entdeckt (Griffiths-Jones 2004; Griffiths-Jones *et al.*, 2006; Griffiths-Jones *et al.*, 2008; Kozomara and Griffiths-Jones 2011; Kozomara and Griffiths-Jones 2014; Kozomara *et al.*, 2019). Weitere Sequenzanalysen legen jedoch nahe, dass noch eine weitaus größere Zahl existiert (Friedlander *et al.*, 2014)

2.2.1 Biogenese

Die Biogenese der miRNAs ist ein mehrstufiger Prozess. Die für menschliche miRNAs kodierenden Gen-Loci liegen mehrheitlich isoliert voneinander, können aber auch gruppiert vorliegen. Davon abhängig können die Gene sowohl mono- als auch polycistronisch abgelesen werden. Eine örtliche Nähe der miRNA-Gene bedeutet nicht zwangsläufig eine funktionelle Assoziation (Lee *et al.*, 2002). MiRNA-Genloci liegen häufig zwischen zwei für Proteine kodierenden DNA-Abschnitten, können sich aber auch auf Introns oder Exons befinden. Die Transkription geschieht durch die RNA-Polymerase III und mehrheitlich durch die RNA-Polymerase II, deren Transkripte *primary-miRNAs* (pri-miRNA) genannt werden (Bartel 2004; Lee *et al.*, 2004; Borchert *et al.*, 2006). Im ersten Schritt wird die pri-miRNA im Zellkern durch den Mikroprozessor-Komplex geschnitten. Dieser besteht aus einer RNase III (Drosha) sowie dem Kofaktor Pasha (DGCR8) (Denli *et al.*, 2004). Das Produkt ist die 60-70 nt lange *precursor-miRNA* (pre-miRNA) mit einer charakteristischen Haarnadelstruktur, die durch Exportin-5 ins Zytoplasma transportiert wird (Zeng *et al.*, 2003; Okada *et al.*, 2009). Dort vereinigt sie sich mit einer RNase III-Endonuklease (*Dicer*) sowie den Kofaktoren *human immunodeficiency virus transactivating response RNA-binding protein* (TRBP) und *proteinkinase R-activating protein* (PACT) (Haase *et al.*, 2005). *Dicer* spaltet die terminale Haarnadelstruktur der pre-miRNA und ein circa 21 bp langer, doppelsträngiger miRNA-Duplex entsteht. Durch die Trennung des Duplex entsteht ein führender Strang und ein Begleitstrang, der mit -* gekennzeichnet ist und ebenfalls als funktionelle miRNA wirken kann

(Zhang *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2013). Die reife miRNA bindet an das Protein Ago2 und wird in den *RNA-induced silencing complex* (RISC-Komplex) befördert (Maniataki and Mourelatos 2005). Ago2 gehört zu den Argonautenproteinen, welche Hauptakteure in verschiedenen Prozessen des *RNA-silencing* sind und wesentlicher Bestandteil des RISC-Komplexes (Sasaki *et al.*, 2003). Entscheidend für die Bindung der miRNA an die Ziel-mRNA ist die 2-8 Nukleotide umfassende *seed*-Region am 5'-Ende der miRNA. Sind sämtliche Basen in dieser Region komplementär zur mRNA, können RISC-Komplex und Ziel-mRNA interagieren (Brennecke *et al.*, 2005). Die nachfolgende Abbildung 4 zeigt schematisch die Biogenese der miRNA.

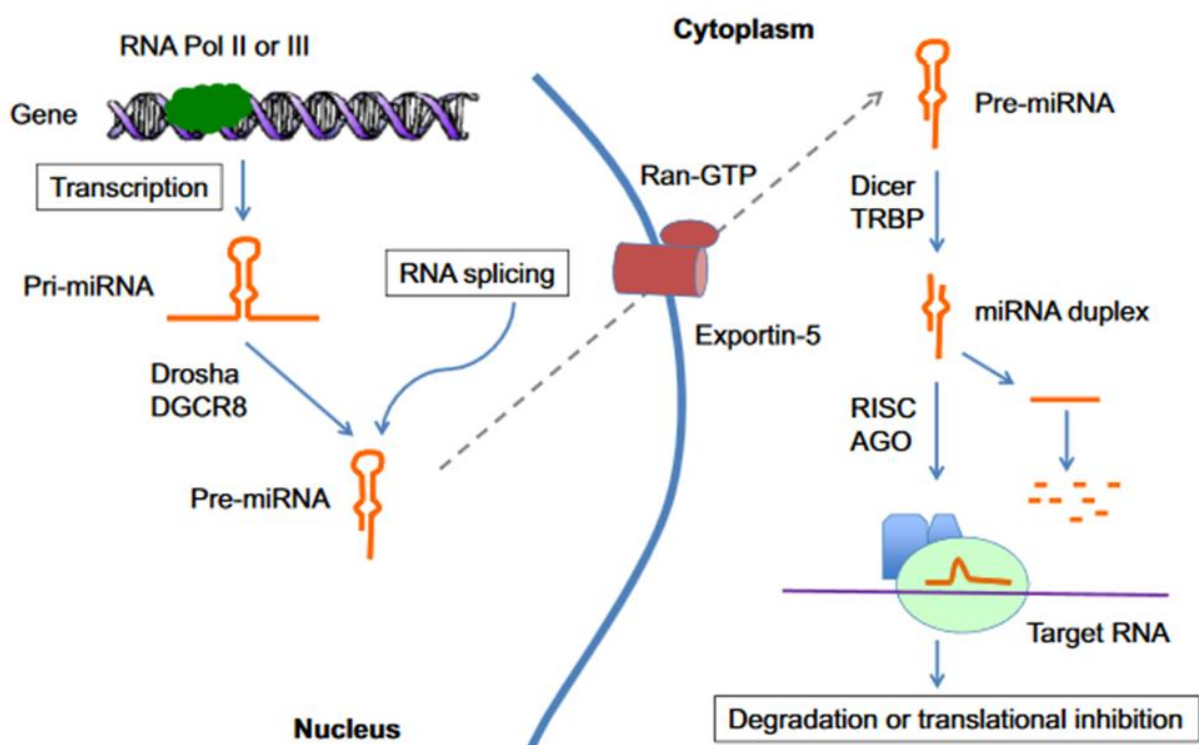


Abbildung 4 - Schematische Darstellung der miRNA Biogenese (Kim *et al.*, 2018)
 DGCR8 = Kofaktor Pasha, pre-miRNA = *precursor-miRNA*, pri-miRNA = *primary-miRNA*,
 RISC = *RNA-induced silencing complex*, RNA pol II = *RNA-Polymerase II*

Bei vollständiger Komplementarität außerhalb der *seed*-Region zwischen den beiden RNA-Molekülen kommt es zum Abbau der mRNA. Sind die Moleküle nicht komplett komplementär zueinander, führt dies zu einer Hemmung der Translation ohne Abbau der mRNA. Da keine vollständige Komplementarität für eine Interaktion nötig ist, kann eine miRNA mehrere mRNAs regulieren oder im umgekehrten Fall, mehrere miRNAs eine mRNA (Yekta *et al.*, 2004). Der genaue Mechanismus der Translationshemmung wird in der Literatur noch diskutiert. Der RISC-Komplex spielt eine entscheidende Rolle, während jedoch auch abgewogen wird, ob translatierte Polypeptide sogleich wieder abgebaut werden (Nottrott *et al.*, 2006; Petersen *et al.*, 2006). Einen epigenetischen Einfluss auf die Expression von mRNAs können miRNAs unter anderem durch DNA-Methylierung und Histonmodifikationen haben (Khraiwesh *et al.*, 2010; Baylin and Jones 2016).

2.2.2 Regulation der miRNA-Expression

Die Regulation der miRNA-Expression kann grundsätzlich auf jeder Stufe der Biogenese stattfinden. Beginnend bei der Transkription kann die Expression über den Promotor gesteuert werden (Rodriguez *et al.*, 2004). Sowohl Transkriptionsfaktoren wie p53 oder Myelocytomatose (MYC) als auch DNA-Methylierungen oder Histonmodifikationen sind mögliche Mechanismen (Saito *et al.*, 2006; Sampson *et al.*, 2007; Ozsolak *et al.*, 2008). Weitere Wege zur Regulierung gibt es auf Ebene des Mikroprozessors (Davis and Hata 2009). Beispielsweise existiert eine wechselseitige Beziehung zwischen Drosha und Kofaktor DGCR8 (Han *et al.*, 2009). Weiterhin besteht ein Regulationsmechanismus zwischen *Dicer* und seinen Kofaktoren TRBP und PACT, deren Verringerung zu einer verminderten Stabilität und Aktivität von *Dicer* führt (Chendrimada *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2006). Beim RISC-Komplex nehmen die Ago-Proteine eine entscheidende Position ein, deren erhöhte Menge zu einer erhöhten miRNA-Expression beiträgt (Diederichs and Haber 2007). Über die Stabilität und den Abbau der miRNA ist bisher recht wenig bekannt, jedoch scheinen miRNAs eine größere Halbwertszeit zu haben als mRNAs, unter anderem durch eine unterschiedliche Thermostabilität und höhere RNase-Resistenz (Aryani and Denecke 2015). Die unterschiedliche Halbwertszeit von miRNAs wird vermutlich über Basensequenzen außerhalb der *seed-Region* reguliert (Bail *et al.*, 2010; Gantier *et al.*, 2011).

2.2.3 Bedeutung von miRNAs in Tumorentstehung und Metastasierung

Die Entstehung von malignen Tumoren ist Gegenstand zahlreicher Forschungsarbeiten. Gemeinhin angenommen werden die Schritte Initiation, Promotion, Konversion, Progression und Metastasierung. Fest steht, dass es ein multifaktorieller Prozess auf genetischer und epigenetischer Ebene ist, bei dem ein gestörtes Gleichgewicht von Onkogenen und Tumorsuppressoren zur Entstehung von Tumoren führen kann und miRNAs sowohl als Onkogen als auch als Tumorsuppressor agieren können (Esquela-Kerscher and Slack 2006; Kim *et al.*, 2018). Bekannt ist, dass miRNAs in gesunden Zellgeweben bei Prozessen wie Differenzierung, Proliferation, Apoptose und DNA-Reparatur von Bedeutung sind, die in deregulierter Form für Tumorentstehung und –wachstum verantwortlich gemacht werden (Hatfield *et al.*, 2005; Hwang and Mendell 2006). Es ist auffällig, dass die für miRNAs kodierenden Gene oftmals in chromosomalen Regionen liegen, die besonders anfällig sind für Bruchstellen oder Mutationen wie Deletionen respektive Amplifikationen (Calin *et al.*, 2004; Chow *et al.*, 2010). Interessant ist zudem, dass speziell im klarzelligen NZK dysregulierte miRNAs häufig signifikant mit bekannten Chromosomenaberrationen korrelieren (Chow *et al.*, 2010). Eine dysregulierte miRNA-Biogenese kann Auswirkungen auf

die Tumorentstehung haben. So kann eine erhöhte Expression onkogener miRNAs zu geringerer Translation tumorsuppressiver Proteine führen. Umgekehrt kann eine geringere Expression tumorsuppressiver miRNAs in einer erhöhten Translation onkogener Proteine resultieren. Die Folge kann in beiden Fällen eine geringere Apoptoserate sowie vermehrte Proliferation, Invasion und Angiogenese sein (Schaefer *et al.*, 2010; Goradel *et al.*, 2019). Jedoch ist eine miRNA nicht immer eindeutig als Onkogen oder Tumorsuppressor zu identifizieren, da dieselbe miRNA je nach Gewebe, in dem sie exprimiert wird und spezifischer Ziel-mRNA, eine unterschiedliche Funktion einnehmen kann (Krek *et al.*, 2005; Liang *et al.*, 2007).

Als Onkomirs werden miRNAs bezeichnet, die in dysregulierter Form kausal mit der Tumorgenese assoziiert sind, ob als Onkogen oder als Tumorsuppressor (Cho 2007). Im Fall der chronisch lymphatischen Leukämie (CLL) wirken miR-15 und miR-16 etwa als Tumorsuppressoren. Ihre Gene liegen in einer Region von Chromosom 13q14, die in mehr als der Hälfte der Patienten mit CLL deletiert ist. Die Deletion führt folglich zu einer verminderten Expression von miR-15 und miR-16 und somit zu einer vermehrten Expression des anti-apoptotisch wirkenden *targets B-cell lymphoma 2 (BCL-2)* (Calin *et al.*, 2002; Cimmino *et al.*, 2005). Onkogen wirkt beispielsweise die in mehreren Tumorentitäten erhöht exprimierte miR-21, welches die Tumorsuppressoren *programmed cell death protein (PDCD4)*, *phosphatase and tensin homolog (PTEN)* und *tissue inhibitor of metalloproteinases 3 (TIMP3)* hemmt (Pena-Llopis *et al.*, 2012).

Wie auch die Tumorgenese ist der Prozess der Metastasierung ein komplexer Vorgang, der Gegenstand zahlreicher Forschungsarbeiten ist, da Metastasen schätzungsweise für 90 % der insgesamt an soliden Tumoren verstorbenen Patienten verantwortlich sind (Gupta and Massague 2006). Der Prozess der Metastasierung beinhaltet zunächst eine vermehrte Gefäßproliferation und Tumorwachstum. Durch Invasion können dann vom Primärtumor gelöste Tumorzellen in Blut- und Lymphgefäße eindringen. In entfernt liegenden Organen des Körpers kann nach Anheftung ans Gefäßendothel ein Übertritt ins umliegende Gewebe stattfinden, wodurch eine Metastasierung ermöglicht wird (Abbildung 5) (Fidler 2003).

Auch bei der Ausbildung von Metastasen sind miRNAs beteiligt (Nicoloso *et al.*, 2009). Ein Beispiel für eine sogenannte *Metastamir*, also den Metastasierungsprozess fördernde oder hemmende miRNA, ist miR-10b im Brustkrebs. Eine Überexpression von miR-10b führt zu vermehrter Invasion und Ausbildung von Fernmetastasen (Ma *et al.*, 2007).

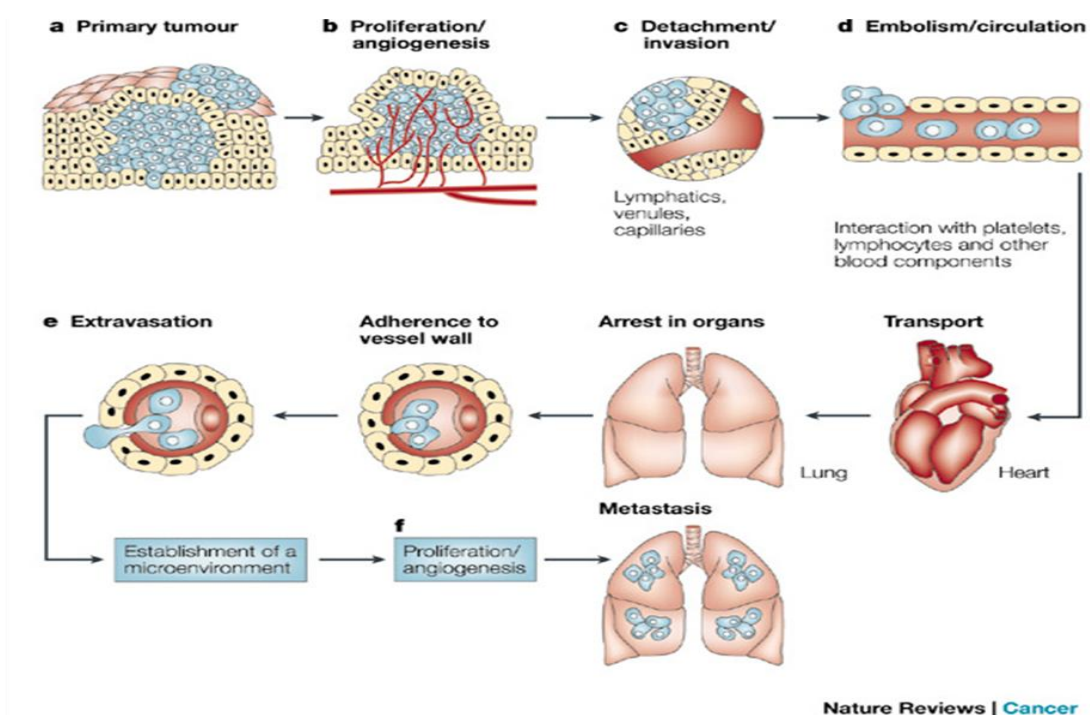


Abbildung 5 - Prozess der Metastasierung in einzelnen Schritten (Fidler 2003)

2.2.4 Bedeutung von miRNAs im NZK

In Bezug auf die Rolle von miRNAs im NZK wurden zahlreiche Studien durchgeführt. So konnte für jeden Subtyp des NZK ein spezifisches miRNA-Expressionsmuster festgestellt werden, was eine eindeutige Unterscheidung auf molekularer Ebene möglich macht (Petillo *et al.*, 2009; Fridman *et al.*, 2010; Youssef *et al.*, 2011). *Microarray*-Analysen sowie qRT-PCR-Untersuchungen von Tumor- und normalem Nierengewebe zeigen ebenfalls signifikante Unterschiede im Muster der miRNA-Expression und lassen somit eine Differenzierung zu (Huang *et al.*, 2009; Jung *et al.*, 2009; Juan *et al.*, 2010; Yi *et al.*, 2010; White *et al.*, 2011; Youssef *et al.*, 2011).

Neben den miRNA-Expressionsmustern wurden zudem einzelne, spezifische miRNAs detektiert, die im Vergleich von Tumor- und normalem Nierengewebe signifikant verändert sind, was auf deren Beteiligung bei der Entstehung und Progression des NZKs schließen lässt (Gottardo *et al.*, 2007; Jung *et al.*, 2009; Faragalla *et al.*, 2012; Cheng *et al.*, 2013; Silva-Santos *et al.*, 2013; The Cancer Genome Atlas Research 2013; Christinat and Krek 2015). In einer weiteren Studie konnte ein miRNA-Muster identifiziert werden, was mit dem Überleben der Patienten korreliert (Ge *et al.*, 2015).

Prognostisch von entscheidender Bedeutung für das NZK ist der Status der Metastasierung. Ein Vergleich der miRNA-Expression in normalem Nieren-, Tumorgewebe und Metastasen zeigte eine signifikante Dysregulation einiger miRNAs (Wotschofsky *et al.*, 2012; Heinzelmann *et al.*, 2014). Außerdem wurden spezifische miRNAs gefunden, die es zulassen, früh metastasierende Karzinome zu detektieren (Heinzelmann *et al.*, 2011; Li *et*

al., 2014). Weitere Untersuchungen identifizierten Expressionsmuster verschiedener miRNAs, die eine Bestimmung des Risikos für die Ausbildung von Metastasen zeigten (Wu *et al.*, 2012; Lokeshwar *et al.*, 2018; Heinzelmann *et al.*, 2019).

Folglich existiert zur Expression von miRNAs im NZK eine Datenlage, welche jedoch bis jetzt unzureichend ist. Aus diesem Grund beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit dem Vergleich der Expressionsmuster ausgewählter miRNAs in Primärtumoren und Metastasen.

3 Zielstellung

Die Metastasierung stellt nach wie vor den prognosebestimmenden Faktor bei Patienten mit NZK da. Deshalb ist es von zentraler Bedeutung, die darin involvierten Signalwege zu verstehen, um neue, effektive Therapieansätze zu entwickeln. Da miRNAs eine essentielle, regulative Funktion in Signalkaskaden besitzen, ist die Identifizierung von metastasierungsassoziierten miRNAs ein wichtiger Schritt zu einem besseren Verständnis dieser molekularen Prozesse.

In Vorarbeiten wurden daher in *Microarray*-Analysen die miRNA-Profile von Primärtumoren und Metastasen miteinander verglichen, um differentiell exprimierte miRNA zu detektieren.

Im ersten Schritt der vorliegenden Promotionsarbeit sollen Expressionsunterschiede der *Microarray*-Ergebnisse von drei ausgewählten miRNAs mittels qRT-PCR quantifiziert werden. Es sollen zum einen die miRNA-Expressionsmuster zwischen Primärtumoren und Metastasen aus Knochen, Lunge und Gehirn verglichen werden. Zum andern soll überprüft werden, ob eine differentielle Expression der einzelnen miRNAs in Abhängigkeit vom Metastasenort vorliegt.

Im zweiten Schritt soll in einem *in-vitro* Zellkulturmodell der funktionelle Einfluss einer deregulierten miRNA auf die Metastasierung des NZK untersucht werden. Zu diesem Zweck sollen auf Proteinebene die direkten *targets* dieser miRNA und die dadurch beeinflussten Signalwege identifiziert werden.

4 Material und Methodik

4.1 Biologische Materialien

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden insgesamt 46 Tumorproben untersucht. Alle Proben stammten aus klarzelligen NZK. Zum einen handelte es sich dabei um nicht-metastasierte (nmNZK) und metastasierte (mNZK) Primärtumore. Als nmNZK definiert wurden Tumore, deren zugehöriger Patient in einem Beobachtungszeitraum von mindestens vier Jahren keine Metastasen aufwies. Zum anderen wurden Metastasen aus Gehirn, Lunge und Knochen untersucht. Die chirurgische Entfernung der Primärtumore und Metastasen erfolgte im Zeitraum von 1994 – 2009 am Universitätsklinikum Jena. Hinzu kamen 4 Proben von Hirnmetastasen, die von 2013 – 2014 am Universitätsklinikum Magdeburg exzidiert wurden. Voraussetzung für das Verwenden der operativ entfernten Tumore war in allen Fällen eine präoperative Einverständniserklärung seitens des Patienten wie auch das Ethikvotum. Alle Proben sind nach operativer Entnahme zeitnah in Formalin fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet (FFPE) worden. Im Anschluss daran wurden die Proben durch einen Pathologen nach den zum Zeitpunkt der Entnahme gültigen UICC-TNM-Kriterien beurteilt. Die exzidierten Primärtumore mussten bei der histopathologischen Beurteilung als klarzellige NZK identifiziert werden, einen mindestens 75%-igen Tumoranteil besitzen sowie weder Nekrosen noch größeren Einblutungen aufweisen. Genauere Merkmale lassen sich Tabelle 6 entnehmen.

Tabelle 6 - Zusammenfassung der untersuchten Proben
 nmNZK=nicht-metastasierter Primärtumor, mNZK=metastasierter Primärtumor, T=*tumor*,
 OP=Operation

		nmNZK	mNZK
Anzahl der Patienten		15	10
Alter	Mittelwert	60	60
	Median	59	60
	Spanne	43-77	49-75
Geschlecht	Frauen/Männer	6/9	3/7
T-Kategorie	1a	8	1
	1b	6	3
	2a	-	1
	2b	1	2
	3a	-	1
	3b	-	2
Metastasen zum OP-Zeitpunkt		-	3
Grading	1	9	1
	2	6	6
	3	-	3
	4	-	-
Nachsorgezeitraum in Monaten	Mittelwert	77	13
	Median	77	10
	Spanne	48-110	0-38
Lokalisation der Metastase	Lunge	Knochen	Gehirn
Anzahl	8	6	7

4.2 Gewebeaufarbeitung

Zunächst wurden die zu analysierenden FFPE-Proben mittels einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung im Lichtmikroskop nochmals überprüft, ob sie die erforderlichen Kriterien erfüllen. Für die Isolation der Gesamt-RNA wurden aus einer FFPE-Probe mittels eines Mikrotoms jeweils zehn Schnitte von 7 µm Dicke hergestellt. Diese wurden in 2 Milliliter (ml) Reaktionsgefäße (RNase frei, RNA *low bind*) gegeben.

