

Entwicklung und Validierung einer miRNA-Signatur zur Charakterisierung des Invasionspotentials von Harnblasentumoren

Dissertation zur Erlangung des Doktors der theoretischen Medizin (Dr. rer. med.)

der medizinischen Fakultät der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2025



vorgelegt von M. Sc. Sabrina Rau, geb. 18.05.1987 in Quierschied

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel, persönlicher Mitteilungen und der angegebenen Quellen angefertigt habe. Alle eingesetzten Methoden wurden selbstständig etabliert. Alle weiteren Experimente und sämtliche Auswertungen wurden persönlich und selbstständig durchgeführt.

Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberaterinnen/Promotionsberater oder anderer Personen) in Anspruch genommen. Es hat niemand von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder in ähnlicher Form in einem anderen Verfahren zur Erlangung des Doktorgrades einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe.

Die Bedeutung der eidesstattlichen Erklärung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Erklärung sind mir bekannt.

_____ Tholey, den 01.12.2025

Inhaltsverzeichnis

SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	2
1. ZUSAMMENFASSUNG	7
1.1 Summary,	8
2. EINLEITUNG	9
2.1 Epidemiologie der Harnblasentumore	9
2.1.1 Inzidenz	9
2.1.2 Ätiologie und Pathogenese	9
2.1.3 Krankheitsstadien	10
2.1.4 pT1 high grade Tumore	11
2.1.5 Diagnostik	11
2.1.6 Molekulare Subtypisierung	12
2.1.7 Therapie	13
2.1.8 Prognose	13
2.2 MicroRNA (miRNA)	14
2.2.1 Biogenese und miRNA-vermittelte Genregulation	14
2.2.2 Die Rolle von miRNA in Tumoren	16
2.2.1 MiRNA in Harnblasentumoren	17
2.2.2 Zirkulierende miRNA in extrazellulären Vesikeln (EV)	18
2.2.3 Potenzial der miRNA als BC-Biomarker in Gewebe und Liquid Biopsy	20
3. ZIELSTELLUNG	21
4. MATERIAL & METHODEN	22
4.1 Material	22
4.1.1 Verbrauchsmaterialien	22
4.1.2 Reagenzien & Gebrauchslösungen	23
4.1.4 Kits	24
4.1.5 Geräte & Software	24
4.1.6 Patientenkohorte	25
4.1.7 Ethikvotum	25
4.1.8 Zelllinien	26
4.2 Methoden	27
4.2.1 MiRNA Isolation	27
4.2.2 Reverse Transkription (RT-PCR)	27
4.2.3 Real-time qPCR	28
4.2.4 Normalisierung und Auswertung der Expressionsdaten	28
4.2.4.1 Effizienzermittlung	28
4.2.4.2 Referenzermittlung	29
4.2.5 Validierung des Transfektionserfolgs	30
4.2.5.1 Transiente Transfektion mit fluoreszenzmarkiertem mimic	30

4.2.5.2	Dosisabhängige Expressionslevel nach Transfektion.....	30
4.3	Statistische Tests	30
4.4	Molekulare Subtypisierung.....	30
4.5	Bioinformatische Analysen	31
4.6	Allgemeine Zellkulturmethoden	31
4.6.1	Auftauen	31
4.6.2	Subkultivierung.....	31
4.6.3	Kryokonservierung.....	32
4.6.4	Zellzählung.....	32
4.6.5	Medien.....	32
4.7	Transiente Transfektion.....	32
4.7.1	Workflow und Transfektionskontrollen.....	32
4.7.2	Kontrolle des Transfektionserfolgs	34
4.8	Funktionelle Analysen	35
4.8.1	BrdU-Assay.....	35
4.8.2	Transwell-Assays und mikroskopische Auswertung	35
4.8.3	Migration und Invasion via Transwell-Inserts.....	36
4.8.4	Visuelle Quantifizierung der Endpoint-Daten.....	37
4.8.5	Real-time cell analysis (RTCA).....	38
4.8.5.1	Migration	39
4.8.5.2	Proliferation	39
5.	ERGEBNISSE	40
5.1	Vorversuche: Normalisierung und Etablierung von Referenzen, miRNA Expressionstestung und miRNA-mimic-Transfektionsexperimente	40
5.1.1	Referenzstabilität.....	40
5.1.2	Effizienzermittlung.....	41
5.1.3	Validierung des Transfektionserfolgs	42
5.1.3.1	Transiente Transfektion mit fluoreszenzmarkiertem mimic	42
5.1.3.2	Dosisabhängige Expressionslevel nach Transfektion.....	43
5.2	Verifizierung der Vorergebnisse	44
5.2.1	Expressionslevel der miRNA in NMIBC vs. MIBC in der Etablierungskohorte.....	44
5.2.2	Expressionslevel der miRNA in NMIBC vs. MIBC in der Trainingskohorte HOM.....	44
5.2.3	Expressionslevel der miRNA in NMIBC vs. MIBC in der Testkohorte ERL	44
5.3	Vergleich der miRNA-Expression von TUR- und Zystektomiepräparaten	46
5.4	Expression der miRNA in invasiven vs. nicht-invasiven Tumorarealen.....	48
5.5	MiRNA-Expressionsprofil von pT1 G3 Tumoren in Relation zu NMIBC und MIBC.....	50
5.5.1	HOM-Kohorte	50
5.5.2	ERL-Kohorte	50
5.6	Korrelation von T-Kategorie und Differenzierungsgrad mit dem miRNA-Profil	51

5.7	Molekulare Subtypisierung.....	53
5.8	ROC Kurven-Analyse und Definition der cut-off-Werte.....	53
5.8.1	Testanwendung der cut-off-Werte: Fallbeispiel Upstaging des Tumors	55
5.9	Bioinformatische Analysen	56
5.9.1	Principle component analysis (PCA)	56
5.9.2	Gruppentrennung durch Kombination verschiedener miRNA Paare	56
5.9.3	Diagnostische Güte: Accuracy, Sensitivität & Spezifität	57
5.9.4	Vorhersage der potenziellen Invasionsfähigkeit von pT1 high grade Tumoren	60
5.10	Funktionelle Analysen	62
5.10.1	MiRNA-Expressionslevel in Zelllinien.....	62
5.10.2	Überexpression der miRNA mimics miR-200a-3p und miR-155-5p.....	63
5.10.2.1	Proliferation	63
5.10.2.2	Migration	63
		66
5.10.2.3	Invasion.....	64
6.	DISKUSSION	68
6.1	Methodenetablierung und Vorergebnisse	68
6.2	Validierung der Vordaten: miRNA-Expressionsprofil trennt NMIBC von MIBC mit hoher Genauigkeit ...	70
6.3	MiRNA-Expression von muskelinvasiven im Vergleich zu nicht-muskelinvasiven Arealen der Resektate	72
6.4	TUR-Präparate als geeignetes Probenmaterial zur Risikovorhersage	73
6.5	Analyse der pT1G3-Tumore	73
6.6	Korrelation mit histopathologischen und klinischen Merkmalen.....	74
6.7	Molekulare Subtypen sind mit dem miRNA-Expressionsprofil assoziiert	74
6.8	Diagnostische Anwendbarkeit der miRNA-Expressionsdaten	75
6.9	Validation der Aussagekraft der miRNA-Profile durch komplexe bioinformatische Analysen	76
6.10	Funktionelle Analysen	76
6.10.1	Methodenoptimierung	76
6.10.2	qPCR-Expression der miRNA in den Zellen	77
6.10.3	Überexpression von miR-200a-3p und miR-155-5p	77
6.11	Limitierungen der Arbeit	79
7.	SCHLUSSFOLGERUNG	80
8.	AUSBLICK.....	81
9.	LITERATUR.....	82

10.	PUBLIKATIONEN	90
11.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	91
12.	TABELLENVERZEICHNIS	94
13.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	96
14.	ANHANG.....	99
14.1	Gewebeexpression	99
14.2	ROC Kurven: Youden Index, sens/spez, cut-off-Werte	101
14.3	Funktionelle Assays:	112
	14.3.1 Proliferation: BrdU, RTCA Säulendiagramm	112
	14.3.2 Migration Transwell Assay	114
14.4	Bioinformatische Tests	115
15.	DANKSAGUNG	118
16.	LEBENS LAUF	119

1. Zusammenfassung

Harnblasenkrebs (BC) stellt eine häufige maligne Tumorerkrankung mit heterogenem biologischen Verhalten dar. Die Unterscheidung zwischen nicht-muskelinvasivem (NMIBC) und muskelinvasivem (MIBC) Harnblasenkrebs ist essenziell für die therapeutische Strategie und prognostische Einschätzung. MicroRNAs (miRNAs) sind kleine nicht-kodierende RNAs; sie regulieren posttranskriptional die Genexpression und könnten als Biomarker für die Tumorprogression fungieren.

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und Validierung einer miRNA-Expressionssignatur zur Klassifikation des Invasionspotentials von Harnblasentumoren, insbesondere zur Differenzierung zwischen NMIBC und MIBC sowie zur Risikostratifizierung hinsichtlich des Progressions- bzw. Invasionspotenzials von pT1 high-grade Tumoren.

Gewebeproben von Patienten mit NMIBC und MIBC sowie die Zelllinien T24, J82 und RT112 wurden untersucht. Die miRNA-Expression wurde mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) analysiert. Funktionelle Assays (BrdU-Proliferationstest, Transwell-Migrations- und Invasionsassay) wurden eingesetzt, um die biologischen Effekte der miRNAs auf Proliferation, Migration und Invasion zu evaluieren. Bioinformatische Ansätze, Receiver-Operating-Characteristic-(ROC)-Analysen und Hauptkomponentenanalysen (PCA) dienten der Validierung, der diagnostischen Präzision und der Festlegung von Schwellenwerten.

Die differenziell exprimierten miRNAs miR-138-5p, miR-146b-5p, miR-155-5p und miR-200a-3p wurden zwischen NMIBC und MIBC identifiziert und korrelierten signifikant mit Tumorstadium und Differenzierungsgrad. Funktionelle Untersuchungen zeigten, dass die Überexpression von miR-200a-3p und miR-155-5p die Proliferation, Migration und Invasion in BC-Zelllinien modulierte. Die miRNA-Signatur ermöglichte eine hochpräzise Klassifikation von NMIBC und MIBC. Schwellenwerte der einzelnen miRNAs wurden definiert, um das Progressionsrisiko bei pT1 high grade Tumoren vorherzusagen.

Die etablierte miRNA-Signatur erweist sich als potenzieller Biomarker zur Unterscheidung zwischen NMIBC und MIBC sowie zur Risikoabstufung bei pT1 high grade Tumoren. Diese Signatur könnte die klinische Entscheidungsfindung optimieren und die Basis für prospektive Studien darstellen.

1.1 Summary

Bladder cancer (BC) represents a prevalent malignancy characterized by heterogeneous biological behavior. The differentiation between non-muscle-invasive bladder cancer (NMIBC) and muscle-invasive bladder cancer (MIBC) is critical for therapeutic decision-making and prognostic assessment. MicroRNAs (miRNAs), small non-coding RNAs, regulate gene expression and hold potential as biomarkers for tumor progression.

This dissertation aimed to develop and validate a miRNA expression signature for classifying the invasive potential of bladder tumors, specifically to distinguish NMIBC from MIBC and to stratify progression risk in pT1 high-grade carcinomas.

Tissue specimens from patients with NMIBC and MIBC, alongside T24, J82, and RT112 cell lines, were analyzed. MiRNA expression was quantified via quantitative polymerase chain reaction (qPCR). Functional assays, including BrdU proliferation, Transwell migration, and invasion assays, were conducted to assess the biological impact of miRNAs on proliferation, migration, and invasion. Bioinformatic analyses, encompassing receiver operating characteristic (ROC) curves and principal component analysis (PCA), were utilized to validate diagnostic accuracy and establish cut-off values.

Differentially expressed miRNAs—miR-138-5p, miR-146b-5p, miR-155-5p, and miR-200a-3p—were identified between NMIBC and MIBC, demonstrating significant correlations with tumor stage and grade. Functional assays revealed that overexpression of miR-200a-3p and miR-155-5p modulated proliferation, migration, and invasion in BC cell lines. The miRNA signature achieved high discriminatory accuracy between NMIBC and MIBC. Defined cut-off values for individual miRNAs enabled prediction of progression risk in pT1 high-grade tumors.

The established miRNA signature emerges as a promising biomarker for differentiating NMIBC from MIBC and stratifying risk in pT1 high-grade tumors. This signature may enhance clinical decision-making and serve as a foundation for prospective investigations.

2. Einleitung

2.1 Epidemiologie der Harnblasentumore

2.1.1 Inzidenz

Das Harnblasenkarzinom (BC) ist die zehnthäufigste Tumorerkrankung weltweit, sowie der zweithäufigste Urogenitaltumor. Mindestens 95 % der Harnblasenkarzinome sind Urothelkarzinome, während mit 3-5 % die reinen Plattenepithelkarzinome selten auftreten. Weltweit werden jährlich 950.000 Neuerkrankungen bei Männern versus 240.000 bei Frauen verzeichnet¹. Die Zahlen belegen, dass Männer bis zu fünfmal häufiger betroffen sind als Frauen¹. In Deutschland erkranken jährlich ca. 16.600 Menschen an malignen Neubildungen der Harnblase. Jährlich erreicht man eine Zahl von knapp 31.000 neuen Fällen². Das mittlere Erkrankungsalter liegt zwischen 70 und 75 Jahren, weniger als 1 % der Neuerkrankungen betreffen Patienten unter 40 Jahren. Die Mortalitätsrate weltweit beträgt 3.3 bei Männern versus 0.86 bei Frauen pro 100.000 Patienten pro Jahr¹, in Deutschland 6.6 bei Männern versus 1.9 bei Frauen^{3,4}. Inzidenz wie auch Mortalitätsraten schwanken stark in unterschiedlichen Ländern. Dies ist auf Faktoren wie variierende Noxenexposition, Ernährungs- und Rauchverhalten, sowie auf gesundheitliche Aufklärung und medizinische Standards zurückzuführen¹.

2.1.2 Ätiologie und Pathogenese

Der bedeutendste Risikofaktor für die Entstehung von BC ist das Rauchen. Tabakrauch enthält aromatische Amine und polyzyklisch-aromatische Kohlenwasserstoffe, deren karzinogene Wirkung nachweislich auf direkte Schädigung der DNA und deren Reparaturmechanismen zurückzuführen ist ^{1,5,6}. Dabei steigt das Risiko exponentiell mit Zunahme des Konsums. Auch Passivrauchen, Gelegenheitsrauchen und der Konsum von E-Zigaretten sind mit der Karzinogenese assoziiert. Aromatische Amine, Kohlenwasserstoffverbindungen sowie Azofarbstoffe finden sich ebenfalls in Lacken und Pflanzenschutzmitteln. Daher sind Berufsgruppen wie u.a. Maler und Lackierer durch erhöhte Exposition stark gefährdet, ein BC zu entwickeln. Chronische Entzündungen begünstigen die Tumorentstehung, wie sie bei Steinleiden und wiederkehrenden Harnwegsinfekten vorkommen. Therapeutische Bestrahlung des kleinen Beckens, gegebenenfalls in Kombination mit systemischer Chemotherapie wie Cyclophosphamid, begünstigt ebenfalls die BC-Tumorgenese und -Progression.

BC weisen eine hohe Mutationsrate auf. Beim nicht-invasiven Harnblasenkarzinom (non-muscle invasive bladder cancer, NMIBC) sind die Gene FGFR3, HRAS, KRAS, TP53, PIK3CA und STAG2 betroffen, beim muskel-invasiven Harnblasenkarzinom (muscle invasive bladder cancer, MIBC) sind die Gene TP53, FGFR3 und RB1 hochfrequentiert betroffen. Diese Gene sind an wichtigen zellulären Prozessen wie Zellzykluskontrolle, Proliferation und Apoptose beteiligt⁷. Das BCs gilt weiterhin als der Tumor mit den drittmeisten Mutationen in Genen für homologe rekombinationsbedingte Reparatur von DNA-Schäden, wie ATM, BRCA1/2 und

CHEK2⁵. Genetische Prädisposition durch Vererbung spielt bei dieser Erkrankung eine untergeordnete Rolle, ist jedoch auch mit einem geringen Prozentsatz an der Ätiologie beteiligt. Weiterhin wurden 14 einzelne Nukleotidpolymorphismen (single nucleotide polymorphismen, SNPs) und eine Deletion im Gen GSTM1 gefunden⁸. Dementsprechend ist der Pathomechanismus der BC-Tumorgenese komplex. In 80 % der BC konnten aktivierende bzw. zu Überexpression führende FGFR3-Genmutationen nachgewiesen werden, welche mit NMIBC assoziiert sind. Auch Mutationen in den Ras-Genen HRas, KRas und NRas konnten in bis zu 15 % der NMIBC nachgewiesen werden. Die muskelinvasiven Harnblasentumore (muscle invasive bladder cancer, MIBC) dagegen weisen hochfrequent inaktivierende Mutationen der p53/Rb/PTEN-Gene auf, die mit der Induktion von Invasion und Metastasierung assoziiert sind ^{7,9–13}.

