

Aus der Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie des
Universitätsklinikums Würzburg

Direktor: Univ.-Professor Dr. med. Hubert Kübler

**Prognostische Rolle von microRNA-21, -126 und -221 im klarzelligen
Nierenzellkarzinom mit Vena cava-Thrombus**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Michael Kotlyar
aus Nowosibirsk

Würzburg, Dezember 2022



Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Hubert Kübler
Korreferent: Prof. Dr. med. A. Wiegering
Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 03.07.2023

Der Promovend ist Arzt.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Epidemiologie des Nierenzellkarzinoms	1
1.2 MiRNAs: Die kleinen Hoffnungsträger	3
1.2.1 Entdeckung und Gegenwart	3
1.2.2 MiRNA-Reifung	5
1.2.3 MiRNA-vermittelte Regulation der Genexpression	6
1.2.4 Rolle von miRNAs in der Karzinogenese	10
1.2.5 MiRNAs als diagnostische und prognostische Biomarker	11
1.3 MiRNAs im klarzelligen Nierenzellkarzinom	12
1.4 Hintergrundinformationen zu den ausgewählten miRNAs	13
1.4.1 MiR-21	13
1.4.2 MiR-126	14
1.4.3 MiR-145	14
1.4.4 MiR-200c	15
1.4.5 MiR-205	15
1.4.6 MiR-210	16
1.4.7 MiR-221	17
1.4.8 MiR-513	17
1.5 Fragestellung	19
2. Material und Methoden	20
2.1 Ethikvotum	20
2.2 RCC-Zelllinien	20
2.2.1 Zellkultur	20
2.2.2 Eingesetzte Reagenzien	20
2.2.3 Passagierung	21
2.3 ccRCC/ TT Paraffingewebeprobe(n)	21

2.4 Seren	22
2.5 Untersuchungsmethoden.....	22
2.5.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	22
2.5.2 Real-time PCR zur Bestimmung der miRNA-Expression	23
2.5.3 Proliferationstests	25
2.6 miR-143/ -145 Cluster.....	28
2.7 Statistik	28
2.7.1 Software, Programmiersprachen, Bibliotheken	28
2.7.2 Testung der Bedingungen für parametrische Tests.....	28
2.7.3 Normalverteilte Datensätze	29
2.7.4 Nicht normalverteilte Datensätze.....	29
2.7.5 Untersuchung auf Unabhängigkeit	29
2.7.6 Signifikanzniveau.....	29
2.7.7 Berechnung der Tumorgroße	30
2.7.8 Überlebensanalyse und Validierung des CRS (miR-21, -126, -221)	30
2.7.9 Cox-Regression	30
3. Ergebnisse	31
3.1 Regensburger ccRCC/ TT Kollektiv – Tumorgewebe.....	31
3.1.1 Paraffin-eingebettetes Tumorgewebe.....	31
3.1.2 Verfügbare Messergebnisse relativer miRNA-Expressionen.....	33
3.1.3 Verfügbare Follow-up Daten.....	34
3.1.4 Zusammenhänge zwischen miRNA-Expressionen und Follow-up Parametern	35
3.1.5 Überlebensanalyse	48
3.2 Würzburger Kollektiv – Seren	53
3.2.1 Übersicht über das Würzburger Kollektiv	53
3.2.2 Verfügbare Follow-up Daten für Würzburger ccRCC Probanden.....	55
3.2.3 Serummaterial des Würzburger Kollektivs.....	57
3.2.4 Relative miRNA-Expressionsunterschiede zwischen den Probandengruppen	58

3.2.5 ccRCC: Zusammenhang zwischen miRNA-Expressionen und Follow-up Parametern	66
3.2.6 ccRCC/ TT: Zusammenhänge zwischen miRNA-Expressionen und Follow-up Parametern	79
3.3 Proliferation der RCC-Zelllinien nach Transfektion.....	90
3.3.1 768-O Zelllinie.....	90
3.3.2 ACHN Zelllinie	91
4. Diskussion	93
4.1 Regensburger ccRCC/ TT Kollektiv – Tumorgewebe	93
4.1.1 Validierung des Überlebensklassifikationsmodells mit dem dazugehörigen CRS (miR-21, -126, -221).....	94
4.1.2 Zusammenhänge zwischen miRNA-Expressionen und klinikopathologischen Faktoren.....	96
4.2 Würzburger Kollektiv: miRNA-Expressionen in Seren von ccRCC/ woTT-, ccRCC/ TT- und Kontrollprobanden	100
4.3 Gesamtbild: Expressionsunterschiede zwischen Gewebe und Serum..	101
4.3.1 MiR-221	105
4.3.2 MiR-145	107
4.3.3 MiR-21	109
4.4 Stärken und Limitationen der Arbeit	112
4.4.1 Limitationen	112
4.4.2 Stärken	114
4.5 Klinischer sowie wissenschaftlicher Weit- und Ausblick	115
4.5.1 Ausblick für das validierte Überlebensklassifikationsmodell.....	115
4.5.2 Entwicklung Serum-basierter Überlebensklassifikationsmodelle.....	115
5. Zusammenfassung.....	116
6. Literaturverzeichnis	118

Appendix

I Abkürzungsverzeichnis

II Abbildungsverzeichnis

III Tabellenverzeichnis

IV Danksagung

V Lebenslauf

VI Eigene Veröffentlichungen

Das in dieser Arbeit gewählte generische Maskulinum bezieht sich zugleich auf die männliche, die weibliche und andere Geschlechteridentitäten. Zur besseren Lesbarkeit wird auf die Verwendung männlicher und weiblicher Sprachformen verzichtet. Alle Geschlechteridentitäten werden ausdrücklich mitgemeint, soweit die Aussagen dies erfordern.

1. Einleitung

1.1 Epidemiologie des Nierenzellkarzinoms

Die absoluten Zahlen für Neuerkrankungen an Nierenkrebs in Deutschland sind laut Krebsregisterdaten des Robert Koch-Instituts seit Ende der 1990er Jahre für Männer von unter 8.000 auf aktuell fast 10.000 Fälle pro Jahr kontinuierlich angestiegen. Für Frauen zeigt sich seit 2009 ein rückläufiger Trend – mit aktuell gut 5000 Fällen pro Jahr [11].

Das Nierenzellkarzinom (RCC) tritt mit einem Anteil von 96 % aller Nierentumore im Erwachsenenalter am häufigsten auf [11]. Znaor et al. legen in ihrem Review aus dem Jahr 2015 dar, dass die weltweite Inzidenz für das RCC steigt. Ein besonders starkes Wachstum ist aktuell in China und Lateinamerika zu beobachten [12]. Um die Inzidenzzunahme zu erklären, wird unter anderem die steigende Prävalenz von Adipositas in Betracht gezogen [13-15]. Die oft in den Raum geworfenen westlichen Ernährungsgewohnheiten scheinen eine untergeordnete Rolle zu spielen, auch wenn ein reichlicher Konsum von Obst und Gemüse mit einer geringen Risikoreduktion für das RCC einhergeht. Eine größere Rolle spielt wohl Übergewicht an sich, das bekanntermaßen mit einer erhöhten Energieaufnahme einhergeht. Insgesamt ist der Zusammenhang zwischen Ernährungsgewohnheiten und Entstehung des RCC nach wie vor nicht eindeutig geklärt und wird kontrovers diskutiert [14-16]. Weitere Risikofaktoren für das RCC sind arterielle Hypertonie [17] und insbesondere Nikotinabusus [18] – letzteres ist laut Weltgesundheitsorganisation in der Prävalenz jedoch weltweit rückläufig [19]. Darüber hinaus spielt die steigende Zahl an Zufallsdiagnosen des RCC in seinen Frühstadien durch den flächendeckenden Einsatz bildgebender Verfahren eine zentrale Rolle [20-22].

Das klarzellige Nierenzellkarzinom (ccRCC), mit dem sich die vorliegende Arbeit primär auseinandersetzt, bildet mit etwa 70-80% die größte Untergruppe aller RCCs [23-25]. Dieser histologische Subtyp zeichnet sich durch eine in 60-80 % der Fälle vorliegende Mutation oder epigenetische Herunterregulierung des sog. von-Hippel-Lindau (VHL) Tumorsuppressorgens aus, was in einer Induktion der Hypoxie-induzierbaren Faktoren (HIF-1A und -2A) und einer daraus folgenden Förderung der Angiogenese und Proliferation resultiert. Zu den darüber hinaus am häufigsten mutierten Genen zählen: PBRM1, SETD2 sowie BAP1. Auch für den mTOR-Signalweg wird eine Rolle in der Karzinogenese des ccRCCs beschrieben [26-30].

Die relative 5-Jahres-Überlebensrate für alle Nierenkrebsstadien ist vergleichsweise hoch und liegt in den USA aktuell bei etwa 75 %, in Deutschland sogar bei 77 %. Diese verbesserte sich von etwa 60 % in den 90er Jahren kontinuierlich [11, 31, 32]. Hierbei muss eine mögliche Verzerrung durch das sog. Will-Rogers-Phänomen (engl. stage migration) in Betracht gezogen werden [22, 33, 34]. Durch Fortschritte in der Diagnostik kann es dabei zum Anstieg der Inzidenz der Frühstadien eines Karzinoms kommen. Dies kann in einer Verlängerung der gesamten mittleren Überlebensraten resultieren. Patel et al. kamen 2018 allerdings zu dem Schluss, dass das Phänomen innerhalb der letzten Jahre ein Ende gefunden haben könnte und die aktuell steigenden Überlebensraten (insbesondere für höhere Stadien des RCC) auf eine tatsächliche Verbesserung der Therapie zurückgeführt werden dürfen [35].

In etwa 10 % der Fälle kann das Nierenzellkarzinom als Tumor-Thrombus in die Vena cava inferior vordringen [36-38]. Noch ungeklärt ist, ob die Invasion des Tumors in das venöse System eine Übergangsphase zwischen lokalisierter und metastasierter Erkrankung darstellt [39]. Bis heute gilt in diesen Fällen die chirurgische Therapie als einzige potenziell kurative Option. Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt nach erfolgreicher Nephrektomie und Tumor-Thrombektomie zwischen 37 % und 65 % [40-45]. Im Falle einer Metastasierung sinkt die 5-Jahres-Überlebenschance allerdings auch bei adäquater chirurgischer Versorgung auf unter 20 % [40, 41, 43, 46].

Im Laufe der letzten Jahre wurden für das Nierenzellkarzinom mit Invasion des venösen Systems zahlreiche potenziell prognoserelevante Faktoren untersucht – darunter das Level der Tumor-Thrombus-Ausprägung, die Fuhrman Klassifikation, der Performance Status, die perinephritische Fettinvasion, das Auftreten von Metastasen, der Lymphknotenstatus sowie gewebebasierte Biomarker [39, 43, 47, 48].

Studien, welche mit Hilfe gewebebasierter Biomarker eine Aussage über die Prognose von RCC-Patienten zu treffen versuchten, waren bislang weitgehend retrospektiver Natur und ihre Ergebnisse reichten nicht aus, um einen Biomarker im klinischen Alltag zu etablieren. Die Prognose von Patienten mit einem RCC/ TT (Nierenzellkarzinom mit Tumor-Thrombus), die nach erfolgreicher operativer Therapie ein Rezidiv erleiden, ist nach wie vor sehr schlecht. Aus diesem Grund ist es von großer Bedeutung, Biomarker zu identifizieren, die es ermöglichen Patienten zu selektieren, die von einer zeitigen, zielgerichteten und intensiven adjuvanten Therapie profitieren können. Denn auch wenn

bereits zahlreiche Studien mit dem Ziel, Therapie-Targets und Biomarker für eine adjuvante Therapie zu identifizieren, durchgeführt wurden und einige derzeit noch laufen, so zeigen kürzlich publizierte Reviews, dass es bis zum heutigen Zeitpunkt leider nicht gelungen ist, eine wirkungsvolle Therapie zu etablieren [49-51].

Im Bereich der Biomarkerforschung stellen sog. microRNAs (miRNAs) einen neuen vielversprechenden Ansatz dar [52-54]. Basierend auf den Erkenntnissen der letzten Jahre zu ihrer Funktion und ihrem möglichen Einsatz als Biomarker beim ccRCC und ccRCC/ TT [1, 2, 7, 26, 55] sollen im Rahmen der vorliegenden Arbeit ausgewählte miRNAs als potenziell prognoserelevante Biomarker im Gewebe und Serum sowie bezüglich ihrer Wirkung auf das Zellwachstum untersucht werden.

1.2 MiRNAs: Die kleinen Hoffnungsträger

Die Regulation der Genexpression ist aktuell Gegenstand zahlreicher Forschungsbemühungen. Denn seit Entschlüsselung des strukturellen Aufbaus der Desoxyribonukleinsäure (DNA) durch James Watson und Francis Crick im Jahre 1953 [56], rückte die Bedeutung der Gene bei der Entstehung und Behandlung von Erkrankungen immer stärker in den Vordergrund. Zu wissen, wie man in diese hochkomplexen Mechanismen eingreifen kann, um Krankheiten langfristig erfolgreich und gezielt behandeln zu können, ist von enormer medizinischer, sozialer und ökonomischer Bedeutung.

Die Genexpression wird auf mehreren Ebenen durch eine Vielzahl unterschiedlicher Mechanismen reguliert. Um die Mechanismen der Entstehung, Aufrechterhaltung und Progression von Krankheiten zu verstehen und hieraus präzise Diagnose- und wirkungsvolle Behandlungsmethoden entwickeln zu können, ist es wichtig, die Genregulation ganzheitlich zu betrachten.

Im Jahre 1993 eröffneten sich mit der erstmaligen Beschreibung von miRNAs neue Möglichkeiten, um bestehende Diagnose- und Behandlungsmethoden sowie das Verständnis der Genregulation aus einem neuen Blickwinkel zu betrachten [57].

1.2.1 Entdeckung und Gegenwart

Die erstmalige Beschreibung von miRNAs erfolgte durch Lee, Feinbaum und Ambros im Rahmen ihrer Genforschung an *Caenorhabditis elegans*, einem Fadenwurm [57]. Sie

entdeckten, dass das Gen lin-4, das für die Kontrolle der Larvenentwicklung zuständig ist, nicht wie angenommen für ein Protein, sondern für zwei kleine nicht-kodierende RNAs kodiert, lin-4L (61 Nukleotide (nt)) und lin-4S (22 nt). Die lin-4-RNA kann ihrerseits an die 3'-untranslatierte Region (3'-UTR) der messenger RNA (mRNA) von lin-14 und lin-28 binden und so durch eine direkte RNA-RNA-Interaktion die Translation und Proteinproduktion posttranskriptionell unterdrücken [57, 58].

Seitdem wurden nicht nur zahlreiche neue miRNAs entdeckt und die einzelnen Mechanismen der Gen-Herunterregulierung durch diese besser verstanden, sondern es gelang auch, neue Zielstrukturen und Funktionen von miRNAs zu identifizieren. Heute ist bekannt, dass miRNAs nicht nur mit der 3'-UTR interagieren, sondern ihre Wirkung auch an der 5'-UTR, der kodierenden Sequenz sowie der Promotorregion entfalten können [59-62]. Hierbei konnten neben translationaler Hemmung und mRNA-Abbau-Effekten [63] in einigen wissenschaftlichen Untersuchungen auch aktivierende Effekte von miRNAs auf die Translation [64, 65] und Transkription [66, 67] gezeigt werden.

1.2.2 MiRNA-Reifung

Die Entstehung von miRNAs ist komplex und vollzieht sich auf mehreren Zellebenen (Abbildung 1). Ihre Biogenese wird im Rahmen zahlreicher Reviews, beispielsweise durch Ha und Kim ausführlich beschrieben [68]. Der erste Schritt menschlicher miRNA-Reifung erfolgt durch Transkription mehrere Kilobase-langer primärer miRNA Transkripte (pri-miRNA) aus dem Genom durch die RNA Polymerase II oder in einigen Fällen auch durch die RNA Polymerase III. Diese werden im darauffolgenden Schritt durch das RNase III Enzym Drosha zu etwa 60-70 nt langen miRNA-Vorläufern sog. pre-miRNAs gespalten. Für den letzten Reifungsschritt erfolgt nun ein aktiver Transport dieser Vorläufer mittels Exportin-5 und Ran-GTP aus dem Zellkern in Richtung Zytoplasma. Hier entsteht schlussendlich die etwa 22 Nukleotid lange, und doppelsträngige miRNA durch die RNase Dicer [68] (Abbildung 1).

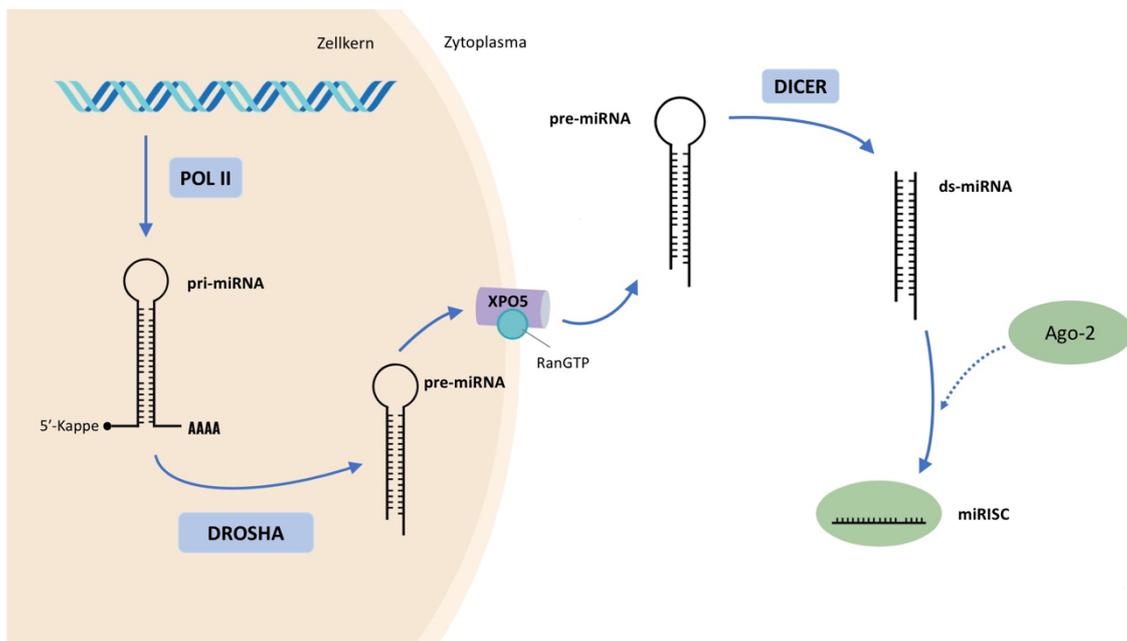


Abbildung 1: miRNA-Reifungsprozess (Biogenese)

AAA: Poly-(A \cong Adenin-Nukleotid)-Schwanz am 3'-Ende, Ago: Argonaut Protein, ds-miRNA: doppelsträngige miRNA; miRISC: miRNA-induced silencing complex, POL II: Polymerase II, XPO5: Exportin 5

1.2.3 MiRNA-vermittelte Regulation der Genexpression

MiRNAs sind zentral an einer Vielzahl biologischer Prozesse beteiligt – darunter fällt beispielsweise die Entwicklung, die Zelldifferenzierung, der Zellmetabolismus, die Zellproliferation sowie der programmierte Zelltod [69-71]. Eine miRNA ist in der Lage, mehrere Hundert mRNAs zu regulieren. Gleichzeitig kann eine einzelne mRNA durch verschiedene miRNAs moduliert werden [72, 73]. Wie Li und Kowdley beschreiben, können miRNAs auf diese Weise zur Entstehung zahlreicher Krankheiten beispielsweise des Herz-Kreislauf-, Nerven- und Immunsystems beitragen und eine entscheidende Rolle in der Karzinogenese spielen. Ihre Erforschung kann demnach neue Diagnose- und Therapiemöglichkeiten eröffnen [69].

Damit eine Gen-Regulation durch miRNA stattfinden kann, verbindet sich die ds-miRNA im Zytoplasma, unter Auflösung ihrer Doppelstrangstruktur und Verwerfung des komplementären Stranges mit einem Argonaut-2 Protein (Ago-2) zum sogenannten microRNA-induced silencing complex (miRISC) (Abbildung 1). Dieser Komplex, der je nach System und Situation neben der mRNA auch mit zahlreichen weiteren Proteinen interagieren kann, stellt die funktionale Einheit der RNA-Interferenz dar [68, 74].

1.2.3.1 Aufbau und Funktion von RISC

Die zentrale Einheit vom RISC (RNA-induced silencing complex) besteht aus dem Argonaut-2 Protein, welches als eine Art Plattform mit mehreren Andockstationen für Proteine und Enzyme fungiert. Dieses lässt sich in vier Domänen unterteilen – Amino (N)-Terminal, PAZ (PIWI-Argonaut-Zwille), MID (middle) und PIWI (P-element Induced Wimpy testis) [75, 76]. Zum weiterführenden Verständnis bedürfen insbesondere die zwei funktionalen Domänen PAZ und PIWI einer näheren Betrachtung.

Man nimmt an, dass in der PAZ-Domäne die 3'-Hydroxygruppe von smallRNAs (also miRNAs oder small interfering RNAs (siRNAs)) gebunden wird, während die 5'-Phosphatgruppe in der MID-Domäne andockt [75, 76].

PIWI spielt innerhalb von Ago-2 und RISC zwei entscheidende Rollen: Einerseits besitzt sie eine strukturelle Ähnlichkeit zur RNase H, wodurch sie als Endonuklease (sogenannter Slicer) fungiert und die komplementäre Ziel-RNA nach der Bindung sequenzspezifisch spalten kann [77, 78]. Andererseits kann PIWI innerhalb

menschlicher Ago-2 Proteine sogenannte Glycin(G)-Tryptophan(W)-182 (GW182) Proteine rekrutieren und mit diesen über W(Tryptophan)-binde-Taschen interagieren [79, 80]. Diese GW-Proteine stehen ihrerseits im wechselseitigen Kontakt mit zytoplasmatischen Poly(A)-binde-Proteinen (PABPC) und können die Exonuklease-Komplexe PAN2-PAN3 und CCR4-NOT rekrutieren, die maßgeblich an der posttranskriptionellen mRNA-Regulierung beteiligt sind [81-83]. Die miRNA selbst übernimmt im miRISC eine zentrale Rolle als eine Art Navigationssystem, indem sie miRISC zu partiell oder vollständig komplementären Bereichen der Ziel-mRNA steuert [84, 85].

1.2.3.2 Funktionen von miRNAs im Zytoplasma

Herunterregulierung von Genen

Die Art und Weise der Regulation an der Ziel-mRNA hängt unter anderem vom Grad der Komplementarität zwischen der miRNA innerhalb des miRISC und der Ziel-mRNA ab. So führt eine vollständige Komplementarität zwischen miRNA und mRNA zur Aktivierung der Ago-2 Endonukleasefunktion und einer daraus resultierenden Spaltung und Zerstörung der Ziel-mRNA. Dieser Vorgang scheint in Säugetieren allerdings eine eher untergeordnete Rolle zu spielen [74, 75]. In deren Zellen zeigt sich in der Regel eine unvollständige Komplementarität zwischen miRNA und mRNA, wodurch eine Ago-2 Endonukleaseaktivierung ausbleibt – Ago-2 agiert hier eher als Mediator [75]. Der für die Herunterregulierung zuständige Mechanismus beginnt mit der Erkennung partiell komplementärer Bereiche der Ziel-mRNA (vorwiegend in der 3'-UTR) durch die Ago-2 gebundene miRNA [75, 85]. Es folgt eine Ago-2 vermittelte GW182-Protein Rekrutierung, der sich die translationale Hemmung anschließt. Zusätzlich erfolgt eine Interaktion mit PABPC und den zytoplasmatischen Poly-(A)-Deadenylase-Komplexen PAN2-PAN3 und CCR4-NOT. Diese Komplexe katalysieren die Deadenylierung (Entfernung des 3'-Poly(A)-Schwanzes) der Ziel-mRNA. Hieran schließt sich die Entkappung der mRNA am 5'-Ende, gefolgt von ihrem Abbau durch die Exoribonuklease 1 (XRN1) an [82, 86-89] (Abbildung 2). Anzumerken ist, dass der Prozess der Deadenylierung, Entkappung und des darauffolgenden mRNA-Abbaus von der reinen translationalen Hemmung entkoppelt werden kann. Dies konnte in Experimenten mit gegen Deadenylierung resistenten mRNAs, ohne Poly-(A)-Schwanz gezeigt werden.

Das deutet darauf hin, dass miRISC eine translationale Hemmung erwirken kann, ohne dabei die mRNA abzubauen [83, 90-93].

Die rein translationale Hemmung durch miRNAs findet den heutigen Erkenntnissen nach in der translationalen Initiationsphase statt [91, 94, 95]. Es besteht die Hypothese, dass die Hemmung translationaler Initiation durch eine miRNA-vermittelte Aktivitätsstörung des eukaryotic initiation factor 4F (eIF4F) Komplexes bedingt wird. Dieser Komplex besteht aus dem eIF4E Protein, das an die 5'-Schutzkappe der mRNA gebunden ist sowie eIF4G und der DEAD-Box RNA-Helicase eIF4A. Dabei fungiert eIF4G als eine Art Gerüst für Interaktionen zwischen Proteinen, die für die Rekrutierung vom 43S Pre-Initiations-Komplex und für die translationale Initiation von zentraler Bedeutung sind. Bei eIF4A RNA-Helicasen handelt es sich um Initiationsfaktoren, die innerhalb der 5'-UTRs agieren und 43S Pre-Initiationskomplexen das Scannen der 5'-UTR in Richtung des Startcodons ermöglichen. Einige Studien konnten zeigen, dass miRISCs diese Prozesse beeinflussen und so hemmend auf die Translation wirken können [96-99] (Abbildung 2).

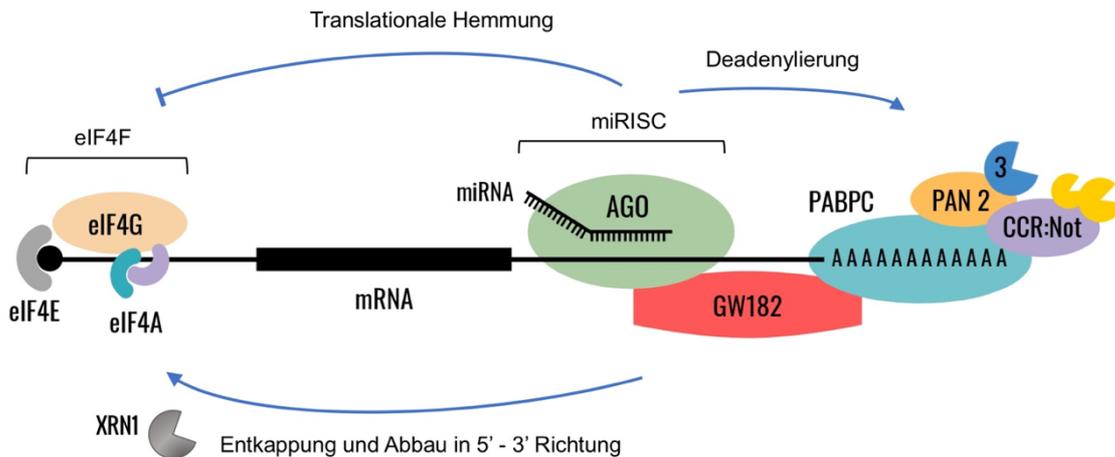


Abbildung 2: Herunterregulierung von Genen durch miRNAs

AGO: Argonaut Protein; CCR: carbon catabolite repressor; eIF: Eukaryotic initiation factor; GW182: Glycin(G)-Tryptophan(W)-182; Not: negative on TATA; PABPC: Polyadenylate-binding protein; PAN: PolyA Nuclease; XRN1: 5'-3' exoribonuclease

Translationale Aktivierung durch miRNAs

Die translationale aktivierende Wirkung von miRNAs wurde bis dato vor allem unter speziellen Bedingungen beobachtet. Mehrere Beispiele sind aus mit AU-reichen Elementen bestückten mRNAs bekannt. Hierbei handelt es sich um Adenosin- und Uridin-reiche Elemente (AREs), die sich in der 3'-UTR von mRNAs befinden können. Sie sind dafür bekannt, die mRNA zu destabilisieren und auf diese Weise dafür zu sorgen, dass es nicht zu einer pathologischen Überexpression kommt. Dies erreichen sie durch einen Deadenylation-vermittelten mRNA-Abbau [100], an dem unterschiedliche ARE-Bindeproteine wie beispielsweise Tristetraprolin (TTP) beteiligt sein können [101, 102]. So ist bekannt, dass AREs zur Kontrolle von Entzündungsprozessen beitragen, die durch Zytokine wie TNF- α oder COX2-abhängige Mediatoren wie PGE2 vermittelt werden [103-105]. Auch mRNAs, die für das Tumorsuppressorprotein p53 kodieren, enthalten AREs in ihren 3'-UTR, was ihre Bedeutung bei der Tumorentstehung verdeutlicht [106, 107]. MiRNAs können an mit AU-reichen Elementen bestückte mRNAs binden und zur Aktivierung der Genexpression beitragen [101, 105, 108].

1.2.3.3 Funktionen von miRNAs im Zellkern

Die Lokalisation von miRNAs ist nicht auf das Zytoplasma beschränkt. MiRNAs und ihre RNAi Co-Faktoren können ebenfalls im Nucleus agieren [109-111]. Den neuesten Untersuchungen zufolge scheinen die meisten miRNAs ihre Wirkung tatsächlich sowohl im Zytoplasma als auch im Nucleus entfalten zu können [109, 110, 112]. Während seit Langem bekannt ist, dass der Export von Vorläufer-miRNAs aus dem Nucleus im Rahmen der miRNA Reifung über Exportin-5 stattfindet [113, 114], kamen erst in den letzten Jahren neue Erkenntnisse bezüglich des Importmechanismus hinzu. So zeigten Castanotto et al., dass Exportin-1 (XPO1) den Transport reifer miRNAs aus dem Zytoplasma in den Zellkern ermöglicht [115]. Darüber hinaus sind das Karyopherin Importin-8 (IPO8) und Ago-2 am Import von miRNAs in den Zellkern beteiligt [116, 117]. Im Zellkern können miRNAs zahlreiche Funktionen entfalten – so zeigten bereits frühe Untersuchungen an *C. elegans*, dass RNAi die Genexpression durch eine Interaktion mit prä-mRNAs hemmen kann [118]. Auch neuere Studien kamen zum Schluss, dass miRNAs die Genexpression durch eine Bindung an die Promotorregion durch eine transkriptionelle Hemmung [60, 119] und möglicherweise auch Aktivierung [61, 62] regulieren können.

Insgesamt offenbart die Forschung der letzten Jahre ein immer weiter gefächertes und heterogenes Bild der miRNA-Funktionen. MiRNAs sollten heutzutage also keinesfalls mehr nur auf ihre post-transkriptionell hemmende Wirkung von mRNAs beschränkt werden, sondern man sollte auch ihre anderen Funktionen, die bislang verhältnismäßig noch wenig erforscht sind, im Hinterkopf behalten und weiter untersuchen. Die Erforschung von miRNA-Signalwegen und der beteiligten Partner kann langfristig zur Entwicklung neuer gezielter Therapiemethoden und Diagnoseverfahren beitragen.

1.2.4 Rolle von miRNAs in der Karzinogenese

Hinweise, dass miRNAs einen Einfluss auf die Tumorentstehung und -progression ausüben können, häuften sich wenige Jahre nach ihrer Erstbeschreibung. Dabei beobachteten Calin et al. erstmals im Jahre 2002, dass miR-15a und miR-16a auf Chromosom 13q14 lokalisiert sind – einer Region, in welcher bei über 50 % der Patienten mit chronisch lymphatischer B-Zell Leukämie (B-CLL) eine Deletion vorliegt. Die Forschungsergebnisse zeigten, dass nur diese miRNAs in der 30 kb kleinen Region

kodiert sind und in 68 % aller B-CLL Patienten entweder komplett fehlen oder aber herunterreguliert sind [120]. Ferner konnte gezeigt werden, dass mehr als die Hälfte aller miRNA-Gene in Bereichen des menschlichen Genoms kodiert sind, die mit der Tumorentstehung assoziiert werden [121]. Forschungsarbeiten durch Lu et al. und Volinia et al. bestärkten die Vermutung, dass miRNAs an der Karzinogenese beteiligt sind, indem sie zeigten, dass anhand von miRNA-Expressionsmessungen zum Teil deutlich zwischen Tumorgewebe und tumorfreiem Gewebe unterschieden werden kann [53, 122]. Dabei können miRNAs, wie beispielsweise dem Review von Esquela-Kerscher et al. entnommen werden kann, sowohl als Onkogene, sogenannte „Oncomirs“, aber auch als Tumorsuppressoren fungieren [123]. Ihre Wirkung entfalten miRNAs, indem sie Tumorsuppressorgene beziehungsweise Onkogene und Gene, die für die Kontrolle der Zelldifferenzierung oder Apoptose zuständig sind, herunterregulieren [120, 124-126]. MiRNAs können hierbei nicht nur die Initiation der Karzinogenese begünstigen, sondern auch zahlreiche Stufen der Tumorprogression (beispielsweise Angiogenese, Epithelio-Mesenchymale Transition (EMT)) modulieren. Hierdurch kann die Tumordinvasion und Metastasierung gefördert, aber auch gehemmt werden [127-129].

1.2.5 MiRNAs als diagnostische und prognostische Biomarker

MiRNA-Expressionsmessungen erlauben in zahlreichen Fällen die Unterscheidung zwischen Tumorgewebe und tumorfreien Proben. Die Messergebnisse fallen in einigen Studien sogar genauer als bei der Verwendung von mRNAs aus. [53, 122]. Die Erfassung von miRNA-Expressionsprofilen ist dabei nicht auf festes Gewebematerial beschränkt, sondern kann auch aus Flüssigkeiten wie Urin, Tränen, Peritonealflüssigkeit, Bronchiallavage, Sperma, Speichel, Plasma und Serum erfolgen [130-134]. MiRNAs im Plasma und Serum sind stabil gegenüber Umwelteinflüssen wie Lagerung bei Raumtemperatur oder mehrfachem Einfrieren und Auftauen [132, 135, 136]. In den letzten Jahren hat sich darüber hinaus herausgestellt, dass miRNA-Expressionsmessungen nicht nur zur Differenzierung zwischen Tumorgewebe und tumorfreien Proben eingesetzt werden können, sondern in einigen Fällen mit ihrer Hilfe auch eine Aussage über das Ansprechen einer Krebserkrankung auf bestimmte Therapiemethoden und das langfristige Überleben von Patienten getroffen werden kann [1, 2, 137-139].

1.3 MiRNAs im klarzelligen Nierenzellkarzinom

Im Jahr 2015 gaben Li et al. im Rahmen ihres Reviews eine Übersicht über zahlreiche miRNAs, die im Gewebe des Nierenzellkarzinoms nachgewiesen werden können und potenziell als Biomarker oder aber in naher Zukunft auch zu Therapie Zwecken eingesetzt werden könnten [140]. Speziell im Fall des klarzelligen Nierenzellkarzinoms zeigten Vergo et al., dass anhand von miRNA-Expressionsmessungen im Gewebe und mit Hilfe eines Kombinierten Risiko-Scores (CRS) bestehend aus miR-21 und miR-126 retrospektiv eine genaue Vorhersage über das Patientenüberleben getroffen werden kann [2]. Darüber hinaus konnte im Rahmen einer weiteren Studie desselben Labors demonstriert werden, dass es nicht nur möglich ist, mit Hilfe von miRNA-Expressionsmessungen unter Verwendung eines CRS (miR-21, -126 und -221) zwischen einem ccRCC Kollektiv mit Invasion der V. cava inferior durch einen Tumor-Thrombus (ccRCC/ TT) und einem ccRCC Kollektiv ohne Tumor-Thrombus (ccRCC/ woTT) zu unterscheiden, sondern ebenfalls eine Aussage über das postoperative Überleben von ccRCC/ TT Patienten zu treffen [1]. Auch frühere Untersuchungen demonstrierten bereits, dass miRNAs erfolgreich und reproduzierbar als diagnostische und prognostische Biomarker für das klarzellige Nierenzellkarzinom eingesetzt werden können [141-143].

Während die Untersuchungen mit Einsatz von Expressionmessungen im Gewebe zunehmen, sind Arbeiten, die sich mit non-invasiven Biomarkern im Serum von RCC-Patienten auseinandersetzen, nach wie vor verhältnismäßig überschaubar [144-149]. Forschungsgruppen, die sich darauf fokussiert haben, zu untersuchen, ob mit Hilfe von miRNAs eine Unterscheidung zwischen ccRCC/ woTT und ccRCC mit Invasion des Gefäßsystems im Serum möglich ist oder eine prognostische Vorhersage innerhalb eines ccRCC/ TT Kollektivs getroffen werden kann, sind nach gründlicher Recherche bislang nicht bekannt.

Es hat sich gezeigt, dass Untersuchungen von miRNAs im ccRCC nicht nur diagnostisch von Interesse sind, sondern dass ihre Dysregulation zahlreiche zur Karzinogenese beitragende Signalwege beeinflussen kann. Hierzu zählt beispielweise die Inaktivierung des VHL Tumorsuppressor-Gens, welche zur Erhöhung Hypoxie-Induzierbarer Faktoren führt, folglich mit einer Induktion des Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und

des Platelet-Derived Growth Factor Alpha (PDGFA) einhergeht und schließlich in einer gesteigerten mikrovaskulären Permeabilität und Angiogenese mündet [150-155]. Ein durch Nallamshetty et al. publiziertes Review zeigt, dass miRNAs eine zentrale Rolle im HIF-Signalweg einnehmen und dabei sowohl direkt HI-Faktoren modulieren als auch selbst, wie im Falle von miR-210, eine Zielstruktur von HI-Faktoren sein können [156]. Auch eine direkte Interaktion von miRNAs und beispielsweise Platelet-Derived Growth Factors B und C (PDGFB, PDGFC), Matrix-Metalloprotease 2 (MMP2), Protoonkogen Murine Double Minute 2 Homolog (MDM2), VEGF-A und Thymidylate Synthase (TYMS) ist möglich [157, 158]. MiRNAs können demnach auf verschiedenen Wegen Einfluss auf die Tumorgenese im RCC ausüben.

Die Auswahl von miRNAs für die Untersuchungen der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit erfolgte einerseits anhand der bereits durchgeführten Studien von Vergheo et al. [1]. Andererseits wurden weitere miRNAs ausgewählt, deren Dysregulation bereits im Zusammenhang mit anderen Karzinomen beschrieben wurde.

1.4 Hintergrundinformationen zu den ausgewählten miRNAs

1.4.1 MiR-21

Die Überexpression von miR-21 beim Mamma- [159], Bronchial- [160] und Kolorektalkarzinom [161] wird mit der Tumorgenese und einer verschlechterten Prognose in Verbindung gebracht. Im RCC konnte gezeigt werden, dass miR-21 unter anderem das Tumorsuppressor-Gen Programmed Cell Death 4 (PDCD4) herunterregulieren kann. Dies hat eine gesteigerte Migration und Invasion von ACHN und 786-O Zellen zur Folge [162]. Eine Verbindung zwischen einer Überexpression von miR-21 und der Tumorentwicklung sowie niedrigerer Überlebensrate wird im RCC mehrfach beschrieben [1, 2, 141, 163]. Untersuchungen der Auswirkung von miR-21 auf RCC-Zelllinien ACHN und 786-O sind allerdings nach wie vor relativ rar [162, 164, 165]. Ihre Rolle als potenzieller non-invasiver Biomarker im Serum eines ccRCC Kollektivs mit Invasion des Gefäßsystems und die Möglichkeit, mit Ihrer Hilfe zwischen einem Kollektiv mit und ohne Gefäßinvasion zu unterscheiden, wurde bislang noch nicht ausreichend untersucht.

1.4.2 MiR-126

MiR-126 fungiert im Gegensatz zu miR-21 am ehesten zumeist als Tumorsuppressor. Ihre Suppression geht mit verstärkter Proliferation, Metastasierung und einer schlechten Prognose beispielsweise beim Bronchial- [166], Mamma- [128], aber auch beim Prostatakarzinom [167] einher. Auch für das ccRCC liegen Daten vor, die auf einen protektiven Effekt von miR-126 hinweisen [3, 168]. Eine Herunterregulierung von miR-126 wird mit einem frühzeitigen Rezidiv bei Patienten mit ccRCC nach radikaler Nephrektomie assoziiert [169]. Untersuchungen an RCC- (786-O) und HeLa-Zellen mit einem miR-126 Knockout durch CRISPR/Cas9 zeigen darüber hinaus, dass miR-126 unter anderem in den HIF-Signalweg involviert ist und ihre Herunterregulierung mit einer VHL-Protein-unabhängigen HIF1A-Hochregulierung einhergeht. Dies lässt eine Induktion der Gefäßproliferation des Tumors durch eine miR-126-Herunterregulierung vermuten [170]. Dabei beschreiben Huang et al. in einer kürzlich publizierten Arbeit, dass miR-126 selbst im RCC durch die long non-coding RNA (lncRNA) DUXAP8 herunterreguliert werden kann, was zu einer Förderung der Tumorproliferation führt [171].

Dem gegenüber steht eine Studie von Li et al., welche nachweisen konnten, dass miR-126 nicht immer als Tumorsuppressor fungiert und in CBF-AML (core binding factor acute myeloid leukemia) auch eine Wirkung als Oncomir entfalten kann [172].

Das Wissen über die Funktion von miR-126 im RCC und speziell ccRCC/ TT ist bislang gering, ebenso sind Untersuchungen an RCC-Zelllinien überschaubar.

1.4.3 MiR-145

Für miR-145 wird beim Kolorektal- [173, 174], Bronchial- [175, 176], aber auch Prostata- [177, 178] und Blasen-Karzinom [179, 180] eine tumorsuppressive Rolle beschrieben. Dabei zeigt sich, dass miR-145 beispielsweise die EMT in Tumoren modulieren kann [176, 181, 182]. Dieser Signalweg kann insbesondere bei der Entwicklung invasiver Nierenzellkarzinome eine wichtige Rolle spielen [183-185]. Ob miR-145 auf den EMT-Signalweg im RCC Einfluss nimmt, ist bislang unzureichend untersucht. Lu et al. konnten allerdings zeigen, dass eine Transfektion von ACHN-Zellen mit miR-145 zu einer Veränderung der Expression von 29 EMT-assozierten Genen führt [5].

Expressionsbestimmungen von miR-145 mittels qPCR (Real Time Quantitative PCR) im RCC-Gewebe zeigen eine Suppression im Vergleich zu tumorfreiem Nierengewebe. Zudem gehen miR-145 Transfektionen von 786-O- und ACHN-Zelllinien mit einer Proliferationshemmung dieser Zellen einher. All das weist auf eine tumorsuppressive Wirkung von miR-145 im RCC hin [4, 5, 186].

MiR-145-Expressionsmessungen im Serum sind rar und nach gründlicher Recherche für das RCC nicht bekannt. Beim Ovariakarzinom zeigt sich eine Herunterregulierung von miR-145 im Vergleich zu Serumproben gesunder Probanden [187], wohingegen beim Schilddrüsenkarzinom eine Überexpression im Vergleich zu tumorfreien Probanden beschrieben wurde [182].

Insgesamt ist die Rolle von miR-145 im RCC und insbesondere ccRCC sowie ccRCC mit Invasion des Gefäßsystems nur spärlich untersucht.

1.4.4 MiR-200c

MiR-200c ist im Gewebe vom Mamma- und Kolorektal-Karzinomen im Gegensatz zu korrespondierendem Normalgewebe herunterreguliert und es wird für sie eine Rolle als Tumorsuppressor beschrieben [188-190]. Ihre Überexpression zeigt eine Erhöhung der Radiosensitivität im Mamma-Ca [191] und eine Verbesserung des Ansprechens gegenüber dem Tyrosinkinaseinhibitor Gefitinib beim nicht-kleinzelligen Bronchial-Ca (NSCLC) [192].

Im ccRCC wird ebenfalls eine Herunterregulierung von miR-200c gegenüber tumorfreiem Nierengewebe mehrfach beschrieben [1, 142, 193]. Zudem zeigten Gao et al., dass miR-200c die Sensitivität von ccRCC-Zellen gegenüber Sorafenib oder Imatinib steigern und die Zellproliferation hemmen kann [194]. Untersuchungen an einem ccRCC/ TT Kollektiv gibt es bislang nur vereinzelt [1].

1.4.5 MiR-205

MiR-205 ist im Tumorgewebe und in Blutproben im Falle einiger Krebserkrankungen dysreguliert. Die Expressionsmessungen fallen dabei höchst unterschiedlich aus: miR-205 zeigt sich hochreguliert im Gewebe vom Blasen- [195], Colon- [196] und nicht-kleinzelligen Bronchial-Karzinomen [197]. Wohingegen eine Herunterregulierung im

Magen-, Prostata- und Schilddrüsenkarzinom-Gewebe beschrieben wird [198-200]. Beim Zervix-Karzinom widersprechen sich die Studienergebnisse und es wird sowohl von einer Herunterregulierung [201], als auch einer Überexpression berichtet [202].

In Blutproben zeigt sich miR-205 beim Blasen-Ca (BC) im Plasma [203] sowie beim Zervix-Ca im Serum [202] überexprimiert, während im Serum von Brustkrebspatientinnen sowohl von einer Hoch- [204] als auch einer Herunterregulierung [205, 206] berichtet wird.

Beim Magen-Ca ließ sich die miR-205-Herunterregulierung mit einem kürzeren Patientenüberleben assoziieren [198]. Mittels miR-205-Expressionsmessungen war es beim Blasen-Ca zudem möglich, zwischen einem Blasenkarzinom mit und ohne Invasion der Muskulatur zu unterscheiden [195].

In einer 2018 publizierte Studie beschreiben Xu et al. eine Herunterregulierung von miR-205 im RCC-Gewebe. Eine Transfektion von ACHN-Zellen mit miR-205 führte zur Wachstumshemmung und Reduktion der Zellmigrationsfähigkeit. Auch ein Zusammenhang zwischen einer miR-205 Suppression und verkürztem Überleben der Patienten wurde beobachtet, was auf eine tumorsuppressive Wirkung von miR-205 im RCC hindeutet. Diese Effekte könnten, wie die Autoren folgern, auf eine Blockierung von EMT durch miR-205 zurückzuführen sein [207].

Insgesamt sind die Erkenntnisse zu miR-205 bei Krebserkrankungen noch inkonsistent, im Falle vom RCC liegen zudem nur wenige Forschungsergebnisse vor. Dies macht die weiterführende Erforschung von miR-205 interessant.

1.4.6 MiR-210

Eine Hochregulierung von miR-210 wird für zahlreiche Karzinome beschrieben – darunter das Kolorektal- [208], Bronchial- [209] und Pankreas-Ca [210]. Wie Huang et al. beschreiben, ist miR-210 zentral in den HIF-Signalweg involviert und kann durch HIF induziert werden. Es ist nicht abschließend geklärt, ob miR-210 aktiv zur Tumorprogression beiträgt oder ob ihre Überexpression nur die Tumorphoxie widerspiegelt [211].

Für das Nierenzellkarzinom ist eine Überexpression von miR-210 sowohl im Tumorgewebe als auch im Serum im Vergleich zu tumorfreien Proben dokumentiert [1, 212-214]. Eine Herunterregulierung von miR-210 in RCC-Zellen (ACHN) geht dabei in

der Regel mit einer Reduktion des Zellwachstums, der Migrationsfähigkeit und der Invasivität einher [212, 213].

1.4.7 MiR-221

Für miR-221 wird in der Literatur häufig eine Rolle als Oncomir beschrieben. So wird ihre Überexpression beim Hepatozellulären Karzinom, beim Mammakarzinom sowie beim Kolorektalkarzinom mit einer tumorproliferativen Wirkung in Verbindung gebracht [215-217]. Lu et al. konnten zudem zeigen, dass eine Überexpression von miR-221 im ccRCC mit einer gesteigerten Proliferation, Migration und Invasion von ccRCC-Zellen einhergeht, während ihre Herunterregulierung das Zellwachstum hemmt [6].

Zum gegenteiligen Schluss kamen Spahn et al. beim Prostatakarzinom. Hier ging eine Suppression von miR-221 mit Tumorprogression und einem reduzierten Überleben einhergeht [218]. Auch Heinzelmann et al. kamen zu dem Ergebnis, dass miR-221 im metastasierten ccRCC herunterreguliert sei [219]. Die Frage, welche Wirkung miR-221 tatsächlich im ccRCC entfaltet, bleibt demnach offen.

1.4.8 MiR-513

Über die Funktion von miR-513 in Karzinomen ist bislang wenig bekannt. Einige wenige Arbeitsgruppen berichten, dass miR-513 im Nierenzellkarzinomgewebe herunterreguliert sei [220, 221]. In anderen Tumorentitäten wurde gezeigt, dass eine miR-513-Suppression im Endometrium- [222] und Ovarial-Karzinom [223] sowie Hochrisikoneuroblastom [224] mit einem frühen Rezidiv und verkürztem Überleben einhergehe.

Betrachtet man weitere Funktionen von miR-513, so ist bekannt, dass diese den sog. Programmed Death-Ligand-1 (PD-L1) herunterregulieren kann [225]. Eine Überexpression von PD-L1 wird seinerseits mit einer verschlechterten Prognose beim RCC [226], aber auch beim Ovarial- [227] und Bronchial-Ca [228] assoziiert.

Bei PD-L1 handelt es sich um ein Typ 1 Transmembranprotein in der Zellmembran, das an den Programmed Death-1 (PD-1) Rezeptor von T-, B-, dendritischen Zellen sowie natürlichen Killer-T-Zellen (NK) binden und die Immunantwort des Körpers gegenüber Karzinomen unterdrücken kann [229]. Aktuell gilt die PD-1/ PD-L1 Achse als eine der zentralen Zielstrukturen in der Immuntherapie zahlreicher Tumorerkrankungen [230]. Ob

miR-513 an der Progression beziehungsweise der Tarnung vom RCC gegenüber dem Immunsystem beteiligt ist und ob diese miRNA prognostisch und diagnostisch von Nutzen sein könnte oder gar ein mögliches Therapieziel darstellt, wird sich in weiterführenden Studien herausstellen müssen.

1.5 Fragestellung

Die zentrale Frage der vorliegenden Arbeit besteht darin zu untersuchen, ob sich die Ergebnisse von Vergho et al. [1] an einem unabhängigen, vergrößerten Kollektiv des Caritas-Krankenhaus St. Josef in Regensburg validieren lassen. Das Ziel ist es, zu erforschen, ob mit Hilfe von miRNA-Expressionsmessungen im Paraffingewebe und des bekannten CRS (miR-21, -126 und -221) erneut eine retrospektive Aussage über das postoperative Überleben von ccRCC/ TT Patienten getroffen werden kann.

Darüber hinaus soll untersucht werden, ob Expressionsbestimmungen weiterer miRNAs, die in Verbindung mit dem Nierenzellkarzinom stehen, zu neuen Erkenntnissen über das ccRCC verhelfen können.

Da bislang nur verhältnismäßig wenige Studien zu non-invasiven miRNA-Biomarkern im Serum von RCC-Patienten vorliegen, stellt sich ferner die Frage, ob für die miRNAs miR-21, -126, -145, -210 und -221 relevante relative Expressionsunterschiede im Serum zwischen ccRCC/ woTT und ccRCC/ TT Patienten sowie tumorfreien Probanden bestehen.

Die gewonnenen Daten sollen abschließend in einem Modell zusammengefasst werden, das die mögliche Bedeutung der untersuchten miRNAs für die Entstehung und Progression des Nierenkarzinoms verdeutlicht.

2. Material und Methoden

2.1 Ethikvotum

Für jede in dieser Arbeit verarbeiteten Proben liegt eine schriftliche Einverständniserklärung des jeweiligen Patienten vor. Die zugrundeliegenden Ethikvota Nr. 136/08 der Universität Würzburg und Nr. 08/108 der Universität Regensburg entsprechen den Standards der Deklaration von Helsinki.

2.2 RCC-Zelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurden Wachstumsveränderungen der Zelllinien 786-O und ACHN nach Transfektion mit miR-21, miR-126 oder miR-221 untersucht. Die epithelialen 786-O-Zellen entstammen einem Nierenzellkarzinom eines 58-jährigen weißen Mannes. Die epithelialen ACHN-Zellen stammen aus einer Metastase eines Nierenzellkarzinoms eines 22-jährigen Mannes ebenfalls kaukasischer Herkunft. Beide Zelllinien wurden von der American Type Culture Collection (Manassas; USA) bezogen.