4.3 RNA-Isolation

Für die Isolation wurde das *miRNeasy FFPE Kit* (Qiagen) nach Herstellerangaben verwendet. Hierfür wurde zunächst 1 ml Xylen zu den Tumorschnitten hinzugegeben, um das Paraffin zu lösen. Nach 10-sekündigem Durchmischen und anschließender Zentrifugation bei 14.500 rpm für 2 Minuten (min) wurde der Überstand verworfen. Um die Xylen-Reste vollständig zu entfernen, wurde danach 1 ml 100%-iges Ethanol zugegeben, der Probenansatz gemischt, für 2 min bei 14.500 rpm Geschwindigkeit zentrifugiert und der Überstand mittels Pipette abgesaugt. Um sicher zu gehen, dass kein Alkohol zurückbleibt, wurde das Reaktionsgefäß bei offenem Deckel bei 37°C für 10 min inkubiert, sodass jegliches Ethanol verdunstete. Im nächsten Schritt wurde zuerst 240 µl *PKD Buffer* hinzugegeben, welcher die Aktivität der anschließend beigefügten 10 µl Proteinase K abpufferte. Proteinase K lysierte die in der Probe enthaltenen Proteine und setzte sowohl die enthaltene Gesamt-RNA als auch die enthaltene DNA frei. Mittels einer Pipette wurde die Suspension mehrmals gemischt und im darauffolgenden Schritt als Erstes bei 56°C für 15 min inkubiert und danach für nochmals 15 min bei 80°C. Nachdem nun die Suspension für 3 min auf Eis gestellt wurde, um die Enzymaktivität zu stoppen, folgte eine 15-minütige Zentrifugation bei 13.500 rpm. Der Überstand enthielt jetzt sowohl RNA als auch DNA. 250 µl dieses Überstandes wurden in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Hinzugegeben wurden 25 µl *DNase Booster Buffer* und 10 µl *DNase I stock solution*. Durch mehrmaliges Schwenken des Reaktionsgefäßes wurde die Lösung vermischt und dann für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die DNase führte zu einem Abbau der enthaltenen DNA, sodass nur noch RNA vorlag. Anschließend wurden 500 µl *Buffer RBC* hinzugegeben und 750 µl 100%-iges Ethanol. *Buffer RBC* enthält chaotrophe Salze, die dazu führten, dass die RNA-Moleküle sich in den im nachfolgenden Schritt verwendeten „*Collection tubes*“ enthaltenen Filtern anlagern konnten. 700 µl des Probenansatzes wurden in die „*Collection tubes*“ gegeben und für 15 s bei 10.000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und der Schritt so lange wiederholt, bis die komplette Probe in den Filter überführt wurde. Um die RNA-Moleküle von Rückständen der chaotrophen Salze zu reinigen und vom Filter zu lösen, wurde zweimal 500 µl *Buffer RPE* mittels Pipette hinzugegeben und zuerst für 15 s bei

10.000 rpm zentrifugiert, beim zweiten Mal für 2 min. *Buffer RPE* reinigt die an die Filtermembran gebundene RNA und entfernt die noch im Filter enthaltenen Salze. Der Durchfluss wurde jeweils verworfen. Als vorletzter Schritt wurde nun der Filter in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt und zur vollständigen Entfernung jeglichen *RPE Buffers* für 5 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Im letzten Schritt der RNA-Isolation wurde der Filter in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und mit 30 µl RNase-freiem Wasser gespült, was durch eine nochmalige Zentrifugation für 1 min bei maximaler Geschwindigkeit geschah. Durch die bipolare Eigenschaft des Wassers wurde die im Filter gebundene RNA gelöst und befand sich nun im 1,5 ml Gefäß. Die Aufbewahrung der Proben geschah bei -20°C.

4.4 Bestimmung der RNA-Konzentration und Reinheit

Die Messung der RNA-Konzentration und die Reinheit der isolierten RNA wurde mittels Spektrophotometer *NanoDrop ND-1000* durchgeführt. Um die Reinheit der RNA zu bestimmen, misst das Gerät die Absorption der Proben bei verschiedenen Wellenlängen des Lichts. Bei einer Wellenlänge von 260 nm wird die RNA-Konzentration gemessen. Zur Messung der Reinheit der Probe wird zunächst die Absorption des Lichts bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen, die eine Verunreinigung durch Proteine erfasst. Bei einer Absorption von 230 nm ist eine Verunreinigung durch Lösungsmittel zu erwarten. Die Absorptionen werden zueinander ins Verhältnis gesetzt. Das 260/280-Verhältnis sollte dabei möglichst über 1,7 liegen.

4.5 Quantitative Real-Time Polymerase Kettenreaktion

Für diese Arbeit wurde die quantitative qRT-PCR verwendet. Der Vorteil dieser Methode ist, dass bestimmte Genprodukte gezielt und hoch sensitiv quantifiziert werden können.

In Tabelle 7 sind für die jeweiligen miRNAs die Anzahl der untersuchten Proben aufgeführt. Die Anzahl unter den miRNAs variiert, da teilweise das Material der einzelnen Proben nicht ausreichend war, um alle miRNAs damit zu analysieren. Für die klinischen Details zu den untersuchten Proben wird auf den Anhang verwiesen.

Tabelle 7 - Zusammenfassung der untersuchten Proben
 nmNZK=nicht-metastasierter Primärtumor, mNZK=metastasierter Primärtumor

	miR-30c-2-3p	miR-29c-5p	miR-375-3p
nmNZK	15	15	13
mNZK	10	10	8
Lungenmetastasen	8	8	8
Hirnmetastasen	6	7	7
Knochenmetastasen	6	6	6

4.5.1 Reverse Transkription

Im ersten Schritt muss dafür die RNA durch eine reverse Transkription in die komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden, bevor die eigentliche Amplifikation durchgeführt werden kann. Die Herstellung der cDNA erfolgte mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase (RT). Es wurde dafür der *TaqMan microRNA Reverse Transkription Kit* und *miRNA-Primer* der Firma *Applied Biosystems* nach dem Protokoll des Herstellers verwendet. Folgende *Primer* wurden eingesetzt.

- miR-30c-2-3p RT-*Primer*
- miR- 29c-5p RT-*Primer*
- miR-375-3p RT-*Primer*
- RNU 48 RT-*Primer* (Referenzgen)

Die zu analysierenden RNA-Proben werden zunächst aufgetaut und gemischt. Für die reverse Transkription wurde in einem 0,2 µl Reaktionsgefäß (*PCR-clean*) ein Ansatz von insgesamt 15 µl hergestellt, bestehend aus 5 µl RNA-Probe mit einer RNA-Konzentration von 20 ng/µl, 7 µl eines RT-*Mastermixes* und 3 µl *Primer*. Die 7 µl des RT-*Mastermixes* setzen sich zusammen aus 4,16 µl nuklease-freiem Wasser, 0,19 µl RNase Inhibitor, 1,5 µl *Reverse Transkriptions Buffer*, 1 µl *MultiScribe RT* und 0,15 µl Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs). Die Proben werden anschließend durchmischt, zentrifugiert und für 5 min auf Eis inkubiert.

Für die PCR-Reaktion wurde ein *Thermocycler* der Firma *Biometra* verwendet. Die einzelnen Schritte sind in der unten stehenden Tabelle 8 aufgeführt. Nach Ablauf der Reaktion wurden die Proben bei -20C° gelagert.

Tabelle 8 - Ablauf des PCR-Programms im Thermocycler
min=Minuten

	Zeit	Temperatur
Primerhybridisierung	30 min	16 °C
Elongation	30 min	42 °C
Denaturierung	5 min	85 °C
	∞	4 °C

4.5.2 qRT-PCR-Amplifikation

Ziel der qRT-PCR ist wie bei der normalen PCR eine Amplifikation eines bestimmten Genabschnittes. Der Vorteil der qRT-PCR liegt darin, dass nach jedem abgelaufenen Zyklus der Gehalt an amplifiziertem Material gemessen und somit relativ quantifiziert werden kann. Dies geschieht durch Sonden, die durch komplementäre Basen spezifisch an die zu untersuchenden Regionen binden. Die Sonden enthalten einen gebundenen *Quencher* und einen gebundenen *Reporter*. Der *Reporter* ist der eigentliche Fluoreszenzfarbstoff, der unter Anregung fluoresziert. Dies geschieht jedoch nur, wenn der gebundene *Quencher* sich abspaltet, da dieser in gebundener Form die Fluoreszenz des Reporters inhibiert. Die Abspaltung geschieht durch die Exonuklease-Aktivität der *Taq-Polymerase* (Abbildung 7).

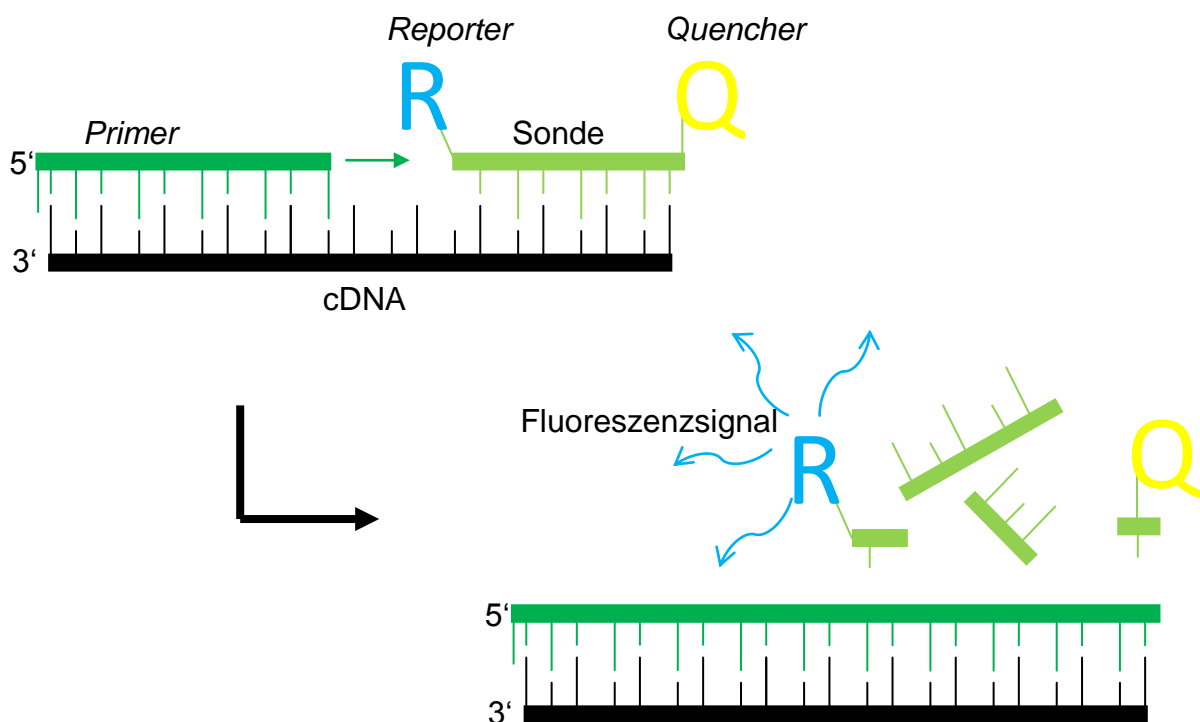


Abbildung 7 - Schematische Darstellung des qRT-PCR – Ablaufs
cDNA=komplementäre DNA

Die Fluoreszenz ist proportional zur Menge der cDNA-Kopien der zu untersuchenden miRNA. Dadurch kann eine exponentielle Kurve errechnet werden, in welcher Zyklusnummer und Farbstoffintensität abgelesen werden können.

Es wird außerdem für jeden Reaktionsansatz der *cycle threshold* (C_T)-Punkt ermittelt, an dem das Fluoreszenzsignal einen festgelegten Schwellenwert (*threshold*) überschreitet. Mithilfe des C_T -Werts können die einzelnen Proben miteinander verglichen werden. Zur Normalisierung der Daten wurde die *small nuclear RNA* (snoRNA) RNU48 als Referenz verwendet, für die in Vorarbeiten gezeigt werden konnte, dass sie in Nierentumoren konstant exprimiert wird (Wotschovsky *et al.*, 2011).

Die cDNA-Proben wurden zusammen mit dem entsprechenden *Primer* (*TaqMan® MicroRNA Assay Primer, Applied Biosystems*) und einem PCR Mastermix (*TaqMan® Gene Expression Master Mix, Applied Biosystems*) auf eine 96-Well Platte pipettiert. In jedes *Well* wurden insgesamt 10µl gegeben, bestehend aus 0,5 µl *Primer*, 5 µl *TaqMan Gene Expression MasterMix (Applied Biosystems)*, 3,5 µl nukleasefreiem Wasser und 1 µl cDNA-Probe. Danach wurde die 96-Well Platte mit einer Folie abgedeckt, für 1 min bei 1000 rpm zentrifugiert und schließlich in das *StepOnePlus™ Real Time PCR System (Applied Biosystems)* gegeben. Für jede Probe wurden auf der Platte 3 biologische Replikate und für jede miRNA eine *Non-Template Control* (NTC), die als Negativkontrolle diente und aus RNase-freiem Wasser bestand, aufgetragen.

Das vom PCR-Gerät ausgeführte Programm ist in der nachfolgenden Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9 - verwendetes qRT-PCR-Programm
PCR=Polymerasekettenreaktion

	Aktivierung des Enzyms für die gesamte Dauer der PCR	Denaturierung	Annealing und Elongation
	Enzymaktivierung	PCR	
Schritt	<i>Hold</i>	Zyklus (40 Zyklen)	
Zeit	10 min	15 s	60 s
Temperatur	95 °C	95 °C	60 °C

4.6 Zellkulturen

Für den zweiten Teil dieser Arbeit wurde die kommerziell erhältliche Zelllinie 786-O verwendet. 786-O sind Zellen eines primären, klarzelligen NZK, die bei einer radikalen Nephrektomie eines 58-jährigen Mannes gewonnen wurden, welcher auch Metastasen entwickelte (Williams *et al.*, 1978). Die Zellen wachsen als *Monolayer*-Kultur auf dem Boden der T25 Zellkulturflasche. Als Medium wurde 45% *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), 45% *Roswell Parc Memorial Institute Medium* (RPMI) mit 10% fetalem Kälberserum

(FKS) verwendet. Die Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt inkubiert.

4.6.1 Auftauen der Zelllinie 786-O

Für das Auftauen der Zellen wurde zunächst das Zellkulturmedium auf 37°C erwärmt und davon 8 ml in ein 10 ml Reaktionsgefäß gegeben. Nun wurde das Medium tröpfchenweise mit einer Pipette auf die eingefrorenen Zellen gegeben. Dazwischen wurden die Zellen wiederholt mit der Pipette gemischt und sukzessive in das 8 ml Reaktionsgefäß überführt, bis letztlich alle eingefrorenen Zellen aufgetaut und im Medium gelöst waren. Anschließend wurde das 10 ml Reaktionsgefäß mit den enthaltenen Zellen bei 1100 rpm für 3 min zentrifugiert und der entstehende Überstand abgesaugt. Das Zellpellet am Grund des Gefäßes wurde nun mit 2 ml Medium gemischt, in eine T25 Zellkulturflasche in den Brutschrank gegeben. Am nächsten Tag wurde ein Mediumwechsel vorgenommen, um bestehende Reste des Einfriermediums zu entfernen.

4.6.2 Kultivierung der Zelllinie 786-O

Um zu verhindern, dass die Zellen den gesamten Boden der T25 Zellkulturflasche ausfüllten und damit potentiell ihren Stoffwechsel veränderten, mussten sie in regelmäßigen Abständen gesplittet und in eine neue T25 Zellkulturflasche eingesät werden. Hierfür wurde zunächst das Medium aus der Zellkulturflasche entfernt und anschließend die Zellen mit 1 ml Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gespült. Nach mehrmaligem Schwenken wurde PBS wieder entfernt, 1x Trypsin/EDTA-Lösung zum Ablösen der Zellen hinzugegeben und die T25 Zellkulturflasche für 1,5 min in den Brutschrank gestellt. Nach Ablösen der Zellen vom Boden der T25 Zellkulturflasche wurden 2 ml Medium hinzugefügt, um die Wirkung des Trypsins zu beenden und die Zellen im Medium zu suspendieren. Es erfolgte eine Überführung in ein 2 ml Reaktionsgefäß, eine Zentrifugation für 3 min bei 1100 rpm. Anschließend wurde die Zellen in einer Verdünnung von 1:4 – 1:10 in eine neue T25 Zellkulturflasche eingesät und durch Hinzugabe von Medium auf Gesamtvolumen von 4,5 ml aufgefüllt.

4.7 Transiente Transfektion

Um eine Überexpression von miR-30c-2-3p in 786-O zu erreichen, wurde eine transiente Transfektion mittels *small interfering RNA* (siRNA) (*mimic*) durchgeführt. Dafür verwendet wurden *miScript miRNA Mimic* (Qiagen), als Transfektionsreagenz *DharmaFECT 2 Transfection Reagent* (GE Healthcare) und das Transfektionsmedium *Opti-MEM* (Sigma

Aldrich). Bei der Durchführung der Transfektion wurde nach dem empfohlenen Protokoll des Herstellers vorgegangen.

4.7.1 Transfektion von miR-30c-2-3p und Ernten der Zellen

Für jede Transfektion wurden jeweils zwei 6-Well Platten verwendet. Auf jeder der 6-Well Platten wurden in jeweils drei Wells je 30.000 Zellen eingesät, welche nur mit Zugabe des Transfektionsmediums kultiviert wurden, jedoch ohne Zugabe der miR-30c-2-3p (*mock*). Die *mocks* dienen bei der Auswertung als Negativkontrolle. In den drei verbliebenen Wells der Platte wurden die eingesäten Zellen transient transfiziert. Dies geschah an drei unterschiedlichen Tagen, sodass letztlich drei biologische Replikate produziert worden sind. Eine der beiden 6-Well Platten wurde nach jeder Transfektion für die Transfektionskontrolle mittels qRT-PCR genutzt, die andere Platte hingegen für eine Proteinanalyse.

Nach erfolgtem Einsäen und Inkubation über 24 h wurde die Transfektion durchgeführt. Zunächst wurde in einem 2 ml Reaktionsgefäß *DharmaFECT 2 Transfection Reagent* (GE Healthcare) in *Opti-MEM-Medium* (Sigma Aldrich) gelöst. In einem zweiten Reaktionsgefäß (0,5 ml) wurde *small interfering RNA* (siRNA) μl in *Opti-MEM-Medium* gelöst. Die genauen Konzentrationen wurden hierbei, wie im Ergebnisteil dargestellt, durch Vorversuche ermittelt. Beide Reaktionsgefäße wurden für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Reaktionsgemisch des zweiten Reaktionsgefäßes wurde anschließend in das erste Reaktionsgefäß überführt. Es folgte eine weitere Inkubation für 20 min bei Raumtemperatur. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 1600 μl Zellkulturmedium hinzugefügt, sodass ein Gesamtvolumen von 2 ml vorlag. Das in den Wells enthaltene Medium wurde entfernt, die Zellen mit 1 ml PBS gespült und anschließend mit dem vorbereiteten Transfektionsreagenz für 8 Stunden im Inkubator kultiviert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Medium der Zellen durch 2 ml Kulturmedium ersetzt, nachdem die Zellen mit 1 ml PBS gespült wurden. Die Platten wurden nun für weitere 42 Stunden im Brutschrank kultiviert, wobei sie maximal eine Konfluenz von 80% erreichen sollten.

Das Vorgehen zum Ernten der Zellen ähnelt sich zunächst dem des *Splittings*. Nach Überführung in ein 2 ml Reaktionsgefäß und Zentrifugation für 3 min bei 1100 rpm wurde der Überstand entfernt und anschließend die zurückbleibenden Zellen zweimal mit 2 ml PBS gespült, jeweils mit anschließender dreiminütiger Zentrifugation bei 1100 rpm. Zum Schluss wurde das PBS möglichst vollständig entfernt und das gewonnene Zellpellet bei -81°C eingefroren.

4.8 RNA-Isolation aus 786-O Zelllinie

Um das Ergebnis der Transfektion mittels einer qRT-PCR auswerten zu können, musste die RNA aus den Zellen isoliert werden. Für die Isolierung der RNA aus den transfizierten Zellen wurde der *miRNeasy Mini Kit* von Qiagen benutzt und nach dem Protokoll des Herstellers vorgegangen.

Zunächst wurden die Zellen hierfür mit 700 µl *QIAzol Lysis Reagenz* lysiert und bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert. Danach wurden 140 µl Chloroform hinzugegeben und für weitere 2-3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation mit 11.300 rpm bei 4°C für 15 min. 350 µl des entstandenen Überstandes wurden nun in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und mit 525 µl 100%igem Ethanol versetzt. Die entstandene Lösung wurde in ein „*Collection tube*“ mit enthaltenem „*Filter cartridge*“ pipettiert und bei 10.000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen, der Filter mit 700 µl *Buffer RWT* gespült und weitere 15 s bei 10.000 rpm zentrifugiert. Auch dieser Durchfluss wurde verworfen. Es folgte eine zweimalige Hinzugabe von jeweils 500 µl *Buffer RPE*. Zwischen jeder Hinzugabe wurde das „*Collection tube*“ wieder bei 10.000 rpm zentrifugiert. Um sicher zu gehen, dass keinerlei *Buffer RPE* zurückblieb, wurde der Filter in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß gestellt und bei maximaler Geschwindigkeit für 1 min zentrifugiert. Der trockene Filter wurde anschließend in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gestellt, mit 30 µl RNase-freiem Wasser versetzt und bei 10.000 rpm für 1 min zentrifugiert. Die isolierte RNA befanden sich nun in 30 µl im Reaktionsgefäß.

Nach der RNA-Isolation erfolgte wie bereits in den Kapiteln 4.6 und 4.7 beschrieben zunächst eine Konzentrationsbestimmung, eine Reverse Transkription zur Herstellung einer cDNA und danach eine qRT-PCR, um die transfizierte miRNA in den Zellen nachzuweisen.

4.9 Identifizierung der miRNA-targets durch 2D-Gelelektrophorese und Massenspektrometrie

Um miRNA-targets auf Proteinebene zu identifizieren, wurden 786-O Zelllysate nach Transfektion mittels zweidimensionaler differentieller Gelelektrophorese (2D-DIGE) und anschließender *Liquid-Chromatographie-Massenspektrometrie/ Massenspektrometrie* (LC-MS/MS) untersucht. Es wurden wie bei der qRT-PCR drei biologische Replikate in die Messung eingeschlossen.