Das Rauchen ist eine der bedeutendsten bekannten Ursachen für die Entstehung von BC und kann unmittelbar die DNA der urothelialen Zellen schädigen. In Reaktion auf einen Doppelstrangbruch wird die intrinsische DNA-Reparatur-Kaskade ausgelöst, die Checkpoint-Protein-Kinase 2 (CHEK2) wirkt als Tumorsuppressor ¹⁴. Mittels retrospektiver Studien konnte eine Assoziation zwischen CHEK2-Mutation bzw. Herunterregulation und der Entstehung von BC belegt werden¹⁵. *Breyer et al.* konnten erstmals einen Zusammenhang zwischen Raucherstatus und CHEK2-Herunterregulation retrospektiv darstellen. Im Urothel gesunder Raucher wurde eine signifikante Herunterregulation von CHEK2 und ein 7.4-fach höheres Risiko zur BC-Entstehung gefunden, während im Urothel gesunder ehemaliger Raucher kein statistisch signifikanter Unterschied in der CHEK2-Expression zwischen Nichtrauchern und ehemaligen Rauchern vorlag⁶.

2.1.3 Krankheitsstadien

95 % aller BC sind maligne Veränderungen der Zellen des Urothels. Carcinoma in situ (CIS bzw. Tis im TNM-System) sind flache, schlecht differenzierte tumoröse Läsionen. Die Tumore beschränken sich bei initialer Diagnose in 75 % auf die Mukosa (Cis und pTa) oder auf die Submukosa (pT1), ca. 20-25% der NMIBC-Tumore werden initial als pT1 highgrade Tumore diagnostiziert¹⁶. Die übrigen 25 % sind bereits über die Submukosa hinaus in die Muskelschicht oder in perivesikale Strukturen eingedrungen und werden als muskelinvasive Tumore (MIBC) bezeichnet (pT2-4). pT2a Tumore sind oberflächlich in die Muscularis propria eingewachsen, während pT2b bereits tiefer in die Muskelschicht eingedrungen sind. pT3 Tumore sind über die Muskelschicht hinaus in das perivesikale Fettgewebe vorgedrungen, pT4a Tumoren sind in Prostata, Gebärmutter, Vagina und/oder den Darm eingedrungen, während T4b-Tumoren in die Becken- oder Bauchwand eingewachsen sind (*Abb.1*) ^{3,8,17–19}.

Cis-Läsionen sind zwar bei Diagnosestellung nicht invasiv, allerdings durch eine aggressive Tumorbilogie und eine bekannte Neigung zu invasiver Progression gekennzeichnet²⁰.

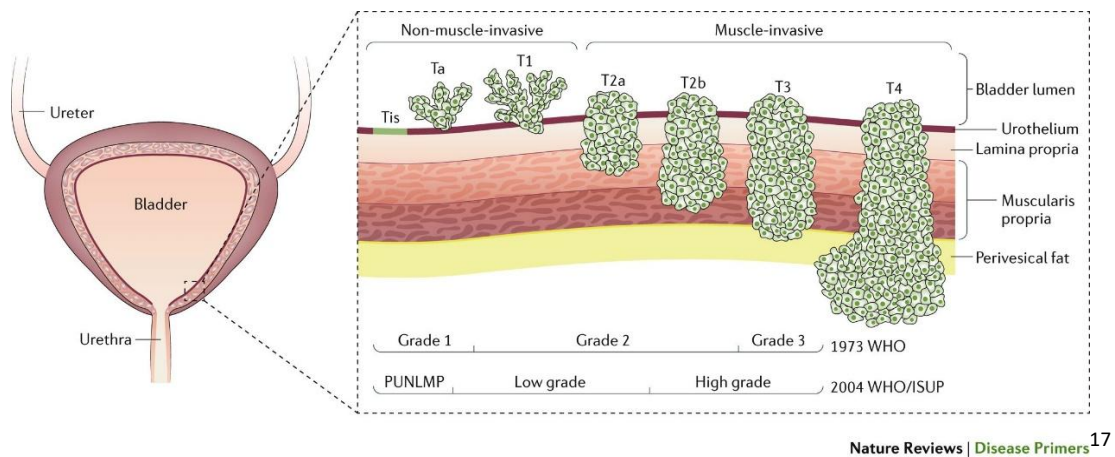


Abb.1: Arten und Stadien von Harnblasentumoren nach dem Tissue Node Metastasis (TNM) System, dem Grading System nach WHO Kriterien von 1973 (G1-G3) und nach WHO Kriterien von 2004 (PUNLMP, low grade, high grade). Quelle: Sanli, O. et al. Bladder cancer. Nat. Rev. Dis. Primer 3, 17022 (2017)

Histopathologisch wird die Lokalisation und Ausbreitung des Primärtumors mittels Union Internationale Contre le Cancer (UICC) –TNM-Klassifikation (T= Tumor; N=Nodus, Lymphknoten; M=Fernmetastase) beurteilt¹⁹. Zusätzlich erfolgt bei den NMIBC low grade Tumoren eine Risikobewertung mittels European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC) Score in niedriges, mittleres und hohes Risiko^{3,16,21,22}. Bei invasiven Tumoren erfolgt weiterhin das Grading in G1-G3 nach WHO-Klassifikation von 1973, zusätzlich eine Einteilung in papilläre Urothelmalignität mit niedrigem malignem Potenzial (papillary urothelial neoplasm of low malignant potential, PUNLMP), low grade und high grade nach den neuesten WHO-Kriterien von 2004⁸.

2.1.4 pT1 high grade Tumore

Dieses Stadium weist im Vergleich zu pTa und pT1 low grade Tumoren eine deutlich schlechtere Prognose hinsichtlich Gesamtüberleben (overall survival, OS), progressionsfreiem Überleben (progression free survival, PFS) und rezidivfreiem Überleben (recurrence free survival, RFS) auf. Innerhalb von 5 Jahren rezidivieren 84 % der pT1 high grade Tumore und in bis zu 45 % kann es zur Progression in die Muskelschicht kommen^{8,23}.

2.1.5 Diagnostik

Symptomatisch erscheinen Patienten mit überwiegend indolenter Mikrohämaturie (10-15 %) oder Makrohämaturie (68-97,5 %)⁸. Ein Symptomkomplex aus erhöhter Miktionsfrequenz, Dysurie und vermehrtem Harndrang kann auf begleitende Harnwegsinfektion, Cis oder invasive Tumorstadien hinweisen, die in besonders fortgeschrittenen Stadien bei vorhandener Harnleiterobstruktion von Flankenschmerz begleitet sein können^{3,8,19,24}. Diagnostisch werden Anamnese, körperliche Untersuchung,

bildgebende Verfahren sowie Urinzytologie appliziert. Labordiagnostisch können bereits im Harn vorhandene maligne Zellen mikroskopisch detektiert werden. Eine unauffällige Urinzytologie schließt ein low grade BC nicht aus, macht aber ein MIBC sehr unwahrscheinlich^{3,8,19,24}. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) und Immunzytologie geben eine genauere Auskunft über das Vorhandensein eines BC⁸. Biomarker wie z.B. Telomerase und Survivin zeigen spezifisch das Vorhandensein maligner Zellen an, während das nukleäre Matrixprotein 22 (NMP22) und das bladder tumor antigen (BTA) unspezifisch auf einen erhöhten Zellumsatz verweisen⁸. Letztere sind als Schnelltest oder Immunassay von der FDA zugelassen, weisen jedoch beträchtliche Schwankungen hinsichtlich Sensitivität und Spezifität auf, die u.a. durch benignen Erkrankungen wie Steinleiden in ihrer Aussagekraft stark beeinflusst werden⁸. Durch eine hohe Anzahl falsch positiver Ergebnisse sind sie somit wenig geeignet für eine zuverlässige onkologische Diagnostik^{8,18}. Weitere Marker können aufgrund mangelnder Testqualität oder mangelnder Datenlage nicht diagnostisch genutzt werden⁸. Ein Markerpanel aus NMP22/EGFR, sowie BTA/CEA wurde in Hochrisikogruppen (Alter, Raucherstatus) mit einer hohen Sensitivität von 90% beschrieben^{8,25}.

Immunhistochemisch werden die Zytokeratine 5 und 20 (CK5, CK20) auf den Zellen nachgewiesen. Sie erlauben eine grobe Einteilung in die luminalen (CK20 positiv, CK20+) oder basalen (CK5 positiv, CK5+) Subtypen und können weiterhin zur Risikobewertung herangezogen werden²⁶. Goldstandard in der BC-Diagnostik ist die Zystoskopie. Bei ausreichendem Verdacht auf ein Urothelkarzinom folgt eine transurethrale Resektion der Blase (TUR-B) und anschließend die histologische Befundung⁸.

Für nachgewiesene FGFR3-Alterationen werden spezielle FGFR3-Inhibitoren eingesetzt. Dies ist möglich dank der umfassenden wissenschaftlichen Arbeit, die über zwei Jahrzehnte lang den genauen physiologischen sowie pathophysiologischen Mechanismus von FGFR3 untersucht und mit BC-Merkmalen sowie Follow-up-Daten von Patienten korreliert hat^{9-11,13,27-29}.

2.1.6 Molekulare Subtypisierung

BC lassen sich immunhistochemisch in luminal und basal einteilen. Einem Konsensusmeeting folgend werden BC in 6 Subtypen klassifiziert: luminal papillär, luminal nicht-spezifiziert, luminal instabil, stroma-like, basal squamous und neuroendokrin-like³⁰⁻³³. Luminale Tumore gelten als gut differenziert, sowie chemoresistent. Die Expression von CK19, CK20 und Uroplakin ist charakteristisch für luminale Tumore²⁶. Es können Mutationen in den Genen FGFR3, RAS, PIK3CA und GATA-3 nachgewiesen werden³²⁻³⁴. Basale Tumore wachsen solide, sind schlecht differenziert und haben mit kurzem Langzeitüberleben eine schlechte Prognose³²⁻³⁴. Sie sind aggressiv bzw. invasiv, chemosensitiv und häufig von Cis begleitet^{32,34,35}. Onkogene Signalwege mit Beteiligung von RB1, MYC und E2F3 sind häufig betroffen³²⁻³⁸.

2.1.7 Therapie

Die Therapie des BC erfolgt abhängig von Histologie, Erkrankungsstadium und Risikobewertung. NMIBC werden via TUR-B reseziert. Bei low risk NMIBC wird zur Rezidivprävention zusätzlich eine adjuvante Instillationstherapie in Form von Chemotherapie appliziert. Tumore mit intermediate risk können zur Rezidivprävention und Progressionsverhinderung oder -verzögerung zusätzlich zur TUR-B mit einer adjuvanten Chemotherapieinstillation oder BCG-Instillation behandelt werden, high risk Tumore werden mittels TUR-B und BCG-Instillation therapiert^{8,16,19}. Metaanalysen zeigen eine Senkung der Rezidiv- und Progressionsrate durch intravesikale Immuntherapie mit BCG im Vergleich zu TUR-B ohne und mit nachfolgender Chemotherapieinstillation^{8,39–41}.

PT1 high grade Tumore stellen nach wie vor eine besondere Herausforderung hinsichtlich individueller Therapieentscheidung zwischen Organerhalt und radikaler Zystektomie dar. Nach aktuellen Leitlinien bewertet der EORTC-Score anhand von Tumoranzahl, Tumorgroße, Rezidivrate, T-Stadium, Grading und dem Vorhandensein von CIS das potenzielle Invasionsrisiko^{16,22}. Aufgrund verschiedener Einflussfaktoren, wie individueller Begutachtung durch den Pathologen, ist diese Art der Risikobewertung jedoch limitiert. Bei Zystektomie nach high risk pT1G3-Diagnose kann der Tumor in bis zu 30 % der Fälle ein Upstaging erfahren, ohne dass ein Risikofaktor mit dem Upstaging verbunden war⁴². Bei Therapieversagen und/oder dem Vorliegen eines Hochrisiko pT1 high grade Tumors kann individuell eine frühe radikale Zystektomie empfohlen werden. Bei Hochrisiko-pT1 high grade Tumoren mit zwei oder mehr Risikofaktoren, also multifokal und/oder > 3 cm groß und/oder mit gleichzeitigem CIS, kann die frühe Zystektomie empfohlen werden. Für kleine Tumore ohne CIS kann organerhaltend therapiert werden⁴².

Bei MIBC und gewünschtem Blasenerhalt kann eine vollständige TUR-B mit anschließender Radiotherapie oder Radiochemotherapie durchgeführt werden⁸. Standardtherapie des MIBC mit kurativem Ansatz ist jedoch die radikale Zystektomie mit bilateraler pelviner Lymphadenektomie⁸. Perioperativ wird je nach Tumorstadium adjuvante oder neoadjuvante Kombinations-Chemotherapie eingesetzt⁸.

Beim metastasierten BC kann in der Erstlinie cisplatinhaltige Chemotherapie oder Gemcitabin/Cisplatin eingesetzt werden⁸. Nicht-Cisplatin-geeignete Patienten können Gemcitabin/Caboplatin erhalten⁸, bei positivem PD-L1-Status können die Checkpoint-Inhibitoren Atezolizumab oder Pembrolizumab verabreicht werden⁸. Bei Progress nach platinhaltiger Erstlinien-Chemotherapie können Patienten in der Zweitlinie Checkpoint-Inhibitoren wie Pembrolizumab, Atezolizumab oder Nivolumab erhalten, bei Kontraindikation gegen Checkpointinhibitoren können Vinflunin oder alternativ Taxane verabreicht werden⁸.

2.1.8 Prognose

Die Prognose ist stark vom Krankheitsstadium bei Erstdiagnose, dem Alter und dem allgemeinen Gesundheitszustand des Patienten abhängig. PT1 Tumore weisen ein bis zu 45

%iges Progressionsrisiko auf, während bei MIBC das Metastasierungsrisiko mit der Tumortiefe korreliert⁸. Bei Metastasierung besteht auch nach radikaler Zystektomie innerhalb der ersten beiden Jahre ein Progressionsrisiko. Dabei entstehen Rezidive in 15-20 % im kleinen Becken, 10-15 % in pelvinen und retroperitonealen Lymphknoten. Von Fernmetastasierung sind zu 43 % die Leber, zu 35 % die Lunge, zu 28 % die Knochen, und die männliche Harnröhre in 5-10 % betroffen²¹.

Jedoch muss bei jedem Patienten ein Progressions- und Rezidivrisiko individuell eingeschätzt werden. Biomarker, die den möglichen Krankheitsverlauf, sowie den Therapieerfolg sicher einschätzen können, fehlen bis dato²¹.

2.2 MicroRNA (miRNA)

MiRNA sind kleine, 16-25 Nukleotid (nt) lange, nicht-kodierende RNA-Moleküle.

Die Rolle von miRNA in der posttranskriptionellen Genregulation war bis 1993 unbekannt und wurde erstmals von Victor Ambros und Gary Ruvkun beschrieben. Sie untersuchten *C. elegans* Mutanten mit Entwicklungsdefekten in der Übergangsphase vom Larven zum Erwachsenenstadium aufgrund von Alterationen in den Genloci *lin-4* und *lin-14*. Lee, Ambros *et al.* fanden heraus, dass das *lin-4*-Gen nicht für ein Protein kodierte, sondern für eine 22nt lange nicht-kodierende RNA, eine miRNA⁴³. Parallel dazu entdeckten Ruvkun *et al.*, dass *lin-4* mit der 3'-untranslated region (3'UTR) der mRNA des *lin-14*-Gens interagiert und zu einer Translationsinhibition führt⁴⁴. Mit der Entdeckung einer weiteren miRNA, *let-7*, konnte 2000 der Zusammenhang zur humanen Physiologie hergestellt werden⁴⁵. Ambros publizierten 2004 in *Nature* einen wegweisenden Review-Artikel über die posttranskriptionelle Rolle von miRNA auf die Genexpression und deren Rolle in physiologischen und möglicherweise pathophysiologischen Prozessen⁴⁶. 2024 erhielten Victor Ambros und Gary Ruvkun den Nobelpreis in der Kategorie ‚Physiologie oder Medizin‘.

