

**Vergleich der miRNA-Expressionsmuster in  
Primärtumoren und Fernmetastasen des  
klarzelligen Nierenzellkarzinoms**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Ulrike Wickmann  
geboren am 22.03.1987 in Berlin

Erster Gutachter: .....

Zweiter Gutachter: .....

Dritter Gutachter: .....

Tag der öffentlichen Verteidigung: .....

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
BAP1	<i>BRCA1 associated protein-1 encoded gene</i>
CAIX	<i>carbonic anhydrase IX</i>
chNZK	chromophobes Nierenzellkarzinom
c-Kit	Tyrosinkinase KIT
CpG	Cytosin phosphat Guanin
CT	Computertomographie
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
ECOG PS	<i>Eastern Cooperative Oncology Group performance scale</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
FFPE	Formalin fixiert Paraffin eingebettet
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
HOX-Gen	Homeobox-Gen
HU	Hounsfield Einheiten
IFN- $\alpha$	Interferon-alpha
IGF-1	<i>insulin-like growth factor 1</i>
IMP	<i>insulin-like growth factor mRNA binding protein</i>
KDM	<i>Lysine-specific demethylase encoded gene</i>
kzNZK	klarzelliges einzelliges Nierenzellkarzinom
MAP-Kinase	<i>mitogen-activated protein-Kinase</i>
microRNA	miRNA
miRNP	micro-Ribonukleotide
MMP	Matrix-Metalloprotease
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
NGX6	<i>Nasopharyngeal carcinoma-associated gene 6</i>
nt	Nukleotide
NTC	Non Template Control
NZK	Nierenzellkarzinom

**Fehler! Verwenden Sie die Registerkarte 'Start', um Heading 3;Überschrift dem Text zuzuweisen, der hier angezeigt werden soll.**

---

P-bodies	<i>processing bodies</i>
PBRM1	<i>protein polybromo-1 encoded gene</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
piRNA	<i>piwi-interacting RNA</i>
PIWI	<i>P-element induced wimpy testis</i>
pNZK	<i>papilläres Nierenzellkarzinom</i>
PIGF	<i>placental growth factor</i>
Pol	<i>Polymerase</i>
Pre-miRNA	<i>precursor-mRNA</i>
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
qRT-PCR	<i>quantitative real time Polymerase Chain Reaction</i>
Ran-GTP	<i>Ran-Guanosintriphosphat</i>
rcf	<i>relative centrifugal force</i>
RISC	<i>RNA induced silencing complex</i>
RNA	<i>Ribonukleinsäure</i>
SAA-1	<i>serum amyloid A1</i>
SDF	<i>stromal cell-derived factor</i>
SETD2	<i>SET domain containing 2 encoded gene</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
snoRNA	<i>small nucleolar RNA</i>
snRNA	<i>small nuclear RNA</i>
Tiam-1	<i>T-Lymphoma invasion and metastasis-inducing protein 1</i>
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
TNF	<i>Tumornekrosefaktor</i>
TRBP	<i>TAR RNA binding protein</i>
UCLA	<i>University of California Los Angeles</i>
UICC	<i>Union for International Cancer Control</i>
UISS	<i>UCLA integrated staging system</i>
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule-1</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VHL	<i>von Hippel-Lindau</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

# INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	I
INHALTSVERZEICHNIS .....	III
1. ZUSAMMENFASSUNG .....	1
2. EINLEITUNG .....	4
2.1 Nierenzellkarzinom.....	4
2.1.1 Epidemiologie .....	4
2.1.2 Ätiologie.....	4
2.1.3 Subtypen des NZKs.....	5
2.1.4 Stadieneinteilung und Malignitätsgrad.....	7
2.1.5 Klinik.....	10
2.1.6 Diagnostik.....	10
2.1.7 Prognose .....	11
2.1.8 Therapie .....	16
2.1.9 Genetik des kzNZKs.....	17
2.1.10 Allgemeine Mechanismen der Metastasierung des NZKs.....	18
2.2 miRNA.....	20
2.2.1 Biogenese.....	21
2.2.2 Funktion und Regulation.....	22
2.2.3 Einfluss von miRNAs auf die Tumorgenese .....	25
2.2.4 Ursachen für die veränderte miRNA-Expression .....	26
2.2.5 miRNAs beim NZK.....	27
3. ZIEL DER ARBEIT.....	29
4. METHODIK.....	31
4.1 Material.....	31
4.1.1 Patientenkollektiv.....	31
4.1.2 Geräte.....	34

**Fehler! Verwenden Sie die Registerkarte 'Start', um Heading 3;Überschrift dem Text zuzuweisen, der hier angezeigt werden soll.**

---

4.1.3	Verbrauchsmaterialien/ Chemikalien .....	34
4.1.4	TaqMan-Primer.....	35
4.2	Methoden .....	36
4.2.1	Aufbereitung kryokonservierten Proben.....	37
4.2.2	Aufbereitung der FFPE-Gewebeproben .....	37
4.2.3	Hämatoxylin-Eosin-Färbung .....	37
4.2.4	RNA-Isolierung .....	38
4.2.5	Bestimmung der RNA-Konzentration und Reinheit.....	40
4.3	qRT-PCR.....	41
4.3.1	Reverse Transkription.....	41
4.3.2	Quantitative real time PCR .....	42
4.4	Biostatistische Auswertung.....	48
5.	ERGEBNISSE .....	49
5.1	Ergebnisse aus den Vorarbeiten .....	49
5.2	Bestimmung der Effizienzen der miRNA-Amplifikation .....	50
5.3	Validierung der Microarray-Ergebnisse .....	51
5.3.1	Validierung an kryokonservierten Proben .....	51
5.3.2	Validierung an FFPE-Proben .....	54
5.4	Analyse der miRNA-Expression in verschiedenen Metastasierungsorten ...	57
5.4.1	miR-10b-Expressionsprofil in kryokonservierten Proben .....	57
5.4.2	miR-10b-Expressionsprofil in FFPE-Proben .....	58
5.4.3	miR-615-Expressionsprofil in kryokonservierten Proben .....	59
5.4.4	miR-615-Expressionsprofil in FFPE-Proben .....	59
5.4.5	miR-199b-Expressionsprofil in kryokonservierten Proben .....	60
5.4.6	miR-199b-Expressionsprofil in FFPE-Proben .....	60
5.4.7	miR-33b*-Expressionsprofil in kryokonservierten Proben.....	61
5.4.8	miR-33b*-Expressionsprofil in FFPE-Proben.....	62

**Fehler! Verwenden Sie die Registerkarte 'Start', um Heading 3;Überschrift dem Text zuzuweisen, der hier angezeigt werden soll.**

---

6.	DISKUSSION.....	63
6.1	Diskussion methodischer Aspekte .....	63
6.2	Diskussion der Expressionsanalysen.....	65
7.	SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK.....	75
8.	LITERATUR UND QUELLENVERZEICHNIS .....	77
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	94
	TABELLENVERZEICHNIS .....	97
	EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG .....	99
	DANKSAGUNG .....	100
	LEBENS LAUF .....	101

## **1. ZUSAMMENFASSUNG**

Das NZK ist der dritthäufigste Tumor des Urogenitaltraktes und das kzNZK mit 75% der häufigste Subtyp des NZKs. Patienten mit einem NZK besitzen zu 30% bereits zum Diagnosezeitpunkt Metastasen und 30-50% entwickeln im weiteren Verlauf Metastasen. Die Metastasierung stellt den wichtigsten prognoselimitierenden Faktor dar. Um das individuelle Metastasierungsrisiko bestimmen zu können, sind bisher keine hinreichenden klinischen und histopathologischen Parameter vorhanden.

MiRNAs sind nicht kodierende einzelsträngige RNA-Moleküle mit einer Länge von ca. 22 nt. Den miRNAs wird eine wichtige Rolle bei der Tumorentstehung, dem -progress und für die Metastasierung zugesprochen. Somit sind miRNAs potentielle Biomarker für Diagnostik und Prognosebewertung von Tumoren. Zu Beginn der Promotionsarbeit war für verschiedene Karzinome die metastasierungsassoziierte Funktion von miRNAs bereits belegt. Allerdings lagen für das NZK zur Bedeutung von miRNAs im Prozess der Metastasierung wenige Daten vor. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von verschiedenen miRNAs in metastasierten und nicht metastasierten Primärtumoren different ist. Allerdings wurden die Expressionsprofile von miRNAs nicht in Fernmetastasen untersucht, sodass das Ziel der vorliegenden Arbeit darin bestand, die Hauptmetastasierungsorte hinsichtlich der miRNA-Expression spezifischer miRNAs zu untersuchen und ortsspezifische Gemeinsamkeiten und Unterschiede zu explorieren, um somit ein besseres Verständnis über den Prozess der Metastasierung zu gewinnen.

In Vorarbeiten wurden mit Hilfe von Microarrayanalysen 4 Kandidaten-miRNAs (miR-10b, -33b\*, -615 und -199b) ausgewählt, die zwischen Primärtumoren und Lungenmetastasen die größten Unterschiede aufwiesen. Im Rahmen der Promotionsarbeit erfolgte die Validierung der Microarrayergebnisse an einem größeren Patientenpool von insgesamt 110 Proben. Unter Einbeziehung von kryokonservierten und FFPE-Gewebeproben beinhaltet dieser Patientenpool Normalgewebe, nicht metastasierte Primärtumoren und metastasierte Primärtumoren mit unterschiedlichen Metastasierungsorten und Metastasen. Zunächst wurde an Gewebeschnitten die HE-Färbung durchgeführt, um geeignete Areale mit einem hohen Tumorzellanteil auszuwählen. Anschließend wurde die GesamtRNA der



**Fehler! Verwenden Sie die Registerkarte 'Start', um Heading 1 dem Text zuzuweisen, der hier angezeigt werden soll.**

---

Proben extrahiert und die miRNA-Expression mit qRT-PCR bestimmt. Für die Auswertung der Daten wurden die Statistikprogramme SPSS und REST verwendet.

Bei der Überprüfung der Microarrayergebnisse an kryokonservierten Geweben konnten die Expressionsänderungen in Lungenmetastasen für alle 4 miRNAs bestätigt werden. Bei der Validierung der Ergebnisse in FFPE-Proben konnten die Expressionsunterschiede für miR-10b, -615 und -199b verifiziert werden, wenngleich die *fold changes* im Vergleich zu kryokonservierten Proben etwas geringer waren. Folglich sind archivierte FFPE-Proben auch für große retrospektive Studien geeignet. Anschließend wurde die miRNA-Expression auch in weiteren Metastasenorten untersucht. Zusätzlich zu den Lungenmetastasen wurden hierbei Abdomen-, Knochen- und Hirnmetastasen analysiert. Hierbei zeigte sich, dass miR-10b und -615 in Metastasen unabhängig vom Metastasenort zum normalen Nierengewebe und zu Primärtumoren eine veränderte Expression aufweisen. Dieses lässt die Schlussfolgerung zu, dass miR-10b und -615 grundsätzlich an Metastasierungsprozessen in anderen Organen beteiligt sein könnten. Höchste signifikante Expressionsunterschiede zwischen unterschiedlichen Metastasenorten zeigte miR-199b. In Lungenmetastasen war miR-199b erhöht exprimiert, wohingegen die Expression in anderen Metastasenorten verglichen zu Primärtumoren oder normalen Nierengeweben keine Expressionsdifferenzen aufwies. Es sind verschiedene Mechanismen denkbar, die die Ortsspezifität bestimmen könnten. Einer dieser Mechanismen scheint die Bildung einer prämetastatischen Nische zu sein. Diese könnte einerseits von Tumorzellen des Primärtumors über freie oder in Exosomen verpackte lösliche Faktoren, oder andererseits über das Mikromilieu des Metastasierungsortes beeinflusst werden. Weiterhin könnten zirkulierende Tumorzellen entitätsabhängig mit gewissen Eigenschaften wie einem speziellen miRNA-Muster versehen sein und somit die Ortsspezifität definieren.

Weitere Untersuchungen müssen die Ziel-mRNAs der untersuchten miRNAs in Abhängigkeit vom Metastasierungsort identifizieren und deren Funktion aufklären. Durch ein besseres Verständnis der Funktion der miRNAs könnten potentiell neue Therapiestrategien entwickelt werden. Weiterhin sollte die Frage beantwortet werden, ob die metastasierungsspezifischen miRNA-Signaturen auch in Körperflüssigkeiten frei zirkulierend oder in Exosomen verpackt nachgewiesen werden können. Somit

**Fehler! Verwenden Sie die Registerkarte 'Start', um Heading 1 dem Text zuzuweisen, der hier angezeigt werden soll.**

---

könnten miRNAs als Prognoseparameter und zur Früherkennung des Metastasierungsprozesses genutzt werden.

## **2. EINLEITUNG**

### **2.1 Nierenzellkarzinom**

#### **2.1.1 Epidemiologie**

Nierentumore haben einen Anteil von 2-3% an allen malignen Neubildungen und stehen in der Urologie in der Häufigkeit nach dem Prostata- und dem Harnblasenkarzinom an dritter Stelle (Jemal et al. 2011).

Das Nierenzellkarzinom (NZK) ist mit fast 90% die mit Abstand häufigste solide Raumforderung in der Niere (Ljungberg 2013) und nimmt damit eine zentrale Rolle in der Uroonkologie ein.

Die Inzidenz des NZK beträgt in den Industriestaaten für Frauen 5,8 und für Männer 11,8 pro 100.000 Einwohner. Die Sterblichkeit wird bei Frauen mit 1,7 und bei Männern mit 4,1 pro 100.000 Einwohner angegeben (Jemal et al. 2011), wobei weltweit die Tschechische Republik das Land mit der höchsten Mortalität ist (Levi et al. 2008, 2011). Die Inzidenz und Mortalität ist in Europa zwischen den 1980er und den 1990er Jahren angestiegen. Ab den 1990er konnte die Mortalität stabilisiert und vornehmlich in den westlichen Ländern Europas wie Frankreich, Deutschland, Österreich, Niederlande und Italien verringert werden (Levi et al. 2008). Zwischen den Staaten Europas sind im Hinblick auf die Mortalität Unterschiede zu verzeichnen. Der Altersgipfel beim NZK liegt zwischen dem 60. und dem 70. Lebensjahr. Männer sind mit einer Prädominanz von 1,5:1 häufiger betroffen als Frauen (Ljungberg 2013).

#### **2.1.2 Ätiologie**

Es gibt drei nachgewiesene sozioökonomische Risikofaktoren in den Industrieländern: Hypertonie, Übergewicht und Rauchen (Chow et al. 2010). Übergewichtige Patienten zeigen allerdings bei einer klinischen Manifestation des klarzelligen Nierenzellkarzinoms (kzNZK) eine bessere Prognose (Waalkes et al. 2010). Weiterhin spielen bei 2-3% der Patienten genetische Faktoren eine Rolle (Clague et al. 2009). Beispiele für vererbte Formen des NZKs sind unter anderem das von Hippel-Lindau (VHL)-Syndrom, die Tuberöse Sklerose, die Hereditäre

**Fehler! Verwenden Sie die Registerkarte 'Start', um Heading 1 dem Text zuzuweisen, der hier angezeigt werden soll.**

---

Leiomyomatose und Nierenzellkarzinom-Syndrom und das Birt-Hogg-Dubé Syndrom (Linehan et al. 2009, Lindblad 2004, Poston et al. 1995, Bjornsson et al. 1996, Launonen et al. 2001).

Ferner ist eine interethnische Variabilität zu beobachten. Afroamerikaner haben ein höheres Risiko am kzNZK zu erkranken, Asiaten und Pazifikinsulaner zeigen die geringste Inzidenz im Vergleich zu allen anderen ethnischen Gruppen (Stafford et al. 2008).

### **2.1.3 Subtypen des NZKs**

Das NZK hat seinen Ursprung häufiger im proximalen Tubulussystem, es ist aber ebenso im distalen Tubulussystem und Sammelrohr eine Entartung der Zellen möglich.

Nach der Weltgesundheitsorganisation (WHO) werden die Nierenzelltumoren in folgende Untergruppen eingeteilt, wobei die vier häufigsten mit Prozentangaben belegt (Eble JN 2004b) und in Abbildung 1 histologisch dargestellt sind:

- kzNZK mit 80-90%
- papilläres NZK (pNZK) mit 10%
- chromophobes NZK (chNZK) mit 4-5%
- Onkozytom mit 5%
- familiär renaler Tumor
- Multilokuläres zystisches NZK
- NZK des Duktus Bellini Systems
- Renal medullärer Tumor
- NZK mit einer Xp 11.2 Translokation
- NZK mit einem assoziierten Neuroblastom
- Mucinös tubuläres spindelförmiges NZK
- Papilläres Adenom
- Unklassifizierbares NZK

Nach einer operativen Entfernung des Tumors oder nach einer perkutanen Biopsie kann dieser histopathologisch klassifiziert werden.

Des Weiteren wird das pNZK in Typ 1 und Typ 2 unterschieden (Pignot et al. 2007).

**Fehler! Verwenden Sie die Registerkarte 'Start', um Heading 1 dem Text zuzuweisen, der hier angezeigt werden soll.**

---

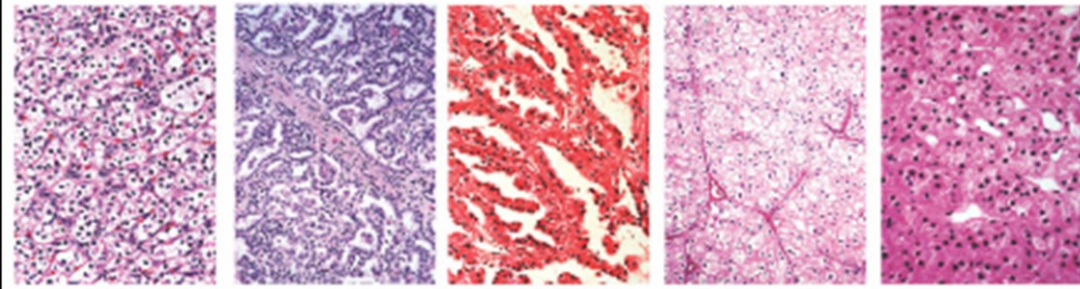


Abbildung 1: HE-Färbung der Subtypen des NZKs (Linehan et al. 2009)

Die Hauptunterscheidungsmerkmale der drei häufigsten malignen histologischen Subtypen sind der Tabelle 1 zu entnehmen (Truong et al. 1999, Oosterwijk et al. 2011)

**Fehler! Verwenden Sie die Registerkarte 'Start', um Heading 1 dem Text zuzuweisen, der hier angezeigt werden soll.**

Tabelle 1: Charakteristika der drei häufigsten NZK-Subtypen

	kzNZK	pNZK	chNZK
zellulärer Ursprung	epithelialen Ursprungs	epithelialen Ursprungs	epithelialen Ursprungs
anatomischer Ursprung	proximales Tubulussystem	proximales Tubulussystem	distales Tubulussystem
<b>Makroskopie</b>			
Auftreten	solitär oder multifokal	häufig bilaterale und multifokale Tumore	solitär
Eigenschaften	-kortikaler Tumor -meist kugelförmig -häufig Zysten, Nekrosen, Hämorrhagien und Kalzifikationen	-eher hypovaskularisiert -häufig Zysten, Nekrosen und Hämorrhagien	-lobulierende Oberfläche -meist ohne Kalzifikationen und Nekrosen
<b>Mikroskopie</b>			
Zytoplasma	-klares oder eosinophiles Zytoplasma (vermehrt in high grade Tumoren und in angrenzenden Bereichen von Nekrosen und Hämorrhagien)	-Hämosideringranula können sich befinden in Makrophagen, Stroma und Tumorzytoplasma	-transparent leicht retikuläres Zytoplasma - gemischt mit kleineren granulierten eosinophilen Zytoplasma
assoziierte molekulargenetische Aberrationen	-VHL – Deletion von 3p (34-56%) -5q Dublikation -Deletion von 6q, 8p, 9p, 14q	- Trisomie oder Tetrasomie 7 -Y Deletion -Trisomie von 3, 12q, 16q, 17q, 20q	-Deletion von 1, 2, 6, 10, 13, 17, 21

### 2.1.4 Stadieneinteilung und Malignitätsgrad

Maligne Tumore werden klassifiziert, damit diese klinisch und wissenschaftlich vergleichbar sind. Das NZK kann histologisch eingeteilt werden, wie im Abschnitt Subtypen erläutert. Weiterhin wird das kzNZK pathologisch-anatomisch und histopathologisch unterteilt.

Die pathologisch-anatomische TNM-Einteilung wurde von dem American Joint Committee on Cancer (AJCC) entwickelt und von der Union for International Cancer Control (UICC) übernommen. In Tabelle 2 steht T für die Tumorgöße und -ausdehnung, N für den Lymphknotenbefall und M für das Vorhandensein von Fernmetastasen.

**Fehler! Verwenden Sie die Registerkarte 'Start', um Heading 1 dem Text zuzuweisen, der hier angezeigt werden soll.**

---

Tabelle 2: UICC 2009, TNM 7<sup>th</sup> Edition

T	Primärtumor
Tx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	kein Anhalt auf Primärtumor
T1	Tumor ist begrenzt auf die Niere und kleiner als 7 cm
	T1a Tumor kleiner als 4 cm
	T1b Tumor zwischen 4 cm und 7 cm
T2	Tumor ist begrenzt auf die Niere und größer als 7 cm
	T2a Tumor ist 7 cm bis 10 cm groß
	T2b Tumor ist größer als 10 cm
T3	Tumor infiltriert das perirenale Fettgewebe oder breitet sich in größere Venen aus ohne die Gerotafaszie zu durchbrechen
	T3a Tumor dehnt sich in die Nierenvene oder deren segmentalen Äste aus bzw. Tumor infiltriert perirenales Fettgewebe
	T3b Tumorausbreitung in die Vena cava kaudal des Zwerchfells
	T3c Tumorausbreitung in Vena cava kranial des Zwerchfells oder Befall der Venenwand
T4	Tumor infiltriert die Gerotafaszie
N	Lymphknotenmetastasen
Nx	regionäre Lymphknoten nicht beurteilbar
N0	keine Lymphknotenmetastasen
N1	Metastasen in einem Lymphknoten
N2	Metastasen in mehr als einem Lymphknoten
M	Fernmetastasen
Mx	Vorhandensein von Fernmetastasen nicht beurteilbar
M0	keine Fernmetastasen vorhanden
M1	Fernmetastasen vorhanden

Die UICC definiert, basierend auf der TNM-Klassifikation, Stadien (Tabelle 3), bei denen alle 3 Komponenten berücksichtigt werden.

**Fehler! Verwenden Sie die Registerkarte 'Start', um Heading 1 dem Text zuzuweisen, der hier angezeigt werden soll.**

Tabelle 3: UICC Stadieneinteilung des NZK der Canadian Cancer Society aktualisiert mit der UICC 7<sup>th</sup> Auflage Dezember 2009

UICC Stadium	TNM			Erläuterung
Stadium I	T1	N0	M0	Der Tumor ist 7cm oder kleiner und ist auf die Niere begrenzt. Der Tumor hat keine Fern- oder Lymphknotenmetastasen.
Stadium II	T2	N0	M0	Der Tumor ist größer als 7 cm und limitiert auf die Niere. Es gibt keine Fern- oder Lymphknotenmetastasen.
Stadium III	T3	N0-N2	M0	Der Tumor hat sich in die großen Venen der Niere ausgebreitet, der Nebenniere oder des perirenal Fettgewebes ohne die Gerotafaszie zu durchbrechen. Der Tumor kann in die Vena cava gewachsen sein. Es kann Lymphknotenmetastasen geben, aber keine Fernmetastasen.
	T1-3	N1	M0	Tumorgröße ist irrelevant. Eine Lymphknotenmetastase nahe der Niere.
Stadium IV	T4	N0-N2	M0	Tumor hat die Gerotafaszie durchbrochen. Es liegen keine Fernmetastasen vor.
	T1-T4	N0-N2	M1	Es liegen Fernmetastasen vor.

Die histopathologische Graduierung nach Fuhrmann spiegelt die morphologischen Veränderungen der Zelle und des Zellkerns wider, somit wird mit dem Differenzierungsgrad angegeben, in welchem Ausmaß sich eine Tumorzelle im Vergleich zur normalen Zelle verändert hat. Die Einteilung erfolgt nach der WHO und der UICC und ist anderen malignen Neoplasien identisch.

- Gx oder G9            Differenzierungsgrad kann nicht bestimmt werden
- G1 – low grade        gut differenziertes malignes Gewebe mit einer hohen Übereinstimmung zum Ursprungsgewebe
- G2                        mäßig differenziertes bösartiges Gewebe
- G3                        schlecht differenziertes bösartiges Gewebe
- G4 – high grade        undifferenziertes/ anaplastisches bösartiges Gewebe

Die TNM-Klassifizierung und Fuhrman Grading sind Grundlagen für die Prognosebewertung und damit für eine Therapieentscheidung.



### **2.1.5 Klinik**

Mehr als 50% der NZK werden heutzutage bei Routinebildgebungsuntersuchungen (Sonographie, Computertomographie (CT) und Magnetresonanztomographie (MRT)) zufällig entdeckt (Jayson und Sanders 1998, Novara et al. 2010).

Die klassische Trias Flankenschmerzen, Makrohämaturie und tastbare abdominale Raumforderung treten initial heute nur noch bei 6-10% der Patienten auf. Diese Fälle korrelieren meist mit einer aggressiven Histologie und weisen ein fortgeschrittenes Stadium auf (Patard et al. 2003). Außerdem können Patienten bei venöser Beteiligung auf Grund von anatomischen Gegebenheiten auch mit einer Varikozele klinisch auffällig werden (Ljungberg 2013).

30% der Patienten stellen sich mit Symptomen in der Klinik vor, die einem paraneoplastischen Syndrom zugeordnet werden können (Ljungberg 2013) und somit unspezifisch für sämtliche Tumorleiden sind. Zu den häufigsten Symptomen gehören Renin induzierte Hypertonie, Kachexie, Gewichtsverlust über einen kurzen Zeitraum, Nachtschweiß, Abgeschlagenheit, Anämie, erhöhte Blutsenkungsgeschwindigkeit und Hyperkalzämie (Ljungberg 2013).

Andere Patienten nehmen primär die Symptome wahr, welche durch mögliche Metastasen verursacht werden wie Knochenschmerzen bei Knochenmetastasen oder persistierenden Husten bei Lungenmetastasen (Kim et al. 2003).

### **2.1.6 Diagnostik**

Die CT ist die am häufigsten genutzte Bildgebung bei Nierenraumforderungen, um die Verdachtsdiagnose NZK zu stellen. Per Subtraktionsaufnahme kann eine renale Raumforderung einem malignen Prozess zugeordnet werden, wenn eine Kontrastmittelanreicherung von mindestens 15 Hounsfield Einheiten (HU) besteht (Israel und Bosniak 2005, Israel und Bosniak 2008).

Folglich kann mit dieser Methode die Verdachtsdiagnose erhärtet, die Morphologie und Funktion der ipsi- und kontralateralen Niere dargestellt (Gong et al. 2012), die Größe des Tumors, als auch eine venöse Infiltration und die Lymphknotenmitbeteiligung beurteilt werden. Allerdings ist anzumerken, dass als Differentialdiagnosen das Onkozytom und das fettfreie Angiomyolipom als benigne

Raumforderung weiterhin in Betracht kommen (Hindman et al. 2012, Pedrosa et al. 2008).

Bei Patienten, die allergisch auf das CT-Kontrastmittel reagieren, ist eine biphasische MR-Angiographie indiziert, wobei die MR-Angiographie jedoch weniger sensitiv für aberrante Gefäße ist (Hora et al. 2013).

Ist die Verdachtsdiagnose NZK bilddiagnostisch gesichert, ist eine Ausbreitungsdiagnostik indiziert. Als Umfelddiagnostik soll leitliniengerecht eine Bildgebung der Lunge mit Hilfe einer Röntgen-Thorax Aufnahme oder einem CT-Thorax angefertigt werden, da Lungenmetastasen die häufigste Metastasenmanifestation darstellen (Lim und Carter 1993). Eine Skelettszintigraphie oder Kranium-Bildgebung ist keine Routineuntersuchung bei asymptomatischen Patienten und wird folglich erst bei klinischem Verdacht angeordnet (Marshall et al. 1990, Koga et al. 2001).

### **2.1.7 Prognose**

Vorreiter für die Prognoseeinschätzung war 1988 Elson et al., der eine Übersicht forderte, die die tumorspezifische Mortalität aufzeigt, um diese als klinischen Leitfaden zu etablieren (Elson et al. 1988).

Heute stellt die TNM-Klassifikation die Basis der klinischen Prognoseabschätzung dar (Sobin LH 2002). Für die 5-Jahres-Überlebensrate ist vor allem die Metastasierung ein deutlich limitierender Faktor. Bei fast 30% der Patienten werden bei Diagnosestellung Metastasen nachgewiesen (synchrone Metastasierung) (Corgna et al. 2007, Cohen und McGovern 2005). Zusätzlich entwickeln Patienten mit initial lokalisierten Tumoren in 30-50% der Fälle zu einem späteren Zeitpunkt Fernmetastasen (metachrone Metastasierung) (Cohen und McGovern 2005, Jones et al. 2005). Synchrone Metastasierung oder eine Metastasierung innerhalb des ersten Jahres nach Diagnosestellung bedeutet mit einem mittleren Überleben von 26 Monaten eine schlechtere Prognose als bei einer metachronen Metastasierung mit einer mittleren Überlebenszeit von 45 Monaten (Thyavihally et al. 2005, Volkmer und Gschwend 2002).

Unbehandelt überleben unter 10% der Patienten mit Metastasierung die ersten 5 Jahre (Motzer et al. 1999).

**Fehler! Verwenden Sie die Registerkarte 'Start', um Heading 1 dem Text zuzuweisen, der hier angezeigt werden soll.**

Obwohl das kzNZK resistent gegenüber Zytostatikatherapie ist, hat sich dank neuer Systemtherapien die mediane Überlebenszeit von Patienten mit einem fortgeschrittenen kzNZK auf 26 Monate verbessert (Coppin et al. 2011).

Eine gute Übersicht über die 5-Jahres-Überlebensrate in Abhängigkeit von der TNM-Klassifikation und den daraus resultierenden Stadien stellte 2006 die deutsche Krebsgesellschaft vor (Tabelle 4).

Tabelle 4: Prognose unter Berücksichtigung der Stadieneinteilung (Claus Garbe 2006)

Stadium	TNM-Klassifizierung	5-Jahres-Überlebensrate
I	T1 N0 M0	70-90%
II	T2 N0 M0	50-60%
III	T1/2 N1 M0	20-30%
	T3 N0 M0	30-50%
	T3 N1 M0	10-20%
IV	T4 jedes N jedes M jedes T N2 jedes M jedes T jedes N M1	0-10%

Allerdings ist nicht nur die anatomische Ausbreitung für die Prognose entscheidend. Histopathologische Faktoren sind darüber hinaus zu berücksichtigen. Zwei multivariate Analysen konnten zeigen, dass der klarzellige Subtyp ein signifikant schlechteres tumorspezifisches Überleben aufweist verglichen mit den anderen Subtypen des NZKs. Auch die histopathologische Graduierung nach Fuhrman beeinflusst die 5-Jahres-Überlebensrate von Patienten (Tabelle 5).

Tabelle 5: 5-Jahres-Überlebensrate in Abhängigkeit vom Grading nach Fuhrman (Tsui et al. 2000)

Fuhrman Grading	5-Jahres-Überlebensrate
G1	89%
G2	65%
G3/ G4	46%

Neben den anatomischen und histopathologischen Faktoren, beeinflusst der klinische Patientenstatus das Überleben des Patienten. Symptomatische Patienten wie Patienten mit einem paraneoplastischen Syndrom haben eine schlechtere Prognose als symptomlose Patienten. Es wurden mehrere Modelle entwickelt, die die histopathologischen und anatomischen Faktoren berücksichtigen. Eines dieser

**Fehler! Verwenden Sie die Registerkarte 'Start', um Heading 1 dem Text zuzuweisen, der hier angezeigt werden soll.**

prognostischen Modelle (Tabelle 6) ist das UCLA (University of California Los Angeles) integrated staging system (UISS).

Tabelle 6: 5-Jahres-Überlebensrate abhängig vom UISS-Stadium (Zisman et al. 2001)

UISS-Stadium	TNM-Klassifikation	Fuhrman Grading	ECOG PS	5-Jahres-Überlebensrate
I	I	1-2	0	94%
II	I	1-2	≥1	67%
	I	3-4	jedes	
	II	jedes	jedes	
	III	jedes	0	
III	III	1	≥1	39%
	IV	1-2	0	
IV	IV	3-4	0	23%
		1-3	≥1	
IV	IV	4	≥1	0%

Die Eastern Cooperative Oncology Group performance scale (ECOG PS) ist in folgender Tabelle 7 definiert.