Zunächst wurde das Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit 1 ml PBS gewaschen. Danach wurde 100 µl *Well* Lysepuffer hinzugegeben und die 6-*Well* Platte auf Eis gestellt. Die Lysate wurden in Reaktionsgefäße überführt und bei 12.000 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert, um die nicht-löslichen Bestandteile abzutrennen. Daraufhin wurden die Proteine mit Acetonitril gefällt. Für die Fällung wurden 200 µl Lysat eingesetzt und mit einer -20 °C

kalten Acetonitril/Methanol (10:1)-Lösung im Verhältnis von 1:2 gemischt. Die Fällung erfolgte für 30 s auf Eis. Danach wurde das Gefäß bei 4 °C bei 2000 g für 2 min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Die Solubilisierung erfolgte mit 50 µl Rehydratisierungspuffer über Nacht bei Raumtemperatur. Für die darauffolgende Proteinkonzentrationsbestimmung wurde das *2-D Quant Kit* von *GE Healthcare* nach Herstellerprotokoll verwendet. Es folgte die 2D-DIGE. Zunächst wurden die Proteine mittels *Amersham CyDye DIGE Fluors (minimal dyes) for Ettan DIGE* fluoreszenzmarkiert, was nach Protokoll des Herstellers *GE Healthcare* durchgeführt wurde. Für die isoelektrische Fokussierung (1. Dimension) wurden 24 cm lange Gel-Streifen mit einem nicht linearen pH-Gradienten von pH 3 bis 10 verwendet. Die solubilisierten und angefärbten Proben wurden auf 450 µl mit Rehydratisierungspuffer aufgefüllt und über Nacht bei Raumtemperatur mit den Gelstreifen inkubiert (*in-gel* Rehydratisierung). Die Elektrophorese erfolgte danach ebenfalls über Nacht mittels des *Ettan IPGphor 3-Systems (GE Healthcare)*. Das verwendete Programm ist in Tabelle 10 aufgeführt.

Tabelle 10 - Programm der zweidimensionalen differentiellen Gelelektrophorese

Einstellungen			Zeit [h]
Schritt	Modus	U [V]	
1	Stufe	150	3
2	Stufe	300	3
3	Gradient	1000	6
4	Gradient	6000*/10000	1
5	Stufe	6000*/10000	4,5
t _{gesamt} /Vh _{gesamt} [h/kVh]			17,5/52
Temperatur		20°C	
I _{max} /Strip		70 µA	

Die nach ihrem isoelektrischen Punkt aufgetrennten Proteine wurden anschließend nach ihrer Größe aufgetrennt (2. Dimension). Dies erfolgte unter Verwendung des *2D-HPE™ Large Gel NF 12,5 % Kit* (Serva) nach Angaben des Herstellers. In Tabelle 11 ist das verwendete Programm aufgeführt.

Tabelle 11 - Programm der zweidimensionalen differentiellen Gelelektrophorese

Schritt	U [V]	I [^{mA} /Gel]	P _{max} [^W /Gel]	t [h:min]
1	100	7	1	0:30
2	200	13	3	0:30
3	300	20	5	0:10
Immobilisierter pH-Gradient (IPG) - Streifen entfernen				
4	1500	40	30	3:50
5	1500	45	40	0:50

Abschließend wurde die Fluoreszenzintensität der aufgetrennten Protein-*spots* durch einen Fluoreszenzscanner (*Typhoon Trio; GE Healthcare*) detektiert und die differentiell exprimierten Proteine mittels der Software *Delta2D* von *Decodon* ausgewertet.

Die Protein-*spots* wurden aus dem Gel gestanzt und von Dr. Claudia Fecher-Trost und Dr. Pascal Schalkowsky in der Experimentellen und Klinischen Pharmakologie und Toxikologie (Universität des Saarlandes) mittels LC-MS/MS analysiert.

Anschließend wurde mittels dem Programm *miRWalk* (Sticht *et al.*, 2018) überprüft, ob die Nukleotidsequenz der zu den detektierten Proteinen zugehörigen mRNA komplementär zur Sequenz von *miR-30c-2-3p* war.

4.10 Biostatistische Auswertung

4.10.1 Auswertung der miRNA Expression in FFPE-Proben

Die Analyse der qRT-PCR zum Vergleich der C_T-Werte und die Errechnung der *fold changes* (FC) wurde mit *Relative Expression Software Tool* (REST) 2008 (Pfaffl *et al.*, 2002) durchgeführt, nachdem die qRT-PCR-Ergebnisse mithilfe von *Microsoft Office Excel 2007* mit unten stehender Formel normalisiert wurden.

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

Für den *Mann-Whitney-U* Test zur Errechnung der Signifikanz und die Erstellung der Boxplots wurde *IBM SPSS – Software for Statistic Analysis* (Version 22.0.0.1) verwendet.

4.10.2 Auswertung der Transienten Transfektion

Um den relativen Gehalt an miRNA in den transfizierten Zellen zu vergleichen, wurden die PCR-Ergebnisse der unbehandelten Zellen mit den Ergebnissen der transfizierten Zellen

verglichen. Zur Auswertung wurde die REST-Software benutzt. Der normalisierte Expressionsunterschied wurde als FC angegeben.

5 Ergebnisse

5.1 Vergleich der Expressionsmuster ausgewählter miRNAs in Primärtumoren und Metastasen mittels qRT-PCR

Da im NZK die Metastasierung für Therapie und Prognose der entscheidende Faktor ist, wurden in Vorarbeiten durch *Microarray*-Analysen die miRNA-Profile von Primärtumoren und Metastasen aus Lunge, Gehirn und Knochen miteinander verglichen. Damit sollten vermehrt beziehungsweise vermindert exprimierte miRNAs detektiert werden, um Hinweise auf eine potenzielle Beteiligung im Metastasierungsprozess zu erlangen. Zukünftig soll damit ein besseres Verständnis der Signalwege im klarzelligen NZK möglich sein. Drei dieser im *Microarray* untersuchten miRNAs wurden für diese Arbeit ausgewählt, um die Ergebnisse mittels qRT-PCR zu validieren. Es handelt sich hierbei um miR-30c-2-3p, miR-29c-5p und miR-375-3p. Untersucht werden sollten zum einen generelle Expressionsunterschiede der ausgewählten miRNAs in Primärtumoren und Metastasen sowie spezifische Unterschiede in den verschiedenen Metastasenorten.

Untersucht wurden nicht-metastasierte (n=15) und metastasierte (n=10) Primärtumore sowie Metastasen (n=20) aus Lunge (n=8), Knochen (n=6) und Gehirn (n=7). Aufgrund des begrenzten Materials der einzelnen Proben konnten teilweise nicht alle miRNAs in jeder Probe analysiert werden. Die genaue Anzahl der untersuchten Proben kann man dem Anhang entnehmen.

5.1.1 Bestimmung der Primereffizienzen

Für die verwendeten *primer* der qRT-PCR musste zunächst deren Effizienz bestimmt werden. Die Effizienz beschreibt die Vervielfältigung der untersuchten Proben (im Idealfall eine Verdopplung der miRNA-Level bei jedem Zyklus) und sollte idealerweise zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Dazu wurden für jeden *primer* mehrere Verdünnungsreihen (Verdünnungsfaktor jeweils 1:10) angesetzt. Die Effizienzwerte für die untersuchten miRNAs sind in Tabelle 12 aufgeführt.

Tabelle 12 - Effizienzen der RT-*primer*
RT=Reverse Transkriptase

RT-<i>primer</i>	Effizienz
RNU 48	1,96
miR-30c-2-3p	1,86
miR-29c-5p	1,97
miR-375-3p	1,86

5.1.2 Quantifizierung der Expression von metastasierungsassoziierten miRNAs in Primärtumoren und Metastasen des klarzelligen NZK

Für die Quantifizierung genereller Expressionsunterschiede in Primärtumoren und Metastasen des klarzelligen NZK wurden miR-30c-2-3p und miR-29c-5p aus den *Microarray*-Vorarbeiten ausgewählt.

In metastasierten Primärtumoren war miR-30c-2-3p 1,7-fach weniger exprimiert als in nicht-metastasierten Primärtumoren. Hier konnte jedoch lediglich eine Tendenz ohne Signifikanz nachgewiesen werden.

Für miR-30c-2-3p ergab sich in den Metastasen der Lunge im Vergleich zu nicht-metastasierten Primärtumoren eine 4,3-fache Herabregulation ($p < 0,001$; 95%-Konfidenzintervall (KI) = (-13,16) – (-1,83)). In Knochenmetastasen zeigte sich eine verminderte Expression um den Faktor 3,0 ($p = 0,006$; 95%-KI = (-13,33) – (-0,48)), in Hirnmetastasen um einen FC von -15,6 ($p < 0,001$; 95%-KI = (-100,00) – (-1,55)).

Im Vergleich der Metastasen zu den metastasierten Primärtumoren zeigte sich in Lungenmetastasen eine signifikante Reduktion von miR-30c-2-3p um 2,5 ($p = 0,016$, 95%-KI = (-14,93) – (-0,40)). In Hirnmetastasen wurde eine Reduktion um den Faktor 9,0 detektiert ($p = 0,002$; 95%-KI = (-66,67) – (-0,72)).

Beim Vergleich der Metastasenorte untereinander wurden signifikante Unterschiede in der Expression registriert. In Hirnmetastasen lag die geringste Expression vor. Hier war miR-30c-2-3p 3,6-fach weniger exprimiert als in Lungenmetastasen ($p = 0,028$; 95%-KI = (-18,18) – (-0,48)). Im Vergleich zu Knochenmetastasen war sie in Hirnmetastasen 5,3-fach niedriger exprimiert ($p = 0,025$; 95%-KI = 0,59 - 44,96) (Abbildung 8).

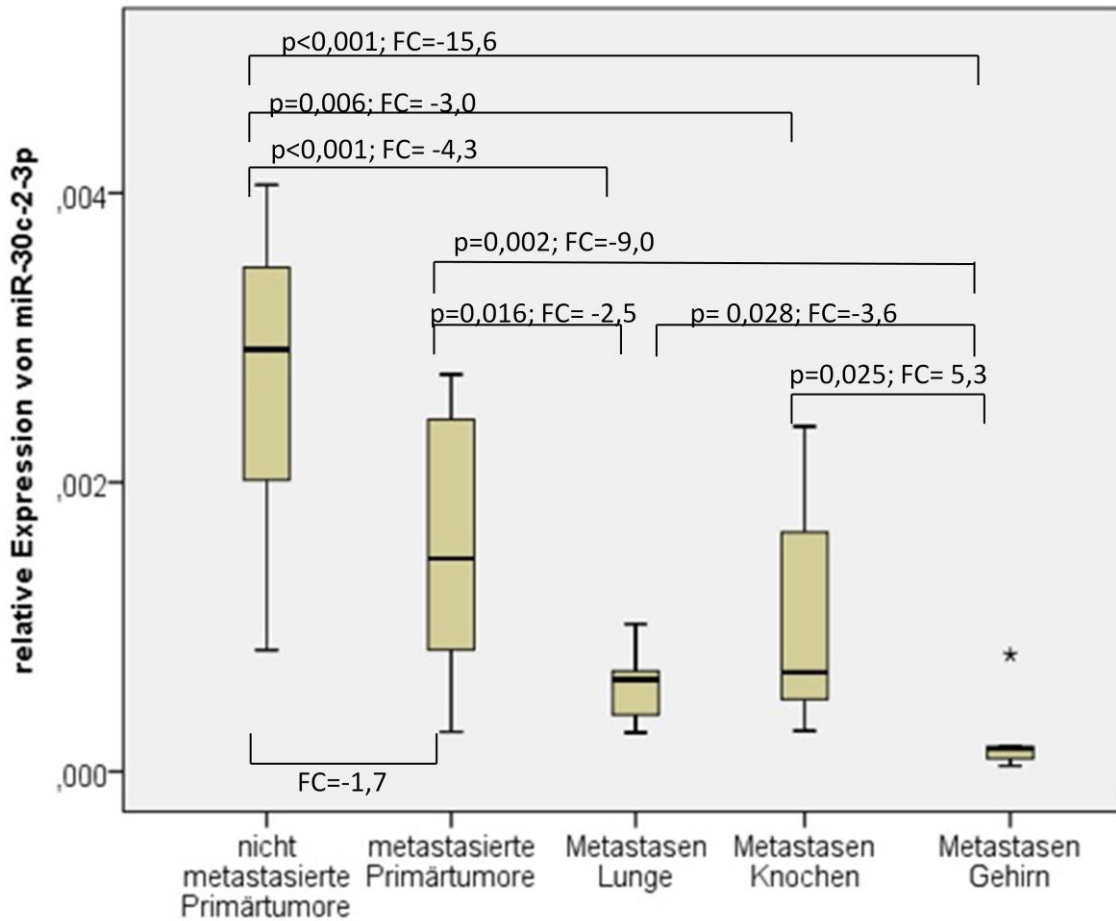


Abbildung 8 - Vergleich der normalisierten *cycle threshold* (C_T) Werte für miR-30c-2-3p in nicht-metastasierten und metastasierten Primärtumoren sowie in Metastasen der Lunge, Knochen und Gehirn
 FC = *fold change*

Die qRT-PCR-Ergebnisse von miR-29c-5p zeigten in metastasierten Primärtumoren im Verhältnis zu nicht-metastasierten Primärtumoren eine verminderte Expression um einen FC von 1,5, der aber nicht signifikant war.

Es wurde eine signifikant verminderte Expression in allen Metastasenorten in der Gegenüberstellung zu den nicht-metastasierten Primärtumoren detektiert. Hierbei war miR-29c-5p in Lungenmetastasen 1,8-fach weniger exprimiert ($p=0,014$, 95%-KI= (-5,50) – (-0,53)), in Knochenmetastasen 2,8-fach ($p=0,001$, 95%-KI= (-9,09) – (-0,76)) und in Hirnmetastasen 4,3-fach ($p<0,001$, 95%-KI= (-10,87) – (-1,60)).

Im Vergleich zu metastasierten Primärtumoren war die Expression von miR-29c-5p lediglich in Hirnmetastasen signifikant um den FC 2,8 vermindert ($p=0,006$, 95%-KI= (-12,82) – (-0,73)).

Im Vergleich der Metastasenorte untereinander ergaben sich signifikante Unterschiede. In Hirnmetastasen lag die Expression am niedrigsten. MiR-29c-5p wurde hier 2,4-fach weniger exprimiert als in Lungenmetastasen ($p=0,003$, 95%-KI= (-5,62) – (-0,92)). In Hirnmetastasen im Vergleich zu Knochenmetastasen lag eine Reduktion der Expression um -1,5 vor ($p=0,093$, 95%-KI= 0,51 - 5,50) (Abbildung 9).

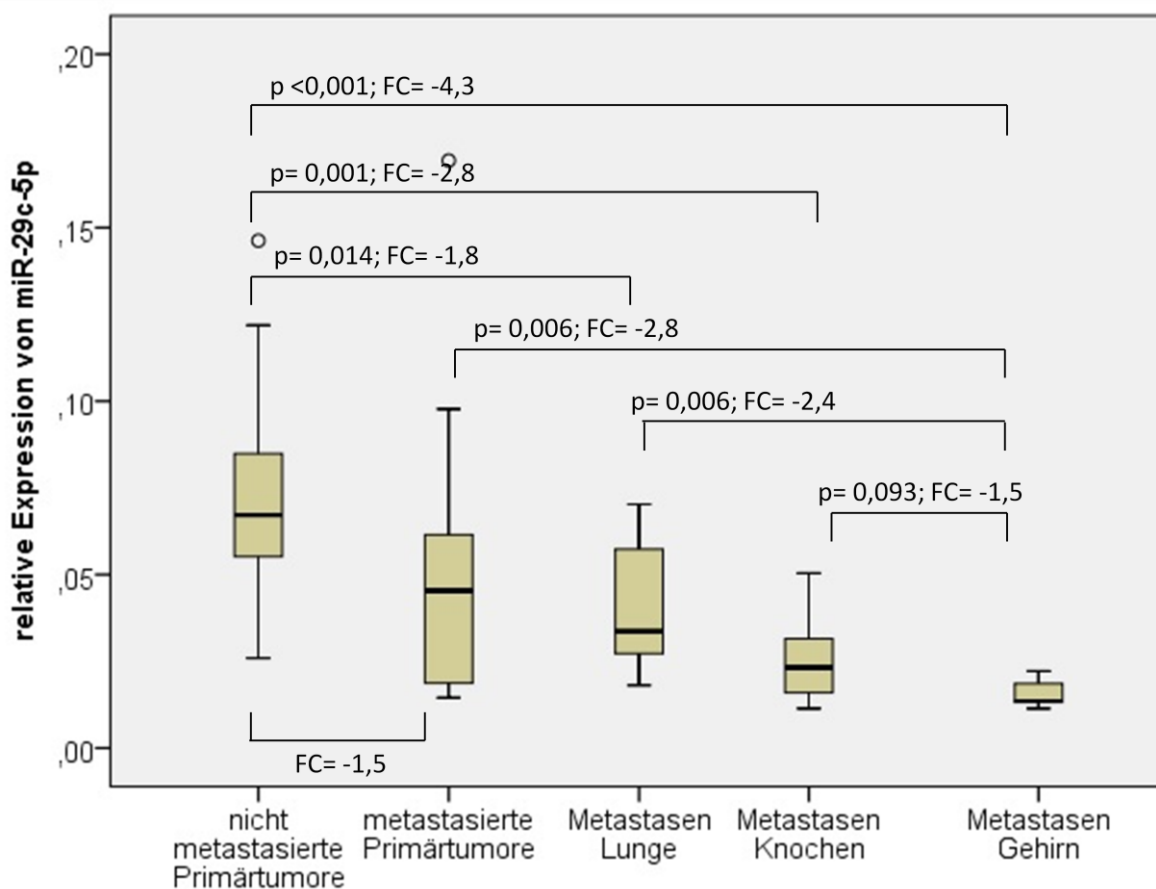


Abbildung 9- Vergleich der normalisierten C_T -Werte für miR-29c-5p in nicht-metastasierten und metastasierten Primärtumoren sowie Metastasen der Lunge, Gehirn und Knochen
FC = fold change

5.1.3 Analyse der Expression von miR-375-3p in Metastasen des klarzelligen NZK

Neben generellen Expressionsunterschieden sollten *Microarray*-Ergebnisse validiert werden, welche eine spezifische Expressionsänderung in den Metastasen der Lunge aufweisen.

Es zeigte sich in Lungenmetastasen verglichen mit nicht-metastasierten Primärtumoren eine Erhöhung der Expression von miR-375-3p um 19,6 ($p < 0,001$, 95%-KI= 1,98 - 186,98), verglichen mit metastasierten Primärtumoren eine 25,3-fache Überexpression ($p = 0,001$, 95%-KI= 3,47 - 339,67). Alle anderen Metastasenlokalisationen wiesen keine Expressionsunterschiede zu den Primärtumoren auf.

Die Expression in Lungenmetastasen unterschied sich ebenfalls signifikant in Bezug zu allen anderen Metastasenorten. Verglichen mit Hirnmetastasen war miR-375-3p in Lungenmetastasen 29,4-fach höher exprimiert ($p = 0,003$, 95%-KI= 1,03 - 1000,00), im Vergleich zu Knochenmetastasen 58,8-fach ($p = 0,002$, 95%-KI= 2,94 - 1000,00) (Abbildung 10).

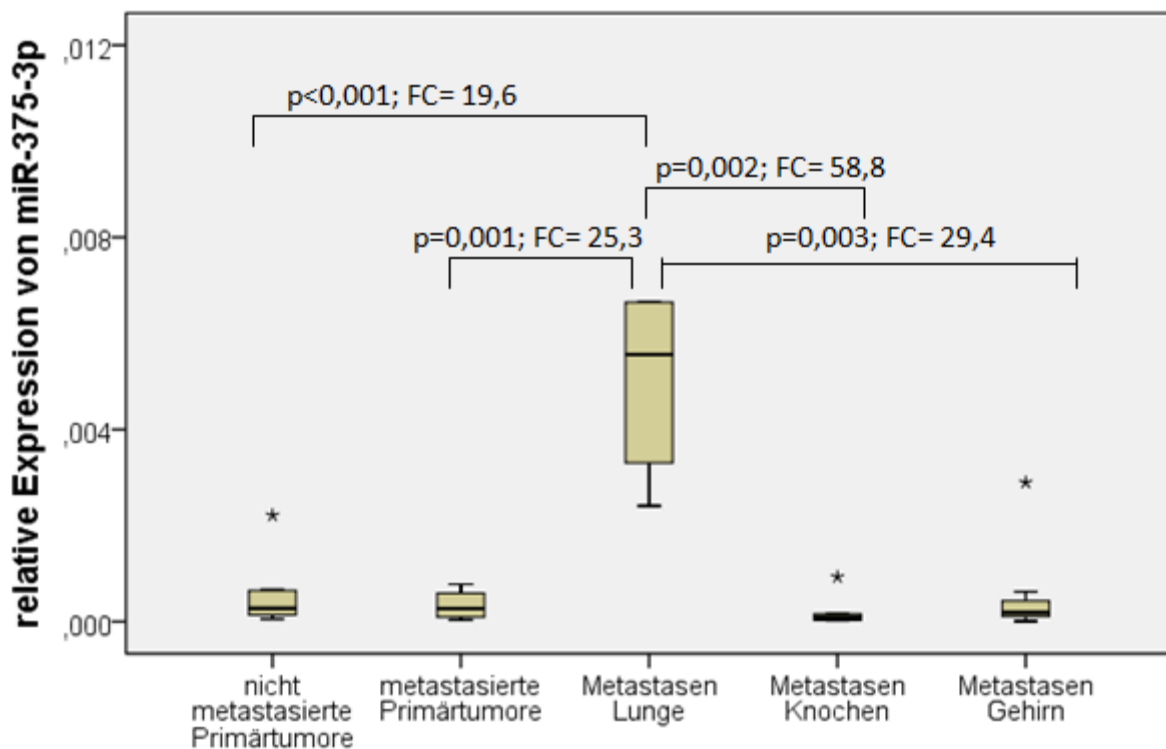


Abbildung 10- Vergleich der normalisierten C_T -Werte für miR-375-3p in nicht-metastasierten sowie metastasierten Primärtumoren und Metastasen in Lunge, Gehirn und Knochen
FC = fold change

5.2 Transiente Transfektion von miR-30c-2-3p

Wie im Teil der Einleitung dargelegt, wirken miRNAs, indem sie die Translation von mRNA in Proteine hemmen und damit die Proteinexpression vermindern. Basierend auf den Ergebnissen der PCR-Untersuchungen wurde miR-30c-2-3p ausgewählt, um deren funktionellen Einfluss auf Proteinebene zu untersuchen. Es wurde dazu eine Überexpression in der NZK-Zelllinie 786-O durch eine transiente Transfektion vorgenommen. Zunächst wurde die optimale Menge des Transfektionsreagenz und der einzusetzenden Konzentration des miR-30c-2-3p-*mimics* ermittelt. Die Messung der Expression erfolgte mittels qRT-PCR.

5.2.1 Etablierung der transienten Transfektion von miR-30c-2-3p

Im ersten Schritt wurde gemessen, wie sich die Expression von miR-30c-2-3p bei einer konstanten Konzentration des *mimics* von 10 nM und unterschiedlichen Mengen des Transfektionsreagenz ändert. Zum Vergleich wurde Zellen nur Transfektionsreagenz zugesetzt. Ebenfalls mit den *mocks* verglichen wurde die Expression von miR-30c-2-3p in gänzlich unbehandelten Zellen.

Bei steigender Menge des Transfektionsreagenz steigt auch die Expression von miR-30c-2-3p bis zu einer Stagnation bei 7 μ l Transfektionsreagenz (Abbildung 11). In der Expression von unbehandelten Zellen und *mock* zeigte sich kein Unterschied. Bei 1 μ l Transfektionsreagenz wurde miR-30c-2-3p 1472-fach überexprimiert, während 3 μ l zu einer 5480-fachen Überexpression führten. Bei 5 μ l Transfektionsreagenz lag eine 9856-fache Überexpression vor, bei 7 μ l eine 8188-fache.

