

Universität des Saarlandes  
Medizinische Fakultät

# Dissertation

Validierung spezifischer micro-RNAs zur Differenzierung muskelinvasiver von nicht-  
muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen

Pascal Merlin Meschkat  
23.11.2022

# **Dissertation**

Pascal Merlin Meschkat

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

**Validierung spezifischer micro-RNAs zur  
Differenzierung muskelinvasiver von nicht-  
muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen**

## Inhalt

<b>Validierung spezifischer micro-RNAs zur Differenzierung muskelinvasiver von nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen .....</b>	<b>1</b>
<b>1 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis, Abkürzungen .....</b>	<b>4</b>
1.1    Abbildungsverzeichnis .....	4
1.2    Tabellenverzeichnis .....	4
1.3    Abkürzungen .....	5
<b>2 Zusammenfassung .....</b>	<b>6</b>
<b>3 Abstract .....</b>	<b>7</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>8</b>
1.1    Harnblasenkarzinom.....	8
1.1.1    Epidemiologie, Ätiologie, Prognose .....	8
1.1.2    Risikofaktoren.....	8
1.1.3    Diagnose.....	9
1.1.4    Therapie des NMIHB .....	10
1.1.5    Therapie des lokalbegrenzten MIHB.....	12
1.1.6    Therapie des metastasierten MIHB .....	13
1.2    Histologische Klassifikation .....	13
1.2.1    WHO-Klassifikation: Tumore des Urothels.....	13
1.2.2    pTNM-Klassifikation der Harnblasenkarzinome [31] .....	14
1.3    MicroRNA (miRNA) .....	15
1.3.1    Biogenese und Funktion.....	15
1.3.2    Micro RNA und ihre Rolle in der Tumorgenese .....	17
1.3.3    Molekulare Pathogenese der Harnblasenkarzinome.....	18
1.3.4    Auswahl der miRNA .....	20
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>22</b>
2.1    Arbeitsplatz .....	22
2.2    Patientenkohorte .....	22
2.3    Patientencharakteristika.....	22
2.4    Verwendete Materialien.....	23

2.4.1	Materialien .....	23
2.4.2	Kits .....	23
2.4.3	MiRNA Primer .....	24
2.4.4	Schritte der reversen Transkription (Programm 43).....	24
2.4.5	Geräte .....	24
2.4.6	Software .....	24
2.5	Gesamt-RNA Isolation mit dem miRNeasy FFPE Kit von Qiagen.....	25
2.6	Quantitative Echtzeit-PCR.....	26
2.7	Auswertung, Statistik.....	28
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>29</b>
3.1	Technische Validierung.....	29
3.2	Erweiterte Validierung.....	36
3.2.1	Erweiterte Validierung der miRNA 138-5p.....	37
3.2.2	Erweiterte Validierung der miRNA 146b-5p.....	41
3.2.3	Erweiterte Validierung der miRNA 144-5p.....	45
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>50</b>
	<b>References .....</b>	<b>57</b>
<b>5</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>60</b>
<b>6</b>	<b>Publikationen .....</b>	<b>64</b>
<b>7</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>64</b>
<b>8</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>65</b>
<b>9</b>	<b>Kolloquiumsvermerk .....</b>	<b>66</b>

# 1 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis, Abkürzungen

## 1.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Altersspezifische Erkrankungsraten nach Geschlecht, ICD-10 C67, Deutschland 2015-2016 je 100,000 [30] .....	8
Abbildung 2: Micro-RNA Biogenese [42].....	17
Abbildung 3: Molekulare Entstehung von muskelinvasiven und nicht-muskelinvasiven Urothelkarzinomen [27] .....	20
Abbildung 4: Expression von miRNA-155-5p: NMIBH vs. MIHB .....	30
Abbildung 5: Expression von miRNA-650 im NMIBH und MIHB.....	31
Abbildung 6: Expression von miRNA-29c-5p im NMIBH und MIHB .....	32
Abbildung 7: Expression von miRNA-146b-5p im NMIBH und MIHB .....	33
Abbildung 8: Expression von miRNA-138-5p im NMIBH und MIHB .....	34
Abbildung 9: Expression von miRNA-144-5p im NMIBH und MIHB .....	35
Abbildung 10: Expression von miRNA-127-3p im NMIBH und MIHB .....	36
Abbildung 11: Erweiterte Validierung der miRNA-138-5p: NMIBH vs. MIHB .....	39
Abbildung 12: Erweiterte Validierung der miRNA138-5p: pT-Kategorie .....	40
Abbildung 13: Erweiterte Validierung der miRNA 138-5p: Grading .....	41
Abbildung 14: Erweiterte Validierung der miRNA 146b-5p: NMIHB vs. MIHB.....	42
Abbildung 15: Erweiterte Validierung der miRNA 146b-5p: pT-Kategorie .....	44
Abbildung 16: Erweiterte Validierung der miRNA 146b-5p: Grading .....	45
Abbildung 17: Erweiterte Validierung der miRNA 144-5p: NMIHB vs. MIHB.....	47
Abbildung 18: Erweiterte Validierung der miRNA 144-5p: pT-Kategorie .....	48
Abbildung 19: Erweiterte Validierung der miRNA 144-5p: Grading .....	49

## 1.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klinisch-pathologische Parameter der Patientenkohorte .....	22
Tabelle 2: Materialien .....	23
Tabelle 3: Kits .....	23
Tabelle 4: Primer.....	24
Tabelle 5: Programm 43 .....	24
Tabelle 6: Geräte .....	24
Tabelle 7: Software .....	24
Tabelle 8 Reagenzien .....	26
Tabelle 9: Ablauf der PCR.....	28
Tabelle 10: Geschlechterverteilung und Häufigkeit NMIHB und MIHB der Validierung .....	29
Tabelle 11: Ergebnisse der technischen Validierung .....	29

Tabelle 12: Verteilung der MIHB, NMIHB, T-Kategorien und des Gradings in der erweiterten Validierung von miRNA 138-5p und 146b-5p .....37

Tabelle 13: Verteilung MIHB, NMIHB, T-Kategorien und des Gradings in der Kohorte der erweiterten Validierung von miRNA 144-5p .....46

Tabelle 14: Schwellenwerte (cycle threshold /CT-Werte) der miRNA-Proben in der qRT-PCR.....60

### 1.3 Abkürzungen

NMIHB	Nicht-muskelinvasives Harnblasenkarzinom
MIHB	Muskelinvasives Harnblasenkarzinom
TUR-B	Transurethrale Resektion der Blase
miRNA	MicroRNA
WHO	World Health Organization
EORTC	European Organisation for Research and Treatment of Cancer
qRT-PCR	Quantitative Real Time Polymerasekettenreaktion

## 2 Zusammenfassung

Das Harnblasenkarzinom ist eine der häufigsten urologischen Tumorentitäten weltweit. Im muskelinvasiven Stadium der Erkrankung ist die Prognose trotz radikaler Therapie häufig schlecht, da die Karzinome meist erst spät diagnostiziert werden. Das chirurgische Vorgehen ist maßgeblich vom initialen Tumorstadium abhängig. Beim nicht-invasiven Harnblasenkarzinom ist eine transurethrale Resektion mit ggf. anschließender Instillationstherapie ausreichend, während bei muskelinvasiven Karzinomen oder schlecht differenzierten Tumoren eine Zystektomie mit Harnableitung als kurativer Ansatz notwendig ist.

Basierend auf Microarrayanalysen unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass sich die miRNA-Expression grundsätzlich in muskelinvasive Harnblasenkarzinome (MIHB) und nicht-muskelinvasive Harnblasenkarzinome (NMIHB) unterscheidet. Ob sich jedoch mit der Analyse von miRNAs die T-Kategorie und das Grading unterscheiden lassen wurde noch nicht untersucht. Um diese Frage zu beantworten, wurden zunächst sieben miRNAs an formalinfixierten Harnblasenkarzinomproben technisch validiert. Anschließend wurden die drei miRNAs 144-5p, 138-5p und 146b-5p an einem größeren Probenkollektiv untersucht, mit der Frage, ob eine Korrelation zwischen der miRNA Expression und T-Kategorie sowie Grading besteht.

Es konnte nachgewiesen werden, dass die Expression der tumorsuppressiven miRNA 138-5p sich invers zur T-Kategorie und Grading verhält. Anhand der miRNA 144-5p konnte ein muskelinvasives von einem nicht-muskelinvasiven Karzinom differenziert werden, unterscheidet sich jedoch nicht signifikant in den T-Kategorien und dem Grading. Vielversprechende Ergebnisse konnten bei der miRNA 146b-5p erhoben werden. Die miRNA Expression der miRNA 146b-5p stieg hochsignifikant mit höherem T-Stadium und Grading. Vergleicht man die miRNA Expression in der miRNA 146b-5p von pT1 Tumoren mit der von pT3-4 Tumoren war diese bis zu zehnfach erhöht exprimiert.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass anhand der miRNA-Expression die muskelinvasiven von den nicht-muskelinvasiven Tumoren unterschieden

werden können. Zudem ist es möglich mit den beiden miRNAs 138-5p und 146b-5p, zwischen den T-Kategorien und dem Grading zu differenzieren.

### **3 Abstract**

Urinary bladder carcinoma is one of the most common urologic tumor entities worldwide. In the muscle-invasive stage of the disease, the prognosis is often poor, despite radical therapy because the carcinomas are usually diagnosed in a late stadium. The surgical approach is largely dependent on the initial tumor stage. In non-invasive bladder carcinoma, transurethral resection with subsequent instillation therapy, if necessary, is sufficient, whereas in muscle-invasive carcinomas or poorly differentiated tumors, cystectomy with urinary diversion is necessary as a curative approach.

Based on microarray analysis by our group, miRNA expression was shown to be fundamentally different in MIBC and NMIBC. Whether the analysis of miRNAs can determine T category and grading has not yet been investigated. To answer this question, seven miRNAs were first technically validated on formalin-fixed urinary bladder carcinoma specimens. Subsequently, the three miRNAs 144-5p, 138-5p, and 146b-5p were examined on a larger sample pool, with the question of whether there was a correlation between miRNA expression and T category and grading.

It was demonstrated that the expression of the tumor suppressive miRNA 138-5p behaves inversely to T category and grading. Based on miRNA 144-5p, muscle-invasive carcinoma could be distinguished from non-muscle-invasive carcinoma. However, miRNA 144-5p did not significantly differ in T categories and grading. Promising results were obtained for miRNA 146b-5p. The miRNA expression of miRNA 146b-5p increased significantly with higher T stage and grading. Comparing miRNA expression in miRNA 146b-5p of pT1 tumors with that of pT3-4 tumors, it was increased up to tenfold.

In conclusion, it was shown that miRNA expression can be used to distinguish muscle-invasive tumors from non-muscle-invasive tumors. In addition, with the two miRNAs 138-5p and 146b-5p, it is possible to differentiate between T categories and grading.



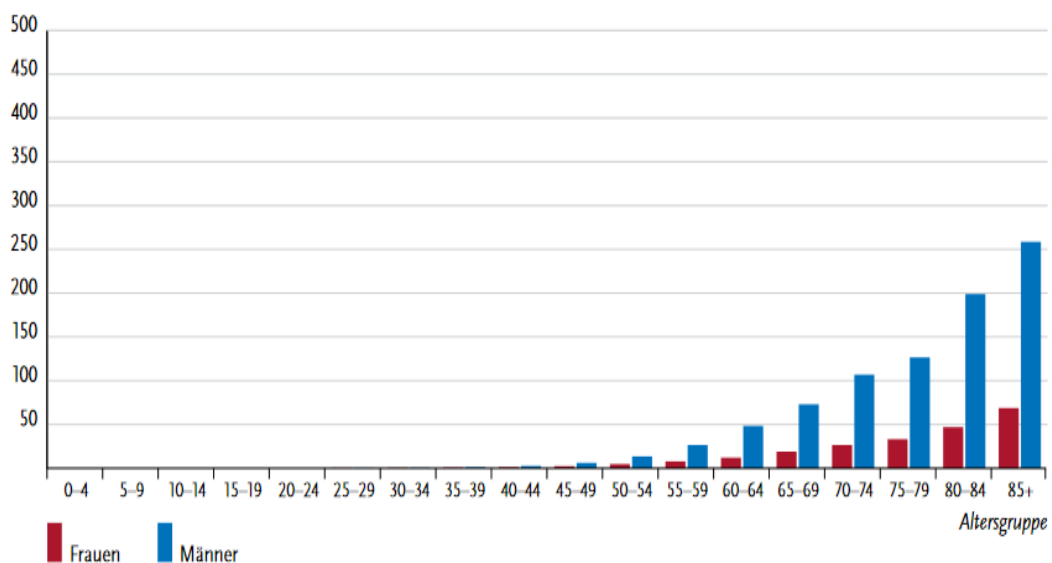
# 1 Einleitung

## 1.1 Harnblasenkarzinom

### 1.1.1 Epidemiologie, Ätiologie, Prognose

Das Harnblasenkarzinom ist einer der häufigsten bösartigen Tumore. Bei Männern ist es das siebt und bei Frauen die siebzehnt häufigste Tumorentität [4]. In Deutschland liegt die altersstandardisierte Inzidenz für beide Geschlechter bei 13,4 (pro 100,000 Personen/Jahr) und die altersstandardisierte Mortalität bei 2,0 (pro 100,000 Personen/Jahr). Die Inzidenz für Männer ist mit 22,7 (pro 100,000 Personen/Jahr) erheblich höher als für Frauen mit 5,5 (pro 100,000 Personen/Jahr). Dieser geschlechterspezifischer Unterschied lässt sich ebenfalls bei der Mortalität erkennen, mit 3,1 (pro 100,000 Personen/Jahr) bei Männern zu 1,2 (pro 100,000 Personen/Jahr) bei Frauen [10].

Abbildung 1: Altersspezifische Erkrankungsraten nach Geschlecht, ICD-10 C67, Deutschland 2015-2016 je 100,000 [30]



### 1.1.2 Risikofaktoren

Hauptrisikofaktor des Harnblasenkarzinoms ist das Rauchen von Tabak. Zigarettenraucher haben im Vergleich zu Nichtrauchern ein dreifach erhöhtes Risiko zu erkranken. Bei 50% der Blasenkarzinompatienten ist die Raucheranamnese positiv [11]. Daneben sind aber auch Beschäftigte in der

Farbstoffindustrie, in der chemischen und petrochemischen Industrie und in teerverarbeitenden Betrieben stark gefährdet. Die dort verwendeten Chemikalien, wie z.B. aromatische Amine, begünstigen das Entstehen eines Karzinoms. Bei ca. 10% der Patienten, welche an einem Blasenkarzinom erkranken, ist oder war eine berufliche Exposition gegeben [4,6,24]. Weitere Faktoren sind ionisierende Strahlung, parasitäre Erkrankungen der Harnblase wie z.B. Bilharziose und chronische Zystitiden. Eine kanzerogene Wirkung einiger Medikamente wie z.B. Cyclophosphamid wird vermutet, sowie gilt das Antidiabetikum Pioglitazin als wahrscheinlich kanzerogen in Bezug auf das Blasenkarzinom [4].

### 1.1.3 Diagnose

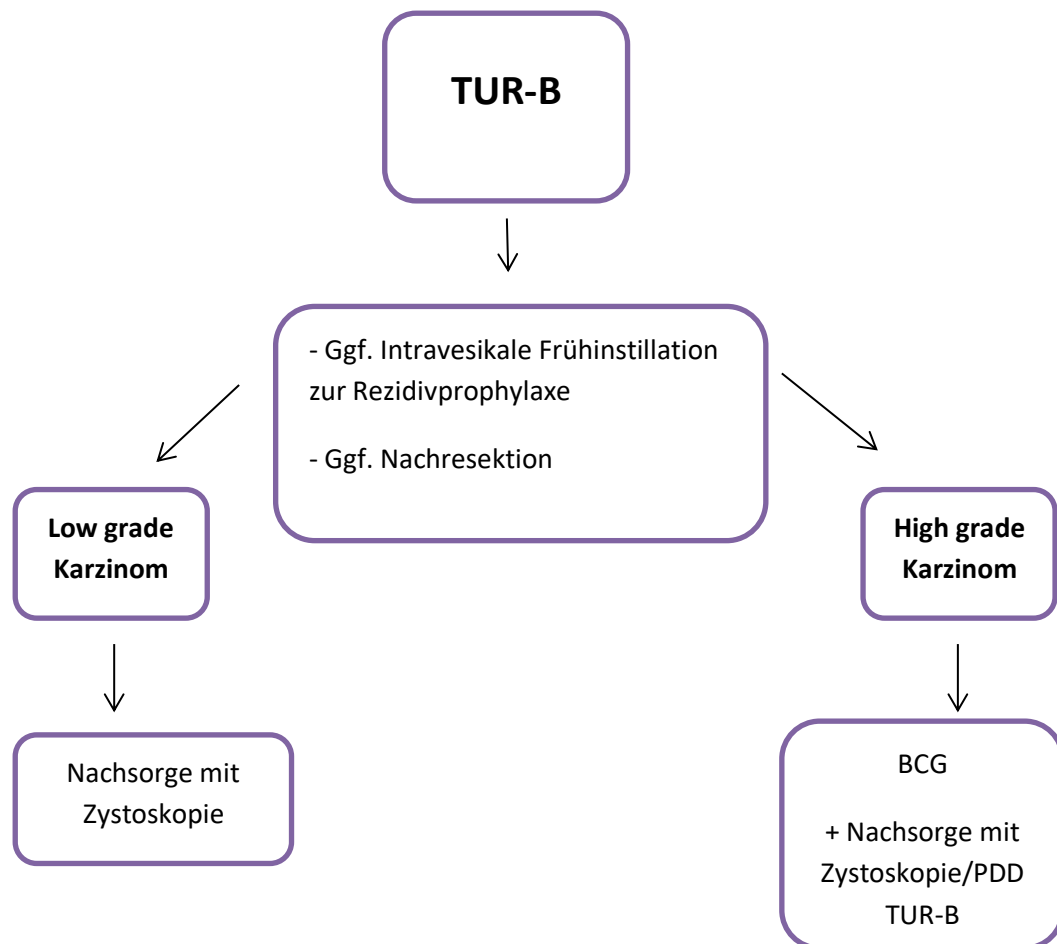
Die frühzeitige Diagnose ist wegen der unspezifischen Symptomatik relativ schwierig. Einen Tumormarker wie bei anderen urologischen Tumorentitäten z.B. das PSA bei dem Prostatakarzinom gibt es beim Harnblasenkarzinom nicht. Die nichtinvasive Diagnostik beschränkt sich im Wesentlichen auf Urinstreifentests und Urinzytologien. Eine schmerzlose Makrohämaturie oder eine Mikrohämaturie im Urinstreifentest treten neben Dysurie und Polyurie als Leitsymptom auf. In fortgeschrittenen Stadien kommt es zur klassischen B-Symptomatik bei Krebserkrankungen, sowie Schmerzen im Beckenbereich und obstruktiven Beschwerden. Bei Verdacht auf ein Harnblasenkarzinom ist neben der körperlichen Untersuchung und einer Ultraschallbildgebung die Urethrozystoskopie Goldstandard [26]. Bei zystoskopischem Tumorverdacht erfolgt die transurethrale Tumorsektion mit anschließender histopathologischer Aufarbeitung. Eine Urinzytologie sollte zur Mikrohämaturieabklärung durchgeführt werden, da eine negative Zytologie ein high grade Urothelkarzinom mit hoher Wahrscheinlichkeit ausschließt. Zudem wird die Zytologie zur Nachsorge eingesetzt. Urinmarker wie z.B. Nuklear Matrix Protein-22 (NMP-22)-Test oder ein Blasen-Tumor-Antigen-Test (BTA) alleine werden zur Diagnose nicht, werden aber in der Nachsorge regelhaft eingesetzt [14,33,41]. Des Weiteren sollte bei einem Stadium ab pT2 oder höher und CIS eine Computertomographie (CT) oder eine Magnetresonanztomographie (MRT) zum Staging der lokalen Ausdehnung bzw. der Metastasierung durchgeführt werden. Hierbei sollte das Abdomen und der Thorax dargestellt werden, da eine Metastasierung in Leber und Lunge typisch ist. [15]

Das Grading und Staging ist therapieentscheidend, da die weitere Behandlung und Prognose von der Invasivität des Tumors und der Ausdehnung abhängt. Es werden zwei Hauptgruppen unterschieden. Zum einen die nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinome (NMIHB), welche die Muskelschicht nicht infiltrieren. Zum anderen die muskelinvasiven Harnblasenkarzinome (MIHB). Zu Letzteren zählen die Stadien ab pT2 und höher. Sobald die Muskulatur infiltriert ist, verschlechtert sich das mediane Überleben von 85 auf 29 Monate[17]. Bei Diagnosestellung sind annähernd 75% der Harnblasenkarzinome in einem nicht-muskelinvasiven Stadium pTa, pT1 oder ein carcinoma in situ (CIS) [4].