MiRNA regulieren posttranskriptional ca. 60 % aller humanen Gene und nehmen Einfluss auf zelluläre Prozesse wie Proteinbiosynthese, Proliferation, Differenzierung, EMT, Metastasierung, Migration und Invasion. Veränderungen im Expressionslevel von miRNA können zu dysreguliertem zellulärem Verhalten führen und im Zuge dessen onkogene Prozesse initiieren⁴⁷⁻⁴⁹.

2.2.1 Biogenese und miRNA-vermittelte Genregulation

MiRNA werden zunächst durch die RNA-Polymerasen II als primary miRNA (pri-miRNA) transkribiert. Der microprocessor-complex, bestehend aus der RNase III Drosha und dem RNA-Bindeprotein DiGeorge syndrome critical region gene 8 (DGCR8) prozessiert die pri-miRNA in eine ca. 70 nt lange pre-miRNA mit Hairpin-Struktur, welche dann mittels EXPORTIN5 aus dem Nukleus ins Zytoplasma transportiert wird. Die RNA-Endonuklease Dicer schneidet die doppelsträngige pre-miRNA in zwei miRNA-Einzelstränge: einen miRNA-5p-Strang (Vorwärtsstrang, 5'-3') und den fast vollständig komplementären miRNA-3p-

Strang (reverser Strang 3'-5'). Die Art der weiteren Prozessierung im RNA-induced silencing complex (RISC), bestehend aus Dicer, TAR RNA-Bindeprotein (TRBP) und Argonaute (AGO) 1–4, bestimmt, welcher der beiden Einzelstränge oder ob gegebenenfalls beide Stränge funktional sind¹⁴. In der Regel ist der -5p-Strang der Leitstrang und wird zur Reifung weiter prozessiert und in der Folge biologisch aktiv, während der -3p-Folgestrang degradiert wird⁵¹. Neuere Arbeiten zeigen vermehrt, dass in einigen dysregulierten Prozessen beide Stränge funktional koexistieren und sogar unterschiedliche Zielstrukturen regulieren. Die entstandene einzelsträngige miRNA enthält an Position 2-7 des 5'-Endes die sogenannte „Seed“-Sequenz, die komplementär zur Ziel-mRNA ist⁵². Die Biogenese von miRNA ist in *Abbildung 5* grafisch dargestellt^{51–56}.

Der regulatorische Effekt von miRNA beruht auf posttranskriptioneller Inhibition der Proteinbiosynthese. MiRNA vermitteln die translationale Inhibition auf unterschiedlichen Wegen: bei vollständiger Komplementarität der Sequenzen wird die mRNA direkt durch das katalytisch aktive AGO2-Protein zerschnitten. Bei unvollständiger Komplementarität kommt es zur Rekrutierung eines Ribonukleoproteinkomplexes, des miRNA-induced silencing complex (miRISC), bestehend aus AGO2 und einem glycine-tryptophan-repeat-containing protein (GW182), welches die „silencing domain“ enthält. miRISC bindet die Ziel-mRNA sequenzspezifisch an der 3' untranslated region (3'UTR), genannt miRNA response elements (MREs). Der vollständige Mechanismus der Translationsinhibition ist weiterhin unklar, es ist jedoch bekannt, dass der miRISC-Complex an der 5'-Untereinheit der mRNA bindet, die eine Erkennungssequenz-Cap für die Ribosomen darstellt. Weiterhin wird die Ribosomenrekrutierung inhibiert, indem die 40s- und 60s-Untereinheiten blockiert und somit die Formierung zum translationsaktiven Ribosomenkomplex verhindert wird. Auch die Verdrängung der Translationsinitiationsfaktoren eukaryotic translation initiation factor 4A1 (eIF4A1) und eIF4A2 spielt eine Rolle. Weiterhin wird die mRNA durch Deadenylierung am 3'-Ende und de-Capping am 5'-Ende durch decapping-activator-DEAD-box-protein 6 (DDX6) destabilisiert und damit der Abbau beschleunigt⁵⁷.

Ein weiterer Mechanismus wurde kürzlich anhand bioinformatischer Analysen erkannt und publiziert. Dieser beschreibt eine miRNA-vermittelte Genexpressionsmodulation via miRNA-Interaktion mit der Promotorregion einer proteinkodierenden Sequenz^{51 58}. Durch diese Mechanismen nehmen miRNA indirekt Einfluss auf diverse zelluläre Prozesse. Von einer Expressionsmodulation können Proteine aller Art betroffen sein, u.a. Transkriptionsfaktoren, Kinasen und Matrixmetalloproteasen. Die miRNA-vermittelte Regulation der Genexpression ist ein flexibler physiologischer Prozess und wird unter bestimmten Umständen gerichtet verändert. So regulieren beispielsweise miR-15 den dynamischen Prozess des Knochenumbaus durch Förderung der Osteoblastendifferenzierung, während Vertreter der miR-34-Familie die Differenzierung von Osteoklasten regulieren⁵⁹.

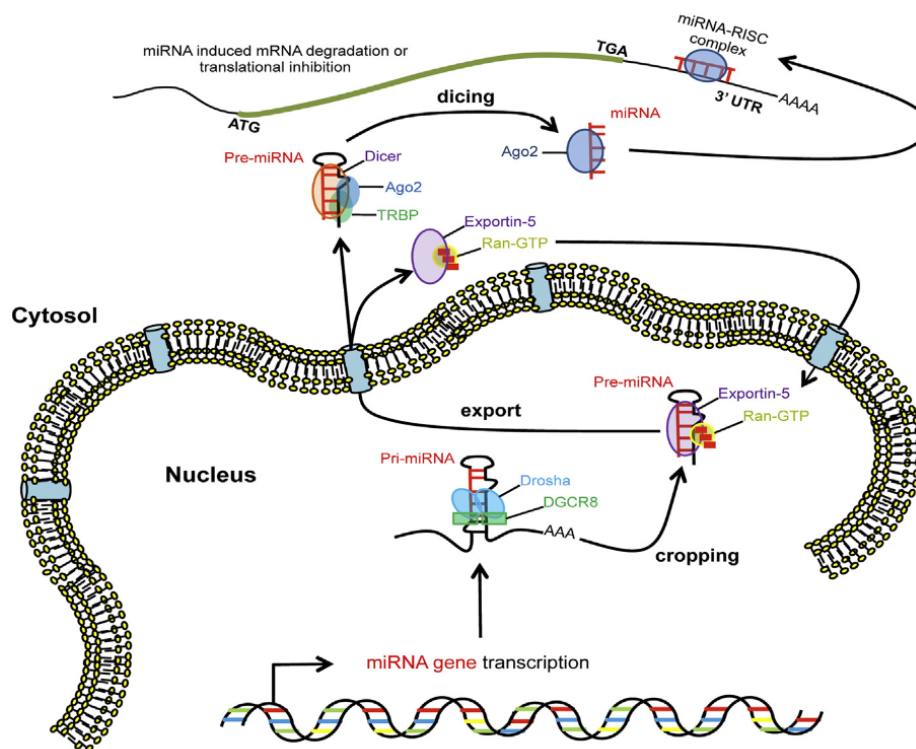


Abb.2: Schematische Darstellung der miRNA Biogenese und miRISC Aktivität zur mRNA Degradation
 Quelle: Acunzo, M., Romano, G., Wernicke, D. & Croce, C. M. MicroRNA and cancer – A brief overview. *Adv. Biol. Regul.* **57**, 1–9 (2015)

2.2.2 Die Rolle von miRNA in Tumoren

Diverse Publikationen konnten belegen, dass miRNA signifikant mit pathologischen Prozessen assoziiert sind^{60–62}. MiRNA spielen in der Tumorgenese eine entscheidende Rolle als onkogene Treiber (OncomiR) oder als Tumorsuppressoren. Dabei ist die onkogene Expressionsderegulation sowohl als miRNA-Überexpression als auch -Repression nachgewiesen. Es gibt verschiedene Deregulationswege. Eine Option ist die genomische Instabilität. Weitere Möglichkeiten sind Promotorvariationen, veränderte Methylierungsmuster und Histonmodifikation. Die Enzyme Drosha und Dicer der miRNA-Biogenese können dysfunktional agieren^{60,63}. An einigen Mechanismen sind long non-coding RNAs (lnc-RNAs) beteiligt. Lnc-RNA sind >200nt lange nicht-kodierende RNA-Moleküle. Sie deregulieren miRNA durch „sponging“, indem sie diese binden und so für die target-mRNA nicht verfügbar machen, sowie durch kompetitive Hemmung durch Bindung an der target-mRNA. Die Prozessierung von pri-miRNA kann durch Interaktion mit Drosha und Dicer gestört werden. Lnc-RNAs können die Stabilität durch gesteigerten Abbau oder Stabilisierung der miRNA beeinflussen, sowie die Expression der miRNA über Histonmodifikation beeinflussen^{64–68}. Tumorgewebe weisen einen signifikanten Unterschied im Expressionslevel spezifischer miRNA auf, verglichen mit den Expressionslevels in zugehörigem Normalgewebe. Die Konsequenz einer veränderten miRNA-Expression

hinsichtlich ihrer tumorigenen Wirkung ist vielfältig. So können diverse zelluläre Prozesse betroffen sein, die in die Initiation, Progression und Metastasierung von Tumoren münden. MiRNA-vermittelte Genexpressionskontrolle spielt eine kritische Rolle hinsichtlich der zellulären Stressantwort bei oxidativem Stress, Hypoxie und DNA-Schäden⁶³. MiRNA haben direkten Einfluss auf die Regulation von onkogenen oder tumorsuppressiven Proteinen. Die miRNA let-7 beispielsweise ist als Tumorsuppressor bekannt und infolge einer Herunterregulation mit der Entstehung von Mamma-, Kolon- und Lungentumoren assoziiert. Let-7 inhibiert die Expression der Proto-Onkogene RAS, HMGA2, MYC und KRAS und ist assoziiert mit erhöhter Tumorprogression und Metastasierung^{69–72}. Mir21 findet sich in diversen soliden Tumoren und hämatologischen Erkrankungen deutlich überexprimiert und fördert die Tumorprogression via Inhibition der Tumorsuppressoren p53 und PTEN⁷³.

2.2.1 MiRNA in Harnblasentumoren

Catto et al. (2004) untersuchten das Expressionsprofil von 322 miRNA in gesundem Urothel, sowie in low grade und high grade NMIBC und in MIBC. Sie fanden, dass miRNA-Expressionsunterschiede spezifisch für den Tumorphänotyp auftreten. Alterationen waren bereits auf molekularer Ebene erkennbar, bevor es zu histologischen Veränderungen am Gewebe kam, so konnte der Krankheitsverlauf vorhergesagt werden⁷⁴.

Baumgart et al. analysierten mittels Microarray-Analyse (*Abb.5*) die spezifischen Expressionsunterschiede zwischen NMIBC- und MIBC-Proben und fanden 63 miRNA, die in NMIBC verglichen mit MIBC-Geweben signifikant verändert exprimiert waren. Folgende fünf wurden mittels PCR quantifiziert: miR-138-5p, miR-146b-5p, miR-155-5p, miR-144-5p und miR-200a-3p. Bis auf miR-144-5p konnte die unterschiedliche Expression zwischen NMIBC und MIBC mittels qPCR validiert werden. Sie konnten weiterhin anhand der Expressionslevel eine Assoziation zum Tumorstadium (T-Kategorie) herstellen⁷⁵.

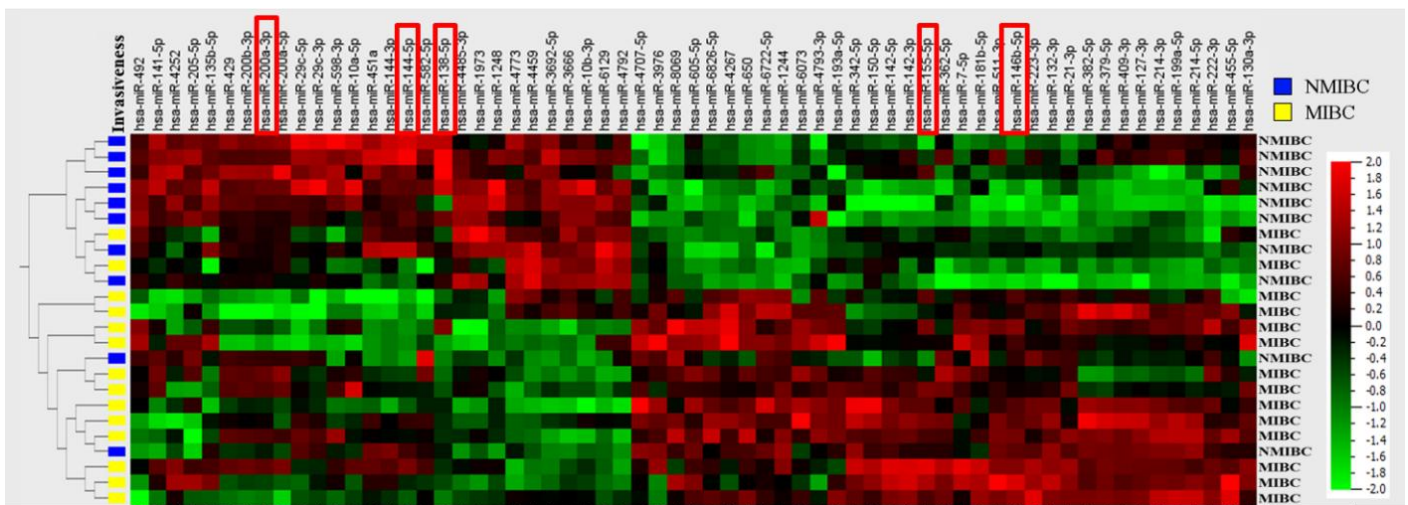


Abb.3: Heatmap der Microarray-Analyse von miRNA in NMIBC (gelb; n=10) und MIBC (blau; n=14) verglichen zu NMIBC. Die Daten wurden anhand ihrer miRNA-Expressionslevel unsupervised hierarchisch geclustert. Die Analyse zeigt 63 miRNA an, die in diesen beiden Krankheitsstadien unterschiedliche Expressionlevel aufweisen. Die durch rote Rahmen gekennzeichneten miRNA wurden zur weiteren Untersuchung ausgewählt³⁹.

Diverse Arbeiten an Harnblasenkarzinomen belegen die funktionelle Rolle von miRNA im Prozess der Tumorentstehung, Progression, Invasion und Metastasierung. Viele Arbeitsgruppen untersuchten den Unterschied der miRNA-Expression in gesundem Urothel im Vergleich zu Tumorgewebe. Weniger Daten existieren bis dato zur veränderten Expression in nicht-muskelinvasiven Tumoren verglichen mit muskelinvasiven Tumoren. Die Datenlage ist heterogen hinsichtlich individueller Signaturen und der diagnostischen Power. Das Potenzial von miRNA zur Früherkennung einer möglichen Invasion bleibt bislang unterrepräsentiert.

2.2.2 Zirkulierende miRNA in extrazellulären Vesikeln (EV)

Extrazelluläre Vesikel sind kleine Membranpartikel, die von allen Zellen sezerniert und von Empfängerzellen endozytotisch resorbiert werden können. Sie entstehen entweder durch Abschnürung aus der Plasmamembran und Freisetzung in den extrazellulären Raum (Membran „budding“) oder durch Einschnürung der Plasmamembran in die Zelle hinein. (Abb. 4). Durch Einstülpung der Plasmamembran nach innen entstehen exosomale Vesikel (Exosomen), die zu den frühen Endosomen transportiert werden und mit deren Membran verschmelzen. Während der Reifung zu späten Endosomen kommt es durch Einstülpung der Membran zur Bildung und Akkumulation von intraluminalen Vesikeln (ILV); diese Struktur wird auch als multivesikuläre Bodies (MVB) bezeichnet. Die MVBs verschmelzen mit der Plasmamembran der Zelle und ILVs werden als Exosomen freigesetzt. Sie verbreiten sich

über Körperflüssigkeiten und können so entfernte Gewebe bzw. Organe erreichen. Man unterscheidet Exosomen (50-150 nm), Mikrovesikel (100-1000 nm) und apoptotische Körperchen (>1000nm). Sie können Proteine, Lipide und Nukleinsäuren transportieren und sind im physiologischen wie auch im pathophysiologischen Zustand Modulatoren interzellulärer Kommunikation⁷⁶. Exosomen sind unter den EV die stabilsten und biokompatibelsten Partikel beim Transport innerhalb von Körperflüssigkeiten und können darüber hinaus physiologische Schranken wie die Blut-Hirn-Schranke überwinden. Exosomen spielen bei der Entstehung von Tumoren eine Rolle hinsichtlich Progression, Metastasierung und beim Umbau des TME sowie bei der Entwicklung von Therapieresistenzen, um den Tumorzellen einen Überlebensvorteil zu verschaffen⁷⁷. Das macht sie in der Onkologie zu einem vielversprechenden Biomarker zur Früherkennung, zum Therapieverlauf, sowie als therapeutisches Transportvehikel⁷⁵⁻⁷⁷.