1 μ l des Transfektionsreagenz DharmaFECT 2 wurde für die Durchführung der weiteren Versuche als optimale Menge angesehen, da eine deutliche Überexpression von miR-30c-2-3p, aber keine Zytotoxizität festgestellt wurde.

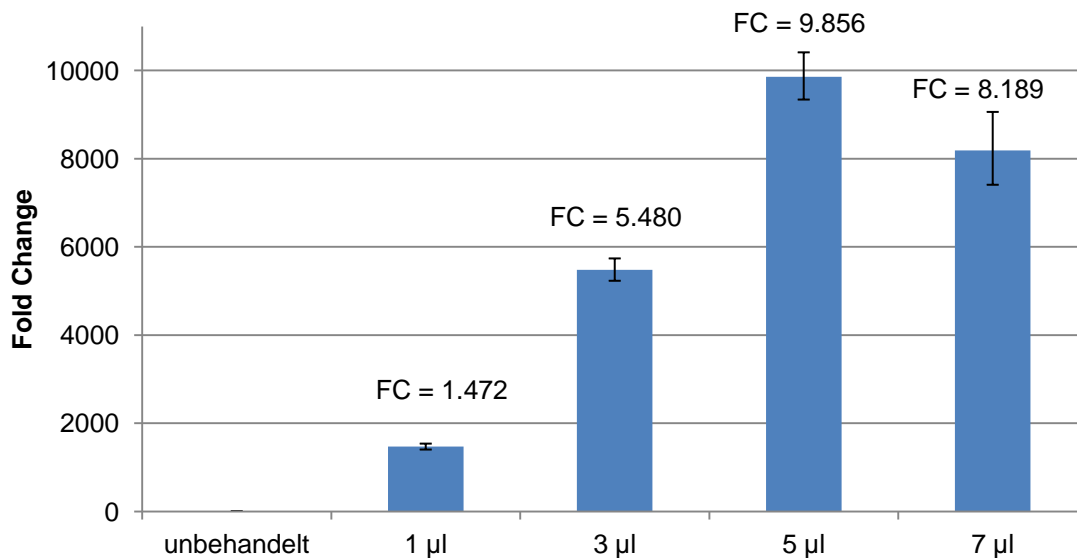


Abbildung 11 - relativer Expressionsunterschied von miR-30c-2-3p mit konstanter *mimic*-Konzentration von 10 nM und unterschiedlicher Menge des Transfektionsreagenz
FC = *fold change*

Nach Festlegung der optimalen Menge des Transfektionsmediums erfolgte nun die Bestimmung der optimalen *mimic*-Konzentration. Schon bei der Etablierung des Transfektionsreagenz zeigte sich bei einer Konzentration des *mimics* von 10 Nanomolar (nM) und 1 µl Transfektionsreagenz eine 1472-fache Überexpression. Die *mimic*-Konzentration wurde daher weiter verdünnt. Die Ergebnisse einer Konzentration des *mimics* von 0,1 nM – 1 nM im Vergleich zum *mock* sind in Abbildung 12 abgebildet.

Es konnte mit steigender Konzentration des *mimics* eine erhöhte Überexpression von miR-30c-2-3p erzielt werden. Für 0,1 nM ergab sich eine 143-fache Überexpression, für 0,2 nM eine 139-fache. Bei 0,3 nM war miR-30c-2-3p 348-fach überexprimiert, bei 0,5 nM dagegen 546-fach. Bei 0,7 nM lag eine 904-fache Überexpression vor und bei 1 nM eine 2378-fache. Für die Durchführung der transiente Transfektion ergab sich somit neben 1 µl des Transfektionsreagenz eine Konzentration von 0,1 nM des miR-30c-2-3p-*mimics*.

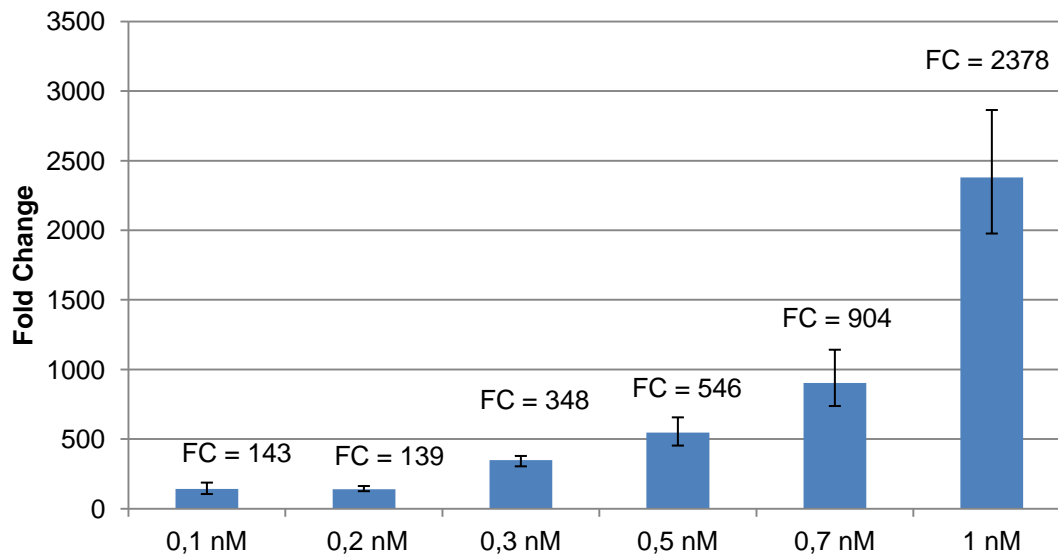


Abbildung 12 - Expression miR-30c-2-3p mit konstanter Menge des Transfektionsreagenz von 1 μ l und unterschiedlicher *mimic*-Konzentration
FC = *fold change*

5.2.2 Transiente Transfektion von miR-30c-2-3p

Mit der in der Etablierung ermittelten Menge von 1 μ l Transfektionsmedium sowie der Konzentration von 1 nM *mimic* wurden an drei unterschiedlichen Tagen eine transiente Transfektion mit jeweils drei biologischen Replikaten durchgeführt. Mittels qRT-PCR wurde die Expression von miR-30c-2-3p gemessen, die mit der in *mocks* verglichen wurde.

Die transiente Transfektion von miR-30c-2-3p führte zu einer reproduzierbaren Überexpression in 786-O. Bei der ersten Transfektion ergab sich eine 274-fache Überexpression. Die zweite Transfektion führte zu einer 480-fachen Überexpression, die dritte Transfektion zu einer 462-fachen (Abbildung 13).

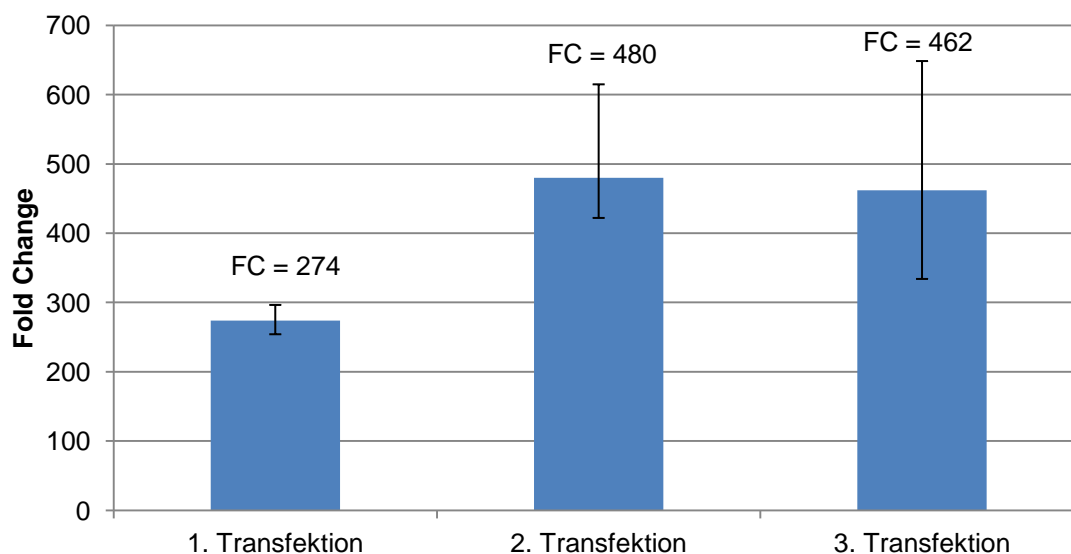


Abbildung 13 - Überexpression von miR-30c-2-3p in drei unterschiedlichen Transfektionen
FC = *fold change*

Somit wurde der Nachweis erbracht, dass die transiente Transfektion miR-30c-2-3p in der Zelllinie 786-O eine reproduzierbare Erhöhung der miRNA in den Zellen bewirkt. Mit drei weiteren biologischen Replikaten erfolgte nun die Proteinanalyse mittels 2D-Gelelektrophorese und Massenspektrometrie.

5.3 Identifizierung potentieller miRNA-*targets* durch 2D-DIGE und LC-MS/MS

Um die potentiellen *targets* von miR-30c-2-3p auf Proteinebene zu identifizieren, wurden die Proteome von *mock* und mit miR-30c-2-3p transfizierten Zellen mittels 2D-DIGE analysiert und die Proteine daraufhin mittels LC-MS/MS identifiziert.

In der Abbildung 14a ist exemplarisch das Ergebnis einer der 2D-DIGEs aufgeführt, welche für jeden *mock* und zugehöriger Transfektion mit miR-30c-2-3p durchgeführt wurden. Die ausgewählten Protein-*spots* sind durch die rot gefärbte Nummerierung markiert. Es handelt sich um die möglichen *targets*. Abbildung 14b stellt die 3-dimensionale Darstellung der Proteins-*spots* dar, hier beispielhaft mit der Identifikationsnummer (ID) 1698 und 1705. Diese Darstellung bildet die Grundlage für die Auswertung. Im Vergleich des *mocks* zur miR-30c-2-3p-Transfektion nimmt die Intensität beider *spots* deutlich ab, was einer Verringerung der Proteinmenge infolge der Aktivität der eingebrachten miR-30c-2-3p entspricht. Die Ergebnisse für die *spot*-Intensität der 3 unabhängigen Triplikate sind im Balkendiagramm (Abbildung 14c) dargestellt.

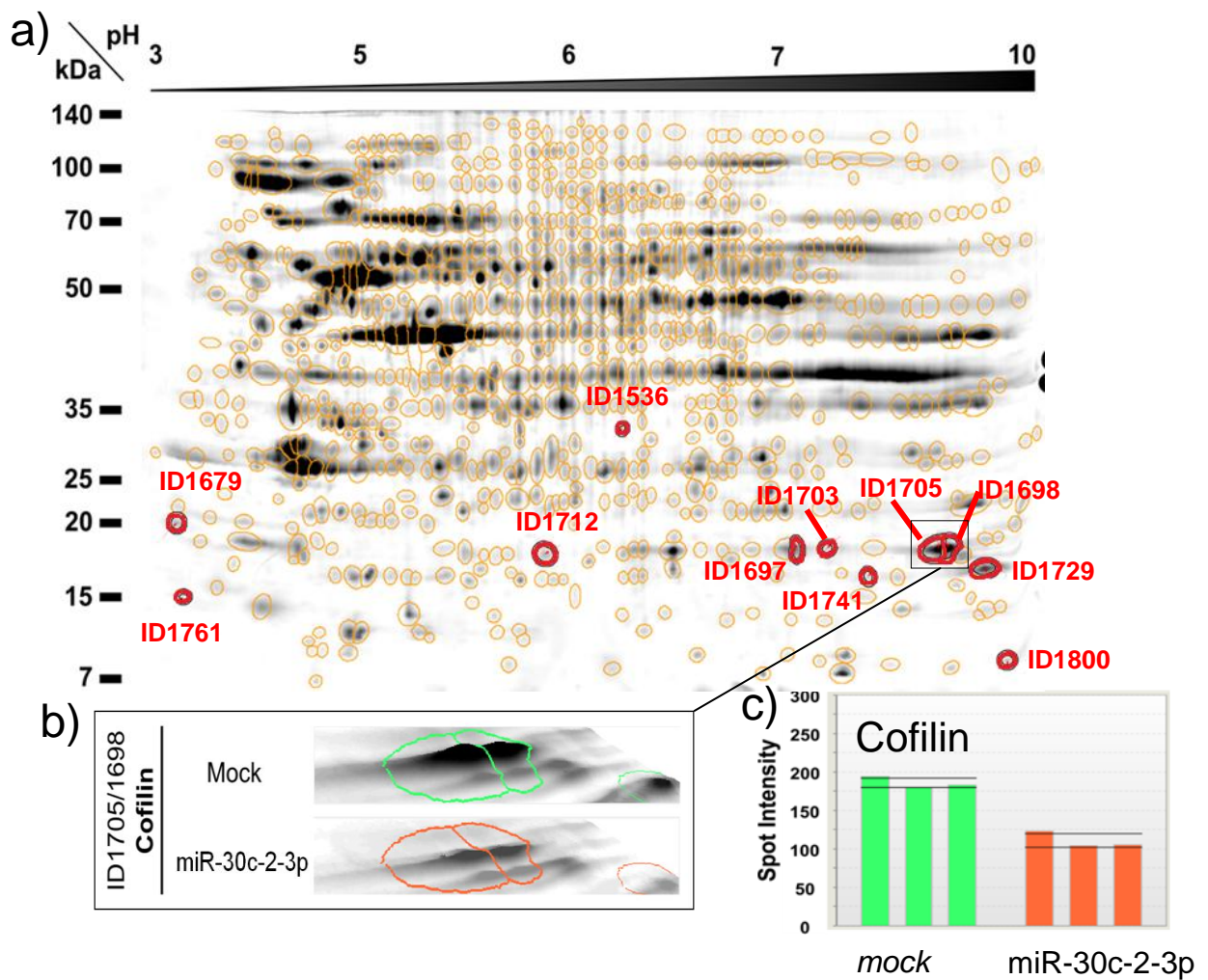


Abbildung 14 - oberer Teil: exemplarisches Ergebnis einer 2D-DIGE; unterer Teil: dreidimensionale Darstellung der Protein-spots ID1705/1698, 2D-DIGE = zweidimensionale differenzielle Gelelektrophorese, ID = Identifikationsnummer

Die *heatmap* in Abbildung 15 zeigt die unterschiedliche Expression aller signifikant unterschiedlichen Protein-*spots*. Es lässt sich bei einer Überexpression von miR-30c-2-3p eine verminderte *target*-Expression feststellen.

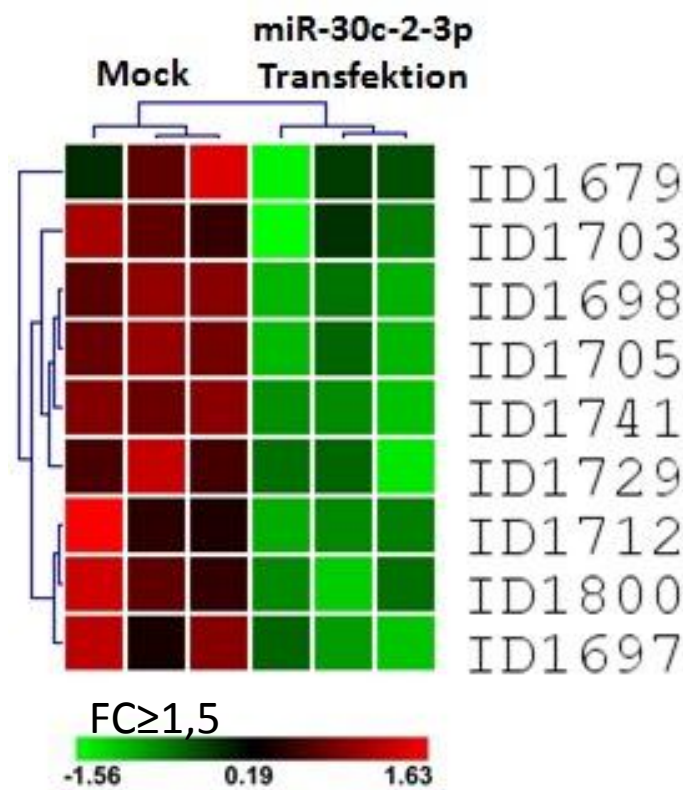


Abbildung 15- *heatmap* der Protein-*spots* als potenzielle *target*-Kandidaten; ein grün eingefärbtes Feld zeigt im Vergleich zu einem rot eingefärbten Feld eine verminderte Expression des Proteins; dargestellt sind die Ergebnisse der drei biologischen Replikate mit $FC \geq 1,5$, $FC = \text{fold change}$, $ID = \text{Identifikationsnummer}$

Die so ausgewählten Protein-*spots* wurden anschließend mittels LC-MS/MS identifiziert. In Tabelle 13 sind die den *spotIDs* zugehörigen Proteinkandidaten und deren Abkürzungen aufgelistet. Da aufgrund der Komplexität des Proteoms eine vollständige Auftrennung in Einzelproteine technisch nicht möglich war, wurden teilweise mehrere Proteine pro *spot* identifiziert.

Im Anschluss wurde mittels des Programms miRWalk getestet, ob die Nukleotidsequenz von miR-30c-2-3p komplementär zur entsprechenden mRNA der detektierten Proteine war. Komplementär waren nur Cofilin 1 (CFL1) und Cofilin 2 (CFL2).

Tabelle 13- Namen und Abkürzungen der zu den *spot/Ds* zugehörigen Proteine
spot/D=*spot* Identifikationsnummer

<i>spot/D</i>	Name	Abkürzung Gen/Protein
1679	60S Ribosomales Protein L11 60S Ribosomales Protein L23	RPL11/RL11 RPL23A/RL23A
1703	Cofilin-1 Cofilin-2	CFL1 CFL2
1698	Cofilin-1	CFL1
1705	Cofilin-1	CFL1
1741	Nukleosiddiphosphat Kinase B	NME2/NDKB
1729	Nukleosiddiphosphat Kinase B Cofilin-1	NME2/NDKB CFL1
1712	Cofilin-1 Cofilin-2	CFL1 CFL2
1800	10 kDa mitochondriales Hitzeschock Protein Protein S100-A8 Dermcidin	HSPE1/CH10 S100A8/S10A8 DCD
1697	Cofilin-1 Cofilin-2	CFL1 CFL2

6 Diskussion

Die Metastasierung stellt im klarzelligen NZK noch immer den maßgeblichen Prognosefaktor dar (Ljungberg 2004). MiRNAs sind in zahlreiche biologische Prozesse involviert, sodass die Identifizierung von metastasierungsassoziierten miRNAs ein wichtiger Schritt zu einem besseren Verständnis der Metastasierung darstellt. Da insbesondere zur miRNA-Expression in den verschiedenen Metastasenorten des NZKs bisher noch wenig bekannt ist, war es das Ziel dieser Arbeit, die Expression ausgewählter miRNAs in Primärtumoren und Metastasen zu untersuchen und potenzielle *targets* zu identifizieren.

In vorangegangenen Arbeiten wurden durch *Microarray*-Analysen differentiell exprimierte miRNAs in Primärtumoren des klarzelligen NZKs und dessen Metastasen in Lunge, Gehirn und Knochen identifiziert (Heinzelmann *et al.*, 2014). Basierend auf diesen Ergebnissen wurden die miRNAs miR-30c-2-3p, miR-29c-5p und miR-375-3p zur Validierung ausgewählt. Im *Microarray* wiesen miR-30c-2-3p und miR-29c-5p in metastasierten Primärtumoren eine niedrigere Expression auf als in nicht-metastasierten Primärtumoren. Außerdem waren sie in allen Metastasenorten noch niedriger exprimiert. MiR-375-3p dagegen war spezifisch in Lungenmetastasen im Vergleich zum übrigen Probenkollektiv überexprimiert. (Heinzelmann *et al.*, 2014). Die Ergebnisse sollten nun in dieser Arbeit validiert werden. Somit sollte zum einen für miR-30c-2-3p und miR-29c-5p überprüft werden, ob man anhand von miRNA-Expressionsmustern generell zwischen Primärtumoren und Metastasen unterscheiden kann. Zum andern sollte für miR-375-3p überprüft werden, ob ortsspezifisch eine differenzielle miRNA-Expression in Abhängigkeit vom Metastasenort vorliegt. Im anschließenden Schritt sollten potenzielle *targets* der miR-30c-2-3p ermittelt werden. Somit soll ein besseres Verständnis der Beteiligung von miRNAs im Prozess der Metastasierung entstehen.

Im Vergleich der Expression von miR-30c-2-3p und miR-29c-5p in Primärtumoren und Metastasen konnten die Ergebnisse der *Microarray*-Vorarbeiten teilweise bestätigt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde ersichtlich, dass sowohl miR-30c-2-3p als auch miR-29c-5p in metastasierten Primärtumoren im Vergleich zu nicht-metastasierten Primärtumoren tendenziell niedriger exprimiert sind. Es konnte zwar keine Signifikanz nachgewiesen werden, weitere Studien konnten dies für miR-30c-2-3p jedoch bestätigen (Wu *et al.*, 2012; Heinzelmann *et al.*, 2019). Die fehlende Signifikanz ist möglicherweise durch eine intratumorale Heterogenität zu erklären. Die intratumorale Heterogenität wurde bereits in anderen Tumorentitäten beschrieben, insbesondere aber auch beim klarzelligen NZK (Hofflin *et al.*, 2015). Die Hypothese beschreibt, dass es sich bei einem Tumor um keine homogene Zellmasse handelt, sondern dass sich innerhalb des Tumors Zellen befinden, die sich in ihren Eigenschaften unterscheiden. So kann die Anzahl der zur Metastasierung befähigten Zellen im Primärtumor zu gering sein, als dass ihre miRNA-Expression mittels einer

quantitativen Messmethode wie der qRT-PCR bei der Untersuchung des Gewebes dargestellt werden kann (Hofflin *et al.*, 2015). Es sollten daher miRNA-*in-situ* Hybridisierung der Primärtumore durchgeführt werden. Dadurch würde die Problematik der intratumoralen Heterogenität geklärt und das Expressionsmuster der einzelnen Zellen beschrieben werden können. Außerdem ist auf die geringe Probenzahl der vorliegenden Arbeit hinzuweisen, sodass die Signifikanz gegebenenfalls bei höheren Probenzahlen nachzuweisen wäre.