#### **1.1.4 Therapie des NMIHB**

Die Therapie des NMIHB besteht in der transurethralen Resektion des Blasentumors (TUR-B). Bei Patienten mit einem *European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) Score* unter 5 sollte innerhalb von zwei Stunden postoperativ einmalig eine Instillation von Chemotherapeutika zur Rezidivprophylaxe erfolgen. Hierbei kommen Chemotherapeutika wie Mitomycin C (MMC), Epirubicin, Gemcitabin zum Einsatz. Die Chemotherapie sollte ca. zwei Stunden in der Blase verbleiben [13,38,39]. Neben Chemotherapeutika kommt der Bacillus Calmette-Guérin (BCG), ein abgeschwächter Bakterienstamm des Mykobakteriums bovis, als Instillationstherapie zum Einsatz. Eine BCG Instillation sollte bei high grade Karzinomen als therapeutische intravesikale Immuntherapie frühesten zwei Wochen nach der TUR-B erfolgen. Die Therapie umfasst einen Induktionszyklus und eine anschließende Erhaltungstherapie. Das Bakterium führt zu einer antikanzerogenen Immunantwort. In Metaanalysen konnte gezeigt werden, dass BCG einen Vorteil gegenüber dem MMC bezüglich einer geringeren Karzinomrezidivrate bei Hochrisiko-Tumoren zeigt. Allerdings ist die Verträglichkeit von BCG schlechter. [22,37,38]. Eine Kombination der beiden Präparate konnte in einer randomisierten Kontrollstudie noch bessere Ergebnisse erzielen [7]. Grundsätzlich wird eine Nachresektion bei allen NMIHBs, außer bei kleinen pTa low grade Tumoren, nach 2-6 Wochen empfohlen. Diese kann mit photodynamischer Diagnostik (PDD) erfolgen. Dabei wird ein Fluoreszenzfarbstoff (Hexaminolevulinat) präoperativ in die Blase instilliert. Dieser reichert sich in malignen Zellen an. Es wird eine Fluoreszenzzystoskopie durchgeführt und kann insbesondere CIS Tumore leichter erkennbar machen.

Bei Hochrisiko NMIHB kann eine radikale Zystektomie (RC) empfohlen werden, da mit einer Progression zum MIHB zu rechnen ist. Zu diesen gehören multifokale oder im Durchmesser > 3cm messende pT1 high grade/G3 Tumore, pT1 Tumore mit begleitendem CIS, BCG-Versager in der Dreimonatskontrolle nach der Induktionsphase oder ein Rezidiv nach abgeschlossener BCG-Therapie. [31] Essentiell ist die regelmäßige Nachsorge. Dies umfasst regelmäßige Zystoskopien zunächst drei Monate postoperativ, sowie nach einem BCG-Induktionszyklus von 6 Wochen. Zusätzlich werden Urinzytologien zur Nachsorge von high grade Tumoren angewandt.



### **1.1.5 Therapie des lokalbegrenzten MIHB**

Die Standardtherapie des MIHB ist die offene radikale Zystektomie mit bilateraler Lymphadenektomie und Harnableitung, sofern klinisch kein Verdacht auf hämatogene oder lymphogene Metastasierung vorliegt. Beim Mann sollten die angrenzenden Organe wie Prostata und Samenblasen, bei der Frau der Uterus, die Adnexe und gegebenenfalls die vordere Vaginalwand mit reseziert werden. [31]. Bei Infiltration des Blasenhalses besteht zudem die Indikation zur Urethrektomie. Zur Erhaltung der Kontinenz und Sexualität kann eine nervenschonende Operationsmethode angeboten werden.

In besonderen Situationen kann eine partielle Zystektomie durchgeführt werden. Zu diesen zählt das Vorliegen eines Urachuskarzinoms, welches en bloc reseziert werden sollte. Eine anschließende lebenslange Nachsorge ist essentiell. [31]. Alternativ zur radikalen Zystektomie kann bei lokal begrenztem MIHB ein multimodaler Ansatz diskutiert werden. Dieser beinhaltet die TUR-B in Kombination mit einer Radiochemotherapie. Ist das Karzinom mit diesem Ansatz nicht kontrollierbar, kann eine salvage-Zystektomie angeboten werden. [31]. Bei Hochrisiko-Patienten sollte eine neoadjuvante bzw. adjuvante Chemotherapie interdisziplinär diskutiert und angeboten werden. Insbesondere Patienten mit lokalfortgeschrittenem pT3b Harnblasenkarzinom profitieren von dieser Therapie [23]. Die neoadjuvante Therapie beinhaltet in der Regel 3-4 Zyklen einer cisplatinhaltigen Kombinationstherapie. Hierbei sollen im Intervall von zwei Zyklen Restagings erfolgen um einen Progress unter Chemotherapie auszuschließen. Die adjuvante Systemtherapie soll ebenfalls cisplatinbasiert sein und 3-4 Zyklen umfassen. Eine festgelegte Kombination der Chemotherapeutika gibt es dabei nicht. [31]

### 1.1.6 Therapie des metastasierten MIHB

Bei Patienten mit Metastasen eines Urothelkarzinoms stellt eine cisplatinhaltige Chemotherapie, unter Berücksichtigung des Allgemeinzustandes des Patienten, die Therapie der Wahl dar. [31] Hierbei stehen mehrere Konzepte zur Verfügung, wobei eine Kombination von Gemcitabin und Cisplatin bei guter Wirksamkeit die beste Verträglichkeit aufweist. [21]

Neben der seit ca. 40 Jahren angewandten Kombinationschemotherapie wird in aktuellen Studien die Wirksamkeit von Immuncheckpoint-Inhibitoren untersucht. Insbesondere PD1 und PD-L1 Inhibitoren werden eingesetzt. Diese zeigen vielversprechende Ergebnisse. In die aktuellen Leitlinien wurden diese noch nicht aufgenommen. [35]

## 1.2 Histologische Klassifikation

Die Blasen Tumore stellen eine heterogene Gruppe dar. Der Großteil ist urothelialen Ursprungs. Die WHO unterscheidet diese in infiltrierende und nicht-invasive Urothelkarzinome. Diesen beiden übergeordneten Gruppen werden zahlreiche Subtypen anhand Ihrer Histologie zugeordnet. Die einzelnen Typen sind in Tabelle 1.2.1 aufgeführt. [16][18]

### 1.2.1 WHO-Klassifikation: Tumore des Urothels

Invasives Urothelkarzinom	Nicht-invasive urotheliale Läsion
Nested, einschließlich großzellig nested Mikrozystisch	Urotheliales Carcinoma in situ
Mikropapillär	Nicht-invasives papilläres Urothelkarzinom, niedriggradig (low grade)
Lymphepitheliom-artig	Nicht-invasives papilläres Urothelkarzinom, hochgradig (high grade)
Plasmazytoid, Siegelringzellig, diffus Sakromatoid	Papilläre urotheliale Neoplasie mit geringem malignem Potential

Gering differenziert Lipid-reich Klarzellig	Urotheliales Papillom
	Invertiertes urotheliales Papillom Urotheliale Proliferation mit unklarem malignem Potential

WHO Klassifikation 2016 [16]

### 1.2.2 pTNM-Klassifikation der Harnblasenkarzinome [31]

<b>pT</b>	<b>Tumorausdehnung</b>
pTX	Primärtumor nicht beurteilbar
pT0	Kein Anhalt für Karzinom
pTa	Nicht-muskelinvasives papilläres Karzinom
pTis	Carcinoma in situ
pT1	Invasion der Lamina propria
pT2	Invasion der Detrusormuskulatur (muskularis propria)
pT2a	Innere Muskelhälfte (oberflächlich)
pT2b	Äußere Muskelhälfte
pT3	Invasion von perivesikalem Gewebe
pT3a	Mikroskopische Invasion
pT3b	Makroskopische Invasion
pT4	Invasion angrenzender Organe
pT4a	Prostata, Uterus, Vagina, Rektum
pT4b	Becken- oder Bauchwand
<b>pN</b>	<b>Lymphknotenmetastasen</b>
pNX	Nicht beurteilbar
pN0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
pN1	Lymphknotenmetastase des Beckens: hypogastrisch, obturatorisch, präsakral oder im Bereich der A. iliaca externa
pN2	Mehrere Lymphknotenmetastasen des Beckens
pN3	Lymphknotenmetastase der A. iliaca communis

<b>pM</b>	<b>Fernmetastasen</b>
pM0	Keine Fernmetastasen
pM1	Fernmetastasen
<b>Stadium</b>	<b>Stadieneinteilung</b>
0a	Ta/N0/M0
0is	Tis/N0/M0
I	T1/N0/M0
II	T2a-b/N0/M0
III	T3a-b/T4a/N0/M0
IV	T4b/N0/M0 oder jegliches T/N1-3/M0 oder jegliches T/N/M1

### 1.3 MicroRNA (miRNA)

#### 1.3.1 Biogenese und Funktion

MicroRNAs (miRNAs) sind 19-22 Nukleotid lange nicht-codierende RNAs, welche die mRNA posttranskriptionell, epigenetisch regulieren. Sie wurden erstmals 1993 im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans*, welcher als Modellorganismus in der Entwicklungsbiologie genutzt wird, beschrieben [32]. Seit dem wurden sie in vielen weiteren Geweben gefunden und die Rolle in der Proteinbiosynthese erforscht [32].

Sie sind verantwortlich für die spezifische Inhibition der Translation, sowie für die Degradierung ihrer Ziel mRNA [25] und spielen in der Entstehung, Progression sowie Metastasierung von Tumoren eine bedeutende Rolle.

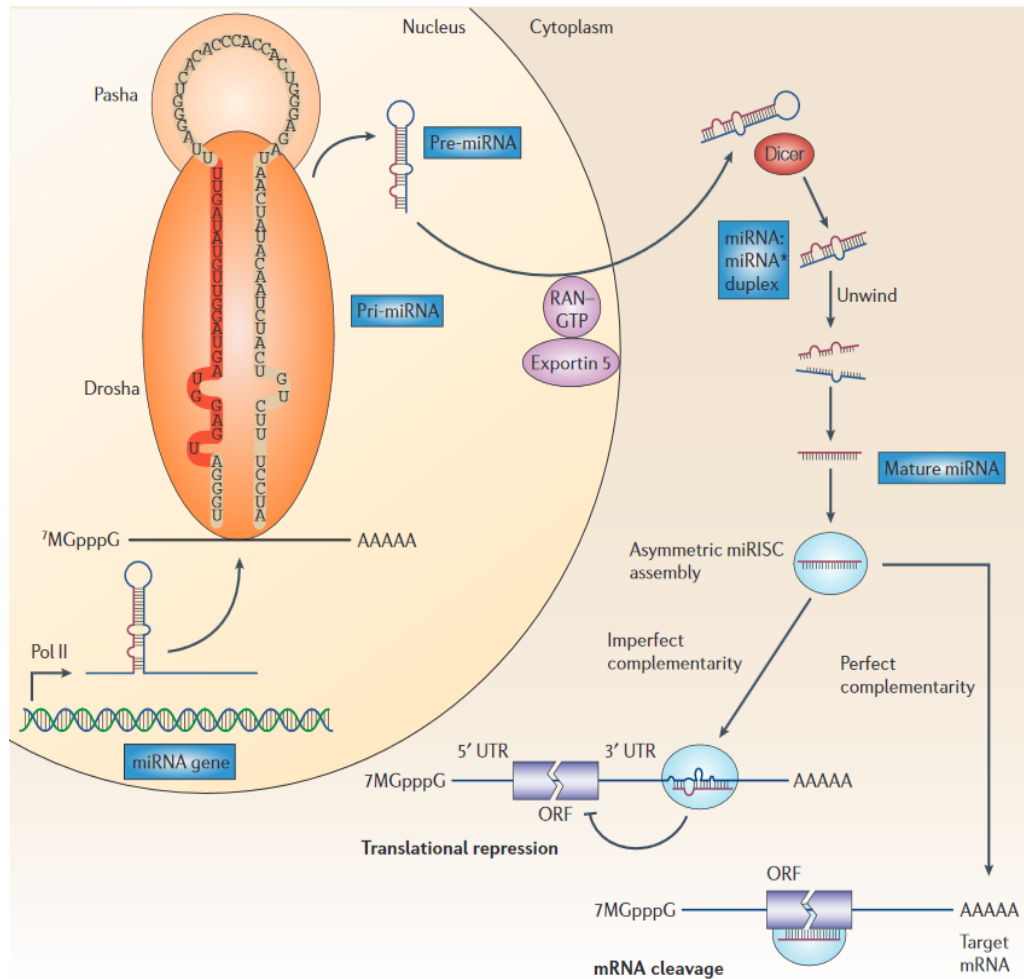
In Abbildung 2 ist die Biosynthese schematisch dargestellt. Diese beginnt mit der Transkription einer primären miRNA (pri-miRNA) im Nukleus durch die RNA Polymerase II. Diese erhält zur Stabilisierung eine Cap-Struktur am 5' Ende und einen Poly-A-Schwanz am 3' Ende. Charakteristisch entsteht eine Haarnadelschleife. Anschließend wird diese pri-miRNA in eine precursor miRNA (pre-miRNA) prozessiert. Dies erfolgt durch den microprocessor complex bestehend aus Pasha (DGCR8) und Drosha (RNA Polymerase III) [25]. In diesem



Schritt verliert die pri-miRNA ihre überhängenden Basenpaare und kann nun durch Exportin 5 in das Zytoplasma zur weiteren Prozessierung als ca 70 Nukleotid lange pre-miRNA freigegeben werden [25]. Dort wird durch Dicer, einer Ribonuklease III mit Helicase-Funktion die Haarnadelschleife entfernt [2,25,42]. Es entsteht eine ca. 21-25 Basenpaar langer Nukleotiddoppelstrang, welcher von dem transactivation-responsive RNA-binding protein (TRBP) entwunden und getrennt wird. Ein reifer miRNA Strang entsteht. Diese geht in den RNA-induced silencing complex (RISC), welcher aus Argonaute2 (Ago2) und TRBP besteht. Der kurzlebige komplementäre Strang wird als miRNA\* bezeichnet und wird oftmals zügig degradiert [2,25,42]. Der RISC-Komplex kann sich nun an die Ziel-mRNA anlagern. Je nach Komplementarität der mi-RNA zur mRNA kommen zwei mögliche Interaktionen vor. Bei perfekter Übereinstimmung des RISC mit dem open reading frame (ORF) lagert sich der Komplex an dieser Stelle an und führt Abbau der mRNA [25] .

Bei unvollständiger Komplementarität lagert sich der RISC-Komplex am 3' UTR-Ende der RNA an und verhindert die Translation in der ORF [25]. Durch diese Regulierung der mRNA haben die miRNA onkogenes sowie tumorsuppressives Potential [19]. Es wurde via microarray Technik in verschiedenen Tumoren eine auffällige dysregulierte Expression der miRNA festgestellt [9,19,42]. Dieses Wissen kann zur rechtzeitigen Therapieentscheidung und Eskalation beitragen.

Abbildung 2: Micro-RNA Biogenese [42]



### 1.3.2 Micro RNA und ihre Rolle in der Tumorgenese

Der Einfluss von dysregulierten miRNAs konnte bei mehreren Tumorentitäten bereits gezeigt werden. [9]. MicroRNAs, welche bei Überexpression onkogen wirken, werden als Oncomir bezeichnet.

Erstmals wurde dies bei der chronisch lymphatischen Leukämie (CLL) beschrieben. Hier findet sich regelhaft eine Deletion der miRNA-15a und 16-1. Diese regulieren normalerweise als Tumorsuppressoren negativ das antiapoptotische Gen BCL2.

Ein Beispiel für eine miRNA, welche als Onkogen wirkt, ist die miRNA-21. Diese wirkt antiapoptotisch und ist in Glioblastomen und Mammakarzinomen hochreguliert. [9]. So kommt es zu einer Dysregulation der Onko- und

Tumorsuppressorgene, welche die Entstehung und Progression eines Karzinoms fördern. [9].

Es konnte bereits gezeigt werden, dass diese Veränderungen in der miRNA auch beim Urothelkarzinom vorkommen. [3,8] Bis dato wurden schon über 200 miRNAs nachgewiesen, welche im Blasenkarzinom abnormal exprimiert werden [20]. Muskelinvasive und nicht muskelinvasive Harnblasenkarzinome unterscheiden sich in ihrer miRNA-Expression erwiesenermaßen vom gesunden Urothel.[3] Allerdings haben nur wenige Arbeiten dabei untersucht, ob sich anhand des miRNA Profils ein invasives, fortgeschrittenes Karzinom von einem nicht-invasivem unterscheiden lässt und zudem ob eine Aussage über das Grading und das T-Stadium möglich ist [3,20].