Tabelle 7: Definition des ECOG PS (Oken et al. 1982)

ECOG PS	Definition
0	normale, uneingeschränkte Aktivität, wie vor der Erkrankung
1	Einschränkung bei körperlicher Anstrengung, gehfähig, leichte körperliche Arbeit möglich
2	gehfähig, Selbstversorgung möglich, aber nicht arbeitsfähig, kann mehr als 50% der Wachzeit aufstehen
3	nur begrenzte Selbstversorgung möglich; 50% oder mehr der Wachzeit an Bett oder Stuhl gebunden
4	völlig pflegebedürftig, keinerlei Selbstversorgung möglich, völlig an Bett oder Stuhl gebunden
5	Tod

Eine retrospektive Analyse veröffentlichte Motzer et al. schon 1999, in welcher er einen Score mit 5 Risikofaktoren erstellte (Tabelle 8) und somit die Patienten in drei prognostische Risikogruppen (Tabelle 9) einteilte. Das ist in den folgenden Tabelle 8 und 9 veranschaulicht (Motzer et al. 1999).

**Fehler! Verwenden Sie die Registerkarte 'Start', um Heading 1 dem Text zuzuweisen, der hier angezeigt werden soll.**

Tabelle 8: Prognose-Score nach Motzer

Risikofaktoren	1 Punkt ab diesem Grenzwert
Karnowsky Status	<80%
Serum Laktatdehydrogenase	>1,5- fach des Normalwertes
Hämoglobin	unter Normwert
korrigiertes Calcium im Serum	>10 mg/dL
vorangegangene Nephrektomie	Nein

Tabelle 9: mediane Überlebenszeit abhängig von der prognostischen Risikogruppe nach Motzer

Risikogruppe	Anzahl der Risikofaktoren	mediane Überlebenszeit
niedrig	0	20 Monate
intermediäre	1-2	10 Monate
hoch	3-5	4 Monate

Des Weiteren wurde von Motzer et al. 2004 der Score leicht verändert für Patienten mit metastasiertem NZK. Anstatt der vorangegangenen Nephrektomie wurde der Parameter ersetzt durch die Zeit von der Diagnosestellung bis hin zur Therapie mit Interferon-alpha (IFN- $\alpha$ ) (mehr oder weniger 1 Jahr) (Motzer und Mazumdar 2004).

Eine Aussage über das Therapieansprechen ist jedoch nicht möglich.

Weitere für das kzNZK klinische, teils neu entdeckte Prognoseparameter sind im Folgenden dargestellt. Hier ist jedoch zu erwähnen, dass keiner dieser Marker in aktuellen Prognosesystemen aufgenommen wurde und damit in der klinischen Praxis routinemäßig keine Rolle spielt.

- Molekulare Prognoseparameter, die mit einer schlechten Prognose korrelieren
  - Ki-67 Überexpression (Dudderidge et al. 2005, Bui et al. 2004) als Zellproliferationsmarker (Cattoretti et al. 1992)
  - Erhöhter Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) (Patard et al. 2009, Paradis et al. 2000) als Angiogenesefaktor
  - Erhöhtes pS6, phosphatase and tensin homolog (PTEN) Deletion und erhöhtes zytoplasmatisches pAkt, zum mammalian target of rapamycin (mTOR) Signalweg gehörend (Pantuck et al. 2007, Velickovic et al. 2002)

**Fehler! Verwenden Sie die Registerkarte 'Start', um Heading 1 dem Text zuzuweisen, der hier angezeigt werden soll.**

---

- Erhöhte CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4 (CXCR4) Expression als Metastasenmarker (Staller et al. 2003)
- Erhöhte Matrix Metalloprotease (MMP) (Kallakury et al. 2001, Kugler et al. 1998) als Angiogenese- und Tumorstadiumsfaktor
- Caveolin 1, Lysyl Oxidase, Annexin A4 (Kosari et al. 2005, Oosterwijk et al. 2011)
- Survivin Überexpression als Apoptoseinhibitor (Zamparese et al. 2008, Parker et al. 2006)
- Hohes serum amyloid A1 (SAA-1) (Vermaat et al. 2010, Kimura et al. 2001)
- Xp 11.2 Translokation (Klatte et al. 2012)
- Erhöhtes insulin-like growth factor *messenger* Ribonucleic acid (mRNA) binding protein 3 (IMP3) (Jiang et al. 2006)
- Vimentin Überexpression (Moch et al. 1999), Fascin Überexpression (Zigeuner et al. 2006)
  
- Molekulare Prognoseparameter, die mit einer guten Prognose korrelieren
  - Hohe carbonic anhydrase IX (CAIX) im Serum (Bui et al. 2004, Klatte et al. 2007) als Hypoxiemarker
  - Hohes p53 (Zigeuner et al. 2004) als Tumorsuppressormarker
  - Hohe vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) Expression als Zelladhäsionsmolekül (Vasselli et al. 2003, Shioi et al. 2006)
  - Erhöhter insulin-like growth factor 1 (IGF-1) im Serum mit mitogenen antiapoptotischen Eigenschaften (Rasmuson et al. 2004)
  
- Differenziert diskutierte molekulare Marker
  - Hypoxie-induzierter Faktor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) als Hypoxiemarker (Lidgren et al. 2005, Lidgren et al. 2006, Klatte et al. 2007)
  - VHL Mutation oder Hypermethylierung (Patard et al. 2009, Yao et al. 2002, Schraml et al. 2002)

### **2.1.8 Therapie**

Die operative Tumorentfernung ist sowohl bei nicht metastasierten kzNZK als auch bei metastasierten kzNZK (Flanigan et al. 2004), indiziert. Heutzutage wird diese offen oder laparoskopisch, sowie möglichst nierenerhaltend durchgeführt. Die Nierenfunktion bleibt bei einer partiellen Nephrektomie teilweise noch erhalten, wovon Diabetiker, Hypertoniker und ältere Patienten bevorzugt profitieren (Lee JH 2007). Ein weiterer Aspekt ist, dass die Lebensqualität bei partieller Nephrektomie postoperativ besser ist, da die Angst mit einer Niere zu leben, Patienten einschränkt (Poulakis et al. 2003).

Bei komorbiden, älteren Patienten mit einem pT1a kann eine aktive Beobachtung gerechtfertigt sein, weil unter anderem ein geringes Größenwachstum und eine Metastasierung nur in 1-2% der Fälle nachgewiesen wurde (Jewett et al. 2011).

Jedoch präsentieren sich 25% aller Patienten bei Diagnosestellung in einem fortgeschrittenen Stadium, entweder mit einem lokal invasiven Tumor oder Metastasen (Cohen und McGovern 2005), wobei die häufigsten Metastasen in der Lunge, im Gehirn und in der Leber lokalisiert sind (Motzer et al. 1996). Eine operative Resektion von Metastasen ist in einigen Fällen von Vorteil. Ein signifikanter Überlebensvorteil konnte bei der Resektion von Knochenmetastasen mit intraoperativer Stabilisierung und Viszeralmetastasen nachgewiesen werden (Fuchs et al. 2005, Zerbi et al. 2008, Staehler et al. 2010). Bei Lungenmetastasen verbessert sich die 5-Jahres-Überlebensrate bei einer kompletten Resektion der Lungenmetastasen und auch zusätzliche extrapulmonale Metastasen sind keine Kontraindikation für diesen Eingriff (Fourquier et al. 1997).

Zur Symptomkontrolle von Knochen- und Hirnmetastasen ist eine Strahlentherapie gerechtfertigt. Beim lokalisierten kzNZK ist eine Radiotherapie dagegen kontraindiziert, denn das kzNZK gilt generell als resistent gegenüber Chemotherapie, Hormontherapie und Strahlentherapie (Motzer et al. 2000).

Die Systemtherapie des metastasierten kzNZK erfolgt durch zielgerichtete molekulare Therapien. Das sind zum einen die Tyrosinkinasehemmer und zum anderen die mTOR-Inhibitoren.

Tyrosinkinaseinhibitoren hemmen häufig mehrere Tyrosinkinaserzeptoren wie zum Beispiel Platelet-derived growth factor (PDGFR), VEGFR und Tyrosinkinase KIT (c-Kit) und wirken somit vor allem der Angiogenese des Tumors entgegen. Zu den

**Fehler! Verwenden Sie die Registerkarte 'Start', um Heading 1 dem Text zuzuweisen, der hier angezeigt werden soll.**

zugelassenen Tyrosinkinasehemmer gehören Sorafenib, Sunitinib, Pazopanib und Axitinib. Diese Tyrosinkinasehemmer erhöhen die progressionsfreie Überlebensrate als first- bzw. second line Therapie.

mTOR ist ein Protein, welches nachweislich zu Proliferation, Zellwachstum und Inhibition der Apoptose beiträgt. Zu den zugelassenen mTOR-Inhibitoren gehören Temsirolimus und Everolimus.

In Tabelle 10 werden die derzeit in Deutschland empfohlenen Therapiealgorithmen beim metastasierten kzNZK dargestellt.

Tabelle 10: Empfohlener Therapiealgorithmus Januar 2014 (Miller et al. 2014)

Therapielinie	Progressionsgruppe/ Vortherapie	Therapie 1. Wahl	Therapie 2. Wahl
1. Linie	niedriges Risiko mittleres Risiko	Sunitinib Pazopanib Bevacizumab+ IFN- $\alpha$	high dose IL-2 Sorafenib klinische Studie
	hohes Risiko	Temsirolimus	Sunitinib klinische Studie
2. Linie	Zytokinvortherapie	Sorafenib Pazopanib Axitinib	Sunitinib
	Vortherapie mit VEGF-Inhibitoren	Everolimus Axitinib	Sorafenib
	Vortherapie mit mTOR-Inhibitoren	klinische Studie	klinische Studie

### 2.1.9 Genetik des kzNZKs

Die molekulare Pathogenese des kzNZKs ist nur zum Teil verstanden. Allerdings wurden bei 70% der Patienten mit einem kzNZK eine Aberration in Form einer Mutation oder Methylierung im VHL-Gen nachgewiesen (Poston et al. 1995). Das VHL-Protein interagiert mit den Hypoxie-induzierten Faktoren (HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , HIF-3 $\alpha$ ). In einer normal regulierten Zelle akkumuliert HIF-1 $\alpha$  unter hypoxischen Zellkonditionen. Bei einem mutierten pVHL oder Fehlen dieses Proteins akkumuliert dieses HIF-1 $\alpha$  in gleicher Weise. Als Transkriptionsfaktoren beeinflussen HIF-Proteine unter anderem die Angiogenese (VEGF), den Glukosemetabolismus (GLUT-1, IGF) und die Stimulation der Wachstumsfaktoren (Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR), PDGF). Bei den Wachstumsfaktoren sind EGF und der VEGF



**Fehler! Verwenden Sie die Registerkarte 'Start', um Heading 1 dem Text zuzuweisen, der hier angezeigt werden soll.**

---

hervorzuheben, da diese über eine Aktivierung des mTOR-Signalweges Zellwachstum, Zellproliferation und Angiogenese induzieren. Im kzNZK konnte eine direkte Verbindung zwischen VEGF und der Tumorgröße (Paradis et al. 2000), Tumorstage (Rioux-Leclercq et al. 2007), Mikrogefäßinvasion (Yildiz et al. 2004), Progressionsrate (Rioux-Leclercq et al. 2007) und dem spezifischen Überleben (Paradis et al. 2000) gezeigt werden. Intrazellulär kann HIF-1 $\alpha$  das Tumorsuppressorgen p53 stabilisieren, jedoch nur, wenn dieses nicht mutiert ist (An et al. 1998).

Zusätzlich konnten Gene identifiziert werden, die über Histone in die Chromatinmodifikation involviert sind und diese können dann über eine Ubiquitin vermittelte Proteolyse im Tumor zu einer Erhöhung des HIF-1 $\alpha$  und -2 $\alpha$  führen (Guo et al. 2012). Zu den Genen, die im kzNZK vermehrt mutiert sind, zählen protein polybromo-1 encoded gene (PBRM1) (Varela et al. 2011), SET domain containing 2 encoded gene (SETD2) (Dalgliesh et al. 2010), Lysine-specific demethylase 5C encoded gene (KDM5C) (Dalgliesh et al. 2010), KDM6A (Dalgliesh et al. 2010) und BRCA1 associated protein-1 encoded gene (BAP1) (Pena-Llopis et al. 2012).

Über einen bisher unbekanntem Wirkmechanismus interagiert CXCR4 mit HIF und pVHL (Eichelberg et al. 2009). Dieser Chemokinrezeptor befindet sich vermehrt auf Tumorzellen, und die Expressionshöhe des Rezeptors war bei metastasierten Patienten deutlich höher als bei lokal begrenzten kzNZK (Chawla R 2008). Der CXCR4 ist häufig parallel exprimiert mit den MMP 2 und 9. Sie vermitteln die Destruktion der Basalmembran und haben somit Einfluss auf den Metastasierungsprozess. Aus der gleichen Familie kommend, konnte eine weitere Korrelation zwischen CXCR3 und dem HIF detektiert werden. CXCR3 ist in Patientenproben mit NZK 1,5fach höher vorhanden als in gesunden Patientenproben. Des Weiteren ist eine Erhöhung in metastasierten- im Vergleich zu nicht metastasierten Proben zu sehen (Utsumi et al. 2014).

### **2.1.10 Allgemeine Mechanismen der Metastasierung des NZKs**

Die Metastasierung beim kzNZK ist der wichtigste Prognosefaktor und teilt die Patienten nach der TNM-Klassifikation direkt in das Stadium IV und somit schlechteste Stadium ein. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass der

**Fehler! Verwenden Sie die Registerkarte 'Start', um Heading 1 dem Text zuzuweisen, der hier angezeigt werden soll.**

---

lebenslimitierende Faktor nicht der Primärtumor, sondern die Metastasen sind (Chambers und Matrisian 1997). Hervorzuheben ist, dass dieser Tumorsubtyp auch nach mehr als 10 Jahren noch Fernmetastasen entwickelt (Eble JN 2004a). Daher nimmt die Metastasentherapie eine zentrale Rolle ein. Metastasierung ist eine essenzielle Eigenschaft von malignen Tumoren.

Metastasen können über verschiedene Mechanismen entstehen und sich ausbreiten.

Die Metastasenausbreitungswege (Kumar 2005) sind:

- Cavitär
- Lymphogen
- Hämatogen
- Implantation-/ Impfmetastasen

Die hämatogene Metastasierung wurde ursprünglich nach Walther (Hans Eugen Walther 1948) eingeteilt und das NZK fällt hier unter den Hohlvenentyp (Siewert 2001). Der Hohlvenentyp besagt, dass über die Vena cava häufig die Lunge von zirkulierenden Tumorzellen betroffen ist und diese Tumorzellen sich anschließend über das arterielle Blutgefäßsystem in den Körper verteilen.

Tumore benötigen eine eigene Blutgefäßversorgung. Eigene Lymphgefäße haben maligne Tumore jedoch nicht, daher verläuft die lymphogene Ausbreitung über periphere Tumorbereiche (Swartz und Skobe 2001). Dieser Mechanismus ist für die Tumorzellen relativ unkompliziert, da Lymphgefäße keine eigentliche Gefäßmembran besitzen. Primär kommen Tumorzellen über regionale Lymphknoten in das efferente Lymphsystem des Körpers und dann über den Venenwinkel auch in das Blutgefäßsystem.

Damit ein Tumor metastasieren kann, müssen die Zellen bestimmte Eigenschaften erfüllen. Der Prozess wird als Metastatische Kaskade bezeichnet (Wullich 2000).

- Wachstum + Ausbreitung
- Invasion in Gefäße
- Verschleppung des Tumormaterials
- Adhäsion an Endothel + Extravasation
- Endothelinvasion + Proliferation + Angiogenese

Seit 1978 ist zusätzlich bekannt, dass jeder Tumor bevorzugt an definierte Orte metastasiert (Fidler 1978). Paget hat dieses als „seed and soil“ Theorie benannt, die bis heute noch Gültigkeit besitzt (Paget 1989). Nach heutiger Ansicht geht man

**Fehler! Verwenden Sie die Registerkarte 'Start', um Heading 1 dem Text zuzuweisen, der hier angezeigt werden soll.**

---

davon aus, dass das Metastasierungspotenzial sowie der –ort genetisch in den Primärtumoren verschlüsselt vorliegt (Dai et al. 2006).

Die häufigsten Metastasenorte des NZKs sind Lunge (50-60%), Knochen (30-40%), Leber (30-40%) und Gehirn (5%) (Motzer et al. 1996).

Von den drei häufigsten histopathologischen Subtypen besitzt das kzNZK das höchste Metastasierungspotential (Beck et al. 2004, Amin et al. 2002). Aber auch unter den kzNZK ist die Metastasierungsrate verschieden. Sowohl die Tumorgröße als auch das Grading spielen eine zentrale Rolle. In folgender Tabelle 11 ist abgebildet, wie häufig Tumore Rezidive mit Metastasen aufweisen (Griffin et al. 2007).

Tabelle 11: Rezidivrate und Zeit in Monaten bis zum Rezidiv in Abhängigkeit von der Tumorausbreitung (Masatoshi et al. 2000, Sandock et al. 1995, Hafez et al. 1997, Levy et al. 1998)

Studie	Jahr	Patienten	Stage	Rezidivrate in %	Zeit bis Rezidiv in Mo
Masatoshi et al.	2000	265	pT1	9	43,6
			pT2	32,4	39,6
			pT3	32,7	25
Sandock et al.	1995	158	pT1	0	-
			pT2	14,6	29,5
			pT3	52,8	22
Hefez et al.	1997	327	pT1	4,4	-
			pT2	5,3	>48
			pT3	11,5	6-24
Levy et al.	1998	286	pT1	7	38
			pT2	26,5	32
			pT3	39,4	17

## 2.2 miRNA

Durch die Entdeckung von microRNAs (miRNAs) wurde das Verständnis der Regulation der Genexpression elementär verändert. Mit einer durchschnittlichen Länge von 22 Nukleotiden (nt) gehören die miRNAs einer Gruppe von kleinen, nicht kodierenden Ribonukleinsäuren (RNA) unter 300 nt Länge an. Dieser Gruppe werden auch die kleinen nukleolären RNAs (snoRNAs), small nuclear RNAs (snRNAs), small interfering RNAs (siRNAs) und piwi-interacting RNAs (piRNAs) zugeordnet (Kutter und Svoboda 2008). Den miRNAs wurde lange Zeit keine

**Fehler! Verwenden Sie die Registerkarte 'Start', um Heading 1 dem Text zuzuweisen, der hier angezeigt werden soll.**

---

Beachtung gewidmet. Heute wird postuliert, dass miRNAs 60% der humanen proteinkodierenden Gene regulieren (Friedman et al. 2009).

Die allererste Veröffentlichung über miRNAs erfolgte 1993. Hier konnte gezeigt werden, dass zwei kleine Transkripte von lin-4 mit 22 nt und 61 nt sequenzweise im *Caenorhabditis elegans* komplementär an einen Abschnitt der lin-14 mRNA binden und es wurde postuliert, dass über diese RNA-Interferenz die Translation von lin-14 mRNA reguliert wird (Lee et al. 1993). Im Jahr 2000 konnte eine zweite miRNA, let-7, in verschiedenen Organismen, unter anderem in *Drosophila*, nachgewiesen werden (Reinhart et al. 2000). Im Laufe der Zeit wurden weitere miRNAs entdeckt, denen wichtige Regulationsfunktionen in zellulären Prozessen zugeordnet werden konnten, wie zum Beispiel in Zellwachstum, –differenzierung (Johnson et al. 2007, Miko et al. 2011), Proliferation, Angiogenese (Kuhnert et al. 2008, Kuehbacher et al. 2008, Dang et al. 2013), embryonale Entwicklung (Kocamis et al. 2013), zelluläre Signalwege (Cui et al. 2006) und in der Apoptose (Li et al. 2013). Bis heute wurden über 1870 humane Sequenzen bei miRBase Version 20 publiziert, welche reife miRNAs kodieren (Stand Juni 2013).

MiRNAs werden spezifisch in Zelltypen oder Phasen der Zellentwicklung exprimiert (Knippers 2006). Sie beeinflussen die posttranskriptionelle Genexpression, entweder über Regulation der mRNA Translation oder der Stabilität im Zytoplasma. Die Dysregulation der posttranskriptionellen Genexpression hat verschiedenste Erkrankungen zur Folge, u.a. auch die Tumorentstehung (Esquela-Kerscher und Slack 2006, Kloosterman und Plasterk 2006, Chang und Mendell 2007).

### **2.2.1 Biogenese**

Die miRNAs sind entweder einzeln oder in Clustern auf Genen kodiert, oder liegen in den Introns proteinkodierender Gene vor (Knippers 2006). Wie in Abbildung 2 dargestellt, werden die Gene über die Polymerase II (Pol II) transkribiert. Dabei wird ein Primärtranskript gebildet, die Pri-miRNA, welche eine Länge von mehreren 1000 nt und eine „Stem-loop“ Struktur aufweist (Lee et al. 2004). Die Pri-miRNA besitzt am 5'-Ende eine 7-Methylguanosin-Kappe und einen Poly-A-Schwanz am 3'Ende (Lee et al. 2004). Im Anschluss wird diese Pri-miRNA von einem Enzymkomplex gespalten, der aus dem RNA-bindenden Protein (DGCR8) und der

**Fehler! Verwenden Sie die Registerkarte 'Start', um Heading 1 dem Text zuzuweisen, der hier angezeigt werden soll.**

RNAse III Domäne Drosha besteht. Es entsteht die precursor-miRNA (Pre-miRNA) mit einer durchschnittlichen Länge von 70 nt, einer Phosphatgruppe am 5'-Ende und einem 2 nt Überhang am 3'-Ende (Lee et al. 2003, Han et al. 2004). Die pre-miRNA wird nun in das Zytoplasma mit dem Ran-Guanosintriphosphat (Ran-GTP) abhängigen Rezeptorprotein Exportin-5 transloziert (Kim 2004, Yi et al. 2003) und hier von der RNAse III (Dicer) und dem Cofaktor TAR RNA *binding protein* (TRBP) prozessiert (Lee et al. 2002, Bernstein et al. 2001). Dicer entfernt die „Stem-loop“ Struktur und es entsteht eine 22-25 nt lange doppelsträngige miRNA, die einen 3'-endständigen Überhang von 2 nt aufweist. Im Anschluss wird die doppelsträngige miRNA durch eine RNA-Helikase entwunden und der nicht verwendete Gegenstrang wird abgebaut. Damit ist die reife miRNA entstanden.

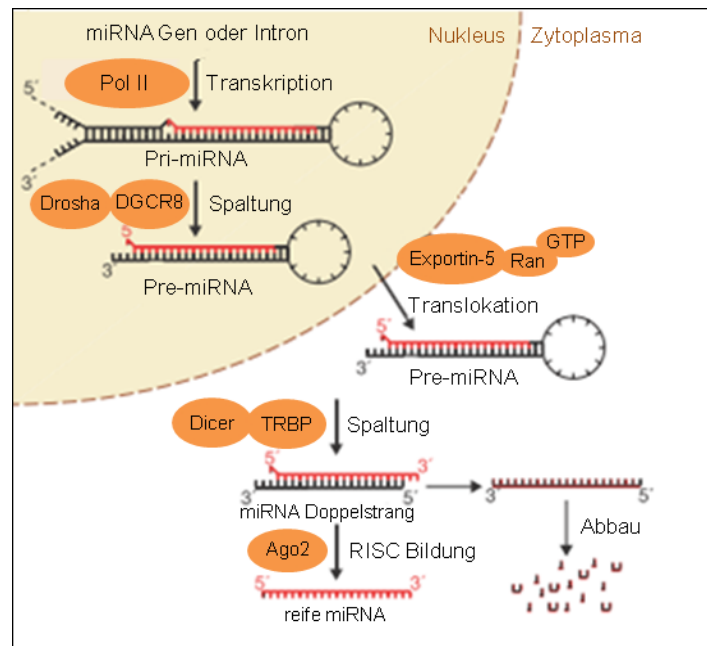


Abbildung 2: MiRNA-Biogenese, modifiziert nach (Winter et al. 2009)

## 2.2.2 Funktion und Regulation

Die reife miRNA lagert sich mit dem *RNA Induced silencing complex* (RISC) zusammen (Hutvagner und Zamore 2002). RISC ist ein Protein-Komplex mit Komponenten der Ago(argonaute)-Proteinfamilie (Knippers 2006, Berg 2013). In Säugetieren kommen 4 verschiedene AGOs (AGO 1-4) vor. An AGO 2 ist bedeutend, dass es durch die *P-element induced wimpy testis* (PIWI)-Domäne eine

**Fehler! Verwenden Sie die Registerkarte 'Start', um Heading 1 dem Text zuzuweisen, der hier angezeigt werden soll.**

RNA-Interferenz (RNAi) auslösen kann (Liu et al. 2004). Die Spezifität des RISC bestimmen die miRNAs (Berg 2013).

MiRNAs binden an die 3'UTR (Doench und Sharp 2004, Lewis et al. 2005) oder die 5'UTR (Lytle et al. 2007) der mRNA (Pillai et al. 2004, Alberts 2012). Bei der miRNA-mRNA-Interaktion, die in Abbildung 3 dargestellt ist, sind folgende Regeln zu beachten (Doench und Sharp 2004, Brennecke et al. 2005, Lewis et al. 2005, Grimson et al. 2007, Nielsen et al. 2007).

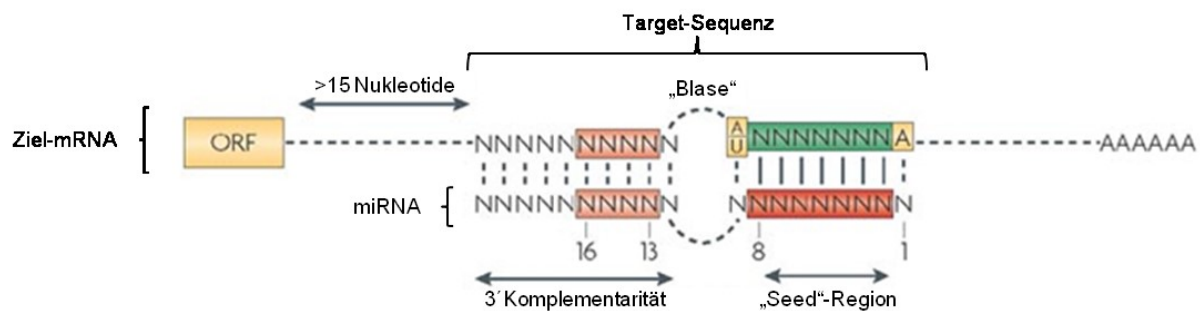


Abbildung 3: MiRNA-mRNA-Interaktion, modifiziert nach (Filipowicz et al. 2008)

Erstens muss eine perfekte Komplementarität der Basenpaarung zwischen der *Seed*-Region (Nukleotide 2-8 am 5'-Terminus) der miRNA und der *Target*-Sequenz am 3'-UTR der mRNA vorherrschen. Folglich verursachen *Guanin-Uracil-Paarungen* (GU-Paarungen), Nukleotidfehlpaarungen oder „Blasen“ (*bulges*) in der Doppelhelix in der *Seed*-Region Störungen bei der miRNA-mRNA Interaktion. Jedoch können durch das Vorhandensein von einem Adenin (A) an Position 1 oder einem A oder U an Position 9 der *Target*-Sequenz die Bindungseffizienz verbessert werden und so Fehlpaarungen zwischen der *Seed*- und der *Target* Region ausgeglichen werden.

Eine weitere Voraussetzung sind Nukleotidfehlpaarungen oder „Blasen“ im zentralen Bereich der miRNA-mRNA Verbindung. Dadurch wird wahrscheinlich verhindert, dass die AGO Proteine binden und somit die endonukleolytische Spaltung der mRNA eingeleitet wird.

Und drittens muss eine ausreichende Komplementarität in dem 3'-Hälfte der miRNA zur mRNA *Target*-Sequenz bestehen, um die miRNA-mRNA Interaktion zu stabilisieren. Hier werden Nukleotidfehlpaarungen und „Blasen“ toleriert. Vor allem wenn in der *Seed*-Region keine ausreichende Paarung vorliegt, wird eine perfekte Basenpaarung der Nukleotide 13-16 in der 3'Hälfte der miRNA wichtig.

**Fehler! Verwenden Sie die Registerkarte 'Start', um Heading 1 dem Text zuzuweisen, der hier angezeigt werden soll.**

Wenn nun die miRNA-mRNA-Interaktion vollzogen ist, kann über folgende Mechanismen, die in Abbildung 4 dargestellt sind, die Translation beeinflusst werden.

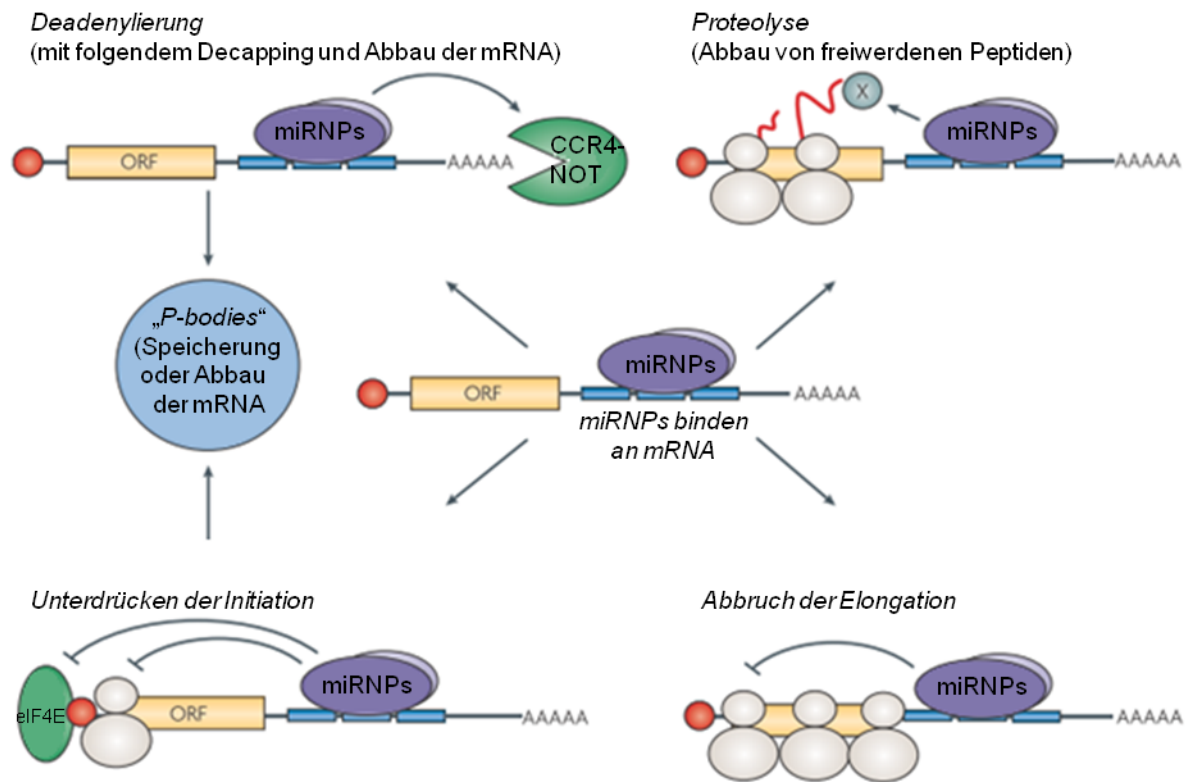


Abbildung 4: Möglichkeiten der Regulation der Translation durch miRNAs, modifiziert nach (Filipowicz et al. 2008)

An die 3'UTR der mRNA binden Micro-Ribonukleotide (miRNPs), was zu einer Deadenylierung (Wu et al. 2006, Giraldez et al. 2006, Eulalio et al. 2007) führt oder alternativ die Initiation der Translation unterdrückt (Pillai et al. 2005, Humphreys et al. 2005, Mathonnet et al. 2007, Wakiyama et al. 2007, Chendrimada et al. 2007). Bei beiden Vorgängen kann im Anschluss über die Bildung von *processing bodies* (P-bodies) die mRNA abgebaut oder gespeichert werden. Ein Abbruch der Elongation führt ebenfalls zu einer Translationsinhibition (Petersen et al. 2006, Maroney et al. 2006). Letztendlich kann miRNA-induziert auch das Produkt der mRNA proteolytisch gespalten werden (Nottrott et al. 2006).

MiRNAs sind hocheffektive Regulatoren. Eine miRNA kann hunderte verschiedene mRNAs mit gleicher Zielsequenz regulieren (Lim et al. 2005). Des Weiteren können mRNAs durch verschiedene miRNAs kombinatorisch blockiert werden, wodurch sich

**Fehler! Verwenden Sie die Registerkarte 'Start', um Heading 1 dem Text zuzuweisen, der hier angezeigt werden soll.**

---

die Wahrscheinlichkeit der Verringerung der Translation erhöht (Brennecke et al. 2005, Grimson et al. 2007, Nielsen et al. 2007).