2.2.1 Zellkultur

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Cellstar[®] Zellkulturflaschen, 75 cm², 250 ml im Brutschrank (37°C, 6 % CO₂, 95 % Luftfeuchtigkeit). Für Proliferationstests wurden die Zellen in Cellstar[®] 96 Well-Platten mit Deckel ausgesät. Für RNA-Gewinnung wurden Cellstar[®] Zellkulturflaschen, 25 cm², 50 ml verwendet. Alle Cellstar[®] Produkte waren steril und wurden von Greiner Bio-One (Frickenhausen; Deutschland) bezogen.

2.2.2 Eingesetzte Reagenzien

Kultivierung, Passagierung und Transfektion

- Dulbecco's PBS (Biochrom; Berlin)
- FBS 10 % (Biochrom; Berlin)
- Glucose 100 g/ L (GIBCO; Life Technologies; Carlsbad; USA)
- Lipofectamine 2000 (Invitrogen; Carlsbad; USA)
- MEM (Eagle) Earl's (Biochrom; Berlin)
- OPTI-MEM (GIBCO; Life Technologies; Carlsbad; USA)
- RPMI 1640 (Biochrom; Berlin)

- Trypsin-EDTA 0,25 % (GIBCO; Life Technologies; Carlsbad; USA)
- Trypanblau 0,4 % (Sigma-Aldrich; Darmstadt; Deutschland)

Für die ACHN-Zelllinie wurde das Nährmedium MEM (Eagle) Earl's verwendet und FBS 10% zugesetzt. Für die 768-O-Zellen wurde das Nährmedium RPMI 1640 genutzt und FBS 10 % sowie Glucose hinzugegeben.

2.2.3 Passagierung

Sobald eine Konfluenz von etwa 80 % erreicht wurde, erfolgte eine Passagierung. Hierzu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit Hilfe von Trypsin-EDTA-Zugabe nach einer Einwirkzeit von 3-5 Minuten von der Oberfläche gelöst, in ein Falcon-Röhrchen überführt und zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet jeweils in MEM (Eagle) Earl's beziehungsweise RPMI 1640 aufgelöst. Das Auszählen der Zellen erfolgte mit Hilfe von Trypanblau und dem automatischen Zellzähler TC20™ von Bio Rad (Hemel Hempstead; United Kingdom).

2.3 ccRCC/ TT Paraffingewebe

Die 56 klarzelligen Nierenzellkarzinom-Proben mit Tumor-Thrombus in der V. cava inferior entstammen einem Patientenkollektiv des Regensburger Caritas Krankenhaus St. Josef, Klinik für Urologie (Direktor: Herr Prof. Dr. Maximilian Burger). Diese wurden in einem Zeitraum von 9 Jahren (1997 bis 2006) akquiriert. Das Tumorgewebe wurde in der Tumorbank des Caritas-Krankenhaus St. Josef, Klinik für Urologie (Direktor: Herr Prof. Dr. Maximilian Burger) in Regensburg aufbewahrt. Anschließend wurde die Gewebesammlung freundlicherweise der Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie des Universitätsklinikums Würzburg zu Forschungszwecken zur Verfügung gestellt.

RNA-Isolierung aus Paraffingewebe

Die RNA-Gewinnung aus paraffin-eingebettetem Tumorgewebe erfolgte durch Frau Barbara Dexler im Forschungslabor der urologischen Klinik und Poliklinik Würzburg mittels RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolations-Kits von Invitrogen (Carlsbad; USA) gemäß den Herstellerangaben. Die gewonnene RNA wurde mit Hilfe von Spark® 10M

von TECAN (Männedorf; Schweiz) vermessen und anschließend bis zur Durchführung weiterer Experimente bei -40°C eingefroren.

2.4 Seren

Die Serum-Proben von ccRCC Patienten mit pathologisch bestätigter (ccRCC/ TT: $n_{\text{TT}} = 34$) und ohne (ccRCC/ woTT: $n_{\text{woTT}} = 35$) Invasion des Gefäßsystems wurden präoperativ im Zeitraum von 12 Jahren (2003 bis 2015) in der Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie des Universitätsklinikums Würzburg akquiriert und bis zur Verwendung im Forschungslabor eingefroren. Im selben Zeitraum wurden als Referenz auch Proben tumorfreier Probanden ($n_{\text{TF}} = 45$) gesammelt. Die Seren wurden ehemals zur Bestimmung des Prostataspezifischen Antigens (PSA) entnommen, wodurch es sich um ein rein männliches Kollektiv handelt.

RNA-Isolierung aus Serum

Die RNA-Gewinnung aus dem Serum erfolgte mit Hilfe eines miRNeasy Serum/ Plasma Kits von Qiagen[®] (Venlo; Niederlande) gemäß den Herstellerempfehlungen.

Zur Isolierung wurden folgende Reagenzien eingesetzt: Chloroform und 80 % Ethanol von Sigma-Aldrich[®] (Darmstadt; Deutschland), 100 % Ethanol von Carl Roth[®] (Karlsruhe; Deutschland). Die gewonnene RNA wurde bis zur Durchführung von Expressionsmessungen bei -25°C eingefroren.

2.5 Untersuchungsmethoden

2.5.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Erstbeschreibung dieser revolutionären Technologie, die die Vervielfältigung bereits kleinster Mengen an Ausgangs-DNA in exponentieller Weise ermöglicht, erfolgte im Jahr 1986 durch den Biochemiker Kary Mullis. Dabei basiert die heute etablierte PCR-Methode auf der Verwendung einer hitzestabilen Taq-Polymerase des Bakteriums *Thermus aquaticus* [231-233] und den gezielten Temperaturmanipulationen in einer Nukleotid-angereicherten Lösung. Die PCR lässt sich in drei Schritte unterteilen [234, 235]:

1. **Denaturierung:** Durch einen Anstieg der Temperatur auf 95°C werden die Wasserstoffbrückenbindungen der komplementären DNA-Stränge aufgebrochen und auf diese Weise voneinander getrennt.
2. **Hybridisierung:** Die anschließende Abkühlung auf 50-65°C führt zur spezifischen Anlagerung eingesetzter Primer an die DNA-Einzelstränge.
3. **Elongation (Polymerisation):** Der angelagerte Primer dient als Ausgangspunkt für die Bildung des neuen Einzelstranges. Hierfür lagert sich die Taq-Polymerase am 3'-Ende des Primers an und verlängert diesen in Richtung 5'-Ende. Dieser bei circa 72°C ablaufende Schritt führt schlussendlich zur Verdopplung der gewünschten cDNA (complementary DNA)-Sequenz. Die mehrfache Abfolge resultiert in einer exponentiellen Vermehrung.

2.5.2 Real-time PCR zur Bestimmung der miRNA-Expression

Zur Bestimmung der miRNA-Expression wurde der TaqMan[®] MicroRNA Assay mit einem TaqMan[®] MicroRNA Reverse Transcription Kit und TaqMan[®] Universal PCR Master Mix 2x, No AmpErase[®] UNG von Applied Biosystems (Carlsbad; USA) gemäß den Herstellerangaben verwendet.

2.5.2.1 Reverse Transkription

Bevor eine miRNA-Expressionsmessung mittels qPCR vorgenommen werden konnte, musste die miRNA mittels Reverser Transkription in cDNA umgeschrieben werden [236-238]. Dies erfolgte mit Hilfe des TaqMan[®] MicroRNA Reverse Transcription Kits. Zur Amplifikation diente der Primus 96 Plus-Cycler von MWG AG Biotech (Ebersberger; Deutschland).

2.5.2.2 Real-time PCR

Die qPCR ermöglicht die primer-spezifische Vervielfältigung der im Rahmen Reverser Transkription hergestellten cDNA-Sequenzen und hieraus die Erfassung der Ausgangsexpression an miRNA. Die Amplifikation erfolgt innerhalb von 30 bis 40 PCR-Zyklen und wird durch kontinuierliche Fluoreszenzmessung detektiert. Letzteres wird durch Verwendung FRET-basierter (Förster-Resonanzenergietransfer) TaqMan[™] Sonden möglich. Bei FRET handelt es sich um einen quantenmechanischen Prozess,

bei dem es zu einer abstandsabhängigen, strahlungsfreien Energieübertragung zwischen zwei fluoreszierenden Molekülen kommt. Das energiegelbende Molekül wird hierbei als Donor (Reporter), das energiefaufnehmende Molekül als Akzeptor (Quencher) bezeichnet. Verringert sich der Abstand zwischen Donor und Akzeptor, kann dies über eine Abnahme oder Zunahme der Donor- beziehungsweise Akzeptor-Fluoreszenz erfasst werden [239]. TaqMan™ Sonden sind sequenz-spezifische Oligonukleotide für die Ziel-DNA, die mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt sind. Bindet die Sonde an ihre Zielsequenz und wird durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der DNA-Polymerase gespalten, führt dies zu einer gesteigerten Reporter-Fluoreszenz [238].

Je früher im Prozess (Zyklen) die gesuchte cDNA erfasst wird, desto größer ist die Ausgangsmenge. Dabei geht eine Verschiebung um einen Zyklus näherungsweise mit einer Halbierung beziehungsweise Verdopplung der cDNA-Menge einher. Den primer-spezifischen Ct(cycle threshold)-Wert erhält man, indem man im Voraus ein Absorptionsniveau festlegt und anschließend die Zykluszahl ermittelt, ab der die geforderte Mess-Schwelle erreicht wird. Um die erfassten Ct-Werte untereinander vergleichen zu können, müssen diese durch eine Subtraktion der Ct-Werte eines Houskeeper-Gens normalisiert werden.

Primer und Geräte zur miRNA-Expressionsmessung

Alle TaqMan® Primer wurden von Applied Biosystems (Carlsbad; USA) bezogen. Die Vermessung der Expressionen erfolgt mit Hilfe des Rotorgene von Qiagen® (Venlo; Niederlande). RNU6B wurde zur Normalisierung der Paraffingewebeergebnisse verwendet, hsa-miR-16 zur Normalisierung der Serumergebnisse genutzt (Tabelle 1).

Tabelle 1: Untersuchte miRNAs im Paraffingewebe Regensburger ccRCC/ TT Patienten (links) sowie Seren Würzburger ccRCC Patienten und tumorfreier Probanden (rechts)

RNU6B wurde zur Normalisierung der Paraffingewebeergebnisse verwendet, hsa-miR-16 zur Normalisierung der Serumergebnisse genutzt.

ccRCC/ TT Paraffingewebe

- hsa-miR-21
- hsa-miR-126
- hsa-miR-145
- hsa-miR-200c
- hsa-miR-205
- hsa-miR-221
- hsa-miR-513
- RNU6B zur Normalisierung der Ergebnisse

Serum

- hsa-miR-21
- hsa-miR-126
- hsa-miR-145
- hsa-miR-210
- hsa-miR-221
- hsa-miR-16 zur Normalisierung der Ergebnisse

2.5.3 Proliferationstests

Die Proliferationsuntersuchung basiert auf dem sogenannten MTT-Test, der auf der Fähigkeit lebender Zellen aufbaut, Tetrazolin-Salze zu reduzieren. Die hierbei entstehenden Formazan-Verbindungen führen zu einem photometrisch messbarem Farbumschlag der Lösung. Die Reduktionsfähigkeit lebender und proliferierender Zellen ist besonders stark ausgeprägt, wodurch es möglich wird, mit Hilfe dieses Tests auch eine Aussage über die Zellproliferation zu treffen [240].

2.5.3.1 Transfektion

Für die Proliferationsmessungen wurden die Zellen zunächst auf 96-Well-Platten ausgesät und mit Hilfe des Lipofectamine 2000-Systems von Invitrogen (Carlsbad; USA)

mit Ambion® mirVana miRNA mimic hsa-miR-126-3p, hsa-miR-21-5p oder hsa-miR-221-3p (Life Technologies; Carlsbad; USA) gemäß den Herstellerangaben transfiziert. Die Negativkontrolle erfolgte mittels Pre-miR™ negative control desselben Herstellers. Am Tag 1 nach Transfektion erfolgte die Zugabe von 100 µl/ Well des von der Gewebekbank empfohlenen Nährmediums.

2.5.3.2 Proliferationsmessungen

Zu den Beobachtungszeitpunkten 2, 4 und 5 Tage nach Transfektion wurde das Medium abgesaugt und die Wells mit je 100 µl Reduktionsmittel des Herstellers befüllt. Hierbei handelte es sich um einen CellTiter96®-Assay von Promega (Madison; USA) mit dem Reagenz Phenazinmethosulfat. Im Rahmen der Reduktion führt es zur Bildung einer wasserlöslichen Formazan-Verbindung mit einer maximalen Absorption zwischen 490 und 500 nm.

Nach einer dreistündigen Reduktionszeit wurde die Absorptionsmessung mit Hilfe des Spark® 10M von TECAN (Männedorf; Schweiz) vorgenommen. Ergebnisse von drei identisch transfizierten Wells wurden als Mittelwerte für weiterführende Berechnungen verwendet.

Die für die Abbildungen und statistischen Untersuchungen verwendeten Mittelwerte und Standardabweichungen wurden nach Durchführung von drei voneinander unabhängigen MTT-Tests mit vergleichbaren Ergebnissen ermittelt. Hierbei wurden jeweils zu jedem Zeitpunkt Triplettwerte für die Auswertung herangezogen. Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte relativ zu Kontrolltransfektionen (Pre-miR™ negative control).

Beispiel eines Rechenwegs

In Tabelle 2 lassen sich Messergebnisse von drei unabhängigen MTT-Tests der Zelllinie ACHN an Tag 2 nach Transfektion (p. T.) nachvollziehen.

Tabelle 2: Darstellung eines Beispiels von MTT-Testergebnissen

	1. Messung			2. Messung			3. Messung		
Kontrolle	0,211	0,216	0,221	0,256	0,317	0,276	0,267	0,264	0,225
miR-21	0,223	0,215	0,234	0,298	0,246	0,246	0,253	0,276	0,277

Arithmetische Mittelwerte:

Kontrolle: 0,250

miR-21: 0,253

Der Mittelwert von den mit miR-21 transfizierten Zellen wird nun ins Verhältnis zur Kontrolle gesetzt: $0,253 / 0,250 = 1,012$

2.5.3.3 Kontrolle des Transfektionserfolgs

Zur Bestätigung einer erfolgreichen Transfektion wurde an Tag 2 p. T. eine RNA-Gewinnung mittels TRIzol[®] von Invitrogen (Carlsbad; USA) gemäß den Herstellerempfehlungen durchgeführt. Die hierfür verwendeten Reagenzien – Chloroform, Isopropanol und 75 %-Ethanol – wurden von Carl Roth[®] (Karlsruhe; Deutschland) bezogen.

Die so gewonnene RNA wurde mit Hilfe des Spark[®] 10M von TECAN (Männedorf; Schweiz) vermessen und bis zur Durchführung weiterer Experimente bei -25 °C eingefroren. Zum Beweis einer erfolgreichen Transfektion wurde eine Messung mittels qRT-PCR vorgenommen. Für alle drei miRNAs konnte eine erfolgreiche Transfektion gezeigt werden.

2.6 miR-143/ -145 Cluster

In der 2014 durch Vergho et al. publizierten Arbeit konnte gezeigt werden, dass miR-143 im ccRCC/ TT Gewebe stark gegenüber ccRCC/ woTT Proben herunterreguliert ist [1]. Nach eigener Recherche gibt es zur Expression von miR-145 in ccRCC/ TT Proben bislang keine publizierten Untersuchungen. Da miR-143 und -145 zum selben Cluster gehören und stark positiv miteinander korrelieren [4, 241], lässt sich vermuten, dass sich miR-145 kongruent hierzu verhält. Diese These wird in zukünftigen Untersuchungen evaluiert werden müssen. In der Diskussion der vorliegenden Arbeit wird angenommen, dass sich miR-145 kongruent zu miR-143 verhält, also dass miR-145 in ccRCC/ TT Gewebeproben gegenüber thrombusfreien Tumorgeweben supprimiert ist.

2.7 Statistik

2.7.1 Software, Programmiersprachen, Bibliotheken

Die grundlegende statistische Auswertung und Visualisierung der Daten erfolgten mit Hilfe der Programmiersprache Python in der web-basierten interaktiven Umgebung Jupyter-Notebook. Als Basis wurden die Pakete von SciPy.org genutzt [242]. Ergänzend wurde auf die Bibliothek Seaborn zurückgegriffen (Version: 0.10.1, <https://seaborn.pydata.org>). Für die Validierung des Überlebensklassifikationsmodells wurde identisch zur Vorpublikation [1] die Programmiersprache R sowie das pROC Paket verwendet [243]. Die Arbeit wurde mittels Office Professional (Office 365) und den dazugehörigen Paketen Word, Excel, Power Point von Microsoft (Redmond; USA) verfasst. Die Abbildungen wurden mit Hilfe von Power Point und der Online-Software Canva (<https://www.canva.com>) erstellt.

2.7.2 Testung der Bedingungen für parametrische Tests

Zur Ermittlung der Verteilung innerhalb der Testgruppen wurde ein Shapiro-Test mit einem Signifikanzniveau von 5 % durchgeführt. Um die Gleichheit von Varianzen zu untersuchen, wurde der Levene-Test mit einem Signifikanzniveau von 5 % verwendet.

2.7.3 Normalverteilte Datensätze

Unterschiede zwischen normalverteilten Testgruppen wurden mit Hilfe eines zweiseitigen, ungepaarten Student's t-Tests auf ihre Signifikanz hin untersucht. Bei Ungleichheit der Varianzen wurde der Welch-Test genutzt. Im Falle der Untersuchung von mehr als zwei Gruppen untereinander wurde zunächst eine ANOVA durchgeführt. Die weiterführende Untersuchung statistischer Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen erfolgte mit Hilfe eines post hoc pairwise t-Tests. In Fällen multipler Testung wurden die p-Werte nach der Holm-Bonferroni Methode korrigiert, um die Wahrscheinlichkeit eines Fehlers 1. Art zu reduzieren.

2.7.4 Nicht normalverteilte Datensätze

Nicht normalverteilte Gruppen wurden auf ihre Unterschiede hin mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests untersucht. Im Falle der Untersuchung von mehr als zwei Gruppen untereinander wurde zunächst ein Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Um die Signifikanzen zwischen den einzelnen Gruppen herauszuarbeiten, erfolgte ein anschließender post hoc Dunn's Test. In Fällen multipler Testung wurde eine p-Wert Korrektur nach der Holm-Bonferroni Methode vorgenommen.

2.7.5 Untersuchung auf Unabhängigkeit

Um die Unabhängigkeit kategorischer Daten zu untersuchen, wurde der Chi-Quadrat Test genutzt. Bei Nicht-Erfüllung der Voraussetzungen, wurde der Exakte Fisher-Test verwendet.

2.7.6 Signifikanzniveau

Das Signifikanzniveau α wurde mit 5 % angesetzt. Signifikante p-Werte von unter 0,05 wurden in Abbildungen mit einem Stern (*) markiert, hochsignifikante Ergebnisse mit einem p-Wert von unter 0,01 mit zwei Sternen (**), p-Werte von unter 0,001 mit drei Sternen (***) gekennzeichnet. In einigen Abbildungen wurden nicht-signifikante Ergebnisse mit „ns“ gekennzeichnet.

2.7.7 Berechnung der Tumorgröße

Die für statistische Auswertungen verwendete Tumorgröße entspricht dem Tumordurchmesser in mm. Wurden bei einem Patienten zum Operationszeitpunkt mehrere Tumore vorgefunden, so wurde der Durchmesser des größten Exemplars für weitere Berechnungen genutzt.

2.7.8 Überlebensanalyse und Validierung des CRS (miR-21, -126, -221)

Zur Überprüfung der Validität des Überlebensklassifikationsmodells aus der Publikation von Vergheo et al. [1] mit dem dazugehörigen CRS (miR-21, -126, -221), der Formel $(4,592 \times \text{miR-21 } \Delta\text{Ct}) + (-3,892 \times \text{miR-126 } \Delta\text{Ct}) + (-1,938 \times \text{miR-221 } \Delta\text{Ct})$ und dem Schwellenwert von 18,7 ΔCt wurden die bekannten Parameter an einem unabhängigen, größeren Regensburger ccRCC/ TT Kollektiv (n = 54) getestet.

Hierzu wurden für jeden der 54 ccRCC/ TT Patienten die relativen miRNA-Expressionen von miR-21, -126 und -221 im Tumorgewebe ermittelt und durch Einsetzen in die oben dargelegte Formel mit den entsprechenden Gewichten multipliziert. Auf diese Weise war es möglich für jeden Patienten einen CRS-Wert zu errechnen und den Patienten in Abhängigkeit des Schwellenwerts von 18,7 ΔCt entweder der High-Risk- (CRS > 18,7 ΔCt) oder der Low-Risk- (CRS < 18,7 ΔCt) Gruppe zuzuordnen.

Schließlich wurde eine Kaplan-Meier Kurve (KM) generiert und ein Log-Rank Test durchgeführt (Signifikanzniveau: 5 %). Die Berechnung der 95 % Konfidenzintervalle für die Sensitivität und Spezifität basiert auf der kontinuieritätskorrigierten Methode aus den Arbeiten von Newcombe [244] und Wilson [245].

2.7.9 Cox-Regression

Für die Durchführung der Cox-Regressionsanalysen wurde sowohl für das Regensburger als auch für das Würzburger Kollektiv das LifeLines Python Paket verwendet [246].

3. Ergebnisse

3.1 Regensburger ccRCC/ TT Kollektiv – Tumorgewebe

Im Folgenden wird zunächst eine Übersicht über die Zusammensetzung des Regensburger Kollektivs und die verfügbaren, experimentell erfassten Messergebnisse sowie die erhobenen klinikopathologischen Daten gegeben. Weiterführend werden die Expressionen einzelner miRNAs bezogen auf die klinikopathologischen Faktoren sowie insbesondere das tumorbedingte Versterben dargestellt. Signifikante Ergebnisse dieser deskriptiven Statistik werden zur Wahrung der Übersicht in Infografiken zusammengefasst. Hieran schließt sich die Überlebensanalyse an, in der das bekannte Überlebensklassifikationsmodell [1] zwecks Validierung auf das unabhängige Regensburger ccRCC/ TT Kollektiv angewandt wird. Es folgt eine univariate Cox-Regression, um den Einfluss einzelner Variablen innerhalb des vorliegenden Datensatzes auf das tumorbedingte Versterben genauer zu analysieren.

3.1.1 Paraffin-eingebettetes Tumorgewebe

Für experimentelle und statistische Untersuchungen standen 56 Paraffin-eingebettete Tumorproben von ccRCC/ TT Patienten aus dem Caritas-Krankenhaus St. Josef in Regensburg zur Verfügung. Die Proben wurden in einem Zeitraum von 6 Jahren akquiriert. Details bezüglich der Tumorgewebeherkunft, miRNA-Isolierung und der verwendeten Methoden zur Bestimmung der miRNA-Expressionen können *Subkapitel 2.3* entnommen werden. Eine Übersicht über die Zusammensetzung des Kollektivs und die Follow-up Daten findet sich in Tabelle 3.

Tabelle 3: Übersicht über das Regensburger ccRCC/ TT Kollektiv (n = 56)

Tumorproben: akquiriert in einem Zeitraum von 6 Jahren

Follow-up Daten: akquiriert in einem Zeitraum von 15 Jahren

Follow-up Zeitraum (Median, n = 54)	94 (1 – 190) Monate
Patientenalter (Median)	67 (41 – 89) Jahre
Geschlecht weiblich männlich	22 (39,3 %) 34 (60,7 %)
Tumorstadium - pT3b	56 (100 %)
Grading nach Fuhrman 2 3	41 (73,2 %) 15 (26,8 %)
Lymphknotenstatus N0 N+	45 (80,4 %) 11 (19,6 %)
Fernmetastasierung (synchron und metachron) M0 M1	35 (62,5 %) 21 (37,5 %)
Tumorgröße (Median)	70 (18 – 225) mm
Gesamtüberleben ja nein	27 (48,2 %) 29 (51,8 %)
Tumorbedingter Tod ja nein	13 (23,2 %) 43 (76,8 %)

3.1.2 Verfügbare Messergebnisse relativer miRNA-Expressionen

Expressionen von miR-21, -126, -145, -200c, -205, -221 sowie -513 wurden im Paraffin-eingebetteten Tumorgewebe (n = 56) von Patienten mit einem ccRCC/ TT mittels qRT-PCR bestimmt und gegen RNU6B normalisiert. Für miR-205 und -513 konnte in je zwei Proben kein Messergebnis ermittelt werden. Demnach lagen für diese beiden miRNAs jeweils nur 54 Δ Ct-Werte vor (Abbildung 3). Die ermittelten relativen Δ Ct-Werte wurden für weiterführende statistische Untersuchungen herangezogen.

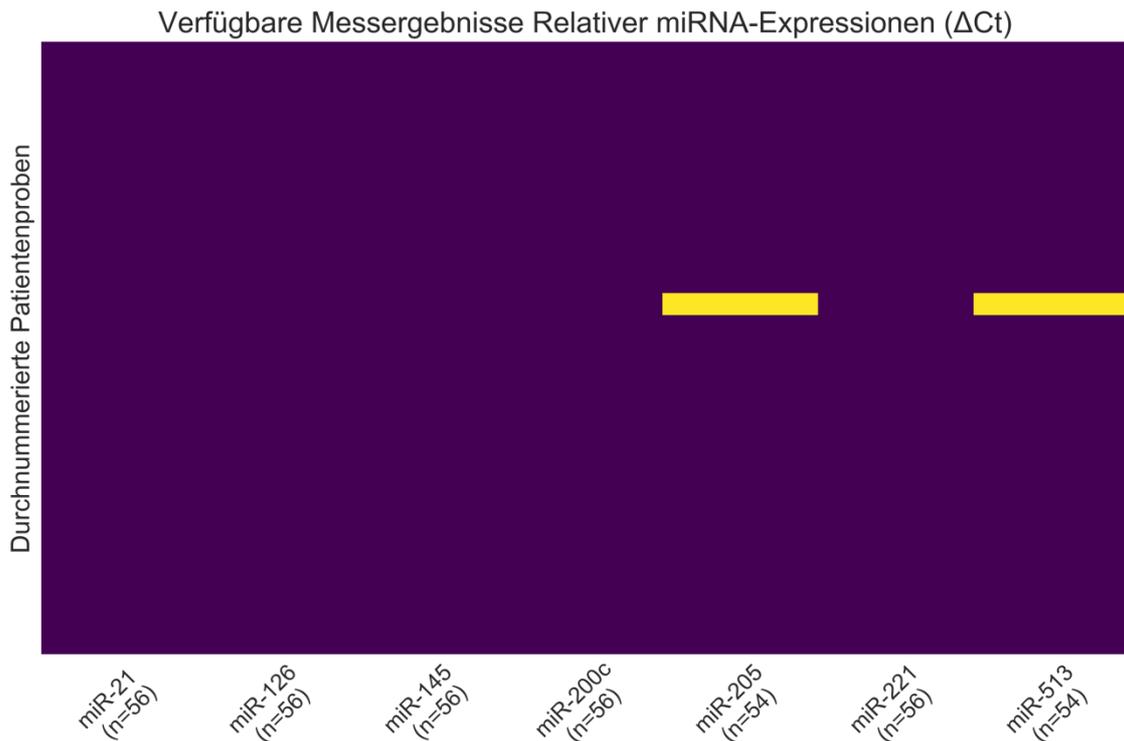


Abbildung 3: Heatmap zur Darstellung verfügbarer Messergebnisse relativer miRNA-Expressionen aus paraffin-eingebettetem Tumormaterial Regensburger ccRCC/ TT Patienten.

MiRNA-Expressionen wurden mittels qRT-PCR ermittelt und gegen RNU6B normalisiert.

Lila: vollständige Daten; Gelb: fehlende Datenpunkte

miR-21, -126, -145, -200c, -221: n = 56;

miR-205, -513: n = 54

3.1.3 Verfügbare Follow-up Daten

Für statistische Auswertung wurden uns durch das Caritas-Krankenhaus St. Josef in Regensburg Follow-up Daten von 56 ccRCC/ TT Patienten zur Verfügung gestellt. Diese wurden in einem Gesamtzeitraum von 15 Jahren akquiriert. Für die nachfolgenden Auswertungen wurden folgende Daten verwendet: Alter, Geschlecht, Lymphknotenstatus, Fernmetastasierung, Graduierung nach Fuhrman, Tumorgröße (Durchmesser), Gesamtüberleben (OS), tumorbedingter Tod (CRD), Follow-up Dauer bis zum Tod oder bis zur letzten Erhebung (Abbildung 4).

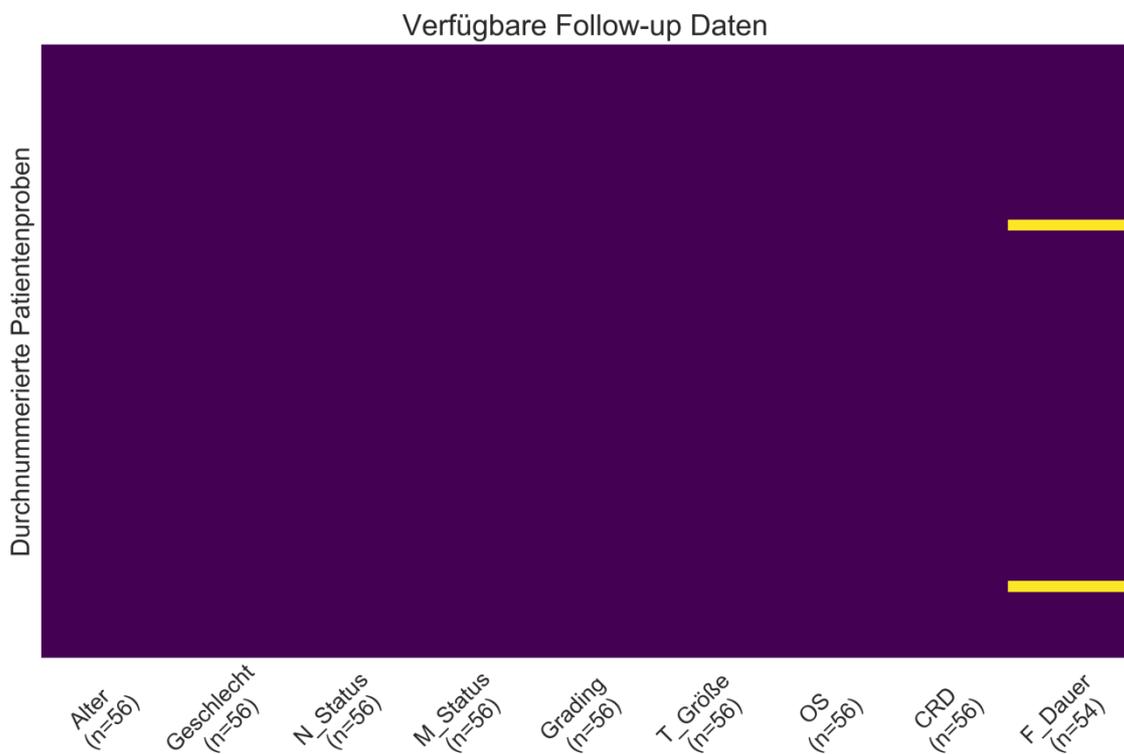


Abbildung 4: Heatmap zur Darstellung verfügbarer Follow-up Daten für das ccRCC/ TT Kollektiv, die uns durch das Regensburger Caritas Krankenhaus St. Josef zur Verfügung gestellt wurden.

Lila: vollständige Daten; Gelb: fehlende Datenpunkte; akquiriert in einem Gesamtzeitraum von 15 Jahren.
CRD: Tumorbedingter Tod; F_Dauer: Follow-up Dauer; M_Status: Status Fernmetastasierung; N_Status: Lymphknotenstatus; OS: Gesamtüberleben; T_Größe: Tumorgröße

3.1.4 Zusammenhänge zwischen miRNA-Expressionen und Follow-up Parametern

Nachfolgend werden Ergebnisse statistischer Auswertungen vorgestellt, die dazu dienen, einen Überblick über den Zusammenhang relativer miRNA-Expressionen und Follow-up Parametern innerhalb des Regensburger ccRCC/ TT Kollektivs zu gewinnen. Untersucht wurden miRNA-Expressionen in Bezug auf die Fernmetastasierung, den Lymphknotenstatus, die Graduierung nach Fuhrman, das Gesamtüberleben sowie das tumorbedingte Versterben.

3.1.4.1 Fernmetastasierung

Während des Beobachtungszeitraums wurden bei 21 Patienten Fernmetastasen diagnostiziert (synchron und metachron = M1, 37,5 %), 35 Patienten blieben metastasenfrei (M0, 62,5 %) (Abbildung 5a).

Mit Hilfe eines ungepaarten zweiseitigen Student's t-Tests konnte eine Herunterregulierung von miR-145 ($p = 0,028$) und miR-221 ($p = 0,06$) in der M1-Subgruppe im Vergleich zu M0 ermittelt werden. Im Mann-Whitney-U-Test zeigte sich miR-21 in der M1-Subgruppe gegenüber M0 mit einem p-Wert von 0,004 deutlich und miR-205 mit einem p-Wert von 0,044 noch signifikant überexprimiert. MiR-126 war mit einem p-Wert von $1e-5$ in der M1-Subgruppe gegenüber der Referenz stark signifikant herunterreguliert. Für miR-200c und -513 konnten keine signifikanten relativen Expressionsunterschiede ermittelt werden (Abbildung 5).

Fernmetastasierung

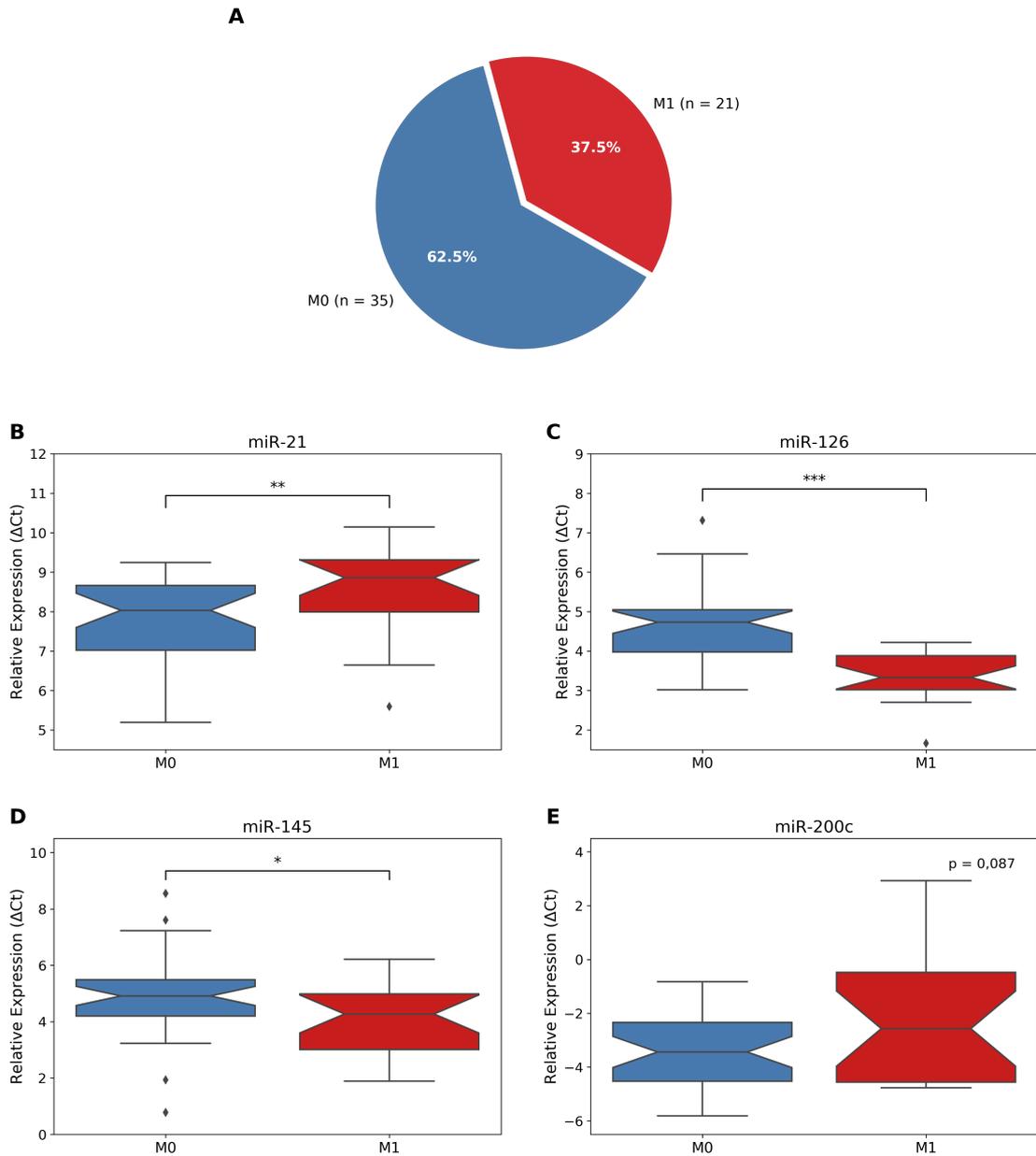
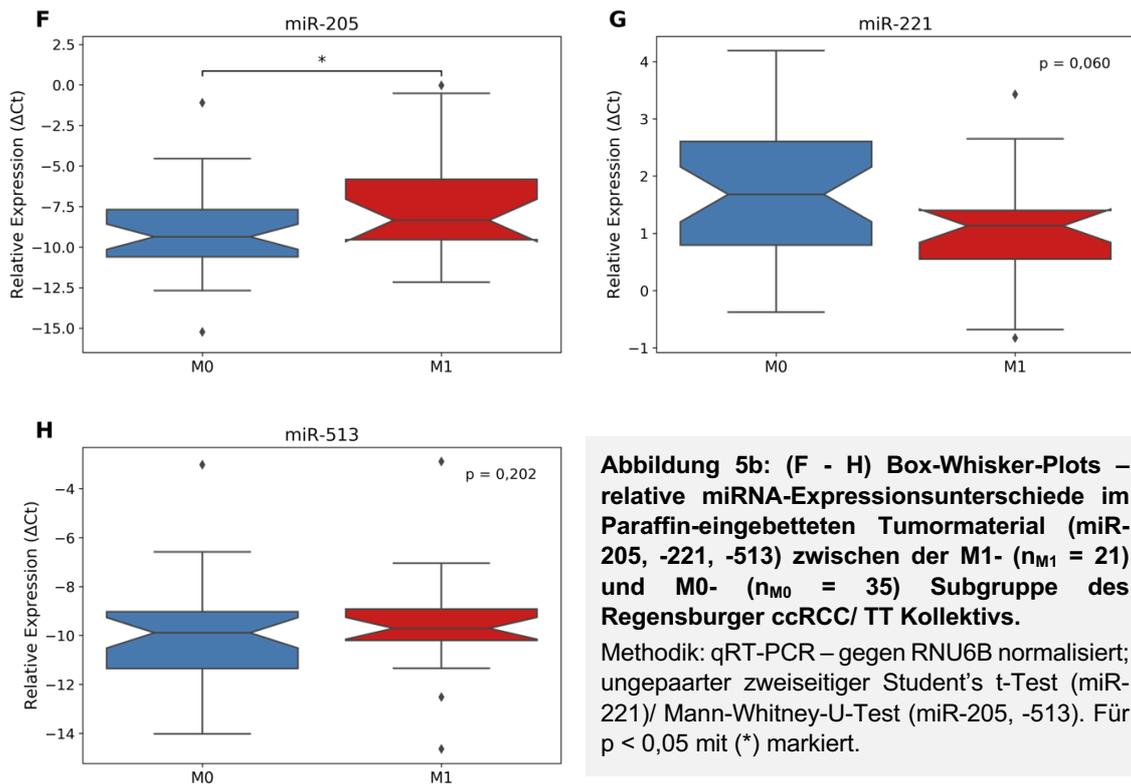


Abbildung 5a: (A) Kuchendiagramm – Regensburger ccRCC/ TT Patienten mit ($n_{M1} = 21$) und ohne ($n_{M0} = 35$) Fernmetastasen (synchron und metachron); (B - E) Box-Whisker-Plots – relative miRNA-Expressionsunterschiede im Paraffin-eingebetteten Tumormaterial (miR-21, -126, -145 und -200c) zwischen der M1- und M0-Subgruppe.

Methodik: qRT-PCR – gegen RNU6B normalisiert; ungepaarter zweiseitiger Student's t-Test (miR-145)/Mann-Whitney-U-Test (miR-21, -126, -200c). Für $p < 0,05$ mit (*), für $p < 0,01$ mit (**) und für $p < 0,001$ mit (***) markiert.



3.1.4.2 Lymphknotenstatus

Zum Operationszeitpunkt wurden bei 11 Patienten Lymphknotenmetastasen diagnostiziert (N+, 19,6 %), 45 Probanden waren metastasenfri (N0, 80,4 %) (Abbildung 6a).

Im ungepaarten zweiseitigen Student's t-Tests konnten für miR-145 ($p = 0,328$) und miR-221 ($p = 0,572$) keine signifikanten relativen Expressionsunterschiede zwischen der N+ und N0-Subgruppe ermittelt werden. Für miR-21 zeigte sich ein Trend ($p = 0,065$). Diese war in der N+-Subgruppe überexprimiert. Mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests konnte eine stark signifikante Suppression ($p = 0,004$) von miR-126 in der N+-Subgruppe ermittelt werden. Hingegen waren miR-205 ($p = 0,047$) und -513 ($p = 0,018$) in der N+-Subgruppe signifikant überexprimiert. Für miR-200c konnte kein statistisch signifikanter Expressionsunterschied ($p = 0,226$) gezeigt werden (Abbildung 6).

Lymphknotenstatus

A

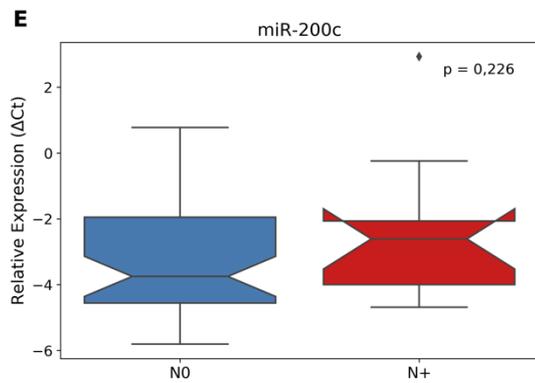
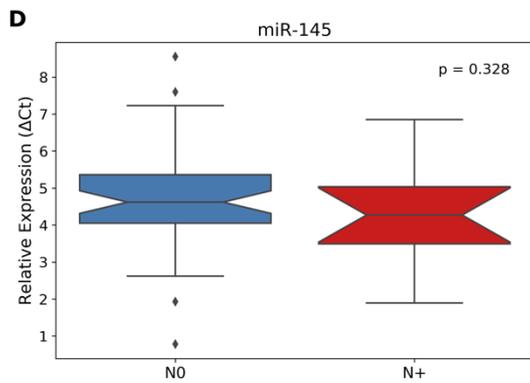
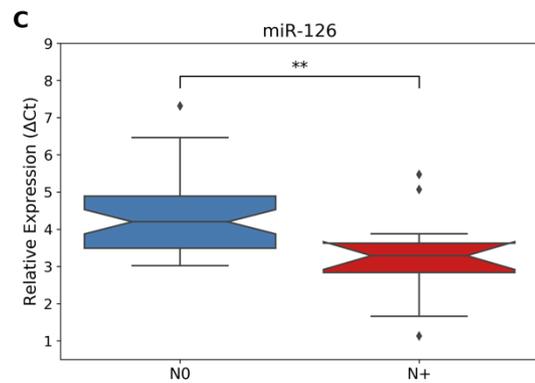
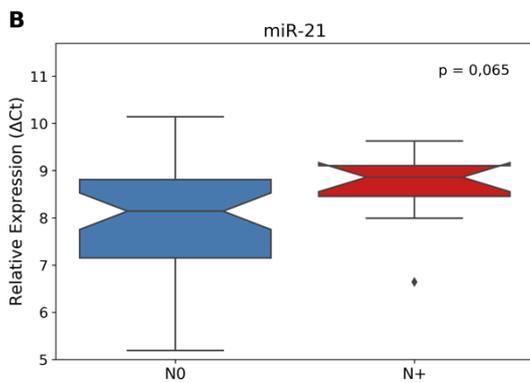
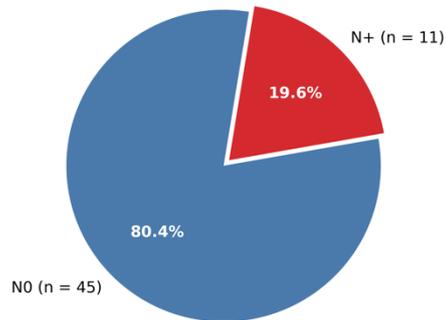


Abbildung 6a: (A) Kuchendiagramm – Regensburger ccRCC/ TT Patienten mit ($n_{N+} = 11$) und ohne ($n_{N0} = 45$) Lymphknotenmetastasen; (B - E) Box-Whisker-Plots – relative miRNA-Expressionsunterschiede im Paraffin-eingebetteten Tumormaterial (miR-21, -126, -145 und -200c) zwischen der N+- und N0-Subgruppe.

Methodik: qRT-PCR – gegen RNU6B normalisiert; ungepaarter zweiseitiger Student's t-Test (miR-21, -145)/ Mann-Whitney-U-Test (miR-126, -200c). Für $p < 0,05$ mit (*) und für $p < 0,01$ mit (**) markiert.

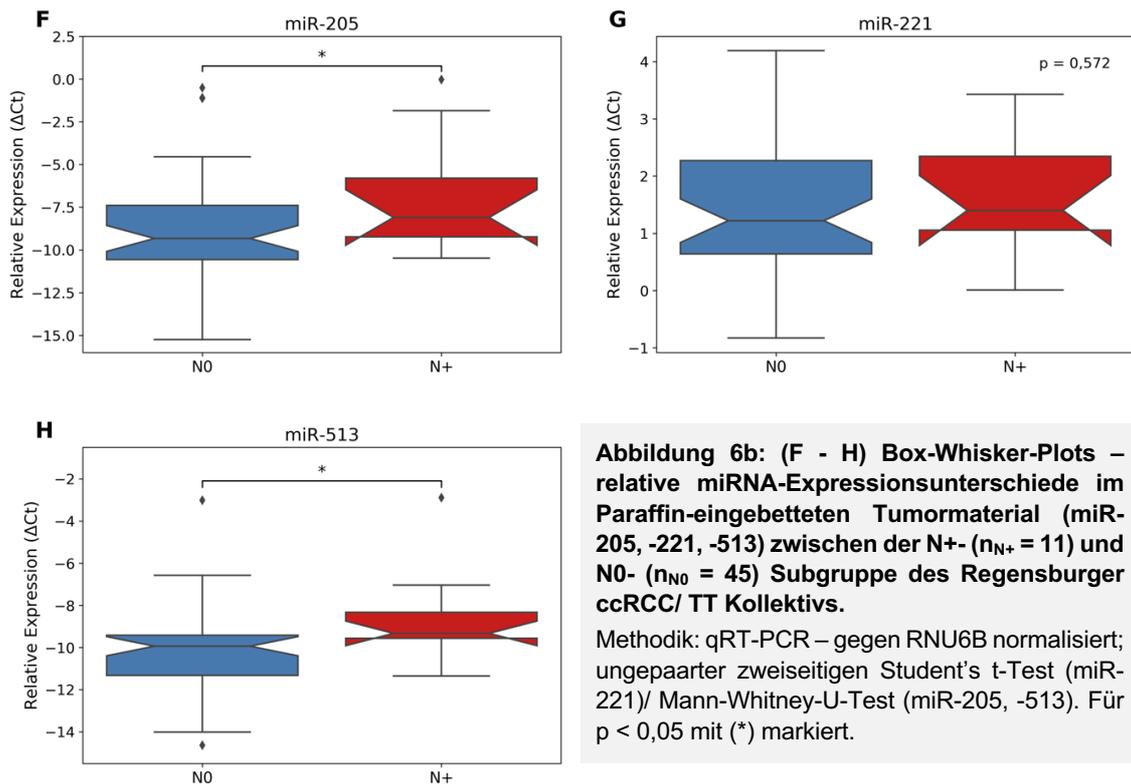


Abbildung 6b: (F - H) Box-Whisker-Plots – relative miRNA-Expressionsunterschiede im Paraffin-eingebetteten Tumormaterial (miR-205, -221, -513) zwischen der N+- ($n_{N+} = 11$) und N0- ($n_{N0} = 45$) Subgruppe des Regensburger ccRCC/ TT Kollektivs.

Methodik: qRT-PCR – gegen RNU6B normalisiert; ungepaarter zweiseitigen Student's t-Test (miR-221)/ Mann-Whitney-U-Test (miR-205, -513). Für $p < 0,05$ mit (*) markiert.

3.1.4.3 Graduierung nach Fuhrman

Innerhalb des Studienkollektivs wurden 15 Patienten (26,8 %) dem Grading 3 (G3) nach Fuhrman zugeordnet, die restlichen 41 Patienten (73,2 %) wurden als Grading2 (G2) eingestuft (Abbildung 7a).

Mit Hilfe eines ungepaarten zweiseitigen Student's t-Tests konnte ein starker Trend für miR-126 ($p = 0,054$) und miR-513 ($p = 0,053$) für eine Überexpression in der G3-Subgruppe im Vergleich zur G2-Subgruppe ermittelt werden. Für miR-145 ($p = 0,792$) und miR-221 ($p = 0,613$) konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. In den Auswertungen mittels Mann-Whitney-U-Test war miR-200c mit einem p-Wert von 0,047 in der G3-Subgruppe gegenüber der G2-Subgruppe noch statistisch signifikant überexprimiert. Für miR-21 ($p = 0,409$) und -205 ($p = 0,137$) konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen G3 und G2 ermittelt werden (Abbildung 7).

Graduierung nach Fuhrman

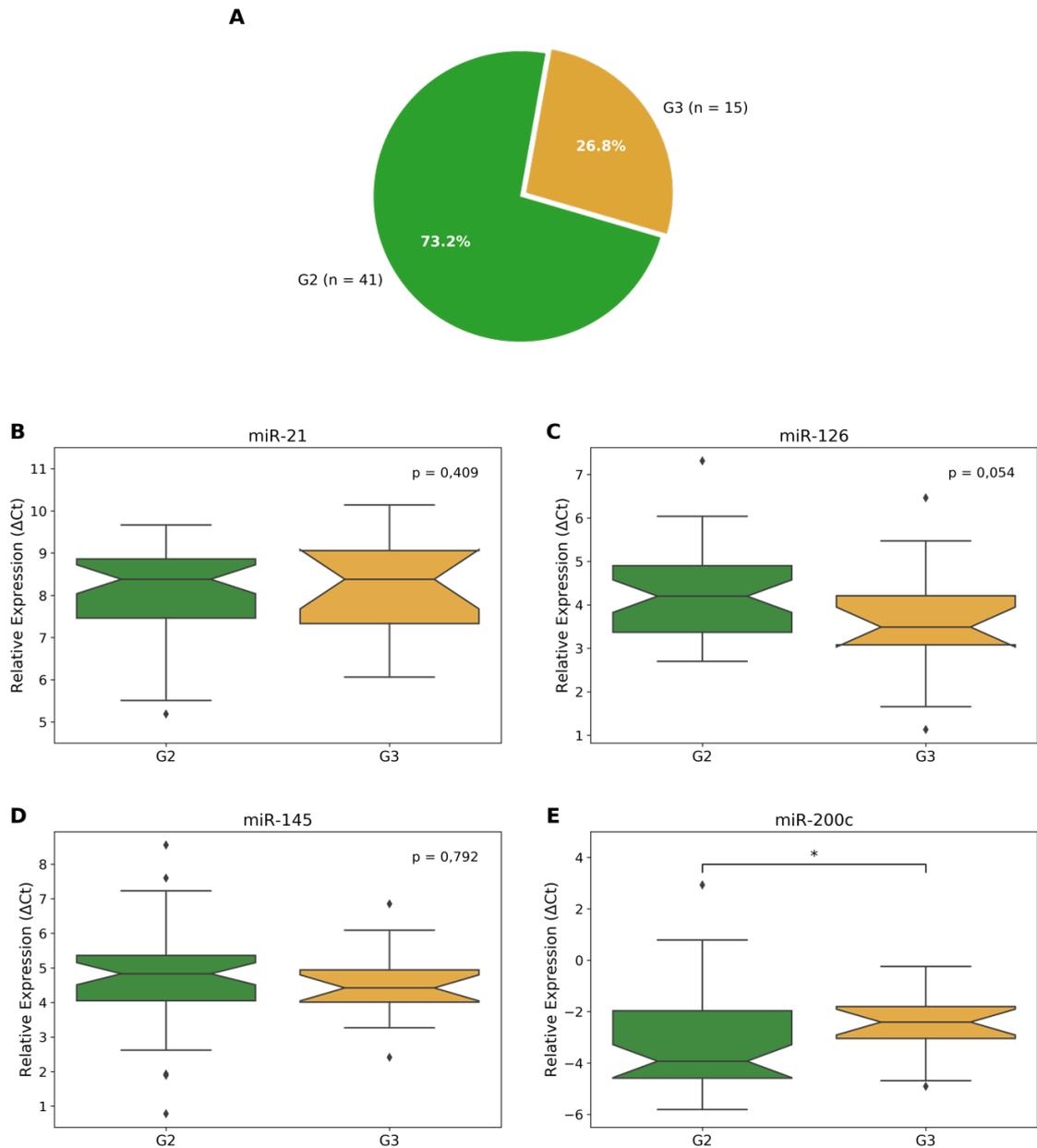


Abbildung 7a: (A) Kuchendiagramm – Regensburger ccRCC/ TT Patienten mit dem Grading 3 ($n_{G3} = 15$) und 2 ($n_{G2} = 41$) nach Fuhrman; (B - E) Box-Whisker-Plots – relative miRNA-Expressionsunterschiede im Paraffin-eingebetteten Tumormaterial (miR-21, -126, -145 und -200c) zwischen der G3- und G2-Subgruppe.

