

Aus der Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. H. Kübler

**Die Bedeutung von micro-RNA-9, -21, -29c, -145, -200c, -205 und -221 für
die Genese und Progression des Urothelkarzinoms der Harnblase – miR-29c
als Progressionsmarker im nicht-muskelinvasiven Urothelkarzinom**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Maximilian Thomas Josef Weinke

aus Berlin

Würzburg, Februar 2022



Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Hubert Kübler

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Andreas Rosenwald

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 08.08.2022

Der Promovend ist Arzt.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Übersicht Harnblasenkarzinom	1
1.1.1	Definition, Epidemiologie des Harnblasenkarzinoms	1
1.1.2	Diagnostik und Therapie.....	2
1.2	Klinische Herausforderung des progredienten NMIBC	3
1.3	Tumorgenese	4
1.4	Micro-RNAs: Biogenese und Bedeutung für die Onkologie.....	5
1.5	micro-RNAs als molekulare Biomarker in unterschiedlichen Tumoren	6
1.6	miR 29c und miR 145 als Tumorsuppressoren	8
1.7	<i>LOXL2</i> als molekulares Target der miR-29c.....	8
2	Fragestellung.....	10
3	Material und Methoden	11
3.1	Materialien.....	11
3.1.1	Patientenmaterial Würzburger Kollektiv	11
3.1.2	Patientenmaterial Mannheimer Kollektiv.....	11
3.1.3	Zelllinien.....	11
3.1.4	Zellkulturmedium DMEM und McCoy's.....	11
3.1.5	Chemikalien und Reagenzien	12
3.1.5.1	molekularbiologische Experimente.....	12
3.1.5.2	Zellkultur.....	13
3.1.6	Geräte und Verbrauchsmaterialien	14
3.2	Methoden.....	15
3.2.1	RNA-Isolierung aus paraffinierten Gewebeproben.....	15
3.2.2	Reverse Transkription der isolierten RNA	15
3.2.3	Real-Time-PCR (qRT-PCR).....	16
3.2.4	Zellkultur	17
3.2.5	Transfektion.....	17
3.2.6	RNA-Isolierung nach Transfektion	18
3.2.7	Proliferationstest	18
3.2.8	Caspase Glo 3/7-Assay	19
3.2.9	Transwell Migration Assay.....	19
4	Ergebnisse.....	21
4.1	Expressionsprofil ausgewählter micro-RNAs im Gewebe des Harnblasenkarzinoms	21
4.1.1	micro-RNA-Expressionsprofil im Blasenkarzinom und gesundem Urothel der Blase	23
4.1.2	Expression der untersuchten miRs in Vergleich von NMIBC und MIBC	25
4.1.3	Assoziation der miR-Expression im NMIBC mit dem klinischen Verlauf	29
4.1.4	Logistische Regressionsanalyse anhand der Expressionsdaten der miR-29c und miR-145	31
4.1.4.1	MiR-29c und miR-145 als möglicher prognostischer Indikator für Progress im NMIBC.....	31
4.1.4.2	Cox-Regression zur Ermittlung des Progressionsrisikos	33
4.1.4.3	Kombiniertes Regressionsmodell.....	33

4.1.4.4	MiR-29c und miR-145 als prognostischer Marker für tumorbedingte Mortalität.....	35
4.2	Validierung der Expressionsanalysen von miR-29c und miR-145 in einem unabhängigen Blasenkarzinom-Kollektiv	36
4.2.1	Assoziation der miR-Expression im NMIBC mit klinischem Verlauf.....	38
4.2.2	Kaplan-Meier-Analyse im Mannheimer Kollektiv.....	39
4.2.3	Cox-Regression.....	40
4.3	In-vitro-Analyse zur Funktion von miR-29c und miR-145 als Tumorsuppressoren in Blasenkarzinom-Zelllinien	41
4.3.1	Überprüfen der Transfektionseffizienz.....	41
4.3.2	Proliferation von mit pre-miR-29c und -145 transfizierten BC-Zellen	43
4.3.3	Migration von J82 Zellen nach Transfektion mit pre-mirco-RNA-29c.....	44
4.3.4	Apoptose-Induktion nach Transfektion mit pre-mirco-RNA-29c	45
4.3.5	Untersuchung von <i>LOXL 2</i> als molekulares Zielgen der miR-29c.....	46
5	Diskussion.....	49
5.1	Micro-RNAs im Urothelkarzinom.....	50
5.1.1	Das Würzburger Urothelkarzinom Kollektiv	50
5.1.2	Expression der miRNAs im Urothelkarzinom.....	51
5.1.2.1	MiR-9	52
5.1.2.2	Micro-RNA-21	54
5.1.2.3	Micro-RNA-200c	55
5.1.2.4	Micro-RNA-205	58
5.1.2.5	Micro-RNA-221	59
5.1.3	Micro-RNA-145 als Marker für Aggressivität des Urothelkarzinoms	60
5.1.3.1	Expressionsdaten der miR-145 im Urothelkarzinom	60
5.1.3.2	Micro-RNA-145 als Progressionsmarker im NMIBC.....	62
5.1.3.3	Micro-RNA-145 im Zellmodell	65
5.1.4	Micro-RNA-29c als Marker für Aggressivität des Urothelkarzinoms	65
5.1.4.1	Expression der miR-29c im Urothelkarzinom.....	65
5.1.4.2	Micro-RNA-29c als Progressionsmarker im NMIBC.....	66
5.1.5	Diagnostische Bedeutung von miR-29c für die klinische Anwendung.....	68
5.1.6	Molekulare Funktion der Micro-RNA-29c als Tumorsuppressor	69
5.1.6.1	Proliferation.....	70
5.1.6.2	Migration.....	70
5.1.6.3	Apoptose.....	71
5.1.7	<i>LOXL2</i> als molekulares Target	73
6	Zusammenfassung	75
7	Anhang.....	77
7.1	Literaturverzeichnis	77
7.2	Abkürzungsverzeichnis	90
7.4	Abbildungsverzeichnis	91
7.6	Tabellenverzeichnis	92

Danksagung

Lebenslauf

Aus Gründen der besseren Lesbarkeit wird im Folgenden auf die gleichzeitige Verwendung weiblicher und männlicher Sprachformen verzichtet und das generische Maskulinum verwendet. Sämtliche Personenbezeichnungen gelten gleichermaßen für alle Geschlechter.

1 Einleitung

1.1 Übersicht Harnblasenkarzinom

1.1.1 Definition, Epidemiologie des Harnblasenkarzinoms

Das Harnblasenkarzinom ist der zweithäufigste urologische Tumor weltweit (1). In Deutschland wird von jährlich über 29.000 Neuerkrankungen ausgegangen, was es hierzulande derzeit an die fünfte Stelle der häufigsten soliden Tumore setzt. Im Jahr 2014 wurden 5.692 Todesfälle aufgrund des Harnblasenkarzinoms verzeichnet. Bei einem mittleren Erkrankungsalter bei Männern und Frauen von 74 bzw. 76 Jahren, sowie einer um den Faktor 3 erhöhten Inzidenz bei Männern, ist dieser Tumor vor allem einer des älteren Mannes (2). Nicht nur die älter werdende Bevölkerung, sondern auch die erhöhte Prävalenz in Industrieländern, lässt darauf schließen, dass sich das Harnblasenkarzinom in den kommenden Jahren somit zu einer größeren Herausforderung in Europa entwickeln wird. Histologisch lassen sich die Tumore der Harnblase unterscheiden; vor allem das Urothelkarzinom, welches in ca. 90% der Fälle und oft multilokulär auftritt, ist von großer Bedeutung und zeigt bei Erstdiagnose bereits in 10-15% der Patienten eine Metastasierung (3).

Seltenere Entitäten, wie das Plattenepithelkarzinom, Adenokarzinom, neuroendokrine Tumore oder kleinzellige Tumore werden in dieser Arbeit nicht weiter behandelt. Prinzipiell kann das Urothelkarzinom im gesamten ableitenden Harntrakt auftreten, als Speicherorgan mit erhöhter Exposition zu potenziell kanzerogenen/ toxischen Stoffen ist es jedoch mit > 90% überwiegend in der Harnblase vorzufinden.

Als ursächlich werden verschiedene Faktoren diskutiert. Als wichtigster Risikofaktor gilt die Exposition zu Tabakrauch, welche für über 50% der Fälle mitverantwortlich ist. Insgesamt besteht bei Rauchern ein 2-3-fach erhöhtes Risiko für das Auftreten eines Urothelkarzinoms. Neben dem Nikotinkonsum gelten vor allem die Exposition zu anderen kanzerogenen Stoffen (aromatische Amine, Phenacetin, Cyclophosphamid) oder chronische Infektionen des Harntraktes als Risikofaktoren (4-8).

Im Gegensatz zu den exogenen Noxen ist über genetische Risikofaktoren im Sinne einer hereditären Prädisposition bislang wenig bekannt. In vereinzelten Studien wurde ein zweifach erhöhtes Risiko bei erkrankten erstgradig Verwandten beschrieben (9). Vor

allem für Urothelkarzinome des oberen Harntraktes ist das HNPCC (*hereditary non-polyposis colorectal cancer*) als genetischer Risikofaktor bekannt.

1.1.2 Diagnostik und Therapie

In bis zu 80% der Fälle wird ein Harnblasenkarzinom durch schmerzlose Makrohämaturie klinisch apparent (10, 11). Als Goldstandard in der Primärdiagnostik für den Nachweis eines Urothelkarzinoms gilt die Zystoskopie. Zudem wird eine Urin- bzw. Spülzytologie durchgeführt, welche vor allem aufgrund der hohen Spezifität von ca. 98% einen wichtigen Bestandteil der Diagnostik bildet, durch die geringere Sensitivität allerdings vor allem als ergänzende Maßnahme durchgeführt werden sollte (12, 13). Im Falle eines makroskopisch sichtbaren Tumors erfolgt die transurethrale Resektion des Blasentumors (TUR-B). Dieses Verfahren dient zum einen der therapeutischen Abtragung des Tumors, welches möglichst in toto unter Einbezug der Detrusormuskulatur erfolgen sollte, zum anderen aber auch als diagnostische Maßnahme zur histologischen Sicherung des Befundes.

Histopathologisch erfolgt das Tumor-Grading, welches seit 2004 das papilläre Urothelkarzinom nicht mehr in drei (G1-3), sondern in zwei verschiedene Schweregrade (low- und high-grade) unterteilt. Als ergänzende Vorstufe des Karzinoms wird das PUNLMP (*papillary urothelial neoplasia with low malignant potential*) als zusätzliche Entität mit geringerer Entartungstendenz aufgeführt.

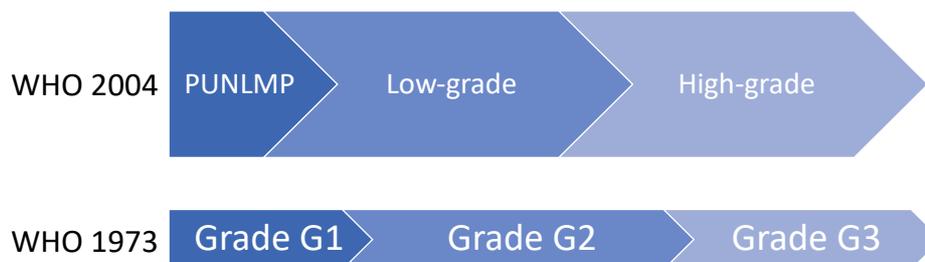


Abbildung 1: Vergleich der unterschiedlichen Grading-Systeme des nicht-muskelinvasiven Urothelkarzinoms. Obenstehend die aktuell geläufige Einteilung der WHO seit 2004.

Nicht-invasive Urothelkarzinome, welche keine papilläre Struktur aufweisen werden als Carcinoma in situ (Cis) bezeichnet und sind per definitionem als high-grade einzuordnen. Zusätzlich erfolgt die Einteilung nach der TNM-Klassifikation. Tumorstadien pTa und pT1 sowie pTis werden als nicht-muskelinvasive Tumore (NMIBC) zusammengefasst und erfahren in der Regel eine lokal begrenzte Therapie (wie in 1.2 näher erläutert).

Beim muskelinvasiven Blasenkarzinom (MIBC), Stadium T2-T4, gilt die radikale Zystektomie (offen, laparoskopisch oder laparoskopisch roboterassistiert) als kurativer Ansatz. In einigen Fällen kann im Rahmen der geplanten operativen Versorgung eine vorausgehende neoadjuvante bzw. induktive oder nachfolgende adjuvante bzw. additive Chemotherapie geplant werden, welche in der Regel aus einer Chemotherapie mit Gemcitabin und Cisplatin besteht und die Überlebenswahrscheinlichkeit nochmals erhöht (14-16).

Alternativ zum operativen Verfahren kann dem Patienten auch die organerhaltende Therapie mittels TUR-B und anschließender Radiochemotherapie in kurativer Intention angeboten werden (17), gilt jedoch nicht als Standard in der Therapie des muskelinvasiven Urothelkarzinoms. Beim metastasierten Blasenkarzinom bildet die Cisplatin-haltige Chemotherapie die Therapie der ersten Wahl, in der Regel in palliativer Intention. Einen wichtigen Bestandteil vor allem der Zweitlinientherapie stellt die Immuntherapie dar. Hierbei dient der Immuncheckpoint „*Programmed-death*“ Signalweg als entscheidender Ansatzpunkt der Therapie.

Aufgrund der hohen Rezidivrate, der intensiven Überwachungsstrategien, sowie den hohen Therapiekosten gilt das Harnblasenkarzinom als die teuerste Krebserkrankung in Bezug auf die lebenslangen Behandlungskosten pro Patient (18, 19).

1.2 Klinische Herausforderung des progredienten NMIBC

Eine große Herausforderung der heutigen onkologischen Therapie des Urothelkarzinoms ist die risikoadaptierte Therapie des nichtmuskelinvasiven Blasenkarzinoms. Bislang wird zur weiteren prognostischen Einschätzung und zur Therapieplanung nach der Tumormaterialgewinnung der EORTC-Score (*European Organisation for Research and Treatment of Cancer*) erhoben, welcher verschiedene Faktoren in die Beurteilung mit einbezieht: Tumoranzahl, -größe, -rezidivrate, T-Stadium der TNM-Klassifikation, sowie Tumor-Grading. Ein low-risk Tumor nach EORTC wäre demnach mit einem geringen Rezidiv- und Progressionsrisiko verbunden, sodass eine alleinige TUR-B mit anschließender Frühinstallations-Chemotherapie (z.B. Mitomycin C) als therapeutische Maßnahme empfohlen wird (20, 21). Zystoskopische Kontrollen gelten im Follow-up als ausreichend, sind aufgrund der hohen Rezidivrate aber auch unabdingbar. Bei einem high-risk NMIBC (*non-muscle-invasive bladder cancer*) zeigten Meta-Analysen eine

geringere Rezidiv- und Progressionsrate unter einer adjuvanten BCG (*Bacillus-Calmette-Guérin*)-Instillationstherapie im Gegensatz zur adjuvanten intravesikalen Chemotherapie mit Mitomycin C (22-26). Bei Patienten mit einem high-risk NMIBC sollte in Abhängigkeit des Alters, der Komorbiditäten und des Progressionsrisikos ebenfalls eine Frühzystektomie diskutiert werden, um einem muskelinvasiven Rezidiv zuvorzukommen und die Prognose nochmals zu verbessern (27).

Bei Diagnosestellung sind ca. 70-75% der Urothelkarzinome im nicht-muskelinvasiven Stadium, in 70% Ta, in 20% T1 und 10% Cis (28, 29), was die Bedeutung der gezielten Therapie hervorhebt, um einen Progress zu verhindern. Trotz der lokalen risikoadaptierten (operativen und adjuvanten) Therapie weisen 10-20% der NMIBC einen muskelinvasiven Progress im Verlauf auf (30).

Dies zeigt die große klinische Herausforderung des bislang schwer absehbaren Risikos für eine Progression und somit auch eine erhöhte Rate an Metastasierungen. In der vorliegenden Arbeit wird diese Herausforderung behandelt und versucht einen möglichen frühzeitigen Biomarker für einen Progress zu identifizieren.

1.3 Tumorgenese

Die Entstehung des Urothelkarzinom ist ein multifaktorielles Geschehen. Nach derzeitiger Studienlage scheinen beim multilokulären Auftreten des Karzinoms sowohl eine monoklonale als auch die polyklonale Ätiologie ursächlich. Bei der Genese beider Ätiologien wird davon ausgegangen, dass unter anderem die zuvor beschriebenen Risikofaktoren zu Mutationen in einer oder mehreren Urothelzellen mit der Aktivierung von Onkogenen oder dem Verlust von Tumorsuppressorgenen führen. Dies kann durch eine maligne Transformation des gesunden Urothels über Dysplasien zur Entstehung von Karzinomzellen führen.

Beim monoklonalen Geschehen kann es über mechanische Abschilferungen und Migration des Tumorzellklons zu einer Dissemination und somit zum multilokulären Befall in der Blase kommen. In einigen zytogenetischen Untersuchungen zeigten sich gleiche Mutationsmuster in den Tumorzellen des multilokulären Geschehens, sodass die untersuchten Karzinome bei demselben Patienten den gleichen Ursprung und somit eine monoklonale Genese nahelegen (31-36). Andere Studien konnten unterschiedliche molekulargenetische Charakteristika im multilokulären Karzinom aufzeigen und auch

das Konzept der „*field cancerization*“ unterstützen, welche auf ein polyklonales Geschehen hindeuten (36-38).

Die maligne Transformation vom gesunden Urothel zur Tumorzelle ist mit diversen molekularen und genetischen Prozessen assoziiert. Zu den drei wichtigsten Mechanismen gehören:

- 1) Chromosomale Aberrationen, aber auch eine veränderte Expression von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen (TSG), welche oft als Trigger für den Beginn der Karzinogenese dienen.
- 2) Veränderungen im Zellzyklus, die häufig zu einer ungeordneten Proliferation führen.
- 3) Verstärkte Angiogenese, welche schließlich eine Metastasierung durch eine erhöhte Vaskularisierung erleichtert. (39, 40)

Als wichtigste Vertreter der Onkogene, die im Zusammenhang mit dem Urothelkarzinom beschrieben sind, gelten: *HRAS*, *MYC* und *ERBB2*. Als am besten untersuchte Tumorsuppressorgene sind vor allem das *RB*- (Retinoblastom) Tumorsuppressorgen und *p53* – eines der am besten untersuchten TSG, welches eine entscheidende Rolle in der Zellzyklus-Regulation spielt – zu nennen.

Diese Gene sind Bestandteil vieler Untersuchungen und können Aufschluss geben im Hinblick auf Diagnostik, Prognose und Therapie der Erkrankung.

1.4 Micro-RNAs: Biogenese und Bedeutung für die Onkologie

In dieser Arbeit liegt der Fokus auf micro-RNAs (miRs), welchen in diversen Studien onkogene bzw. tumorsuppressive Eigenschaften und ein möglicher Zusammenhang mit der Tumorregulation und Prognose des Urothelkarzinoms nachgewiesen werden konnte. Zu Beginn der 90er Jahre konnte in molekulargenetischen Untersuchungen am Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* das *lin-4* Gen nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass dieses Gen nicht für ein Protein kodierte, sondern für zwei kleine RNA-Abschnitte mit einer Länge von 22 bzw. 61 Nukleotiden. Es zeigte sich daraufhin, dass diese RNA-Stränge sich an die 3' untranslatierte Region (UTR) der mRNA (messenger-RNA) des *lin-14* Gens komplementär anlagern konnten und somit eine Translation dieser mRNA verhinderten (41, 42). Diese Forschungsergebnisse legten den

Grundstein für zahlreiche weitere Untersuchungen an diesen, seit 2001 als micro-RNA bezeichneten, RNA-Abschnitten.

Zu Beginn der Biosynthese der micro-RNAs werden die miRNA-Gene aus dem Genom in einige Hundert bis Tausend Nukleotid-große RNAs, pri-miRNAs genannt, transkribiert. Initial liegt diese als einsträngiges Transkript vor, faltet sich allerdings rasch zu der charakteristischen haarnadelförmigen Sekundärstruktur. Mithilfe eines Mikroprozessor-Komplexes, bestehend aus dem RNA-bindenden Protein DGCR3 (Pasha) und der RNase III (Drosha), wird die pri-miRNA noch im Zellkern zur ca. 70 Nukleotid-großen pre-miRNA prozessiert. Diese gilt als unmittelbarer Vorläufer der reifen miRNA, welche nach der Transferierung ins Zytoplasma und weiterer Spaltung durch die Dicer-RNase entsteht. Die miRNA lagert sich daraufhin an ein Protein der Argonaut-Familie an und bildet damit den RISC- (RNA-induced silencing complex) Proteinkomplex. Der RISC-Komplex mit der inkorporierten miRNA lagert sich an die 3'-UTR einer Ziel-mRNA an und führt zu dessen Abbau bzw. zur Verhinderung ihrer Translation. (43-45)

Durch den üblicherweise negativen Einfluss der micro-RNAs auf die Translation bzw. Stabilität einer mRNA, welche ihrerseits oft für zelluläre Prozesse wie Zellzyklusregulation, Differenzierung, Apoptose und Migration mitverantwortlich ist, können miRNAs über diese posttranskriptionelle Genregulation indirekt Einfluss auf die Proteinbiosynthese nehmen. Die miRNAs können somit tumorsuppressive bzw. onkogene Eigenschaften annehmen, indem sie die Expression des jeweiligen Gegenspielers inhibieren. Auch ein Funktionsverlust der miRNA selbst impliziert in einigen Fällen eine Assoziation zur Tumorgenese. So konnte erstmalig im Jahr 2002 ein Zusammenhang hergestellt werden, als in einer von Calin et al. veröffentlichten Studie im CLL (chronische lymphatische Leukämie) ein häufiger Verlust des miR- 15a/16-1 Cluster beobachtet werden konnte und diese miRNA im CLL folgend als Tumorsuppressor eingestuft wurde (46).

1.5 micro-RNAs als molekulare Biomarker in unterschiedlichen Tumoren

Aufgrund der Literaturrecherche und Informationen aus micro-RNA-Datenbanken wurden für diese Arbeit einzelne micro-RNAs mit potenziell wichtiger Rolle im

Einleitung

Urothelkarzinom selektiert. Im Einzelnen wurden die miRs -9, -21, -29c, -145, -200c, -205, -221 untersucht.

Der miR-9 wird bislang in diversen Studien über unterschiedliche Tumore eine entscheidende Rolle in der Tumorgenese zugeschrieben. Eine klare Aussage bezüglich des onkogenen bzw. tumorsuppressiven Potenzials scheint aufgrund der teils unterschiedlichen Regulierung aktuell nicht möglich. Für das Mammakarzinom konnte in einer Studie gezeigt werden, dass die miR-9 über eine Herabregulierung von E-Cadherin die Tumorangiose stimuliert und somit eine verstärkte Tumorpheriferation und Metastasierung hervorruft (47). Auch im Urothel konnte in ersten Untersuchungen Anzeichen für ein onkogenes Potenzial der miR-9 geliefert werden (48). Andere Arbeiten konnten hingegen unter anderem im Mammakarzinom ein tumorsuppressives Potenzial der micro-RNA-9 belegen (49), was die heterogene Regulation der miR-9 in Tumoren zeigt.

Bezüglich der miR-21 zeigten unterschiedliche Arbeiten ebenso onkogene Eigenschaften in diversen Tumoren. Im Lungenkarzinom, Mammakarzinom und auch im Blasenkarzinom konnte dies in unterschiedlichen Analysen nachgewiesen werden (50-52).

Die Familie der microRNA-200 gilt als tumorsuppressiv. Hier scheint vor allem eine Suppression der EMT (*epithelial-mesenchymale Transformation*) eine Rolle zu spielen und ein weniger aggressives Verhalten der Tumorzellen (Invasion und Metastasierung) zu begünstigen. Dies konnte bislang in unterschiedlichen Tumoren, wie dem Mamma-, Prostata-, aber auch Urothelkarzinom gezeigt werden (53-57).

Über einen ähnlichen Mechanismus wie die miR-200, nämlich die Regulierung des ZEB (*Zinc finger E-box-binding homeobox*), welches über E-Cadherin ebenfalls die EMT reguliert, wirkt auch die miR-205. Eine geringe Expression von miR-205 ist mit einem aggressiveren Tumorverhalten assoziiert, sodass hier bei erhöhter Expression tumorsuppressive Eigenschaften beobachtet werden konnten (55, 58).

Der microRNA-221 konnte nach einer hemmenden Wirkung auf die Erythropoese auch eine onkogene Wirkung mit einer erhöhten Proliferationsrate in verschiedenen Tumoren nachgewiesen werden. Hierzu gehören unter anderem das hepatozelluläre-, Mamma-, Prostata-, wie aber auch das Blasenkarzinom (59-61). Bei allen aufgeführten miRs gibt es potenzielle Bezugspunkte zum Urothelkarzinom, ohne dass hier weitere tieferegehende

Ergebnisse vorliegen. Aufgrund dessen wurden sie zur weiteren Bearbeitung im Rahmen der vorliegenden Arbeit selektiert.

1.6 miR 29c und miR 145 als Tumorsuppressoren

In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit konnte den micro-RNAs -29c und -145 eine besondere Bedeutung im Urothelkarzinom nachgewiesen werden, sodass diese zwei micro-RNAs intensiver untersucht wurden.

Den micro-RNAs der Familie 29 konnte bereits in mehreren Studien eine Assoziation zu diversen Erkrankungen nachgewiesen werden. Eine verringerte Expression der miR-29-Familie scheint neben einem erhöhten Risiko für Aortenaneurysmen, systemische Sklerose und Leberfibrose auch mit einer verminderten Apoptose, sowie verstärkter Proliferation und Migration in Krebserkrankungen vergesellschaftet zu sein (62-65). Auch im Urothelkarzinom konnte bereits nachgewiesen werden, dass eine Überexpression der miR-29c mit einem verminderten Zellwachstum und verringerter Migrationsfähigkeit einhergeht (66). Rosenberg et al. konnten sogar einen Zusammenhang zu einer schlechteren Prognose des Tumors bei Unterexpression der miR-29c herstellen (67).

Ebenso wie miR-29c hat auch die miR-145 tumorsuppressive Eigenschaften inne und ist in zahlreichen Tumoren herabreguliert (68). So ist eine verringerte Expression mit einer verstärkten Proliferation und erhöhten Progressionsneigung assoziiert (69). Auch im Expressionsprofil für miR-145 beim Urothelkarzinom der Blase konnten tumorsuppressive Charakteristika nachgewiesen werden (70).

1.7 LOXL2 als molekulares Target der miR-29c

Wie zuvor beschrieben, konnte bereits in einigen Tumoren nachgewiesen werden, dass die tumorsuppressive miR-29c unter anderem auch die Migrationsfähigkeit vieler Tumore einschränkt. Über welche molekularen Prozesse dies geschieht ist bislang noch nicht ausreichend erforscht. In einer experimentellen Studie von Mizuno et al. konnte *LOXL2* (*Lysyl oxidase-like 2*) als Target-Gen der miR-29c im Plattenepithelkarzinom der Lunge identifiziert werden (71). Die *LOXL2* gehört zu der Familie der LOX, welche mitverantwortlich für die Vernetzung von Elastin und Kollagen und somit für die Biosynthese der extrazellulären Matrix ist. Eine geringe Expression der LOX-Proteine

Einleitung

scheint aufgrund der zunehmend lockeren Bindegewebsstruktur mit Erkrankungen wie Gefäßdissektionen, aber auch einigen Tumoren assoziiert zu sein (72, 73). In einer Studie zum Magenkarzinom wurde von Kaneda et al. *LOX* bereits als Tumorsuppressor beschrieben (74). Der verstärkte *LOX*-Gehalt hingegen scheint aufgrund der zunehmenden Fibrosierung des Gewebes zu Erkrankungen wie Atherosklerose und Alzheimer-Demenz führen zu können (75, 76). *LOXL2* konnte in verschiedenen Experimenten nachgewiesen werden, dass es die Migrationsfähigkeit von Tumorzellen fördert (77). Diese Eigenschaft korreliert in der Regel mit einer ungünstigen Prognose und erhöhten Neigung zu Invasion und Dissemination. Diese teils paradoxen Eigenschaften der LOX-Proteine legen nahe, dass eine aberrante Expression in Tumoren unterschiedliche Wirkungen haben können (78). Auch in urologischen Tumoren konnte Proteinen der LOX-Familie tumorregulierende Eigenschaften nachgewiesen werden (79). Für das Nierenzellkarzinom konnte so bereits gezeigt werden, dass über ein Mitglied der miR-29-Familie (miR-29s) die onkogene *LOXL2* reguliert wird (80). Für das Blasenkarzinom scheint *LOXL2* hingegen bislang kaum erforscht.

2 Fragestellung

Das Urothelkarzinom ist der zweithäufigste urologische Tumor und gilt nicht zuletzt aufgrund seiner häufigen Rezidive als eine der teuersten Krebserkrankungen, betrachtet man die kumulativen Therapiekosten pro Patient (81). Aufgrund der hohen Detektionsrate des Urothelkarzinoms im oberflächlichen Stadium ist eine Abschätzung des Progressionsrisikos wichtig, um eine optimale Therapie für den Patienten zu ermöglichen. Derzeit werden für diese Risikoabschätzung klinische und histopathologische Faktoren zurate gezogen. Diese sind jedoch nicht spezifisch genug, sodass die derzeitige Einteilung keine hinreichend verlässliche Aussage in Bezug auf den Progress der Erkrankung zulässt (82). Zahlreiche Studien konnten belegen, dass molekulare Biomarker, wie micro-RNAs, bei diversen Tumorerkrankungen zusätzliche und robuste Prognosefaktoren darstellen können. Diese kleinen Moleküle binden an die untranslatierte Region (UTR) von bestimmten mRNAs und können so wesentlich die Genregulation modulieren und tumorsuppressive oder onkogene Funktionen einnehmen. Ob sich miRNAs als robuste Prognosefaktoren für das oberflächliche Urothelkarzinom der Harnblase eignen, ist zurzeit weitgehend ungeklärt. Um die Bedeutung verschiedener micro-RNAs für die Entstehung und den Verlauf des oberflächlichen Urothelkarzinom der Harnblase zu evaluieren, wurde in dieser Arbeit anhand von Literatur-Studien vielversprechende miRs ausgewählt und wie folgt untersucht:

1. Ein Expressionsprofil der miRs -9, -21, -29c, -145, -200c, -205, -221 für das Blasenkarzinom wurde anhand eines neu erstellten Blasenkarzinomkollektivs bestimmt. Durch eine Korrelation mit histopathologischen und klinischen Follow-up-Daten wurden die miRs auf ihre Eignung als Prognosemarker für das nicht muskelinvasive Blasenkarzinom hin untersucht.
2. Geeignete miRs wurden in Bezug auf ihr Potential, das Progressionsrisiko vorherzusagen, mit einem zweiten unabhängigen Patientenkollektiv validiert.
3. Analyse der Funktion von progressionsassoziierten miRNAs *in vitro*. in Hinblick auf ihren Einfluss auf Proliferation, Migration und Apoptose unter Verwendung von miR-transfizierten Urothelkarzinomzellen.
Detektion von möglichen Zielgenen ausgewählter miRs.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Patientenmaterial Würzburger Kollektiv

Zur Untersuchung des papillären Urothelkarzinoms wurden in der vorliegenden Arbeit 88 Gewebeproben von 77 Patienten aus Würzburg ausgewertet. Da dieses Material Gegenstand für einen Großteil der Untersuchungen in dieser Arbeit ist, ist die genaue Zusammenstellung dieses Kollektivs im Ergebnisteil in Tabelle 1 näher erläutert. Für dieses Vorhaben liegt ein Ethikvotum der Ethik-Kommission der Universität Würzburg mit dem Zeichen 47/20-am vor.

3.1.2 Patientenmaterial Mannheimer Kollektiv

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Validierung der Ergebnisse aus dem Würzburger Kollektiv ein zweites unabhängiges Kollektiv verwendet, welches mit der freundlichen Unterstützung der Kollegen der Universität Mannheim, insb. PD Dr. T. Worst, zusammengestellt und zur Verfügung gestellt wurde. Für dieses Kollektiv liegt ein Ethikvotum der Medizinischen Universität Mannheim mit dem Zeichen 2016-814R-MA vor. Die Eigenschaften des Kollektivs sind in Tabelle 5 näher dargestellt.