### **2.2.3 Einfluss von miRNAs auf die Tumorgenese**

2002 wurde bei der chronisch lymphatischen Leukämie vom B-Zell-Typ erstmals beschrieben, dass miR-15 und miR-16 in diesem Tumor herunterreguliert sind (Calin et al. 2002). Weitere Studien konnten bis heute belegen, dass sowohl eine Hoch- als auch Herunterregulation von miRNAs in Tumoren nachweisbar ist (Volinia et al. 2006, Calin et al. 2002, Calin et al. 2004). Diese Erkenntnis wurde unterstützt durch die Beobachtung, dass die Dicer-Expression in Tumoren herunterreguliert sein kann (Karube et al. 2005, Ma et al. 2014). Weiterhin konnten miRNAs detektiert werden, deren Expression in spezifischen Tumoren verändert sind und andere, die gewebeunabhängig in verschiedenen Tumoren eine veränderte Expression aufweisen (z.B. miR-21) (Chan et al. 2005, Iorio et al. 2005, Volinia et al. 2006).

Allgemein können miRNAs in ihrer Funktion gegensätzliche Rollen einnehmen, d.h. sie können als Onkogene, die tumorsuppressive mRNAs herunterregulieren oder als Tumorsuppressoren agieren, die onkogene mRNAs herunterregulieren wie in folgender Abbildung 5 dargestellt ist (Esquela-Kerscher und Slack 2006, Fabbri et al. 2007, Zhang et al. 2007). MiRNAs, die in die entscheidenden Prozesse der Tumorgenese eingreifen (Zellproliferation, Apoptose, Replikationspotential, Angiogenese, Immunantwort, Tumordinvasion, Metastasenbildung und Metabolismus) werden auch als oncomiRs bezeichnet (Esquela-Kerscher und Slack 2006).



**Fehler! Verwenden Sie die Registerkarte 'Start', um Heading 1 dem Text zuzuweisen, der hier angezeigt werden soll.**

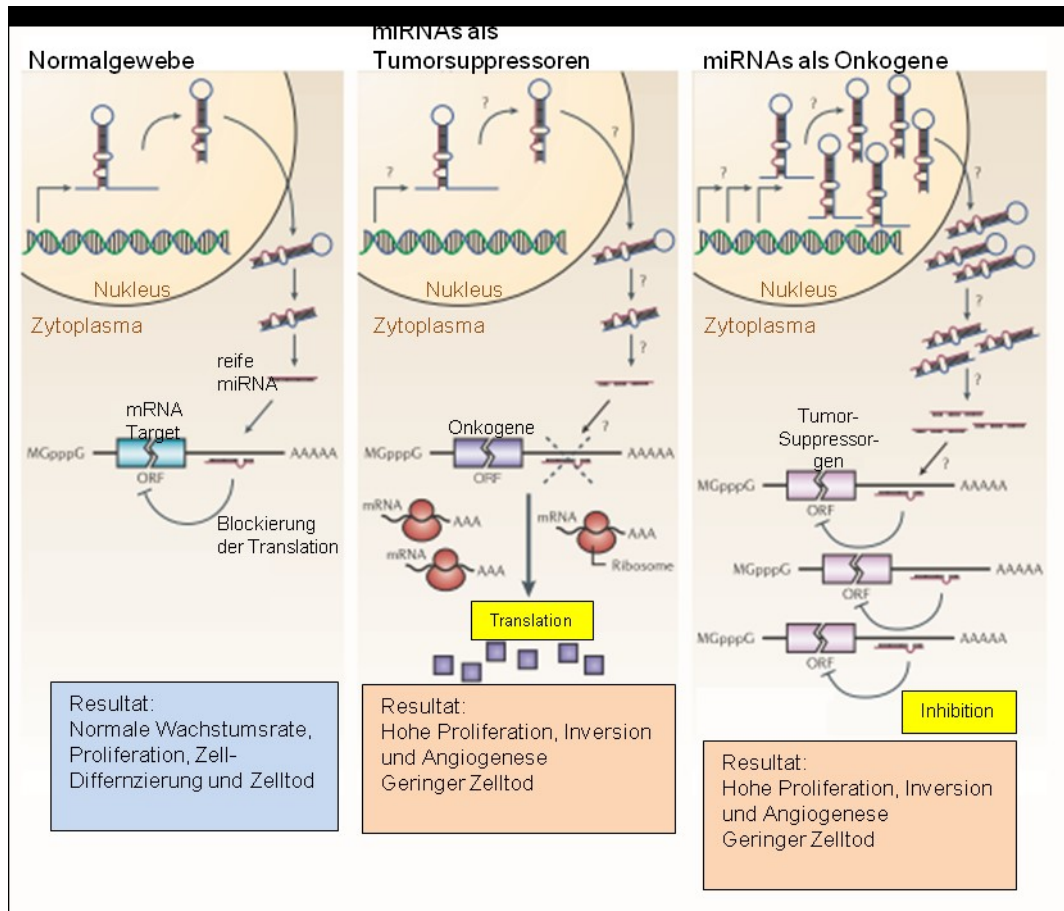


Abbildung 5: Rolle der miRNAs in Normalgewebe, als Tumorsuppressoren und Onkogene, modifiziert nach (Esquela-Kerscher und Slack 2006)

## 2.2.4 Ursachen für die veränderte miRNA-Expression

Vorangegangene Studien zeigen, dass miRNA-Gene häufiger in tumorassoziierten Bereichen im Genom oder in „fragile sites“ lokalisiert sind, in denen vermehrt Deletion, Translokation und Veränderungen der hier lokalisierten Gene vorkommen (Calin et al. 2004), und somit Translationsstörungen zur Folge haben. Des Weiteren können epigenetische Veränderungen wie Histonacetylierung oder auch Methylierungsprozesse die miRNA-Expression entscheidend verändern (Lopez-Lago et al. 2010).

Zusätzlich kann eine fehlerhafte Biogenese von miRNAs die Ursache sein. Gründe für eine Überexpression von miRNAs können die Amplifikation (Sharifi et al. 2014), Deregulation von Transkriptionsfaktoren (Liu et al. 2013a, Gurung et al. 2014) oder auch Demethylierung von Cytosin phosphat Guanin (CpG) -Inseln sein (Lehmann et al. 2008, Weber et al. 2007, Datta et al. 2008, Toyota et al. 2008, Lodygin et al. 2008,

Wiklund et al. 2011). Auf der anderen Seite können miRNAs vermindert exprimiert werden, verursacht durch Deletion (Okada et al. 2014), epigenetisches Abschalten von Genen oder auch durch Deregulation von Transkriptionsfaktoren (Liu et al. 2013a, Truong et al. 2014).

### **2.2.5 miRNAs beim NZK**

MiRNAs sind mehr und mehr in den Fokus der klinisch relevanten Forschung gerückt. Unter anderem können miRNAs aus Geweben sowie Körperflüssigkeiten extrahiert werden und sind somit als potentielle klinische Biomarker für Diagnostik und Prognose attraktiv (Oosterwijk et al. 2011).

In Studien wurden miRNAs identifiziert, die die 4 häufigsten Subtypen (kzNZK, chNZK, pNZK und das benigne Onkozytom) unterscheiden können, wobei die Onkogenese des kzNZK eher der des pNZK ähnelt und das chNZK dem Onkozytom. So erklärt sich, dass das miRNA-Profil und Expressionslevel im kzNZK und pNZK ähnlich sind im Vergleich zum normalen Nierengewebe, sich aber zum chNZK und Onkozytom differenzieren lassen (Faragalla et al. 2012, Petillo et al. 2009). 2011 konnte eine Microarray-, quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) und cross-validierte Studie diverse miRNAs explorieren, die für jeden Subtyp charakteristisch sind (Youssef et al. 2011).

Die miRNA-Expression als Diagnostikmarker für das kzNZK wurde in einigen wenigen Studien erforscht. In diesen wurde Gewebe von kzNZK mit gesundem Nierengewebe verglichen (Jung et al. 2009, Juan et al. 2010), allerdings zeigen sich beim Vergleich der Ergebnisse kaum Übereinstimmungen in den gefundenen miRNAs. Bei miR-210 konnte die Expressionsveränderung im kzNZK sowohl im Tumorgewebe als auch im Serum des Patienten nachgewiesen werden (Zhao et al. 2013, Iwamoto et al. 2014). Andere Beispiele für eine veränderte Expression von zirkulierenden miRNAs im Serum von Patienten mit NZK sind miR-378 und -451 (Redova et al. 2012). Nach neuesten Erkenntnissen wird sogar die Urinstabilität von miRNAs, die in Tumoren des Urogenitaltrakts verändert sind, postuliert. Die Studie zeigt, dass miRNA-15a beim NZK erhöht ist, beim benignen Onkozytom und Inflammationen des Urogenitaltraktes jedoch keine signifikanten Veränderungen vorliegen (von Brandenstein et al. 2012).

**Fehler! Verwenden Sie die Registerkarte 'Start', um Heading 1 dem Text zuzuweisen, der hier angezeigt werden soll.**

---

Die Metastasierung ist verantwortlich für 90% der Tumor assoziierten Mortalität (Chaffer und Weinberg 2011). Beim kzNZK ist die Verbindung von miRNAs mit dem Prozess der Metastasierung allerdings weitestgehend unerforscht.

Die Epithelial-mesenchymale Transition (EMT) ist ein wichtiger Schritt der Metastasierung im NZK und Wang et al. konnten zeigen, dass im Tumorgewebe miR-200c herunterreguliert ist und somit über das E-Cadherin die EMT verstärkt ist (Wang et al. 2013). Auch miR-215, die in metastasierten kzNZK herunterreguliert gefunden wurde, soll mit einer Aktivierung der EMT korrelieren. Somit konnte gezeigt werden, dass miR-215 einen negativen Effekt auf zelluläre Migration, Invasion und Proliferation hat (White et al. 2011). In einer anderen Studie, im Kolonkarzinomgewebe, konnte miR-215 mit einem Zellzyklusarrest über p53 in Verbindung gebracht werden (Braun et al. 2008). Ob die niedrig exprimierte miR-215 im kzNZK auch mit einer Verringerung des p53 induzierten Zellzyklusarrestes korreliert, ist bisher unbekannt.

Metastasierung ist mit einem kürzeren Überleben assoziiert. In einer retrospektiven Studie konnten Heinzelmann et al. für das kzNZK eine indirekte Proportionalität zwischen ausgewählten niedrig exprimierten miRNAs (miR-30c, -451, -26 und 126) und dem progressionsfreien Überleben aufzeigen (Heinzelmann et al. 2011). 2012 konnte eine direkte Proportionalität gezeigt werden zwischen der Expressionshöhe von miR-21 im NZK und der Überlebenszeit sowie dem Tumorstadium (Zaman et al. 2012, Faragalla et al. 2012). Ende 2013 konnte diese Korrelation im NZK zusätzlich für miR-221/-222 nachgewiesen werden (Teixeira et al. 2013).

Somit sind oncomiRs ein entscheidender Faktor in der Tumordinvasion und der Metastasierung und damit prognoselimitierend (Bracken et al. 2009).

### **3. ZIEL DER ARBEIT**

Die Metastasierung stellt den entscheidenden prognostischen Faktor für Patienten mit einem kzNZK dar. Die bei metastasierten Patienten möglichen zielgerichteten Therapien zeigen bei hohem Nebenwirkungsprofil eine niedrige Ansprechrate und eine geringe Lebenszeitverlängerung. Zuverlässige Parameter für die individuelle Vorhersage des Krankheitsverlaufes und Therapieansprechens fehlen derzeit. Daher werden molekulare Marker für eine individuelle Risikostratifizierung und damit Therapieplanung, sowie eine patientenadaptierte Nachsorge benötigt. Das Verständnis der biologischen Prozesse, insbesondere der Metastasierung ist Voraussetzung für die Entwicklung neuer effizienter Therapiestrategien.

~~Das Ziel der Arbeit und die damit folgenden Fragestellungen sind:~~ MiRNAs regulieren entscheidende Prozesse der Entstehung und Progression von Tumoren, so auch der Metastasierung. Für das kzNZK konnten in unserer Arbeitsgruppe durch vorangegangene Microarrayanalysen miRNAs identifiziert werden, die eine differenzielle Expression in Lungenmetastasen im Vergleich zum Primärtumor aufwiesen.

Das Ziel dieser Arbeit ist nun die Validierung ausgewählter Kandidaten-miRNAs (miR-10b, -33b\*, -199b und -615) an einem größeren Probenkollektiv. Darüber hinaus soll untersucht werden, ob die ausgewählten miRNAs Unterschiede in Abhängigkeit vom Metastasierungsort aufweisen. Dafür sollen mit Hilfe von qRT-PCR die miRNA-Expression in Fernmetastasen unterschiedlicher Lokalisation vergleichend zu Primärtumoren analysiert werden, um folgende Fragestellungen zu beantworten.

- 1) Können die miRNA-Expressionsunterschiede zwischen Lungenmetastasen und Tumoren bestätigt werden?
- 2) Sind die miRNAs generell in Metastasen unabhängig vom Metastasierungsort verändert?
- 3) Gibt es Unterschiede in der miRNA-Expression in Abhängigkeit vom Metastasierungsort?
- 4) Können die Ergebnisse von kryokonservierten Geweben auch an einer unabhängigen Kohorte an in der Routinediagnostik eingesetztem

**Fehler! Verwenden Sie die Registerkarte 'Start', um Heading 1 dem Text zuzuweisen, der hier angezeigt werden soll.**

---

Ausgangsmaterial (Formalin fixiert Paraffin eingebettet (FFPE)) reproduziert werden?

## **4. METHODIK**

### **4.1 Material**

#### **4.1.1 Patientenkollektiv**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Tumorproben von Patienten mit der Diagnose eines kzNZKs aus der Datenbank der Klinik für Urologie des Universitätsklinikums Jena ausgesucht. Diese Studie wurde durch das Ethikkomitee geprüft und zugelassen. Zudem liegen Einverständniserklärungen von allen Patienten vor. Für die kryokonservierten Proben wurde beachtet, dass diese direkt nach der Nephrektomie in flüssigem Stickstoff eingefroren und gelagert wurden. Pathologen prüften das gesamte Probenkollektiv auf deren Subtyp und ordneten diese histopathologisch entsprechend der UICC-TNM-Klassifikation (2009) ein. Das untersuchte Tumorkollektiv beinhaltet Proben verschiedener Tumorstadien und Metastasierungsgrade. Klinische und histopathologische Informationen zu den Proben sind in Tabelle 12 und Tabelle 13 zusammengestellt.

**Fehler! Verwenden Sie die Registerkarte 'Start', um Heading 1 dem Text zuzuweisen, der hier angezeigt werden soll.**

Tabelle 12: Klinische und histopathologische Parameter der kryokonservierten Patientenproben

<b>Patientenzahl</b>		<b>77</b>
<b>METASTASIERTE PRIMÄRTUMOREN</b>		<b>23</b>
Alter bei OP (in Jahren)	Altersspanne	46-73
	Durchschnittsalter	59,4
Geschlecht	männlich	17
	weiblich	6
T-Kategorie	1a	1
	1b	5
	2	4
	3a	7
	3b	3
	4	3
Grading	1	3
	2	11
	3	9
Metastasierungszeitraum-Spanne (in Monaten)		0-81
Metastasierungszeitraum-Median (in Monaten)		3
Metastasierung	synchron	12
	metachron	11
<b>NICHT METASTASIERTE PRIMÄRTUMOREN</b>		<b>21</b>
Alter bei OP (in Jahren)	Altersspanne	39-77
	Durchschnittsalter	59,1
Geschlecht	männlich	12
	weiblich	9
T-Kategorie	1a	9
	1b	8
	2	1
	3a	3
	3b	0
	4	0
Grading	1	13
	2	8
	3	0
Nachbeobachtungszeit-Spanne (in Monaten)		48-110
Nachbeobachtungszeit-Median (in Monaten)		78
<b>METASTASEN</b>		<b>18</b>
Metastasenort	Lunge	12
	Abdomen	6
<b>NICHT MALIGNES NIERENGEWEBE</b>		<b>15</b>

**Fehler! Verwenden Sie die Registerkarte 'Start', um Heading 1 dem Text zuzuweisen, der hier angezeigt werden soll.**

Tabelle 13: Klinische und histopathologische Parameter der FFPE-Proben

<b>Patientenzahl</b>		<b>33</b>
<b>METASTASIERTE PRIMÄRTUMOREN</b>		<b>6</b>
Alter bei OP (in Jahren)	Altersspanne	49-75
	Durchschnittsalter	58,3
Geschlecht	männlich	3
	weiblich	3
T-Kategorie	1a	0
	1b	2
	2	3
	3a	1
	3b	0
	4	0
Grading	1	0
	2	5
	3	1
Metastasierungszeitraum-Spanne (in Monaten)		0-13
Metastasierungszeitraum Median (in Monaten)		0
Metastasierung	synchron	4
	metachron	2
<b>NICHT METASTASIERTE PRIMÄRTUMOREN</b>		<b>6</b>
Alter bei OP	Altersspanne	50-67
	Durchschnittsalter	57,7
Geschlecht	männlich	3
	weiblich	3
T-Kategorie	1a	3
	1b	2
	2	1
	3a	0
	3b	0
	4	0
Grading	1	4
	2	2
	3	0
Nachbeobachtungszeit-Spanne (in Monaten)		65-108
Nachbeobachtungszeit-Median (in Monaten)		85
<b>METASTASEN</b>		<b>21</b>
Metastasenort	Lunge	9
	Knochen	6
	Gehirn	6



**Fehler! Verwenden Sie die Registerkarte 'Start', um Heading 1 dem Text zuzuweisen, der hier angezeigt werden soll.**

---

#### **4.1.2 Geräte**

LightCycler®480	(Roche)
Roller for Microseal Film	(MJ Research INC)
PTC-200 Peltier Thermal Cycler Alpha Unit™	(MJ Research)
Block Assembly for PTC DNA Engine™ System	
NanoDrop ND-1000	(prQlab)
Vortex-Genie2	(Scientific Industries)
Mini-Centrifuge	(Sprout)
PCV-3000 Combined Centrifuge/Vortex Mixer	(Grant bio)
Universal 32R Typ 1610	(Hettich Zentrifugen)
Mini Centrifuge Model MCF 2360	(LMS)

#### **4.1.3 Verbrauchsmaterialien/ Chemikalien**

Chloroform	(Ambion)
Deckgläser	(Menzel Gläser)
Desinfektionsmittel Descosept AF	(Dr. Schumacher GmbH)
Entellan	(Merck Millipore)
Ethanol	(Merck Millipore)
Fixierspray für die IHC	(Merck Millipore)
Hämalaunlösung sauer nach Mayer	(Dr. K.Hollborn & Söhne)
HPLC-Wasser (RNase-frei, entionisiert)	(Sigma-Aldrich)
Kammerobjektträger	(BD Biosciences)
miRNeasy FFPE Kit	(Qiagen)
miRVana miRNA Isolationskit	(Ambion)
Nuclease-Free Water	(Promega)
PCR-Platten für LightCycler® 480 I+II	(Kisker biotech GmbH&Co. KG)
GK480K	
RNase Zap R	(Ambion)
RNase Zap®	(Ambion)
RNase-, DNase frei G060/UC-RT	
TaqMan Gene Expression Kit	(Applied Biosystems)

**Fehler! Verwenden Sie die Registerkarte 'Start', um Heading 1 dem Text zuzuweisen, der hier angezeigt werden soll.**

---

TaqMan miRNA Primer	(Applied Bioystems)
TaqMan R MicroRNA Reverse Transcription Kit	(Applied Biosystems)
TaqMan® Gene Expression Master Mix	(Applied Biosystems)
Ultra Clear RT-PCR zertifizierte	(Kisker Biotech GmbH&Co. KG)
Xylol	(Carl Roth)
<u>TaqMan microRNA Reverse Transkription Kit</u>	
dNTP Mix	(Applied Biosystems)
Multi Scribe Reverse Transcriptase	(Applied Biosystems)
10x RT Buffer	(Applied Biosystems)
RNase Inhibitor	(Applied Biosystems)
TaqMan® Micro RNA Assays	(Applied Biosystems)

#### **4.1.4 TaqMan-Primer**

RNU48	(Applied Biosystems)
hsa-miR-10b	(Applied Biosystems)
hsa-miR-33b*	(Applied Biosystems)
mmu-miR-615	(Applied Biosystems)
hsa-miR-199b	(Applied Biosystems)

## 4.2 Methoden

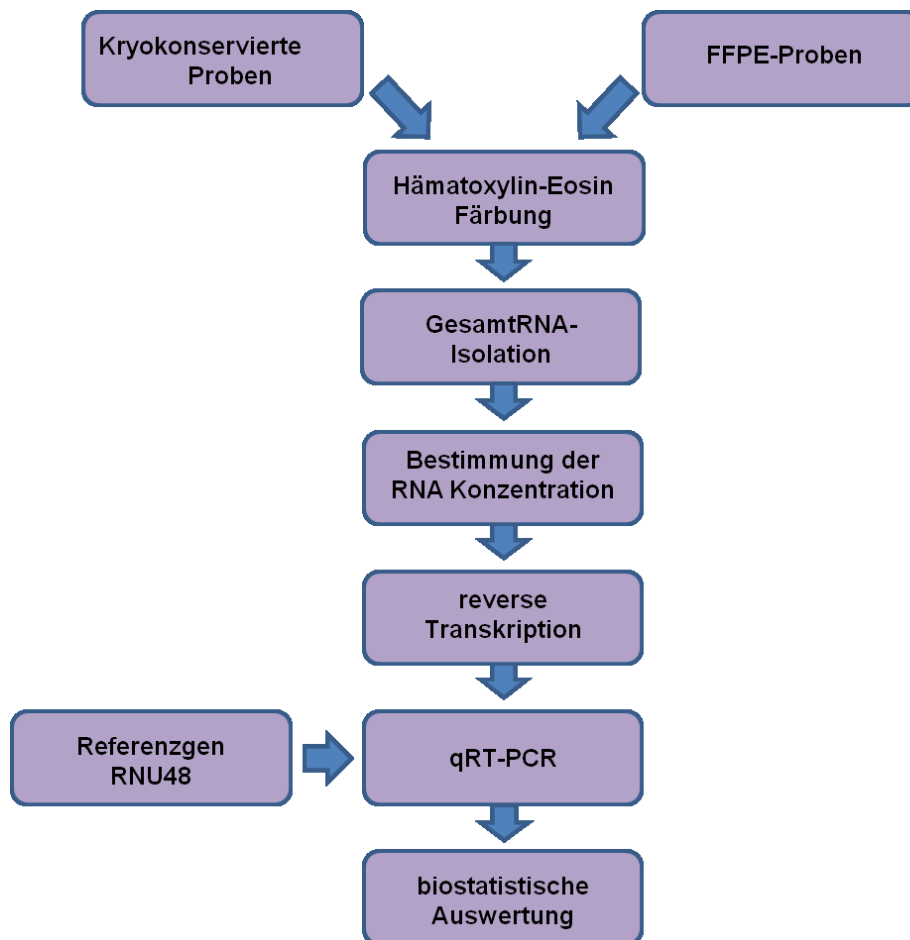


Abbildung 6: Arbeitsablauf

Wie im Arbeitsablauf (Abbildung 6) dargestellt, wurde aus extrahierten und konservierten Proben die GesamtRNA isoliert. Die Expression der miRNAs wurde mit Hilfe der *quantitative real time Polymerase Chain Reaction* (qRT-PCR) validiert und quantifiziert. Im ersten Schritt wurde die zu untersuchende RNA in cDNA umgeschrieben (Reverse Transkription). Diese cDNA wird im Anschluss vervielfacht (Amplifikation) und die cDNA-Menge dabei in Echtzeit detektiert und relativ quantifiziert. Zur Normalisierung der Ergebnisse wurde RNU48 als Referenzgen verwendet. Die Auswahl der verwendeten Primer wurde durch vorangegangene Microarrayanalyse durchgeführt.

#### **4.2.1      Aufbereitung kryokonservierten Proben**

Die kryokonservierten Gewebe wurden auf den Kryostaten, der auf -20°C heruntergekühlt war, aufgebracht. Hier wurden die Schnitte mit einer Dicke von 5 µm angefertigt und anschließend mit einer Pinzette auf einen Objektträger überführt, wo sie bei 4°C für 2 min fixiert wurden. Die Schnitte wurden danach getrocknet und mit entionisiertem Wasser gespült.

Für die Hämatoxylinfärbung nach Mayer wurden die Probenschnitte in der Färbung für 10 min inkubiert. Danach folgten Spülvorgänge, erst mit einer 0,25% Ammoniaklösung und danach mit entionisiertem Wasser. Die Proben wurden nun mit 96% Ethanol und folgend mit Eosin für 5 min inkubiert. Das anschließende Entwässern der Schnitte wurde mit Hilfe von 70% Ethanol, 96% Ethanol und 100% Isopropanol für jeweils 2 min durchgeführt. Im Anschluss erfolgte das Waschen der Schnitte mit Xylol. Letztlich wurden die Schnitte mit dem Eindeckmedium Entellan versetzt und mit einem Deckglas abgeschlossen.

#### **4.2.2      Aufbereitung der FFPE-Gewebeproben**

Die FFPE-Proben wurden mit einem Mikrotom in 4 µm große Schnitte zerteilt und dann mit einer Pinzette auf eine Wasseroberfläche bei Raumtemperatur überführt. Die durch die Oberflächenspannung des Wassers geglätteten Schnitte wurden auf einen Objektträger überführt und für 45 min bei 60°C getrocknet, um anschließend bei 37°C gelagert zu werden. Anschließend wurden die Schnitte für 20 min mit Xylol versetzt, um das Paraffin in den Schnitten zu entfernen. Anschließend wurden die Schnitte für jeweils 2 min in einer Alkoholreihe mit erhöhendem Wassergehalt gewaschen, d.h. erst 100% Isopropanol, 90% Ethanol und in 10% Schritten bis 50% Ethanol. Vor der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) wurden die Schnitte mit entionisiertem Wasser gespült.

#### **4.2.3      Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

**Fehler! Verwenden Sie die Registerkarte 'Start', um Heading 1 dem Text zuzuweisen, der hier angezeigt werden soll.**

---

Die HE-Färbung ist ein Routineverfahren in der Histologie, um die Morphologie von feingeweblichen Schnitten beurteilen zu können. Es handelt sich um eine Kombinationsfärbung aus Hämatoxylin und Eosin. Das Hämatoxylin verhält sich als basische Komponente und färbt blau, was negativ geladen, also basophil ist. Somit stellen sich bevorzugt Zellkerne mit enthaltener DNA und das endoplasmatische Retikulum blau dar. Das Eosin hingegen ist ein saurer Farbstoff und bindet somit alle azidophilen, basischen Strukturen. Eosin färbt das Zytoplasma rot an.

Anschließend wurden die Proben mikroskopisch untersucht und geprüft, dass die Histologie einem kznzk entspricht, die Proben einen Tumoranteil von mindestens 70% aufweisen, nekrosenfrei sind und keine größeren Einblutungen zu erkennen sind. Die Anforderungen an das gesunde Nierengewebe bestehen darin, dass es mindestens 2 cm vom Tumor entfernt entnommen wurde und mikroskopisch tumorfrei ist.

#### **4.2.4 RNA-Isolierung**

Für die Microarrayanalyse und die qRT-PCR wird GesamtRNA benötigt. Diese wurde aus verschiedenen Gewebeproben (kryokonserviert und FFPE) isoliert. Die verwendeten Gewebeproben unterlagen den unter 4.2.3 definierten Extraktionsvoraussetzungen.

Für die Isolierung der zwei Ausgangsmaterialien wurden unterschiedliche Isolierungsverfahren angewendet, die im Folgenden erklärt werden.

##### **4.2.4.1 GesamtRNA aus Gefriermaterial**

Der MiRVana miRNA Isolierungskit wurde nach Herstellerangaben für die Isolierung der GesamtRNA aus den kryokonservierten Proben verwendet. Mit Hilfe des auf -20°C gekühlten Kryostaten wurden ca. 30 mg Gewebe in 10 µm Schnitte zerkleinert und anschließend in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß auf Eis überführt. Dem Reaktionsgefäß wurde ein Lysis/Binding Puffer im Verhältnis 10:1 hinzugefügt. Anschließend wurde das Gewebe-Puffer Gemisch durchmischt und bis zur vollständigen Lysierung des Gewebes auf Eis inkubiert. MiRNA Homogenate Additive wurde im Verhältnis 1:10 beigefügt, durchmischt und für 10 min auf Eis inkubiert.

**Fehler! Verwenden Sie die Registerkarte 'Start', um Heading 1 dem Text zuzuweisen, der hier angezeigt werden soll.**

---

Phenol/Chloroform wurde im gleichen Volumen wie der Lysis/Binding Puffer für die organische Extraktion der GesamtRNA hinzugefügt. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß 30-60 sek geschüttelt und bei 10.000 relative centrifugal force (rcf) für 5 min zentrifugiert. Als Folge sind 3 Phasen zu erkennen. In der obersten Phase ist die gewünschte RNA enthalten. Die mittlere Phase enthält DNA und die unterste Phase Proteine und Gewebereste. Die oberste Phase wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und das Volumen bestimmt. Es folgte die Isolierung der GesamtRNA. Hierfür wurde die 1,25fache Menge an 100%igem Ethanol hinzugefügt und anschließend vermengt. Hiernach wurde von dem Gemisch 700 µl auf einen Glasfaserfilter aufgetragen, der für 15 sek bei 10.000 rcf zentrifugiert wurde. Das Filtrat wurde verworfen. Dieser Vorgang wurde so lange wiederholt, bis das gesamte Lysat-Ethanol-Gemisch auf der Säule aufgetragen war. Der Filter wurde in folgenden Waschschritten aufgereinigt. Hierfür wurden erst 700 µl miRNA Wash Solution 1 hinzugefügt und der Filter anschließend bei 10.000 rcf für 15 sek zentrifugiert. Das Filtrat wurde auch hier verworfen. Danach wurde erst 500 µl miRNA Wash Solution 2 und im Anschluss 3 hinzugefügt und bei 10.000 rcf für 15 sek zentrifugiert. Durch die folgende Zentrifugation bei 10.000 rcf für 1 min wurde die zusätzliche Flüssigkeit vom Filter entfernt. Der Filter wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 100 µl RNase-freiem entionisiertem Wasser von 95°C versetzt um die GesamtRNA von der Säule zu lösen. Im Anschluss wurde der Ansatz bei 10.000 rcf für 45 sek zentrifugiert und der Filter verworfen. Die isolierte GesamtRNA wurde bei -20°C aufbewahrt.

#### **4.2.4.2 GesamtRNA aus FFPE-Gewebeproben**

Zur Isolierung von GesamtRNA aus FFPE-Gewebeblöcken wurde das miR-Neasy FFPE Isolierungskit nach Angaben des Herstellers verwendet. Aus den Gewebeproben wurden hierfür mit einem Mikrotom erst 20 Schnitte mit einer Schnittdicke von 7 µm angefertigt und diese danach in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Für den Schritt der Entparaffinierung wurde 1 ml 100%iges Xylol in das Reaktionsgefäß hinzugefügt, durchmischt und für 2 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Um die Xylolreste zu entfernen, wurde dem Ansatz 1 ml 100%igem Ethanol hinzugefügt, vermengt und bei

**Fehler! Verwenden Sie die Registerkarte 'Start', um Heading 1 dem Text zuzuweisen, der hier angezeigt werden soll.**

---

maximaler Geschwindigkeit für 2 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Der Niederschlag wurde bei offenem Reaktionsgefäß bei 37°C getrocknet, wodurch Ethanolrückstände beseitigt wurden. Um den Niederschlag zu lysieren, Zellbestandteile freizusetzen und Proteine abzubauen, wurde dem Gewebe 480 µl Buffer PKD und 20 µl Proteinase K hinzugefügt und anschließend bei 56°C und 80°C inkubiert. Um die DNA an einen Filter zu binden, wurde dem Ansatz 1 ml Bindungspuffer RBC hinzugefügt und vermengt. Im Kit sind zwei gDNA-Eliminator Filter enthalten. Auf diese beiden Filter wurden jeweils 800 µl des Gemisches aufgetragen und die Filter für 30 sek bei 8.000 rcf zentrifugiert, um die DNA zu binden. Das Filtrat wurde in ein neues 15 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 3,5 ml 100%igem Ethanol versetzt und vorsichtig vermengt. Um anschließend die GesamtRNA zu binden, wurden von dem Probengemisch 700 µl auf den Rneasy MinElute Filter überführt und bei 10.000 rcf für 15 sek zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen. Nun wurde der Schritt so oft wiederholt, bis das restliche Volumen des Gemisches auf den Filter aufgebracht wurde. Der Filter wurde in folgenden Waschschritten gereinigt. Zuerst wurde 500 µl RPE Puffer hinzugefügt und für 15 sek bei 10.000 rcf zentrifugiert. Anschließend wurde dieselbe Menge Puffer dem Filter hinzugefügt und für 2 min bei 10.000 rcf zentrifugiert. Das Filtrat wurde beide Male verworfen. Nun wurde der Filter in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Hierdurch konnte die restliche Flüssigkeit entfernt werden. Der letzte Schritt ist das Lösen der GesamtRNA vom Filter. Hierfür wurde der Filter in eine neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 30-100 µl RNase-freiem entionisiertem Wasser von 80°C gespült, anschließend für 1 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und der Filter verworfen. Die GesamtRNA als Filtrat wurde bei -80°C aufbewahrt.