Methodik: qRT-PCR – gegen RNU6B normalisiert; ungepaarter zweiseitiger Student's t-Test (miR-126, -145)/ Mann-Whitney-U-Test (miR-21, -200c). Für $p < 0,05$ mit (*) markiert.

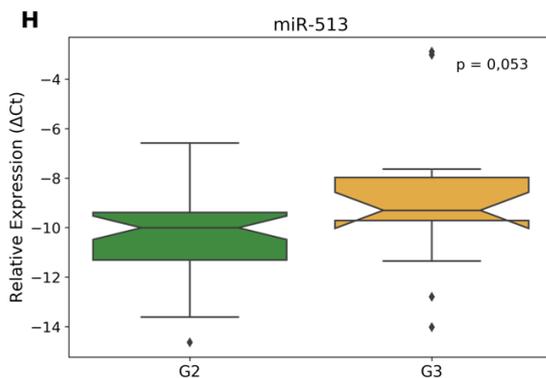
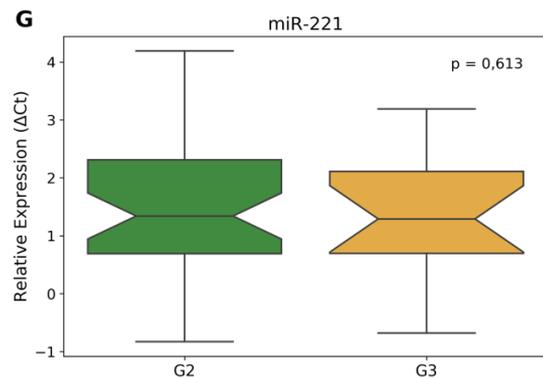
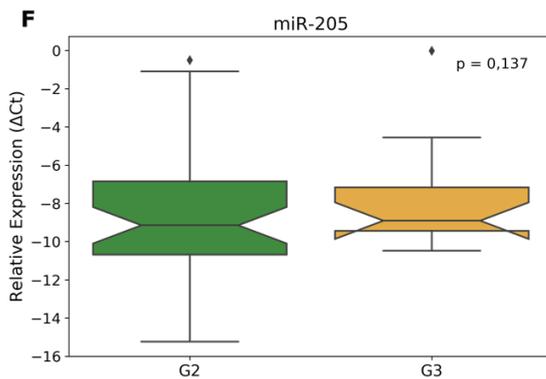


Abbildung 7b: (F - H) Box-Whisker-Plots – relative miRNA-Expressionsunterschiede im Paraffin-eingebetteten Tumormaterial (miR-205, -221, -513) zwischen der G3- (n = 15) und G2- (n = 41) Subgruppe des Regensburger ccRCC/ TT Kollektivs.
 Methodik: qRT-PCR – gegen RNU6B normalisiert; ungepaarter zweiseitiger Student's t-Test (miR-221, -513)/ Mann-Whitney-U-Test (miR-205). Keine signifikanten Expressionsunterschiede.

3.1.4.4 Gesamtüberleben

Im Verlauf des Follow-ups verstarben 29 Patienten (51,8 %), 27 Studienteilnehmer (48,2 %) überlebten (Abbildung 8a).

Im ungepaarten zweiseitigen Student's t-Test zeigte sich eine Überexpression von miR-21 in den Proben verstorbener Patienten ($p = 0,075$) und in derselben Subgruppe eine deutlich signifikante Herunterregulierung von miR-126 ($p = 2e-4$), miR-145 ($p = 0,004$) sowie miR-221 ($p = 0,002$) gegenüber der Referenz. Mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests konnte eine signifikante Überexpression von miR-205 ($p = 0,031$) in der Subgruppe der Verstorbenen ermittelt werden. Für miR-200c ($p = 0,487$), und miR-513 ($p = 0,371$) konnten keine signifikanten Expressionsunterschiede festgestellt werden (Abbildung 8).

Gesamtüberleben

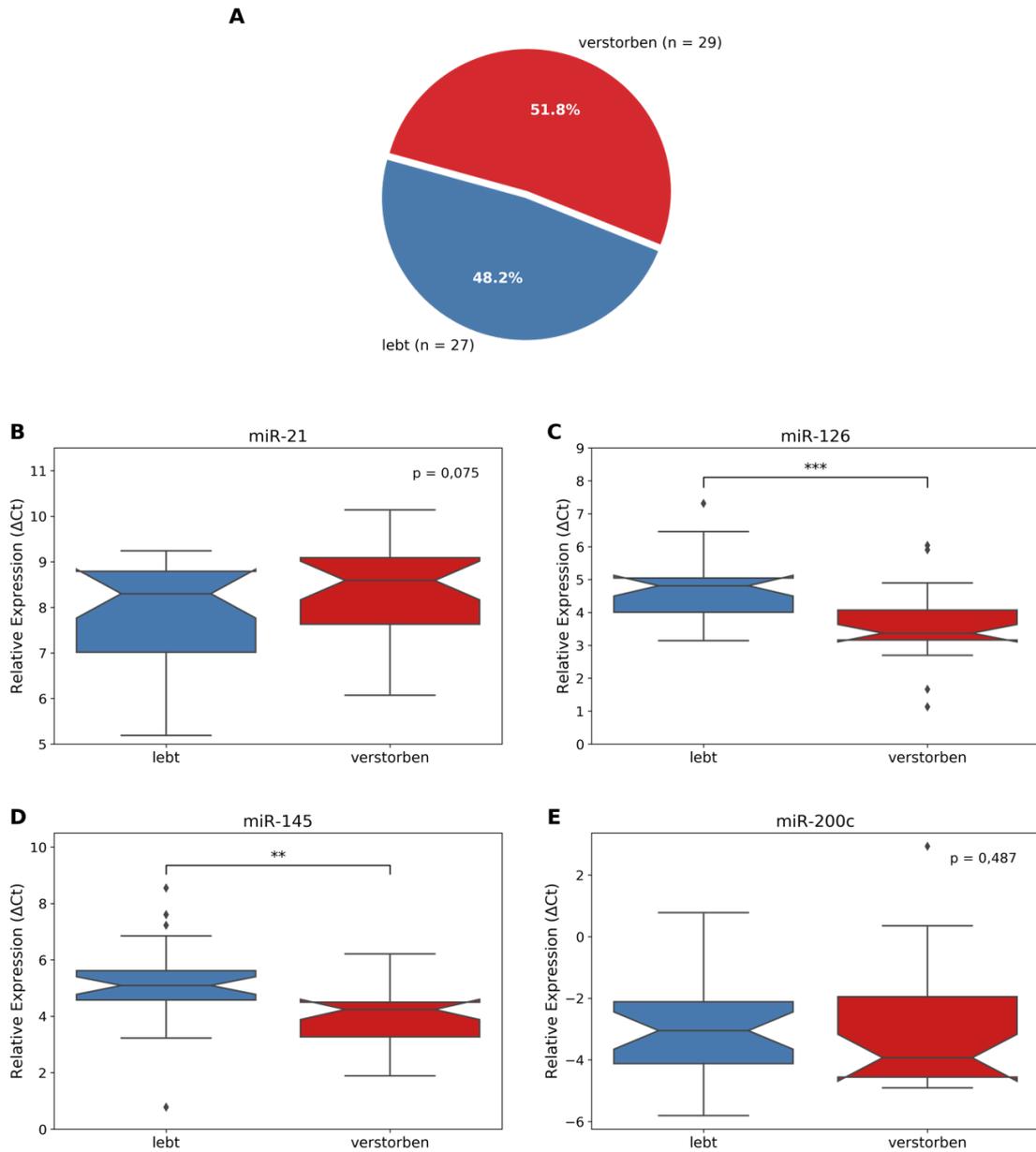


Abbildung 8a: (A) Kuchendiagramm – Regensburger ccRCC/ TT Patienten, die im Verlauf des Follow-ups verstorben sind ($n_{\text{verstorben}} = 29$) und denjenigen, die am Leben blieben ($n_{\text{lebt}} = 27$); (B - E) Box-Whisker-Plots – relative miRNA-Expressionsunterschiede von miR-21, -126, -145 und -200c im Paraffin-eingebetteten Tumormaterial.

Methodik: qRT-PCR – gegen RNU6B normalisiert; ungepaarter zweiseitiger Student's t-Test (miR-21, -126, -145)/ Mann-Whitney-U-Test (miR-200c). Für $p < 0,01$ mit (**), für $p < 0,001$ mit (***) markiert.

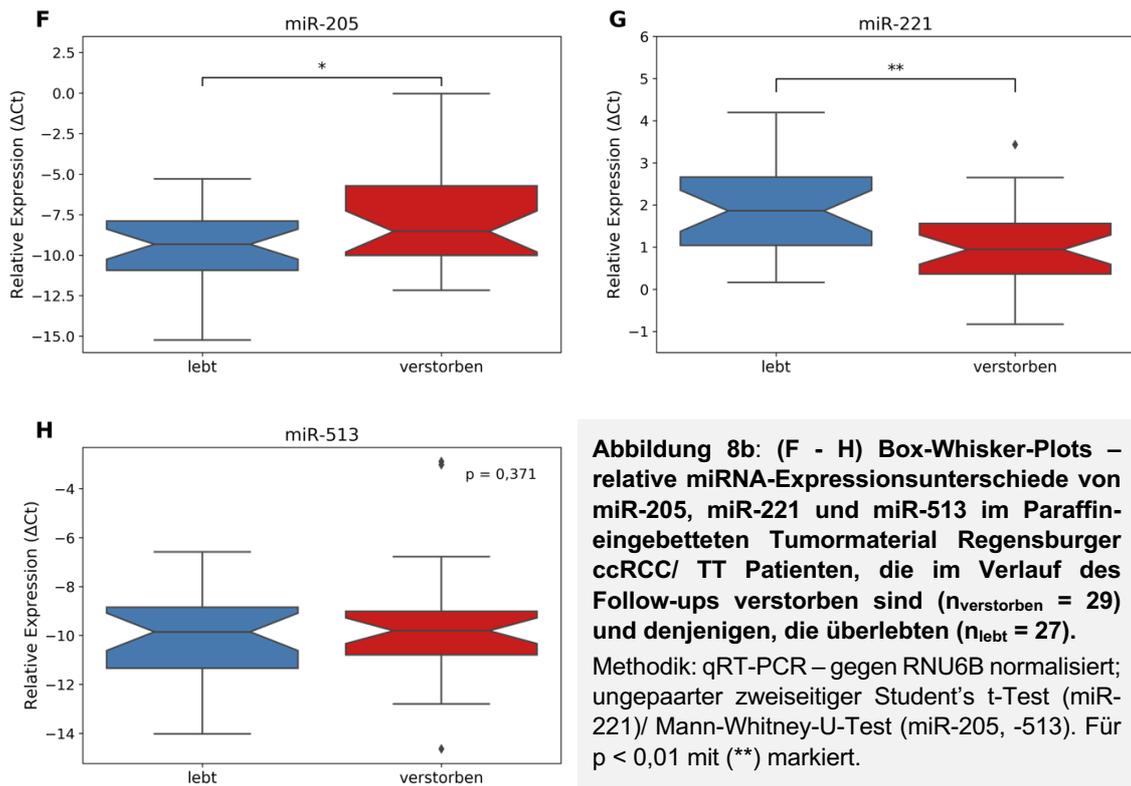


Abbildung 8b: (F - H) Box-Whisker-Plots – relative miRNA-Expressionsunterschiede von miR-205, miR-221 und miR-513 im Paraffin-eingebetteten Tumormaterial Regensburger ccRCC/ TT Patienten, die im Verlauf des Follow-ups verstorben sind ($n_{\text{verstorben}} = 29$) und diejenigen, die überlebten ($n_{\text{lebt}} = 27$).
 Methodik: qRT-PCR – gegen RNU6B normalisiert; ungepaarter zweiseitiger Student's t-Test (miR-221)/ Mann-Whitney-U-Test (miR-205, -513). Für $p < 0,01$ mit (**) markiert.

3.1.4.5 Tumorbedingtes Versterben

Während des Beobachtungszeitraums verstarben 13 Patienten tumorbedingt (23,2 %), 43 Patienten (76,8 %) erlitten keinen CRD (Abbildung 9a).

Die Auswertung relativer Expressionen von miR-145 ($p = 0,190$), -200c ($p = 0,109$), -221 ($p = 0,269$) zeigte im ungepaarten zweiseitigen Student's t-Test keine signifikanten Unterschiede zwischen der CRD-Subgruppe und Patienten, die nicht am Tumor verstarben. Mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests konnte eine stark signifikante Überexpression für miR-21 ($p = 9,5e-4$) und eine signifikante Überexpression für miR-513 ($p = 0,041$) sowie für miR-205 ein Trend ($p = 0,079$) zur Überexpression in der CRD-Subgruppe ermittelt werden. MiR-126 war in der CRD-Subgruppe mit einem p-Wert von 0,001 stark signifikant herunterreguliert (Abbildung 9).

Tumorbedingter Tod

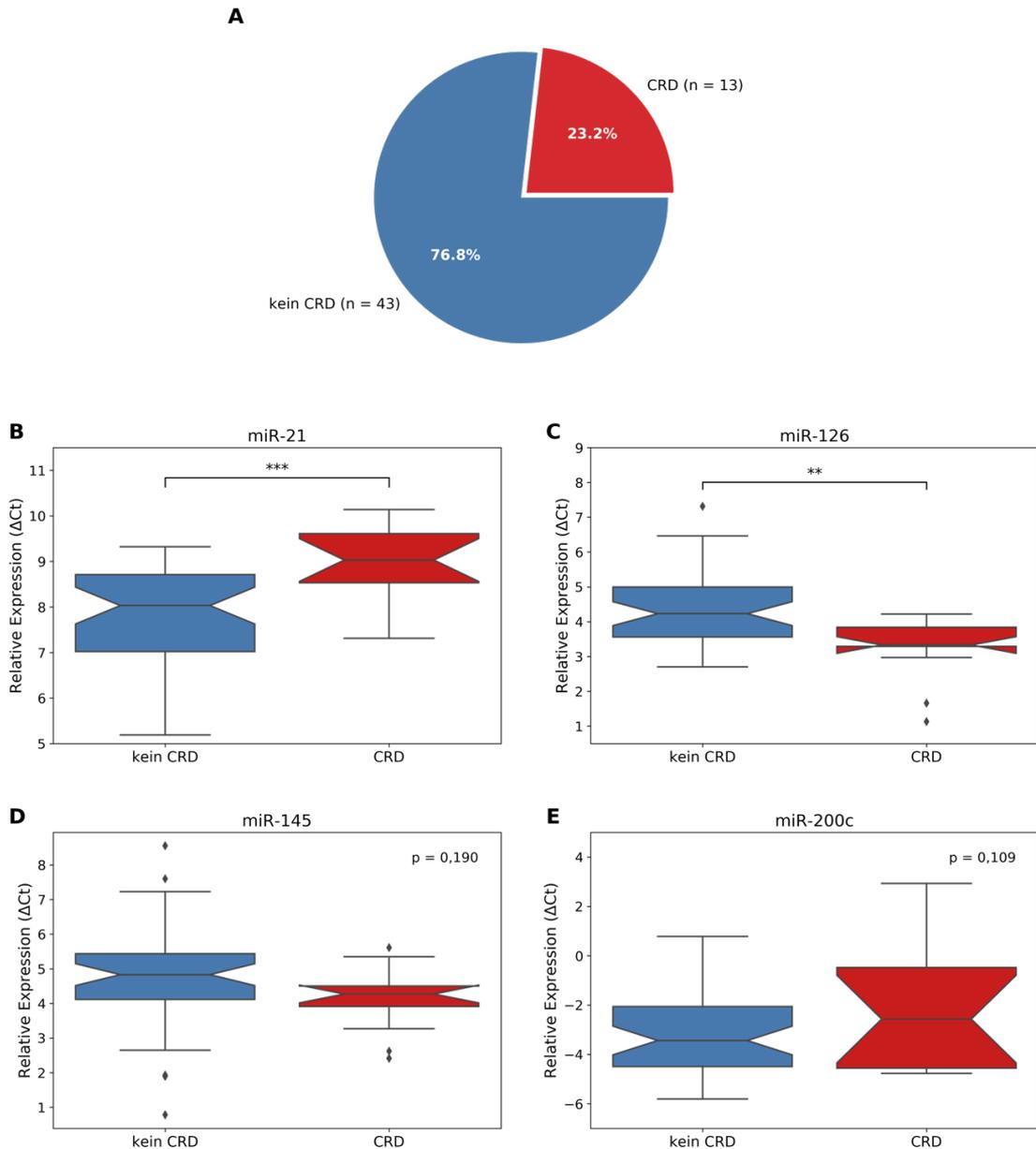


Abbildung 9a: (A) Kuchendiagramm – Regensburger ccRCC/ TT Patienten, die im Verlauf des Follow-ups einen tumorbedingten Tod (CRD) erlitten ($n_{\text{CRD}} = 13$) und Patienten, die nicht am Tumor verstarben ($n_{\text{kein CRD}} = 43$); (B - E) Box-Whisker-Plots – relative miRNA-Expressionsunterschiede von miR-21, -126, -145 und -200c im Paraffin-eingebetteten Tumormaterial.

Methodik: qRT-PCR – gegen RNU6B normalisiert; ungepaarter zweiseitiger Student's t-Test (miR-145, -200c)/ Mann-Whitney-U-Test (miR-21, -126). Für $p < 0,01$ mit (**), für $p < 0,001$ mit (***) markiert.

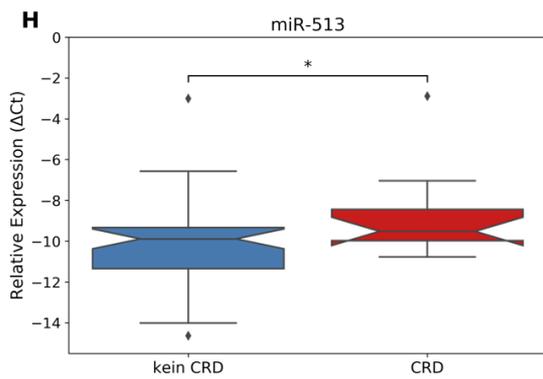
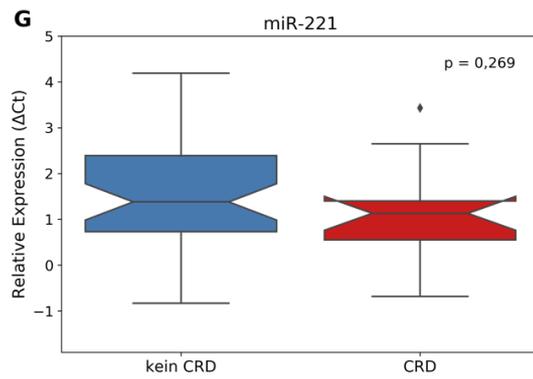
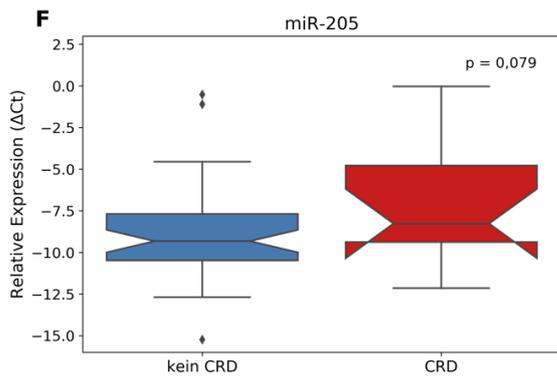


Abbildung 9b: (F - H) Box-Whisker-Plots – relative miRNA-Expressionsunterschiede von miR-205, -221, -513 im Paraffin-eingebetteten Tumormaterial Regensburger ccRCC/ TT Patienten, die im Verlauf des Follow-ups einen tumorbedingten Tod (CRD) erlitten ($n_{CRD} = 13$) und Patienten, die nicht am Tumor verstarben ($n_{kein\ CRD} = 43$).

Methodik: qRT-PCR – gegen RNU6B normalisiert; ungepaarter zweiseitiger Student's t-Test (miR-221)/ Mann-Whitney-U-Test (miR-205, -513). Für $p < 0,05$ mit (*) markiert.

3.1.4.6 Übersicht über relative miRNA-Expressionsunterschiede innerhalb des Regensburger ccRCC/ TT Kollektivs

Die nachfolgenden Infografiken geben eine Übersicht über signifikante relative miRNA-Expressionsunterschiede im Paraffin-eingebetteten Tumorgewebe des Regensburger ccRCC/ TT Kollektivs. Abbildung 10 fasst signifikante Expressionsunterschiede in Bezug auf klinikopathologische Daten zusammen, während in Abbildung 11 relative miRNA-Expressionen bezogen auf das tumorbedingte Versterben und das Gesamtüberleben dargestellt werden.

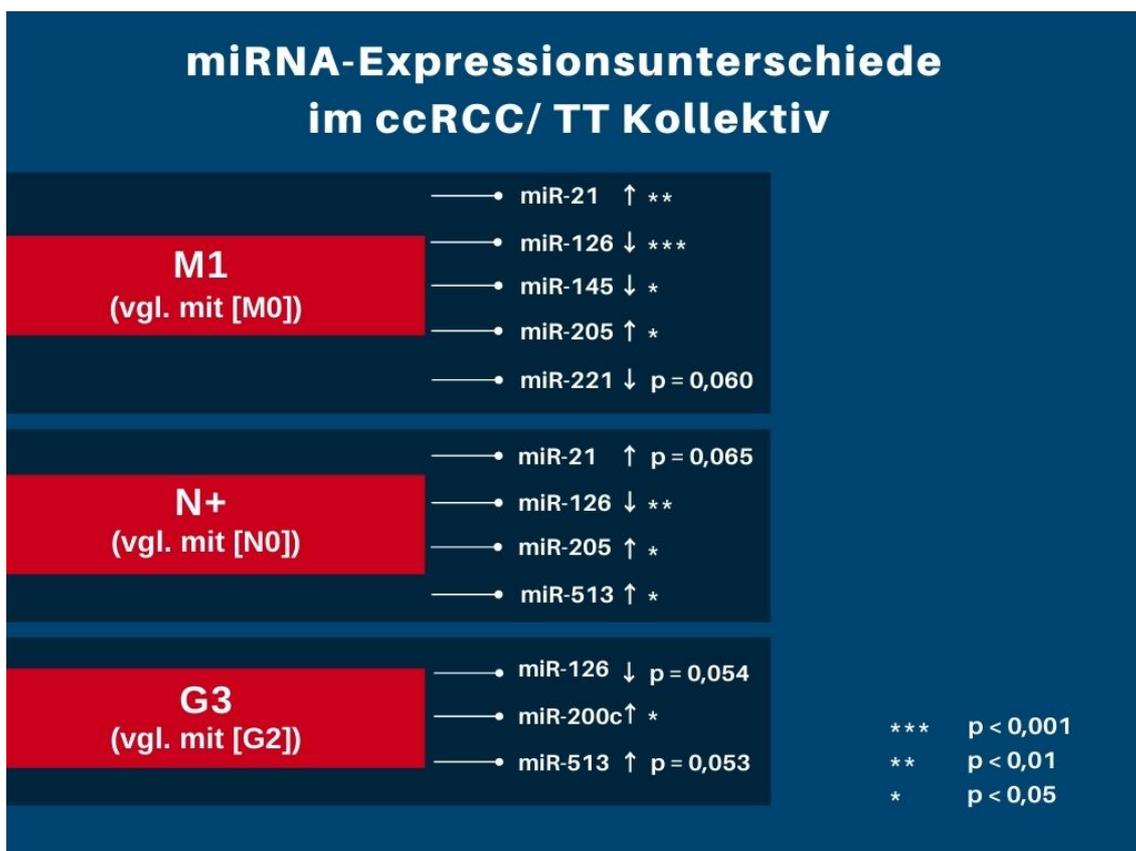


Abbildung 10: Übersicht über Follow-up-bezogene relative miRNA-Expressionsunterschiede (synchrone und metachrone Metastasierung (M), Lymphknotenstatus (N), Graduierung nach Fuhrman (G)) im Paraffin-eingebetteten Tumorgewebe innerhalb des Regensburger ccRCC/ TT-Kollektivs.

Eine relative Überexpression wurde mit "↑" und eine Herunterregulation mit "↓" veranschaulicht. Die ermittelte Signifikanzstärke im ungepaarten zweiseitigen Student's t-Test/ Mann-Whitney-U-Test wurde für p < 0,05 mit (*), für p < 0,01 mit (**) und für p < 0,001 mit (***) gekennzeichnet.

miRNA-Expressionsunterschiede im ccRCC/ TT Kollektiv



Abbildung 11: Übersicht über Follow-up-bezogene relative miRNA-Expressionsunterschiede (CRD, Gesamtüberleben) im Paraffin-eingebetteten Tumorgewebe innerhalb des Regensburger ccRCC/ TT Kollektivs.

Eine relative Überexpression wurde mit "↑" und eine Herunterregulation mit "↓" veranschaulicht. Die ermittelte Signifikanzstärke im ungepaarten zweiseitigen Student's t-Test/ Mann-Whitney-U-Test wurde für $p < 0,05$ mit (*), für $p < 0,01$ mit (**) und für $p < 0,001$ mit (***) gekennzeichnet.

3.1.5 Überlebensanalyse

3.1.5.1 Validierung des Überlebensklassifikationsmodells mit dem dazugehörigen CRS (miR-21, miR-126, miR-221)

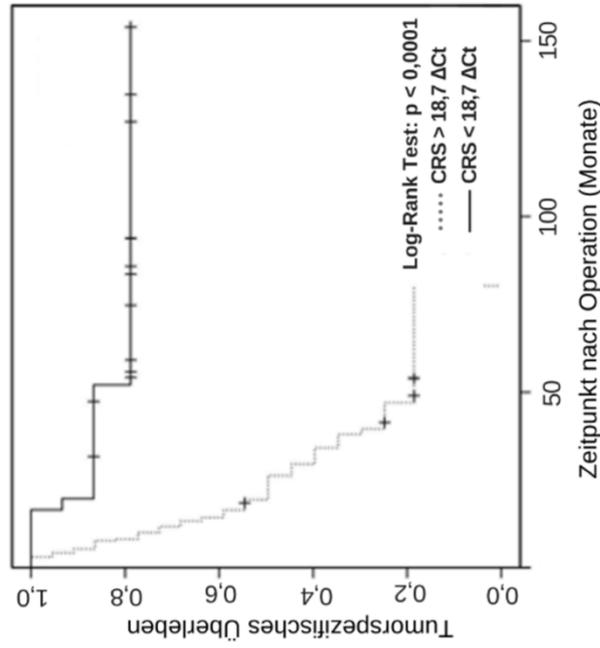
Das durch Vergho et al. [1] vorbeschriebene Überlebensklassifikationsmodell mit dem bekannten CRS (miR-21, -126, -221), der dazugehörigen Formel ($4,592 \times \Delta\text{Ct miR-21}$) + ($-3,892 \times \Delta\text{Ct miR-126}$) + ($-1,938 \times \Delta\text{Ct miR-221}$) sowie dem Schwellenwert von 18,7 ΔCt wurde auf das Regensburger ccRCC/ TT Kollektiv (n = 54) angewandt, um dessen Generalisierbarkeit an unabhängigen Kohorten zu überprüfen.

Hierzu wurden für jeden der 54 ccRCC/ TT Patienten die relativen miRNA-Expressionen von miR-21, -126 und -221 ermittelt und durch Einsetzen in die oben dargelegte Formel mit den entsprechenden Gewichten multipliziert. Auf diese Weise war es möglich für jeden Patienten einen CRS-Wert zu errechnen und ihn in Abhängigkeit des Schwellenwerts von 18,7 ΔCt entweder der High-Risk (CRS > 18,7 ΔCt) oder der Low-Risk (CRS < 18,7 ΔCt) Gruppe zuzuordnen (*Subkapitel 2.7.8 – Material und Methoden*). Abbildung 12 kann entnommen werden, dass es erfolgreich gelungen ist das Kollektiv in eine High-Risk-Gruppe ($n_{\text{HR}} = 28$) und eine Low-Risk-Gruppe ($n_{\text{LR}} = 26$) aufzuteilen. In der Kaplan-Meier Überlebensanalyse fielen die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen im Log-Rank-Test deutlich signifikant aus ($p = 7e-5$).

Es konnte eine Sensitivität von 92,3 % (CI 95 %: 62,1 % – 99,6 %) und eine Spezifität von 61,0 % (CI 95 %: 44,5 % – 75,4 %) erreicht werden. Von 13 Patienten, die an der Tumorerkrankung verstarben, konnten in der vorliegenden Analyse demnach 12 korrekt der High-Risk Gruppe zugeordnet werden (92,3 %).

Während in der Low-Risk-Gruppe lediglich ein Patient von insgesamt 26 Personen innerhalb des gesamten Beobachtungszeitraums an der Tumorerkrankung verstarb, starben in der High-Risk-Gruppe 12 von 28 Personen. Die tumorspezifischen Überlebensraten betrugen für die Low-Risk-Gruppe nach 5 Jahren 100 % und nach 10 Jahren 94 %. Für die High-Risk-Gruppe lagen die Überlebensraten nach 5 Jahren bei 70 % und nach 10 Jahren bei 50 %.

A Überlebensanalyse von ccRCC/TT Patienten (n = 37) aufgetrennt mit Hilfe des CRS (miR-21, -126, -221), Vergo et al. 2014



B Überlebensanalyse zur Validierung des CRS (miR-21, -126, -221) und Schwellenwerts anhand des ccRCC/TT Regensburger Kollektivs (n = 54)

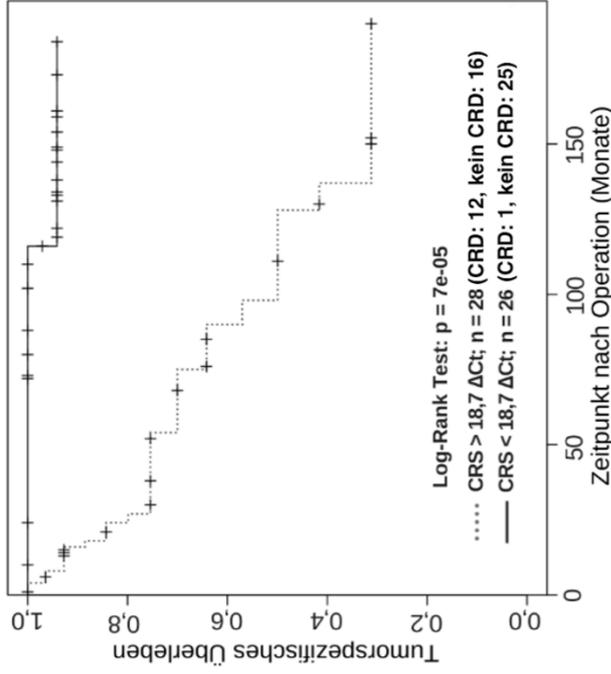


Abbildung 12: Kaplan-Meier (KM) Überlebensanalyse für tumorspezifisches Überleben (CSS) von ccRCC/TT Patienten aus der Studie von Vergo et al. [1] (A; n=37) sowie die aktuellen Validierungsergebnisse für das Regensburger ccRCC/TT Kollektiv (B; n = 54), aufgeteilt mit Hilfe des Kombinierten Risikoscores (CRS: miR-21, miR-126, miR-221) und des Schwellenwerts von 18,7 Δ Ct.

Die miRNA-Kombination, die Gewichte sowie der Schwellenwert von 18,7 Δ Ct wurden zwecks Validierung aus der 2014 publizierten Arbeit von Vergo et al. übernommen und auf das neue Kollektiv angewandt. Details hierzu sind in *Subkapitel 2.7.8 (Material und Methoden)* zu finden. A) Originale KM-Kurve aus der 2014 publizierten Arbeit von Vergo et al. [1] (CC BY 4.0; deutsche Beschriftungen hinzugefügt). B) KM-Kurve des neuen Regensburger ccRCC/TT Kollektivs, aufgeteilt mit Hilfe des bekannten CRS und des Schwellenwerts von 18,7 Δ Ct. Patienten, die bis zum letzten erhobenen Follow-up die Krebserkrankung überlebt haben, wurden zensiert und mit einem „+“ gekennzeichnet. Die Testung der Signifikanz erfolgte mit Hilfe eines Log-Rank Tests.

Follow-up Raten

Von 54 der insgesamt 56 Regensburger ccRCC/ TT Patienten lag eine Überlebenszeit vor. Demnach wurden zwei Patienten von der Überlebensanalyse ausgeschlossen. Tabelle 4 und Tabelle 5 können die Follow-up Raten für diese 54 Patienten entnommen werden. Nach 5 Jahren lag von 93 % der Patienten ein vollständiges Follow-up vor, nach 10 Jahren von 80 %. Follow-up Raten für die Low- und High-Risk-Gruppen können ebenfalls der Tabelle entnommen werden.

Tabelle 4: Follow-up nach 5 und 10 Jahren, Aufteilung der Patienten nach individuellem Verlauf in die Kategorien „kein CRD“, „CRD“ und „lost to follow-up“.

Nach 5 Jahren starb keiner der 26 Low-Risk-Patienten an der Tumorerkrankung. In der High-Risk-Gruppe erlitten 17 Patienten keinen CRD, 7 verstarben an der Tumorerkrankung, bei 4 Patienten konnte kein Follow-up mehr erhoben werden. Nach 10 Jahren erlitten 20 Patienten der Low-Risk-Gruppe und 12 Patienten der High-Risk-Gruppe keinen CRD. Ein Low-Risk-Patient bzw. 10 High-Risk-Patienten erlitten einen CRD. Lost to follow-up bei 5 Patienten der Low-Risk-Gruppe und 6 Patienten der High-Risk-Gruppe.

	5 Jahres Follow-up		10 Jahres Follow-up	
	Low-Risk	High-Risk	Low-Risk	High-Risk
kein CRD	26	17	20	12
CRD	0	7	1	10
lost to follow-up	0	4	5	6

Tabelle 5: Errechnete Follow-up Raten für das gesamte Regensburger ccRCC/ TT Kollektiv, die Low-Risk- sowie die High-Risk-Gruppe nach 5 und 10 Jahren Beobachtungszeit.

Das 5-Jahres Follow-up konnte bei insgesamt 50 von initial 54 Patienten erhoben werden, hiervon gehörten 26 Patienten der Low-Risk-Gruppe (initial 26 Patienten) und 24 Patienten der High-Risk-Gruppe (initial 28 Patienten) an. Das 10-Jahres Follow-up konnte bei insgesamt 43 Patienten erhoben werden, hiervon gehörten 21 der Low-Risk-Gruppe und 22 Patienten der High-Risk-Gruppe an.

	Follow-up Raten	
	5 Jahre	10 Jahre
Gesamtes Kollektiv	93 %	80 %
Low-Risk-Gruppe	100 %	81 %
High-Risk-Gruppe	86 %	79 %

3.1.5.2 Cox-Proportional-Hazards-Regression

Einfluss der Follow-up Parameter und miRNA-Expressionsprofile auf das tumorbedingte Versterben

Tabelle 6 können die Ergebnisse der univariaten Cox-Regression einzelner klinikopathologischer Faktoren sowie der miRNAs in Bezug auf den CRD entnommen werden. Diese Untersuchung diene einerseits zur Schätzung des Ausmaßes der Effektgröße einzelner Variablen auf den CRD innerhalb des Regensburger ccRCC/ TT Kollektivs, andererseits sollte untersucht werden, ob eine Vergleichbarkeit zum Würzburger Kollektiv aus der Vorarbeit [1] gegeben ist.

Es lässt sich feststellen, dass im vorliegenden unabhängigen Datensatz die gleichen Variablen (miR-21, miR-126, Grading nach Fuhrman, Lymphknotenstatus) in der univariaten Cox-Regressionsanalyse als relevante Faktoren in Bezug auf den CRD identifiziert werden konnten. Die einzelnen Faktoren üben zudem die gleichen Effekte in Bezug auf das tumorbedingte Versterben aus. So ist beispielsweise weiterhin eine höhere miR-21 Expression mit einer höheren CRD-Wahrscheinlichkeit assoziiert (HR 3,79, $p = 0,003$), während miR-126 wiederholt mit einem reduzierten CRD-Risiko in Verbindung gebracht werden konnte (HR 0,19, $p = 3e-5$). Die neu untersuchte miR-205 war mit einem höheren Risiko für einen CRD assoziiert (HR 1,23, $p = 0,014$), für miR-503 konnte kein Zusammenhang mit dem tumorbedingten Versterben hergestellt werden. Für die Fernmetastasierung konnten aufgrund einer sogenannten quasi-vollständigen Trennung keine Hazard Ratio (unendlich positiv) und kein P-Wert errechnet werden. Eine ausführliche Stellungnahme zu den Ergebnissen in Bezug auf die Fernmetastasierung findet sich im Appendix.

Zusammenfassend lässt sich den Ergebnissen der Cox-Regression entnehmen, dass die in der Vorarbeit beschriebenen Einflussfaktoren sich einerseits in der gleichen Art und Weise auf das tumorbedingte Versterben auswirken und diese andererseits auch eine ähnliche Einflussstärke haben.

Tabelle 6: Ergebnisse der univariaten Cox-Regression von klinikopathologischen Faktoren und miRNAs in Bezug auf den tumorbedingten Tod (CRD) der Regensburger ccRCC/ TT Patienten.

Anzahl beobachteter Probanden: 54, (für miR-205 und miR-513 = 52 Probanden, siehe 3.1.2)

Anzahl am Tumor verstorbener Patienten: 13, (für miR-205 und miR-513 = 12 CRD-Fälle, siehe 3.1.2)

Signifikante Einflussfaktoren wurden **fett** markiert und für $p < 0,05$ mit (*), für $p < 0,01$ mit (**) und für $p < 0,001$ mit (***) gekennzeichnet.

HR: Hazard Ratio; CI: Konfidenzintervall, ∞ /NA: Für die Fernmetastasierung konnten aufgrund einer sogenannten quasi-vollständigen Trennung keine Hazard Ratio (unendlich positiv) und kein P-Wert errechnet werden.

Parameter	HR (95 % CI)	P-Wert
miR-21	3,79 (1,55 – 9,26)	0,003**
miR-126	0,19 (0,09 – 0,42)	3e-5***
miR-145	0,75 (0,54 – 1,05)	0,10
miR-200c	1,23 (0,94 – 1,60)	0,13
miR-221	0,74 (0,46 – 1,19)	0,21
miR-205	1,23 (1,04 – 1,46)	0,014*
miR-513	1,22 (0,97 – 1,54)	0,086
Alter	0,98 (0,92 – 1,03)	0,42
Geschlecht	2,10 (0,58 – 7,65)	0,26
Tumorgröße	1,01 (1,00 – 1,03)	0,07
Grading nach Fuhrman	3,79 (1,27 – 11,33)	0,02*
N-Status	6,70 (2,09 – 21,47)	0,001**
Fernmetastasierung	∞	NA

3.2 Würzburger Kollektiv – Seren

Im Folgenden wird zunächst eine Übersicht über die Zusammensetzung des Würzburger Kollektivs und die verfügbaren, experimentell in Probandenseren erfassten miRNA-Expressionsergebnisse sowie die erhobenen klinikopathologischen Daten gegeben. Im darauffolgenden Abschnitt werden Ergebnisse präsentiert, die der Beantwortung der Frage dienen, ob anhand der im Serum erfassten Expressionen einzelner miRNAs (miR-21, -126, -145, -210, -221) eine statistisch signifikante Unterscheidung zwischen den einzelnen Probandengruppen (ccRCC/ woTT, ccRCC/ TT, tumorfreie Kontrolle) vorgenommen werden kann. Zur Vervollständigung der statistischen Auswertungen werden die Expressionsprofile einzelner miRNAs bezogen auf die klinikopathologischen Faktoren innerhalb des Würzburger Tumorkollektivs (ccRCC/ woTT, ccRCC/ TT) dargestellt.

3.2.1 Übersicht über das Würzburger Kollektiv

Für die nachfolgend beschriebenen experimentellen und statistischen Untersuchungen standen 114 Seren zur Verfügung. Darunter befanden sich 45 tumorfreie Probanden (TF: 39,5 %), 35 Patienten mit einem diagnostizierten klarzelligem Nierenzellkarzinom ohne Gefäßinvasion (ccRCC/ woTT: 30,7 %) und 34 Tumorpatienten mit einem klarzelligem Nierenzellkarzinom mit pathologisch bestätigter Gefäßinfiltration (ccRCC/ TT: 29,8 %) (Abbildung 13). Es handelte sich um ein männliches Kollektiv. Die Seren der Tumorpatienten wurden in einem Zeitraum von 12 Jahren am Universitätsklinikum Würzburg in der Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie akquiriert.

Würzburger Kollektiv

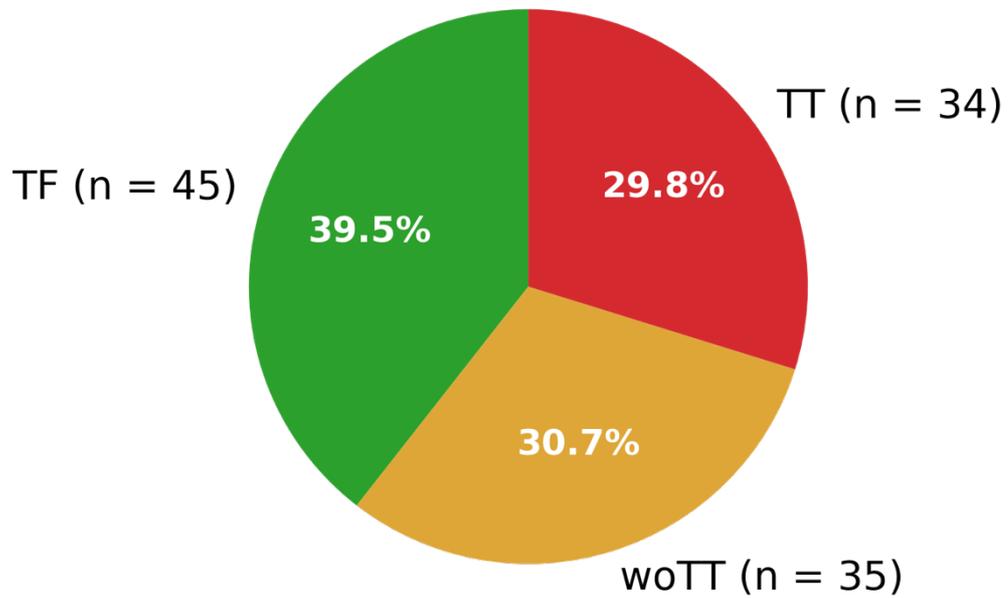


Abbildung 13: Kuchendiagramm – Serumproben Würzburger Probanden (n = 114).
Tumorfrei (TF: $n_{TF} = 45$), ccRCC/ woTT (woTT: $n_{woTT} = 35$), ccRCC/ TT (TT: $n_{TT} = 34$)

3.2.2 Verfügbare Follow-up Daten für Würzburger ccRCC Probanden

Für statistische Auswertungen standen Follow-up Daten von 69 Tumorpatienten zur Verfügung – 35 Patienten mit einem diagnostizierten ccRCC/ woTT und 34 mit einem ccRCC/ TT. Die Follow-up Daten wurden in einem Zeitraum von 16 Jahren in der Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie des Universitätsklinikums Würzburg akquiriert. Folgende Daten wurden für die Auswertungen verwendet: Alter, Geschlecht, Lymphknotenstatus, synchrone Metastasierung, Grading nach Fuhrman, Tumorgroße in mm (Durchmesser), Gesamtüberleben (n = 64), tumorbedingtes Versterben (n = 64), Follow-up Dauer (n = 64) (Abbildung 14). Eine ausführliche Übersicht über die Zusammensetzung des Kollektivs und dessen Follow-up Daten kann Tabelle 7 entnommen werden.

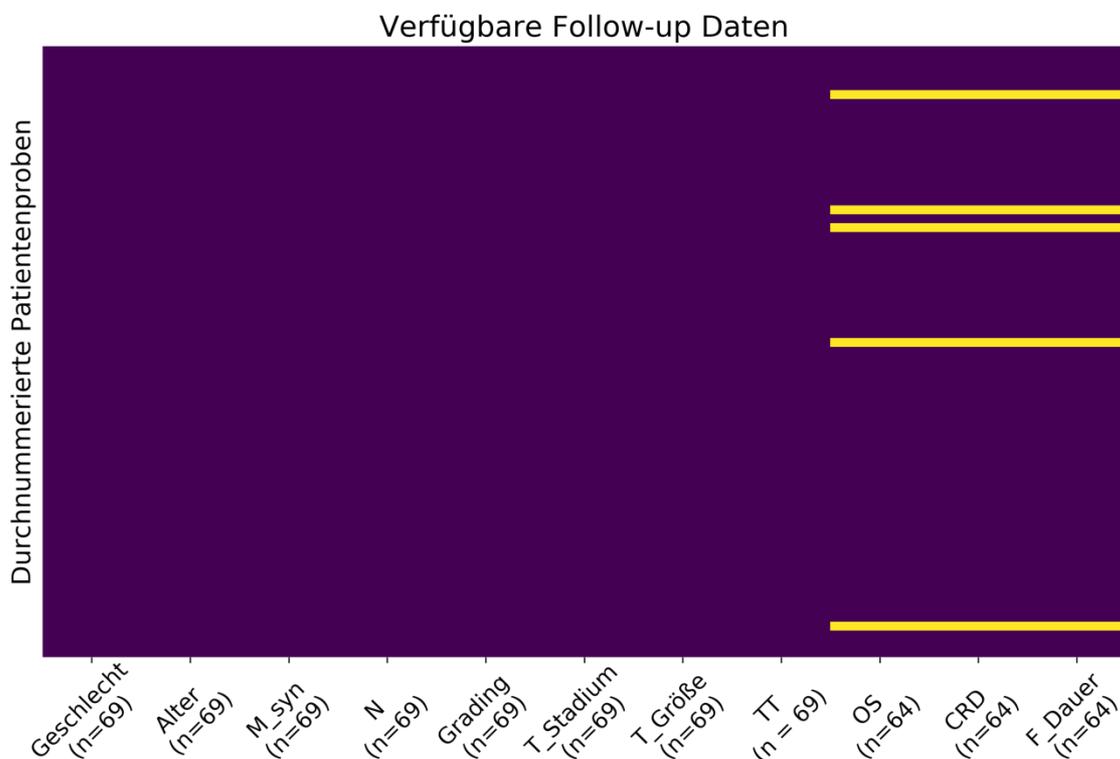


Abbildung 14: Heatmap zur Darstellung verfügbarer Follow-up Daten Würzburger ccRCC Patienten (n = 69) – 35 mit ccRCC/ woTT und 34 mit ccRCC/ TT.

Lila: vollständige Daten; Gelb: fehlende Informationen. Für Alter, Geschlecht, Lymphknotenstatus (N), Grading nach Fuhrman (Grading), synchrone Metastasierung (M_syn), Tumorstadium (T_Stadium), Tumorgroße in mm (T_Größe; Durchmesser) und Gefäßinfiltration (TT) standen jeweils 69 Datenpunkte zur Verfügung. Für das Gesamtüberleben (OS), den tumorbedingten Tod (CRD) sowie die Follow-up Dauer (F_Dauer) waren 64 Datenpunkte verfügbar.

Tabelle 7: Übersicht über Würzburger ccRCC Probanden.

(n = 69, Follow-up Daten akquiriert in einem Zeitraum von 16 Jahren)

Follow-up Zeitraum (Median; n = 64)	44 (0 – 179) Monate
Patientenalter (Median)	66 (31 – 87) Jahre
Geschlecht männlich	69 (100 %)
Tumorstadium pT1 pT2 pT3a pT3b pT4	26 (37,7 %) 6 (8,7 %) 8 (11,6 %) 28 (40,6 %) 1 (1,4 %)
Venöse Gefäßinfiltration ja nein	34 (49,3 %) 35 (50,7 %)
Grading nach Fuhrman 1 2 3 4	2 (2,9 %) 48 (69,6 %) 18 (26,1%) 1 (1,4 %)
Lymphknotenstatus N0 N+	60 (87,0 %) 9 (13,0 %)
Synchrone Metastasierung M0 M1	49 (71,0 %) 20 (29,0 %)
Tumorgröße (Median)	65 (10 – 150) mm
Gesamtüberleben (n = 64) ja nein	44 (68,8 %) 20 (31,2 %)
Tumorbedingter Tod (n = 64) ja nein	12 (18,7 %) 52 (81,3%)

3.2.3 Serummaterial des Würzburger Kollektivs

Verfügbare Messergebnisse relativer miRNA-Expressionen

Expressionen von miR-21, -126, -145, -210 und -221 wurden im Serum von tumorfreien Probanden ($n_{TF} = 45$), ccRCC/ woTT ($n_{woTT} = 35$) und ccRCC/ TT Patienten ($n_{TT} = 34$) mittels qRT-PCR bestimmt und gegen miR-16 normalisiert. Details zur Methodik können in den *Subkapiteln 2.4 und 2.5* nachgelesen werden. In der ccRCC/ woTT Patientengruppe konnte für miR-145 in einer Probe kein Messergebnis ermittelt werden. Aufgrund von Materialmangel war es nicht möglich diese Messung zu wiederholen, weshalb nur 34 Δ Ct-Werte vorliegen. Die ermittelten Werte wurden für die nachfolgenden statistischen Auswertungen herangezogen (Abbildung 15).