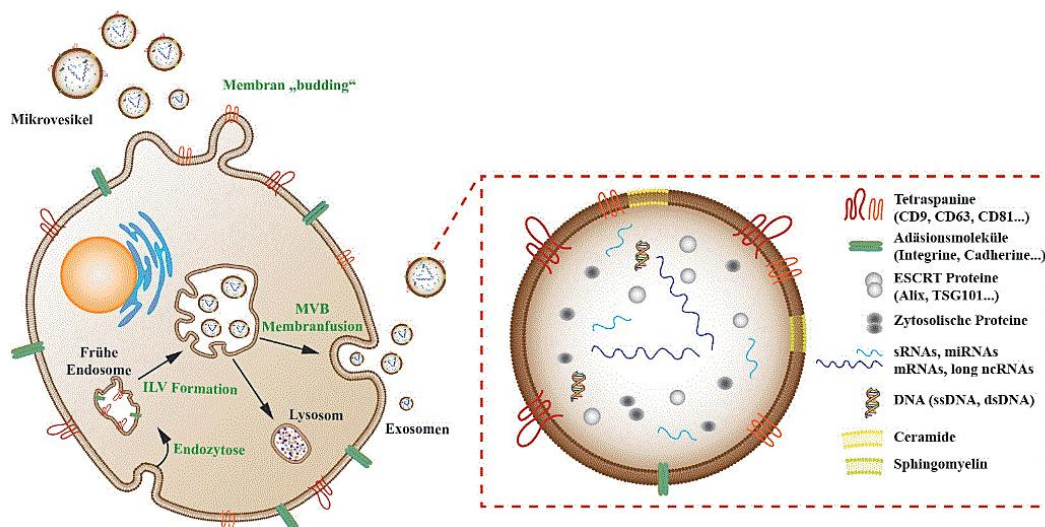


Abb.4: Schematische Darstellung der Biogenese von extrazellulären Vesikeln und der molekularen Zusammensetzung von Exosomen, in denen u.a. miRNA transportiert werden¹⁴².

Baumgart et al. beschreiben in ihren Arbeiten nicht nur die spezifische Alteration bestimmter miRNA in Harnblasenkarzinomen. Sie untersuchten den Zusammenhang von durch invasive Urothelkarzinomzelllinien sezernierten, exosomal miRNA und dem Invasionsstadium von Harnblasenkarzinomen in vitro⁷⁸. Sie zeigten eine invasionsassoziierte Signatur von 15 miRNA, die in Exosomen invasiver BC-Zellen signifikant verändert exprimiert waren. Sieben waren hochreguliert, acht herunterreguliert in invasiven im Vergleich zu nicht invasiven BC-Zellen. Weiterhin analysierten sie miRNA-Level in Tumorgewebe und in EVs aus Urin von NMIBC und MIBC. Sie fanden eine signifikant höhere Expression von exosomal miR-146b-5p und miR-155-5p im Urin von MIBC, verglichen mit NMIBC-Proben.

2.2.3 Potenzial der miRNA als BC-Biomarker in Gewebe und Liquid Biopsy

Die tumorigene wie auch tumorsuppressive Rolle von miRNA in verschiedenen soliden Tumoren und hämatologischen Neoplasien wurde intensiv untersucht. Ihre spezifische Dysregulation in Tumorgewebe und ihre hohe Stabilität in Körperflüssigkeiten wie Blut und Urin machen sie zu vielversprechenden Biomarkern hinsichtlich Früherkennung, Prognose und Therapieverlauf. Ebenso könnten sie als Angriffspunkt zielgerichteter Therapien dienen. Überexpression von onkogenen miRNAs könnte durch Inhibition reguliert werden, niedrige Expressionslevel tumorsuppressiver miRNAs könnten durch Substitution mit synthetischen „mimics“ behandelt werden^{48,51,79–83}.

Es wurden bereits klinische Studien durchgeführt, um die diagnostische Relevanz von miRNA als „liquid biomarker“ in Urin und Blut zu bewerten⁴⁷. Erkenntnisse der uroonkologischen Forschung an BC legen nahe, dass anhand von Unterschieden in der Expression spezifischer miRNA nicht nur die Tumorgenese genauer beschrieben werden, sondern auch die unterschiedlichen Progressionsstadien von Tumoren definiert werden können.

Ein systemisches Review aus 2022 identifizierte 25 relevante Arbeiten zum diagnostischen Nutzen von miRNA aus liquid biopsies von Patienten. Diese ergaben jedoch heterogene Ergebnisse und es konnte keine einheitliche miRNA-Signatur identifiziert werden, was die Notwendigkeit weiterer Forschung unterstreicht⁸⁴.

Eine Meta-Analyse aus 2024 zu Exosomen als minimalinvasive Biomarker im Urin belegte hohe Werte in der Diagnostik von BC, wobei lnc-RNA die höchste Sensitivität und miRNA die höchste Spezifität aufwiesen⁸⁵.

Die bisherigen Forschungsdaten lassen den Schluss zu, dass exosomale miRNA auch ein vielversprechender prognostischer Marker zur Identifizierung des Invasionspotenzials in die Muskelschicht sein können. Die Anwendung sowohl als diagnostischer, als auch als prognostischer Biomarker muss erst noch durch klinische Studien validiert werden.

3. Zielstellung

Ziel dieser Promotionsarbeit war die Definition und Validierung eines molekularen miRNA-Marker-Profils zur akkuraten Bewertung des Invasionspotentials von Tumoren der Harnblase. NMIBC können organerhaltend therapiert werden, während bei MIBC die radikale Zystektomie die Standardtherapie darstellt. PT1 high grade Tumore sind nicht-muskelinvasive Tumore, weisen jedoch ein bis zu 30 %iges Progressionsrisiko zur Muskelinvasion auf. Diese Tumore stellen hinsichtlich der individuellen Therapieentscheidung zwischen Organerhalt oder radikaler Zystektomie nach wie vor eine Herausforderung dar. Die aktuelle Risikobewertung bezüglich des Invasionspotentials ist limitiert, sodass molekulare Marker benötigt werden, um eine sichere Risikobewertung zu gewährleisten und damit die Therapieentscheidung zu unterstützen.

Diesem Ziel untergeordnet waren folgende Fragestellungen:

1. Können die Daten aus den Vorarbeiten validiert werden?
2. Ist die Vorhersage des Invasionspotentials bereits an TUR-Präparaten möglich?
3. Weisen muskelinvasive und nicht-muskelinvasive Areale der Resektionspräparate unterschiedliche Expressionsprofile auf?
4. Kann mittels miRNA-Profil eine Differenzierung der pT1 high grade Tumore hinsichtlich ihres Muskelinvasionsrisikos erzielt werden?
5. Spiegelt das miRNA-Profil tumorbiologische Eigenschaften wider?
6. Sind die miRNA-Expressionsprofile mit den klassischen molekularen Subtypen assoziiert?
7. Wie sicher kann das miRNA-Profil anhand von TUR-Präparaten NMIBC von MIBC trennen?
8. Kann die Aussagekraft der miRNA-Profile hinsichtlich des Invasionsrisikos durch komplexe bioinformatische Analysen validiert werden?
9. Welche funktionelle Rolle spielen die vier final ausgewählten miRNAs im Invasionsprozess von BC-Zellen?

4. Material & Methoden

4.1 Material

4.1.1 Verbrauchsmaterialien

CIM-plates	Agilent
Deckgläser	CarlRoth
DNA/RNA LoBind tubes 1,5ml, 2ml	Eppendorf
E-plates	Agilent
Handschuhe, nitril	Abena
Kanülen	
Kimtech Präzisionstücher	Kimberly-Clark Professional
Kryoröhrchen	TPP
LightCycler 480 Multiwell Plate 96, white	Roche
LightCycler480 Sealing Foil	Roche
Multistep Spitzen, combitips advanced	Eppendorf
Transwell-Inserts Invasion, FluoroBlok System (8 µm, für 12-well Platte)	Corning
Transwell-Inserts Migration, FluoroBlok System (8 µm, für 12-well Platte)	Corning
Objektträger	Langenbrinck
Pasteurpipetten, Glas	
Petrischalen	Falcon
PCR Reaktionsgefäße 8er-softstripes, 0,1ml	Biozym
Pipetten	Eppendorf, Gilson
Pipettenspitzen, gefiltert, DNase-, RNase-, Pyrogen-frei, steril	Sapphire, Greiner bio-one
Pipettenspitzen, ungefiltert	Greiner bio-one
Quadriperm, Objektträger mit vier Kammern	Sarstedt
Reaktionsgefäße 0,1ml, 0,2ml, 0,5ml, 1ml, 1,5 ml, 2ml	Eppendorf
Serologische Pipetten 2ml, 5ml, 10ml, 25ml	Greiner bio-one
Skalpell, Einweg	Braun
Transwell-Inserts (Porengröße:)	Corning
Wattestäbchen	Bellawa
Zellkulturflaschen 25cm ² , 75cm ² , 175cm ²	Greiner bio-one
Zellkulturplatten 6-, 12-, 24-well	Corning
Zellzählkammern	Biozym Scientific GmbH
Zentrifugenröhrchen 15ml, 50ml	Sarstedt AG & Co.

Tabelle 1: Verbrauchsmaterialien

4.1.2 Reagenzien & Gebrauchslösungen

Aqua dest.	Ampuwa
Aphidikulin	Calbiochem, Merck
Acid-Phenol	
Chloroform	
4',6-Diamidino-2-phenyl-indol -dihydrochlorid (DAPI)	Sigma-Aldrich
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Sigma-Aldrich
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Serva
Descocept Flächendesinfektionsmittel	VWR
Ethanol, absolut	VWR
Eosin	Sigma-Aldrich
Fetales Kälberserum (FCS)	VWR
Hämatoxylin	Sigma-Aldrich
Immersionsöl	Olympus
Kristallviolett	Sigma-Aldrich
Lipofectamin RNAiMax	Thermo Fischer Scientific
Methanol	Thermo Fischer Scientificmimic
Minimum Essential Medium Eagle (MEM)	Sigma-Aldrich
miRIDIAN microRNA Mimic Transfection Control Dy547	Horizon Discovery
Opti-MEM Zellkulturmedium	Thermo Fischer Scientific
Pufferlösung (PBS)	Sigma-Aldrich
Zellkultur Objektträger	Merck
RNaseZAP	Sigma-Aldrich
RPMI Zellkulturmedium	Sigma-Aldrich
Syn-hsa-miR-155-5p miScript miRNA Mimic	Qiagen
Syn-hsa-miR-200a-3p miScript miRNA Mimic	Qiagen
TaqMan MicroRNA Assay RNU48, ID: 001006	Thermo Fischer Scientific
TaqMan MicroRNA Assay hsa-miR-191-5p, ID: 002299	Thermo Fischer Scientific
TaqMan MicroRNA Assay hsa-miR-361-5p, ID: 000554	Thermo Fischer Scientific
TaqMan MicroRNA Assay hsa-miR-138-5p, ID: 002284	Thermo Fischer Scientific
TaqMan MicroRNA Assay hsa-miR-146b-5p; ID: 474220	Thermo Fischer Scientific
TaqMan MicroRNA Assay hsa-miR-155-5p; ID: 467534	Thermo Fischer Scientific
TaqMan MicroRNA Assay hsa-miR-200a-3p; ID: 000502	Thermo Fischer Scientific
Trypanblau 0,4%	Sigma-Aldrich
Trypsin	Sigma-Aldrich

Tabelle 2: Reagenzien und Gebrauchslösungen

4.1.4 Kits

Cell Proliferation ELISA BrdU (Colometric)	Roche
miRNeasy Isolationskit für FFPE Gewebe	Qiagen
miRNeasy Isolationskit für Zellen	Qiagen
TaqMan microRNA RT Kit, 1000 reactions	Applied Biosystems/Thermofisher Scientific

Tabelle 3: Kits

4.1.5 Geräte & Software

Absaughilfe	Integra
Fluoreszenzmikroskop ECLIPSE T100	Nikon
GraphPad Prism 9	GraphPad Software, Inc
ImageJ	Open Source
LightCycler® 480	Roche/ Lifescience Mannheim
LightCycler® Software 1.5.1	Roche/ Lifescience Mannheim
LUNA-II™	Logos Biosystems
Mikroskop Axiovert S	Zeiss
Mikroskop ECLIPSE Ci	Nikon
Mikrotom	Leica
Mikrotomklinge S35, Einweg	Feather
Multisteppipette analog	Eppendorf
Multisteppipette digital	Eppendorf
Nikon NIS-Elements BR5.02.01	Nikon
NormFinder	Open Source, Department of Molecular Medicine, Aarhus
Platten-Reader Infiniti F200 pro	Tecan
Pipettierhilfe	Integra
RTCA Software Pro	Agilent, OMNI Life Science (OLS)
Spektrophotometer NanoDrop® ND-1000	Peqlab
Thermomixer comfort	Eppendorf
Thermocycler UNO II	Biometra
Tischzentrifuge	Biozym
Tischzentrifuge Mini SPin	Eppendorf
Vortexer, Vortex gene 2	Scientific Industries
Wasserbad	pfm medical
xCelligence® real time cell analyser (RTCA)	Agilent, OMNI Life Science (OLS)
Zentrifuge 5804R	Eppendorf
Zotero	Open Source

Tabelle 4: Geräte und Software

4.1.6 Patientenkohorte

Zur Untersuchung der ausgewählten miRNA wurden multizentrisch formalinfixierte, in Paraffin eingebettete (FFPE) Tumorgewebe von Patienten verwendet.

Zur methodischen Etablierung wurden zunächst FFPE-TUR-B-Präparate von pTa low grade Tumoren (n=10) und FFPE-Zystektomie-Präparate von pT2-4 Tumoren (n=13) von Patienten untersucht, die vor 2016 in der Klinik für Urologie und Kinderurologie in Homburg behandelt wurden, im Folgenden als Etablierungskohorte bezeichnet.

Die Trainingskohorte oder Homburger-(HOM)-Kohorte besteht aus Patienten, die in der Klinik für Urologie und Kinderurologie in Homburg ab 2016 behandelt wurden. TUR-B Präparate und/oder Zystektomie-Präparate beider Kohorten wurden vom Institut für Pathologie der Uniklinik Homburg zur Verfügung gestellt. Klinische und histologische Daten wurden der klinikinternen Datenbank entnommen. Die Trainingskohorte setzt sich zusammen aus den TUR-Präparaten von NMIBC (pTa low grade; n=27), invasiven (inv) und nicht-invasiven (ninv) Anteilen von MIBC (pT2-4; n=46;) nach TUR (n=16; inv n=16; ninv n=3) oder Zystektomie (n=23; inv n=22; ninv n=2), invasiven und nicht-invasiven Anteilen von pT1G3 (n=43) nach TUR (n=28; inv n=24; ninv n=21) oder Zystektomie (n=15; inv n=8; ninv n=11). Tumorfrees Urothel (n=10) von tumortragenden Harnblasen wurde ebenfalls untersucht.

Die pT1 high grade und die pT2-4 Gewebe wurden anhand eines 4µm HE-Schnitts von einem Pathologen hinsichtlich nicht-invasiver und invasiver Areale bewertet; nicht-invasive Areale wurden grün markiert, invasive Areale wurden schwarz markiert. So konnten diese Areale separat isoliert und untersucht werden (*Abb.7*).

Die Testkohorte oder Erlanger-(ERL)-Kohorte umfasst TUR-B-Präparate von NMIBC (pTa low grade; n=86), MIBC (pT2-4; n=90) nach TUR (n=16) oder Zystektomie (n=74) und pT1G3 nach TUR (n=108).