3.1.3 Zelllinien

Für die in-vitro Untersuchungen vom Urothelkarzinom in der Zellkultur wurden zwei verschiedene Zelllinien verwendet. Beide Zellreihen wurden von der ATCC (American Type Culture Collection) bezogen.

Die RT4-Zellreihe wurde von einem 63-jährigen kaukasischen, männlichen Patienten isoliert. Das papilläre Karzinom des Patienten war ein Rezidiv und befand sich im pT2 G1 Stadium.

Die Zelllinie J82 wurde aus dem Primarius eines 58-jährigen Kaukasiers etabliert, welches sich zum Zeitpunkt der Probenisolierung im Stadium pT3 G3 befand (83, 84).

3.1.4 Zellkulturmedium DMEM und McCoy's

Die Zelllinien wurden gemäß den Angaben der ATCC behandelt und kultiviert. Hierfür wurde bei der RT4-Zelllinie das McCoy's 5a Medium verwendet. Für J82 wurde Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) High Glucose als Grundlage verwendet.

Material und Methoden

Beide Nährmedien wurden zuvor mit 10% (bei McCoy's Medium) bzw. 20% (bei DMEM) fetalem Kälberserum (FBS), 1% Penicillin/Streptomycin, 1% L-Gluthamin und 1% HEPES versetzt und vor Verwendung auf 37°C erhitzt. Dem DMEM High Glucose Medium wurde zusätzlich 1% Natrium Pyruvat hinzugegeben. Nach dem Ausplattieren wurden die Zellen im Brutschrank bei 37°C, 6% CO₂-Gehalt der Luft und 95%iger Luftfeuchtigkeit kultiviert.

3.1.5 Chemikalien und Reagenzien

3.1.5.1 molekularbiologische Experimente

Chemikalie/ Reagenz	Hersteller
Rotihistol	Roth (Deutschland)
Ethanol	Roth (Deutschland)
Digestion Puffer	Applied Biosystem (USA)
Protease	Applied Biosystem (USA)
Isolation additive	Applied Biosystem (USA)
Wash 1 concentrate	Applied Biosystem (USA)
Wash 2/3 concentrate	Applied Biosystem (USA)
DNase	Applied Biosystem (USA)
10x DNase Puffer	Applied Biosystem (USA)
Elution solution	Applied Biosystem (USA)
10x RT Puffer	Applied Biosystem (USA)
dNTP mix	Applied Biosystem (USA)
RNase Inhibitor	Applied Biosystem (USA)
MultiScribe reverse transcriptase	Applied Biosystem (USA)
RNase-free water	Applied Biosystem (USA)
Universal PCR Mastermix No Amperase	Applied Biosystem (USA)
5x Primer miR-9	Applied Biosystem (USA)
20x Primer miR-9	Applied Biosystem (USA)
5x Primer miR-21	Applied Biosystem (USA)
20x Primer miR-21	Applied Biosystem (USA)
5x Primer miR-29c	Applied Biosystem (USA)
20x Primer miR-29c	Applied Biosystem (USA)
5x Primer miR-145	Applied Biosystem (USA)

Material und Methoden

20x Primer miR-145	Applied Biosystem (USA)
5x Primer miR-200b	Applied Biosystem (USA)
20x Primer miR-200b	Applied Biosystem (USA)
5x Primer miR-200c	Applied Biosystem (USA)
20x Primer miR-200c	Applied Biosystem (USA)
5x Primer miR-205	Applied Biosystem (USA)
20x Primer miR-205	Applied Biosystem (USA)
5x Primer miR-221	Applied Biosystem (USA)
20x Primer miR-221	Applied Biosystem (USA)
5x Primer miR-151	Applied Biosystem (USA)
20x Primer miR-151	Applied Biosystem (USA)
miR-vana 29c	Applied Biosystem (USA)
miR-vana 205	Applied Biosystem (USA)
Control-miR	Applied Biosystem (USA)
Chloroform	Roth (Deutschland)
Isopropanol	Roth (Deutschland)
TRIzol	Invitrogen
CellTiter 96® AQueous One Solution (MTS)	Promega
Methanol	Sigma
Kristallviolett	Sigma
Kollagen von Kalbshaut (0,1%) Typ I	Sigma
Albumin von Kalbsserum	Sigma
Caspase-Glo 3/7 Puffer	Promega
Caspase-Glo 3/7 Substrat	Promega

3.1.5.2 Zellkultur

Chemikalie/ Reagenz	Hersteller
DMEM high glucose	Biochrom (Deutschland)
McCoy's 5a Medium	Biochrom (Deutschland)
FBS	Sigma
HEPES	Biochrom
GlutaMAX	Invitrogen
Penicillin/ Streptomycin	Biochrom
Sodium Pyruvat	Biochrom

Material und Methoden

Trypsin/EDTA (0,25%)	Invitrogen
Dulbecco´s PBS	Biochrom
OPTI-MEM 1x	Invitrogen
Lipofectamin	Invitrogen
Trypan-Blau (0,4%)	Sigma

3.1.6 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Gerät/ Material	Modell	Hersteller
PCR-Strips	0,2ml	Simport
Eppendorf Tubes	1,5-5ml	Eppendorf
Zentrifugen Röhrchen	15-50ml	Greiner
Zentrifuge (RNA-Isolierung)	Biofuge primo	Heraeus instruments
Zentrifuge (Zellkultur)	Megafuge 16R	Heraeus instruments
Thermal PCR Cycler (RT-PCR)	Primus 96 plus	MWG-Biotech
PCR-Cycler (qRT-PCR)	Rotor-Gene Q	Qiagen
Bench	06 12	Prettl
Photometer	Spark 10M	Tecan
Brutschrank	CB 210	WBC Binder
Zellzähler	TC 20	Bio-Rad
Mikroskop (Zellkultur)	Diavert	Leitz
Mikroskop (Migration Assay)	Orthoplan	Leica
Gefrierschrank		Liebherr
Kühlschrank		Liebherr
Zellkulturflaschen	Cellstar (T25, T75, 6-Well, 12-Well, 96-Well)	Greiner
96-Well-Platte (Caspase-Test)	Lumitrac	Greiner
Transwell Kammer (Migration Assay)	Porengröße: 8µm Durchmesser: 6,5mm	Corning
Wasserbad	Eco Temp TW 12	Julabo
Heizblock	Thermomixer comfort	Eppendorf

3.2 Methoden

3.2.1 RNA-Isolierung aus paraffinierten Gewebeproben

Das Tumorgewebe wurde in Paraffin eingebettet, im Institut für Pathologie der Universitätsklinik Würzburg ausgewertet und in der Tumorbank der Klinik für Urologie und Kinderurologie erfasst. Aus den in Paraffin eingebetteten Resektionsspänen (TUR-B) bzw. Zystektomiepräparaten wurde Tumorgewebe vom Pathologen zur späteren Extraktion markiert. Anschließend wurde aus den Gewebeproben RNA isoliert und die Expression ausgewählter micro-RNAs (miR-9, -21, -29c, -145, -200c, -205 und -221) mittels qRT-PCR analysiert.

Zur Isolierung der RNA aus Paraffingewebe wurde das RecoverAll Total Nucleic Acid Isolationskit verwendet und das Protokoll des Herstellers befolgt:

Das markierte Gewebe wurde nach Zugabe von 1ml Rotihistol bei 50°C inkubiert, welches nach einer Zentrifugation wieder entfernt wurde. Anschließend wurde das Gewebe mit 1ml Ethanol (100%) zweimal gewaschen und entparaffiniert. Dem übrigen RNA-Pellet wurde nach einer Inkubation über ca. 90 min bei 37°C ca. 100µl Verdaupuffer, sowie 4µl Protease hinzugefügt und abermals inkubiert.

Zur RNA-Isolierung wurde ein Isoliermix, bestehend aus 120µl Verdaupuffer und 275µl Ethanol (100%), gemischt, welches zu den Proben gegeben wurde. Das neue Gemisch aus Proben und Isoliermix wurde auf eine Filtersäule pipettiert und nach mehrmaligem Zentrifugieren und der Zugabe der zwei Waschpuffer (Waschpuffer 1 und 2/3) getrocknet.

Im finalen Schritt der Isolierung wurde ein DNase-Mix aus 6µl DNase Puffer, 4µl DNase und 50µl Nuklease-freiem Wasser gemischt und auf den Filter pipettiert. Nach einer Inkubation der Proben bei 20°C über 30min folgten weitere Waschschrte mit den beiden Waschpuffern und je anschließender Zentrifugation, sowie dem Verwerfen des Durchflusses. Abschließend wurde die RNA schließlich mithilfe von 60µl Elutionspuffer von dem Filter gelöst und eingefroren.

3.2.2 Reverse Transkription der isolierten RNA

Um den micro-RNA Gehalt im Gewebe quantifizieren zu können, wurde die Real-Time-PCR (qRT-PCR) verwendet. Bevor die Messung mit dieser Methode jedoch möglich ist, bedarf es dem Zwischenschritt der Reversen Transkription (RT-PCR), in welchem die

komplementäre cDNA synthetisiert und vervielfältigt wird. Der RNA-Anteil wurde nach der Isolierung zunächst im Photometer gemessen und anschließend mit destilliertem Wasser zu einer Konzentration von 10ng/ml verdünnt. Die Reverse Transkription erfolgte mithilfe des TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kits. Mithilfe von micro-RNA spezifischen Primern wurde konnte ein ebenso spezifisches Transkript erstellt werden. Zur Amplifikation der DNA wurde der Thermocycler verwendet.

3.2.3 Real-Time-PCR (qRT-PCR)

Die qRT-PCR ist eine Vervielfältigungsmethode für die gewonnene cDNA und basiert auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR. Diese wirkt über drei Schritte (85):

I) Denaturierung

Der gezielte Temperaturanstieg auf 94-96°C lässt die Wasserstoffbrückenbindungen der DNA-Doppelhelix aufbrechen, sodass nur noch die einsträngigen DNA-Teile vorliegen.

II) Primerhybridisierung

Durch das schnelle Abkühlen auf 55-65°C können sich die spezifischen Primer an die komplementären DNA-Segmente anlagern.

III) Elongation

Bei einer Temperatur von 68-72°C ergänzt die Taq-DNA-Polymerase, beginnend am 3'-Ende des angelagerten Primers, die Nukleotide des DNA-Stranges mit ihrem komplementären Basenpaar.

Dieser Prozess wird mehrere Zyklen (in der Regel 30-40 Zyklen) wiederholt und erlaubt so eine exponentielle Amplifizierung der DNA.

Im Rahmen der qRT-PCR kann der oben beschriebene Prozess in Echtzeit erfasst werden. Die spezifischen miR-Primer, welche zu der cDNA-Lösung hinzugegeben wurden, sind mit einem fluoreszierenden Farbstoff versetzt. Mit dem Anlagern an den DNA-Strang steigt das Signal der Fluoreszenz. Die Signalstärke steigert sich somit in jedem Zyklus. Durch Festlegen eines Schwellenwertes für das Fluoreszenzsignal kann nach Beenden der qRT-PCR anhand der Zykluszahl, welche zum Erreichen des Schwellenwertes durchlaufen werden musste, der DNA-Gehalt quantifiziert werden. Das cDNA Transkript wurde gemäß den Angaben des qRT-PCR-Kits behandelt. Die qRT-PCR wurde im Rotorgene durchgeführt.

Alle Ergebnisse der qRT-PCR sind als ΔC_t angegeben, welches die Differenz in der Expression der untersuchten miR zu einem „housekeeper“ widerspiegelt. In dieser Arbeit wurde die miR-151 als solches Haushaltsgen verwendet, da es eine sehr konstante Expression im verwendeten Urothel zeigte.

3.2.4 Zellkultur

Splitten und Kultivieren der Tumorzelllinien

Die Zellen wurden in T75 Flaschen ausplattiert und 2mal pro Woche bei einer Konfluierungsdichte von ca. 80% gesplittet. Hierfür wurde der Mediumüberstand entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen (3-5ml PBS). Nach Hinzufügen von Trypsin/EDTA (0,25%) und einer zweiminütigen Inkubation bei 37°C lösten sich die Zellen von der Flaschenoberfläche. Durch die Zugabe von FCS-haltigem Medium wurde die enzymatische Aktivität des Enzyms abgepuffert, um eine weitere Zelldestruktion zu verhindern und der Flascheninhalt in ein separates 15ml Zentrifugationsröhrchen überführt. Nach der Zentrifugation und dem Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet in 3ml Medium resuspendiert und die Zellkonzentration im Zellzähler ausgewertet. Die RT4- bzw. J82-Zellreihen wurden mit einer Konzentration von je 1×10^6 erneut ausgesät und der übrige Teil für weitere Versuche subkultiviert.

3.2.5 Transfektion

Um den Einfluss der micro-RNAs auf die Tumorzellreihen zu untersuchen wurde das Prinzip der transienten Transfektion angewendet. Hierbei werden die Nukleotidsequenzen in die Zellen eingeschleust und somit der miR-Gehalt ekto- angehoben.

Bei allen Transfektionsversuchen wurde das in 3.1.3 beschriebene Medium ohne Penicillin/ Streptomycin verwendet. Die Zellen wurden je nach Versuchsmodell in 96-Well-Platten, 6-Well-Platten oder T25-Flaschen subkultiviert. Nach einer Inkubation über 24 Stunden wurde das Medium zunächst wieder abgesaugt. Als neuer Zusatz wurde OptiMEM mit Lipofectamin (1:100 bzw. 1:200 bei 96-Well Platten) und mit der miR-vana-29c bzw. -145 gemischt. Auf die Zellen wurde dieser Mix gegeben und anschließend mit derselben Menge Medium aufgefüllt. Die zeitgleiche Transfektion mit einer pre-miR-Control diente als Referenztransfektion. Am 1. Tag post transfection wurde erneut Medium hinzugegeben.

3.2.6 RNA-Isolierung nach Transfektion

Zur Überprüfung des Transfektionserfolges wurde die RNA aus der Zellkultur nach transienter Transfektion isoliert und durch anschließende RT-PCR und qRT-PCR der miR-Gehalt quantifiziert.

Die Isolierung erfolgt am 2. Tag post transfection: Zunächst wurde die Probe homogenisiert, indem 1ml TRIzol pro 50-100mg hinzugefügt wurde. Nach zweimaligem Vortexen und der Inkubation der Proben bei Raumtemperatur wurden 0,2ml Chloroform (pro 1ml TRIzol) hinzugefügt. Bei der anschließenden Zentrifugation bildete sich eine klare, RNA-haltige Phase, welche vorsichtig in ein neues Eppendorf-Tube überführt und mit 0,5ml Isopropanol (pro 1ml TRIzol) gemischt wurde. Durch erneutes Inkubieren und Zentrifugieren setzte sich die RNA gelartig am Boden des Röhrchens ab. Nach Entfernen des Überstandes wurde das Pellet mit 1ml 75%igen Ethanol (pro 1ml TRIzol) gewaschen. Nach dem Abpipettieren des Alkohols wurde das Pellet in 50µl RNase-freiem Wasser bis zur vollständigen Suspension bei 55-60°C gelöst. Durch die anschließende Nanodrop-Messung konnte die RNA-Konzentration vermessen werden, welches der Ausgangspunkt für die RT-PCR (siehe 3.2.2) ist.

3.2.7 Proliferationstest

Für die Ermittlung der Proliferation der Zellen wurde in diesen Versuchen der MTS-Test durchgeführt. Dieser Test basiert auf der Aktivität von zellulären Dehydrogenasen. Diese Dehydrogenasen spalten nach Zugabe der MTS-Reagenz die enthaltene Tetrazolium-Verbindung (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -5-(3-Carboxymethoxyphenyl) -2-(4-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium; MTS) in das wasserlösliche und im Medium farblich sichtbare Formazan.

Die Zellen wurden in den durchgeführten Versuchen zunächst auf 3 verschiedene 96-Well-Platten in einer Konzentration von 5×10^3 ausplattiert und für 24 Stunden inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen mit den zu untersuchenden micro-RNAs transient transfiziert. Am 2./ 5. und 6. Tag post transfection wurde das Medium abgesaugt, 100µl der MTS-Reagenz (als 10%ige in PBS dilutierte Lösung) hinzugegeben und die Zellen für weitere 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Das entstandene Formazan konnte anschließend im Photometer bei einer Absorption von 490nm detektiert und quantifiziert werden. Von drei identisch behandelten Wells wurde der Mittelwert gebildet und für die weiteren Untersuchungen verwendet.

3.2.8 Caspase Glo 3/7-Assay

Der Caspase Glo 3/7-Assay misst die Aktivität der Caspasen 3 und 7. Diese cysteinyl aspartate specific **Proteasen** sind wichtiger Bestandteil in der Einleitung der Apoptose. Die Zugabe einer Caspase-Reagenz (aus dem Caspase Glo 3/7-Assay von Promega) zu den Zellen führt zu einem lumineszierenden Signal, welches proportional mit der Aktivität der Caspasen ansteigt und im Photometer quantifiziert werden kann.

Für den Versuch wurden zunächst die Zellen (J82) in einer Konzentration von 1×10^4 auf einer 96-Well Platte mit weißer Wellwand, um eine lumineszierende Streuung aus anderen Wells zu verhindern, subkultiviert. Nach Durchführung der Transfektion mit miR-29c, wurde zusätzlich eine Negativkontrolle erstellt, welche lediglich mit Lipofectamin beimpft und mit einer pre-miR-Control transfiziert wurde. Zusätzlich wurde eine Positivkontrolle mit TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in einer Konzentration von 1:1000 (0,1µl Reagenz auf 100µl Puffer) behandelt. Der TRAIL aus der Familie der TNF α (Tumor Nekrose Faktor α)-Proteine gilt als sicherer Induktor des programmierten Zelltods (Apoptose). Vor der Messung wurden der Caspase Puffer und das Substrat, wie in den Angaben des Herstellers beschrieben, zur Caspase Reagenz gemischt. Im nächsten Schritt wurden 100µl der Reagenz auf die 100µl Medium mit Zellen pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten konnte die Aktivität der Caspasen im Photometer gemessen werden. Es wurden je drei Wells identisch behandelt und für die Ergebnisse als Mittelwert zusammengefasst.

3.2.9 Transwell Migration Assay

Die Dissemination und Metastasierung von Tumoren erfolgt unter anderem durch die Fähigkeit der Zellen in die extrazelluläre Matrix zu migrieren. Diese Motilität der Zellen kann in in-vitro Experimenten geprüft werden und wurde in dieser Arbeit mithilfe des Transwell Migration Assays getestet. Hierbei wurden Transwell Kammern mit einer Porengröße von 8µm verwendet.

Zunächst wurden die Zellen in einer T25-Zellkulturflasche subkultiviert und am nächsten Tag mit der pre-miR-29c sowie der pre-miR-Control transfiziert. Am ersten Tag post transfection wurde das FCS-haltige Medium abgesaugt und mit serumfreien Hungermedium ersetzt. Die Zellen wurden sodann über 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Zur Vorbereitung der Transwell Kammern wurde Kollagen Typ I auf die Unterseite der

Material und Methoden

Membran gegeben und anschließend in Hungermedium mit 1% bovinem Serum Albumin geblockt. Die Zellen wurden anschließend in einer Konzentration von 3×10^5 in $100 \mu\text{l}$ Hungermedium gelöst und in die Transwell Kammer pipettiert. $500 \mu\text{l}$ serumhaltiges Vollmedium wurde daraufhin in eine 12-Well-Platte gegeben und die Transwell Kammern mitsamt der Zellen in das Medium gehängt, sodass die Membran vollständig mit Medium umgeben war. Über drei Stunden wurden die Zellen inkubiert und anschließend das Medium aus den Kammern entfernt. Die Zellen, die durch die Poren ins Kollagen migrierten, wurden durch das Eintauchen der Kammer in $500 \mu\text{l}$ Methanol fixiert. Im nächsten Schritt wurden die Kammern in PBS gewaschen, anschließend in $250 \mu\text{l}$ Kristallviolett gefärbt und abermals in PBS gewaschen. Abschließend wurde die Membran mit einem Skalpell aus der Kammer herausgetrennt und die migrierten Zellen unter dem Mikroskop gezählt.

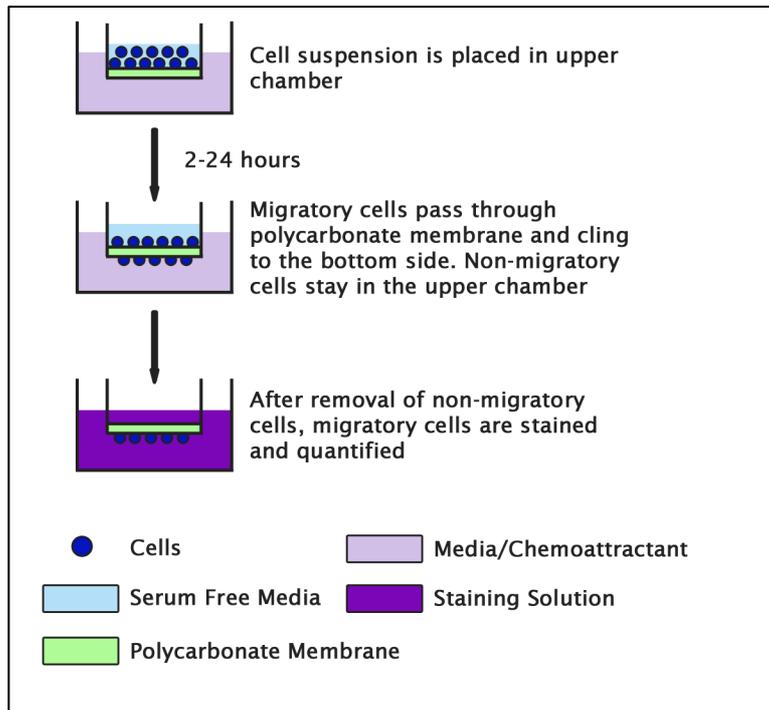


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Transwell Migration Assays (aus <https://www.cellbiolabs.com/sites/default/files/CBA-100-C-cell-migration-invasion-assay.pdf> mit freundlicher Genehmigung von Ken Rosser (Vice President, Business operations, Cell Biolabs Inc.))

Für die Ergebnisse wurden drei Transwell Kammern identisch behandelt und der Mittelwert ermittelt.

4 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Zusammenhang zwischen der Expression verschiedener micro-RNAs und der Invasivität des Harnblasenkarzinoms untersucht. Die Arbeit wird in drei Abschnitte gegliedert: Im Folgenden wird zunächst die Expression der miRs im Kollektiv mit Blasenkarzinom-Patienten analysiert und mit klinischen Parametern assoziiert. Anschließend werden die Ergebnisse der ex-vivo Analysen aus einem zweiten unabhängigen Tumorkollektiv erläutert, bevor auf die Auswertung der Ergebnisse der in-vitro Analyse und der Funktion der micro-RNAs in Zellmodellen eingegangen wird.

4.1 Expressionsprofil ausgewählter micro-RNAs im Gewebe des Harnblasenkarzinoms

Zur Untersuchung eines miRNA Expressionsprofils im papillären Urothelkarzinom wurden in der vorliegenden Arbeit 88 Gewebeproben von 77 Patienten ausgewertet. In Tabelle 1 wurden charakteristische, klinische Parameter des Patientenkollektivs dargestellt. Die Tumorproben wurden von Patienten, die sich an der Uniklinik Würzburg einer transurethraler Resektion der Blase (TUR-B) (alle NMIBC, teils MIBC) oder einer radikalen Zystektomie (MIBC) unterziehen mussten, gewonnen. Als Referenzgewebe diente im Rahmen einer TUR-B gewonnenes und in der histopathologischen Untersuchung als nicht malignes bzw. gesundes Urothel markiertes Gewebe. Hierfür wurde sowohl an den Resektionsrand eines Tumors angrenzendes gesundes Gewebe (markiert durch das Institut für Pathologie der Universität Würzburg, mit freundlicher Unterstützung durch Prof. Dr. A. Rosenwald), als auch Gewebe von Patienten ohne Nachweis eines Karzinoms verwendet, welches im Rahmen einer Diagnostik zum Ausschluss eines Tumors gewonnen wurde. Aus den in Paraffin eingebetteten Tumorproben wurden die durch die Pathologie markierten Areale mit einem Tumoranteil >90% präpariert und nach RNA-Isolierung die miR-Expression analysiert (hierzu vgl. Methodik 3.2.1).

Ziel der Untersuchung stellten die Fragen dar, inwieweit die Gruppe der NMIBC mit verschiedenem klinischem Verlauf aberrante miR-Expressionen aufweisen und sich in Ihren miR-Expressionsprofilen unterscheiden. Für diese retrospektive Untersuchung

Ergebnisse

wurde ein in der Klinik für Urologie und Kinderurologie der Universität Würzburg aufgebautes Blasenkarzinom-Kollektiv (n=72) verwendet. Ein Ethikvotum der Ethik-Kommission der Universität Würzburg für die Verwendung des Materials in der vorliegenden Studie liegt mit dem Zeichen 47/20-am vor.

Dieses Kollektiv setzt sich aus 48 NMIBC und 24 MIBC zusammen: Anhand der aus den Patientenakten ersichtlichen Follow-up Daten erfolgte für die Fragestellung eine Vorselektion (siehe Tab.1), um den Anteil von klinisch unterschiedlich verlaufenden NMIBCs zu erhöhen. So wurden die NMIBCs (n=48) in klinisch unterschiedlich verlaufenden Gruppen unterteilt: NMIBC ohne ein muskelinvasives Rezidiv im Verlauf der Erkrankung (n=40) und NMIBC mit einem histologischen Progress im Verlauf (n=8). Für weitere Fragestellungen wurde muskelinvasives MIBC-Material (n=24) sowie nicht malignes Referenzgewebe aus dem Urothel verwendet (n=16). Ergänzend hierzu erfolgte eine nachträgliche Selektion von 6 MIBC-Präparaten aus dem Pool der 24 MIBC-Patienten, welche im Verlauf ein muskelinvasives Rezidiv zeigten und von denen beide (NMIBC und MIBC-Material) histologischen Präparate vorliegen.

Die Zusammensetzungen des verwendeten BC- Gesamtkollektives, der Untergruppen sowie von histopathologischen Merkmalen des Kollektives sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Das Grading erfolgte nach der bis 2004 üblichen WHO-Klassifikation (G1-G3).

Tabelle 1: Übersicht histopathologischer Merkmale des verwendeten Blasenkarzinom-Kollektivs.

Patientenanzahl	n=77															
Anzahl der ausgewerteten Tumorproben	n=72															
Anzahl des ausgewerteten gesunden Referenzgewebes	n=16															
Tumor-Stadium (pT-Stadium)	<table style="border: none; width: 100%;"> <tr> <td style="border: none;">Ta: n=34</td> <td style="border: none;">}</td> <td style="border: none;">NMIBC: n=48</td> </tr> <tr> <td style="border: none;">pT1: n=14</td> <td style="border: none;"></td> <td style="border: none;"></td> </tr> <tr> <td style="border: none;">pT2: n=14</td> <td style="border: none;">}</td> <td style="border: none;"></td> </tr> <tr> <td style="border: none;">pT3: n=8</td> <td style="border: none;"></td> <td style="border: none;">MIBC: n=24</td> </tr> <tr> <td style="border: none;">pT4: n=2</td> <td style="border: none;"></td> <td style="border: none;"></td> </tr> </table>	Ta: n=34	}	NMIBC: n=48	pT1: n=14			pT2: n=14	}		pT3: n=8		MIBC: n=24	pT4: n=2		
Ta: n=34	}	NMIBC: n=48														
pT1: n=14																
pT2: n=14	}															
pT3: n=8		MIBC: n=24														
pT4: n=2																
Grade	G1: n=15 G2: n=44 G3: n=12 k.A.: n=1															

Ergebnisse

Alter	Ø 67 Jahre (Range: 18-89 Jahre)
Geschlecht	w: n=22 (28,6%) m: n=55 (71,4%)
Follow up	Ø aller Patienten (n=77): 95,8 Monate (Range: 0-270 Monate) Ø NMIBC (n=48): 113,3 Monate (Range: 0-270 Monate)
NMIBC ohne muskelinvasives Rezidiv	n=40
NMIBC mit Progress	n=8
MIBC	n=24
Hiervon gepaart vorliegende NMIBC	n=6
Follow-up der NMIBC bis zum klinischen Progress	Ø 51,5 Monate (Range: 9-191 Monate) (n=8)
Verstorben (nicht UCa-spezifisch)	n=1
Verstorben (UCa-spezifisch)	n=4 (nach Ø 52,3 Monate)
Relative miR-29c Expression in den untersuchten Karzinomen	-9,16-3,24 Δ C _T (Ø -1,1 Δ C _T)
Relative miR-145 Expression in den untersuchten Karzinomen	-2,09-8,16 Δ C _T (Ø 3,13 Δ C _T)

4.1.1 micro-RNA-Expressionsprofil im Blasenkarzinom und gesundem Urothel der Blase

Um einen Einfluss von miRs auf die Genese des Blasenkarzinom zu untersuchen, wurde ein Expressionsprofil der unten genannten miRs erstellt und in Abbildung 3 veranschaulicht. Es wurde die Expression im unselektionierten Blasenkarzinom-Gesamtkollektiv (n=72), welches sowohl nichtmuskelinvasives als auch muskelinvasives Karzinomgewebe beinhaltetete, mit gesundem Urothel (Referenzgewebe, n= 16)) verglichen.

Ergebnisse

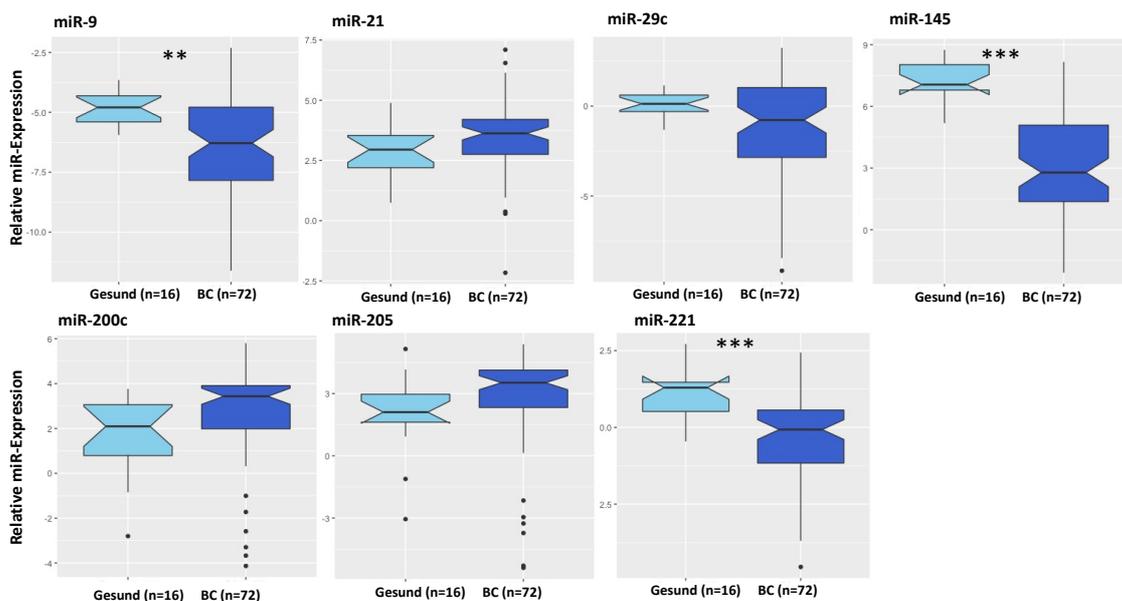


Abbildung 3: Gegenüberstellung der relativen miR-Expression im Blasenkarzinom und gesundem Referenzmaterial
Darstellung des Expressionsprofils der miRs 9,21,29c,145,200c,205 und 221 im Blasenkarzinom (n=72) mit Gegenüberstellung zu gesundem Referenzgewebe (n=16) anhand der relativen miR-Expression (in ΔC_T). Veranschaulichung mithilfe von Box-Whisker-Plot. Signifikanztestung mittels Student's T-Test: *: p-Wert<0,05. **: p-Wert<0,01.***: p-Wert<0,001

Zunächst wurde die Über- bzw. Unterexpression der unterschiedlichen micro-RNAs im Tumor im Vergleich zum gesunden Referenzgewebe in der Expressionsanalyse gegenübergestellt. Die Expressionsdaten sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: Vergleich der miR-Expression im gesunden respektive im tumorösen Gewebe. Signifikanztestung mittels Student's T-Test. Darstellung der Mediane der Expression (in ΔC_T) und der Differenz der relativen Expressionen von gesundem und Tumor-Gewebe (in $\Delta\Delta C_T$).