Wie im *Microarray* waren miR-30c-2-3p und miR-29c-5p in allen Metastasenorten signifikant geringer exprimiert als in nicht-metastasierten Primärtumoren. Nicht vollständig bestätigt werden konnte der Unterschied zwischen metastasierten Primärtumoren und Metastasen, zumindest eine Tendenz war aber in allen Metastasierungsorten festzustellen. Für miR-30c-2-3p konnten die *Microarray*-Ergebnisse im Vergleich von Lungen- und Hirnmetastasen zu metastasierten Primärtumoren bestätigt werden. Der Unterschied in Knochenmetastasen war nicht signifikant. MiR-29c-5p war in Hirnmetastasen signifikant geringer exprimiert als in metastasierten Primärtumoren, nicht jedoch in Knochen- und Lungenmetastasen. Auch hier konnte aber eine Tendenz nachgewiesen werden. Begründet sein könnte dies darin, dass es sich beim *Microarray* aus den Vorarbeiten um eine semiquantitative Methode handelt und die Expressions-Messung mittels einer qRT-PCR eine Quantifizierung möglich ist. Allerdings ist auch hier erneut auf die geringe Probenzahl der vorliegenden Arbeit hinzuweisen

Über den Vergleich der miRNA-Expression in Primärtumoren und Metastasen des klarzelligen NZKs sind bisher kaum Arbeiten publiziert. Beispielsweise verglichen Butz *et al.* unter anderem die miRNA-Expression in Primärtumoren und den zugehörigen Metastasen von klarzelligen Nierenzellkarzinomen. MiR-30a-5p zeigte sich hier im Vergleich zum zugehörigen Primärtumor in Metastasen tendenziell niedriger exprimiert (Butz *et al.*, 2015). Es ist jedoch zu betonen, dass nicht angegeben wurde, um welchen Metastasenort es sich handelte.

Potenziell deuten die Ergebnisse also darauf hin, dass miR-30c-2-3p und miR-29c-5p als Suppressoren der Metastasierung wirken und folglich in metastasierten Primärtumoren und Metastasen niedriger exprimiert sind.

Die *Microarray*-Ergebnisse für miR-375-3p wurden in dieser Arbeit vollständig bestätigt. Zum ersten Mal wurde gezeigt, dass miR-375-3p ortsspezifisch in Lungenmetastasen des klarzelligen NZKs im Vergleich zum übrigen Probenkollektiv hoch signifikant überexprimiert ist. Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass miR-375-3p spezifisch an der Metastasierung in die Lunge beteiligt ist. Zur miR-375-3p-Expression in Lungenmetastasen existierten bisher nicht viele Studien, sodass ein Vergleich der vorliegenden Arbeit zur aktuellen Studienlage schwerfällt. Barshack *et al.* untersuchten die Expression verschiedener miRNAs von Primärtumoren der Lunge und Lungenmetastasen verschiedener Tumorentitäten, unter anderem auch Metastasen des klarzelligen NZKs. Festgestellt wurde hier eine höhere

Expression von miR-375-3p in Primärtumoren von nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen und neuroendokrinen Lungentumoren als in Lungenmetastasen anderer Tumorentitäten (Barshack *et al.*, 2010). Um die Ergebnisse mit der vorliegenden Arbeit genauer vergleichen zu können, müsste jedoch ein Vergleich der miR-375-3p Expression in den zugehörigen Primärtumoren der untersuchten Lungenmetastasen gezogen werden.

Als Grund für die Überexprimierung in den Lungenmetastasen des klarzelligen NZKs sind zwei unterschiedliche Hypothesen denkbar.

Erster Grund für diese spezifische Veränderung könnte der Einfluss des speziellen Mikromilieus der Lunge auf das Expressionsmuster der Tumorzellen sein. In Lungenmetastasen von kindlichen Osteosarkomen konnte nachgewiesen werden, dass miR-375-3p höher exprimiert war im Vergleich zu Primärtumoren (Berlanga *et al.*, 2016). Außerdem konnte gezeigt werden, dass sich im Adenokarzinom der Lunge sowie im kleinzelligen Lungenkarzinom eine Überexpression von miR-375-3p im Vergleich zu normalem Lungengewebe findet. Potenziell könnte also das normale Lungengewebe einen Einfluss auf die Expression von miR-375-3p haben. Einschränkend muss hier jedoch erwähnt werden, dass dieselbe Studie eine verminderte Expression von miR-375-3p im adenosquamösen Karzinom im Vergleich zum normalen Lungengewebe nachgewiesen hat (Jin *et al.*, 2015).

Zweiter Grund könnte andererseits sein, dass eine veränderte Expression von miR-375-3p innerhalb der Primärtumore die Voraussetzung für eine Metastasierung in die Lunge ist. Wenn dies so wäre, müsste auch in metastasierten Primärtumoren die Expression von miR-375-3p erhöht sein. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden. Grund hierfür könnte zum einen sein, dass die Primärtumore nicht mit den zugehörigen Metastasen gepaart waren. Unter den untersuchten metastasierten Primärtumoren können also Tumore sein, die nicht oder nicht nur in die Lunge metastasiert sind, sodass eine erhöhte Expression von miR-375-3p im Gesamtergebnis nicht zum Tragen kommt. Außerdem könnte auch hier die bereits erwähnte intratumorale Heterogenität ein weiterer Grund dafür sein. Es wären also auch hier weitere Untersuchungen mit *in-situ*-Hybridisierungen nötig.

Für die Funktion von miR-375-3p existieren in der Literatur diverse Daten. Zum einen wird miR-375-3p eine Rolle als Tumorsuppressor zugewiesen. Im NZK gibt es Hinweise darauf, dass miR-375-3p als Tumorsuppressor agiert, indem das Onkogen YWHAZ als direktes *target* angezielt wird. MiR-375-3p war im Tumorgewebe signifikant weniger exprimiert als im normalen Nierengewebe (Nishimura *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2018). Auch im hepatozellulären Karzinom wirkt miR-375-3p als Tumorsuppressor, indem es das Onkogen *astrocyte elevated gene-1 protein* (AEG-1) reguliert. AEG-1 ist in die Tumorentstehung und Progression involviert (Hu *et al.*, 2009; Yan *et al.*, 2014). Weiterhin wird miR-375-3p im Magenkarzinom als Tumorsuppressor beschrieben (Lian *et al.*, 2016). In anderen

Tumorentitäten wird miR-375-3p dagegen eine Rolle als Onkomir zugeschrieben, etwa im malignen Melanom (Mazar *et al.*, 2011). Dies verdeutlicht, dass miR-375-3p in Abhängigkeit des Zelltyps unterschiedliche *targets* besitzen kann, wodurch unterschiedliche tumorassoziierte Prozesse gesteuert werden. Wichtig zur Abgrenzung dieser Arbeit ist außerdem, dass in den angegebenen Studien der Vergleich zwischen Tumor- und Normalgewebe gezogen wurde und nicht wie in der vorliegenden Arbeit zwischen Primärtumor und Metastasen. *Targets* für miR-375-3p speziell in Lungenmetastasen des klarzelligen NZK sind bisher noch nicht untersucht worden.

Nach Abschluss der Quantifizierung der *Microarray*-Vorarbeiten zeigte sich also, dass miR-30c-2-3p in Metastasen und metastasierten Primärtumoren vermindert exprimiert war und somit eine Rolle in der Metastasierung spielen könnte. Um weitere Erkenntnisse zu entsprechenden Signalwegen von miR-30c-2-3p zu erlangen, wurden in der vorliegenden Dissertation mittels LC-MS/MS und 2D-DIGE potentielle *target*-Kandidaten identifiziert. Nun wurde mittels des Programms miRWalk getestet, ob die Nukleotidsequenz von miR-30c-2-3p komplementär zur jeweiligen mRNA der detektierten Proteine war. Demnach sind als potenzielle *targets* nur CFL1/CFL2 anzusehen. Die übrigen Proteine waren zwar vermindert exprimiert, können aber keine direkten *targets* sein, da die Nukleotidsequenz von miR-30c-2-3p nicht komplementär zur entsprechenden mRNA der Proteine war. Prinzipiell ist aber auch eine indirekte Regulation dieser Proteine durch miR-30c-2-3p möglich.

Bei CFL1 und CFL2 handelt es sich um Isoformen, die sich nur sehr wenig in ihrer Basensequenz unterscheiden. Aufgrund der Ähnlichkeit der Sequenz wurde sowohl die CFL1 als auch CFL2 in der LC-MS/MS identifiziert. CFL2 wird für das NZK als nicht relevant angesehen, da es sich hierbei um ein Protein handelt, was in Muskelgewebe vorkommt. CFL1 gehört mit CFL2 und *Actin-depolymerizing Factor* (ADF) zur ADF/CFL-Familie (Van Troys *et al.*, 2008). ADF/CFL bindet monomeres (G)-Aktin und filamentöses (F)-Aktin. Der CFL-Signalweg führt somit sowohl zu Polymerisation als auch Depolymerisation von Aktin und reguliert dessen Dynamik und Funktion im Zusammenspiel mit weiteren Aktin-bindenden Proteinen (s. Abbildung 16) (Bravo-Cordero *et al.*, 2013; Mizuno 2013). Aktin ist nicht nur eine zentrale Komponente im Migrationsverhalten von Zellen, was entscheidend ist für Invasivität und Ausbildung von Metastasen, sondern auch essentieller Bestandteil in der Regulation des Zellzyklus (Hanahan and Weinberg 2000; Heng and Koh 2010; Bravo-Cordero *et al.*, 2013).

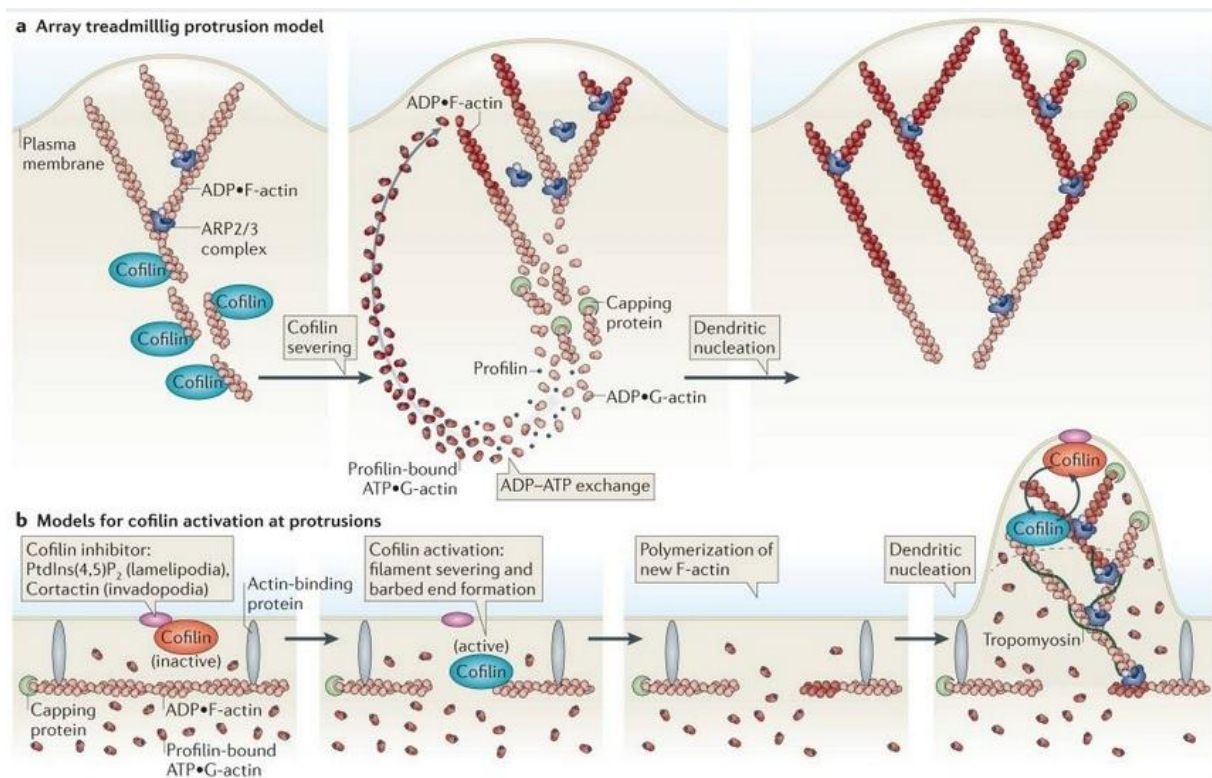


Abbildung 16 - Polymerisation und Depolymerisation von (G)-Aktin und (F)-Aktin (Bravo-Cordero *et al.*, 2013)

ARP = *actin related protein*, ADP = Adenosindiphosphat, ATP = Adenosintriphosphat

In der Literatur existieren bisher wenige Publikationen zum CFL-Signalweg im NZK. Erhöhte Level an CFL wiesen Unwin *et al.* 2003 im klarzelligem NZK nach, ohne dass hier zwischen metastasierten und nicht-metastasierten Primärtumoren unterschieden wurde (Unwin *et al.*, 2003). In anderen Tumorentitäten, wie dem Prostatakarzinom sowie dem Vulva- und Gallenblasenkarzinom, konnte ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten CFL-Signalweg-Aktivität und einer erhöhten Invasivität nachgewiesen werden (Yang *et al.*, 2013; Collazo *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2016). Andere Studien zeigten jedoch, dass eine Überexpression von CFL nicht immer zu höherer Invasivität und Metastasierung führt. So konnten Peng *et al.* zwar in einem Mäusemodell durch eine Suppression von CFL eine verminderte Metastasierung im Adenokarzinom der Lunge und ein längeres Überleben demonstrieren (Peng *et al.*, 2011). Jedoch steht dazu im Widerspruch, dass in der Adenokarzinom-Zelllinie der Lunge H1299 bei erhöhter Expression von CFL1 eine verminderte Invasion der Zellen aufgezeigt werden konnte (Lee *et al.*, 2005).

Die Ergebnisse dieser Arbeit können also Hinweise auf eine Funktion von miR-30c-2-3p als Tumorsuppressor im klarzelligem NZK liefern. Diese Annahme unterstützend, ist für miR-30c-2-3p ein Zusammenhang zwischen verminderter Expression und einer erhöhten HIF2 α -Aktivität beschrieben. HIF2 α hat einen maßgeblichen Anteil an der Entstehung des klarzelligem NZK (Kim and Kaelin 2004; Mathew *et al.*, 2014). In der vorliegenden Arbeit wurde HIF2 α allerdings nicht als potenzielles *target* identifiziert. Erklärbar ist dies dadurch,

dass mittels der verwendeten Methode zur Proteinidentifizierung nicht spezifisch nach HIF2 α gesucht wurde, sondern generell nach vermindert exprimierten Proteinen nach Überexpression von miR-30c-2-3p. Das Signal der reduzierten Expression von HIF2 α kann also zu gering gewesen sein, um es mittels LC-MS/MS und 2D-DIGE zu detektieren.

Auch in anderen Tumorentitäten wie dem Mammakarzinom besitzt miR-30c-2-3p eine Rolle als Tumorsuppressor, indem sie hemmenden Einfluss auf den *Nuclear Factor kappa B* (NF- κ B)-Signalweg nimmt, welcher mit erhöhter Zellproliferation und verminderter Apoptoserate in Verbindung steht. Hervorzuheben ist dabei, dass der NF- κ B -Signalweg auch an Metastasierungsprozessen beteiligt ist (Shukla *et al.*, 2015). Im Ovarialkarzinom hemmt miR-30c-2-3p die Zellproliferation sowie die Expression des Onkogens *B-cell CLL/lymphoma 9* (BCL9) (Jia *et al.*, 2011). In der vorliegenden Arbeit wurden diese Proteine nicht als potenzielle *targets* identifiziert. Dies verdeutlicht, dass miR-30c-2-3p in Abhängigkeit des Zelltyps unterschiedliche *targets* haben kann. Möglicherweise ist außerdem wie bei HIF2 α die verwendete Methode zur Proteinidentifizierung nicht optimal.

Die vorliegende Arbeit liefert somit vielversprechende Ansätze für weitere Untersuchungen. Trotzdem unterliegt sie einigen Limitierungen. Da die Probenanzahl gering war, sollten die Untersuchungen mit größerer Anzahl fortgeführt werden. Die Anzahl der Proben hat sich während den Analysen nochmals reduziert, da zum einen bei einigen Proben die Reinheit der enthaltenen RNA nicht ausreichend war. Weiterhin zeigte sich das Referenzgen RNU48 bei einigen Proben nicht stabil exprimiert, sodass hier ein aussagekräftiger Vergleich zur miRNA nicht möglich war. Diese Proben wurden daher nicht in die Studie eingeschlossen. Grundsätzlich wurde allerdings die stabile Expression von RNU48 im NZK in mehreren Studien bereits bestätigt. Hieraus folgt, dass sich RNU48 als Referenzgen eignet (Wotschofsky *et al.*, 2011; Carlsson *et al.*, 2019). Weiterhin handelt es sich um eine rein deskriptive Studie mit vorausgewählten Tumorproben. Allerdings war während der Messung die Probenzugehörigkeit nicht nachvollziehbar, sodass es sich um eine geblindete Messung handelte. Weitere Limitierungen sind in der Auswahl der Tumorproben zu finden. Der Tumorgehalt sollte mindestens über 85 % liegen, sodass durch das verbleibende Restgewebe von 15 % Schwankungen der Messergebnisse zu erklären sind. Auch handelt es sich bei den untersuchten Proben um FFPE-Proben und nicht um Frischgewebe. Die Stabilität von miRNAs in FFPE-Proben wurde jedoch bereits bestätigt (Liu and Xu 2011). Des Weiteren wurden lediglich Metastasen von Lunge, Gehirn und Knochen in die Studie eingeschlossen. Es fehlen Analysen von Proben weiterer Metastasenorte wie Leber oder Lymphknoten. Außerdem waren Primärtumore und Metastasen nicht gepaart, sodass der Metastasierungsort der untersuchten Primärtumoren nicht ersichtlich ist.

Die Anzahl der durchgeführten Analysen ist auch bei der *target*-Identifizierung ein limitierender Faktor. Des Weiteren war in der LC-MS/MS aufgrund der Komplexität des

Proteoms eine vollständige Auftrennung in Einzelproteine nicht möglich. Es wurden daher teilweise mehrere *targets* pro *spot* identifiziert. Es können hinter jedem Protein-*spot* also mehrere *targets* stehen. Die hier aufgeführten Ergebnisse sind daher als erste Hinweise auf potenzielle *target*-Kandidaten von miR-30c-2-3p zu betrachten, die mittels sensibleren Verfahren wie *Western-Blot* Analysen nochmals zu validieren sind.

7 Ausblick

Diese Arbeit weist nach, dass Unterschiede in der miRNA-Expression sowohl zwischen nicht-metastasierten und metastasierten Primärtumoren vorliegen als auch zu den Metastasierungsorten Lunge, Gehirn und Knochen (miR-30c-2-3p und miR-29c-5p). Weiterhin liegen in den einzelnen Metastasierungsorganen spezielle miRNA-Muster vor (miR-375-3p).

MiR-30c-2-3p und miR-29c-5p können im Metastasierungsprozess beteiligt sein. Sie könnten als Suppressoren der Metastasierung wirken, da sie tendenziell in metastasierten Primärtumoren im Vergleich zu nicht-metastasierten Primärtumoren vermindert exprimiert sind. Weiterhin wurde nachgewiesen, dass sich die miRNA-Expression in metastasierten Primärtumoren und Metastasen weiter unterscheidet. MiR-30c-2-3p war in Lungen- und Hirnmetastasen vermindert exprimiert, in Knochenmetastasen tendenziell. MiR-29c-5p war in Lungen- und Knochenmetastasen tendenziell weniger exprimiert, in Hirnmetastasen signifikant.

Die Untersuchungen sollten in größerer Probenzahl wiederholt werden, insbesondere für miR-29c-5p, da für miR-30c-2-3p die geringere Expression metastasierten Primärtumoren im Vergleich zu nicht-metastasierten Primärtumoren in anderen Studien bereits bestätigt wurde (Wu *et al.*, 2012; Heinzelmann *et al.*, 2019). In der vorliegenden Arbeit ist dieser Unterschied nicht signifikant, was durch eine potenzielle intratumorale Heterogenität erklärbar sein kann. Um dies zu berücksichtigen, müssten miRNA-*in-situ* Hybridisierungen der Primärtumoren vollzogen werden. Auch zur Expression in den Metastasen sollten weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Für miR-30c-2-3p sollte dies in Knochenmetastasen vorgenommen werden, für miR-29c-5p in Lungen- und Hirnmetastasen. So kann gegebenenfalls eine signifikante Verminderung ihrer Expression auch in diesen Metastasierungsorten nachgewiesen werden. Sollte dies der Fall sein, wird ihre Rolle im Metastasierungsprozess weiter bestätigt.

Die erhöhte Expression von miR-375-3p in Lungenmetastasen im Vergleich zum übrigen Probenmaterial gibt Hinweise darauf, dass sich die Prozesse nicht nur in Primärtumoren und Metastasen unterscheiden, sondern auch in den Metastasierungsorten selbst. Diese Veränderungen könnten durch das unterschiedliche Mikromilieu zu erklären sein. Der Einfluss des Mikromilieus auf die Tumorzellen kann durch Zell-Zell-Kontakte, lösliche

Faktoren oder durch Exosomen und weitere Mikrovesikel geschehen (Lee *et al.*, 2012; Mittelbrunn and Sanchez-Madrid 2012). Zunächst sollte für weitere Erkenntnisse die Expression von miR-375-3p in normalen Epithelzellen der Lunge und Lungenmetastasen verglichen werden. Außerdem sollten Analysen von Epithelzellen der Lunge und Zellen des klarzelligem NZKs durchgeführt werden, um zu untersuchen, ob direkter Kontakt zu Lungenepithelzellen einen Effekt auf die Expression von miR-375-3p in Zellen des NZKs induziert. Um den Einfluss von löslichen Faktoren auf Tumorzellen des klarzelligem NZKs zu messen, müssten Versuche mit konditioniertem Medium, also Medium, was vorher zu Lungenepithelzellen gegeben wurde, durchgeführt werden und dann die Expression von miR-375-3p in NZK-Zellen untersucht werden. Eine weitere Möglichkeit ist, dass nur Tumorzellen mit bestimmten Eigenschaften die Fähigkeit haben, sich in der Lunge anzusiedeln. Falls hierfür eine Überexpression von miR-375-3p Voraussetzung ist, wäre zu erwarten, dass für miR-375-3p bereits in metastasierten Primärtumoren eine Überexpression vorliegt. Dies wurde in dieser Arbeit nicht bestätigt. Ursache hierfür könnte sein, dass Primärtumor und Metastase nicht gepaart wurden. Eine Untersuchung der miR-375-3p in Primärtumoren und zugehöriger Lungenmetastase wäre daher nötig und ebenso ein Vergleich zur Expression in nicht-metastasierten Primärtumoren. Weiterhin könnten von anderen Tumorentitäten die Expression von miR-375-3p in Lungenmetastasen und Primärtumoren untersucht werden, da bereits vorangegangene Studien in weiteren Tumorentitäten eine erhöhte Expression von miR-375-3p in Lungenmetastasen im Vergleich zum Primärtumor zeigten. Für weitere Erkenntnisse wäre es dann nötig, *targets* für miR-375-3p zu identifizieren. Gegebenenfalls könnte somit ein Zusammenhang zwischen miR-375-3p und dem spezifischen Metastasenort Lunge hergestellt werden. Die Überprüfung könnte entscheidend zum weiteren Verständnis der Metastasierung und damit zur verbesserten Diagnose sowie Therapie und damit auch zur Prognose beitragen.

Das im zweiten Teil der Arbeit identifizierte CFL ist ein *target*-Kandidat für indirekte Rückschlüsse auf die Funktion von miR-30c-2-3p. In der vorliegenden Arbeit wurde die Zelllinie 786-O eines klarzelligem NZK verwendet. Die Transfektion müsste zur Validierung auch in anderen Zelllinien von NZK durchgeführt werden. Die Ergebnisse müssten dann auch hier mittels *Western Blot*-Analysen quantifiziert werden. Um den Einfluss von miR-30c-2-3p auf funktioneller Ebene zu untersuchen, sollten im weiteren Funktionsanalysen hinsichtlich Invasivität und Migrationsverhalten der transfizierten Zellen durchgeführt werden. Um dann die Ergebnisse nicht nur *in vitro* sondern auch *in vivo* zu validieren, müsste die Expression der in dieser Arbeit nachgewiesenen *target*-Kandidaten im Tumorgewebe selbst nachgewiesen werden, etwa mittels immunhistochemischer Nachweisverfahren.