#### **4.2.5 Bestimmung der RNA-Konzentration und Reinheit**

Die photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration ~~photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration~~ der untersuchten Proben erfolgte mit dem NanoDrop 1000. Dieses Verfahren basiert auf der Tatsache, dass Nukleinsäuren (DNA und RNA) bei einer Wellenlänge von 260 nm ein Absorptionsmaximum aufweisen.

**Fehler! Verwenden Sie die Registerkarte 'Start', um Heading 1 dem Text zuzuweisen, der hier angezeigt werden soll.**

---

Hierfür wurde bei jeder Messung eine Menge von 1,7 µl der zu bestimmenden Probe auf die Messoberfläche aufgetragen und photometrisch analysiert.

Neben der Konzentration kann zusätzlich die mögliche Verunreinigung der Proben mit Proteinen (Absorptionsmaximum von 280 nm) und Lösungsmitteln (Absorptionsmaximum von 230 nm) kontrolliert werden. Dabei ist bei dem Verhältnis 260/280 nm ein Wert zwischen 1,9 bis 2,1 und bei dem Verhältnis 260/230 nm ein Wert zwischen 1,8 bis 2,1 optimal. In nachfolgenden Untersuchungen wurden nur RNA-Proben eingeschlossen, die die festgelegte Untergrenze von 1,5 bei dem Verhältnis 260/280 nm und 1,3 bei dem Verhältnis 260/230 nm nicht unterschritten.

### 4.3 qRT-PCR

Die PCR stellt eine der größten wissenschaftlichen Entdeckungen in den letzten Jahrzehnten dar und revolutionierte die Molekularbiologie. Das Ziel stellt die Amplifizierung von Nukleinsäuren dar.

#### 4.3.1 Reverse Transkription

Um eine qRT-PCR durchführen zu können, muss zunächst die RNA in cDNA durch reverse Transkription umgeschrieben werden. Die reverse Transkription erfolgte mit Hilfe des TaqMan microRNA Reverse Transcription Kit und miRNA TaqMan Primern. Die Umschreibung wird mit dem Enzym Reverse Transkriptase, auch RNA-abhängige Polymerase genannt, katalysiert.

Nach folgendem Pipettierschema wurden alle benötigten Komponenten in ein 200 µl Reaktionsgefäß überführt und direkt durchgemengt.

7 µl Mastermix + 5 µl Probe (30g/µl) + 3 µl RT-Primer

Der RT-Mastermix wurde wie folgt hergestellt (Tabelle 14).



**Fehler! Verwenden Sie die Registerkarte 'Start', um Heading 1 dem Text zuzuweisen, der hier angezeigt werden soll.**

Tabelle 14: Zusammensetzung des RT-Mastermix

Komponente	Mastermix Volumen
100mM dNTP (mit dTTP)	0,15 µl
MultiScribe Reverse Transkriptase (50U/µl)	1,00 µl
10x Reverse Transkriptions Buffer	1,50 µl
RNAse Inhibitor (20 U/µl)	0,19 µl
Nucleasefreies Wasser	4,16 µl
Gesamt	7,00 µl

Nach fünf minütiger Inkubation des Probenansatzes auf Eis erfolgte die Reverse Transkription in einem Thermocycler nach folgendem Verlaufsprotokoll.

Verlaufsprotokoll:	Annealing	30 min	16°C
	Extension	30 min	42°C
	Denaturierung	5 min	85°C

Der Probenansatz wirurde anschließend bei -20°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

### 4.3.2 Quantitative real time PCR

Die cDNA-Produkte stellen die Voraussetzung für eine Amplifikation der zu untersuchenden miRNA dar. Die Quantifizierung wird mit Hilfe der qRT-PCR generiert.

Der Mastermix wurde nach folgendem Pipettierschema (Tabelle 15) hergestellt, durchmischt und zentrifugiert.

Tabelle 15: Mastermixansatz für die qRT-PCR

Komponente	Volumen in 10 µl Reaktion
TaqMan MicroRNA Assay Primer (20x)	0,5 µl
TaqMan Gene Mastermix	5,0 µl
Nuklease freies Wasser	3,5 µl
Gesamt	9 µl

Es wurde 1 µl cDNA jeweils und 9 µl Mastermix in eine 96-Well Platte überführt.

Als Kontrolle wurde für jede miRNA parallel ein Non Template Control (NTC) mitgeführt, bei welcher die 9 µl Mastermix mit 1 µl Wasser versetzt wurde. Die

**Fehler! Verwenden Sie die Registerkarte 'Start', um Heading 1 dem Text zuzuweisen, der hier angezeigt werden soll.**

---

Proben und Kontrollen wurden jeweils in drei technischen Replikaten aufgetragen. Im Anschluss wurde die 96-Well Platte mit einer Folie luftdicht verschlossen, um Verdampfung während der Temperaturveränderungen beim Amplifizierungsvorgang zu vermeiden. Im Folgenden wurden die Proben für eine Minute bei 1000 U/min zentrifugiert und anschließend in die dafür vorgesehene Vorrichtung des LightCycler®480 überführt und das Programm gestartet.

**Fehler! Verwenden Sie die Registerkarte 'Start', um Heading 1 dem Text zuzuweisen, der hier angezeigt werden soll.**

---

PCR-Programm:

AmpliTaq Gold Enzym Aktivierung	10 min	95°C	} 45 Zyklen
Denaturierung	15 s	95°C	
Annealing+Elongation	60 s	60°C	

Damit das Protokoll ohne Unterbrechung ablaufen kann, ist eine thermostabile DNA-Polymerase unabdingbar. Am häufigsten werden taq man DNA-Polymerasen verwendet, da diese eine schnelle Prozessierung bei der Elongation unter 60°C bewerkstelligen und bei 95°C eine hohe Thermostabilität aufweisen.

Die Amplifikation wird mit Hilfe von Sonden quantitativ detektiert. Die Sonden sind mit Quencher und einer Fluoreszenzmarkierung versehen (Abbildung 7). Der Abstand zwischen beiden ist so, dass bei der ungebundenen Sonde nach Einstrahlung von Primärlicht das vom Fluoreszenzfarbstoff emittierte Licht durch den Quencher absorbiert wird und somit kein Signal ausgesendet wird. Sobald die Sonde an die zu analysierenden DNA hybridisiert und der fluoreszierende Teil aus der Sonde durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taqman DNA-Polymerase entfernt wird, ist ein Fluoreszenzsignal detektierbar. Da das gequenchte Fluoreszenznukleotid nur im Hybridkomplex freigesetzt und dadurch fluoreszierend wird, ist die über die Entkopplung mit dem Quencher erzeugte Fluoreszenz ein direktes Maß für die Menge des gebildeten Hybridkomplexes. Da die Fluoreszenzintensität nach jedem Zyklus in Echtzeit detektiert wird, spricht man hier von einer real-time-Messung.

**Fehler! Verwenden Sie die Registerkarte 'Start', um Heading 1 dem Text zuzuweisen, der hier angezeigt werden soll.**

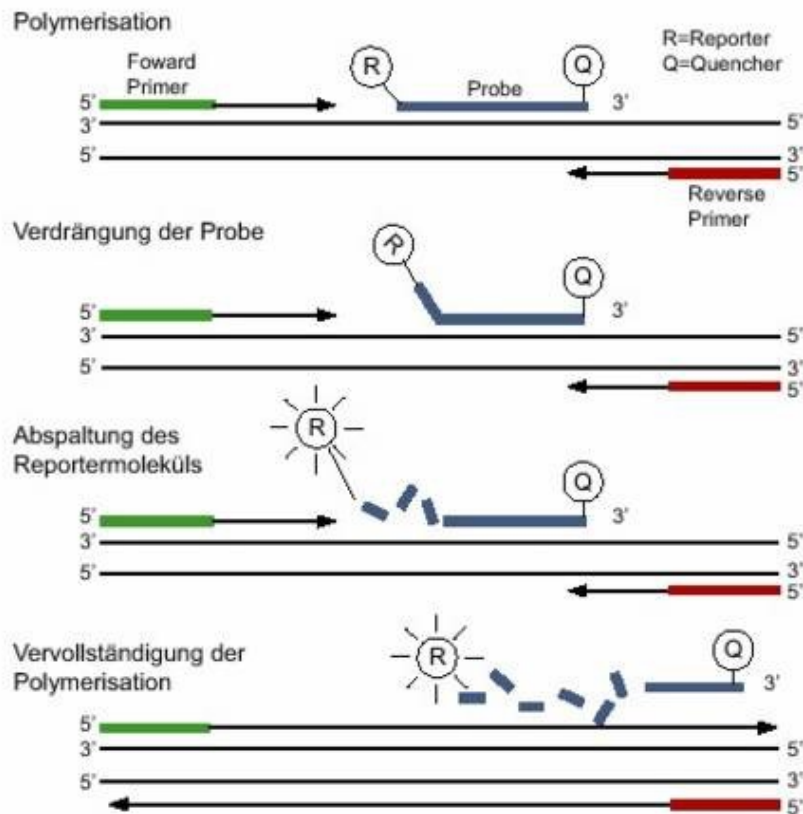


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Prinzips der qRT-PCR (nach Applied Biosystems)

Nun kann die Fluoreszenz gegen die PCR-Zyklen abgebildet werden (Abbildung 8). Der Kurvenverlauf kann in drei Abschnitte eingeteilt werden. Im ersten Abschnitt ist die Templatemenge relativ gering und die Wahrscheinlichkeit, dass sich Template, Primer und Polymerase treffen ist suboptimal. Der zweite Abschnitt definiert sich über deren exponentielle Phase, in der sich die Templatemenge in jedem Zyklus verdoppelt. Das führt zum Verbrauch der Substrate und somit zum dritten Abschnitt, der in einer Plateauphase gipfelt.

Fehler! Verwenden Sie die Registerkarte 'Start', um Heading 1 dem Text zuzuweisen, der hier angezeigt werden soll.

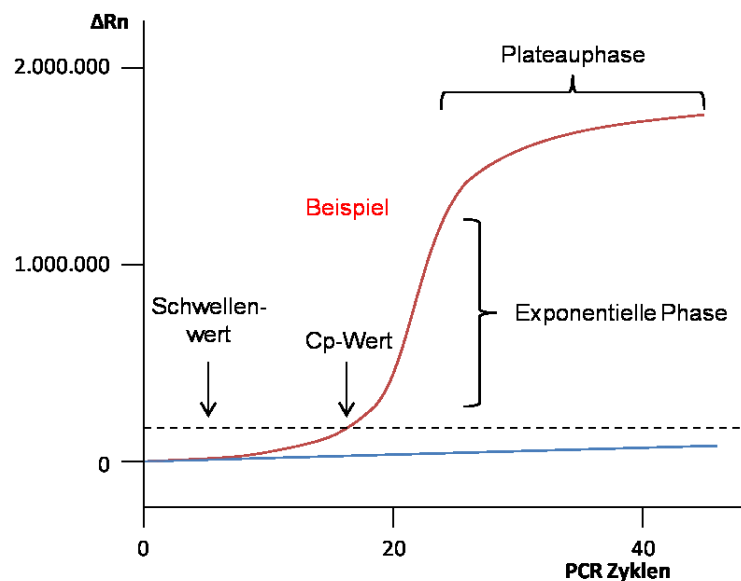


Abbildung 8: Darstellung eines Verlaufs einer Fluoreszenzkurve mittels qRT-PCR (modifiziert nach NCBI)

Das Fluoreszenzsignal ist erst ab einem gewissen Schwellenwert (Threshold) sichtbar und jener ist einem PCR-Zyklus zugeordnet. Dieser PCR-Zyklus, bei dem das Signal erstmals das Hintergrundrauschen übersteigt, wird mit Hilfe des Cp-Wertes (crosspoint) angegeben.

Bei der PCR sollte bei jedem Zyklus die Templatemenge verdoppelt werden und da die Amplifikation exponentiell und nicht linear verläuft, können kleinste Veränderungen der Effizienz der Amplifikationsreaktion die gesamte Produktendmenge verändern. Idealerweise würde Formel (1) die Anzahl der Amplikate widerspiegeln. In Realität ist von Formel (2) auszugehen.

$$(1) N = N_0 \times 2^n$$

$$(2) N = N_0 \times (1 + E)^n$$

$N$  = Anzahl der amplifizierten Moleküle

$N_0$  = Molekülzahl vor der Amplifikation

$n$  = Zyklenzahl

$E$  = Effizienz der Reaktion

Formel (1): Berechnungsformel der idealen Amplikatmenge

Formel (2): Berechnungsformel der realen Amplikatmenge

**Fehler! Verwenden Sie die Registerkarte 'Start', um Heading 1 dem Text zuzuweisen, der hier angezeigt werden soll.**

Die Effizienz kann zwischen 0 – 1 sein. Um die Effizienz zu bestimmen, wird eine Verdünnungsreihe angelegt, wie in der Abbildung 9 dargestellt. Je mehr eine Probe verdünnt wird, umso später ist der Cp-Punkt zu erwarten. Die Probe wurde schrittweise 1:10 verdünnt. Bei optimalen PCR-Bedingungen sollte bei einem Verdünnungsfaktor von 1:10 zwischen den einzelnen Cp-Punkten der Kurven 3,32 Zyklen liegen ( $2^n = \text{Verdünnungsfaktor}$ ).

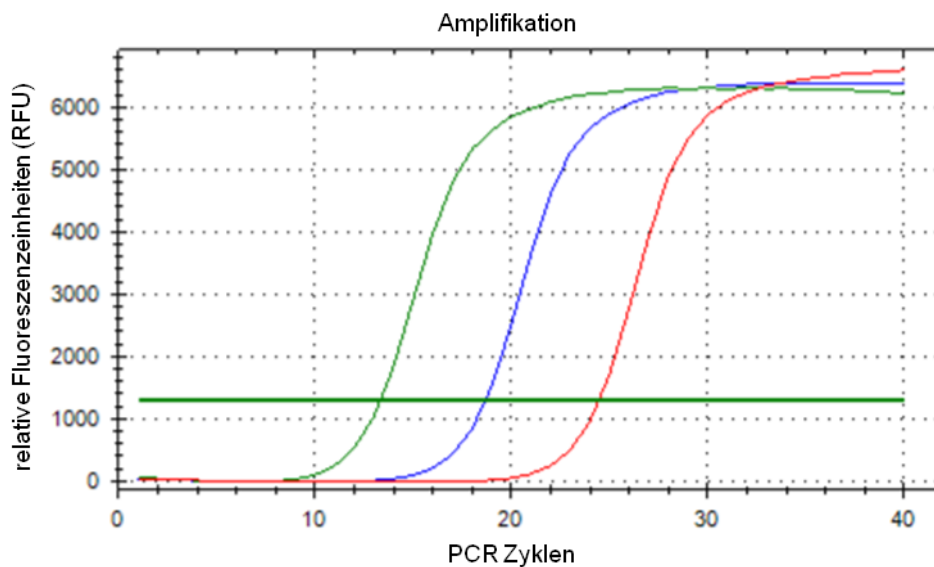


Abbildung 9: Beispiel für eine Verdünnungsreihe

Um eine aussagekräftige Angabe von Veränderungen der Genexpression in den Proben zu erhalten, ist eine relative Quantifizierung mit Hilfe eines endogenen Referenzgens eine etablierte Variante. Die genutzte RNU48 zeigt eine stabile Expression unter den getesteten Bedingungen. Somit wird im selben Probenmaterial sowohl das Referenzgen (RNU48) also auch die zu untersuchende jeweilige miRNA bestimmt und dann wie in Formel (3) gezeigt, ins Verhältnis gesetzt. Das Ergebnis ist eine dimensionslose Zahl, die die relative Genexpression anzeigt.

$$\text{Relative Genexpression} = \frac{\text{Zielgen}}{\text{Referenzgen}}$$

Formel (3): Berechnungsformel der relativen Genexpression

**Fehler! Verwenden Sie die Registerkarte 'Start', um Heading 1 dem Text zuzuweisen, der hier angezeigt werden soll.**

---

Bei der qRT-PCR besteht eine hohe Kontaminationsproblematik mit Proteinen und genomischer DNA. Das resultiert daraus, dass mit sehr kleinen Flüssigkeitsmengen gearbeitet wird. Verstärkt wird das Problem dadurch, dass aus wenigen Molekülen exponentiell viele hergestellt werden. Somit kann es zu falsch positiven Ergebnissen kommen, da jedes Molekül ein optimales Template für einen weiteren Amplifikationsprozess darstellt. Daher wurden die Proben als technisches Triplikat durchgeführt, um einzelne Verunreinigungen bei der Amplifikation zu erkennen und diese Proben auszuschließen. Durch Wiederholungen der Amplifikation oder des kompletten Prozesses der qRT-PCR konnte das Ergebnis korrigiert werden.

#### 4.4 Biostatistische Auswertung

Sowohl die Cp-Werte der qRT-PCR als auch die Effizienzen wurden mit der Auswertungssoftware für den Light Cycler® 480 (Roche) 1.5.0 Version erstellt. Anschließend wurden die Mittelwerte mit Hilfe einer Referenz in Excel (Microsoft Office Excel 2007) nach folgender Formel (4) normalisiert:

$$\text{Normalisierter Cp Wert} = \frac{\text{Effizienz}_{RNU48}^{CpRNU48}}{\text{Effizienz}_{miRNA}^{CpmiRNA}}$$

Formel (4): Berechnung des normalisierten Cp-Wertes

Im Anschluss daran konnten die normalisierten Expressionswerte der einzelnen Gruppen unter Verwendung des Statistikprogramms IBM® SPSS® Statistics 20 graphisch in Form von Boxplots dargestellt werden. Die miRNA-Expressionsdifferenz von zwei Probengruppen wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt und somit 2-seitige asymptotische Signifikanzen berechnet. Definiert wurde ein p-Wert  $\leq 0,05$  als signifikant,  $< 0,01$  als hoch signifikant und  $< 0,001$  als höchst signifikant.

Der *fold change* wurde mit dem Relative Expression Software Tool (REST 2009) von Qiagen erstellt. Damit wurde mathematisch die Differenz von 2 Gruppen bestimmt. Ein Wert  $> 1$  bedeutet eine Überexpression von einer Gruppe zu einer anderen und ein Wert  $< 1$  steht für eine Herunterregulation.

## 5. ERGEBNISSE

### 5.1 Ergebnisse aus den Vorarbeiten

In Vorarbeiten wurden in unserer Arbeitsgruppe Microarray-Analysen an einem kleineren Patientenpool von 22 Primärtumoren (metastasierte und nicht metastasierte) und 8 Lungenmetastasen durchgeführt. Dabei wurden 22 miRNAs aus Gefriermaterial detektiert, die signifikante Expressionsunterschiede in Lungenmetastasen im Vergleich zu metastasierten und zu nicht metastasierten kzNZK aufwiesen. Im Folgenden (Abbildung 10) sind die Microarray-Ergebnisse zusammengefasst.

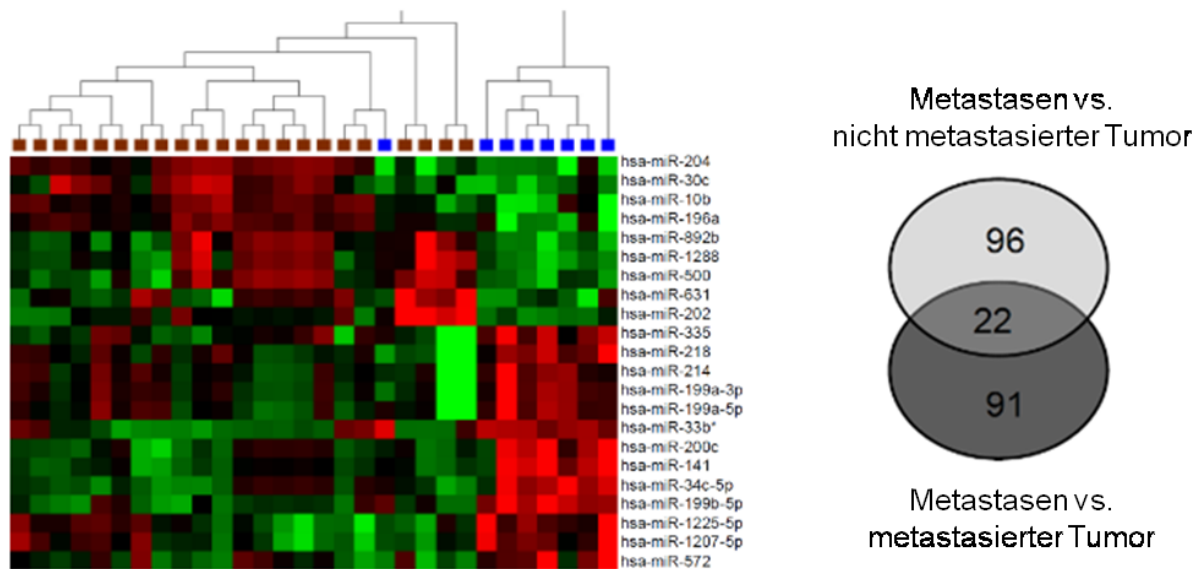


Abbildung 10: Microarray Heatmap der miRNA-Analyse von Primärtumoren (braun) im Vergleich zu Lungenmetastasen (blau). Dargestellt sind statistisch signifikante Unterschiede im miRNA-Expressionsprofil ausgehend von GesamtRNA aus Gefriermaterial

Von den Microarray-Ergebnissen wurden vier miRNAs (miR-10b, -615, -33b\* und -199b) für die weitere Validierung ausgewählt, welche den stärksten Signifikanzwert besitzen und somit die deutlichsten Unterschiede zwischen Primärtumoren und Metastasen aufweisen (Tabelle 16).



**Fehler! Verwenden Sie die Registerkarte 'Start', um Heading 1 dem Text zuzuweisen, der hier angezeigt werden soll.**

Tabelle 16: MiRNAs mit der stärksten Expressionsänderung in Lungenmetastasen verglichen mit Primärtumoren nach Microarray-Analyse

miRNA	p-Wert	Fold Change
in Lungenmetastasen hochreguliert		
miR-199b	5,80E-09	22,49
miR-33b*	7,40E-07	15,55
in Lungenmetastasen herunterreguliert		
miR-10b	4,80E-05	-4,62
miR-615	9,70E-05	-2,56

## 5.2 Bestimmung der Effizienzen der miRNA-Amplifikation

Es wurden zunächst von den vier Kandidaten-miRNAs (miR-10b, -615, -33b\* und -199b) und von der endogenen Kontroll-RNA RNU48, die jeweilige Effizienz der Amplifikationsreaktion bestimmt. Hier dargestellt sind die Amplifikationskurven der einzelnen Verdünnungen von miR-10b (Abbildung 11).

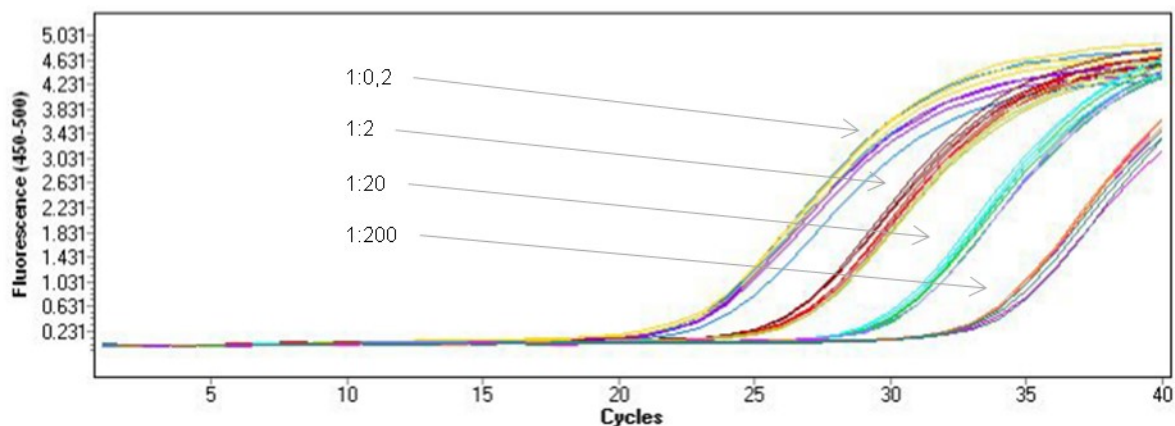


Abbildung 11: Amplifikationskurven der Verdünnungen (1:0,2; 1:2; 1:20 und 1:200) zur Bestimmung der Effizienz am Beispiel von miR-10b

Um jeweils eine korrekte Normalisierung gewährleisten zu können, wurden die Effizienzen für jeden Primer von GesamtRNA in den verschiedenen Ausgangsmaterialien (Gefriermaterial und FFPE-Proben) bestimmt und in folgenden Tabelle 17 und Tabelle 18 dargestellt.

**Fehler! Verwenden Sie die Registerkarte 'Start', um Heading 1 dem Text zuzuweisen, der hier angezeigt werden soll.**

Tabelle 17: Amplifikationseffizienzen der miRNA-Primer von GesamtRNA aus kryokonservierten Geweben

Primer	Effizienz
miR-10b	1,95
miR-33b*	1,97
miR-615	1,77
miR-199b	1,90
RNU48	1,91

Tabelle 18: Amplifikationseffizienzen der miRNA-Primer von GesamtRNA aus FFPE-Proben

Primer	Effizienz
miR-10b	1,97
miR-33b*	1,99
miR-615	1,87
miR-199b	1,89
RNU48	1,99

### **5.3 Validierung der Microarray-Ergebnisse**

#### **5.3.1 Validierung an kryokonservierten Proben**

Die in den vorangegangenen Microarray-Analysen detektierten Expressionsunterschiede zwischen Tumoren (metastasierten und nicht metastasierten) und Lungenmetastasen wurden nun im Rahmen dieser Promotionsarbeit an einem unabhängigen und größeren Probenkollektiv mit Hilfe der qRT-PCR validiert. Hierfür wurden kryokonservierte Gewebe von 44 kzNZK Tumoren (21 nicht metastasierte, 23 metastasierte) und 12 Lungenmetastasen einbezogen.

##### **5.3.1.1 miR-10b-Expression**

Sowohl zwischen den Lungenmetastasen verglichen mit den nicht metastasierten Tumoren (4fach, p-Wert=0,00002), als auch verglichen mit den metastasierten Tumoren (3,11fach, p-Wert=0,001), konnte eine signifikant erniedrigte miRNA-Expression bestätigt werden (Abbildung 12).

**Fehler! Verwenden Sie die Registerkarte 'Start', um Heading 1 dem Text zuzuweisen, der hier angezeigt werden soll.**

---

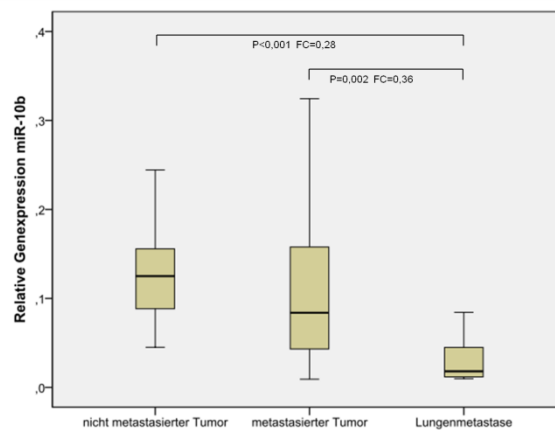


Abbildung 12: Relative Genexpression von miR-10b in Lungenmetastasen im Vergleich zu nicht metastasierenden Tumoren und metastasierenden Tumoren ausgehend von GesamtRNA aus Gefriermaterial

### 5.3.1.2 miR-615-Expression

Die Auswertung von miR-615 zeigte eine signifikant verminderte Expression in den Lungenmetastasen verglichen mit den nicht metastasierenden Tumoren (2,34fach, p-Wert=0,00005). Beim Vergleichen der Lungenmetastasen mit den metastasierenden Tumoren war eine tendenzielle, jedoch keine signifikante Expressionsdifferenz zu erkennen (Abbildung 13).

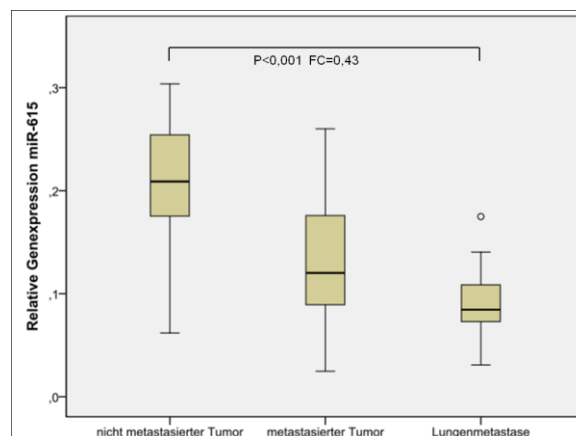


Abbildung 13: Relative Genexpression von miR-615 in Lungenmetastasen im Vergleich zu metastasierenden und nicht metastasierenden Tumoren ausgehend von GesamtRNA aus Gefriermaterial

### 5.3.1.3 miR-33b\*-Expression

Im Gegensatz zu miR-10b und miR-615 konnte eine signifikante Erhöhung von miR-33b\* in den Lungenmetastasen im Vergleich zu nicht metastasierten Tumoren (2,09fach, p-Wert=0,025) gezeigt werden. Auch hier konnten keine signifikante Expressionsdifferenzen von miR-33b\* zwischen den Lungenmetastasen und den metastasierten Tumoren festgestellt werden (Abbildung 14).

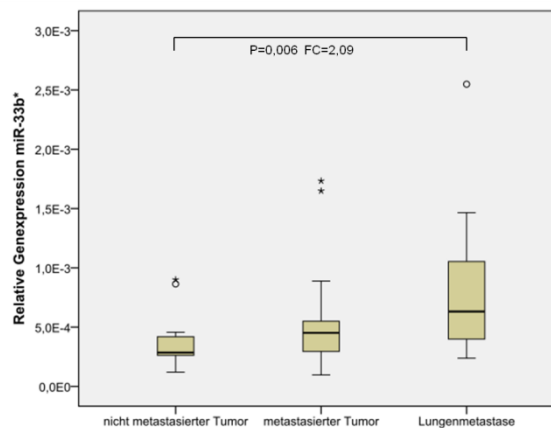


Abbildung 14: Relative Genexpression von miR-33b\* in Lungenmetastasen verglichen mit nicht metastasierten und metastasierten Tumoren ausgehend von GesamtRNA aus Gefriermaterial

### 5.3.1.4 miR-199b-Expression

MiR-199b wies in Lungenmetastasen eine 29,71fach erhöhte Expression in Lungenmetastasen verglichen mit den nicht metastasierten Tumoren auf (p-Wert=0,000003). Zusätzlich wurden signifikante Expressionsunterschiede zwischen den Lungenmetastasen und den metastasierten Tumoren (12,4fach, p-Wert=0,00002) detektiert (Abbildung 15).

**Fehler! Verwenden Sie die Registerkarte 'Start', um Heading 1 dem Text zuzuweisen, der hier angezeigt werden soll.**

---

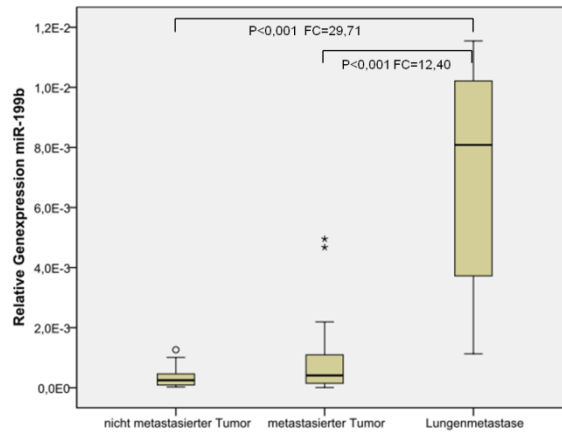


Abbildung 15: Relative Genexpression von Lungenmetastasen verglichen mit nicht metastasierten und metastasierten Tumoren ausgehend von GesamtRNA aus Gefriermaterial

### 5.3.2 Validierung an FFPE-Proben

Nach der Bestätigung der Microarrayergebnisse an kryokonservierten Proben wurde an einem unabhängigen Kollektiv aus FFPE-Gewebeproben die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse untersucht. Die verwendeten Proben setzten sich zusammen aus 12 kzNZK (6 nicht metastasierte Tumoren und 6 metastasierte Tumoren) und 9 Lungenmetastasen.