Micro-RNA	Median der rel. Expression in gesundem Gewebe (in ΔC_T)	Median der rel. Expression im Tumorgewebe (in ΔC_T)	Differenz der relativen miR-Expressionen (in $\Delta\Delta C_T$)	p-Wert im Student's T-Test
miR-9	-4,8	-6,29	-1,49	0,004
miR-21	2,95	3,63	0,68	0,2
miR-29c	0,13	-0,78	-0,65	0,09
miR-145	7,06	2,78	-4,28	2×10^{-9}
miR-200c	2,10	3,44	1,34	0,06
miR-205	2,10	3,52	1,42	0,26
miR-221	1,29	-0,07	-1,36	5×10^{-5}

Eine Überexprimierung im Tumorgewebe zeigte sich in den miRs-21, -200c und -205, wovon lediglich die miR-200c signifikante p-Werte im Student's T-Test aufwies ($p=0,006$). Im Blasentumor herabreguliert sind die miRs-9, -29c, -145 und -221. Hiervon ließen sich bei allen, außer der miR-29c, signifikante Unterschiede zum gesunden Referenzgewebe nachweisen. Bei miR-145 und -221 zeigten sich statistisch hoch signifikante Werte ($p < 0,001$). MiR-29c zeigte lediglich moderat signifikante Unterschiede bei einem p-Wert von 0,09 und somit eine Tendenz zur Herabregulation im Tumormaterial. Somit sind in dem verwendeten Blasenkarzinomkollektiv die miRs-9,-29c,-145, -200c und -221 aberrant exprimiert.

4.1.2 Expression der untersuchten miRs in Vergleich von NMIBC und MIBC

Um zu untersuchen, ob Blasenkarzinome mit unterschiedlicher Aggressivität bzw. unterschiedlich starker Invasivität eine abweichende miRNA-Expression aufweisen, wurde das Tumorkollektiv in nicht-muskelinvasives (NMIBC) und muskelinvasives (MIBC) Tumormaterial unterschieden. Die Expressionsdaten der beiden Gruppen wurden gegenübergestellt und in Abbildung 4 veranschaulicht.

Ergebnisse

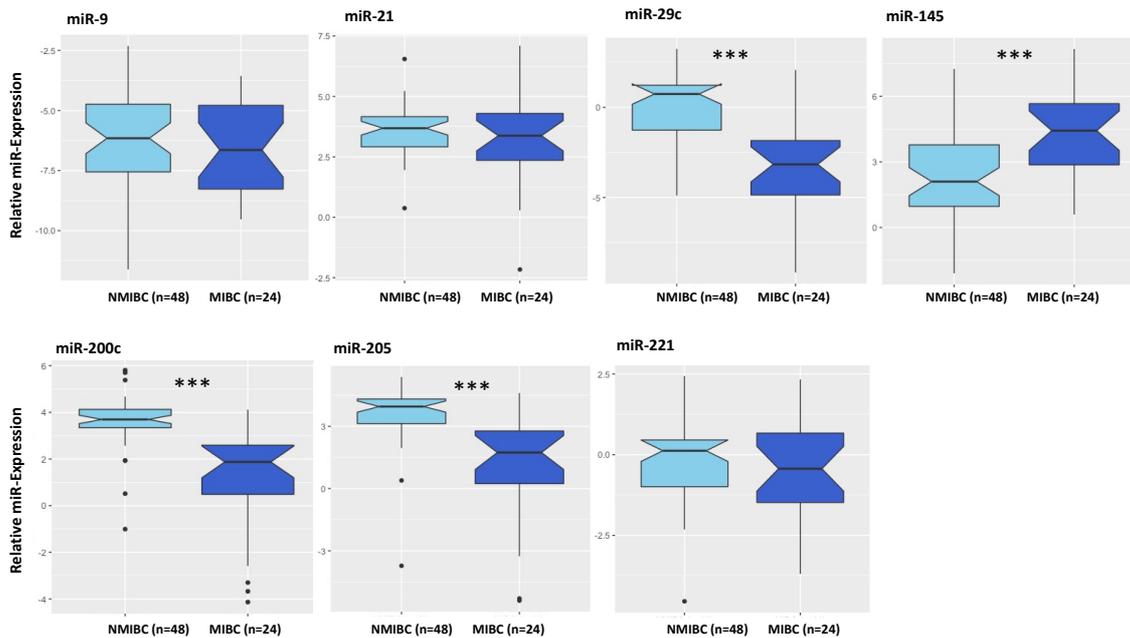


Abbildung 4: Vergleich der relativen miR-Expression des NMIBC mit dem MIBC
Darstellung des Expressionsprofils der miRs -9,-21,-29c,-145,-200c,-205 und 221 im nicht-muskelinvasivem Blasenkarzinom (n=48) mit Gegenüberstellung zu muskelinvasivem Karzinomgewebe (n=24) anhand der relativen miR-Expression (in ΔC_T). Veranschaulichung mithilfe von Box-Whisker-Plot. Signifikanztestung mittels Student's T-Test: *: p-Wert<0,05. **: p-Wert<0,01. ***: p-Wert<0,001.

Der Überblick in Abbildung 4 zeigt zunächst, dass die miR-Expression der MIBC-Proben (dunkelblau) in allen untersuchten miRNAs, mit Ausnahme der miR-145, im Vergleich zum NMIBC herabreguliert ist. Zwischen den zwei untersuchten Kollektiven zeigten sich in der Signifikanztestung für die miR-29c, -145, -200c und -205 hochsignifikante Unterschiede, für miR-9, -21 und -221 hingegen konnte keine statistische Signifikanz beobachtet werden.

Betrachtet man die Spannweiten (*Whiskers*) der Box-Whisker-Plots der miR-29c sowie miR-145, so fällt eine mit 8,14 ΔC_T (für miR-29c) und 9,34 ΔC_T (für miR-145) überdurchschnittlich erhöhte Schwankungsbreite der relativen Expression im untersuchten nicht muskelinvasiven Tumormaterial auf.

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse somit eine Assoziation der Expression von miR-29c,-200c, -205 und -145 mit der Invasivität bzw. Aggressivität der untersuchten Blasen Tumore.

Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde nach Schwellenwerten der miR-Expression gesucht, die eine robuste Unterscheidung des Gesamtkollektives in NMIBC und MIBC

Ergebnisse

erlauben. Für die Beurteilung dieser Schwellenwerte wurde jeweils anhand von ROC-Analysen (*receiver operating characteristic*) die Spezifität und Sensitivität ermittelt. Zusätzlich wurde hierbei die AUC (*area under the curve*) bestimmt und analysiert.

Die Sensitivität bestimmt die Rate der richtig-positiven Ergebnisse, in diesem Fall dem Vorliegen eines muskelinvasiven Tumors anhand des ermittelten Schwellenwertes.

Die Spezifität beschreibt hingegen die Rate der richtig negativen Werte, welchen sich in dem vorliegenden Fall auf das Vorliegen eines nicht-muskelinvasiven Tumors bezieht.

Entsprechend korreliert eine niedrige Sensitivität mit einer höheren Rate an falsch negativen und eine niedrige Spezifität mit einer höheren Rate an falsch positiven Ergebnissen.

Die AUC beschreibt den Bereich unter der ROC-Kurve, welche in diesem Fall aus Gründen der Übersicht nicht für jeden Fall einzeln grafisch dargestellt ist. Je näher die AUC bei 1 liegt, desto höher ist die Spezifität und Sensitivität des logistischen Regressionsmodells; je näher bei 0,5, desto niedriger ist die Spezifität und Sensitivität des Modells.

Anhand dieser statistischen Testungen lässt sich quantifizieren wie valide der ermittelte Schwellenwert eine Unterscheidung zwischen NMIBC und MIBC zulässt. Diese Ergebnisse wurden in

Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: Zusammenfassung der Ergebnisse aus der ROC-Analyse. Übersichtliche Darstellung der Ergebnisse nach Ermittlung eines Schwellenwertes und der jeweiligen Spezifität, Sensitivität sowie AUC für alle untersuchten miRs. Zudem sind die Ergebnisse der statistischen Signifikanztestung mittels Student's T-Test aufgeführt.

Micro-RNA	p-Wert im Student's T-Test	Bester ermittelter Schwellenwert in ΔC_T	Sensitivität des Schwellenwertes	Spezifität des Schwellenwertes	AUC
miR-9	0,56	-6,76	0,667	0,5	0,55
miR-21	0,26	1,825	0,979	0,25	0,56
miR-29c	5×10^{-8}	-2,838	0,708	0,958	0,84
miR-145	7×10^{-4}	2,195	0,521	0,917	0,74
miR-200c	3×10^{-8}	2,622	0,896	0,833	0,90
miR-205	4×10^{-7}	2,963	0,812	0,917	0,87
miR-221	0,38	-0,072	0,667	0,583	0,57

Ergebnisse

Die Ergebnisse von Abbildung 4 spiegeln sich auch in der logistischen Regressionsanalyse (Tabelle 3) wider. Diese unterstreicht auch die Korrelation des p-Wertes mit der AUC, welche zeigt, dass mit einer an 1 annähernden AUC auch die Signifikanz der Ergebnisse in der Signifikanztestung steigt.

Für miR-9, miR-21 und miR-221 konnten bei nicht-signifikanten p-Werten eine AUC zwischen 0,55 und 0,57 ermittelt werden.

Hingegen zeigten sich bei den untersuchten miRs mit hoch signifikanten p-Werten auch ein AUC Wert, der gegen den Idealwert von 1 läuft (zwischen 0,74 und 0,9). Vor allem ist die miR-200c mit der höchsten Signifikanz unter den untersuchten miRs hervorzuheben. Durch die Ermittlung des Schwellenwertes von $2,62\Delta C_T$ ist in dem vorliegenden Patientenkollektiv eine verlässliche Dichotomisierung in NMIBC und MIBC mit einem AUC Wert von 0,9 bei einer Spezifität von 0,83 und einer Sensitivität von 0,89 möglich.

Für das untersuchte Kollektiv gelten zusammenfassend miR-29c, -145, -200c und -205 als vielversprechende Marker für Invasivität, da sich NMIBC von MIBC anhand der jeweils ermittelten Grenzwerte statistisch robust unterscheiden lassen.

Um diese Ergebnisse weiter zu differenzieren, wurden zusätzlich sechs Patienten untersucht, von denen sowohl die initiale Probe eines NMIBC (Material mittels TUR-B gewonnen) als auch das Zystektomie-Präparat nach muskelinvasivem Rezidiv vorliegt. Die relative miR-Expression ist in Abbildung 5 zusammenfassend veranschaulicht.

Ergebnisse

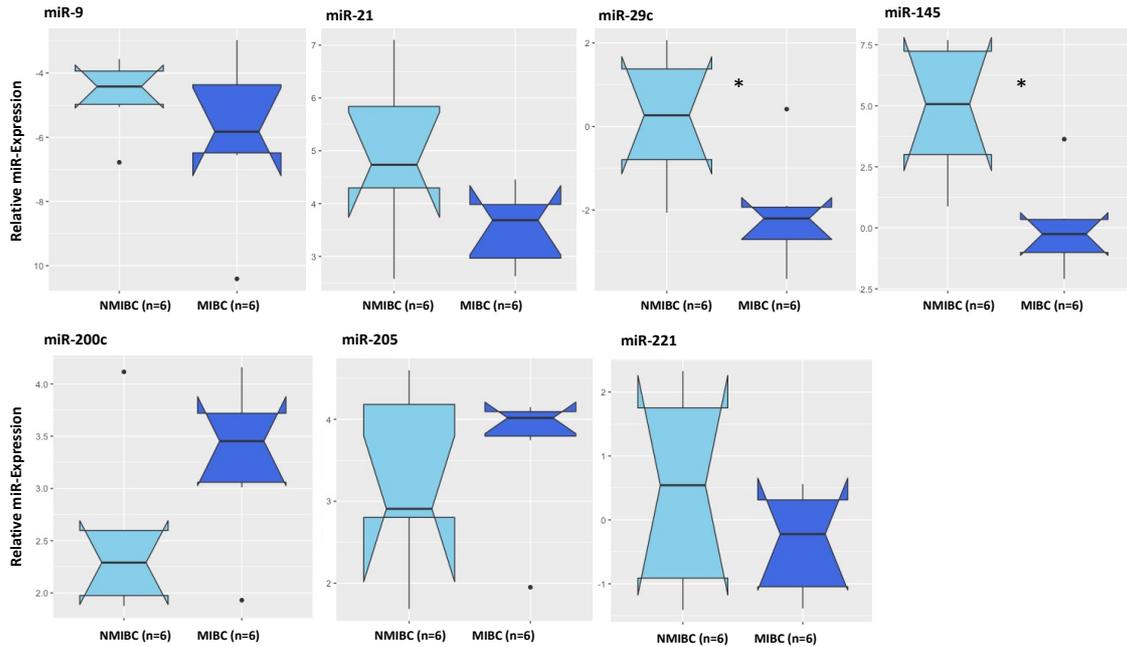


Abbildung 5: Vergleich der miR-Expression im NMIBC mit MIBC in den gepaarten Proben. Darstellung der Expression der miRs -9, -21, -29c, -145, -200c, -205 und -221 der sechs Patienten mit nicht-muskelinvasivem Blasenkarzinom (n=6) mit Gegenüberstellung zu ihrem muskelinvasivem Karzinomgewebe (n=6) anhand der relativen miR-Expression (in ΔC_T). Veranschaulichung mithilfe von Box-Whisker-Plot. Signifikanztestung mittels gepaartem Student's T-Test: *: p-Wert < 0,05.

Wie in Abbildung 5 veranschaulicht, zeigt sich bei miR-29c (p-Wert: 0,023) und miR-145 (p-Wert: 0,009) eine statistisch signifikant niedrigere Expression im MIBC. Verglichen mit den in Abbildung 4 veranschaulichten Ergebnissen konnte sich somit für miR-29c erneut eine niedrigere Expression im fortgeschrittenen Tumormaterial nachweisen lassen. Dies legt nahe, dass mit dem Fortschreiten der Erkrankung und einer Muskelinvasion die miR-29c-Expression weiter abnimmt. Für die miR-145 ergibt sich mit der Überexpression in der nicht gepaarten Untersuchung und Herabregulation in der gepaarten Untersuchung letztlich kontroverse Expression. Eine eindeutig tumorsuppressive Funktion der miR-145 konnte in dieser Fragestellung somit nicht herausgearbeitet werden.

4.1.3 Assoziation der miR-Expression im NMIBC mit dem klinischen Verlauf

Aufbauend auf der zuvor beschriebenen Assoziation der Expression von miR-29c, miR-145, miR-200c und miR-205 mit der Invasivität der BC wurde sich im Folgenden vorerst auf die weitere Untersuchung dieser miRs konzentriert. Um eine mögliche prognostische Aussagekraft der ausgewählten miRs darzustellen, wurde die Expression von miR-29c, -

Ergebnisse

145, -200c und -205, anhand des klinischen Verlaufes der im Kollektiv vorhandenen NMIBC differenziert. Dazu wurden die NMIBC des Kollektivs (n=48) anhand der patientenspezifischen Follow-up Daten in zwei Gruppen – nicht progrediente NMIBC gegenüber progrediente NMIBC- unterteilt und deren Expressionsdaten gegenübergestellt (siehe Abbildung 6). Die „nicht progredienten“ NMIBC (n=40) setzen sich aus Patienten zusammen, welche im gesamten Follow-up seit der Erstdiagnose entweder keine oder maximal pT1-Rezidive aufwiesen. Die Patienten mit „progredienten“ NMIBC (n=8) entwickelten während des Beobachtungszeitraums ein muskelinvasives (\geq pT2) Blasen tumorrezidiv (siehe auch Tabelle 1).

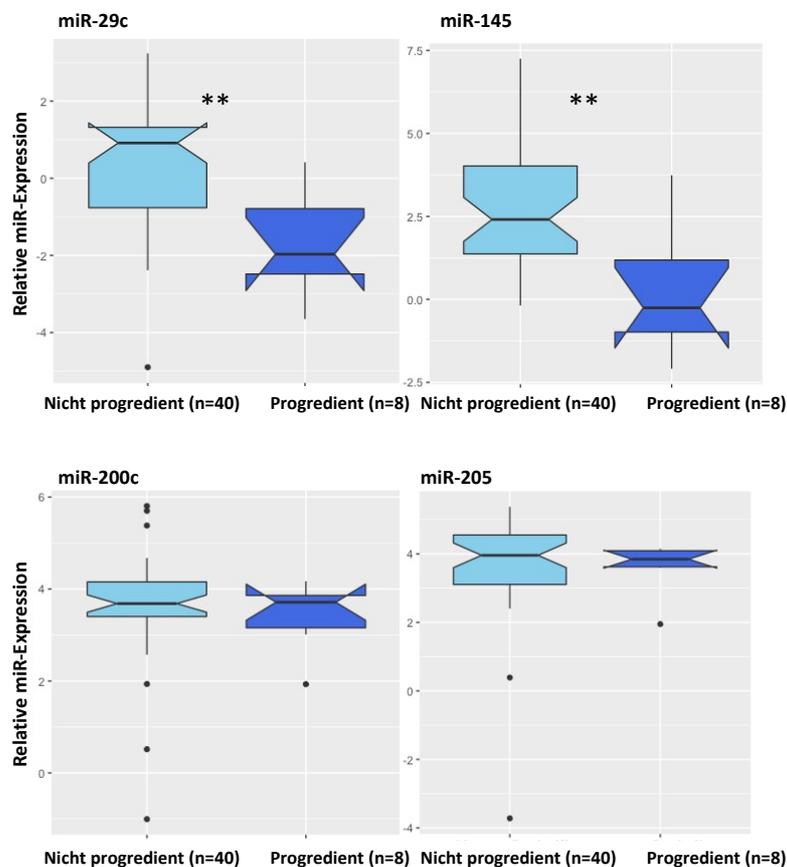


Abbildung 6: Vergleich der miR-Expression im NMIBC mit unterschiedlicher Progression. p-Wert Ermittlung mittels Student's T-Test. *: p-Wert<0,05. **: p-Wert<0,01.

Wie im Box-Whisker-Plot in Abbildung 6 verdeutlicht, lassen sich für miR-29c und miR-145 signifikante Unterschiede ($p < 0,01$) zwischen den zwei unterschiedlichen Gruppen der NMIBC feststellen, während keine Unterschiede für miR-200c und miR-205 vorhanden sind.

So ist die miR-29c in den progredienten NMIBCs mit einem $\Delta\Delta C_T$ der Mediane von $2,89C_T$ signifikant herabreguliert ($p=0,0016$).

Für miR-145 lässt sich beobachten, dass diese in den progredienten NMIBC im Verhältnis zu den nicht muskulinvasiv rezidivierenden Tumoren signifikant niedriger exprimiert ist (p-Wert: 0,0029 und $\Delta\Delta C_T$ der Mediane: $2,67C_T$ [$2,41\Delta C_T$ und $0,26\Delta C_T$]). Insgesamt ist somit zu erkennen, dass die relative Expression sowohl der miR-29c, als auch der miR-145 in den prognostisch ungünstigeren NMIBCs signifikant herabreguliert ist.

Da für die miR-200c bei einem $\Delta\Delta C_T$ der Mediane von $0,03\Delta C_T$ und für die miR-205 von $0,11\Delta C_T$ eine fast gleiche Expression zwischen beiden Gruppen zu beobachten war, wurde auf weiterführende Untersuchungen bezüglich dieser beiden miRs abgesehen

4.1.4 Logistische Regressionsanalyse anhand der Expressionsdaten der miR-29c und miR-145

4.1.4.1 MiR-29c und miR-145 als möglicher prognostischer Indikator für Progress im NMIBC

Die vorangegangenen Ergebnisse konnten zeigen, dass die relative Expression der miR-29c und miR-145 in den progredienten Karzinomen den progressionsfreien NMIBC gegenüber herabreguliert ist. Dies diente als Ausgangspunkt für die weitere Untersuchung des Kollektivs der NMIBC und die Korrelation mit klinischen Follow-up-Daten. Dafür wurden die Expressionsdaten mittels einer ROC-Analyse (receiver operating characteristic) dichotomisiert und auf die prognostische Aussagekraft in Bezug auf weitere Progression untersucht. Daraufhin wurde der ermittelte Schwellenwert genutzt, um eine Kaplan-Meier-Kurve für das progressionsfreie Überleben zu erstellen. In Abbildung 7 wurde ein Follow-up Zeitraum von je 17 Jahren abgebildet.

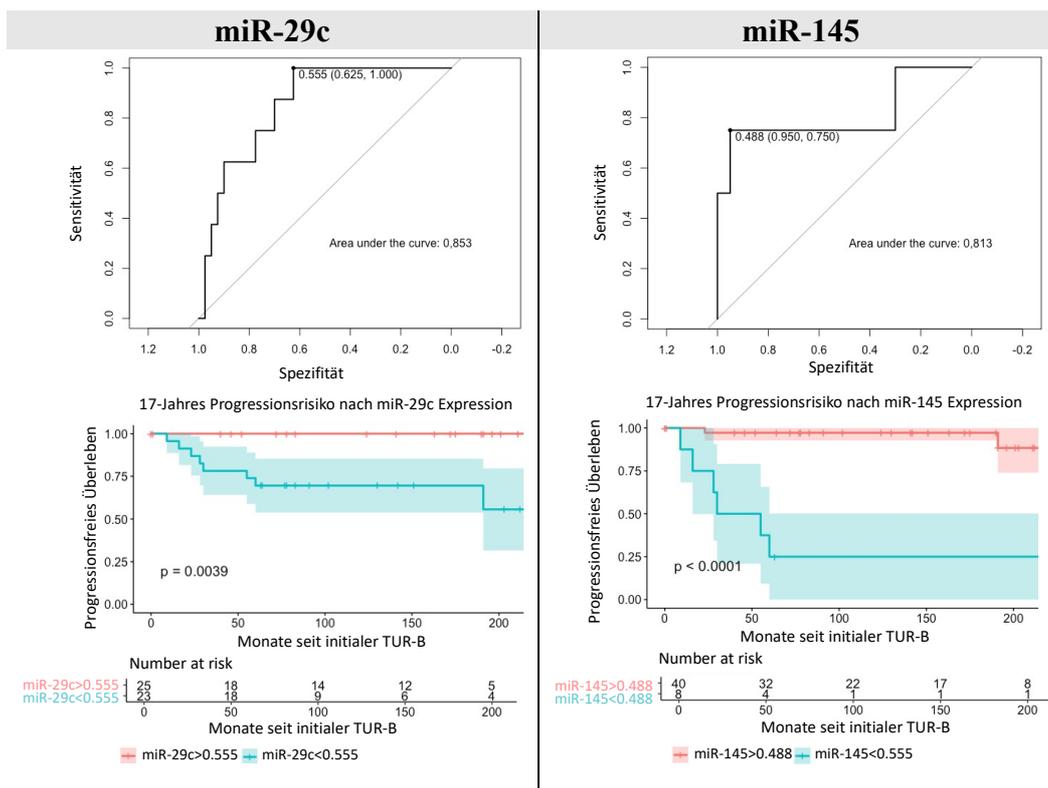


Abbildung 7 Kaplan-Meier-Analyse zur Veranschaulichung des Progressionsrisiko anhand des Schwellenwertes der miR-29c und miR-145. Darstellung der ROC-Kurve mit Darstellung des Schwellenwertes zur Dichotomisierung nach Ermittlung des Youden-Indexes für miR-29c und miR-145. Zudem Darstellung der Kaplan-Meier-Kurve zur Untersuchung des progressionsfreien Überlebens nach Dichotomisierung der NMIBC von miR-29c und miR-145.

Um eine Aussage bezüglich des Progressionsrisikos treffen zu können, wurde mithilfe der ROC-Analyse die Gruppe der NMIBC dichotomisiert. Bei miR-29c wurde durch Ermittlung des Youden Indexes für die Einteilung der Gruppen als Schwellenwert $0,555\Delta C_T$ definiert. Der Schwellenwert unterteilte die NMIBC in zwei ähnlich große Gruppen mit $n=25$ für die miR-29c-Expression $>0,555\Delta C_T$ und $n=23$ für die miR-29c $<0,555\Delta C_T$. Für den ermittelten Wert zeigte sich eine hohe Sensitivität von 100% sowie eine Spezifität von 62,5% bei einer AUC von 0,85. In der Kaplan Meier Kurve zeigte sich zwischen den dichotomisierten Gruppen ein signifikanter Unterschied (p-Wert im log-rank-test = 0,0039). Somit ist eine Korrelation zwischen der stärker herabregulierten Gruppe (miR-29c-Expression $<0,555\Delta C_T$) und dem früheren Auftreten eines muskelinvasiven Progresses zu erkennen.

Bei der Untersuchung von miR-145 wurden die Gruppen anhand des Schwellenwertes von $0,488\Delta C_T$ dichotomisiert. Hierfür zeigte sich bei einer Sensitivität von 75% eine hohe

Spezifität von 95%. Die Kaplan-Meier-Analyse zeigte hochsignifikante Unterschiede zwischen den Gruppen (p-Wert: <0,0001).

Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass im vorliegenden Kollektiv die Herabregulation der miR-29c und miR-145 Expression ein verlässlicher Prognosemarker für das Auftreten von Muskelinvasivität im Verlauf der Erkrankung ist.

4.1.4.2 Cox-Regression zur Ermittlung des Progressionsrisikos

Um die Wertigkeit der miR-29c und miR-145 zur Einteilung in prognostisch günstigere und ungünstige NMIBC statistisch besser abschätzen zu können, wurde das Auftreten eines muskelinvasiven Progresses weiter mit dem ermittelten Schwellenwert korreliert und eine univariate Cox-Regressionsanalyse durchgeführt. Durch die Ermittlung der Hazard Ratio lässt sich die Wahrscheinlichkeit eines muskelinvasiven Rezidivs weiter quantifizieren.

Tabelle 4: Ergebnisse der univariaten Cox-Regressionsanalyse. Als Variable wurde das Auftreten eines muskelinvasiven Rezidivs im Verlauf für die Untersuchung gewählt.

	Hazard Ratio	Unteres CI	Oberes CI	Likelihood ratio test (p-Wert)
miR-29c	0,64	0,46	0,89	0,01
miR-145	0,53	0,33	0,84	0,001

Hierbei zeigte sich eine Hazard Ratio von 0,64. Somit ist ein Eintreten der Nullhypothese – in diesem Fall ein muskelinvasives Rezidiv der NMIBC im Verlauf – in der Gruppe mit einer höheren miR-29c-Expression signifikant erniedrigt (p-Wert: 0,01). Bei einem 95% Konfidenzintervall von 0,46-0,89 ist die Wahrscheinlichkeit eines Progresses um mindestens 11% und maximal 54%, durchschnittlich jedoch 36% (HR von 0,64) reduziert.

Auch in der univariaten Cox-Regression der miR-145 konnte bei einer Hazard Ratio von 0,53 ein um durchschnittlich 47% signifikant erniedrigtes Risiko (p-Wert: 0,001) eines muskelinvasiven Rezidivs bei einer höheren miR-145-Expression gezeigt werden. Das 95%-Konfidenzintervall beträgt hier 0,33-0,84.

4.1.4.3 Kombiniertes Regressionsmodell

Anschließend an die vorherigen Ergebnisse wurde eine multivariate Regressionsanalyse durchgeführt und somit untersucht, ob das Einbeziehen mehrerer, verschiedener micro-

Ergebnisse

RNAs eine höhere statistische Aussagekraft bezüglich der Fragestellung zeigen kann. Mithilfe des schrittweisen statistischen AIC (*Akaike information criterion*) wurden zunächst alle in dieser Arbeit untersuchten micro-RNAs geprüft. Ebenfalls wurde untersucht, inwiefern die Berücksichtigung des Tumorstadiums (pTa oder pT1), des Gradings (G1-3) oder des Geschlechts die statistische Aussagekraft erhöhen kann. In diesen Untersuchungen konnte bezüglich der Fragestellung nach dem Progressionsrisiko der höchste statistische Nutzen für die kombinierte Untersuchung der Expression der miR-29c und miR-145 gezeigt werden. Die vorangegangenen Untersuchungen der ROC-Kurve, Kaplan-Meier-Kurve und Cox-Regression wurde schließlich auch für die Kombination der zwei miRs als kombiniertes Regressionsmodell geprüft. Alle anderen im multifaktoriellen Regressionsmodell untersuchten Faktoren konnten keinen zusätzlichen Nutzen im Sinne einer erhöhten statistischen Aussagekraft bringen.

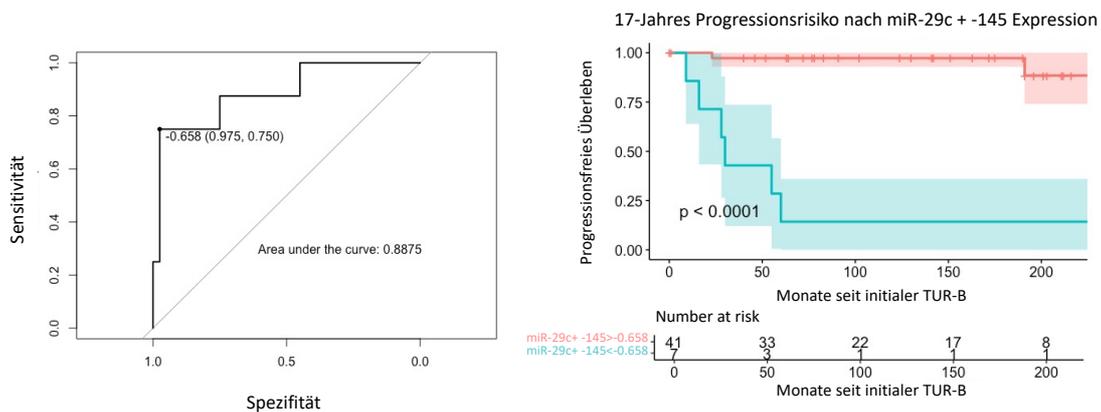


Abbildung 8: Regressionsmodell zur Abschätzung des Progressionsrisikos anhand des Schwellenwertes der miR-29c und miR-145.
Darstellung der ROC-Kurve mit Darstellung des Schwellenwertes zur Dichotomisierung nach Ermittlung des Youden-Indexes für miR-29c und miR-145. Zudem Darstellung der Kaplan-Meier-Kurve zur Untersuchung des progressionsfreien Überlebens nach Dichotomisierung der NMIBC von miR-29c und miR-145.

Über die ROC-Kurve wurde zunächst ein weiterer Schwellenwert ermittelt, welcher für sowohl die miR-29c als auch miR-145 Gültigkeit besitzt. Dieser wurde mithilfe des Youden-Index auf $-0,658\Delta C_T$ definiert bei einer Sensitivität von 75% und einer Spezifität von 97,5%. Nach Dichotomisierung der beiden Gruppen anhand des Schwellenwertes konnte die Kaplan-Meier-Analyse die in Abbildung 8 dargestellte Kurve zeigen. Bei einem p-Wert von $<0,0001$ konnte hier eine statistisch hoch signifikante Aussagekraft des Schwellenwertes auch im multivariaten Modell gezeigt werden.

In der angeschlossenen Cox-Analyse konnte bei einem p-Wert von $p=0.0007$ eine noch höhere statistische Signifikanz in der multivariaten Begutachtung im Vergleich zur univariaten Analyse der zwei micro-RNAs gezeigt werden.