### **1.3.3 Molekulare Pathogenese der Harnblasenkarzinome**

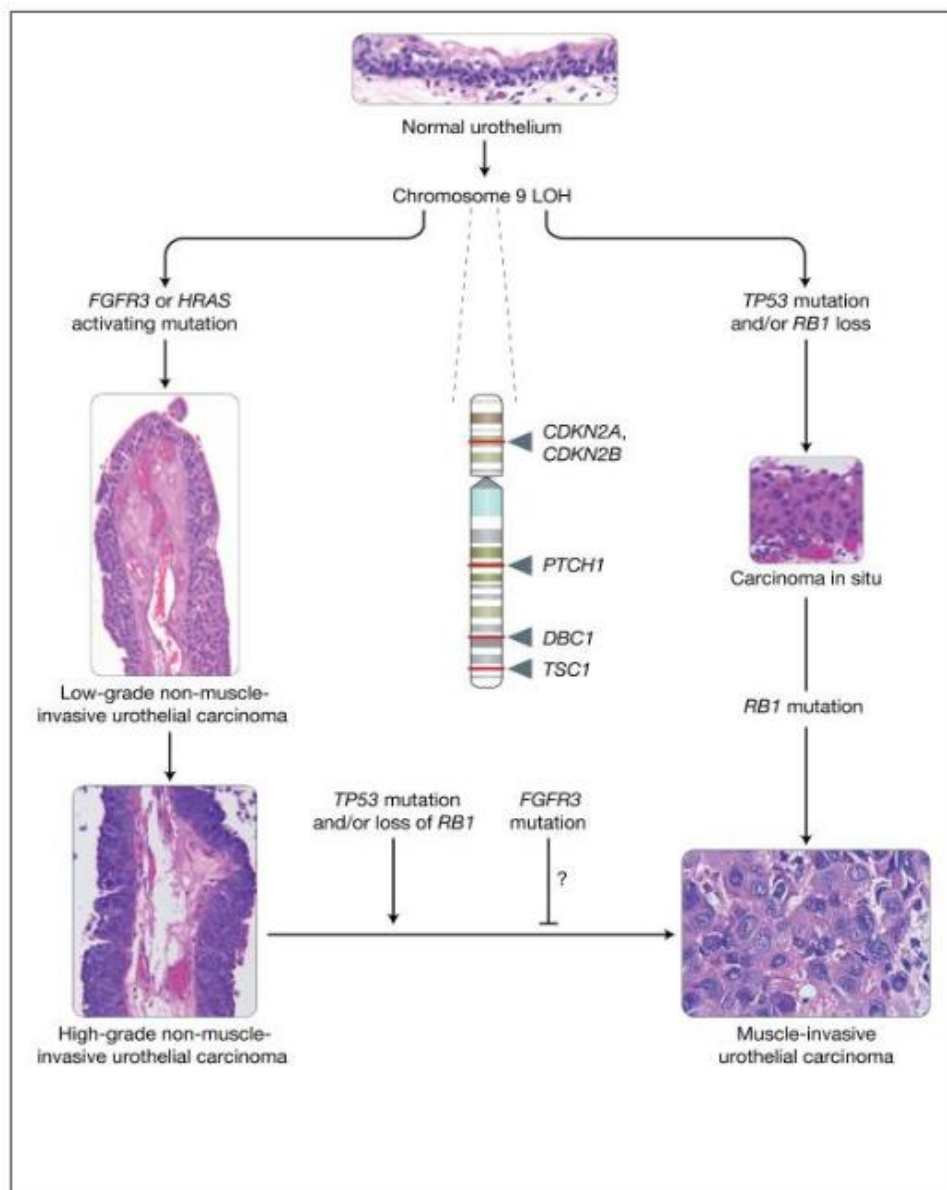
Bei der molekularen Pathogenese des Harnblasenkarzinoms muss zwischen der Entwicklung eines nicht-muskelinvasiven von einem muskelinvasiven Urothelkarzinom unterschieden werden. Während im NMIHB eine Mutation mit Aktivierung der intrazellulären GTPase HRAS (Harvey rat sarcoma viral gene homologue) und dem fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) im Vordergrund steht, entwickeln sich muskelinvasive Karzinome bei Defekten des Tumorsuppressorgens TP53 und Retinoblastom-1-Tumorsuppressorgens (RB1) [27].

Die Abbildung 3 fasst die wichtigsten molekularen Veränderungen zusammen, die für die Entstehung von nicht-muskelinvasiven Urothelkarzinomen und muskelinvasiven Urothelkarzinomen verantwortlich sind. Ausgehend von einem normalen Urothel mit einer Dicke von fünf bis sieben Zellen, wird der Verlust der Heterozygotie (LOH) von Chromosom 9 mit der Mehrzahl der Urothelkarzinome in Verbindung gebracht. Dies fällt häufig mit einer Mutation in FGFR3 oder HRAS zusammen, die an der Entstehung von NMIHBs beteiligt sind. In Abbildung 3 links im Flussdiagramm sind papilläre NMIHBs mit niedrigem und hohem Grading, als Beispiele für die mit steigendem Grading zunehmende Architekturstörung und die zunehmende zytologische Atypie dargestellt. FGFR3- und HRAS-Mutationen sind normalerweise nicht im selben Karzinom zu finden. Im Gegensatz dazu wird die MIHB-Klasse durch Mutationen in den Tumorsuppressorgenen TP53 und RB1 definiert. Diese treten häufig gleichzeitig

in den Tumoren auf. Es wird angenommen, dass MIHBs de novo aus einem Carcinoma in situ entstehen (siehe Abbildung 3, rechts). Histologisch sind im MHIB ausgeprägte zytologische Atypien nachweisbar, welche ein hohes Verhältnis von Kernen zu Zytoplasma, Mitosen und einen totalen Verlust der Gewebearchitektur aufweisen. (Abbildung 3). Zusätzlich ist eine Invasion der Muscularis propria vorhanden.

NMIHBs haben eine hohe Wahrscheinlichkeit des Wiederauftretens und entwickeln sich selten zu einem höhergradigen Karzinom oder MIHB. Wenn ein Progress mit Muskelinvasion auftritt, fällt es normalerweise mit einem Funktionsverlust der Tumorsuppressoren TP53 oder RB1 zusammen. [27,28]

Abbildung 3: Molekulare Entstehung von muskelinvasiven und nicht-muskelinvasiven Urothelkarzinomen [27]



### 1.3.4 Auswahl der miRNA

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe wurden Mikroarray-Analysen an 10 NMIHB und 14 MIHB durchgeführt. Dabei waren 63 miRNAs differentiell exprimiert. In MIHB konnte eine erhöhte Expression von 35 dieser miRNAs nachgewiesen werden. Dagegen waren 28 miRNA signifikant erniedrigt. [3] Sechs dieser miRNA wurden ausgewählt, um sie an einer größeren Kohorte zu prüfen. Zwei der

miRNAs waren erniedrigt (miRNA 138-5p, 29c-5p) und vier vermehrt (miRNA 127-3p, 155-5p, 650 und 146b-5p) exprimiert [3]

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Arbeitsplatz

Der Arbeitsplatz wurde zu Beginn mit RNaseZap DNase/RNase-frei gereinigt. Die verwendeten Reaktionsgefäße, das Wasser und Pipettenspitzen waren ebenfalls DNase/RNase-frei.

### 2.2 Patientenkohorte

Die verwendeten Proben stammen von Patienten der Klinik für Urologie und Kinderurologie des Universitätsklinikums des Saarlands. Das Probematerial wurde nach operativer Entfernung des Tumors bzw. nach Zystektomie gewonnen. Pathologisch aufgearbeitet wurden die Proben vom Institut für Pathologie des Uniklinikums des Saarlands und in Paraffinblöcken fixiert (FFPE). Anschließend wurden die Tumore an HE-Schnitten histopathologisch klassifiziert. In der Analyse wurden jene Patienten berücksichtigt, welche zum Zeitpunkt der OP keine weiteren Tumorerkrankungen aufwiesen und Ihre Einverständniserklärung erteilt haben. Für die miRNA-Analyse liegt ein Votum der Ethikkommission vor. Die Patientencharakteristika sind in der entsprechenden Tabelle aufgeführt.

### 2.3 Patientencharakteristika

Tabelle 1: Klinisch-pathologische Parameter der Patientenkohorte

Probenmaterial		Tumorgewebe
Anzahl		60
Alter bei OP in Jahren	Median	68
Altersspannweite in Jahren		30-87
Geschlecht	Männlich	43
	Weiblich	17
pT	pTa	29

	pT1	7
	pT2	8
	pT3	11
	pT4	5
<b>pN</b>	N0	12
	N+	11
	NX	36
<b>Grading</b>	G1	7
	G2	26
	G3	27

## 2.4 Verwendete Materialien

### 2.4.1 Materialien

Tabelle 2: Materialien

DNA LoBind Tube 0.5ml	Eppendorf AG
MicroAmp™ Optical Adhesive Film	Applied Biosystems™
Combitips advanced® 0.2ml	Eppendorf AG

### 2.4.2 Kits

Tabelle 3: Kits

TaqMan® MicroRNA Assays	Applied Biosystems™
miRNeasy FFPE Kit (50)	Qiagen
TaqMan® Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems™



### 2.4.3 MiRNA Primer

Tabelle 4: Primer

miRNA-127-3p	Applied Biosystems™
miRNA-138-5p	Applied Biosystems™
miRNA-144-5p	Applied Biosystems™
miRNA-146b-5p	Applied Biosystems™
miRNA-155-5p	Applied Biosystems™
miRNA-29c-5p	Applied Biosystems™
Referenz RNU48	Applied Biosystems™

### 2.4.4 Schritte der reversen Transkription (Programm 43)

Tabelle 5: Programm 43

Schritt	Zeit	Temperatur in Celsius
Hybridisierung	30min	16
Elongation	30min	42
Denaturierung	5min	85
	∞	4

### 2.4.5 Geräte

Tabelle 6: Geräte

UNO II	Biometra
Centrifuge 5804 R	Eppendorf AG
StepOnePlus Real Time PCR System	Applied Biosystems™
Reasearch plus Pipetten (2,5-1000µl)	Eppendorf AG
Multipipette® stream	Eppendorf AG

### 2.4.6 Software

Tabelle 7: Software

StepOne™ Software v2.3	Life Technologies
REST Version 2009	Qiagen
IBM SPSS Statistics	IBM SPSS GmbH

## **2.5 Gesamt-RNA Isolation mit dem miRNeasy FFPE Kit von Qiagen**

Für die Gesamt-RNA Isolation wurden 10-15 Schnitte (Dicke: 7 µm) der Formalin-fixierten in Paraffin eingebetteten Gewebeproben (FFPE) angefertigt und auf einen Objektträger aufgebracht. Die Proben wurden mit Hilfe eines Skalpell makrodisseziert und in einem 1.5ml Reaktionsgefäß mit 1ml Xylol (100%ig) überführt. Die Probe wurde gemischt und 2min bei 13.400rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Präzipitat in 1ml Ethanol (100%ig) gelöst, um Xylolreste zu entfernen. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß bei 13.400rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Ethanol wurde restlos aus der Probe entfernt, indem das geöffnete Reaktionsgefäß bei 37°C inkubiert wurde. Nachdem die Proben vollständig getrocknet waren, folgte die Gewebelysierung. Zu dem Präzipitat wurden 240µl Buffer PKD gegeben und gemischt, bis das Pellet vollständig gelöst war. Danach wurde 10µl Proteinkinase K zu jeder Probe zugegeben und zunächst bei 56°C für 15min und anschließend 15min bei 80°C inkubiert. Im nächsten Schritt wurde das Reaktionsgefäß 3min auf Eis gekühlt und anschließend 15min bei 13.500rpm zentrifugiert.

Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Pellet verworfen. Zur Probe wurden 25µl DNase Booster Buffer gegeben. Nach der Durchmischung wurde 10µl DNase I in das Reaktionsgefäß pipettiert. Der Ansatz wurde durch Auf- und Ab-Pipettieren gut durchmischt. Die Reagenzien wurden 15min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Um die Bindung der Gesamt-RNA an die RNeasy MinElute Säule zu gewährleisten, wurde die Probe mit 500µl Buffer RBC versetzt. Der komplette Probenansatz wurde in ein 5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 1750µl Ethanol vermischt. In den nachfolgenden Schritten wurden 700µl Probe auf die Säule gegeben und 15s bei 10.000rpm zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen und der Schritt solange wiederholt, bis das komplette Probengemisch zentrifugiert wurde.

Die Säule wurde mit Hilfe von zwei Schritten gewaschen. Dazu wurden 500µl Buffer RPE auf die Säule gegeben, 15s bei 10.000rpm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Im zweiten Waschschrift wurde 500µl Buffer RPE

zugegeben und die Säule 2min bei 10.000rpm zentrifugiert. Das Eluat wurde ebenfalls verworfen.

Zur Trocknung der Säule wurde diese in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 5min bei 13.500rpm zentrifugiert. Die gebundene Gesamt-RNA wurde mit 15-100µl RNase-freiem Wasser von der Säule gelöst. Nachdem das RNAase-freie Wasser auf die Säule pipettiert wurde, wurde die Säule für 1min bei 13.500rpm zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule verworfen und die RNA-Konzentration konnte mittels des NanoDrop ND-1000 bestimmt werden. Die fertigen Proben wurden bei -20°C gelagert.

## 2.6 Quantitative Echtzeit-PCR

Die Validierung der miRNA-Expression wurde mit Hilfe der quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) durchgeführt. Diese erfolgte in zwei Schritten.

Im ersten Schritt wurde die einzelsträngige miRNA mittels reverser Transkription in eine doppelsträngige cDNA transkribiert. Dafür wurde das TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit und spezifische TaqMan® MicroRNA Assay Primer (miR-127-3p, miR-138-5p, miR-144-5p, miR-146b-5p, miR-155-5p, miR-29c-5p, miR-650) verwendet. Neben den zu untersuchenden Primern wurde RNU48 als Referenz benutzt. Für die reverse Transkription wurden zunächst 3µl Probe (Gesamt-Konzentration: 100ng/µl) in ein 0,2ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde der verwendete Primerpool angesetzt, indem 2µl des jeweiligen Primers in ein Reaktionsgefäß pipettiert und bis zu einem Gesamtvolumen von 200µl mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt wurde. Der Primerpool wurde gut durchmischt und konnte bei -20 °C gelagert werden. Anschließend erfolgte die Zugabe der Reagenzien (Tab. 3), welche nach der Durchmischung für 5min auf Eis inkubiert wurden.

Tabelle 8 Reagenzien

Reagenz	[µl]
Nukleasefreies H <sub>2</sub> O	1,01
100mM dNTPs (mit dTTP)	0,3
10x RT Puffer	1,5

Rnase Inhibitor, 20U/µl	0,19
RT Primer Pool	6
Multiscribe RT, 50U/µl	3
Total Volumen Mastermix	12

Die Umschreibung in cDNA wurde unter Verwendung des PCR-Programmes 43 im UNO II von Biometra durchgeführt. Nach Beendigung des Programms konnten die Proben entweder gleich in den zweiten Schritt überführt werden oder wurden bei -20°C gelagert.

Die umgeschriebene cDNA konnte nun mit der qPCR unter Verwendung spezifischer fluoreszenzmarkierter Primer quantifiziert werden. Für jede Probe wurde ein 10µl Ansatz verwendet. Dieser setzte sich aus jeweils 1µl der cDNA und 9µl Mastermix zusammen. Der Mastermix enthielt 6 µl miRNA Primer, 0,3 µl dNTPs, 3 µl Multiscribe RT (50U/ µl ), 1,5 µl Puffer, 0,19 µl Rnase Inhibitor (20U/ µl ) 1,01 µl nukleasefreies H<sub>2</sub>O und 3 µl des TaqMan® Gene Expression Master Mix.

Die Proben wurden zusammen mit dem Mastermix auf eine 96 Well Platte in Triplets pipettiert. Die Platte war während des Pipettierens auf einem Eisblock gelagert. Zusätzlich zu den Proben wurden sowohl für das verwendete Wasser als auch für jeden Primer Negativkontrollen (NTC) angesetzt, um eventuelle Kontaminationen des Wasser oder der Primer zu detektieren. Die Primer-NTCs setzen sich zusammen aus 1µl Wasser und 9 µl Mastermix. Nachdem alle Proben pipettiert wurden, wurde die Platte luftdicht versiegelt und 1min bei 1000rpm zentrifugiert. Anschließend wurde die Proben mit dem StepOnePlus Real Time PCR System von Applied Biosystems™ gemessen. Dafür wurden 45 Zyklen der Denaturierung und Elongation durchgeführt.

Tabelle 9: Ablauf der PCR

	Enzymaktivierung	Denaturierung	Anlagerung/Verlängerung
Temperatur in Celsius	95	95	60
Zeit	10min	15s	1min

Während der PCR binden die Primer an die passenden Regionen der cDNA, wodurch eine Amplifikation durchgeführt werden kann. Zudem enthält der Ansatz TaqMan-Sonden, welche aus einem Quencher-Reporter-System bestehen. In Verbindung mit dem Quencher wird das Fluoreszenzsignal des Reporters unterdrückt. Lagert sich die Sonde an die cDNA an, kommt es während der PCR-Zyklen durch die Exonuklease-Aktivität der DNA-Polymerase zum Abbau dieser Sonde. Dabei werden Reporter und Quencher getrennt, wodurch das Fluoreszenzsignal des Reporters nicht weiter gehemmt wird. Das Signal des Reporters wurde am Ende jedes PCR-Zyklus gemessen und verhält sich proportional zur vorhandenen miRNA-Menge. Das Gerät ermittelt einen Ct-Wert (engl. cycle threshold; Schwellenwert). Dieser Wert ist der Zeitpunkt, an dem das Fluoreszenzsignal der jeweiligen Probe erstmals signifikant aus dem Hintergrundrauschen hervortritt.

## 2.7 Auswertung, Statistik

Zur statistischen Auswertung wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet, um die Expressionslevel der miRNAs in den Kategorien T-Stadium, Grading und Invasivität zu vergleichen. Das Signifikanzniveau lag bei  $p < 0,05$  und das Konfidenzintervall bei 95%. Die Ergebnisse wurden in Boxplot-Graphiken dargestellt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Technische Validierung

Für die technische Validierung wurden 10 NMIHB und 15 MIHB Proben verwendet (Tabelle 10). Folgende microRNAs wurden überprüft, miRNA 155-5p, 144-5p, 138-5p, 146b-5p, 29c-5p, 650 und 127-3p. Als Referenz wurde RNU48 ausgewählt- Die Proben stammten von sieben weiblichen und 18 männlichen Patienten.

**Tabelle 10: Geschlechterverteilung und Häufigkeit NMIHB und MIHB der Validierung**

	<b>Häufigkeit</b>	<b>Prozentual</b>
<b>Weiblich</b>	7	25,9
<b>Männlich</b>	18	66,7
<b>NMIHB</b>	10	37
<b>MIHB</b>	15	55,6

Ziel der microRNA-Validierung war die Identifikation passender miRNAs, welche sich für die anschließende Analyse an einer größeren Kohorte eignen.