4.1.7 Ethikvotum

Analyse der microRNA-Expression und Identifizierung von Zielgenen in urologischen Tumoren (Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes: 162/13)

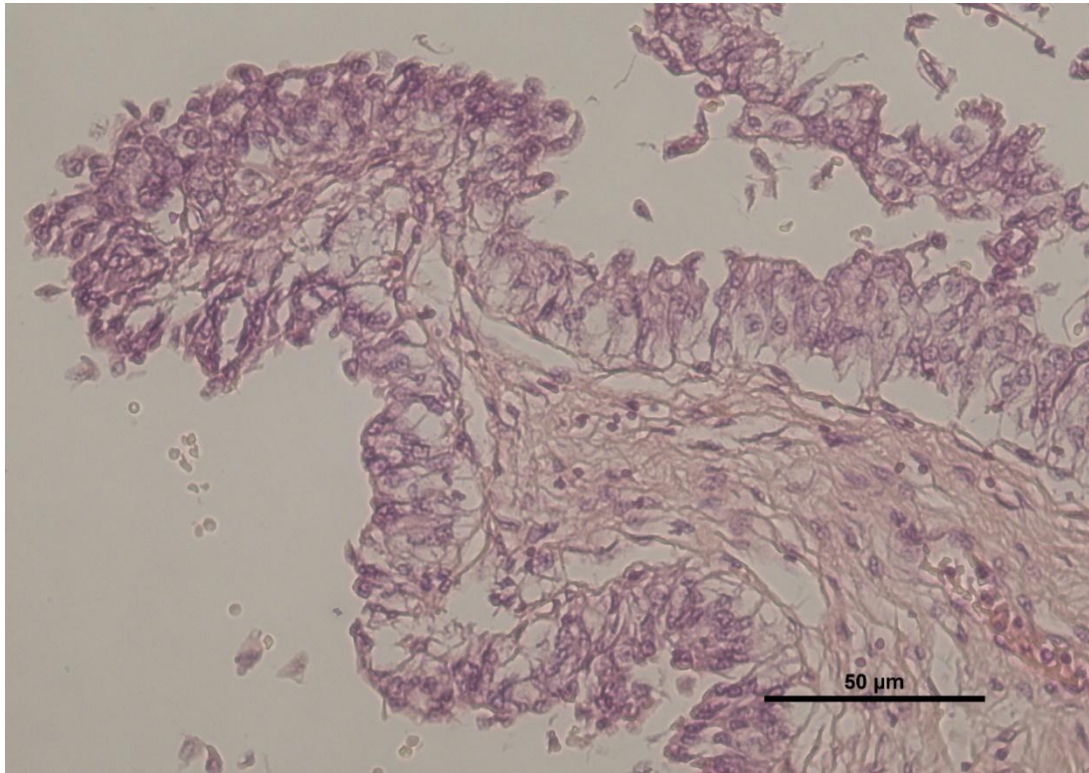


Abb. 5: Nicht-invasives Areal eines MIBC Zystektomiepräparates. Das entartete Urothel der tumor-tragenden Harnblase ist erkennbar an diversen Zelltypen. HE, 40x.

4.1.8 Zelllinien

In *Tabelle 1* werden allgemeine und molekulare Charakteristika der fünf verwendeten Zelllinien aufgeführt⁸⁶. HCV-29 wurde als gesunde Kontrolle eingesetzt, während die Zelllinien T24 und J82 als in vitro Modell für invasive BC, RT112 und 5637 für nicht-invasive BC verwendet wurden.

Cell line	Year	Gender	Stage	Grade	Histology	FGFR3	PIK3CA	HRAS	TERT	CDKN2A	TP53	Subtype
5637	1974	male	nr	G2	nr							
HCV-29*	1971	male	na	na	urothelium							
J82	1972	male	pT3	G3	UCC							
RT-112	1977	female	pTa	G2	UCC							
T24	1970	female	pTa	G3	UCC							
nr = not reported					Wild type	Molecular subtype						
na = not applicable					Genetic aberrations	Luminal						
ucc = urothelial cell carcinoma					Unknown	Basal						
*biopsy after radiotherapy					Mixed reports	Mixed						

Tabelle 5: Allgemeine und molekulare Charakteristika der verwendeten Zelllinien T24, J82, RT112, 5637 und HCV-29 58

4.2 Methoden

4.2.1 MiRNA Isolation

Von den FFPE-Gewebeproben der HOM-Kohorte wurden jeweils 5-10x 7 µm Schnitte erzeugt, auf Objektträger aufgezogen und im noch feuchten Zustand „gekratzt“: nach dem Muster des eingezeichneten HE-Schnitts wurden die invasiven und nicht-invasiven Tumoreareale separat mit einem Skalpell aus dem Schnitt separiert. Die Proben der ERL-Kohorte wurden uns als 10x7 µm Schnitte zugesandt; hiervon wurden je nach Größe des Areals 5-7 Schnitte nach Vorgabe der eingezeichneten Tumoreareale trocken gekratzt, die Gewebepartikel in Eppendorftubes 2min in Xylol entparaffiniert und in 100% Ethanol (EtOH) 2min, 70% EtOH 2min und 2x 2min Aqua dest. rehydriert. Aus dem freigelegten Tumorgewebe wurde mittels Qiagen-miRNeasy-Kit miRNA isoliert⁸⁷ und in 50µl RNase-freiem ddH₂O eluiert. Der RNA-Gehalt des Eluats wurde mittels NanoDrop spektrometrisch quantifiziert und auf 2ng/µl verdünnt.

4.2.2 Reverse Transkription (RT-PCR)

Zur Analyse der miRNA-Expression via qPCR wurden die miRNA-Proben mit spezifischen Primern für jede Referenz und jedes Target separat in cDNA umgeschrieben. Dazu verwendeten wir ein TaqMan-miRNA-RT-Kit, das dNTPs, Reverse Transkriptase, RNase-Inhibitor und Puffer enthält, und erstellten daraus einen Mastermix pro Reaktion wie in *Tabelle 2*, von dem jeweils 7µl Reaktion gebracht werden. Weiterhin kommen zu dem Ansatz 3µl des jeweiligen Primers (5x), sowie 5µl der 2ng/µl miRNA-Verdünnung hinzu, sodass ein Reaktionsvolumen von 15µl mit final 10ng miRNA vorliegt. Die cDNA entsteht in einem Standard-Cycler nach dem Protokoll in *Tabelle 3*.

Reagenz	1x
100mM dNTPs	0.15 µl
Multiscribe reverse transcriptase 50U/ul	1.00 µl
10x RT buffer	1.50 µl
RNase Inhibitor 20U/ul	0.19 µl
Nuclease free water	4.16 µl

Tabelle 6: Protokoll zur Erstellung eines Mastermix für die reverse Transkription von miRNA in cDNA.

Reverse Transkription	16°C 30min 42°C 30min
Stop	85°C 5min
Hold	4°C ∞

Tabelle 7: PCR-Cycle-Programm für die reverse Transkription von miRNA in cDNA.

4.2.3 Real-time qPCR

Zur Quantifizierung der jeweiligen miRNA wurde ein Mastermix separat für jede Referenz und jedes Target mit 0,5µl des jeweiligen Primers (20x), 5µl Fast Advanced Mastermix und 3,5µl ddH₂O erstellt. Von dem Mastermix wurden 18µl zusammen mit 2µl cDNA, im 50%-Ansatz wurden 9 µl Mastermix mit 1µl cDNA in Reaktion gebracht. Der 50%-Ansatz entspricht exakt der Hälfte des eingesetzten Reaktionsvolumens und wurde mittels Etablierungskohorte validiert. Es wurden identische Expressionsdaten je Probe entsprechend dem 100%-Ansatz gemessen. Zur Einsparung von Reagenzien und Probenmaterial wurde dieser Ansatz für alle folgenden qPCR-Runs verwendet. Jede Probe wurde im Triplikat gemessen, laut Programm in *Tabelle 4*.

Enzymaktivierung	95°C 20sec
Amplifikation: 40 Zyklen	95°C 3sec 60°C 1min
Stop	37°C 1min
Hold	4°C ∞

Tabelle 8: PCR-Cycle-Programm für die reverse Transkription von miRNA in cDNA

4.2.4 Normalisierung und Auswertung der Expressionsdaten

Der LightCycler ermittelt Expressionslevel als crossing points (CP). Die Normalisierung der CP-Werte erfolgte über die $\Delta\Delta\text{CP}$ -Methode nach Livak, indem aus den Mittelwerten (MW) der Triplikate ein ΔCP aus der Differenz $\text{CP}_{(\text{Target})} - \text{CP}_{(\text{Referenz})}$ gebildet wurde. Die ΔCP -Werte wurden mit (-1) multipliziert und als $-\Delta\text{CP}$ zur statistischen Auswertung und grafischen Darstellung verwendet. Dieser Schritt dient dazu, die Werte proportional zu ihrem tatsächlichen Expressionslevel grafisch darstellen zu können. Auch die cut-off Werte wurden aus den $-\Delta\text{CP}$ -Daten generiert.

Die relative Expression ($\Delta\Delta\text{CP}$) wurde via $\Delta\Delta\text{CP} = \text{MW } \Delta\text{CP}_{(\text{Behandlung})} - \text{MW } \Delta\text{CP}_{(\text{Kontrolle})}$ ermittelt. In dieser Arbeit wurden keine Behandlungs- und Kontrolldaten erhoben, sondern verschiedene Stadien des BC gegeneinander verglichen und es werden verschiedene Konditionen innerhalb der Zellkulturexperimente untersucht. Die relativen Expressionsunterschiede wurden als Foldchange (fch) angegeben, der sich folgendermaßen berechnet: $\text{fch} = 2^{-\Delta\Delta\text{CP}}$.⁸⁸

4.2.4.1 Effizienzermittlung

Die $\Delta\Delta\text{CP}$ -Methode nach Livak hat den Nachteil, dass sie eine akkurate Verdopplung der Moleküle pro Zyklus voraussetzt, was einer Effizienz von 2 ($E = 2$) entspricht. Die reale Effizienz der qPCR erreicht jedoch unter optimierten Bedingungen Werte von $E = 1,7 - 1,9$ mit einer Schwankungsbreite von $1,5 - 2,1$. Um die qPCR-Daten international und auch zwischen einzelnen Anwendern transparent und reproduzierbar zu generieren, wird nach

MIQE-Guidelines^{89 88} empfohlen, die Effizienzen aller Primer zu ermitteln und gegebenenfalls eine Effizienzkorrektur zu applizieren⁹⁰.

Die Ermittlung der einzelnen Primer-Effizienz erfolgt über eine Standardkurve. Die Steigung der Standardkurve beschreibt die Kinetik der PCR-Amplifikation und gilt als Effizienz der Amplifikationsreaktion bzw. des jeweiligen Primers. Eine perfekte Amplifikation würde eine Standardkurve mit einer Steigung von "2" erzeugen; das bedeutet, dass sich mit jedem Zyklus die Templatemenge optimal verdoppelt. Die reale PCR-Effizienz wird mit folgender Formel berechnet:

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

$$\text{Beispiel: Steigung} = -3,036 \rightarrow E = 10^{-1/-3.036} \rightarrow E = 2,084$$

$$1.7 \triangleq 70\% \text{ Effizienz}$$

$$1.93 \triangleq 93\% \text{ Effizienz}$$

$$2.0 \triangleq 100\% \text{ Effizienz}$$

Es wurden fünf Proben unterschiedlicher Tumorstadien des BC ausgewählt und die miRNA laut Standard-RT-Protokoll in cDNA umgeschrieben. Im nächsten Schritt erfolgte eine Präamplifikation mittels Standard-qPCR-Protokoll im Thermocycler. Sinn der Prä-Amplifikation ist es, genügend Template zu erzeugen, um eine sinnvolle Standardkurve erstellen zu können. Bei der Erstellung einer Standardkurve mittels LightCycler sollte die Range der ermittelten CPs zwischen CP 14 und CP 35 liegen, da in diesem Bereich eine hohe Zuverlässigkeit und Sensitivität gewährleistet ist.

Die Verdünnungsreihe enthielt mindestens fünf Stufen. Das Präamplifikat wurde 1:100 verdünnt und dann in jeweils 1:10 Schritten verdünnt. Jede Verdünnungsstufe wurde im Triplikat via absoluter Quantifizierung gemessen.

In der LightCycler® 480-Software wurde als Analyse die Abs Quant/2nd Derivative Max Methode angewandt. Die Software berechnete die Effizienz automatisch und zeigt sie im Analysefenster an.

4.2.4.2 Referenzermittlung

Im Rahmen der Normalisierung ist die Identifikation von Kalibratoren, sogenannten Referenzen, wichtig. Geeignete Referenzen sind diejenigen Strukturen, deren Expression sich unter sich verändernden biologischen Konditionen nicht verändert.

In einer vorangegangenen laborinternen Arbeit wurden mittels Array-Analyse Kandidaten-miRNA herausgefiltert, die über verschiedene BC-Tumorstadien stabile Expressionswerte zeigten. Diese miRNAs wurden mit der Literatur sowie Empfehlungen der Firma⁹¹ verglichen und auf Basis der Recherche⁹²⁻⁹⁴ wurden vier miRNAs und eine small nucleolar RNA als Referenzkandidaten ausgewählt: RNU48, miR-191-5p, miR-361-5p, miR-16-5p, miR-29c-5p. Diese wurden vorab mit der Etablierungskohorte auf ihre Expressionsstabilität überprüft.

Die 417 Daten der HOM- und ERL-Kohorte wurden final mittels NormFinder-Software getestet. NormFinder ist ein Open-Source-Algorithmus zur Identifizierung des optimalen Normalisierungsgens bzw. -gensets unter einer Reihe von Kandidaten⁹⁵.

4.2.5 Validierung des Transfektionserfolgs

4.2.5.1 Transiente Transfektion mit fluoreszenzmarkiertem mimic

Zunächst wurde überprüft, ob die miRNA-mimics nach Transfektion erfolgreich von den Zellen aufgenommen werden können. Dazu wurde ein fluoreszenzmarkiertes non-function-mimic in T24 (20nM), J82(10nM), RT112(5nM), und HCV29(5nM) transfiziert und die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Die rotleuchtenden Partikel belegen das Vorhandensein der eingebrachten mimics und damit die erfolgreiche Transfektion (*Abb.10*).

4.2.5.2 Dosisabhängige Expressionslevel nach Transfektion

Eine weitere Kontrolle, ob das Einbringen der mimics in die Zellen erfolgreich war, erfolgte via qPCR. Dazu wurden 5nM, 10nM und 20nM mimics in die Zellen transfiziert. Es wurden je eine Negativkontrolle (neg) und eine Transfektionsreagenzkontrolle (negtrans) mitgeführt. Die mimic-Konzentration wurde in Relation gesetzt zur Konzentration der *negtrans*-Kontrolle und als Foldchange (fch) angegeben. Der fch zwischen Negativkontrolle und Transfektionsreagenzkontrolle wurde herangezogen, um eine Aussage darüber zu treffen, ob das Reagenz an sich intrazellulär zu erhöhter Expression der untersuchten miRNA führt.

4.3 Statistische Tests

Die statistischen Analysen wurden mittels GraphPad Prism (v.9.3.1) durchgeführt, exakte Angaben sind jeweils unter den Abbildungen zu finden. Receiver Operating Characteristics (ROC)-Kurven dienen der Beurteilung eines Klassifikators zur Trennung zweier Gruppen mittels Sensitivität und Spezifität. GraphPad vollführte automatisch die ROC-Kurven-Analyse und gab Werte für Sensitivität und Spezifität an, sowie cut-off-Werte je nach Kombination beider. Mit dem Youden-Index kann ein optimaler Schwellenwert zur Trennung zweier Gruppen gefunden werden. Über die Formel $Youden-Index = (Sens. + Spez.) - 1$ kann der theoretisch optimale Wert manuell errechnet werden.

4.4 Molekulare Subtypisierung

Die molekulare Subtypisierung der Testkohorte erfolgte im Institut für Pathologie am Universitätsklinikum Erlangen. Von allen MIBC-Tumoren wurden Tissue Microarrays (TMA) angefertigt, die insgesamt 4 Gewebestücke à 0,6 mm aus verschiedenen Arealen des

jeweiligen Tumors widerspiegeln. Es wurden jeweils 2 µm FFPE-Schnitte angefertigt, entparaffiniert und für CK5/6 (Clone XM26, monoclonal mouse, DiagnosticBioSystems®, 1:50), CK14 (Clone SP53, rabbit monoclonal, CELL MARQUE, 1:50), CK20 (Clone Ks 20.8, mouse monoclonal, DAKO®, 1:50), GATA3 (clone L50-823, mouse, monoclonal, DCS®, 1:100), CD44 (clone DF1485, mouse, monoclonal, Dako®, 1:150) und FOXA1 (Clone ab55178, mouse monoclonal, Abcam®, 1:1000) auf einem Ventana Benchmark Ultra Färbeautomaten anhand standardisierter, akkreditierter Färbeprotokolle gefärbt. Die Auswertung der Färbungen erfolgte anhand des immunreaktiven Scores (IRS) und des H-Scores. (*Quelle: Fördermittelantrag*)

4.5 Bioinformatische Analysen

Die Expressionsdaten der Trainings- und Testkohorte wurden zur Arbeitsgruppe von Prof. Lenhof am Zentrum für Bioinformatik der Universität des Saarlandes gereicht und von der Doktorandin Lea Eckhart analysiert. Sie nutzte als künstliche Intelligenzsysteme (KI) die vier maschinellen Lernalgorithmen AdaBoost, k-nearest neighbors (KNN), neurale Netze und random forests mit unterschiedlichen Hyperparametern, um eine akkurate Klassifizierung der BC mittels der vier miRNAs einzeln und in Kombination zu erzielen. Anhand der ERL-Daten wurden Algorithmen erstellt und KI-Modelle trainiert, auf den HOM-Daten wurde getestet. Diese Modelle sind deutlich komplexer als cut-off-Werte und könnten eine noch genauere Klassifizierung der BC-Gruppen ermöglichen und damit das Muskelinvasionspotential durch korrekte Eingruppierung in die MIBC-Gruppe zuverlässig vorhersagen.