4.1.4.4 MiR-29c und miR-145 als prognostischer Marker für tumorbedingte Mortalität

Nach den Beobachtungen hinsichtlich des progressionsfreien Überlebens wurde daraufhin das Kollektiv bezüglich der tumorspezifischen Mortalität betrachtet. Die Expressionsdaten wurden erneut anhand des zuvor für die Progression ermittelten Schwellenwertes dichotomisiert und auf die mortalitätsbezogene Aussagekraft analysiert. Die resultierende Kaplan-Meier Kurve im Hinblick auf das Gesamt-Überleben ist grafisch in Abbildung 9 dargestellt. Der Beobachtungszeitraum beträgt auch hier 17 Jahre. Die Anzahl der tumorassoziierten Todesfälle ist $n=4$.

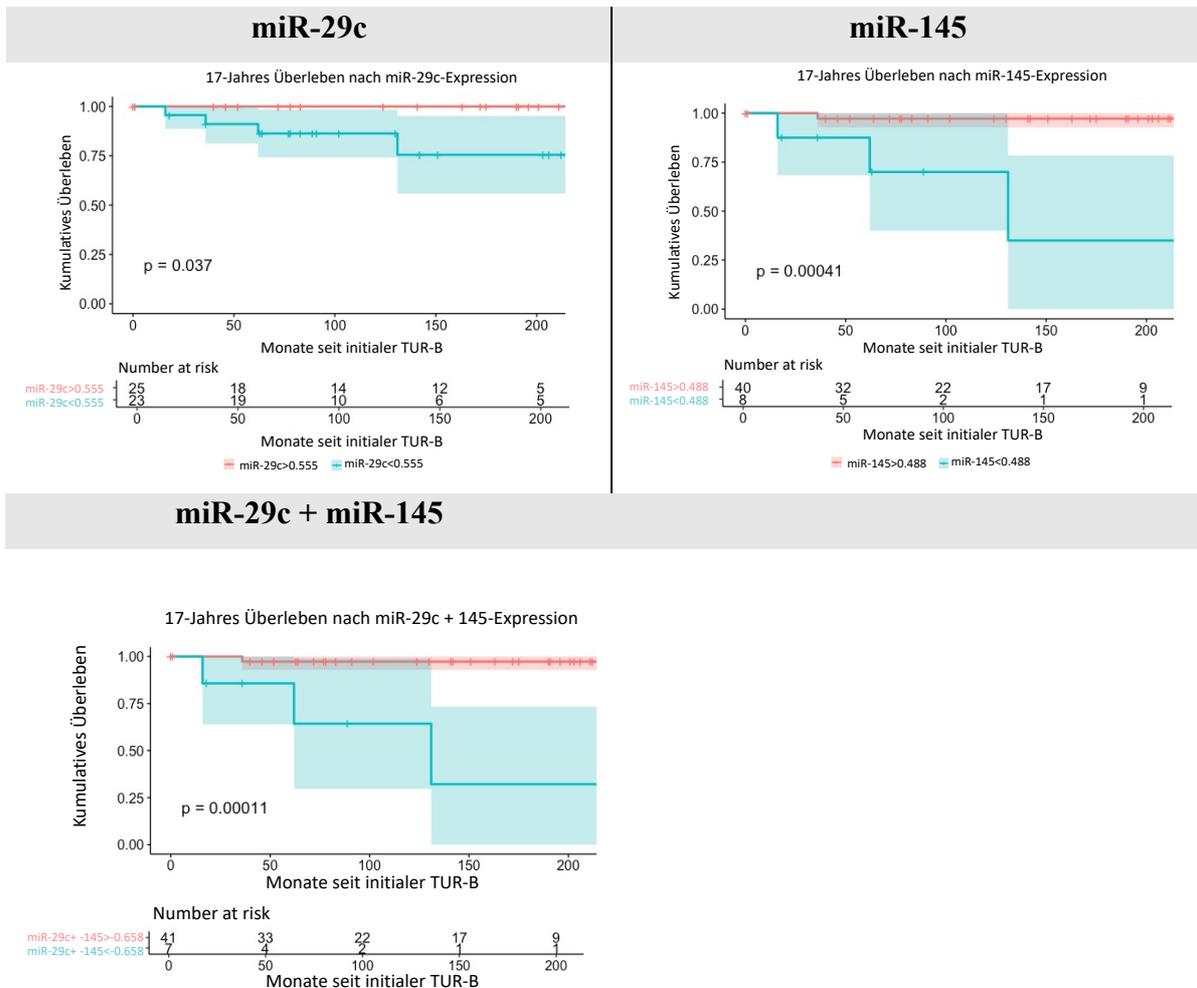


Abbildung 9: Darstellung der Kaplan-Meier-Kurve zur Untersuchung der Mortalität. Hierfür erfolgte die Dichotomisierung der NMIBC anhand der Schwellenwerte der Expression von miR-29c und miR-145 in der uni- und multivariaten Analyse.

Für die Expressionsdaten der miR-29c wurde ein Schwellenwert von $0,555\Delta C_T$ ermittelt. Trotz der niedrigen Fallzahl konnte mit diesem Schwellenwert eine Gruppe mit signifikant höheren Risiko (p-Wert im log-rank-test=0,037) bestimmt werden an dem diagnostizierten NMIBC zu versterben. Alle tumorassoziierten Todesfälle waren in der Gruppe mit einer Expression von $>0,555\Delta C_T$ zu finden.

Bei miR-145 wurde das Kollektiv anhand des Schwellenwertes von $0,475\Delta C_T$ dichotomisiert. Hierfür konnte in der Kaplan-Meier-Analyse bei einem p-Wert von 0,0004 ebenfalls eine Signifikanz für eine erhöhte Mortalität in der Gruppe mit einer niedrigeren miR-145-Expression nachgewiesen werden.

Bei dem für beide miRs ermittelten Schwellenwert von $-0,658\Delta C_T$ zeigte sich in der Kaplan-Meier-Kurve erneut eine höhere statistische Aussagekraft bei einem p-Wert im log-rank-test von $p=0,0001$. Damit ist für das untersuchte Kollektiv eine Expression der miR-29c und miR-145 von $<-0,658\Delta C_T$ mit einem höheren Mortalitätsrisiko vergesellschaftet. Aufgrund der geringen Fallzahl ergaben sich allerdings in dieser Untersuchung lediglich Tendenzen.

4.2 Validierung der Expressionsanalysen von miR-29c und miR-145 in einem unabhängigen Blasenkarzinom-Kollektiv

Zur Validierung der oben beschriebenen Ergebnisse für die nicht-muskelinvasiven Tumorproben wurde in der vorliegenden Arbeit ein zweites unabhängiges NMIBC-Kollektiv verwendet, welches mit der freundlichen Unterstützung der Kollegen der Klinik für Urologie der Universitätsklinik Mannheim, insbesondere Dr. T. Worst und PD Dr. Philipp Erben, zusammengestellt und zur Verfügung gestellt wurde. Für dieses, fortan als Mannheimer Kollektiv genannte, Kollektiv liegt ein Ethikvotum der Medizinischen Universität Mannheim mit dem Zeichen 2016-814R-MA vor. Die Zusammenstellung des Mannheimer Kollektivs ist in Tabelle 5 erläutert. Aufgrund der vorgestellten Ergebnisse aus dem Würzburger Kollektiv sind im Folgenden nur miR-29c und miR-145 Bestandteil der Validierung.

Ergebnisse

Tabelle 5: Übersicht histopathologischer Merkmale des verwendeten Mannheimer Kollektivs. Auflistung der wichtigen Eigenschaften und histopathologischen Merkmale von 27 paraffinierten Tumorproben nicht-muskelinvasiver Urothelkarzinome des Mannheimer Kontrollkollektivs. Zum Vergleich die Gegenüberstellung zum Würzburger Kollektiv von 48 nicht-muskelinvasiven Tumorproben.

	Mannheimer Kollektiv	Würzburger Kollektiv
Patientenanzahl	n=27	n=48
Anzahl der ausgewerteten Tumorproben	n=27	n=48
Tumor-Stadium (pT-Stadium)	pTa: n=7 pT1: n=20	pTa: n=34 pT1: n=14
Grade	G1: n=8 G2: n=19	G1: n=15 G2: n=31 G3: n=2
Alter	Ø 72,6 Jahre (Range: 56-91 Jahre)	Ø 69,4 Jahre (Range:47 -90 Jahre)
Geschlecht	w: n=9 (33,3%) m: n=18 (66,7%)	w: n=13 (27,1%) m: n=35 (72,9%)
Follow up	Ø aller Patienten: 89,0 Monate	Ø aller Patienten: 62,0 Monate
NMIBC ohne muskelinvasives Rezidiv	n=15	n=40
NMIBC mit Progress	n=12	n=8
Follow up der NMIBC bis zum Progress	n=12 Ø 41,0 Monate (Range: 1-150 Monate)	n=8 Ø 51,5 Monate (Range: 9-191 Monate)
Verstorben (nicht UCa-spezifisch)	n=1	n=1
Verstorben (UCa-spezifisch)	n=5 (nach Ø 81,2 Monate)	n=4 (nach Ø 69,7 Monate)
miR-29c Expression in den untersuchten Karzinomen	-1,58-2,13 Δ Ct (Ø 0,16 Δ Ct)	-9,16-3,24 Δ C _T (Ø -1,1 Δ C _T)

Das in Tabelle 5 beschriebene Mannheimer Validierungskollektiv wurde ähnlich wie das Würzburger Kollektiv anhand der vorliegenden Follow-up Daten und der

histopathologischen Eigenschaften selektioniert. Hierbei wurde ein in Patientenanzahl, dem Verhältnis von NMIBC mit und ohne Progress und Follow-up-Zeitraum zum Würzburger Patientenmaterial möglichst vergleichbares Kollektiv zusammenzustellen, um eine Validierung zu ermöglichen.

4.2.1 Assoziation der miR-Expression im NMIBC mit klinischem Verlauf

Aufbauend auf den oben beschriebenen Resultaten wurde das Mannheimer Kollektiv analog zu den Untersuchungen am Würzburger Kollektiv analysiert. Wie zuvor im Würzburger Kollektiv wurden auch im Mannheimer Kollektiv mittels RT-PCR die Expressionsdaten für miR-29c und miR-145 ermittelt und unter Verwendung der vorliegenden Follow-up Daten in „nicht-progrediente“ und „progrediente“ NMIBC unterteilt

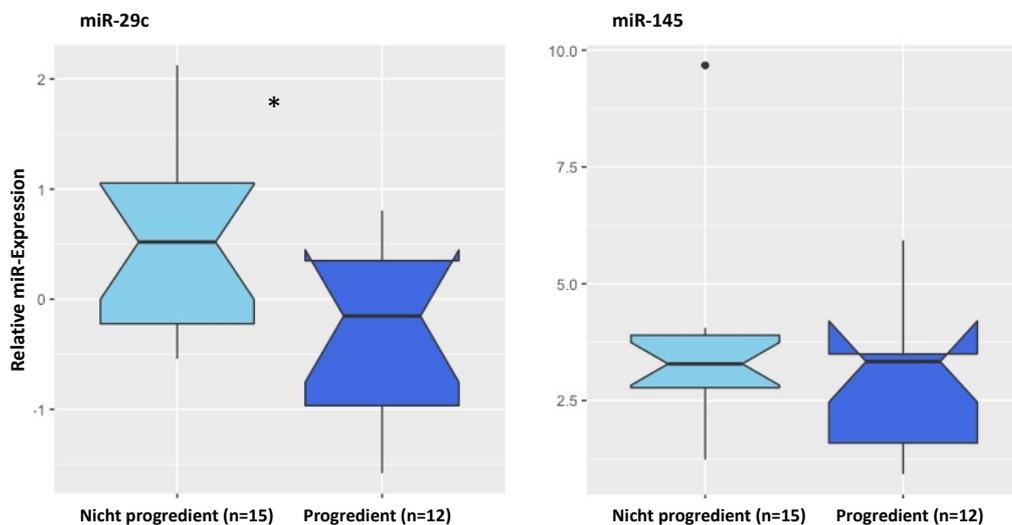


Abbildung 10: MiR-Expression im NMIBC mit unterschiedlichem klinischem Verlauf. Vergleich der miR-29c und miR-145 Expression in zwei Gruppen bestehend aus nicht-muskelinvasivem Blasenkarzinom mit unterschiedlicher Progression. Veranschaulichung mithilfe Box-Whisker-Plots. p-Wert Ermittlung mittels Student's T-Test. *: p-Wert<0,05.

Wie in Abbildung 10 veranschaulicht, ist die Expression der miR-29c in den progredienten NMIBC im Vergleich zu den maximal oberflächlich rezidivierenden Blasentumoren herabreguliert. Der Mittelwert unterscheidet sich bei einem Wert von $0,54 \Delta C_T$ in nicht-progredienten Tumoren und $-0,3 \Delta C_T$ in der progredienten Gruppe um $0,84 \Delta C_T$. Dies macht nach der $\Delta \Delta C_T$ -Methode eine 1,8-fach erhöhte miR-29c Expression in der nicht-progredienten Gruppe im Mannheimer Kollektiv. Insgesamt zeigt sich in der

Ergebnisse

Signifikanztestung mittels Student's T eine signifikante Herabregulierung der miR-29c Expression in den prognostisch ungünstigeren Tumoren mit einem p-Wert von 0,015.

Für die miR-145 konnte hingegen bei einem p-Wert von 0,37 keine signifikant unterschiedliche Expression gezeigt werden. Bei einem $\Delta\Delta C_T$ der Mediane von $0,04\Delta C_T$ zeigt sich hier vielmehr eine nahezu gleiche Expression.

Aufgrund dieses Ergebnisses wurde in den folgenden Untersuchungen auf die miR-29c als Gegenstand der weiteren experimentellen Versuche konzentriert.

4.2.2 Kaplan-Meier-Analyse im Mannheimer Kollektiv

Um die prognostische Aussagekraft des im Würzburger Kollektiv ermittelten Schwellenwerts der miR-29c Expression zu validieren, wurde das Mannheimer Kollektiv mit dem identischen Schwellenwert ($0,555 \Delta C_T$) dichotomisiert. Im Mannheimer Kollektiv liegt der Beobachtungszeitraum bei 13 Jahren. Anschließend wurde das progressionsfreie Überleben in den beiden Gruppen mithilfe einer Kaplan Meier Analyse untersucht und grafisch dargestellt (Abbildung 11).

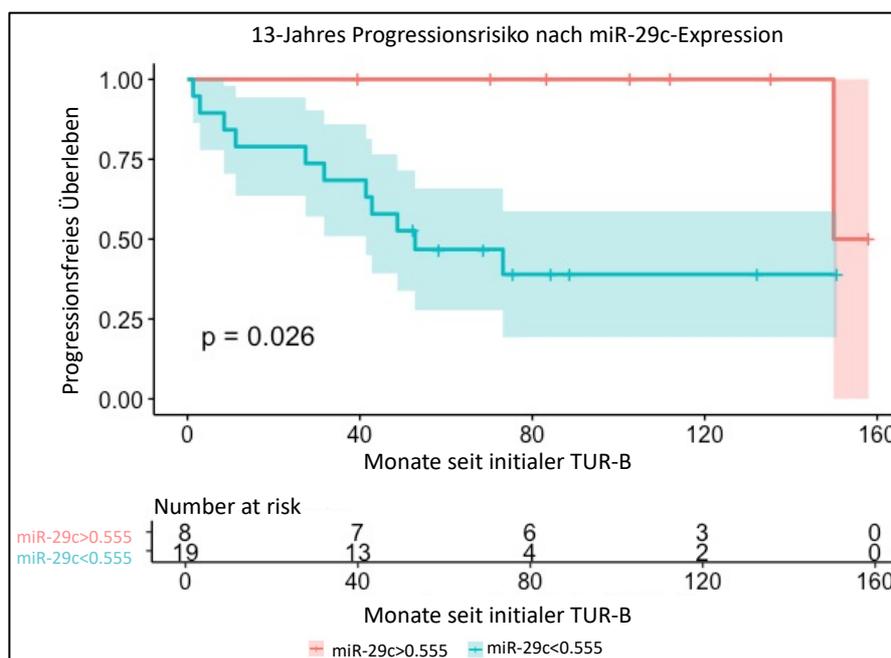


Abbildung 11: Darstellung der Kaplan-Meier-Kurve zur Untersuchung des progressionsfreien Überlebens. Dichotomisierung der NMIBC anhand des von miR-29c Schwellenwertes von $0,555\Delta C_T$.

Wie in Abbildung 11 zu erkennen, zeigen sich zwischen den dichotomisierten Gruppen signifikante Unterschiede mit einem p-Wert im log-rank-Test von 0,026. Eine Expression der miR-29c im NMIBC von $<0,555\Delta C_T$ ist somit mit einer schlechteren Prognose und

häufigeren muskelinvasiven Rezidiven auch in diesem zweiten unabhängigen Validierungskollektiv assoziiert. Dies zeigt, dass der miR-29c-Schwellenwert, welcher aus dem Würzburger Kollektiv erhoben und zur Dichotomisierung des Mannheimer Kollektivs verwendet wurde, in diesem zweiten Kollektiv validiert werden konnte.

4.2.3 Cox-Regression

Für eine weitere Beurteilung wurde an vorherige Ergebnisse auch im Mannheimer Kollektiv eine Cox-Regressionsanalyse angeschlossen. Auch in dieser Analyse erfolgte die Dichotomisierung anhand des Schwellenwertes aus dem primären Würzburger Kollektiv.

Tabelle 6: Ergebnisse der univariaten Cox-Regressionsanalyse. Als Variable wurde das Auftreten eines muskelinvasiven Rezidivs im Verlauf für die Untersuchung gewählt.

Hazard Ratio	Unteres CI	Oberes CI	Logrank p-Wert
0,29	0,11	0,73	0,003

In der Cox Regression zeigte sich eine Hazard Ratio von 0,29 bei einem 95% CI 0,11-0,73 und einem p-Wert im logrank-Test von 0,003. Somit ist die Wahrscheinlichkeit eines muskelinvasiven Rezidivs bei einer höheren Expression in etwa um den Faktor 0,29 reduziert. Mit einer 95%igen Wahrscheinlichkeit ist die Probabilität des Auftretens einer Progression im Verlauf um mindestens 27% und maximal 89% reduziert. Bei einem p-Wert von 0,005 sind diese Ergebnisse statistisch signifikant. Diese Ergebnisse bestätigen ebenfalls den aus dem Würzburger Kollektiv ermittelten Schwellenwert von $0,555\Delta C_T$ als zuverlässigen Marker zur Unterteilung in prognostisch günstige bzw. ungünstige Gruppen in den beiden untersuchten Kollektiven.

In der kombinierten Regressionsanalyse konnte nach Durchführung des schrittweisen AIC-Algorithmus gezeigt werden, dass bezüglich des in 4.1.4.3 für miR-29c und -145 ermittelten Schwellenwertes von $-0,658\Delta C_T$ in dem Mannheimer Kontrollkollektiv kein Vorteil im Vergleich zur alleinigen Untersuchung der miR-29c vorliegt. Aufgrund dessen scheint eine weitere Untersuchung der kombinierten Ergebnisse nicht zielführend, weshalb dies nicht weiterer Bestandteil der Untersuchung ist.

4.3 In-vitro-Analyse zur Funktion von miR-29c und miR-145 als Tumorsuppressoren in Blasenkarzinom-Zelllinien

4.3.1 Überprüfen der Transfektionseffizienz

In der Expressionsanalyse der progredienten NMIBC zeigten sich die miRs-29c und miR-145 aberrant exprimiert. Da eine niedrige miR-Expression im Tumorgewebe in beiden Fällen beobachtet wurde, kann für beide miRs eine tumorsuppressive Eigenschaft in Blasenkarzinom-Zelllinien vermutet werden.

Für die weiteren Versuche wurden die aus invasiven Tumoren isolierten und in vielen wissenschaftlichen Arbeiten beschriebenen Urothelkarzinom-Zellreihen RT4 und J82 verwendet.

Die Zellreihen wurden je mit einer Kontroll-pre-miR (miR-Ctrl) als Negativkontrolle und mit den untersuchten pre-miRs transient transfiziert, um eine Überexpression der jeweiligen miRs in den Zellen zu erzielen. Aus den transfizierten Zellen wurde anschließend RNA isoliert und auf ihre miR-Expression mittels RT-PCR untersucht, um so die Transfektionseffizienz zu beurteilen. Die in Abbildung 12 dargestellten Ergebnisse ergeben sich aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten und zeigen die relative miR-Expression in den Zellreihen nach Transfektion mit der untersuchten micro-RNA am 3. Tag *post transfection*.

Ergebnisse

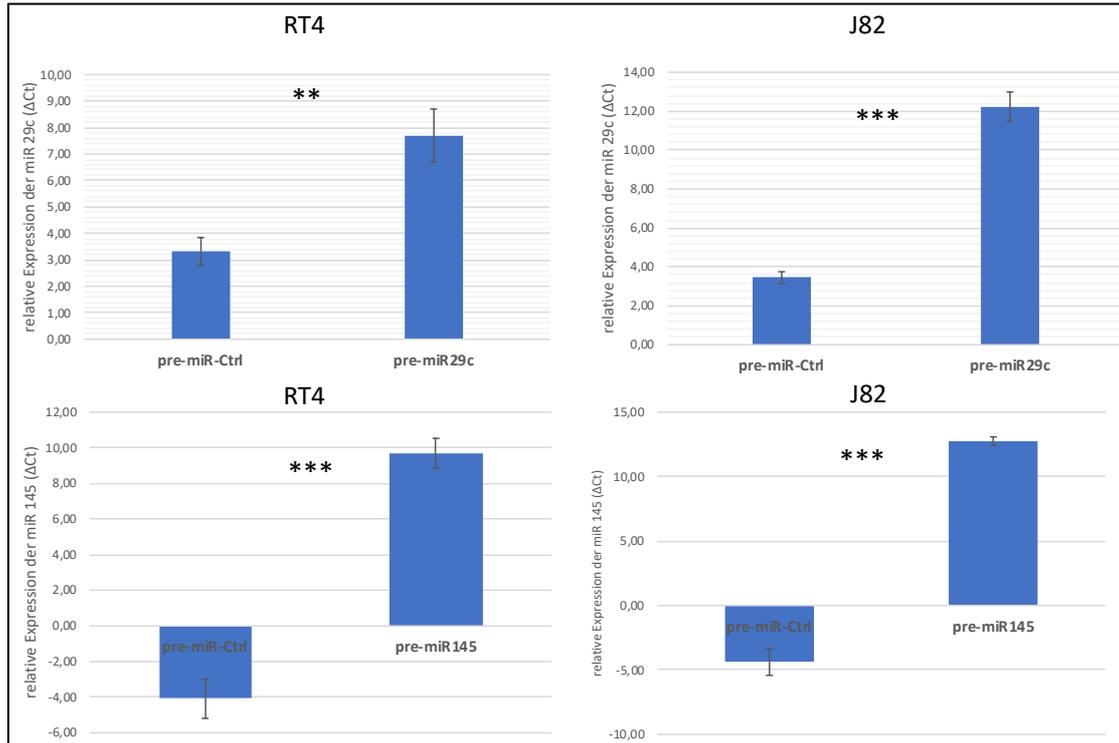


Abbildung 12: Transfektionseffizienz der untersuchten miRs in den Zelllinien. Darstellung der Expression der miR-29c und miR-145 in zwei Urothelkarzinom Zellreihen (RT4 und J82) nach transienter Transfektion mit der untersuchten miR und einer pre-miR-Ctrl am 3. Tag post transfection. Die Abweichungsbalken wurden aus den Standardabweichungen der 3 unabhängigen Experimente ermittelt. Signifikanzen im Student's t-Test wurden mit *: p-Wert<0,05. **: p-Wert<0,01. ***: p-Wert<0,001.

Die Ergebnisse zeigen signifikante Unterschiede in der relativen miR-Expression zwischen den Zellen, welche mit der pre-miR-29c bzw. -145 transfiziert wurden, und den zugehörigen pre-miR-Ctrl transfizierten Zellen. In der RT4 Zellreihe ist zu beobachten, dass sich 2 Tage nach Transfektion die Expression der miR-29c bei einem $\Delta\Delta C_T$ -Wert der Mittelwerte von $4,38 \Delta C_T$ um ein 20-faches erhöht (Ermittlung der x-fachen Überexpression mittels $\Delta\Delta C_T$ -Methode). Nach Transfektion mit miR-145 erhöht die RT4 die Expression sogar um ein 14.500-faches ($\Delta\Delta C_T$: $13,83\Delta C_T$). Auch die J82 Zellen reagierten auf die Transfektion mit einer Überexpression der miR. RNA-29c wurde um ein 440-faches höher exprimiert ($\Delta\Delta C_T$: $8,78\Delta C_T$) als nach Transfektion mit der control-miR. Die miR-145- Expression ließ sich ektop (siehe oben) um ein 144.400-faches anheben ($\Delta\Delta C_T$: $17,14 \Delta C_T$).

Somit konnte eine hohe Effizienz nach transienter Transfektion der benutzen Zelllinien für beide untersuchten micro-RNAs belegt werden.

4.3.2 Proliferation von mit pre-miR-29c und -145 transfizierten BC-Zellen

Um den Einfluss von miR-29c und miR-145 auf die Proliferation der Blasenkarzinomzellen weiter zu evaluieren, wurden die Zellen hierbei in einer 96-Well-Platte mit den untersuchten pre-miRs transient transfiziert und anschließend MTS-Tests (siehe 3.2.7) durchgeführt. Hierdurch wurde das Verhältnis der in den Kulturen vorhanden Zahlen vitaler Zellen an drei aufeinanderfolgenden Tagen bestimmt und so das Proliferationsverhalten der verwendeten transfizierten Blasenkarzinom-Zelllinien über den Zeitraum verglichen werden. Als Kontrolle wurden die Zellen mit einer pre-miR-Ctrl transfiziert und analysiert. Für unten beschriebene Ergebnisse wurde je drei unabhängige Versuche zusammengefasst.

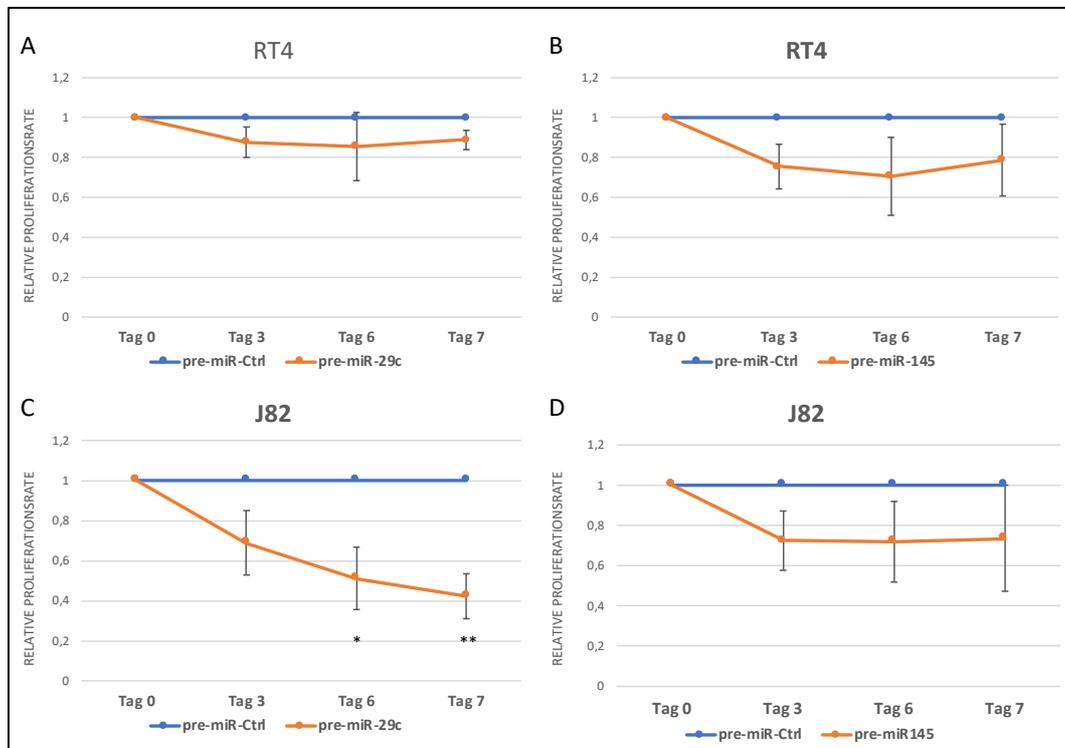


Abbildung 13: Ergebnisse aus dem MTS-Proliferationsessay in Blasenkarzinom-Zellenlinien. Gegenüberstellung der Ergebnisse nach Transfektion von RT4 (A und B) und J82 (C und D) mit pre-miR-29c bzw. miR-145 und einer pre-miR-Control. Gezeigt wird die relative Proliferationsrate im Verhältnis zur Kontroll-Transfektion am Tag 3,6 und 7 post transfection. Die Konzentration der Zellzahl in der Kontrolle wurde willkürlich als 1 gesetzt. Die Abweichungsbalken wurden aus den Standardabweichungen der 3 unabhängigen Experimente ermittelt. Signifikanzermittlung nach Durchführung des Student's T-Test. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$

Nach Transfektion der Zellen mit beiden miRs ist im Verlauf eine relative Reduktion der vitalen Zellen im Vergleich zu den Kontrollen zu beobachten. Da die Kontroll-Zellen

über diesen Zeitraum kontinuierlich proliferieren, kann die beobachtete Reduktion der Zellzahl als Inhibierung der Proliferation pre-miR-transfizierter Zellen gewertet werden. Bei den RT4-Zellen ist eine moderate, jedoch statistisch nicht signifikante Proliferationsinhibierung zu erkennen. So ist nach Transfektion mit miR-29c (Abbildung 13A) am dritten Tag die Proliferation der RT-4-Zellen auf 88% im Vergleich zur miR-Ctrl reduziert. Auch nach ektopter Anhebung des miR-145-Gehalts in RT4-Zellen (Abbildung 13B) zeigt sich ein ähnliches Bild: Nach einem Beobachtungszeitraum von 7 Tagen ließ sich verglichen mit der Referenzkultur eine statistisch nicht signifikante Reduktion auf 79 % nachweisen.

Auch in J82 bleibt eine signifikante Proliferationsinhibierung der mit miR-145 transfizierten Zellen aus. Zwar ist eine Inhibition der Proliferation von J82-Zellen erkennbar, jedoch konnte bei einer Zellkonzentration von 74% zu Tag 7 p.t. in Relation zur miR-Ctrl (Abbildung 13D) keine statistische Signifikanz erreicht werden. Bei transienter Transfektion der J82 mit miR-29c (Abbildung 13C) hingegen ist ein signifikanter relativer Abfall der überlebenden Zellen zu beobachten. Bereits nach der Messung am 3. Tag *post transfection* reduziert sich das Zellwachstum bereits um circa ein Drittel auf 69 %. Auch in den folgenden Beobachtungstagen wird die Proliferation weiter gehemmt, an Tag 6 ist nur noch die Hälfte (51 %) der Zellkonzentration im MTS-Test messbar. Am 7. Tag p.t. lässt sich ein signifikanter Abfall des Wachstums auf 41% beschreiben.

Somit konnte gezeigt werden, dass in allen miR-29c oder miR-145 überexprimierten Zelllinien eine Reduktion der Proliferation erreicht werden konnte. Jedoch nur die Überexpression von miR-29c verursacht eine statistisch signifikante Inhibierung des Zellwachstums in der Blasenkarzinomzellreihe J82. Dies weist eine tumorsuppressive Eigenschaft der miR-29c im verwendeten Zellmodell nach.

4.3.3 Migration von J82 Zellen nach Transfektion mit pre-mirco-RNA-29c

Aufgrund der nicht signifikanten Resultate für die beschriebenen Experimente bei Verwendung von pre-miR-145 oder den RT4-Zellen wurde sich auf die Rolle von miR-29c in J82 Zellen fokussiert. Im Folgenden wird mit dem Migrationsverhalten ein weiterer wichtiger tumorregulierender Faktor, welcher häufig in Zusammenhang mit Progression und Metastasierung steht, untersucht. Hierfür wird das Migrationsverhalten der Urothelkarzinomzellen im „Boyden-chamber-assay“ (siehe 3.2.9) nach Transfektion

der J82 mit pre-miR-29c analysiert. Auch für diese Versuche diente die transiente Transfektion mit pre-miR-Ctrl als Negativkontrolle.