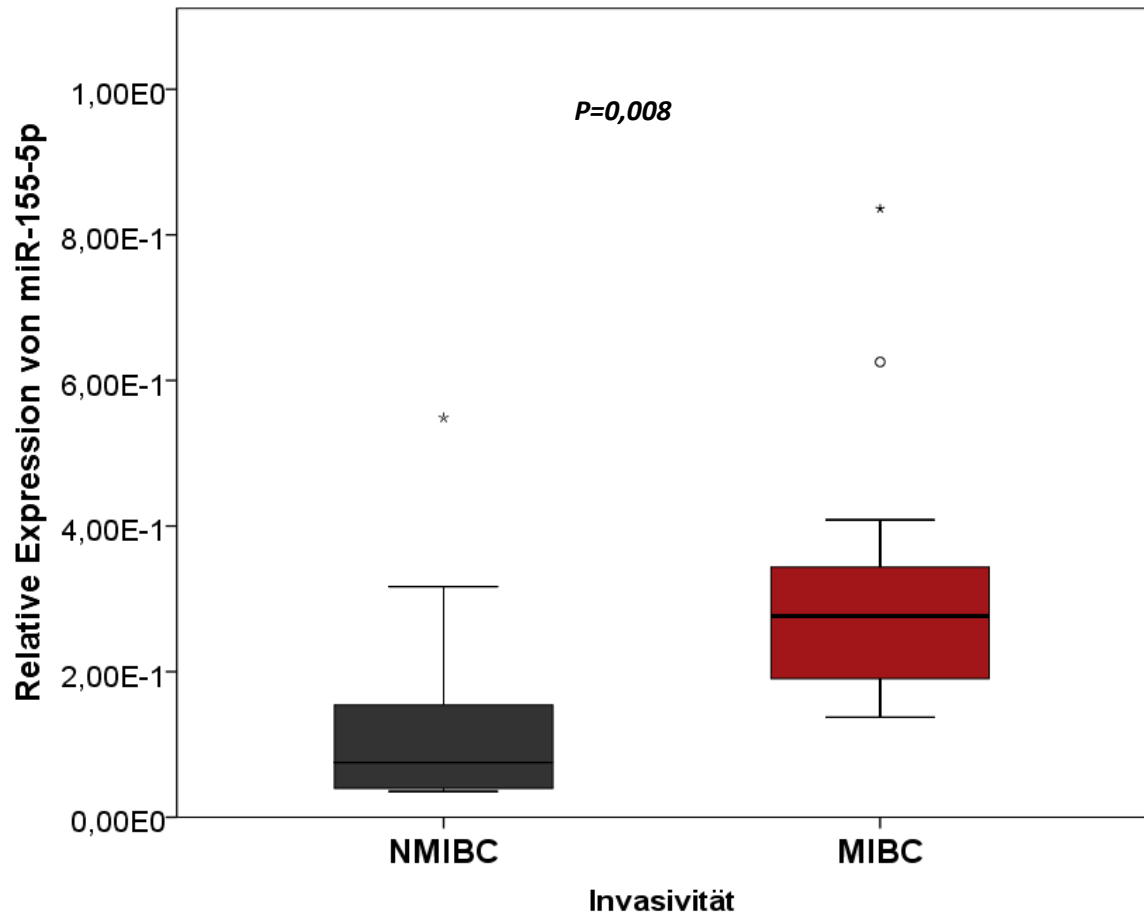
Von den sieben miRNAs waren im Vergleich MIHB zu NMIHB vier hochreguliert und drei vermindert exprimiert. Alle erreichten ein Signifikanzniveau von  $p < 0,05$ . Tabelle 11 zeigt die p-Werte und Fold-changes sowie ob eine miRNA hoch (up) oder herunter (down) reguliert war.

**Tabelle 11: Ergebnisse der technischen Validierung**

<b>miRNA</b>	<b>p-Wert</b>	<b>Fold Change</b>	<b>Expression</b>
155-5p	0,008	2,588	hochreguliert
650	0,01	3,277	hochreguliert
29c-5p	0,036	0,443	runterreguliert
146b-5p	< 0,001	5,198	hochreguliert
138-5p	0,008	0,320	runterreguliert
144-5p	0,011	0,492	runterreguliert

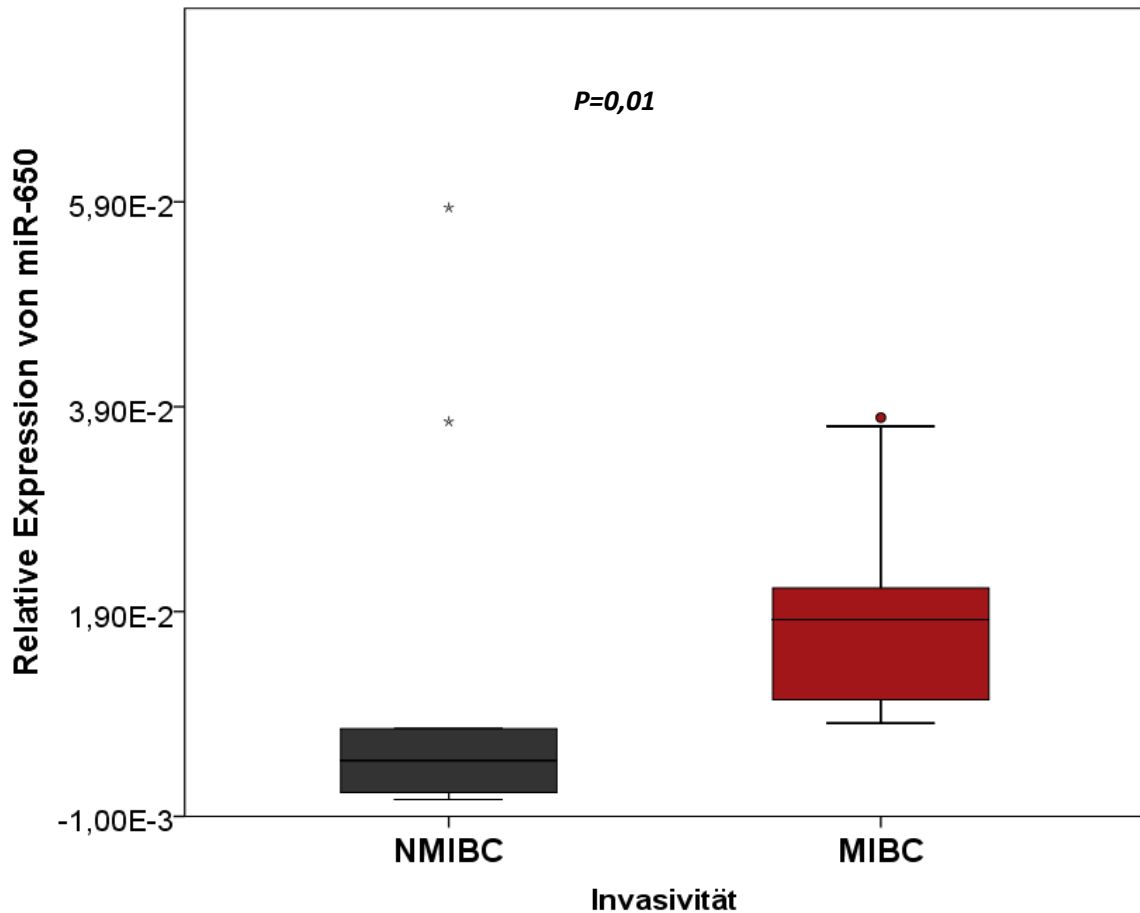
127-3p	< 0,001	4,227	hochreguliert
--------	---------	-------	---------------

Abbildung 4: Expression von miRNA-155-5p: NMIBH vs. MIHB



Eine Hochregulation der miRNA 155-5p wurde mit einem Fold-change von 2,588, bei einer Signifikanz von  $p=0,008$ , in den invasiven Karzinomen (Abbildung 4) nachgewiesen.

Abbildung 5: Expression von miRNA-650 im NMIBH und MIHB



Das Boxplot in Abbildung 5 stellt die miRNA 650 dar. Diese zeigte ebenfalls eine vermehrte Expression um den Faktor 3,277 (Fold-change). Die Signifikanz mit  $p=0,01$  liegt niedriger als bei der miRNA 155-5p. Außerdem lässt sich eine geringere Streuung der Werte bei den NMIBH als bei den muskelinvasiven Karzinomen erkennen.

In Abbildung 6 ist die miRNA 29c-5p dargestellt. Mit einem P-Wert von 0,036 zeigte diese miRNA die geringste Signifikanz zur Unterscheidung von nicht-muskelinvasiven von muskelinvasiven Tumoren unter den analysierten miRNAs. Der Fold-change liegt bei 0,443.

Eine deutlich vermehrte Expression im MIHB mit einer Signifikanz von  $p < 0,001$  wurde bei der Validierung der miRNA 146b-5p gemessen. Sie ist im Boxplot in Abbildung 7 dargestellt. Ebenso wurde der größte Fold-change von 5,198 unter den miRNAs berechnet.



Zudem wurde der kleinste Interquartilsabstand bei den nicht invasiven Harnblasenkarzinomen gemessen.

Abbildung 6: Expression von miRNA-29c-5p im NMIBH und MIHB

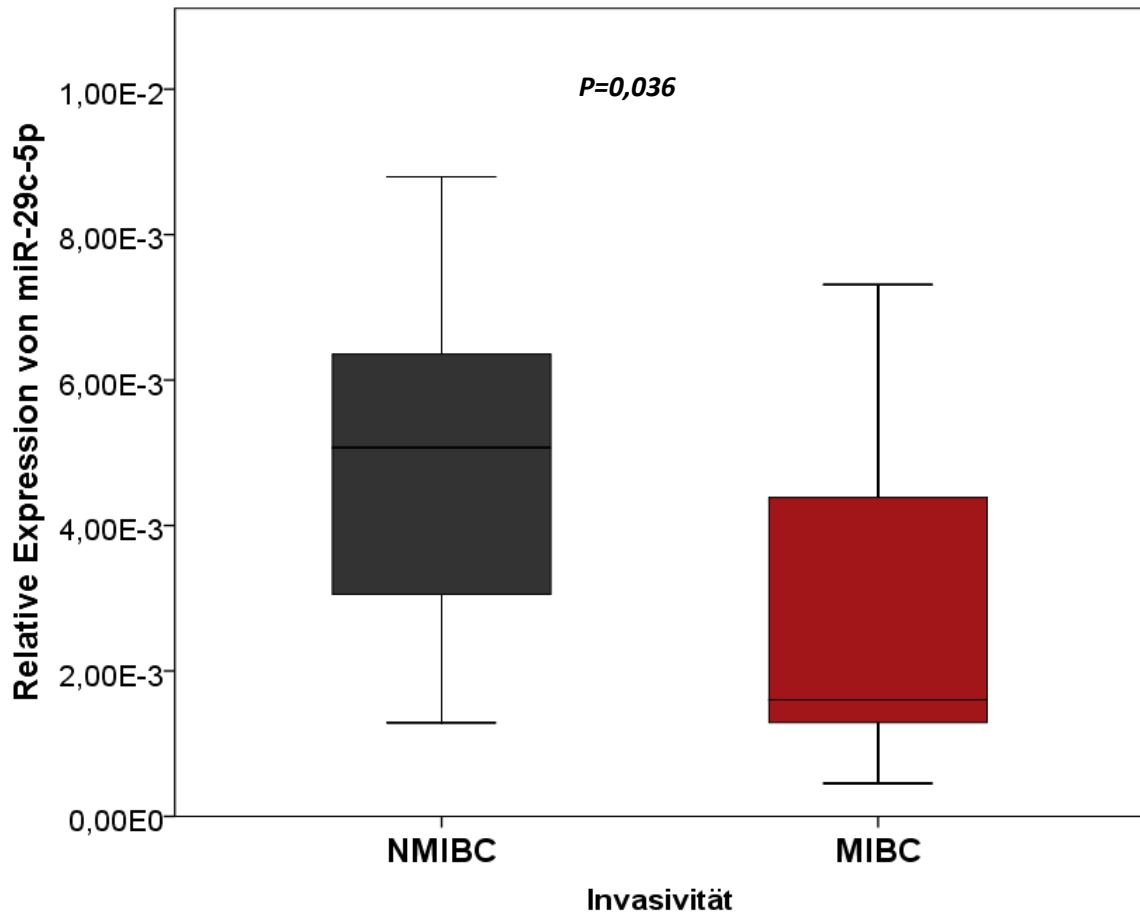
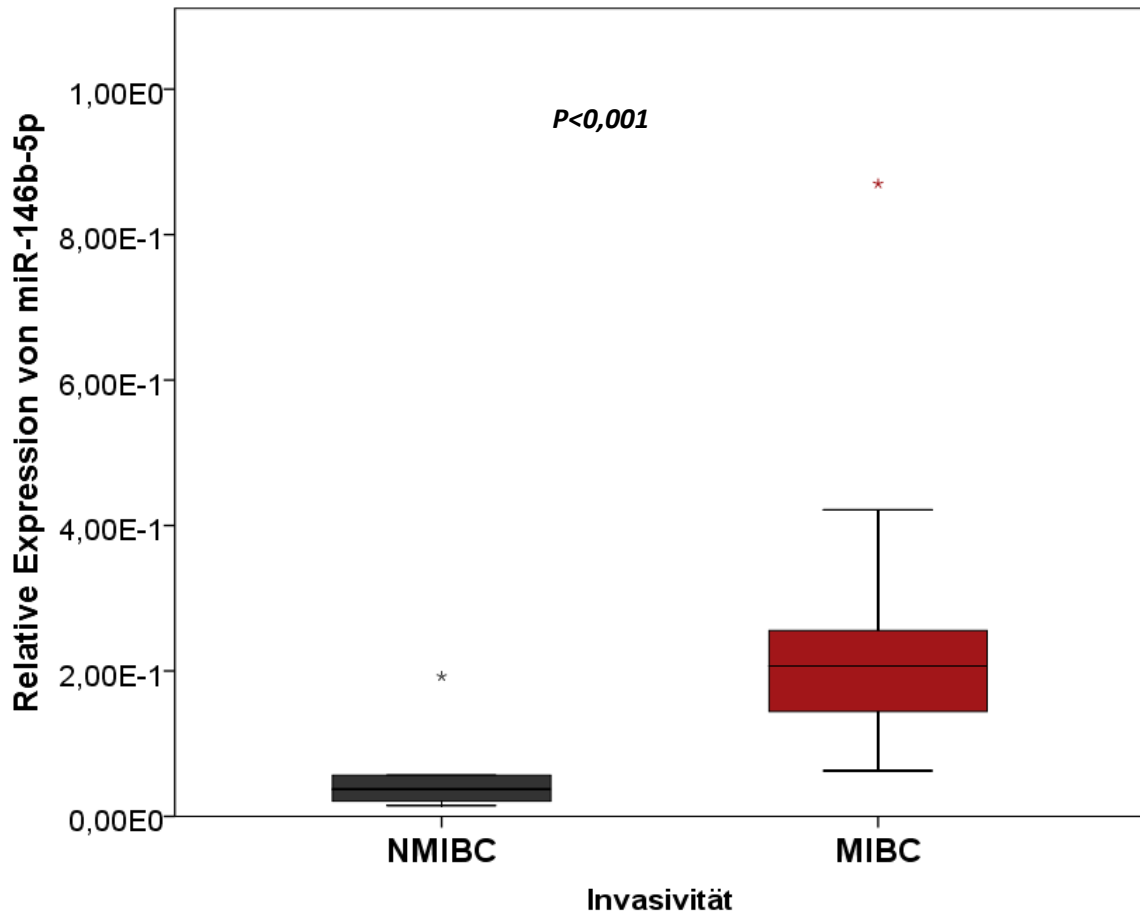


Abbildung 8 stellt die Boxplots der Expression der miRNA 138-5p dar. Es wurde eine verminderte Expression in den invasiven Karzinomen gemessen. Die miRNA ist um den Faktor 0,32 reduziert nachgewiesen worden mit einer Signifikanz von  $p=0,008$ .

Die Validierung der miRNA 144-5p wies eine signifikante Minderexpression in den Proben der MIHB nach ( $p=0,011$ ). Der Fold-change lag bei 0,492. Somit liegt die Expression im MIHB ca. bei 50% im Vergleich zum NMIBH. (Abbildung 9)

Abbildung 7: Expression von miRNA-146b-5p im NMIBH und MIHB



Das letzte Boxplot der Validierung zeigt die miRNA 127-3p in Abbildung 10. Diese miRNA ist mit einem  $p < 0,001$  und einem Fold-change von 4,227 ist signifikant hochreguliert.

Es ist außerdem ein deutlicher Unterschied in der Streuung der Werte um dem jeweiligen Median zu beobachten. Der Interquartilsabstand bei der Gruppe der NMIBH war relativ gering im Vergleich zur muskelinvasiven Kategorie.