#### 5.3.2.1 miR-10b-Expression

Abbildung 16 zeigt eine Herunterregulation der Lungenmetastasen verglichen mit den nicht metastasierten Tumoren (2,67fach, p-Wert=0,034). Zusätzlich konnte eine Herunterregulation von miR-10b in Lungenmetastasen im Vergleich zu metastasierten Tumoren nachgewiesen werden (3,18fach, p-Wert=0,025).

**Fehler! Verwenden Sie die Registerkarte 'Start', um Heading 1 dem Text zuzuweisen, der hier angezeigt werden soll.**

---

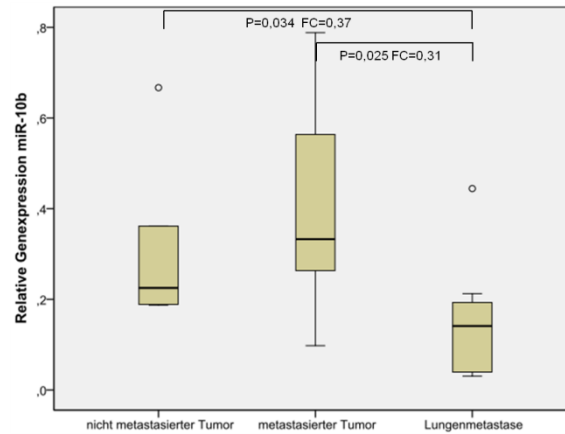


Abbildung 16: Relative Genexpression von miR-10b in Lungenmetastasen verglichen mit nicht metastasierenden und metastasierenden Tumoren ausgehend von GesamtRNA aus FFPE-Gewebe

### 5.3.2.2 miR-615-Expression

Für miR-615 wurde eine signifikant erniedrigte Expression in den Lungenmetastasen sowohl im Vergleich zu nicht metastasierenden Tumoren (4,55fach, p-Wert=0,003) als auch zu metastasierenden Tumoren (3,3fach, p-Wert=0,007) bestätigt (Abbildung 17).

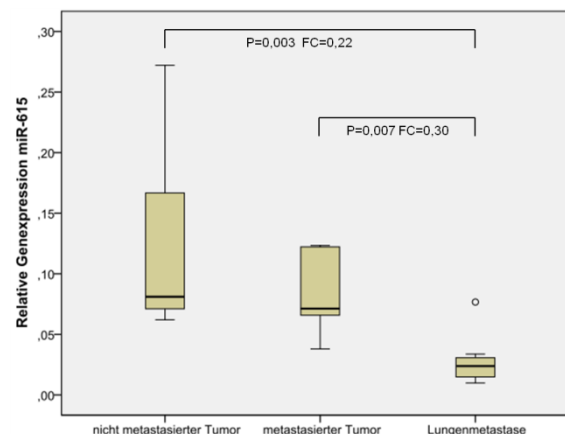


Abbildung 17: Relative Genexpression von miR-615 in Lungenmetastasen im Vergleich zu metastasierenden und nicht metastasierenden Tumoren ausgehend von GesamtRNA aus FFPE-Gewebe

### 5.3.2.3 miR-33b\*-Expression

In den FFPE-Proben zeigte miR-33b\* in den Lungenmetastasen keine signifikante Expressionsänderung verglichen mit den nicht metastasierenden Tumoren noch

**Fehler! Verwenden Sie die Registerkarte 'Start', um Heading 1 dem Text zuzuweisen, der hier angezeigt werden soll.**

---

verglichen mit den metastasierten Tumoren (Abbildung 18). Jedoch war eine tendenzielle Expressionsdifferenz zwischen den Lungenmetastasen im Vergleich zu dem metastasierten Tumor erkennbar.

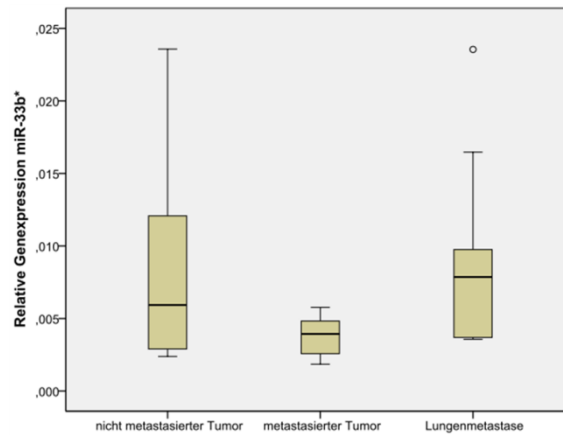


Abbildung 18: Relative Genexpression von Lungenmetastasen im Vergleich mit nicht metastasierten und metastasierten Tumoren ausgehend von GesamtRNA aus FFPE-Gewebe

#### 5.3.2.4 miR-199b-Expression

MiR-199b zeigte in den FFPE-Geweben die deutlichste Hochregulation der Lungenmetastasen gegenüber den nicht metastasierten Tumoren (11,06fach, p-Wert=0,003) und gegenüber den metastasierten Tumoren (12,36fach, p-Wert=0,002) (Abbildung 19).

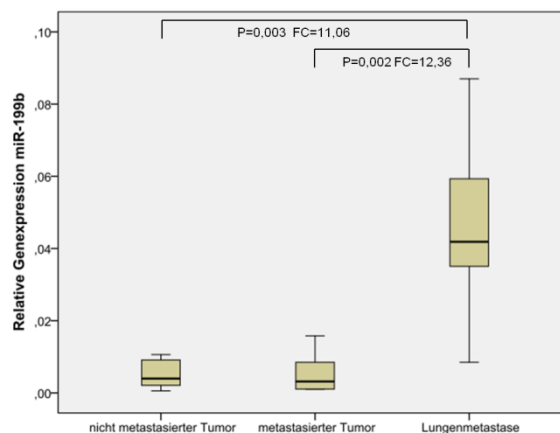


Abbildung 19: Relative Genexpression von miR-199b in Lungenmetastasen verglichen mit nicht metastasierten und metastasierten Tumoren ausgehend von GesamtRNA aus FFPE-Gewebe

## **5.4 Analyse der miRNA-Expression in verschiedenen Metastasierungsorten**

Um zu überprüfen, ob die Expression der Kandidaten-miRNAs auch in anderen Metastasierungsorten verändert ist, wurden zusätzlich zu Proben aus Lungenmetastasen weitere Metastasenlokalisationen mit Primärtumoren verglichen. Für das kryokonservierte Gewebe bestand das untersuchte Probenkollektiv aus 44 kzNZK Tumoren (21 nicht metastasierte, 23 metastasierte), 18 Fernmetastasen (12 Lungenmetastasen, 6 Abdomenmetastasen) und 15 nicht malignen Nierengeweben. Durch die Verwendung von FFPE-Proben bestand die Möglichkeit, die Ergebnisse an einem anderen Ausgangsmaterial mit einer unabhängigen Probenkohorte zu überprüfen und zwei weitere Metastasierungsorte zu betrachten. Der Probenpool bestand aus 12 kzNZK (6 nicht metastasierte Tumoren und 6 metastasierte Tumoren) und 21 Fernmetastasen (9 Lungenmetastasen, 6 Knochenmetastasen und 6 Hirnmetastasen).

### **5.4.1 miR-10b-Expressionsprofil in kryokonservierten Proben**

Bei differenzierter Betrachtung der Fernmetastasen zeigten sich geringe ortsspezifische Unterschiede. MiR-10b war in Lungenmetastasen niedriger exprimiert (4fach, p-Wert=0,00002) als in Abdomenmetastasen (3,62fach, p-Wert=0,004) im Vergleich zu nicht metastasierten Tumoren. Einen zusätzlichen signifikanten Expressionsunterschied zu metastasierten Tumoren zeigten nur die Lungenmetastasen (3,11fach, p-Wert=0,001), aber nicht die Abdomenmetastasen (Abbildung 20).



**Fehler! Verwenden Sie die Registerkarte 'Start', um Heading 1 dem Text zuzuweisen, der hier angezeigt werden soll.**

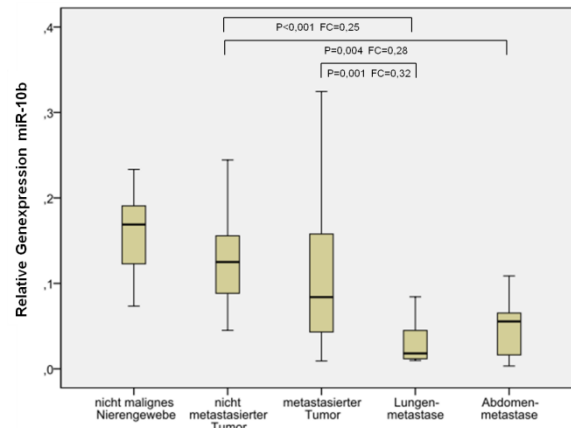


Abbildung 20: Relative Genexpression von miR-10b in Metastasen der Lunge und des Abdomens vs. nicht malignen Nierengeweben, nicht metastasierten Tumoren und metastasierten Tumoren ausgehend von GesamtRNA aus kryokonservierten Gewebe

#### 5.4.2 miR-10b-Expressionsprofil in FFPE-Proben

In Abbildung 21 wird die Herunterregulation von miR-10b in Lungen- (2,67fach, p-Wert=0,034) und Hirnmetastasen (8,33fach, p-Wert=0,004) im Vergleich zu nicht metastasierten Tumoren dargestellt. Zusätzlich konnten geringere Expressionen in Lungen- (3,18fach, p-Wert=0,025) und Knochenmetastasen (3,58fach, p-Wert=0,025) in Bezug zu metastasierten Tumoren gezeigt werden. In Hirnmetastasen war im Vergleich zu metastasierten Tumoren (9,9fach, p-Wert= 0,006) eine deutlichere Herunterregulation nachweisbar.

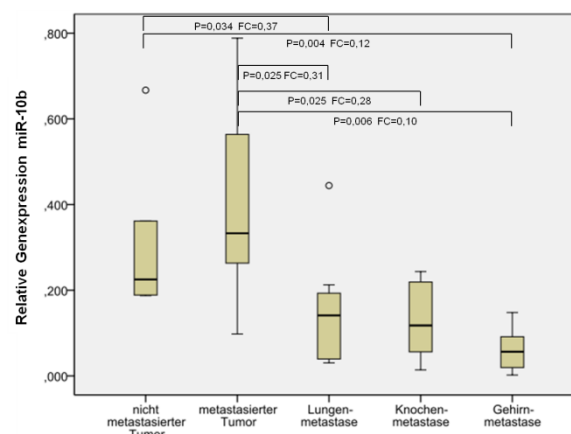


Abbildung 21: Relative Genexpression von miR-10b in Lungenmetastasen, Knochenmetastasen und Gehirnmetastasen im Vergleich zu nicht metastasierten Tumoren und metastasierten Tumoren ausgehend von GesamtRNA aus FFPE-Gewebe

### 5.4.3 miR-615-Expressionsprofil in kryokonservierten Proben

MiR-615 zeigte eine verminderte Expression in Fernmetastasen der Lunge und des Abdomens gegenüber nicht malignen Nierengeweben und nicht metastasierten Tumoren. Bei Unterscheidung der Metastasenorte war eine stärkere Herunterregulation in den Lungenmetastasen (2,34fach, p-Wert=0,00005) als in den Abdomenmetastasen (1,93fach, p-Wert=0,031), jeweils im Vergleich zu nicht metastasierten Tumoren, zu verzeichnen (Abbildung 22).

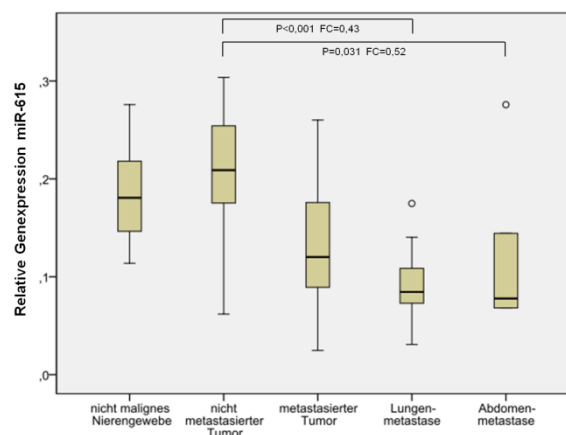


Abbildung 22: Relative Genexpression von miR-615 in Lungenmetastasen und Abdomenmetastasen vs. nicht malignen Nierengeweben, nicht metastasierten Tumoren und metastasierten Tumoren ausgehend von GesamtRNA aus kryokonservierten Gewebe

### 5.4.4 miR-615-Expressionsprofil in FFPE-Proben

Für miR-615 wurden signifikant erniedrigte Expressionswerte für Lungen- (4,55fach, p-Wert=0,003) und Hirnmetastasen (2,58fach, p-Wert=0,037) in Bezug zu nicht metastasierten Tumoren detektiert. Eine signifikant verminderte Expression verglichen mit metastasierten Tumoren (3,3fach, p-Wert=0,007) zeigte sich nur für Lungenmetastasen (Abbildung 23).

**Fehler! Verwenden Sie die Registerkarte 'Start', um Heading 1 dem Text zuzuweisen, der hier angezeigt werden soll.**

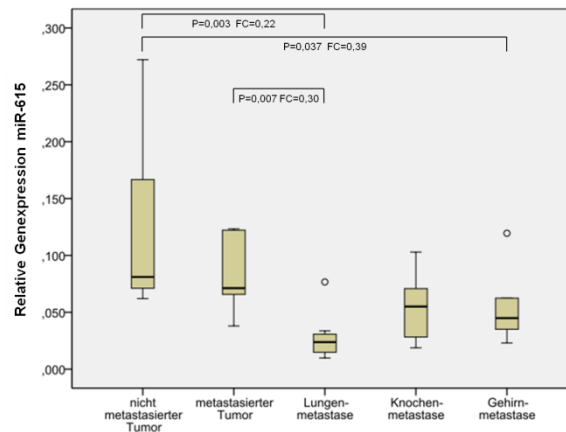


Abbildung 23: Relative Genexpression von miR-615 in Lungenmetastasen, Knochenmetastasen und Gehirnetastasen im Vergleich zu nicht metastasierten Tumoren und metastasierten Tumoren ausgehend von GesamtRNA aus FFPE-Gewebe

#### 5.4.5 miR-199b-Expressionsprofil in kryokonservierten Proben

Nur die Lungenmetastasen zeigten eine deutliche Überexpression sowohl zu nicht metastasierten Tumoren (29,71fach, p-Wert=0,000003) als auch zu metastasierten Tumoren (12,4fach, p-Wert=0,00002) (Abbildung 24).

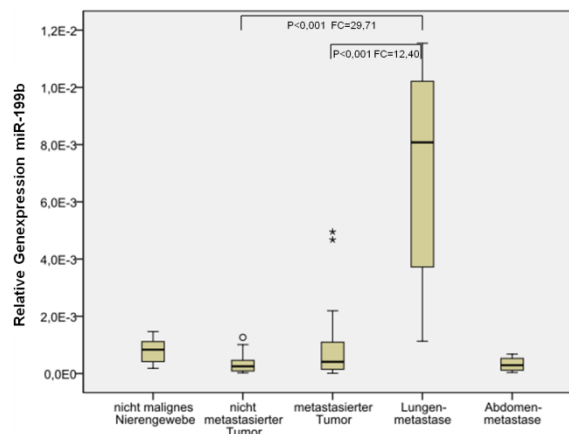


Abbildung 24: Relative Genexpression von miR-199b in Lungenmetastasen und Abdomenmetastasen im Vergleich mit nicht malignen Nierengeweben, nicht metastasierten Tumoren und metastasierten Tumoren ausgehend von GesamtRNA aus kryokonservierten Gewebe

#### 5.4.6 miR-199b-Expressionsprofil in FFPE-Proben

**Fehler! Verwenden Sie die Registerkarte 'Start', um Heading 1 dem Text zuzuweisen, der hier angezeigt werden soll.**

---

Eine deutlich erhöhte Expression von miR-199b war in Lungenmetastasen zu verzeichnen im Vergleich zu nicht metastasierten (11,06fach, p-Wert=0,003), als auch zu metastasierten Tumoren (12,36fach, p-Wert=0,002). Zusätzlich konnte bei den Knochenmetastasen verglichen mit nicht metastasierten Tumoren (4,28fach, p-Wert=0,025) und mit metastasierten Tumoren (4,78fach, p-Wert=0,025) eine Expressionserhöhung beobachtet werden, welche aber weit weniger prägnant als bei den Lungenmetastasen war. Die Hirnmetastasen ließen weder zu nicht metastasierten Tumoren noch zu metastasierten Tumoren Expressionsänderungen von miR-199b erkennen (Abbildung 25).

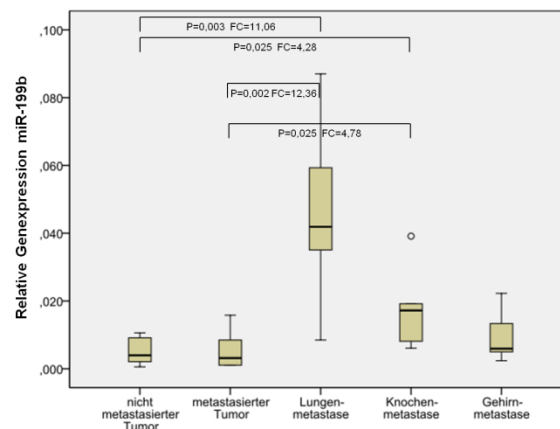


Abbildung 25: Relative Genexpression von miR-199b in Lungenmetastasen, Knochenmetastasen und Gehirnmetastasen im Vergleich zu nicht metastasierten Tumoren und metastasierten Tumoren ausgehend von GesamtRNA aus FFPE-Gewebe

#### 5.4.7 miR-33b\*-Expressionsprofil in kryokonservierten Proben

Für miR-33b\* konnte bei detaillierter ortsspezifischer Betrachtung ausschließlich eine Expressionserhöhung zwischen Lungenmetastasen im Vergleich zu nicht metastasierten Tumoren (2,09fach, p-Wert=0,006) detektiert werden, wohingegen die Abdomenmetastasen keine signifikanten Unterschiede gegenüber den nicht metastasierten Tumoren aufwiesen (Abbildung 26). Ein signifikanter Expressionsunterschied der Fernmetastasen im Vergleich zu metastasierten Tumoren konnte nicht detektiert werden.

**Fehler! Verwenden Sie die Registerkarte 'Start', um Heading 1 dem Text zuzuweisen, der hier angezeigt werden soll.**

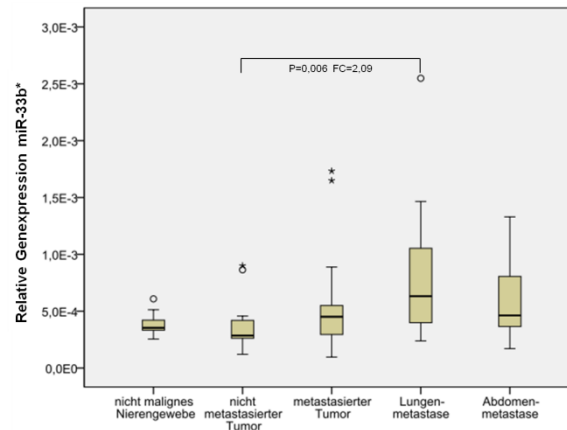


Abbildung 26: Relative Genexpression von miR-33b\* in Lungen- und Abdomenmetastasen verglichen mit nicht malignen Nierengeweben, nicht metastasierten Tumoren und metastasierten Tumoren ausgehend von GesamtRNA aus kryokonservierten Gewebe

#### 5.4.8 miR-33b\*-Expressionsprofil in FFPE-Proben

Hirnmetastasen zeigten eine signifikante Hochregulation der miR-33b\* in Bezug zu metastasierten Tumoren (3,04fach, p-Wert=0,006). Es konnte für keine weitere Metastasenlokalisierung ein signifikanter Expressionsunterschied verglichen mit Primärtumoren nachgewiesen werden (Abbildung 27).

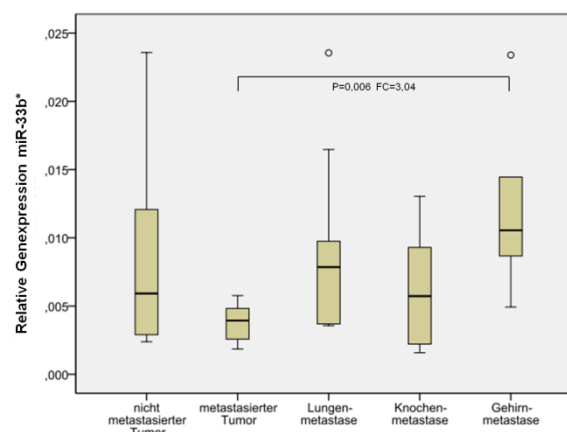


Abbildung 27: Darstellung der relativen Genexpression von miR-33b\* in Lungenmetastasen, Knochenmetastasen und Gehirnmetastasen im Vergleich zu nicht metastasierten Tumoren und metastasierten Tumoren ausgehend von GesamtRNA aus FFPE-Gewebe

## **6. DISKUSSION**

Das kzNZK weist aufgrund seines hohen Metastasierungspotentials die höchste Mortalität unter den urologischen Tumoren auf. Treten Metastasen auf, sinkt die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit auf unter 10%.

Um die Prognose der Patienten verbessern zu können, ist ein umfassendes Verständnis des Metastasierungsprozesses erforderlich. In verschiedenen soliden Tumoren konnten miRNAs eine wichtige Rolle bei der Tumorprogression und Metastasierung zugeordnet werden, unter anderem im Mamma-, Lungen-, Pankreas- und Magenkarzinom (Davoren et al. 2008, Yanaihara et al. 2006, Bloomston et al. 2007, Petrocca et al. 2008). Allerdings ist die Relevanz von miRNAs beim kzNZK, speziell bei der Metastasierung, bisher nur wenig untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurden daher Primärtumoren und Fernmetastasen hinsichtlich ihrer miRNA-Expression vergleichend betrachtet.

Neben der Metastasierung an sich, ist auch der jeweilige Metastasenort ein entscheidender Einflussfaktor für die Prognose und das Therapieansprechen. In einer retrospektiven Studie von McKay et al. 2014 konnte gezeigt werden, dass Patienten mit ossären und/ oder hepatischen Metastasen nach einer leitliniengerechten Therapie eine schlechtere Gesamtüberlebenszeit aufwiesen als Patienten mit Metastasen in Lunge, Gehirn, Lymphknoten und anderen Metastasenorten (McKay et al. 2014). Um die metastasierungsassoziierten Prozesse am Metastasenort besser zu verstehen, wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene Metastasenorte in die Untersuchung einbezogen. Das Verständnis der biologischen Prozesse stellt die Voraussetzung für eine individuelle, klinisch relevante Risikostratifizierung und Therapieplanung dar. In den nachfolgenden Abschnitten werden zunächst die methodischen Aspekte und anschließend die Ergebnisse inhaltlich diskutiert.

### **6.1 Diskussion methodischer Aspekte**

Um differenziell exprimierte miRNAs zu detektieren, ist die Microarrayanalyse ein übliches Standardverfahren, da hierbei die Expression aller bekannten miRNAs gemessen wird. In Vorarbeiten wurde mit Hilfe der Microarray-Analyse das miRNA-

**Fehler! Verwenden Sie die Registerkarte 'Start', um Heading 1 dem Text zuzuweisen, der hier angezeigt werden soll.**

---

Profil in Lungenmetastasen mit denen von metastasierten und nicht metastasierten Primärtumoren verglichen. Diese Ergebnisse sollten im Rahmen dieser Arbeit an einer größeren Fallzahl validiert werden. Microarrayanalysen unterliegen einer gewissen Limitation, da sie eine relativ hohe Falsch-Positiv-Rate aufweisen können. Folglich ist eine anschließende Validierung mit einer quantitativen Methode erforderlich, was unter anderem Gegenstand dieser Promotionsarbeit war.

Die qRT-PCR gilt als quantitative und sensitive Methode, um die Expression von miRNAs reproduzierbar und genau vergleichen zu können und ist somit als Standardmethode für die Validierung etabliert. Für einen relativen Vergleich der miRNA-Expression in verschiedenen Geweben werden Referenzgene zur Normalisierung benötigt, die in den zu vergleichenden Geweben eine stabile Expression aufweisen müssen. Beim Vergleich der Ergebnisse mit anderen Publikationen ist zu erwähnen, dass in den unterschiedlichen Studien keine einheitlichen Referenzgene verwendet wurden. Obwohl die Normalisierung mit verschiedenen Referenzgenen keine Unterschiede im Ergebnis zeigen sollten, konnte die Studie von Wotschofsky et al. 2011 darlegen, dass beim Vergleich von in der Literatur empfohlenen Referenzgenen Unterschiede in den Gewebegruppen (nicht malignen Nierengewebe, malignes Nierengewebe und Knochenmetastasen) des kzNZKs festzustellen sind (Wotschofsky et al. 2011). So ist eine komplette Kontroversität bei miR-106b zu sehen. In einer Veröffentlichung wurde miR-106b für das kzNZK als Referenzgen bestätigt (Juan et al. 2010). In einer anderen Veröffentlichung wird miR-106b als stärkster Indikator für Metastasierung nach Nephrektomie betrachtet (Slaby et al. 2010). Nach der Veröffentlichung von Wotschofsky et al. (2011) ist die Vergleichbarkeit von Publikationen bei Verwendung verschiedener Referenzgene kritisch zu betrachten. In der vorliegenden Arbeit wurde RNU48 als Referenzgen verwendet, da es in den drei Gewebegruppen stabil und gleich exprimiert ist und keine Abhängigkeit von Alter, Tumorstadium und Tumorgrad zeigte.

Die Isolierung von GesamtRNA aus den verschiedenen Ausgangsmaterialien erfolgte mit filterbasierten Isolierungssystemen. Bei diesen Verfahren wird die Gefahr von Verunreinigungen mit Proteinen, Lösungsmitteln oder DNA minimiert. Mit Hilfe des NanoDrops konnte gezeigt werden, dass die Qualität der GesamtRNA aus FFPE-Geweben deutlich niedriger war als bei kryokonservierten Proben. Die Qualität der

**Fehler! Verwenden Sie die Registerkarte 'Start', um Heading 1 dem Text zuzuweisen, der hier angezeigt werden soll.**

---

FFPE-Proben ist nach dem Fixationsprozess durch Degradierung, Quervernetzung und chemische Modifikationen stark beeinträchtigt (Bourgon et al. 2014). Vorarbeiten haben allerdings bestätigt, dass die geringere Qualität der RNA keinen Einfluss auf die miRNA-Expressionsanalysen hat. Möglicherweise sind die miRNAs, wegen ihrer geringen Größe, in den FFPE-Proben relativ stabil (Lu et al. 2005, Hui et al. 2009). In der Klinik werden Gewebeproben routinemäßig als FFPE-Proben konserviert, um die histopathologische Klassifikation von Tumoren und anderen Erkrankungen durchzuführen. Somit stehen durch FFPE-Proben größere Probenkollektive zur Verfügung, mit denen miRNA-Profile valide identifiziert werden könnten. Im Jahr 2010 wurde für das kzNZK erstmals gezeigt, dass FFPE-Proben für miRNA-Expressionsuntersuchungen geeignet sind. Weng et al. konnte an FFPE- und kryokonservierten Geweben belegen, dass, unabhängig von der Fixierung, dieselben miRNAs in Primärtumoren verglichen mit nicht malignen Geweben verändert waren (Weng et al. 2010). Die *fold changes* waren vergleichbar, aber nicht identisch. Um dies an eigenen Daten zu bestätigen, wurden in der vorliegenden Arbeit die ausgewählten miRNAs einmal an einer kryokonservierten Kohorte und einmal an einer unabhängigen FFPE-konservierten Kohorte analysiert. Verglichen wurden die *fold changes* in den einzelnen Probengruppen. Die Expressionsänderungen konnten in beiden Ausgangsmaterialien nachgewiesen werden. Es wurden allerdings minimale Unterschiede in den *fold changes* zwischen den Ausgangsmaterialien festgestellt. Zusammenfassend sind die FFPE-Proben für die Microarrayanalyse und die qRT-PCR geeignet. Somit können in Zukunft auch retrospektiv größere Studien an FFPE-Proben durchgeführt werden. Aber die Ergebnisse belegen auch, dass innerhalb einer Studie nur eine Art des Ausgangsmaterials verwendet werden sollte.

## **6.2 Diskussion der Expressionsanalysen**

Für die Validierung wurden zwei herunter- und zwei hochregulierte miRNAs ausgewählt, um potentielle Tumorsuppressoren, aber auch Onkogene einzuschließen. Übereinstimmend mit den Microarray-Ergebnissen sind miR-10b und miR-615 in den Lungenmetastasen signifikant zu Primärtumoren herunterreguliert, wohingegen miR-199b hochreguliert ist. Die Robustheit der ausgewählten miRNAs als potentielle Marker der Metastasierung und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse



**Fehler! Verwenden Sie die Registerkarte 'Start', um Heading 1 dem Text zuzuweisen, der hier angezeigt werden soll.**

---

werden durch die Validierung an zwei unabhängigen Patientenkohorten aus zwei verschiedenen Ausgangsmaterialien belegt. Bei miR-33b\* zeigt sich in den kryokonservierten Proben ein signifikanter Expressionsunterschied zwischen den Lungenmetastasen und den nicht metastasierten Primärtumoren, welcher in den FFPE-Proben nicht bestätigt werden konnte. Dies könnte auf die großen Schwankungen der Expression der nicht metastasierten Tumoren zurückzuführen sein. Die Ergebnisse zeigen eine Reproduzierbarkeit der Microarrayanalysen an. Auch abzuleiten ist, dass für jede einzelne miRNA eine Validierung vorgenommen werden muss.

Für die drei miRNAs (miR-10b, -615 und -199b) ist zu erwähnen, dass die Primärtumoren jeweils große miRNA-Expressionsschwankungen aufzeigen, was zu höheren Interquartilenabständen führt (Abbildung 12, Abbildung 20, Abbildung 21, Abbildung 22 und Abbildung 23). Ursache für die Streuung könnte die intratumorale Heterogenität sein. Primärtumorproben könnten aus der Tumorperipherie, oder auch mit Teilen des Tumorzentrums entnommen worden sein. Die gesetzten Bedingungen für die Proben (mindestens 75% Tumoranteil, keine Nekrosen oder größere Einblutungen) wurden eingehalten. Tumoren bestehen aus Tumorzellen und einem Tumorstroma (Bindegewebe, Blutgefäßen und entzündliche Infiltrate), die jeweils eine spezifische miRNA-Expression aufweisen. Bei schnell wachsenden Tumorzellen kann sich das Stroma unzureichend ausbilden und es kommt vermehrt im Tumorzentrum zu Sauerstoffmangel verglichen mit der Tumorperipherie. Sowohl die Zentrum-Peripherie-Divergenz als auch die Heterogenität des Tumors wäre eine Erklärung für die Streuung. Dabei ist zum einen die mögliche Heterogenität der einzelnen Tumorzellen im Karzinom, aggressivere, also zur Invasion und Metastasierung neigende, und weniger aggressive Tumorzellen gemeint. Zum anderen ist damit zu rechnen, dass die Tumorproben mit anderen Zelltypen wie Fibroblasten, Endothelzellen und Immunzellen durchsetzt sind und somit die relative miRNA-Expression der Tumorprobe unterschiedlich beeinflussen.

Nach der Bestätigung der Microarrayergebnisse wurden im nächsten Schritt bewusst andere Metastasierungsorte mit eingeschlossen, um zu prüfen, ob ähnliche Expressionsänderungen von miRNAs in verschiedenen Metastasenorten vorliegen. Hierfür wurden zusätzlich zu den Lungenmetastasen bei kryokonservierten Proben

**Fehler! Verwenden Sie die Registerkarte 'Start', um Heading 1 dem Text zuzuweisen, der hier angezeigt werden soll.**

---

Metastasen des Abdomens und bei FFPE-Proben Gehirn- und Knochenmetastasen untersucht.

MiR-33b\* zeigte in den kryokonservierten Geweben, neben der signifikanten Expressionsdifferenz zwischen Lungenmetastasen und nicht metastasierten Tumoren, keine weitere signifikante Expressionsdifferenz zwischen einer anderen Metastasenlokalisierung und den Primärtumoren. In den FFPE-Proben konnte eine signifikante Expressionsdifferenz in den Gehirnetastasen verglichen mit metastasierten Primärtumoren nachgewiesen werden. In der Literatur sind wenige Studien zur miR-33b\*-Expression in Verbindung mit Tumoren veröffentlicht. Im Medulloblastom konnte eine Herunterregulierung in Tumorzellen verglichen mit Normalgeweben detektiert werden (de Bont et al. 2008). Nach funktionellen Analysen in Medulloblastomzellen und Leberzellen soll eine niedrig exprimierte miR-33b\* die Zellproliferation aktivieren (Takwi et al. 2012, Cirera-Salinas et al. 2012). Ob diese miRNA eine Rolle in den Metastasen des kZNZKs spielt, ist unbekannt und Expressionsunterschiede konnten auch in dieser Arbeit nicht eindeutig bestätigt werden. Der Fokus der weiteren Diskussion liegt daher nicht auf miR-33b\*.