8 Literaturverzeichnis

1. Alam, R., H.D. Patel, T. Osumah, A. Srivastava, M.A. Gorin, M.H. Johnson, B.J. Trock, P. Chang, A.A. Wagner, J.M. McKiernan, M.E. Allaf and P.M. Pierorazio (2019). "Comparative effectiveness of management options for patients with small renal masses: a prospective cohort study." BJU Int 123(1): 42-50.
2. Aryani, A. and B. Denecke (2015). "In vitro application of ribonucleases: comparison of the effects on mRNA and miRNA stability." BMC Res Notes 8: 164.
3. Badalato, G.M., M. Kates, J.P. Wisnivesky, A.R. Choudhury and J.M. McKiernan (2012). "Survival after partial and radical nephrectomy for the treatment of stage T1bN0M0 renal cell carcinoma (RCC) in the USA: a propensity scoring approach." BJU Int 109(10): 1457-62.
4. Bail, S., M. Swerdel, H. Liu, X. Jiao, L.A. Goff, R.P. Hart and M. Kiledjian (2010). "Differential regulation of microRNA stability." RNA 16(5): 1032-9.
5. Barshack, I., G. Lithwick-Yanai, A. Afek, K. Rosenblatt, H. Tabibian-Keissar, M. Zepeniuk, L. Cohen, H. Dan, O. Zion, Y. Strenov, S. Polak-Charcon and M. Perelman (2010). "MicroRNA expression differentiates between primary lung tumors and metastases to the lung." Pathol Res Pract 206(8): 578-84.
6. Bartel, D.P. (2004). "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function." Cell 116(2): 281-97.
7. Baylin, S.B. and P.A. Jones (2016). "Epigenetic Determinants of Cancer." Cold Spring Harb Perspect Biol 8(9).
8. Bechtold, R.E. and R.J. Zagoria (1997). "Imaging approach to staging of renal cell carcinoma." Urol Clin North Am 24(3): 507-22.
9. Bedke, J., T. Gailer, V. Grunwald, A. Hegele, E. Herrmann, S. Hinz, J. Janssen, S. Schmitz, M. Schostak, H. Tesch, S. Zastrow and K. Miller (2016). "Systemic therapy in metastatic renal cell carcinoma." World J Urol.
10. Berlanga, P., L. Munoz, M. Piqueras, J.A. Sirerol, M.D. Sanchez-Izquierdo, D. Hervas, M. Hernandez, M. Llavador, I. Machado, A. Llobart-Bosch, A. Canete, V. Castel and J. Font de Mora (2016). "miR-200c and phospho-AKT as prognostic factors and mediators of osteosarcoma progression and lung metastasis." Mol Oncol 10(7): 1043-53.
11. Beroukhi, R., J.P. Brunet, A. Di Napoli, K.D. Mertz, A. Seeley, M.M. Pires, D. Linhart, R.A. Worrell, H. Moch, M.A. Rubin, W.R. Sellers, M. Meyerson, W.M. Linehan, W.G. Kaelin, Jr. and S. Signoretti (2009). "Patterns of gene expression and copy-number alterations in von-hippel lindau disease-associated and sporadic clear cell carcinoma of the kidney." Cancer Res 69(11): 4674-81.
12. Bissig, H., J. Richter, R. Desper, V. Meier, P. Schraml, A.A. Schäffer, G. Sauter, M.J. Mihatsch and H. Moch (1999). "Evaluation of the Clonal Relationship between Primary and Metastatic Renal Cell Carcinoma by Comparative Genomic Hybridization." Am J Pathol 155(1): 267-274.
13. Borchert, G.M., W. Lanier and B.L. Davidson (2006). "RNA polymerase III transcribes human microRNAs." Nat Struct Mol Biol 13(12): 1097-101.
14. Boyerinas, B., C. Jochems, M. Fantini, C.R. Heery, J.L. Gulley, K.Y. Tsang and J. Schlom (2015). "Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity Activity of a Novel Anti-PD-L1 Antibody Avelumab (MSB0010718C) on Human Tumor Cells." Cancer Immunol Res 3(10): 1148-1157.
15. Bravo-Cordero, J.J., M.A. Magalhaes, R.J. Eddy, L. Hodgson and J. Condeelis (2013). "Functions of cofilin in cell locomotion and invasion." Nat Rev Mol Cell Biol 14(7): 405-15.
16. Bray, F., J. Ferlay, I. Soerjomataram, R.L. Siegel, L.A. Torre and A. Jemal (2018). "Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries." CA Cancer J Clin 68(6): 394-424.
17. Brennecke, J., A. Stark, R.B. Russell and S.M. Cohen (2005). "Principles of microRNA-target recognition." PLoS Biol 3(3): e85.
18. Buczek, M., B. Escudier, E. Bartnik, C. Szczylik and A. Czarnecka (2014). "Resistance to tyrosine kinase inhibitors in clear cell renal cell carcinoma: from the patient's bed to molecular mechanisms." Biochim Biophys Acta 1845(1): 31-41.

19. Butz, H., P.M. Szabo, H.W. Khella, R. Nofech-Mozes, A. Patocs and G.M. Yousef (2015). "miRNA-target network reveals miR-124 as a key miRNA contributing to clear cell renal cell carcinoma aggressive behaviour by targeting CAV1 and FLOT1." *Oncotarget* 6(14): 12543-57.
20. Calin, G.A., C.D. Dumitru, M. Shimizu, R. Bichi, S. Zupo, E. Noch, H. Aldler, S. Rattan, M. Keating, K. Rai, L. Rassenti, T. Kipps, M. Negrini, F. Bullrich and C.M. Croce (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(24): 15524-9.
21. Calin, G.A., C. Sevignani, C.D. Dumitru, T. Hyslop, E. Noch, S. Yendamuri, M. Shimizu, S. Rattan, F. Bullrich, M. Negrini and C.M. Croce (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.
22. Capitanio, U., C. Terrone, A. Antonelli, A. Minervini, A. Volpe, M. Furlan, R. Matloob, F. Regis, C. Fiori, F. Porpiglia, E. Di Trapani, M. Zacchero, S. Serni, A. Salonia, M. Carini, C. Simeone, F. Montorsi and R. Bertini (2015). "Nephron-sparing techniques independently decrease the risk of cardiovascular events relative to radical nephrectomy in patients with a T1a-T1b renal mass and normal preoperative renal function." *Eur Urol* 67(4): 683-9.
23. Carlsson, J., J. Christiansen, S. Davidsson, F. Giunchi, M. Fiorentino and P. Sundqvist (2019). "The potential role of miR-126, miR-21 and miR-10b as prognostic biomarkers in renal cell carcinoma." *Oncol Lett* 17(5): 4566-4574.
24. Chendrimada, T.P., R.I. Gregory, E. Kumaraswamy, J. Norman, N. Cooch, K. Nishikura and R. Shiekhattar (2005). "TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing." *Nature* 436(7051): 740-4.
25. Cheng, T., L. Wang, Y. Li, C. Huang, L. Zeng and J. Yang (2013). "Differential microRNA expression in renal cell carcinoma." *Oncol Lett* 6(3): 769-776.
26. Cho, W.C. (2007). "OncomiRs: the discovery and progress of microRNAs in cancers." *Mol Cancer* 6: 60.
27. Choueiri, T.K., B. Escudier, T. Powles, P.N. Mainwaring, B.I. Rini, F. Donskov, H. Hammers, T.E. Hutson, J.L. Lee, K. Peltola, B.J. Roth, G.A. Bjarnason, L. Geczi, B. Keam, P. Maroto, D.Y. Heng, M. Schmidinger, P.W. Kantoff, A. Borgman-Hagey, C. Hessel, C. Scheffold, G.M. Schwab, N.M. Tannir and R.J. Motzer (2015). "Cabozantinib versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma." *N Engl J Med* 373(19): 1814-23.
28. Choueiri, T.K., S.K. Pal, D.F. McDermott, S. Morrissey, K.C. Ferguson, J. Holland, W.G. Kaelin and J.P. Dutcher (2014). "A phase I study of cabozantinib (XL184) in patients with renal cell cancer." *Ann Oncol* 25(8): 1603-8.
29. Chow, T.F., Y.M. Youssef, E. Lianidou, A.D. Romaschin, R.J. Honey, R. Stewart, K.T. Pace and G.M. Yousef (2010). "Differential expression profiling of microRNAs and their potential involvement in renal cell carcinoma pathogenesis." *Clin Biochem* 43(1-2): 150-8.
30. Christinat, Y. and W. Krek (2015). "Integrated genomic analysis identifies subclasses and prognosis signatures of kidney cancer." *Oncotarget* 6(12): 10521-31.
31. Cimmino, A., G.A. Calin, M. Fabbri, M.V. Iorio, M. Ferracin, M. Shimizu, S.E. Wojcik, R.I. Aqeilan, S. Zupo, M. Dono, L. Rassenti, H. Alder, S. Volinia, C.G. Liu, T.J. Kipps, M. Negrini and C.M. Croce (2005). "miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(39): 13944-9.
32. Clague, J., J. Lin, A. Cassidy, S. Matin, N.M. Tannir, P. Tamboli, C.G. Wood and X. Wu (2009). "Family history and risk of renal cell carcinoma: results from a case-control study and systematic meta-analysis." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18(3): 801-7.
33. Collazo, J., B. Zhu, S. Larkin, S.K. Martin, H. Pu, C. Horbinski, S. Koochekpour and N. Kyprianou (2014). "Cofilin drives cell-invasive and metastatic responses to TGF-beta in prostate cancer." *Cancer Res* 74(8): 2362-73.
34. Dabestani, S., L. Marconi and A. Bex (2016). "Metastasis therapies for renal cancer." *Curr Opin Urol* 26(6): 566-72.
35. Davis, B.N. and A. Hata (2009). "Regulation of MicroRNA Biogenesis: A miRiad of mechanisms." *Cell Commun Signal* 7: 18.

36. Delahunt, B., J.C. Cheville, G. Martignoni, P.A. Humphrey, C. Magi-Galluzzi, J. McKenney, L. Egevad, F. Algaba, H. Moch, D.J. Grignon, R. Montironi and J.R. Srigley (2013). "The International Society of Urological Pathology (ISUP) grading system for renal cell carcinoma and other prognostic parameters." *Am J Surg Pathol* 37(10): 1490-504.
37. Delahunt, B. and J.N. Eble (1997). "Papillary renal cell carcinoma: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 105 tumors." *Mod Pathol* 10(6): 537-44.
38. Denli, A.M., B.B. Tops, R.H. Plasterk, R.F. Ketting and G.J. Hannon (2004). "Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex." *Nature* 432(7014): 231-5.
39. Diederichs, S. and D.A. Haber (2007). "Dual role for argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression." *Cell* 131(6): 1097-108.
40. Eble, J.N., G. Sauter, J.I. Epstein and B.B. Tops (2004). "Pathology and genetics of tumours of the urinary system and male genital organs." *World Health Organization Classification of Tumours*. Lyon: IARC Press.
41. Esquela-Kerscher, A. and F.J. Slack (2006). "Oncomirs - microRNAs with a role in cancer." *Nat Rev Cancer* 6(4): 259-69.
42. Fan, L., D. Lianfang, X. Jinfang, S. Yijin and W. Ying (2008). "Diagnostic efficacy of contrast-enhanced ultrasonography in solid renal parenchymal lesions with maximum diameters of 5 cm." *J Ultrasound Med* 27(6): 875-85.
43. Faragalla, H., Y.M. Youssef, A. Scorilas, B. Khalil, N.M. White, S. Mejia-Guerrero, H. Khella, M.A. Jewett, A. Evans, Z. Lichner, G. Bjarnason, L. Sugar, M.I. Attalah and G.M. Yousef (2012). "The clinical utility of miR-21 as a diagnostic and prognostic marker for renal cell carcinoma." *J Mol Diagn* 14(4): 385-92.
44. Ferlay, J., M. Colombet, I. Soerjomataram, T. Dyba, G. Randi, M. Bettio, A. Gavin, O. Visser and F. Bray (2018). "Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018." *Eur J Cancer* 103: 356-387.
45. Fidler, I.J. (2003). "The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited." *Nat Rev Cancer* 3(6): 453-8.
46. Fingar, D.C., C.J. Richardson, A.R. Tee, L. Cheatham, C. Tsou and J. Blenis (2004). "mTOR controls cell cycle progression through its cell growth effectors S6K1 and 4E-BP1/eukaryotic translation initiation factor 4E." *Mol Cell Biol* 24(1): 200-16.
47. Flamm, M., B. Nußbaumer, B. Mesgarpour, M.G. Van Noord and G. Gartlehner (2013). "Literatursuche und Evidenzsynthese: S3-Leitlinie maligne Nierentumore." *Donau-Universität Krems; Department für Evidenzbasierte Medizin und Klinische Epidemiologie*(Teil 1: Forschungsfrage Diagnostik, Systematische Übersichtsarbeit).
48. Fokas, E., M. Henzel, K. Hamm, G. Surber, G. Kleinert and R. Engenhart-Cabillic (2010). "Radiotherapy for brain metastases from renal cell cancer: should whole-brain radiotherapy be added to stereotactic radiosurgery?: analysis of 88 patients." *Strahlenther Onkol* 186(4): 210-7.
49. Fridman, E., Z. Dotan, I. Barshack, M.B. David, A. Dov, S. Tabak, O. Zion, S. Benjamin, H. Benjamin, H. Kuker, C. Avivi, K. Rosenblatt, S. Polak-Charcon, J. Ramon, N. Rosenfeld and Y. Spector (2010). "Accurate molecular classification of renal tumors using microRNA expression." *J Mol Diagn* 12(5): 687-96.
50. Friedlander, M.R., E. Lizano, A.J. Houben, D. Bezdan, M. Banez-Coronel, G. Kudla, E. Mateu-Huertas, B. Kagerbauer, J. Gonzalez, K.C. Chen, E.M. LeProust, E. Marti and X. Estivill (2014). "Evidence for the biogenesis of more than 1,000 novel human microRNAs." *Genome Biol* 15(4): R57.
51. Gantier, M.P., C.E. McCoy, I. Rusinova, D. Saulep, D. Wang, D. Xu, A.T. Irving, M.A. Behlke, P.J. Hertzog, F. Mackay and B.R. Williams (2011). "Analysis of microRNA turnover in mammalian cells following Dicer1 ablation." *Nucleic Acids Res* 39(13): 5692-703.
52. Ge, Y.Z., R. Wu, H. Xin, M. Zhu, T.Z. Lu, H. Liu, Z. Xu, P. Yu, Y.C. Zhao, M.H. Li, Z.K. Hu, Y. Zhao, B. Zhong, X. Xu, L.H. Zhou, L.W. Xu, J.P. Wu, W.C. Li, J.G. Zhu and R.P. Jia (2015). "A tumor-specific microRNA signature predicts survival in clear cell renal cell carcinoma." *J Cancer Res Clin Oncol* 141(7): 1291-9.

53. Goradel, N.H., N. Mohammadi, H. Haghi-Aminjan, B. Farhood, B. Negahdari and A. Sahebkar (2019). "Regulation of tumor angiogenesis by microRNAs: State of the art." J Cell Physiol 234(2): 1099-1110.
54. Gottardo, F., C.G. Liu, M. Ferracin, G.A. Calin, M. Fassan, P. Bassi, C. Sevignani, D. Byrne, M. Negrini, F. Pagano, L.G. Gomella, C.M. Croce and R. Baffa (2007). "Micro-RNA profiling in kidney and bladder cancers." Urol Oncol 25(5): 387-92.
55. Griffiths-Jones, S. (2004). "The microRNA Registry." Nucleic Acids Res 32(Database issue): D109-11.
56. Griffiths-Jones, S., R.J. Grocock, S. van Dongen, A. Bateman and A.J. Enright (2006). "miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature." Nucleic Acids Res 34(Database issue): D140-4.
57. Griffiths-Jones, S., H.K. Saini, S. van Dongen and A.J. Enright (2008). "miRBase: tools for microRNA genomics." Nucleic Acids Res 36(Database issue): D154-8.
58. Grimm, M.O., K. Leucht, V. Grunwald and S. Foller (2020). "New First Line Treatment Options of Clear Cell Renal Cell Cancer Patients with PD-1 or PD-L1 Immune-Checkpoint Inhibitor-Based Combination Therapies." J Clin Med 9(2).
59. Gupta, G.P. and J. Massague (2006). "Cancer metastasis: building a framework." Cell 127(4): 679-95.
60. Haase, A.D., L. Jaskiewicz, H. Zhang, S. Laine, R. Sack, A. Gatignol and W. Filipowicz (2005). "TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing." EMBO Rep 6(10): 961-7.
61. Hammers, H.J., E.R. Plimack, J.R. Infante, B.I. Rini, D.F. McDermott, L.D. Lewis, M.H. Voss, P. Sharma, S.K. Pal, A.R.A. Razak, C. Kollmannsberger, D.Y.C. Heng, J. Spratlin, M.B. McHenry and A. Amin (2017). "Safety and Efficacy of Nivolumab in Combination With Ipilimumab in Metastatic Renal Cell Carcinoma: The CheckMate 016 Study." J Clin Oncol 35(34): 3851-3858.
62. Hammerschmid, C.G., B. Walter and A. Hartmann (2008). "[Renal cell carcinoma 2008. Histopathology, molecular genetics and new therapeutic options]." Pathologe 29(5): 354-63.
63. Han, J., J.S. Pedersen, S.C. Kwon, C.D. Belair, Y.K. Kim, K.H. Yeom, W.Y. Yang, D. Haussler, R. Blelloch and V.N. Kim (2009). "Posttranscriptional crossregulation between Drosha and DGCR8." Cell 136(1): 75-84.
64. Hanahan, D. and R.A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell 100(1): 57-70.
65. Hatfield, S.D., H.R. Shcherbata, K.A. Fischer, K. Nakahara, R.W. Carthew and H. Ruohola-Baker (2005). "Stem cell division is regulated by the microRNA pathway." Nature 435(7044): 974-8.
66. Heidenreich, A. and V. Ravery (2004). "Preoperative imaging in renal cell cancer." World J Urol 22(5): 307-15.
67. Heinzlmann, J., M. Arndt, R. Pleyers, T. Fehlmann, S. Hoelters, P. Zeuschner, A. Vogt, A. Pryalukhin, E. Schaeffeler, R.M. Bohle, M. Gajda, M. Janssen, M. Stoeckle and K. Junker (2019). "4-miRNA Score Predicts the Individual Metastatic Risk of Renal Cell Carcinoma Patients." Ann Surg Oncol 26(11): 3765-3773.
68. Heinzlmann, J., B. Henning, J. Sanjmyatav, N. Posorski, T. Steiner, H. Wunderlich, M.R. Gajda and K. Junker (2011). "Specific miRNA signatures are associated with metastasis and poor prognosis in clear cell renal cell carcinoma." World J Urol 29(3): 367-73.
69. Heinzlmann, J., A. Unrein, U. Wickmann, S. Baumgart, M. Stapf, A. Szendroi, M.O. Grimm, M.R. Gajda, H. Wunderlich and K. Junker (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): 1046-54.
70. Heng, D.Y., W. Xie, M.M. Regan, L.C. Harshman, G.A. Bjarnason, U.N. Vaishampayan, M. Mackenzie, L. Wood, F. Donskov, M.H. Tan, S.Y. Rha, N. Agarwal, C. Kollmannsberger, B.I. Rini and T.K. Choueiri (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(2): 141-8.
71. Heng, Y.W. and C.G. Koh (2010). "Actin cytoskeleton dynamics and the cell division cycle." Int J Biochem Cell Biol 42(10): 1622-33.

72. Hofflin, R., W. Roth, H. Sultmann, C. Grulich, G. Hatiboglu, J. Nyarangi-Dix, G. Schonberg, D. Teber, B. Hadaschik, S. Pahernik, M. Hohenfellner and S. Duensing (2015). "[Intratumoral heterogeneity in renal cell carcinoma. Molecular basis and translational implications]." Urologe A 54(6): 800-3.
73. Hu, G., Y. Wei and Y. Kang (2009). "The multifaceted role of MTDH/AEG-1 in cancer progression." Clin Cancer Res 15(18): 5615-20.
74. Huang, Y., Y. Dai, J. Yang, T. Chen, Y. Yin, M. Tang, C. Hu and L. Zhang (2009). "Microarray analysis of microRNA expression in renal clear cell carcinoma." Eur J Surg Oncol 35(10): 1119-23.
75. Hunt, J.D., O.L. van der Hel, G.P. McMillan, P. Boffetta and P. Brennan (2005). "Renal cell carcinoma in relation to cigarette smoking: meta-analysis of 24 studies." Int J Cancer 114(1): 101-8.
76. Hunter, G.K., E.H. Balagamwala, S.A. Koyfman, T. Bledsoe, L.J. Sheplan, C.A. Reddy, S.T. Chao, T. Djemil, L. Angelov and G.M. Videtic (2012). "The efficacy of external beam radiotherapy and stereotactic body radiotherapy for painful spinal metastases from renal cell carcinoma." Pract Radiat Oncol 2(4): e95-e100.
77. Hwang, H.W. and J.T. Mendell (2006). "MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis." Br J Cancer 94(6): 776-80.
78. Jacobs, S.C., S.I. Berg and R.K. Lawson (1980). "Synchronous bilateral renal cell carcinoma: total surgical excision." Cancer 46(11): 2341-5.
79. Jamis-Dow, C.A., P.L. Choyke, S.B. Jennings, W.M. Linehan, K.N. Thakore and M.M. Walther (1996). "Small (< or = 3-cm) renal masses: detection with CT versus US and pathologic correlation." Radiology 198(3): 785-8.
80. Jayson, M. and H. Sanders (1998). "Increased incidence of serendipitously discovered renal cell carcinoma." Urology 51(2): 203-5.
81. Jia, W., J.O. Eneh, S. Ratnaparkhe, M.K. Altman and M.M. Murph (2011). "MicroRNA-30c-2* expressed in ovarian cancer cells suppresses growth factor-induced cellular proliferation and downregulates the oncogene BCL9." Mol Cancer Res 9(12): 1732-45.
82. Jiang, F., R. Desper, C.H. Papadimitriou, A.A. Schäffer, O.-P. Kallioniemi, J. Richter, P. Schraml, G. Sauter, M.J. Mihatsch and H. Moch (2000). "Construction of Evolutionary Tree Models for Renal Cell Carcinoma from Comparative Genomic Hybridization Data." Cancer Res 60(22): 6503-6509.
83. Jin, Y., Y. Liu, J. Zhang, W. Huang, H. Jiang, Y. Hou, C. Xu, C. Zhai, X. Gao, S. Wang, Y. Wu, H. Zhu and S. Lu (2015). "The Expression of miR-375 Is Associated with Carcinogenesis in Three Subtypes of Lung Cancer." PLoS One 10(12): e0144187.
84. Juan, D., G. Alexe, T. Antes, H. Liu, A. Madabhushi, C. Delisi, S. Ganesan, G. Bhanot and L.S. Liou (2010). "Identification of a microRNA panel for clear-cell kidney cancer." Urology 75(4): 835-41.
85. Jung, M., H.J. Mollenkopf, C. Grimm, I. Wagner, M. Albrecht, T. Waller, C. Pilarsky, M. Johannsen, C. Stephan, H. Lehrach, W. Nietfeld, T. Rudel, K. Jung and G. Kristiansen (2009). "MicroRNA profiling of clear cell renal cell cancer identifies a robust signature to define renal malignancy." J Cell Mol Med 13(9B): 3918-28.
86. Junker, K., G. Weirich, M.B. Amin, P. Moravek, W. Hindermann and J. Schubert (2003). "Genetic subtyping of renal cell carcinoma by comparative genomic hybridization." Recent Results Cancer Res 162: 169-75.
87. Kabaria, R., Z. Klaassen and M.K. Terris (2016). "Renal cell carcinoma: links and risks." Int J Nephrol Renovasc Dis 9: 45-52.
88. Kaelin, W.G., Jr. (2008). "The von Hippel-Lindau tumour suppressor protein: O2 sensing and cancer." Nat Rev Cancer 8(11): 865-73.
89. Kamat, A.M., R.P. Shock, Y. Naya, C.J. Rosser, J.W. Slaton and L.L. Pisters (2004). "Prognostic value of body mass index in patients undergoing nephrectomy for localized renal tumors." Urology 63(1): 46-50.
90. Keller, C., Geberth, S. (2010). Praxis der Nephrologie. 2. Auflage.