4.6 Allgemeine Zellkulturmethoden

4.6.1 Auftauen

Die Zellen wurden aus dem Stickstoff entnommen, zügig auf 37°C erwärmt, mit 5ml Medium resuspendiert und bei 300g für 3min zentrifugiert. Das Pellet wurde in Medium resuspendiert, in eine Zellkulturflasche (75cm²) pipettiert und bei 37°C, 5 % CO₂ kultiviert. Nach 24 Stunden wurde ein Medienwechsel durchgeführt.

4.6.2 Subkultivierung

Die Zellen wurden zweimal pro Woche bei einer Konfluenz von 80-90 % gesplittet; dazu wurde das Medium abgesaugt, einmal mit 5ml PBS gewaschen und mit 3ml Trypsin versetzt. Die Zellen T24, J82, HCV-29 und 5637 wurden für 4min, RT112 für 8min im Wärmeinkubator bei 37°C abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden in 8ml Medium aufgenommen, 3min bei 300g zentrifugiert und das Pellet mit dem jeweiligen Medium resuspendiert und in gegebenem Verhältnis in eine frische Flasche inokuliert.

4.6.3 Kryokonservierung

Um Zellen wegzufrieren, wurden sie wie oben beschrieben abgelöst und das Pellet in 2ml einer 1:1 Mischung aus DMEM, 30% FCS und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) resuspendiert. Die Zellen wurden in ein 2ml Kryoröhrchen überführt, zunächst im -80°C Tiefkühlschrank schonend eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff auf Dauer konserviert.

4.6.4 Zellzählung

Um eine definierte Zellzahl für unterschiedliche Assays einsetzen zu können, wurden die Zellen abgelöst, in 5ml Medium resuspendiert, 10µl dieser Zellsuspension mit 10µl Trypanblau versetzt, in eine Zellzählkammer pipettiert und automatisiert mit dem LUNAII-Zellzählgerät gezählt. Die Software des Gerätes analysiert die Größe der Zellen, den prozentualen Anteil lebender und toter Zellen und erlaubt weiterhin eine Verdünnungsberechnung für das gewünschte Volumen anhand der Lebendzellzahl.

Zelllinie	Transfektion	BrdU	CIM-plate	E-plate	Migration	Invasion
T24	7x10 ⁵	5 x 10 ³	3 x 10 ⁴	1x10 ⁴	5x10 ⁴	5x10 ⁴
J82	6x10 ⁵	3 x 10 ³	3 x 10 ⁴	1x10 ⁴	3x10 ⁴	3x10 ⁴
RT112	9x10 ⁵	7 x 10 ³	5 x 10 ⁴	3x10 ³	7x10 ⁴	7x10 ⁴
5637	9x10 ⁵	7 x 10 ³	5 x 10 ⁴	3x10 ³	7x10 ⁴	7x10 ⁴
HCV29	7x10 ⁵	5 x 10 ³	6 x 10 ⁴	4x10 ³	5x10 ⁴	5x10 ⁴

Tabelle 9: Etablierte Zellzahlen für die Zelllinien T24, J82, RT112, 5637 und HCV-29 zum Einsatz in die jeweiligen Assays.

4.6.5 Medien

Die Zelllinien T24 und HCV-29 wurden in DMEM +10% FCS kultiviert, J82 in MEM +10% FCS und RT112 und 5637 in RPMI +10 % FCS.

4.7 Transiente Transfektion

4.7.1 Workflow und Transfektionskontrollen

Für die funktionellen Zellexperimente wurden synthetische miRNA, sogenannte mimics eingesetzt, um die miRNA-Expression künstlich zu erhöhen. Mimics lagen als 5nmol Lyophilisat vor und wurden durch Lösen in 250µl RNase-free H₂O auf eine

Stockkonzentration von 20µM resuspendiert. Durch 1:1 und 1:10 Verdünnung wurden Aliquots mit Arbeitskonzentrationen von 10µM und 1µM erstellt.

An Tag 1 wurden Zellen in 6-Well-Platten in Konzentrationen wie in *Tabelle 5* beschrieben, in Opti-MEM ausgesät und 4 Stunden im Wärmeschrank gelassen, damit sie sich absetzen konnten. Opti-MEM ist ein speziell entwickeltes Starving-Medium, das kein FCS enthält, aber durch die Zugabe von u. a. Insulin den Starving-Prozess für Zellen schonender gestaltet. Dies reduziert den Bias in Folgeexperimenten, der durch intrazellulären Stress verursacht werden und folglich die Analyse von biochemischen Prozessen verzerren könnte. Der Starving-Prozess an sich führt zu einer verbesserten zellulären Endozytose der Lipidkomplexe. Die Zellen waren zu Transfektionsbeginn zu 80 % konfluent, die Transfektion erfolgte in 2ml Opti-MEM-Medium.

TUBE 1: Mimic Ansatz	Reagenz	Medium
Negativkontrolle (neg.)	/	+ 150 µl Opti-MEM
Transfektionskontrolle (neg. trans)	/	+ 150 µl Opti-MEM
Mimic Kontrolle 10nM (mimko)	2µl (10nM)	+ 150 µl Opti-MEM
Mimic (10nM)	2µl (10nM)	+ 150 µl Opti-MEM

TUBE 2: Lipofectamin Ansatz	Reagenz	Medium
Negativkontrolle (neg.)	/	+ 150 µl Opti-MEM
Transfektionskontrolle (neg. trans)	8µl Lipofectamin	+ 150 µl Opti-MEM
Mimic Kontrolle (mimko)	8µl Lipofectamin	+ 150 µl Opti-MEM
Mimic (10nM)	8µl Lipofectamin	+ 150 µl Opti-MEM

Tabelle 10: Pipettierschema zum Ansatz einer transienten Transfektion von Zellen in 2ml Medium mit einer Arbeitskonzentration von 10nM. In Tube 1 wurde der Teil des Ansatzes erstellt, der die mimics enthielt, Tube 2 enthielt das Transfektionsreagenz. Beide Tubes wurden separat angesetzt, gut durchgemischt, zusammenpipettiert und zur Bildung von reaktiven Komplexen 5min bei RT inkubiert.

Tube 1 und Tube 2 wurden durch Pipettieren gut durchmischt, anschließend zusammen pipettiert und 5min bei RT inkubiert, damit sich Lipid-mimic-Komplexe bilden konnten.

Das Medium wurde abgesaugt, die Zellen dreimal mit 2ml PBS gewaschen und mit 1,7ml Opti-MEM aufgefüllt. Die Transfektionsansätze wurden tröpfchenweise zu den Zellen gegeben und 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. An Tag 2 wurde das Medium abgesaugt, die Zellen dreimal mit 2ml PBS gewaschen und mit 2ml Kompletmedium aufgefüllt. Die Zellen wurden für weitere 24 Stunden inkubiert, damit sie sich einerseits von der Transfektion erholen und andererseits die physiologischen Prozesse ablaufen konnten, die durch die Überexpression der mimics ausgelöst wurden. An Tag 3 wurden die Zellen mit 300µl Trypsin für 3min, RT112 für 5min inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden mit 700 µl Medium in 1,5ml tubes überführt und bei 300g für 3min zentrifugiert. Das Medium wurde anschließend abgesaugt, die Zellen in 1ml resuspendiert, gezählt und auf eine etablierte Zellzahl je nach anschließendem Assay eingestellt (*Tabelle 5*).

Es wurde in jeweils vier Versuchsbedingungen wie folgt transfiziert: die Negativkontrolle (neg) wurde ausschließlich mit Opti-MEM versetzt. Die Negativ-Transfektionskontrolle (negtrans) wurde mit Opti-MEM und Lipofectamin inkubiert, um einen möglichen Effekt durch das Transfektionsmedium selbst erfassen zu können. Die mimic-Kontrolle (mimko) enthielt Lipofectamin und ein funktionsloses mimic, welches der Beobachtung von Effekten durch das Einbringen synthetischer mimics an sich diente. Die vierte Kondition enthielt Lipofectamin und das mimic, welches in der jeweiligen Zelllinie überexprimiert werden sollte.

Die Konzentration von mimics muss nach bestimmten Gesichtspunkten optimal eingestellt werden: Ziel ist es, mittels einer Überexpression zellphysiologische Effekte zu generieren und zu beobachten, ohne dabei eine völlig unnatürlich hohe Konzentration einzusetzen. Eine zu hohe Konzentration kann intrazellulären Stress führen, der durch die Akkumulation der mimics zu hochmolekularen RNA-Spezies entsteht. Diese führen dann zu unerwünschten Nebeneffekten wie Proliferationsverzögerung oder Zelltod⁹⁶. Verschiedene Arbeiten zu miRNA-Überexpressions-Experimenten nutzten Konzentrationen von 25nM oder 100nM⁹⁶. In dieser Arbeit wurden Konzentrationen $\leq 25\text{nM}$ verwendet.

Unterschiedliche Konzentrationen je Zelllinie ergaben sich aus dem Umstand, dass manche Zelllinien empfindlicher auf das Einbringen von mimics reagierten; so konnten für T24 und J82 5-25 nM, für RT112 und HCV29 5nM eingesetzt werden. In Vorversuchen wurden der Transfektionserfolg, die konzentrationsabhängigen Foldchanges, sowie funktionelle Effekte durch die Überexpression untersucht, um die finalen Konzentrationen je Zelllinie individuell zu generieren.

4.7.2 Kontrolle des Transfektionserfolgs

Zur Kontrolle des Transfektionserfolgs wurden die Zellen abgelöst, zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet in Flüssigstickstoff trocken kryokonserviert. Aus dem Pellet wurde miRNA isoliert und via RT und qPCR überprüft, ob die Überexpression erfolgreich war.

Als weitere Kontrolle des Transfektionserfolgs wurden Zellen mit einem non-targeting-mimic transfiziert, welches keine funktionellen Effekte in der Zelle erzielt, jedoch mit dem fluoreszierenden Farbstoff Cy3 markiert und so mikroskopisch als rot leuchtende Partikel darstellbar war (absorbance/emission max: 547/563 nm). Dazu wurden die Zellen nach erfolgter Transfektion an Tag 3 abgelöst, mit 1ml Medium in Quadriperm OT ausplattiert und über Nacht im Wärmeschrank inkubiert. Zur Fixierung wurde das Medium abgesaugt, je 1ml eiskalter MeOH zugegeben, 5min bei RT inkubiert, abgesaugt und bei RT unter dem Abzug trocken gelassen. Vollständig getrocknete OTs wurden zur Kernfärbung mit 1ml DAPI-Lösung (1:1000) versetzt, für 7min bei RT inkubiert, anschließend 3x mit PBS für jeweils 5min gewaschen und danach bei RT getrocknet und die OTs eingedeckt.

4.8 Funktionelle Analysen

4.8.1 BrdU-Assay

Zunächst wurden die Reagenzien vorbereitet. Das BrdU-Labeling-Reagenz wurde 1:100 mit sterilem Zellkulturmedium auf eine Konzentration von 100 μM verdünnt. 100 μl der Anti-BrdU-POD working solution wurden 1:100 mit 9,9ml Antikörperlösung versetzt.

An Tag 1 wurden die Zellen ausgesät (*Tabelle 4*) und 24 Stunden im Wärmeschrank inkubiert. An Tag 2 erfolgte die Zugabe von 10 μl BrdU-Labeling-Solution (100 μM) um eine 10 μM Sollkonzentration zu erreichen. Während der Zellproliferation wird Bromodeoxyuridin (BrdU) in die neusynthetisierte DNA eingebaut. Das Labeling erfolgte für 18 Stunden. An Tag 3 wurde das Labeling der Zellen beendet, indem die Flüssigkeit über dem Waschbecken abgeklopft und anschließend die Zellen für 30min bei RT mit der im Kit enthaltenen Fixierlösung fixiert wurden. Im nächsten Schritt erfolgt die Zugabe von 100 μl Anti-BrdU-POD-working solution; diese enthält mit Meerrettichperoxidase gekoppelte Antikörper, die an das eingebaute BrdU binden. Nach dreimaligem Waschen mit 300 μl Waschlösung wurden pro Well 100 μl Substratlösung zugegeben; das Substrat wurde in den folgenden 20min von der Meerrettichperoxidase zu einem blauen Farbstoff umgesetzt. Um die Reaktion zu stoppen, dienten pro Well 25 μl 1M H_2SO_4 , welches gleichzeitig den blauen Farbstoff in einen gelben Farbstoff umsetzte. Unter leichten Schüttelbewegungen wurde 1min inkubiert und anschließend zügig spektrometrisch gemessen, da der Farbkomplex nur für 5min stabil bleibt. Die Absorptionsmessung erfolgte im Tecan Reader mit einem 450 nm Filter und einer Referenzwellenlänge von 620 nm.

Es wurden stets zwei Kontrollen mitgeführt. Die Background-Kontrolle erfolgte pro Platte im Triplikat und diente der potenziellen Detektion unspezifischer AK-Bindung an ungelabelten Zellen; sie bestand aus Zellen, Fixierlösung, Anti-BrdU-POD-Working-Solution und Substrat. Die Leerkontrolle (Blank) erfolgte ebenfalls im Triplikat und bestand aus BrdU-Labeling-Solution, Fixierlösung, Anti-BrdU-POD-Working-Solution und Substrat. Sie diente der Überprüfung einer potenziellen unspezifischen Färbung der Platte selbst.

4.8.2 Transwell-Assays und mikroskopische Auswertung

Für die Endpoint-Migrations- und Invasionsversuche (Assays) wurden FluoroBlok-Einsätze (Inserts) verwendet, die nach dem Boyden-Chamber-Prinzip funktionieren. Diese speziellen Inserts sind mit einer lichtundurchlässigen Polyethylenterephthalat-Membran (PET) versehen, die Wellenlängen zwischen 400 und 700nm blockiert und so die Detektion von Fluoreszenzsignalen ermöglicht. Das Signal von fluoreszenzmarkierten Zellen in der oberen Kammereinheit, welche nicht migriert sind, wird durch die FluoroBlok-Membran abgeschirmt und dadurch falsch positive Signale verhindert.

Die Boyden-Chamber ist ein zweikammeriges System, mit dem die Chemotaxis von Zellen ermittelt werden kann. Die obere Kammer repräsentiert einzelne Inserts; sie dienen der Inokulation der Zellsuspension und werden begrenzt von einer Membran mit definierter

Porengröße, in unserem Fall 8µm. Für Invasions-Assays trägt die Membran außerdem eine Schicht aus Matrigel, welches eine biologische Gewebematrix nachahmt. Die untere Kammer enthält Zellmedium mit einem Lockstoff (chemoattractant), auf dessen biochemischen Reiz hin die Zellen zu migrieren beginnen. Das Medium der unteren Kammer wird mit 8µg/ml oder 10µg/ml des Proliferationshemmers Aphidikulin versetzt, um die reale Zellzahl an der Membran nicht durch zusätzlich entstehende Zellen zu verzerren. Die Zellen, die durch die Membran migriert sind, lagern sich an der Unterseite der Membran an, wo sie fixiert und gefärbt werden können.