MiR-10b hingegen zeigte eine erniedrigte Expression in Abdomen-, Lungen-, Gehirn- und Knochenmetastasen im Vergleich zu Primärtumoren. In der vorliegenden Arbeit wurden für miR-10b in allen untersuchten Metastasenorten an zwei unabhängigen Kohorten und in zwei unterschiedlichen Ausgangsmaterialien eine signifikante Herunterregulation in den Metastasen verglichen mit den Primärtumoren detektiert. Diese Ergebnisse konnten durch andere Studien bestätigt werden. Wu et al. konnten 2012 in ihrer Studie (Wu et al. 2012) zeigen, dass die Expression von vier miRNAs mit der Metastasierung und der Prognose korreliert. Das Patientenkollektiv bestand aus 13 nicht metastasierten Primärtumorgeweben und 15 Metastasen. Bei den Metastasen wurde jedoch die Lokalisation nicht unterschieden und auch Lymphknotenmetastasen wurden mit einbezogen. Anhand von Microarrayanalysen wurden 7 hochregulierte und 14 herunterregulierte miRNAs detektiert. Aus 21 Kandidaten-miRNAs wurde im Anschluss an die qRT-PCR eine 4 miRNA Signatur (miR-130b, -199b, -10b und -139) erstellt. Anhand dieser Signatur wurden Patienten in Hoch- und Niedrigrisikogruppen eingeteilt und auf Metastasierungsrisiko und tumorspezifisches Überleben untersucht. Diese Untersuchung belegt ergänzend zu den hier gezeigten Daten, dass miRNAs als potentielle Biomarker fungieren können.

**Fehler! Verwenden Sie die Registerkarte 'Start', um Heading 1 dem Text zuzuweisen, der hier angezeigt werden soll.**

---

White et al. haben eine weitere Studie durchgeführt, welche die miRNA-Expression von Metastasen ohne Angabe der Lokalisation und Primärtumoren des kzNZKs verglichen haben (White et al. 2011). In der Microarrayanalyse an 18 Primärtumoren und 10 Metastasen wurden 9 hochregulierte und 56 herunterregulierte miRNAs in den Metastasen gefunden. Fünf herunterregulierte miRNAs (miR-10b, -126, -196a, -204 und -215) wurden an 18 Primärtumoren und 10 Metastasen mit Hilfe der qRT-PCR bestätigt. Anschließend wurden diese miRNA-Expressionsunterschiede an 80 FFPE-Proben verifiziert. Übereinstimmend mit der vorliegenden Arbeit konnte die verminderte Expression von miR-10b in den Metastasen, verglichen zu Primärtumoren bestätigt werden, sowohl im kryokonservierten Gewebe als auch in FFPE-Proben. Im Gegensatz zu den hier zitierten Studien von Wu et al. und White et al. wurde in der Publikation von Wotschofsky et al. der Metastasierungsort berücksichtigt (Wotschofsky et al. 2012). Sie untersuchten kryokonserviertes Normalgewebe (n=22), Tumorgewebe (nicht metastasierte Tumoren n=22 und metastasierte Tumoren n=22) und Gewebe aus Knochenmetastasen (n=13) des kzNZKs. Dabei detektierten sie eine stufenweise Herunterregulation der miRNAs. Zwischen Normalgeweben und Tumorgeweben waren 23 miRNAs in Tumorgeweben herunterreguliert. Darunter zum Beispiel miR-10b, -19a, -200c und andere. Eine weitere Herunterregulierung im Metastasengewebe von Knochen verglichen mit Tumorgeweben wurde bei 21 miRNAs detektiert. Übereinstimmend mit unserer Arbeit konnte die Herunterregulierung der miR-10b in Knochenmetastasen des kzNZKs verglichen mit den Primärtumoren und den Normalgeweben gezeigt werden. Die Funktion von miR-10b im kzNZK ist, nach aktuellem Kenntnisstand, nicht bekannt. Allerdings lassen die Ergebnisse die Hypothese zu, dass miR-10b eine funktionelle Relevanz bei der Entstehung und Entwicklung von Metastasen in entfernten Organen haben könnte. In anderen Tumorentitäten wie Mamma-, Magen- und Lungenkarzinom (Vimalraj et al. 2013, Han et al. 2014, Li et al. 2014, Liu et al. 2013b) wurde die Bedeutung von miR-10b bei der Metastasierung nachgewiesen und die Targets und Signalwege von miR-10b mit funktionellen Analysen bestimmt. Es ist jedoch anzumerken, dass in diesen Tumorentitäten miR-10b, im Gegensatz zum kzNZK, eine erhöhte Expression in den Primärtumoren und Fernmetastasen verglichen mit Normalgeweben aufwies. Da miRNAs eine hohe Gewebespezifität besitzen, kann man aus diesen Daten nur begrenzt Rückschlüsse auf die Rolle von miR-10b in den Fernmetastasen des kzNZKs ziehen. Die Targetanalysen wurden in

**Fehler! Verwenden Sie die Registerkarte 'Start', um Heading 1 dem Text zuzuweisen, der hier angezeigt werden soll.**

---

*in vitro* Studien an etablierten Zelllinien durchgeführt. Beim Mammakarzinom wurde festgestellt, dass durch die erhöhte Expression von miR-10b Syndekan-1 inhibiert wird, wodurch die Metastasierung und Invasion des Primärtumors gefördert wird (Ibrahim et al. 2012). Des Weiteren soll die gesteigerte Expression von miR-10b durch die erniedrigte Regulation des epithelialen Markers E-Cadherin und die Hochregulation des mesenchymalen Markers Vimentin die EMT aktivieren (Han et al. 2014). Li et al. konnten zeigen, dass im Magenkarzinom miR-10b verglichen mit normalen Geweben vermindert exprimiert und *T-Lymphoma Invasion And Metastasis-Inducing Protein 1* (Tiam-1) ein Target ist (Li et al. 2014). Über den Tiam-Rac-Signalweg wird die Metastasenbildung aktiviert. Die Publikationen beweisen, dass in Abhängigkeit von der Tumorentität unterschiedliche Targets für einzelne miRNAs zu erwarten sind. Theoretisch könnte jede miRNA aufgrund der Komplementarität an hunderte verschiedene mRNAs binden, was die funktionelle Variabilität in Abhängigkeit vom Gewebe und der Funktion widerspiegelt. Zusätzlich reguliert jede miRNA zellspezifisch mRNA-Targets. Diese Tatsache belegt die Notwendigkeit, die potentiellen Targets und die dadurch beeinflussten Signalwege entitätsspezifisch zu analysieren. Daher sollten die mRNA-Targets für miR-10b in den Metastasen des kzNZKs zukünftig in funktionellen Analysen und Expressionsstudien untersucht werden, um deren Bedeutung besser verstehen zu können.

MiR-615 ist ebenfalls generell in Metastasen unabhängig vom Metastasierungsort niedrig exprimiert. Es konnte eine signifikante Herunterregulation der Metastasen des Abdomens, der Lunge und des Gehirns verglichen mit den Primärtumoren bestätigt werden, wobei für die Knochenmetastasen die gleiche Tendenz zu erkennen war. Dies könnte an der geringen Anzahl (n=6) der untersuchten Knochenmetastasen liegen. Es ist zu prüfen, ob die Erhöhung der Anzahl zu signifikanten Unterschieden führt. Andererseits könnte miR-615 nur eine geringe Rolle für Knochenmetastasen spielen. Für miR-615 konnten nur zwei tumorassoziierte Studien gefunden werden, die die biologische Funktion von miR-615 untersuchten. 2011 konnten Hulf et al. zeigen, dass miR-615 im Prostatakarzinom verglichen mit normalen Prostatagewebe hochreguliert ist (Hulf et al. 2011). Mit anderen Genen ist das miR-615-Gen zusammen mit dem *Homebox* (HOX)-Gen in einem Cluster auf dem Chromosom 13 lokalisiert und soll somit bevorzugt HOX-mRNA beeinflussen (Yekta et al. 2008). Es

**Fehler! Verwenden Sie die Registerkarte 'Start', um Heading 1 dem Text zuzuweisen, der hier angezeigt werden soll.**

---

wurde berichtet, dass eine veränderte Expression der HOX-Gene sowohl zur Onkogenese als auch Tumorsuppression beitragen kann (Shah und Sukumar 2010). Wang et al. zeigte in seiner Studie an transfizierten Kolonkarzinomzellen, dass das Nasopharyngeal carcinoma-associated gene 6 (NGX6) durch miR-615 und 13 andere miRNAs reguliert ist (Wang et al. 2010). Das NGX6 gilt als Tumorsuppressor des Kolonkarzinoms (Zhang et al. 2003). Dadurch wurden zellbiologische Prozesse wie Apoptose, Mobilität, Migration, Hydrolyseaktivität und die molekulare Signaltransduktion verändert.

Neben den oben genannten Gemeinsamkeiten gibt es auch Unterschiede im miRNA-Profil der Tumorzellen an den spezifischen Metastasenorten. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals nachgewiesen werden, dass miRNAs im kzNZK in Abhängigkeit vom Metastasierungsort spezifische Veränderung aufweisen. So zeigte sich eine 20fache Überexpression von miR-199b in den Lungenmetastasen im Vergleich zu Primärtumoren, jedoch nicht in den Metastasen des Abdomens, des Gehirns oder der Knochen. Unsere Ergebnisse bezüglich miR-199b in Metastasen des kzNZKs sind vergleichbar mit den Ergebnissen der oben zitierten Studie von Wu et al. (Wu et al. 2012). Die Autoren zeigten, dass neben miR-10b, auch miR-199b in Metastasen dereguliert ist, jedoch wurde der Metastasenort nicht berücksichtigt. Basierend auf unseren Ergebnissen und vor dem Hintergrund, dass die Lunge mit 50-60% den Hauptmetastasierungsort des kzNZKs darstellt, lässt sich vermuten, dass die in der Studie von Wu et al. beschriebene signifikante Änderung von miR-199b durch eine hohe Anzahl von Metastasen aus der Lunge bedingt ist.

Es ist zu klären, welche Mechanismen die Ortsspezifität von Metastasen verantworten. Nach aktueller Studienlage sind kaum Untersuchungen publiziert, die das miRNA-, RNA-, DNA- und Proteinspektrum in den Tumorzellen in Abhängigkeit vom Metastasierungsort in den Fokus stellten. Es ist zu vermuten, dass die Tumorzellen des Primärtumors und/ oder der durch spezifische Eigenschaften charakterisierte Metastasierungsort für die Ortsspezifität der miRNA-Expression verantwortlich sind. Bekannt ist, dass das Mikromilieu einen großen Einfluss auf die Tumorzellen hat (Kang et al. 2009). Verschiedene Daten unterstützen die These, dass das spezifische Mikromilieu am Metastasierungsort sowohl bei der Bildung der prämetastatischen Nische (Abbildung 28 A) als auch bei der Ausbildung der Metastasen von Bedeutung ist (Hiratsuka et al. 2006, Unwith et al. 2014). Dabei

**Fehler! Verwenden Sie die Registerkarte 'Start', um Heading 1 dem Text zuzuweisen, der hier angezeigt werden soll.**

---

spielen verschiedene Zellen wie Fibroblasten, Endothelzellen und Immunzellen eine große Rolle. Immunzellen, wie dendritische Zellen, werden über IFN- $\gamma$  von natürlichen Killerzellen aktiviert und stellen bei geringerer Präsenz einen prädisponierenden Faktor zur Tumoretablierung dar (Naujoks et al. 2014). Des Weiteren ist ein saures Mikromilieu der Metastasenetablierung förderlich (Riemann et al. 2014). Dieses wirkt deregulierend auf die Integrität der Basalmembran (Kato et al. 2005, Kato et al. 2007), auf die Aktivität von Ionenkanäle (Brackenbury 2012, Monteith et al. 2012, Schwab et al. 2012) und steigert über mitogen-activated protein-Kinase (MAP-Kinasen) und p38 die fokale Adhäsion (Riemann et al. 2011, Stock et al. 2005). Somit wird über ein saures Mikromilieu die Migration und Invasion von zirkulierenden Tumorzellen gefördert.

Ausgehend vom Primärtumor wird der zukünftige Metastasenort zusätzlich über lösliche Faktoren wie VEGF (Kaplan et al. 2005), placental growth factor (PlGF) (Kaplan et al. 2005) und Transforming Growth Factor beta (TGF- $\beta$ ) (Hiratsuka et al. 2006) vorbereitet. Diese löslichen Faktoren führen zu einer Hochregulierung von inflammatorischen Zytokinen wie stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) und S100A8 (Hiratsuka et al. 2006), welche ihrerseits Knochenmark-abgeleitete hämatopoetische Stammzellen anlocken (Srikrishna 2012, Kaplan et al. 2005). Diese Knochenmark-abgeleiteten Zellen sezernieren prämetastatische Faktoren wie Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), MMP-9 und TGF- $\beta$  (Kaplan et al. 2005, Kim et al. 2009, Hiratsuka et al. 2002). Über eine HIF-regulierte Lysyloxidase (Wong et al. 2011) werden Fibroblasten aktiviert, die Fibronectin sezernieren, ein wichtiges Adhäsionsprotein in der prämetastatischen Nische (Erler et al. 2009). Die Lysyloxidase ist weiterhin verantwortlich für Kollagen IV-Verbindungen in der Basalmembran der Lunge und weitere Modifizierungen der extrazellulären Matrix (Erler et al. 2009). So wird eine Umgebung geschaffen, die Zellanziehung, Tumorzelladhäsion und Invasion fördert.

Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass von Tumorzellen freigesetzte Exosomen durch Regulation der Tumorumgebung einen entscheidenden Einfluss auf die Metastasierung haben können. Exosomen sind kleine, von Zellen abgegebene Membranvesikel, die eine Rolle bei der Zell-Zell-Kommunikation spielen (Alderton 2012, Thuma und Zoller 2014). In den Membranvesikeln enthaltene Proteine, RNAs und miRNAs der Ausgangszelle regulieren nach Aufnahme in die Zielzelle verschiedene Prozesse (Simpson et al. 2009). Für NZK-Zellen konnte in Studien *in*

**Fehler! Verwenden Sie die Registerkarte 'Start', um Heading 1 dem Text zuzuweisen, der hier angezeigt werden soll.**

---

*vitro* und *in vivo* an Mäusen gezeigt werden, dass Exosomen von Endothelzellen aufgenommen werden, die dadurch erhöhte Angiogenese- und Metastasierungsraten aufweisen (Grange et al. 2011, Zhang et al. 2013). Zusätzlich konnte in einer Studie von Ono et al. 2014 in einer Mammakarzinom-Zelllinie belegt werden, dass in Exosomen verpackte miR-23b metastasierte Zellen in ein Ruhestadium in der metastatischen Nische versetzen und somit die Wirksamkeit von Chemotherapeutika auf Metastasenzellen vermindern (Ono et al. 2014). Yet et al. konnten 2014 aus dem Blutserum von Patienten mit einem Nasopharyngeomkarzinom Exosomen extrahieren und unter anderen miRNAs (miR-24-3p, miR-891a, miR-106a-5p, miR-20a-5p und miR-1908) nachweisen, die bekannt sind für die Modifizierung von Zellproliferation und Differenzierung (Ye et al. 2014).

Zusammenfassend müssen weitere Untersuchungen daher klären, ob das miRNA-Profil der Tumorzellen durch das Mikromilieu am Metastasierungsort entweder über freigesetzte lösliche Faktoren, oder über Exosomen reguliert wird.

MiRNAs regulieren proteinkodierende Gene von Zellen innerhalb des bereits diskutierten Mikromilieus und der prämetastatischen Nische. Aber auch die mögliche Relevanz der miRNAs für die zirkulierenden Tumorzellen sollte diskutiert werden. Zirkulierende Tumorzellen mit Metastasierungspotential entstehen über die EMT oder bestehen nach dem intrinsischen Weg vom frühen Beginn der Tumorentwicklung an im Zellverband (Chaffer und Weinberg 2011). Denkbar ist, dass die Zellen tumorentitätsspezifisch mit gewissen Eigenschaften wie Adhäsionsmolekülen versehen werden, wodurch sie in Abhängigkeit vom Gewebe Metastasen bilden (Abbildung 28 B). Mit Hilfe von spezifischen Adhäsionsmolekülen könnten zirkulierende Tumorzellen organspezifisch an Mikrogefäße binden, oder organspezifisch einem chemischen Gradienten folgen. Somit wäre die Spezifität des Metastasierungsortes durch Eigenschaften der Tumorzellen definiert. Diese These unterstützend, konnte beim NZK in Mäusen gezeigt werden, dass Cadherin-11 bei der Knochenmetastasierung eine Rolle spielt (Satcher et al. 2014). Zusätzlich diskutiert werden kann, ob bei der Ansiedlung der Tumorzellen unabhängig vom Metastasenort eine einzelne der in Abbildung 28 mit A-B bezifferten Varianten zum tragen kommt oder ein Zusammenspiel dieser Möglichkeiten besteht. Möglicherweise kommen aber auch die von A-B bezifferten Varianten, abhängig vom Metastasierungsort zur Anwendung und somit würde der Metastasierungsort die Spezifität bestimmen.

**Fehler! Verwenden Sie die Registerkarte 'Start', um Heading 1 dem Text zuzuweisen, der hier angezeigt werden soll.**

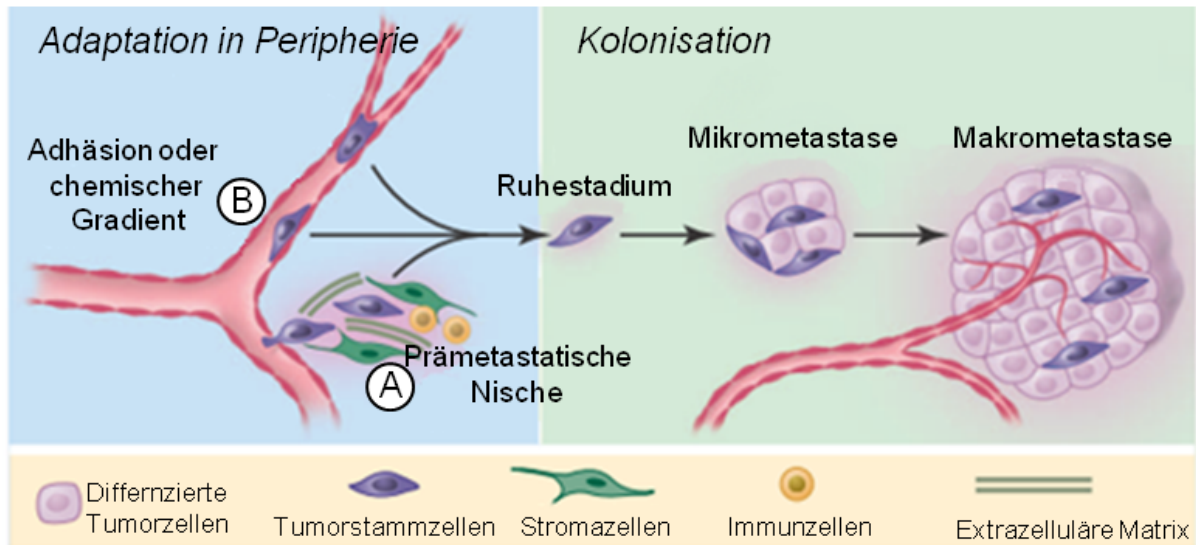


Abbildung 28: Adaptationsmöglichkeiten von zirkulierenden Tumorzellen in einer fremden Umgebung, modifiziert nach (Chaffer und Weinberg 2011)

Ein weiterer möglicher Zusammenhang zwischen dem Tumor und dem spezifischen Metastasenort besteht in der Ähnlichkeit der zirkulierenden Tumorzellen mit dem Ursprungsgewebe (Helzer et al. 2009). Es könnten somit vom Primärtumor unspezifisch unselektiert Zellen abgesiedelt und anschließend auf Grund ihrer Ursprungsgewebeähnlichkeit in dem Metastasenort aufgenommen werden. Die Metastasenorte müssten folglich bestimmte Eigenschaften besitzen, die dazu führen, dass sich Tumorzellen entitätsabhängig ansiedeln.

Eine weitere Hypothese könnte darin bestehen, dass die zirkulierenden Tumorzellen entitätsunabhängig alle distalen Organe infiltrieren und die Merkmale der zirkulierenden Tumorzellen entscheiden über den Verbleib im Ruhestadium oder die Bildung einer Mikrometastase hin zu einer Makrometastase.

Um die Relevanz von metastasenspezifischen miRNAs im klinischen Alltag nutzen zu können, wäre eine minimalinvasive Analyse der miRNAs in Körperflüssigkeiten (Blut oder Urin) von Patienten mit kzNZK von Vorteil. Bisher wurden zirkulierende stabile miRNAs im Serum (Chen et al. 2008), Plasma (Chen et al. 2008, Mitchell et al. 2008), Speichel (Park et al. 2009), Urin (Hanke et al. 2010) und Muttermilch (Kosaka et al. 2010) nachgewiesen. In der Studie von Ono et al. 2014 konnte ein miRNA-Muster in Exosomen nachgewiesen werden, das nachweislich am Metastasierungsort Tumorzellen in ein Ruhestadium versetzt und somit beeinflusst.



**Fehler! Verwenden Sie die Registerkarte 'Start', um Heading 1 dem Text zuzuweisen, der hier angezeigt werden soll.**

---

Nach aktuellem Kenntnisstand konnten miRNAs im Serum, Tumorbiopsien oder Urin analysiert werden, die einerseits Patienten mit einem NZK von Gesunden unterscheiden (Redova et al. 2012, Silva-Santos et al. 2013, Iwamoto et al. 2014) und andererseits Raumforderungen in der Niere differenzieren können (von Brandenstein et al. 2012, Youssef et al. 2011). Hier ist eine besondere Herausforderung, geeignete Referenzgene für die jeweiligen Körpersekrete zu bestimmen (Chen et al. 2013). Ein weiterer Vorteil von Körpersekreten ist die Möglichkeit der Wiederholung der Messung in zeitlichen Abständen, wodurch zirkulierende miRNAs als Verlaufs- als auch Therapiekontrolle sehr gut geeignet sein könnten. Des Weiteren könnten durch Blutuntersuchungen möglicherweise frühzeitige Diagnosestellungen zu Tumorprogress und Metastasierung getroffen werden, die bilddiagnostisch im frühen Stadium nicht detektierbar sind.

## **7. SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK**

Um miRNA-Änderungen in Metastasen zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression von miRNAs in Fernmetastasen vergleichend zu Primärtumoren und gesundem Nierengewebe als Kontrolle analysiert.

Bezugnehmend auf die Zielstellung dieser Arbeit resultieren folgende Schlussfolgerungen:

- 1) Die in den Microarrayanalysen detektierten miRNA-Expressionsunterschiede zwischen Lungenmetastasen und Primärtumoren konnten durch die qRT-PCR von kryokonservierten Geweben für alle vier Kandidaten-miRNAs bestätigt werden. In einer unabhängigen Analyse unter Verwendung von FFPE-Gewebe als Ausgangsmaterial zeigten 3 der 4 miRNAs reproduzierbare Ergebnisse, allerdings mit geringeren *fold changes* als in kryokonservierten Proben. Damit konnte diese Arbeit die zukünftige Verwendung von FFPE-Proben für Microarrayanalysen und qRT-PCR bestätigen.
- 2) MiR-10b und miR-615 weisen in Metastasen unabhängig vom Metastasierungsort eine signifikant veränderte Expression auf. Diese Ergebnisse weisen auf eine generelle Funktion von miR-10b und miR-615 im komplexen Prozess der Metastasierung hin.
- 3) Es konnten spezifische Unterschiede in der miRNA-Expression in Abhängigkeit vom Metastasierungsort am Beispiel der miR-199b belegt werden. Die miRNA-Expression wird offensichtlich durch spezifische Prozesse oder Eigenschaften der Tumorzellen an verschiedenen Metastasierungsorten beeinflusst. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Hypothesen für die ortsspezifische Expressionserhöhung von miR-199b in Lungenmetastasen aufgestellt, die in zukünftigen Studien untersucht werden sollten.

Trotz des hohen Wissenszuwachses auf dem Gebiet der miRNAs gibt es noch viele Herausforderungen und offene Fragen. Diese initiale Studie belegt, dass durch die molekulare Analyse von Metastasen, insbesondere auf der miRNA-Ebene, wichtige Erkenntnisse zum besseren Verständnis der Metastasierung gewonnen werden

**Fehler! Verwenden Sie die Registerkarte 'Start', um Heading 1 dem Text zuzuweisen, der hier angezeigt werden soll.**

---

können. Weitere Analysen sind essenziell, um die klinische Relevanz der hier untersuchten deregulierten miRNAs in unabhängigen, größeren Patientenkohorten zu überprüfen. Dabei sollten zum einen die miRNA-Expressionsänderungen in unterschiedlichen Metastasenorten in Verbindung mit den dazugehörigen Primärtumoren näher untersucht werden, um den verschiedenen Metastasen der kzNZK spezifische miRNA-Profile zuordnen zu können. Zum anderen sollten die spezifischen Targets deregulierter miRNAs und die dadurch beeinflussten Signalwege identifiziert werden. Somit könnte die funktionelle Relevanz dieser miRNAs in den Prozessen am Metastasenort besser verstanden werden. Daraus könnten sich neue Therapieoptionen entwickeln, die effektiv der Metastasierung in den tumorentfernten Organen entgegenwirken und somit die Prognose der Patienten deutlich verbessern könnten.

Mit dem Ziel, miRNAs als klinische Marker verwenden zu können, konnten Studien darlegen, dass miRNAs nicht nur in Geweben, sondern auch von Zellen freigesetzt (in Exosomen verpackt oder an Proteine gebunden) in verschiedenen Körpersekreten detektiert werden können. Daher haben zirkulierende miRNAs, frei oder an Exosomen gebunden, ein großes Potential als diagnostische, prognostische oder prädiktive Marker dienen zu können.

## **8. LITERATUR UND QUELLENVERZEICHNIS**

- 17.03.2014. WHO cancer mortality database (IARC) <http://www-dep.iarc.fr/WHOdb/WHOdb.htm>.
- Alberts B, Hopkin, Johnson, Lewis, Raff, Roberts, Walter. 2012. Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie. WILEY-VCH.
- Alderton GK. 2012. Metastasis. Exosomes drive premetastatic niche formation. *Nat Rev Cancer*, 12 (7):447.
- Amin MB, Amin MB, Tamboli P, Javidan J, Stricker H, de-Peralta Venturina M, Deshpande A, Menon M. 2002. Prognostic impact of histologic subtyping of adult renal epithelial neoplasms: an experience of 405 cases. *Am J Surg Pathol*, 26 (3):281-291.
- An WG, Kanekal M, Simon MC, Maltepe E, Blagosklonny MV, Neckers LM. 1998. Stabilization of wild-type p53 by hypoxia-inducible factor 1alpha. *Nature*, 392 (6674):405-408.
- Beck SD, Patel MI, Snyder ME, Kattan MW, Motzer RJ, Reuter VE, Russo P. 2004. Effect of papillary and chromophobe cell type on disease-free survival after nephrectomy for renal cell carcinoma. *Ann Surg Oncol*, 11 (1):71-77.
- Berg T, Stryer. 2013. Stryer Biochemie. Springer Spektrum.
- Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409 (6818):363-366.
- Bjornsson J, Short MP, Kwiatkowski DJ, Henske EP. 1996. Tuberous sclerosis-associated renal cell carcinoma. Clinical, pathological, and genetic features. *Am J Pathol*, 149 (4):1201-1208.
- Bloomston M, Frankel WL, Petrocca F, Volinia S, Alder H, Hagan JP, Liu CG, Bhatt D, Taccioli C, Croce CM. 2007. MicroRNA expression patterns to differentiate pancreatic adenocarcinoma from normal pancreas and chronic pancreatitis. *Jama*, 297 (17):1901-1908.
- Bourgon R, Lu S, Yan Y, Lackner MR, Wang W, Weigman V, Wang D, Guan Y, Ryner L, Koeppen H, Patel R, Hampton GM, Amler LC, Wang Y. 2014. High-throughput detection of clinically relevant mutations in archived tumor samples by multiplexed PCR and next-generation sequencing. *Clin Cancer Res*, 20 (8):2080-2091.
- Bracken CP, Gregory PA, Khew-Goodall Y, Goodall GJ. 2009. The role of microRNAs in metastasis and epithelial-mesenchymal transition. *Cell Mol Life Sci*, 66 (10):1682-1699.
- Brackenbury WJ. 2012. Voltage-gated sodium channels and metastatic disease. *Channels (Austin)*, 6 (5):352-361.
- Braun CJ, Zhang X, Savelyeva I, Wolff S, Moll UM, Schepeler T, Orntoft TF, Andersen CL, Dobbelstein M. 2008. p53-Responsive micrnas 192 and 215 are capable of inducing cell cycle arrest. *Cancer Res*, 68 (24):10094-10104.
- Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. 2005. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol*, 3 (3):e85.
- Bui MH, Visapaa H, Seligson D, Kim H, Han KR, Huang Y, Horvath S, Stanbridge EJ, Palotie A, Figlin RA, Belldegrun AS. 2004. Prognostic value of carbonic anhydrase IX and Ki67 as predictors of survival for renal clear cell carcinoma. *J Urol*, 171 (6 Pt 1):2461-2466.

- Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. 2004. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101 (9):2999-3004.
- Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM. 2002. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99 (24):15524-15529.
- Cattoretti G, Becker MH, Key G, Duchrow M, Schluter C, Galle J, Gerdes J. 1992. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol*, 168 (4):357-363.
- Chaffer CL, Weinberg RA. 2011. A perspective on cancer cell metastasis. *Science*, 331 (6024):1559-1564.
- Chambers AF, Matrisian LM. 1997. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J Natl Cancer Inst*, 89 (17):1260-1270.
- Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. 2005. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res*, 65 (14):6029-6033.
- Chang TC, Mendell JT. 2007. microRNAs in vertebrate physiology and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 8:215-239.
- Chawla R KM, Siva H, Tunuguntla GR, Jorda M, Lokeshwar BL. 2008. Is CXCR-4 a new prognostic and metastatic marker in renal cell carcinoma? *J Urol*.
- Chen X, Liang H, Guan D, Wang C, Hu X, Cui L, Chen S, Zhang C, Zhang J, Zen K, Zhang CY. 2013. A combination of Let-7d, Let-7g and Let-7i serves as a stable reference for normalization of serum microRNAs. *PLoS One*, 8 (11):e79652.
- Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, Guo J, Zhang Y, Chen J, Guo X, Li Q, Li X, Wang W, Zhang Y, Wang J, Jiang X, Xiang Y, Xu C, Zheng P, Zhang J, Li R, Zhang H, Shang X, Gong T, Ning G, Wang J, Zen K, Zhang J, Zhang CY. 2008. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res*, 18 (10):997-1006.
- Chendrimada TP, Finn KJ, Ji X, Baillat D, Gregory RI, Liebhaber SA, Pasquinelli AE, Shiekhattar R. 2007. MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. *Nature*, 447 (7146):823-828.
- Chow WH, Dong LM, Devesa SS. 2010. Epidemiology and risk factors for kidney cancer. *Nat Rev Urol*, 7 (5):245-257.
- Cirera-Salinas D, Pauta M, Allen RM, Salerno AG, Ramirez CM, Chamorro-Jorganes A, Wanschel AC, Lasuncion MA, Morales-Ruiz M, Suarez Y, Baldan A, Esplugues E, Fernandez-Hernando C. 2012. Mir-33 regulates cell proliferation and cell cycle progression. *Cell Cycle*, 11 (5):922-933.
- Clague J, Lin J, Cassidy A, Martin S, Tannir NM, Tamboli P, Wood CG, Wu X. 2009. Family history and risk of renal cell carcinoma: results from a case-control study and systematic meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 18 (3):801-807.
- Claus Garbe PA, Matthias W. Beckmann. 2006. Kurzgefasste interdisziplinäre Leitlinien 2006: Empfehlungen zur Diagnostik und Therapie maligner Erkrankungen. Zuckschwerdt.
- Cohen HT, McGovern FJ. 2005. Renal-cell carcinoma. *N Engl J Med*, 353 (23):2477-2490.