91. Khraiwesh, B., M.A. Arif, G.I. Seumel, S. Ossowski, D. Weigel, R. Reski and W. Frank (2010). "Transcriptional control of gene expression by microRNAs." Cell 140(1): 111-22.
92. Kim, H.L., A.S. Beldegrun, D.G. Freitas, M.H. Bui, K.R. Han, F.J. Dorey and R.A. Figlin (2003). "Paraneoplastic signs and symptoms of renal cell carcinoma: implications for prognosis." J Urol 170(5): 1742-6.
93. Kim, J., F. Yao, Z. Xiao, Y. Sun and L. Ma (2018). "MicroRNAs and metastasis: small RNAs play big roles." Cancer Metastasis Rev 37(1): 5-15.
94. Kim, W.Y. and W.G. Kaelin (2004). "Role of VHL gene mutation in human cancer." J Clin Oncol 22(24): 4991-5004.
95. Kohn, L., U. Svenson, B. Ljungberg and G. Roos (2015). "Specific genomic aberrations predict survival, but low mutation rate in cancer hot spots, in clear cell renal cell carcinoma." Appl Immunohistochem Mol Morphol 23(5): 334-42.
96. Kondo, K., M. Yao, M. Yoshida, T. Kishida, T. Shuin, T. Miura, M. Moriyama, K. Kobayashi, N. Sakai, S. Kaneko, S. Kawakami, M. Baba, N. Nakaigawa, Y. Nagashima, Y. Nakatani and M. Hosaka (2002). "Comprehensive mutational analysis of the VHL gene in sporadic renal cell carcinoma: relationship to clinicopathological parameters." Genes Chromosomes Cancer 34(1): 58-68.
97. Kozomara, A., M. Birgaoanu and S. Griffiths-Jones (2019). "miRBase: from microRNA sequences to function." Nucleic Acids Res 47(D1): D155-D162.
98. Kozomara, A. and S. Griffiths-Jones (2011). "miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data." Nucleic Acids Res 39(Database issue): D152-7.
99. Kozomara, A. and S. Griffiths-Jones (2014). "miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data." Nucleic Acids Res 42(Database issue): D68-73.
100. Krek, A., D. Grun, M.N. Poy, R. Wolf, L. Rosenberg, E.J. Epstein, P. MacMenamin, I. da Piedade, K.C. Gunsalus, M. Stoffel and N. Rajewsky (2005). "Combinatorial microRNA target predictions." Nat Genet 37(5): 495-500.
101. Krestin, G.P., W. Gross-Fengels and B. Marincek (1992). "[The importance of magnetic resonance tomography in the diagnosis and staging of renal cell carcinoma]." Radiologe 32(3): 121-6.
102. Latif, F., K. Tory, J. Gnarra, M. Yao, F.M. Duh, M.L. Orcutt, T. Stackhouse, I. Kuzmin, W. Modi, L. Geil and et al. (1993). "Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene." Science 260(5112): 1317-20.
103. Lee, C.T., J. Katz, P.A. Fearn and P. Russo (2002). "Mode of presentation of renal cell carcinoma provides prognostic information." Urol Oncol 7(4): 135-40.
104. Lee, R.C., R.L. Feinbaum and V. Ambros (1993). "The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14." Cell 75(5): 843-54.
105. Lee, Y., S. El Andaloussi and M.J. Wood (2012). "Exosomes and microvesicles: extracellular vesicles for genetic information transfer and gene therapy." Hum Mol Genet 21(R1): R125-34.
106. Lee, Y., I. Hur, S.Y. Park, Y.K. Kim, M.R. Suh and V.N. Kim (2006). "The role of PACT in the RNA silencing pathway." EMBO J 25(3): 522-32.
107. Lee, Y., K. Jeon, J.T. Lee, S. Kim and V.N. Kim (2002). "MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization." EMBO J 21(17): 4663-70.
108. Lee, Y., M. Kim, J. Han, K.H. Yeom, S. Lee, S.H. Baek and V.N. Kim (2004). "MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II." EMBO J 23(20): 4051-60.
109. Lee, Y.J., D.J. Mazzatti, Z. Yun and P.C. Keng (2005). "Inhibition of invasiveness of human lung cancer cell line H1299 by over-expression of cofilin." Cell Biol Int 29(11): 877-83.
110. Leibovich, B.C., M.L. Blute, J.C. Cheville, C.M. Lohse, I. Frank, E.D. Kwon, A.L. Weaver, A.S. Parker and H. Zincke (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): 1663-71.
111. Leitlinienprogramm-Onkologie (2020). "Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Nierenzellkarzinoms, Langversion 2.01." Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche

- Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF) AWMF Registernummer 043/0170L, <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/nierenzellkarzinom/> (Zugriff am: 11.03.2020).
112. Li, W., M. Liu, Y. Feng, Y.F. Xu, Y.F. Huang, J.P. Che, G.C. Wang, X.D. Yao and J.H. Zheng (2014). "Downregulated miR-646 in clear cell renal carcinoma correlated with tumour metastasis by targeting the nin one binding protein (NOB1)." *Br J Cancer* 111(6): 1188-200.
 113. Lian, S., J.S. Park, Y. Xia, T.T. Nguyen, Y.E. Joo, K.K. Kim, H.K. Kim and Y.D. Jung (2016). "MicroRNA-375 Functions as a Tumor-Suppressor Gene in Gastric Cancer by Targeting Recepteur d'Origine Nantais." *Int J Mol Sci* 17(10).
 114. Liang, Y., D. Ridzon, L. Wong and C. Chen (2007). "Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues." *BMC Genomics* 8: 166.
 115. Lin, S.P., A.J. Bierhals and J.S. Lewis, Jr. (2007). "Best cases from the AFIP: Metastatic renal cell carcinoma." *Radiographics* 27(6): 1801-7.
 116. Liu, A. and X. Xu (2011). "MicroRNA isolation from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues." *Methods Mol Biol* 724: 259-67.
 117. Ljungberg, B. (2004). "Prognostic factors in renal cell carcinoma." *Urologe A* 43 Suppl 3: S119-20.
 118. Ljungberg, B. (2004). "Prognostic factors in renal cell carcinoma." *Scand J Surg* 93(2): 118-25.
 119. Ljungberg, B., L. Albiges, Y. Abu-Ghanem, K. Bensalah, S. Dabestani, S. Fernandez-Pello, R.H. Giles, F. Hofmann, M. Hora, M.A. Kuczyk, T. Kuusk, T.B. Lam, L. Marconi, A.S. Merseburger, T. Powles, M. Staehler, R. Tahbaz, A. Volpe and A. Bex (2019). "European Association of Urology Guidelines on Renal Cell Carcinoma: The 2019 Update." *Eur Urol* 75(5): 799-810.
 120. Lokeshwar, S.D., A. Talukder, T.J. Yates, M.J.P. Hennig, M. Garcia-Roig, S.S. Lahorewala, N.N. Mullani, Z. Klaassen, B.R. Kava, M. Manoharan, M.S. Soloway and V.B. Lokeshwar (2018). "Molecular Characterization of Renal Cell Carcinoma: A Potential Three-MicroRNA Prognostic Signature." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 27(4): 464-472.
 121. Ma, L., J. Teruya-Feldstein and R.A. Weinberg (2007). "Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer." *Nature* 449(7163): 682-8.
 122. MacLennan, S., M. Imamura, M.C. Lapitan, M.I. Omar, T.B. Lam, A.M. Hilvano-Cabungcal, P. Royle, F. Stewart, G. MacLennan, S.J. MacLennan, S.E. Canfield, S. McClinton, T.R. Griffiths, B. Ljungberg and J. N'Dow (2012). "Systematic review of oncological outcomes following surgical management of localised renal cancer." *Eur Urol* 61(5): 972-93.
 123. Magera, J.S., Jr., B.C. Leibovich, C.M. Lohse, S. Sengupta, J.C. Cheville, E.D. Kwon and M.L. Blute (2008). "Association of abnormal preoperative laboratory values with survival after radical nephrectomy for clinically confined clear cell renal cell carcinoma." *Urology* 71(2): 278-82.
 124. Maniataki, E. and Z. Mourelatos (2005). "A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA." *Genes Dev* 19(24): 2979-90.
 125. Mathew, L.K., S.S. Lee, N. Skuli, S. Rao, B. Keith, K.L. Nathanson, P. Lal and M.C. Simon (2014). "Restricted expression of miR-30c-2-3p and miR-30a-3p in clear cell renal cell carcinomas enhances HIF2alpha activity." *Cancer Discov* 4(1): 53-60.
 126. Mazar, J., D. DeBlasio, S.S. Govindarajan, S. Zhang and R.J. Perera (2011). "Epigenetic regulation of microRNA-375 and its role in melanoma development in humans." *FEBS Lett* 585(15): 2467-76.
 127. McDermott, D.F. and M.B. Atkins (2013). "PD-1 as a potential target in cancer therapy." *Cancer Med* 2(5): 662-73.
 128. Mittelbrunn, M. and F. Sanchez-Madrid (2012). "Intercellular communication: diverse structures for exchange of genetic information." *Nat Rev Mol Cell Biol* 13(5): 328-35.
 129. Mizuno, K. (2013). "Signaling mechanisms and functional roles of cofilin phosphorylation and dephosphorylation." *Cell Signal* 25(2): 457-69.
 130. Moch, H., A.L. Cubilla, P.A. Humphrey, V.E. Reuter and T.M. Ulbright (2016). "The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours." *Eur Urol* 70(1): 93-105.

131. Moch, H., J.C. Presti, G. Sauter, N. Buchholz, P. Jordan, M.J. Mihatsch and F.M. Waldman (1996). "Genetic Aberrations Detected by Comparative Genomic Hybridization Are Associated with Clinical Outcome in Renal Cell Carcinoma." *Cancer Res* 56(1): 27-30.
132. Moore, L.E., P. Boffetta, S. Karami, P. Brennan, P.S. Stewart, R. Hung, D. Zaridze, V. Matveev, V. Janout, H. Kollarova, V. Bencko, M. Navratilova, N. Szeszenia-Dabrowska, D. Mates, J. Gromiec, I. Holcatova, M. Merino, S. Chanock, W.H. Chow and N. Rothman (2010). "Occupational trichloroethylene exposure and renal carcinoma risk: evidence of genetic susceptibility by reductive metabolism gene variants." *Cancer Res* 70(16): 6527-36.
133. Moreira, D.M., B. Gershman, C.M. Lohse, S.A. Boorjian, J.C. Cheville, B.C. Leibovich and R.H. Thompson (2016). "Paraneoplastic syndromes are associated with adverse prognosis among patients with renal cell carcinoma undergoing nephrectomy." *World J Urol*.
134. Motzer, R.J., B. Escudier, D.F. McDermott, S. George, H.J. Hammers, S. Srinivas, S.S. Tykodi, J.A. Sosman, G. Procopio, E.R. Plimack, D. Castellano, T.K. Choueiri, H. Gurney, F. Donskov, P. Bono, J. Wagstaff, T.C. Gaurer, T. Ueda, Y. Tomita, F.A. Schutz, C. Kollmannsberger, J. Larkin, A. Ravaud, J.S. Simon, L.A. Xu, I.M. Waxman and P. Sharma (2015). "Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma." *N Engl J Med* 373(19): 1803-13.
135. Motzer, R.J., M. Mazumdar, J. Bacik, W. Berg, A. Amsterdam and J. Ferrara (1999). "Survival and prognostic stratification of 670 patients with advanced renal cell carcinoma." *J Clin Oncol* 17(8): 2530-40.
136. Motzer, R.J., K. Penkov, J. Haanen, B. Rini, L. Albiges, M.T. Campbell, B. Venugopal, C. Kollmannsberger, S. Negrier, M. Uemura, J.L. Lee, A. Vasiliev, W.H. Miller, Jr., H. Gurney, M. Schmidinger, J. Larkin, M.B. Atkins, J. Bedke, B. Alekseev, J. Wang, M. Mariani, P.B. Robbins, A. Chudnovsky, C. Fowst, S. Hariharan, B. Huang, A. di Pietro and T.K. Choueiri (2019). "Avelumab plus Axitinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma." *N Engl J Med* 380(12): 1103-1115.
137. Motzer, R.J., N.M. Tannir, D.F. McDermott, O. Aren Frontera, B. Melichar, T.K. Choueiri, E.R. Plimack, P. Barthelemy, C. Porta, S. George, T. Powles, F. Donskov, V. Neiman, C.K. Kollmannsberger, P. Salman, H. Gurney, R. Hawkins, A. Ravaud, M.O. Grimm, S. Bracarda, C.H. Barrios, Y. Tomita, D. Castellano, B.I. Rini, A.C. Chen, S. Mekan, M.B. McHenry, M. Wind-Rotolo, J. Doan, P. Sharma, H.J. Hammers and B. Escudier (2018). "Nivolumab plus Ipilimumab versus Sunitinib in Advanced Renal-Cell Carcinoma." *N Engl J Med* 378(14): 1277-1290.
138. Nicoloso, M.S., R. Spizzo, M. Shimizu, S. Rossi and G.A. Calin (2009). "MicroRNAs--the micro steering wheel of tumour metastases." *Nat Rev Cancer* 9(4): 293-302.
139. Nishimura, Y., S. Komatsu, D. Ichikawa, H. Nagata, S. Hirajima, H. Takeshita, T. Kawaguchi, T. Arita, H. Konishi, K. Kashimoto, A. Shiozaki, H. Fujiwara, K. Okamoto, H. Tsuda and E. Otsuji (2013). "Overexpression of YWHAZ relates to tumor cell proliferation and malignant outcome of gastric carcinoma." *Br J Cancer* 108(6): 1324-31.
140. Nottrott, S., M.J. Simard and J.D. Richter (2006). "Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes." *Nat Struct Mol Biol* 13(12): 1108-14.
141. Nouh, M.A., N. Kuroda, M. Yamashita, Y. Hayashida, T. Yano, J. Minakuchi, S. Taniguchi, I. Nomura, M. Inui, M. Sugimoto and Y. Kakehi (2010). "Renal cell carcinoma in patients with end-stage renal disease: relationship between histological type and duration of dialysis." *BJU Int* 105(5): 620-7.
142. Oberling, C., M. Riviere and F. Haguenau (1960). "Ultrastructure of the clear cells in renal carcinomas and its importance for the demonstration of their renal origin." *Nature* 186: 402-3.
143. Oh, S.W., Y.S. Yoon and S.A. Shin (2005). "Effects of excess weight on cancer incidences depending on cancer sites and histologic findings among men: Korea National Health Insurance Corporation Study." *J Clin Oncol* 23(21): 4742-54.
144. Okada, C., E. Yamashita, S.J. Lee, S. Shibata, J. Katahira, A. Nakagawa, Y. Yoneda and T. Tsukihara (2009). "A high-resolution structure of the pre-microRNA nuclear export machinery." *Science* 326(5957): 1275-9.

145. Ozsolak, F., L.L. Poling, Z. Wang, H. Liu, X.S. Liu, R.G. Roeder, X. Zhang, J.S. Song and D.E. Fisher (2008). "Chromatin structure analyses identify miRNA promoters." Genes Dev 22(22): 3172-83.
146. Parker, A.S., J.R. Cerhan, C.A. Janney, C.F. Lynch and K.P. Cantor (2003). "Smoking cessation and renal cell carcinoma." Ann Epidemiol 13(4): 245-51.
147. Patel, N.H., K.M. Attwood, M. Hanzly, T.T. Creighton, D.C. Mehedint, T. Schwaab and E.C. Kauffman (2015). "Comparative Analysis of Smoking as a Risk Factor among Renal Cell Carcinoma Histological Subtypes." J Urol 194(3): 640-6.
148. Pena-Llopis, S., S. Vega-Rubin-de-Celis, A. Liao, N. Leng, A. Pavia-Jimenez, S. Wang, T. Yamasaki, L. Zhrebker, S. Sivanand, P. Spence, L. Kinch, T. Hambuch, S. Jain, Y. Lotan, V. Margulis, A.I. Sagalowsky, P.B. Summerour, W. Kabbani, S.W. Wong, N. Grishin, M. Laurent, X.J. Xie, C.D. Haudenschild, M.T. Ross, D.R. Bentley, P. Kapur and J. Brugarolas (2012). "BAP1 loss defines a new class of renal cell carcinoma." Nat Genet 44(7): 751-9.
149. Peng, X.C., F.M. Gong, Y.W. Zhao, L.X. Zhou, Y.W. Xie, H.L. Liao, H.J. Lin, Z.Y. Li, M.H. Tang and A.P. Tong (2011). "Comparative proteomic approach identifies PKM2 and cofilin-1 as potential diagnostic, prognostic and therapeutic targets for pulmonary adenocarcinoma." PLoS One 6(11): e27309.
150. Pesch, B., J. Haerting, U. Ranft, A. Klimpel, B. Oelschlagel and W. Schill (2000). "Occupational risk factors for renal cell carcinoma: agent-specific results from a case-control study in Germany. MURC Study Group. Multicenter urothelial and renal cancer study." Int J Epidemiol 29(6): 1014-24.
151. Petersen, C.P., M.E. Bordeleau, J. Pelletier and P.A. Sharp (2006). "Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells." Mol Cell 21(4): 533-42.
152. Petillo, D., E.J. Kort, J. Anema, K.A. Furge, X.J. Yang and B.T. Teh (2009). "MicroRNA profiling of human kidney cancer subtypes." Int J Oncol 35(1): 109-14.
153. Pfaffl, M.W., G.W. Horgan and L. Dempfle (2002). "Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR." Nucleic Acids Res 30(9): e36.
154. Pischon, T., P.H. Lahmann, H. Boeing, A. Tjonneland, J. Halkjaer, K. Overvad, K. Klipstein-Grobusch, J. Linseisen, N. Becker, A. Trichopoulou, V. Benetou, D. Trichopoulos, S. Sieri, D. Palli, R. Tumino, P. Vineis, S. Panico, E. Monninkhof, P.H. Peeters, H.B. Bueno-de-Mesquita, F.L. Buchner, B. Ljungberg, G. Hallmans, G. Berglund, C.A. Gonzalez, M. Dorronsoro, A.B. Gurrea, C. Navarro, C. Martinez, J.R. Quiros, A. Roddam, N. Allen, S. Bingham, K.T. Khaw, R. Kaaks, T. Norat, N. Slimani and E. Riboli (2006). "Body size and risk of renal cell carcinoma in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)." Int J Cancer 118(3): 728-38.
155. Rajewsky, N. (2006). "microRNA target predictions in animals." Nat Genet 38 Suppl: S8-13.
156. Raval, R.R., K.W. Lau, M.G. Tran, H.M. Sowter, S.J. Mandriota, J.L. Li, C.W. Pugh, P.H. Maxwell, A.L. Harris and P.J. Ratcliffe (2005). "Contrasting properties of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in von Hippel-Lindau-associated renal cell carcinoma." Mol Cell Biol 25(13): 5675-86.
157. Renshaw, A.A. (2002). "Subclassification of renal cell neoplasms: an update for the practising pathologist." Histopathology 41(4): 283-300.
158. Richard, S., R. Lidereau and S. Giraud (2004). "The growing family of hereditary renal cell carcinoma." Nephrol Dial Transplant 19(12): 2954-8.
159. Rini, B.I., E.R. Plimack, V. Stus, R. Gafanov, R. Hawkins, D. Nosov, F. Pouliot, B. Alekseev, D. Soulieres, B. Melichar, I. Vynnychenko, A. Kryzhanivska, I. Bondarenko, S.J. Azevedo, D. Borchiellini, C. Szczylik, M. Markus, R.S. McDermott, J. Bedke, S. Tartas, Y.H. Chang, S. Tamada, Q. Shou, R.F. Perini, M. Chen, M.B. Atkins and T. Powles (2019). "Pembrolizumab plus Axitinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma." N Engl J Med 380(12): 1116-1127.