Für die Ergebnisse wurden 3 unabhängige Experimente zusammengefasst, welche in Abbildung 14 dargestellt sind.

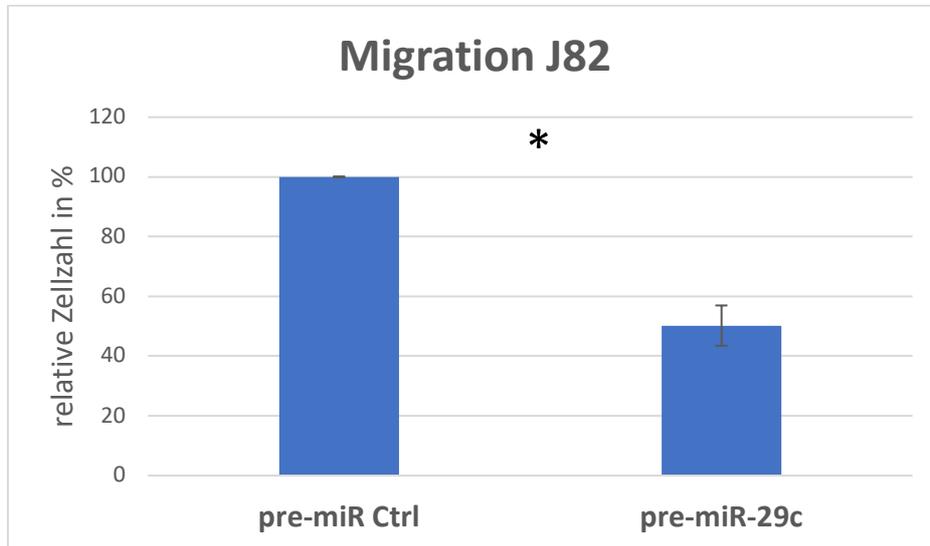


Abbildung 14: Ergebnisse des Boyden-chamber-Assays nach Transfektion der Zellen mit miR-29c bzw. pre-miR-Ctrl.

Die Ergebnisse sind in relativen Zellzahlen (in %) dargestellt nach Gegenüberstellung mit den mit pre-miR-Ctrl transfizierten Zellen. Die Konzentration der Zellzahl in der Kontrolle wurde willkürlich als 100% gesetzt. Die Abweichungsbalken wurden aus den Standardabweichungen der 3 unabhängigen Experimente ermittelt. Signifikanz nach Durchführung des Mann-Whitney-Wilcoxon-Tests *: p-Wert<0,05.

Die oben dargestellte Grafik veranschaulicht die signifikant geringere Zellmenge, welche nach Transfektion mit miR-29c auf der Boyden-Membran zu erkennen ist.

So sinkt die Zellzahl nach ektopter Anhebung des 29c-Gehalts und Durchführung des Migrations-Tests auf 50,2%. Diese Ergebnisse zeigen, dass durch Überexpression der miR-29c die Migration von J82 Zellen negativ beeinflusst wird, was als weiteres Indiz des tumorsuppressiven Potentials der miR-29c zu sehen ist.

4.3.4 Apoptose-Induktion nach Transfektion mit pre-mirco-RNA-29c

Die vorangegangenen Ergebnisse in 4.3.2 konnten zeigen, dass die Zahl vitaler Zellen durch die Transfektion mit miR-29c signifikant inhibiert wurde. Neben einer zugrundeliegenden Inhibierung der Proliferation könnte für die Reduktion der Zellzahl auch eine Induktion des programmierten Zelltods in den transfizierten Zellen ursächlich sein. Um eine gesteigerte Apoptose zu untersuchen kann die Caspase-3/-7-Aktivität in den Zellen analysiert werden. Hierfür wurde in der vorliegenden Arbeit die Zellreihe J82

Ergebnisse

mit der miR-29c transient, ektop transfiziert. Als Negativ-Kontrolle diente erneut eine Transfektion mit pre-miR-Control. Als Positivkontrolle wurde der TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in einer Verdünnung von 1:1000 (0,1µl Reagenz auf 100µl Puffer) verwendet, der als Induktor der Apoptose in Blasenkarzinomzellen gilt. Die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten wurden in Abbildung 15 zusammengefasst.

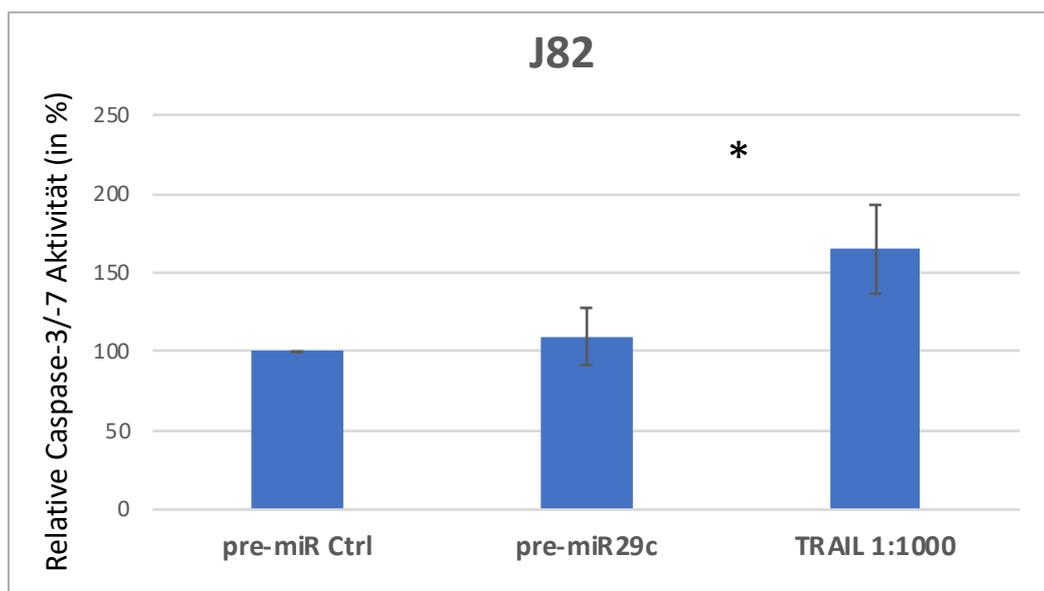


Abbildung 15: Darstellung der relativen Caspase-Aktivität nach Transfektion mit pre-miR-Ctrl, pre-miR-29c und TRAIL. Die Konzentration der Zellzahl in der Negativkontrolle wurde willkürlich als 100% gesetzt. Die Abweichungsbalken wurden aus den Standardabweichungen der 3 unabhängigen Experimente ermittelt. Signifikanz nach Durchführung des Mann-Whitney-Wilcoxon-Tests *: p-Wert<0,05

Wie in Abbildung 15 dargestellt konnte zwischen der Caspase-Aktivität unter der Negativkontrolle (miR-Control) und miR-29c kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Unter Aktivierung des Trail Rezeptors konnte hingegen ein signifikant erhöhtes Enzym-Niveau und somit die erwartete induzierte Apoptose gemessen werden. Da nach Transfektion der Tumorzellreihe J82 mit miR-29c keine signifikant vermehrte Aktivität der Caspasen gemessen werden konnte, wird durch die Überexpression der miR-29c keine vermehrte Apoptose über Caspase-3/ -7 induziert.

4.3.5 Untersuchung von *LOXL 2* als molekulares Zielgen der miR-29c

Um die zuvor beschriebene miR-29c vermittelte Proliferations- und Migrationsinhibierung sowie die reduzierte miR-29c Expression in prognostisch ungünstigen Tumoren molekular einzuordnen und in einen biochemisch funktionellen

Ergebnisse

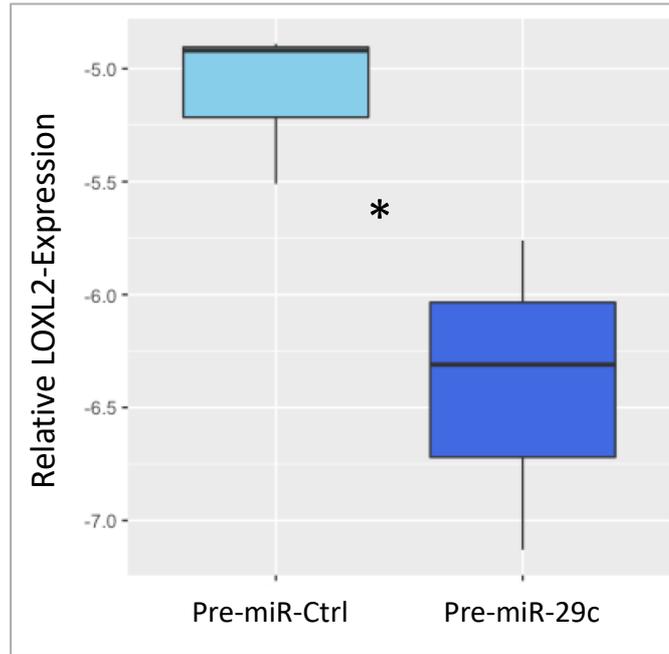


Abbildung 17: Darstellung der relativen LOXL2-Expression nach Transfektion mit pre-miR-29c. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte am 3. Tag p.t. in J82-Zellen nach Transfektion mit pre-miR-29c und einer Control-miR als Referenz. Der Whisker-Boxplot wurde aus den Ergebnissen von 3 unabhängigen Experimenten der RT-PCR erstellt. Die Signifikanz ist nach Durchführung des Student's-t-Tests ermittelt und mit * ($p < 0,05$) dargestellt.

Der oben abgebildete Whisker-Boxplot zeigt eine unterschiedliche Expression von *LOXL2* nach transienter Transfektion mit pre-miR-29c im Vergleich zu den mit pre-miR-Ctrl transfizierten J82-Zellen. Der Gehalt von *LOXL2* unterscheidet sich bei einem $\Delta\Delta Ct$ von 1,3Ct der Mediane um ein 2,6-faches. Die signifikant herabregulierte *LOXL2*-Expression (p -Wert:0,044) nach ektopter miR-29c Überexpression zeigt, dass eine Regulation der *LOXL2*-Expression in dem vorliegenden Zellmodell durch die miR-29c erfolgen kann. Die Herabregulation der *LOXL2* durch die in den vorhergehenden Untersuchungen tumorsuppressiv wirkende miR-29c lässt einen möglichen onkogenen Einfluss der *LOXL2* im Blasenkarzinom vermuten. Insgesamt zeigt die experimentelle Untersuchung, dass eine Überexpression von miR-29c die *LOXL2*-Expression auf RNA-Ebene reguliert. Dieses Ergebnis untermauert die Möglichkeit, dass *LOXL2* ein Zielgen von miR-29c sein kann.

5 Diskussion

Das Urothelkarzinom der Harnblase stellt als zweithäufigste urologische Tumorerkrankung eine große onkologische Herausforderung dar. Die molekularen Ursachen der Karzinogenese sind beim Urothelkarzinom bislang nur unzureichend erforscht, als dass diese im klinischen Alltag eine Hilfestellung bei Diagnostik, Therapie oder Prognose der Erkrankung bieten würden.

Seit der Erstbeschreibung der micro-RNAs 1993 (41) wurde zunehmend deren Bedeutung für die Tumorgenese in unterschiedlichen Tumoren beschrieben.

Daher war eine zentrale Frage dieser Arbeit, ob und welche micro-RNAs für die Genese des Blasenkarzinoms von Bedeutung sind und inwieweit sich solche micro-RNAs auch als molekulare Prognosemarker für das NMIBC eignen. Um dieser Frage nachzugehen, wurden anhand einer Literaturrecherche micro-RNAs ausgewählt, welchen eine Regulation in unterschiedlichen Tumoren, inklusive des Blasenkarzinoms, bereits nachgewiesen werden konnte.

In Tabelle 7 sind Publikationen zu den in dieser Arbeit untersuchten micro-RNAs zusammengefasst, welche die onkogenen und/oder tumorsuppressiven Eigenschaften der micro-RNAs in verschiedenen Tumorentitäten hervorheben.

Tabelle 7: Überblick über die Regulation der unterschiedlichen micro-RNA-Expressionen in verschiedenen Tumoren verglichen zum jeweiligen Normalgewebe.

Micro-RNA	Expression im Tumor	Studie
miR-9	Medulloblastom ↓ Ovarial-Ca ↓ Mamma-Ca ↓/↑	Ferretti et al. (86) Laios et al. (87) Lehmann et al. (49)
miR-21	Mamma-Ca ↑ Kolon-Ca ↑ Hepatocelluläres Ca ↑	Iorio et al. (88) Yamamichi et al. (89) Meng et al. (90)
miR-29c	Lungen-Ca ↓ Magen-Ca ↓	Zhan et al. (91) Saito et al. (92)
miR-145	Mamma-Ca ↓ Kolon-Ca ↓	Iorio et al. (88) Salby et al. (93)
miR-200c	Lungen-Ca ↓ Mamma-Ca ↓ Magen-Ca ↓	Ceppi et al. (94) Burk et al. (95) Tang et al. (96)
miR-205	Prostata-Ca ↓ Mamma-Ca ↓ Nierenzell-Ca ↓	Kalogirou et al. (57) Iorio et al. (97) Majid et al. (98)

miR-221	Prostata-Ca ↓ Glioblastom ↑ Magen-Ca ↑	Kneitz et al. (99) Ciafre et al. (100) Chun-Zhi et al. (101)
---------	--	--

Anhand der Vielzahl bekannter Studien zeigt sich bereits die Bedeutung der micro-RNAs für die Tumorgenese, welche anhand der aberranten Expression dieser miRs in vielen Tumorentitäten dargestellt wurde (sog. Onko-miRs). Hierbei wurde in den einzelnen, zuvor in Tabelle 7 beschriebenen, Arbeiten unter anderem die miR-Expression im Tumorgewebe mit der Expression im gesunden Referenzgewebe verglichen. Dabei konnte den Onko-miRs eine tumorsuppressive bzw. onkogene Eigenschaft zugeordnet werden, die sich in einer Über- bzw. Unterexpression im Tumorgewebe ausdrückt. Für einige Onko-miRs konnte hierbei in verschiedenen Tumoren eine unterschiedliche Regulation nachgewiesen werden.

Wie in Tabelle 7 dargestellt zeigen die miRs- 9, -29c, -145, -200c und -205 in vielen Tumoren eher tumorsuppressive Eigenschaften. MiR-21 und -221 hingegen werden tendenziell onkogene Charakteristika zuteil. Anhand von micro-RNA-221 wurde jedoch verdeutlicht, dass eine Onko-miR in verschiedenen Tumorentitäten unterschiedlich reguliert sein kann und teils als Tumorsuppressor, in wieder anderen Tumoren als Onkogen agieren kann. Dieses Phänomen der pleiotropen Wirkung von miRs beruht höchst wahrscheinlich auf dem jeweiligen molekularen Mikromilieu, das in den verschiedenen Zelltypen bzw. unterschiedlichen Typen von Tumorzellen vorliegt (102).

5.1 Micro-RNAs im Urothelkarzinom

5.1.1 Das Würzburger Urothelkarzinom Kollektiv

In der vorliegenden Arbeit sollte der diagnostische und prognostische Nutzen der zuvor beschriebenen Auswahl von Onko-miRs im Urothelkarzinom der Blase untersucht werden. Hierfür wurde ein Kollektiv aus Tumorproben zusammengestellt, welches aus einem Anteil von 48 NMIBC Patienten und 18 MIBC-Patienten besteht. Zusätzlich wurden 6 weitere MIBC-Proben hinzugefügt, welche von 6 der 48 NMIBC Patienten abstammten und im Verlauf der Erkrankung ein muskelinvasives Rezidiv entwickelten. Somit konnte ein NMIBC-Kollektiv erstellt werden, welches mit konventionellen repräsentativen Kollektiven vergleichbar ist. Es ist bekannt, dass ungefähr 10-20% aller NMIBC-Patienten einen muskelinvasiven Progress im Verlauf zeigen (21, 30, 103). Dies

bildet sich im vorliegenden Kollektiv bei einem Progress in 16,6% der NMIBC Patienten ab. Bei einem durchschnittlichen Auftreten eines MIBC von 25-30% zum primären Vorstellungszeitpunkt aller Blasenmorpapatienten (28, 29) ist dies im vorliegenden selektionierten MIBC-Anteil mit 33,3% nicht signifikant überrepräsentiert. Da das MIBC in der erweiterten Fragestellung als Positivkontrolle verwendet wurde, ist eine leichte Überrepräsentierung der MIBC aus Sicht des Autors im Sinne einer potenziell erhöhten Aussagekraft bei höherer Fallzahl der MIBC erwünscht gewesen. Das vorliegende Kollektiv ist in Bezug auf die NMIBC als ein repräsentatives, unselektioniertes Kollektiv zu sehen (Anteil der progredient werdenden NMIBC repräsentativ). Aufgrund der 6 selektionierten MIBC-Proben für die gepaarte Untersuchung ist dieses Kollektiv als selektioniertes Kollektiv anzusehen.

5.1.2 Expression der miRNAs im Urothelkarzinom

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurde zunächst die Expression der unterschiedlichen micro-RNAs im Urothelkarzinom untersucht und dies mit gesundem Urothel verglichen.

Tabelle 8 zeigt eine Übersicht einzelner bisher publizierter Arbeiten zu der Rolle der untersuchten micro-RNAs im Urothelkarzinom der Blase.

Tabelle 8: Überblick über die Regulation der unterschiedlichen micro-RNA-Expressionen im Urothelkarzinom der Blase verglichen zum gesunden Urothel. Für mit einem „↔“ in vermerkte micro-RNAs konnte in der vorliegenden Arbeit lediglich eine Tendenz der Über-/Unterexpression ohne statistische Signifikanz gezeigt werden. TS: Tumorsuppressor, OG: Onkogen.

Micro-RNA	Expression im Urothel-Ca	Studie	Weinke	Funktion in anderem Tumorgewebe
miR-9	↑	Wang et al. (48)	↓	TS (↓)
	↔	Pignot et al. (104)		
miR-21	↑	Tao et al. (52)	↔	OG (↑)
	↑	Zhang et al. (105)		
	↑	Fischer et al. (106)		
miR-29c	↓	Rosenberg et al. (67)	↔	TS (↓)
	↓	Friedman et al. (107)		

Diskussion

	↓ ↓	Wang et al. (108) Fan et al. (109)		
miR-145	↓ ↓ ↓ ↓	Matsushita et al. (110) Ichimi et al. (111) Dyrskjot et al. (112) Avgeris et al. (113)	↓	TS (↓)
miR-200c	↑ ↑	Wiklund et al. (58) Mahdavinezhad et al. (114)	↔	TS (↓)
miR-205	↑ ↑	Ratert et al. (115) Wiklund et al. (58)	↔	TS (↓)
miR-221	↑ ↓ ↑	Gottardo et al. (116) Tsikrika et al.(117) Li et al. (118)	↓	OG (↑)

In Tabelle 7 und

Tabelle 8 können die vorliegenden Ergebnisse mit der aktuellen Studienlage verglichen werden, um eine Kongruenz der Ergebnisse zu überprüfen. Die Expressionsanalysen zeigten, dass miRs-9, -145 und -221 je eine signifikant niedrigere Expression im Tumorgewebe im Vergleich zum gesunden Referenzmaterial besitzen. Für die anderen untersuchten Onko-miRs konnte im vorliegenden Kollektiv keine signifikant aberrante Expression im Urothelkarzinomgewebe nachgewiesen werden.

Weiterführend wurde das Karzinomgewebe anhand des histopathologischen Stagings in muskelinvasives (MIBC) und nicht-muskelinvasives (NMIBC) Material unterteilt und gesondert betrachtet, um die Bedeutung der einzelnen miRs für die Progression des Urothelkarzinoms darzustellen.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der untersuchten micro-RNAs diskutiert, die im verwendeten Kollektiv keine Rolle als Prognosemarker für das NMIBC spielen.

MiR-145 und miR-29c werden aufgrund ihrer Bedeutung als Prognosemarker für das NMIBC gesondert diskutiert.

5.1.2.1 MiR-9

Zunächst wurde die micro-RNA-9 auf ihre Expression im Tumorgewebe verglichen mit gesundem Referenzgewebe untersucht. In der vorliegenden Arbeit konnte hierbei eine statistisch signifikant niedrigere Expression im Tumorgewebe nachgewiesen werden. Somit zeigt sich diesbezüglich im vorliegenden Kollektiv eine mögliche tumorsuppressive Funktion der miR-9.

Weiterführend wurde untersucht, ob die Invasivität des Tumors im vorliegenden Kollektiv anhand der miR-9-Expression abzuleiten ist. Hierfür wurde die Expression der NMIBC und MIBC verglichen. In der vorliegenden Arbeit konnte kein signifikanter Unterschied in der miR-9-Expression zwischen den zwei untersuchten Subgruppen bewiesen werden, sodass eine Unterscheidung in NMIBC bzw. MIBC anhand der miR-9-Expression im vorliegenden Kollektiv nicht möglich ist. Da sich keine differenzielle Expression in den unterschiedlich invasiven Tumoren nachweisen lässt, scheint die micro-RNA-9 in Bezug auf die Fragestellung nach einem prognostischen Marker für Invasion nicht weiter interessant und wurde aufgrund dessen in ergänzenden Versuchsreihen nicht weiter berücksichtigt.

Wang et al beschrieben in ihrer Publikation entgegen den zuvor beschriebenen Ergebnissen eine Überexpression der micro-RNA-9 im Blasentumormaterial. Da in dieser Arbeit jedoch von einem im Vergleich zur vorliegenden Arbeit sehr unterschiedlich zusammengestellten Kollektiv auszugehen ist, kann dies eine unterschiedliche Expression in den zwei Arbeiten erklären. (48)

Die Arbeitsgruppe um Pignot et al. konnte wiederum keine signifikant unterschiedliche Regulation im Tumorgewebe nachweisen.

Sowohl Pignot et al. als auch Boubaker et al. zeigten in ihren Untersuchungen signifikant höhere Expressionen in den muskelinvasiven Tumorproben. Ebenfalls wurde eine höhere Expression bei prognostisch ungünstigen high-grade NMIBC beschrieben, welches ebenfalls mit einem niedrigerem „overall survival“ sowie geringerem rezidivfreien Überleben assoziiert scheint. (104, 119) Dies zeichnet somit eher ein Bild einer onkogenen miR-9, welche anhand ihrer Expressionsdaten sogar eine Unterscheidung in prognostisch günstige und ungünstige Tumore in den von diesen Arbeitsgruppen untersuchten Kollektiven zu ermöglichen scheint. Dies konnte hingegen durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nicht weiter bestätigt werden.

Insgesamt zeigt sich eine gegensätzliche Darstellung zwischen der bisherigen Literatur und den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Da miR-9 jedoch in anderen Tumorentitäten auch als eher tumorsuppressive Onko-miR beschrieben wurde, scheint hier ein heterogenes Expressionsmuster auch für das Urothelkarzinom denkbar. Da im weiteren Verlauf dieser Arbeit auf eine weiterführende molekulare Untersuchung der miR-9 und möglicher Targets verzichtet wurde, kann hier eine weiterführende Untersuchung sinnvoll erscheinen, um eine valide Aussage bezüglich der onkologischen Funktion der miR-9 treffen zu können.

Einige Autoren beschrieben nach weiteren molekularen Versuchen unter anderem einen Zusammenhang einer erhöhten miR-9-Expression mit dem Verlust von E-Cadherin, einem Invasions-hemmendem Protein (48, 120), was die These der onkogenen Funktion weiter stützt. Vereinzelt ist jedoch auch ein Zusammenhang einer niedrigen miR-9-Expression mit einer Tumorgenese beschrieben. So zeigten Wang et al. in ihrer Studie einen potentiellen Zusammenhang einer erhöhten *CDK6* (*Cyclin-dependent-kinase-6*)-Expression mit der Entwicklung des Blasenkarzinoms (121). Da zuvor in anderen Tumoren eine Herabregulierung der miR-9 eine Überexpression der onkogenen *CDK6* bewirkte (122), ist hierbei eine mögliche Verbindung auch im Blasentumor zu sehen. Dies könnte die These einer tumorsuppressiven miR-9 aus der vorliegenden Arbeit untermauern.

5.1.2.2 Micro-RNA-21

Auch bei miR-21 wurde zunächst die Frage untersucht, ob eine differenzielle Expression zwischen gesundem und tumorösem Gewebe im untersuchten Kollektiv vorliegt. Die vorliegenden Ergebnisse konnten keine signifikant unterschiedliche Expression der miR-21 im Urothelkarzinom im Gegensatz zum gesunden Kontrollkollektiv zeigen.

Anschließend wurde die Expression zwischen MIBC und NMIBC verglichen mit der Frage, inwiefern eine Differenzierung des histopathologischen Stadium bereits an der miR-21-Expression abzuleiten ist und somit auch ein fortgeschrittener, prognostisch schlechterer Tumor auf micro-RNA-Expressionsebene zu erkennen ist.

Beim unmittelbaren Vergleich der miR-21-Expression im MIBC und dem NMIBC konnten weder zwischen den gepaarten noch zwischen den ungepaarten Proben statistisch signifikante Unterschiede herausgearbeitet werden. Folglich ist im vorliegenden

Kollektiv eine Differenzierung in NMIBC und MIBC anhand der miR-21-Expression nicht möglich und auch keine Aussage bezüglich der Invasivität und Prognose zu treffen. Somit lässt sich insgesamt anhand der vorliegenden Ergebnisse keine tumorregulierende Wirkung der miR-21 im Urothelkarzinom nachweisen. Aus diesem Grunde ist miR-21 in der vorliegenden Arbeit nicht als Progressionsmarker geeignet und dadurch kein weiterer Bestandteil ergänzender Untersuchungen.

Diverse Arbeiten konnten die Funktion der miR-21 als onkogene micro-RNA in unterschiedlichen Tumorentitäten (z.B. Mammakarzinom oder Kolonkarzinom (88, 89)) belegen. Zhang und Kollegen konnten in ihren Versuchen nachweisen, dass miR-21 auch im Urothelkarzinom im Vergleich zum gesunden Referenzgewebe signifikant höher exprimiert ist (105). Hierbei handelte es sich im Gegensatz zum vorliegenden Würzburger Kollektiv um ein Hochrisikokollektiv, welches nur invasive Urothelkarzinome (T1-T4), welche mittels Zystoprostektomie therapiert wurden, untersuchte. Auch Tao et al. untersuchten anhand eines kleinen MIBC-Kollektivs (n=8) die miR-21-Expression im Urothelkarzinom der Blase verglichen mit gesundem Referenzgewebe und wiesen eine erhöhte relative miR-21-Expression im Tumorgewebe nach (52). Fischer et al. konnten in der Untersuchung eines selektionierten Hochrisiko-Kollektivs ebenfalls eine Überexpression der miR-21 im Tumorgewebe zeigen (106). Dip et al. konnten in ihrer Arbeit bei der Untersuchung zweier Kollektive (NMIBC, n=30 und MIBC, n=30) eine Überexpression der miR-21 im fortgeschrittenen MIBC im Vergleich zum NMIBC konstatieren (123). Und auch Zhang et al. beschrieben eine Korrelation zu einem klinisch schlechterem Verlauf mit einem reduziertem overall survival in der Kaplan-Meier-Kurve (105).

Die bisherige Literatur zeigt somit eine onkogene Funktion der miR-21, welche mit der Invasivität und ebenfalls einer schlechteren klinischen Prognose im Urothelkarzinom korreliert. Dies konnte durch die Ergebnisse am vorliegenden Kollektiv nicht bestätigt werden. Die zuvor durch die häufig verwendeten Hochrisikokollektive als teils unterschiedlich beschriebene Methodik, ist eine mögliche Erklärung der von der bisherigen Studienlage abweichenden Ergebnisse.

5.1.2.3 Micro-RNA-200c

In Bezug auf die Fragestellung nach einer unterschiedlichen Expression zwischen gesundem und tumorbefallenem Gewebe konnten die Ergebnisse dieser Arbeit für miR-

200c eine höhere Expression derselben im Blasen Tumormaterial verglichen mit dem gesunden Referenzmaterial zeigen, jedoch wurde das festgelegte statistische Signifikanzlevel von $p < 0,05$ knapp verpasst (p-Wert: 0,06). Somit lässt sich ein Trend einer erhöhten miR-200c-Expression im Tumorgewebe ableiten, was mit einer onkogenen Funktion vergesellschaftet ist. Aufgrund der fehlenden statistischen Signifikanz ist jedoch anhand der relativen miR-200c-Expression keine verlässliche Unterscheidung in tumoröses und nicht-tumoröses Gewebe im untersuchten Kollektiv möglich.

Die Ergebnisse der Arbeiten von Mahdavinezhad et al. und Wiklund et al. stützen die Tendenz der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, welche eine Überexpression im Blasenkarzinomgewebe beschreibt. In diesen Arbeiten wird ebenfalls eine höhere Expression im Tumorgewebe - jedoch mit dem Nachweis einer statistischen Signifikanz - beschrieben (58, 114).

Somit bestätigt die Literatur den in den vorliegenden Ergebnissen beschriebenen Trend eines onkogenen Einflusses der miR-200c im Blasen Tumormaterial, wenngleich aufgrund der fehlenden statistischen Signifikanz im vorliegenden Kollektiv hierbei eine weitere Untersuchung der miR-200c z.B. in einem größeren Kollektiv sinnvoll erscheinen kann. Weiterführend wurde hiernach das Tumorgewebe in NMIBC und MIBC unterteilt und die miR-200c-Expression miteinander verglichen. Hierbei zeigte sich in der Untersuchung der ungepaarten Tumorproben eine hochsignifikante (p-Wert $< 0,001$) Herabregulation im histopathologisch höheren Tumorstadium (MIBC), verglichen mit dem NMIBC. Somit lässt sich für die miR-200c im vorliegenden Kollektiv auf die beschriebene Fragestellung eine tumorsuppressive Wirkung beschreiben.

Wszolek et. al beschrieben ein ähnliches Verhalten der miR-200c im Urothelkarzinom mit einer signifikant niedrigeren Expression im MIBC, verglichen mit dem NMIBC (124). Auch die Arbeitsgruppen um Mahdavinezhad et al. und Wiklund et al. beschrieben trotz der Überexpression im Tumorgewebe im Vergleich zum gesunden Referenzgewebe eine Herabregulation der miR-200c-Expression im muskelinvasiven und somit prognostisch ungünstigen Tumor. Sie vermuteten hier ein prinzipiell onkogenes Potenzial der miR-200c, jedoch mit einer inhibierenden und somit tumorsuppressiven Wirkung auf eine Invasion, Progression und Metastasierung. (58, 114)

Somit wird der miR-200c, vor allem im direkten Vergleich der Tumorproben mit einer unterschiedlichen Invasivität, eine tumorsuppressive Wirkung zuteil, was sich durch die Ergebnisse untermauern ließ

Mit einer ähnlichen Fragestellung, vor allem jedoch mit Frage, ob sich die miR-200c-Expression bei einem Patienten korrelierend mit einem klinischen Progress verändert, erfolgte hierfür anhand des Vergleichs der Expressionsdaten von zwei unterschiedlichen Tumorproben (NMIBC und MIBC) des gleichen Patienten der gepaarte Vergleich der NMIBC und MIBC. Hierbei konnten keine signifikanten Unterschiede herausgearbeitet werden. Aufgrund dessen ist keine Unterscheidung in die histologisch unterschiedlichen Stadien der je zwei Tumorproben möglich. Als Limitation sollte hier jedoch die relativ kleine Kollektivgröße von je 6 Tumorproben berücksichtigt werden. Um eine valide Aussage treffen zu können, würde sich hierfür die Untersuchung eines größeren Kollektivs eignen. In der Literatur scheint diese Fragestellung bislang auch noch nicht weitergehend beschrieben.

Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse aus den vorherigen Untersuchungen, welche eine tumorsuppressive Wirkung der miR-200c im Urothelkarzinom implizieren, erfolgte die weitere Unterscheidung der NMIBC in progredient werdende NMIBC mit einem muskelinvasiven Rezidiv und NMIBC ohne progredienten Verlauf im Follow-up-Zeitraum. Dies wurde mit den Expressionsdaten korreliert und ausgewertet mit der Fragestellung, ob der klinische Verlauf anhand der miR-200c-Expresionsdaten im NMIBC abzusehen ist. Hierbei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der miR-200c-Expression zwischen den NMIBC-Gruppen. Eine Unterscheidung der NMIBC in prognostisch günstige oder ungünstige NMIBC ist somit in diesem Kollektiv anhand der miR-200c-Expression bei statistisch nicht signifikanten Ergebnissen nicht möglich.

In bisherigen Studien scheint eine prognostische Differenzierung der NMIBC anhand der miR-200c-Expression ebenfalls nicht beschrieben.

Molekulare Untersuchungen konnten zeigen, dass die miR-200-Familie (u.a. miR-200c) die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) reguliert. Als molekulares Targetprotein scheint das *Zinc finger E-Box-binding-homeobox* (ZEB)-Protein eine entscheidende Rolle zu spielen. Durch eine Herabregulation von miR-200c scheint über eine Überexpression der onkogenen *ZEB1* ein Verlust von E-Cadherin und somit auch die EMT induziert zu werden(53, 125, 126). Somit sind die vorliegenden Ergebnisse - eine

reduzierte miR-200c-Expression im fortgeschrittenen, muskelinvasiven Blasenkarzinom - kongruent zur aktuellen Studienlage und lassen eine tumorsuppressive Wirkung von miR-200c über oben beschriebene molekulare Mechanismen weiter vermuten. Ein diagnostischer Nutzen zur Differenzierung in prognostisch günstige und ungünstige NMIBC-Gruppen konnte bislang weder in der vorliegenden Arbeit noch in der bisherigen Literatur belegt werden, sodass weitere molekulare Untersuchungen vor allem in Bezug auf den therapeutischen Nutzen - mögliche frühzeitige Indikation zur radikalen operativen Versorgung - für den klinischen Alltag von großer Bedeutung sein können. Aufgrund der Ergebnisse mit einer differenziellen Expression zwischen NMIBC und MIBC, welches sich auch mit der Studienlage deckt, kann hier jedoch ein ergänzender diagnostischer Nutzen im Falle von unklaren histopathologischen auch für den klinischen Alltag von Bedeutung sein.

5.1.2.4 Micro-RNA-205

Zunächst wurde in der vorliegenden Arbeit auch für miR-205 die Fragestellung untersucht, ob sich zwischen Blasenkarzinomgewebe und gesundem Referenzgewebe eine differenzielle relative Expression zeigt. Hierbei konnten bei der Untersuchung vom gesunden Urothel verglichen mit dem Tumormaterial keine statistisch signifikanten Unterschiede herausgearbeitet werden.

Weiterführend wurde die Fragestellung untersucht, ob sich eine differenzielle miR-205-Expression im NMIBC, verglichen mit dem MIBC nachweisen lässt. Hierfür konnte eine statistisch hochsignifikant niedrigere miR-205-Expression (p-Wert: <0,001) im MIBC nachgewiesen werden. Folglich beschreibt dies eindeutig tumorsuppressive Eigenschaften der miR-205 im untersuchten Kollektiv. Dies impliziert, dass mit einer zunehmenden Tumordinvasion eine Herabregulation des miR-205-Gehalts erfolgt.

Ergänzend wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob sich eine unterschiedliche Expression im NMIBC mit einem unterschiedlichen klinischen Verlauf nachweisen lässt. In der Untersuchung der prognostisch günstigen bzw. ungünstigen NMIBC zeigte sich keine signifikant aberrante miR-205-Expression. Im vorliegenden Kollektiv scheint die Untersuchung der miR-205 als prognostischer Marker im NMIBC nicht zielführend.

Wiklund et al. konnten ebenso wie für miR-200c auch bei miR-205 eine höhere Expression im Blasentumormaterial im Vergleich zum gesunden Urothel zeigen, jedoch wiesen sie in ihren Versuchsreihen einen signifikant niedrigeren miR-205- Gehalt im

MIBC verglichen mit den oberflächlicheren Tumorproben nach (58). Auch Ratert et al. beschreiben zunächst eine signifikant höhere miR-205-Expression im Urothelkarzinom verglichen zum gesunden Referenzmaterial, wiederum eine signifikant niedrigere Expression im MIBC im Gegensatz zum NMIBC (115).

In der aktuellen Literatur ist die miR-205 in Bezug auf den Vergleich von Tumorgewebe mit gesundem Referenzmaterial bisher als onkogene micro-RNA im Urothelkarzinom beschrieben. Dies kann durch die vorliegenden Ergebnisse nicht weiter bestätigt werden, was jedoch auch mit der unterschiedlichen Methodik mit vor allem bisher in der Literatur untersuchten selektionierten Hochrisikokollektiven zusammenhängen kann.

Die beschriebene tumorsuppressive Funktion der miR-205 im NMIBC verglichen mit den MIBC lassen sich durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen.

Als prognostischer Marker im NMIBC ist miR-205 in der Literatur bislang ebenfalls kaum beschrieben. Die Arbeitsgruppe um Tran et al. zeigten ein geringeres Gesamtüberleben bei Urothelkarzinompatienten mit höherer miR-205-Expression im Gegensatz zu solchen Tumoren mit niedrigerer Expression (127), was eine erhöhte miR-205-Expression in ihren Untersuchungen zu einem prognostisch ungünstigen Marker macht. Da dieses Kollektiv jedoch zu einem überwiegenden Anteil aus MIBC (>67%) besteht, wurde dort in der Frage nach einem prognostischen Marker die MIBC mit einbezogen, sodass hier keine eindeutige Vergleichbarkeit zur vorliegenden Fragestellung (prognostischer Marker im NMIBC) herzustellen ist.

In der Literatur ist miR-205 unter anderem als *ZEB1*-Inhibitor und somit Regulator der EMT beschrieben (55), was eine erhöhte miR-205-Expression wiederum mit einer günstigen Prognose vergesellschaftet könnte. Dies bestätigt das Bild eines tumorsuppressiven Einflusses der miR-205 im Urothelkarzinom.

In der vorliegenden Arbeit konnte diese tumorsuppressive Wirkung aufgrund der Herabregulierung im MIBC nachvollzogen werden. Insgesamt scheint miR-205 eine wichtige Rolle in der Tumorgenese mit teils heterogener Regulation in unterschiedlichen Tumorstadien zu spielen.

5.1.2.5 Micro-RNA-221

Auch für die miR-221 wurde zunächst untersucht, ob sich eine unterschiedliche Expression zwischen dem gesunden Urothelgewebe und tumorösem Gewebe nachweisen lässt. Hierbei zeigte sich in dieser Arbeit eine signifikante Herabregulation im

Blasentumorgewebe im Gegensatz zum gesunden Referenzgewebe, sodass die micro-RNA-221 tumorsuppressive Eigenschaften in dieser Fragestellung zeigt.

Ergänzend wurde die Frage untersucht, ob sich zwischen NMIBC und MIBC eine unterschiedliche relative Expression nachweisen lässt. Hierfür konnten keine Unterschiede in der miR-221-Expression zwischen den histopathologischen Stadien (NMIBC vs. MIBC) weder in der gepaarten noch ungepaarten Untersuchung gezeigt werden. Somit kann miR-221 in Bezug auf die beschriebene Fragestellung weder eine onkogene noch tumorsuppressive nachgewiesen werden, weshalb auch auf die ergänzende Untersuchung mit der Frage nach einem prognostischen Marker verzichtet wurde.

Ebenso wie in der vorliegenden Arbeit beschreiben Tsikrika et al. in ihrem Kollektiv eine deutlich niedrigere Expression im Tumormaterial verglichen zum gesunden Referenzgewebe (117). Da dieses Kollektiv vergleichbar zusammengestellt ist wie das vorliegende Würzburger Kollektiv, scheint dies die These einer tumorsuppressiven miR-221 im Urothelkarzinom weiter zu stützen.

Gottardo et al. und Li et al. hingegen zeichnen diesbezüglich ein anderes Bild. Sie schreiben der miR-221 aufgrund einer höheren Expression im Karzinom in ihrem Kollektiv eine eher onkogene Wirkung zu (116, 118). Da diese Hochrisikokollektive stark selektioniert wurden, ist hier keine vollständige Vergleichbarkeit gewährleistet. Unter anderem scheint miR-221 über eine Herabregulation der Cyklin-abhängigen Kinase-Inhibitor (CDKN) p27^{Kip1} eine Einleitung der Apoptose verhindern zu können, was als möglicher Ansatz für die onkogene Wirkung dient (128).

Bezüglich der unterschiedlichen Tumorstadien (NMIBC vs. MIBC) scheint in der Literatur bislang kaum etwas publiziert, sodass die miR-221 auch in anderen Kollektiven nicht als Marker für eine Muskelinvasion bekannt ist.

Insgesamt scheinen aufgrund der Diskrepanz zwischen den Ergebnissen und der Literatur jedoch weitere Untersuchungen sinnvoll, um eine valide Aussage bezüglich der miR-221-Expression im Urothelkarzinom treffen zu können.

5.1.3 Micro-RNA-145 als Marker für Aggressivität des Urothelkarzinoms

5.1.3.1 Expressionsdaten der miR-145 im Urothelkarzinom

Zunächst wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob sich eine Regulation der relativen Expression von miR-145 im Urothelkarzinom nachweisen lässt. Hierbei zeigte

sich eine signifikant reduzierte miR-145 Expression im verwendeten Würzburger Kollektiv, sodass für die Entstehung des Blasenkarzinoms von einer tumorsuppressiven Wirkung der miR-145 ausgegangen werden kann.

In mehreren anderen Arbeiten wurde eine ähnliche Fragestellung untersucht und Urothelkarzinomgewebe mit angrenzendem histologisch gesunden Urothel verglichen. Hierbei zeigte sich ebenfalls eine reduzierte miR-145-Expression im Tumorgewebe (111-113, 129). Dies deckt sich mit den Auswertungen dieser Arbeit, was somit den bisherigen Forschungsstand einer tumorsuppressiven miR-145 für das Blasenkarzinom weiter untermauern konnte.

Anschließend an diese Versuche wurde die relative miR-145-Expression im MIBC mit der im NMIBC verglichen. Hierbei konnte eine signifikant höhere miR-145-Expression im MIBC nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass miR-145 im Urothelkarzinom, welches bereits einen muskelinvasiven Anteil enthält, eine gegenläufige Expression besitzt.

Da das vorliegende Kollektiv auch gepaarte Proben (ursprüngliches NMIBC und späteres MIBC eines Patienten) enthielt, erfolgte anschließend der Vergleich der gepaarten Proben.

In den gepaarten Tumorproben konnte überraschenderweise eine signifikant niedrigere Expression im MIBC verglichen mit dem NMIBC beobachtet werden. Dieses kontroverse Ergebnis erscheint zunächst unverständlich, wenn man die Überexpression beim Vergleich aller untersuchten NMIBC mit den MIBC betrachtet. Somit könnte in dieser Fragestellung vermutet werden, dass mit einer zunehmenden Tumorzellinvasion der miR-145-Gehalt abfällt, was wiederum eine tumorsuppressive Eigenschaft darstellen würde. Somit scheint dies insgesamt widersprüchlich zu den Ergebnissen der ungepaarten Untersuchung. Als Limitation ist diesbezüglich in der vorliegenden Arbeit zu berücksichtigen, dass in der Versuchsreihe mit gepaarten Proben lediglich nur eine geringe Fallzahl (n=6) untersucht wurde.

Die bisherige Studienlage konnte unter anderem durch die Publikation von Avgeris et al. eine Korrelation zum histopathologischen Stadium mit einer signifikant höheren miR-145-Expression im fortgeschrittenen ($>pT2$) Stadium nachweisen (113). Pignot et al. beschreiben für ihr untersuchtes Kollektiv ebenfalls neben einer Herabregulation der miR-145 im Blasentumor verglichen mit gesundem Referenzmaterial, jedoch eine

Überexpression im MIBC im Vergleich zum NMIBC (104). Diese Arbeiten stützen die Ergebnisse aus der ungepaarten Untersuchung im vorliegenden Würzburger Kollektiv. Matsushita et al. hingegen legen eine tumorsuppressive Funktion auch beim Vergleich des MIBC und NMIBC nahe. So konnten sie als direktes molekulares Target von miR-145 unter anderem *UHRF1 (Ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains, 1)* ausmachen. Dieses Onkogen scheint im Zellzyklus-Checkpoint der G1/S-Transition einzugreifen (130, 131) und wird durch miR-145 inhibiert. Eine Überexpression von *UHRF1* kann somit zu einer genomischen Instabilität führen und den programmierten Zelltod an diesem Checkpoint verhindern. Da in ihrer Arbeit eine erhöhte *UHRF1*-Expression im MIBC verglichen mit dem NMIBC nachgewiesen werden konnte, kann dies die These einer tumorsuppressiven miR-145 auch in Bezug auf oben beschriebene Fragestellung bekräftigen. (110)

Insgesamt zeichnet die bisherige Literatur ebenfalls – wie auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit – ein heterogenes Bild für die Rolle der miR-145 als progressionsassoziierte miR im Blasenkarzinom. Somit ist eine Aussage bezüglich der miR-145 Expression im NMIBC verglichen mit dem MIBC abschließend nicht möglich. Eine mögliche Erklärung der differenziellen miR-145 Expression in den verschiedenen Studien könnte eine miR-145 Regulation über verschiedene andere Faktoren sein. So scheint eine Regulation von micro-RNAs prinzipiell auch durch Variablen wie Geschlecht oder Erkrankungsalter (132, 133) möglich, was jedoch im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht weiter untersucht wurde. Aufgrund der relativ geringen Fallzahlen kann ein solcher Bias die Ergebnisse je nach verwendetem Kollektiv verändern. Um welchen Faktor oder welche Faktoren es sich hierbei handelt, konnte nicht festgestellt werden.

Zusammenfassend zeigt sich in der vorliegenden Arbeit eine miR-145 mit tumorsuppressiven Eigenschaften. Hierfür ist das in anderen Arbeiten beschriebene *UHRF1* ein interessantes Zielgen, welches direkt über miR-145 reguliert wird (110). Eine endgültige Aussagekraft bezüglich der miR-145-Expression im MIBC verglichen mit dem NMIBC ist jedoch durch die teils widersprüchlichen Ergebnisse nicht abschließend möglich.

5.1.3.2 Micro-RNA-145 als Progressionsmarker im NMIBC

Die Untersuchung der micro-RNA-145 als möglichen frühzeitigen Marker für Progression nimmt in der vorliegenden Arbeit einen großen Teil der Untersuchungen ein. Hierbei wurde zunächst die miR-Expression der NMIBC im Patientenkollektiv analysiert, mit den klinischen Follow-up-Daten korreliert und die Fragestellung untersucht, ob sich eine unterschiedliche Expression zwischen den NMIBC mit unterschiedlichem klinischen Verlauf nachweisen lässt. Es konnte gezeigt werden, dass die micro-RNA-145 im NMIBC mit einem späteren muskelinvasiven Rezidiv und somit den prognostisch ungünstigen Tumoren im Vergleich zum nicht-progredienten NMIBC signifikant herabreguliert ist. Dies lässt somit auf eine tumorsuppressive Eigenschaft der miR-145 schließen, wonach eine niedrige Expression mit einer schlechteren Prognose vergesellschaftet sein könnte.

Dyrskjot et al. haben in ihrer Expressionsanalyse unter anderem mit einer ähnlichen Fragestellung nach dem prognostischen Potenzial im NMIBC die miR-145 untersucht, konnten allerdings eine Überexpression im progredient werdenden NMIBC nachweisen (112). Auch Avgeris et al. beschrieben eine Korrelation zwischen einer hohen miR-145 Expression im NMIBC und einer mit einem erhöhten Progressionsrisiko verbundenen schlechteren Prognose (113). Somit unterscheiden sich die Ergebnisse dieser Arbeitsgruppen von den Ergebnissen aus der vorliegenden Arbeit.

Aufgrund der zuvor erarbeiteten Ergebnisse mit einer signifikant niedrigeren miR-145-Expression in prognostisch ungünstigen NMIBC wurde untersucht, ob sich das unselektionierte NMIBC-Kollektiv anhand eines Schwellenwertes der miR-145-Expression in prognostisch günstige und ungünstige Tumore unterteilen lässt. Hierbei ließ sich mit $0,488\Delta C_T$ ein Schwellenwert mit einer hohen Spezifität von 95% und einer Sensitivität von 75% nachweisen. Die hohe Spezifität legt somit nahe, dass bei einer unter dem ermittelten Schwellenwert liegenden miR-145 Expression im vorliegenden Kollektiv mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Progress zu erwarten ist. Mithilfe der Kaplan-Meier-Analyse konnten hochsignifikante Unterschiede zwischen den anhand des Schwellenwertes dichotomisierten Gruppen ermittelt werden (p-Wert: $<0,0001$). Dies untermauert auch die klinische Bedeutung des Schwellenwertes, welcher eine frühzeitige Einteilung in prognostisch günstige und ungünstige Tumore ermöglicht und somit in einer Therapieplanung mitberücksichtigt werden könnte (z.B. frühzeitige Zystektomie).

Avgeris et al. zeigten in ihrer Studie, dass eine erhöhte miR-143/145-Expression mit einem erhöhten Progressionsrisiko assoziiert scheint. Dies deckt sich nicht mit den vorliegenden Ergebnissen, jedoch ist zu berücksichtigen, dass nur das miR-143/145-Cluster als kombiniertes Expressionsmodell untersucht wurde (113). Somit ist keine direkte Vergleichbarkeit der Ergebnisse möglich.

Schließlich wurde in einer Kaplan-Meier-Analyse untersucht, ob die miR-145 Expression auch mit einem unterschiedlichen Gesamtüberleben assoziiert ist. Hierbei ließ sich ebenfalls zeigen, dass eine miR-145-Expression unter dem Schwellenwert von $0,488\Delta C_T$ mit einer erhöhten Mortalität assoziiert ist, wenngleich die Fallzahl bei nur 4 tumorassoziierten Toden lag.

Vergleichbare Untersuchungen sind in der Literatur nicht beschrieben, sodass dies eine bislang einzigartige Versuchsreihe ist.

In anderen Tumorentitäten, wie z.B. dem kleinzelligen Bronchialkarzinom ist ebenfalls eine tumorsuppressive miR-145 beschrieben. So scheint eine niedrige miR-145-Expression mit einer schlechteren Prognose auch in diesem Tumor zu korrelieren (134). Ein bekanntes molekulares Target der miR-145 ist das Onkogen *MYC*, welches unter anderem mit einer erhöhten Zellproliferation in Tumoren assoziiert ist (135, 136) und durch eine Überexpression von miR-145 inhibiert werden kann (137). Da *MYC* bereits mehrfach in der Tumorgenese unterschiedlicher Karzinome (138-140) und auch des Urothelkarzinoms (141, 142) beschrieben wurde, ist hierbei ein direkter miR-145-vermittelter Zusammenhang denkbar. Ob miR-145 die tumorsuppressive Wirkung auch im Urothelkarzinom der Blase über die Regulation des Onkogens *MYC* entfaltet, erscheint ein interessanter Untersuchungsansatz.

Anhand des zweiten selektionierten Mannheimer Kontrollkollektivs wurde schließlich untersucht, ob eine Validierung der zuvor beschriebenen Ergebnisse aus dem Würzburger Kollektiv möglich ist. Zunächst wurde auch hier geprüft, ob sich eine differenzielle Expression im progredienten und nicht progredienten NMIBC nachweisen lässt. Die Expressionsdaten in dem Validierungskollektiv zeigten keine signifikant unterschiedliche Expression. Unter Verwendung von dem im Würzburger Kollektiv ermittelten Schwellenwertes erfolgte auch die Regressionsanalyse mittels Kaplan-Meier-Analyse. Hierbei konnten bei einem nicht signifikanten p-Wert in der Signifikanztestung die Ergebnisse aus den vorherigen Versuchen im Würzburger Kollektiv nicht bestätigt

werden, sodass für das Mannheimer Kollektiv keine verlässliche Dichotomisierung in prognostisch günstige bzw. ungünstige Subgruppen anhand des Würzburger Schwellenwertes erfolgen konnte. Auch hier divergiert die Expression von miR-145 in den beiden verwendeten Kollektiven offensichtlich. Wie zuvor dargestellt, ist zu vermuten, dass die miR-145 Expression durch einen oder mehrere progressionsunabhängige Faktor/en beeinflusst werden, sodass eine Validierung der Rolle von miR-145 als prognostischer Marker für das NMIBC im zweiten unabhängigen Kollektiv nicht gelingt. MiR-145 dient somit nach Untersuchung beider Kollektive nicht als geeigneter Biomarker, um eine klinische Progression im Verlauf vorherzusagen.

5.1.3.3 Micro-RNA-145 im Zellmodell

Aufbauend auf den Ergebnissen aus dem nativen FFPE-Tumormaterial wurde der Einfluss der miR-145 im zellulären Modell untersucht. Zunächst wurde hierbei das Proliferationsverhalten von miR-145 überexprimierten Blasenkarzinomzellreihen nach transients Transfektion mit pre-miR-145 untersucht. Im MTS-Test konnte hierbei eine niedrigere Zellzahl nach Transfektion mit pre-miR-145 im Vergleich zur Negativkontrolle nachgewiesen werden, wenngleich die Unterschiede zu den Kontrollen nicht statistisch signifikant waren. Dies legt einen antiproliferativen Effekt der miR-145 in den Blasenkarzinomzellen nahe, auch wenn die Ergebnisse aufgrund der fehlenden statistischen Signifikanz lediglich als Trend einzuordnen sind.

Viele Studien konnten die Ergebnisse aus den verwendeten Zellmodellen bestätigen. So konnte in verschiedenen Studien nach ektopter Überexpression von miR-145 in Blasenkarzinomzelllinien eine signifikante Reduktion der Proliferation nachgewiesen werden (112, 129, 143, 144).

Insgesamt scheinen sich die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit der bisherigen Studienlage zu decken, welche miR-145 vor allem tumorsuppressive Eigenschaften zuschreibt. Da die untersuchten Zellreihen zudem aus muskelinvasiven Tumoren isoliert wurden, kann hier ein tumorsuppressiver Einfluss auch im fortgeschrittenen Urothelkarzinom vermutet werden. Somit stützt dies die Ergebnisse der RT-PCR aus den nativen Tumorproben des Würzburger Kollektivs, welche miR-145 tumorsuppressive Eigenschaften zuschreiben.

5.1.4 Micro-RNA-29c als Marker für Aggressivität des Urothelkarzinoms

5.1.4.1 Expression der miR-29c im Urothelkarzinom

Initial wurde auch für die micro-RNA-29c untersucht, ob sich Unterschiede in der miR-29c-Expression zwischen Blasenkarzinommaterial und gesundem Referenzgewebe nachweisen lassen. Hierbei konnten eine Tendenz zur niedrigeren miR-29c-Expression im Tumormaterial herausgearbeitet werden, jedoch wurde die festgelegte Signifikanzmarke von $p < 0,05$ bei einem p-Wert von 0,09 verpasst.

Zahlreiche Studien konnten miR-29c bereits tumorsuppressive Eigenschaften zuschreiben (siehe Tabelle 7 und

Tabelle 8) (66, 67, 107-109), was die Tendenz der vorliegenden Arbeit, nämlich miR-29c als Tumorsuppressor im Blasenkarzinom zu sehen, bekräftigt.

Weiterführend wurde die Expression in den histologisch unterschiedlichen Gruppen (NMIBC vs. MIBC) verglichen. Hierbei zeigt sich eine statistisch signifikant niedrigere Expression der micro-RNA-29c im muskelinvasiven Tumor (T2-T4) verglichen mit dem nicht-muskelinvasiven Stadium (Ta-T1). Ergänzend wurde die Fragestellung untersucht, ob sich eine aberrante miR-29c-Expression in der gepaarten Untersuchung zwischen NMIBC und MIBC des gleichen Patienten zeigen lässt. Hierbei zeigte sich eine signifikante Herabregulation der miR-29c auch im MIBC. Dies könnte ein Anhaltspunkt dafür sein, dass bei Patienten im Verlauf der Erkrankung eine progrediente Suppression der miR-29c mit der Progression der Tumorentwicklung assoziiert ist. Dies bestätigt den Trend der vorangegangenen Untersuchung und unterstreicht eine tumorsuppressive Wirkung auch während der Progression des Tumors. Eine niedrigere miR-29c-Expression im MIBC verglichen mit prognostisch günstigen (nicht-invasiv-rezidivierenden) NMIBC wurde auch von Rosenberg et. al publiziert(67), sodass die aktuelle Studienlage die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten untermauern.

Insgesamt decken sich die Ergebnisse der Literatur mit denen der vorliegenden Arbeit, welche zeigen, dass miR-29c im aggressiveren, muskelinvasiven Urothelkarzinom verglichen mit dem nicht-muskelinvasiven Urothelkarzinom der Harnblase herabreguliert ist.

Diese Ergebnisse zeigen, dass miR-29c als möglicher Marker für Invasivität und Aggressivität im Urothelkarzinom interessant bleibt, da die Expression von miR-29c mit

der Progression des Blasenkarzinoms assoziiert erscheint. Inwiefern miR-29c auch als Prognosemarker im NMIBC fungieren kann, wird im Folgenden weitergehend diskutiert.

5.1.4.2 Micro-RNA-29c als Progressionsmarker im NMIBC

Aufbauend auf den vorangegangenen Ergebnissen wurde untersucht, ob sich miR-29c als prognostischer Marker für den Verlauf von NMIBC eignet. Hierfür erfolgte zunächst eine Unterteilung in progredient werdende bzw. nicht progredient werdende NMIBC. Dabei zeigte sich eine signifikant niedrigere Expression der miR-29c im NMIBC mit einem muskelinvasiven Rezidiv im Verlauf. Dies unterstreicht die tumorsuppressive Wirkung der miR-29c und zeigt, dass eine geringe Expression der micro-RNA-29c im NMIBC mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist. Angeschlossen an diese Untersuchungen wurde geprüft, ob sich die prognostisch unterschiedlichen Gruppen auch anhand eines Schwellenwertes dichotomisieren lassen. Hierfür wurde zunächst mithilfe des Youden-Index ein bestmöglicher Schwellenwert ermittelt. Für diesen Wert zeigte sich schließlich in der ROC-Kurve eine höchstmögliche Sensitivität von 100% sowie eine Spezifität von 62,5%. Die Sensitivität zeigt somit, dass sich anhand des Schwellenwertes im vorliegenden Kollektiv ein NMIBC mit einem späteren Progress zu 100% erkennen lässt, wenngleich bei einer Spezifität von 62,5% falsch positive Werte in Kauf genommen werden müssen. Mit einem p-Wert von $<0,005$ in der Kaplan-Meier-Analyse konnten zudem die beiden Gruppen in Bezug auf ein progressionsfreies Überleben und bei einem $p<0,05$ auch auf tumorbedingtes Versterben (Mortalität) getrennt werden. Dies unterstreicht die Bedeutung von miR-29c als möglicher Prognosemarker für das NMIBC, da im untersuchten Kollektiv eine statistisch verlässliche Unterscheidung in prognostisch günstige und ungünstige Tumore anhand der miR-29c Expression möglich ist.

In vergleichbaren Untersuchungsmodellen der Arbeitsgruppen um Dyrskjot et al. sowie Rosenberg et al. konnte ebenfalls eine signifikant niedrigere miR-29c Expression im prognostisch ungünstigen NMIBC (mit muskelinvasivem Rezidiv im Verlauf) gezeigt werden. Zudem wurde in diesen Arbeiten ebenfalls in einer Kaplan-Meier-Analyse nach Dichotomisierung der Gruppen anhand der unterschiedlichen miR-29c Expression, eine niedrigere miR-29c-Expression mit einem höheren Progressionsrisiko korreliert (67, 112).

Ein unmittelbarer Vergleich der in diesen zwei Publikationen verwendeten Schwellenwerte mit dem der vorliegenden Arbeit ist aufgrund der unterschiedlichen

Methodik (u.a. unterschiedlich verwendeten Housekeeper zum Normalisieren der RT-PCR Daten) nicht möglich.

Insgesamt untermauert die aktuelle Studienlage die vorliegenden Ergebnisse einer tumorsuppressiven miR-29c. Zudem konnte gezeigt werden, dass eine niedrige miR-29c Expression mit einer schlechteren klinischen Prognose aufgrund eines erhöhten Progressionsrisikos vergesellschaftet ist und anhand der miR-29c Expression prognostisch günstige von prognostisch ungünstigen Tumoren statistisch robust abgegrenzt werden können.

Um die Ergebnisse aus dem Würzburger Kollektiv zu bestätigen, wurden die miR-29c Expressionsdaten eines unabhängigen Kontrollkollektivs (Mannheimer NMIBC Kollektiv) analysiert und auf die prognostische Aussagekraft von miR-29c untersucht.

Im Validierungskollektiv, das eine vergleichbare Zusammensetzung zum Würzburger Kollektiv besaß, konnte, wie bereits für das Würzburger Kollektiv bestätigt, eine signifikant niedrigere miR-29c-Expression in den prognostisch ungünstigen NMIBC festgestellt werden.

Analog zu den Versuchen am Würzburger Kollektiv wurde mit Hilfe der ermittelten miR-29c Expressionsdaten eine Regressionsanalyse durchgeführt. Hierbei wurde der zuvor am Würzburger Kollektiv ermittelte miR-29c Schwellenwert verwendet, um das Mannheimer Kollektiv zu dichotomisieren. Nach Dichotomisierung des Kontrollkollektivs anhand des Würzburger Schwellenwerts konnte in der Kaplan-Meier-Kurve gezeigt werden, dass sich die beiden NMIBC-Gruppen prognostisch unterschiedlich verhalten, da ein signifikant längeres progressionsfreies Überleben und eine signifikant niedrigere Mortalitätsrate (tumorassoziiertes Versterben) in der Gruppe mit einer höheren miR-29c-Expression besteht.

Somit konnte der Schwellenwert bestätigt und die prognostische Aussagekraft von miR-29c als prognostischer Marker für das NMIBC in zwei voneinander unabhängigen Kollektiven validiert werden.

Vergleichbare Validierungsstudien eines konkreten Schwellenwertes von miR-29c wurden in der Literatur bislang nicht beschrieben, sodass diese Untersuchungen einzigartig sind. Die Verwendung dieses Schwellenwertes hätte in den untersuchten Kollektiven eine frühzeitige Diagnose von Hochrisikopatienten ermöglicht und durch eine frühzeitige kurative Therapie (Zystektomie) gegebenenfalls die Prognose verbessern

können. Ob hierdurch wirklich das progressionsfreie Überleben verlängert werden und die Mortalität gesenkt werden kann, kann im Rahmen zukünftiger prospektiver Studien untersucht und aufgearbeitet werden.

5.1.5 Diagnostische Bedeutung von miR-29c für die klinische Anwendung

Mithilfe weiterer histopathologischer Werte wurde ergänzend im Rahmen einer kombinierten Regressionsanalyse untersucht, ob die prognostische Genauigkeit unter Berücksichtigung mehrerer Variablen erhöht werden kann. Bisher ist in der Klinik der EORTC-Score zur Abschätzung des Progressionsrisikos geläufig. Hierbei wird aus unterschiedlichen Variablen (T-Stadium, Grading, Tumorgröße und Auftreten eines Rezidivs) ein Wert gebildet, welcher unter anderem das Progressionsrisiko vorhersagen soll. Da es sich im untersuchten Kollektiv nur um das Erstauftreten der NMIBC handelt und Informationen bezüglich der Tumorgröße nicht vorliegen, kann in der vorliegenden Arbeit lediglich das Grading und T-Stadium aus dem EORTC-Score zum Vergleich mitberücksichtigt werden.