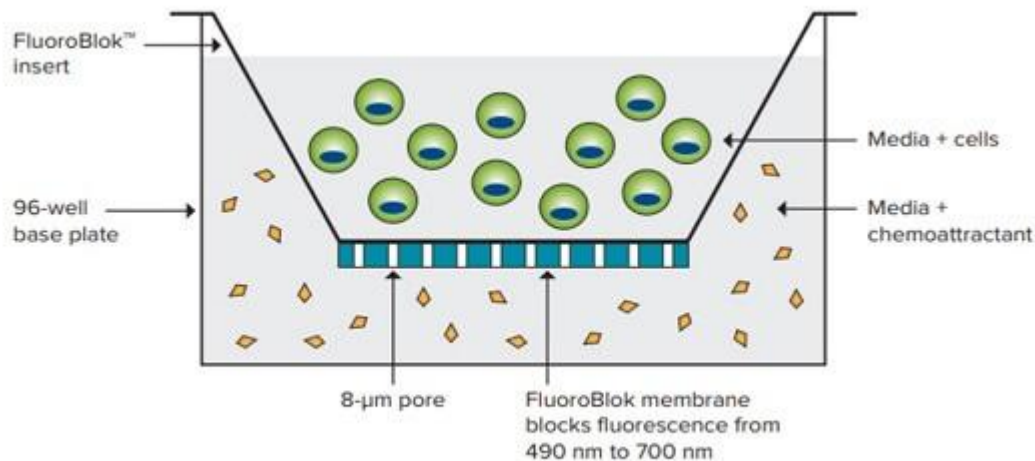


Abb.6: Prinzip der Boyden Chamber von transwell inserts für Zellchemotaxis Analysen¹²

4.8.3 Migration und Invasion via Transwell-Inserts

Die Zellen wurden wie in 2.2.5 und 2.2.6 beschrieben transfiziert und für die Folgeversuche präpariert. Die Zellsuspension enthielt die gewünschte Anzahl an Zellen in FCS-freiem Medium. Für Invasionsversuche wurde die obere Kammer zur Rehydratation der Matrigelschicht zunächst auf RT gebracht, dann mit 200µl PBS befüllt und für 2 Stunden im Brutschrank verwahrt. Das PBS wurde anschließend vorsichtig abpipettiert, ohne die Matrigelschicht zu stören. Es wurden 200µl á 5×10^4 Zellen in die Inserts pipettiert und die Inserts in die Platte eingesteckt. Die Wells der 24-Well-Platten wurden mit jeweils 750µl Medium +10% FCS und Aphidikulin (8µg/ml bei T24, J82 und 5637; 10µg/ml bei HCV-29 und RT112) befüllt. Migrationsversuche wurden für 16h, Invasionsversuche für 24h im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss wurden die Inserts vorsichtig aus den Wells gehoben, das Medium in der oberen Schicht durch vorsichtiges Pipettieren an den Ecken abgesaugt und mit Wattestäbchen sanft gereinigt, um verbliebene, nicht-migrierte Zellen zu entfernen. Die 24-Well-Platte wurde zunächst mikroskopisch untersucht, ob gegebenenfalls Zellen im Medium schwimmen, die sich von der Membran gelöst haben könnten oder nicht daran adhären konnten. Das Medium wurde dann abgesaugt und zum Waschen der Inserts wurden je 750µl PBS eingefüllt, die Einsätze wurden darin eingetauscht. Die Zellen wurden dann mit 750µl eiskaltem 100% Methanol (MeOH) in einer frischen Platte durch Inkubation

für 10min bei -20°C fixiert und im Anschluss 3x für 5min mit PBS gewaschen. Zur Kernfärbung der fixierten Zellen wurden die Inserts in 750µl DAPI-Lösung (1:1000) getaucht, für 7min bei RT inkubiert und anschließend erneut 3x mit PBS für jeweils 5min gewaschen. Die Zellen wurden bis zur mikroskopischen Auswertung in 750µl PBS bei 4°C oder ohne PBS für mehrere Wochen bei -20°C gelagert.

4.8.4 Visuelle Quantifizierung der Endpoint-Daten

Die Anzahl der migrierten Zellen auf der unteren Seite der Membran wurde mit einem inversen Mikroskop detektiert und bei 10x Vergrößerung wurden je drei zufällig ausgewählte Gesichtsfelder mit der Leica-NDS-Software gespeichert (Abb.9). Diese Bilder wurden mit der ImageJ-Software ausgezählt. Um die Migration zu berechnen, wurde zunächst die Gesamtzahl der migrierten Zellen pro Insert bestimmt. Dazu wurde ein Mittelwert aus der Anzahl der Zellen der drei Gesichtsfelder gebildet. Der Mittelwert wurde durch die Fläche des Mikroskop-Betrachtungsfeldes, der sog. Sehfeldzahl, geteilt und dann multipliziert mit der Fläche des Transwell-Inserts.

Beispiel: $(210/0,0022 \text{ cm}^2) \times 0,33 \text{ cm}^2 = 69.300 \text{ Zellen}$

Anschließend wurde die prozentuale Migration berechnet, indem diese Zahl durch die Anzahl der ausgesäten Zellen dividiert und anschließend mit 100 multipliziert wurde.

Beispiel: $(69.300/70000) \times 100 = 99 \% \text{ Migration}$

Vergrößerung	10x	
Sehfeldzahl	2,5	cm
Objektfelddurchmesser d	=Sehfeldzahl/Vergrößerung	0,25
Bildverarbeitung	0,34	µm/px
Auflösung	(2880 x 2048)	px
Fläche a	681836,544	µm ²
	0,681836544	mm ²
	0,006818365	cm ²
Fläche Insert	0,33	cm ²
Berechnung gesamt migrierter Zellzahl (migr.)	= (Mittelwert Zellzahl migr. / Fläche a) x Fläche transwell insert	
Berechnung prozentualer Migration/Invasion (%)	= (Zellzahl migr./ Zellzahl Einsaat) x 100	

Tabelle 11: Daten zur visuellen Quantifizierung der transwell assays mit einem Mikroskop

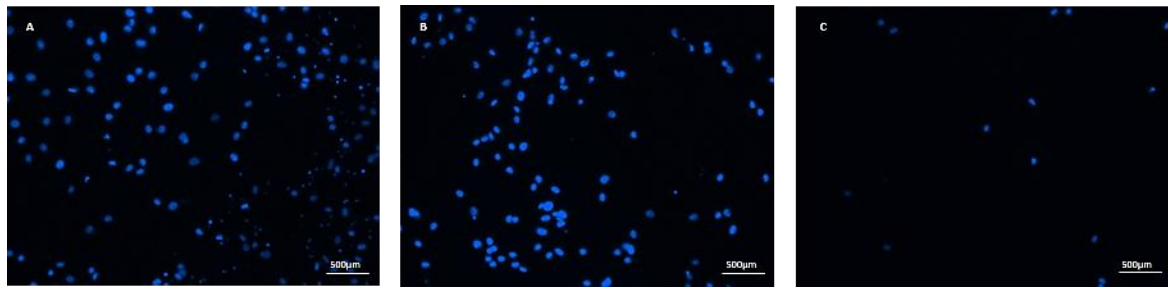


Abb.7: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der unteren Membran eines FluoroBlok transwell inserts nach Migration von T24 Zellen. Einsaat 5×10^4 Zellen (A-C). Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt und manuell in der ImageJ Software ausgezählt.

A: T24 neg; B: T24 negtrans; C: T24 miR-200a-3p(20nM). 10x Vergrößerung

4.8.5 Real-time cell analysis (RTCA)

Das RTCA-System beruht auf der Messung der Impedanz von Goldelektroden innerhalb der RTCA-plates, bei E-plates am Boden der Platte, bei CIM-plates an der Unterseite der oberen Kammer bzw. an der Membran, an die sich migrierte Zellen haften. Durch die Vermehrung von Zellen bei der Proliferationsmessung bzw. die Ansiedlung der Zellen auf der Unterseite der Membran bei Migrationsversuchen ändert sich die Spannung an den Elektroden, die Zellen erhöhen die Impedanz der Elektroden. Diese Änderung wird von der Software als Signal detektiert und als Cell Index grafisch umgesetzt. Der Cell Index (CI) ist die Differenz aus der Impedanz $t=n$ zu einem Zeitpunkt und der Impedanz $t=0$ im zellfreien Zustand. Beim normalisierten Zellindex wurden Daten zu einem gewählten Zeitpunkt auf 1.0 (100 %) gesetzt. Hier wurde für alle RTCA-Analysen der Zeitpunkt 4h ausgewählt, da die Zellen so lange benötigen, um sich nach Inokulation im Insert abzusetzen.

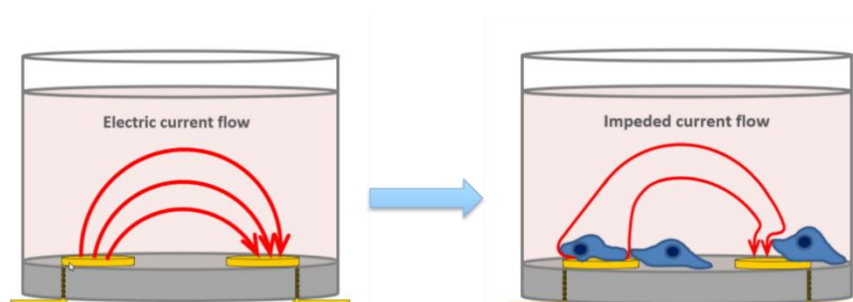


Abb.8: Schematische Darstellung des Stromflusses im Well einer E-Platte. **A** Elektronenfluss von einem Sensor zum nächsten innerhalb von zellfreiem Medium. **B** Abgelenkter Stromfluss zwischen zwei Sensoren durch die Anwesenheit von Zellen, die an der Goldelektrode anhaften/wachsen¹².

4.8.5.1 Migration

Die untere Kammer der CIM-plate wurde mit 160µl Medium +10% FCS und Aphidikulin befüllt. Anschließend wurde die obere Kammer darauf fixiert und das Konstrukt für 30min bei RT inkubiert, damit Platte und Medium dieselbe Temperatur annehmen. Zellen wurden wie in 1.2.5 und 1.2.6 vorbereitet und zu einer 100µl Suspension mit einer Zellzahl laut *Tabelle 4* und FCS-freiem Medium präpariert. Die Platte wurde in den RTCA Analyzer gesetzt, eine Backgroundmessung vorgenommen und anschließend die Zellen in die oberen Kammern pipettiert. Die Platte wurde 30min. in der Zellkulturbank belassen, damit sich die Zellen absetzen konnten, bevor die Platte in das Gerät gesetzt, das Experiment gestartet und für 72 Stunden gemessen wurde. Je Kondition wurden die Zellen im Duplikat gemessen und der Versuch dreimal wiederholt.

4.8.5.2 Proliferation

In die E-plate wurden 100µl FCS-haltiges Medium gefüllt und die Platte für 30min. in der Zellkulturbank belassen, bevor im RTCA-Analyzer eine Backgroundmessung durchgeführt wurde. Zellen wurden wie in 1.2.5 und 1.2.6 behandelt und zu einer 100µl Suspension mit einer Zellzahl laut *Tabelle 4* und FCS-haltigem Medium vorbereitet. Die Zellsuspension wurde in die Platte pipettiert und eine Stunde in der Zellkulturbank bei RT stehen gelassen, damit sich die Zellen absetzen können. Dann wurde die Platte in das Gerät gesetzt und der Versuch für 96 Stunden gemessen. Je Kondition wurden die Zellen im Duplikat gemessen und der Versuch dreimal wiederholt.

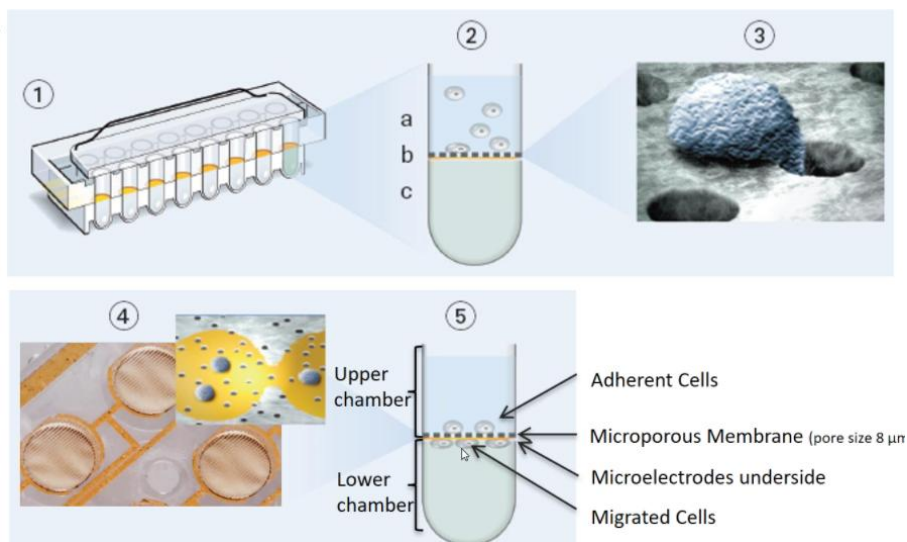


Abb.9: Prinzip der RTCA Migration via Impedanzmessung⁹⁷ in einer xCelligence CIM-Plate. 1: CIM-Plate, obere und untere Kammer; 2: Einzelnen wells der CIM-Plate mit inokulierten Zellen (a), der Membran mit 8µm Porengröße und der unteren Kammer, die Medium mit Chemoattraktant enthält (c); 3: elektronenmikroskopische Aufnahme einer Zelle, kurz bevor sie durch die Pore migriert; 4: Goldelektroden an der Unterseite der Membran der oberen Kammer. 5: schematischer Ablauf der Migration innerhalb eines CIM-plate wells: Zellen werden in einer 100µl Zellsuspension in die obere Kammer gefüllt, migrieren durch die Membran und adhären an deren Unterseite. Durch die Adhäsion wird eine Impedanzänderung als Signal detektiert

5. Ergebnisse

5.1 Vorversuche: Normalisierung und Etablierung von Referenzen, miRNA Expressionstestung und miRNA-mimic-Transfektionsexperimente

5.1.1 Referenzstabilität

Die Expressionslevel der fünf ausgewählten Testreferenzen wurden anhand von 12 Proben (pTa n=6; pT2-4 n=6) analysiert. Tabelle 5 zeigt Anzahl (n), Mittelwert (MW), Standardabweichung (STD) und Standardfehler des MW (SEM). MiR-16-5p und miR-29c-3p zeigen die höchste Streuungsbreite in STD und SEM und werden von weiteren Analysen ausgeschlossen.

	n	MW	STD	SEM
RNU48	12	24,84	0,67	0,19
miR-16	12	22,83	1,37	0,40
miR-29c	12	22,32	1,58	0,46
miR-191	12	23,69	1,19	0,34
miR-361	12	25,90	1,35	0,39

Tab. 12: Daten der Testung auf Referenzstabilität

Die Referenzstabilität von RNU48, miR-191 und miR-361 wurde anhand von 417 Proben (pTa n=119; pT1 high grade n=163; pT2-4 n=135) der HOM- und ERL-Kohorte mittels NormFinder-Algorithmus ausgewertet (Abb. 11). Die stabilste Referenz ist diejenige, die den kleinsten Variationswert laut Algorithmus und gleichzeitig die geringste Standardabweichung aufweist. MiR-361 erwies sich durch niedrigsten Stabilitätswert (Abb.8) und niedrigste Standardabweichung (Tab.6) als stabilste Referenz.

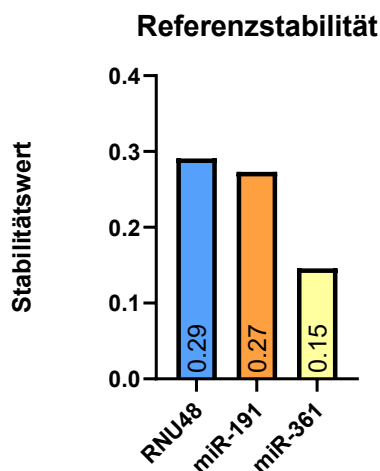


Abb.10: Ermittlung von Referenzstabilität

Referenz	STD
RNU48	1,53
miR-191	1,18
miR-361	1,10

Tabelle 13: Standardabweichung(B)

5.1.2 Effizienzermittlung

Anhand der fünf BC-Proben erstellt die LightCycler® 480 Software Standardkurven und berechnet die Effizienz. *Tabelle 7* zeigt Effizienzwerte der Referenzprimer RNU48, miR-191-5p, miR-361-5p und der Targetprimer miR-138-5p, miR-146b-5p, miR-155-5p und miR-200a-3p, *Abbildung 9* zeigt die Standardkurve der ausgewählten Referenz miRNA'-361.