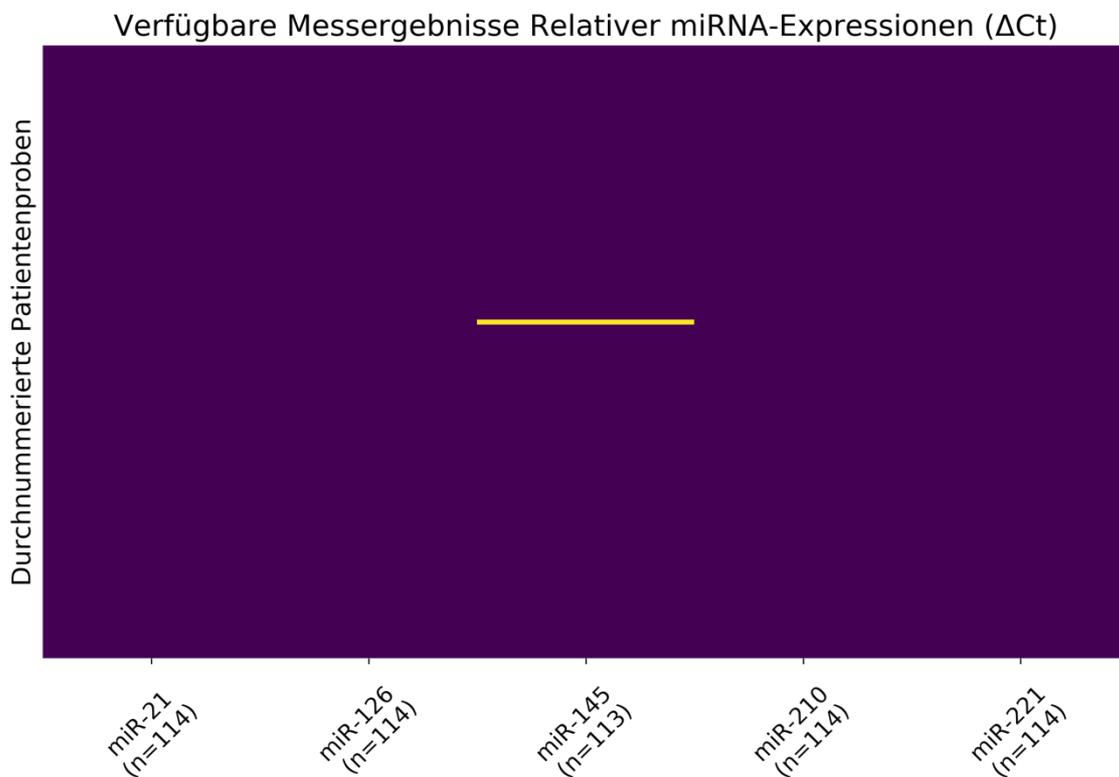


Abbildung 15: Heatmap zur Darstellung verfügbarer Messergebnisse relativer miRNA-Expressionen aus Seren Würzburger Probanden.

Tumorfrei ($n_{TF} = 45$), ccRCC/ woTT ($n_{woTT} = 35$), ccRCC/ TT ($n_{TT} = 34$)

MiRNA-Expressionen wurden mittels qRT-PCR ermittelt und gegen miR-16 normalisiert.

Lila: vollständige Daten; Gelb: fehlende Datenpunkte

miR-21, -126, -210, -221: $n = 114$; miR-145: $n = 113$

3.2.4 Relative miRNA-Expressionsunterschiede zwischen den Probandengruppen

Im Rahmen der statistischen Auswertung wurde für jede miRNA (miR-21, -126, -145, -210, -221) untersucht, ob anhand ihrer relativen Expression eine statistisch signifikante Unterscheidung zwischen Kontrollproben, ccRCC/ woTT sowie ccRCC/ TT Seren vorgenommen werden kann. Nachfolgen werden die Ergebnisse für jede einzelne miRNA präsentiert. Eine Übersicht der Ergebnisse dieses Kapitels findet sich in den *Subkapiteln 3.2.4.5 und 3.2.4.6.*

3.2.4.1 MiR-21

Mittels ANOVA konnten für miR-21 hochsignifikante Expressionsunterschiede ($p = 4e-3$) zwischen den Serumproben von Kontrollprobanden ($n_{TF} = 45$), ccRCC/ woTT ($n_{woTT} = 35$) und ccRCC/ TT ($n_{TT} = 34$) Patienten ermittelt werden (Abbildung 16). Im anschließenden gepaarten t-Test konnte nach einer p-Wert-Korrektur mit Hilfe der Holm-Bonferroni Methode eine deutlich signifikante Überexpression für die ccRCC/ woTT Patientengruppe gegenüber der Kontrolle ($p = 0,008$) ermittelt werden. In ccRCC/ TT Proben war miR-21 gegenüber ccRCC/ woTT Proben signifikant herunterreguliert ($p = 0,03$). Zwischen ccRCC/ TT Proben und der Kontrolle konnte kein statistisch signifikanter Unterschied ($p = 0,45$) ermittelt werden (Abbildung 16).

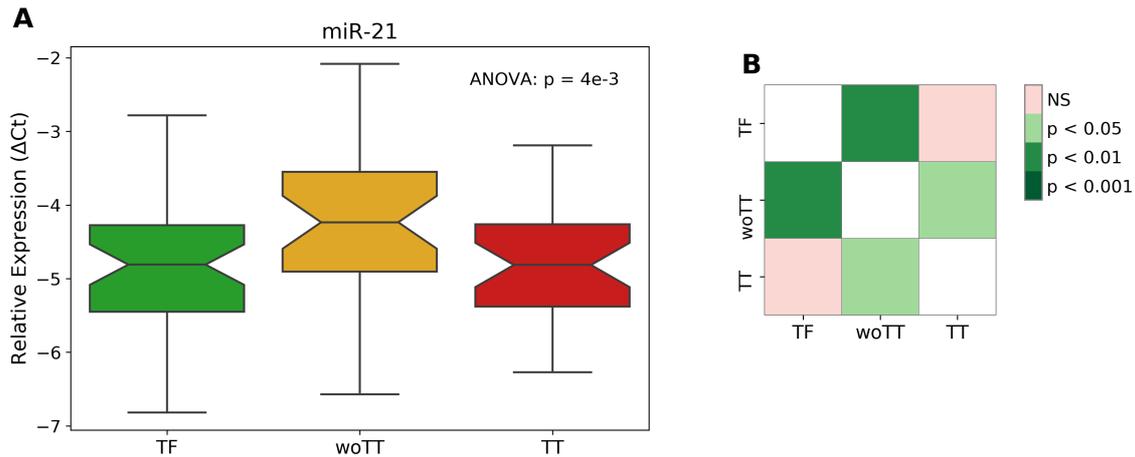


Abbildung 16: Relative miR-21 Expressionsunterschiede zwischen Würzburger Probandenseren.

MiRNA-Expressionen wurden mittels qRT-PCR ermittelt und gegen miR-16 normalisiert.

A.) Box-Whisker-Plots zur Darstellung relativer Expressionen von miR-21 in Kontrollseren ($n_{TF} = 45$), Seren von Tumorpatienten ohne ($n_{woTT} = 35$) und mit Gefäßinvasion ($n_{TT} = 34$). Statistik: ANOVA

B.) Heatmap zur Darstellung von p-Wert-Ergebnissen aus dem post hoc gepaarten t-Test zwischen den Serumgruppen. Es erfolgte eine p-Wert Korrektur nach der Holm-Bonferroni Methode. Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen wurden für $p < 0,05$ stärkeabhängig mittels ansteigender grüner Farbintensität veranschaulicht. Nicht signifikante Ergebnisse (NS) wurden rot dargestellt.

3.2.4.2 MiR-126

Die statistische Auswertung relativer miR-126-Expressionen in Seren von Kontrollprobanden ($n_{TF} = 45$), ccRCC/ woTT ($n_{woTT} = 35$) und ccRCC/ TT ($n_{TT} = 34$) Patienten mittels Kruskal-Wallis Test zeigte mit einem p-Wert von $9,3e-6$ hochsignifikante Unterschiede zwischen den Serumproben (Abbildung 17).

Mit Hilfe des anschließenden post hoc Dunn's Tests konnte nach einer p-Wert-Korrektur mittels Holm-Bonferroni Methode eine deutlich signifikante miRNA-126-Hochregulierung in den ccRCC/ woTT ($p = 1e-5$) sowie ccRCC/ TT Patientenseren ($p = 0,002$) gegenüber der Kontrolle ermittelt werden. Zwischen ccRCC/ TT und ccRCC/ woTT Proben konnte nicht statistisch signifikant ($p = 0,26$) unterschieden werden (Abbildung 17).

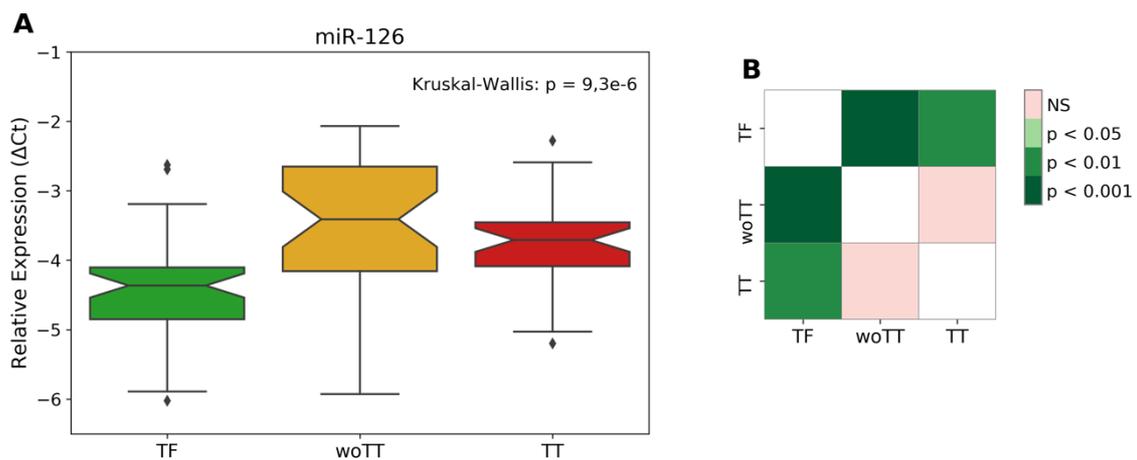


Abbildung 17: Relative miR-126 Expressionsunterschiede zwischen Würzburger Probandenseren.

MiRNA-Expressionen wurden mittels qRT-PCR ermittelt und gegen miR-16 normalisiert.

A.) Box-Whisker-Plots zur Darstellung relativer Expressionen von miR-126 im Serum von Kontrollprobanden ($n_{TF} = 45$), Patienten mit ccRCC/ woTT ($n_{woTT} = 35$) sowie ccRCC/ TT ($n_{TT} = 34$). Statistik: Kruskal-Wallis Test

B.) Heatmap zur Darstellung von p-Wert-Ergebnissen aus dem post hoc Dunn's Test zwischen den einzelnen Serumgruppen. Es erfolgte eine p-Wert Korrektur nach der Holm-Bonferroni Methode. Signifikante miRNA-Expressionsunterschiede zwischen den einzelnen Gruppen wurden für $p < 0,05$ stärkeabhängig mittels ansteigender grüner Farbintensität veranschaulicht. Nicht signifikante Ergebnisse (NS) wurden rot dargestellt.

3.2.4.3 MiR-145

Die statistische Auswertung relativer miR-145 Expressionen in Seren von Kontrollprobanden ($n_{TF} = 45$), ccRCC/ woTT ($n_{woTT} = 34$) und ccRCC/ TT ($n_{TT} = 34$) Patienten mittels ANOVA zeigte mit einem p-Wert von $1e-6$ hochsignifikante Unterschiede zwischen den Serumproben (Abbildung 18).

Im anschließenden gepaarten t-Test konnte nach einer p-Wert-Korrektur mit Hilfe der Holm-Bonferroni Methode eine signifikante miR-145-Überexpression in ccRCC/ woTT ($p = 2e-6$) und ccRCC/ TT Proben ($p = 0,020$) gegenüber der Kontrolle ermittelt werden. In ccRCC/ TT Proben war miR-145 gegenüber ccRCC/ woTT Seren signifikant ($p = 0,009$) herunterreguliert (Abbildung 18).

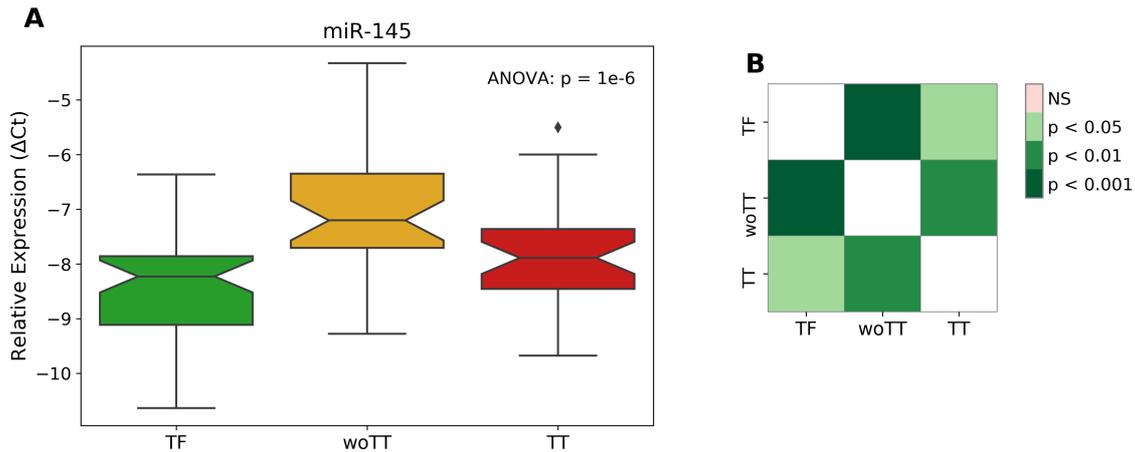


Abbildung 18: Relative miR-145 Expressionsunterschiede zwischen Würzburger Probandenseren.

MiRNA-Expressionen wurden mittels qRT-PCR ermittelt und gegen miR-16 normalisiert.

A.) Box-Whisker-Plots zur Darstellung relativer Expressionen von miR-145 im Serum von Kontrollprobanden ($n_{TF} = 45$), ccRCC/ woTT ($n_{woTT} = 34$) sowie ccRCC/ TT ($n_{TT} = 34$) Probanden. Statistik: ANOVA

B.) Heatmap zur Darstellung von p-Wert-Ergebnissen aus dem post hoc gepaarten t-Test zwischen den einzelnen Serumgruppen. Es erfolgte eine p-Wert Korrektur nach der Holm-Bonferroni Methode. Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen wurden für $p < 0,05$ stärkeabhängig mittels ansteigender grüner Farbintensität veranschaulicht. Nicht signifikante Ergebnisse (NS) wurden rot dargestellt.

3.2.4.3 MiR-210

Die statistische Auswertung relativer miR-210 Expressionen in Seren von Kontrollprobanden ($n_{TF} = 45$), ccRCC/ woTT ($n_{woTT} = 35$) und ccRCC/ TT ($n_{TT} = 34$) Patienten mittels Kruskal-Wallis Test zeigte mit einem p-Wert von 0,85 keine statistisch signifikanten miRNA-Expressionsunterschiede zwischen den Proben (Abbildung 19).

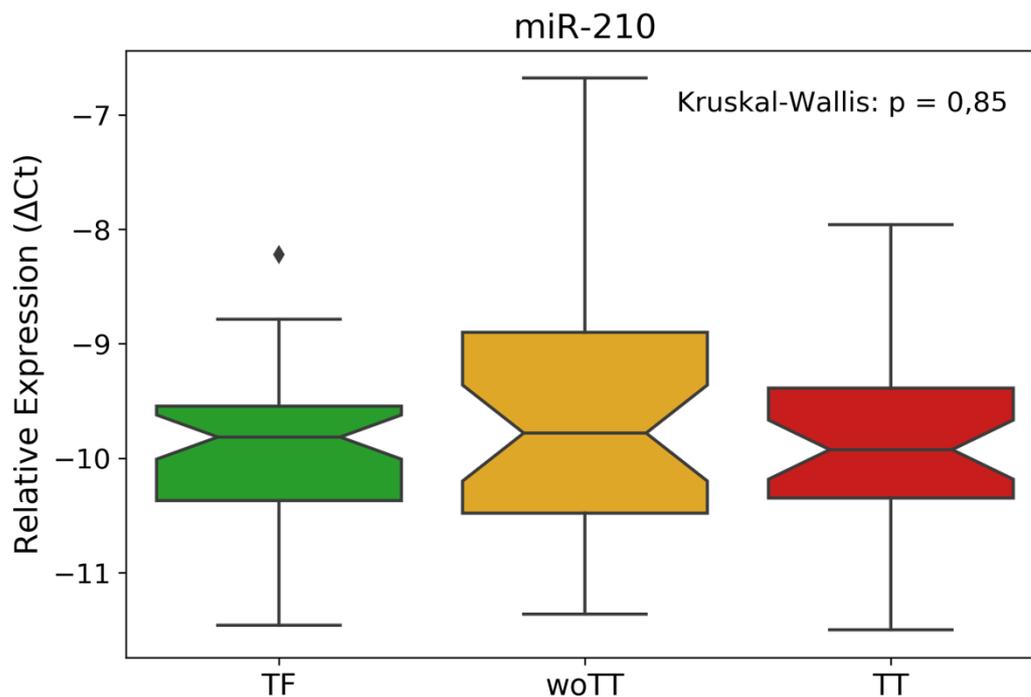


Abbildung 19: Relative miR-210 Expressionsunterschiede zwischen Würzburger Probandenseren. Box-Whisker-Plots zur Darstellung relativer Expressionen von miR-210 im Serum von Kontrollprobanden ($n_{TF} = 45$), ccRCC/ woTT ($n_{woTT} = 35$) sowie ccRCC/ TT ($n_{TT} = 34$) Patienten. MiRNA-Expressionen wurden mittels qRT-PCR ermittelt und gegen miR-16 normalisiert. Statistik: Kruskal-Wallis Test. Es konnten keine statistisch signifikanten miRNA-Expressionsunterschiede zwischen den Gruppen ermittelt werden.

3.2.4.4 MiR-221

Die statistische Auswertung relativer miR-221 Expressionen der Seren von Kontrollprobanden ($n_{TF} = 45$), ccRCC/ woTT ($n_{woTT} = 35$) und ccRCC/ TT ($n_{TT} = 34$) Patienten mittels Kruskal-Wallis-Test zeigte mit einem p-Wert von $9e-4$ hochsignifikante Unterschiede zwischen den Serumproben.

Im anschließenden post hoc Dunn's Test konnte nach einer p-Wert-Korrektur mittels Holm-Bonferroni Methode eine signifikante miR-221-Überexpression in ccRCC/ woTT Seren ($p = 0,03$) gegenüber der Kontrolle ermittelt werden. MiR-221 war in ccRCC/ TT Proben im Vergleich zu ccRCC/ woTT Seren deutlich signifikant herunterreguliert ($p = 7e-4$). Zwischen ccRCC/ TT und Kontrollproben konnte nicht statistisch signifikant ($p = 0,14$) unterschieden werden (Abbildung 20).

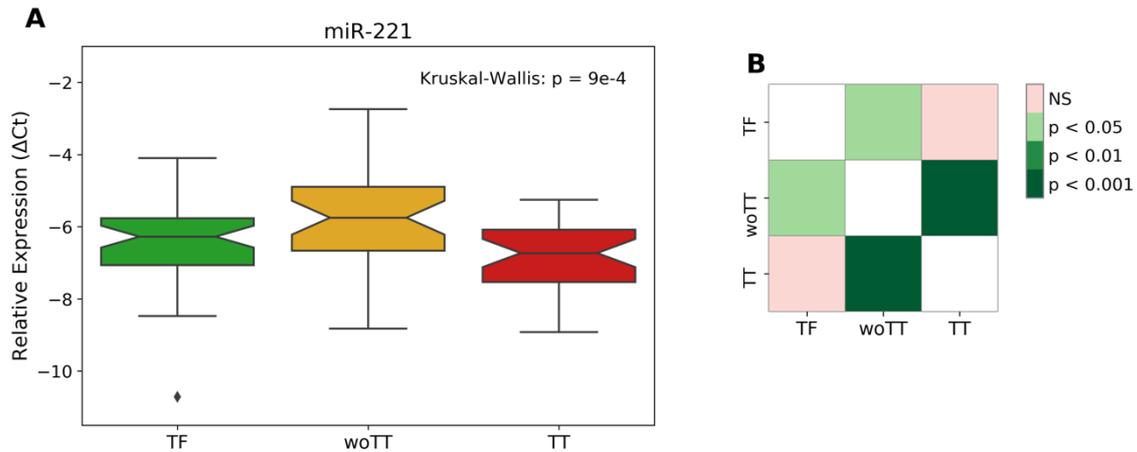


Abbildung 20: Relative miR-221 Expressionsunterschiede zwischen Würzburger Probandenserien.

A.) Box-Whisker-Plots zur Darstellung relativer Expressionen von miR-221 im Serum von Kontrollprobanden ($n_{TF} = 45$), Patienten mit ccRCC/ woTT ($n_{woTT} = 35$) sowie ccRCC/ TT ($n_{TT} = 34$). Statistik: Kruskal-Wallis Test

B.) Heatmap zur Darstellung von p-Wert-Ergebnissen aus dem post hoc Dunn's Test zwischen den einzelnen Serumgruppen. Es erfolgte eine p-Wert Korrektur nach der Holm-Bonferroni Methode. Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen wurden für $p < 0,05$ stärkeabhängig mittels ansteigender grüner Farbintensität veranschaulicht. Nicht signifikante Ergebnisse (NS) wurden rot dargestellt.

3.2.4.5 Übersicht über relative miRNA-Expressionsunterschiede innerhalb des Würzburger Kollektivs

Tabelle 8 bietet eine Übersicht über relevante relative Expressionsunterschiede einzelner miRNAs zwischen Serumproben der dreien Würzburger Gruppen (Tumorfrei: $n_{TF} = 45$, ccRCC/ woTT: $n_{woTT} = 35$, ccRCC/ TT: $n_{TT} = 34$). Ergänzend zur abgebildeten Signifikanzstärke wurden die miRNA- Δ Ct-Differenzen zwischen den Gruppen errechnet. MiR-210 wurde aus der tabellarischen Darstellung ausgeschlossen, da für diese keine statistisch signifikanten relativen Expressionsunterschiede zwischen den Serumproben ermittelt werden konnten (Abbildung 19).

Tabelle 8: Übersicht über relative miRNA-Expressionsunterschiede zwischen Serumgruppen des Würzburger Kollektivs.

ccRCC/ woTT (woTT: $n_{woTT} = 35$), ccRCC/ TT (TT: $n_{TT} = 34$), tumorfreie Probanden (TF: $n_{TF} = 45$)
 Statistik: post hoc gepaarter t-Test nach einer ANOVA (miR-21, -145)/ post hoc Dunn's Test nach einem Kruskal-Wallis Test (miR-126 und -221). Es erfolgte eine p-Wert-Korrektur nach der Holm-Bonferroni Methode. Signifikante Unterschiede wurden für $p < 0,05$ mit (*), für $p < 0,01$ mit (**) und für $p < 0,001$ mit (***) markiert. Nicht signifikante Ergebnisse wurden mit „ns“ beschriftet. Eine relative Überexpression wurden mit "↑", eine Herunterregulation mit "↓" veranschaulicht.
 Ergänzend zur abgebildeten Signifikanzstärke wurden die miRNA- Δ Ct-Differenzen zwischen den Gruppen errechnet.

	woTT vs. TF	TT vs. TF	TT vs. woTT
miR-21	↑** (0,70 Δ Ct)	↑ ns (0,15 Δ Ct)	↓* (- 0,55 Δ Ct)
miR-126	↑*** (0,92 Δ Ct)	↑** (0,60 Δ Ct)	↓ ns (- 0,32 Δ Ct)
miR-145	↑*** (1,41 Δ Ct)	↑* (0,57 Δ Ct)	↓** (- 0,84 Δ Ct)
miR-221	↑* (0,73 Δ Ct)	↓ ns (- 0,34 Δ Ct)	↓*** (- 1,07 Δ Ct)

3.2.4.6 Upside-Down-Effekt relativer miRNA-Expressionen im Serum

Betrachtet man die miRNA-Expressionsprofile im Serum in der Übersicht, so lässt sich ein gewisser *Upside-Down-Effekt* zwischen den Proben einzelner Gruppen beobachten (Abbildung 21). Während sich zunächst eine deutliche Überexpression aller vier miRNAs (miR-21, -126, -145, -221) in ccRCC/ woTT Proben ($n_{woTT} = 35$) gegenüber Seren tumorfreier Probanden ($n_{TF} = 45$) beobachten lässt, sinkt ihre relative Expression wieder stark ab, sobald der Tumor das Gefäßsystem infiltriert ($n_{TT} = 34$). Die Expressionslevel nähern sich nahezu dem Stand tumorfreier Probanden an. Lediglich für miR-126 sowie -145 lässt sich noch eine leichte statistisch signifikante Überexpression in den TT-Proben gegenüber TF-Seren ermitteln (Abbildung 21).

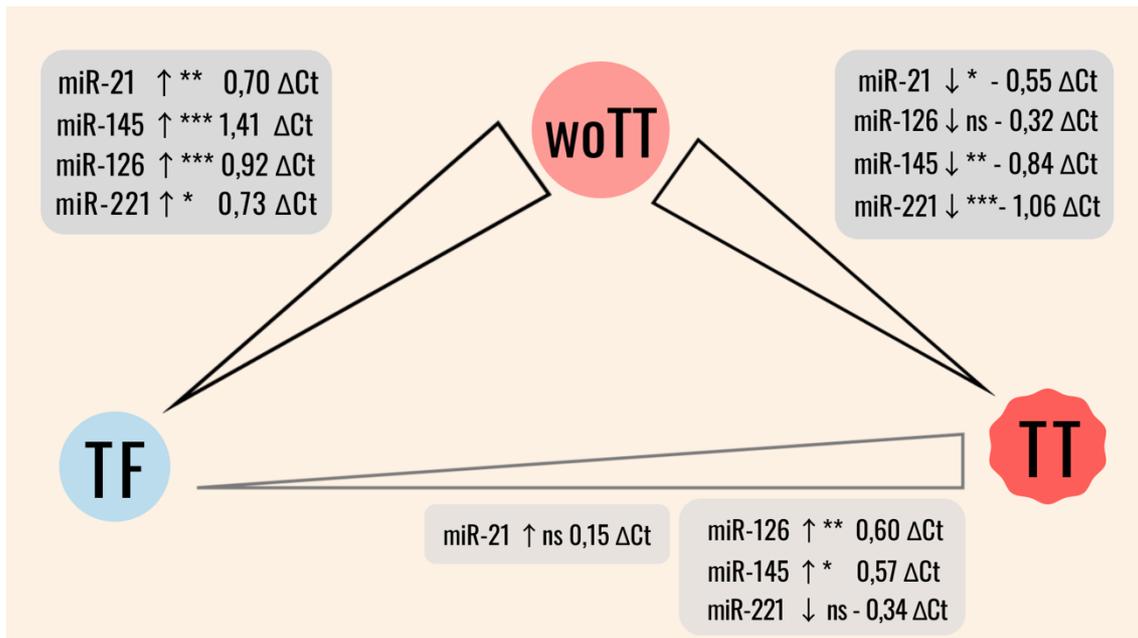


Abbildung 21: Upside-Down-Effekt – relative miRNA-Expressionsunterschiede zwischen Seren von ccRCC/ woTT (woTT) und ccRCC/ TT (TT) Patienten sowie tumorfreien Probanden (TF).

Eine relative Überexpression wurden mit "↑", eine Herunterregulation mit "↓" veranschaulicht. Die Signifikanzstärke im post hoc gepaarten t-Test nach einer ANOVA (miR-21, -145) / post hoc Dunn's Test nach einem Kruskal-Wallis Test (miR-126, -221) wurde für $p < 0,05$ mit (*), für $p < 0,01$ mit (**) und für $p < 0,001$ mit (***) gekennzeichnet. Es erfolgte eine p-Wert-Korrektur nach der Holm-Bonferroni Methode. Nicht signifikante Expressionsunterschiede wurden mit „ns“ gekennzeichnet. Zusätzlich wurden die Differenzen zwischen den ΔCt -Mittelwerten einzelner miRNAs der Gruppen ermittelt, um die Stärke der Expressionsunterschiede zu verdeutlichen.

3.2.5 ccRCC: Zusammenhang zwischen miRNA-Expressionen und Follow-up Parametern

In die nachfolgende statistische Untersuchung der Assoziation zwischen relativen miRNA-Expressionen und Follow-up Parametern wurden 69 ccRCC Patienten einbezogen, die sich weiter in Serumproben von 34 ccRCC/ TT (49,3 %) und 35 ccRCC/ woTT (50,7 %) Patienten unterteilen ließen (Abbildung 22). Detaillierte Informationen zu den Follow-up Daten der ccRCC Probanden können Tabelle 7 (Subkapitel 3.2.2) entnommen werden.

Eine Übersicht über die ermittelten Assoziationen ist in Kapitel 3.2.5.6 zu finden. Hieran schließt sich in Subkapitel 3.2.5.7 eine Cox-Regression an, um den Einfluss einzelner miRNAs und klinikopathologischer Faktoren auf das tumorbedingte Versterben der ccRCC-Patienten zu untersuchen.

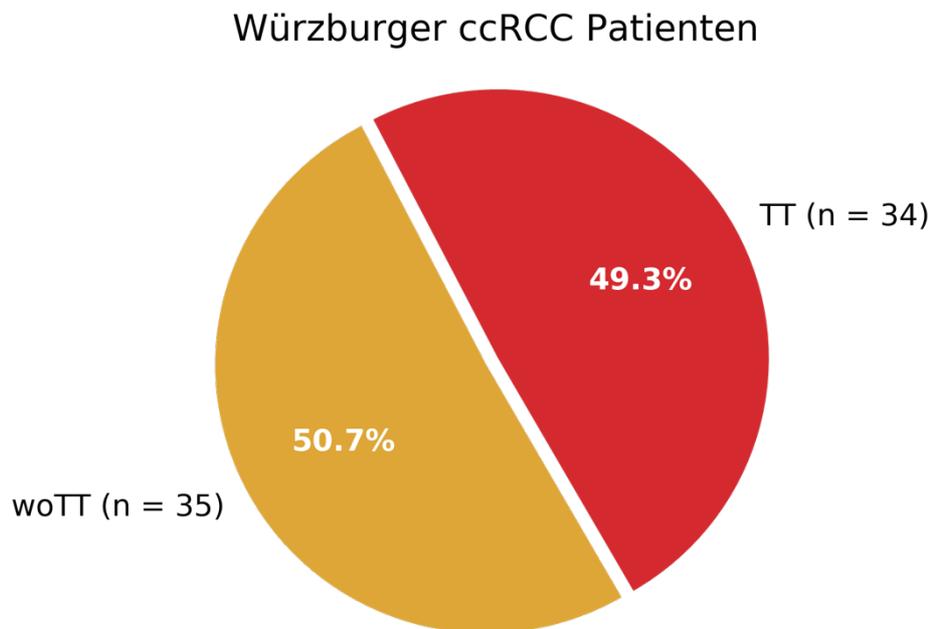


Abbildung 22: Kuchendiagramm – Würzburger ccRCC Patienten (ccRCC/ TT: $n_{TT} = 34$ und ccRCC/ woTT: $n_{woTT} = 35$).

3.2.5.1 Synchrone Metastasierung

Synchrone Metastasen wurden bei 20 Patienten diagnostiziert (M1, 29,0 %), 49 Probanden waren metastasenfrei (M0, 71,0 %) (Abbildung 23a).

Im ungepaarten zweiseitigen Student's t-Tests konnten keine statistisch signifikanten relativen Expressionsunterschiede für miR-21 ($p = 0,224$), -145 ($p = 0,667$) und -221 ($p = 0,278$) zwischen der M1- und M0-Subgruppe ermittelt werden. Im Welch-Test ergaben sich keine statistisch signifikanten Ergebnisse für miR-126 ($p = 0,908$) und -210 ($p = 0,109$) (Abbildung 23).

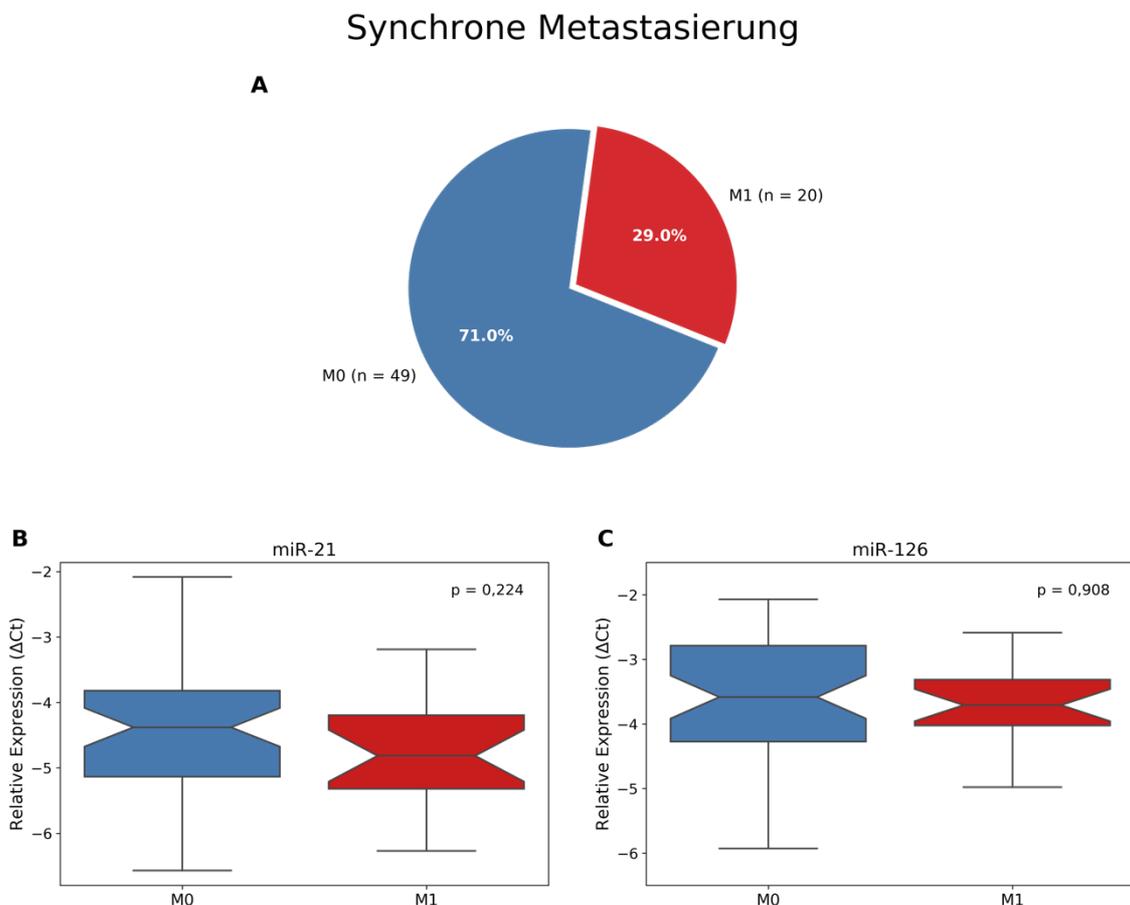


Abbildung 23a: (A) Kuchendiagramm – Fallzahlen Würzburger ccRCC Patienten mit ($n_{M1} = 20$) und ohne ($n_{M0} = 49$) synchrone Metastasierung; (B - C) Box-Whisker-Plots – relative Expression von miR-21 und -126 im Serum dieser Subgruppen.

Methodik: qRT-PCR – gegen miR-16 normalisiert, ungepaarter zweiseitiger Student's t-Test (miR-21) / Welch-Tests (miR-126). Keine statistisch signifikanten Expressionsunterschiede.

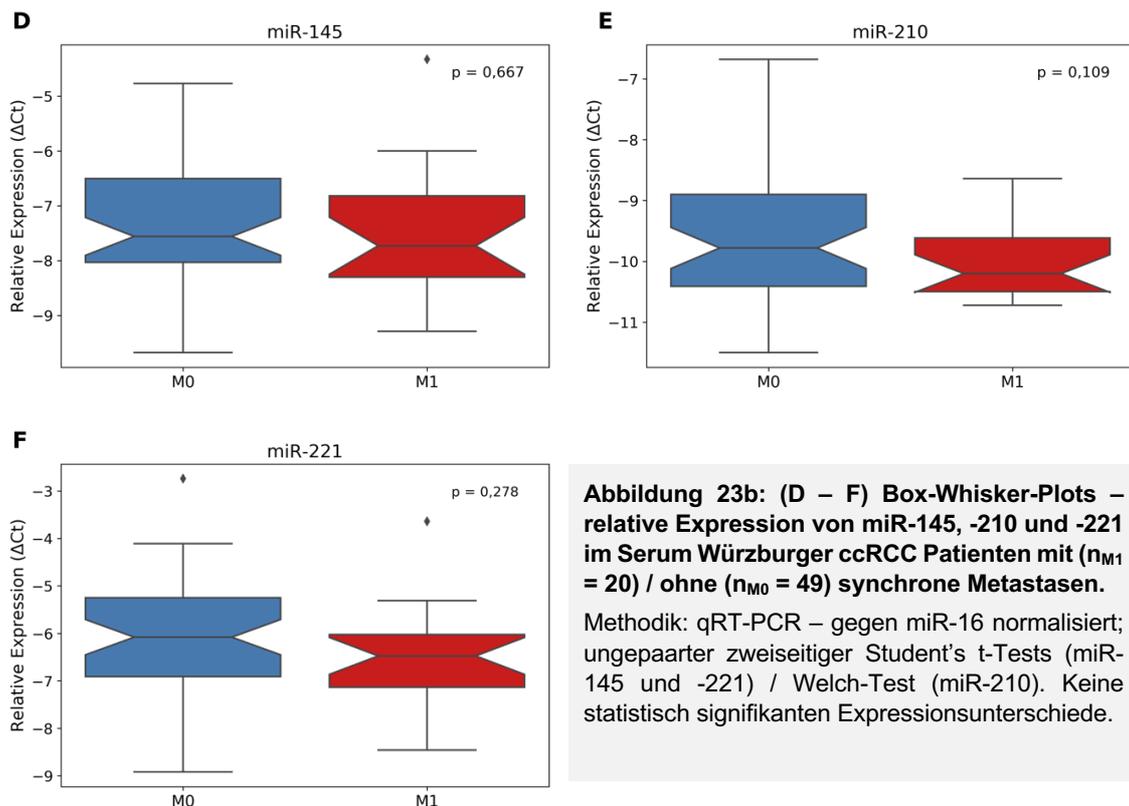


Abbildung 23b: (D – F) Box-Whisker-Plots – relative Expression von miR-145, -210 und -221 im Serum Würzburger ccRCC Patienten mit ($n_{M1} = 20$) / ohne ($n_{M0} = 49$) synchrone Metastasen.
Methodik: qRT-PCR – gegen miR-16 normalisiert; ungepaarter zweiseitiger Student's t-Tests (miR-145 und -221) / Welch-Test (miR-210). Keine statistisch signifikanten Expressionsunterschiede.

3.2.5.2 Lymphknotenstatus

Bei neun ccRCC-Patienten wurden Lymphknotenmetastasen diagnostiziert (13,0 %), 60 Probanden waren frei von Lymphknotenmetastasen (87,0 %) (Abbildung 24a).

Mit Hilfe eines ungepaarten zweiseitigen Student's t-Tests konnten keine signifikanten miRNA-Expressionsunterschiede zwischen der N+- und N0-Subgruppe festgestellt werden – miR-21 ($p = 0,935$), -126 ($p = 0,971$), -210 ($p = 0,262$) und -221 ($p = 0,923$).

MiR-145 war mit einem p-Wert von 0,062 in Proben der N+-Subgruppe gegenüber der Referenz überexprimiert (Abbildung 24).

Lymphknotenstatus

A

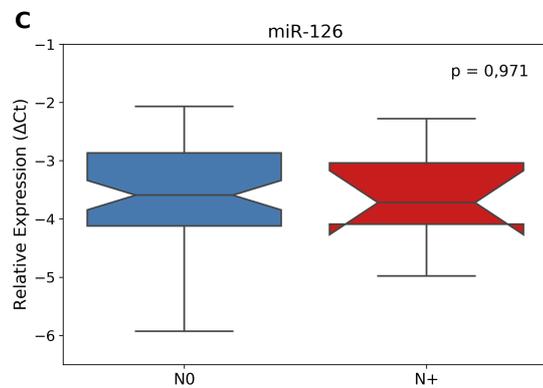
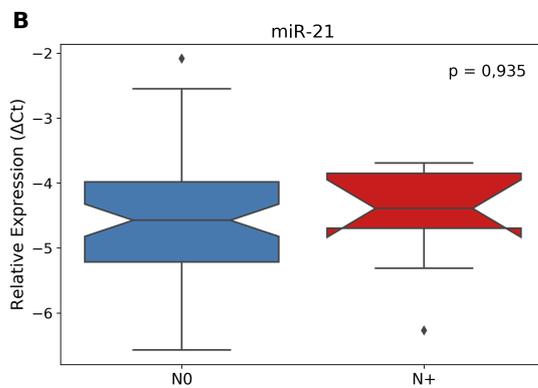
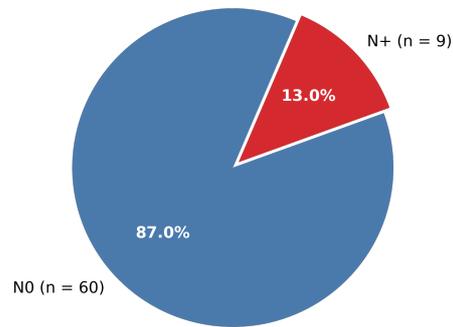


Abbildung 24a: (A) Kuchendiagramm – Fallzahlen Würzburger ccRCC-Patienten mit ($n_{N+} = 9$) und ohne ($n_{N0} = 60$) Lymphknotenmetastasen; (B - C) Box-Whisker-Plots – relative Expression von miR-21 und -126 im Serum dieser Subgruppen.

Methodik: qRT-PCR – gegen miR-16 normalisiert; ungepaarter zweiseitiger Student's t-Test. Keine statistisch signifikanten Expressionsunterschiede.

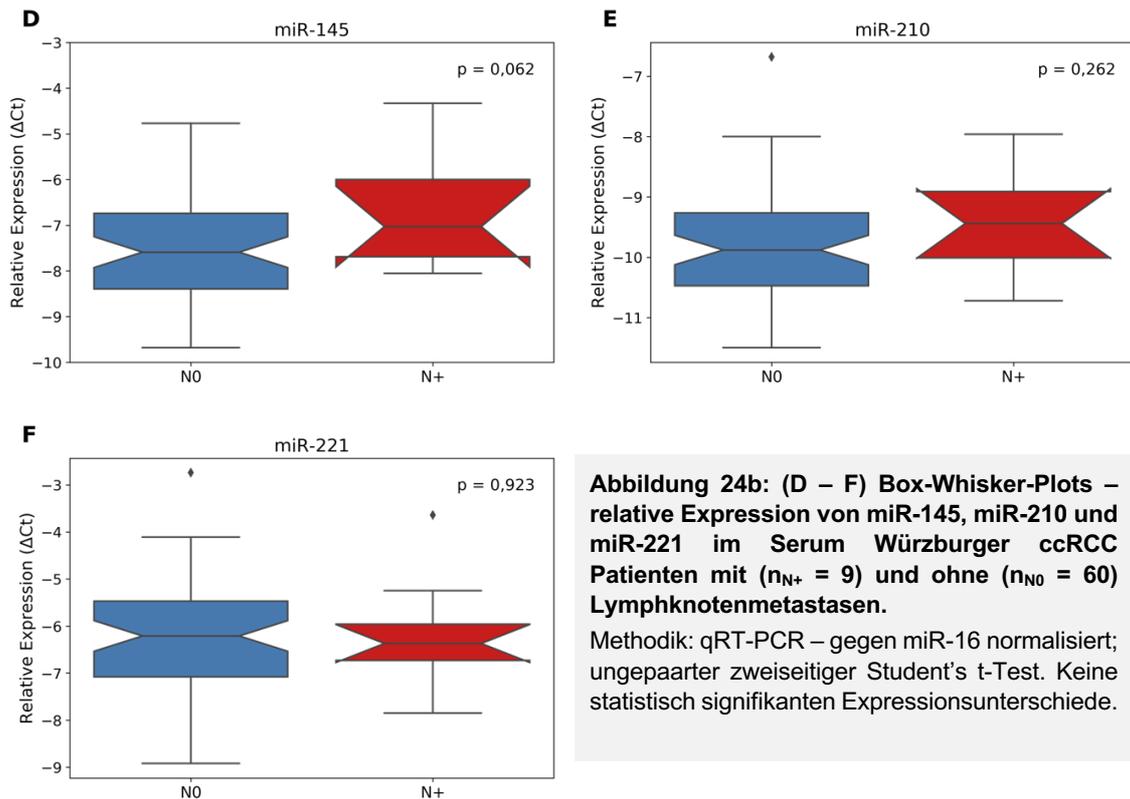


Abbildung 24b: (D – F) Box-Whisker-Plots – relative Expression von miR-145, miR-210 und miR-221 im Serum Würzburger ccRCC Patienten mit ($n_{N+} = 9$) und ohne ($n_{N0} = 60$) Lymphknotenmetastasen.
Methodik: qRT-PCR – gegen miR-16 normalisiert; ungepaarter zweiseitiger Student's t-Test. Keine statistisch signifikanten Expressionsunterschiede.

3.2.5.3 Graduierung nach Fuhrman

Innerhalb der ccRCC-Gruppe wurden zwei Patienten dem Grading 1 nach Fuhrman zugeordnet (2,9 %), 48 Patienten dem Grading 2 (69,6 %), 18 Patienten dem Grading 3 (26,1 %) und ein Patient dem Grading 4 (1,4 %) (Abbildung 25a). Aufgrund einer sehr geringen G1- und G4-Probenanzahl, wurden diese nicht in die statistischen Auswertungen einbezogen.

Auswertungen mit Hilfe des ungepaarten zweiseitigen Student's t-Tests zeigten für miR-21 ($p = 0,60$), -145 ($p = 0,50$) sowie -221 ($p = 0,58$) keine signifikanten relativen Expressionsunterschiede zwischen der G2- und G3-Subgruppe. Ebenso konnte für miR-126 ($p = 0,20$) kein signifikantes Ergebnis mittels Mann-Whitney-U-Test ermittelt werden. Mit einem p-Wert von 0,035 war miR-210 in Proben der G3-Subgruppe gegenüber der G2-Subgruppe statistisch signifikant überexprimiert (Mann-Whitney-U-Test) (Abbildung 25).

Graduierung nach Fuhrman

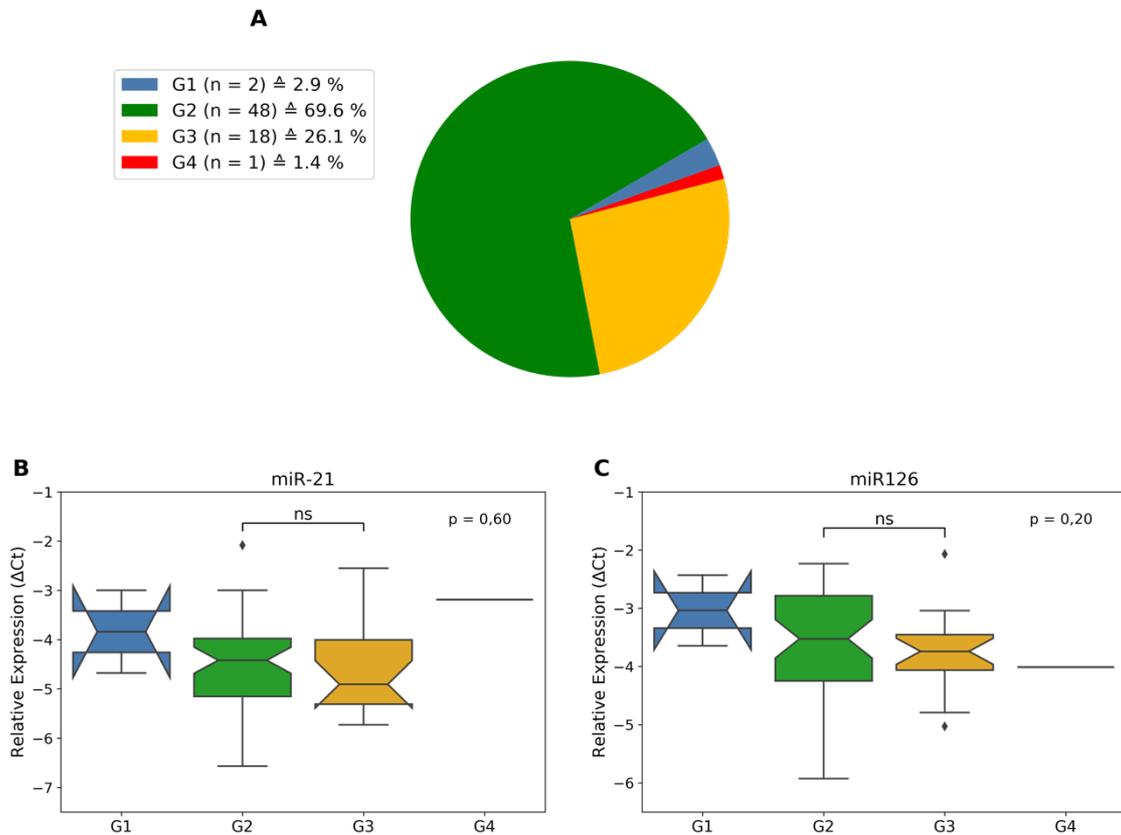


Abbildung 25a: (A) Kuchendiagramm – Fallzahlen Würzburger ccRCC Patienten, die dem Grading nach Fuhrman zugeordnet wurden ($n_{G1} = 2$, $n_{G2} = 48$, $n_{G3} = 18$, $n_{G4} = 1$); (B - C) Box-Whisker-Plots – relative Expression von miR-21 und -126 im Serum dieser Subgruppen.

Methodik: qRT-PCR – gegen miR-16 normalisiert; statistische Auswertung zwischen der G2- und G3-Subgruppe mittels ungepaarten zweiseitigen Student's t-Tests (miR-21)/ Mann-Whitney-U-Tests (miR-126). Keine statistisch signifikanten Expressionsunterschiede (ns).

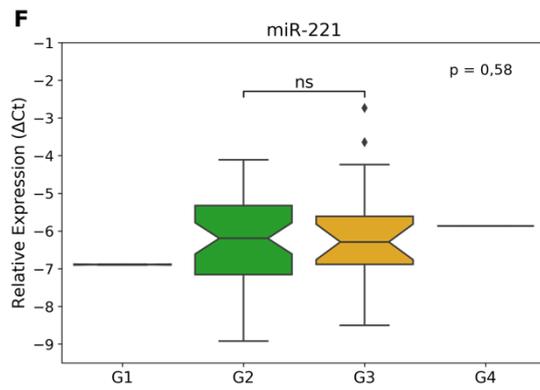
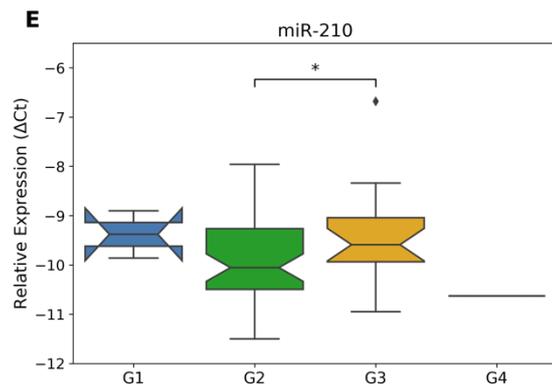
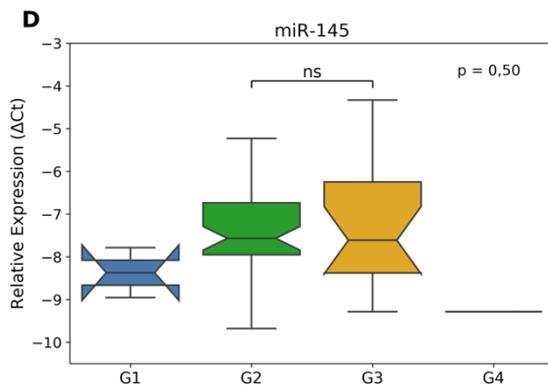


Abbildung 25b: (D - F): Box-Whisker-Plots – relative Expression von miR-145, -210 und -221 im Serum Würzburger ccRCC-Patienten, die dem Grading nach Fuhrman zugeordnet wurden ($n_{G1} = 2$, $n_{G2} = 48$, $n_{G3} = 18$, $n_{G4} = 1$).

Methodik: qRT-PCR – gegen miR-16 normalisiert, statistische Auswertung zwischen der G2- und G3-Subgruppe mittels ungepaarten zweiseitigen Student's t-Tests (miR-145, -221)/ Mann-Whitney-U-Test (miR-210). Für $p < 0,05$ mit (*) und für nicht signifikante Ergebnisse mit (ns) markiert.