- Coppin C, Kollmannsberger C, Le L, Porzsoft F, Wilt TJ. 2011. Targeted therapy for advanced renal cell cancer (RCC): a Cochrane systematic review of published randomised trials. *BJU Int*, 108 (10):1556-1563.
- Corgna E, Betti M, Gatta G, Roila F, De Mulder PH. 2007. Renal cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*, 64 (3):247-262.
- Cui Q, Yu Z, Purisima EO, Wang E. 2006. Principles of microRNA regulation of a human cellular signaling network. *Mol Syst Biol*, 2:46.
- Dai CY, Haqq CM, Puzas JE. 2006. Molecular correlates of site-specific metastasis. *Semin Radiat Oncol*, 16 (2):102-110.
- Dalgliesh GL, Furge K, Greenman C, Chen L, Bignell G, Butler A, Davies H, Edkins S, Hardy C, Latimer C, Teague J, Andrews J, Barthorpe S, Beare D, Buck G, Campbell PJ, Forbes S, Jia M, Jones D, Knott H, Kok CY, Lau KW, Leroy C, Lin ML, McBride DJ, Maddison M, Maguire S, McLay K, Menzies A, Mironenko T, Mulderrig L, Mudie L, O'Meara S, Pleasance E, Rajasingham A, Shepherd R, Smith R, Stebbings L, Stephens P, Tang G, Tarpey PS, Turrell K, Dykema KJ, Khoo SK, Petillo D, Wondergem B, Anema J, Kahnoski RJ, Teh BT, Stratton MR, Futreal PA. 2010. Systematic sequencing of renal carcinoma reveals inactivation of histone modifying genes. *Nature*, 463 (7279):360-363.
- Dang LT, Lawson ND, Fish JE. 2013. MicroRNA control of vascular endothelial growth factor signaling output during vascular development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 33 (2):193-200.
- Datta J, Kutay H, Nasser MW, Nuovo GJ, Wang B, Majumder S, Liu CG, Volinia S, Croce CM, Schmittgen TD, Ghoshal K, Jacob ST. 2008. Methylation mediated silencing of MicroRNA-1 gene and its role in hepatocellular carcinogenesis. *Cancer Res*, 68 (13):5049-5058.
- Davoren PA, McNeill RE, Lowery AJ, Kerin MJ, Miller N. 2008. Identification of suitable endogenous control genes for microRNA gene expression analysis in human breast cancer. *BMC Mol Biol*, 9:76.
- de Bont JM, Packer RJ, Michiels EM, den Boer ML, Pieters R. 2008. Biological background of pediatric medulloblastoma and ependymoma: a review from a translational research perspective. *Neuro Oncol*, 10 (6):1040-1060.
- Doench JG, Sharp PA. 2004. Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev*, 18 (5):504-511.
- Dudderidge TJ, Stoeber K, Loddo M, Atkinson G, Fanshawe T, Griffiths DF, Williams GH. 2005. Mcm2, Geminin, and Ki67 define proliferative state and are prognostic markers in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, 11 (7):2510-2517.
- Eble JN SG, Epstein JI, et al (eds.) Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs
- Eble JN SG, Epstein JI, et al (eds.) 2004b. Pathology and genetics of tumours of the urinary system and male genital organs. World Health Organization Classification of Tumours. Lyon IARC Press.
- Eichelberg C, Junker K, Ljungberg B, Moch H. 2009. Diagnostic and prognostic molecular markers for renal cell carcinoma: a critical appraisal of the current state of research and clinical applicability. *Eur Urol*, 55 (4):851-863.
- Elson PJ, Witte RS, Trump DL. 1988. Prognostic factors for survival in patients with recurrent or metastatic renal cell carcinoma. *Cancer Res*, 48 (24 Pt 1):7310-7313.

- Erler JT, Bennewith KL, Cox TR, Lang G, Bird D, Koong A, Le QT, Giaccia AJ. 2009. Hypoxia-induced lysyl oxidase is a critical mediator of bone marrow cell recruitment to form the premetastatic niche. *Cancer Cell*, 15 (1):35-44.
- Esquela-Kerscher A, Slack FJ. 2006. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*, 6 (4):259-269.
- Eulalio A, Rehwinkel J, Stricker M, Huntzinger E, Yang SF, Doerks T, Dorner S, Bork P, Boutros M, Izaurralde E. 2007. Target-specific requirements for enhancers of decapping in miRNA-mediated gene silencing. *Genes Dev*, 21 (20):2558-2570.
- Fabbri M, Ivan M, Cimmino A, Negrini M, Calin GA. 2007. Regulatory mechanisms of microRNAs involvement in cancer. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 7 (7):1009-1019.
- Faragalla H, Youssef YM, Scorilas A, Khalil B, White NM, Mejia-Guerrero S, Khella H, Jewett MA, Evans A, Lichner Z, Bjarnason G, Sugar L, Attalah MI, Yousef GM. 2012. The clinical utility of miR-21 as a diagnostic and prognostic marker for renal cell carcinoma. *J Mol Diagn*, 14 (4):385-392.
- Fidler IJ. 1978. Tumor heterogeneity and the biology of cancer invasion and metastasis. *Cancer Res*, 38 (9):2651-2660.
- Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. 2008. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet*, 9 (2):102-114.
- Flanigan RC, Mickisch G, Sylvester R, Tangen C, Van Poppel H, Crawford ED. 2004. Cytoreductive nephrectomy in patients with metastatic renal cancer: a combined analysis. *J Urol*, 171 (3):1071-1076.
- Fourquier P, Regnard JF, Rea S, Levi JF, Lévassieur P. 1997. Lung metastases of renal cell carcinoma: results of surgical resection. *Eur J Cardiothorac Surg*, 11 (1):17-21.
- Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. 2009. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*, 19 (1):92-105.
- Fuchs B, Trousdale RT, Rock MG. 2005. Solitary bony metastasis from renal cell carcinoma: significance of surgical treatment. *Clin Orthop Relat Res*, (431):187-192.
- Giraldez AJ, Mishima Y, Rihel J, Grocock RJ, Van Dongen S, Inoue K, Enright AJ, Schier AF. 2006. Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. *Science*, 312 (5770):75-79.
- Gong IH, Hwang J, Choi DK, Lee SR, Hong YK, Hong JY, Park DS, Jeon HG. 2012. Relationship among total kidney volume, renal function and age. *J Urol*, 187 (1):344-349.
- Grange C, Tapparo M, Collino F, Vitillo L, Damasco C, Deregibus MC, Tetta C, Bussolati B, Camussi G. 2011. Microvesicles released from human renal cancer stem cells stimulate angiogenesis and formation of lung premetastatic niche. *Cancer Res*, 71 (15):5346-5356.
- Griffin N, Gore ME, Sohaib SA. 2007. Imaging in metastatic renal cell carcinoma. *AJR Am J Roentgenol*, 189 (2):360-370.
- Grimson A, Farh KK, Johnston WK, Garrett-Engele P, Lim LP, Bartel DP. 2007. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell*, 27 (1):91-105.
- Guo G, Gui Y, Gao S, Tang A, Hu X, Huang Y, Jia W, Li Z, He M, Sun L, Song P, Sun X, Zhao X, Yang S, Liang C, Wan S, Zhou F, Chen C, Zhu J, Li X, Jian M, Zhou L, Ye R, Huang P, Chen J, Jiang T, Liu X, Wang Y, Zou J, Jiang Z, Wu

- R, Wu S, Fan F, Zhang Z, Liu L, Yang R, Liu X, Wu H, Yin W, Zhao X, Liu Y, Peng H, Jiang B, Feng Q, Li C, Xie J, Lu J, Kristiansen K, Li Y, Zhang X, Li S, Wang J, Yang H, Cai Z, Wang J. 2012. Frequent mutations of genes encoding ubiquitin-mediated proteolysis pathway components in clear cell renal cell carcinoma. *Nat Genet*, 44 (1):17-19.
- Gurung B, Muhammad AB, Hua X. 2014. Menin is required for optimal processing of the micro-RNA let-7a. *J Biol Chem*.
- Hafez KS, Novick AC, Campbell SC. 1997. Patterns of tumor recurrence and guidelines for followup after nephron sparing surgery for sporadic renal cell carcinoma. *J Urol*, 157 (6):2067-2070.
- Han J, Lee Y, Yeom KH, Kim YK, Jin H, Kim VN. 2004. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev*, 18 (24):3016-3027.
- Han X, Yan S, Weijie Z, Feng W, Liuxing W, Mengquan L, Qingxia F. 2014. Critical role of miR-10b in transforming growth factor-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. *Cancer Gene Ther*, 21 (2):60-67.
- Hanke M, Hoefig K, Merz H, Feller AC, Kausch I, Jocham D, Warnecke JM, Sczakiel G. 2010. A robust methodology to study urine microRNA as tumor marker: microRNA-126 and microRNA-182 are related to urinary bladder cancer. *Urol Oncol*, 28 (6):655-661.
- Hans Eugen Walther HvM. 1948. Krebsmetastasen. Basel Benno Schwab & Co.
- Heinzelmann J, Henning B, Sanjmyatav J, Posorski N, Steiner T, Wunderlich H, Gajda MR, Junker K. 2011. Specific miRNA signatures are associated with metastasis and poor prognosis in clear cell renal cell carcinoma. *World J Urol*, 29 (3):367-373.
- Helzer KT, Barnes HE, Day L, Harvey J, Billings PR, Forsyth A. 2009. Circulating tumor cells are transcriptionally similar to the primary tumor in a murine prostate model. *Cancer Res*, 69 (19):7860-7866.
- Hindman N, Ngo L, Genega EM, Melamed J, Wei J, Braza JM, Rofsky NM, Pedrosa I. 2012. Angiomyolipoma with minimal fat: can it be differentiated from clear cell renal cell carcinoma by using standard MR techniques? *Radiology*, 265 (2):468-477.
- Hiratsuka S, Watanabe A, Aburatani H, Maru Y. 2006. Tumour-mediated upregulation of chemoattractants and recruitment of myeloid cells predetermines lung metastasis. *Nat Cell Biol*, 8 (12):1369-1375.
- Hiratsuka S, Nakamura K, Iwai S, Murakami M, Itoh T, Kijima H, Shipley JM, Senior RM, Shibuya M. 2002. MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis. *Cancer Cell*, 2 (4):289-300.
- Hora M, Stransky P, Travnicek I, Urge T, Eret V, Kreuzberg B, Baxa J, Mirka H, Petersson F, Hes O, Ferda J. 2013. Three-tesla MRI biphasic angiography: a method for preoperative assessment of the vascular supply in renal tumours--a surgical perspective. *World J Urol*, 31 (5):1171-1176.
- Hui AB, Shi W, Boutros PC, Miller N, Pintilie M, Fyles T, McCready D, Wong D, Gerster K, Waldron L, Jurisica I, Penn LZ, Liu FF. 2009. Robust global micro-RNA profiling with formalin-fixed paraffin-embedded breast cancer tissues. *Lab Invest*, 89 (5):597-606.
- Hulf T, Sibbritt T, Wiklund ED, Bert S, Strbenac D, Statham AL, Robinson MD, Clark SJ. 2011. Discovery pipeline for epigenetically deregulated miRNAs in cancer: integration of primary miRNA transcription. *BMC Genomics*, 12:54.



- Humphreys DT, Westman BJ, Martin DI, Preiss T. 2005. MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102 (47):16961-16966.
- Hutvagner G, Zamore PD. 2002. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science*, 297 (5589):2056-2060.
- Ibrahim SA, Yip GW, Stock C, Pan JW, Neubauer C, Poeter M, Pupjalis D, Koo CY, Kelsch R, Schule R, Rescher U, Kiesel L, Gotte M. 2012. Targeting of syndecan-1 by microRNA miR-10b promotes breast cancer cell motility and invasiveness via a Rho-GTPase- and E-cadherin-dependent mechanism. *Int J Cancer*, 131 (6):E884-896.
- Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, Magri E, Pedriali M, Fabbri M, Campiglio M, Menard S, Palazzo JP, Rosenberg A, Musiani P, Volinia S, Nenci I, Calin GA, Querzoli P, Negrini M, Croce CM. 2005. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res*, 65 (16):7065-7070.
- Israel GM, Bosniak MA. 2005. How I do it: evaluating renal masses. *Radiology*, 236 (2):441-450.
- Israel GM, Bosniak MA. 2008. Pitfalls in renal mass evaluation and how to avoid them. *Radiographics*, 28 (5):1325-1338.
- Iwamoto H, Kanda Y, Sejima T, Osaki M, Okada F, Takenaka A. 2014. Serum miR-210 as a potential biomarker of early clear cell renal cell carcinoma. *Int J Oncol*, 44 (1):53-58.
- Jayson M, Sanders H. 1998. Increased incidence of serendipitously discovered renal cell carcinoma. *Urology*, 51 (2):203-205.
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. 2011. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 61 (2):69-90.
- Jewett MA, Mattar K, Basiuk J, Morash CG, Pautler SE, Siemens DR, Tanguay S, Rendon RA, Gleave ME, Drachenberg DE, Chow R, Chung H, Chin JL, Fleshner NE, Evans AJ, Gallie BL, Haider MA, Kachura JR, Kurban G, Fernandes K, Finelli A. 2011. Active surveillance of small renal masses: progression patterns of early stage kidney cancer. *Eur Urol*, 60 (1):39-44.
- Jiang Z, Chu PG, Woda BA, Rock KL, Liu Q, Hsieh CC, Li C, Chen W, Duan HO, McDougal S, Wu CL. 2006. Analysis of RNA-binding protein IMP3 to predict metastasis and prognosis of renal-cell carcinoma: a retrospective study. *Lancet Oncol*, 7 (7):556-564.
- Johnson CD, Esquela-Kerscher A, Stefani G, Byrom M, Kelnar K, Ovcharenko D, Wilson M, Wang X, Shelton J, Shingara J, Chin L, Brown D, Slack FJ. 2007. The let-7 microRNA represses cell proliferation pathways in human cells. *Cancer Res*, 67 (16):7713-7722.
- Jones J, Otu H, Spentzos D, Kolia S, Inan M, Beecken WD, Fellbaum C, Gu X, Joseph M, Pantuck AJ, Jonas D, Libermann TA. 2005. Gene signatures of progression and metastasis in renal cell cancer. *Clin Cancer Res*, 11 (16):5730-5739.
- Juan D, Alexe G, Antes T, Liu H, Madabhushi A, Delisi C, Ganesan S, Bhanot G, Liou LS. 2010. Identification of a microRNA panel for clear-cell kidney cancer. *Urology*, 75 (4):835-841.
- Jung M, Mollenkopf HJ, Grimm C, Wagner I, Albrecht M, Waller T, Pilarsky C, Johannsen M, Stephan C, Lehrach H, Nietfeld W, Rudel T, Jung K, Kristiansen G. 2009. MicroRNA profiling of clear cell renal cell cancer identifies

- a robust signature to define renal malignancy. *J Cell Mol Med*, 13 (9b):3918-3928.
- Kallakury BV, Karikehalli S, Haholu A, Sheehan CE, Azumi N, Ross JS. 2001. Increased expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitors of metalloproteinases 1 and 2 correlate with poor prognostic variables in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, 7 (10):3113-3119.
- Kang SY, Halvorsen OJ, Gravdal K, Bhattacharya N, Lee JM, Liu NW, Johnston BT, Johnston AB, Haukaas SA, Aamodt K, Yoo S, Akslen LA, Watnick RS. 2009. Prosaposin inhibits tumor metastasis via paracrine and endocrine stimulation of stromal p53 and Tsp-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106 (29):12115-12120.
- Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, Bramley AH, Vincent L, Costa C, MacDonald DD, Jin DK, Shido K, Kerns SA, Zhu Z, Hicklin D, Wu Y, Port JL, Altorki N, Port ER, Ruggero D, Shmelkov SV, Jensen KK, Rafii S, Lyden D. 2005. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature*, 438 (7069):820-827.
- Karube Y, Tanaka H, Osada H, Tomida S, Tatematsu Y, Yanagisawa K, Yatabe Y, Takamizawa J, Miyoshi S, Mitsudomi T, Takahashi T. 2005. Reduced expression of Dicer associated with poor prognosis in lung cancer patients. *Cancer Sci*, 96 (2):111-115.
- Kato Y, Ozawa S, Tsukuda M, Kubota E, Miyazaki K, St-Pierre Y, Hata R. 2007. Acidic extracellular pH increases calcium influx-triggered phospholipase D activity along with acidic sphingomyelinase activation to induce matrix metalloproteinase-9 expression in mouse metastatic melanoma. *Febs j*, 274 (12):3171-3183.
- Kato Y, Lambert CA, Colige AC, Mineur P, Noel A, Franken F, Foidart JM, Baba M, Hata R, Miyazaki K, Tsukuda M. 2005. Acidic extracellular pH induces matrix metalloproteinase-9 expression in mouse metastatic melanoma cells through the phospholipase D-mitogen-activated protein kinase signaling. *J Biol Chem*, 280 (12):10938-10944.
- Kim HL, Beldegrun AS, Freitas DG, Bui MH, Han KR, Dorey FJ, Figlin RA. 2003. Paraneoplastic signs and symptoms of renal cell carcinoma: implications for prognosis. *J Urol*, 170 (5):1742-1746.
- Kim S, Takahashi H, Lin WW, Descargues P, Grivennikov S, Kim Y, Luo JL, Karin M. 2009. Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis. *Nature*, 457 (7225):102-106.
- Kim VN. 2004. MicroRNA precursors in motion: exportin-5 mediates their nuclear export. *Trends Cell Biol*, 14 (4):156-159.
- Kimura M, Tomita Y, Imai T, Saito T, Katagiri A, Ohara-Mikami Y, Matsudo T, Takahashi K. 2001. Significance of serum amyloid A on the prognosis in patients with renal cell carcinoma. *Cancer*, 92 (8):2072-2075.
- Klatte T, Seligson DB, Riggs SB, Leppert JT, Berkman MK, Kleid MD, Yu H, Kabbinnar FF, Pantuck AJ, Beldegrun AS. 2007. Hypoxia-inducible factor 1 alpha in clear cell renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, 13 (24):7388-7393.
- Klatte T, Streubel B, Wrba F, Remzi M, Krammer B, de Martino M, Waldert M, Marberger M, Susani M, Haitel A. 2012. Renal cell carcinoma associated with transcription factor E3 expression and Xp11.2 translocation: incidence, characteristics, and prognosis. *Am J Clin Pathol*, 137 (5):761-768.
- Kloosterman WP, Plasterk RH. 2006. The diverse functions of microRNAs in animal development and disease. *Dev Cell*, 11 (4):441-450.
- Knippers. 2006. *Molekulare Genetik*. Georg Thieme Verlag Aufl. Stuttgart, New York.

- Kocamis H, Hossain M, Cinar MU, Salilew-Wondim D, Mohammadi-Sangcheshmeh A, Tesfaye D, Holker M, Schellander K. 2013. Expression of microRNA and microRNA processing machinery genes during early quail (*Coturnix japonica*) embryo development. *Poult Sci*, 92 (3):787-797.
- Koga S, Tsuda S, Nishikido M, Ogawa Y, Hayashi K, Hayashi T, Kanetake H. 2001. The diagnostic value of bone scan in patients with renal cell carcinoma. *J Urol*, 166 (6):2126-2128.
- Kosaka N, Izumi H, Sekine K, Ochiya T. 2010. microRNA as a new immune-regulatory agent in breast milk. *Silence*, 1 (1):7.
- Kosari F, Parker AS, Kube DM, Lohse CM, Leibovich BC, Blute ML, Cheville JC, Vasmataz G. 2005. Clear cell renal cell carcinoma: gene expression analyses identify a potential signature for tumor aggressiveness. *Clin Cancer Res*, 11 (14):5128-5139.
- Kuehbacher A, Urbich C, Dimmeler S. 2008. Targeting microRNA expression to regulate angiogenesis. *Trends Pharmacol Sci*, 29 (1):12-15.
- Kugler A, Hemmerlein B, Thelen P, Kallerhoff M, Radzun HJ, Ringert RH. 1998. Expression of metalloproteinase 2 and 9 and their inhibitors in renal cell carcinoma. *J Urol*, 160 (5):1914-1918.
- Kuhnert F, Mancuso MR, Hampton J, Stankunas K, Asano T, Chen CZ, Kuo CJ. 2008. Attribution of vascular phenotypes of the murine *Egfl7* locus to the microRNA miR-126. *Development*, 135 (24):3989-3993.
- Kumar A, Fausto. 2005. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. Elsevier Aufl. Pennsylvania.
- Kutter C, Svoboda P. 2008. miRNA, siRNA, piRNA: Knowns of the unknown. *RNA Biol*, 5 (4):181-188.
- Launonen V, Vierimaa O, Kiuru M, Isola J, Roth S, Pukkala E, Sistonen P, Herva R, Aaltonen LA. 2001. Inherited susceptibility to uterine leiomyomas and renal cell cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98 (6):3387-3392.
- Lee JH YC, Min GE et al. 2007. Comparison of the surgical outcome and renal function between radical and nephron-sparing surgery for renal cell carcinomas. *Korean J Urol* 48:671-676.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75 (5):843-854.
- Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN. 2002. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *Embo j*, 21 (17):4663-4670.
- Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN. 2004. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *Embo j*, 23 (20):4051-4060.
- Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, Kim S, Kim VN. 2003. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 425 (6956):415-419.
- Lehmann U, Hasemeier B, Christgen M, Muller M, Romermann D, Langer F, Kreipe H. 2008. Epigenetic inactivation of microRNA gene *hsa-mir-9-1* in human breast cancer. *J Pathol*, 214 (1):17-24.
- Levi F, Ferlay J, Galeone C, Lucchini F, Negri E, Boyle P, La Vecchia C. 2008. The changing pattern of kidney cancer incidence and mortality in Europe. *BJU Int*, 101 (8):949-958.
- Levy DA, Slaton JW, Swanson DA, Dinney CP. 1998. Stage specific guidelines for surveillance after radical nephrectomy for local renal cell carcinoma. *J Urol*, 159 (4):1163-1167.

- Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. 2005. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, 120 (1):15-20.
- Li M, Yu M, Liu C, Zhu H, He X, Peng S, Hua J. 2013. miR-34c works downstream of p53 leading to dairy goat male germline stem-cell (mGSCs) apoptosis. *Cell Prolif*, 46 (2):223-231.
- Li Z, Lei H, Luo M, Wang Y, Dong L, Ma Y, Liu C, Song W, Wang F, Zhang J, Shen J, Yu J. 2014. DNA methylation downregulated mir-10b acts as a tumor suppressor in gastric cancer. *Gastric Cancer*.
- Lidgren A, Hedberg Y, Grankvist K, Rasmuson T, Vasko J, Ljungberg B. 2005. The expression of hypoxia-inducible factor 1alpha is a favorable independent prognostic factor in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, 11 (3):1129-1135.
- Lidgren A, Hedberg Y, Grankvist K, Rasmuson T, Bergh A, Ljungberg B. 2006. Hypoxia-inducible factor 1alpha expression in renal cell carcinoma analyzed by tissue microarray. *Eur Urol*, 50 (6):1272-1277.
- Lim DJ, Carter MF. 1993. Computerized tomography in the preoperative staging for pulmonary metastases in patients with renal cell carcinoma. *J Urol*, 150 (4):1112-1114.
- Lim LP, Lau NC, Garrett-Engele P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, Bartel DP, Linsley PS, Johnson JM. 2005. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*, 433 (7027):769-773.
- Lindblad P. 2004. Epidemiology of renal cell carcinoma. *Scand J Surg*, 93 (2):88-96.
- Linehan WM, Pinto PA, Bratslavsky G, Pfaffenroth E, Merino M, Vocke CD, Toro JR, Bottaro D, Neckers L, Schmidt LS, Srinivasan R. 2009. Hereditary kidney cancer: unique opportunity for disease-based therapy. *Cancer*, 115 (10 Suppl):2252-2261.
- Liu J, Ye X, Wu FX. 2013a. Characterizing dynamic regulatory programs in mouse lung development and their potential association with tumorigenesis via miRNA-TF-mRNA circuits. *BMC Syst Biol*, 7 Suppl 2:S11.
- Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG, Thomson JM, Song JJ, Hammond SM, Joshua-Tor L, Hannon GJ. 2004. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science*, 305 (5689):1437-1441.
- Liu Y, Li M, Zhang G, Pang Z. 2013b. MicroRNA-10b overexpression promotes non-small cell lung cancer cell proliferation and invasion. *Eur J Med Res*, 18:41.
- Ljungberg B, Bex, Canfield, Dabestani, Hofmann, Hora, Kuczyk, Lam, Marconi, Merseburger, Mulders, Staehler, Volpe. 2013. Guidelines on Renal Cell Carcinoma. European Association of Urology 2013.
- Lodygin D, Tarasov V, Epanchintsev A, Berking C, Knyazeva T, Korner H, Knyazev P, Diebold J, Hermeking H. 2008. Inactivation of miR-34a by aberrant CpG methylation in multiple types of cancer. *Cell Cycle*, 7 (16):2591-2600.
- Lopez-Lago MA, Thodima VJ, Guttapalli A, Chan T, Heguy A, Molina AM, Reuter VE, Motzer RJ, Chaganti RS. 2010. Genomic deregulation during metastasis of renal cell carcinoma implements a myofibroblast-like program of gene expression. *Cancer Res*, 70 (23):9682-9692.
- Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR. 2005. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*, 435 (7043):834-838.

- Lytle JR, Yario TA, Steitz JA. 2007. Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104 (23):9667-9672.
- Ma X, Fan Y, Gao Y, Zhang Y, Huang Q, Ai Q, Ni D, Chen W, Zhang P, Song E, Wang B, Shi T, Zheng T, Zhang X. 2014. Dicer is down-regulated in clear cell renal cell carcinoma and in vitro Dicer knockdown enhances malignant phenotype transformation. *Urol Oncol*, 32 (1):46.e49-17.
- Maroney PA, Yu Y, Fisher J, Nilsen TW. 2006. Evidence that microRNAs are associated with translating messenger RNAs in human cells. *Nat Struct Mol Biol*, 13 (12):1102-1107.
- Marshall ME, Pearson T, Simpson W, Butler K, McRoberts W. 1990. Low incidence of asymptomatic brain metastases in patients with renal cell carcinoma. *Urology*, 36 (4):300-302.
- Masatoshi M, Masatsugu I, Jun-ichiro I, Shiro B. 2000. [An optimal follow-up protocol for renal cell carcinoma based on the occurrence of recurrences after surgery]. *Nihon Hinyokika Gakkai Zasshi*, 91 (12):700-707.
- Mathonnet G, Fabian MR, Svitkin YV, Parsyan A, Huck L, Murata T, Biffo S, Merrick WC, Darzynkiewicz E, Pillai RS, Filipowicz W, Duchaine TF, Sonenberg N. 2007. MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. *Science*, 317 (5845):1764-1767.
- McKay RR, Kroeger N, Xie W, Lee JL, Knox JJ, Bjarnason GA, MacKenzie MJ, Wood L, Srinivas S, Vaishampayan UN, Rha SY, Pal SK, Donskov F, Tantravahi SK, Rini BI, Heng DY, Choueiri TK. 2014. Impact of bone and liver metastases on patients with renal cell carcinoma treated with targeted therapy. *Eur Urol*, 65 (3):577-584.
- Miko E, Margitai Z, Czimmerer Z, Varkonyi I, Dezso B, Lanyi A, Bacso Z, Scholtz B. 2011. miR-126 inhibits proliferation of small cell lung cancer cells by targeting SLC7A5. *FEBS Lett*, 585 (8):1191-1196.
- Miller K, Bergmann L, Gschwend J, Keilholz U, Kuczyk M. 2014. [Interdisciplinary recommendations for the treatment of metastatic renal cell carcinoma]. *Aktuelle Urol*, 45 (1):39-44.
- Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB, Tewari M. 2008. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105 (30):10513-10518.
- Moch H, Schraml P, Bubendorf L, Mirlacher M, Kononen J, Gasser T, Mihatsch MJ, Kallioniemi OP, Sauter G. 1999. High-throughput tissue microarray analysis to evaluate genes uncovered by cDNA microarray screening in renal cell carcinoma. *Am J Pathol*, 154 (4):981-986.
- Monteith GR, Davis FM, Roberts-Thomson SJ. 2012. Calcium channels and pumps in cancer: changes and consequences. *J Biol Chem*, 287 (38):31666-31673.
- Motzer RJ, Mazumdar M. 2004. Predicting survival of patients with metastatic renal cell carcinoma. *Urologe A*, 43 Suppl 3:S135-136.
- Motzer RJ, Bander NH, Nanus DM. 1996. Renal-cell carcinoma. *N Engl J Med*, 335 (12):865-875.
- Motzer RJ, Mazumdar M, Bacik J, Berg W, Amsterdam A, Ferrara J. 1999. Survival and prognostic stratification of 670 patients with advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol*, 17 (8):2530-2540.

- Motzer RJ, Mazumdar M, Bacik J, Russo P, Berg WJ, Metz EM. 2000. Effect of cytokine therapy on survival for patients with advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol*, 18 (9):1928-1935.
- Naujoks M, Weiss J, Riedel T, Homberg N, Przewoznik M, Noessner E, Rocken M, Mocikat R. 2014. Alterations of costimulatory molecules and instructive cytokines expressed by dendritic cells in the microenvironment of an endogenous mouse lymphoma. *Cancer Immunol Immunother*, 63 (5):491-499.
- Nielsen CB, Shomron N, Sandberg R, Hornstein E, Kitzman J, Burge CB. 2007. Determinants of targeting by endogenous and exogenous microRNAs and siRNAs. *Rna*, 13 (11):1894-1910.
- Nottrott S, Simard MJ, Richter JD. 2006. Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. *Nat Struct Mol Biol*, 13 (12):1108-1114.
- Novara G, Ficarra V, Antonelli A, Artibani W, Bertini R, Carini M, Cosciani Cunico S, Imbimbo C, Longo N, Martignoni G, Martorana G, Minervini A, Mirone V, Montorsi F, Schiavina R, Simeone C, Serni S, Simonato A, Siracusano S, Volpe A, Carmignani G. 2010. Validation of the 2009 TNM version in a large multi-institutional cohort of patients treated for renal cell carcinoma: are further improvements needed? *Eur Urol*, 58 (4):588-595.
- Okada N, Lin CP, Ribeiro MC, Biton A, Lai G, He X, Bu P, Vogel H, Jablons DM, Keller AC, Wilkinson JE, He B, Speed TP, He L. 2014. A positive feedback between p53 and miR-34 miRNAs mediates tumor suppression. *Genes Dev*.
- Oken MM, Creech RH, Tormey DC, Horton J, Davis TE, McFadden ET, Carbone PP. 1982. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol*, 5 (6):649-655.
- Ono M, Kosaka N, Tominaga N, Yoshioka Y, Takeshita F, Takahashi RU, Yoshida M, Tsuda H, Tamura K, Ochiya T. 2014. Exosomes from bone marrow mesenchymal stem cells contain a microRNA that promotes dormancy in metastatic breast cancer cells. *Sci Signal*, 7 (332):ra63.
- Oosterwijk E, Rathmell WK, Junker K, Brannon AR, Pouliot F, Finley DS, Mulders PF, Kirkali Z, Uemura H, Belldegrun A. 2011. Basic research in kidney cancer. *Eur Urol*, 60 (4):622-633.
- Paget S. 1889. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev*, 8 (2):98-101.
- Pantuck AJ, Seligson DB, Klatte T, Yu H, Leppert JT, Moore L, O'Toole T, Gibbons J, Belldegrun AS, Figlin RA. 2007. Prognostic relevance of the mTOR pathway in renal cell carcinoma: implications for molecular patient selection for targeted therapy. *Cancer*, 109 (11):2257-2267.
- Paradis V, Lagha NB, Zeimoura L, Blanchet P, Eschwege P, Ba N, Benoit G, Jardin A, Bedossa P. 2000. Expression of vascular endothelial growth factor in renal cell carcinomas. *Virchows Arch*, 436 (4):351-356.
- Park NJ, Zhou H, Elashoff D, Henson BS, Kastratovic DA, Abemayor E, Wong DT. 2009. Salivary microRNA: discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection. *Clin Cancer Res*, 15 (17):5473-5477.
- Parker AS, Kosari F, Lohse CM, Houston Thompson R, Kwon ED, Murphy L, Riehle DL, Blute ML, Leibovich BC, Vasmataz G, Cheville JC. 2006. High expression levels of survivin protein independently predict a poor outcome for patients who undergo surgery for clear cell renal cell carcinoma. *Cancer*, 107 (1):37-45.

