

Tumormarker beim klarzelligem Nierenzellkarzinom: Welches Potential besitzen micro-RNAs?

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Benedikt Constantin Jakob Ewig

aus Bonn

2021

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Jörg Ellinger
2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. h.c. Alexander Mustea

Tag der Mündlichen Prüfung: 28. April 2021

Aus der Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie
Direktor: Prof. Dr. med. Manuel Ritter

Meinen Eltern.

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	7
1.	Einleitung.....	10
1.1	Klarzelliges Nierenzellkarzinom.....	10
1.1.1	Epidemiologie.....	10
1.1.2	Ätiologie	11
1.1.3	Anatomie und Morphologie.....	12
1.1.4	Klassifikation	13
1.1.5	Diagnostik	14
1.1.6	Therapie.....	15
1.2	Tumormarker.....	16
1.3	MicroRNA.....	16
1.3.1	Geschichte	16
1.3.2	Biogenese von microRNA.....	17
1.3.3	microRNA als Tumorsuppressorgene und Onkogene.....	18
1.3.4	microRNA als Tumormarker	19
1.4	Zielsetzung.....	20
2.	Material und Methoden	21
2.1	Material	21
2.1.1	Geräte	21
2.1.2	Labormaterialien.....	22
2.1.3	Chemikalien	22
2.1.4	Kits.....	23
2.1.5	Primer	23
2.1.6	Probenmaterial	24
2.1.7	Positivkontrollen	24

2.1.8	Lösungen	25
2.1.9	Software	25
2.2	Methoden	25
2.2.1	Probensammlung	25
2.2.2	RNA-Isolation aus Serum	26
2.2.3	cDNA-Synthese.....	27
2.2.4	Präamplifikation.....	28
2.2.5	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	29
2.2.6	Quantifizierung der Messergebnisse	35
2.2.7	Statistische Auswertung	36
3.	Ergebnisse	38
3.1	Patientenkollektiv	38
3.2	cel-miR 39- Wiederfindung	39
3.3	Primeroptimierung.....	39
3.4	Expression der microRNAs in Seren mit klarzelligem Nierenzellkarzinom und in Seren der gesunden Kontrollgruppe	41
3.5	Korrelation micro-RNA-Expression und Tumorstadium.....	46
4.	Diskussion	47
5.	Zusammenfassung	57
6.	Abbildungsverzeichnis	58
7.	Tabellenverzeichnis	59
8.	Literaturverzeichnis	60
9.	Danksagung	66

Abkürzungsverzeichnis

3'-UTR	nicht translatierter Bereich des 3'-Terminus
AP	Alkalische Phosphatase
AQP1	Proteine Aquaporin-1
AUC	Area under the curve
BPS	Benignes Prostatasyndrom
ccRCC	clear cell renal cell carcinoma, klarzelliges Nierenzellkarzinom
cDNA	complementary DNA, komplementäre DNA
CIO	Centrum für Integrative Onkologie Köln-Bonn
CRC	Colorectal cancer, kolorektales Karzinom
Ct	Cycle threshold
CT	Computertomographie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
gDNA	genomische DNA
GEKID	Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland
GK	gesunde Kontrollgruppe
HIF1 α	Hypoxie-induzierenden Faktor 1 α
ISUP	International Society of Urological Pathology
MDR-1	multi drug resistance protein-1
microRNA	micro Ribonukleotid Acid, micro Ribonukleotidsäure
miR	microRNA

mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	multiple Sklerose
MW	Mittelwert
noRT	No-Reverse Transcriptase-Control, Kontrolle ohne Transkriptase
NSCLC	non small cell lung carcinoma, nichtkleinzelliges Lungenkarzinom
nt	Nukleotid
NTC	No-Template-Control, Kontrolle ohne Template
PCR	Polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
PLIN2	Perilipin-2
Poly (A)	Polyadenylierung
pre-miRNA	Precursor micro Ribonukleinsäure
pri-miRNA	primary-micro Ribonukleinsäure
RCC	Renal cell carcinoma, Nierenzellkarzinom
RKI	Robert-Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROC	Receiver Operating Characteristic
ROX	Carboxy Rhodamin X
RT	Reverse Transkription (-reaktion)
SD	Standard deviation, Standardabweichung
Taq	Thermus aquaticus
UICC	Union International Contre le Cancer

UNG	Uracil-N-Glycosylase
VHL	Von-Hippel-Lindau, Von-Hippel-Lindau
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1 Klarzelliges Nierenzellkarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Tumorerkrankungen der Niere stellen in Deutschland mit 3,8 % aller Krebserkrankungen die sechsthäufigste Krebserkrankung bei Männern dar, bei Frauen war sie mit 2,4 % die zehnthäufigste Krebserkrankung (Robert-Koch Institut 2018a; Robert-Koch-Institut 2018b). Mit 68 Jahren liegt das mittlere Erkrankungsalter bei Männern etwas unter dem bei Frauen (72 Jahre). Insgesamt tritt eine Erkrankung bei Männern im bundesdeutschen, altersstandardisierten Durchschnitt fast doppelt so häufig auf wie bei Frauen (Robert-Koch Institut 2018a). Nach Europastandard bedeutet dies eine Inzidenz von 16,5 pro 100.000 Männer und eine Inzidenz von 7,8 pro 100.000 Frauen.

In den letzten Jahren konnte ein Anstieg der absoluten Neuerkrankungen durch das Robert-Koch-Institut (RKI) und durch die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland (GEKID) festgestellt werden, während die altersstandardisierte Inzidenz bei Männern und Frauen jedoch unverändert blieb (2013: Männer 16,6 und Frauen 8,0 pro 100.000; 2014: Männer 16,5 und Frauen 7,8 pro 100.000). Für 2018 wird prognostisch ein leichter Rückgang der Inzidenz in Deutschland erwartet (Männer: 16,3 pro 100.000 Einwohner; Frauen: 7,3 pro 100.000 Einwohner). Die Zahl der absoluten Sterbefälle blieb bei beiden Geschlechtern relativ konstant, wohingegen die altersstandardisierte Sterberate einen fallenden Trend zeigte.

Über 50 % der Nierentumore werden zufällig im Rahmen der Untersuchungen bei einer anderen Erkrankung entdeckt. Laut RKI fallen bei der Erstdiagnose zwei Drittel der Patienten unter die T1-Klassifikation (Männer 65 %, Frauen 67 %); etwa 10 % unter die T2-Klassifikation (Männer 9 %, Frauen 10 %). Geschlechterübergreifend entfallen knapp ein Viertel aller Erkrankungen auf das T3- (Männer 23 %, Frauen 21 %) oder T4-Stadium (Männer und Frauen je 2 %). Die relative 5-Jahres-Überlebensrate lag für 2013 und 2014 geschlechterübergreifend bei 77 %, die 10-Jahres-Überlebensrate bei 70 % (Männer) bzw. 71 % (Frauen).

Im internationalen Vergleich der Neuerkrankungsrate in westlichen Ländern belegt Deutschland den 4. Platz (Männer) bzw. den 5. Platz (Frauen), während gleichzeitig die

deutsche Sterberate im internationalen Vergleich verhältnismäßig niedrig liegt. Statistisch betrachtet fällt eine hohe Erkrankungs- und Sterberate insbesondere in Tschechien, aber auch in den neuen Bundesländern auf.

Ein Screening ist in Deutschland aufgrund der niedrigen Inzidenz, der unspezifischen diagnostischen Verfahren und einer hohen Prävalenz für benigne Nierentumore ohne größeren Krankheitswert nicht etabliert. Ein Problem stellt die lange Zeit fehlende Symptomatik bei den Betroffenen dar. Zwar werden zwei Drittel der Patienten in einem T1- oder T2-Stadium diagnostiziert, jedoch geschieht dies in über 50 % der Fälle zufällig und gut 25 % der Patienten werden mit einem T3-Stadium oder schlechter diagnostiziert. Klinische Symptome wie Flankenschmerz, Hämaturie, tastbarer Tumor oder eine B-Symptomatik treten erst in einem fortgeschrittenen Tumorstadium auf. Aktuell wird Patienten, die an einer terminalen Niereninsuffizienz, einer tuberösen Hirnsklerose, dem Von-Hippel-Lindau-Syndrom oder an zystischen Nierenerkrankungen leiden, empfohlen, regelmäßige Kontrolluntersuchungen durchführen zu lassen. Diese Patientengruppen haben ein erhöhtes Risiko, an einem Nierenkarzinom zu erkranken (Manski 2017).

1.1.2 Ätiologie

Es lassen sich benigne von malignen Veränderungen der Niere unterscheiden. Zu den benignen Raumforderungen der Niere zählen das Onkozytom und das Angiomyolipom. Bei den malignen Veränderungen der Niere sind die häufigsten Subtypen das klarzellige Nierenzellkarzinom (ccRCC, clear cell renal cell carcinoma), welches 80 % der Nierenkarzinome ausmacht, das papilläre (10 %) und das chromophobe (5 %) Karzinom der Niere. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird hauptsächlich auf das ccRCC eingegangen.

Das ccRCC entsteht als Adenokarzinom aus dem Epithel des proximalen Tubulus des Nephrons (Manski 2017). Zu den Risikofaktoren für das Nierenzellkarzinom wurde verschiedene Faktoren nachgewiesen: Ein Nikotinabusus sowie ein niedriger Sozialstand begünstigen die Entstehung eines ccRCC ebenso wie eine Grunderkrankung einer Niereninsuffizienz, Adipositas oder arteriellen Hypertonie

(Manski 2017). Ein genetischer Risikofaktor liegt bei Verwandten ersten Grades eines ccRCC-Patienten vor. Diese Personengruppe hat ein doppelt so hohes Risiko ebenfalls zu erkranken (RKI, 2014). Auch verschiedene genetische Syndrome wie das Von-Hippel-Lindau-Syndrom, das Birt-Hogg-Dubé-Syndrom oder die tuberöse Hirnsklerose gelten als Risikofaktoren für ein ccRCC. Etwa 75 % der ccRCC-Patienten weisen eine Von-Hippel-Lindau-Mutation auf. Des Weiteren konnte für die Toxine Trichlorethen, Cadmium, Blei, petrochemische Substanzen und Teer eine begünstigende Rolle für die Erkrankung an einem ccRCC beschrieben werden. Alkoholkonsum und Sport scheinen eine protektive Wirkung zu haben (Manski 2017)

1.1.3 Anatomie und Morphologie

Die malignen Tumoren der Niere (Nierenkarzinome) können wie folgt unterteilt werden: 10 % sind papilläre , 5 % chromophobe Nierenzellkarzinome; einen geringen Anteil machen weitere Subtypen des Nierenzellkarzinoms wie beispielsweise das Sammelrohrkarzinome, das medullärzellige Nierenzellkarzinome, das Succinat-Dehydrogenasemangel-Nierenzellkarzinom, das erworbene, mit Nierenzysten assoziierte Nierenzellkarzinom , sowie das muzinöse tubuläre und spindelzellförmige Karzinome aus (Deng 2020). Das klarzellige Nierenzellkarzinom (ccRCC, clear cell renal cell carcinoma) stellt mit 70-80 % das mit Abstand häufigste Nierenzellkarzinom dar.

Nierenkarzinome können Größen von wenigen Zentimetern bis größer als 10 cm annehmen und werden bei Begrenzung auf das Nierenparenchym als T1- bzw. T2-Stadium diagnostiziert. Ein infiltratives Wachstum in die Nierenvene besteht bei 10 % der Fälle (Tumorstadium T3b & T3c). Eine Metastasierung folgt meist der Reihenfolge Lunge, Weichteile (lumbale Lymphknoten, Muskeln), Knochen, Leber, ZNS und Haut. Ein Nierentumor metastasiert meist erst hämatogen und danach lymphogen.

Stellt sich der Tumor makroskopisch typischerweise mit einer gelb-braunen Schnittfläche dar, so erscheint er unter dem Mikroskop nach konventionellen Färbeverfahren klar, was durch eingelagertes Glykogen und Fette entsteht.

1.1.4 Klassifikation

Die verschiedenen Stadien des Nierenzellkarzinoms werden nach der TNM-Klassifikation eingeteilt (siehe Tabelle 1 und 2). „T“ beschreibt die Tumorgröße und die Ausdehnung des Tumors vom Ursprungsort ausgehend. Ob ein oder mehrere Lymphknoten von einer Absiedlung des Tumors befallen sind, wird durch „N“ ausgedrückt. „M“ gibt den Status einer Metastasenbildung in einem anderen Organ oder in einem nicht-regionären Lymphknoten an. Die UICC-Tumorstadieneinteilung (siehe Tab. 2) kombiniert unterschiedliche Kriterien der TNM-Klassifikation und fasst diese zur Erhaltung der besseren Übersicht zusammen. Das Fuhrmann-Grading beschreibt den histologischen Typ des Tumors und ob dieser gut, mäßig, schlecht oder undifferenziert ist (siehe Tabelle 3).

Tab. 1: TNM-Klassifikation nach den Kriterien der Union international contre le cancer (UICC)

Tumorstadium	Merkmal
T1 Tumor begrenzt auf Niere, < 7 cm	T1a: Tumor < 4 cm T1b: Tumor > 4 cm bis < 7 cm
T2 Tumor begrenzt auf Niere, > 7 cm	T2a: Tumor 7 cm bis 10 cm T2b: Tumor > 10 cm
T3 Tumor infiltriert perirenales Fettgewebe oder breitet sich in größeren Venen aus, begrenzt innerhalb der Gerota-Faszie	T3a: Tumorausdehnung in Nierenvene, in segmentale Äste oder Infiltration von perirenalem Fettgewebe T3b: Tumorausdehnung in V. cava unterhalb des Zwerchfells T3c: Tumorausdehnung in V. cava oberhalb des Zwerchfells oder Befall der Venenwand
T4	Infiltration über Gerota-Faszie hinaus, einschließlich zusammenhängender Ausdehnung in ipsilaterale Nebenniere
N Lymphknotenbefall	N0: keine Lymphknotenmetastasen N1: Metastasen in einem Lymphknoten

	N2: Metastasen in mehreren Lymphknoten
M	M0: keine Fernmetastasen
Fernmetastasen	M1: Fernmetastasen

Tab. 2: UICC-Tumorstadieneinteilung des ccRCC mittels TNM-Klassifikation

Stadium	TNM-Klassifikation
Stadium I	T1 N0 M0
Stadium II	T2 N0 M0
Stadium III	T3 N0 M0 oder T1-T3 N1 M0
Stadium IV	T4 oder N2 oder M1

Tab. 3: Histopathologische Einteilung des ccRCC nach Fuhrmann

Fuhrmann-Grading	histopathologische Merkmale
G1	gut differenziert
G2	mäßig differenziert
G3	schlecht differenziert
G4	undifferenziert

Diese Form der Graduierung des histologischen Differenzierungsgrades des Nierezellkarzinom nach Fuhrmann wurde zwischenzeitlich durch das Graduierungssystem der International Society of Urological Pathology (ISUP) abgelöst. Jedoch wurde zum Zeitpunkt der Probengewinnung für diese Studie noch das Fuhrmann-Grading angewandt. Daher wurde dieses in der vorliegenden Studie herangezogen, um eine Korrelation zwischen dem Expressionniveau einer microRNA und dem histologischen Differenzierungsgrad einer Probe zu untersuchen.

1.1.5 Diagnostik

Besteht der Verdacht eines Nierenzellkarzinoms, so folgt die Basisdiagnostik aus einer laborchemischen Untersuchung (Kreatinin, Urin, Blutbild, Calcium, Leberwerte, AP, LDH, Blutgerinnung), einer Sonographie der Nieren, einer Computertomographie (CT)

mit Kontrastmittel bzw. einer Magnetresonanztomographie (MRT) des Abdomens und einem CT-Thorax (Suche nach Lungenmetastasen). Eine Feinnadelbiopsie wird meist nur zur histologischen Sicherung eines fortgeschrittenen Tumorgeschehens vor einer systemischen Therapie und differentialdiagnostisch bei Verdacht auf einen Nierenabszess, ein Lymphom oder eine Metastase angewendet.

Ein Screening wird aufgrund der niedrigen Inzidenz und einer zu erwartenden hohen Zahl falsch-positiver Diagnosen von gutartigen Raumforderungen der Niere nicht durchgeführt. Experimentell konnte eine Früherkennung des Nierenzellkarzinoms mittels im Urin ausgeschiedener Proteine Aquaporin-1 (AQP1) und Perilipin-2 (PLIN2) gelingen (Morrissey et al. 2015).

Zurzeit existieren nur unspezifische diagnostische Methoden für die Früherkennung eines ccRCC. Ebenso fehlt ein spezifischer Laborparameter, der als Tumormarker zur Früherkennung bzw. zur Nachsorge eingesetzt werden kann.