3.2.5.4 Tumorbedingtes Versterben

Im Verlauf des Beobachtungszeitraums kam es bei 12 ccRCC-Patienten zum CRD (18,8 %), 52 Patienten erlitten keinen CRD (81,2 %) (Abbildung 26a).

Mit Hilfe des ungepaarten zweiseitigen Student's t-Tests konnten keine signifikanten relativen miRNA-Expressionsunterschiede zwischen der CRD-Patientengruppe und der Referenz ermittelt werden (Abbildung 26) – miR-21 ($p = 0,443$), miR-126 ($p = 0,543$), miR-145 ($p = 0,863$), miR-210 ($p = 0,634$), miR-221 ($p = 0,468$).

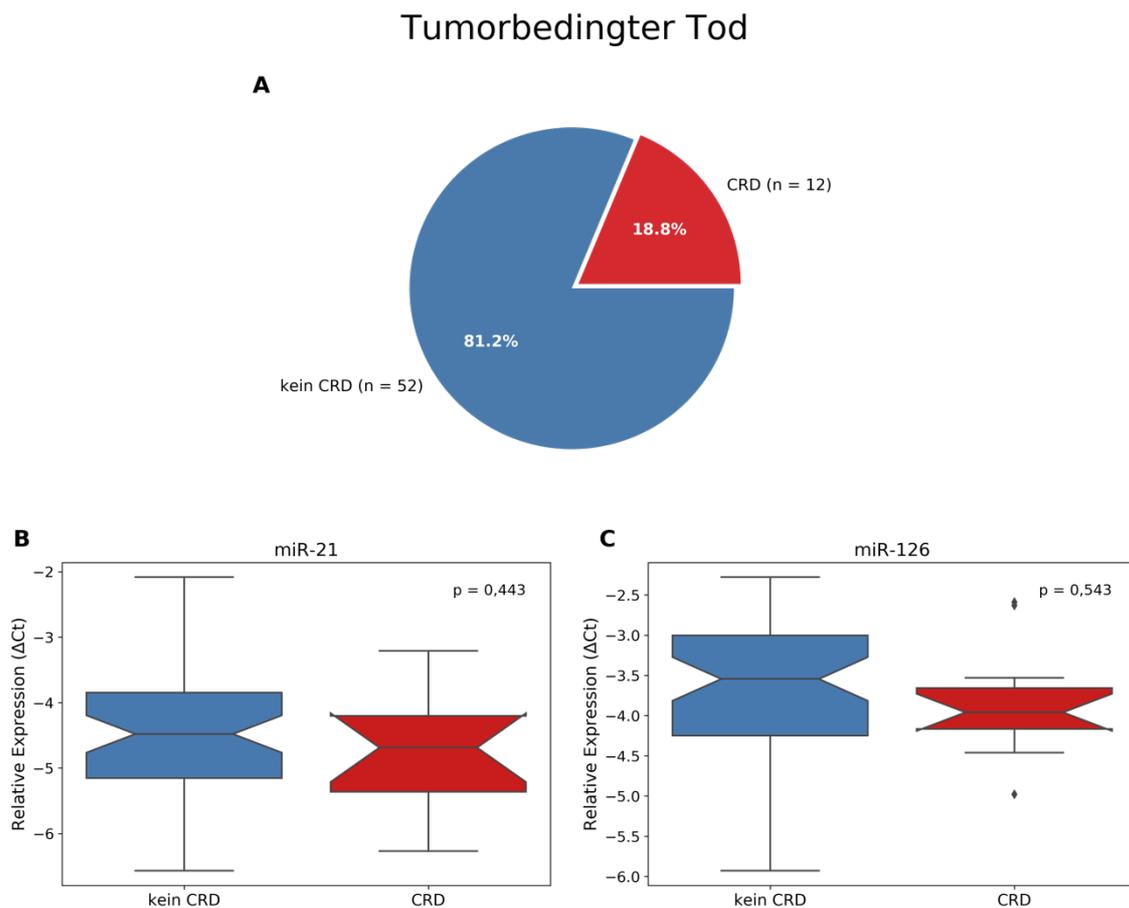


Abbildung 26a: (A) Kuchendiagramm – Fallzahlen Würzburger ccRCC Patienten, die im Verlauf des Follow-ups einen tumorbedingten Tod (CRD) erlitten ($n_{\text{CRD}} = 12$) und denjenigen, die nicht am Tumor verstarben ($n_{\text{kein CRD}} = 52$); (B - C) Box-Whisker-Plots – relative Expressionen von miR-21 und miR-126 im Serum dieser Gruppen.

Methodik: qRT-PCR – gegen miR-16 normalisiert; ungepaarter zweiseitiger Student's t-Test. Keine statistisch signifikanten Expressionsunterschiede.

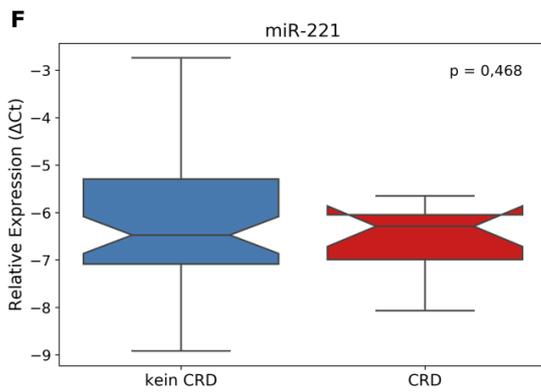
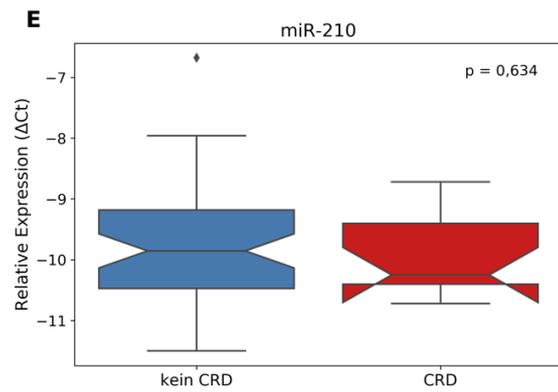
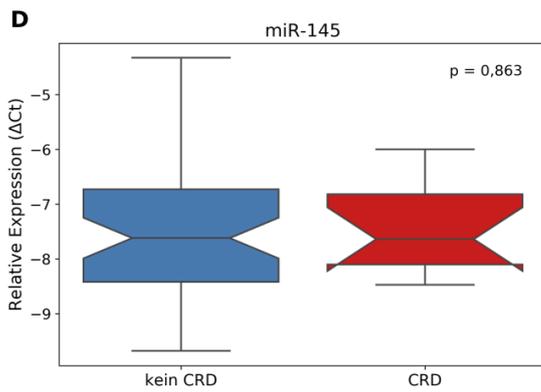


Abbildung 26b: (D - F) Box-Whisker-Plots – relative Expressionen von miR-145, miR-210 und miR-221 im Serum Würzburger ccRCC Probanden, die im Verlauf des Follow-ups einen tumorbedingten Tod (CRD) erlitten ($n_{CRD} = 12$) im Vergleich zu denjenigen, die nicht am Tumor verstarben ($n_{kein\ CRD} = 52$).

Methodik: qRT-PCR – gegen miR-16 normalisiert; ungepaarter zweiseitiger Student's t-Test. Keine statistisch signifikanten Expressionsunterschiede.

3.2.5.5 Gesamtüberleben

Im Verlauf des Follow-ups verstarben 20 ccRCC Patienten (31,2 %), 44 Studienteilnehmer überlebten (68,8 %) (Abbildung 27a).

Mit Hilfe des ungepaarten zweiseitigen Student's t-Test konnten für miR-21 ($p = 0,163$), -126 ($p = 0,627$), -145 ($p = 0,645$) sowie -210 ($p = 0,374$) keine signifikanten relativen miRNA-Expressionsunterschiede zwischen den beiden Subgruppen ermittelt werden. Der Welch-Test ergab für miR-221 ebenfalls kein statistisch signifikantes Ergebnis ($p = 0,392$) (Abbildung 27).

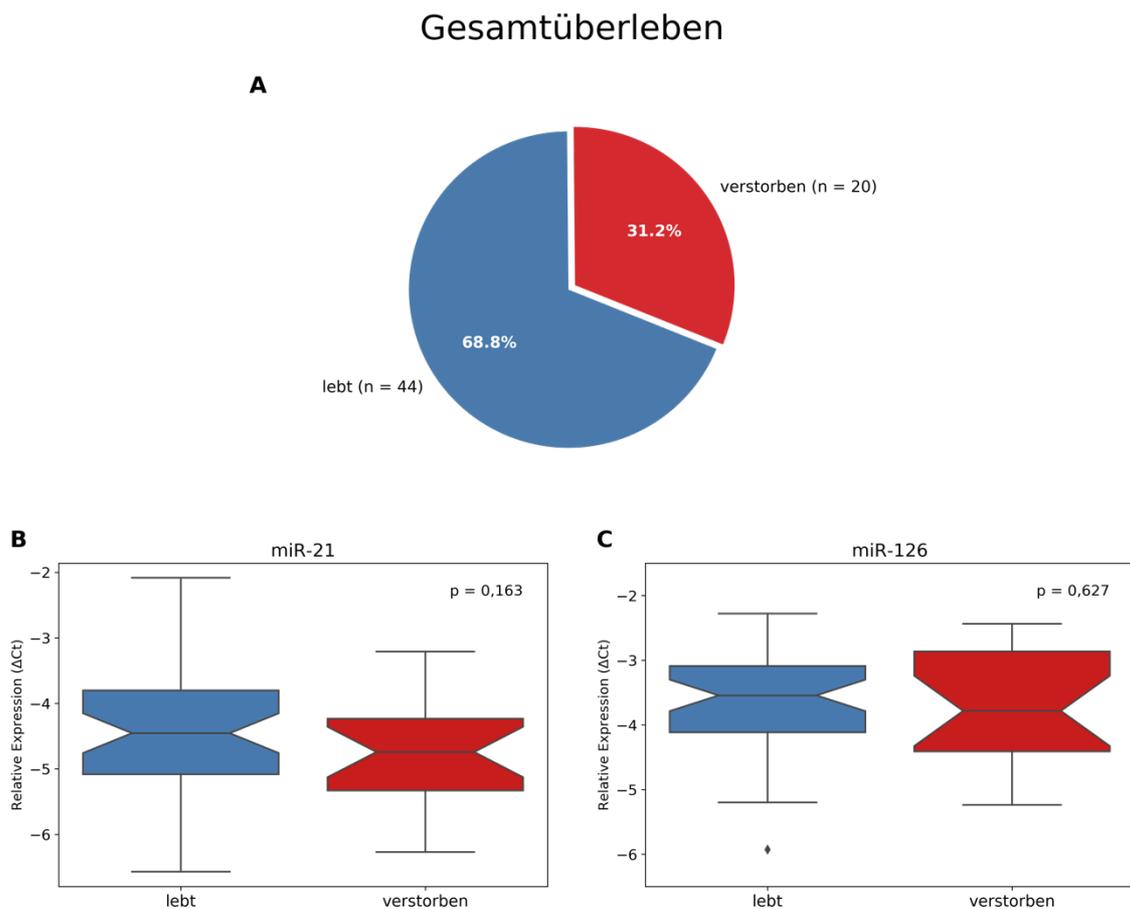


Abbildung 27a: (A) Kuchendiagramm – Fallzahlen Würzburger ccRCC-Patienten, die im Verlauf des Follow-ups verstarben ($n_{\text{verstorben}} = 20$) und denjenigen, die überlebten ($n_{\text{lebt}} = 44$); (B - C) Box-Whisker-Plots – relative Expressionen von miR-21, miR-126 im Serum dieser Subgruppen.

Methodik: qRT-PCR – gegen miR-16 normalisiert; ungepaarter zweiseitiger Student's t-Test. Keine statistisch signifikanten Expressionsunterschiede.

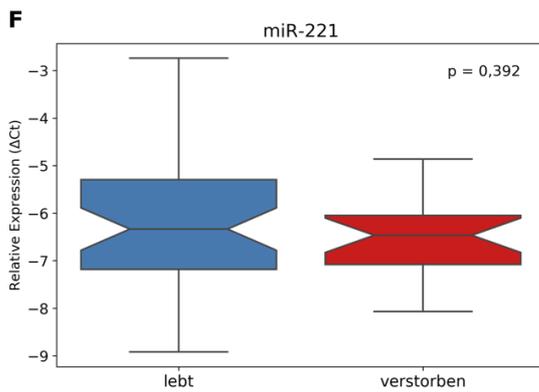
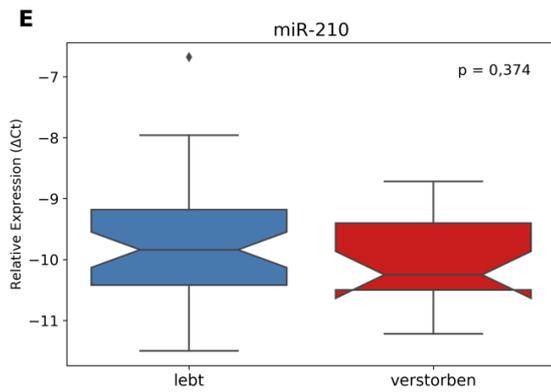
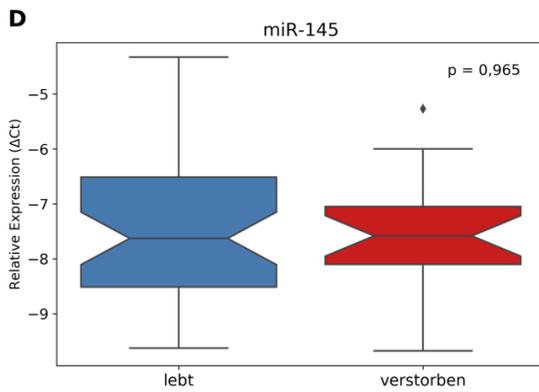


Abbildung 27b: (D - F) Box-Whisker-Plots – relative Expressionen von miR-145, miR-210 und miR-221 im Serum Würzburger ccRCC Probanden, die während des Follow-ups verstarben ($n_{\text{verstorben}} = 20$) und denjenigen, die am Leben blieben ($n_{\text{lebt}} = 44$).

Methodik: qRT-PCR – gegen miR-16 normalisiert; ungepaarter zweiseitiger Student's t-Test (miR-145, miR-210)/ Welch-Test (miR-221). Keine statistisch signifikanten Expressionsunterschiede.

3.2.5.6 Übersicht über die Zusammenhänge innerhalb der Würzburger ccRCC-Gruppe

Innerhalb der Würzburger ccRCC-Gruppe ließen sich in Serumproben lediglich für miR-145 und miR-210 Assoziationen in Bezug auf Follow-up Parameter ermitteln (Tabelle 9). So war miR-145 in der N+-Subgruppe gegenüber N0 hochreguliert ($p = 0,062$). MiR-210 zeigte sich in der G3-Subgruppe (Graduierung nach Fuhrman) gegenüber G2 überexprimiert ($p = 0,035$). Für alle anderen miRNAs konnten keine signifikanten Abweichungen gezeigt werden.

Tabelle 9: Übersicht über relevante Zusammenhänge zwischen relativen miRNA-Expressionen in Seren und Follow-up Parametern Würzburger ccRCC Patienten.

MiR-145 zeigte sich in der N+-Subgruppe gegenüber N0 hochreguliert. MiR-210 war in der G3-Subgruppe (Grading nach Fuhrman) gegenüber G2 überexprimiert.

Statistik: zweiseitiger Student's t-Test (miR-145)/ Mann-Whitney-U-Test (miR-210). Signifikante Ergebnisse wurden für $p < 0,05$ mit (*) gekennzeichnet. Nicht signifikante Ergebnisse wurde mit „ns“ beschriftet.

	N+ vs. N0	G3 vs. G2
miR-145	↑ ($p = 0,062$) ns	ns
miR-210	ns	↑*

3.2.5.7 Cox-Proportional-Hazards-Regression

Einfluss der Follow-up Parameter und miRNAs auf das tumorbedingte Versterben Würzburger ccRCC Patienten

Tabelle 10 bietet eine Übersicht über die Ergebnisse der univariaten Cox-Regression einzelner klinikopathologischer Faktoren sowie der miRNAs in Bezug auf das tumorbedingte Versterben des Würzburger ccRCC-Kollektivs ($n_{\text{ccRCC}} = 63$, $n_{\text{CRD}} = 12$).

Es lässt sich feststellen, dass im vorliegenden Datensatz, nur klinikopathologische Faktoren (N-Status, synchrone Metastasierung, Tumorgröße) in der univariaten Cox-Regressionsanalyse als relevante Einflussfaktoren in Bezug auf das tumorbedingte Versterben identifiziert werden konnten. Alle drei Variablen waren mit einem höheren CRD-Risiko assoziiert (N-Status: HR 9,87, $p = 1e-4$; synchrone Metastasierung: HR 19,43, $p = 2e-4$, Tumorgröße: HR 1,22, $p = 0,02$). Für keine miRNA konnte ein statistisch signifikanter Zusammenhang mit dem tumorbedingten Versterben hergestellt werden.

Tabelle 10: Ergebnisse der univariaten Cox-Regression für Würzburger ccRCC Patienten – klinikopathologische Faktoren und miRNAs in Bezug auf den tumorbedingten Tod (CRD).

Anzahl beobachteter Probanden: 63

Anzahl der Patienten, die einen CRD erlitten: 12

Signifikante Einflussfaktoren wurden **fett** markiert und für $p < 0,05$ mit (*) sowie für $p < 0,001$ mit (***) gekennzeichnet.

HR: Hazard Ratio; CI: Konfidenzintervall.

Parameter	HR (95 % CI)	P-Wert
miR-21	0,83 (0,45 – 1,50)	0,53
miR-126	0,77 (0,42 – 1,42)	0,40
miR-145	1,08 (0,66 – 1,77)	0,76
miR-210	0,89 (0,47 – 1,70)	0,73
miR-221	0,86 (0,54 – 1,37)	0,53
Alter	0,99 (0,93 – 1,05)	0,75
Tumorgroße	1,22 (1,03 – 1,43)	0,02*
Grading nach Fuhrman	2,03 (0,67 – 6,01)	0,21
N-Status	9,87 (3,07 – 31,7)	0,0001***
Synchrone Metastasierung	19,43 (4,13 – 91,4)	0,0002***

3.2.6 ccRCC/ TT: Zusammenhänge zwischen miRNA-Expressionen und Follow-up Parametern

Für 34 ccRCC/ TT Patienten standen Follow-up Daten zur Verfügung, für 33 war das Follow-up vollständig. Die Follow-up Daten wurden über einen Zeitraum von 15 Jahren an der Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie am Universitätsklinikum Würzburg akquiriert. Der Altersmedian lag bei 68 Jahren. Bei knapp der Hälfte aller ccRCC/ TT Patienten wurden synchrone Metastasen ($n_{M1} = 16, 47,1 \%$) diagnostiziert. Lymphknotenmetastasen wurden bei 23,5 % der Patienten ($n_{N+} = 8$) festgestellt. Der Tumorgrößenmedian lag bei 83 mm. Von 33 ccRCC/ TT Patienten erlitten 10 einen tumorbedingten Tod ($n_{CRD} = 10$). Eine detaillierte Übersicht über die Würzburger ccRCC/ TT Patienten kann Tabelle 11 entnommen werden.

Eine Übersicht über die ermittelten Assoziationen ist in *Subkapitel 3.2.6.5* zu finden. Hieran schließt sich in *Subkapitel 3.2.6.6* eine Cox-Regression an, um den Einfluss einzelner miRNAs und klinikopathologischer Faktoren auf das tumorbedingte Versterben der ccRCC/ TT Patienten zu untersuchen.

Tabelle 11: Übersicht über Follow-up Daten Würzburger ccRCC/ TT Patienten.

(n = 34, Daten akquiriert in einem Zeitraum von 15 Jahren)

Follow-up Zeit (Median; n = 33)	29 (0 – 165) Monate
Patientenalter (Median)	68 (47 – 87) Jahre
Geschlecht männlich	34 (100 %)
Tumorstadium pT3a pT3b pT4	5 (14,7 %) 28 (82,4 %) 1 (2,9 %)
Venöse Gefäßinfiltration intrarenal Nierenvene Vena cava	6 (17,6 %) 14 (41,2 %) 14 (41,2 %)
Grading nach Fuhrman 2 3 4	19 (55,9 %) 14 (41,2 %) 1 (2,9%)
Lymphknotenstatus N0 N+	26 (76,5 %) 8 (23,5 %)
Synchrone Metastasierung M0 M1	18 (52,9 %) 16 (47,1 %)
Tumorgroße (Median)	83 (34 – 150) mm
Gesamtüberleben (n = 33) ja nein	21 (63,6%) 12 (36,4 %)
Tumorbedingter Tod (n = 33) ja nein	10 (30,3 %) 23 (69,7 %)

3.2.6.1 Synchrone Metastasierung

Synchrone Metastasen wurden bei 16 ccRCC/ TT Patienten diagnostiziert (47,1 %), 18 Probanden waren frei von Metastasen (52,9 %) (Abbildung 28a).

Im ungepaarten zweiseitigen Student's t-Test konnten keine signifikanten relativen Expressionsunterschiede für miR-21 ($p = 0,224$), -126 ($p = 0,739$), miR-145 ($p = 0,887$), miR-210 ($p = 0,450$) und miR-221 ($p = 0,762$) zwischen der M1- und M0-Subgruppe ermittelt werden (Abbildung 28).

Synchrone Metastasierung - ccRCC/ TT

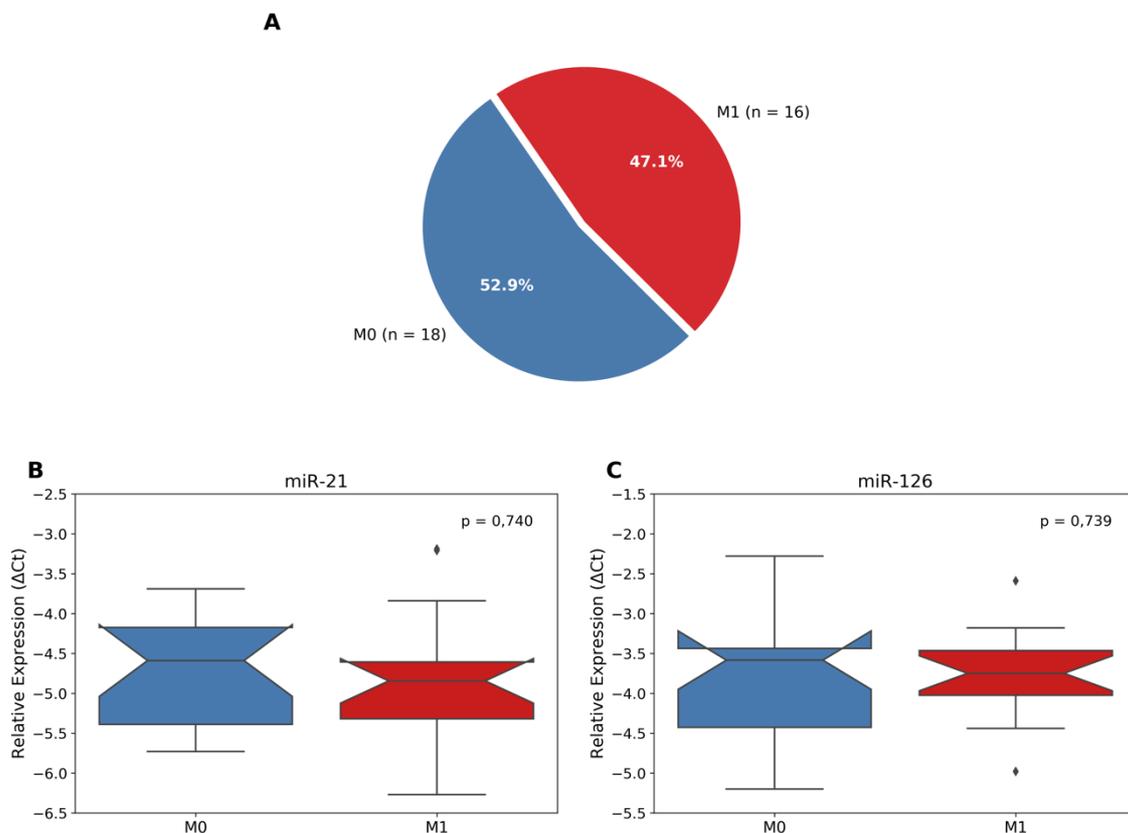


Abbildung 28a: (A) Kuchendiagramm – Fallzahlen Würzburger ccRCC/ TT Patienten mit ($n_{M1} = 16$) und ohne ($n_{M0} = 18$) synchrone Metastasierung; (B - C) Box-Whisker-Plots – relative Expressionen von miR-21 und -126 in Seren dieser Subgruppen.

Methodik: qRT-PCR – gegen miR-16 normalisiert; ungepaarter zweiseitiger Student's t-Test. Keine statistisch signifikanten Expressionsunterschiede.

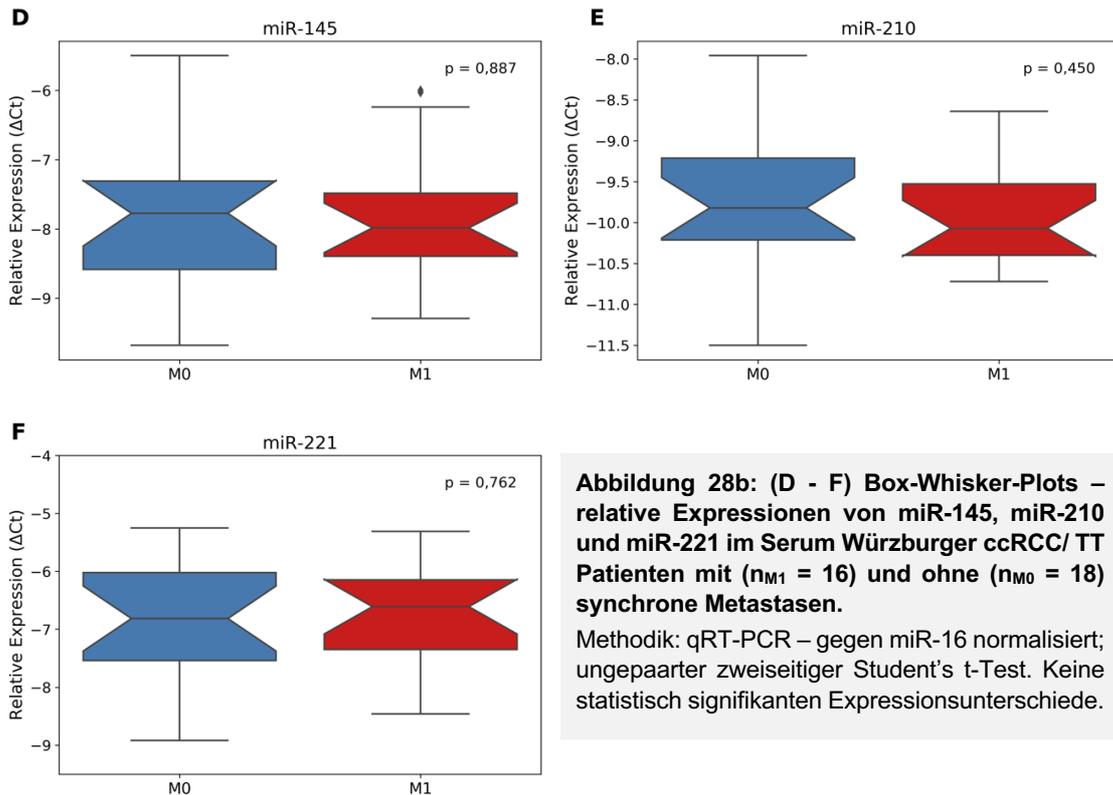


Abbildung 28b: (D - F) Box-Whisker-Plots – relative Expressionen von miR-145, miR-210 und miR-221 im Serum Würzburger ccRCC/ TT Patienten mit ($n_{M1} = 16$) und ohne ($n_{M0} = 18$) synchrone Metastasen.
Methodik: qRT-PCR – gegen miR-16 normalisiert; ungepaarter zweiseitiger Student's t-Test. Keine statistisch signifikanten Expressionsunterschiede.

3.2.6.2 Lymphknotenstatus

Bei acht ccRCC/ TT Patienten wurden Lymphknotenmetastasen diagnostiziert (23,5 %), 26 Probanden waren frei von Metastasen (76,5 %) (Abbildung 29a).

Mit Hilfe des ungepaarten zweiseitigen Student's t-Tests konnten für miR-21 ($p = 0,366$), miR-126 ($p = 0,648$) sowie miR-221 ($p = 0,415$) keine signifikanten relativen Expressionsunterschiede zwischen der N+- und N0-Subgruppe festgestellt werden. MiR-145 war mit einem p-Wert von 0,009 in der N+-Subgruppe statistisch signifikant überexprimiert. Für miR-210 konnte ein leichter Trend ermittelt werden – diese war in der N+-Subgruppe überexprimiert ($p = 0,096$) (Abbildung 29).

Lymphknotenstatus - ccRCC/ TT

A

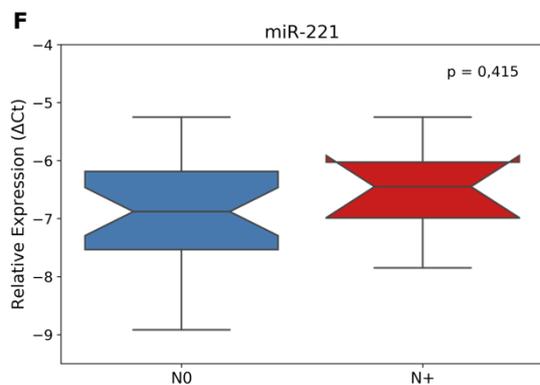
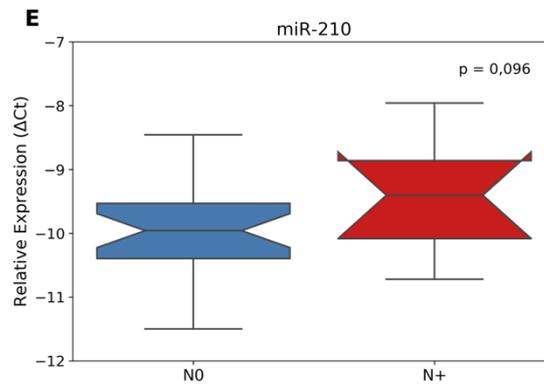
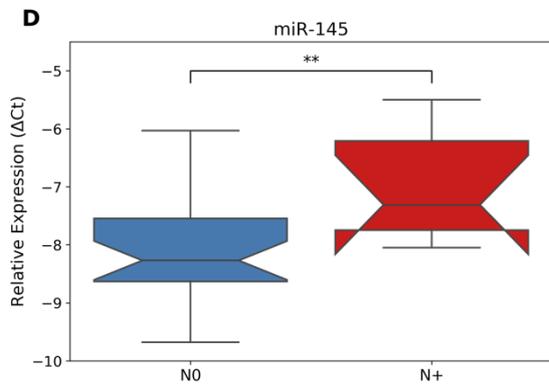
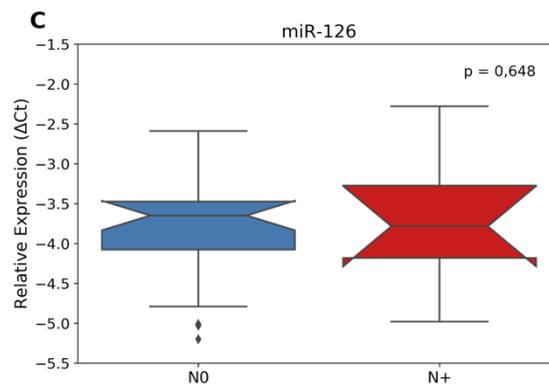
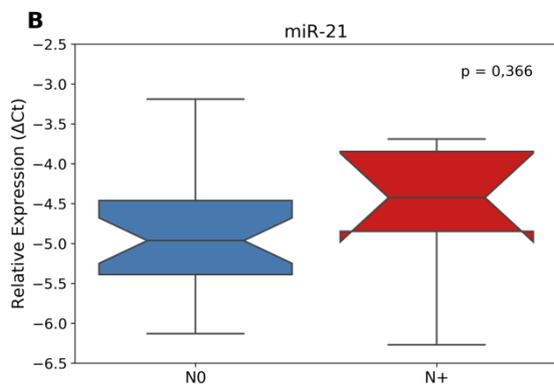
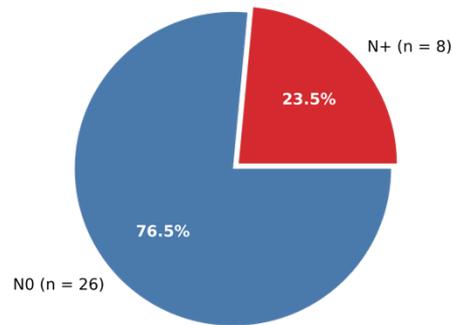


Abbildung 29: (A) Kuchendiagramm – Würzburger ccRCC/ TT Patienten mit ($n_{N+} = 8$) und ohne ($n_{N0} = 26$) Lymphknotenmetastasen; (B - F) Box-Whisker-Plots – relative Expressionen von miR-21, miR-126, miR-145, miR-210, miR-221 im Serum dieser Gruppen.

Methodik: qRT-PCR – gegen miR-16 normalisiert; ungepaarter zweiseitiger Student's t-Test. Für $p < 0,01$ mit (**) markiert.

3.2.6.3 Graduierung nach Fuhrman

Innerhalb der ccRCC/ TT Gruppe wurden 19 Patienten dem Grading 2 nach Fuhrman (54,6 %), 14 Patienten G3 (42,4 %) und ein Patient G4 (1,5 %) zugeordnet (Abbildung 30a). Aufgrund einer sehr geringen G4-Probenanzahl wurden diese nicht in die statistischen Auswertungen einbezogen.

Auswertungen mit Hilfe des ungepaarten zweiseitigen Student's t-Tests zeigten für miR-21 ($p = 0,59$), miR-126 ($p = 0,27$), miR-145 ($p = 0,72$), miR-210 ($p = 0,18$) sowie miR-221 ($p = 0,46$) keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen der G2- und G3-Subgruppe (Abbildung 30).

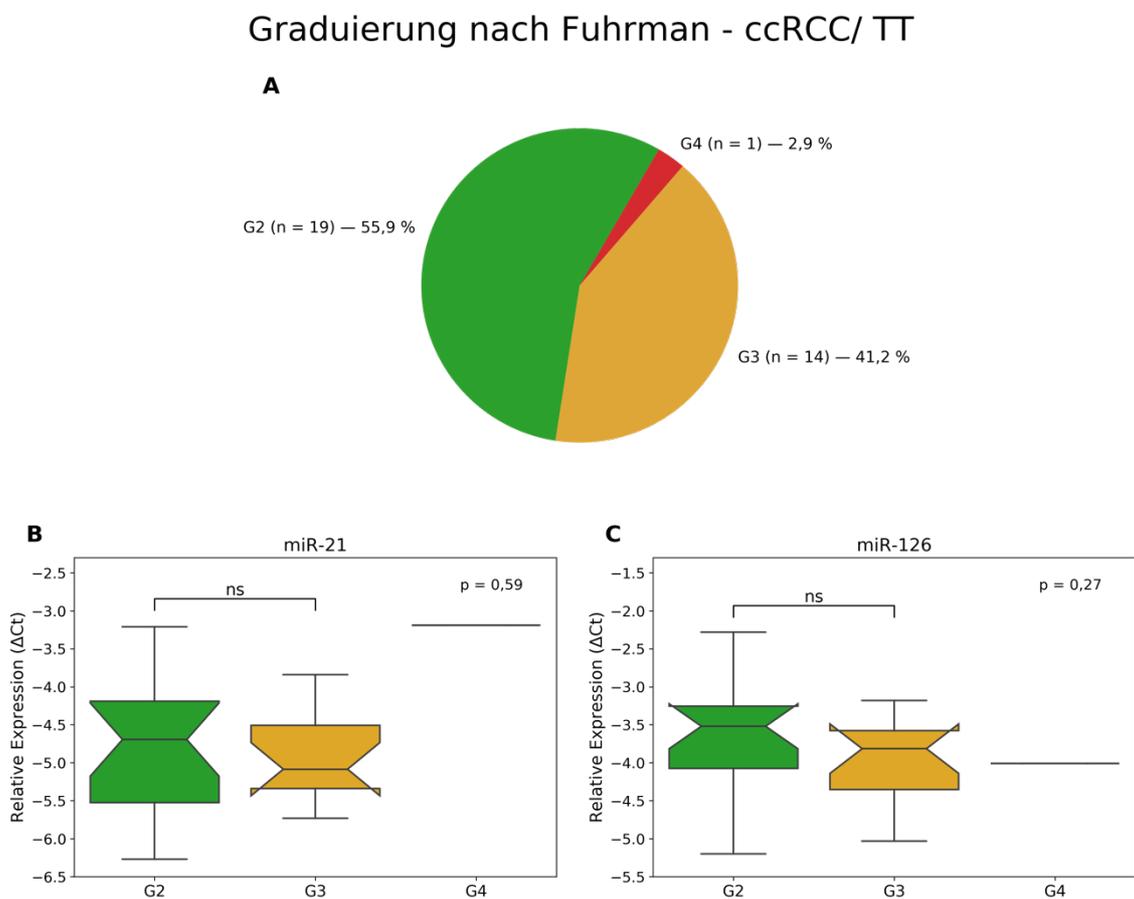


Abbildung 30a: (A) Kuchendiagramm – Fallzahlen Würzburger ccRCC/ TT Patienten, die dem Grading nach Fuhrman ($n_{G2} = 19$, $n_{G3} = 14$, $n_{G4} = 1$) zugeordnet wurden; (B - C) Box-Whisker-Plots – relative Expressionen von miR-21 und miR-126 im Serum dieser Subgruppen.

Methodik: qRT-PCR – gegen miR-16 normalisiert; ungepaarter zweiseitiger Student's t-Test. Keine statistisch signifikanten Expressionsunterschiede (ns). Aufgrund einer sehr geringen G4-Probenanzahl wurden diese nicht in die statistischen Auswertungen einbezogen.

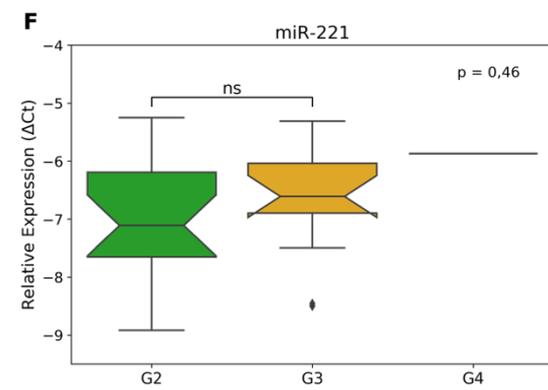
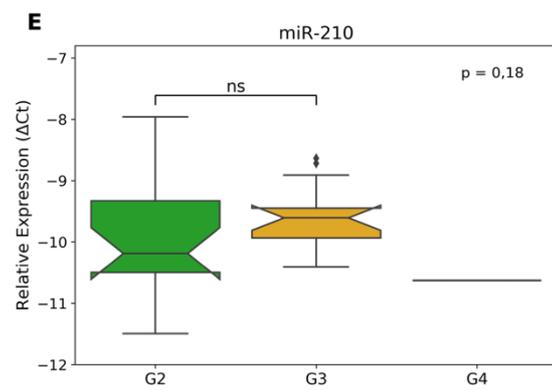
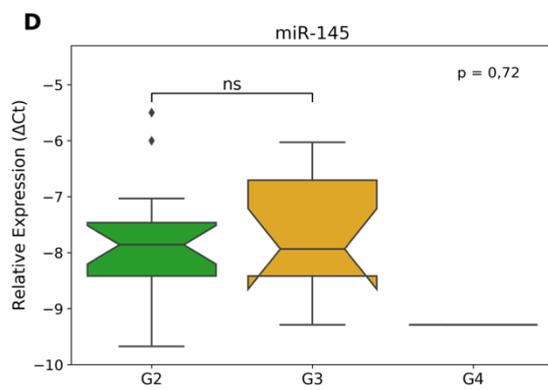


Abbildung 30b: (D - F): Box-Whisker-Plots – relative Expressionen von miR-145, miR-210 und miR-221 im Serum Würzburger ccRCC/ TT Patienten, die dem Grading nach Fuhrman zugeordnet wurden ($n_{G2} = 19$, $n_{G3} = 14$, $n_{G4} = 1$)

Methodik: qRT-PCR – gegen miR-16 normalisiert; ungepaarter zweiseitiger Student's t-Test. Keine signifikanten Expressionsunterschiede (ns).

Aufgrund einer sehr geringen G4-Probenanzahl wurden diese nicht in die statistischen Auswertungen einbezogen.

3.2.6.4 Tumorbedingtes Versterben

Im Verlauf des Follow-ups erlitten 10 ccRCC/ TT Patienten einen CRD (30,3 %), 23 Patienten erlitten keinen CRD (69,7 %) (Abbildung 31a).

Mit Hilfe des ungepaarten zweiseitigen Student's t-Tests konnten für miR-21 ($p = 0,550$), miR-126 ($p = 0,612$), miR-210 ($p = 0,949$) sowie miR-221 ($p = 0,711$) beziehungsweise mittels Mann-Whitney-U-Test für miR-145 ($p = 0,64$) keine signifikanten miRNA-Expressionsunterschiede identifiziert werden (Abbildung 31).

Tumorbedingter Tod - ccRCC/ TT

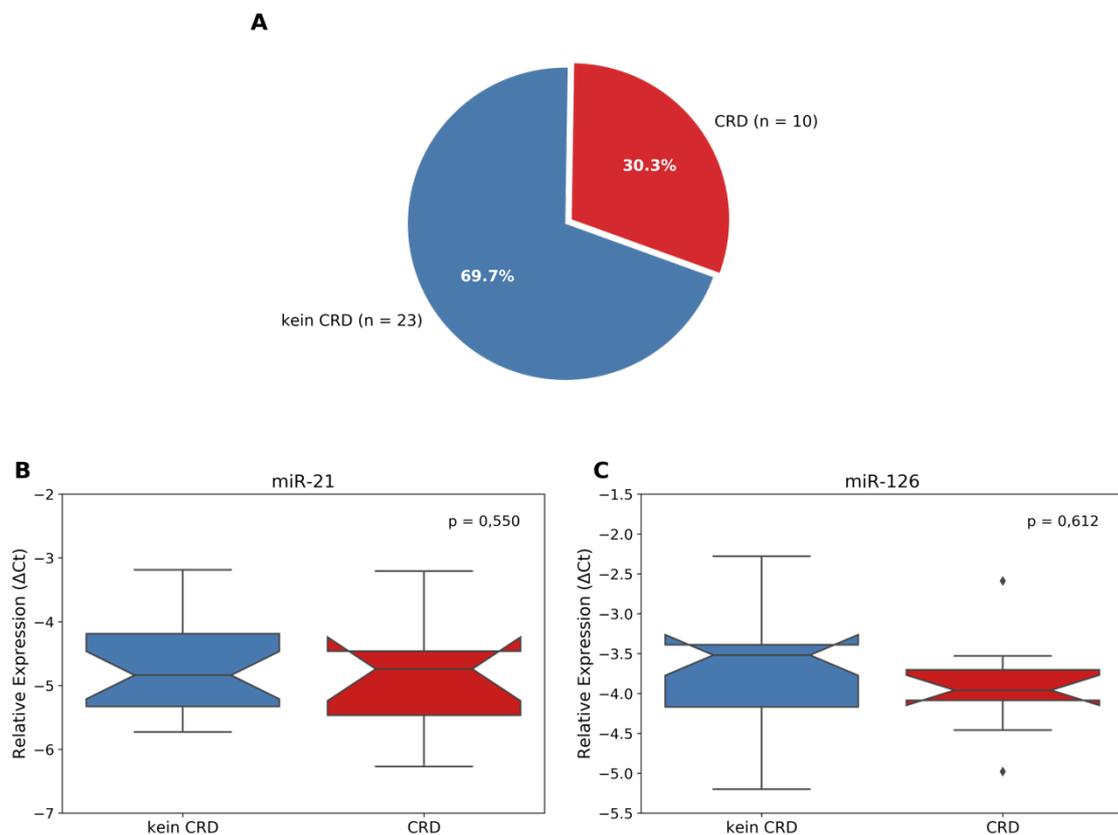


Abbildung 31a: (A) Kuchendiagramm – Fallzahlen von ccRCC/ TT Patienten, die im Verlauf des Follow-ups einen tumorbedingten Tod erlitten ($n_{\text{CRD}} = 10$) und denjenigen, die nicht am Tumor verstarben ($n_{\text{kein CRD}} = 23$); (B - C) Box-Whisker-Plots – relative Expressionen von miR-21 und miR-126 im Serum dieser Gruppen.

Methodik: qRT-PCR – gegen miR-16 normalisiert; ungepaarter zweiseitiger Student's t-Test. Keine statistisch signifikanten Expressionsunterschiede.

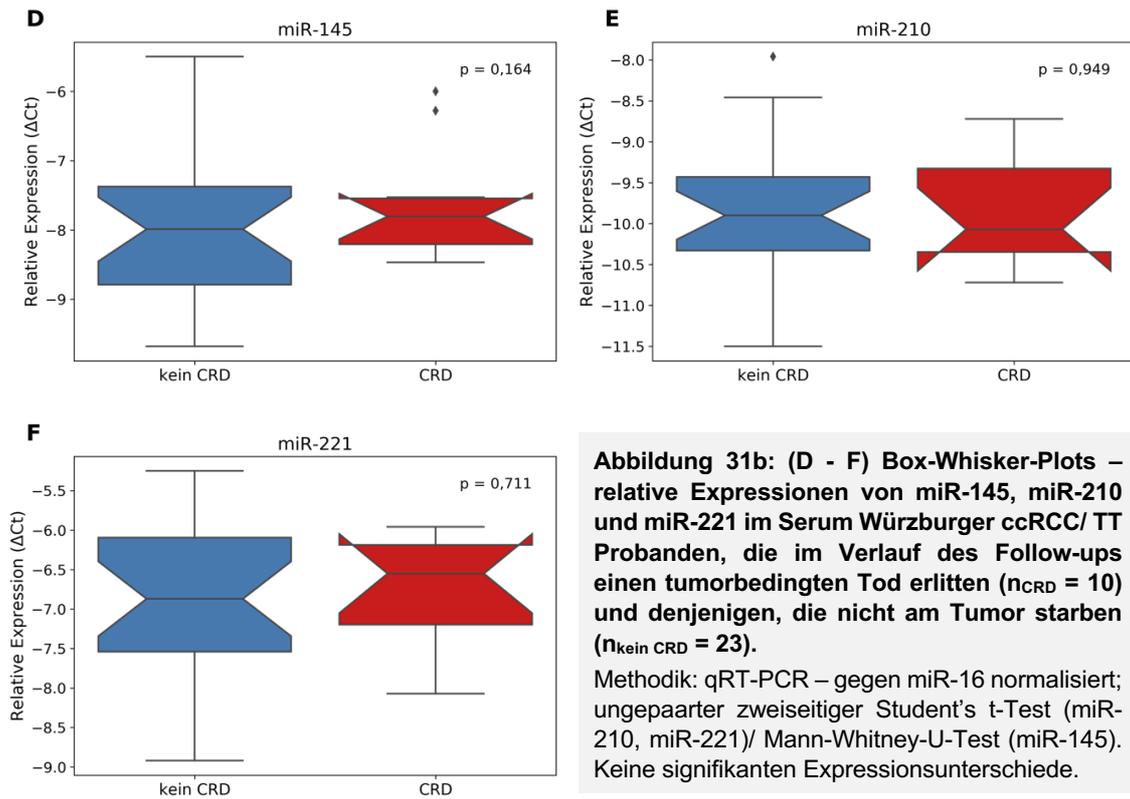


Abbildung 31b: (D - F) Box-Whisker-Plots – relative Expressionen von miR-145, miR-210 und miR-221 im Serum Würzburger ccRCC/ TT Probanden, die im Verlauf des Follow-ups einen tumorbedingten Tod erlitten ($n_{\text{CRD}} = 10$) und denjenigen, die nicht am Tumor starben ($n_{\text{kein CRD}} = 23$).

Methodik: qRT-PCR – gegen miR-16 normalisiert; ungepaarter zweiseitiger Student's t-Test (miR-210, miR-221)/ Mann-Whitney-U-Test (miR-145). Keine signifikanten Expressionsunterschiede.

3.2.6.5 Übersicht über Assoziationen innerhalb der Würzburger ccRCC/ TT Gruppe

In Zusammenschau ließen sich in Serumproben der Würzburger ccRCC/ TT Gruppe lediglich für miR-145 und miR-210 Zusammenhänge in Bezug auf die Follow-up Parameter ermitteln (Tabelle 12). MiR-145 war mit einem p-Wert von 0,009 in der N+-Subgruppe statistisch signifikant gegenüber der Referenz überexprimiert. Für miR-210 konnte ein leichter Trend ermittelt werden – diese war in der N+-Subgruppe hochreguliert (p = 0,096). Für alle anderen miRNAs konnten keine signifikanten Abweichungen identifiziert werden.

Tabelle 12: Übersicht über relevante Assoziationen zwischen relativen miRNA-Expressionen in Seren und Follow-up Parametern Würzburger ccRCC/ TT Patienten.

MiR-145 zeigte sich in der N+-Subgruppe gegenüber N0 hochreguliert. Für MiR-210 konnte in der N+-Subgruppe ein leichter Trend identifiziert werden, sie war gegenüber der Referenz überexprimiert.

Statistik: ungepaarter zweiseitiger Student's t-Test. Signifikante Ergebnisse wurden für $p < 0,01$ mit (**) gekennzeichnet.

	N+ vs. N0
miR-145	↑**
miR-210	↑ (p = 0,096)

3.2.6.6 Cox-Proportional-Hazards-Regression

Einfluss der Follow-up Parameter und miRNAs auf das tumorbedingte Versterben Würzburger ccRCC/ TT Patienten

Tabelle 13 bietet eine Übersicht über die Ergebnisse der univariaten Cox-Regression einzelner klinikopathologischer Faktoren sowie der miRNAs in Bezug auf das tumorbedingte Versterben Würzburger ccRCC/ TT Patienten. Es lässt sich feststellen, dass im vorliegenden Datensatz nur klinikopathologische Faktoren (N-Status, synchrone Metastasierung) als relevante Faktoren in Bezug auf den CRD identifiziert werden konnten. Beide Variablen waren mit einer höheren CRD-Wahrscheinlichkeit assoziiert (N-Status: HR 5,84, p = 0,006; synchrone Metastasierung: HR 6,21, p = 0,02). Für keine einzelne miRNA konnte ein statistisch relevanter Einfluss auf das tumorbedingte Versterben gezeigt werden.

Tabelle 13: Ergebnisse der univariaten Cox-Regression für Würzburger ccRCC/ TT Patienten – klinikopathologische Faktoren und miRNAs in Bezug auf den tumorbedingten Tod.

Anzahl beobachteter Probanden: 33

Anzahl der Patienten, die einen CRD erlitten: 10

Signifikante Ergebnisse wurden **fett** markiert und für $p < 0,01$ mit (**) sowie für $p < 0,05$ mit (*) gekennzeichnet.

HR: Hazard Ratio; CI: Konfidenzintervall

Parameter	HR (95 % CI)	P-Wert
miR-21	0,93 (0,40 – 2,17)	0,87
miR-126	0,74 (0,32 – 1,72)	0,49
miR-145	1,28 (0,72 – 2,26)	0,40
miR-210	0,97 (0,45 – 2,09)	0,94
miR-221	1,11 (0,61 – 2,03)	0,73
Alter	0,98 (0,91 – 1,05)	0,58
Tumorgröße	1,08 (0,88 – 1,32)	0,47
Grading nach Fuhrman	1,12 (0,32 – 3,93)	0,86
N-Status	5,84 (1,65 – 20,59)	0,006**
Synchrone Metastasierung	6,21 (1,29 – 29,97)	0,02*

3.3 Proliferation der RCC-Zelllinien nach Transfektion

Um die Auswirkung einer Überexpression von miR-21, miR-126, oder miR-221 auf die Proliferation der Nierenzellkarzinom-Zelllinien 768-O und ACHN zu untersuchen, wurden MTT-Tests durchgeführt (*Subkapitel 2.2 und 2.5.3*).