- Patard JJ, Leray E, Rodriguez A, Rioux-Leclercq N, Guille F, Lobel B. 2003. Correlation between symptom graduation, tumor characteristics and survival in renal cell carcinoma. *Eur Urol*, 44 (2):226-232.
- Patard JJ, Rioux-Leclercq N, Masson D, Zerrouki S, Jouan F, Collet N, Dubourg C, Lobel B, Denis M, Fergelot P. 2009. Absence of VHL gene alteration and high VEGF expression are associated with tumour aggressiveness and poor survival of renal-cell carcinoma. *Br J Cancer*, 101 (8):1417-1424.
- Pedrosa I, Sun MR, Spencer M, Genega EM, Olumi AF, Dewolf WC, Rofsky NM. 2008. MR imaging of renal masses: correlation with findings at surgery and pathologic analysis. *Radiographics*, 28 (4):985-1003.
- Pena-Llopis S, Vega-Rubin-de-Celis S, Liao A, Leng N, Pavia-Jimenez A, Wang S, Yamasaki T, Zhrebker L, Sivanand S, Spence P, Kinch L, Hambuch T, Jain S, Lotan Y, Margulis V, Sagalowsky AI, Summerour PB, Kabbani W, Wong SW, Grishin N, Laurent M, Xie XJ, Haudenschild CD, Ross MT, Bentley DR, Kapur P, Brugarolas J. 2012. BAP1 loss defines a new class of renal cell carcinoma. *Nat Genet*, 44 (7):751-759.
- Petersen CP, Bordeleau ME, Pelletier J, Sharp PA. 2006. Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol Cell*, 21 (4):533-542.
- Petillo D, Kort EJ, Anema J, Furge KA, Yang XJ, Teh BT. 2009. MicroRNA profiling of human kidney cancer subtypes. *Int J Oncol*, 35 (1):109-114.
- Petrocca F, Visone R, Onelli MR, Shah MH, Nicoloso MS, de Martino I, Iliopoulos D, Pillozzi E, Liu CG, Negrini M, Cavazzini L, Volinia S, Alder H, Ruco LP, Baldassarre G, Croce CM, Vecchione A. 2008. E2F1-regulated microRNAs impair TGFbeta-dependent cell-cycle arrest and apoptosis in gastric cancer. *Cancer Cell*, 13 (3):272-286.
- Pignot G, Elie C, Conquy S, Vieillefond A, Flam T, Zerbib M, Debre B, Amsellem-Ouazana D. 2007. Survival analysis of 130 patients with papillary renal cell carcinoma: prognostic utility of type 1 and type 2 subclassification. *Urology*, 69 (2):230-235.
- Pillai RS, Artus CG, Filipowicz W. 2004. Tethering of human Ago proteins to mRNA mimics the miRNA-mediated repression of protein synthesis. *Rna*, 10 (10):1518-1525.
- Pillai RS, Bhattacharyya SN, Artus CG, Zoller T, Cougot N, Basyuk E, Bertrand E, Filipowicz W. 2005. Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science*, 309 (5740):1573-1576.
- Poston CD, Jaffe GS, Lubensky IA, Solomon D, Zbar B, Linehan WM, Walther MM. 1995. Characterization of the renal pathology of a familial form of renal cell carcinoma associated with von Hippel-Lindau disease: clinical and molecular genetic implications. *J Urol*, 153 (1):22-26.
- Poulakis V, Witzsch U, de Vries R, Moeckel M, Becht E. 2003. Quality of life after surgery for localized renal cell carcinoma: comparison between radical nephrectomy and nephron-sparing surgery. *Urology*, 62 (5):814-820.
- Rasmuson T, Grankvist K, Jacobsen J, Olsson T, Ljungberg B. 2004. Serum insulin-like growth factor-1 is an independent predictor of prognosis in patients with renal cell carcinoma. *Acta Oncol*, 43 (8):744-748.
- Redova M, Poprach A, Nekvindova J, Iliev R, Radova L, Lakomy R, Svoboda M, Vyzula R, Slaby O. 2012. Circulating miR-378 and miR-451 in serum are potential biomarkers for renal cell carcinoma. *J Transl Med*, 10:55.

- Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G. 2000. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 403 (6772):901-906.
- Riemann A, Schneider B, Gundel D, Stock C, Thews O, Gekle M. 2014. Acidic priming enhances metastatic potential of cancer cells. *Pflugers Arch*.
- Riemann A, Schneider B, Ihling A, Nowak M, Sauvant C, Thews O, Gekle M. 2011. Acidic environment leads to ROS-induced MAPK signaling in cancer cells. *PLoS One*, 6 (7):e22445.
- Rioux-Leclercq N, Fergelot P, Zerrouki S, Leray E, Jouan F, Bellaud P, Epstein JI, Patard JJ. 2007. Plasma level and tissue expression of vascular endothelial growth factor in renal cell carcinoma: a prospective study of 50 cases. *Hum Pathol*, 38 (10):1489-1495.
- Sandock DS, Seftel AD, Resnick MI. 1995. A new protocol for the followup of renal cell carcinoma based on pathological stage. *J Urol*, 154 (1):28-31.
- Satcher RL, Pan T, Cheng CJ, Lee YC, Lin SC, Yu G, Li X, Hoang AG, Tamboli P, Jonasch E, Gallick GE, Lin SH. 2014. Cadherin-11 in renal cell carcinoma bone metastasis. *PLoS One*, 9 (2):e89880.
- Schraml P, Struckmann K, Hatz F, Sonnet S, Kully C, Gasser T, Sauter G, Mihatsch MJ, Moch H. 2002. VHL mutations and their correlation with tumour cell proliferation, microvessel density, and patient prognosis in clear cell renal cell carcinoma. *J Pathol*, 196 (2):186-193.
- Schwab A, Fabian A, Hanley PJ, Stock C. 2012. Role of ion channels and transporters in cell migration. *Physiol Rev*, 92 (4):1865-1913.
- Shah N, Sukumar S. 2010. The Hox genes and their roles in oncogenesis. *Nat Rev Cancer*, 10 (5):361-371.
- Sharifi M, Salehi R, Gheisari Y, Kazemi M. 2014. Inhibition of microRNA miR-92a induces apoptosis and inhibits cell proliferation in human acute promyelocytic leukemia through modulation of p63 expression. *Mol Biol Rep*.
- Shioi K, Komiya A, Hattori K, Huang Y, Sano F, Murakami T, Nakaigawa N, Kishida T, Kubota Y, Nagashima Y, Yao M. 2006. Vascular cell adhesion molecule 1 predicts cancer-free survival in clear cell renal carcinoma patients. *Clin Cancer Res*, 12 (24):7339-7346.
- Siewert JR. 2001. *Chirurgie*. Springer Aufl. Berlin, Heidelberg.
- Silva-Santos RM, Costa-Pinheiro P, Luis A, Antunes L, Lobo F, Oliveira J, Henriques R, Jeronimo C. 2013. MicroRNA profile: a promising ancillary tool for accurate renal cell tumour diagnosis. *Br J Cancer*, 109 (10):2646-2653.
- Simpson RJ, Lim JW, Moritz RL, Mathivanan S. 2009. Exosomes: proteomic insights and diagnostic potential. *Expert Rev Proteomics*, 6 (3):267-283.
- Slaby O, Jancovicova J, Lakomy R, Svoboda M, Poprach A, Fabian P, Kren L, Michalek J, Vyzula R. 2010. Expression of miRNA-106b in conventional renal cell carcinoma is a potential marker for prediction of early metastasis after nephrectomy. *J Exp Clin Cancer Res*, 29:90.
- Sobin LH WC. 2002. *TNM Classification of Malignant Tumors*. International Union Against Cancer (UICC), 6th edition:193-195.
- Srikrishna G. 2012. S100A8 and S100A9: new insights into their roles in malignancy. *J Innate Immun*, 4 (1):31-40.
- Staehtler MD, Kruse J, Haseke N, Stadler T, Roosen A, Karl A, Stief CG, Jauch KW, Bruns CJ. 2010. Liver resection for metastatic disease prolongs survival in renal cell carcinoma: 12-year results from a retrospective comparative analysis. *World J Urol*, 28 (4):543-547.



- Stafford HS, Saltzstein SL, Shimasaki S, Sanders C, Downs TM, Sadler GR. 2008. Racial/ethnic and gender disparities in renal cell carcinoma incidence and survival. *J Urol*, 179 (5):1704-1708.
- Staller P, Sulitkova J, Lisztwan J, Moch H, Oakeley EJ, Krek W. 2003. Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel-Lindau tumour suppressor pVHL. *Nature*, 425 (6955):307-311.
- Stock C, Gassner B, Hauck CR, Arnold H, Mally S, Eble JA, Dieterich P, Schwab A. 2005. Migration of human melanoma cells depends on extracellular pH and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange. *J Physiol*, 567 (Pt 1):225-238.
- Swartz MA, Skobe M. 2001. Lymphatic function, lymphangiogenesis, and cancer metastasis. *Microsc Res Tech*, 55 (2):92-99.
- Takwi AA, Li Y, Becker Buscaglia LE, Zhang J, Choudhury S, Park AK, Liu M, Young KH, Park WY, Martin RC, Li Y. 2012. A statin-regulated microRNA represses human c-Myc expression and function. *EMBO Mol Med*, 4 (9):896-909.
- Teixeira AL, Ferreira M, Silva J, Gomes M, Dias F, Santos JI, Mauricio J, Lobo F, Medeiros R. 2013. Higher circulating expression levels of miR-221 associated with poor overall survival in renal cell carcinoma patients. *Tumour Biol*.
- Thuma F, Zoller M. 2014. Outsmart tumor exosomes to steal the cancer initiating cell its niche. *Semin Cancer Biol*.
- Thyaviahally YB, Mahantshetty U, Chamarajanagar RS, Raibhattanavar SG, Tongaonkar HB. 2005. Management of renal cell carcinoma with solitary metastasis. *World J Surg Oncol*, 3:48.
- Toyota M, Suzuki H, Sasaki Y, Maruyama R, Imai K, Shinomura Y, Tokino T. 2008. Epigenetic silencing of microRNA-34b/c and B-cell translocation gene 4 is associated with CpG island methylation in colorectal cancer. *Cancer Res*, 68 (11):4123-4132.
- Truong HH, Xiong J, Ghotra VP, Nirmala E, Haazen L, Le Devedec SE, Balcio XfLHE, He S, Snaar-Jagalska BE, Vreugdenhil E, Meerman JH, van de Water B, Danen EH. 2014. beta1 Integrin Inhibition Elicits a Prometastatic Switch Through the TGFbeta-miR-200-ZEB Network in E-Cadherin-Positive Triple-Negative Breast Cancer. *Sci Signal*, 7 (312):ra15.
- Truong LD, Todd TD, Dhurandhar B, Ramzy I. 1999. Fine-needle aspiration of renal masses in adults: analysis of results and diagnostic problems in 108 cases. *Diagn Cytopathol*, 20 (6):339-349.
- Tsui KH, Shvarts O, Smith RB, Figlin RA, deKernion JB, Belldegrun A. 2000. Prognostic indicators for renal cell carcinoma: a multivariate analysis of 643 patients using the revised 1997 TNM staging criteria. *J Urol*, 163 (4):1090-1095; quiz 1295.
- Unwith S, Zhao H, Henna L, Ma D. 2014. The potential role of HIF on tumour progression and dissemination. *Int J Cancer*.
- Utsumi T, Suyama T, Imamura Y, Fuse M, Sakamoto S, Nihei N, Ueda T, Suzuki H, Seki N, Ichikawa T. 2014. The Association of CXCR3 and Renal Cell Carcinoma Metastasis. *J Urol*.
- Varela I, Tarpey P, Raine K, Huang D, Ong CK, Stephens P, Davies H, Jones D, Lin ML, Teague J, Bignell G, Butler A, Cho J, Dalgliesh GL, Galappaththige D, Greenman C, Hardy C, Jia M, Latimer C, Lau KW, Marshall J, McLaren S, Menzies A, Mudie L, Stebbings L, Largaespada DA, Wessels LF, Richard S, Kahnoski RJ, Anema J, Tuveson DA, Perez-Mancera PA, Mustonen V, Fischer A, Adams DJ, Rust A, Chan-on W, Subimerb C, Dykema K, Furge K, Campbell PJ, Teh BT, Stratton MR, Futreal PA. 2011. Exome sequencing

- identifies frequent mutation of the SWI/SNF complex gene PBRM1 in renal carcinoma. *Nature*, 469 (7331):539-542.
- Vasselli JR, Shih JH, Iyengar SR, Maranchie J, Riss J, Worrell R, Torres-Cabala C, Tabios R, Mariotti A, Stearman R, Merino M, Walther MM, Simon R, Klausner RD, Linehan WM. 2003. Predicting survival in patients with metastatic kidney cancer by gene-expression profiling in the primary tumor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 (12):6958-6963.
- Velickovic M, Delahunt B, McIver B, Grebe SK. 2002. Intragenic PTEN/MMAC1 loss of heterozygosity in conventional (clear-cell) renal cell carcinoma is associated with poor patient prognosis. *Mod Pathol*, 15 (5):479-485.
- Vermaat JS, van der Tweel I, Mehra N, Sleijfer S, Haanen JB, Roodhart JM, Engwegen JY, Korse CM, Langenberg MH, Kruit W, Groenewegen G, Giles RH, Schellens JH, Beijnen JH, Voest EE. 2010. Two-protein signature of novel serological markers apolipoprotein-A2 and serum amyloid alpha predicts prognosis in patients with metastatic renal cell cancer and improves the currently used prognostic survival models. *Ann Oncol*, 21 (7):1472-1481.
- Vimalraj S, Miranda PJ, Ramyakrishna B, Selvamurugan N. 2013. Regulation of breast cancer and bone metastasis by microRNAs. *Dis Markers*, 35 (5):369-387.
- Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M, Prueitt RL, Yanaihara N, Lanza G, Scarpa A, Vecchione A, Negrini M, Harris CC, Croce CM. 2006. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103 (7):2257-2261.
- Volkmer BG, Gschwend JE. 2002. Stellenwert der Metastasen Chirurgie beim metastasierten Nierenzellkarzinom. *Der Urologe A*, 41 (3):225-230.
- von Brandenstein M, Pandarakalam JJ, Kroon L, Loeser H, Herden J, Braun G, Wendland K, Dienes HP, Engelmann U, Fries JW. 2012. MicroRNA 15a, inversely correlated to PKCalpha, is a potential marker to differentiate between benign and malignant renal tumors in biopsy and urine samples. *Am J Pathol*, 180 (5):1787-1797.
- Waalkes S, Merseburger AS, Kramer MW, Herrmann TR, Wegener G, Rustemeier J, Hofmann R, Schrader M, Kuczyk MA, Schrader AJ. 2010. Obesity is associated with improved survival in patients with organ-confined clear-cell kidney cancer. *Cancer Causes Control*, 21 (11):1905-1910.
- Wakiyama M, Takimoto K, Ohara O, Yokoyama S. 2007. Let-7 microRNA-mediated mRNA deadenylation and translational repression in a mammalian cell-free system. *Genes Dev*, 21 (15):1857-1862.
- Wang X, Chen X, Wang R, Xiao P, Xu Z, Chen L, Hang W, Ruan A, Yang H, Zhang X. 2013. microRNA-200c modulates the epithelial-to-mesenchymal transition in human renal cell carcinoma metastasis. *Oncol Rep*, 30 (2):643-650.
- Wang XY, Wu MH, Liu F, Li Y, Li N, Li GY, Shen SR. 2010. Differential miRNA expression and their target genes between NGX6-positive and negative colon cancer cells. *Mol Cell Biochem*, 345 (1-2):283-290.
- Weber B, Stresmann C, Brueckner B, Lyko F. 2007. Methylation of human microRNA genes in normal and neoplastic cells. *Cell Cycle*, 6 (9):1001-1005.
- Weng L, Wu X, Gao H, Mu B, Li X, Wang JH, Guo C, Jin JM, Chen Z, Covarrubias M, Yuan YC, Weiss LM, Wu H. 2010. MicroRNA profiling of clear cell renal cell carcinoma by whole-genome small RNA deep sequencing of paired frozen

- and formalin-fixed, paraffin-embedded tissue specimens. *J Pathol*, 222 (1):41-51.
- White NM, Khella HW, Grigull J, Adzovic S, Youssef YM, Honey RJ, Stewart R, Pace KT, Bjarnason GA, Jewett MA, Evans AJ, Gabril M, Yousef GM. 2011. miRNA profiling in metastatic renal cell carcinoma reveals a tumour-suppressor effect for miR-215. *Br J Cancer*, 105 (11):1741-1749.
- Wiklund ED, Bramsen JB, Hulf T, Dyrskjot L, Ramanathan R, Hansen TB, Villadsen SB, Gao S, Ostenfeld MS, Borre M, Peter ME, Orntoft TF, Kjems J, Clark SJ. 2011. Coordinated epigenetic repression of the miR-200 family and miR-205 in invasive bladder cancer. *Int J Cancer*, 128 (6):1327-1334.
- Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. 2009. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol*, 11 (3):228-234.
- Wong CC, Gilkes DM, Zhang H, Chen J, Wei H, Chaturvedi P, Fraley SI, Wong CM, Khoo US, Ng IO, Wirtz D, Semenza GL. 2011. Hypoxia-inducible factor 1 is a master regulator of breast cancer metastatic niche formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108 (39):16369-16374.
- Wotschovsky Z, Meyer HA, Jung M, Fendler A, Wagner I, Stephan C, Busch J, Erbersdobler A, Disch AC, Mollenkopf HJ, Jung K. 2011. Reference genes for the relative quantification of microRNAs in renal cell carcinomas and their metastases. *Anal Biochem*, 417 (2):233-241.
- Wotschovsky Z, Liep J, Meyer HA, Jung M, Wagner I, Disch AC, Schaser KD, Melcher I, Kilic E, Busch J, Weikert S, Miller K, Erbersdobler A, Mollenkopf HJ, Jung K. 2012. Identification of metastamirs as metastasis-associated microRNAs in clear cell renal cell carcinomas. *Int J Biol Sci*, 8 (10):1363-1374.
- Wu L, Fan J, Belasco JG. 2006. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103 (11):4034-4039.
- Wu X, Weng L, Li X, Guo C, Pal SK, Jin JM, Li Y, Nelson RA, Mu B, Onami SH, Wu JJ, Ruel NH, Wilczynski SP, Gao H, Covarrubias M, Figlin RA, Weiss LM, Wu H. 2012. Identification of a 4-microRNA signature for clear cell renal cell carcinoma metastasis and prognosis. *PLoS One*, 7 (5):e35661.
- Wullich B. 2000. Molekulargenetische Grundlagen der Progression maligner Erkrankungen. *Der Urologe A*, 39 (3):222-227.
- Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, Seike M, Kumamoto K, Yi M, Stephens RM, Okamoto A, Yokota J, Tanaka T, Calin GA, Liu CG, Croce CM, Harris CC. 2006. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell*, 9 (3):189-198.
- Yao M, Yoshida M, Kishida T, Nakaigawa N, Baba M, Kobayashi K, Miura T, Moriyama M, Nagashima Y, Nakatani Y, Kubota Y, Kondo K. 2002. VHL tumor suppressor gene alterations associated with good prognosis in sporadic clear-cell renal carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, 94 (20):1569-1575.
- Ye SB, Li ZL, Luo DH, Huang BJ, Chen YS, Zhang XS, Cui J, Zeng YX, Li J. 2014. Tumor-derived exosomes promote tumor progression and T-cell dysfunction through the regulation of enriched exosomal microRNAs in human nasopharyngeal carcinoma. *Oncotarget*.
- Yekta S, Tabin CJ, Bartel DP. 2008. MicroRNAs in the Hox network: an apparent link to posterior prevalence. *Nat Rev Genet*, 9 (10):789-796.
- Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. 2003. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev*, 17 (24):3011-3016.

- Yildiz E, Gokce G, Kilicarslan H, Ayan S, Goze OF, Gultekin EY. 2004. Prognostic value of the expression of Ki-67, CD44 and vascular endothelial growth factor, and microvessel invasion, in renal cell carcinoma. *BJU Int*, 93 (7):1087-1093.
- Youssef YM, White NM, Grigull J, Krizova A, Samy C, Mejia-Guerrero S, Evans A, Yousef GM. 2011. Accurate molecular classification of kidney cancer subtypes using microRNA signature. *Eur Urol*, 59 (5):721-730.
- Zaman MS, Shahryari V, Deng G, Thamminana S, Saini S, Majid S, Chang I, Hirata H, Ueno K, Yamamura S, Singh K, Tanaka Y, Tabatabai ZL, Dahiya R. 2012. Up-regulation of microRNA-21 correlates with lower kidney cancer survival. *PLoS One*, 7 (2):e31060.
- Zamparese R, Pannone G, Santoro A, Lo Muzio L, Corsi F, Pedicillo MC, Scillitani EL, Tortorella S, Staibano S, Piscuoglio S, Lo Russo L, Bufo P. 2008. Survivin expression in renal cell carcinoma. *Cancer Invest*, 26 (9):929-935.
- Zerbi A, Ortolano E, Balzano G, Borri A, Beneduce AA, Di Carlo V. 2008. Pancreatic metastasis from renal cell carcinoma: which patients benefit from surgical resection? *Ann Surg Oncol*, 15 (4):1161-1168.
- Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. 2007. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol*, 302 (1):1-12.
- Zhang L, Wu X, Luo C, Chen X, Yang L, Tao J, Shi J. 2013. The 786-0 renal cancer cell-derived exosomes promote angiogenesis by downregulating the expression of hepatocyte cell adhesion molecule. *Mol Med Rep*, 8 (1):272-276.
- Zhang XM, Wang XY, Sheng SR, Wang JR, Li J. 2003. Expression of tumor related genes NGX6, NAG-7, BRD7 in gastric and colorectal cancer. *World J Gastroenterol*, 9 (8):1729-1733.
- Zhao A, Li G, Peoc'h M, Genin C, Gigante M. 2013. Serum miR-210 as a novel biomarker for molecular diagnosis of clear cell renal cell carcinoma. *Exp Mol Pathol*, 94 (1):115-120.
- Zigeuner R, Ratschek M, Rehak P, Schips L, Langner C. 2004. Value of p53 as a prognostic marker in histologic subtypes of renal cell carcinoma: a systematic analysis of primary and metastatic tumor tissue. *Urology*, 63 (4):651-655.
- Zigeuner R, Droschl N, Tauber V, Rehak P, Langner C. 2006. Biologic significance of fascin expression in clear cell renal cell carcinoma: systematic analysis of primary and metastatic tumor tissues using a tissue microarray technique. *Urology*, 68 (3):518-522.
- Zisman A, Pantuck AJ, Dorey F, Said JW, Shvarts O, Quintana D, Gitlitz BJ, deKernion JB, Figlin RA, Belldegrun AS. 2001. Improved prognostication of renal cell carcinoma using an integrated staging system. *J Clin Oncol*, 19 (6):1649-1657.

## **ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

Abbildung 1: HE-Färbung der Subtypen des NZKs (Linehan et al. 2009) .....	6
Abbildung 2: MiRNA-Biogenese, modifiziert nach (Winter et al. 2009).....	22
Abbildung 3: MiRNA-mRNA-Interaktion, modifiziert nach (Filipowicz et al. 2008) ....	23
Abbildung 4: Möglichkeiten der Regulation der Translation durch miRNAs, modifiziert nach (Filipowicz et al. 2008) .....	24
Abbildung 5: Rolle der miRNAs in Normalgewebe, als Tumorsuppressoren und Onkogene, modifiziert nach (Esquela-Kerscher und Slack 2006).....	26
Abbildung 6: Arbeitsablauf.....	36
Abbildung 7: Schematische Darstellung des Prinzips der qRT-PCR (nach Applied Biosystems).....	45
Abbildung 8: Darstellung eines Verlaufs einer Fluoreszenzkurve mittels qRT-PCR (modifiziert nach NCBI) .....	46
Abbildung 9: Beispiel für eine Verdünnungsreihe .....	47
Abbildung 10: Microarray Heatmap der miRNA-Analyse von Primärtumoren (braun) im Vergleich zu Lungenmetastasen (blau). Dargestellt sind statistisch signifikante Unterschiede im miRNA-Expressionsprofil ausgehend von GesamtRNA aus Gefriermaterial.....	49
Abbildung 11: Amplifikationskurven der Verdünnungen (1:0,2; 1:2; 1:20 und 1:200) zur Bestimmung der Effizienz am Beispiel von miR-10b .....	50
Abbildung 12: Relative Genexpression von miR-10b in Lungenmetastasen im Vergleich zu nicht metastasierten Tumoren und metastasierten Tumoren ausgehend von GesamtRNA aus Gefriermaterial .....	52

Abbildung 13: Relative Genexpression von miR-615 in Lungenmetastasen im Vergleich zu metastasierten und nicht metastasierten Tumoren ausgehend von GesamtRNA aus Gefriermaterial .....	52
Abbildung 14: Relative Genexpression von miR-33b* in Lungenmetastasen verglichen mit nicht metastasierten und metastasierten Tumoren ausgehend von GesamtRNA aus Gefriermaterial .....	53
Abbildung 15: Relative Genexpression von Lungenmetastasen verglichen mit nicht metastasierten und metastasierten Tumoren ausgehend von GesamtRNA aus Gefriermaterial.....	54
Abbildung 16: Relative Genexpression von miR-10b in Lungenmetastasen verglichen mit nicht metastasierten und metastasierten Tumoren ausgehend von GesamtRNA aus FFPE-Gewebe .....	55
Abbildung 17: Relative Genexpression von miR-615 in Lungenmetastasen im Vergleich zu metastasierten und nicht metastasierten Tumoren ausgehend von GesamtRNA aus FFPE-Gewebe .....	55
Abbildung 18: Relative Genexpression von Lungenmetastasen im Vergleich mit nicht metastasierten und metastasierten Tumoren ausgehend von GesamtRNA aus FFPE-Gewebe .....	56
Abbildung 19: Relative Genexpression von miR-199b in Lungenmetastasen verglichen mit nicht metastasierten und metastasierten Tumoren ausgehend von GesamtRNA aus FFPE-Gewebe .....	56
Abbildung 20: Relative Genexpression von miR-10b in Metastasen der Lunge und des Abdomens vs. nicht malignen Nierengeweben, nicht metastasierten Tumoren und metastasierten Tumoren ausgehend von GesamtRNA aus kryokonservierten Gewebe .....	58
Abbildung 21: Relative Genexpression von miR-10b in Lungenmetastasen, Knochenmetastasen und Gehirnmetastasen im Vergleich zu nicht metastasierten Tumoren und metastasierten Tumoren ausgehend von GesamtRNA aus FFPE-Gewebe .....	58

**Fehler! Verwenden Sie die Registerkarte 'Start', um Heading 1 dem Text zuzuweisen, der hier angezeigt werden soll.**

---

Abbildung 22: Relative Genexpression von miR-615 in Lungenmetastasen und Abdomenmetastasen vs. nicht malignen Nierengeweben, nicht metastasierten Tumoren und metastasierten Tumoren ausgehend von GesamtRNA aus kryokonservierten Gewebe ..... 59

Abbildung 23: Relative Genexpression von miR-615 in Lungenmetastasen, Knochenmetastasen und Gehirnmastasen im Vergleich zu nicht metastasierten Tumoren und metastasierten Tumoren ausgehend von GesamtRNA aus FFPE-Gewebe ..... 60

Abbildung 24: Relative Genexpression von miR-199b in Lungenmetastasen und Abdomenmetastasen im Vergleich mit nicht malignen Nierengeweben, nicht metastasierten Tumoren und metastasierten Tumoren ausgehend von GesamtRNA aus kryokonservierten Gewebe ..... 60

Abbildung 25: Relative Genexpression von miR-199b in Lungenmetastasen, Knochenmetastasen und Gehirnmastasen im Vergleich zu nicht metastasierten Tumoren und metastasierten Tumoren ausgehend von GesamtRNA aus FFPE-Gewebe ..... 61

Abbildung 26: Relative Genexpression von miR-33b\* in Lungen- und Abdomenmetastasen verglichen mit nicht malignen Nierengeweben, nicht metastasierten Tumoren und metastasierten Tumoren ausgehend von GesamtRNA aus kryokonservierten Gewebe ..... 62

Abbildung 27: Darstellung der relativen Genexpression von miR-33b\* in Lungenmetastasen, Knochenmetastasen und Gehirnmastasen im Vergleich zu nicht metastasierten Tumoren und metastasierten Tumoren ausgehend von GesamtRNA aus FFPE-Gewebe ..... 62

Abbildung 28: Adaptationsmöglichkeiten von zirkulierenden Tumorzellen in einer fremden Umgebung, modifiziert nach (Chaffer und Weinberg 2011)..... 73

## **TABELLENVERZEICHNIS**

Tabelle 1: Charakteristika der drei häufigsten NZK-Subtypen.....	7
Tabelle 2: UICC 2009, TNM 7 <sup>th</sup> Edition .....	8
Tabelle 3: UICC Stadieneinteilung des NZK der Canadian Cancer Society aktualisiert mit der UICC 7 <sup>th</sup> Auflage Dezember 2009 .....	9
Tabelle 4: Prognose unter Berücksichtigung der Stadieneinteilung (Claus Garbe 2006) .....	12
Tabelle 5: 5-Jahres-Überlebensrate in Abhängigkeit vom Grading nach Fuhrman (Tsui et al. 2000).....	12
Tabelle 6: 5-Jahres-Überlebensrate abhängig vom UISS-Stadium (Zisman et al. 2001) .....	13
Tabelle 7: Definition des ECOG PS (Oken et al. 1982) .....	13
Tabelle 8: Prognose-Score nach Motzer .....	14
Tabelle 9: mediane Überlebenszeit abhängig von der prognostischen Risikogruppe nach Motzer.....	14
Tabelle 10: Empfohlener Therapiealgorithmus Januar 2014 (Miller et al. 2014).....	17
Tabelle 11: Rezidivrate und Zeit in Monaten bis zum Rezidiv in Abhängigkeit von der Tumorausbreitung (Masatoshi et al. 2000, Sandock et al. 1995, Hafez et al. 1997, Levy et al. 1998).....	20
Tabelle 12: Klinische und histopathologische Parameter der kryokonservierten Patientenproben .....	32
Tabelle 13: Klinische und histopathologische Parameter der FFPE-Proben .....	33
Tabelle 14: Zusammensetzung des RT-Mastermix .....	42
Tabelle 15: Mastermixansatz für die qRT-PCR .....	42



**Fehler! Verwenden Sie die Registerkarte 'Start', um Heading 1 dem Text zuzuweisen, der hier angezeigt werden soll.**

---

Tabelle 16: MiRNAs mit der stärksten Expressionsänderung in Lungenmetastasen verglichen mit Primärtumoren nach Microarray-Analyse ..... 50

Tabelle 17: Amplifikationseffizienzen der miRNA-Primer von GesamtRNA aus kryokonservierten Geweben ..... 51

Tabelle 18: Amplifikationseffizienzen der miRNA-Primer von GesamtRNA aus FFPE-Proben ..... 51

**Fehler! Verwenden Sie die Registerkarte 'Start', um Heading 1 dem Text zuzuweisen, der hier angezeigt werden soll.**

---

## **EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Frau Prof. Dr. med. Junker, Frau Dr. rer. nat. Joana Heinzelmann, M. sc. Sophie Baumgart und Andre Unrein.

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 08.12.2014

Ulrike Wickmann

## **DANKSAGUNG**

Diese Promotionsarbeit war zu jeder Zeit von einer sehr guten Betreuung begleitet für die ich sehr dankbar bin. Fragen oder Probleme wurden zeitnah und kompetent auch über große örtliche Distanzen und selbst am Wochenende geklärt.

Mein Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Junker für die Unterstützung und Förderung meiner Promotionsarbeit. Des Weiteren für ihr Engagement innerhalb des urologischen Forschungslabors in Jena, wodurch eine freundliche, lehrreiche, produktive und angenehme Arbeitsatmosphäre vorhanden war.

Ebenso danke ich meiner Betreuerin Frau Dr. rer. nat. Joana Heinzelmann, die mit Freundlichkeit, Kompetenz, Ehrlichkeit und einer unfassbaren Geduld mir zu jeder Zeit eine große Stütze darstellte und für jedes Problem ein offenes Ohr bereit hielt. Auch ihrer Familie möchte ich danke sagen, dass sie mich in Homburg so nett aufgenommen haben und Joana unterstützt haben, die sicherlich durch mich einige Male zu spät und/ oder mit Arbeit nach Hause kommen musste.

Dem gesamten Team des urologischen Forschungslabors Jena möchte ich danken für die nette Zusammenarbeit und die schöne Zeit während der praktischen Laborarbeit.

Danken möchte ich meiner Familie, Lebenspartner und Freunden, die mir Liebe und Geduld entgegenbrachten und meine Launen ertragen haben, vor allem die schlechten. Meinen Eltern und meiner Schwester, die mir Sicherheit und Geborgenheit geben. Von meinen guten Freunden möchte ich Franziska Bode, Annekathrin Schenk und Benjamin Rödiger hervorheben, die mit Witz, Freude und Charakter mich in Jena all die Jahre begleitet haben.

Diese Arbeit widme ich meinen Großeltern Frau Sieglinde Wickmann und Herrn Martin Schmidt, die mir Wissenslust vorgelebt haben und mir in zahlreichen Lebenssituationen ein Vorbild sind.

## **LEBENS LAUF**

### **Persönliche Daten**

Name: Ulrike Wickmann  
Geburtsdatum: 22.03.1987  
Geburtsort: Berlin  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Anschrift: Ernst-Abbe-Straße 17, 07743 Jena  
Familienstand: ledig

### **Schul Ausbildung**

09/1993 – 07/1999 Stadtschule 2, Gransee, Grundschule  
09/1999 – 06/2007 Strittmatter-Gymnasium Gransee  
Schuljahr 2003/2004 Auslandsaufenthalt in Québec/ Kanada  
06/2007 Allgemeine Hochschulreife, Abitur

### **Studium**

seit 09/2007 Studium der Humanmedizin an der  
Friedrich-Schiller-Universität Jena