1.1.6 Therapie

Der Ansatz einer kurativen Therapie bei klarzelligem Nierenzellkarzinom besteht im operativen Verfahren (Onkologie 2017). Kleinere und gut zugängliche Karzinome können per Nierenteilresektion entfernt werden, größere, schlecht zugängliche Tumoren und jene, die bereits einen Venenthrombus ausgebildet haben, werden mittels radikaler Nephrektomie therapiert.

Als Operationsverfahren kann zwischen dem offen-chirurgischen, dem laparoskopischen oder dem Roboter-assistierten Verfahren gewählt werden. Es wird stets eine Entfernung des gesamten Primärtumors und gegebenenfalls von Metastasen z. B. in der Lunge oder von infiltrierten Lymphknoten angestrebt.

Die Operation bleibt die Therapie der Wahl. Das Nierenzellkarzinom bildet ein transmembranäres Protein (multi drug resistance protein-1, MDR-1), welches hydrophobe Stoffe wie Chemotherapeutika aus den Zellen transportiert. Das ccRCC zeigt somit kein Ansprechen auf diese therapeutischen Substanzen. Bei Inoperabilität des Primärtumors oder etwaiger Metastasen erfolgt eine systemische Therapie mittels

Immunmodulatoren (Axitinib, Bevacizumab, Everolimus, Pazopanib, Sorafenib, Sunitinib, Temserolimus), die auf die Signaltransduktion der Tumorzellen inhibitorisch wirken.

Ältere Patienten mit erhöhter Komorbidität oder Patienten mit sehr kleinen Tumoren können zunächst einer Active Surveillance unterzogen werden. Dies beinhaltet eine abwartende, den Krankheitsverlauf beobachtende Strategie, bei der zu einem späteren Zeitpunkt noch therapeutisch, kurativ oder palliativ interveniert werden kann. Diese Strategie findet ihre Anwendung und Berechtigung, da das klarzellige Nierenzellkarzinom im Allgemeinen ein langsames Wachstum zeigt.

1.2 Tumormarker

Tumormarker dienen der Detektion meist maligner Erkrankungen bzw. als Verlaufsparemeter dieser. Sie liegen als Proteine, Peptide oder etwa als Abbauprodukte einer Substanz, z.B. eines Hormons, vor, welche sich beim Vorliegen eines malignen Geschehens im Blut eines Patienten in erhöhter Konzentration nachweisen lassen. Außerdem weisen sie im optimalen Fall eine hohe Organspezifität auf.

Für das klarzellige Nierenzellkarzinom existieren zurzeit keine etablierten Tumormarker. Inhalt aktueller Forschungsprojekte ist daher die Detektion biologischer Substanzen im Blut von ccRCC-Patienten, die eine von der Norm abweichende Konzentration aufweisen. Neben Proteinen, Peptiden und Abbauprodukten werden microRNA-Sequenzen erforscht, welche aufgrund ihrer spezifisch erhöhten oder erniedrigten Konzentrationen im Serum für das Vorliegen eines ccRCC sprechen.

1.3 MicroRNA

1.3.1 Geschichte

Rosalind C. Lee beschrieb erstmals 1993 das Phänomen einer microRNA (Lee et al. 1993). Sie entdeckte in der Nematode *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) das Gen *lin-4*, welches nicht wie erwartet für ein Protein, sondern für zwei kleinere RNA-Sequenzen codierte. Das größere, etwa 60 Nukleotide lange RNA-Molekül wurde später als

Precursor (pre-miRNA) ausgemacht. Das kürzere, etwa 20 Nukleotide messende RNA-Molekül wurde als reife microRNA identifiziert und als RNA lin-4 benannt. Dieses erwies sich als regulierend auf das Gen lin-14, indem es am nicht translatierten Bereich des 3'-Terminus, kurz 3'-UTR, der lin-14 messenger RNA (mRNA) komplementär band. Dadurch wurde die Translation der mRNA reduziert.

Der Begriff microRNA wurde erst im Jahr 2000 manifestiert, als man mit let-7 eine weitere microRNA entdeckte, welche die Regulation des Gens lin-41 beeinflusste (Reinhart et al. 2000). Der oben beschriebene Mechanismus ließ sich auf andere Organismen übertragen.

Zurzeit werden kontinuierlich neue microRNAs detektiert und in Datenbanken wie z.B. „miRBase“ (miRBase 2020) katalogisiert. Die Zahl der Publikationen im Zusammenhang mit microRNAs zeigt ebenfalls einen anhaltend ansteigenden Trend, nicht zuletzt weil man einen Zusammenhang zwischen microRNAs und dem Entstehen maligner Tumoren vermutet und wahrscheinlich 20 – 30 % der Gene im menschlichen Genom unter dem Einfluss von microRNAs stehen.

1.3.2 Biogenese von microRNA

Eine microRNA wird im Kern einer Zelle vom Genom mittels RNA-Polymerase II und III abgelesen. Das Primärtranskript, die sogenannte primary-microRNA (pri-miRNA), besteht aus 500 – 3000 Nukleotiden mit einem polyadenylierten 3'-Ende und eine 7-Methylguanosin-Cap am 5'-Ende. Die RNase III (Drosha) und das dsRNA-Bindeprotein DGCR8 stellen den Mikroprozessor-Komplex im Zellkern dar. Dieser Komplex prozessiert die pri-miRNA zu der 70 – 80 Nukleotid langen precursor-miRNA (pre-miRNA), welche mittels aktiven Transports durch die Kernporen in das Zytoplasma der Zelle gelangt. Dort wird sie durch das RNase-III-Enzym Dicer in 17 – 24 Nukleotid große ds-RNA aufgeteilt. Zudem gehen Dicer und das ds-RNA-Bindeprotein TRBP eine Verbindung ein, woraufhin die Doppelstrang-RNA aufgewunden und in ihre Einzelstränge getrennt wird. Dabei entsteht die reife microRNA (= guide RNA), welche durch den 5'-Terminus charakterisiert ist. Durch ihre Aufnahme in den Ribonukleoprotein-Komplex (miRNP) entsteht der miRISC-Komplex. Dieser kann auf

zwei unterschiedliche Weisen ein Zielgen herunterregulieren (Kim und Nam 2006): Stimmt die Bindesequenz zwischen miRISC-Komplex und der mRNA nur partiell überein, so führt dies zur Hemmung der Translation der mRNA. Binden der miRISC-Komplex und die mRNA hochgradig komplementär aneinander, so führt dies zu einer Zerlegung der mRNA.

Generell werden microRNAs sehr unterschiedlich exprimiert. Aufgrund ihres regulierenden Einflusses werden sie in Entwicklungsphasen und während physiologischer Abläufe in alternierenden Konzentrationen produziert. Ihre Genlokalisierung kann sich nach aktuellem Wissensstand sowohl auf Exons und Introns befinden, welche der Kodierung von Proteinen dienen, als auch auf nichtcodierenden Abschnitten des Gens liegen (He und Hannon 2004). MicroRNAs fungieren als regulierendes Element zwischen Genom und Proteinbiosynthese, indem diese mittels microRNA begünstigt, blockiert oder reduziert wird.

1.3.3 microRNA als Tumorsuppressorgene und Onkogene

Die Entstehung eines Tumors beruht auf der genomischen Veränderung bestimmter Proteine, sowie auf dem Fehlen von Kontroll- und Reparaturmechanismen ebenjener Mutationen.

Für einen regelhaften Zellzyklus benötigt eine Zelle unterschiedliche Proteine, die auf Protein kodierenden Regionen des Genoms liegen. Sowohl die Proteine, aber insbesondere auch die Gensequenz an sich unterliegen Kontrollen und ggf. Reparaturmechanismen. So wird ein erkannter Fehler in der Gensequenz entweder behoben oder die gesamte Zelle wird in den Zelltod (Apoptose) getrieben. Fallen diese Mechanismen aufgrund des Vorliegens einer Mutation des Gens aus, so kann hieraus eine ungebremste Zellteilung und damit eine Tumorentstehung resultieren. Für einen fehlerfreien Ablauf des Zellzyklus sorgen Tumorsuppressorgene und Onkogene. Erstere verhindern durch ihre Aktivität die Tumorentstehung. Findet jedoch eine Mutation auf dem Genabschnitt statt, der für Tumorsuppressorgene codiert, so tritt dieser Schutzmechanismus außer Kraft und es kommt zur Neoplasie. Onkogene liegen physiologisch zunächst als Protoonkogene vor und kontrollieren als Gesamtheit den

vollständigen Zellzyklus. Erfolgt nun eine Mutation eines Protoonkogens, so entsteht ein Onkogen und der Kontrollmechanismus des Protoonkogens wird gehemmt. Als Folge können sich Tumoren bilden.

MicroRNAs wirken bei der Translation von mRNA und somit bei der Expression von Protein mit. Werden sie nun reduziert oder amplifiziert, so können sie als Tumorsuppressorgen oder Onkogen fungieren.

1.3.4 microRNA als Tumormarker

Im Jahr 2007 stellten Gottardo, Liu und Kollegen erstmals in einer Studie eine Verbindung zwischen microRNAs und dem klarzelligem Nierenzellkarzinom her. Dabei zeigten unterschiedliche microRNAs ein erhöhtes oder ein erniedrigtes Level und schienen in Zusammenhang mit der Erkrankung an einem ccRCC zu stehen. Seither sind über 500 Studien zu ebenjener Thematik veröffentlicht worden. In einer Metaanalyse wurden 2015 die bis dato relevantesten Studien zusammengefasst und es zeigte sich eine Vielzahl an hoch- und herunterregulierten microRNAs (Gu et al. 2015). Das Genmaterial wurde aus unterschiedlichen Medien wie Nierengewebe, Patientenserum oder -plasma gewonnen. In einer Vielzahl von Veröffentlichungen werden weitere microRNA-Sequenzen im Zusammenhang mit dem ccRCC genannt (Heinemann et al. 2018; Fan et al. 2018). Der konkrete Einfluss der microRNA auf den Zellzyklus wird dabei erst langsam nachvollzogen und scheint noch nicht endgültig geklärt.

Unterdessen konnten anderen Tumorentitäten ebenfalls dysregulierte microRNAs zugeteilt werden. Mit miR-371a-3p zeichnete sich eine einzelne Sequenz als hochsignifikant beim Vorliegen eines Hodentumors aus (Radtke et al. 2017), weshalb sie bereits als Tumormarker im klinischen Alltag Einzug gehalten hat. Für die hoch sensitive und hoch spezifische Detektion des nichtkleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC) (Keller et al. 2009a) oder der Multiplen Sklerose (MS) (Keller et al. 2009b) erwiesen sich sogenannte Biomarker-Sets als besonders effizient. Ein Set setzte sich dabei aus mehreren dysregulierten microRNAs zusammen (MS-Set = 48 microRNAs; NSCLC-Set = 24).

1.4 Zielsetzung

Im Vorfeld konnte für microRNA-378-3p ein erhöhtes microRNA-Level im Serum von Patienten mit einem klarzelligem Nierenzellkarzinom gezeigt werden (Redova et al. 2012; Fedorko et al. 2015; Hauser et al. 2012). Auch microRNA-210-3p wurde von ccRCC-Patienten verstärkt exprimiert (Fedorko et al. 2015; Iwamoto et al. 2014). Eine andere Arbeitsgruppe stellte für microRNA-193a-3p und microRNA-362-3p, sowie für microRNA-28-5p und microRNA-572 eine Hochregulierung im Zusammenhang mit dem Auftreten eines ccRCC dar (Wang et al. 2015).

Folglich liegt das Ziel der vorliegenden Studie zum einen in der Beantwortung der Frage, ob mithilfe gewisser microRNAs zwischen einem ccRCC-Patienten und einem gesunden Patienten unterscheiden werden kann. Zum anderen sollen jene Studien, welche ersteres bereits zeigen konnten, anhand eines größeren verwendeten Patientenkollektivs verifiziert werden. Außerdem soll eine Korrelation zwischen der Höhe eines microRNA-Levels und einem bestimmten Tumorstadium bzw. einem bestimmten Fuhrmann-Grad ermittelt werden.

Für die Untersuchungen dieser Arbeit werden Seren von Patienten, welche an einem ccRCC erkrankt waren, mit denen von Probanden verglichen, welche objektiv betrachtet als gesund gelten oder an einer benignen urologischen Erkrankung wie einer benignen Prostatasyndrom (BPS) oder einer Nephrolithiasis leiden.

Als Biomarker für das ccRCC sollen jene microRNA-Sequenzen in Betracht kommen, welche aufgrund ihrer Sensitivität und Spezifität mit hoher Sicherheit einen signifikanten Unterschied zwischen einem Nierenzellkarzinompatienten und einem gesunden Probanden abbilden können.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Einkanal-Pipetten Research [®] (0,5 – 10 µl, 2 – 20 µl, 10 - 100 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Finnpipette 4510 Digital 8 Channel Manual Pipette (5 – 50 µl)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA (Applied Biosystems)
Eppendorf Zentrifuge 5415C	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Matrix EXP Pipette 8 Channel (5 – 250 µl)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA (Applied Biosystems)
Multipette stream [®]	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
TProfessional Trio Thermocycler	analytikJena, Jena, Deutschland
Tischzentrifuge Universal 30 RF	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland
Vortex Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
ABI Prism 7900 HT Fast Real-Time PCR System	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA (Applied Biosystems)

2.1.2 Labormaterialien

Material	Hersteller
Pipettenspitzen mit Filter (10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Axygen, Union City, California, USA
Integrity Filter Tips (30 µl)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA (Applied Biosystems)
PCR-Tubes (1,5 ml)	ABGene, Epsom, England
PCR-Tubes (0,2 ml)	ABGene, Epsom, England
Safe-Lock Tubes (0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Serum-S-Monovette	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
384-Well PCR Platten	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA

2.1.3 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Ethanol 100 %	VWR, Darmstadt, Deutschland
2-Mercaptoethanol	Sigma, St. Louis, Missouri, USA
TE-Puffer	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
RNase AWAY	Molecular BioProducts Inc., San Diego, USA

Die verwendeten Kits wurden gemäß den Herstellervorschriften gelagert.

2.1.4 Kits

Kits	Hersteller
mirVana™ PARIS™ Kit AM 1556	Ambion, Life Technologies, Austin, Texas, USA
TaqMan® PreAmp Master Mix Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA (Applied Biosystems)
TaqMan® Fast Advanced Assay	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA (Applied Biosystems)
TaqMan® Advanced microRNA cDNA synthesis Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA (Applied Biosystems)
miScript miRNA cel-MiR-39	Qiagen, Hilden, Deutschland

2.1.5 Primer

miRNA Primer Assay	Assay Nummer	ID	microRNA Sequenz 5' -> 3'
cel-miR-39	478293_mir		UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG
miR-210-3p	477970_mir		CUGUGCGUGUGACAGCGGCUGA
miR-378-3p	478349_mir		ACUGGACUUGGAGUCAGAAGGC
miR-362-3p	478058_mir		AACACACCUAUUCAAGGAUUCA
miR-193a-3p	478306_mir		AACUGGCCUACAAAGUCCCAGU

Alle Primer wurden von der Firma Invitrogen (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) designt und hergestellt.

2.1.6 Probenmaterial

Die Patientenseren dieser Studie wurden im Zeitraum von 2006 bis 2011 in der Klinik und Poliklinik für Urologie des Universitätsklinikums Bonn gesammelt. Sie wurden vor dem jeweiligen operativen Eingriff gewonnen und nach den Standard Operating Procedures der Biobank des „Centrum für Integrative Onkologie Köln-Bonn“ (CIO) verarbeitet und gelagert. Es wurden insgesamt 45 Proben verwendet: Es wurden 30 Proben von Patienten mit einem klarzelligen Nierenzellkarzinom verwendet; jeweils 15 Proben stammten von Patienten mit einem lokal begrenzten (T1/T2 und N0 und M0) oder fortgeschrittenem (T3/T4 oder N1 oder M1) Nierenzellkarzinom. Ferner bestand die Kontrollgruppe (GK) aus 15 Patienten, die objektiv betrachtet als gesund galten oder sich einer Behandlung für eine benigne urologische Erkrankung unterzogen, z.B. einer benignen Prostatahyperplasie oder eine Urolithiasis. Die klinisch-pathologischen Parameter sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Sämtliche Probanden haben vor der Gewinnung der Seren schriftlich ihr Einverständnis erklärt, dass ihr Blut zum Zwecke wissenschaftlicher Untersuchungen eingesetzt werden darf. Die Genehmigung der Durchführung dieser Studie wurde durch die Ethik-Kommission des Universitätsklinikums Bonn erteilt (Antrag vom 03.06.2015, Lfd. Nr.157/15). Sämtliche Untersuchungen dieser Studie wurden unter Berücksichtigung der Statuten der revidierten Deklaration von Helsinki des Weltärztebundes 1983 und der Vorgaben der gültigen Gesetze vollzogen.