Für die nachfolgenden Abbildungen und statistische Untersuchungen verwendete Mittelwerte und Standardabweichungen wurden nach Durchführung von drei voneinander unabhängigen MTT-Tests mit vergleichbaren Ergebnissen ermittelt. Hierbei wurden jeweils zu jedem Zeitpunkt Triplettwerte für die Auswertung herangezogen. Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte relativ zu Kontrolltransfektionen (Pre-miRTM negative control) (*Subkapitel 2.5.3.2*).

3.3.1 768-O Zelllinie

Wie Abbildung 32 entnommen werden kann, führte die Überexpression mit miR-21 an Tag 2 p. T. zu einer Reduktion der Proliferation auf 85 % im Vergleich zur Kontrolle ($p = 0,050$). An den Beobachtungstagen 4 ($p = 0,092$) und 5 ($p = 0,098$) blieb die Reduktion der Proliferation bestehen, diese fiel allerdings nicht statistisch signifikant aus. Die Überexpression mit miR-126 (Tag 2 p. T.: $p = 0,148$, Tag 4 p. T.: $p = 0,636$, Tag 5 p. T.: $p = 0,715$) oder miR-221 (Tag 2 p. T.: $p = 0,743$, Tag 4 p. T.: $p = 0,718$, Tag 5 p. T.: $p = 0,178$) führte zu keiner signifikanten Veränderung der Zellproliferation. Die statistischen Auswertungen erfolgten mit Hilfe eines ungepaarten zweiseitigen Student's t-Tests.

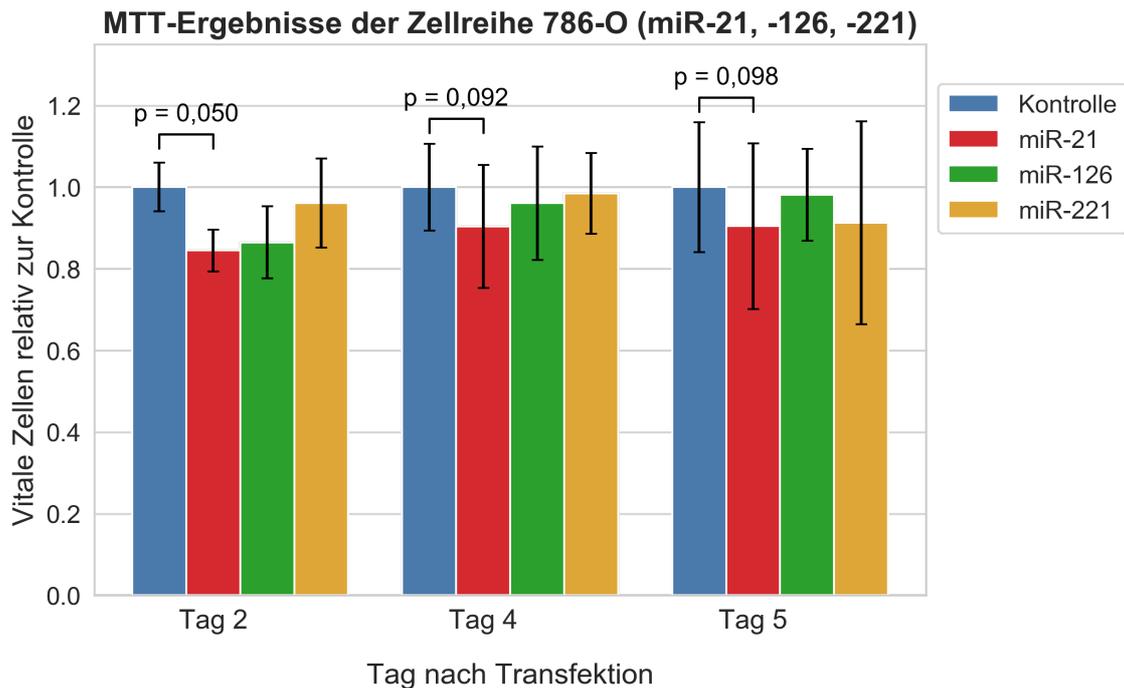


Abbildung 32: Säulendiagramm zur Darstellung von Ergebnissen der MTT-Tests als Anteil vitaler 786-O-Zellen nach Transfektion mit mirVana™ miR-21, miR-126 oder miR-221 im Vergleich zu Kontrolltransfektionen mit Pre-miR™ negative control (Kontrolle \triangleq 1).

Bestimmungen zellulärer Proliferationen erfolgten zu den Zeitpunkten 2, 4, und 5 Tage nach Transfektion (p. T.).

miR-21: An Tag 2 p. T. zeigte sich eine Reduktion der Proliferation auf 85 % ($p = 0,050$). Eine nicht signifikante Reduktion der Proliferation blieb ebenso an Tag 4 ($p = 0,092$) und 5 ($p = 0,098$) p. T. erhalten.

miR-126/ miR-221: keine signifikanten Proliferationsänderungen.

Statistik: ungepaarter zweiseitiger Student's t-Test.

3.3.2 ACHN Zelllinie

Die Überexpression von miR-126 führte an Tag 4 p. T. zu einer statistisch signifikanten Reduktion des Anteils vitaler ACHN-Zellen auf 92 % ($p = 0,025$) des Referenzwertes. An den Tagen 2 ($p = 0,1826$) und 5 ($p = 0,83$) p. T. zeichneten sich keine signifikanten Proliferationsunterschiede ab (Abbildung 33).

Wie Abbildung 33 entnommen werden kann, resultierte die Transfektion mit miR-221 an Tag 4 p. T. in einer (nicht-signifikanten) Induktion des Zellwachstums um 13 % im Vergleich zur Kontrolle ($p = 0,063$). An den Tagen 2 ($p = 0,791$) und 5 ($p = 0,589$) p. T. konnten jedoch keine signifikanten Proliferationsunterschiede festgestellt werden.

Die Überexpression von miR-21 (Tag 2 p. T.: $p = 0,836$, Tag 4 p. T.: $p = 0,530$, Tag 5 p. T.: $p = 0,341$) führte zu keiner signifikanten Änderung des Zellwachstums (Abbildung 33). Die statistischen Auswertungen erfolgten mit Hilfe des ungepaarten zweiseitigen Student's t-Tests beziehungsweise des Mann-Whitney-U-Tests (Tag 2 p. T. für miR-126).

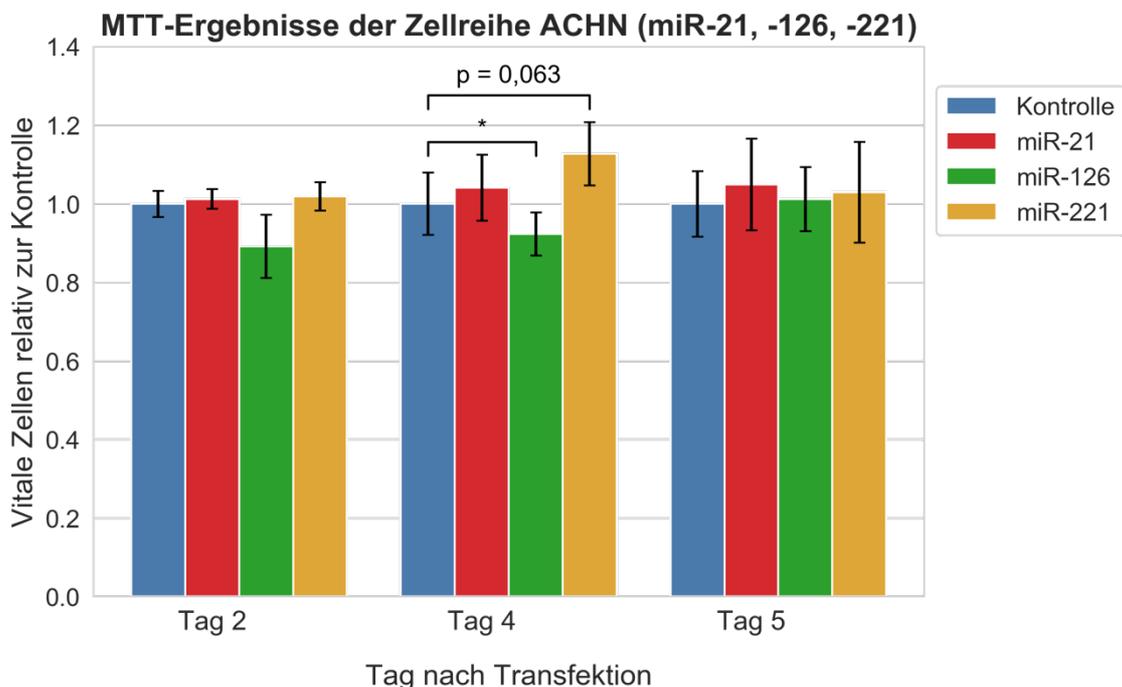


Abbildung 33: Säulendiagramm zur Darstellung von Ergebnissen der MTT-Tests als Anteil vitaler ACHN-Zellen nach Transfektion mit mirVana™ miR-21, miR-126 oder miR-221 im Vergleich zu Kontrolltransfektionen mit Pre-miR™ negative control (Kontrolle \triangleq 1).

Bestimmungen zellulärer Proliferationen erfolgten zu den Zeitpunkten 2, 4, und 5 Tage nach Transfektion (p. T.).

miR-21: Keine signifikanten Proliferationsänderungen.

miR-126: An Tag 4 p.T. kam es zu einer statistisch signifikanten Reduktion der Proliferation auf 92 % im Vergleich zur Referenz ($p = 0,025$). Zu den restlichen Zeitpunkten konnte keine signifikante Proliferationsänderung festgestellt werden.

miR-221: An Tag 4 p. T. kam es zu einer Induktion der Zellproliferation. Der relative Anteil vitaler Zellen lag 13 % über der Referenz ($p = 0,063$).

Statistik: ungepaarter zweiseitiger Student's t-Test/ Mann-Whitney-U-Test (miR-126: Tag 2 p.T.). Signifikante Ergebnisse wurden für $p < 0,05$ mit (*) gekennzeichnet.

4. Diskussion

Das Diskussionskapitel unterteilt sich in vier Abschnitte. Der erste Teil widmet sich den Ergebnissen aus den Untersuchungen der Tumorgewebe des Regensburger ccRCC/ TT Kollektivs. Das Augenmerk liegt auf dem zu validierenden Überlebensklassifikationsmodell sowie ausgewählten neu untersuchten miRNAs. Der zweite Abschnitt konzentriert sich auf die Serum-miRNA-Untersuchungen des Würzburger Kollektivs. Der dritte Teil stellt ein Gesamtbild her, in das sowohl miRNA-Expressionsergebnisse aus dem Tumorgewebe und dem Serum einbezogen werden als auch Erkenntnisse aus den neuesten wissenschaftlichen Publikationen. Im vierten und letzten Abschnitt folgt die Diskussion der Stärken und Limitationen der Arbeit sowie der klinische und wissenschaftliche Weit- und Ausblick.

4.1 Regensburger ccRCC/ TT Kollektiv – Tumorgewebe

Obwohl das klarzellige Nierenzellkarzinom mit 70-80 % den größten Anteil unter den Nierenzellkarzinomen einnimmt, entwickeln nur wenige Patienten einen in die inferiore V. cava einwachsenden Tumorthrombus [23-25, 36, 247]. Diese Tatsache könnte mit dafür verantwortlich sein, dass für diese speziellen Nierenkrebsfälle die diagnostischen und prognostischen Biomarker noch unzureichend erforscht wurden und sich bislang keine wirkungsvolle adjuvante Therapie etablieren konnte. Die 5-Jahres-Überlebensrate nach erfolgreicher operativer Behandlung liegt heute zwischen 46 und 65 %, im Falle einer zusätzlichen Metastasierung sinkt diese allerdings auf unter 20 % [40, 41, 43, 46]. Aus der 2014 durch Vergo et al. publizierten Arbeit geht hervor, dass nicht alle ccRCC-Patienten mit einem Tumorthrombus gleichermaßen vom aktuellen Therapiestandard profitieren. Die Ergebnisse legen nahe, dass es möglich ist, ein ccRCC/ TT Kollektiv mit Hilfe von Biomarkern weiter zu unterteilen und so eine Gruppe von Patienten mit einem sehr schlechten Verlauf zu identifizieren [1].

Der Arbeitsgruppe ist es gelungen mit Hilfe eines Überlebensklassifikationsmodells basierend auf dem CRS aus miR-21, miR-126 und miR-221, retrospektiv 37 ccRCC/ TT Patienten in eine prognostisch eher günstig (Low-Risk) und eine sehr ungünstig verlaufende Gruppe (High-Risk) zu untergliedern. Durch ihren retrospektiven Charakter, eine geringe Fallzahl sowie eine Beschränkung auf Würzburger Patienten war diese Studie hinsichtlich ihrer Aussagekraft limitiert [1].

Zahlreiche Arbeitsgruppen haben in den letzten Jahren wiederholt demonstriert, dass es mit Hilfe von miRNA-Expressionsbestimmungen aus Gewebeproben möglich ist, reproduzierbare Messergebnisse zu ermitteln und so präzise zwischen tumorfreiem und entartetem Gewebe zu unterscheiden [53, 122]. Darüber hinaus zeichnen sich miRNAs durch ihre Stabilität in diversen Körpermaterialien (Tumorgewebe, Blut, Urin) sowie gegenüber Umwelteinflüssen aus [130, 132, 135, 136]. Ihre tumorstadienspezifische Expression und ihre bereits mehrfach beschriebene Rolle bei der Angiogenese, der EMT und Metastasierung erklären, warum ihre Erforschung als potenzielle diagnostische und prognostische Biomarker sowie ihr Einsatz zu Therapiezielen in den letzten Jahrzehnten in den Fokus der Wissenschaft rückte [127-129, 248].

Basierend auf den Ergebnissen von Vergo et al. aus dem Jahr 2014 [1] wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Fallzahl der ccRCC/ TT Tumorproben (n = 56) mit Hilfe eines unabhängigen Kollektivs aus dem Regensburger Caritas-Krankenhaus St. Josef (Klinik für Urologie) erweitert. Zusätzlich zu den aus der Vorarbeit bekannten miRNAs (miR-21, miR-126, miR-200c, miR-210, miR-221) wurde die Auswahl um miR-145, miR-205 sowie miR-513 ergänzt.

Die akquirierten Daten wurden dazu genutzt, um zu untersuchen, ob das vorbeschriebene Überlebensklassifikationsmodell sich an einem unabhängigen Kollektiv validieren lässt und die prognostische Untergliederung des Regensburger ccRCC/ TT Kollektivs in eine Low-Risk- und High-Risk-Gruppe ermöglicht. Durch Ausweitung der Untersuchungen auf weitere miRNAs im Tumorgewebe und Serum war es ferner möglich neue Erkenntnisse über miRNA-Funktionen im ccRCC zu gewinnen.

4.1.1 Validierung des Überlebensklassifikationsmodells

Erfreulicherweise gelang es, die Ergebnisse von Vergo et al. [1] unter Anwendung des identischen CRS (miR-21, miR-126, miR-221) mit der dazugehörigen Formel ($4,592 \times \Delta\text{Ct miR-21} + (-3,892 \times \Delta\text{Ct miR-126}) + (-1,938 \times \Delta\text{Ct miR-221})$) sowie desselben Schwellenwerts von 18,7 ΔCt zu validieren und das aus 54 Patienten (vollständiges Follow-up) bestehende unabhängige Regensburger ccRCC/ TT Kollektiv retrospektiv in eine Hochrisikogruppe ($> 18,7 \Delta\text{Ct} \triangleq \text{High-Risk}$) und eine prognostisch günstiger verlaufende Gruppe ($< 18,7 \Delta\text{Ct} \triangleq \text{Low-Risk}$) zu unterteilen (Abbildung 12).

Es wurde eine Sensitivität von 92,3 % (CI 95 %: 62,1 % – 99,6 %) und eine Spezifität von 61,0 % (CI 95 %: 44,5 % – 75,4 %) erzielt. Am Tumor verstorbene Patienten wurden

demnach erneut sehr präzise der High-Risk-Gruppe zuordnet (12/13 korrekt). Zum Vergleich: in der Vorarbeit [1] wurden 18 von 20 CRD-Fällen korrekt als High-Risk klassifiziert.

In der Kaplan-Meier Überlebensanalyse (Abbildung 12) fielen die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen im Log-Rank-Test deutlich signifikant aus ($p = 7e-5$). Konkret bedeutet dies, dass in der Low-Risk-Gruppe lediglich ein Patient von insgesamt 26 Personen innerhalb des gesamten Beobachtungszeitraums an der Tumorerkrankung verstarb, während in der High-Risk-Gruppe 12 von 28 Personen der Krankheit erlagen. Betrachtet man die klassischen Beobachtungszeiträume, so waren nach 5 Jahren Follow-up bereits 30 % der Patienten in der High-Risk-Gruppe an der Krebserkrankung verstorben, nach 10 Jahren wuchs die Todesrate auf 50 %. Zum Vergleich: 100% der Patienten innerhalb der Low-Risk-Gruppe haben 5 Jahre des Follow-ups überlebt. Nach 10 Jahren hatten weiterhin 94 % der Low-Risk-Patienten die Tumorerkrankung überlebt. Die präsentierten Ergebnisse werden durch solide 5- (93 %) und 10- (80 %) Jahres Follow-up Raten gestützt (Tabelle 5).

Die beschriebenen Ergebnisse werden weiterführend durch die univariate Cox-Regression untermauert (Tabelle 6), in der gezeigt werden konnte, dass im vorliegenden Datensatz die gleichen miRNAs einen signifikanten Einfluss auf das tumorbedingte Versterben der Patienten nehmen wie in der Vorarbeit. Dabei war miR-21 (HR 3,79, $p = 0,003$) erneut mit einer negativen Prognose assoziiert, während für miR-126 wiederholt eine Risikoreduktion gezeigt werden konnte (HR 0,19, $p = 3e-5$).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sich das von Vergheo et al. [1] publizierte Überlebensklassifikationsmodell mit dem dazugehörigen CRS (miR-21, -126, -221) im Rahmen dieser Arbeit an einem unabhängigen, vergrößerten Patientenkollektiv erfolgreich beweisen konnte. Basierend auf den vorliegenden Ergebnissen birgt das Modell das Potential unter Ausweitung der Datengrundlage langfristig die Therapieplanung im klinischen Alltag unterstützen zu können. Ob sich das Modell unter weiteren Optimierungsmaßnahmen, insbesondere im prospektiven Setting, beweisen kann, wird sich in Zukunft zeigen müssen.

4.1.2 Zusammenhänge zwischen miRNA-Expressionen und klinikopathologischen Faktoren

4.1.2.1 Proben metastasierter und nodal positiver Probanden

Aus der Vorarbeit von Vergho et al. [1] bekannte miRNA-Dysregulationen für Proben metastasierter Patienten, konnten erneut bestätigt werden. So war miR-126 in der Gruppe mit diagnostizierten Fernmetastasen gegenüber der Referenz signifikant supprimiert, während sich miR-21 erwartungsgemäß deutlich signifikant überexprimiert zeigte (Abbildung 5a). Die neu untersuchte miR-145 zeigte sich in der fernmetastasierten Gruppe signifikant supprimiert, während miR-205 statistisch signifikant hochreguliert war (Abbildung 5).

In der N+-Subgruppe fand sich eine deutliche und erwartete signifikante Suppression von miR-126 und eine signifikante Überexpression von miR-21 im Vergleich zur Referenz. Für die neu untersuchten miR-205 und -513 präsentierte sich eine signifikante Überexpression in Gewebeproben der N+-Subgruppe (Abbildung 6).

4.1.2.2 Tumorbedingtes Versterben

Ebenfalls identisch zur Vorarbeit war in der am Tumor verstorbenen Patientengruppe miR-21 stark signifikant überexprimiert, während für miR-126 eine signifikante Suppression ermittelt werden konnte (Abbildung 9). Dies wird durch die univariate Cox-Regression, in der miR-21 mit einer negativen Prognose (HR 3,79, $p = 0,003$) assoziiert war, untermauert, während sich für miR-126 eine erwartete Risikoreduktion (HR 0,19, $p = 3e-5$) zeigte (Tabelle 6). Die Ergebnisse in Bezug auf miR-21 und -126 decken sich mit zahlreichen Publikationen anderer Arbeitsgruppen. So wird der Zusammenhang zwischen einer Überexpression von miR-21, der Progression des RCC und einer reduzierten Überlebensrate mehrfach in der Literatur beschrieben [1, 2, 141, 163-165]. Auch die tumorsuppressive Rolle von miR-126 ist dokumentiert. Eine Herunterregulation von miR-126 scheint mit einer HIF1A-Hochregulierung und einer daraus resultierenden Induktion der Angiogenese einherzugehen. Ihre Suppression konnte mit einem frühzeitigen Rezidiv von ccRCC-Patienten nach radikaler Nephrektomie assoziiert werden [3, 168, 169].

Ferner konnte für die neu untersuchten miRNAs (miR-205, miR-513) eine statistisch signifikante Hochregulierung von miR-513 sowie eine geringfügige, allerdings nicht mehr

statistisch signifikante ($p = 0,079$) Überexpression von miR-205 in Proben am Tumor verstorbener Patienten festgestellt werden (Abbildung 9). In der univariaten Cox-Regression ließ sich lediglich für miR-205 ein geringer statistisch signifikanter Zusammenhang mit dem tumorbedingten Versterben (HR 1,23, $p = 0,014$) herstellen (Tabelle 6). Die Ergebnisse der miR-205-Analysen widersprechen den durch andere Arbeitsgruppen veröffentlichten Erkenntnissen zu ihrer Rolle beim RCC, in denen eine tumorsuppressive Rolle für miR-205 durch Interaktion mit VEGF und dem PTEN/AKT Signalweg beschrieben wird [249, 250]. Auch beim Hochrisikoprostatakarzinom konnten Kalogirou et al. [200] zeigen, dass eine miR-205 Suppression mit Lymphknotenmetastasen assoziiert wird. Ein Zusammenhang mit dem tumorspezifischen Überleben konnte durch die Arbeitsgruppe allerdings nicht identifiziert werden.

In Zusammenschau lässt sich festhalten, dass es möglich war, die Ergebnisse aus unselektionierten bzw. wenig selektionierten Kollektiven (in Bezug auf das RCC-Stadium gemischte Kollektive) anderer Arbeitsgruppen im selektionierten Regensburger ccRCC/TT größtenteils zu bestätigen. Lediglich für miR-205 widersprachen sich die Ergebnisse. Diesbezüglich sind weiterführende, größer angelegte Analysen notwendig, um die Rolle von miR-205 beim RCC zu festigen.

4.1.2.3 MiR-221

MiR-221 präsentierte sich in Proben von ccRCC/TT Patienten mit Fernmetastasierung supprimiert ($p = 0,060$) (Abbildung 5b), ebenso wie in Proben verstorbener Patienten (Abbildung 8) – in der CRD-Gruppe war nur ein geringer Trend erkennbar ($p = 0,269$, Abbildung 9b). In der univariaten Cox-Regression machte sich ein Trend zur Risikoreduktion in Bezug auf das tumorbedingte Versterben (HR 0,74, $p = 0,21$, Tabelle 6) bemerkbar. Im Rahmen unserer Zellkulturexperimente zeigte sich an Tag 5 p. T. eine Reduktion der Proliferation der 768-O Zelllinie auf 92 % ($p = 0,178$), die Ergebnisse waren allerdings nicht statistisch signifikant (Abbildung 32).

Die Ergebnisse in der aktuellen Literatur sind widersprüchlich: Einerseits beschreiben Lu et al. in ihrer 2015 publizierte Arbeit, dass eine Überexpression von miR-221 in einer gesteigerten Proliferation, Migration und Invasion von 786-O-Zellen resultiert. Dabei konnte eine Überexpression von miR-221 im Tumorgewebe im Vergleich zum benachbarten tumorfreien Material identifiziert werden [6]. Auf der anderen Seite publizierten Heinzlmann et al. bereits 2011 eine Studie, in der sie eine

Herunterregulierung von miR-221 in metastasierten ccRCC Gewebeproben gegenüber Tumorproben von Patienten ohne Metastasen beobachtet hatten [219]. Beim Prostatakarzinom kamen Spahn et al. zum Ergebnis, dass eine Suppression von miR-221 mit Tumorprogression und einer verschlechterten Prognose assoziiert sei [218]. Anhand der zitierten Studien, der vorliegenden Ergebnisse und der Erkenntnisse unserer eigenen Arbeitsgruppe [1, 218] bildet sich am ehesten eine tumorsuppressive Rolle für miR-221 im ccRCC ab. Unter Einbindung in den CRS ließ sich mit ihrer Hilfe die Prognose von ccRCC/ TT Patienten präziser bestimmen.

4.1.2.4 MiR-145

MiR-145 zeigte sich in Gewebeproben von Patienten mit Fernmetastasierung supprimiert (Abbildung 5a), ebenso wie in der am Tumor verstorbenen Gruppe ($p = 0,19$) (Abbildung 9a). In der univariaten Cox-Regression ließ sich für miR-145 eine gewisse Risikoreduktion in Bezug auf das tumorbedingte Versterben erkennen (HR 0,75, $p = 0,10$) (Tabelle 6).

Bisherige Untersuchungen durch andere Laborgruppen kamen zum Schluss, dass miR-145 im RCC-Gewebe herunterreguliert ist und ihre Überexpression in ACHN- und 786-O-Zellen mit einer Proliferationshemmung einhergeht [4, 5, 186]. Diese Ergebnisse decken sich teilweise mit denen von Vergho et al., in der 2014 publizierte Arbeit konnte gezeigt werden, dass miR-143 im ccRCC/ TT Gewebe stark gegenüber ccRCC/ woTT Proben herunterreguliert ist [1]. Nach eigener Recherche gibt es zur Expression von miR-145 in ccRCC/ TT Proben bislang keine publizierte Untersuchungen. Da miR-143 und -145 zum selben Cluster gehören und in bisherigen Analysen ihre Expression stark positiv miteinander korreliert [4, 241], lässt sich vermuten, dass miR-145 sich in diesem Fall kongruent verhält. Für die noch folgende Diskussion der miRNA-Expressionsunterschiede zwischen Serum und Tumorgewebe wird angenommen werden, dass miR-145 in ccRCC/ TT Gewebeproben gegenüber thrombusfreien ccRCC-Proben supprimiert ist.

Beim Blick auf andere Tumore lässt sich feststellen, dass miR-145 in die Regulation der EMT involviert ist [175, 176, 181, 182] und in Tumorgeweben zumeist supprimiert zu sein scheint.

In Bezug auf die miR-145 Expression im RCC-Gewebe existieren kontroverse Ergebnisse: So fanden etwa Petrozza et al. in ihrer 2015 publizierte Arbeit gar keine

statistisch signifikante Abweichung zwischen tumorfreiem Gewebe und ccRCC Proben [251].

In Zusammenschau scheint die wissenschaftliche Lage in Bezug auf die Rolle von miR-145 im ccRCC noch unscharf. In unseren Daten zeichnet sich für das selektionierte Regensburger ccRCC/ TT Kollektiv eine Risikoreduktion für das tumorbedingte Versterben ab.

4.1.2.5 MiR-513

Für die neu untersuchte miR-513 konnte eine signifikante Überexpression in Proben von N+-Patienten (Abbildung 6) sowie der CRD-Gruppe (Abbildung 9b) beobachtet werden. Dies widerspricht den bisherigen Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen. So berichten Nientiedt et al. sowie Zaravinos et al., dass miR-513 im Nierenzellkarzinomgewebe herunterreguliert sei [220, 221]. Die wenigen weiteren Publikationen zur Funktion von miR-513 in anderen Tumorentitäten deuten auf eine tumorsuppressive Rolle hin. So wird berichtet, dass eine miR-513-Suppression im Endometrium- und Ovarialkarzinom sowie im Hochrisikoneuroblastom mit einer verschlechterten Prognose einhergehe [222-224]. Da sich unsere Messungen lediglich auf das ccRCC/ TT Kollektiv beschränken und kein direkter Vergleich zu thrombusfreien oder gar tumorfreien Gewebeproben vorliegt, ist es nicht möglich unsere Ergebnisse zufriedenstellend mit denen anderer Arbeitsgruppen zu vergleichen. Demnach lässt sich zum aktuellen Zeitpunkt nur sagen, dass eine Überexpression von miR-513 in unserem Kollektiv mit negativen Faktoren assoziiert wird. Ob dies mit einer onkogenen oder protektiven Funktion von miR-513 einhergeht, ist zum aktuellen Zeitpunkt nicht beurteilbar. Die in der Einleitung aufgestellte These, dass miR-513 im RCC eventuell PD-L1 herunterregulieren könnte und auf diese Weise tumorsuppressiv wirke, lässt sich durch die vorliegenden Expressionsergebnisse nicht bestätigen.

Da die Rolle von miR-513 im RCC noch unklar ist, wäre es von Interesse diese in weiterführenden Studien näher zu erforschen. Grundlage hierfür bieten Publikationen von Arbeitsgruppen, die bereits über Dysregulationen von miR-513 im RCC berichtet haben [220, 221].

4.2 Würzburger Kollektiv: miRNA-Expressionen in Seren von ccRCC/ woTT-, ccRCC/ TT- und Kontrollprobanden

Über die Validierung der Ergebnisse von Vergho et al. [1] hinaus stellte sich die Frage, ob es mit Hilfe einer einfachen, kostengünstigen und für den klinischen Alltag praktikablen miRNA-Expressionserfassung aus dem Serum möglich ist, zwischen tumorfreien Probanden, am ccRCC/ woTT und am ccRCC/ TT erkrankten Patienten zu unterscheiden.

Wie bereits in *Unterkapitel 3.2.4.6* des Ergebnisteils beschrieben, zeigt sich bei isolierter Betrachtung der Serum-Expressionsergebnisse ein gewisser *Upside-Down-Effekt* (Abbildung 34). Während sich zunächst eine deutliche Überexpression aller vier miRNAs (miR-21, miR-126, miR-145, miR-221) in der ccRCC/ woTT Gruppe gegenüber tumorfreien Probanden beobachten lässt, sinkt ihre relative Expression wieder stark ab, sobald der Tumor das Gefäßsystem infiltriert. Die Expressionslevel nähern sich nahezu dem Stand tumorfreier Individuen an. Lediglich für miR-126 sowie miR-145 lässt sich noch eine leichte, aber statistisch signifikante Überexpression gegenüber tumorfreien Proben ermitteln. Bei isolierter Betrachtung der Serumergebnisse lässt sich kein zufriedenstellender Erklärungsansatz für den beobachteten *Upside-Down-Effekt* herleiten. Aus diesem Grund soll dieses Phänomen nachfolgend unter Einbeziehung der Ergebnisse aus den Tumorgewebeuntersuchungen und ausführlicher Literaturrecherche tiefergreifender diskutiert werden.

In den *Subkapiteln 3.2.5.7 und 3.2.6.6* lässt sich ferner nachvollziehen, dass basierend auf den univariaten Cox-Regressionsanalysen keine der miRNAs prognoserelevant für das gesamte Würzburger ccRCC Kollektiv oder die isolierte Gruppe der ccRCC/ TT Patienten war.

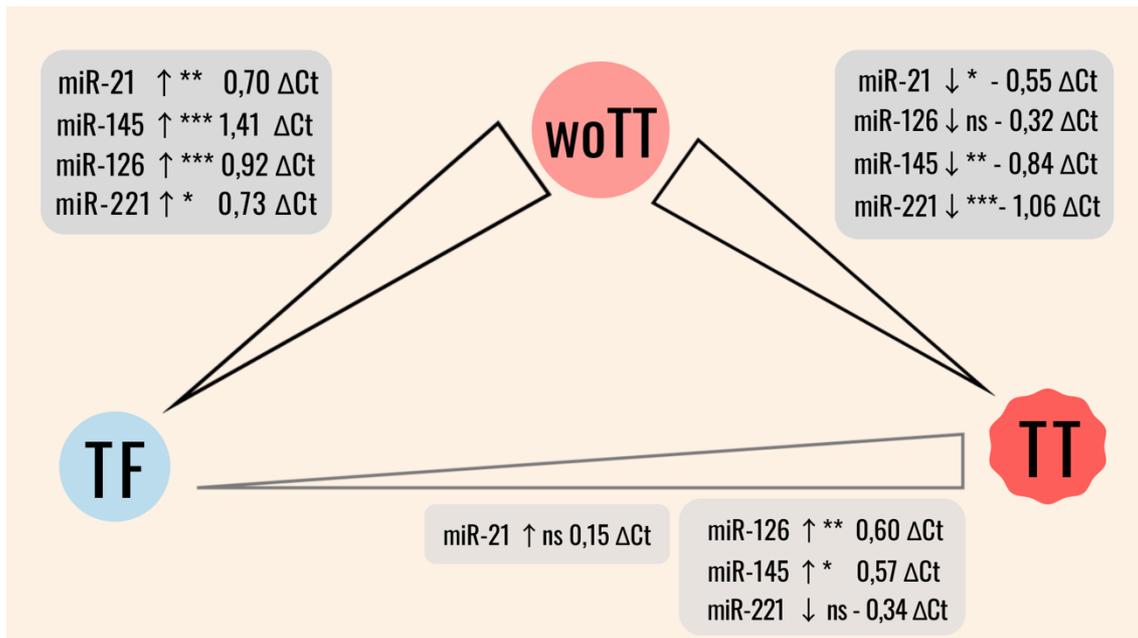


Abbildung 34: Upside-Down-Effekt - miRNA-Expressionsunterschiede zwischen Seren von ccRCC/ woTT- (woTT) und ccRCC/ TT- (TT) Patienten sowie tumorfreien Probanden (TF)

Eine relative Überexpression wurden mit "↑", eine Herunterregulation mit "↓" veranschaulicht. Die Signifikanzstärke im post hoc t-Test nach einer ANOVA (miR-21, -145) / post hoc Dunn's Test nach einem Kruskal-Wallis Test (miR-126, -221) wurde für $p < 0,05$ mit (*), $p < 0,01$ mit (**) und $p < 0,001$ mit (***) gekennzeichnet. Es erfolgte eine p-Wert-Korrektur nach der Holm-Bonferroni Methode. Nicht signifikante Expressionsunterschiede wurden mit „ns“ gekennzeichnet. Zusätzlich wurden die Differenzen zwischen den Δ Ct-Mittelwerten einzelner miRNAs der Gruppen ermittelt, um die Stärke der Expressionsunterschiede zu verdeutlichen.

4.3 Gesamtbild: Expressionsunterschiede zwischen Gewebe und Serum

Der beschriebene *Upside-Down-Effekt* der miRNA-Expressionen im Serum erscheint im ersten Augenblick überraschend, da sich miRNAs im Gewebe von ccRCC-Patienten zum Teil völlig anders verhalten. So zeigen Expressionsbestimmungen von beispielsweise miR-21 im Gewebe, für die mehrfach eine onkogene Rolle in der Literatur beschrieben wird, einen allmählichen Anstieg ihrer relativen Expression, je weiter das ccRCC fortschreitet [1, 2]. Für die am ehesten als tumorsuppressiv beschriebenen miRNAs (miR-126, miR-145, miR-221) zeigt sich hingegen meist ein stetiger Expressionsabfall, der sich mit dem Progress des Tumors assoziieren lässt (*für miR-145 beachte Subkapitel 2.6*) [1, 4, 5, 169, 252]. Laut Arbeiten von Vergho et al. lässt sich für miR-126 kein statistisch signifikanter Expressionsunterschied zwischen ccRCC/ woTT-

Proben und umliegendem tumorfreiem Gewebe nachweisen [1, 2], während andere Arbeitsgruppen von einer Überexpression berichten [3, 252]. Den allermeisten Untersuchungen scheint gemeinsam zu sein, dass die miR-126 Expression mit der Tumorprogression sinkt und dies mit einer negativen Prognose assoziiert ist [1, 3, 169]. Ähnlich verhält es sich mit miR-221: In der 2014 von Vergheo et al. publizierten Arbeit konnte gezeigt werden, dass miR-221 im Tumorgewebe vom ccRCC/ TT gegenüber ccRCC/ woTT deutlich herunterreguliert ist [1]. Heinzelmann et al. kamen ebenfalls zum Ergebnis, dass miR-221 im metastasierten ccRCC supprimiert ist [219]. Laut Lu et al. und Szabó et al. ist miR-221 im ccRCC/ woTT Gewebe im Vergleich zu umliegenden tumorfreien Proben überexprimiert [6, 7]. Anhand vorliegender Ergebnisse lässt sich im Serum eine ähnliche Dynamik relativer Expressionen für miR-21, miR-126 und miR-221 im Vergleich zum bekannten Expressionsverhalten im Gewebe beobachten (Abbildung 35) [2, 3, 252]. Alle drei miRNAs zeigen sich sowohl im Tumorgewebe als auch im Serum von ccRCC/ woTT Probanden gegenüber tumorfreiem Gewebe beziehungsweise Serum tumorfreier Probanden überexprimiert. MiR-145 ist laut Literaturrecherche im ccRCC/ woTT-Gewebe herunterreguliert [4, 5], während sich in unseren Serumuntersuchungen eine deutliche Überexpression feststellen lässt ($1,41 \Delta Ct$, $p = 2e-6$) (Abbildung 35). Nach gründlicher Recherche sind zum heutigen Zeitpunkt keine Arbeiten veröffentlicht, in denen die Expression von miR-145 im Blut von RCC Patienten untersucht wurde. Bezüglich anderer urologischer Tumoren findet man eine im Jahr 2015 durch Kelly et al. publizierte Studie, in der die Arbeitsgruppe eine Überexpression von miR-145 im Blut von Prostatakarzinompatienten gegenüber tumorfreien Probanden berichtet [253]. Dringt der Tumor schlussendlich ins Gefäßsystem ein, lässt sich beobachten, dass die tumorsuppressiven miRNAs (miR-126, miR-145, miR-221) im Gewebe im Vergleich zu ccRCC/ woTT Proben stark absinken [1] (*für miR-145 beachte Subkapitel 2.6*) – dies gleicht der erfassten Dynamik im Serum (Abbildung 36). Allerdings entsteht eine Diskrepanz beim Blick auf die bekannte Onco-miR-21. Während diese im Gewebe weiter ansteigt [1], sinkt sie in den Serumergebnissen überraschenderweise ab ($-0,55 \Delta Ct$; $p = 0,03$) und nähert sich dem Level tumorfreier Probanden an – sie ist gegenüber diesen nicht mehr statistisch signifikant überexprimiert (Abbildung 34). Aktuell stehen hierzu nach gründlicher Recherche keine publizierten Serum-Vergleichsdaten von Patienten mit einem weit fortgeschrittenem RCC zur Verfügung.

Die folgenden Unterkapitel widmen sich einer detaillierten Betrachtung einzelner ausgewählter miRNAs (miR-21, miR-145, miR-221), um ihre Rolle im ccRCC tiefergreifender zu diskutieren. Die Unterkapitel befassen sich ferner mit molekularen Mechanismen dieser miRNAs, die als mögliche Begründung für den beschriebenen *Upside-Down-Effekt* im Serum (Abbildung 34) herangezogen werden können.

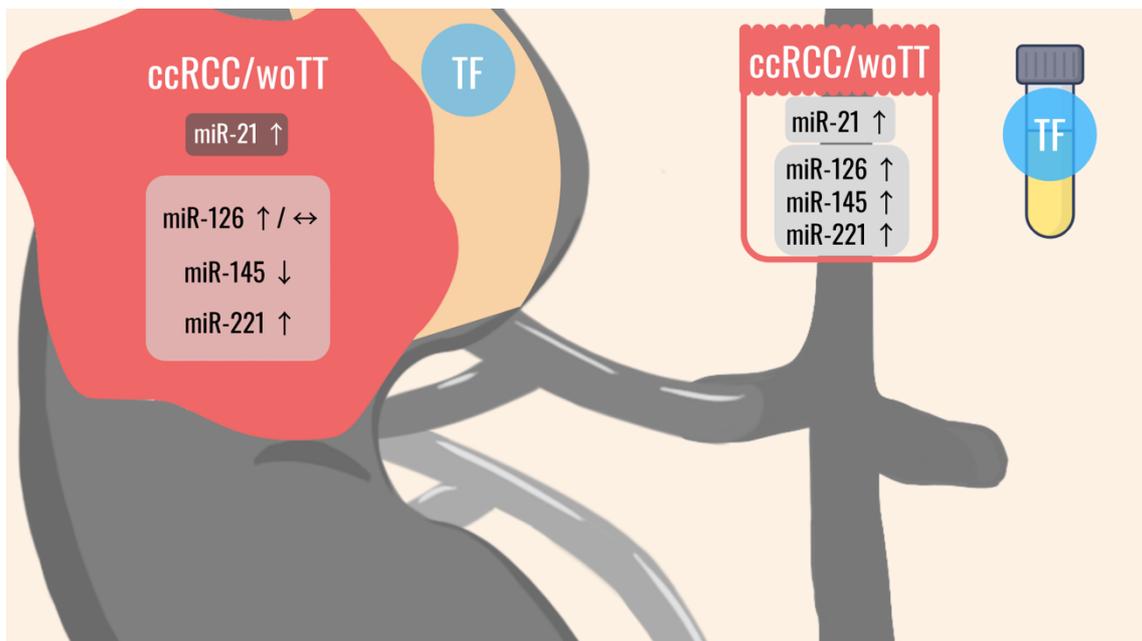


Abbildung 35: Veranschaulichung von miRNA-Expressionsunterschieden im Gewebe (links) und Serum (rechts) von ccRCC/ woTT gegenüber tumorfreien Proben (TF).

Eine relative Überexpression wurde mit "↑", eine Herunterregulation mit "↓" und kein Expressionsunterschied mit „↔“ gekennzeichnet. Die dargestellten Expressionsunterschiede entsprechen dem Vergleich zwischen ccRCC/ woTT Geweben gegenüber umliegenden tumorfreien Gewebearealen (miR-21 [2], miR-126 [2, 3], miR-145 [4, 5], miR-221 [6, 7]) bzw. ccRCC/ woTT Patientenserum gegenüber Serum tumorfreier Probanden (Daten vorliegender Arbeit).

Abbildung modifiziert nach Kotlyar, et al., Cancers, 2023. [8]

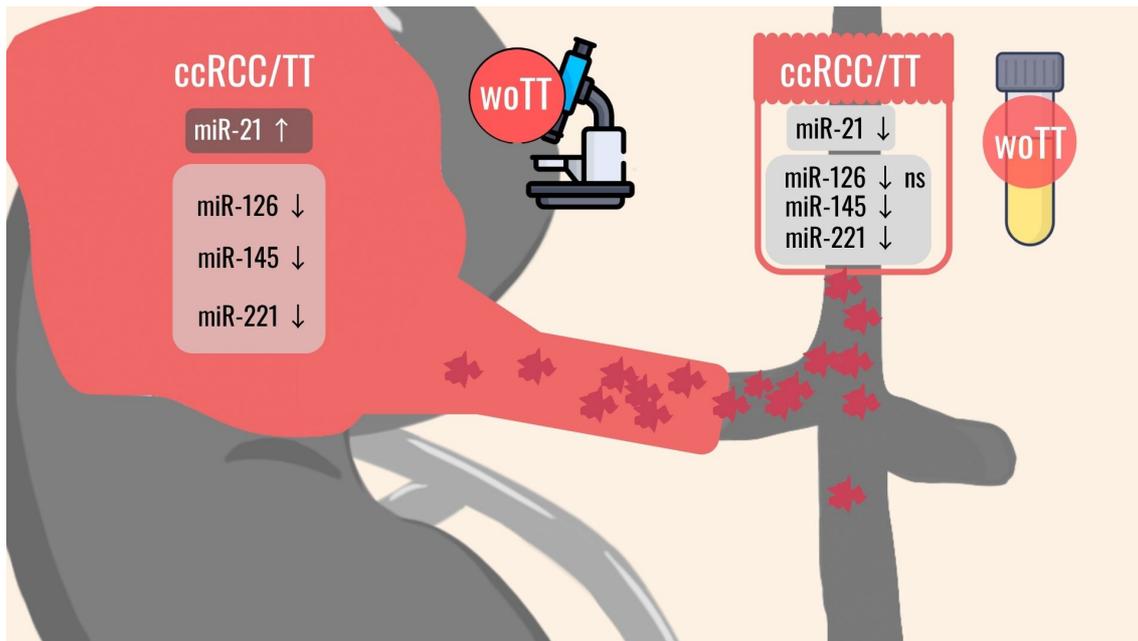


Abbildung 36: Veranschaulichung von miRNA-Expressionsunterschieden im Gewebe (links) und Serum (rechts) von ccRCC/ TT gegenüber ccRCC/ woTT (woTT) Proben.

Schematische Darstellung des Eindringens des ccRCCs in das Gefäßsystem unter Abgabe von Tumorzellen.

Eine relative Überexpression wurde mit "↑" und eine Herunterregulation mit "↓" gekennzeichnet. Die dargestellten Expressionsunterschiede entsprechen dem Vergleich zwischen Tumorgeweben von ccRCC/ TT gegenüber ccRCC/ woTT (miR-21, miR-126, miR-145 (*beachte Subkapitel 2.6*), -221 [1]) bzw. ccRCC/ TT Patientenserum gegenüber Serum von ccRCC/ woTT Probanden (Daten vorliegender Arbeit). Mit „ns“ ist eine nicht signifikante Suppression gekennzeichnet.

Abbildung modifiziert nach Kotlyar, et al., *Cancers*, 2023. [8]

4.3.1 MiR-221

Die Rolle von miR-221 im ccRCC ist unzureichend untersucht und bislang nicht eindeutig. Dies wurde bereits in der Einleitung (1.4.7) und in *Subkapitel 4.1.2.3* des Diskussionsteils ausführlich dargelegt. Nachfolgend soll die durch mehrere Arbeitsgruppen vermutete onkogene Rolle von miR-221 im ccRCC auf Grundlage unserer Ergebnisse und unter Einbeziehung weiterer Literatur kritisch betrachtet werden.

- (1) Lu et al. teilten miR-221, nachdem sie ihre Überexpression in ccRCC-Geweben gegenüber umliegendem tumorfreiem Gewebe beobachteten, eine onkogene Rolle zu. Um ihre Ergebnisse zu untermauern, führten sie Zellkulturuntersuchungen durch, mit der Erkenntnis, dass miR-221 vermehrt in RCC-Zelllinien (786-O, ACHN, Caki-1, Caki-2) gegenüber normalen menschlichen Epithelzellen aus dem proximalen Tubulus (HK-2) überexprimiert ist. Ein miR-221-Knockout bremste die Proliferation, Migration und Invasion der 786-O-Zelllinie [6].
- (2) Teixeira et al. schlugen ebenfalls eine onkogene Rolle für miR-221 vor, nachdem sie 2014 ihre Expression im Plasma von RCC Patienten (72,1 % klarzellig) vermessen und ihre Überexpression mit einer negativen Prognose korrelieren konnten [147]. Im Jahr 2017 erweiterte die Arbeitsgruppe ihre Untersuchungen und zeigte unter Verwendung eines kombinierten Risikoscores aus miR-210, miR-221 sowie miR-1233, dass dieser Marker mit einem früheren tumorassoziierten Versterben in Verbindung steht. Auch in diesem Fall zeigte sich miR-221 überexprimiert [254].

Potenziell fehlten beiden Arbeitsgruppen für ein vollständiges Bild der miR-221 Funktion im ccRCC zwei wichtige Elemente:

- I. Probanden, bei denen zusätzlich entweder die Expression von miR-221 im Serum/Plasma ((1) Lu et al. [6]) oder aber wie im Falle von (2) Teixeira et al. im Gewebe vermessen wurde [147, 254].
- II. Proben von Patienten mit einem stark fortgeschrittenen Nierenzellkarzinom mit Invasion des Gefäßsystems.

Betrachtet man beide Stadien (ccRCC/ woTT und ccRCC/ TT) unter Einbeziehung der miRNA-Expressionsergebnisse aus Gewebe und Serum, zeichnet sich ein gegenteiliges Bild für die Funktion von miR-221 im ccRCC ab.

Zwar lässt sich zunächst in ccRCC/ woTT Proben eine deutliche Überexpression von miR-221 sowohl im Gewebe als auch im Serum beobachten, was durchaus ihre onkogene Rolle untermauern könnte (Abbildung 35). Diese Dynamik kehrt sich allerdings um, sobald der Tumor ins Gefäßsystem eindringt – miR-221 sinkt sowohl im Gewebe [1], als auch im Serum deutlich ab (Serum: $-1.06 \Delta\text{Ct}$; $p = 7e-4$) (Abbildung 36). In diesem Stadium ist miR-221 im Serum gegenüber tumorfreien Probanden sogar leicht, allerdings nicht statistisch signifikant, herunterreguliert ($-0,34 \Delta\text{Ct}$; $p = 0,136$) (Abbildung 34).

In Zusammenschau dieser Ergebnisse, unter Einbeziehung der Zellkulturresultate (Abbildung 32, Abbildung 33), in denen eine miR-221 Überexpression in keiner statistisch signifikanten negativen oder positiven Wirkung auf RCC-Zelllinien resultierte und unter Berücksichtigung der Ergebnisse von Vergheo et al. [1], lässt sich schlussfolgern, dass miR-221 die onkogene Rolle im ccRCC vermutlich zu Unrecht zugeschrieben wird. Bei näherer Betrachtung ist eine protektive Rolle von miR-221 im ccRCC denkbar. Ihre Überexpression im Gewebe und Serum von ccRCC/ woTT Probanden ließe sich in diesem Konzept als körpereigene Reaktion, um das Tumorwachstum aufzuhalten, interpretieren. Dies lässt sich unter anderem daraus folgern, dass die miR-221-Expression nach Invasion des Gefäßsystems stark absinkt (Abbildung 36) – möglicherweise als Zeichen eines ausgeprägten Krankheitsprogresses. Die Zellkulturergebnisse von Lu et al. [6], welche zeigen, dass miR-221 in 786-O Zellen überexprimiert ist und ihr Knockout in einer Proliferationshemmung resultiert, widersprechen der beschriebenen Interpretation nicht zwangsläufig. Eine einzige miRNA kann zahlreiche unterschiedliche Targets besitzen und hierdurch mehrere Aufgaben innerhalb einer Zelllinie erfüllen. Die Überexpression von miR-221 in den Tumorzellen muss demnach nicht zwangsläufig als ein negativer Faktor gewertet werden. Ein Knockdown von miR-221 hätte auch die Funktion der Kontroll-HK-2 Zelllinie in ihrer Funktion beeinflussen können. Dies wurde in der zitierten Studie von Lu et al. [6] jedoch nicht untersucht. Der fehlende Effekt einer miR-221 Überexpression auf die 786-O und ACHN Zelllinien in der vorliegenden Untersuchung kann daraus resultieren, dass die optimalen Spiegel bereits erreicht wurden und ein „Mehr“ nicht zwangsläufig in einem messbaren Effekt mündet (Abbildung 32, Abbildung 33). Weiteren Aufschluss über die Funktion von miR-221 könnte eine Untersuchung von HK-2 Zellen im Vergleich zu RCC-

Zelllinien erbringen. Es wäre interessant zu erfahren, wie diese Zelllinie auf eine Überexpression beziehungsweise ein Knockdown von miR-221 reagiert.

4.3.2 MiR-145

Bei Betrachtung der relativen Expressionsergebnisse von miR-145 im Tumorgewebe und Serum von ccRCC/ woTT Patienten, kann eine Diskrepanz beobachtet werden. Während miR-145 im ccRCC/ woTT Tumorgewebe gegenüber umliegendem tumorfreiem Gewebe herunterreguliert ist [4], präsentiert sie sich in Seren von ccRCC/ woTT Patienten gegenüber tumorfreien Probanden überexprimiert (Abbildung 35).

Einerseits kann dies damit erklärt werden, dass die Wirkung des Tumors auf das Serum eingeschränkt ist, solange keine Gefäßinvasion stattgefunden hat. Denn, sobald der Tumor weiter fortschreitet und Anschluss an das Gefäßsystem gewinnt, lässt sich eine deutliche Suppression sowohl im Tumorgewebe [1] (*beachte Subkapitel 2.6*), als auch im Serum ($-0,84 \Delta Ct$; $p = 9e-3$) von ccRCC/ TT Probanden beobachten (Abbildung 36). Andererseits wäre eine Regulation beispielsweise durch sog. long non-coding RNAs (LncRNA) denkbar.