Vergleicht man nun die miR-29c-Expression mit dem Grading sowie dem T-Stadium (im EORTC-Score mitberücksichtigt (145)) und bezieht dies im Rahmen einer kombinierten Regressionsanalyse mit ein, konnte in den vorliegenden Kollektiven gezeigt werden, dass der ermittelte Schwellenwert der miR-29c-Expression der bestmögliche prädiktive Marker aller vorliegenden Variablen ist. Selbst nach ergänzendem Hinzuziehen des Gradings oder T-Stadiums zu der relativen miR-29c-Expression konnte die prognostische Genauigkeit nicht verbessert werden. Unter Berücksichtigung der anderen in dieser Arbeit untersuchten miRs (-9,-21,-145,-200c,-205,-221) zeigte sich jedoch im kombinierten Regressionsmodell eine erhöhte Signifikanz in der Kaplan-Meier-Kurve, wenn sowohl miR-29c als auch miR-145 einen gemeinsamen Schwellenwert bilden. Da sich dieser Schwellenwert im Mannheimer Kollektiv nicht bestätigen ließ, ist eine kombinierte Untersuchung von miR-29c und miR-145 nicht weiter zielführend.

Da sich miR-29c im vorliegenden Kollektiv als sicherster Marker zur Abschätzung des Progressionsrisikos im Vergleich zu den geläufigen klinischen Markern (T-Stadium und Grading) herausstellt, könnte micro-RNA-29c als möglicher neuer Prognosemarker für die Verwendung im klinischen Alltag großes Potenzial besitzen. Eine frühzeitige Diagnose von NMIBC mit einem hohen Progressionsrisiko mithilfe der miR-29c-

Expression könnte somit auch für eine Therapieplanung von Patienten mit einem NMIBC eine große Relevanz haben.

5.1.6 Molekulare Funktion der Micro-RNA-29c als Tumorsuppressor

Wie zuvor beschrieben konnte eine aberrante Expression der miR-29c im Urothelkarzinom nachgewiesen werden. Zur weiterführenden Beurteilung wurden *in vitro* Versuche angeschlossen, um die Rolle von miR-29c als Tumorsuppressor aufzuzeigen. Im Folgenden wurde die Proliferation (5.1.6.1), Migration (5.1.6.2) und Apoptose (5.1.6.3) von miR-29c überexprimierten Blasenkarzinom-Zelllinien untersucht, um wesentliche Merkmale eines Tumorsuppressors darzustellen

5.1.6.1 Proliferation

Zunächst wurde der Einfluss der miR-29c auf die Proliferation der Karzinomzellen untersucht.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen eine geringere Zellzahl der RT4-Tumorzellreihe nach transienter Transfektion der Zellen mit pre-miR-29c verglichen mit der Negativkontrolle: Es konnte jedoch keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden. Nach transienter Transfektion der J82-Zellreihe mit pre-miR-29c konnte hingegen eine signifikante Inhibierung der Proliferation in den mit miR-29c transfizierten Karzinomzellen festgestellt werden, was ein eindeutiger Hinweis auf eine tumorsuppressive Funktion der micro-RNA-29c im Blasenkarzinom darstellt.

Eine niedrigere Proliferationsrate durch die Überexpression der miR-29c in Blasenkarzinomzellreihen konnte bereits in vorherigen Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen nachgewiesen werden (66, 109, 146).

Unter anderem wird als molekulares Target das proliferationsassoziierte Enzym PI3K (Phosphoinositid-3-Kinasen) beschrieben, welches über den AKT-Signalweg eine onkogene Wirkung annehmen kann und unter anderem durch miR-29c inhibiert werden kann (109, 147).

Auch der posttranskriptionelle Einfluss der miR-29c auf die *CDK6* (*cyclin-dependent-kinase-6*) Expression wurde bereits in unterschiedlichen Tumoren belegt (148, 149). Dieses Schlüsselgen gilt als wichtiger Regulator der G1/S- Zellzyklustransition und kann somit eine wesentliche onkogene Rolle in der Karzinogenese spielen. Dass eine erhöhte *CDK6* mit einer schlechteren Prognose im Urothelkarzinom assoziiert ist, wurde bereits

durch Wang et al beschrieben (121). Die Arbeitsgruppe um Zhao et al. beschrieb *CDK6* als molekulares Target der miR-29c für das Urothelkarzinom, sodass die vermutete antiproliferative Funktion der miR-29c durch die Regulation des *CDK6* somit gestützt werden kann. (66)

Zusammenfassend konnte eine signifikante Proliferationsinhibierung nach transienter Transfektion mit pre-miR-29c bewiesen werden.

5.1.6.2 Migration

Ein wichtiger Faktor in der Entstehung eines Tumorprogresses stellt die Migration der Tumorzellen in Blutgefäße sowie in benachbartes Gewebe dar. Durch eine erhöhte Motilität der Karzinomzellen scheint eine Migration durch schützende Membranen möglich, was sowohl ein lokales Fortschreiten, als auch eine Fernmetastasierung begünstigen kann (150). Anhand des Boyden-Chamber-Assays wurde die Fragestellung untersucht, inwiefern miR-29c die Migration der Zellen und somit das Risiko eines klinischen Progresses beeinflussen kann.

In den Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Migrationseigenschaft und somit die Möglichkeit der Zellinvasion in den miR-29c transfizierten Zellen deutlich erniedrigt ist. Dies stellt einen weiteren wichtigen Pfeiler eines Tumorsuppressors dar und markiert erneut die tumorsuppressive Funktion der miR-29c im Urothelkarzinom.

Für einige micro-RNAs konnte ein Einfluss auf die Migration in Blasenkarzinomzelllinien nachgewiesen werden (151, 152), jedoch existierten für miR-29c im Blasenkarzinom noch keine Daten. Eine Rolle von miR-29c als Regulator von Migration konnte lediglich in anderen Tumorentitäten beschrieben werden. In der 2020 erschienenen Arbeit von Lu et al. wurde eine durch miR-29c regulierte Migration für das Gallenblasenkarzinom nachgewiesen (153). Die Arbeitsgruppe um Zhong et al. konnte mit miR-29a bereits eine migrationsinhibierende Regulation über die miR-29-Familie sogar im Urothelkarzinom beschreiben. Hier wurde eine Inhibierung der Migration über VEGFA (*vascular endothelial growth factor A*) beschrieben (154). VEGFA ist als Induktor der Neoangiogenese bereits häufig eine proliferative Wirkung zugeschrieben und über eine Erhöhung der Permeabilität mit einer Regulation der Migrationseigenschaften in Verbindung gebracht worden (155-158). Da eine Regulation von VEGFA über miR-29c bereits im Adenokarzinom der Lunge beschrieben wurde (159), scheint dies als molekulares Target auch für das Blasenkarzinom denkbar.

Die beschriebenen Ergebnisse zeigen eine Bedeutung der miR-29c als Regulator von Migrationsvorgängen im Urothelkarzinom, welche jedoch bislang noch nicht umfassend erforscht wurden. Die miR-29c vermittelte Migrationsinhibierung könnte über die posttranskriptionelle Regulation des miR-29c Targets VEGFA stattfinden. Dieser Untersuchungsansatz war nicht mehr Teil der vorliegenden Arbeit und bedarf weiterer Validierung.

5.1.6.3 Apoptose

Wie zuvor bereits beschrieben verursacht die Überexpression von miR-29c eine Reduktion der Zellzahl in den untersuchten Blasenkarzinomzelllinien. Neben der beobachteten Proliferationsinhibierung durch miR-29c könnte dieses Ergebnis auch durch die Induktion von apoptotischen Mechanismen ausgelöst werden. Aufgrund dessen wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob die Caspasen -3/-7 als bekannter Initiator der Apoptose in der Blasenkarzinomzelllinie durch eine Überexpression der miR-29c aktiviert und damit der programmierte Zelltod initiiert wird. Die Aktivierung von Caspasen (*cysteinyI-aspartate specific protease*) ist einer der bekanntesten Trigger der Apoptose (160). Welche Rolle miR-29c hierbei einnehmen kann, ist bislang nicht abschließend untersucht.

Eine höhere Aktivität der Caspase-3/-7 nach transienter Transfektion mit pre-miR-29c konnte in der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden. Somit lässt sich die in den Proliferationstestungen beschriebene reduzierte Zellzahl in miR-29c überexprimierten Zellen nicht über eine erhöhte Caspase-3/-7 Aktivität erklären.

Ein Caspase-induzierter Zelltod konnte hingegen bereits in diversen Karzinomen nachgewiesen werden. Dass ein solcher Mechanismus auch über micro-RNAs als potenzielle Tumorsuppressorgene eingeleitet wird, konnten Lin et al. in ihrer Arbeit für das Prostatakarzinom zeigen (161). Auch für das Urothelkarzinom zeigten Ostefeld et al., dass über eine Überexpression der tumorsuppressiven miR-145 der Zelltod durch die Aktivierung der Caspase-3/-7 eingeleitet wird (162).

Dass die miR-29c eine Rolle in der Regulierung der Caspasen spielen kann, ist am Beispiel der Arbeit von Li et al. für das Ösophaguskarzinom beschrieben (163). Eine Caspasen-vermittelte Aktivierung der Apoptose über die micro-RNA-29c im Urothelkarzinom ist in der Literatur bislang nicht beschrieben.

Somit ist davon auszugehen, dass die zwei untersuchten Caspasen keinen wesentlichen miR-29c-vermittelten Anteil an der Apoptose im Urothelkarzinom haben. Ob andere Induktoren der Apoptose durch miR-29c beeinflusst werden, kann nicht beurteilt werden. Kroemer et al. in ihrer Übersichtsarbeit im *Nature* zeigen, dass auch Defekte in der Induktion von einem Caspase-unabhängigem Zelltod in Tumorzellen auftreten können (164). Dies kann im vorliegenden Fall lediglich vermutet werden und war nicht Bestandteil dieser Arbeit.

Zusammenfassend konnte in miR-29c überexprimierten Urothelkarzinomzellen eine Inhibierung der Proliferation sowie der Migration nachgewiesen werden. Dies unterstreicht nach den Untersuchungen am Nativmaterial nun auch in den in vitro Untersuchungen die tumorsuppressive Bedeutung der miR-29c im Urothelkarzinom.

5.1.7 LOXL2 als molekulares Target

Um die tumorsuppressive Funktion von miR-29c weiter abzuklären, wurde nach neuen Zielgenen der miR-29c gesucht. Im Rahmen einer internetbasierten Datenbankrecherche konnte eine Bindungsstelle zwischen miR-29c und der 3'UTR der *LOXL2* nachgewiesen werden, sodass eine *LOXL2* ein mögliches Zielgen darstellt.

Um eine posttranskriptionelle Regulation von *LOXL2* durch miR-29c zu beweisen, wurde untersucht, ob durch eine ektopische Überexpression der miR-29c die *LOXL2*-Expression reguliert wird.

Nach transienter Transfektion der Blasenkarzinomzellen mit pre-miR-29c konnte eine signifikant niedrigere Expression von *LOXL2* nachgewiesen werden. Die aufgeführten Ergebnisse beweisen somit eine posttranskriptionelle Regulation von *LOXL2* auf RNA Ebene durch miR-29c.

Aufgrund der bekannten onkogenen Funktion von *LOXL2* stellt es im Zusammenhang mit der postulierten tumorsuppressiven Funktion von miR-29 ein interessantes Target dar. Eine der bekanntesten wichtigen, physiologischen Funktionen der LOX-Familie ist über die Querverbindung von Kollagen und Elastin die Stabilisierung der extrazellulären Matrix (165). Eine Überexpression von *LOX* kann zu einem fibrotischen Umbau der Zellen und somit zu einer erhöhten Steifigkeit der Zellen führen. Dies wiederum kann einen Tumorprogress sowie Metastasierung über eine erhöhte Zellmigration bedingen (78, 166, 167). Die molekularen Mechanismen über welche LOX Einfluss auf die

Karzinogenese nehmen kann, ist noch nicht endgültig verstanden. Vermutet wird unter anderem, dass *LOXL2* über eine Regulation des posttranskriptionellen Faktors „Snail“ die E-Cadherin-Transkription inhibiert und somit die EMT initiiert wird (168).

Dass *LOXL2* als onkogenes Target fungieren kann, konnte bereits für unterschiedliche Tumorentitäten, wie z.B. dem Magen- oder Pankreaskarzinom nachgewiesen werden (169, 170). Hierbei wird eine onkogene Wirkung unter anderem über den PI3K-Akt-Signalweg für das kolorektale Karzinom beschrieben (171). Dass dies ein möglicher Signalweg im Blasenkarzinom unter dem Einfluss von miR-29c sein kann, wurde zuvor bereits in 5.1.6.1 beschrieben, ist jedoch noch zu beweisen.

Dass die Gene der LOX-Familie auch im Blasenkarzinom tumorregulierend auf posttranskriptioneller Ebene dienen können, konnten Wu et al. zeigen, wenngleich dies bislang lediglich für die im Gegensatz zur *LOXL2* tumorsuppressiven *LOX* und *LOXL4* gezeigt werden konnte (172). Die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse werden durch die Gruppe um Nishikawa et al. unterstützt, welche im Nierenzellkarzinom zeigen konnten, dass durch eine Überexpression der miR-29c, *LOXL2* supprimiert und somit die Tumorzellmigration inhibiert werden konnte (173). Ein wesentlicher Einfluss der *LOXL2* scheint für das Urothelkarzinom in der Literatur bislang kaum beschrieben.

Zusammenfassend könnte eine bisher unbekannte Inhibierung der *LOXL2* Expression durch miR-29c im Urothelkarzinom beschrieben werden. Mithilfe der vorliegenden Ergebnisse konnte somit gezeigt werden, dass zumindest teilweise die tumorsuppressive Funktion von miR-29c durch die Regulation von *LOXL2* vermittelt wird. Aufgrund der progressions-assoziierten Expression von miR-29c wäre es nun interessant zu untersuchen, ob *LOXL2* ebenfalls als Progressionsmarker im Blasenkarzinom fungieren könnte. Da miRs in der Regel ein ganzes Bündel von verschiedenen Zielgenen regulieren kann und miR-29c eine regulierende Funktion im Verlauf der Entwicklung zu aggressiveren Tumoren besitzt, wäre es zudem wichtig, in zukünftigen Versuchen die Rolle der möglichen Zielgene für die Progression des Blasenkarzinoms zu analysieren. Mithilfe dieser Untersuchungen könnten Mechanismen der Tumorgenese und Progression des Blasenkarzinoms weiter entschlüsselt werden.

6 Zusammenfassung

Das Urothelkarzinom ist das zweithäufigste urologische Malignom mit weltweit steigender Inzidenz. Nach initial kurativ intendierter transurethraler Resektion des Tumors zeigt bislang immer noch jeder vierte Patient einen Progress im Verlauf mit einem erhöhten Risiko einer Metastasierung, ohne dass hierfür verlässliche prognostische Marker zur Verfügung stehen. Mithilfe eines solchen (Bio)markers könnte beim Urothelkarzinom eine frühzeitige Diagnostik von Hochrisikokarzinomen ermöglicht, die Therapieplanung verbessert und somit das Risiko einer Metastasierung und erhöhten Mortalität gesenkt werden. Als mögliche Biomarker rücken micro-RNAs über ihre posttranskriptionelle Regulierung in den Fokus onkologischer Forschung. Mithilfe einer Datenbankrecherche wurden 7 verschiedene micro-RNAs (miR-9, -21, -29c, -145, -200c, -205, -221) selektioniert, welchen bereits in unterschiedlichen Malignomen eine Rolle in der Karzinogenese nachgewiesen werden konnte. Ein Einfluss dieser miRs im Urothelkarzinom war bislang noch nicht suffizient beschrieben, sodass anhand einer Expressionsanalyse in der vorliegenden Arbeit ein Biomarker für einen Progress untersucht werden sollte. Hierfür wurde ein archiviertes Gewebekollektiv, bestehend aus NMIBC, MIBC und benignem Referenzmaterial verwendet und die mittels RT-PCR ermittelte miR-Expression mit klinischen Parametern sowie Follow-up-Daten korreliert. Letztlich konnte für unterschiedliche micro-RNAs ein Einfluss auf das Urothelkarzinom im untersuchten Kollektiv nachgewiesen werden und somit deren Bedeutung als Onko-miRs im Urothelkarzinom gestärkt werden. Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurden die NMIBC retrospektiv anhand der Follow-up-Daten in zwei prognostisch unterschiedliche Subgruppen unterteilt und die Expressionsdaten miteinander verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl miR-29c als auch miR-145 in prognostisch ungünstigeren NMIBC mit einem muskelinvasiven Rezidiv im Verlauf eine signifikant niedrigere Expression im untersuchten Kollektiv aufwiesen. Anhand eines in der Regressionsanalyse ermittelten Schwellenwertes konnte in der Kaplan-Meier-Analyse sowohl ein erhöhtes progressionsfreies Überleben als auch eine niedrigere tumorassoziierte Mortalität in den NMIBC mit einer miR-Expression unterhalb des ermittelten Schwellenwertes gezeigt werden. Somit wurde im untersuchten Kollektiv ein Marker ermittelt, welcher anhand der miR-29c und -145-Expression eine Unterteilung in prognostisch günstige und ungünstige Gruppen ermöglicht. In einem zweiten

Zusammenfassung

unabhängigen Validierungskollektiv wurden miR-29c und -145 auf ihre zuvor erhobene prognostische Aussagekraft untersucht. Hierbei konnte miR-145 als prognoserelevanter Biomarker nicht validiert werden. Für miR-29c konnte hingegen erneut eine niedrige Expression mit einer schlechteren klinischen Prognose assoziiert werden. Zudem konnte der zuvor ermittelte Schwellenwert auch in dem zweiten Kollektiv und miR-29c somit als Prognosemarker in den untersuchten Kollektiven validiert werden.

In der Zellkultur konnte die tumorsuppressive Funktion der miR-29c weiter bestätigt werden. So zeigte sich in ektopisch miR-29c-überexprimierten Urothelkarzinomzellen eine signifikant niedrigere Proliferations- und Migrationsrate. Um die posttranskriptionelle Funktion der tumorsuppressiven miR-29c weiter abzuklären, konnte *LOXL2* als ein solides Zielgen der miR-29c mittels RT-PCR-Analysen identifiziert werden.

Anhand dieser Ergebnisse konnten vor allem miR-29c tumorsuppressive Eigenschaften im Urothelkarzinom zugeschrieben werden. Im untersuchten Gewebekollektiv stellt die miR-29c einen relevanten Progressionsmarker dar, welcher im Rahmen prospektiver Studien weiter validiert werden könnte. Eine Implementierung der miR-29c-Expressionsanalyse in die Diagnostik der NMIBC ist somit insgesamt ein vielversprechender Ansatz um eine rasche Diagnose von Hochrisikokarzinomen zu stellen und folglich einer frühzeitigen Therapie zugänglich zu machen.

7 Anhang

7.1 Literaturverzeichnis

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136(5):E359-86.
2. Barnes B, Kraywinkel K, Nowossadeck E, Schönfeld I, Starker A, Wienecke A, et al. Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. Robert Koch-Institut; 2016.
3. Alfred Witjes J, Lebret T, Comperat EM, Cowan NC, De Santis M, Bruins HM, et al. Updated 2016 EAU Guidelines on Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer. *Eur Urol*. 2017;71(3):462-75.
4. Babjuk M, Bohle A, Burger M, Capoun O, Cohen D, Comperat EM, et al. EAU Guidelines on Non-Muscle-invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder: Update 2016. *Eur Urol*. 2017;71(3):447-61.
5. Barbosa ALA, Vermeulen S, Aben KK, Grotenhuis AJ, Vrieling A, Kiemeney LA. Smoking intensity and bladder cancer aggressiveness at diagnosis. *PLoS One*. 2018;13(3):e0194039.
6. Burger M, Catto JW, Dalbagni G, Grossman HB, Herr H, Karakiewicz P, et al. Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. *Eur Urol*. 2013;63(2):234-41.
7. Freedman ND, Silverman DT, Hollenbeck AR, Schatzkin A, Abnet CC. Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women. *Jama*. 2011;306(7):737-45.
8. Jankovic S, Radosavljevic V. Risk factors for bladder cancer. *Tumori*. 2007;93(1):4-12.
9. Aben KK, Witjes JA, Schoenberg MP, Hulsbergen-van de Kaa C, Verbeek AL, Kiemeney LA. Familial aggregation of urothelial cell carcinoma. *Int J Cancer*. 2002;98(2):274-8.
10. Massey BD, Nation EF, Gallup CA, Hendricks ED. Carcinoma of the Bladder: 20-year Experience in Private Practice. *The Journal of Urology*. 1965;93(2):212-6.
11. Wallace DM, Harris DL. Delay in Treating Bladder Tumours. *Lancet*. 1965;2(7407):332-4.
12. Bassi P, De Marco V, De Lisa A, Mancini M, Pinto F, Bertoloni R, et al. Non-invasive diagnostic tests for bladder cancer: a review of the literature. *Urol Int*. 2005;75(3):193-200.
13. Planz B, Jochims E, Deix T, Caspers HP, Jakse G, Boecking A. The role of urinary cytology for detection of bladder cancer. *Eur J Surg Oncol*. 2005;31(3):304-8.
14. von der Maase H, Hansen SW, Roberts JT, Dogliotti L, Oliver T, Moore MJ, et al. Gemcitabine and cisplatin versus methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin in advanced or metastatic bladder cancer: results of a large, randomized, multinational, multicenter, phase III study. *J Clin Oncol*. 2000;18(17):3068-77.

15. von der Maase H, Sengelov L, Roberts JT, Ricci S, Dogliotti L, Oliver T, et al. Long-term survival results of a randomized trial comparing gemcitabine plus cisplatin, with methotrexate, vinblastine, doxorubicin, plus cisplatin in patients with bladder cancer. *J Clin Oncol*. 2005;23(21):4602-8.
16. Feifer AH, Taylor JM, Tarin TV, Herr HW. Maximizing cure for muscle-invasive bladder cancer: integration of surgery and chemotherapy. *Eur Urol*. 2011;59(6):978-84.
17. Ploussard G, Daneshmand S, Efsthathiou JA, Herr HW, James ND, Rodel CM, et al. Critical analysis of bladder sparing with trimodal therapy in muscle-invasive bladder cancer: a systematic review. *Eur Urol*. 2014;66(1):120-37.
18. Botteman MF, Pashos CL, Redaelli A, Laskin B, Hauser R. The health economics of bladder cancer: a comprehensive review of the published literature. *Pharmacoeconomics*. 2003;21(18):1315-30.
19. Sievert KD, Amend B, Nagele U, Schilling D, Bedke J, Horstmann M, et al. Economic aspects of bladder cancer: what are the benefits and costs? *World J Urol*. 2009;27(3):295-300.
20. Solsona E, Iborra I, Ricos JV, Monros JL, Casanova J, Dumont R. Effectiveness of a single immediate mitomycin C instillation in patients with low risk superficial bladder cancer: short and long-term followup. *J Urol*. 1999;161(4):1120-3.
21. Sylvester RJ, van der Meijden AP, Oosterlinck W, Witjes JA, Bouffouix C, Denis L, et al. Predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer using EORTC risk tables: a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials. *Eur Urol*. 2006;49(3):466-5; discussion 75-7.
22. Krege S, Giani G, Meyer R, Otto T, Rubben H. A randomized multicenter trial of adjuvant therapy in superficial bladder cancer: transurethral resection only versus transurethral resection plus mitomycin C versus transurethral resection plus bacillus Calmette-Guerin. *Participating Clinics. J Urol*. 1996;156(3):962-6.
23. Shelley MD, Kynaston H, Court J, Wilt TJ, Coles B, Burgon K, et al. A systematic review of intravesical bacillus Calmette-Guerin plus transurethral resection vs transurethral resection alone in Ta and T1 bladder cancer. *BJU Int*. 2001;88(3):209-16.
24. Sylvester RJ, van der MA, Lamm DL. Intravesical bacillus Calmette-Guerin reduces the risk of progression in patients with superficial bladder cancer: a meta-analysis of the published results of randomized clinical trials. *J Urol*. 2002;168(5):1964-70.
25. Bohle A, Bock PR. Intravesical bacille Calmette-Guerin versus mitomycin C in superficial bladder cancer: formal meta-analysis of comparative studies on tumor progression. *Urology*. 2004;63(4):682-6; discussion 6-7.
26. Shelley MD, Wilt TJ, Court J, Coles B, Kynaston H, Mason MD. Intravesical bacillus Calmette-Guerin is superior to mitomycin C in reducing tumour recurrence in high-risk superficial bladder cancer: a meta-analysis of randomized trials. *BJU Int*. 2004;93(4):485-90.

27. Cogorno Wasytkowski L, Rios-Gonzalez E, Linares Espinos E, Leibar Tamayo A, Martinez-Pineiro Lorenzo L. Indication for early cystectomy in nonmuscle-invasive bladder cancer. Literature review. *Actas Urol Esp.* 2018;42(1):17-24.
28. Sengupta S, Blute ML. The management of superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *Urology.* 2006;67(3 Suppl 1):48-54; discussion -5.
29. Kirkali Z, Chan T, Manoharan M, Algaba F, Busch C, Cheng L, et al. Bladder cancer: epidemiology, staging and grading, and diagnosis. *Urology.* 2005;66(6 Suppl 1):4-34.
30. Rosenberg JE, Carroll PR, Small EJ. Update on chemotherapy for advanced bladder cancer. *J Urol.* 2005;174(1):14-20.
31. Sidransky D, Frost P, Von Eschenbach A, Oyasu R, Preisinger AC, Vogelstein B. Clonal origin of bladder cancer. *N Engl J Med.* 1992;326(11):737-40.
32. Gibas Z, Gibas L. Cytogenetics of bladder cancer. *Cancer Genet Cytogenet.* 1997;95(1):108-15.
33. Takahashi T, Habuchi T, Kakehi Y, Mitsumori K, Akao T, Terachi T, et al. Clonal and chronological genetic analysis of multifocal cancers of the bladder and upper urinary tract. *Cancer Res.* 1998;58(24):5835-41.
34. Li M, Cannizzaro LA. Identical clonal origin of synchronous and metachronous low-grade, noninvasive papillary transitional cell carcinomas of the urinary tract. *Hum Pathol.* 1999;30(10):1197-200.
35. Louhelainen J, Wijkstrom H, Hemminki K. Allelic losses demonstrate monoclonality of multifocal bladder tumors. *Int J Cancer.* 2000;87(4):522-7.
36. Harris AL, Neal DE. Bladder cancer--field versus clonal origin. *N Engl J Med.* 1992;326(11):759-61.
37. Hafner C, Knuechel R, Stoehr R, Hartmann A. Clonality of multifocal urothelial carcinomas: 10 years of molecular genetic studies. *Int J Cancer.* 2002;101(1):1-6.
38. Paiss T, Wohr G, Hautmann RE, Mattfeldt T, Muller M, Haeussler J, et al. Some tumors of the bladder are polyclonal in origin. *J Urol.* 2002;167(2 Pt 1):718-23.
39. Adshear JM, Kessler AM, Ogden CW. Genetic initiation, progression and prognostic markers in transitional cell carcinoma of the bladder: a summary of the structural and transcriptional changes, and the role of developmental genes. *Br J Urol.* 1998;82(4):503-12.
40. Williams SG, Stein JP. Molecular pathways in bladder cancer. *Urological Research.* 2004;32(6):373-85.
41. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 1993;75(5):843-54.
42. Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell.* 1993;75(5):855-62.

43. Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*. 2004;432(7014):231-5.
44. He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet*. 2004;5(7):522-31.
45. Filipowicz W, Jaskiewicz L, Kolb FA, Pillai RS. Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. *Curr Opin Struct Biol*. 2005;15(3):331-41.
46. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, 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):15524-9.
47. Ma L, Young J, Prabhala H, Pan E, Mestdagh P, Muth D, et al. miR-9, a MYC/MYCN-activated microRNA, regulates E-cadherin and cancer metastasis. *Nat Cell Biol*. 2010;12(3):247-56.
48. Wang H, Zhang W, Zuo Y, Ding M, Ke C, Yan R, et al. miR-9 promotes cell proliferation and inhibits apoptosis by targeting LASS2 in bladder cancer. *Tumour Biol*. 2015;36(12):9631-40.
49. Lehmann U, Hasemeier B, Christgen M, Muller M, Romermann D, Langer F, et al. Epigenetic inactivation of microRNA gene hsa-mir-9-1 in human breast cancer. *J Pathol*. 2008;214(1):17-24.
50. Si ML, Zhu S, Wu H, Lu Z, Wu F, Mo YY. miR-21-mediated tumor growth. *Oncogene*. 2007;26(19):2799-803.
51. Zhang JG, Wang JJ, Zhao F, Liu Q, Jiang K, Yang GH. MicroRNA-21 (miR-21) represses tumor suppressor PTEN and promotes growth and invasion in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Clin Chim Acta*. 2010;411(11-12):846-52.
52. Tao J, Lu Q, Wu D, Li P, Xu B, Qing W, et al. microRNA-21 modulates cell proliferation and sensitivity to doxorubicin in bladder cancer cells. *Oncol Rep*. 2011;25(6):1721-9.
53. Adam L, Zhong M, Choi W, Qi W, Nicoloso M, Arora A, et al. miR-200 expression regulates epithelial-to-mesenchymal transition in bladder cancer cells and reverses resistance to epidermal growth factor receptor therapy. *Clin Cancer Res*. 2009;15(16):5060-72.
54. Gibbons DL, Lin W, Creighton CJ, Rizvi ZH, Gregory PA, Goodall GJ, et al. Contextual extracellular cues promote tumor cell EMT and metastasis by regulating miR-200 family expression. *Genes Dev*. 2009;23(18):2140-51.
55. Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, Barry SC, Tsykin A, Farshid G, et al. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat Cell Biol*. 2008;10(5):593-601.
56. Hurteau GJ, Carlson JA, Spivack SD, Brock GJ. Overexpression of the microRNA hsa-miR-200c leads to reduced expression of transcription factor 8 and increased expression of E-cadherin. *Cancer Res*. 2007;67(17):7972-6.
57. Kalogirou C, Spahn M, Krebs M, Joniau S, Lerut E, Burger M, 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):21414-34.

58. Wiklund ED, Bramsen JB, Hulf T, Dyrskjot L, Ramanathan R, Hansen TB, et al. Coordinated epigenetic repression of the miR-200 family and miR-205 in invasive bladder cancer. *International journal of cancer*. 2011;128(6):1327-34.
59. Felli N, Fontana L, Pelosi E, Botta R, Bonci D, Facchiano F, et al. MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(50):18081-6.
60. Fornari F, Gramantieri L, Ferracin M, Veronese A, Sabbioni S, Calin GA, et al. MiR-221 controls CDKN1C/p57 and CDKN1B/p27 expression in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene*. 2008;27(43):5651-61.
61. Kneitz B, Krebs M, Kalogirou C, Schubert M, Joniau S, van Poppel H, et al. Survival in patients with high-risk prostate cancer is predicted by miR-221, which regulates proliferation, apoptosis, and invasion of prostate cancer cells by inhibiting IRF2 and SOCS3. *Cancer Res*. 2014;74(9):2591-603.
62. Maurer B, Stanczyk J, Jungel A, Akhmetshina A, Trenkmann M, Brock M, et al. MicroRNA-29, a key regulator of collagen expression in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*. 2010;62(6):1733-43.
63. Boon RA, Seeger T, Heydt S, Fischer A, Hergenreider E, Horrevoets AJ, et al. MicroRNA-29 in aortic dilation: implications for aneurysm formation. *Circ Res*. 2011;109(10):1115-9.
64. Roderburg C, Urban GW, Bettermann K, Vucur M, Zimmermann H, Schmidt S, et al. Micro-RNA profiling reveals a role for miR-29 in human and murine liver fibrosis. *Hepatology*. 2011;53(1):209-18.
65. Park SY, Lee JH, Ha M, Nam JW, Kim VN. miR-29 miRNAs activate p53 by targeting p85 alpha and CDC42. *Nat Struct Mol Biol*. 2009;16(1):23-9.
66. Zhao X, Li J, Huang S, Wan X, Luo H, Wu D. MiRNA-29c regulates cell growth and invasion by targeting CDK6 in bladder cancer. *Am J Transl Res*. 2015;7(8):1382-9.
67. Rosenberg E, Baniel J, Spector Y, Faerman A, Meiri E, Aharonov R, et al. Predicting progression of bladder urothelial carcinoma using microRNA expression. *BJU International*. 2013;112(7):1027-34.
68. Xing AY, Wang B, Shi DB, Zhang XF, Gao C, He XQ, et al. Deregulated expression of miR-145 in manifold human cancer cells. *Exp Mol Pathol*. 2013;95(1):91-7.
69. Yin Y, Yan ZP, Lu NN, Xu Q, He J, Qian X, et al. Downregulation of miR-145 associated with cancer progression and VEGF transcriptional activation by targeting N-RAS and IRS1. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1829(2):239-47.
70. Dip N, Reis ST, Srougi M, Dall'Oglio MF, Leite KR. Expression profile of microrna-145 in urothelial bladder cancer. *Int Braz J Urol*. 2013;39(1):95-101; discussion 2.
71. Mizuno K, Seki N, Mataka H, Matsushita R, Kamikawaji K, Kumamoto T, et al. Tumor-suppressive microRNA-29 family inhibits cancer cell migration and invasion directly targeting LOXL2 in lung squamous cell carcinoma. *Int J Oncol*. 2016;48(2):450-60.