160. Robert-Koch-Institut (2019). "Krebs in Deutschland für 2015/2016." Robert Koch-Institut (Hrsg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg.). Berlin 12. Ausgabe.
161. Rodriguez, A., S. Griffiths-Jones, J.L. Ashurst and A. Bradley (2004). "Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units." Genome Res 14(10A): 1902-10.
162. Saito, Y., G. Liang, G. Egger, J.M. Friedman, J.C. Chuang, G.A. Coetzee and P.A. Jones (2006). "Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells." Cancer Cell 9(6): 435-43.
163. Sampson, V.B., N.H. Rong, J. Han, Q. Yang, V. Aris, P. Soteropoulos, N.J. Petrelli, S.P. Dunn and L.J. Krueger (2007). "MicroRNA let-7a down-regulates MYC and reverts MYC-induced growth in Burkitt lymphoma cells." Cancer Res 67(20): 9762-70.
164. Sanjmyatav, J., K. Junker, S. Matthes, M. Muehr, D. Sava, M. Sternal, S. Wessendorf, M. Kreuz, M. Gajda, H. Wunderlich and C. Schwaenen (2011). "Identification of genomic alterations associated with metastasis and cancer specific survival in clear cell renal cell carcinoma." J Urol 186(5): 2078-83.
165. Sasaki, T., A. Shiohama, S. Minoshima and N. Shimizu (2003). "Identification of eight members of the Argonaute family in the human genome." Genomics 82(3): 323-30.
166. Sato, Y., T. Yoshizato, Y. Shiraishi, S. Maekawa, Y. Okuno, T. Kamura, T. Shimamura, A. Sato-Otsubo, G. Nagae, H. Suzuki, Y. Nagata, K. Yoshida, A. Kon, Y. Suzuki, K. Chiba, H. Tanaka, A. Niida, A. Fujimoto, T. Tsunoda, T. Morikawa, D. Maeda, H. Kume, S. Sugano, M. Fukayama, H. Aburatani, M. Sanada, S. Miyano, Y. Homma and S. Ogawa (2013). "Integrated molecular analysis of clear-cell renal cell carcinoma." Nat Genet 45(8): 860-7.
167. Schaefer, A., M. Jung, G. Kristiansen, M. Lein, M. Schrader, K. Miller, C. Stephan and K. Jung (2010). "MicroRNAs and cancer: current state and future perspectives in urologic oncology." Urol Oncol 28(1): 4-13.
168. Seizinger, B.R., G.A. Rouleau, L.J. Ozelius, A.H. Lane, G.E. Farmer, J.M. Lamiell, J. Haines, J.W. Yuen, D. Collins, D. Majoor-Krakauer and et al. (1988). "Von Hippel-Lindau disease maps to the region of chromosome 3 associated with renal cell carcinoma." Nature 332(6161): 268-9.
169. Shannon, B.A., R.J. Cohen, H. de Bruto and R.J. Davies (2008). "The value of preoperative needle core biopsy for diagnosing benign lesions among small, incidentally detected renal masses." J Urol 180(4): 1257-61; discussion 1261.
170. Shen, T., X.O. Shu, Y.B. Xiang, H.L. Li, H. Cai, Y.T. Gao, W. Zheng and L. Lipworth (2015). "Association of hypertension and obesity with renal cell carcinoma risk: a report from the Shanghai Men's and Women's Health Studies." Cancer Causes Control 26(8): 1173-80.
171. Shukla, K., A.K. Sharma, A. Ward, R. Will, T. Hielscher, A. Balwierz, C. Breunig, E. Munstermann, R. Konig, I. Keklikoglou and S. Wiemann (2015). "MicroRNA-30c-2-3p negatively regulates NF-kappaB signaling and cell cycle progression through downregulation of TRADD and CCNE1 in breast cancer." Mol Oncol 9(6): 1106-19.
172. Silva-Santos, R.M., P. Costa-Pinheiro, A. Luis, L. Antunes, F. Lobo, J. Oliveira, R. Henrique and C. Jeronimo (2013). "MicroRNA profile: a promising ancillary tool for accurate renal cell tumour diagnosis." Br J Cancer 109(10): 2646-53.
173. Sobin, L.H., M. Gospodariwicz and C. Wittekind (2009). "TNM classification of malignant tumors." UICC International Union Against Cancer. Wiley-Blackwell 7th edn.
174. Sprenkle, P.C., N. Power, T. Ghoneim, K.A. Touijer, G. Dalbagni, P. Russo and J.A. Coleman (2012). "Comparison of open and minimally invasive partial nephrectomy for renal tumors 4-7 centimeters." Eur Urol 61(3): 593-9.
175. Srigley, J.R., B. Delahunt, J.N. Eble, L. Egevad, J.I. Epstein, D. Grignon, O. Hes, H. Moch, R. Montironi, S.K. Tickoo, M. Zhou and P. Argani (2013). "The International Society of Urological Pathology (ISUP) Vancouver Classification of Renal Neoplasia." Am J Surg Pathol 37(10): 1469-89.
176. Stadler, W.M., D. Huo, C. George, X. Yang, C.W. Ryan, T. Karrison, T.M. Zimmerman and N.J. Vogelzang (2003). "Prognostic factors for survival with gemcitabine plus 5-fluorouracil based regimens for metastatic renal cancer." J Urol 170(4 Pt 1): 1141-5.

177. Sticht, C., C. De La Torre, A. Parveen and N. Gretz (2018). "miRWalk: An online resource for prediction of microRNA binding sites." PLoS One. 2018 Oct 18; 13(10).
178. Storkel, S. (1999). "[Epithelial tumors of the kidney. Pathological subtyping and cytogenetic correlation]." Urologe A 38(5): 425-32.
179. Sun, M., S.F. Shariat, C. Cheng, V. Ficarra, M. Murai, S. Oudard, A.J. Pantuck, R. Zigeuner and P.I. Karakiewicz (2011). "Prognostic factors and predictive models in renal cell carcinoma: a contemporary review." Eur Urol 60(4): 644-61.
180. Tarhini, A.A. and F. Iqbal (2010). "CTLA-4 blockade: therapeutic potential in cancer treatments." Onco Targets Ther 3: 15-25.
181. The Cancer Genome Atlas Research, N. (2013). "Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma." Nature 499(7456): 43-9.
182. Theis, R.P., S.M. Dolwick, D. Burr, T. Siddiqui and N.R. Asal (2008). "Smoking, environmental tobacco smoke, and risk of renal cell cancer: a population-based case-control study." BMC Cancer 8: 387.
183. Thoenes, W., S. Storkel and H.J. Rumpelt (1986). "Histopathology and classification of renal cell tumors (adenomas, oncocytomas and carcinomas). The basic cytological and histopathological elements and their use for diagnostics." Pathol Res Pract 181(2): 125-43.
184. Unwin, R.D., R.A. Craven, P. Harnden, S. Hanrahan, N. Totty, M. Knowles, I. Eardley, P.J. Selby and R.E. Banks (2003). "Proteomic changes in renal cancer and co-ordinate demonstration of both the glycolytic and mitochondrial aspects of the Warburg effect." Proteomics 3(8): 1620-32.
185. van den Berg, A., M.F. Hulsbeek, D. de Jong, K. Kok, P.M. Veldhuis, J. Roche and C.H. Buys (1996). "Major role for a 3p21 region and lack of involvement of the t(3;8) breakpoint region in the development of renal cell carcinoma suggested by loss of heterozygosity analysis." Genes Chromosomes Cancer 15(1): 64-72.
186. Van Troys, M., A. Lambrechts, V. David, H. Demol, M. Puype, J. Pizarro-Cerda, K. Gevaert, P. Cossart and J. Vandekerckhove (2008). "The actin propulsive machinery: the proteome of *Listeria monocytogenes* tails." Biochem Biophys Res Commun 375(2): 194-9.
187. Velickovic, M., B. Delahunt and S.K. Grebe (1999). "Loss of heterozygosity at 3p14.2 in clear cell renal cell carcinoma is an early event and is highly localized to the FHIT gene locus." Cancer Res 59(6): 1323-6.
188. Verine, J., A. Pluvinage, G. Bousquet, J. Lehmann-Che, C. de Bazelaire, N. Soufir and P. Mongiat-Artus (2010). "Hereditary renal cancer syndromes: an update of a systematic review." Eur Urol 58(5): 701-10.
189. White, N.M., H.W. Khella, J. Grigull, S. Adzovic, Y.M. Youssef, R.J. Honey, R. Stewart, K.T. Pace, G.A. Bjarnason, M.A. Jewett, A.J. Evans, M. Gabriel and G.M. Yousef (2011). "miRNA profiling in metastatic renal cell carcinoma reveals a tumour-suppressor effect for miR-215." Br J Cancer 105(11): 1741-9.
190. Williams, R.D., A.Y. Elliott, N. Stein and E.E. Fraley (1978). "In vitro cultivation of human renal cell cancer. II. Characterization of cell lines." In Vitro 14(9): 779-86.
191. Wittekind, B.J., C.C. Compton and L.H. Sobin (2012). "A Commentary on Uniform Use." UICC International Union Against Cancer. Wiley-Blackwell 4th edition: P. 106-106.
192. Wotschovsky, Z., J. Liep, H.A. Meyer, M. Jung, I. Wagner, A.C. Disch, K.D. Schaser, I. Melcher, E. Kilic, J. Busch, S. Weikert, K. Miller, A. Erbersdobler, H.J. Mollenkopf and K. Jung (2012). "Identification of metastamirs as metastasis-associated microRNAs in clear cell renal cell carcinomas." Int J Biol Sci 8(10): 1363-74.
193. Wotschovsky, Z., H.A. Meyer, M. Jung, A. Fendler, I. Wagner, C. Stephan, J. Busch, A. Erbersdobler, A.C. Disch, H.J. Mollenkopf and K. Jung (2011). "Reference genes for the relative quantification of microRNAs in renal cell carcinomas and their metastases." Anal Biochem 417(2): 233-41.
194. Wu, Q., Y. Jiang, S. Cui, Y. Wang and X. Wu (2016). "The role of cofilin-I in vulvar squamous cell carcinoma: A marker of carcinogenesis, progression and targeted therapy." Oncol Rep 35(5): 2743-54.

195. Wu, X., L. Weng, X. Li, C. Guo, S.K. Pal, J.M. Jin, Y. Li, R.A. Nelson, B. Mu, S.H. Onami, J.J. Wu, N.H. Ruel, S.P. Wilczynski, H. Gao, M. Covarrubias, R.A. Figlin, L.M. Weiss and H. Wu (2012). "Identification of a 4-microRNA signature for clear cell renal cell carcinoma metastasis and prognosis." *PLoS One* 7(5): e35661.
196. Yan, J.W., J.S. Lin and X.X. He (2014). "The emerging role of miR-375 in cancer." *Int J Cancer* 135(5): 1011-8.
197. Yang, X., W.W. Du, H. Li, F. Liu, A. Khorshidi, Z.J. Rutnam and B.B. Yang (2013). "Both mature miR-17-5p and passenger strand miR-17-3p target TIMP3 and induce prostate tumor growth and invasion." *Nucleic Acids Res* 41(21): 9688-704.
198. Yang, Z.L., X. Miao, L. Xiong, Q. Zou, Y. Yuan, J. Li, L. Liang, M. Chen and S. Chen (2013). "CFL1 and Arp3 are biomarkers for metastasis and poor prognosis of squamous cell/adenosquamous carcinomas and adenocarcinomas of gallbladder." *Cancer Invest* 31(2): 132-9.
199. Yekta, S., I.H. Shih and D.P. Bartel (2004). "MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA." *Science* 304(5670): 594-6.
200. Yi, Z., Y. Fu, S. Zhao, X. Zhang and C. Ma (2010). "Differential expression of miRNA patterns in renal cell carcinoma and nontumorous tissues." *J Cancer Res Clin Oncol* 136(6): 855-62.
201. Youssef, Y.M., N.M. White, J. Grigull, A. Krizova, C. Samy, S. Mejia-Guerrero, A. Evans and G.M. Yousef (2011). "Accurate molecular classification of kidney cancer subtypes using microRNA signature." *Eur Urol* 59(5): 721-30.
202. Zargar, H., T.D. Atwell, J.A. Cadeddu, J.J. de la Rosette, G. Janetschek, J.H. Kaouk, S.F. Matin, T.J. Polascik, K. Zargar-Shoshtari and R.H. Thompson (2016). "Cryoablation for Small Renal Masses: Selection Criteria, Complications, and Functional and Oncologic Results." *Eur Urol* 69(1): 116-28.
203. Zeng, Y., R. Yi and B.R. Cullen (2003). "MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(17): 9779-84.
204. Zhang, H., F.A. Kolb, L. Jaskiewicz, E. Westhof and W. Filipowicz (2004). "Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III." *Cell* 118(1): 57-68.
205. Zhang, X., N.D. Xing, C.J. Lai, R. Liu, W. Jiao, J. Wang, J. Song and Z.H. Xu (2018). "MicroRNA-375 Suppresses the Tumor Aggressive Phenotypes of Clear Cell Renal Cell Carcinomas through Regulating YWHAZ." *Chin Med J (Engl)* 131(16): 1944-1950.
206. Zhou, L., X.D. Liu, M. Sun, X. Zhang, P. German, S. Bai, Z. Ding, N. Tannir, C.G. Wood, S.F. Matin, J.A. Karam, P. Tamboli, K. Sircar, P. Rao, E.B. Rankin, D.A. Laird, A.G. Hoang, C.L. Walker, A.J. Giaccia and E. Jonasch (2016). "Targeting MET and AXL overcomes resistance to sunitinib therapy in renal cell carcinoma." *Oncogene* 35(21): 2687-97.
207. Zisman, A., A.J. Pantuck, J. Wieder, D.H. Chao, F. Dorey, J.W. Said, J.B. deKernion, R.A. Figlin and A.S. Belldegrun (2002). "Risk group assessment and clinical outcome algorithm to predict the natural history of patients with surgically resected renal cell carcinoma." *J Clin Oncol* 20(23): 4559-66.

9 Anhang

Abkürzungsverzeichnis

µl	-	Mikroliter
2D-DIGE	-	zweidimensionale differentielle Gelelektrophorese
ADF	-	Actin depolymerizing factor
ADP	-	Adenosindiphosphat
Ago-Protein	-	Argonautenprotein
ARP	-	actin related protein
ATP	-	Adenosintriphosphat
BCL2	-	B-Zell lymphoma 2
BCL9	-	B-Zell lymphoma 2
BPA1	-	Breast Cancer 1 associated protein 1
BSG	-	Blutsenkungsgeschwindigkeit
cDNA	-	Komplementäre DNA
CFL1	-	Cofilin-1
CFL2	-	Cofilin-2
CLL	-	chronisch lymphatische Leukämie
C _T	-	threshold cycle
CT	-	Computertomographie
DGCR8	-	DiGeorge Syndrome Critical region gene 8
DMEM	-	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	-	Desoxyribonukleinsäure
GFR	-	Glomeruläre Filtrationsrate
h	-	Stunde
HIF	-	Hypoxie Induzierter Faktor
ID	-	Identifikationsnummer
IFN-α	-	Interferon-α
IL-2	-	Interleukin-2
IMDC	-	International Metastatic Renal Cell Carcinoma Database Consortium
IPG	-	Immobilisierter pH-Gradient
ISUP	-	Internationalen Gesellschaft für Urologische Pathologie
KI	-	Konfidenzintervall
kVh	-	Kilovoltstunde
LC-MS/MS	-	Liquid-Chromatographie-Massenspektrometrie/ Massenspektrometrie

LDH	-	Laktatdehydrogenase
min	-	Minute
miRNA	-	MicroRNA
ml	-	Milliliter
mock	-	Mit normalem Medium versetzte Zellen
mRNA	-	Messenger RNA
MRT	-	Magnetresonanztomographie
MSKCC	-	Memorial Sloan-Kettering Cancer Centre
mTOR	-	Mammalian Target of Rapamycin
MYC	-	Myelocytomatose
n	-	Anzahl der Proben
NF- κ B	-	Nuclear Factor kappa B
ng	-	Nanogramm
nM	-	Nanomolar
NTC	-	Non-Template Control
NZK	-	Nierenzellkarzinom
OP	-	Operation
p	-	Signifikanzwert
PACT	-	Proteinkinase R-activating protein
PBS	-	Phosphatgepufferte Salzlösung
PBRM1	-	Polybromo-1
PCR	-	Polymerase Chain Reaction
PDGFR	-	Platelet Derived Growth Factor Receptor
pH-Wert	-	potentia hydrogenii-Wert
Pre-miRNA	-	Precursor miRNA
Pri-miRNA	-	Primary miRNA
qPCR	-	Quantitative Realtime Polymerase Chain Reaction
RISC	-	RNA-Induced Silencing Complex
RNA	-	Ribonukleinsäure
rpm	-	revolutions per minute
RPMI	-	Roswell Park Memorial Institute Medium
RT	-	Reverse Transkriptase
s	-	Sekunde
s. a.	-	siehe auch
sog.	-	sogenannt
S.E.	-	Standardfehler
SETD2	-	SET domain containing protein 2
t	-	Zeit

TBS	-	Tris buffered saline
TNM	-	Tumor-Node-Metastasis
TRBP	-	human immunodeficiency virus transactivating response RNA-binding protein
Tris	-	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UISS	-	University of California Integrated Staging System
VEGFR	-	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
VHL	-	Von Hippel-Lindau
WHO	-	World Health Organization
ZNS	-	Zentralnervensystem

Geräte und Programme

Gerät oder Programm	Hersteller
6-Well-Platten	Sigma Aldrich; St. Louis; USA
Abzug Model Captair	Thermo Scientific; Wilmington; USA
Delta2D	Decodon GmbH; Greifswald; Germany
Ettan IPGphor 3	GE Healthcare; Chalfont St Giles; GB
IBM SPSS Statistics – Software for	IBM; New York; USA Predictive Analysis
Inkubator Heraeus®	Thermo Scientific; Wilmington; USA
Luna™ Automatic Cell Counter	Logos Biosystems; Annandale; USA
Microtom RM 2125RT	Leica Biosystems; Wetzlar; Deutschland
MiRWalk	Medical Research Center; Medical Faculty Mannheim; University of Heidelberg
Mikroskop Axiovert S 100	Zeiss; Oberkochen; Deutschland
Reaktionsgefäße	Eppendorf; Hamburg; Deutschland
REST (Relative Expression Software Tool) 2008	M.W. Pfaffl; München; Deutschland
SERVA IPG BlueStrip	Serva; Heidelberg; Germany
Sicherheitswerkbank Heraeus®	Thermo Scientific; Wilmington; USA
StepOnePlus™ Real Time PCR System	Ambion Applied Biosystem; Austin; USA
Thermocycler UNO II	Biometra; Göttingen; Deutschland
Typhoon Trio	GE Healthcare; Chalfont St Giles; GB
Vortexer UNIMAG ZX3	Uni Equip; Planegg; Deutschland
T25 Zellkulturflaschen	Thermo Scientific; Wilmington; USA
Zentrifuge Jouan B4i	Thermo Scientific; Wilmington; USA
Zentrifuge MiniSpin® Plus	Eppendorf; Hamburg; Deutschland

Chemikalien und Kitsysteme

Bezeichnung	Hersteller
2D HPE™ Large Gel NF 12.5 % Kit	Serva; Heidelberg; Germany
2-D Quant Kit	GE Healthcare; Chalfont St Giles; GB
Amersham CyDye DIGE Fluors	GE Healthcare; Chalfont St Giles; GB (minimal dyes) for Ettan DIGEs
Ampholyte - SERVALYT™ Carrier	Serva; Heidelberg; Germany Ampholytes
DharmaFECT 2 Transfection Reagent	GE Healthcare; Chalfont St Giles; GB
Dulbecco's Modified Eagle Medium	Sigma Aldrich; St. Louis; USA
Fetales Kälberserum (FKS)	Sigma Aldrich; St. Louis; USA
miRNeasy Mini Kit	Qiagen; Hilden; Germany
miScript miRNA Mimic	Qiagen; Hilden; Germany
Opti-MEM Medium	Sigma Aldrich; St. Louis; USA
Phosphatgepufferte Salzlösung	Sigma Aldrich; St.Louis; USA
Roswell Parc Memorial Institute Medium	Sigma Aldrich; St. Louis; USA
SERVALYT™ Carrier Ampholytes	Serva; Heidelberg; Germany
TaqMan® Gene Expression Master Mix	Ambion Applied Biosystems; Austin; USA
TaqMan® MicroRNA Reverse Transkriptions Kit	Ambion Applied Biosystems; Austin; USA
TaqMan® MicroRNA Assay Primer	Ambion Applied Biosystems; Austin; USA
1x 0,25 % Trypsin, 0,02 % EDTA	Sigma Aldrich; St. Louis; USA

Klinische Details der untersuchten FFPE-Proben

Tabelle 14 - Zusammenfassung der analysierten Tumorproben für miR-30c-2-3p
miR=microRNA, nmNZK=nicht-metastasierter Primärtumor eines Nierenzellkarzinoms,
mNZK=metastasierter Primärtumor eines Nierenzellkarzinoms, T=Tumor

miR-30c-2-3p		nmNZK	mNZK
Anzahl der Patienten		15	10
Alter	Mittelwert	60	60
	Median	59	60
	Spanne	43-77	49-75
Geschlecht	Frauen/Männer	6/9	3/7
T-Kategorie	1a	8	2
	1b	6	2
	2a	-	1
	2b	1	2
	3a	-	1
	3b	-	2
Metastasen zum OP-Zeitpunkt		-	3
Grading	1	9	0
	2	6	6
	3	-	4
	4	-	-
Nachsorgezeitraum in Monaten	Mittelwert	77	13
	Median	77	10
	Spanne	48-110	0-38
Lokalisation der Metastase	Lunge	Gehirn	Knochen
Anzahl	8	6	6

Tabelle 15 - Zusammenfassung der analysierten Tumorproben für miR-29c-5p
miR=microRNA, nmNZK=nicht-metastasierter Primärtumor eines Nierenzellkarzinoms,
mNZK=metastasierter Primärtumor eines Nierenzellkarzinoms, T=Tumor

miR-29-c-5p		nmNZK	mNZK
Anzahl der Patienten		15	10
Alter	Mittelwert	60	60
	Median	59	60
	Spanne	43-77	49-75
Geschlecht	Frauen/Männer	6/9	3/7
T-Kategorie	1a	8	2
	1b	6	2
	2a	-	1
	2b	1	2
	3a	-	1
	3b	-	2
Metastasen zum OP-Zeitpunkt		-	3
Grading	1	9	0
	2	6	6
	3	-	4
	4	-	-
Nachsorgezeitraum in Monaten	Mittelwert	77	13
	Median	77	10
	Spanne	48-110	0-38
Lokalisation der Metastase	Lunge	Gehirn	Knochen
Anzahl	8	7	6

Tabelle 16 - Zusammenfassung der analysierten Tumorproben für miR-375-3p
 miR=microRNA, nmNZK=nicht-metastasierter Primärtumor eines Nierenzellkarzinoms,
 mNZK=metastasierter Primärtumor eines Nierenzellkarzinoms, T=Tumor

miR-375-3p		nmNZK	mNZK
Anzahl der Patienten		13	8
Alter	Mittelwert	61	61
	Median	63	60
	Spanne	43-77	49-75
Geschlecht	Frauen/Männer	5/8	3/5
T-Kategorie	1a	8	2
	1b	4	2
	2a	-	1
	2b	1	1
	3a	-	1
	3b	-	1
Metastasen zum OP-Zeitpunkt		-	2
Grading	1	7	0
	2	6	5
	3	-	3
	4	-	-
Nachsorgezeitraum in Monaten	Mittelwert	77	14
	Median	77	10
	Spanne	48-110	5-38
Lokalisation der Metastase	Lunge	Gehirn	Knochen
Anzahl	8	7	6

10 Danksagungen

Als erstes möchte ich mich bedanken bei Frau Prof. Dr. med. Kerstin Junker, der Leiterin des Forschungslabor der Klinik für Urologie und Kinderurologie am Universitätsklinikum des Saarlandes, für die Möglichkeit, diese spannende wissenschaftliche Arbeit durchführen zu können.

Des Weiteren möchte ich mich bedanken bei Frau Dr. rer. nat. Joana Heinzemann und Herrn Dr. rer. nat. Sebastian Hölter für die überaus geduldige Unterstützung bei aufkommenden Fragen. Das ist alles andere als selbstverständlich gewesen. Mein Dank gilt außerdem dem gesamten Team des Forschungslabors. Insbesondere hervorheben möchte ich dabei Herrn Alexander Vogt.

Ein Dank gebührt dem Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und der Toxikologie der Universität des Saarlandes für die zur Verfügung gestellten Geräte.

Ich möchte meinen Respekt an alle in der Grundlagenforschung tätigen Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftlern aussprechen. Diese Arbeit erfordert eine enorme Geduld und Frustrationstoleranz. Das Ziel dabei nicht aus den Augen zu verlieren, finde ich bewundernswert.

Mein Dank gilt meinen Eltern und meiner Schwester für die Unterstützung und den Rückhalt, den sie mir zu jeder Zeit zukommen lassen. Danke, dass ich Dich, Laura, an meiner Seite wissen darf. Und Danke an alle meine Freunde. Danke, dass es euch gibt.

Um den Leser vor größerem Kitsch zu bewahren, möchte ich die Danksagung nun gerne beenden.

11 Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.