LncRNAs werden ebenso wie miRNAs der übergeordneten Gruppe nicht-kodierender RNAs zugeordnet (ncRNAs) [255, 256]. Wu et al. konnten zeigen, dass LncRNAs im Serum von ccRCC-Patienten auffindbar sind und man anhand ihrer Expression zwischen Tumorpatienten und tumorfreien Probanden differenzieren kann [257]. Dabei ist bekannt, dass LncRNAs als sog. miRNA-Schwämme mehrere miRNAs binden und sie in ihrer Funktion beeinträchtigen können [258]. Ferner kann eine LncRNA als Präkursor für die miRNA-Biogenese dienen und den Reifungsprozesse auf unterschiedlichen Ebenen beeinflussen [259].

So stellte die Arbeitsgruppe um Shi et al. fest, dass lncRNA-ROR im Tumorgewebe von RCC-Patienten im Vergleich zu benachbarten tumorfreien Regionen deutlich überexprimiert ist. Auch in den ccRCC-Zelllinien Caki-1 und -2 zeigte sich lncRNA-ROR gegenüber HK-2 Zellen stark hochreguliert. Ein Knockdown von lncRNA-ROR in Caki-1 und -2 führte zu einer Hemmung ihrer Proliferation und zur Apoptose [9]. Kombiniert man die Erkenntnisse von Shi et al. mit den Ergebnissen von der kürzlich publizierten Studie von Li et al., stellt man fest, dass miR-145 ein Target von lncRNA-ROR darstellt. Die

Transfektion von HepG2 oder SMMC-7721 Leberzellkarzinomzellen mit lncRNA-ROR resultierte in einer deutlichen Suppression von miR-145 [10].

Basierend darauf stellt die mögliche lncRNA-ROR/ miR-145 Interaktion einen plausiblen Erklärungsansatz für die Suppression von miR-145 in ccRCC-Gewebeproben thrombusfreier Probanden dar (Abbildung 37). Auch ist es denkbar, dass mit der Tumorprogression dieser Effekt weiter verstärkt wird, was in einer weiteren Herunterregulierung von miR-145 im Tumorgewebe von ccRCC/ TT Probanden im Vergleich zu ccRCC/ woTT resultiert [1] (*beachte Subkapitel 2.6*). Durch die Invasion des Gefäßsystems, wäre es demnach möglich, dass lncRNA-ROR vermehrt ins Blut gelangt und eine Suppression von miR-145 in Serumproben von ccRCC/ TT Patienten gegenüber thrombusfreien Probanden bewirkt (Abbildung 37). Da miR-145 in zahlreiche tumorsuppressive Mechanismen involviert ist – Hemmung von Hexokinase-2, FSCN-1, MMP-11, VEGFA – begünstigt ihre Suppression den Tumorprogress [4, 181, 260-263].

Zusammenfassend könnte die beobachtete Diskrepanz der relativen miR-145 Expression zwischen Tumorgewebe und Serum von ccRCC/ woTT Proben, einerseits durch den in diesem Stadium noch fehlenden Einfluss des Tumors auf die tumorsuppressiven Faktoren im Blut erklärt werden. Andererseits kann die Herunterregulierung von miR-145 im Tumorgewebe von ccRCC-Patienten ggf. auf eine Regulation durch lncRNA-ROR zurückzuführen sein. Dieser Mechanismus könnte auch für das beobachtete rapide Absinken von miR-145 in Serumproben von ccRCC/ TT Patienten mitverantwortlich sein. Diese Thesen werden in zukünftigen wissenschaftlichen Untersuchungen evaluiert werden müssen.

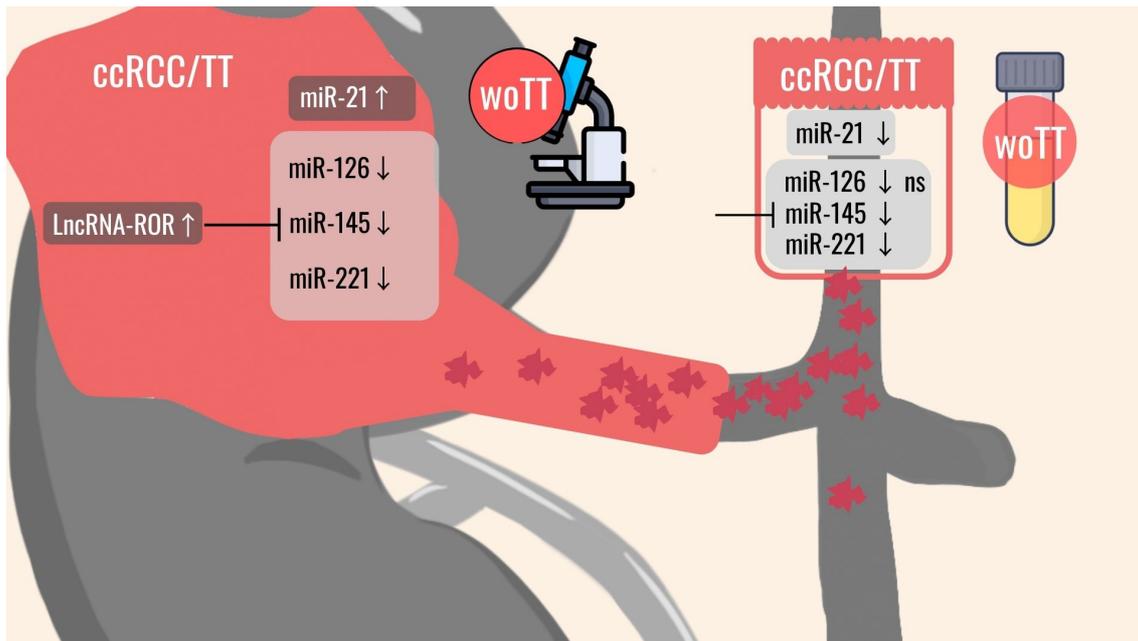


Abbildung 37: Veranschaulichung von miRNA- Expressionsunterschieden im Gewebe (links) und Serum (rechts) von ccRCC/ TT gegenüber ccRCC/ woTT Proben (woTT) sowie eines möglichen hemmenden Wirkmechanismus durch LncRNA-ROR.

Schematische Darstellung des Eindringens des ccRCCs ins Gefäßsystem unter Abgabe von Tumorzellen. Eine relative Überexpression wurden mit "↑" und eine Herunterregulation mit "↓" gekennzeichnet. Die dargestellten Regulationen entsprechen dem Vergleich zwischen ccRCC/ TT Gewebeprouben gegenüber ccRCC/ woTT Geweben (miR-21, -126, -145 (*beachte Subkapitel 2.6*), -221 [1]) bzw. ccRCC/ TT Patientenserum gegenüber Serum von ccRCC/ woTT Probanden (Daten vorliegender Arbeit). Ein möglicher hemmender Wirkmechanismus durch LncRNA-ROR wurde mit „—|“ dargestellt [9, 10]. Mit „ns“ ist eine nicht signifikante Suppression gekennzeichnet.

Abbildung modifiziert nach Kotlyar, et al., *Cancers*, 2023. [8]

4.3.3 MiR-21

MiR-21 ist in erster Linie für ihre onkogene Rolle bekannt. Dies basiert auf der Beobachtung, dass sie in zahlreichen Tumorgeweben überexprimiert ist und das Zellwachstum unterschiedlicher Krebszellen fördern kann [159-161, 165]. Auch in laboreigenen Arbeiten wurde festgestellt, dass miR-21 im Gewebe thrombusfreier ccRCC-Probanden hochreguliert ist [2] und ihre Expression mit dem Tumorfortschritt und der Invasion ins Gefäßsystem weiter zunimmt [1]. Ihre Überexpression wurde mit einer schlechteren Prognose für betroffene Patienten assoziiert [1, 2].

Bekannte Targets von miR-21 sind PDCD4 sowie der PTEN/PI3K/AKT-Signalweg. Durch eine Hemmung von PDCD4 und PTEN kann miR-21 die Proliferation, Invasion, Migration sowie Chemoresistenz von Krebszellen anregen [162, 264-266] (Abbildung 38).

Die vorliegenden Serumuntersuchungen zeigen eine miR-21 Überexpression (0,70 Δ Ct, $p = 0,008$) in ccRCC/ woTT Proben im Vergleich zu Proben tumorfreier Individuen (Abbildung 34). Dies entspricht dem bekannten Muster bzw. der Vorstellung, dass bereits in diesem Tumorstadium Tumorzellen im Blut auffindbar sind. Interessanterweise lässt sich im vorliegenden Fall eine deutliche Diskrepanz beobachten, sobald der Tumor das Gefäßsystem infiltriert: Während die relative miR-21 Expression im Tumorgewebe von ccRCC/ TT Patienten im Vergleich zu thrombusfreien Probanden weiter zunimmt, fällt diese im Serum ab (- 0,55 Δ Ct, $p = 0,03$) (Abbildung 36).

Einen möglichen Erklärungsansatz für die beobachtete Diskrepanz des miR-21 Expressionsverhaltens zwischen Tumorgewebe und Serum können die Daten von He et al. bieten [267]. Die Forschungsgruppe demonstrierte in ihrer 2017 veröffentlichten Arbeit, dass miR-21 vermutlich nicht auf ihre weitgehend akzeptierte onkogene Rolle reduziert werden kann, sondern auch zentral in die Funktionalität des Immunsystems involviert ist. Die Arbeitsgruppe zeigte, dass miR-21 über den PTEN/PI3K/AKT-Signalweg für die normale T-Zell-Funktion von Bedeutung ist. Stimulierte T-Zellen von miR-21-Knockout Mäusen (miR-21⁻) produzieren signifikant weniger IFN- γ und IL-2 im Vergleich zu den Wild-Typ-Artgenossen (WT) [267]. Im weiterführenden in-vivo Experiment implantierten He et al. miR-21-Knockoutmäusen beziehungsweise WT-Mäusen subkutan entweder Leberzellkarzinom- (Heps) oder Sarkomzellen (S-180). Beide Modelle zeigten ein beschleunigtes Tumorwachstum in miR-21⁻-Mäusen im Vergleich zu den WT-Artgenossen. Im Blut und in der Milz von miR-21⁻-Mäusen zeigte sich ferner eine deutlich verringerte Anzahl an CD4⁺, CD8⁺ T-Zellen im Vergleich zum Wildtyp. Die Fähigkeit der miR-21⁻-T-Zellen Tumorgewebe zu infiltrieren und IFN- γ zu exprimieren war ebenfalls eingeschränkt [267].

Kombiniert man die Beobachtungen aus der vorliegenden Arbeit mit den Erkenntnissen von He et al., ließe sich anhand der beschriebenen dualistischen miR-21 Rolle annehmen, dass ihre Überexpression im Tumorgewebe ggf. vor allem dem Progress der Krebserkrankung dient, während ihre anfänglich beobachtete Hochregulierung im Serum thrombusfreier Probanden eine gesteigerte Aktivität für die Antitumorantwort widerspiegelt. Unter dieser Annahme ließe sich die miR-21 Suppression im Serum von ccRCC/ TT Probanden im Vergleich zu thrombusfreien Patienten dadurch erklären, dass infolge der Gefäßinvasion eine durch den Tumor bedingte Immunsuppression verursacht wird, die sich unter anderem als miR-21 Suppression im Serum präsentiert.

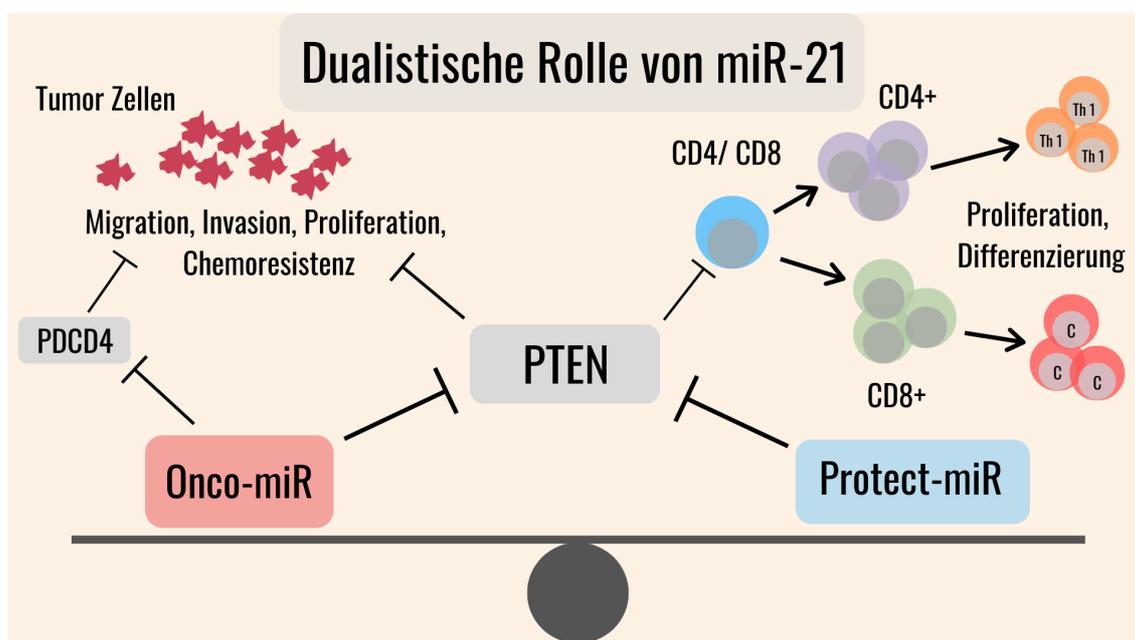


Abbildung 38: Schematische Darstellung eines möglichen dualistischen Wirkmechanismus von miR-21 als Onco-miR und Protect-miR und daraus resultierende Effekte

Eine hemmende Funktionalität wurde mit „—|“, eine induzierende mit einem „→“ veranschaulicht. C: Cytotoxische Zelle; Th1: Typ-1-T-Helferzelle; PDCD4: Programmed cell death protein 4; PTEN: Phosphatase and Tensin homolog

Sollte sich dieser Sachverhalt in weiteren Arbeiten bestätigen, hätte dies weitreichende Konsequenzen. Einerseits müsste in Frage gestellt werden, ob eine miR-21 Überexpression im Blut und Tumorgewebe tatsächlich dieselbe Funktionalität widerspiegelt. Andererseits müsste die miR-21 Rolle innerhalb des Immunsystems im Rahmen zielgerichteter Therapien und bei der Biomarker-Entwicklung berücksichtigt werden.

Eine zweite mögliche Erklärung für das beobachtete Expressionsverhalten wäre, dass sich der Tumor zwecks Invasion ins Gefäßsystem der sog. Vasculogenic Mimicry bedient und somit durch das Immunsystem nicht mehr adäquat erkannt wird. Dieses Phänomen ist für das ccRCC mehrfach beschrieben [268-270].

Zusammenfassend kommt für die beobachtete Diskrepanz der relativen miR-21 Expression zwischen Tumorgewebe und Serum möglicherweise eine dualistische Rolle in Frage. Unter der Annahme, dass miR-21 im Tumorgewebe eine andere Rolle vertritt als im Blut – oder ein unterschiedliches Gleichgewicht in Bezug auf die Funktionen gegeben ist – könnte der beobachtete Abfall der miR-21 Expression im Serum von ccRCC/ TT Patienten im Vergleich zu ccRCC/ woTT Patienten entweder eine Immunsuppression seitens des Tumors oder aber einen Tarnmechanismus widerspiegeln.

4.4 Stärken und Limitationen der Arbeit

Die vorliegende Arbeit weist Limitationen auf, die im nachfolgenden Teil erläutert werden. Abschließend erfolgt eine Zusammenstellung der Besonderheiten und Stärken der vorliegenden Arbeit.

4.4.1 Limitationen

4.4.1.1 Willkürstichproben

Bei den Daten des Regensburger und Würzburger Kollektivs handelte es sich um Willkürstichproben. Das bedeutet, dass in die Studie Patienten eingeschlossen wurden, die dieser nicht zufällig zugewiesen wurden, sondern verfügbar waren. Der Nachteil eines solchen Vorgehens ist, dass man nicht die Einschlusswahrscheinlichkeit für jeden einzelnen an der Studie teilnehmenden Patienten kennt. Aus statistischer Sicht birgt dies die Gefahr einer Stichprobenverzerrung. Diese macht es schwierig, aus den gewonnenen Ergebnissen und Erkenntnissen zuverlässige und allgemeingültige Aussagen über die Zielpopulation abzuleiten.

Möchte man nach Auswertung von Studienergebnissen valide und zuverlässige Aussagen über eine Zielpopulation treffen, so benötigt man hierfür eine Zufallsstichprobe, bei der man die Einschlusswahrscheinlichkeit für die gezogene

Stichprobe eines jeden Individuums kennt. Idealerweise erfolgt hierfür im Voraus eine Stratifikation der Patienten im Rahmen einer prospektiven Studie.

4.4.1.2 Potenzielle Überanpassung der Klassifikationsmodelle

Die nächste potenzielle Limitation ist die bekannte Problematik einer Überanpassung bei Machine Learning Modellen. Die Gefahr einer Überanpassung steigt insbesondere dann, wenn Modelle an kleinen Kollektiven entwickelt werden. In der zugrundeliegenden Arbeit von Vergheo et al. [1] wurde während der Modellentwicklung am Würzburger ccRCC/ TT mit Hilfe des sogenannten Akaike information criterion (AIC) die optimale Kombination der Vorhersageparameter (miR-21, -126, miR-221) für das tumorspezifische Überleben von Probanden ermittelt [1, 271]. Ferner wurden die Gewichte $((4,592 \times \text{miR-21 } \Delta\text{Ct}) + (-3,892 \times \text{miR-126 } \Delta\text{Ct}) + (-1,938 \times \text{miR-221 } \Delta\text{Ct}))$ generiert und mit Hilfe des Youden-Index der Schwellenwert von 18,7 ΔCt festgelegt.

In der vorliegenden Arbeit wurden schließlich die vorbeschriebenen Gewichte, der Schwellenwert und die miRNA-Kombination an einem unabhängigen, vergrößerten Regensburger Kollektiv überprüft. Es konnte demonstriert werden, dass das Modell auch in diesem Fall präzise Vorhersagen generieren kann. Der beschriebene Prozess reduziert die Wahrscheinlichkeit einer Überanpassung.

4.4.1.3 Einfache Serum-miRNA-Isolationsmethode

Mit Blick auf die Seren-Untersuchungen wird deutlich, dass im Rahmen der vorliegenden Arbeit auf eine einfache und praktikable Methode der miRNA-Isolierung zurückgegriffen wurde (*Subkapitel 2.4*). Dieser Ansatz ist nicht unproblematisch, da nicht eindeutig bekannt ist, ob die Expressionsergebnisse vornehmlich die miRNA-Expressionen in Tumorzellen, den miRNA-Expressionsstatus im Serum während einer Antitumor-Reaktion oder unter anderem auch tumorunabhängige Reaktionen (z.B. Immunzellen im Rahmen einer Infektion, zellfreie Bestandteile) widerspiegeln.

4.4.1.4 Retrospektiver Charakter

Der retrospektive Charakter der Datenerfassung und die damit verbundene Reduktion der Aussagekraft der gewonnenen Ergebnisse und Erkenntnisse betrifft im aktuellen Fall die gesamte Arbeit. Dieser ist allerdings insbesondere für die Überlebensanalyse des

Regensburger ccRCC/ TT Kollektivs erwähnenswert. Auch wenn ein prospektives Studiendesign für die Entwicklung und Validierung eines Überlebensklassifikationsmodells wünschenswert wäre, erscheint es zum aktuellen Zeitpunkt nur schwer möglich, unter Einsatz überschaubarer Kosten und einer angemessenen Zeitspanne genügend derart spezieller Probanden zu rekrutieren und nachzuverfolgen. Mit der zunehmenden Vernetzung überregionaler Zentren in naher Zukunft wird es möglich werden, auch für ein derart spezielles Patientenkollektiv eine gemeinsame prospektive Studie aufzusetzen.

4.4.2 Stärken

4.4.2.1 Einfache Serum-miRNA-Isolationsmethode

Bei der Untersuchung der Seren wurde eine einfache, allerdings zugleich kostengünstige und zeiteffiziente Methode der miRNA-Expressionsbestimmung angewandt, mit dem Ziel diese auch für den klinischen Alltag praktikabel zu gestalten.

4.4.2.2 Validierung des ccRCC/ TT Überlebensklassifikationsmodells

Hinsichtlich des Regensburger ccRCC/ TT Kollektivs ist hervorzuheben, dass es erfolgreich gelungen ist, das von Vergho et al. [1] vorbeschriebene Modell mit dem dazugehörigen Kombinierten Risikoscore (miR-21, miR-126, miR-221) an einem unabhängigen, vergrößerten Patientenkollektiv zu validieren. Hierdurch konnte einerseits gezeigt werden, dass keine ausgeprägte Überanpassung des Modells vorliegt. Andererseits war es erneut möglich zu demonstrieren, dass ein bekanntes Hochrisikokollektiv von Nierenzellkarzinompatienten mit Infiltration der Vena cava deutliche Heterogenität bezüglich des klinischen Verlaufs aufweist. Das Hochrisikokollektiv konnte zumindest retrospektiv nochmals in eine High-Risk und Low-Risk Gruppe weiter unterteilt werden, die mit dem Überleben der Patienten in Zusammenhang stehen.

4.4.2.3 Gesamtbild

Die vorliegende Arbeit bietet nicht nur einen Überblick über Expressionsmuster in einzelnen Kompartimenten, sondern liefert eine Gesamtbetrachtung und

Erklärungsansätze des Zusammenspiels von miRNA-Expressionsmustern in Gewebe und Serum.

4.5 Klinischer sowie wissenschaftlicher Weit- und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit war es möglich, mehrere Hypothesen zu formulieren, die mittel- bis langfristig das Potential bieten, klinisch relevant zu werden und Ausgangspunkt für weiterführende Forschung zu werden.

4.5.1 Ausblick für das validierte Überlebensklassifikationsmodell

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich das vorbeschriebene Gewebe-basierte miRNA-Überlebensklassifikationsmodell erfolgreich an einem größeren unabhängigen Regensburger ccRCC/ TT Kollektiv anwenden ließ. Im prospektiven Kontext scheint es demnach mittel- bis langfristig durchaus im Rahmen des Möglichen, das validierte Überlebensklassifikationsmodell derart weiterzuentwickeln, dass es supportive klinische Anwendung in der Therapieplanung findet. Das Modell könnte dazu beitragen, ccRCC/ TT Patienten in Risikogruppen aufzuteilen, um Entscheidungen hinsichtlich der Notwendigkeit einer intensivierten Therapie zu treffen. Um dieses Vorhaben in die Realität umzusetzen, wird es einerseits notwendig sein, die Aussagekraft bereits vorliegender Erkenntnisse durch statistische Methoden zu stärken. Andererseits idealer Weise eine sogenannte Machine Learning Pipeline aufzubauen. Pipelines bieten die Möglichkeit, mehrere Schritte in der Datenaufbereitung zu koppeln. Auf diese Weise können Teile des Lernprozesses eines Modells automatisiert werden, um den Aufbau einer größeren Lernbibliothek zu vereinfachen. Auch Personen ohne Programmierkenntnisse könnten sich hierdurch am Prozess beteiligen.

4.5.2 Entwicklung Serum-basierter Überlebensklassifikationsmodelle

Mit Hilfe der Serumuntersuchungen konnte gezeigt werden, dass für mehrere miRNAs signifikante Expressionsunterschiede zwischen einzelnen Probandengruppen bestehen. Basierend auf diesen Erkenntnissen könnte in zukünftigen Arbeiten das Ziel anvisiert werden, Serum-basierte miRNA-Überlebensklassifikationsmodelle beispielsweise mit Hilfe von Machine Learning oder Deep Learning Methoden zu entwickeln.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen der Progression des klarzelliges Nierenzellkarzinoms kann es zur Invasion der Vena cava durch einen Tumorthrombus kommen. Allerdings besteht auch in diesem weit fortgeschrittenen Stadium eine zum Teil deutliche Heterogenität bezüglich des klinischen Verlaufs. Während sich mit bekannten Verfahren die Prognose bislang nur unzureichend vorhersagen ließ, gelang es in Vorarbeiten mittels im Tumorgewebe erfasster miRNA-Expressionen, ein Überlebensklassifikationsmodell auf Basis eines Kombinierten Risikoscores (miR-21, miR-126, miR-221) zu konzipieren. Hierdurch konnte das postoperative Überleben von ccRCC/ TT Patienten des Würzburger Universitätsklinikums retrospektiv vorhergesagt werden.

In der vorliegenden Arbeit war es möglich, mit Hilfe molekularbiologischer sowie biostatistischer Methoden das vorbeschriebene Modell erfolgreich an einem unabhängigen, größeren Regensburger ccRCC/ TT Patientenkollektiv zu validieren. Am Tumor verstorbenen Patienten konnten erneut einer klinisch relevanten High-Risk-Gruppe bzw. einer prognostisch günstigeren Gruppe zugeordnet werden. MiR-21 und miR-126 waren erneut statistisch signifikant mit der Fernmetastasierung und dem tumorbedingten Versterben assoziiert. MiR-21 präsentierte sich sowohl in der am Tumor verstorbenen als auch in der fernmetastasierten Patientengruppe deutlich überexprimiert, während die Expression von miR-126 stark vermindert war. Die neu untersuchte miR-205 zeigte sich in der fernmetastasierten sowie nodal positiven Patientengruppe hochreguliert, ein geringer Zusammenhang mit dem tumorbedingten Versterben konnte hergestellt werden.

Im zweiten Ansatz gelang es relevante miRNA-Expressionsunterschiede zwischen Serum Würzburger ccRCC-Patienten mit und ohne Invasion des Gefäßsystems sowie tumorfreien Kontrollen zu identifizieren. In der Gesamtübersicht war im Serum für miR-21, miR-126, miR-145 und miR-221 ein sog. Upside-Down-Effekt zu beobachten. Während sich diese miRNAs in ccRCC/ woTT Proben gegenüber tumorfreien Probanden zunächst überexprimiert zeigten, sank ihre relative Expression stark ab, sobald der Tumor das Gefäßsystem infiltrierte. Für miR-21 ließ sich hierdurch in ccRCC/ TT- im Vergleich zu ccRCC/ woTT-Proben ein zwischen Serum (supprimiert) und Gewebe (überexprimiert) gegenläufiges Expressionsverhalten identifizieren.

In Würzburger ccRCC/ TT Seren war zudem miR-145 in der nodal positiven Gruppe deutlich überexprimiert. Für alle anderen miRNAs konnten keine signifikanten Assoziationen in Bezug auf klinikopathologische Faktoren festgestellt werden.

Die langfristige Herausforderung besteht darin, das validierte Überlebensklassifikationsmodell für ccRCC/ TT Patienten derart weiterzuentwickeln, dass es supportive klinische Anwendung in der Therapieplanung finden kann. Die Erkenntnisse zu Expressionsunterschieden in Seren bieten ferner eine Grundlage für die Exploration von Serum-miRs als Prognosemarker im ccRCC.

6. Literaturverzeichnis

1. Vergho, D.C., et al., *Impact of miR-21, miR-126 and miR-221 as prognostic factors of clear cell renal cell carcinoma with tumor thrombus of the inferior vena cava*. PLoS One, 2014. **9**(10): p. e109877.
2. Vergho, D., et al., *Combination of expression levels of miR-21 and miR-126 is associated with cancer-specific survival in clear-cell renal cell carcinoma*. BMC Cancer, 2014. **14**: p. 25.
3. Khella, H.W.Z., et al., *Low Expression of miR-126 Is a Prognostic Marker for Metastatic Clear Cell Renal Cell Carcinoma*. The American Journal of Pathology, 2015. **185**(3): p. 693-703.
4. Yoshino, H., et al., *Tumor-suppressive microRNA-143/145 cluster targets hexokinase-2 in renal cell carcinoma*. Cancer Science, 2013. **104**(12): p. 1567-1574.
5. Lu, R., et al., *miR-145 functions as tumor suppressor and targets two oncogenes, ANGPT2 and NEDD9, in renal cell carcinoma*. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 2014. **140**(3): p. 387-397.
6. Lu, G.J., et al., *miRNA-221 promotes proliferation, migration and invasion by targeting TIMP2 in renal cell carcinoma*. Int J Clin Exp Pathol, 2015. **8**(5): p. 5224-9.
7. Szabó, Z., et al., *Expression of miRNA-21 and miRNA-221 in clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) and their possible role in the development of ccRCC*. Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations, 2016. **34**(12): p. 533.e21-533.e27.
8. Kotlyar, M.J., et al., *Critical Evaluation of a microRNA-Based Risk Classifier Predicting Cancer-Specific Survival in Renal Cell Carcinoma with Tumor Thrombus of the Inferior Vena Cava*. Cancers (Basel), 2023. **15**(7).
9. Shi, J., et al., *lncRNA ROR promotes the proliferation of renal cancer and is negatively associated with favorable prognosis*. Mol Med Rep, 2017. **16**(6): p. 9561-9566.
10. Li, C., et al., *The lincRNA-ROR/miR-145 axis promotes invasion and metastasis in hepatocellular carcinoma via induction of epithelial-mesenchymal transition by targeting ZEB2*. Scientific Reports, 2017. **7**(1): p. 4637.
11. Robert-Koch-Institut. *Krebs in Deutschland 2013/2014*. 2017 [cited 2018 21.12]; Available from:

https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2017/kid_2017_c64_niere.pdf?__blob=publicationFile.

12. Znaor, A., et al., *International Variations and Trends in Renal Cell Carcinoma Incidence and Mortality*. European Urology, 2015. **67**(3): p. 519-530.
13. Dal Maso, L., et al., *Renal cell cancer and body size at different ages: an Italian multicenter case-control study*. Am J Epidemiol, 2007. **166**(5): p. 582-91.
14. Samanic, C., et al., *Relation of body mass index to cancer risk in 362,552 Swedish men*. Cancer Causes Control, 2006. **17**(7): p. 901-9.
15. McGuire, B.B. and J.M. Fitzpatrick, *BMI and the risk of renal cell carcinoma*. Curr Opin Urol, 2011. **21**(5): p. 356-61.
16. Chow, W.H., L.M. Dong, and S.S. Devesa, *Epidemiology and risk factors for kidney cancer*. Nat Rev Urol, 2010. **7**(5): p. 245-57.
17. Weikert, S., et al., *Blood pressure and risk of renal cell carcinoma in the European prospective investigation into cancer and nutrition*. Am J Epidemiol, 2008. **167**(4): p. 438-46.
18. Hunt, J.D., et al., *Renal cell carcinoma in relation to cigarette smoking: Meta-analysis of 24 studies*. International Journal of Cancer, 2005. **114**(1): p. 101-108.
19. WHO. *Age-standardized estimates of current tobacco use, tobacco smoking and cigarette smoking*. 2022 [cited 2022 26.09.]; Available from: <https://apps.who.int/gho/data/node.main.TOBAGESTDCURR?lang=en>.
20. Rao, V.M., et al., *Trends in utilization rates of the various imaging modalities in emergency departments: nationwide Medicare data from 2000 to 2008*. J Am Coll Radiol, 2011. **8**(10): p. 706-9.
21. Mathew, A., et al., *Global increases in kidney cancer incidence, 1973-1992*. Eur J Cancer Prev, 2002. **11**(2): p. 171-8.
22. Welch, H.G. and W.C. Black, *Overdiagnosis in cancer*. J Natl Cancer Inst, 2010. **102**(9): p. 605-13.
23. Shuch, B., et al., *Understanding pathologic variants of renal cell carcinoma: distilling therapeutic opportunities from biologic complexity*. Eur Urol, 2015. **67**(1): p. 85-97.
24. Thoenes, W., S. Storkel, and H.J. Rumpelt, *Histopathology and classification of renal cell tumors (adenomas, oncocytomas and carcinomas). The basic cytological and histopathological elements and their use for diagnostics*. Pathol Res Pract, 1986. **181**(2): p. 125-43.

25. Leibovich, B.C., et al., *Histological subtype is an independent predictor of outcome for patients with renal cell carcinoma*. J Urol, 2010. **183**(4): p. 1309-15.
26. The Cancer Genome Atlas Research, N., et al., *Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma*. Nature, 2013. **499**: p. 43.
27. Dalglish, G.L., *Systematic sequencing of renal carcinoma reveals inactivation of histone modifying genes*. Nature, 2010. **463**.
28. Varela, I., et al., *Exome sequencing identifies frequent mutation of the SWI/SNF complex gene PBRM1 in renal carcinoma*. Nature, 2011. **469**(7331): p. 539-42.
29. Gnarra, J.R., et al., *Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma*. Nature Genetics, 1994. **7**: p. 85.
30. Nickerson, M.L., et al., *Improved identification of von Hippel-Lindau gene alterations in clear cell renal tumors*. Clin Cancer Res, 2008. **14**.
31. Noone AM, H.N., Krapcho M, Miller D, Brest A, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds) *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2015*. 2018, National Cancer Institute, Bethesda, MD.
32. Siegel, R., et al., *Cancer statistics, 2014*. CA Cancer J Clin, 2014. **64**(1): p. 9-29.
33. Pichler, M., et al., *Renal cell carcinoma stage migration in a single European centre over 25 years: effects on 5- and 10-year metastasis-free survival*. Int Urol Nephrol, 2012. **44**(4): p. 997-1004.
34. Welch, H.G., L.M. Schwartz, and S. Woloshin, *Are increasing 5-year survival rates evidence of success against cancer?* Jama, 2000. **283**(22): p. 2975-8.
35. Patel, H.D., et al., *Clinical Stage Migration and Survival for Renal Cell Carcinoma in the United States*. European Urology Oncology.
36. Ljungberg, B., et al., *Vein invasion in renal cell carcinoma: impact on metastatic behavior and survival*. J Urol, 1995. **154**(5): p. 1681-4.
37. Hoehn, W. and P. Hermanek, *Invasion of veins in renal cell carcinoma - frequency, correlation and prognosis*. Eur Urol, 1983. **9**(5): p. 276-80.
38. Novick, A.C. and D.M. Cosgrove, *Surgical approach for removal of renal cell carcinoma extending into the vena cava and the right atrium*. J Urol, 1980. **123**(6): p. 947-50.
39. Laird, A., et al., *Differential expression of prognostic proteomic markers in primary tumour, venous tumour thrombus and metastatic renal cell cancer tissue and correlation with patient outcome*. PLoS One, 2013. **8**(4): p. e60483.

40. Haferkamp, A., et al., *Renal cell carcinoma with tumor thrombus extension into the vena cava: prospective long-term followup*. J Urol, 2007. **177**(5): p. 1703-8.
41. Vergho, D.C., et al., *Tumor thrombus of inferior vena cava in patients with renal cell carcinoma - clinical and oncological outcome of 50 patients after surgery*. BMC Res Notes, 2012. **5**: p. 5.
42. Haddad, A.Q., et al., *Oncologic outcomes following surgical resection of renal cell carcinoma with inferior vena caval thrombus extending above the hepatic veins: a contemporary multicenter cohort*. J Urol, 2014. **192**(4): p. 1050-6.
43. Klatter, T., et al., *Prognostic factors for renal cell carcinoma with tumor thrombus extension*. J Urol, 2007. **178**(4 Pt 1): p. 1189-95; discussion 1195.
44. Blute, M.L., et al., *The Mayo Clinic experience with surgical management, complications and outcome for patients with renal cell carcinoma and venous tumour thrombus*. BJU Int, 2004. **94**(1): p. 33-41.
45. Berczi, A., et al., *Surgical Management and Outcome of Renal Cell Carcinoma with Inferior Vena Cava Tumor Thrombus*. Urol Int, 2017. **99**(3): p. 267-271.
46. Hatakeyama, S., et al., *Prognostic benefit of surgical management in renal cell carcinoma patients with thrombus extending to the renal vein and inferior vena cava: 17-year experience at a single center*. BMC Urol, 2013. **13**: p. 47.
47. Sun, M., et al., *Prognostic factors and predictive models in renal cell carcinoma: a contemporary review*. Eur Urol, 2011. **60**(4): p. 644-61.
48. Tilki, D., et al., *Impact of histologic subtype on cancer-specific survival in patients with renal cell carcinoma and tumor thrombus*. Eur Urol, 2014. **66**(3): p. 577-83.
49. Figlin, R.A., et al., *Adjuvant therapy in renal cell carcinoma: does higher risk for recurrence improve the chance for success?* Ann Oncol, 2018. **29**(2): p. 324-331.
50. Meissner, M.A., et al., *Adjuvant therapy for advanced renal cell carcinoma*. Expert Rev Anticancer Ther, 2018. **18**(7): p. 663-671.
51. Rodriguez-Vida, A., M. Strijbos, and T. Hutson, *Predictive and prognostic biomarkers of targeted agents and modern immunotherapy in renal cell carcinoma*. ESMO Open, 2016. **1**(3): p. e000013.
52. Hui, A., et al., *Micro-RNAs as diagnostic or prognostic markers in human epithelial malignancies*. BMC Cancer, 2011. **11**: p. 500.
53. Lu, J., et al., *MicroRNA expression profiles classify human cancers*. Nature, 2005. **435**(7043): p. 834-8.

54. Rosenfeld, N., et al., *MicroRNAs accurately identify cancer tissue origin*. Nat Biotechnol, 2008. **26**(4): p. 462-9.
55. Ge, Y.Z., et al., *A tumor-specific microRNA signature predicts survival in clear cell renal cell carcinoma*. J Cancer Res Clin Oncol, 2015. **141**(7): p. 1291-9.
56. Watson, J.D. and F.H. Crick, *Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid*. Nature, 1953. **171**(4356): p. 737-8.
57. Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros, *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*. Cell, 1993. **75**(5): p. 843-54.
58. Ambros, V., *microRNAs: tiny regulators with great potential*. Cell, 2001. **107**(7): p. 823-6.
59. Xu, W., et al., *Identifying microRNA targets in different gene regions*. BMC Bioinformatics, 2014. **15 Suppl 7**: p. S4.
60. Kim, D.H., et al., *MicroRNA-directed transcriptional gene silencing in mammalian cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(42): p. 16230-5.
61. Place, R.F., et al., *MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(5): p. 1608-13.
62. Majid, S., et al., *MicroRNA-205-directed transcriptional activation of tumor suppressor genes in prostate cancer*. Cancer, 2010. **116**(24): p. 5637-49.
63. Zhang, J., et al., *Oncogenic role of microRNA-532-5p in human colorectal cancer via targeting of the 5'UTR of RUNX3*. Oncol Lett, 2018. **15**(5): p. 7215-7220.
64. Truesdell, S.S., et al., *MicroRNA-mediated mRNA translation activation in quiescent cells and oocytes involves recruitment of a nuclear microRNP*. Sci Rep, 2012. **2**: p. 842.
65. Orom, U.A., F.C. Nielsen, and A.H. Lund, *MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation*. Mol Cell, 2008. **30**(4): p. 460-71.
66. Li, L.C., et al., *Small dsRNAs induce transcriptional activation in human cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(46): p. 17337-42.
67. Dharap, A., et al., *MicroRNA miR-324-3p induces promoter-mediated expression of RelA gene*. PLoS One, 2013. **8**(11): p. e79467.

68. Ha, M. and V.N. Kim, *Regulation of microRNA biogenesis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. **15**(8): p. 509-24.
69. Li, Y. and K.V. Kowdley, *MicroRNAs in common human diseases*. Genomics Proteomics Bioinformatics, 2012. **10**(5): p. 246-53.
70. Ng, R., et al., *A microRNA-21 surge facilitates rapid cyclin D1 translation and cell cycle progression in mouse liver regeneration*. J Clin Invest, 2012. **122**(3): p. 1097-108.
71. Zhang, P., et al., *MiR-155 is a liposarcoma oncogene that targets casein kinase-1 α and enhances β -catenin signaling*. Cancer Res, 2012. **72**(7): p. 1751-62.
72. Lim, L.P., et al., *Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs*. Nature, 2005. **433**: p. 769.
73. John, B., et al., *Human MicroRNA targets*. PLoS Biol, 2004. **2**(11): p. e363.
74. Ameres, S.L. and P.D. Zamore, *Diversifying microRNA sequence and function*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2013. **14**(8): p. 475-88.
75. Ipsaro, J.J. and L. Joshua-Tor, *From Guide to Target: Molecular Insights into Eukaryotic RNAi Machinery*. Nat Struct Mol Biol, 2015. **22**(1): p. 20-8.
76. Wang, Y., et al., *Structure of an argonaute silencing complex with a seed-containing guide DNA and target RNA duplex*. Nature, 2008. **456**(7224): p. 921-6.
77. Song, J.J., et al., *Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity*. Science, 2004. **305**(5689): p. 1434-7.
78. Parker, J.S., S.M. Roe, and D. Barford, *Crystal structure of a PIWI protein suggests mechanisms for siRNA recognition and slicer activity*. Embo j, 2004. **23**(24): p. 4727-37.
79. Sheu-Gruttadauria, J. and I.J. MacRae, *Phase Transitions in the Assembly and Function of Human miRISC*. Cell, 2018. **173**(4): p. 946-957.e16.
80. Schirle, N.T. and I.J. MacRae, *The crystal structure of human Argonaute2*. Science, 2012. **336**(6084): p. 1037-40.
81. Fabian, M.R., et al., *miRNA-mediated deadenylation is orchestrated by GW182 through two conserved motifs that interact with CCR4-NOT*. Nat Struct Mol Biol, 2011. **18**(11): p. 1211-7.
82. Braun, J.E., et al., *GW182 proteins directly recruit cytoplasmic deadenylase complexes to miRNA targets*. Mol Cell, 2011. **44**(1): p. 120-33.

83. Chekulaeva, M., et al., *miRNA repression involves GW182-mediated recruitment of CCR4-NOT through conserved W-containing motifs*. Nat Struct Mol Biol, 2011. **18**(11): p. 1218-26.
84. Kim, V.N., J. Han, and M.C. Siomi, *Biogenesis of small RNAs in animals*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(2): p. 126-39.
85. Huntzinger, E. and E. Izaurralde, *Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay*. Nat Rev Genet, 2011. **12**(2): p. 99-110.
86. Braun, J.E., E. Huntzinger, and E. Izaurralde, *The role of GW182 proteins in miRNA-mediated gene silencing*. Adv Exp Med Biol, 2013. **768**: p. 147-63.
87. Jonas, S. and E. Izaurralde, *Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing*. Nat Rev Genet, 2015. **16**(7): p. 421-33.
88. Braun, J.E., et al., *A direct interaction between DCP1 and XRN1 couples mRNA decapping to 5' exonucleolytic degradation*. Nat Struct Mol Biol, 2012. **19**(12): p. 1324-31.
89. Christie, M., et al., *Structure of the PAN3 pseudokinase reveals the basis for interactions with the PAN2 deadenylase and the GW182 proteins*. Mol Cell, 2013. **51**(3): p. 360-73.
90. Fukaya, T. and Y. Tomari, *MicroRNAs mediate gene silencing via multiple different pathways in drosophila*. Mol Cell, 2012. **48**(6): p. 825-36.
91. Ricci, E.P., et al., *miRNA repression of translation in vitro takes place during 43S ribosomal scanning*. Nucleic Acids Res, 2013. **41**(1): p. 586-98.
92. Zekri, L., D. Kuzuoglu-Ozturk, and E. Izaurralde, *GW182 proteins cause PABP dissociation from silenced miRNA targets in the absence of deadenylation*. Embo j, 2013. **32**(7): p. 1052-65.
93. Mishima, Y., et al., *Translational inhibition by deadenylation-independent mechanisms is central to microRNA-mediated silencing in zebrafish*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(4): p. 1104-9.
94. Ding, X.C. and H. Grosshans, *Repression of C. elegans microRNA targets at the initiation level of translation requires GW182 proteins*. Embo j, 2009. **28**(3): p. 213-22.
95. Mathonnet, G., et al., *MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F*. Science, 2007. **317**(5845): p. 1764-7.

96. Meijer, H.A., et al., *Translational repression and eIF4A2 activity are critical for microRNA-mediated gene regulation*. Science, 2013. **340**(6128): p. 82-5.
97. Pestova, T.V. and V.G. Kolupaeva, *The roles of individual eukaryotic translation initiation factors in ribosomal scanning and initiation codon selection*. Genes Dev, 2002. **16**(22): p. 2906-22.
98. Fukaya, T., H.O. Iwakawa, and Y. Tomari, *MicroRNAs block assembly of eIF4F translation initiation complex in Drosophila*. Mol Cell, 2014. **56**(1): p. 67-78.
99. Fukao, A., et al., *MicroRNAs trigger dissociation of eIF4AI and eIF4AII from target mRNAs in humans*. Mol Cell, 2014. **56**(1): p. 79-89.
100. Chen, C.Y. and A.B. Shyu, *AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation*. Trends Biochem Sci, 1995. **20**(11): p. 465-70.
101. Jing, Q., et al., *Involvement of microRNA in AU-rich element-mediated mRNA instability*. Cell, 2005. **120**(5): p. 623-34.
102. Phillips, K., et al., *Arthritis suppressor genes TIA-1 and TTP dampen the expression of tumor necrosis factor alpha, cyclooxygenase 2, and inflammatory arthritis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(7): p. 2011-6.
103. FitzGerald, G.A., *COX-2 and beyond: Approaches to prostaglandin inhibition in human disease*. Nat Rev Drug Discov, 2003. **2**(11): p. 879-90.
104. Kontoyiannis, D., et al., *Impaired on/off regulation of TNF biosynthesis in mice lacking TNF AU-rich elements: implications for joint and gut-associated immunopathologies*. Immunity, 1999. **10**(3): p. 387-98.
105. Palanisamy, V., et al., *Control of cytokine mRNA expression by RNA-binding proteins and microRNAs*. J Dent Res, 2012. **91**(7): p. 651-8.
106. Galban, S., et al., *Influence of the RNA-binding protein HuR in pVHL-regulated p53 expression in renal carcinoma cells*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(20): p. 7083-95.
107. Mazan-Mamczarz, K., et al., *RNA-binding protein HuR enhances p53 translation in response to ultraviolet light irradiation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(14): p. 8354-9.
108. Bhattacharyya, S.N., et al., *Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress*. Cell, 2006. **125**(6): p. 1111-24.
109. Gagnon, K.T., et al., *RNAi factors are present and active in human cell nuclei*. Cell Rep, 2014. **6**(1): p. 211-21.

110. Jeffries, C.D., H.M. Fried, and D.O. Perkins, *Nuclear and cytoplasmic localization of neural stem cell microRNAs*. *Rna*, 2011. **17**(4): p. 675-86.
111. Robb, G.B., et al., *Specific and potent RNAi in the nucleus of human cells*. *Nat Struct Mol Biol*, 2005. **12**(2): p. 133-7.
112. Liao, J.Y., et al., *Deep sequencing of human nuclear and cytoplasmic small RNAs reveals an unexpectedly complex subcellular distribution of miRNAs and tRNA 3' trailers*. *PLoS One*, 2010. **5**(5): p. e10563.
113. Yi, R., et al., *Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs*. *Genes Dev*, 2003. **17**(24): p. 3011-6.
114. Bohnsack, M.T., K. Czaplinski, and D. Gorlich, *Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs*. *Rna*, 2004. **10**(2): p. 185-91.
115. Castanotto, D., et al., *CRM1 mediates nuclear-cytoplasmic shuttling of mature microRNAs*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(51): p. 21655-9.
116. Wei, Y., et al., *Importin 8 regulates the transport of mature microRNAs into the cell nucleus*. *J Biol Chem*, 2014. **289**(15): p. 10270-5.
117. Weinmann, L., et al., *Importin 8 is a gene silencing factor that targets argonaute proteins to distinct mRNAs*. *Cell*, 2009. **136**(3): p. 496-507.
118. Boshier, J.M., et al., *RNA interference can target pre-mRNA: consequences for gene expression in a Caenorhabditis elegans operon*. *Genetics*, 1999. **153**(3): p. 1245-56.
119. Miao, L., et al., *A dual inhibition: microRNA-552 suppresses both transcription and translation of cytochrome P450 2E1*. *Biochim Biophys Acta*, 2016. **1859**(4): p. 650-62.
120. Calin, G.A., et al., *Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(24): p. 15524-9.
121. Calin, G.A., et al., *Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(9): p. 2999-3004.
122. Volinia, S., et al., *A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(7): p. 2257-61.
123. Esquela-Kerscher, A. and F.J. Slack, *Oncomirs - microRNAs with a role in cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2006. **6**(4): p. 259-69.

124. Swarbrick, A., et al., *miR-380-5p represses p53 to control cellular survival and is associated with poor outcome in MYCN-amplified neuroblastoma*. Nat Med, 2010. **16**(10): p. 1134-40.
125. Hu, W., et al., *Negative regulation of tumor suppressor p53 by microRNA miR-504*. Mol Cell, 2010. **38**(5): p. 689-99.
126. Takamizawa, J., et al., *Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival*. Cancer Res, 2004. **64**(11): p. 3753-6.
127. Ma, L., J. Teruya-Feldstein, and R.A. Weinberg, *Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer*. Nature, 2007. **449**(7163): p. 682-8.
128. Tavazoie, S.F., et al., *Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis*. Nature, 2008. **451**(7175): p. 147-52.
129. Ma, L., et al., *miR-9, a MYC/MYCN-activated microRNA, regulates E-cadherin and cancer metastasis*. Nat Cell Biol, 2010. **12**(3): p. 247-56.
130. Weber, J.A., et al., *The microRNA spectrum in 12 body fluids*. Clin Chem, 2010. **56**(11): p. 1733-41.
131. Gallo, A., et al., *The majority of microRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes*. PLoS One, 2012. **7**(3): p. e30679.
132. Chen, X., et al., *Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases*. Cell Res, 2008. **18**(10): p. 997-1006.
133. Arroyo, J.D., et al., *Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(12): p. 5003-8.
134. Hanke, M., et al., *A robust methodology to study urine microRNA as tumor marker: microRNA-126 and microRNA-182 are related to urinary bladder cancer*. Urol Oncol, 2010. **28**(6): p. 655-61.
135. Mitchell, P.S., et al., *Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(30): p. 10513-8.
136. Cortez, M.A., et al., *MicroRNAs in body fluids--the mix of hormones and biomarkers*. Nat Rev Clin Oncol, 2011. **8**(8): p. 467-77.
137. Rothe, F., et al., *Global microRNA expression profiling identifies MiR-210 associated with tumor proliferation, invasion and poor clinical outcome in breast cancer*. PLoS One, 2011. **6**(6): p. e20980.

138. Jamieson, N.B., et al., *MicroRNA molecular profiles associated with diagnosis, clinicopathologic criteria, and overall survival in patients with resectable pancreatic ductal adenocarcinoma*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(2): p. 534-45.
139. Alencar, A.J., et al., *MicroRNAs are independent predictors of outcome in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(12): p. 4125-35.
140. Li, M., et al., *MicroRNAs in renal cell carcinoma: a systematic review of clinical implications (Review)*. Oncol Rep, 2015. **33**(4): p. 1571-8.
141. Faragalla, H., et al., *The clinical utility of miR-21 as a diagnostic and prognostic marker for renal cell carcinoma*. J Mol Diagn, 2012. **14**(4): p. 385-92.
142. White, N.M., et al., *miRNA profiling for clear cell renal cell carcinoma: biomarker discovery and identification of potential controls and consequences of miRNA dysregulation*. J Urol, 2011. **186**(3): p. 1077-83.
143. Juan, D., et al., *Identification of a microRNA panel for clear-cell kidney cancer*. Urology, 2010. **75**(4): p. 835-41.
144. Redova, M., et al., *Circulating miR-378 and miR-451 in serum are potential biomarkers for renal cell carcinoma*. J Transl Med, 2012. **10**: p. 55.
145. Zhai, Q., et al., *Identification of miR-508-3p and miR-509-3p that are associated with cell invasion and migration and involved in the apoptosis of renal cell carcinoma*. Biochem Biophys Res Commun, 2012. **419**(4): p. 621-6.
146. Zhao, A., et al., *Serum miR-210 as a novel biomarker for molecular diagnosis of clear cell renal cell carcinoma*. Exp Mol Pathol, 2013. **94**(1): p. 115-20.
147. Teixeira, A.L., et al., *Higher circulating expression levels of miR-221 associated with poor overall survival in renal cell carcinoma patients*. Tumour Biol, 2014. **35**(5): p. 4057-66.
148. Wang, C., et al., *A panel of five serum miRNAs as a potential diagnostic tool for early-stage renal cell carcinoma*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 7610.
149. Zhang, W., et al., *MicroRNAs in Serum Exosomes as Potential Biomarkers in Clear-cell Renal Cell Carcinoma*. Eur Urol Focus, 2016.
150. Keck, P., et al., *Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF*. Science, 1989. **246**(4935): p. 1309-1312.
151. Takahashi, H. and M. Shibuya, *The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions*. Clin Sci (Lond), 2005. **109**(3): p. 227-41.