2.1.7 Positivkontrollen

Als Positivkontrolle und Kalibrator wurde die Tumorzelllinie A498 verwendet, welche jede der untersuchten microRNAs exprimiert. Die Gesamt-RNA der A498 Zelllinie wurde nach ihrer Isolation bei -80° C gelagert und wies eine Konzentration von 1,0 ng/µl auf.

2.1.8 Lösungen

Lösung	Hersteller
1 % DEPC-Wasser	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA (Applied Biosystems)
1 x TE Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8,0)	AppliChem, Darmstadt, A0386

2.1.9 Software

Software	Hersteller
QBase+	Biogazelle, Zwijnaarde, Belgien
SDS (File) 2.4	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA (Applied Biosystems)
IBM SPSS Statistics 24.0	SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Probensammlung

Die Blutproben wurden in S-Monovetten der Firma Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland gewonnen, welche ein Silikat zur Gerinnungsaktivierung besaßen. Die koagulierten Proben wurden 30 – 120 Minuten nach Blutentnahme mittels Zentrifugation bei 4.000 U/min für 10 Minuten bei Raumtemperatur weiterverarbeitet. Die zu je 2 ml aufgeteilten Serum-Aliquots wurden anschließend bei -80 °C eingefroren.

2.2.2 RNA-Isolation aus Serum

Zur Gewinnung von zellfreier, zirkulierender Micro-RNA aus 400 µl Serum wurde das „mirVana“ miRNA Isolation Kit Paris der Firma Ambion verwendet. Dieses Aufreinigungskit kann sowohl zur Gewinnung von mRNA, als auch microRNA eingesetzt werden. Um Enzyme wie etwa RNase zu inhibieren wurde eine Denaturierung der Seren durchgeführt, gefolgt von einer Aufspaltung in drei Phasen mittels Acid-Phenol:Chloroform. Die drei Phasen enthielten nun in der unteren Schicht Proteine, in der mittleren DNA und in der oberen, wässrigen Schicht RNA. Jene oberste Schicht wurde mittels Pipettieren gewonnen, mit Ethanol gemischt, anschließend auf einen Glasfaser-Filter gegeben und gewaschen, bis ein Eluat zurückblieb. Dieses wurde im Anschluss bei -80° C gelagert.

Das Standard-Protokoll der RNA-Isolation wurde durch einen sog. Spiking-Schritt ergänzt. In diesem Schritt wurde die synthetische, ursprünglich aus dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* gewonnene microRNA cel-miR-39 hinzugefügt. Da es kein Homolog zur menschlichen Sequenz gibt, kann in späteren Versuchen durch die Bestimmung dieser microRNA die RNA Isolation und Quantifizierung in jeder Probe normalisiert werden. Es wurde zu jedem Serum während der Aufreinigung 25 fmol, also 5 µl cel-miR-39 hinzugegeben (Konzentration $c = 1 \text{ fmol}/\mu\text{l}$).

Jeweils 400 µl 2x Denaturation Puffer wurden in einem 2 ml großen Eppendorfer Tube vorgelegt. Diesem wurden 400 µl Serum beigefügt. Im anschließenden Spiking wurde die oben beschriebene cel-miR-39 in einer Konzentration von 5 fmol/µl hinzugegeben und vermischt. Zur organischen Extraktion wurden dem Lysat-Volumen 800 µl Acid-Phenol:Chloroform beigefügt. Es folgte das Zentrifugieren über mindestens 15 Minuten bei 10.000 U/min, bis eine kompakte Interphase sichtbar wurde. Die wässrige, obere Phase wurde nun vorsichtig in ein 1,5 ml Tube gegeben und für 5 Minuten bei 10.000 U/min zentrifugiert. Hiervon wurden 500 µl zur finalen Isolation der Gesamt-RNA in ein 2 ml Eppendorfer Tube gegeben. Diesen 500 µl wurde im nächsten Schritt 625 µl Ethanol beigefügt. Der entstandene Lysat-Ethanol-Mix wurde anschließend auf den Glasfaser-Filter pipettiert und bei 10.000 U/min für 15 Sekunden zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Die restliche Lösung wurde auf einen Filter pipettiert und zu den gleichen Konditionen erneut zentrifugiert. Durch das Waschen des Eluats, welches

einmal durch „Wash Solution 1“ und zweimal durch „Wash Solution 2/3“ geschah, konnten Verunreinigungen der gewonnenen RNA entfernt werden. Die entstandene Säule wurde in ein neues Collection Tube überführt, welchem 50 µl auf 95° C erwärmte Elution Solution hinzugefügt wurde. Nach anschließendem Zentrifugieren führte dies zum Herauslösen des RNA-Eluats aus dem Filter. Die aufgefangene RNA wurde bei -80°C gelagert.

2.2.3 cDNA-Synthese

Um die gewonnene micro-RNA-Sequenz beliebig häufig vervielfältigen zu können, musste diese in eine komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Für die Umschreibung verwendeten wir das TaqMan® Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit der Firma Thermo Fisher (ehemals Applied Biosystems). Die nur aus 20 bis 30 Nukleotiden (nt) bestehende, reife microRNA-Sequenz wird im ersten Schritt am 3'-Ende mittels Polyadenylierung verlängert. Anschließend wird mittels Ligation am 5'-Ende ein Adapter angebracht, der im weiteren Verlauf als Bindungsstelle für den miR-AMP-vorwärts-Primer der Präamplifikationsreaktion dient. Der dritte Schritt beinhaltet die Umschreibung der microRNA in die cDNA mittels reverser Transkription.

Für die Polyadenylierung (Poly (A)) wurde pro Probe in einem 1,5 ml Tube der Poly (A)-Reaktionsmix aus 0,5 µl 10x Poly (A) Puffer, 0,5 µl ATP, 0,3 µl Poly (A) Enzym, sowie 1,7 µl RNase-freiem Wasser angesetzt. Diesem wurden 2 µl einer Probe hinzugefügt und bei diesen Konditionen im Thermocycler inkubiert:

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]
Polyadenylierung	37	45
Stop Reaktion	65	10
Erhaltungsreaktion	4	unendlich

Unmittelbar anschließend wurde die Ligrationsreaktion durchgeführt. Dazu wurde je Probe ein Ligrationsreaktionsmix in einem 1,5 ml Tube angesetzt, der sich aus 3,0 µl 5x DNA Ligase Puffer, 4,5 µl 50% PEG 8000, 0,6 µl 25x Ligation Adaptor, 1,5 µl RNA

Ligase und 0,4 µl RNase-freiem Wasser zusammensetzte. Dieser Mix wurde mit je einem Polyadenylierungsprodukt vermischt und bei diesen Konditionen inkubiert:

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]
Ligation	16	60
Erhaltungsreaktion	4	unendlich

Der Ligationsreaktion folgte direkt die reverse Transkriptionsreaktion (RT). Der dazu pro Probe notwendige RT-Reaktionsmix beinhaltete 6,0 µl 5x RT Puffer, 1,2 µl dNTP Mix (je 25 mM), 1,5 µl 20x Universal RT Primer, 3,0 µl 10x RT Enzymmix, sowie 3,3 µl RNase-freiem Wasser und wurde dem Ligationsprodukt zugegeben. Die anschließende Inkubation erfolgte im Thermocycler unter folgenden Konditionen:

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]
Reverse Transkription	42	15
Stop Reaktion	85	5
Erhaltungsreaktion	4	unendlich

2.2.4 Präamplifikation

Weil microRNA nur in geringer Konzentration im Serum vorliegt, ist eine Präamplifikation der aufgearbeiteten Sequenz notwendig, um diese in einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nachweisen zu können. Das Grundprinzip der Präamplifikation entspricht dem einer PCR: Denaturierte cDNA-Stränge werden mittels Taq-Polymerase komplementär kopiert. So wird die Anzahl der Sequenzen pro Zyklus verdoppelt. In dieser Studie erfolgte eine Präamplifikation über 20 Zyklen.

Pro Probe wurde in einem 1,5 ml Tube ein Präamplifikationsmix aus 25 µl 2x miR-Amp Master Mix, 2,5 µl 20x miR-Amp Primer Mix und 17,5 µl RNase freiem Wasser angesetzt. Auf 45 µl des miR-Amp-Reaktionsmix kamen 5 µl des RT-Reaktionsprodukts. Die Gesamtmenge je Probe von 50 µl wurde im Thermocycler nach folgendem Schema behandelt:

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit	Zyklen
Enzymreaktion	95	5 min	1
Denaturierung	95	3 sec	
Anlagerung und Verlängerung	60	30 sec	20
Stop-Reaktion	99	10 min	1
Erhaltungsschritt	4	unendlich	1

Nach einer Verdünnung von 1:10 mit RNase-freiem Wasser wurde die präamplifizierte cDNA bei -20 °C gelagert.

2.2.5 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion wird zur exponentiellen Vermehrung von DNA-Strängen eingesetzt. Im ersten Schritt wird mittels Denaturierung bei 95 °C ein Aufspalten des DNA-Doppelstrangs erzeugt. Anschließend kommt es bei 60 °C zur Anlagerung des spezifischen Primers. Bei ebenfalls 60 °C werden durch die aktivierte Polymerase neue, freie Nukleotide am 3'-Ende angebaut. So wird eine Elongation des komplementären DNA-Strangs vollzogen. Diese drei Schritte (Denaturierung, Anlagerung, Elongation) ergeben einen Zyklus, in dem sich die DNA jeweils verdoppelt. Insgesamt werden während einer PCR 40 Zyklen durchlaufen.

In dieser Arbeit wurden dem allerersten Zyklus zwei weitere Reaktionsschritte vorgeschaltet. Nach der oben dargestellten Umschreibung der microRNA-Sequenzen in cDNA kann noch ein kleiner Rest von microRNA vorhanden sein. Dieser würde nach Reaktion mit der Polymerase gleichermaßen ein Signal erzeugen, welches dann fälschlicherweise ebenfalls gemessen wird. Zur Vermeidung dieser Messungenauigkeit wird der PCR zunächst eine Inkubation mit Uracil-N-Glycosylase (UNG) vorgeschaltet. Anschließend wird das Sample auf 95 °C erhitzt. Dadurch wird die UNG inhibiert und die

„HotStart“-Polymerase aktiviert. In dieser Studie wurden ausnahmslos „HotStart“-Polymerasen eingesetzt, da herkömmliche Polymerasen sich bereits ab 55 °C im aktiven Zustand befinden und man somit aufgrund der ähnlichen Temperatur der UNG eine frühzeitige Aktivierung der Polymerase nicht sicher hätte ausschließen können.

Eine fluorogene Sonde (TaqMan[®] Probe) sorgt dafür, dass das Produkt der PCR quantifiziert werden kann. Die Sonde setzt sich aus einem fluoreszenten Reporter-Farbstoff (R) am 5'-Ende und einem Quencher (Q) am 3'-Ende zusammen und dockt an einer Sequenz zwischen Forward- und Reverse-Primer spezifisch an. Zunächst liegen Reporter und Quencher in enger räumlicher Nähe, weshalb die Fluoreszenz unterdrückt wird. Durch die aktivierte Taq-Polymerase wird die Sonde von ihrer Bindungssequenz gelöst, Reporter und Quencher entfernen sich voneinander und der Farbstoff des Reporters kann nun gemessen werden. Das entstandene Signal kann einer spezifischen Sequenz zugeordnet werden und steigt in Abhängigkeit der Templatekonzentration pro durchlaufenen Reaktionszyklus an. Unspezifische Hintergrundsignale können ab einem bestimmten Schwellenwert (threshold) vom eigentlichen Signal abgegrenzt werden. Dieser als Ct-Wert (Cycle threshold) titulierte Moment kennzeichnet den Zyklus, ab welchem die Schwelle der Nachweisbarkeit erreicht ist. Die Menge der in einer Probe enthaltenen microRNA kann also durch den Ct-Wert beschrieben werden. Sequenzen, die einen festgelegten Ct-Wert überschreiten, gelten als nicht nachweisbar.

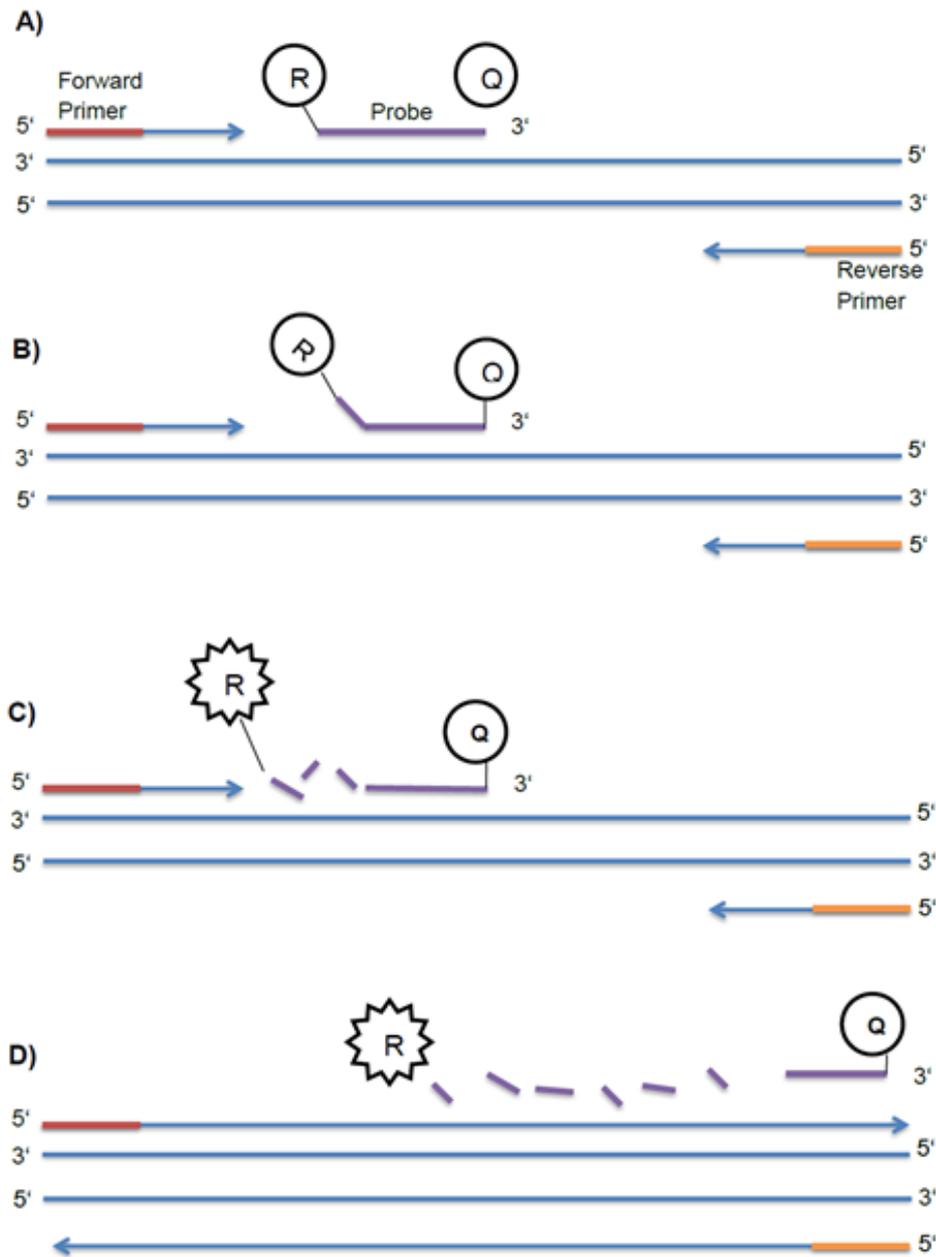


Abb. 1: Schematische Darstellung der TaqMan[®]-Sonde; R: fluoreszenter Reporter-Farbstoff; Q: Quencher: A) TaqMan[®] Probe bestehend aus Reporter-Farbstoff und Quencher dockt an spezifischer Sequenz zwischen Forward und Reverse Primer an; B) Nach Aktivierung der Taq-Polymerase wird TaqMan[®]-Sonde von dieser Sequenz zunehmend gelöst; C) Der Reporter-Farbstoff kann nach der Entfernung vom Quencher gemessen werden; D) Das Signal wird einer spezifischen Sequenz zugeordnet und steigt an pro durchlaufenen Reaktionszyklus.