Abbildung 8: Expression von miRNA-138-5p im NMIBH und MIHB

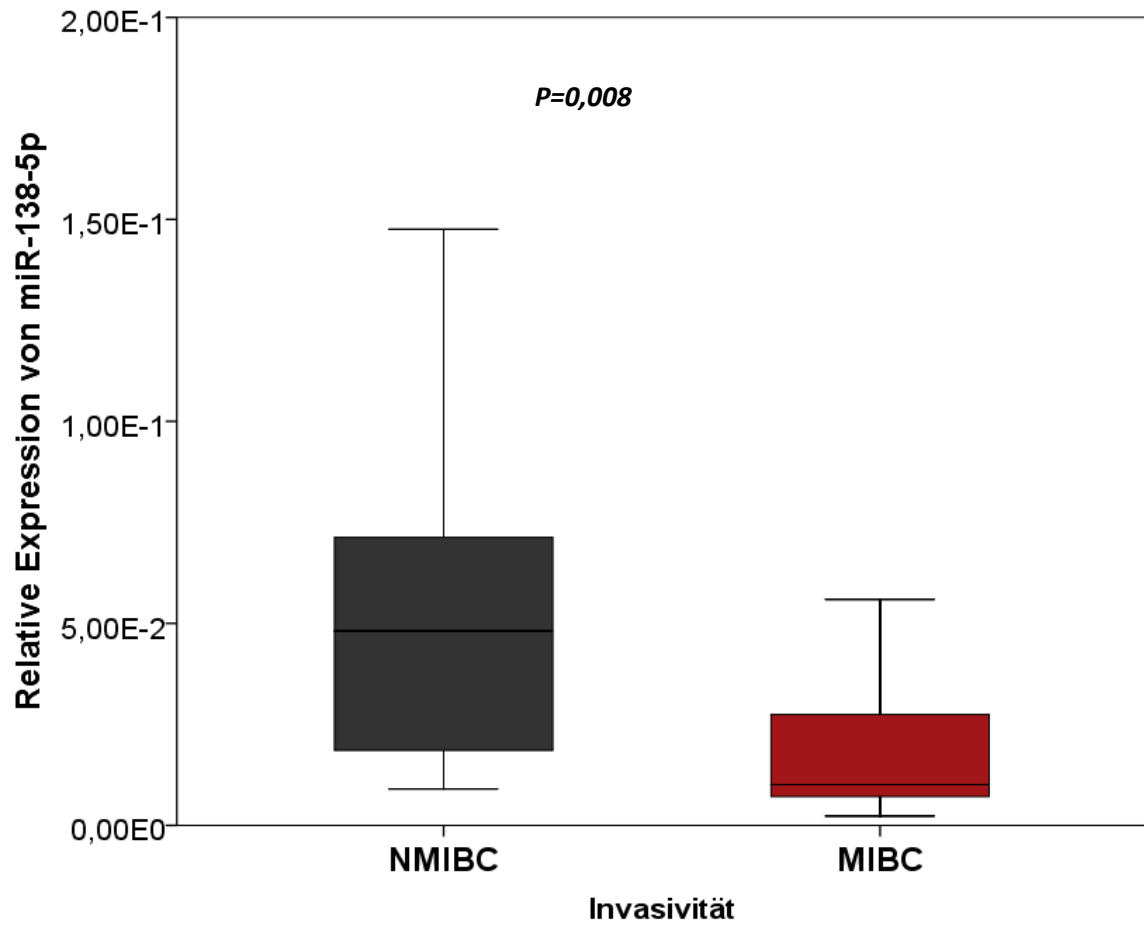


Abbildung 9: Expression von miRNA-144-5p im NMIBH und MIHB

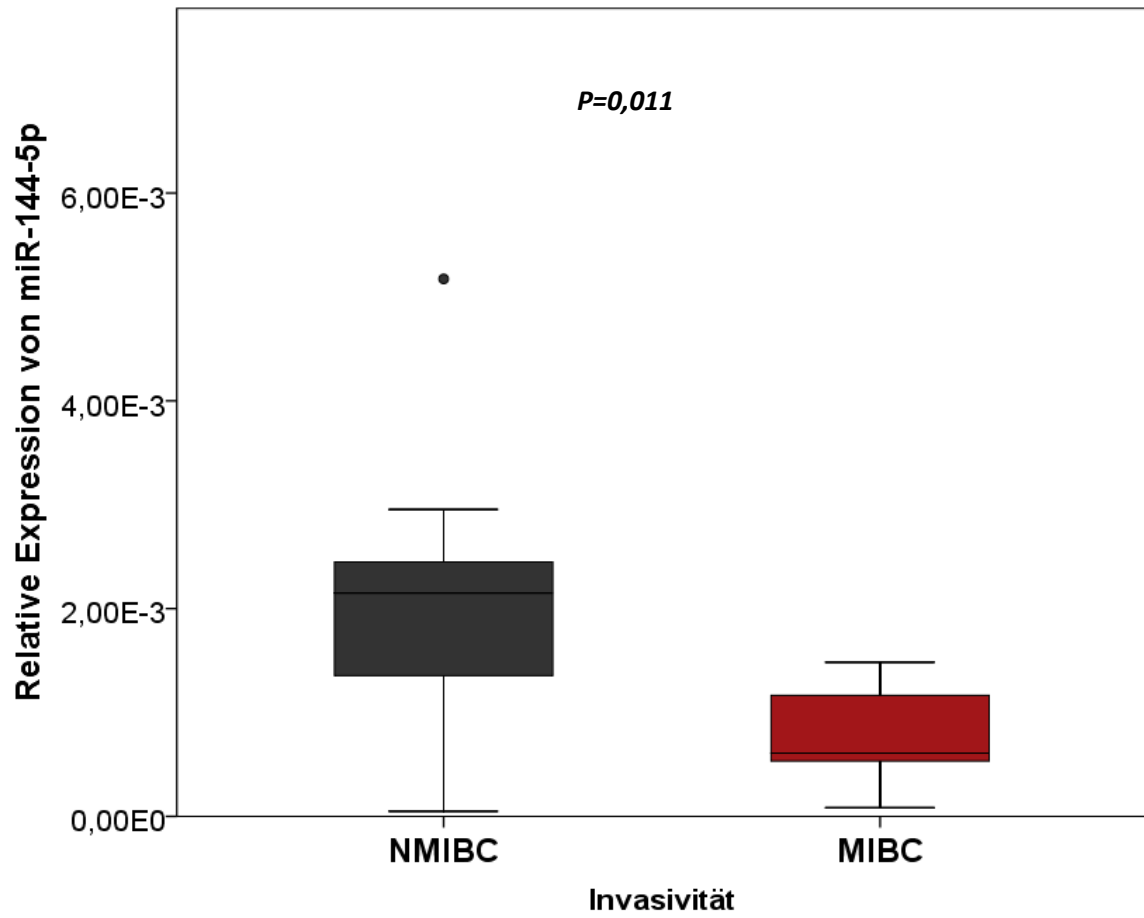
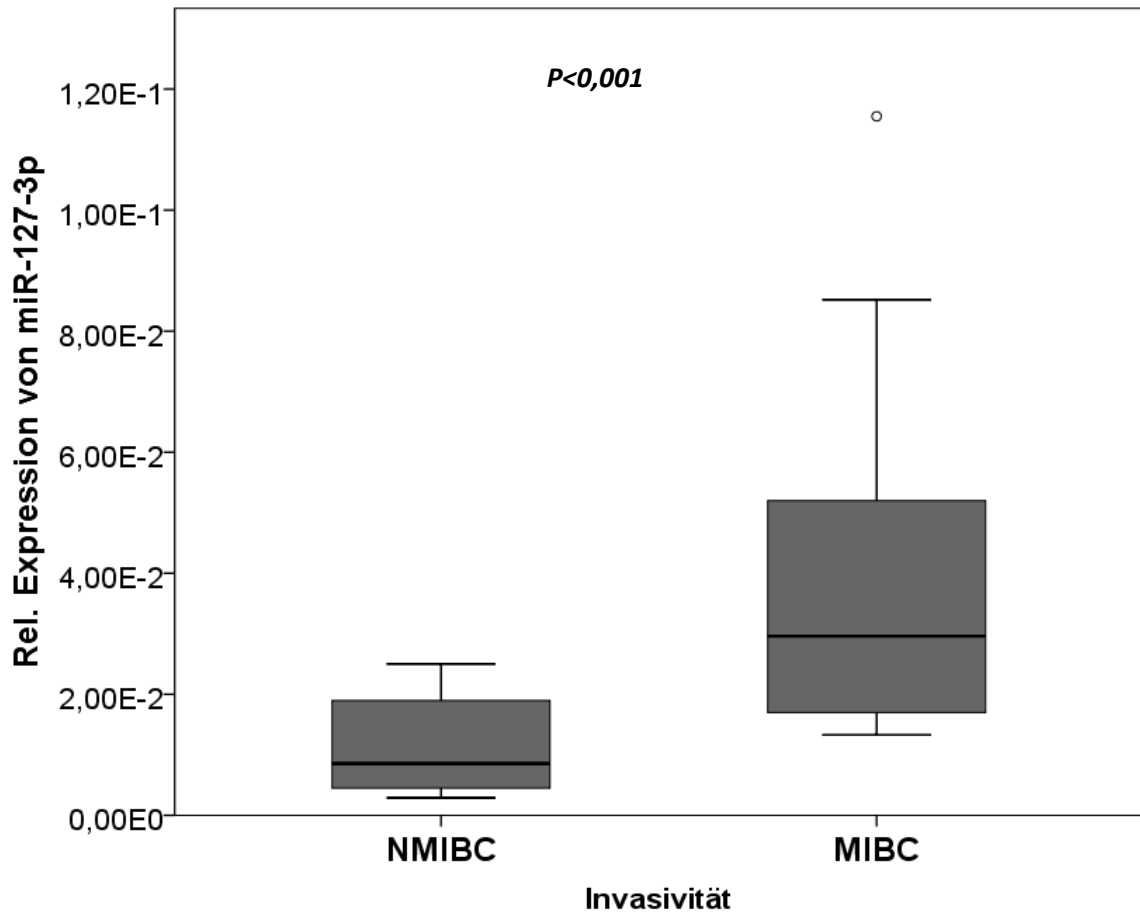


Abbildung 10: Expression von miRNA-127-3p im NMIBH und MIHB



### 3.2 Erweiterte Validierung

Die Validierung der miRNAs 138-5p und 146b-5p wurde an einer erweiterten Kohorte von 55 Karzinomen durchgeführt. Unter den untersuchten Proben waren 32 nicht-muskelinvasive und 23 muskelinvasive Tumore (Tabelle 12). Das mediane Operations-Alter lag bei 68,2 Jahren.

**Tabelle 12: Verteilung der MIHB, NMIHB, T-Kategorien und des Gradings in der erweiterten Validierung von miRNA 138-5p und 146b-5p**

	<b>Häufigkeit</b>	<b>Prozentual</b>
NMIHB	32	58,3
MIHB	23	41,8
pTa	26	47,3
pT1	6	10,9
pT2	8	14,5
pT3-4	15	27,3
G1	7	12,7
G2	23	41,8
G3	25	45,5

Von den Proben waren 58,2% NMIHB, davon 47,3% (n=26) pTa Tumore. Es wurden insgesamt 23 muskelinvasive Tumore analysiert. Diese verteilten sich auf die T-Kategorien pT2 mit n= 8 und pT3-4 mit n= 15.

Das Grading unter den Proben ist in Tabelle 12 aufgeführt. Tumore mit einem Grading von 1 waren mit n= 7 am seltensten. Diese machten 12,7% der Proben aus. Die höheren Grade G2 (n= 23) und G3 (n= 25) waren im direkten Vergleich ähnlich häufig vertreten.

### **3.2.1 Erweiterte Validierung der miRNA 138-5p**

Die miRNA 138-5p zeigte in der erweiterten Validierung der MIHB vs. NMIHB eine höhere Signifikanz mit  $p < 0,001$  als in der im ersten Schritt durchgeführten technischen Validierung ( $p = 0,008$ ). Der Fold-change lag in der erweiterten Kohorte etwas niedriger mit 0,263 (FC= 0,32). Zugleich wurde das Streumaß geringer, wie in den Boxplots in Abbildung 11 dargestellt.

Betrachtet man die T-Kategorien untereinander, war die miRNA 138-5p bei höheren T-Stadien erniedrigt. Im Vergleich war zwischen pTa und pT2/pT3-4 mit hoher Signifikanz zu unterscheiden. Unter den invasiven Karzinomen ab pT1 konnte keine bedeutende Differenz nachgewiesen werden. (Abbildung 12).

Bei der Betrachtung des Tumor-Gradings zeigte sich eine zunehmend verminderte Expression der miRNA 138-p in den histologisch schlechter

differenzierten Karzinomen. So lässt sich ein G1 Tumor mit  $p= 0,016$  und einem Fold-change von 0,275 von einem G3 Tumor unterscheiden. Auch zwischen den Graduierungen G2 und G3 ist eine Differenzierung möglich. Hier lag der p-Wert bei 0,001 und der Fold-change bei 0,278. (Abbildung 13).

Abbildung 11: Erweiterte Validierung der miRNA-138-5p: NMIBH vs. MIHB

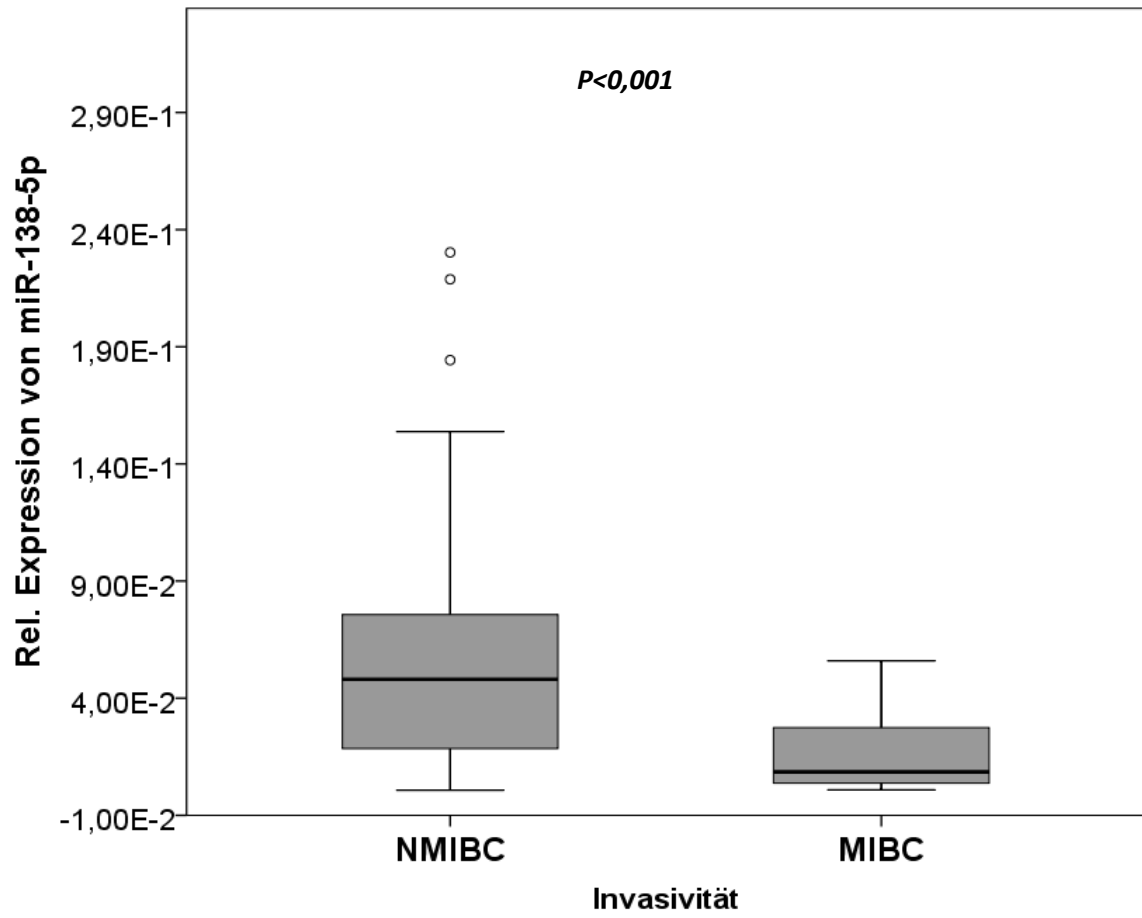




Abbildung 12: Erweiterte Validierung der miRNA138-5p: pT-Kategorie

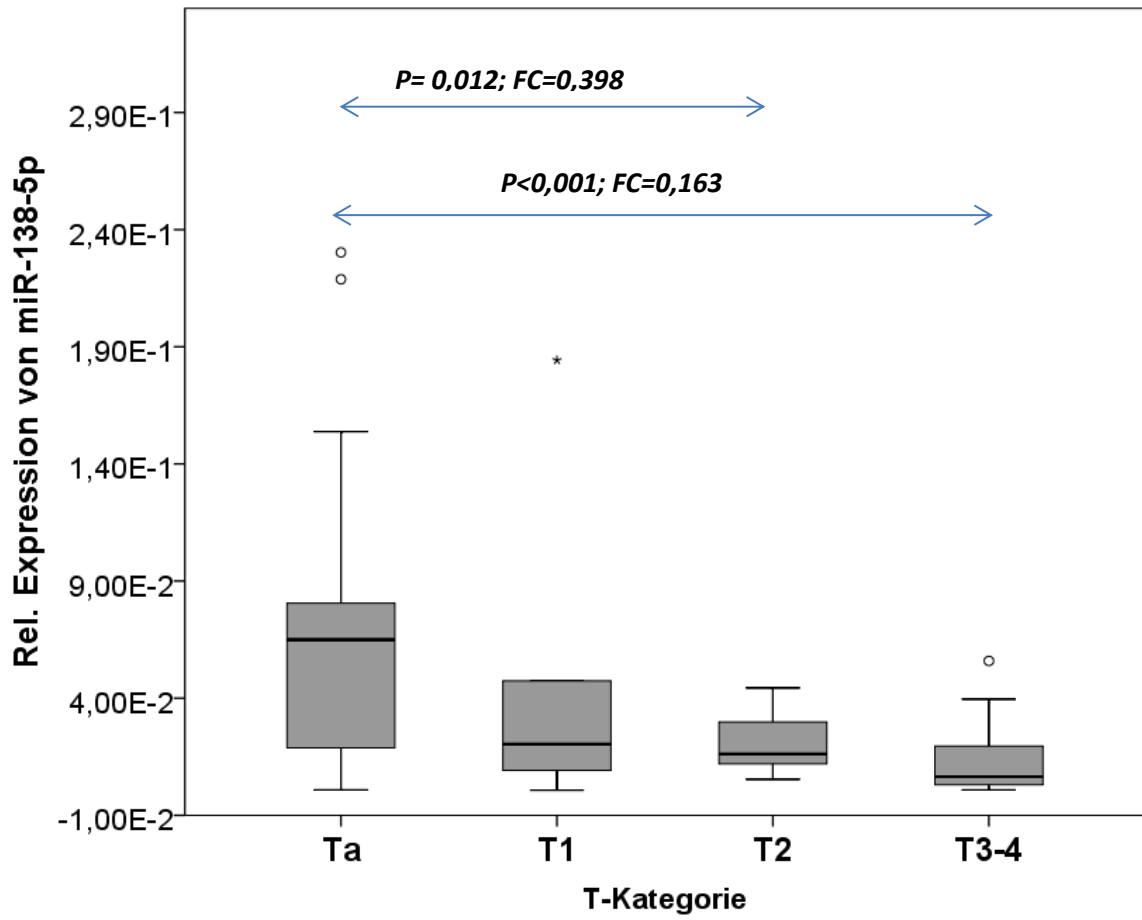
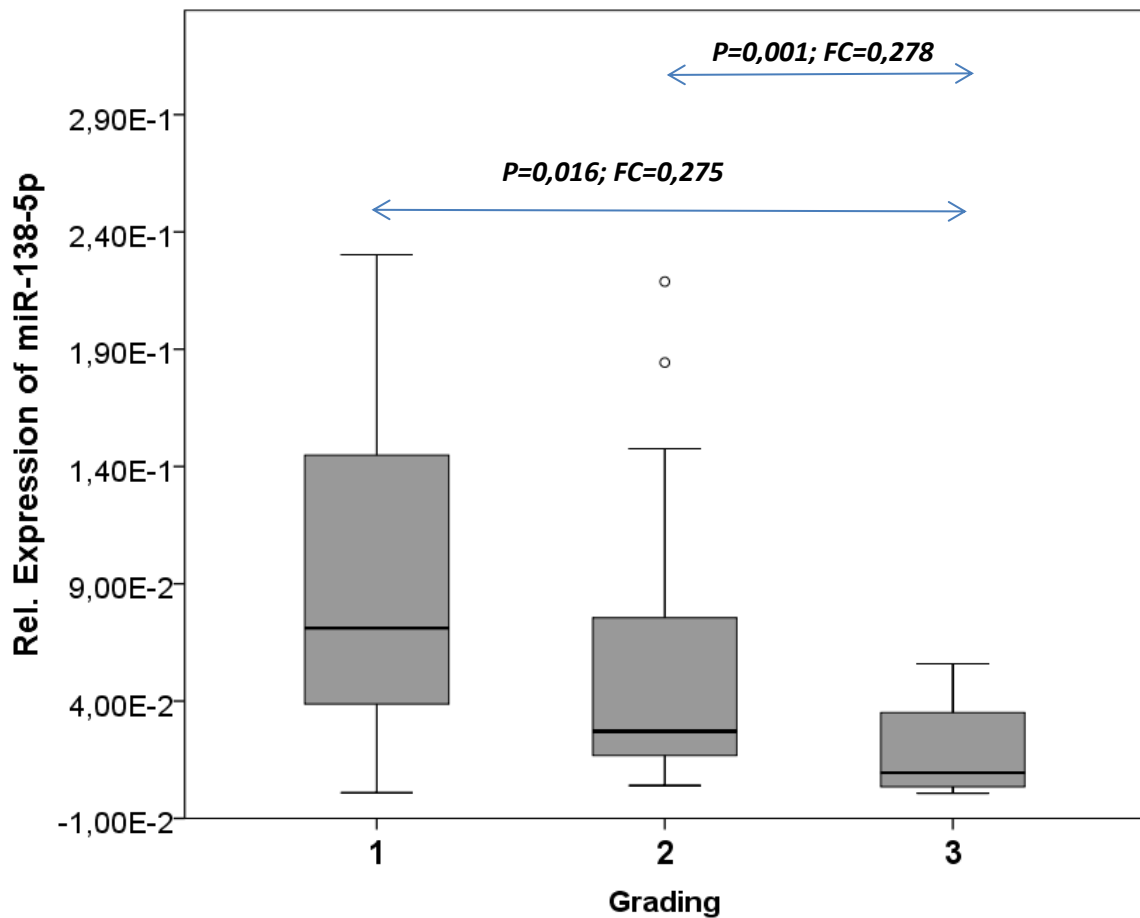