152. Valera, V.A., et al., *Regulatory Effects of microRNA-92 (miR-92) on VHL Gene Expression and the Hypoxic Activation of miR-210 in Clear Cell Renal Cell Carcinoma*. J Cancer, 2011. **2**: p. 515-26.
153. Al-Ali, B.M., et al., *MicroRNAs in renal cell carcinoma: implications for pathogenesis, diagnosis, prognosis and therapy*. Anticancer Res, 2012. **32**(9): p. 3727-32.
154. Maxwell, P.H., et al., *The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis*. Nature, 1999. **399**: p. 271.
155. Carmeliet, P., et al., *Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis*. Nature, 1998. **394**(6692): p. 485-90.
156. Nallamshetty, S., S.Y. Chan, and J. Loscalzo, *Hypoxia: a master regulator of microRNA biogenesis and activity*. Free Radic Biol Med, 2013. **64**: p. 20-30.
157. Lichner, Z., et al., *Pleiotropic action of renal cell carcinoma-dysregulated miRNAs on hypoxia-related signaling pathways*. Am J Pathol, 2012. **180**(4): p. 1675-87.
158. Khella, H.W., et al., *Exploring the role of miRNAs in renal cell carcinoma progression and metastasis through bioinformatic and experimental analyses*. Tumour Biol, 2012. **33**(1): p. 131-40.
159. Marino, A.L., et al., *MicroRNA expression as risk biomarker of breast cancer metastasis: a pilot retrospective case-cohort study*. BMC Cancer, 2014. **14**: p. 739.
160. Liu, Z.-L., et al., *MicroRNA-21 (miR-21) expression promotes growth, metastasis, and chemo- or radioresistance in non-small cell lung cancer cells by targeting PTEN*. Molecular and Cellular Biochemistry, 2013. **372**(1): p. 35-45.
161. Slaby, O., et al., *Altered expression of miR-21, miR-31, miR-143 and miR-145 is related to clinicopathologic features of colorectal cancer*. Oncology, 2007. **72**(5-6): p. 397-402.
162. Bera, A., et al., *microRNA-21-induced dissociation of PDCD4 from rictor contributes to Akt-IKKbeta-mTORC1 axis to regulate renal cancer cell invasion*. Exp Cell Res, 2014. **328**(1): p. 99-117.
163. Zaman, M.S., et al., *Up-regulation of microRNA-21 correlates with lower kidney cancer survival*. PLoS One, 2012. **7**(2): p. e31060.
164. Li, X., et al., *MicroRNA-21 (miR-21) Post-Transcriptionally Downregulates Tumor Suppressor PDCD4 and Promotes Cell Transformation, Proliferation, and*

- Metastasis in Renal Cell Carcinoma*. Cellular Physiology and Biochemistry, 2014. **33**(6): p. 1631-1642.
165. Lv, L., et al., *MicroRNA-21 is Overexpressed in Renal Cell Carcinoma*. The International Journal of Biological Markers, 2013. **28**(2): p. 201-207.
 166. Liu, B., et al., *MiR-126 restoration down-regulate VEGF and inhibit the growth of lung cancer cell lines in vitro and in vivo*. Lung Cancer, 2009. **66**(2): p. 169-75.
 167. Hua, Y., et al., *MicroRNA-126 inhibits proliferation and metastasis in prostate cancer via regulation of ADAM9*. Oncol Lett, 2018. **15**(6): p. 9051-9060.
 168. Zhang, G.M., et al., *MicroRNA-126 inhibits tumor cell invasion and metastasis by downregulating ROCK1 in renal cell carcinoma*. Mol Med Rep, 2016. **13**(6): p. 5029-2036.
 169. Slaby, O., et al., *Identification of MicroRNAs associated with early relapse after nephrectomy in renal cell carcinoma patients*. Genes Chromosomes Cancer, 2012. **51**(7): p. 707-16.
 170. Liu, W., et al., *Pseudohypoxia induced by miR-126 deactivation promotes migration and therapeutic resistance in renal cell carcinoma*. Cancer Lett, 2017. **394**: p. 65-75.
 171. Huang, T., et al., *Long Non-Coding RNA DUXAP8 Enhances Renal Cell Carcinoma Progression via Downregulating miR-126*. Med Sci Monit, 2018. **24**: p. 7340-7347.
 172. Li, Z., et al., *Distinct microRNA expression profiles in acute myeloid leukemia with common translocations*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008. **105**(40): p. 15535-15540.
 173. Sheng, N., et al., *MiR-145 inhibits human colorectal cancer cell migration and invasion via PAK4-dependent pathway*. Cancer Med, 2017. **6**(6): p. 1331-1340.
 174. Wang, W., et al., *Epigenetically regulated miR-145 suppresses colon cancer invasion and metastasis by targeting LASP1*. Oncotarget, 2016. **7**(42): p. 68674-68687.
 175. Chang, Y., et al., *miR-145-5p inhibits epithelial-mesenchymal transition via the JNK signaling pathway by targeting MAP3K1 in non-small cell lung cancer cells*. Oncol Lett, 2017. **14**(6): p. 6923-6928.
 176. Hu, H., et al., *MiR-145 and miR-203 represses TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transition and invasion by inhibiting SMAD3 in non-small cell lung cancer cells*. Lung Cancer, 2016. **97**: p. 87-94.

177. Ozen, M., et al., *Overexpression of miR-145-5p inhibits proliferation of prostate cancer cells and reduces SOX2 expression*. *Cancer Invest*, 2015. **33**(6): p. 251-8.
178. Wang, C., et al., *Tumor-suppressive microRNA-145 induces growth arrest by targeting SENP1 in human prostate cancer cells*. *Cancer Sci*, 2015. **106**(4): p. 375-82.
179. Kou, B., et al., *miR-145 inhibits invasion of bladder cancer cells by targeting PAK1*. *Urol Oncol*, 2014. **32**(6): p. 846-54.
180. Minami, K., et al., *MiR-145 negatively regulates Warburg effect by silencing KLF4 and PTBP1 in bladder cancer cells*. *Oncotarget*, 2017. **8**(20): p. 33064-33077.
181. Zhao, H., et al., *miR-145 suppresses breast cancer cell migration by targeting FSCN-1 and inhibiting epithelial-mesenchymal transition*. *Am J Transl Res*, 2016. **8**(7): p. 3106-14.
182. Boufraqueh, M., et al., *miR-145 suppresses thyroid cancer growth and metastasis and targets AKT3*. *Endocr Relat Cancer*, 2014. **21**(4): p. 517-31.
183. Liu, F., et al., *MicroRNA-138 attenuates epithelial-to-mesenchymal transition by targeting SOX4 in clear cell renal cell carcinoma*. *Am J Transl Res*, 2017. **9**(8): p. 3611-3622.
184. Mikami, S., et al., *Invasion and metastasis of renal cell carcinoma*. *Med Mol Morphol*, 2014. **47**(2): p. 63-7.
185. Piva, F., et al., *Epithelial to Mesenchymal Transition in Renal Cell Carcinoma: Implications for Cancer Therapy*. *Mol Diagn Ther*, 2016. **20**(2): p. 111-7.
186. Doberstein, K., et al., *MicroRNA-145 Targets the Metalloprotease ADAM17 and Is Suppressed in Renal Cell Carcinoma Patients*. *Neoplasia*, 2013. **15**(2): p. IN30-IN31.
187. Wu, H., et al., *MiR-145 is downregulated in human ovarian cancer and modulates cell growth and invasion by targeting p70S6K1 and MUC1*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013. **441**(4): p. 693-700.
188. Karimi Mazraehshah, M., et al., *Anticancer effects of miR-200c in colorectal cancer through BMII*. *J Cell Biochem*, 2018. **119**(12): p. 10005-10012.
189. Hur, K., et al., *MicroRNA-200c modulates epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in human colorectal cancer metastasis*. *Gut*, 2013. **62**(9): p. 1315-26.
190. Song, C., et al., *miR-200c inhibits breast cancer proliferation by targeting KRAS*. *Oncotarget*, 2015. **6**(33): p. 34968-78.

191. Sun, Q., et al., *MiR-200c inhibits autophagy and enhances radiosensitivity in breast cancer cells by targeting UBQLN1*. *Int J Cancer*, 2015. **136**(5): p. 1003-12.
192. Zhou, G., et al., *miR-200c enhances sensitivity of drug-resistant non-small cell lung cancer to gefitinib by suppression of PI3K/Akt signaling pathway and inhibites cell migration via targeting ZEB1*. *Biomed Pharmacother*, 2017. **85**: p. 113-119.
193. Nakada, C., et al., *Genome-wide microRNA expression profiling in renal cell carcinoma: significant down regulation of miR-141 and miR-200c*. *J Pathol*, 2008. **216**.
194. Gao, C., F.H. Peng, and L.K. Peng, *MiR-200c sensitizes clear-cell renal cell carcinoma cells to sorafenib and imatinib by targeting heme oxygenase-1*. *Neoplasma*, 2014. **61**(6): p. 680-689.
195. Ratert, N., et al., *miRNA profiling identifies candidate mirnas for bladder cancer diagnosis and clinical outcome*. *J Mol Diagn*, 2013. **15**(5): p. 695-705.
196. Jing, N., et al., *Expression levels of miR-205 and miR-506 in colon cancer tissues and their relationships with clinicopathological features*. *Oncol Lett*, 2018. **16**(4): p. 4331-4336.
197. Duan, B., et al., *miR-205 as a biological marker in non-small cell lung cancer*. *Biomed Pharmacother*, 2017. **91**: p. 823-830.
198. Tao, Y., et al., *miR-205 regulation of ICT1 has an oncogenic potential via promoting the migration and invasion of gastric cancer cells*. *Biomed Pharmacother*, 2017. **96**: p. 191-197.
199. Vosgha, H., et al., *miR-205 targets angiogenesis and EMT concurrently in anaplastic thyroid carcinoma*. *Endocr Relat Cancer*, 2018. **25**(3): p. 323-337.
200. Kalogirou, C., et al., *MiR-205 is progressively down-regulated in lymph node metastasis but fails as a prognostic biomarker in high-risk prostate cancer*. *Int J Mol Sci*, 2013. **14**(11): p. 21414-34.
201. Pang, H. and X. Yue, *MiR-205 serves as a prognostic factor and suppresses proliferation and invasion by targeting insulin-like growth factor receptor 1 in human cervical cancer*. *Tumour Biol*, 2017. **39**(6): p. 1010428317701308.
202. Ma, Q., et al., *Serum microRNA-205 as a novel biomarker for cervical cancer patients*. *Cancer Cell Int*, 2014. **14**: p. 81.
203. Fang, Z., et al., *Circulating miR-205: a promising biomarker for the detection and prognosis evaluation of bladder cancer*. *Tumour Biol*, 2016. **37**(6): p. 8075-82.

204. Shaker, O., et al., *Role of microRNAs -29b-2, -155, -197 and -205 as diagnostic biomarkers in serum of breast cancer females*. Gene, 2015. **560**(1): p. 77-82.
205. Liu, J., et al., *Analysis of miR-205 and miR-155 expression in the blood of breast cancer patients*. Chin J Cancer Res, 2013. **25**(1): p. 46-54.
206. Zhang, H., et al., *The expression and clinical significance of serum miR-205 for breast cancer and its role in detection of human cancers*. Int J Clin Exp Med, 2015. **8**(2): p. 3034-43.
207. Xu, X.W., et al., *Expression of miR-205 in renal cell carcinoma and its association with clinicopathological features and prognosis*. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018. **22**(3): p. 662-670.
208. Sabry, D., et al., *Role of miRNA-210, miRNA-21 and miRNA-126 as diagnostic biomarkers in colorectal carcinoma: impact of HIF-1alpha-VEGF signaling pathway*. Mol Cell Biochem, 2018.
209. Switlik, W., et al., *miR-30a-5p together with miR-210-3p as a promising biomarker for non-small cell lung cancer: A preliminary study*. Cancer Biomark, 2018. **21**(2): p. 479-488.
210. Greither, T., et al., *Elevated expression of microRNAs 155, 203, 210 and 222 in pancreatic tumors is associated with poorer survival*. Int J Cancer, 2010. **126**(1): p. 73-80.
211. Huang, X., Q.-T. Le, and A.J. Giaccia, *MiR-210 – micromanager of the hypoxia pathway*. Trends in Molecular Medicine, 2010. **16**(5): p. 230-237.
212. Liu, T.Y., et al., *Expression of microRNA-210 in tissue and serum of renal carcinoma patients and its effect on renal carcinoma cell proliferation, apoptosis, and invasion*. Genet Mol Res, 2016. **15**(1): p. 15017746.
213. Redova, M., et al., *MiR-210 expression in tumor tissue and in vitro effects of its silencing in renal cell carcinoma*. Tumour Biol, 2013. **34**(1): p. 481-91.
214. Samaan, S., et al., *miR-210 is a prognostic marker in clear cell renal cell carcinoma*. J Mol Diagn, 2015. **17**(2): p. 136-44.
215. Pineau, P., et al., *miR-221 overexpression contributes to liver tumorigenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(1): p. 264-9.
216. Liang, Y.K., et al., *MiR-221/222 promote epithelial-mesenchymal transition by targeting Notch3 in breast cancer cell lines*. NPJ Breast Cancer, 2018. **4**: p. 20.
217. Qin, J. and M. Luo, *MicroRNA-221 promotes colorectal cancer cell invasion and metastasis by targeting RECK*. FEBS Lett, 2014. **588**(1): p. 99-104.

218. Spahn, M., et al., *Expression of microRNA-221 is progressively reduced in aggressive prostate cancer and metastasis and predicts clinical recurrence*. Int J Cancer, 2010. **127**(2): p. 394-403.
219. Heinzelmann, J., et al., *Specific miRNA signatures are associated with metastasis and poor prognosis in clear cell renal cell carcinoma*. World J Urol, 2011. **29**(3): p. 367-73.
220. Nientiedt, M., et al., *Identification of aberrant tRNA-halves expression patterns in clear cell renal cell carcinoma*. Scientific reports, 2016. **6**: p. 37158-37158.
221. Zaravinos, A., et al., *New miRNA profiles accurately distinguish renal cell carcinomas and upper tract urothelial carcinomas from the normal kidney*. PLoS One, 2014. **9**(3): p. e91646.
222. Dong, P., et al., *miR-34a, miR-424 and miR-513 inhibit MMSET expression to repress endometrial cancer cell invasion and sphere formation*. Oncotarget, 2018. **9**(33): p. 23253-23263.
223. Bagnoli, M., et al., *Identification of a chrXq27.3 microRNA cluster associated with early relapse in advanced stage ovarian cancer patients*. Oncotarget, 2015. **6**(12): p. 9643.
224. Ramraj, S.K., et al., *Serum-circulating miRNAs predict neuroblastoma progression in mouse model of high-risk metastatic disease*. Oncotarget, 2016. **7**(14): p. 18605-19.
225. Gong, A.Y., et al., *MicroRNA-513 regulates B7-H1 translation and is involved in IFN-gamma-induced B7-H1 expression in cholangiocytes*. J Immunol, 2009. **182**(3): p. 1325-33.
226. Thompson, R.H., et al., *Tumor B7-H1 is associated with poor prognosis in renal cell carcinoma patients with long-term follow-up*. Cancer Res, 2006. **66**(7): p. 3381-5.
227. Hamanishi, J., et al., *Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(9): p. 3360-5.
228. Mu, C.Y., et al., *High expression of PD-L1 in lung cancer may contribute to poor prognosis and tumor cells immune escape through suppressing tumor infiltrating dendritic cells maturation*. Med Oncol, 2011. **28**(3): p. 682-8.
229. Chen, J., et al., *Regulation of PD-L1: a novel role of pro-survival signalling in cancer*. Ann Oncol, 2016. **27**(3): p. 409-16.

230. Alsaab, H.O., et al., *PD-1 and PD-L1 Checkpoint Signaling Inhibition for Cancer Immunotherapy: Mechanism, Combinations, and Clinical Outcome*. *Frontiers in Pharmacology*, 2017. **8**(561).
231. Brock, T.D. and H. Freeze, *Thermus aquaticus gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile*. *J Bacteriol*, 1969. **98**(1): p. 289-97.
232. Chien, A., D.B. Edgar, and J.M. Trela, *Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile Thermus aquaticus*. *J Bacteriol*, 1976. **127**(3): p. 1550-7.
233. Saiki, R.K., et al., *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*. *Science*, 1988. **239**(4839): p. 487-91.
234. Mullis, K., et al., *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1986. **51 Pt 1**: p. 263-73.
235. Mullis, K.B. and F.A. Faloon, *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction*. *Methods Enzymol*, 1987. **155**: p. 335-50.
236. Spiegelman, S., K.F. Watson, and D.L. Kacian, *Synthesis of DNA Complements of Natural RNAs: A General Approach*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1971. **68**(11): p. 2843-2845.
237. Shaffer, A.L., W. Wojnar, and W. Nelson, *Amplification, detection, and automated sequencing of gibbon interleukin-2 mRNA by Thermus aquaticus DNA polymerase reverse transcription and polymerase chain reaction*. *Anal Biochem*, 1990. **190**(2): p. 292-6.
238. Chen, C., et al., *Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR*. *Nucleic Acids Res*, 2005. **33**(20): p. e179.
239. Förster, T., *Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz*. *Annalen der Physik*, 1948. **437**(1-2): p. 55-75.
240. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. *J Immunol Methods*, 1983. **65**(1-2): p. 55-63.
241. Das, A.V. and R.M. Pillai, *Implications of miR cluster 143/145 as universal anti-oncomiRs and their dysregulation during tumorigenesis*. *Cancer Cell Int*, 2015. **15**: p. 92.
242. Virtanen, P., et al., *SciPy 1.0: fundamental algorithms for scientific computing in Python*. *Nature Methods*, 2020. **17**(3): p. 261-272.

243. Robin, X., et al., *pROC: an open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves*. BMC Bioinformatics, 2011. **12**: p. 77.
244. Newcombe, R.G., *Two-sided confidence intervals for the single proportion: comparison of seven methods*. Statistics in medicine, 1998. **17**(8): p. 857-872.
245. Wilson, E.B., *Probable Inference, the Law of Succession, and Statistical Inference*. Journal of the American Statistical Association, 1927. **22**(158): p. 209-212.
246. Davidson-Pilon, C. *lifelines Documentation*. 2020 [cited 2020 14.04.20]; 0.24.4:[Available from: <https://lifelines.readthedocs.io/en/latest/#>].
247. Rini, B.I., S.C. Campbell, and B. Escudier, *Renal cell carcinoma*. Lancet, 2009. **373**(9669): p. 1119-32.
248. Nicoli, S., et al., *MicroRNA-mediated integration of haemodynamics and Vegf signalling during angiogenesis*. Nature, 2010. **464**: p. 1196.
249. Huang, J., et al., *miRNA-205-5p functions as a tumor suppressor by negatively regulating VEGFA and PI3K/Akt/mTOR signaling in renal carcinoma cells*. Oncol Rep, 2019. **42**(5): p. 1677-1688.
250. Wang, H., et al., *miR-205 suppresses cell proliferation, invasion, and metastasis via regulation of the PTEN/AKT pathway in renal cell carcinoma*. Mol Med Rep, 2016. **14**(4): p. 3343-9.
251. Petrozza, V., et al., *Oncogenic MicroRNAs Characterization in Clear Cell Renal Cell Carcinoma*. Int J Mol Sci, 2015. **16**(12): p. 29219-25.
252. Carlsson, J., et al., *The potential role of miR-126, miR-21 and miR-10b as prognostic biomarkers in renal cell carcinoma*. Oncol Lett, 2019. **17**(5): p. 4566-4574.
253. Kelly, B.D., et al., *A Circulating MicroRNA Signature as a Biomarker for Prostate Cancer in a High Risk Group*. J Clin Med, 2015. **4**(7): p. 1369-79.
254. Dias, F., et al., *Plasmatic miR-210, miR-221 and miR-1233 profile: potential liquid biopsies candidates for renal cell carcinoma*. Oncotarget, 2017. **8**(61): p. 103315-103326.
255. Fernandes, J.C.R., et al., *Long Non-Coding RNAs in the Regulation of Gene Expression: Physiology and Disease*. Noncoding RNA, 2019. **5**(1).
256. Xue, M., Y. Zhuo, and B. Shan, *MicroRNAs, Long Noncoding RNAs, and Their Functions in Human Disease*. Methods Mol Biol, 2017. **1617**: p. 1-25.

257. Wu, Y., et al., *A serum-circulating long noncoding RNA signature can discriminate between patients with clear cell renal cell carcinoma and healthy controls*. *Oncogenesis*, 2016. **5**: p. e192.
258. Hansen, T.B., et al., *Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges*. *Nature*, 2013. **495**(7441): p. 384-8.
259. Dhir, A., et al., *Microprocessor mediates transcriptional termination of long noncoding RNA transcripts hosting microRNAs*. *Nat Struct Mol Biol*, 2015. **22**(4): p. 319-27.
260. Zhang, M., et al., *FSCN1 predicts survival and is regulated by a PI3K-dependent mechanism in renal cell carcinoma*. *J Cell Physiol*, 2018. **233**(6): p. 4748-4758.
261. Zhang, Y., et al., *MicroRNA-145 inhibits migration and invasion via inhibition of fascin 1 protein expression in non-small-cell lung cancer cells*. *Mol Med Rep*, 2015. **12**(4): p. 6193-8.
262. Chen, J.-j., et al., *Reverse Correlation between MicroRNA-145 and FSCN1 Affecting Gastric Cancer Migration and Invasion*. *PLOS ONE*, 2015. **10**(5): p. e0126890.
263. Wu, D., et al., *microRNA145 inhibits cell proliferation, migration and invasion by targeting matrix metalloproteinase-11 in renal cell carcinoma*. *Mol Med Rep*, 2014. **10**(1): p. 393-8.
264. Yuan, H., et al., *Downregulation of PDCD4 by miR-21 suppresses tumor transformation and proliferation in a nude mouse renal cancer model*. *Oncol Lett*, 2017. **14**(3): p. 3371-3378.
265. Ma, X., et al., *Loss of the miR-21 allele elevates the expression of its target genes and reduces tumorigenesis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(25): p. 10144-9.
266. Wu, Y.R., et al., *MicroRNA-21 promotes cell proliferation, migration, and resistance to apoptosis through PTEN/PI3K/AKT signaling pathway in esophageal cancer*. *Tumour Biol*, 2016. **37**(9): p. 12061-12070.
267. He, W., et al., *MiR-21 is required for anti-tumor immune response in mice: an implication for its bi-directional roles*. *Oncogene*, 2017. **36**(29): p. 4212-4223.
268. Folberg, R. and A.J. Maniotis, *Vasculogenic mimicry*. *Apmis*, 2004. **112**(7-8): p. 508-25.
269. Bai, J., et al., *TR4 nuclear receptor promotes clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) vasculogenic mimicry (VM) formation and metastasis via altering the miR490-3p/vimentin signals*. *Oncogene*, 2018. **37**(44): p. 5901-5912.

270. Zhou, L., et al., *The Presence of Vascular Mimicry Predicts High Risk of Clear Cell Renal Cell Carcinoma after Radical Nephrectomy*. The Journal of Urology, 2016. **196**(2): p. 335-342.
271. Akaike, H., *A new look at the statistical model identification*. IEEE Transactions on Automatic Control, 1974. **19**(6): p. 716-723.
272. Heinze, G. and M. Schemper, *A solution to the problem of monotone likelihood in Cox regression*. Biometrics, 2001. **57**(1): p. 114-9.

Appendix

Zu Subkapitel 3.1.5.2: Fernmetastasierung in der Cox-Regressionsanalyse

Die Fernmetastasierung (synchron und metachron) nimmt in der Cox-Regressionsanalyse von Subkapitel 3.1.5.2 eine Sonderstellung ein (Tabelle 6). Aufgrund dessen, dass bei 100 % der Patienten, die einen tumorbedingten Tod erlitten haben, im Verlauf des Follow-ups Fernmetastasen diagnostiziert wurden und folglich kein Patient beobachtet wurde, der keine Fernmetastasen entwickelt hat und im Verlauf am Tumor verstarb, kommt es zu einer sogenannten quasi-vollständigen Trennung des Datensatzes. Für die Hazard Ratio ergibt sich im vorliegenden Fall ein unendlich positiver Wert. Es gibt mehrere Möglichkeiten wie man mit diesem statistischen Problem umgehen kann. Die Aufarbeitung all dieser Möglichkeiten sprengt den Rahmen dieser Arbeit und ist in Bezug auf die Beantwortung der zugrundeliegenden Fragestellungen nicht zielführend. Bei näherem Interesse bietet die Arbeit von Heinze und Schemper [272] weiterführende detaillierte Informationen zu dieser Thematik.

Aufgrund dessen, dass die Errechnung eines β -Koeffizienten und der Hazard Ratio für den Faktor der Fernmetastasierung nicht ausschlaggebend für die Beantwortung der Fragestellungen dieser Arbeit ist, wird sich an dieser Stelle der Möglichkeit bedient, von der quasi-vollständigen Trennung und den damit einhergehenden statistischen Folgen zu berichten und auf weiterführende mathematische Anpassungen zur Umgehung dieser Problematik verzichtet. Ferner lässt sich mit Hilfe eines Exakten Fisher-Tests zeigen, dass im am Tumor verstorbenem Patientenkollektiv bei statistisch signifikant ($p = 1e-7$) mehr Patienten im Verlauf des Follow-ups Fernmetastasen diagnostiziert werden konnten (Abbildung 39).

CRD - Fernmetastasierung

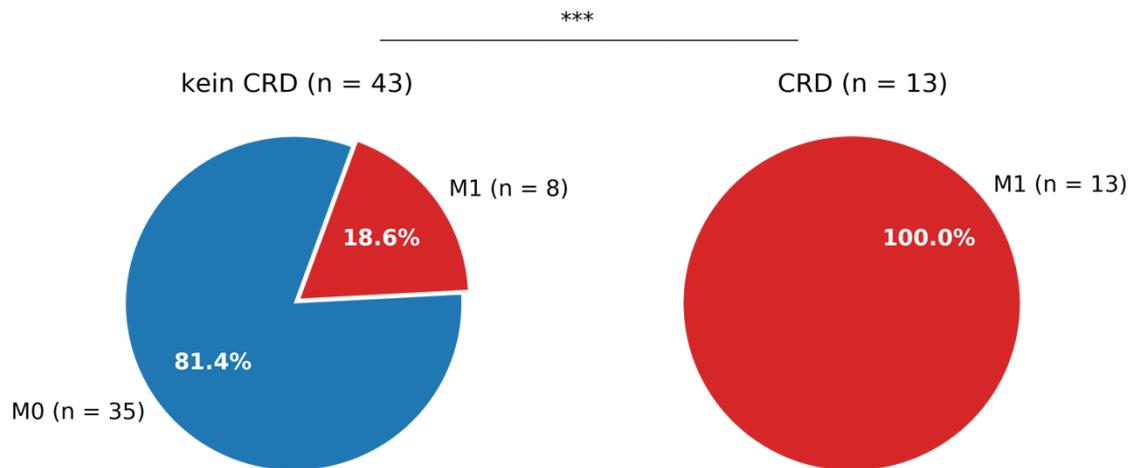


Abbildung 39: Kuchendiagramme zur Darstellung der Verteilung der Fernmetastasierung (synchron und metachron) zwischen Regensburger ccRCC/ TT Patienten, die einen tumorbedingten Tod erlitten ($n_{\text{CRD}} = 13$; $n_{\text{M1}} = 13 \triangleq 100\%$) und denjenigen, die nicht am Tumor verstarben ($n_{\text{kein CRD}} = 43$; $n_{\text{M1}} = 8 \triangleq 18,6\%$, $n_{\text{M0}} = 35 \triangleq 81,4\%$).

Statistik: Exakter Fisher-Test – für $p < 0,001$ mit (***) markiert.

I Abkürzungsverzeichnis

A

Ago: Argonaut Protein

AIC: Akaike Information Criterion

ANOVA: Analysis of Variance

ARE: Adenosin- und Uridin-reiches Element

B

BAP1: BRCA1 associated protein-1

BC: Blasenkarzinom

B-CLL: Chronisch Lymphatische B-Zell Leukämie

C

Cas9: CRISPR associated protein 9

CBF-AML: Core Binding Factor Acute Myeloid Leukemia

CCR4-NOT: CCR4-NOT transcription complex subunit 1

ccRCC: klarzelliges Nierenzellkarzinom

cDNA: complementary DNA

CI: Confidence Interval/ Konfidenzintervall

COX: Cyclooxygenase

CRD: Tumorbedingter Tod

CRISPR: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

CRS: Kombiniertes Risiko-Score

D

DNA: deoxyribonucleic acid

E

eIF4F: eukaryotic initiation factor 4F

EMT: Epithelio-Mesenchymale Transition

F

FRET: Förster-Resonanzenergietransfer

FSCN-1: Fascin actin-bundling protein 1

G

G: Grading

GTP: Guanosintriphosphat

GW182: Glycin(G)-Tryptophan(W)-182

H

HIF: Hypoxie-induzierbarer Faktor

I

IPO8: Importin-8

K

KM: Kaplan-Meier

L

lncRNA: Long non-coding RNA

M

MDM2: Murine Double Minute 2 Homolog

MID: middle

miRISC: microRNA-induced silencing complex

miRNA: microRNA

MMP: Matrix-Metalloprotease

mRNA: messenger RNA

mTOR: mechanistic Target of Rapamycin

MTT: (4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)

N

ncRNA: nicht-kodierende RNA

NK: Natürliche Killer-T-Zellen

NSCLC: Nicht-kleinzelliges Bronchial-Karzinom

nt: Nukleotide

O

OS: Gesamtüberleben

P

PABPC: Poly(A)-binde-Proteine

PAZ: PIWI-Argonaut-Zwille

PBRM1: Polybromo 1

PCR: Polymerase-Kettenreaktion

PD-1: Programmed Death-1

PDCD: Programmed Cell Death

PDGFA: Platelet-Derived Growth Factor Alpha

PDGFB: Platelet-Derived Growth Factors B

PDGFC: Platelet-Derived Growth Factors C

PD-L1: Programmed Death-Ligand-1

PGE: Prostaglandin

PI3K: Phosphoinositid-3-Kinasen

PIWI: P-element Induced Wimpy testis

pre-miRNA: microRNA Vorläufer

pri-miRNA: primärer microRNA Transkript

PTEN: Phosphatase and Tensin homolog

Q

qPCR: Real Time Quantitative PCR

qRT-PCR: Quantitative reverse transcription PCR

R

Ran: RAs-related Nuclear protein
RCC: Nierenzellkarzinom
RISC: RNA-induced silencing complex
RNA: ribonucleic acid
RNAi: RNA-Interferenz
RNase: Ribonuklease
ROR: Regulator of Reprogramming

S

SETD2: SET domain containing 2
siRNA: small interfering RNA

T

Taq-Polymerase: Thermus aquanticus Polymerase
TNF: Tumornekrosefaktor
TTP: Tristetraprolin
TYMS: Thymidylate Synthase

U

UTR: untranslatierte Region

V

VHL: von-Hippel-Lindau

W

WT: Wild-Typ

X

XPO1: Exportin-1
XRN1: Exoribonuklease 1

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: miRNA-Reifungsprozess (Biogenese).....	5
Abbildung 2: Herunterregulierung von Genen durch miRNAs.....	9
Abbildung 3: Heatmap zur Darstellung verfügbarer Messergebnisse relativer miRNA- Expressionen aus paraffin-eingebettetem Tumormaterial Regensburger ccRCC/ TT Patienten.....	33
Abbildung 4: Heatmap zur Darstellung verfügbarer Follow-up Daten für das ccRCC/ TT Kollektiv, die uns durch das Regensburger Caritas Krankenhaus St. Josef zur Verfügung gestellt wurden.....	34
Abbildung 5a: (A) Kuchendiagramm – Regensburger ccRCC/ TT Patienten mit ($n_{M1} = 21$) und ohne ($n_{M0} = 35$) Fernmetastasen (synchron und metachron); (B - E) Box-Whisker-Plots – relative miRNA-Expressionsunterschiede im Paraffin-eingebetteten Tumormaterial (miR- 21, -126, -145 und -200c) zwischen der M1- und M0-Subgruppe.	36
Abbildung 5b: (F - H) Box-Whisker-Plots – relative miRNA-Expressionsunterschiede im Paraffin- eingebetteten Tumormaterial (miR-205, -221, -513) zwischen der M1- ($n_{M1} = 21$) und M0- ($n_{M0} = 35$) Subgruppe des Regensburger ccRCC/ TT Kollektivs.	37
Abbildung 6a: (A) Kuchendiagramm – Regensburger ccRCC/ TT Patienten mit ($n_{N+} = 11$) und ohne ($n_{N0} = 45$) Lymphknotenmetastasen; (B - E) Box-Whisker-Plots – relative miRNA- Expressionsunterschiede im Paraffin-eingebetteten Tumormaterial (miR-21, -126, -145 und -200c) zwischen der N+- und N0-Subgruppe.	38
Abbildung 6b: (F - H) Box-Whisker-Plots – relative miRNA-Expressionsunterschiede im Paraffin- eingebetteten Tumormaterial (miR-205, -221, -513) zwischen der N+- ($n_{N+} = 11$) und N0- ($n_{N0} = 45$) Subgruppe des Regensburger ccRCC/ TT Kollektivs.	39
Abbildung 7a: (A) Kuchendiagramm – Regensburger ccRCC/ TT Patienten mit dem Grading 3 ($n_{G3} = 15$) und 2 ($n_{G2} = 41$) nach Fuhrman; (B - E) Box-Whisker-Plots – relative miRNA- Expressionsunterschiede im Paraffin-eingebetteten Tumormaterial (miR-21, -126, -145 und -200c) zwischen der G3- und G2-Subgruppe.	40
Abbildung 7b: (F - H) Box-Whisker-Plots – relative miRNA-Expressionsunterschiede im Paraffin- eingebetteten Tumormaterial (miR-205, -221, -513) zwischen der G3- ($n = 15$) und G2- (n $= 41$) Subgruppe des Regensburger ccRCC/ TT Kollektivs.	41
Abbildung 8a: (A) Kuchendiagramm – Regensburger ccRCC/ TT Patienten, die im Verlauf des Follow-ups verstorben sind ($n_{\text{verstorben}} = 29$) und denjenigen, die am Leben blieben ($n_{\text{lebt}} =$ 27); (B - E) Box-Whisker-Plots – relative miRNA-Expressionsunterschiede von miR-21, - 126, -145 und -200c im Paraffin-eingebetteten Tumormaterial.	42

Abbildung 8b: (F - H) Box-Whisker-Plots – relative miRNA-Expressionsunterschiede von miR-205, miR-221 und miR-513 im Paraffin-eingebetteten Tumormaterial Regensburger ccRCC/ TT Patienten, die im Verlauf des Follow-ups verstorben sind ($n_{\text{verstorben}} = 29$) und denjenigen, die überlebten ($n_{\text{lebt}} = 27$).	43
Abbildung 9a: (A) Kuchendiagramm – Regensburger ccRCC/ TT Patienten, die im Verlauf des Follow-ups einen tumorbedingten Tod (CRD) erlitten ($n_{\text{CRD}} = 13$) und Patienten, die nicht am Tumor verstarben ($n_{\text{kein CRD}} = 43$); (B - E) Box-Whisker-Plots – relative miRNA-Expressionsunterschiede von miR-21, -126, -145 und -200c im Paraffin-eingebetteten Tumormaterial.	44
Abbildung 9b: (F - H) Box-Whisker-Plots – relative miRNA-Expressionsunterschiede von miR-205, -221, -513 im Paraffin-eingebetteten Tumormaterial Regensburger ccRCC/ TT Patienten, die im Verlauf des Follow-ups einen tumorbedingten Tod (CRD) erlitten ($n_{\text{CRD}} = 13$) und Patienten, die nicht am Tumor verstarben ($n_{\text{kein CRD}} = 43$).	45
Abbildung 10: Übersicht über Follow-up-bezogene relative miRNA-Expressionsunterschiede (synchrone und metachrone Metastasierung (M), Lymphknotenstatus (N), Graduierung nach Fuhrman (G)) im Paraffin-eingebetteten Tumorgewebe innerhalb des Regensburger ccRCC/ TT-Kollektivs.	46
Abbildung 11: Übersicht über Follow-up-bezogene relative miRNA-Expressionsunterschiede (CRD, Gesamtüberleben) im Paraffin-eingebetteten Tumorgewebe innerhalb des Regensburger ccRCC/ TT Kollektivs.	47
Abbildung 12: Kaplan-Meier (KM) Überlebensanalyse für tumorspezifisches Überleben (CSS) von ccRCC/ TT Patienten aus der Studie von Verghe et al. [1] (A; $n=37$) sowie die aktuellen Validierungsergebnisse für das Regensburger ccRCC/ TT Kollektiv (B; $n = 54$), aufgeteilt mit Hilfe des Kombinierten Risikoscores (CRS: miR-21, miR-126, miR-221) und des Schwellenwerts von $18,7 \Delta\text{Ct}$.	49
Abbildung 13: Kuchendiagramm – Serumproben Würzburger Probanden ($n = 114$).	54
Abbildung 14: Heatmap zur Darstellung verfügbarer Follow-up Daten Würzburger ccRCC Patienten ($n = 69$) – 35 mit ccRCC/ woTT und 34 mit ccRCC/ TT.	55
Abbildung 15: Heatmap zur Darstellung verfügbarer Messergebnisse relativer miRNA-Expressionen aus Seren Würzburger Probanden.	57
Abbildung 16: Relative miR-21 Expressionsunterschiede zwischen Würzburger Probandenseren.	59
Abbildung 17: Relative miR-126 Expressionsunterschiede zwischen Würzburger Probandenseren.	60
Abbildung 18: Relative miR-145 Expressionsunterschiede zwischen Würzburger Probandenseren.	61

Abbildung 19: Relative miR-210 Expressionsunterschiede zwischen Würzburger Probandenseren.	62
Abbildung 20: Relative miR-221 Expressionsunterschiede zwischen Würzburger Probandenseren.	63
Abbildung 21: Upside-Down-Effekt – relative miRNA-Expressionsunterschiede zwischen Seren von ccRCC/ woTT (woTT) und ccRCC/ TT (TT) Patienten sowie tumorfreien Probanden (TF).	65
Abbildung 22: Kuchendiagramm – Würzburger ccRCC Patienten (ccRCC/ TT: $n_{TT} = 34$ und ccRCC/ woTT: $n_{woTT} = 35$).	66
Abbildung 23a: (A) Kuchendiagramm – Fallzahlen Würzburger ccRCC Patienten mit ($n_{M1} = 20$) und ohne ($n_{M0} = 49$) synchrone Metastasierung; (B - C) Box-Whisker-Plots – relative Expression von miR-21 und -126 im Serum dieser Subgruppen.	67
Abbildung 23b: (D – F) Box-Whisker-Plots – relative Expression von miR-145, -210 und -221 im Serum Würzburger ccRCC Patienten mit ($n_{M1} = 20$) / ohne ($n_{M0} = 49$) synchrone Metastasen.	68
Abbildung 24a: (A) Kuchendiagramm – Fallzahlen Würzburger ccRCC-Patienten mit ($n_{N+} = 9$) und ohne ($n_{N0} = 60$) Lymphknotenmetastasen; (B - C) Box-Whisker-Plots – relative Expression von miR-21 und -126 im Serum dieser Subgruppen.	69
Abbildung 24b: (D – F) Box-Whisker-Plots – relative Expression von miR-145, miR-210 und miR-221 im Serum Würzburger ccRCC Patienten mit ($n_{N+} = 9$) und ohne ($n_{N0} = 60$) Lymphknotenmetastasen.	70
Abbildung 25a: (A) Kuchendiagramm – Fallzahlen Würzburger ccRCC Patienten, die dem Grading nach Fuhrman zugeordnet wurden ($n_{G1} = 2$, $n_{G2} = 48$, $n_{G3} = 18$, $n_{G4} = 1$); (B - C) Box-Whisker-Plots – relative Expression von miR-21 und -126 im Serum dieser Subgruppen.	71
Abbildung 25b: (D - F): Box-Whisker-Plots – relative Expression von miR-145, -210 und -221 im Serum Würzburger ccRCC-Patienten, die dem Grading nach Fuhrman zugeordnet wurden ($n_{G1} = 2$, $n_{G2} = 48$, $n_{G3} = 18$, $n_{G4} = 1$).	72
Abbildung 26a: (A) Kuchendiagramm – Fallzahlen Würzburger ccRCC Patienten, die im Verlauf des Follow-ups einen tumorbedingten Tod (CRD) erlitten ($n_{CRD} = 12$) und denjenigen, die nicht am Tumor verstarben ($n_{kein\ CRD} = 52$); (B - C) Box-Whisker-Plots – relative Expressionen von miR-21 und miR-126 im Serum dieser Gruppen.	73
Abbildung 26b: (D - F) Box-Whisker-Plots – relative Expressionen von miR-145, miR-210 und miR-221 im Serum Würzburger ccRCC Probanden, die im Verlauf des Follow-ups einen tumorbedingten Tod (CRD) erlitten ($n_{CRD} = 12$) im Vergleich zu denjenigen, die nicht am Tumor verstarben ($n_{kein\ CRD} = 52$).	74

Abbildung 27a: (A) Kuchendiagramm – Fallzahlen Würzburger ccRCC-Patienten, die im Verlauf des Follow-ups verstarben ($n_{\text{verstorben}} = 20$) und denjenigen, die überlebten ($n_{\text{lebt}} = 44$); (B - C) Box-Whisker-Plots – relative Expressionen von miR-21, miR-126 im Serum dieser Subgruppen.	75
Abbildung 27b: (D - F) Box-Whisker-Plots – relative Expressionen von miR-145, miR-210 und miR-221 im Serum Würzburger ccRCC Probanden, die während des Follow-ups verstarben ($n_{\text{verstorben}} = 20$) und denjenigen, die am Leben blieben ($n_{\text{lebt}} = 44$).	76
Abbildung 28a: (A) Kuchendiagramm – Fallzahlen Würzburger ccRCC/ TT Patienten mit ($n_{M1} = 16$) und ohne ($n_{M0} = 18$) synchrone Metastasierung; (B - C) Box-Whisker-Plots – relative Expressionen von miR-21 und -126 in Seren dieser Subgruppen.....	81
Abbildung 28b: (D - F) Box-Whisker-Plots – relative Expressionen von miR-145, miR-210 und miR-221 im Serum Würzburger ccRCC/ TT Patienten mit ($n_{M1} = 16$) und ohne ($n_{M0} = 18$) synchrone Metastasen.....	82
Abbildung 29: (A) Kuchendiagramm – Würzburger ccRCC/ TT Patienten mit ($n_{N+} = 8$) und ohne ($n_{N0} = 26$) Lymphknoten-metastasen; (B - F) Box-Whisker-Plots – relative Expressionen von miR-21, miR-126, miR-145, miR-210, miR-221 im Serum dieser Gruppen.....	83
Abbildung 30a: (A) Kuchendiagramm – Fallzahlen Würzburger ccRCC/ TT Patienten, die dem Grading nach Fuhrman ($n_{G2} = 19$, $n_{G3} = 14$, $n_{G4} = 1$) zugeordnet wurden; (B - C) Box-Whisker-Plots – relative Expressionen von miR-21 und miR-126 im Serum dieser Subgruppen.	84
Abbildung 30b: (D - F): Box-Whisker-Plots – relative Expressionen von miR-145, miR-210 und miR-221 im Serum Würzburger ccRCC/ TT Patienten, die dem Grading nach Fuhrman zugeordnet wurden ($n_{G2} = 19$, $n_{G3} = 14$, $n_{G4} = 1$).....	85
Abbildung 31a: (A) Kuchendiagramm – Fallzahlen von ccRCC/ TT Patienten, die im Verlauf des Follow-ups einen tumorbedingten Tod erlitten ($n_{\text{CRD}} = 10$) und denjenigen, die nicht am Tumor verstarben ($n_{\text{kein CRD}} = 23$); (B - C) Box-Whisker-Plots – relative Expressionen von miR-21 und miR-126 im Serum dieser Gruppen.	86
Abbildung 31b: (D - F) Box-Whisker-Plots – relative Expressionen von miR-145, miR-210 und miR-221 im Serum Würzburger ccRCC/ TT Probanden, die im Verlauf des Follow-ups einen tumorbedingten Tod erlitten ($n_{\text{CRD}} = 10$) und denjenigen, die nicht am Tumor starben ($n_{\text{kein CRD}} = 23$).	87
Abbildung 32: Säulendiagramm zur Darstellung von Ergebnissen der MTT-Tests als Anteil vitaler 786-O-Zellen nach Transfektion mit mirVana™ miR-21, miR-126 oder miR-221 im Vergleich zu Kontrolltransfektionen mit Pre-miR™ negative control (Kontrolle $\triangleq 1$).	91

Abbildung 33: Säulendiagramm zur Darstellung von Ergebnissen der MTT-Tests als Anteil vitaler ACHN-Zellen nach Transfektion mit mirVana™ miR-21, miR-126 oder miR-221 im Vergleich zu Kontrolltransfektionen mit Pre-miR™ negative control (Kontrolle $\triangleq 1$).	92
Abbildung 34: Upside-Down-Effekt - miRNA-Expressionsunterschiede zwischen Seren von ccRCC/ woTT- (woTT) und ccRCC/ TT- (TT) Patienten sowie tumorfreien Probanden (TF)	101
Abbildung 35: Veranschaulichung von miRNA-Expressionsunterschieden im Gewebe (links) und Serum (rechts) von ccRCC/ woTT gegenüber tumorfreien Proben (TF).	103
Abbildung 36: Veranschaulichung von miRNA-Expressionsunterschieden im Gewebe (links) und Serum (rechts) von ccRCC/ TT gegenüber ccRCC/ woTT (woTT) Proben.	104
Abbildung 37: Veranschaulichung von miRNA- Expressionsunterschieden im Gewebe (links) und Serum (rechts) von ccRCC/ TT gegenüber ccRCC/ woTT Proben (woTT) sowie eines möglichen hemmenden Wirkmechanismus durch LncRNA-ROR.	109
Abbildung 38: Schematische Darstellung eines möglichen dualistischen Wirkmechanismus von miR-21 als Onco-miR und Protect-miR und daraus resultierende Effekte	111
Abbildung 39: Kuchendiagramme zur Darstellung der Verteilung der Fernmetastasierung (synchron und metachron) zwischen Regensburger ccRCC/ TT Patienten, die einen tumorbedingten Tod erlitten ($n_{\text{CRD}} = 13$; $n_{\text{M1}} = 13 \triangleq 100\%$) und denjenigen, die nicht am Tumor verstarben ($n_{\text{kein CRD}} = 43$; $n_{\text{M1}} = 8 \triangleq 18,6\%$, $n_{\text{M0}} = 35 \triangleq 81,4\%$).	140

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Untersuchte miRNAs im Paraffingewebe Regensburger ccRCC/ TT Patienten (links) sowie Seren Würzburger ccRCC Patienten und tumorfreier Probanden (rechts)	25
Tabelle 2: Darstellung eines Beispiels von MTT-Testergebnissen	27
Tabelle 3: Übersicht über das Regensburger ccRCC/ TT Kollektiv ($n = 56$)	32
Tabelle 4: Follow-up nach 5 und 10 Jahren, Aufteilung der Patienten nach individuellem Verlauf in die Kategorien „kein CRD“, „CRD“ und „lost to follow-up“.	50
Tabelle 5: Errechnete Follow-up Raten für das gesamte Regensburger ccRCC/ TT Kollektiv, die Low-Risk- sowie die High-Risk-Gruppe nach 5 und 10 Jahren Beobachtungszeit.	50
Tabelle 6: Ergebnisse der univariaten Cox-Regression von klinikopathologischen Faktoren und miRNAs in Bezug auf den tumorbedingten Tod (CRD) der Regensburger ccRCC/ TT Patienten.	52
Tabelle 7: Übersicht über Würzburger ccRCC Probanden.	56

Tabelle 8: Übersicht über relative miRNA-Expressionsunterschiede zwischen Serumgruppen des Würzburger Kollektivs	64
Tabelle 9: Übersicht über relevante Zusammenhänge zwischen relativen miRNA-Expressionen in Seren und Follow-up Parametern Würzburger ccRCC Patienten.....	77
Tabelle 10: Ergebnisse der univariaten Cox-Regression für Würzburger ccRCC Patienten – klinikopathologische Faktoren und miRNAs in Bezug auf den tumorbedingten Tod (CRD).	78
Tabelle 11: Übersicht über Follow-up Daten Würzburger ccRCC/ TT Patienten.	80
Tabelle 12: Übersicht über relevante Assoziationen zwischen relativen miRNA-Expressionen in Seren und Follow-up Parametern Würzburger ccRCC/ TT Patienten.....	88
Tabelle 13: Ergebnisse der univariaten Cox-Regression für Würzburger ccRCC/ TT Patienten – klinikopathologische Faktoren und miRNAs in Bezug auf den tumorbedingten Tod.....	89

IV Danksagung

An dieser Stelle möchte ich denjenigen Personen meinen Dank aussprechen, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation maßgeblich unterstützt haben.

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Hubertus Riedmiller und Herrn Prof. Dr. med. Hubert Kübler für die Überlassung des Themas sowie Schaffung und Aufrechterhaltung der Rahmenbedingungen dieser Arbeit bedanken.

Ein großer Dank gilt auch Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Daniel Vergho, mit dessen Unterstützung ich überhaupt in das spannende Feld der urologischen Biomarkerforschung eintauchte.

Herrn Prof. Dr. med. Armin Wiegering danke ich für die Unterstützung und die Bereitschaft, das Zweitgutachten zu übernehmen.

Einen besonderen Dank möchte ich Herrn Dr. med. vet. Burkhard Kneitz widmen. Als Leiter des urologischen Forschungslabors stand er mir von Anfang an durchwegs mit viel Geduld, Expertise und seinen Erfahrungswerten zur Seite.

Nicht unerwähnt bleiben dürfen insbesondere auch Vera Schwartz, Barbara Dexler und Katrin Borschert, die mich während der Laborzeit mit Rat und Tat bei der Umsetzung der Experimente unterstützten.

Für die Beratung und Hilfestellung bei der Implementierung statistischer und bioinformatischer Auswertungen der Genexpressionsdaten bedanke ich mich bei Frau Dr. med. vet. Susanne Kneitz.

Ich bedanke mich bei Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Charis Kalogirou, der als Senior bei der letzten Veröffentlichung der zu dieser Dissertation gehörigen wissenschaftlichen Publikation mitwirkte.

Besonders hervorheben möchte ich Herrn Dr. med. Markus Krebs, der von Anfang an und bis zum letzten Wort mir mit Rat, Tat und auch mit stetiger mentaler Unterstützung bei der Umsetzung meiner Dissertation und der dazugehörigen wissenschaftlichen Publikation zur Seite stand. Als Mentor hat er maßgeblich dazu beigetragen, dass ich nicht nur meine Promotion erfolgreich abschließen konnte, sondern auch die Begeisterung entwickelte, um den wissenschaftlichen Weg fortzuführen.

Der abschließende Dank gilt meiner Familie. Zunächst seien meine Eltern erwähnt, die im Jahr 2000 mit mir aus Russland nach Deutschland einwanderten und über die folgenden Jahre ihre persönlichen Belange und Bedürfnisse immer hintenangestellt

haben, sodass ich überhaupt die Möglichkeit hatte meinen Weg ins Medizinstudium zu finden. Zuletzt gilt mein Dank dir, Eva, dein Rückhalt vom ersten Augenblick an, deine Motivation sowie der fachliche Diskurs haben das Ergebnis dieser Arbeit maßgeblich bereichert.

VI Eigene Veröffentlichungen

Kotlyar, M.J., et al., Critical Evaluation of a microRNA-Based Risk Classifier Predicting Cancer-Specific Survival in Renal Cell Carcinoma with Tumor Thrombus of the Inferior Vena Cava. *Cancers (Basel)*, 2023. 15(7)