In dieser Arbeit verwendeten wir den TaqMan[®] Fast Advanced Master Mix, der sich aus der AmpliTaq Fast DNA Polymerase, der UNG, den dNTPs mit dUTP, dem ROX-Farbstoff und einer Pufferkomponente zusammensetzt. Wir entschieden uns für diesen Master Mix wegen seiner reduzierten Laufzeit bei hoher Spezifität und hohem Dynamikbereich. Diese beiden Merkmale ermöglichen ein genaues Erkennen und Ablesen von kurzen Gensequenzen wie der microRNA. Die UNG dient der Eliminierung von microRNA-Resten, die nach der Umschreibung in cDNA in den jeweiligen Samples enthalten sein können. Dies gelingt durch eine Hydrolyse der Uracil enthaltenden Templates, wodurch eine Re-Amplifizierung von microRNA vermieden wird. Für die einzelnen microRNA-Sequenzen wurde jeweils ein spezifisches TaqMan[®] Gene Expression Assay (20x) beigefügt, welches außerdem den Forward und Reverse Primer, sowie die spezifische TaqMan[®] Probe beinhaltet.

Wir verwendeten für die PCR eine 384-Well-Platte, pro Well wurden 9,0 µl des Master Mix vorgelegt und 1,0 µl des jeweiligen cDNA-Templates hinzugefügt (Gesamtvolumen pro Well 10,0 µl). Für jede Probe erfolgte eine Dreifachbestimmung in drei nebeneinander liegenden Wells.

TaqMan[®] Master Mix (2X)	TaqMan[®] Gene Expression Assay (20X)	Nuklease-freies Wasser	Spezifische Probe (cDNA)
5,0	0,5	3,5	1,0

Nach Vorgaben des Herstellers wurde der ABI Prism 7900 HT Fast Real-Time PCR System programmiert:

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit	Zyklen
UNG Inkubation	50	2 min	1
Taq-Polymerase-Aktivierung	95	20 sec	1
Denaturierung	95	1 sec	40
Anlagerung und Verlängerung	60	20 sec	40

Um die Spezifität der Primer nachzuweisen und um Verunreinigungen der PCR-Templates durch Gensequenzen auszuschließen, wurden bei der PCR verschiedene Negativ-Kontrollen eingesetzt: Bei der „No-Template-Control“ (NTC) wurde Wasser statt cDNA eingesetzt. Bei der „No-Reverse-Transcriptase-Control“ (noRT) wurde während der cDNA-Synthese anstelle der reversen Transcriptase Wasser beigefügt. Durch den Einsatz einer genomischen DNA (gDNA) konnte die spezifische Bindung der reversen Transcriptase an RNA gezeigt werden. Die gDNA-Konzentration lag bei 0,01 ng/µl, was einer 1% DNA-Verunreinigung der aufgereinigten RNA-Seren entsprach. Zudem wurde eine RNA Probe der Zelllinie A498 als Positiv-Kontrolle eingesetzt.

Es wurde im Weiteren eine RNA-Verdünnungsreihe genutzt um die Effizienz der PCR Reaktion zu bestimmen. Hierzu wurden mehrere Serumproben gemischt; dieser Mix enthielt alle getesteten microRNAs in ausreichender Konzentration.

Verdünnungsschritt	1	2	3	4
Pool GK	0,1	0,01	0,001	0,0001
Konzentration in ng/μl				

Die Verdünnungsreihe erzeugte eine Gerade. Ihre Steigung, der sogenannte Slope, gibt die Effizienz eines jeden Primers wieder, der in dem entsprechenden PCR-Ansatz verwendet wurde. Dies bringt die folgende Gleichung zum Ausdruck:

$$E = 10^{-1/\text{slope} - 1}$$

Ausgehend von den theoretischen Überlegungen, dass sich pro PCR-Zyklus das Genmaterial verdoppelt (Effizienz $E = 2$), spräche dies für eine Effizienz von 100%. Diese Theorie lässt sich in der Praxis kaum realisieren, so zeigten die eingesetzten Primer eine Effizienz zwischen $E = 1,930$ (miR-193a-3p) und $E = 2,883$ (miR-378-3p). Die Effizienz einer PCR wird dabei vom Assay, dem Leistungsspektrum des Mastermixes und von der Qualität der untersuchten Proben maßgeblich beeinflusst. Eine höhere Effizienz spricht somit für eine gesteigerte Empfindlichkeit. Bei einer erniedrigten Effizienz ist der Ct-Wert bei identischer Zielkonzentration der Proben entsprechend erhöht.

Effizienz des Referenzgens:

Primer	cel-miR-39
Effizienz	2,208
Effizienz	120,8
[%]	

Effizienz der untersuchten micro-RNA-Sequenzen (Targetgene) :

Primer	miR-210-3p	miR-362-3p	miR-378-3p	miR-193a-3p
Effizienz	2,224	2,571	2,883	1,930
Effizienz [%]	122,4	157,1	188,3	93,0

2.2.6 Quantifizierung der Messergebnisse

Trotz Einsatz gleicher Gesamt-RNA Mengen in die Reaktionen ist von geringfügig unterschiedlichen RNA Ausgangskonzentrationen auszugehen. Um die Messungen jedoch mit einer hohen Genauigkeit vergleichen zu können, ist eine Normalisierung mit Hilfe eines sogenannten Referenzgens notwendig.

Als Referenzgene kommen nur jene microRNAs in Frage, die regelhaft exprimiert werden, nicht unter innerem oder äußerem Einfluss stehen und sowohl in malignen wie in benignen Organismen zu finden sind. In dieser Studie verwendeten wir ein exogenes Referenzgen (cel-miR-39). Dieses wurde während der microRNA-Isolation in einer bekannten Konzentration als Spike-In einer jeden Probe hinzugefügt ($c = 5 \text{ fmol}/\mu\text{l}$). Wird nun der Ct-Wert einer microRNA-Sequenz ermittelt, kann die Konzentration des Genmaterials exakt angegeben werden. Folgende Formel beschreibt den Zusammenhang:

$$\text{Gen (normalisiert)} = \frac{\text{Targetgen}}{\text{Referenzgen}}$$

Für eine Relativierung der Ct-Werte wird ein Kalibrator benötigt, dessen exakte Konzentration bekannt ist. Deshalb haben wir die Positivkontrolle A498 als Kalibrator verwendet, deren Anfangskonzentration $C = 1,0 \text{ ng}/\mu\text{l}$ betrug. Durch die Relativierung der gemessenen Ct-Werte gegen einen Kalibrator können Differenzen von mehreren PCR-Läufen ausgeglichen werden.

$$\text{Formel zur Relativierung} = \frac{\frac{\text{Targetgen (Probe)}}{\text{Referenzgen (Probe)}}}{\frac{\text{Targetgen (Kalibrator)}}{\text{Referenzgen (Kalibrator)}}}$$

Normalisierung und Relativierung der Ct-Werte reduzieren Schwankungen der Ausgangskonzentrationen, der Aufreinigungseffizienz und der PCR-Effizienzen, sowie die Fehler, die während der Umschreibung aufgetreten sein können. Diese Unterschiede würden in Ziel- wie Referenzgen gleichermaßen ausgeprägt sein.

Um einen Unterschied der microRNA-Levels der drei Vergleichsgruppen darzustellen, müssen die Gruppen untereinander in ein Verhältnis gesetzt werden. Mittels der Delta-Delta-Ct-Methode (Livak und Schmittgen 2001) werden die Messergebnisse relativ quantifiziert. Zunächst erfolgt die Normalisierung und Relativierung der Ct-Werte, anschließend wird der Delta-Ct-Wert berechnet:

$$\Delta Ct = Ct (\text{Zielgen}) - Ct(\text{Referenzgen})$$

Die Subtraktion der Delta-Ct-Werte zweier Gruppen ermittelt den Delta-Delta-Ct-Wert:

$$\Delta\Delta Ct - \text{Wert} = \Delta Ct (\text{Kontroll} - \text{Patienten}) - \Delta Ct (\text{Tumor} - \text{Patienten})$$

Der sog. Fold-Change kann schließlich diese Unterschiede zwischen den Gruppen anhand linearer Werte zeigen und eine Regulation der Genexpression beschreiben:

$$\text{Fold Change} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

2.2.7 Statistische Auswertung

Die Messwerte in der PCR wurden zunächst mit der SDS (File) Software 2.4 und QBase+ analysiert. Zur Durchführung der weiteren statistischen Auswertung wurde die

Software IBM® SPSS® Statistics 24.0 verwendet. Um die einzelnen Gruppen zu vergleichen, wurde der Mann-Whitney-U-Test eingesetzt. Die Prüfung der Spezifität und Sensitivität der potentiellen Tumormarker erfolgte durch die Erstellung der ROC-Kurven (Receiver Operating Characteristic). Zur grafischen Veranschaulichung der Messwerte wurden Boxplots erstellt. Das Signifikanzniveau zur Feststellung eines Unterschiedes zwischen den Vergleichsgruppen wurde a priori auf $\alpha = 0.05$ festgelegt. Um die Größe des Unterschieds einordnen zu können, wurde die Effektstärke r bestimmt:

$$r = \left| \frac{z}{\sqrt{n}} \right|$$

(n = Anzahl der verwendeten Proben; z = z-Wert)

Dabei galt, dass $r < 0,1$ eine geringe, $r \geq 0,1$ bzw. $r < 0,3$ eine mittlere und $r > 0,5$ eine große Effektstärke beschrieben. Das Konfidenzintervall lag bei 95 %, der dazugehörige z-Wert bei $\pm 1,96$.

3. Ergebnisse

3.1 Patientenkollektiv

In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 45 Patientenseren untersucht. Für die Optimierungsphase der Primer wurden drei Pools erstellt, die durch das Vermengen einzelner Proben einer jeweiligen Gruppe (lokal-begrenzt, fortgeschritten/metastasiert oder der gesunden Kontrollgruppe (GK)) gebildet wurden. Schließlich wurde jede der 45 Proben einzeln analysiert. Es wurden für die statistische Analyse die Gruppe der ccRCC Proben unterteilt in T1- und T3-Stadium nach den Kriterien der TNM-Klassifikation und des Weiteren nach den Kriterien des Fuhrmann-Grading beurteilt.

Tab. 4: Aufteilung der Seren nach TNM Klassifikation und Fuhrmann-Grading

	ccRCC n = 30	GK n = 15
Alter in Jahren		
Mittelwert	65,0	62,5
Spannweite	41 - 82	41 - 86
TNM-Klassifikation	T1 = 15	n. a.
	T3 = 15	n. a.
	N0 = 28	n. a.
	N1 = 1	n. a.
	N2 = 1	n. a.
	M0 = 29	n. a.
	M1 = 1	n. a.
Fuhrmann-Grading	G1 = 3	n. a.
	G2 = 23	n. a.
	G3 = 5	n. a.

3.2 cel-miR 39- Wiederfindung

Zu Beginn der Versuchsreihe wurde jeder Probe das exogene Referenzgen cel-miR-39 zugefügt. Durch das messbare Signal in allen untersuchten Proben wurde der Nachweis einer erfolgreichen microRNA-Isolation erbracht. Die gleichmäßige Expression in allen Proben begründete somit die Verwendung der cel-miR-39 als Referenzgen für den weiteren Studienablauf.

3.3 Primeroptimierung

Aus einer Gruppe bereits aufgereinigter Seren wurden drei verschiedene Pools erstellt. Der Pool „lokal-begrenzt“ enthielt Seren von Patienten mit lokal begrenztem Tumorstadium, der Pool „fortgeschritten“ Seren von Patienten in fortgeschrittenem, teilweise metastasiertem Tumorstadium und der Pool „GK“ Seren der gesunden Patientengruppe. Die Positiv-Kontrolle durch die Tumorzelllinie A498 überprüfte, ob die Umschreibung in cDNA regelhaft stattgefunden hat. Es wurden des Weiteren drei Negativ-Kontrollen eingesetzt. Dabei simulierte die eingesetzte genomische DNA (gDNA) eine 1% DNA-Verunreinigung der aufgereinigten RNA-Seren und diente somit als Nachweis für eine spezifische Bindung der Primer an microRNA und cDNA. Die so genannte no-RT-Kontrolle enthielt keine reverse Transkriptase für die Umschreibung von microRNA zu cDNA. Die dritte Negativ-Kontrolle war eine Probe, die anstelle der microRNA lediglich RNase-freies Wasser enthielt (NTC-Probe).

Zunächst wurde eine PCR mit dem Referenzgen cel-miR-39 als Primer angesetzt. Die sieben Proben (Pool „local“, Pool „advanced“, Pool „GK“, A498, gDNA, no-RT-Kontrolle, NTC), sowie eine präamplifizierte NTC-Probe wurden 4-fach aufgeteilt:

- (1) 14x präamplifiziert, 1:10 verdünnt
- (2) 14x präamplifiziert, unverdünnt
- (3) 20x präamplifiziert, 1:10 verdünnt
- (4) 20x präamplifiziert, unverdünnt

Während die 14-fach präamplifizierten ein schwaches Signal erzeugten, konnte bei den 20-fach präamplifizierten Proben ein gutes Signal gemessen werden. Zwischen den verdünnten und den unverdünnten Proben konnte kein Unterschied festgestellt werden. In den weiteren Versuchen wurde die Empfehlungen des Herstellers des Test-Kits befolgt und alle Proben in einer 1:10 – Verdünnung gemessen, jedoch wurde die Präamplifikation auf 20 Zyklen erhöht.

Für die folgende PCR wurde eine Verdünnungsreihe in 10er Schritten anhand der Positiv-Probe A498 erstellt und erneut gegen cel-miR-39 getestet. Es war ein deutlicher Unterschied zwischen den Verdünnungsschritten zu verzeichnen. In den daraufhin erstellten Standardkurven lag der Slope für cel-miR-39 bei -3,3. Sowohl die NTC-, als auch die präamplifizierte NTC-Probe blieben nicht messbar.

Schließlich wurden die sieben bekannten Proben mit 20-fach Präamplifikation und 1:10-Verdünnung gegen die sechs zu untersuchenden Primer gemessen. Die Primer miR-193a-3p, miR-210-3p, miR-362-3p und miR-378a-3p zeigten Aktivitäten bei den drei Pools und bei der Positiv-Kontrolle. Daher fiel die Entscheidung, diese vier Primer für die nachfolgende Versuchsphase zu übernehmen. Die Ergebnisse einer Studie aus dem Vorfeld konnte nicht reproduziert werden, denn weder miR-28-5p, noch miR-572 zeigten ein messbares Signal.

Alle verwendeten Proben waren für die Messungen nutzbar, da durch verschiedene Primer und insbesondere durch die Referenzgene microRNA nachgewiesen werden konnte.

In den darauf folgenden Untersuchungen wurden die Expressionslevel der vier microRNAs miR-193a-3p, miR-210-3p, miR-362-3p und miR-378-3p in 45 Patientenseren untersucht. Innerhalb der ccRCC-Gruppe wurde außerdem untersucht, ob sich ein Unterschied zwischen dem T1-Tumorstadium und dem T3-Tumorstadium, sowie nach dem Fuhrmann-Grading feststellen ließ. Alle untersuchten Primer und das Referenzgen ließen sich in 100% der Proben der Gruppe GK nachweisen. Ebenso verhielt es sich bei den Proben der Gruppe ccRCC.

3.4 Expression der microRNAs in Seren mit klarzelligem Nierenzellkarzinom und in Seren der gesunden Kontrollgruppe

Die Messwerte der beiden Gruppen GK und ccRCC wurden gegen das exogene Referenzgen cel-miR-39 normalisiert.