Abbildung 13: Erweiterte Validierung der miRNA 138-5p: Grading



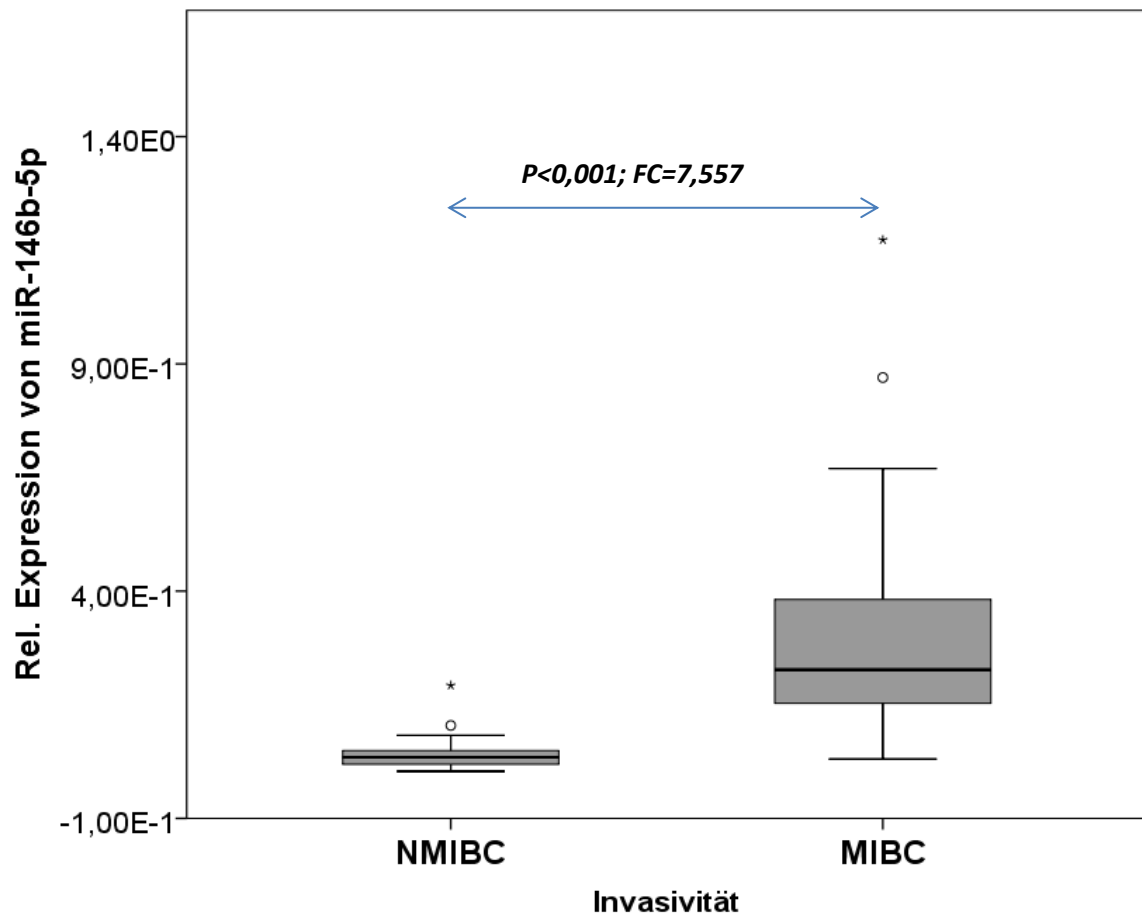
### 3.2.2 Erweiterte Validierung der miRNA 146b-5p

In der erweiterten Validierung konnte eine Hochregulierung der miRNA 146b-5p Expression in muskelinvasiven Tumorstadien bestätigt werden. Wie zuvor in der technischen Validierung war der p-Wert hoch signifikant bei  $< 0,001$ . Der Fold-change lag bei 7,557. In Abbildung 14 sind die Boxplots hierzu dargestellt. Bei der Untersuchung an einer größeren Probenzahl zeigt sich der Interquartilsabstand der NMIHB zudem geringer.

Im Vergleich der T-Kategorien wurden mit hoher Signifikanz Unterschiede zwischen den nicht-muskelinvasiven (pTa und pT1) und muskelinvasiven (pT2 und pT3-4) Tumoren nachgewiesen. In pTa Tumoren war die miRNA 146b-5p mit einem  $p < 0,001$  und einem FC von 8,078 bei pT3-4 Tumoren hoch signifikant

unterschiedlich. Im Vergleich von pTa zu pT2 Tumoren zeigte sich die miRNA 146b-5p ebenfalls deutlich erhöht exprimiert (FC 5,854).

Abbildung 14: Erweiterte Validierung der miRNA 146b-5p: NMIHB vs. MIHB



Auch konnte zwischen pT1 Tumoren mit  $p=0,001$ , einem FC von 10,039 und pT3-4 bzw. 7,275 bei pT2 differenziert werden (Abbildung 15). Eine Diskriminierung von pTa und pT1 Tumoren war nicht möglich ( $p=0,775$ ). Ebenso war unter den muskelinvasiven Karzinomen anhand der miRNA 146b-5p bei  $p>0,05$  nicht zu unterscheiden.

Abbildung 16 zeigt die Boxplots der miRNA 146b-5p im Verhältnis zum Grading. Bei höherem Grading ist eine Zunahme der miRNA nachgewiesen worden. Vergleicht man G1 mit G3 Tumoren, war die Expression mit  $p=0,002$  und bei

einem FC von 4,166 erhöht. Mit hoher Signifikanz konnte zwischen G2 und G3 Tumoren unterschieden werden. Die miRNA 146b-5p war in G3 Karzinomen mit  $p < 0,001$  ca. 6-mal so hoch (FC= 5,973) exprimiert wie in G2 Karzinomen (Abbildung 16).

Abbildung 15: Erweiterte Validierung der miRNA 146b-5p: pT-Kategorie

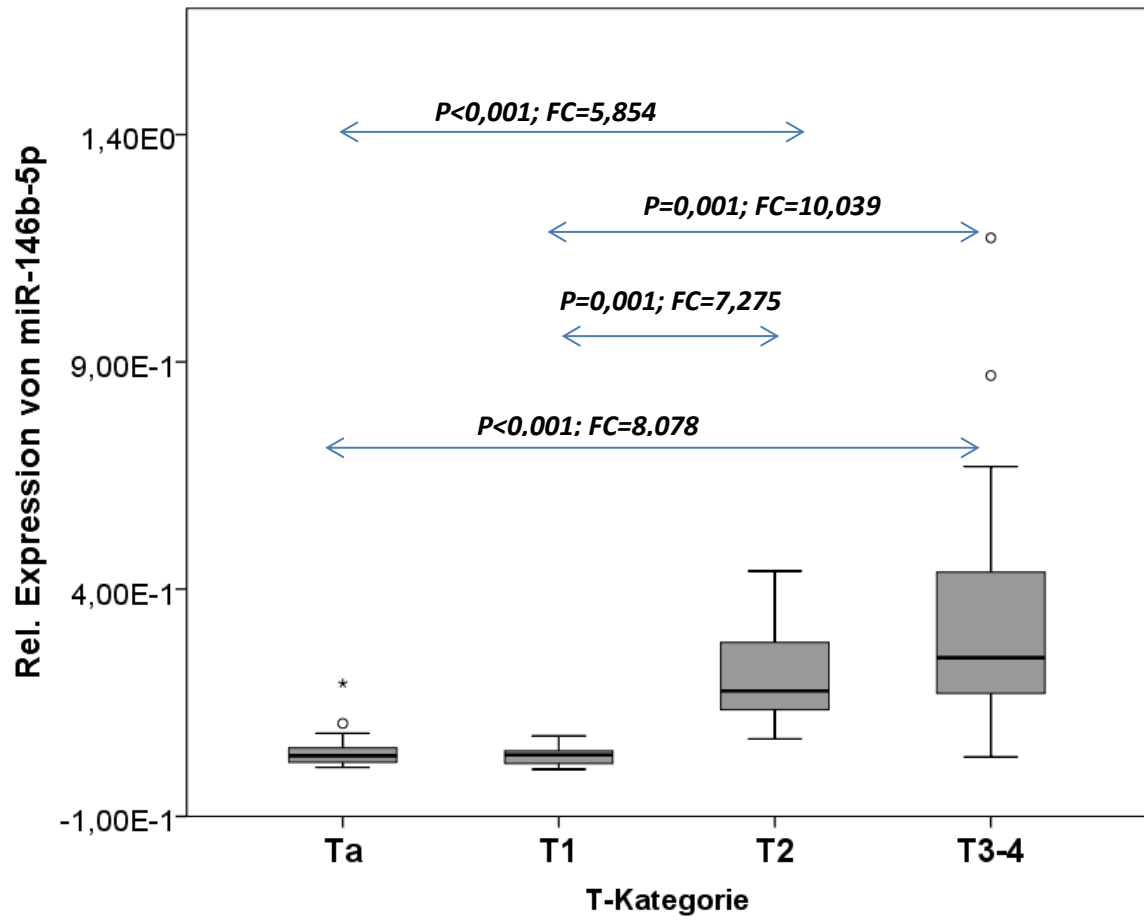
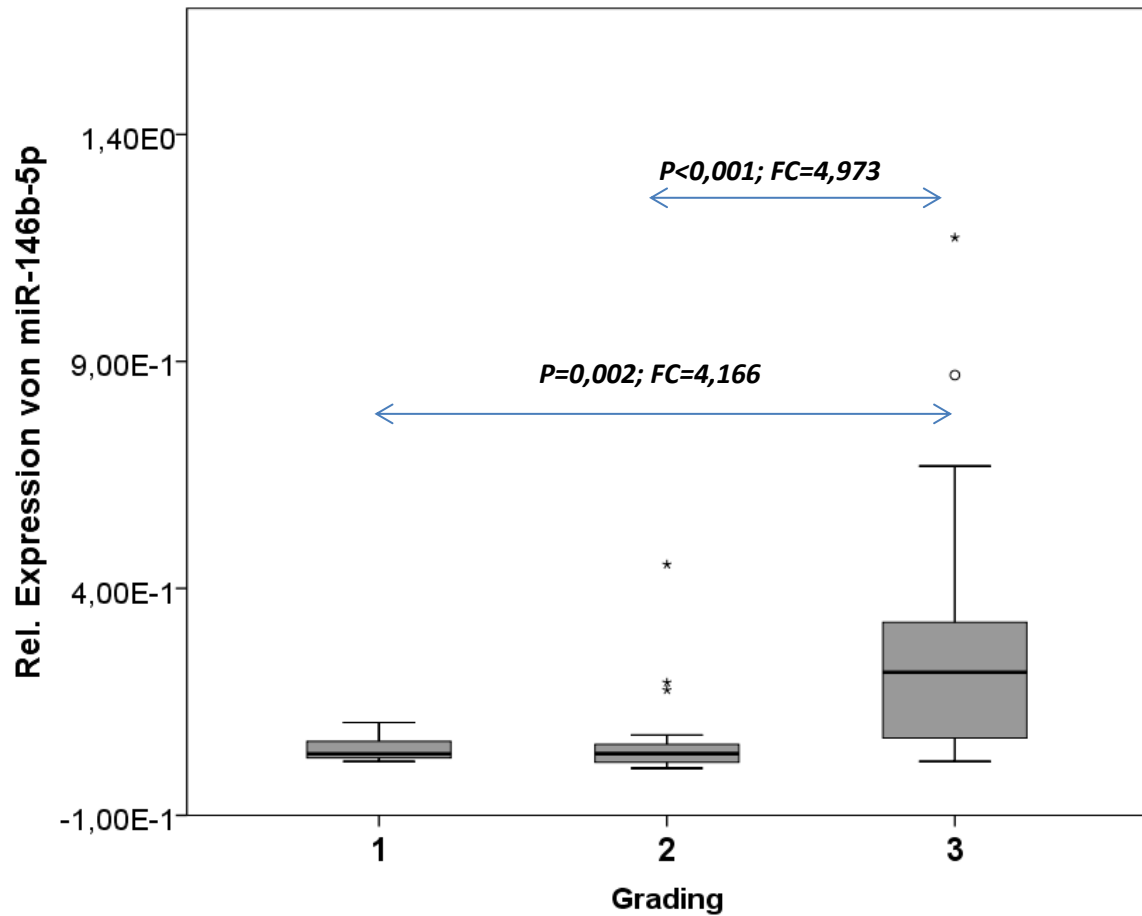


Abbildung 16: Erweiterte Validierung der miRNA 146b-5p: Grading



### 3.2.3 Erweiterte Validierung der miRNA 144-5p

Zur weiteren Beurteilung und Validierung der miRNA 144-5p wurden insgesamt 57 Proben untersucht. Unter den untersuchten Karzinomen waren 34 NMIHB und 23 MIHB vertreten. Die Häufigkeiten der einzelnen T-Kategorien sind ebenfalls in Tabelle 13 aufgeführt.

**Tabelle 13: Verteilung MIHB, NMIHB, T-Kategorien und des Gradings in der Kohorte der erweiterten Validierung von miRNA 144-5p**

	<b>Häufigkeit</b>	<b>Prozentual</b>
<b>NMIHB</b>	34	59,6
<b>MIHB</b>	23	40,4
<b>pTa</b>	28	49,1
<b>pT1</b>	6	10,5
<b>pT2</b>	8	14
<b>pT3-4</b>	15	26,3
<b>G1</b>	8	14
<b>G2</b>	24	42,1
<b>G3</b>	25	43,9

In der erweiterten Validierung der miRNA 144-5p war eine verminderte Expression ( $p=0,033$ ) im MIHB nachzuweisen. Der Fold-change lag bei 0,732. Im Vergleich zur der technischen Validierung ( $p=0,011$ ; FC 0,492) war die Signifikanz nicht so deutlich. In den T-Kategorien konnte zwischen den pTa und den pT2 Tumoren eine signifikant reduzierte Expression mit  $p= 0,049$  und einem FC von 0,555 gemessen werden. Anhand der weiteren Tumorstadien lässt sich kein unterschiedliches miRNA 144-5p Profil zur Unterscheidung der T-Kategorien ableiten.

Bei der Betrachtung der miRNA 144-5p Expression in Bezug auf das Grading ließ sich in den untersuchten Proben kein Unterschied feststellen. Die p-Werte lagen deutlich über dem Signifikanzniveau von  $p= 0,05$ . Die Boxplots sind in Abbildung 19 dargestellt.