72. Peyrol S, Raccurt M, Gerard F, Gleyzal C, Grimaud JA, Sommer P. Lysyl oxidase gene expression in the stromal reaction to in situ and invasive ductal breast carcinoma. *Am J Pathol.* 1997;150(2):497-507.
73. Sibon I, Sommer P, Lamaziere JM, Bonnet J. Lysyl oxidase deficiency: a new cause of human arterial dissection. *Heart.* 2005;91(5):e33.
74. Kaneda A, Wakazono K, Tsukamoto T, Watanabe N, Yagi Y, Tatematsu M, et al. Lysyl oxidase is a tumor suppressor gene inactivated by methylation and loss of heterozygosity in human gastric cancers. *Cancer Res.* 2004;64(18):6410-5.
75. Kagan HM, Raghavan J, Hollander W. Changes in aortic lysyl oxidase activity in diet-induced atherosclerosis in the rabbit. *Arteriosclerosis.* 1981;1(4):287-91.
76. Gilad GM, Kagan HM, Gilad VH. Evidence for increased lysyl oxidase, the extracellular matrix-forming enzyme, in Alzheimer's disease brain. *Neurosci Lett.* 2005;376(3):210-4.
77. Hollosi P, Yakushiji JK, Fong KS, Csiszar K, Fong SF. Lysyl oxidase-like 2 promotes migration in noninvasive breast cancer cells but not in normal breast epithelial cells. *Int J Cancer.* 2009;125(2):318-27.
78. Payne SL, Hendrix MJ, Kirschmann DA. Paradoxical roles for lysyl oxidases in cancer--a prospect. *J Cell Biochem.* 2007;101(6):1338-54.
79. Li T, Wu C, Gao L, Qin F, Wei Q, Yuan J. Lysyl oxidase family members in urological tumorigenesis and fibrosis. *Oncotarget.* 2018;9(28):20156-64.
80. Nishikawa R, Chiyomaru T, Enokida H, Inoguchi S, Ishihara T, Matsushita R, et al. Tumour-suppressive microRNA-29s directly regulate LOXL2 expression and inhibit cancer cell migration and invasion in renal cell carcinoma. *FEBS Lett.* 2015;589(16):2136-45.
81. Sievert KD, Amend B, Nagele U, Schilling D, Bedke J, Horstmann M, et al. Economic aspects of bladder cancer: what are the benefits and costs? *World Journal of Urology.* 2009;27(3):295-300.
82. Bol MGW, Baak JPA, Buhr-Wildhagen S, Kruse A-J, Kjellevoid KH, Janssen EAM, et al. Reproducibility and Prognostic Variability of Grade and Lamina Propria Invasion in Stages Ta, T1 Urothelial Carcinoma of the Bladder. *The Journal of Urology.* 2003;169(4):1291-4.
83. Masters JR, Hepburn PJ, Walker L, Highman WJ, Trejdosiewicz LK, Povey S, et al. Tissue culture model of transitional cell carcinoma: characterization of twenty-two human urothelial cell lines. *Cancer Res.* 1986;46(7):3630-6.
84. Earl J, Rico D, Carrillo-de-Santa-Pau E, Rodriguez-Santiago B, Mendez-Pertuz M, Auer H, et al. The UBC-40 Urothelial Bladder Cancer cell line index: a genomic resource for functional studies. *BMC Genomics.* 2015;16:403.
85. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1986;51 Pt 1:263-73.

86. Ferretti E, De Smaele E, Po A, Di Marcotullio L, Tosi E, Espinola MS, et al. MicroRNA profiling in human medulloblastoma. *International journal of cancer*. 2009;124(3):568-77.
87. Laios A, O'Toole S, Flavin R, Martin C, Kelly L, Ring M, et al. Potential role of miR-9 and miR-223 in recurrent ovarian cancer. *Mol Cancer*. 2008;7:35.
88. Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res*. 2005;65(16):7065-70.
89. Yamamichi N, Shimomura R, Inada K, Sakurai K, Haraguchi T, Ozaki Y, et al. Locked nucleic acid in situ hybridization analysis of miR-21 expression during colorectal cancer development. *Clin Cancer Res*. 2009;15(12):4009-16.
90. Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, Ghoshal K, Jacob ST, Patel T. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology*. 2007;133(2):647-58.
91. Zhan S, Wang C, Yin F. MicroRNA-29c inhibits proliferation and promotes apoptosis in non-small cell lung cancer cells by targeting VEGFA. *Mol Med Rep*. 2018;17(5):6705-10.
92. Saito Y, Suzuki H, Imaeda H, Matsuzaki J, Hirata K, Tsugawa H, et al. The tumor suppressor microRNA-29c is downregulated and restored by celecoxib in human gastric cancer cells. *International journal of cancer*. 2013;132(8):1751-60.
93. Slaby O, Svoboda M, Fabian P, Smerdova T, Knoflickova D, Bednarikova M, 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):397-402.
94. Ceppi P, Mudduluru G, Kumarswamy R, Rapa I, Scagliotti GV, Papotti M, et al. Loss of miR-200c expression induces an aggressive, invasive, and chemoresistant phenotype in non-small cell lung cancer. *Mol Cancer Res*. 2010;8(9):1207-16.
95. Burk U, Schubert J, Wellner U, Schmalhofer O, Vincan E, Spaderna S, et al. A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells. *EMBO reports*. 2008;9(6):582-9.
96. Tang H, Deng M, Tang Y, Xie X, Guo J, Kong Y, et al. miR-200b and miR-200c as prognostic factors and mediators of gastric cancer cell progression. *Clinical Cancer Research*. 2013;19(20):5602-12.
97. Iorio MV, Casalini P, Piovan C, Di Leva G, Merlo A, Triulzi T, et al. microRNA-205 regulates HER3 in human breast cancer. *Cancer Res*. 2009;69(6):2195-200.
98. Majid S, Saini S, Dar AA, Hirata H, Shahryari V, Tanaka Y, et al. MicroRNA-205 inhibits Src-mediated oncogenic pathways in renal cancer. *Cancer Res*. 2011;71(7):2611-21.
99. Kneitz B, Krebs M, Kalogirou C, Schubert M, Joniau S, van Poppel H, et al. Survival in patients with high-risk prostate cancer is predicted by miR-221, which regulates proliferation, apoptosis, and invasion of prostate cancer cells by inhibiting IRF2 and SOCS3. *Cancer research*. 2014;74(9):2591-603.

100. Ciafre SA, Galardi S, Mangiola A, Ferracin M, Liu CG, Sabatino G, et al. Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;334(4):1351-8.
101. Chun-Zhi Z, Lei H, An-Ling Z, Yan-Chao F, Xiao Y, Guang-Xiu W, et al. MicroRNA-221 and microRNA-222 regulate gastric carcinoma cell proliferation and radioresistance by targeting PTEN. *BMC Cancer.* 2010;10:367.
102. Biggar KK, Kornfeld SF, Maistrovski Y, Storey KB. MicroRNA regulation in extreme environments: differential expression of microRNAs in the intertidal snail *Littorina littorea* during extended periods of freezing and anoxia. *Genomics, proteomics & bioinformatics.* 2012;10(5):302-9.
103. Fernandez-Gomez J, Madero R, Solsona E, Unda M, Martinez-Pineiro L, Gonzalez M, et al. Predicting nonmuscle invasive bladder cancer recurrence and progression in patients treated with bacillus Calmette-Guerin: the CUETO scoring model. *J Urol.* 2009;182(5):2195-203.
104. Pignot G, Cizeron-Clairac G, Vacher S, Susini A, Tozlu S, Vieillefond A, et al. microRNA expression profile in a large series of bladder tumors: identification of a 3-miRNA signature associated with aggressiveness of muscle-invasive bladder cancer. *International journal of cancer.* 2013;132(11):2479-91.
105. Zhang HH, Qi F, Cao YH, Zu XB, Chen MF. Expression and clinical significance of microRNA-21, maspin and vascular endothelial growth factor-C in bladder cancer. *Oncol Lett.* 2015;10(4):2610-6.
106. Fischer N, Goke F, Splittstosser V, Lankat-Buttgereit B, Muller SC, Ellinger J. Expression of programmed cell death protein 4 (PDCD4) and miR-21 in urothelial carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;417(1):29-34.
107. Friedman JM, Liang G, Liu C-C, Wolff EM, Tsai YC, Ye W, et al. The putative tumor suppressor microRNA-101 modulates the cancer epigenome by repressing the polycomb group protein EZH2. *Cancer research.* 2009;69(6):2623-9.
108. Wang G, Zhang H, He H, Tong W, Wang B, Liao G, et al. Up-regulation of microRNA in bladder tumor tissue is not common. *Int Urol Nephrol.* 2010;42(1):95-102.
109. Fan Y, Song X, Du H, Luo C, Wang X, Yang X, et al. Down-regulation of miR-29c in human bladder cancer and the inhibition of proliferation in T24 cell via PI3K-AKT pathway. *Med Oncol.* 2014;31(7):65.
110. Matsushita R, Yoshino H, Enokida H, Goto Y, Miyamoto K, Yonemori M, et al. Regulation of UHRF1 by dual-strand tumor-suppressor microRNA-145 (miR-145-5p and miR-145-3p): Inhibition of bladder cancer cell aggressiveness. *Oncotarget.* 2016;7(19):28460.
111. Ichimi T, Enokida H, Okuno Y, Kunimoto R, Chiyomaru T, Kawamoto K, et al. Identification of novel microRNA targets based on microRNA signatures in bladder cancer. *Int J Cancer.* 2009;125(2):345-52.
112. Dyrskjot L, Ostenfeld MS, Bramsen JB, Silahatoglu AN, Lamy P, Ramanathan R, et al. Genomic profiling of microRNAs in bladder cancer: miR-129 is associated with poor outcome and promotes cell death in vitro. *Cancer Res.* 2009;69(11):4851-60.

113. Avgeris M, Mavridis K, Tokas T, Stravodimos K, Fragoulis EG, Scorilas A. Uncovering the clinical utility of miR-143, miR-145 and miR-224 for predicting the survival of bladder cancer patients following treatment. *Carcinogenesis*. 2015;36(5):528-37.
114. Mahdavinezhad A, Mousavi-Bahar SH, Poorolajal J, Yadegarazari R, Jafari M, Shabab N, et al. Evaluation of miR-141, miR-200c, miR-30b Expression and Clinicopathological Features of Bladder Cancer. *Int J Mol Cell Med*. 2015;4(1):32-9.
115. Ratert N, Meyer HA, Jung M, Lioudmer P, Mollenkopf HJ, Wagner I, et al. miRNA profiling identifies candidate mirnas for bladder cancer diagnosis and clinical outcome. *J Mol Diagn*. 2013;15(5):695-705.
116. Gottardo F, Liu CG, Ferracin M, Calin GA, Fassan M, Bassi P, et al. Micro-RNA profiling in kidney and bladder cancers. *Urologic oncology*. 2007;25(5):387-92.
117. Tsikrika FD, Avgeris M, Levis PK, Tokas T, Stravodimos K, Scorilas A. miR-221/222 cluster expression improves clinical stratification of non-muscle invasive bladder cancer (TaT1) patients' risk for short-term relapse and progression. *Genes Chromosomes Cancer*. 2018;57(3):150-61.
118. Li Y, Wan B, Liu L, Zhou L, Zeng Q. Circular RNA circMTO1 suppresses bladder cancer metastasis by sponging miR-221 and inhibiting epithelial-to-mesenchymal transition. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019;508(4):991-6.
119. Setti Boubaker N, Cicchillitti L, Said R, Gurtner A, Ayed H, Blel A, et al. The clinical and prognostic value of miR-9 gene expression in Tunisian patients with bladder cancer. *Mol Biol Rep*. 2019;46(5):4743-50.
120. Bringuier PP, Umbas R, Schaafsma HE, Karthaus HF, Debruyne FM, Schalken JA. Decreased E-cadherin immunoreactivity correlates with poor survival in patients with bladder tumors. *Cancer Res*. 1993;53(14):3241-5.
121. Wang G, Zheng L, Yu Z, Liao G, Lu L, Xu R, et al. Increased cyclin-dependent kinase 6 expression in bladder cancer. *Oncol Lett*. 2012;4(1):43-6.
122. Rodriguez-Otero P, Roman-Gomez J, Vilas-Zornoza A, Jose-Eneriz ES, Martin-Palanco V, Rifon J, et al. Deregulation of FGFR1 and CDK6 oncogenic pathways in acute lymphoblastic leukaemia harbouring epigenetic modifications of the MIR9 family. *Br J Haematol*. 2011;155(1):73-83.
123. Dip N, Reis ST, Timoszczuk LS, Viana NI, Piantino CB, Morais DR, et al. Stage, grade and behavior of bladder urothelial carcinoma defined by the microRNA expression profile. *J Urol*. 2012;188(5):1951-6.
124. Wszolek MF, Rieger-Christ KM, Kenney PA, Gould JJ, Silva Neto B, Lavoie AK, et al. A MicroRNA expression profile defining the invasive bladder tumor phenotype. *Urologic oncology*. 2011;29(6):794-801 e1.
125. Eger A, Aigner K, Sonderegger S, Dampier B, Oehler S, Schreiber M, et al. DeltaEF1 is a transcriptional repressor of E-cadherin and regulates epithelial plasticity in breast cancer cells. *Oncogene*. 2005;24(14):2375-85.
126. Lee H, Jun SY, Lee YS, Lee HJ, Lee WS, Park CS. Expression of miRNAs and ZEB1 and ZEB2 correlates with histopathological grade in papillary urothelial tumors of the urinary bladder. *Virchows Arch*. 2014;464(2):213-20.

127. Tran MN, Choi W, Wszolek MF, Navai N, Lee IL, Nitti G, et al. The p63 protein isoform DeltaNp63alpha inhibits epithelial-mesenchymal transition in human bladder cancer cells: role of MIR-205. *J Biol Chem.* 2013;288(5):3275-88.
128. Lu Q, Lu C, Zhou GP, Zhang W, Xiao H, Wang XR. MicroRNA-221 silencing predisposed human bladder cancer cells to undergo apoptosis induced by TRAIL. *Urologic oncology.* 2010;28(6):635-41.
129. Matsushita R, Yoshino H, Enokida H, Goto Y, Miyamoto K, Yonemori M, et al. Regulation of UHRF1 by dual-strand tumor-suppressor microRNA-145 (miR-145-5p and miR-145-3p): Inhibition of bladder cancer cell aggressiveness. *Oncotarget.* 2016;7(19):28460-87.
130. Arima Y, Hirota T, Bronner C, Mousli M, Fujiwara T, Niwa Si, et al. Down-regulation of nuclear protein ICBP90 by p53/p21Cip1/WAF1-dependent DNA-damage checkpoint signals contributes to cell cycle arrest at G1/S transition. *Genes to Cells.* 2004;9(2):131-42.
131. Unoki M, Kelly J, Neal D, Ponder B, Nakamura Y, Hamamoto R. UHRF1 is a novel molecular marker for diagnosis and the prognosis of bladder cancer. *British journal of cancer.* 2009;101(1):98-105.
132. Sharma S, Eghbali M. Influence of sex differences on microRNA gene regulation in disease. *Biology of sex differences.* 2014;5(1):1-8.
133. Tsai H-P, Huang S-F, Li C-F, Chien H-T, Chen S-C. Differential microRNA expression in breast cancer with different onset age. *PLoS One.* 2018;13(1):e0191195.
134. Shen H, Shen J, Wang L, Shi Z, Wang M, Jiang B-h, et al. Low miR-145 expression level is associated with poor pathological differentiation and poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2015;69:301-5.
135. Henriksson M, Lüscher B. Proteins of the Myc network: essential regulators of cell growth and differentiation. *Advances in cancer research.* 1996;68:109-82.
136. Mannava S, Grachtchouk V, Wheeler LJ, Im M, Zhuang D, Slavina EG, et al. Direct role of nucleotide metabolism in C-MYC-dependent proliferation of melanoma cells. *Cell Cycle.* 2008;7(15):2392-400.
137. Sachdeva M, Zhu S, Wu F, Wu H, Walia V, Kumar S, et al. p53 represses c-Myc through induction of the tumor suppressor miR-145. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2009;106(9):3207-12.
138. Little CD, Nau MM, Carney DN, Gazdar AF, Minna JD. Amplification and expression of the c-myc oncogene in human lung cancer cell lines. *Nature.* 1983;306(5939):194-6.
139. Shibuya M, Yokota J, Ueyama Y. Amplification and expression of a cellular oncogene (c-myc) in human gastric adenocarcinoma cells. *Mol Cell Biol.* 1985;5(2):414-8.
140. Liao D, Dickson R. c-Myc in breast cancer. *Endocrine-related cancer.* 2000;7(3):143-64.

141. Schmitz-Drager BJ, Schulz WA, Jurgens B, Gerharz CD, van Roeyen CR, Bultel H, et al. c-myc in bladder cancer. Clinical findings and analysis of mechanism. *Urol Res.* 1997;25 Suppl 1:S45-9.
142. Zaharieva B, Simon R, Ruiz C, Oeggerli M, Mihatsch MJ, Gasser T, et al. High-throughput tissue microarray analysis of CMYC amplification in urinary bladder cancer. *International journal of cancer.* 2005;117(6):952-6.
143. Chiyomaru T, Enokida H, Tatarano S, Kawahara K, Uchida Y, Nishiyama K, et al. miR-145 and miR-133a function as tumour suppressors and directly regulate FSCN1 expression in bladder cancer. *British journal of cancer.* 2010;102(5):883-91.
144. Ostenfeld MS, Bramsen JB, Lamy P, Villadsen SB, Fristrup N, Sorensen KD, et al. miR-145 induces caspase-dependent and -independent cell death in urothelial cancer cell lines with targeting of an expression signature present in Ta bladder tumors. *Oncogene.* 2010;29(7):1073-84.
145. Sylvester RJ, Van Der Meijden AP, Oosterlinck W, Witjes JA, Bouffieux C, Denis L, et al. Predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer using EORTC risk tables: a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials. *European urology.* 2006;49(3):466-77.
146. Kim SS, Choi C, Kwon DD. Urinary microRNAs as potential biomarkers for differentiating the “atypical urothelial cells” category of the Paris system for reporting urine cytology. *International journal of clinical and experimental pathology.* 2017;10(8):8303.
147. Osaki M, Oshimura M, Ito H. PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis.* 2004;9(6):667-76.
148. Zhao J-J, Lin J, Lwin T, Yang H, Guo J, Kong W, et al. microRNA expression profile and identification of miR-29 as a prognostic marker and pathogenetic factor by targeting CDK6 in mantle cell lymphoma. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology.* 2010;115(13):2630-9.
149. Jiang H, Liu Z, Cheng X, Zhang Y, Dai X, Bao G, et al. MiR-29c suppresses cell invasion and migration by directly targeting CDK6 in gastric carcinoma. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2019;23:7920-8.
150. Fidler IJ, Gersten DM, Hart IR. The biology of cancer invasion and metastasis. *Advances in cancer research.* 28: Elsevier; 1978. p. 149-250.
151. Kou B, Gao Y, Du C, Shi Q, Xu S, Wang C-Q, et al., editors. miR-145 inhibits invasion of bladder cancer cells by targeting PAK1. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations;* 2014: Elsevier.
152. Ueno K, Hirata H, Majid S, Yamamura S, Shahryari V, Tabatabai ZL, et al. Tumor suppressor microRNA-493 decreases cell motility and migration ability in human bladder cancer cells by downregulating RhoC and FZD4. *Molecular cancer therapeutics.* 2012;11(1):244-53.
153. Lu K, Feng F, Yang Y, Liu K, Duan J, Liu H, et al. High-throughput screening identified miR-7-2-3p and miR-29c-3p as metastasis suppressors in gallbladder carcinoma. *Journal of Gastroenterology.* 2020;55(1):51-66.

154. Zhong Z, Huang M, Lv M, He Y, Duan C, Zhang L, et al. Circular RNA MYLK as a competing endogenous RNA promotes bladder cancer progression through modulating VEGFA/VEGFR2 signaling pathway. *Cancer letters*. 2017;403:305-17.
155. Connolly D, Olander J, Heuvelman D, Nelson R, Monsell R, Siegel N, et al. Human vascular permeability factor: isolation from U937 cells. *Journal of Biological Chemistry*. 1989;264(33):20017-24.
156. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature reviews cancer*. 2003;3(6):401-10.
157. Carmeliet P. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology*. 2005;69(Suppl. 3):4-10.
158. Zeng F-C, Zeng M-Q, Huang L, Li Y-L, Gao B-M, Chen J-J, et al. Downregulation of VEGFA inhibits proliferation, promotes apoptosis, and suppresses migration and invasion of renal clear cell carcinoma. *OncoTargets and therapy*. 2016;9:2131.
159. Liu L, Bi N, Wu L, Ding X, Men Y, Zhou W, et al. MicroRNA-29c functions as a tumor suppressor by targeting VEGFA in lung adenocarcinoma. *Molecular cancer*. 2017;16(1):1-12.
160. Imawati Budihardjo, Holt Oliver, Michael Lutter, Xu Luo a, Wang X. Biochemical Pathways of Caspase Activation During Apoptosis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 1999;15(1):269-90.
161. Lin YC, Lin JF, Tsai TF, Chou KY, Chen HE, Hwang TI. Tumor suppressor miRNA-204-5p promotes apoptosis by targeting BCL2 in prostate cancer cells. *Asian J Surg*. 2017;40(5):396-406.
162. Ostensfeld MS, Bramsen JB, Lamy P, Villadsen SB, Fristrup N, Sørensen KD, et al. miR-145 induces caspase-dependent and -independent cell death in urothelial cancer cell lines with targeting of an expression signature present in Ta bladder tumors. *Oncogene*. 2010;29(7):1073-84.
163. Li B, Hong P, Zheng C-C, Dai W, Chen W-Y, Yang Q-S, et al. Identification of miR-29c and its target FBXO31 as a key regulatory mechanism in esophageal cancer chemoresistance: functional validation and clinical significance. *Theranostics*. 2019;9(6):1599.
164. Kroemer G, Martin SJ. Caspase-independent cell death. *Nature medicine*. 2005;11(7):725-30.
165. Lucero HA, Kagan HM. Lysyl oxidase: an oxidative enzyme and effector of cell function. *Cell Mol Life Sci*. 2006;63(19-20):2304-16.
166. Cox TR, Erler JT. Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: implications for fibrotic diseases and cancer. *Dis Model Mech*. 2011;4(2):165-78.
167. Levental KR, Yu H, Kass L, Lakins JN, Egeblad M, Erler JT, et al. Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell*. 2009;139(5):891-906.

168. Peinado H, Del Carmen Iglesias-de la Cruz M, Olmeda D, Csiszar K, Fong KS, Vega S, et al. A molecular role for lysyl oxidase-like 2 enzyme in snail regulation and tumor progression. *EMBO J.* 2005;24(19):3446-58.
169. Peng L, Ran Y-L, Hu H, Yu L, Liu Q, Zhou Z, et al. Secreted LOXL2 is a novel therapeutic target that promotes gastric cancer metastasis via the Src/FAK pathway. *Carcinogenesis.* 2009;30(10):1660-9.
170. Park JS, Lee J-h, Lee YS, Kim JK, Dong SM, Yoon DS. Emerging role of LOXL2 in the promotion of pancreas cancer metastasis. *Oncotarget.* 2016;7(27):42539.
171. Pez F, Dayan F, Durivault J, Kaniewski B, Aimond G, Le Provost GS, et al. The HIF-1-inducible lysyl oxidase activates HIF-1 via the Akt pathway in a positive regulation loop and synergizes with HIF-1 in promoting tumor cell growth. *Cancer Res.* 2011;71(5):1647-57.
172. Wu G, Guo Z, Chang X, Kim MS, Nagpal JK, Liu J, et al. LOXL1 and LOXL4 are epigenetically silenced and can inhibit ras/extracellular signal-regulated kinase signaling pathway in human bladder cancer. *Cancer research.* 2007;67(9):4123-9.
173. Nishikawa R, Chiyomaru T, Enokida H, Inoguchi S, Ishihara T, Matsushita R, et al. Tumour-suppressive microRNA-29s directly regulate LOXL2 expression and inhibit cancer cell migration and invasion in renal cell carcinoma. *FEBS letters.* 2015;589(16):2136-45.

7.2 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	<i>Abbildung</i>	MIBC	<i>muscle invasive bladder carcinoma</i>
AIC	<i>Akaike information criterion</i>	mRNA	<i>messenger RNA</i>
AKT/PKB	<i>Proteinkinase B</i>	NMIBC	<i>non-muscle invasive bladder carcinoma</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>	PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
AUC	<i>area under the curve</i>	PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
BC	<i>bladder carcinoma</i>	PI3K	<i>phosphatidylinositol 3-kinase</i>
BCG	<i>Bacillus-Calmette-Guérin</i>	PUNLMP	<i>papillary urothelial neoplasia with low malignant potential</i>
Caspasen	<i>cysteiny-l-aspartate specific protease</i>	qRT-PCR	<i>quantitative real time PCR</i>
Cdk6	<i>Cyclin-dependent-kinase-6</i>	Rb	<i>Retinoblastom</i>
CI	<i>confidence interval</i>	RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
Cis	<i>Carcinoma in situ</i>	RNA	<i>ribonucleic acid</i>
CLL	<i>Chronisch lymphatische Leukämie</i>	ROC	<i>receiver operating characteristics</i>
DGCR3	<i>DiGeorge syndrome critical region gene 3</i>	RT-PCR	<i>reverse transcriptase PCR</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle's limiting medium</i>	TNF	<i>Tumornekrosefaktor</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>	TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
EDTA	<i>Ethylendiamintetraacetat</i>	TSG	<i>Tumorsuppressorgen</i>
EMT	<i>Epithelial-mesenchymale Transition</i>	TUR-B	<i>Transurethrale Resektion der Blase</i>
EORTC	<i>European Organization for Research and Treatment of Cancer</i>	UHRF1	<i>Ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains 1</i>
FBS	<i>fetal bovine serum</i>	UTR	<i>Untranslatierte Region</i>
HNPCC	<i>hereditary non-polyposis colorectal cancer</i>	VEGFA	<i>vascular endothelial growth factor A</i>
LOX	<i>Lysyloxidase</i>	WHO	<i>world health organization</i>
LOXL2	<i>Lysyl oxidase like 2</i>	ZEB-	<i>Zinc finger E-box-binding homeobox</i>
miR/miRNA	<i>micro-RNA</i>		

7.4 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vergleich der unterschiedlichen Grading-Systeme des nicht-muskelinvasiven Urothelkarzinoms.....	2
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Transwell Migration Assays	20
Abbildung 3: Gegenüberstellung der relativen miR-Expression im Blasenkarzinom und gesundem Referenzmaterial.....	24
Abbildung 4: Vergleich der relativen miR-Expression des NMIBC mit dem MIBC	26
Abbildung 5: Vergleich der miR-Expression im NMIBC mit MIBC in den gepaarten Proben.....	29
Abbildung 6: Vergleich der miR-Expression im NMIBC mit unterschiedlicher Progression.....	30
Abbildung 7: Kaplan-Meier-Analyse zur Veranschaulichung des Progressionsrisiko anhand des Schwellenwertes der miR-29c und miR-145.	32
Abbildung 8: Regressionsmodell zur Abschätzung des Progressionsrisikos anhand des Schwellenwertes der miR-29c und miR-145.	34
Abbildung 9: Darstellung der Kaplan-Meier-Kurve zur Untersuchung der Mortalität.....	35
Abbildung 10: MiR-Expression im NMIBC mit unterschiedlichem klinischen Verlauf.	38
Abbildung 11: Darstellung der Kaplan-Meier-Kurve zur Untersuchung des progressionsfreien Überlebens.....	39
Abbildung 12: Transfektionseffizienz der untersuchten miRs in den Zelllinien.	42
Abbildung 13: Ergebnisse aus dem MTS-Proliferationsessay in Blasenkarzinom-Zellenlinien.	43
Abbildung 14: Ergebnisse des Boyden-chamber-Assays nach Transfektion der Zellen mit miR-29c bzw. pre-miR-Ctrl.....	45
Abbildung 15: Darstellung der relativen Caspase-Aktivität nach Transfektion mit pre-miR-Ctrl, pre-miR-29c und TRAIL.	46
Abbildung 16: Mögliche Bindungsstellen von miR-29c an die Ziel-mRNA der <i>LOXL2</i>	47
Abbildung 17: Darstellung der relativen <i>LOXL2</i> -Expression nach Transfektion mit pre-miR-29c.....	48

7.5 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Übersicht histopathologischer Merkmale des verwendeten Blasenkarzinom-Kollektivs.	22
Tabelle 2:	Vergleich der miR-Expression im gesunden respektive im tumorösen Gewebe.	24
Tabelle 3:	Zusammenfassung der Ergebnisse aus der ROC-Analyse.....	27
Tabelle 4:	Ergebnisse der univariaten Cox-Regressionsanalyse.	33
Tabelle 5:	Übersicht histopathologischer Merkmale des verwendeten Mannheimer Kollektivs.	37
Tabelle 6:	Ergebnisse der univariaten Cox-Regressionsanalyse.	40
Tabelle 7:	Überblick über die Regulation der unterschiedlichen micro-RNA-Expressionen in verschiedenen Tumoren verglichen zum jeweiligen Normalgewebe.	49
Tabelle 8:	Überblick über die Regulation der unterschiedlichen micro-RNA-Expressionen im Urothelkarzinom der Blase verglichen zum gesunden Urothel.	51

Danksagung

Mein Dank gilt allen, die zum Gelingen der Doktorarbeit beigetragen haben.

Zuerst möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Hubert Kübler herzlich für die Überlassung des Themas, die Unterstützung in der Entstehung der Arbeit und die Förderung im klinischen Alltag danken.

Besonderer Dank gilt meinem Betreuer Dr. vet. med. Burkhard Kneitz für die ausgezeichnete Betreuung durch wertvolle Gedankenanstöße, die unermüdliche Unterstützung bei der Interpretation der Ergebnisse und die unendliche Geduld mit mir. Er hat mir dadurch ein ideales Forschungsumfeld ermöglicht und ohne ihn wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Ebenfalls möchte ich besonders Dr. med. Charis Kalogirou für die hervorragende, kompetente und freundschaftliche Unterstützung danken. Durch wichtige Anregungen, die stete Motivation und Unterstützung im Laboralltag wie auch in der Patientenversorgung konnte er mich früh für die Urologie als klinisches Fach begeistern. Weiterhin danke ich Vera Schwartz und Barbara Dexler für die gute Einweisung und die exzellente technische Unterstützung vor allem während der Forschungsarbeiten.

Die Arbeit ist meinen Eltern, Sabine und Thomas Weinke gewidmet, ohne deren uneingeschränkte Unterstützung das Studium und somit Zustandekommen der Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Meinen Eltern sowie meinen Geschwistern Daniel und Ferdinand Weinke gilt ein besonderer Dank, die mir ein wichtiger Rückhalt sind und auf deren Hilfe ich mich in allen Lebenslagen verlassen kann sowie Karlijn de Graaf für ihre Geduld und Unterstützung in der Entstehung der Arbeit.

CURRICULUM VITAE

Der Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version dieser Arbeit nicht veröffentlicht.