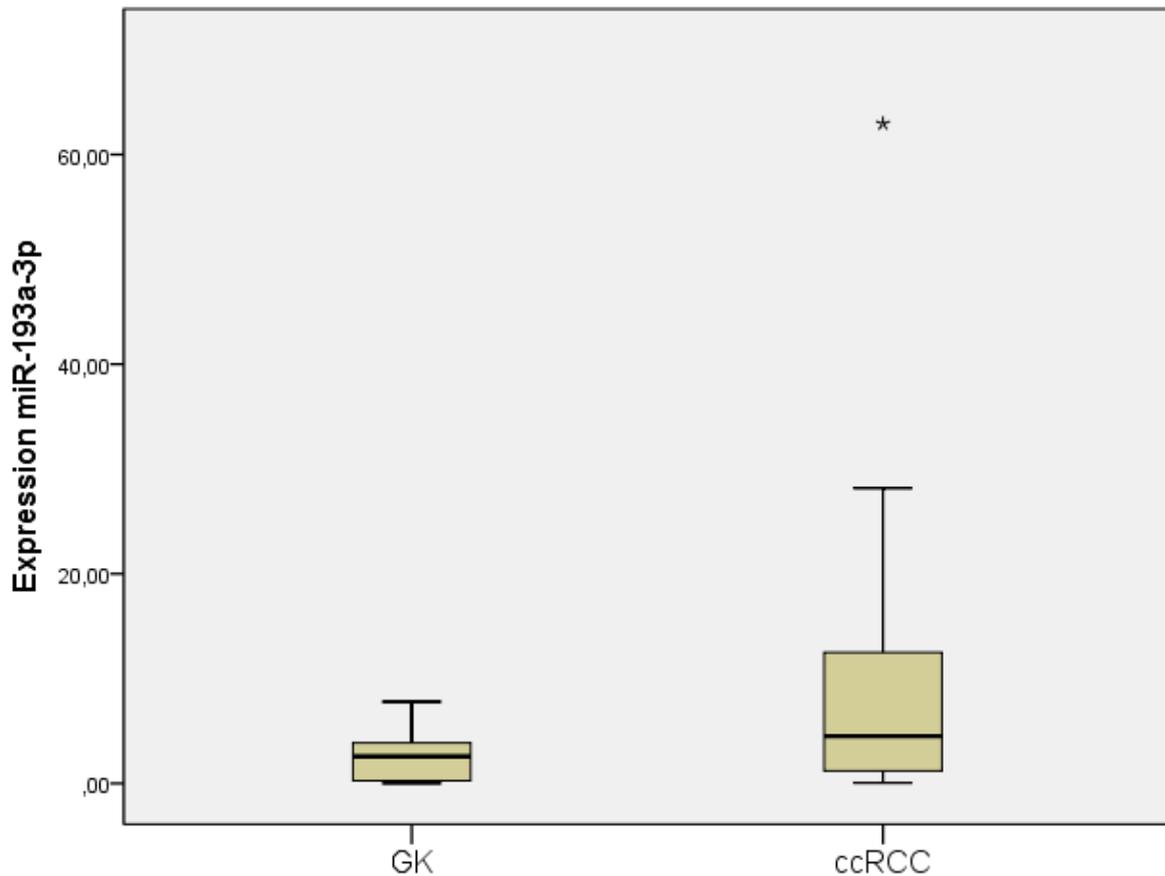


Abb. 2: Relativiertes Level von miR-193a-3p im Serum von Patienten der gesunden Kontrollgruppe (GK) und Patienten mit einem klarzelligem Nierenzellkarzinom (ccRCC); Ausreißer (o), Extremwerte (*); Gruppe GK: Median 2,57, 95 % Konfidenzintervall 1,16 – 3,99, Minimum 0,01, Maximum 7,80; Gruppe ccRCC: Median 4,50, 95 % Konfidenzintervall 4,16 – 13,62, Minimum 0,05, Maximum 62,95.

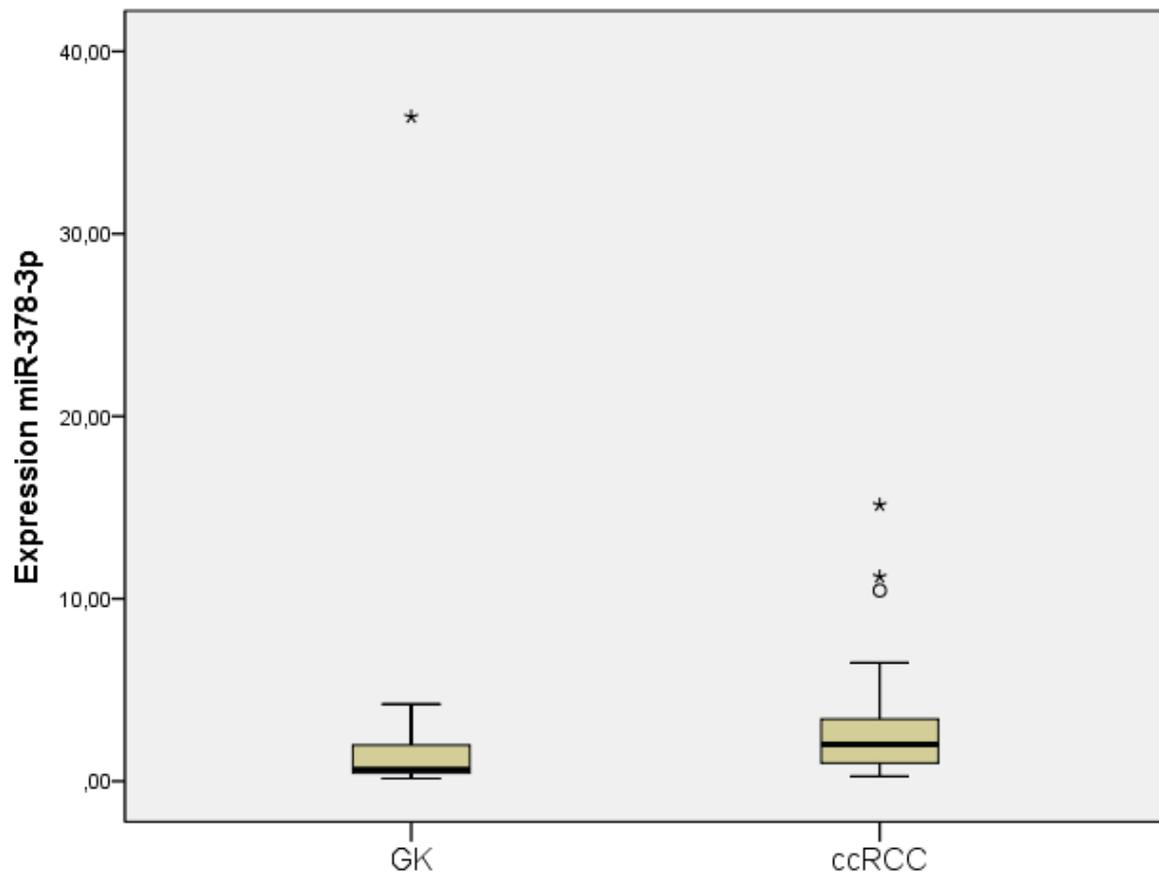


Abb. 3: Relativiertes Level von miR-378-3p im Serum von Patienten der gesunden Kontrollgruppe (GK) und Patienten mit einem klarzelligem Nierenzellkarzinom (ccRCC); Ausreißer (o), Extremwerte (*); Gruppe GK: Median 0,66, 95 % Konfidenzintervall -1,46 – 8,70, Minimum 0,15, Maximum 36,41; Gruppe ccRCC: Median 2,02, 95 % Konfidenzintervall 1,73 – 4,33, Minimum 0,27, Maximum 15,14.

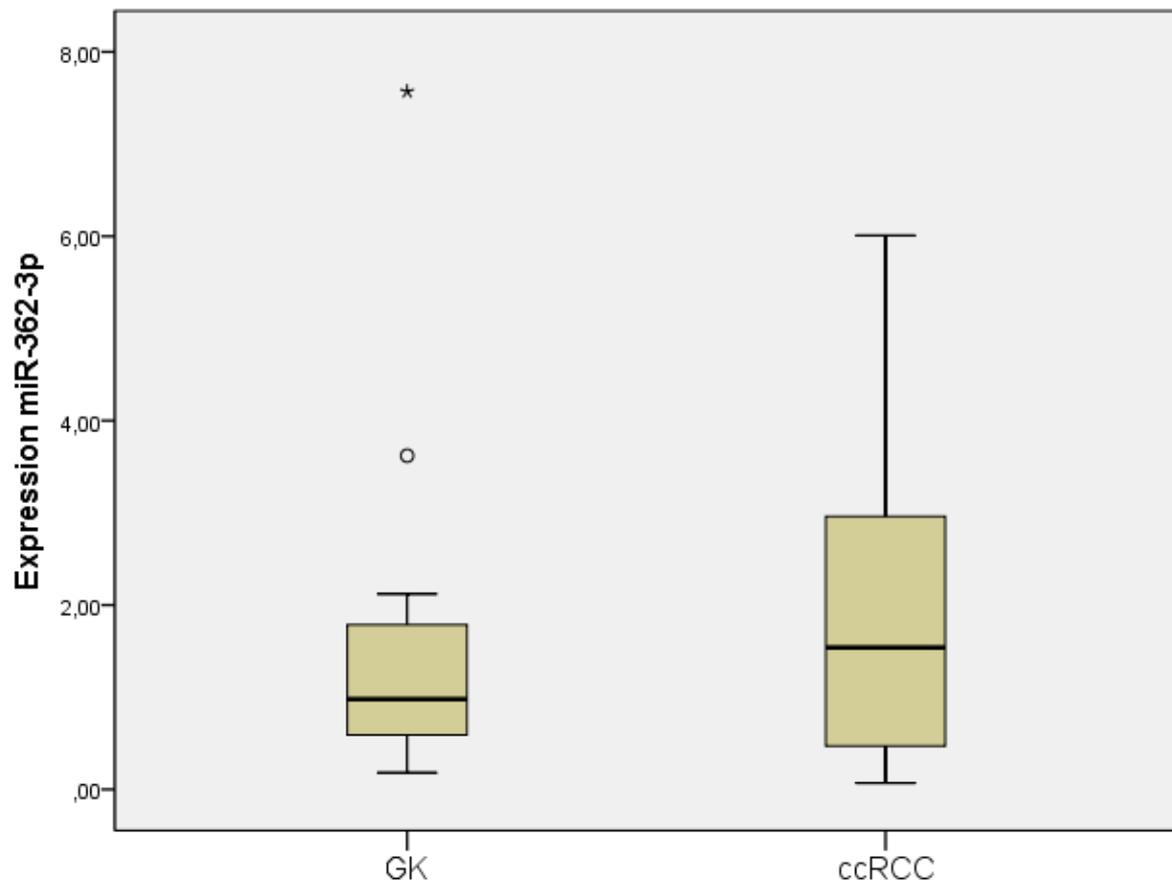


Abb. 4: Relativiertes Level von miR-362-3p im Serum von Patienten der gesunden Kontrollgruppe (GK) und Patienten mit einem klarzelligem Nierenzellkarzinom (ccRCC); Ausreißer (o), Extremwerte (*); Gruppe GK: Median 0,98, 95 % Konfidenzintervall 0,55 – 2,64, Minimum 0,18, Maximum 7,57; Gruppe ccRCC: Median 1,54, 95 % Konfidenzintervall 1,28 – 2,49, Minimum 0,07, Maximum 6,01.

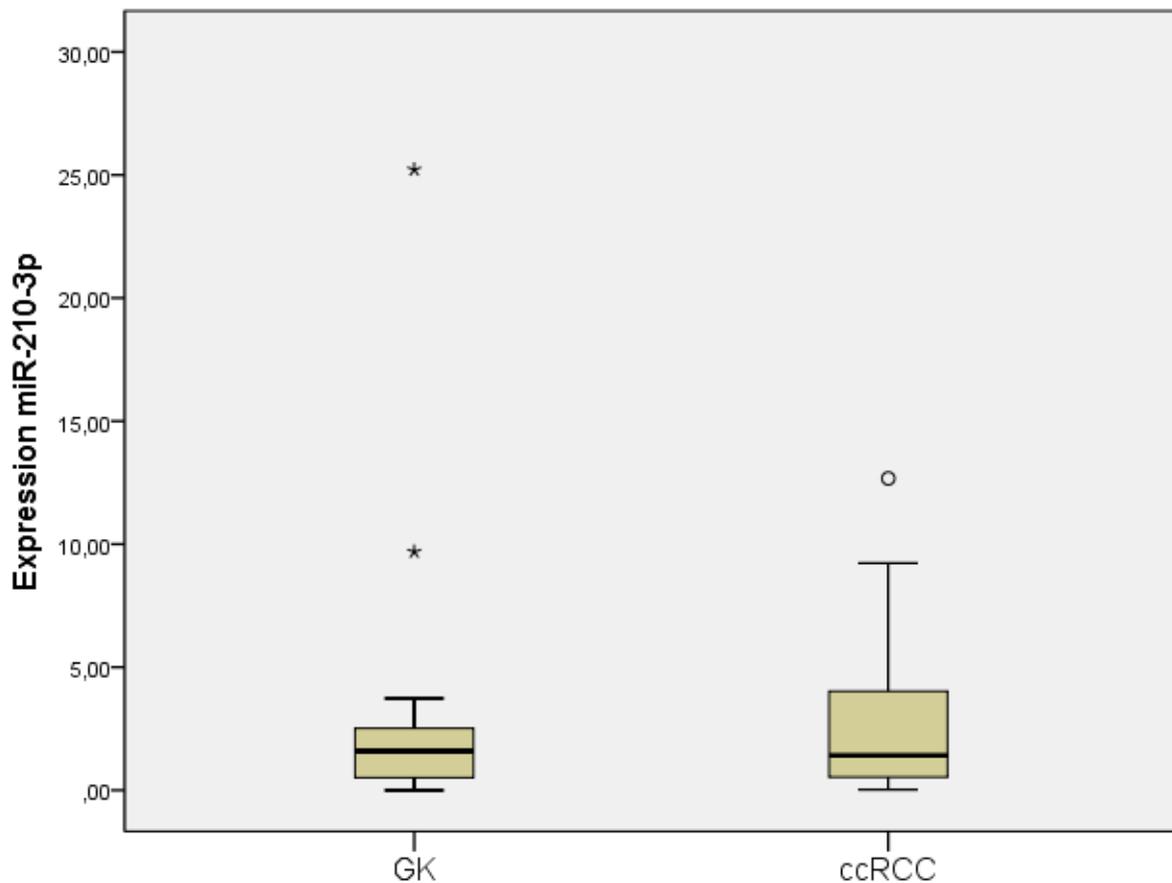


Abb. 5: Relativiertes Level von miR-210-3p im Serum von Patienten der gesunden Kontrollgruppe (GK) und Patienten mit einem klarzelligen Nierenzellkarzinom (ccRCC); Ausreißer (o), Extremwerte (*); Gruppe GK: Median 1,59, 95 % Konfidenzintervall -0,3 – 7,12, Minimum 0,00, Maximum 25,22; Gruppe ccRCC: Median 1,42, 95 % Konfidenzintervall 1,57 – 3,92, Minimum 0,02, Maximum 12,67.

Die Ergebnisse ließen sich teilweise in der statistischen Datenanalyse bestätigen (siehe Tab. 5). Bei Normalisierung gegen cel-miR-39 zeigte der Mann-Whitney-U-Test für die microRNA-193-3p einen statistisch signifikanten ($p = .031$; AUC = .699) Unterschied zwischen den Gruppen GK (MW 1,27) und ccRCC (MW 1,58). Für die microRNA-378-3p wurde dieser Gruppenunterschied ebenfalls signifikant ($p = .048$; AUC = .682). Die ROC-Analyse konnte die Signifikanz für beide microRNA-Sequenzen bestätigen. Es wurden keine weiteren signifikant unterschiedlichen microRNA-Levels gemessen.

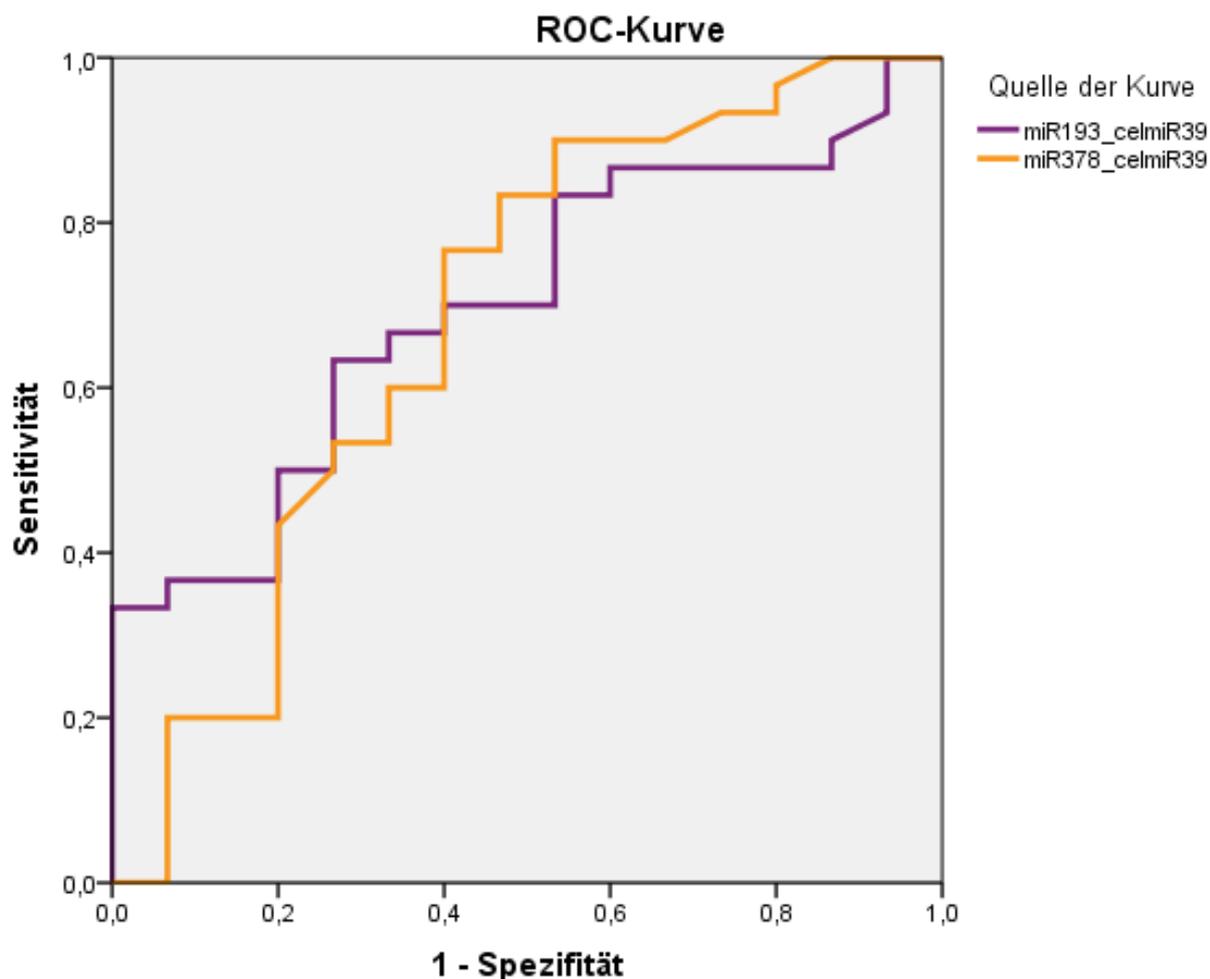


Abb. 6: Receiver Operating Characteristic-Kurve (ROC) zum Differenzierungsvermögen der miR-193a-3p und der miR-378-3p zwischen GK und ccRCC anhand der jeweiligen Sensitivität und Spezifität.