Abbildung 17: Erweiterte Validierung der miRNA 144-5p: NMIHB vs. MIHB

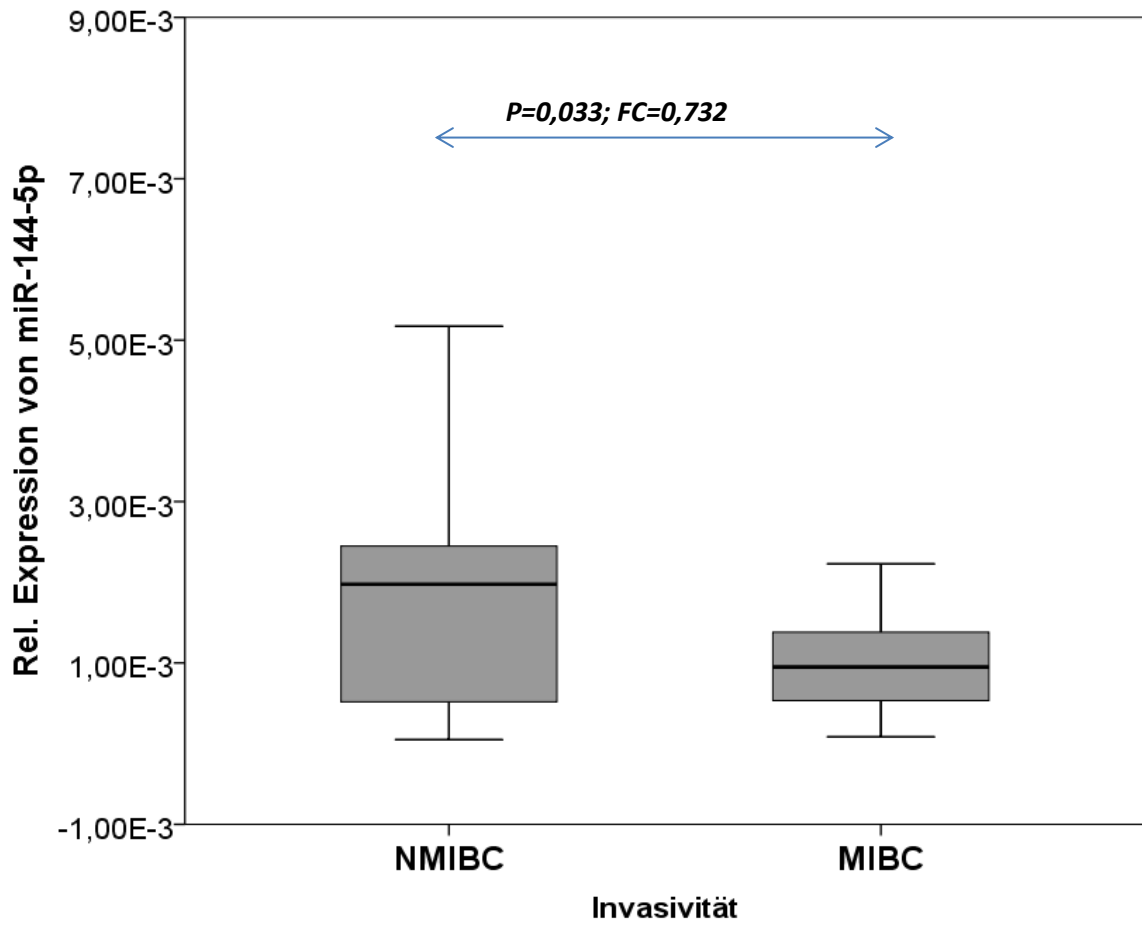




Abbildung 18: Erweiterte Validierung der miRNA 144-5p: pT-Kategorie

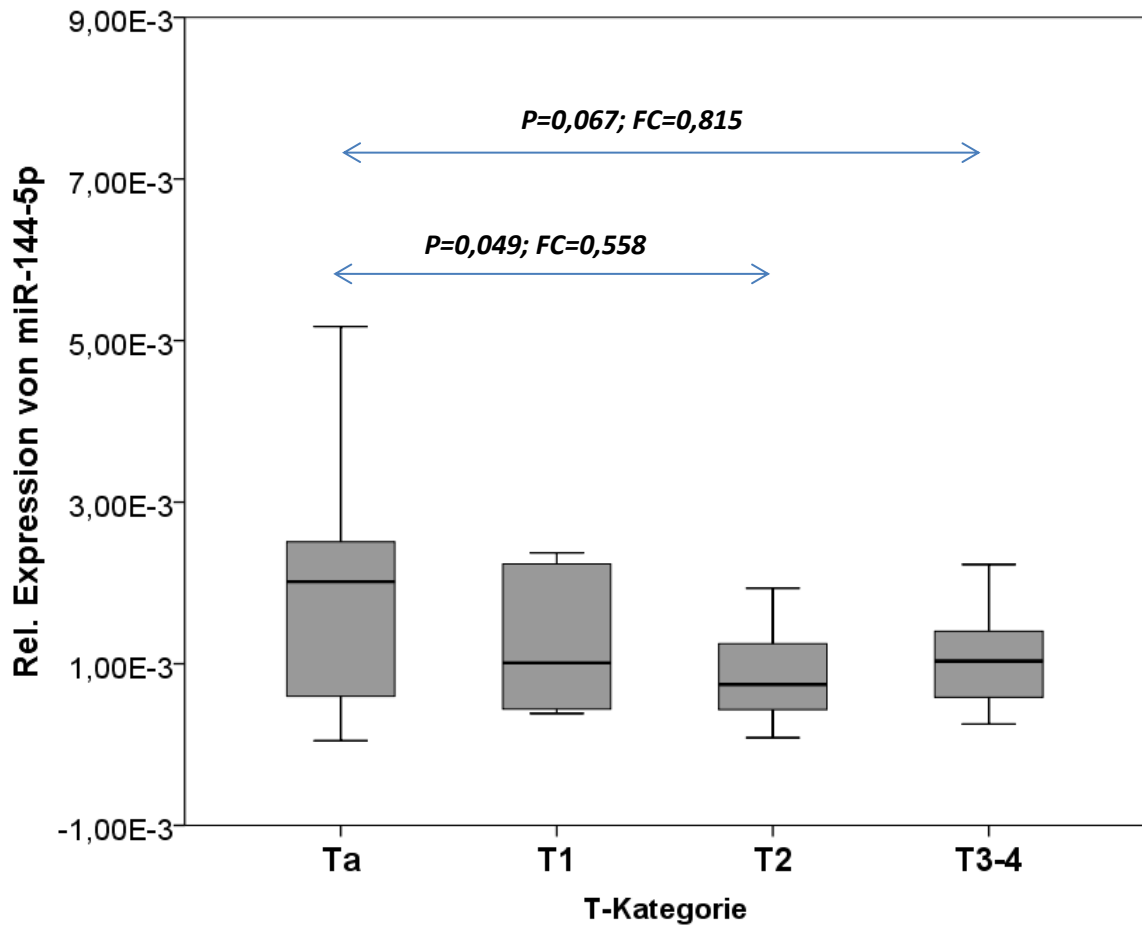
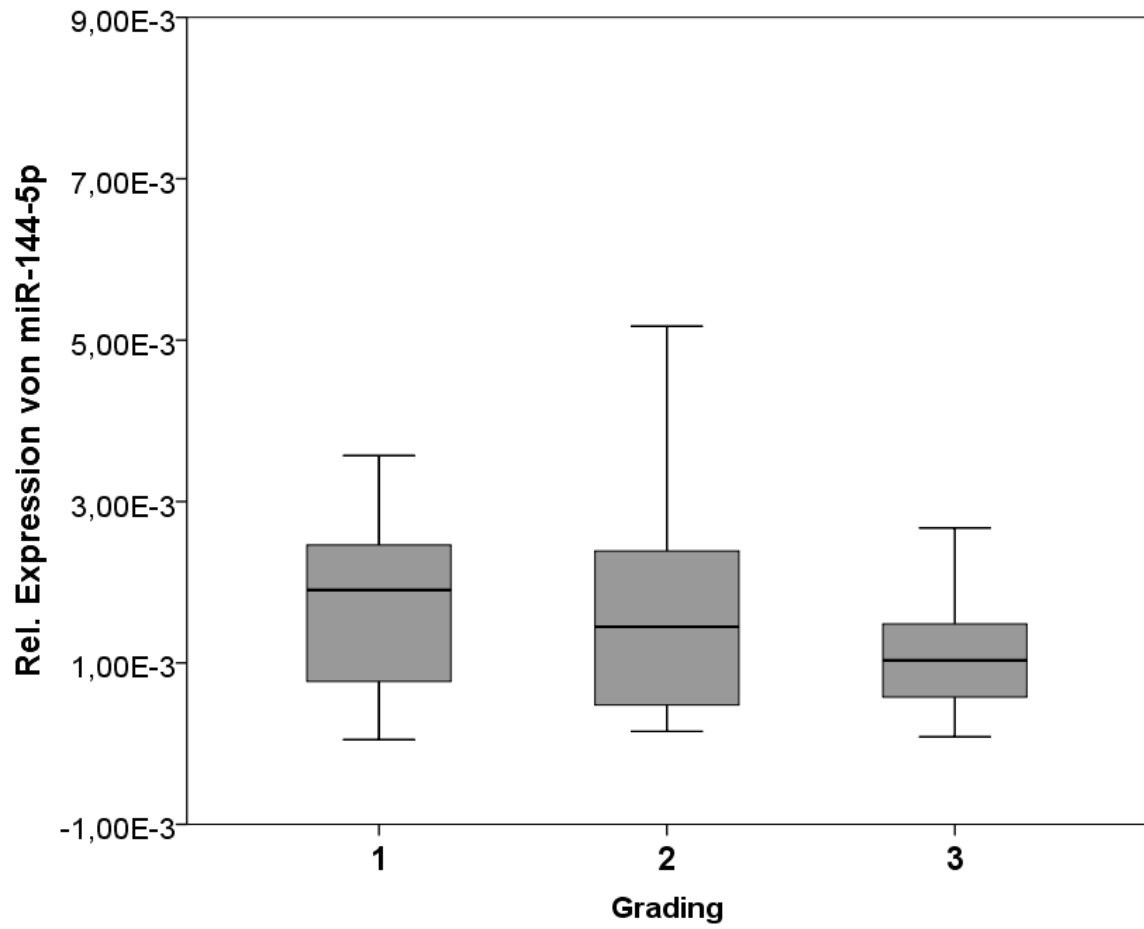


Abbildung 19: Erweiterte Validierung der miRNA 144-5p: Grading



## 4 Diskussion

Durch moderne Sequenzierungstechniken konnte in den letzten Jahren eine Vielzahl von miRNAs identifiziert werden. Die Gesamtzahl der bekannten miRNAs ist seit dem Jahr 2012 von ca. 2000 auf über 38.000 im Jahr 2021 ([www.mirbase.org](http://www.mirbase.org)) rasant gestiegen. Es wird angenommen, dass allein 2300 dieser miRNAs humane miRNAs sind.[1] Die spezifischen Funktionen der miRNAs sind Thema aktueller Forschung und noch bei vielen miRNAs nicht vollkommen aufgeklärt. Zunehmend ist ihre Rolle in der Karzinomentwicklung und Progression bekannt. Bis dato wurden bereits ca. 200 veränderte miRNAs allein im Harnblasenkarzinom beschrieben.[20]

Die im ersten Schritt der Arbeit durchgeführte technische Validierung konnte die Microarraydaten der sieben miRNAs durch die real time PCR-Analysen bestätigen. Es konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe von miRNA Analysen ein Harnblasenkarzinom genauer klassifiziert werden kann und muskelinvasive von nicht-muskelinvasiven Karzinomen unterschieden werden können. Auf Basis dieser Ergebnisse kann im klinischen Alltag die Diagnosesicherheit in Bezug auf die Tumorausdehnung und Klassifizierung verbessert werden. Diese Erkenntnis ist klinisch relevant, da ein Understaging in der Primärresektion oft vorkommt. Insbesondere bei primär pT1 Tumoren liegt die Understaging-Rate bei 34-70%[23]. In 50% der Nachresektionen kommt es zu einer höher Klassifizierung des Tumorstadiums [23].

Mit Hilfe einer miRNA Analyse des Primärpräparats könnte frühzeitig die Indikation zur kurativen radikalen Zystektomie mit Harnableitung gestellt werden. Den Patienten könnte eine weitere transurethrale Resektion erspart werden, diese aber auch vor Therapieverzögerung schützen.

Im zweiten Schritt konnte nach erfolgreicher Validierung die Aufschlüsselung nach T-Kategorie und Grading durchgeführt werden. Dabei zeigten die ausgewählten miRNAs unterschiedliche Expressionsmuster in Karzinomen verschiedenen pT-Stadien und unterschiedlichem Grading.

Es bestätigte sich, dass die miRNA 138-5p in invasiven Tumoren signifikant herabreguliert ist. Dies zeigte sich bei Betrachtung der T-Kategorien. Die miRNA

war signifikant herunterreguliert ab Stadium pT1. Ebenfalls konnte anhand der miRNA 138-5p eine verminderte Expression bei steigendem Grading nachgewiesen werden. Es ließ sich ein pTa Tumor von einem invasiven Karzinom ab pT1 differenzieren. Zudem war es möglich, ein G1 Harnblasenkarzinom von einem G2 oder G3 und sogar ein G2 von einem G3 Tumor zu unterscheiden. In den muskelinvasiven Karzinomen zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied der T-Kategorien.

Eine verminderte Expression der miRNA 138-5p korreliert offenbar mit einem höhergradigen und aggressiveren Phänotyp. Die Rolle der miRNA 138-5p in der Tumorgenese als Tumorsuppressor wurde bereits in früheren Arbeiten bei Urothelkarzinomen beschrieben[36]. Durch den Verlust der tumorsuppressiven Wirkung der miRNA kommt es zu einer Überexpression des Apoptose-Inhibitors Survivin und von Zinc finger E-box-binding homeobox 2 (ZEB2) [36]. Darüber hinaus reduziert die Überexpression der miRNA-138-5p die ZEB2-vermittelte Zellinvasion und Bildung von Metastasen, während eine Depletion der miRNA 138-5p die ZEB2 vermittelte Zellinvasion und Bildung von Metastasen im Harnblasenkarzinom erhöhte [36,44]. So stellt die miRNA 138-p einen Marker zu Charakterisierung der Invasivitätsfähigkeit generell dar, allerdings ließ sich nicht zwischen der Invasionstiefe unterscheiden. Im klinischen Alltag kann die miRNA 138-5p zur Unterscheidung eines low grade Karzinoms von höhergradigen Tumoren verwendet werden. Zeigt sich eine verminderte Expression der miRNA 138-5p, ist von einem invasiv wachsendem Karzinom auszugehen. In den aktuellen Leitlinien ist eine erweiterte Bildgebung bei einem Erstbefund eines nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms nur bei bestimmten Risikokonstellationen empfohlen. [31] Mit der Hilfe der miRNA 138-5p kann frühzeitig die Indikation zum erweiterten Staging gestellt werden und ggf. eine Nachresektion überflüssig machen.

Vergleicht man die T-Kategorien pT1, pT2 und pT3-4 der miRNA 144-5p untereinander, konnte keine klare Tendenz einer veränderten Expression abgeleitet werden. Eine Unterscheidung des Gradings war durch die Expressionsanalyse der miRNA 144-5p nicht möglich. Gut differenzierte

Harnblasenkarzinome ließen sich anhand der miRNA 144-5p von schlechter differenzierten nicht unterscheiden.

Aktuell ist über die Rolle der miRNA 144-5p in der Pathogenese des Urothelkarzinoms noch wenig bekannt. Bei anderen Tumorentitäten, wie dem Nierenzellkarzinom konnte eine frühere Arbeit zeigen, dass eine niedrige miRNA 144-5p Expression mit einer generell schlechteren Prognose einhergeht. Die miRNA144-5p wirkt im Nierenzellkarzinom als Tumorsuppressor in der Genachse mit dem Onkogen Syndecan 3 (SDC3). Eine hohe SDC3 Expression korreliert mit höherer Tumoraggressivität. [43] Weitere Arbeiten konnten die Rolle der miRNA 144-5p in der Tumorgenese bei plattenepithelialen Lungenkarzinomen und Oesophaguskarzinomen bestätigen. Auch hier zeigte sich eine schlechtere Prognose bei niedriger miRNA 144-5p Expression. [12,40] Es ist noch nicht erforscht, ob diese Mechanismen auf das Harnblasenkarzinom übertragen werden können. Anhand der Daten dieser Arbeit kann jedoch ein Zusammenhang möglich sein und die miRNA 144-5p zur Differenzierung eines MIHB von einem NMIHB herangezogen werden. Zudem zeigte sich insgesamt eine verminderte Expression bei invasiven Karzinomen ab pT1, auch wenn diese in den Analysen nur bei dem direkten Vergleich von pTa und pT2 Tumoren signifikant war. Somit kann die miRNA 144-5p auf ein invasives Wachstum hinweisen.

Aus den Ergebnissen geht hervor, dass die miRNA 146b-5p ein möglicher Marker für schlecht differenzierte Harnblasenkarzinome ist. Die Überexpression der miRNA 146b-5p konnte bereits in mehreren Arbeiten bei anderen Tumorentitäten nachgewiesen werden. Die Rolle der miRNA 146b-5p in Bezug auf das Urothelkarzinom ist allerdings weitestgehend unbekannt. [34] Im kolorektalen Karzinom (CRC) wirkt sie onkogen. Die miRNA 146b-5p beeinflusst direkt die Pyruvatdehydrogenase B (PDHB) am 3' UTR-Ende der RNA. Die PDHB wird durch die miRNA 146b-5p gehemmt. Es kommt zur gesteigerten Glykolyse in Karzinomzellen und unkontrolliertem Zellwachstum mit Zunahme der Invasivität. Erhöht man stattdessen die PDHB-Konzentration kommt es zur Hemmung der miRNA und einem gegenteiligen Effekt auf das Wachstum der Karzinomzellen im Sinne eines negativen Feedbacks. [46] Der

Einfluss der miRNA 146b-5p auf die Proliferation und Metastasierung konnte ebenfalls bei papillären Schilddrüsenkarzinomen nachgewiesen werden und dient bei diesen als Prädiktor für aggressives Wachstum. [45] Eine weitere Erforschung der miRNA 146b-5p in Bezug auf das Harnblasenkarzinom ist jedoch notwendig.

Anhand der miRNA 146b-5p ließ sich eine Diskriminierung für die Muskelinvasivität und Differenzierung ableiten. Ab pT2 und höher war ein signifikanter Anstieg nachzuweisen. Dieses Ergebnis ist klinisch relevant für die Therapieentscheidung und kann zur Vermeidung eines Understaging angewandt werden. Zudem konnte ein deutlicher Unterschied zwischen G1/G2 und G3 Tumoren in der miRNA 146b-5p Expression beobachtet werden. Folglich kann bei Überexpression der miRNA146-b ein muskelinvasives, schlecht differenziertes Karzinom angenommen werden. Mit dem Wissen, dass die miRNA 146b-5p bei Überexpression in anderen Tumorentitäten auf eine Metastasierung hinweist, könnte diese auch bei einem Harnblasenkarzinom als Indikator zum erweiterten Staging genutzt werden. Hierzu muss die Rolle der miRNA im Urothelkarzinom weiter erforscht werden.

Eine wichtige Erkenntnis ist, dass G3 Tumore eine Überexpression der miRNA 146-5p aufweisen. Dies ist insbesondere klinisch relevant zum Ausschluss eines high grade pT1 G3 Tumors. Des Weiteren wurden in dieser Arbeit keine urotheliale carcinoma in situ (CIS) untersucht, welche sich durch ein hohes Grading ausweisen. Da diese high grade Tumore, insbesondere multilokuläre, ein großes Progressionspotential in ein muskelinvasives Urothelkarzinom aufweisen, ist eine Frühzystektomie als Therapieoption zu diskutieren, obwohl per Definition noch keine Muskelinvasion vorliegt. Zudem kann eine therapeutische Instillationstherapie frühzeitig angeboten werden. Hierzu müssen weitere Versuche durchgeführt werden, da die Zahl der pT1 G3 Tumore in der Kohorte mit sechs Proben unterrepräsentiert war.

Die untersuchten Gewebe stammten hauptsächlich aus Zystektomiepräparaten. Dies machte eine genaue histologische Einteilung möglich, lässt aber offen, ob in durch transurethrale Resektion gewonnenen Präparaten ebenfalls eine genaue

Aussage über ihre Invasivität anhand der miRNA getroffen werden kann. Möglicherweise kann aus operationstechnischen Gründen wie z.B. thermischen Schäden oder inkompletter Resektion eine falsche Klassifizierung vorliegen.

Für eine unkomplizierte und nichtinvasive Anwendung von miRNA Analysen präoperativ wäre ein nichtinvasiver Test von miRNAs in Zukunft zur Diagnostik wünschenswert. Dies hätte zum einen Vorteile in Bezug auf die Patientencompliance und zum anderen können Ressourcen geschont und Kosten gespart werden.

Mit dem Wissen, dass eine Differenzierung von NMIHB von MIHB anhand der analysierten miRNA an Gewebeproben möglich ist, untersuchte unsere Arbeitsgruppe in einer fortführenden Arbeit extrazelluläre Vesikel aus Urinproben von Patienten mit Harnblasenkarzinom auf deren miRNA Signatur. Es konnte gezeigt werden, dass bei der miRNA 146b-5p und der miRNA 155-5p eine signifikante Überexpression im MIHB vorhanden ist. Anhand beider miRNA konnten pTa-Tumore von pT2-Tumoren unterschieden werden. Allerdings konnte keine Signifikanz bei dem Vergleich pTa zu pT3-4 nachgewiesen werden. Die Expression der beiden miRNAs war in den Urinproben der Kategorien pTa zu pT1 sowie pT1 zu pT2 nicht signifikant unterschiedlich. Ebenfalls wurde die miRNA 144-5p untersucht. Diese konnte jedoch nicht in den extrazellulären Vesikeln detektiert werden.[3]

Grundsätzlich waren die Ergebnisse im Hinblick auf eine zukünftige klinische Anwendung von miRNA-Analysen in Urinproben vielversprechend, um ein NMIHB von einem MIHB zu differenzieren. Die Analyse von Urinproben bietet mehrere Vorteile. Eine Urinprobe ist einfach zu gewinnen und bietet dem Patienten eine nichtinvasive Möglichkeit der Diagnostik und kann zu einer gesteigerten Patientencompliance beitragen. Zudem können thermische Schäden durch Koagulation oder Resektion die miRNA-Analyse nicht beeinträchtigen. Weiterhin können im Urin extrazelluläre Vesikel des gesamten Harntraktes nachgewiesen werden und so auf zystoskopisch nicht erreichbare Urothelkarzinome des oberen Harntraktes frühzeitig hinweisen. [3]

Des Weiteren können miRNA-Analysen im Urin in der Tumornachsorge relevant sein. Insbesondere nicht-muskelinvasive Harnblasenkazinome benötigen eine lebenslange zystoskopische Nachsorge. Dies macht das Urothelkarzinom laut einer Arbeit von Sanger et. Al von 2005 zur kostenintensivsten Entität aller malignen Erkrankungen. [23] Eine Überwachung der Patienten mit Hilfe von miRNAs als Biomarker für Rezidive kann somit diese immensen Kosten reduzieren und das Gesundheitssystem entlasten.

Ein weiterer wichtiger Faktor für zukünftige Untersuchungen der miRNA ist eine geeignete Referenz zur Normalisierung der miRNA Analysen. Die in dieser Arbeit verwendete small nucleolar RNA 48 (RNU48) wurde als eine der am häufigsten Referenzen für urotheliale Karzinome ausgewählt. Somit können die Ergebnisse mit anderen Arbeiten unkompliziert verglichen werden.[29]

Es gibt allerdings auch Einschränkungen durch das Verwenden von nur einer Referenz. Problematisch ist, dass die RNU48, wie auch andere Referenzmoleküle in ihrer Stabilität variieren und mit der Zeit in geringeren Konzentrationen in den Proben vorkommen als das zu untersuchende Zielmolekül. Aufgrund von Lagerung, der Aufarbeitung und dem Alter der Gewebeprobe können Veränderungen in der Expression in der PCR-Analyse auftreten. Bei der RNU48 handelt es sich nicht um eine miRNA, sondern um eine small nucleolar RNA, die eine geringere Stabilität bei der Lagerung in Paraffinpräparaten als die miRNA besitzt. Dies ist bei der Auswahl der Proben und der Auswertung zu berücksichtigen. [29] Um eine höhere Qualität der Normalisierung zu gewährleisten, empfiehlt es sich für zukünftige Analysen, mehrere miRNAs oder mehrere small nucleolar RNAs zu verwenden, welche den Eigenschaften der zu untersuchenden miRNA in Bezug auf Haltbarkeit und Aufarbeitung bzw. Weiterbearbeitung ähneln[5]. N. Ratert et al. haben hierzu bereits einige mögliche Kombinationen vorgeschlagen. [29] Zur Expressionsanalyse wurden in dieser Arbeit paraffineingebettete Präparate von Zystektomiepatienten verwendet. Es muss weiter untersucht werden, ob Proben aus Urin oder Blut bzw. eine Resektionsproben vergleichbare miRNA Profile nachzuweisen sind.



Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass ein Urothelkarzinom anhand des miRNA Profils charakterisiert werden kann. Es konnte bestätigt werden, dass die Differenzierung eines nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms von einem muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms möglich ist. Anhand der drei ausgewählten miRNAs für die erweiterte Validierung konnte zudem Unterschiede zwischen den T-Kategorien und dem Grading bestätigt werden. Somit kann mit der Bestimmung des miRNA-Profiles eines Harnblasenkarzinoms eine genaue Charakterisierung nach T-Kategorie und Grading erfolgen. Aus den Ergebnissen geht hervor, dass es wichtig sein wird, eine geeignete Kombination an miRNAs zu verwenden um die T-Kategorie und das Grading definieren zu können. Einige miRNAs haben das Potenzial eine Invasion der Lamina propria anzuzeigen, wobei andere mit einer Muskelinvasion und schlechter Differenzierung in Zusammenhang gebracht werden können. Somit kann eine genauere Risikostratifizierung erfolgen und mehr Patientensicherheit gewonnen werden. Zudem kann frühzeitig eine weitere Diagnostik oder eine frühzeitige Therapieeskalation eingeleitet werden.

Betrachtet man den demografischen Wandel ist von einer Zunahme der Inzidenz für das Harnblasenkarzinom auszugehen, somit auch die erheblichen Kosten der aufwendigen Tumornachsorge nach TUR-B. Durch ein Tumorprofiling mit Hilfe von miRNA-Analysen kann die Therapie und Tumornachsorge effektiv Kosten senken, vor Therapieverzögerung schützen und ermöglicht eine individualisierte Medizin. In dieser Arbeit konnten einige mögliche miRNAs identifiziert werden. Es sind allerdings weitere Studien an größeren Kohorten notwendig, um die Profile für den klinischen Alltag zu etablieren.

## References

1. Alles J, Fehlmann T, Fischer U et al (2019) An estimate of the total number of true human miRNAs. *Nucleic Acids Res* 47(7): 3353–3364
2. Bartel D P (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116(2): 281–297
3. Baumgart S, Meschkat P, Edelmann P et al (2019) MicroRNAs in tumor samples and urinary extracellular vesicles as a putative diagnostic tool for muscle-invasive bladder cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 145(11): 2725–2736
4. Burger M, Catto J W F, Dalbagni G et al (2013) Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. *Eur Urol* 63(2): 234–241
5. Bustin S A, Benes V, Garson J A et al (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 55(4): 611–622
6. Colt J S, Friesen M C, Stewart P A et al (2014) A case-control study of occupational exposure to metalworking fluids and bladder cancer risk among men. *Occup Environ Med* 71(10): 667–674
7. Di Stasi S M, Giannantoni A, Giurioli A et al (2006) Sequential BCG and electromotive mitomycin versus BCG alone for high-risk superficial bladder cancer. *Lancet Oncol* 7(1): 43–51
8. Enokida H, Yoshino H, Matsushita R et al (2016) The role of microRNAs in bladder cancer. *Investig Clin Urol* 57 Suppl 1(Suppl 1): S60-76
9. Europe PMC Funders (01.07.2013) miRNAs and Cancer: an Epigenetics View. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5791883/>. Accessed 6 Jun. 2018
10. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R et al (2015) Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 136(5): E359-86
11. Freedman N D, Silverman D T, Hollenbeck A R et al (2011) Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women. *JAMA* 306(7): 737–745
12. Gao Z, Zhang P, Xie M et al (2018) miR-144/451 cluster plays an oncogenic role in esophageal cancer by inhibiting cell invasion. *Cancer cell international* 18: 184
13. Giesbers A A, van Helsdingen P J, Kramer A E (1989) Recurrence of superficial bladder carcinoma after intravesical instillation of mitomycin-C. Comparison of exposure times. *Br J Urol* 63(2): 176–179
14. Guo A, Wang X, Gao L et al (2014) Bladder tumour antigen (BTA stat) test compared to the urine cytology in the diagnosis of bladder cancer: A meta-analysis. *Canadian Urological Association journal = Journal de l'Association des urologues du Canada* 8(5-6): E347-52
15. Heidenreich A, Albers P, Classen J et al (2010) Imaging studies in metastatic urogenital cancer patients undergoing systemic therapy. *Urol Int* 85(1): 1–10

16. Humphrey P A, Moch H, Cubilla A L et al (2016) The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part B: Prostate and Bladder Tumours. *Eur Urol* 70(1): 106–119
17. Jimenez R E, Gheiler E, Oskanian P et al (2000) Grading the invasive component of urothelial carcinoma of the bladder and its relationship with progression-free survival. *Am J Surg Pathol* 24(7): 980–987
18. Knowles M A, Hurst C D (2015) Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity. *Nat Rev Cancer* 15(1): 25–41
19. Lee Y S, Dutta A (2009) MicroRNAs in cancer. *Annu Rev Pathol* 4: 199–227
20. Li Q, Wang H, Peng H et al (2019) MicroRNAs: Key Players in Bladder Cancer. *Molecular diagnosis & therapy* 23(5): 579–601
21. Maase H von der, Hansen S W, Roberts J T et al (2000) Gemcitabine and cisplatin versus methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin in advanced or metastatic bladder cancer: results of a large, randomized, multinational, multicenter, phase III study. *J Clin Oncol* 18(17): 3068–3077
22. Malmstrom P-U, Sylvester R J, Crawford D E et al (2009) An individual patient data meta-analysis of the long-term outcome of randomised studies comparing intravesical mitomycin C versus bacillus Calmette-Guerin for non-muscle-invasive bladder cancer. *Eur Urol* 56(2): 247–256
23. Michel M S, Thüroff W J, Janetschek G, eds. *Die Urologie*. Springer
24. Pesch B, Taeger D, Johnen G et al (2014) Screening for bladder cancer with urinary tumor markers in chemical workers with exposure to aromatic amines. *Int Arch Occup Environ Health* 87(7): 715–724
25. Piletic K, Kunej T (2016) MicroRNA epigenetic signatures in human disease. *Arch Toxicol* 90(10): 2405–2419
26. Ploeg M, Kiemeny L A L M, Smits G A et al (2012) Discrepancy between clinical staging through bimanual palpation and pathological staging after cystectomy. *Urol Oncol* 30(3): 247–251
27. Pollard C, Smith S C, Theodorescu D (2010) Molecular genesis of non-muscle-invasive urothelial carcinoma (NMIUC). *Expert Rev Mol Med* 12: e10
28. PubMed Central (PMC) (21.08.2020) Molecular genesis of non-muscle-invasive urothelial carcinoma (NMIUC). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3025483/figure/F1/>. Accessed 21 Aug. 2020
29. Ratert N, Meyer H-A, Jung M et al (2012) Reference miRNAs for miRNAome analysis of urothelial carcinomas. *PLoS one* 7(6): e39309
30. Robert Koch-Institut Krebs in Deutschland | 2015/2016 | Harnblase C67
31. S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms (Version 2.0)
32. Schaefer A, Jung M, Kristiansen G et al (2010) MicroRNAs and cancer: current state and future perspectives in urologic oncology. *Urol Oncol* 28(1): 4–13

33. Schlake A, Crispen P L, Cap A P et al (2012) NMP-22, urinary cytology, and cystoscopy: a 1 year comparison study. *The Canadian journal of urology* 19(4): 6345–6350
34. Song T, Xia W, Shao N et al (2010) Differential miRNA expression profiles in bladder urothelial carcinomas. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* 11(4): 905–911
35. Stenehjem D D, Tran D, Nkrumah M A et al (2018) PD1/PDL1 inhibitors for the treatment of advanced urothelial bladder cancer. *Onco Targets Ther* 11: 5973–5989
36. Sun D-K, Wang J-M, Zhang P et al (2015) MicroRNA-138 Regulates Metastatic Potential of Bladder Cancer Through ZEB2. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 37(6): 2366–2374
37. Sylvester R J, Brausi M A, Kirkels W J et al (2010) Long-term efficacy results of EORTC genitourinary group randomized phase 3 study 30911 comparing intravesical instillations of epirubicin, bacillus Calmette-Guerin, and bacillus Calmette-Guerin plus isoniazid in patients with intermediate- and high-risk stage Ta T1 urothelial carcinoma of the bladder. *Eur Urol* 57(5): 766–773
38. Sylvester R J, Oosterlinck W, Holmang S et al (2016) Systematic Review and Individual Patient Data Meta-analysis of Randomized Trials Comparing a Single Immediate Instillation of Chemotherapy After Transurethral Resection with Transurethral Resection Alone in Patients with Stage pTa-pT1 Urothelial Carcinoma of the Bladder. *Eur Urol* 69(2): 231–244
39. Sylvester R J, Oosterlinck W, van der Meijden A P M (2004) A single immediate postoperative instillation of chemotherapy decreases the risk of recurrence in patients with stage Ta T1 bladder cancer. *J Urol* 171(6 Pt 1): 2186-90, quiz 2435
40. Uchida A, Seki N, Mizuno K et al (2019) Involvement of dual-strand of the miR-144 duplex and their targets in the pathogenesis of lung squamous cell carcinoma. *Cancer Sci* 110(1): 420–432
41. van Rhijn B W G, van der Poel H G, van der Kwast T H (2005) Urine markers for bladder cancer surveillance. *Eur Urol* 47(6): 736–748
42. Vishnoi A, Rani S (2017) MiRNA Biogenesis and Regulation of Diseases: An Overview. *Methods Mol Biol* 1509: 1–10
43. Yamada Y, Arai T, Kojima S et al (2018) Regulation of antitumor miR-144-5p targets oncogenes: Direct regulation of syndecan-3 and its clinical significance. *Cancer Sci* 109(9): 2919–2936
44. Yang R, Liu M, Liang H et al (2016) miR-138-5p contributes to cell proliferation and invasion by targeting Survivin in bladder cancer cells. *Molecular cancer* 15(1): 82
45. Yu C, Zhang L, Luo D et al (2018) MicroRNA-146b-3p Promotes Cell Metastasis by Directly Targeting NF2 in Human Papillary Thyroid Cancer. *Thyroid* 28(12): 1627–1641
46. Zhu Y, Wu G, Yan W et al (2017) miR-146b-5p regulates cell growth, invasion, and metabolism by targeting PDHB in colorectal cancer. *Am J Cancer Res* 7(5): 1136–1150

## 5 Anhang

Tabelle 14: Schwellenwert-Zyklus (cycle threshold /CT-Werte) der miRNA-Proben in der qRT-PCR

Pathologienummer. RNA Isolation	RNU48	miR-144-5p	miR-138-5p	miR-146b-5p
12932/15 I G	27,30	38,16	32,64	29,80
22338/13	26,65	36,18	30,47	32,37
7679/15 III i	28,39	x	32,55	29,94
1437-13 II	28,43	37,24	38,86	33,22
2351/13 I F	28,29	37,96	33,27	30,43
19841/14 I F	28,72	38,28	37,23	30,88
10060/13 I H	28,90	37,92	33,40	30,09
8096/13 I i	28,35	37,16	36,51	28,93
28322/15	26,04	38,71	31,79	31,75
26551/15 I	28,21	35,80	33,38	30,58
29796/13 III G	27,32	38,66	33,33	31,14
11853-15	28,56	37,28	31,00	32,26
20393/15 III	26,61	34,97	30,63	33,18
23473-13	27,12	36,07	30,94	31,57
17931/13 I	28,50	37,46	30,62	31,76
583/12 (13)	28,02	35,76	34,81	32,72
583-13	27,38	36,20	33,70	31,73
15090-02	29,46	39,34	35,35	31,08
11204/13	27,97	36,64	34,76	33,55
727/16 I F	26,69	35,76	36,81	31,72
23078/14	26,23	37,58	33,00	32,18
12170/15	28,10	36,80	30,86	32,25
4737/15 I k	27,49	39,43	35,90	29,15
2993/16 (1)	26,88	35,28	30,60	32,33
4225/13 II	27,30	35,96	30,00	32,26
20753/15 I k	27,28	40,81	32,11	29,78
15828/13 III F	28,14	37,23	36,10	29,28
8300-15	25,97	36,50	29,52	32,94
9261/14	28,32	37,22	33,60	32,46
8125/14	26,67	36,57	32,80	31,52
3722/15 II	27,30	35,85	31,91	32,15
21704/13 V	27,51	41,83	31,38	32,47
18006-15	26,62	38,46	30,49	31,96
8457/15	28,53	40,91	38,64	32,12
20816/15 III	26,81	38,02	29,00	32,48
21724/13 I K	29,18	39,82	34,23	31,06
4657-15	26,72	35,42	32,77	31,47

2069/14 I i	28,66	38,70	36,20	31,20
23818/15 I F	26,65	36,09	33,28	28,71
8924-14	28,01	39,12	36,32	30,91
13190/15 I	27,15	36,27	30,96	31,70
28975/15	27,18	38,10	32,94	33,26
23775/15 I L	28,01	38,13	36,76	30,15
8206/15 I	25,98	38,27	29,71	30,24
8976/15 I R	26,71	37,74	32,88	30,08
27228/14 III H	27,23	36,98	34,15	29,50
25579/15 1	26,58	35,59	32,30	32,38
24854-13	28,31	38,31	32,71	32,81
2740/16 I i	27,21	37,93	34,27	30,32
16483/15 I E	28,57	37,97	33,23	28,77
24301/15 II	25,52	36,67	30,76	33,62
13474-15	26,48	35,10	30,88	32,22
1480/14	26,96	36,83	30,06	33,63
15982/15 I	26,60	36,89	30,96	30,34
927/16 I i	26,07	36,94	33,27	30,06
4589-15	27,73	37,65	35,05	27,50
26224/14 II M	27,88	38,64	34,70	29,12

Patho Nt. RNA Isolation	RNU48	miR-29c-5p	miR-650	miR-127-3p	miR-155-5p
12932/15 I G	27,30	35,61	32,88	32,74	29,65
22338/13	26,65	33,48	37,26	35,15	31,31
7679/15 III i	28,39	37,68	33,92	34,02	29,07
19841/14 I F	28,72	38,17	35,25	34,11	30,45
26551/15 I	28,21	35,58	32,94	33,82	29,07
29796/13 III G	27,32	35,20	34,19	33,95	28,75
17931/13 I	27,97	35,78	36,16	35,90	32,70
15090-02	28,10	35,40	32,20	36,35	30,89
727/16 I F	26,88	33,94	37,06	33,43	31,36
12170/15	27,28	38,38	33,05	33,24	28,94
2993/16 (1)	28,32	35,82	35,79	35,11	29,97
15828/13 III F	27,51	35,26	35,59	34,09	31,17
9261/14	29,18	38,78	33,93	32,74	31,57
8125/14	28,66	37,36	35,31	33,59	30,97
3722/15 II	26,65	34,33	33,52	31,66	29,47
24190-13	27,15	35,61	36,71	33,67	30,96
21704/13 V	27,18	35,54	34,77	36,53	32,01
18006-15	28,01	35,14	33,75	34,34	30,87
20816/15 III	26,71	36,39	32,97	32,58	28,56

21724/13 I K	27,23	35,02	31,95	31,22	28,52
2069/14 I i	29,18	38,78	33,93	32,74	31,57
23818/15 I F	27,21	37,03	34,15	33,18	29,87
28975/15	28,57	35,67	34,27	32,19	28,83
23775/15 I L	27,88	37,27	33,69	31,99	29,70
15982/15 I	28,02	37,62	35,06	34,85	30,71

Patho Nt. RNA Isolation	RNU48	miR-155-5p
12932/15 I G	26,85	29,40
22338/13	26,44	31,24
7679/15 III i	27,49	28,34
1437-13 II	27,85	31,05
2351/13 I F	27,71	30,90
19841/14 I F	28,06	29,23
10060/13 I H	29,17	30,12
8096/13 I i	28,73	29,81
28322/15	26,15	31,17
26551/15 I	27,48	27,78
29796/13 III G	27,23	28,22
11853-15	26,28	31,50
20393/15 III	28,40	27,81
17931/13 I	27,70	32,60
583/12 (13)	26,82	29,87
583-13	26,16	31,29
15090-02	27,47	29,41
11204/13	27,32	29,33
727/16 I F	26,53	31,20
23078/14	27,29	30,08
12170/15	29,91	31,03
4737/15 I k	28,85	29,77
2993/16 (1)	27,42	28,59
4225/13 II	27,13	30,43
20753/15 I k	27,20	29,52
15286-14	28,73	33,06
8300-15	26,44	31,15
9261/14	28,65	31,50
8125/14	29,09	30,41
3722/15 II	26,75	29,43
21704/13 V	27,32	31,47
18006-15	27,70	30,88
8457/15	26,26	30,29

20816/15 III	26,85	28,71
21724/13 I K	26,79	28,01
4657-15	26,78	32,40
2069/14 I i	27,24	28,53
23818/15 I F	27,70	28,13
8924-14	25,63	31,08
13190/15 I	27,10	31,23
28975/15	26,48	29,10
23775/15 I L	27,30	29,54
8976/15 I R	29,52	30,88
27228/14 III H	26,20	32,49
25579/15 1	27,67	31,50
2740/16 I i	27,31	30,26
16483/15 I E	26,39	30,78
24301/15 II	26,85	29,89
1480/14	27,80	27,44
15982/15 I	27,56	29,61
927/16 I i	29,26	31,19
20995-14	26,61	30,26
26224/14 II M	28,01	29,97



## 6 Publikationen

Baumgart S, Meschkat P, Edelmann P, Heinzelmann J, Prylukhin A, Bohle R, Heinzlbecker J, Stöckle M, Junker K.

- MicroRNAs in tumor samples and urinary extracellular vesicles as a putative diagnostic tool for muscle-invasive bladder cancer.
- J Cancer Res Clin Oncol. 2019 Nov;145(11):2725-2736. doi: 10.1007/s00432-019-03035-6 . Epub 2019 Sep 24. PMID: 31552489 .

## 7 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt an dieser Stelle Frau Prof. Dr. med. Junker für die Möglichkeit der Anfertigung meiner Dissertation an der urologischen Klinik für Urologie und Kinderurologie der Universität des Saarlandes im urologischen Forschungslabor für klinische und experimentelle Forschung. Vielen Dank für die engagierte Betreuung, das spannende, zukunftsorientierte Thema und Unterstützung während der Ausarbeitung dieser Promotionsarbeit.

Außerdem möchte ich mich herzlich bei den Mitarbeitern des Forschungslabors und insbesondere Frau Dr. nat. Sophie Baumgart für die engmaschige, kompetente Betreuung, sowie die unkomplizierte Einarbeitung und Hilfestellung während der Experimente im Labor bedanken.

Außerdem möchte ich meiner Familie und meinen Freunden danken, welche mich während des Studiums und der Arbeit an der Dissertation unterstützt und motiviert haben.

## **8 Lebenslauf**

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

## **9 Kolloquiumsvermerk**

Tag der Promotion: 23.11.2022

Dekan: Prof. Dr. M.D. Menger

Berichterstatter: Prof. K. Junker  
Prof. E. Meese