Tab. 5: Statistische Datenanalyse ccRCC vs. GK von miR-210-3p, miR-362-3p, miR-378-3p, miR193a-3p normalisiert gegen cel-miR-39

	miR-210-3p	miR-362-3p	miR-378-3p	miR-193a-3p
p-Wert	.782	.539	.048	.031
AUC	.526	.557	.682	.699
95%-Konfidenzintervall	.342 - .709	.383 - .731	.502 - .863	.544 - .854
Sensitivität	30,0%	43,3%	76,7%	63,3%
Spezifität	86,7%	86,7%	60,0%	73,3%

3.5 Korrelation micro-RNA-Expression und Tumorstadium

Innerhalb der Gruppe ccRCC wurde auf einen Unterschied der microRNA-Level der verschiedenen Tumorstadien untersucht und überprüft, ob sich eine Korrelation zwischen der Höhe des microRNA-Levels und dem Tumorstadium darstellen lässt. Die Tumorstadien der untersuchten Patientenseren ließen sich nach der TNM-Klassifikation und nach dem Fuhrmann-Grading einteilen.

Nach der TNM-Klassifikation konnten die untersuchten Proben je zur Hälfte dem T1- bzw. T3-Stadium zugeordnet werden. In der Expression von miR-193a-3p ($p = .576$) und miR-378-3p ($p = .300$) zeigte sich kein Unterschied bezüglich der unterschiedlichen T-Stadien.

Zuletzt wurden die Messergebnisse der vier microRNA-Sequenzen unter dem Gesichtspunkt des Fuhrmann-Grading betrachtet. Das Grading-Niveau G1 und G2, sowie die Klassen G3 und G4 wurden unter jeweils einer Kategorie zusammengefasst und miteinander verglichen.

Mithilfe des Mann-Whitney-U-Test konnte kein signifikanter Unterschied des Expressionslevels der untersuchten micro-RNAs (miR-210-3p: $p = .191$; miR-362-3p: $p = .232$; miR-378-3p: $p = .802$; miR-193a-3p: $p = .597$) in Hinsicht auf das Fuhrmann-Grading dargestellt werden.

4. Diskussion

In den vergangenen Jahren war eine ansteigende Inzidenz des Nierenzellkarzinoms festzustellen. Aufgrund seiner Häufigkeit und seiner lediglich palliativen Behandlungsmöglichkeit im Falle einer Metastasierung besteht ein großes Interesse an der Identifizierung eines Biomarkers zur Früherkennung und zur Verlaufskontrolle des RCC. Aktuell existiert keine Form der ccRCC-Vorsorgeuntersuchung. Die Suche nach einem Tumormarker richtet sich speziell auf nicht-invasive Verfahren, die eine ausreichend große Sensitivität und Spezifität aufweisen. Dieser Tumormarker soll die Kriterien eines effizienten und präzisen Detektors erfüllen und sein Expressionsniveau im besten Fall im Rahmen einer Blutentnahme bestimmt werden können. Aufgrund ihrer Stabilität gegenüber schwankenden Temperaturen, unterschiedlichen pH-Werten, sowie gegenüber RNAsen (Mitchell et al. 2008) eignen sich microRNAs besonders als potentielle Biomarker.

Vorliegende Studie diente der Validierung bestimmter microRNAs (miR-210-3p, miR-362-3p, miR-378-3p, miR-193a-3p, miR-28-5p, miR-572) und deren Vermögen zur Unterscheidung zwischen ccRCC-Seren und Seren gesunder Probanden. Außerdem sollte die Korrelation der Tumorstadien mit dem Expressionsniveau der microRNAs nach der TNM-Klassifikation und nach Kriterien des Fuhrmann-Gradings geklärt werden.

miR-378-3p war im Serum von ccRCC-Patienten in einer signifikant niedrigeren Konzentration als bei der Kontrollgruppe nachweisbar ($p = 0.048$). Das signifikante Ergebnis wies jedoch nur eine geringe Trennschärfe auf ($AUC = 0,682$). Mittels Receiver – Operating – Characteristic - Kurve (ROC – Kurve) ließ sich nur eine niedrige Sensitivität von 76,6 % und eine geringe Spezifität von 60,0 % feststellen.

Für miR-378-3p wurden im Vorfeld signifikant erhöhte Levels im Serum der kranken Probanden im Vergleich zu dem gesunder gemessen (Fedorko et al. 2015; Redova et al. 2012; Zhao et al. 2013; Hauser et al. 2012). Die Arbeitsgruppe um Fedorko wies zudem nach einer Woche und nach drei Monaten einen statistisch signifikanten Abfall des Levels von miR-378-3p im Serum jener Patienten nach, welche mittels Nephrektomie therapiert worden sind. Redova et al. (2012) konnten ein signifikant

erhöhtes Serumlevel von miR-378-3p bei ccRCC-Patienten nachweisen ($p=0.0003$, $AUC=0.71$). Dabei wurden richtigerweise 70% der Gruppe ccRCC und 60% der Gruppe GK zugeordnet. Hauser et al. (2012) konnten nur während der Screeningphase ein signifikant erhöhtes Level von miR-378-3p bei ccRCC-Patienten zeigen, dieses Ergebnis jedoch nicht durch die Validierungsphase verifizieren. In hiesiger Studie ließ sich zwar ebenfalls ein signifikant unterschiedliches Niveau von miR-378-3p in Seren der Gruppe ccRCC und in denen der Gruppe GK zeigen, jedoch waren die microRNA-Levels der Gruppe ccRCC als erniedrigt zu bezeichnen. Dies bestätigt das Ergebnis von Wang et al. (2015). Hier war miR-378-3p in den Seren der Gruppe ccRCC in einem signifikant niedrigerem Maß aufgefallen ($p=0.0033$). Wie bereits oben beschrieben war hier ein Set aus fünf micro-RNAs fähig, eindeutig zwischen den Seren der Gruppe ccRCC und der gesunden Kontrollgruppe zu differenzieren. Die miR-378 könnte jedoch ebenfalls als potenzieller Biomarker für das kolorektale Karzinom (CRC) dienen. (Zanutto et al. 2014) konnten eine signifikant erhöhte Expression von miR-378 im Plasma von CRC-Patienten nachweisen und zudem einen signifikanten Abfall dieser micro-RNA nach entsprechender operativer Versorgung des kolorektalen Karzinoms. Dieses Ergebnis lässt Zweifel an der spezifischen Zuordnung von miR-378 zu einer bestimmten Krebsentität. Ein Vergleich von Studien, welche Serum von Patienten als Untersuchungsmedium verwendet haben, und Studien, welche Plasma einsetzten, ist nicht ohne Einschränkungen möglich. Seren weisen von Natur aus eine höhere microRNA-Konzentration auf als Plasma, was durch die Freisetzung von microRNAs aus Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten während des Gerinnungsprozesses begründet wird (Wang et al. 2012).

Mithilfe von miR-193a-3p konnte zwischen den Gruppen ccRCC und GK unterschieden werden ($p = 0.031$). Die Richtung des Effekts spricht, wie erwartet, für ein erhöhtes Level der microRNA im Serum von ccRCC-Patienten. Bei einer AUC von 0.699 gilt die Trennschärfe jedoch als niedrig zu bewerten und der Einsatz für einen diagnostischen Test erscheint nicht sinnvoll. Die Sensitivität der miR-193a-3p wies mit 63,3 % lediglich eine geringe Wahrscheinlichkeit auf, kranke Probanden tatsächlich der Gruppe ccRCC zuzuordnen. Dies würde bedeuten, dass 36,7% der ccRCC-Patienten im Rahmen eines Tumorscreenings nicht erfasst würden, wenn miR-193a-3p als Tumormarker verwendet

werden. Zudem würde bei einer Spezifität von 73,3 % über ein Viertel aller Probanden fälschlicherweise als krank beurteilt werden.

Im Rahmen der Studie von Wang et al. (2015) ergab sich bei Betrachtung der einzelnen Gene für miR-193a-3p ein signifikant erhöhtes Level in den Seren der Gruppe ccRCC ($p < 0.0001$). Die Sensitivität der einzelnen Gene wurde nicht weiter analysiert, als Set aus fünf microRNAs lag jedoch die Sensitivität bei 78,5% und die Spezifität bei 74,8% (AUC = 0.796, $p < 0.01$). Die Kombination der fünf Gene konnte also signifikant zwischen ccRCC und GK unterscheiden, bei den genannten Werten der AUC, der Sensitivität und der Spezifität wären jedoch auch hier die Kriterien nicht erfüllt, damit das genannte Set als klinischer Screeningparameter fungieren könnte.

Bezüglich der miR-193a-3p und der miR-378-3p ließen sich Wangs Ergebnisse durch hiesige Studie somit bestätigen. Darüber hinaus konnte Wangs Arbeitsgruppe (2015) einen positiv prädiktiven Wert insbesondere für die Tumorstadien T1 und T4 nach TNM-Klassifikation erbringen. In der hier vorliegenden Untersuchung hingegen konnte zu keinem Zeitpunkt eine Korrelation zwischen dem microRNA-Level und dem Stadium des Nierenzelltumors weder nach Kriterien der TNM-Klassifikation, noch nach Kriterien des Fuhrman-Gradings dargestellt werden. Unter den Gesichtspunkten der Trennschärfe, sowie der Sensitivität und Spezifität eignen sich die Sequenzen miR-378-3p und miR-193a-3p nach Kenntnisstand hiesiger Studie nicht, um als Tumormarker für das klarzellige Nierenzellkarzinom zu fungieren.

Das ubiquitäre Vorkommen von miR-362-3p wurde in jeder verwendeten Serum-Probe dieser Studie bestätigt. Ein signifikantes Unterscheidungsvermögen zwischen kranken und gesunden Probanden blieb jedoch aus ($p = 0.539$). 2015 konnte Wang et al. im Serum von ccRCC-Patienten ein signifikant erhöhtes Level an miR-362-3p nachweisen im Vergleich zu den Seren der gesunden Kontrollgruppe ($p > 0,0001$). In Kombination mit vier weiteren microRNAs (miR-28-5p, miR-572, miR-378-3p, miR-193a-3p) gelang schließlich eine Unterscheidung zwischen ccRCC und GK mit einer Sensitivität von 78,5% und einer Spezifität von 74,8%. Ebenso konnte bei der Betrachtung dieses Sets von fünf microRNAs eindeutig zwischen den Tumorstadien I und IV nach der TNM-Klassifikation unterschieden werden. Diese Ergebnisse aus der vorangegangenen Studie konnten in der vorliegenden Arbeit zu keinem Zeitpunkt repliziert werden. Es wird

vermutet, dass miR-362-3p durch seinen Einfluss auf die Karzinom begünstigende Nemo-kinase die Funktion eines Tumorsuppressors beim Nierenzellkarzinom innehat (Zou et al. 2016). Es zeigte sich ein negativ proportionales Verhältnis zwischen dem Expressionsniveau von miR-362-3p und der Zellproliferation, -migration und -invasion der RCC-Tumorzelllinien ACHN und 786-O. Zudem scheint miR-362-3p die Apoptose von Krebszellen zu fördern und deren Zellteilung in der G1-Phase zu unterbrechen.

Die ebenfalls untersuchte miR-210-3p, welche im Vorfeld signifikant erhöhte Levels aufwies (Iwamoto et al. 2014; Fedorko et al. 2015; Zhao et al. 2013), ließ sich in allen Seren dieser Studie zwar nachweisen, konnte allerdings bei gegebenem Signifikanzniveau von $p = 0,05$ nicht treffsicher zwischen erkrankten und gesunden Probanden unterscheiden.

Zhao et al. (2013) verglichen Seren von 68 ccRCC-Patienten mit 42 Seren der gesunden Kontrollgruppe. Er konnte ein ausreichend großes Unterscheidungsvermögen der miR-210-3p zwischen beiden Vergleichsgruppen nachweisen ($p < 0.001$, AUC = 0.874, Sensitivität 81%, Spezifität von 79,4%). 2014 konnten Iwamoto et al. diese Ergebnisse bestätigen ($p = 0.001$, AUC = 0,77, Sensitivität 65%, Spezifität 83%). Es wurden 34 Seren der Gruppe ccRCC und 23 Seren der Gruppe GK verglichen und anhand der miR-210 ein signifikantes Unterscheidungsvermögen dokumentiert. Den Nachweis eines Zusammenhangs zwischen dem Expressionslevel der microRNA und klinischen Kriterien wie dem Alter, dem Geschlecht, der Tumorgroße oder dem Vorliegen von Metastasen konnte Iwamoto nicht erbringen. Fedorko et al. (2015) wiesen signifikant erhöhte Serum miR-210 Level in 195 RCC-Proben und 100 GK-Proben bei RCC Patienten nach ($p < 0.0001$, AUC = 0,85, Sensitivität 80%, Spezifität 78%). Dies war möglich, wenn miR-210 und miR-378 als Marker kombiniert betrachtet wurden. 20 Seren der erkrankten Gruppe wurden separat prä- und postoperativ analysiert und zeigten nach Nephrektomie einen signifikanten Abfall von miR-210 und miR-378 drei Monate nach der Operation ($p < 0,0001$).

2009 wurde eine Hochregulation von miR-210 bei Zellen in hypoxischem Stress gezeigt (Crosby et al. 2009). Die microRNA besaß eine hemmende Wirkung auf RAD52, welches eine zentrale Rolle in der DNA-Reparatur spielt und somit die Bildung von

Tumoren begünstigt. Dass eine Korrelation zwischen dem veränderten Expressionsniveau von miR-210 und dem Auftreten eines Nierenzellkarzinoms besteht, zeigten weitere Studien: (Nakada et al. 2011). (2011) zeigten eine signifikant erhöhte Expression der microRNA in RCC-Zelllinien und ihren Zusammenhang zum akkumulierten Hypoxie-induzierenden Faktor 1 α (HIF1 α) unter hypoxischen Bedingungen. Dieser Vorgang wird begünstigt durch eine Inaktivität des Von-Hippel-Lindau-Gens (VHL), welche in über 70% der Nierenzellkarzinome nachgewiesen werden kann. Die Gruppe um Nakada konnte umgekehrt nach Reaktivierung des VHL-Gens eine Degradierung von HIF1 α und damit einhergehend ein verringertes Level an miR-210 dokumentieren. 2015 wurde ebenfalls der hochregulierende Einfluss von HIF1 α auf miR-210 anhand der Gewebeuntersuchung von 45 RCC-Patienten beschrieben (Tang und Xu 2015). Ein Zusammenhang zwischen der dysregulierten miR-210 und dem Krebs-spezifischen Überleben wurde nicht nachgewiesen. Ein erhöhtes Risiko für ein Rezidiv und für ein kürzeres Gesamtüberleben beim ccRCC (Samaan et al. 2015), sowie ein erhöhtes Risiko für ein Versterben durch ein Nierenzellkarzinom (Dias et al. 2017) wurde jedoch anhand von ccRCC-Gewebe (Samaan) und anhand des Plasmas von RCC-Patienten (Dias) demonstriert. Letztgenannte Studie bewies durch Untersuchung von RCC-Zelllinien die vermehrte Freisetzung u.a. von miR-210 unter Hypoxie. Diese gilt wiederum als Stimulus für gesteigerte Zellproliferation, Angiogenese und erhöht das Potential der Metastasenbildung. Diese Ergebnisse konnten durch Zhang et al. (2018) teilweise verifiziert werden, indem ein erhöhtes Expressionsniveau der genannten microRNA in ccRCC-Gewebe in Verbindung gebracht wurde mit der Tumorentstehung und dem Vorkommen eines Tumorrezidivs nach Nephrektomie .

Drei weitere Arbeiten befassten sich ebenfalls mit der Dysregulation der miR-210 beim Nierenzellkarzinom, kamen jedoch zu anders gerichteten Ergebnissen als die bisher erwähnten Studien. 2017 beschrieben (Yoshino et al. 2017) anhand von Zelllinien zwar ebenfalls die erhöhte Expression der microRNA beim RCC, jedoch auch, dass ein Abbau von miR-210-3p in Verbindung mit einer gesteigerten Tumorgenese, sowie einem schlechteren Gesamt- und Tumor-freiem Überleben steht. Bereits im Jahr 2013 befanden (McCormick et al. 2013)., dass ein erhöhtes microRNA-Level bei niedrigem pT-Stadium und bei niedrigem Fuhrmann-Grad mit einem besseren Gesamtüberleben und einer reduzierten Proliferation der Nierenzellkarzinomzellen einhergehe. Ebenso

wurde bei Nierenzellkarzinomzelllinien eine verringerte Ausprägung von miR-210-3p als unterstützendes Element der Multi-Drug-Resistance (MDR), also der Resistenz des RCC gegenüber Chemotherapeutika, genannt (Li et al. 2018).

Im Vorfeld wurde die dysregulierte miR-210 jedoch auch in Zusammenhang mit anderen Krebsentitäten bzw. mit RCC- unspezifischen Zellveränderungen gebracht. Bei einer Erkrankung an Brustkrebs wurden bei erhöhtem Expressionslevel eine geringere Krankheitsfreiheit und ein schlechteres Gesamtüberleben (Camps et al. 2008), sowie eine gesteigerte Resistenz gegen das Immuntherapeutikum Trastuzumab und eine höhere Wahrscheinlichkeit für eine lymphogene Metastasierung beschrieben (Jung et al. 2012). Nach einer Studie von (Fasanaro et al. 2008) wird eine gesteigerte Expression von miR-210 in Endothelzellen unter Hypoxie beobachtet. Die Endothelzellen werden durch die microRNA moduliert und gelangen somit zu einem gesteigerten Überleben, einer vermehrten Zellmigration und –differenzierung. Eine vermehrte Angiogenese, welche zwangsläufig einer gesteigerten Endothelzellaktivität bedarf, zeigt sich allerdings nicht nur beim Nierenzellkarzinom, sondern bei unterschiedlichen Krebsentitäten. Eine eindeutige, RCC- spezifische Zuordnung der miR-210 erscheint somit als nicht gegeben.

Die genannten Arbeiten legen eine bedeutende Rolle der miR-210 beim Nierenzellkarzinom nahe. Aufgrund der unterschiedlich ausgewerteten Materialien wie Serum, Plasma, Tumorgewebe und Tumorzellreihen lassen sich die Ergebnisse nur bedingt miteinander vergleichen. Beispielsweise ist naturgemäß von einem vermehrten Vorkommen der microRNA in Gewebe auszugehen, anders als etwa im Serum der Patienten. Während in hiesiger Arbeit ausschließlich das ccRCC betrachtet wurde, wird in einigen anderen Studien nicht eindeutig zwischen den Subtypen des Nierenzellkarzinoms unterschieden. Darüber hinaus haben wir lediglich das Expressionsniveau von miR-210-3p untersucht, auch hier schienen vorangegangene Arbeiten nicht exakt zu differenzieren. MiR-210-3p und miR-210-5p basieren beide auf derselben Vorläufersequenz, stellen jedoch per se unterschiedliche Sequenzen dar. Mit der genannten Nomenklatur wird der Fall beschrieben, dass das relative, vermehrte Vorkommen einer der beiden Sequenzen nicht bekannt ist. Es kann somit keine Aussage darüber getroffen werden, ob die microRNA mit -3p-Endung oder mit -5p-Endung das Hauptprodukt der Vorläufersequenz und somit die reife Kopie darstellt. In

unserer Arbeit konnte kein signifikanter Unterschied des Expressionsniveaus von miR-210-3p zwischen den gesunden und kranken Probanden ausgemacht werden. Ob wir im Endeffekt die nicht vorherrschende, also unreife Sequenz betrachtet haben und darin die ausbleibende Signifikanz begründet ist, bleibt zu überprüfen. Auch wenn eine Großzahl von Studien die dysregulierte miR-210 im Zusammenhang mit dem Nierenzellkarzinom sieht, geben die drei oben genannten Studien von Camps et al., Jung et al. und Fasanaro et al. Grund zum Zweifel, ob die miR-210 als einzelner, krebsspezifischer Tumormarker für das RCC fungieren kann.

Von sechs in der vorliegenden Arbeit untersuchten microRNAs waren miR-28-5p und miR-572 in keinem der untersuchten Seren nachweisbar. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass das hier verwendete TaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit nicht in der Lage zu sein scheint, jene beiden microRNAs in ausreichendem Maße in cDNA umzuschreiben, wie es zuvor einer anderen Studiengruppe gelungen war (Wang et al. 2015). Diese verwendete das TaqMan probe-based RT-qPCR System, welches den Reaktionsschritt der reversen Transkription von microRNA zu cDNA mittels stem-loop RT-Primer vollzieht. Die sich anschließende PCR wurde wie in der vorliegenden Arbeit durchgeführt, ebenso wie die Detektion der Signale, welche durch die microRNAs erzeugt wurden. Die in vorliegender Arbeit verwendeten microRNA-Arrays scheinen für microRNA-28-5p und microRNA-572 nicht zu funktionieren. Ob dies an einer zu geringen Bindungsaffinität der Arrays an den entsprechenden microRNA-Sequenzen liegt oder ob das Expressionslevel dieser microRNAs zu gering ausfällt, bleibt zu diskutieren. Da ein messbares Signal durch miR-28-5p und miR-572 ausblieb und damit kein Nachweis jeglicher Funktionalität ebenjener Gene erbracht werden konnte, wurden diese beiden Sequenzen bereits zu Beginn der Studie vom weiteren Versuchsablauf ausgeschlossen.

Betrachtet man das Design vorliegender Arbeit und vorhergehender Studien, so lassen sich große Parallelen darstellen. Alle Studien haben miteinander gemein, dass zuerst eine Isolation der microRNA-Sequenzen aus dem Serum der Versuchsproben vollzogen wurde, bevor anschließend mittels reverser Transkription eine Umschreibung der microRNA zu cDNA, dann eine Präamplifizierung der generierten cDNA und schließlich eine detaillierte Analyse der microRNA-Levels mittels Echtzeit-PCR (rt-PCR)

durchgeführt wurde. Anders als in dieser Studie wurde in den Arbeiten von Wang, Iwamoto und Redova das TaqMan MicroRNA RT Kit zur reversen Transkription verwendet. Hinsichtlich der miR-362-3p, miR-572, miR-28-3p, miR-210-3p und miR-378-3p konnten die Ergebnisse nicht repliziert werden. Die verschiedenen Wege der Umschreibung könnten somit ein möglicher Grund für die abweichenden Ergebnisse sein. Beinahe alle Studien verwendeten endogene oder exogene Referenzgene, die zur Normalisierung der gemessenen Signale dienten. Schließlich ließ sich mittels Delta-Delta-Ct-Methode die Ausprägung der microRNA-Expression unabhängig von schwankenden PCR-Durchläufen korrekt darstellen. Eine Ausnahme stellte die Arbeit von Fedorko (2015) dar. Hier konnten zwar signifikant erhöhte microRNA-Levels für miR-210-3p und miR-378-3p bei ausreichend hoher Sensitivität (80%) und Spezifität (78%) gezeigt werden. Jedoch wurden diese Messergebnisse nicht gegen ein Referenzgen normalisiert, sondern die absoluten, quantitativ gemessenen Signale ausgewertet. Das Auftreten von unterschiedlichen PCR-Effizienzen, was ebenfalls zu einem verstärkten Signal einer microRNA führen kann, wurde also nicht berücksichtigt. Insgesamt verringert sich dadurch die Aussagekraft jener Studie.

Die Ergebnisse unserer Arbeit weichen also teilweise stark von den Resultaten ab, welche im Vorfeld erbracht wurden. Die vorliegende, relativ kleine Kohortengröße von 45 Proben (30 ccRCC-Seren, 15 GK-Seren) erfüllte nicht die Bedingungen einer Normalverteilung. Dies führte zu Ungenauigkeiten bei den Berechnungen der Signifikanzen. Allgemein ermöglicht eine größere Anzahl an zu untersuchenden Seren ($n > 100$), Extremwerte besser in die Gesamtheit der Messwerte einzuordnen. Die Ergebnisse gewinnen an Genauigkeit, da jene Extremwerte nicht weiter ins Gewicht fallen.

In dieser Arbeit wurden ausschließlich Proben der Biobank des CIO Köln Bonn verwendet. Wenn Proben einer einzelnen Biobank verwendet werden, kann eine regionale Vorselektion entstehen. Es würde nur die Bevölkerung einer gewissen Region repräsentiert werden, jedoch nicht der Durchschnitt der Gesamtbevölkerung Deutschlands. Ergebnisse einer Studie mit Proben aus lediglich einer Biobank sind somit weniger repräsentativ, als es Ergebnisse einer Multicenter-Studie wären. Als eine von wenigen Forschungsgruppen konzipierten Hauser et al. (2012) eine Arbeit nach den

Statuten einer Multicenter-Studie. Dieses Vorgehen hätte wiederum die wissenschaftliche Aussagekraft der Ergebnisse anderer Studien gesteigert.

Im Zuge der Präamplifikation haben wir eine Modifikation des Versuchsprotokolls vorgenommen, indem wir die vom Hersteller empfohlene Anzahl der Präamplifikationszyklen von 14 auf 20 Zyklen erhöht haben. Dieser Schritt war nötig, da bei genauer Befolgung der Herstellerempfehlungen keine ausreichenden Signale der microRNAs während der PCR ermittelt werden konnten. Nach 20 Präamplifikationszyklen waren die gemessenen Signale stets eindeutig von Hintergrundgeräuschen zu unterscheiden. Eine Verfälschung der Messergebnisse durch übermäßige Vervielfältigung der microRNAs wurde vermieden, indem die Signale gegen jene des exogenen Referenzgens cel-miR-39 normalisiert wurden.

Die postoperative Betrachtung der microRNA-Levels wurde in hiesiger Studie nicht vorgenommen, sie bietet jedoch bei der Suche nach einem geeigneten Biomarker für das klarzellige Nierenzellkarzinom einen zusätzlichen Informationsgewinn. So hätte begutachtet werden können, ob sich das Level einer microRNA nach der Entfernung des malignen Gewebes nach einer festgelegten Zeitspanne von beispielsweise drei Wochen verändert. Entsprechend hätte eine organspezifische Zuordnung einer microRNA vollzogen werden können.

Vorangegangene Arbeiten kennzeichneten sich durch eine höhere Sensitivität und Spezifität, wenn zur Unterscheidung zwischen ccRCC und GK nicht nur eine einzelne microRNA herangezogen wurde, sondern wenn Sets aus zwei oder mehr microRNAs gebildet wurden (Redova et al. 2012; Fedorko et al. 2015; Wang et al. 2015). Gegebenenfalls kann die kombinierte Betrachtungsweise der Expressionsniveaus von miR-378-3p und von miR-193a-3p zu einer besseren Trennschärfe, sowie zu einer höheren Sensitivität und Spezifität führen. Dies bleibt zu überprüfen.

In dieser Studie gelang es nicht, anhand des Expressionsniveaus einer microRNA einen signifikanten Unterschied zwischen den Tumorstadien T1 und T3, sowie zwischen den histologischen Differenzierungsgraden nach Fuhrmann darzustellen. Es kann somit keine Aussage darüber getroffen werden, ob eine der untersuchten microRNAs über eine prognostische Aussagekraft verfügt.

Abschließend lässt sich sagen, dass miR-378-3p und miR-193a-3p ein gewisses Potential als Tumormarker beim ccRCC aufweisen. Jede microRNA für sich war in der Lage, signifikant zwischen gesunden und kranken Probanden dieser Studie zu unterscheiden. Allerdings waren sowohl das jeweilige Differenzierungsvermögen, als auch die microRNA-spezifische Sensitivität und Spezifität von zu geringer Ausprägung, als dass die Kriterien für einen potentiellen Tumormarker beim ccRCC erfüllt wurden. Daher wurde in dieser Studie von einer weiterführenden Untersuchung der genannten microRNAs abgesehen.

Bei signifikant messbaren Unterschieden der microRNA-Levels von miR-378-3p und miR-193a-3p bedarf es weiterführender Untersuchungen, um das vollständige Potential dieser beiden Sequenzen als Tumormarker beim klarzelligen Nierenzellkarzinom feststellen zu können. Es wäre vorstellbar, beide microRNAs in Kombination, also in Form eines microRNA-Sets zu betrachten. Als Studiendesign empfiehlt sich eine multizentrische Studie mit ausreichend großer Probandenzahl. Zum anderen sollte im Zuge einer weiteren Studie eine ausreichend große Kohorte an benignen Nierentumoren im Vergleich zu ccRCC-Patienten betrachtet werden. Dies hätte zum Ziel, anhand eines aus dem Serum gewonnen Biomarkers eindeutig zwischen gutartigen und bösartigen Nierentumoren unterscheiden zu können. Vor allem Patienten mit benignen Tumoren würden davon profitieren, da ihnen beispielsweise eine Operation zur (Teil-) Entnahme der betroffenen Niere erspart bliebe. Von erweitertem Interesse bleibt der postoperative Verlauf des microRNA-Expressionsniveaus. Diese Verlaufskontrolle bietet die Möglichkeit, die Tauglichkeit einer microRNA als Verlaufsparemeter im Zuge eines Therapiemonitorings zu überprüfen.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden miR-210-3p, miR-362-3p, miR-378-3p, miR-193a-3p, miR-28-5p und miR-572 auf ihr Potential als Tumormarker beim klarzelligem Nierenzellkarzinom (ccRCC) untersucht. Aufgrund der positiven Studienergebnisse aus dem Vorfeld entscheiden wir uns für eine Validierung ebendieser microRNAs. Aktuell ist für das ccRCC noch kein spezifischer Tumormarker bekannt, ein Nierenzellkarzinom wird meistens per Zufall im Zuge anderer diagnostischer Untersuchungen wie einem CT oder einem Ultraschall entdeckt. Ein entsprechender Tumormarker würde nicht nur der Früherkennung eines ccRCC dienen, sondern auch bei der Differenzierung zwischen gutartigen und bösartigen Raumforderung der Niere helfen und als Verlaufsparemeter nach der operativen Versorgung eines ccRCC fungieren.

Für diese Arbeit wurden die Seren von 45 Probanden analysiert, wobei 30 Proben der Gruppe der erkrankten Patienten und 15 Proben der Gruppe der gesunden Probanden zugeordnet werden konnten. Im Versuchsablauf wurden zunächst die micro-RNAs mittels Isolationsverfahren aus den Seren gewonnen. Nach der Umschreibung in cDNA und der Präamplifikation erfolgte schließlich mittels real-time PCR die Analyse der Sequenzen.

Während miR-362-3p und miR-210-3p zu keinem Zeitpunkt dieser Arbeit signifikant zwischen der GK und ccRCC unterscheiden konnte, gelang dies sowohl miR-378-3p, als auch miR-193a-3p. Bei ccRCC-Patienten wurde miR-378-3p in signifikant niedriger Konzentration nachgewiesen. Allerdings ergaben sich lediglich eine Sensitivität von 76,6 % und eine Spezifität von 60,0 %, sowie eine AUC = 0.682. Ein ähnliches Bild ergab sich für miR-193a-3p, welche bei signifikant vermehrter Expression in den ccRCC-Seren zwischen beiden Gruppen einen eindeutigen Unterschied ausmachen konnte. Jedoch sind auch hier die Sensitivität (63,3 %), die Spezifität (73,3 %) und die AUC (0.699) gering. Diese Werte sind für einen potentiellen Tumormarker als zu niedrig zu beschreiben, weshalb von einer weiterführenden Untersuchung abgesehen wurde. Keine der microRNAs war mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium oder einem niedrigen Differenzierungsgrad assoziiert.

6. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Schematische Darstellung der TaqMan[®]-Sonde; R: fluoreszenter Reporter-Farbstoff; Q: Quencher: A) TaqMan[®] Probe bestehend aus Reporter-Farbstoff und Quencher dockt an spezifischer Sequenz zwischen Forward und Reverse Primer an; B) Nach Aktivierung der Taq-Polymerase wird TaqMan[®]-Sonde von dieser Sequenz zunehmend gelöst; C) Der Reporter-Farbstoff kann nach der Entfernung vom Quencher gemessen werden; D) Das Signal wird einer spezifischen Sequenz zugeordnet und steigt an pro durchlaufenen Reaktionszyklus. 31
- Abb. 2: Relativiertes Level von miR-193a-3p im Serum von Patienten der gesunden Kontrollgruppe (GK) und Patienten mit einem klarzelligen Nierenzellkarzinom (ccRCC). 41
- Abb. 3: Relativiertes Level von miR-378-3p im Serum von Patienten der gesunden Kontrollgruppe (GK) und Patienten mit einem klarzelligen Nierenzellkarzinom (ccRCC). 42
- Abb. 4: Relativiertes Level von miR-362-3p im Serum von Patienten der gesunden Kontrollgruppe (GK) und Patienten mit einem klarzelligen Nierenzellkarzinom (ccRCC). 43
- Abb. 5: Relativiertes Level von miR-210-3p im Serum von Patienten der gesunden Kontrollgruppe (GK) und Patienten mit einem klarzelligen Nierenzellkarzinom (ccRCC). 44
- Abb. 6: Receiver Operating Characteristic-Kurve (ROC) zum Differenzierungsvermögen der miR-193a-3p und der miR-378-3p zwischen GK und ccRCC anhand der jeweiligen Sensitivität und Spezifität. 45

7. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: TNM-Klassifikation nach den Kriterien der Union international contre le cancer (UICC)	13
Tab. 2: UICC-Tumorstadieneinteilung des ccRCC mittels TNM-Klassifikation.....	14
Tab. 3: Histopathologische Einteilung des ccRCC nach Fuhrmann.....	14
Tab. 4: Aufteilung der Seren nach TNM Klassifikation und Fuhrmann-Grading.....	38
Tab. 5: Statistische Datenanalyse ccRCC vs. GK von miR-210-3p, miR-362-3p, miR-378-3p, miR193a-3p normalisiert gegen cel-miR-39.....	45

8. Literaturverzeichnis

Camps, Carme; Buffa, Francesca M.; Colella, Stefano; Moore, John; Sotiriou, Christos; Sheldon, Helen et al. (2008): hsa-miR-210 Is induced by hypoxia and is an independent prognostic factor in breast cancer. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 14 (5), S. 1340–1348. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1755.

Courts (2011): Basics – Micro-RNA. Hg. v. Konradin Medien GmbH. Online verfügbar unter <http://scienceblogs.de/bloodnacid/2011/09/15/basics-microrna/>, zuletzt aktualisiert am 08.05.2018, zuletzt geprüft am 08.05.2018.

Crosby, Meredith E.; Kulshreshtha, Ritu; Ivan, Mircea; Glazer, Peter M. (2009): MicroRNA regulation of DNA repair gene expression in hypoxic stress. In: *Cancer research* 69 (3), S. 1221–1229. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2516.

Deng, Francis (2020): WHO classification of tumors of the kidney | Radiology Reference Article | Radiopaedia.org. Online verfügbar unter <https://radiopaedia.org/articles/who-classification-of-tumours-of-the-kidney?lang=us>, zuletzt aktualisiert am 01.03.2020, zuletzt geprüft am 01.03.2020.

Dias, Francisca; Teixeira, Ana Luísa; Ferreira, Marta; Adem, Bárbara; Bastos, Nuno; Vieira, Joana et al. (2017): Plasmatic miR-210, miR-221 and miR-1233 profile. Potential liquid biopsies candidates for renal cell carcinoma. In: *Oncotarget* 8 (61), S. 103315–103326. DOI: 10.18632/oncotarget.21733.

Fan, Yang; Ma, Xin; Li, Hongzhao; Gao, Yu; Huang, Qingbo; Zhang, Yu et al. (2018): miR-122 promotes metastasis of clear-cell renal cell carcinoma by downregulating Dicer. In: *International journal of cancer* 142 (3), S. 547–560. DOI: 10.1002/ijc.31050.

Fasanaro, Pasquale; D'Alessandra, Yuri; Di Stefano, Valeria; Melchionna, Roberta; Romani, Sveva; Pompilio, Giulio et al. (2008): MicroRNA-210 modulates endothelial cell response to hypoxia and inhibits the receptor tyrosine kinase ligand Ephrin-A3. In: *The Journal of biological chemistry* 283 (23), S. 15878–15883. DOI: 10.1074/jbc.M800731200.

Fedorko, Michal; Stanik, Michal; Iliev, Robert; Redova-Lojova, Martina; Machackova, Tana; Svoboda, Marek et al. (2015): Combination of MiR-378 and MiR-210 Serum Levels Enables Sensitive Detection of Renal Cell Carcinoma. In: *International journal of molecular sciences* 16 (10), S. 23382–23389. DOI: 10.3390/ijms161023382.

Gottardo, Fedra; Liu, Chang Gong; Ferracin, Manuela; Calin, George A.; Fassan, Matteo; Bassi, Pierfrancesco et al. (2007): Micro-RNA profiling in kidney and bladder cancers. In: *Urologic oncology* 25 (5), S. 387–392. DOI: 10.1016/j.urolonc.2007.01.019.

Gu, Liangyou; Li, Hongzhao; Chen, Luyao; Ma, Xin; Gao, Yu; Li, Xintao et al. (2015): MicroRNAs as prognostic molecular signatures in renal cell carcinoma. A systematic review and meta-analysis. In: *Oncotarget* 6 (32), S. 32545–32560. DOI: 10.18632/oncotarget.5324.

Hauser, Stefan; Wulfken, Lena M.; Holdenrieder, Stefan; Moritz, Rudolf; Ohlmann, Carsten-Henning; Jung, Volker et al. (2012): Analysis of serum microRNAs (miR-26a-2*, miR-191, miR-337-3p and miR-378) as potential biomarkers in renal cell carcinoma. In: *Cancer epidemiology* 36 (4), S. 391–394. DOI: 10.1016/j.canep.2012.04.001.

He, Lin; Hannon, Gregory J. (2004): MicroRNAs. Small RNAs with a big role in gene regulation. In: *Nature reviews. Genetics* 5 (7), S. 522–531. DOI: 10.1038/nrg1379.

Heinemann, Frauke G.; Tolkach, Yuri; Deng, Mario; Schmidt, Doris; Perner, Sven; Kristiansen, Glen et al. (2018): Serum miR-122-5p and miR-206 expression. Non-invasive prognostic biomarkers for renal cell carcinoma. In: *Clinical epigenetics* 10, S. 11. DOI: 10.1186/s13148-018-0444-9.

Iwamoto, Hideto; Kanda, Yusuke; Sejima, Takehiro; Osaki, Mitsuhiko; Okada, Futoshi; Takenaka, Atsushi (2014): Serum miR-210 as a potential biomarker of early clear cell renal cell carcinoma. In: *International journal of oncology* 44 (1), S. 53–58. DOI: 10.3892/ijo.2013.2169.

Jung, Eun-Jung; Santarpia, Libero; Kim, Juyeon; Esteva, Francisco J.; Moretti, Erica; Buzdar, Aman U. et al. (2012): Plasma microRNA 210 levels correlate with sensitivity to trastuzumab and tumor presence in breast cancer patients. In: *Cancer* 118 (10), S. 2603–2614. DOI: 10.1002/cncr.26565.

Keller, Andreas; Leidinger, Petra; Borries, Anne; Wendschlag, Anke; Wucherpfennig, Frank; Scheffler, Matthias et al. (2009a): miRNAs in lung cancer - studying complex fingerprints in patient's blood cells by microarray experiments. In: *BMC cancer* 9, S. 353. DOI: 10.1186/1471-2407-9-353.

Keller, Andreas; Leidinger, Petra; Lange, Julia; Borries, Anne; Schroers, Hannah; Scheffler, Matthias et al. (2009b): Multiple sclerosis. MicroRNA expression profiles accurately differentiate patients with relapsing-remitting disease from healthy controls. In: *PloS one* 4 (10), e7440. DOI: 10.1371/journal.pone.0007440.

Kim, V. Narry; Nam, Jin-Wu (2006): Genomics of microRNA. In: *Trends in genetics : TIG* 22 (3), S. 165–173. DOI: 10.1016/j.tig.2006.01.003.

Lee, R. C.; Feinbaum, R. L.; Ambros, V. (1993): The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. In: *Cell* 75 (5), S. 843–854.

Li, Songchao; Yang, Jinjian; Wang, Jun; Gao, Wansheng; Ding, Yafei; Ding, Yinghui; Jia, Zhankui (2018): Down-regulation of miR-210-3p encourages chemotherapy resistance of renal cell carcinoma via modulating ABCC1. In: *Cell & bioscience* 8, S. 9. DOI: 10.1186/s13578-018-0209-3.

Livak, K. J.; Schmittgen, T. D. (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method. In: *Methods (San Diego, Calif.)* 25 (4), S. 402–408. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.

Manski, Dirk (2017): Urologielehrbuch.de. Ausgabe 2017. Ausgabe 2017. Stadtbergen: Manski, Dr. Dirk.

McCormick, R. I.; Blick, C.; Ragoussis, J.; Schoedel, J.; Mole, D. R.; Young, A. C. et al. (2013): miR-210 is a target of hypoxia-inducible factors 1 and 2 in renal cancer, regulates ISCU and correlates with good prognosis. In: *British journal of cancer* 108 (5), S. 1133–1142. DOI: 10.1038/bjc.2013.56.

miRBase (2020). Online verfügbar unter <http://www.mirbase.org/>, zuletzt aktualisiert am 01.03.2020, zuletzt geprüft am 01.03.2020.

Mitchell, Patrick S.; Parkin, Rachael K.; Kroh, Evan M.; Fritz, Brian R.; Wyman, Stacia K.; Pogosova-Agadjanyan, Era L. et al. (2008): Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (30), S. 10513–10518. DOI: 10.1073/pnas.0804549105.

Morrissey, Jeremiah J.; Mellnick, Vincent M.; Luo, Jingqin; Siegel, Marilyn J.; Figenshau, R. Sherburne; Bhayani, Sam; Kharasch, Evan D. (2015): Evaluation of Urine Aquaporin-1 and Perilipin-2 Concentrations as Biomarkers to Screen for Renal Cell Carcinoma. A Prospective Cohort Study. In: *JAMA oncology* 1 (2), S. 204–212. DOI: 10.1001/jamaoncol.2015.0213.

Nakada, Chisato; Tsukamoto, Yoshiyuki; Matsuura, Keiko; Nguyen, Tung Lam; Hijiya, Naoki; Uchida, Tomohisa et al. (2011): Overexpression of miR-210, a downstream target of HIF1 α , causes centrosome amplification in renal carcinoma cells. In: *The Journal of pathology* 224 (2), S. 280–288. DOI: 10.1002/path.2860.

Onkologie, Leitlinienprogramm (2017): Kurzversion S3-Leitlinie Nierenzellkarzinom 2017, zuletzt geprüft am 07.05.2018.

Radtke, A.; Cremers, J-F; Kliesch, S.; Riek, S.; Junker, K.; Mohamed, S. A. et al. (2017): Can germ cell neoplasia in situ be diagnosed by measuring serum levels of microRNA371a-3p? In: *Journal of cancer research and clinical oncology* 143 (11), S. 2383–2392. DOI: 10.1007/s00432-017-2490-7.

Redova, Martina; Poprach, Alexandr; Nekvindova, Jana; Iliev, Robert; Radova, Lenka; Lakomy, Radek et al. (2012): Circulating miR-378 and miR-451 in serum are potential biomarkers for renal cell carcinoma. In: *Journal of translational medicine* 10, S. 55. DOI: 10.1186/1479-5876-10-55.

Reinhart, B. J.; Slack, F. J.; Basson, M.; Pasquinelli, A. E.; Bettinger, J. C.; Rougvie, A. E. et al. (2000): The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. In: *Nature* 403 (6772), S. 901–906. DOI: 10.1038/35002607.

Robert-Koch Institut (2018a): Krebs, Niere in Deutschland | 2013/2014 | Niere C64 2018, zuletzt geprüft am 13.04.2018.

Robert-Koch-Institut (2018b): Krebs gesamt in Deutschland | 2013/2014 | Krebs gesamt 2018, zuletzt geprüft am 13.04.2018.

Samaan, Sara; Khella, Heba W. Z.; Girgis, Andrew; Scorilas, Andreas; Lianidou, Evi; Gabril, Manal et al. (2015): miR-210 is a prognostic marker in clear cell renal cell carcinoma. In: *The Journal of molecular diagnostics : JMD* 17 (2), S. 136–144. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2014.10.005.

Tang, Kun; Xu, Hua (2015): Prognostic value of meta-signature miRNAs in renal cell carcinoma. An integrated miRNA expression profiling analysis. In: *Scientific reports* 5, S. 10272. DOI: 10.1038/srep10272.

Wang, Cheng; Hu, Jicheng; Lu, Meiling; Gu, Hongwei; Zhou, Xiaojun; Chen, Xi et al. (2015): A panel of five serum miRNAs as a potential diagnostic tool for early-stage renal cell carcinoma. In: *Scientific reports* 5, S. 7610. DOI: 10.1038/srep07610.

Wang, Kai; Yuan, Yue; Cho, Ji-Hoon; McClarty, Sara; Baxter, David; Galas, David J. (2012): Comparing the MicroRNA spectrum between serum and plasma. In: *PloS one* 7 (7), e41561. DOI: 10.1371/journal.pone.0041561.

Yoshino, Hirofumi; Yonemori, Masaya; Miyamoto, Kazutaka; Tatarano, Syuichi; Kofuji, Satoshi; Nohata, Nijiro et al. (2017): microRNA-210-3p depletion by CRISPR/Cas9 promoted tumorigenesis through revival of TWIST1 in renal cell carcinoma. In: *Oncotarget* 8 (13), S. 20881–20894. DOI: 10.18632/oncotarget.14930.

Zanutto, S.; Pizzamiglio, S.; Ghilotti, M.; Bertan, C.; Ravagnani, F.; Perrone, F. et al. (2014): Circulating miR-378 in plasma. A reliable, haemolysis-independent biomarker for colorectal cancer. In: *British journal of cancer* 110 (4), S. 1001–1007. DOI: 10.1038/bjc.2013.819.

Zhang, Jinhua; Ye, Yuanqing; Chang, David W.; Lin, Shu-Hong; Huang, Maosheng; Tannir, Nizar M. et al. (2018): Global and Targeted miRNA Expression Profiling in Clear Cell Renal Cell Carcinoma Tissues Potentially Links miR-155-5p and miR-210-3p to both Tumorigenesis and Recurrence. In: *The American journal of pathology* 188 (11), S. 2487–2496. DOI: 10.1016/j.ajpath.2018.07.026.

Zhao, An; Li, Guorong; Péoc'h, Michel; Genin, Christian; Gigante, Marc (2013): Serum miR-210 as a novel biomarker for molecular diagnosis of clear cell renal cell carcinoma. In: *Experimental and molecular pathology* 94 (1), S. 115–120. DOI: 10.1016/j.yexmp.2012.10.005.

Zou, Xiaowen; Zhong, Jianhua; Li, Jiaqiang; Su, Zhengming; Chen, Yan; Deng, Wanxin et al. (2016): miR-362-3p targets nemo-like kinase and functions as a tumor suppressor in renal cancer cells. In: *Molecular medicine reports* 13 (1), S. 994–1002. DOI: 10.3892/mmr.2015.4632.

9. Danksagung

Einen großen Dank richte ich an meinen Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Jörg Ellinger für die Überlassung dieser Doktorarbeit, für die angenehme Zusammenarbeit und für immerzu schnellen und kompetenten Rat und Beistand bei Problemen und Fragen.

Ebenfalls möchte ich mich bei Frau Doris Schmidt bedanken, die nicht nur während der Zeit im Labor immer eine Lösung fand, sondern auch beim Verfassen dieser Arbeit mir unterstützend zur Seite stand.

Meinen Eltern danke ich für ihren uneingeschränkten Zuspruch und ihre anhaltende Motivation. Ohne sie hätte ich diese Arbeit nie angehen können.

Ein besonderer Dank geht an Herrn Dr. med. Peter May für die Begleitung nicht nur während dieser Doktorarbeit.

Meiner Freundin gilt ein sehr großer Dank, die die gesamte Zeit während der Erstellung dieser Arbeit mit mir durchlaufen ist und mir dabei immer ein Rückhalt und eine Motivatorin war.