Primer	Effizienzwert
RNU48	2.084
miR-191-5p	1.850
miR-361-5p	2.033
miR-138-5p	1.996
miR-146b-5p	2.135
miR-155-5p	2.084
miR-200a-3p	2.027

Tabelle 14: Effizienzwerte der Referenz- und Targetprimer; AnalyseAbs/Quant/2nd Derivate Max Methode via LightCycler® 480

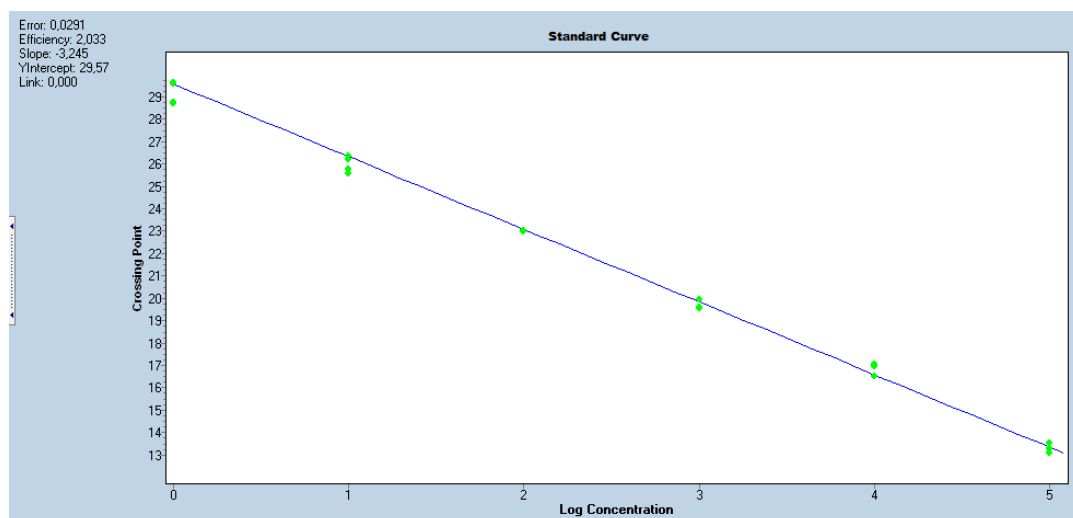


Abb.11: Standardkurve zur Effizienzermittlung des Primers miR-361-5p.

5.1.3 Validierung des Transfektionserfolgs

5.1.3.1 Transiente Transfektion mit fluoreszenzmarkiertem mimic

Die rotleuchtenden Partikel belegen das Vorhandensein der eingebrachten Kontrollmimics in T24, J82, RT112, und HCV29 (*Abb.12*).

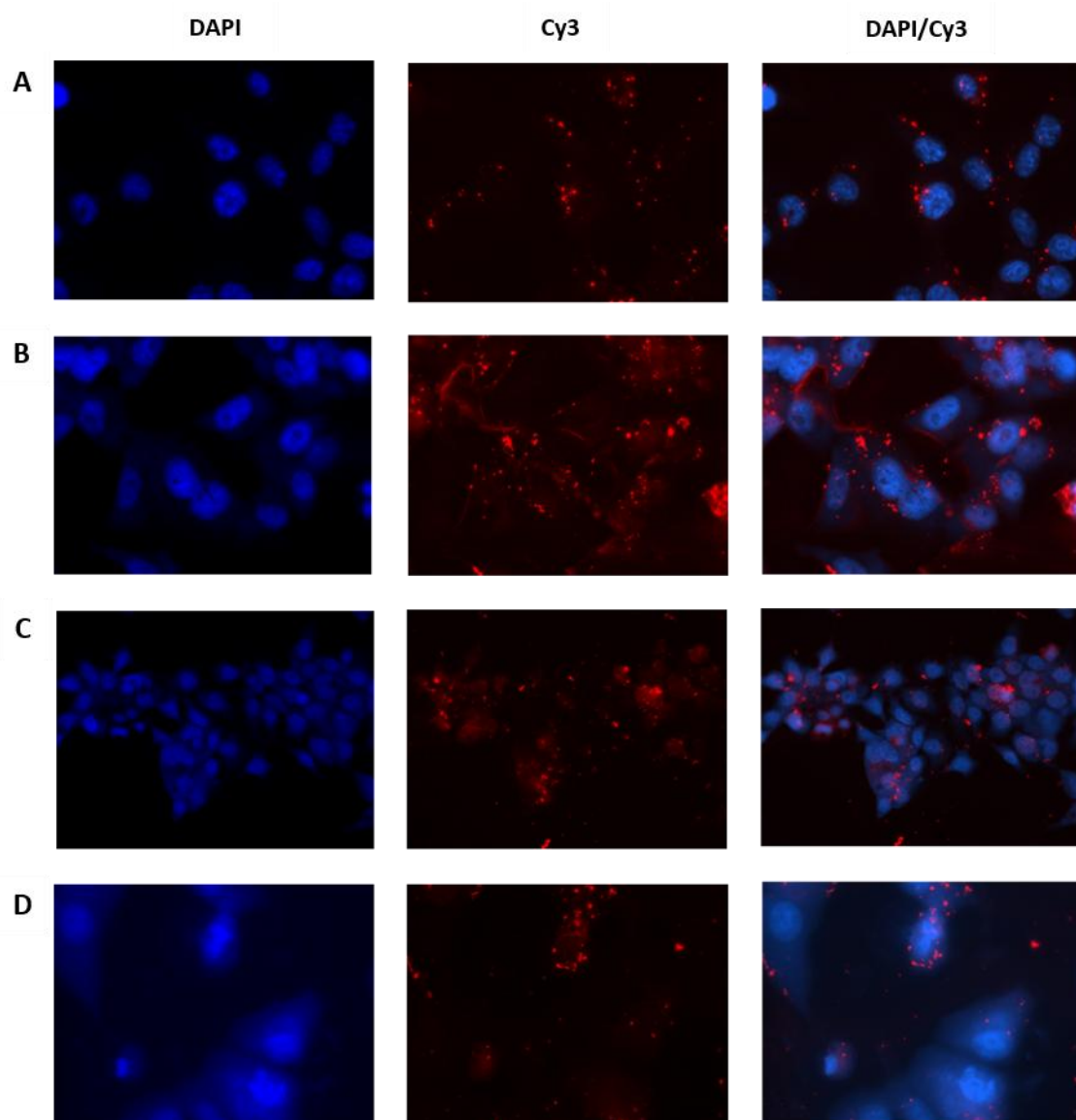


Abb.12: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Zelllinien T24 (A1-3), J82(B1-2), RT112 (C1-3) und HCV29(D1-3) nach Transfektion mit Cy3 markierten mimics (miRIDIAN microRNA Mimic Transfection Control Dy547).

A-D, DAPI: Detektion der Kernfärbung mit DAPI (368/461nm); 60x

A-D, Cy3: Signal der Cy3 markierten mimics; (555/569nm); 60x

A-D, DAPI/Cy3: Multikanal, mit DAPI- und Cy3-Signal; 60x

5.1.3.2 Dosisabhängige Expressionslevel nach Transfektion

Abbildung 15 bestätigt anhand der fch-Werte, dass die Transfektion erfolgreich in den Zellen zu einer erhöhten Konzentration von miR-200a-3p und miR-155-5p führte, relativ bezogen auf die Konzentration der *negtrans*-Kontrolle. Die fch zwischen Negativkontrolle und Transfektionskontrolle (T24 fch:1,14; J82 fch: 0,17; RT112 fch:2,0; HCV29 fch:3,36) wiesen darauf hin, dass die Zugabe von Transfektionsreagenz selbst bereits eine leichte Veränderung in der Expression der untersuchten miRNA führte. In T24 Zellen änderte sich die Expression bei 5nM um fch 25,2, 10 nM um fch 202,25 und bei 20 nM um fch 278,20. In J82-Zellen änderte sich die Expression bei 5nM um fch 44,94, 10 nM um fch 128,00 und 20 nM um fch 164,28. In RT112-Zellen änderte sich die Expression bei 5nM um fch 33,13, 10nM um fch 82,71 und 20nM um fch 163,14. In HCV29 Zellen änderte sich die Expression bei 5nM um fch 22,63, 10 nM um fch 60,13 und 20 nM um fch 235,57 (Abb.13).

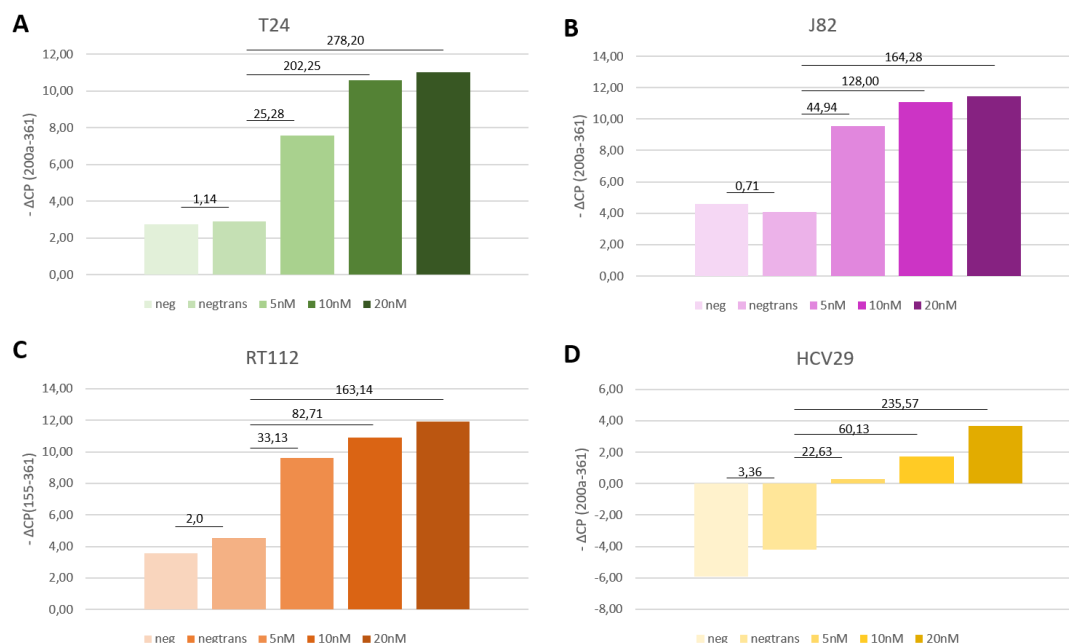


Abb.13: qPCR Analyse zur Kontrolle des Transfektionserfolges. T24 (A), J82 (B), RT112 (C) und HCV29 (D) Zellen im nativen Zustand (neg), nach Behandlung mit 4μl Lipofectamin RNAimax (negtrans) und nach Transfektion mit je 4μl Lipofectamin RNAimax und 5nM, 10nM und 20nM mimic. Fold changes (fch) wurden berechnet zwischen neg und negtrans; die Konzentrationsunterschiede der mit mimic transfizierten Zellen wurden als fch in Relation zu negtrans berechnet.

5.2 Verifizierung der Vorergebnisse

5.2.1 Expressionslevel der miRNA in NMIBC vs. MIBC in der Etablierungskohorte

Anhand der Etablierungskohorte wurde das klassische TaqMan-qPCR-System etabliert und gleichzeitig überprüft, ob die Daten der Vorarbeit⁷⁵ bestätigt werden können. MirR-114 wies instabile Kurven auf. Nach Rücksprache mit der Firma, welche ihre Primer vorab nicht auf Tauglichkeit überprüfte und sich nur auf ein technisch definiertes Design beruft, wurde miR-144 in den weiteren Experimenten nicht weiter untersucht. Die Daten (*Abb.14*) zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen NMIBC und MIBC in der Expression von miR-138-5p ($p=0.74$; fch=1.10). Die Expression der miR-146b-5p ($p<0.01$; fch=4.89), miR-155-5p ($p<0.01$; fch=3.58) und miR-200a-3p ($p<0.001$; fch=0.74) waren signifikant unterschiedlich exprimiert in MIBC verglichen mit NMIBC. Die Erhöhung bzw. Erniedrigung der Expressionslevel entsprach bis auf miR-138-5p dem Level der Vorergebnisse⁷⁵. Die Normalisierung erfolgte über die RNU48 entsprechend den Vordaten⁷⁵. In der Etablierungskohorte wurde nach Livak ausgewertet⁹⁷, die Vordaten wurden mit der LightCycler480-Software normalisiert.

5.2.2 Expressionslevel der miRNA in NMIBC vs. MIBC in der Trainingskohorte HOM

Die Vorergebnisse sollten nun anhand einer größeren, unabhängigen Trainingskohorte mit NMIBC (pTa low grade; TUR n=27) und MIBC (pT2-4; TUR n=16; CYS n=23) validiert werden.

Für miR-138-5p ($p=0,004$; fch=0,36) und miR-200a-3p ($p=0,0006$; fch=0,39) zeigte sich eine signifikant geringere, für miR-146b-5p ($p<0,0001$; fch=22,13) und miR-155-5p ($p<0,0001$; fch=4,99) eine signifikant höhere Expression in MIBC verglichen mit NMIBC (*Abb.15*). Die Normalisierung erfolgt über miR-361.

5.2.3 Expressionslevel der miRNA in NMIBC vs. MIBC in der Testkohorte ERL

Die Testkohorte ERL wurde nun herangezogen, um Qualität und Aussagekraft der untersuchten miRNA-Expressionsdaten aus Homburg an einer noch größeren, unabhängigen Kohorte eines anderen Instituts zu testen.

Die Expressionslevel von miR-138-5p ($p<0,0001$; fch=0,42) und miR-200a-3p ($p<0,0001$; fch=0,54) ergaben eine signifikant geringere, die von miR-146b-5p ($p<0,0001$; fch=10,78) und miR-155-5p ($p<0,0001$; fch=6,69) eine signifikant höhere Expression in MIBC (pT2-4 n=90; TUR+CYS) verglichen mit NMIBC (pTa low grade; TUR n=86) (*Abb.16*).

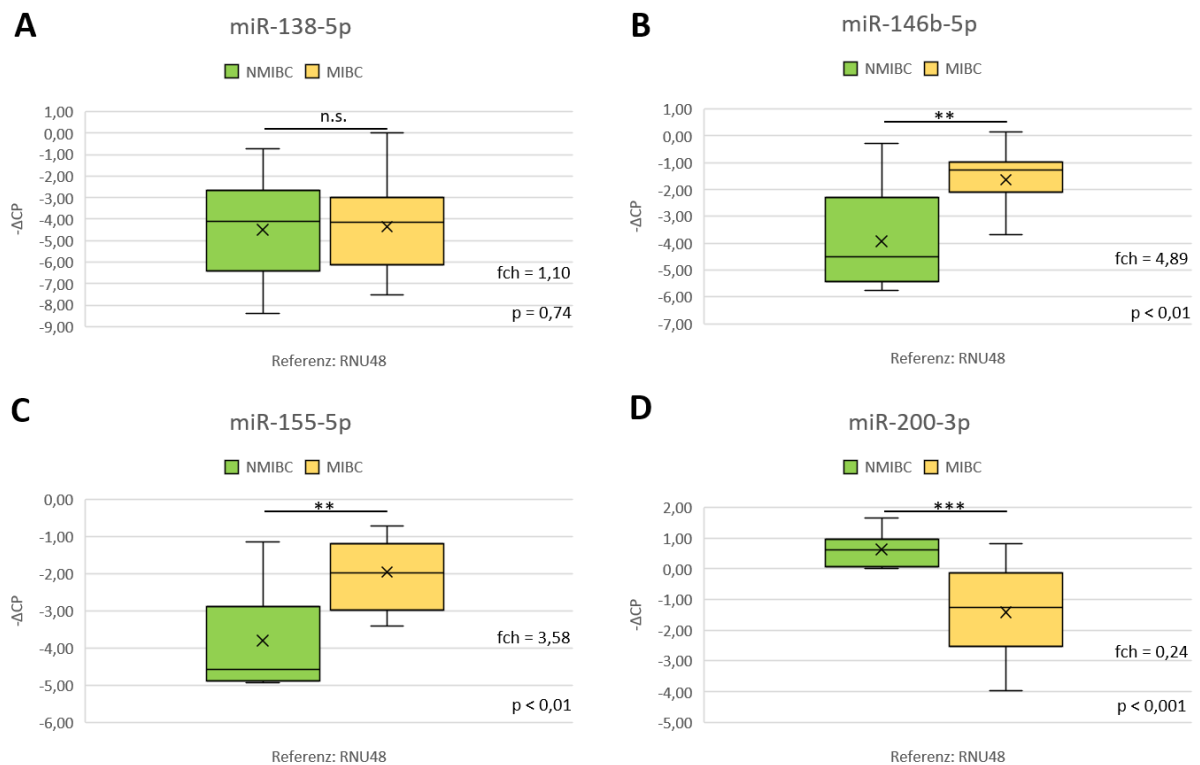


Abb.14: Die Expressionslevel der vier ausgewählten miRNAs miR-138-5p (A), miR-146b-5p (B), miR-155-5p (C) und miR-200a-3p (D) in NMIBC (n = 10) im Vergleich zu MIBC (n = 13) wurden anhand der Etablierungskohorte mittels qPCR analysiert. Die Normalisierung erfolgte über die Referenz RNU48. Angegebene p-Werte wurden in Excel mit dem t-test errechnet, MannWhitney U-Test wurde via Rangtest erstellt; fold changes (fch) wurden nach Livak manuell in Excel berechnet.

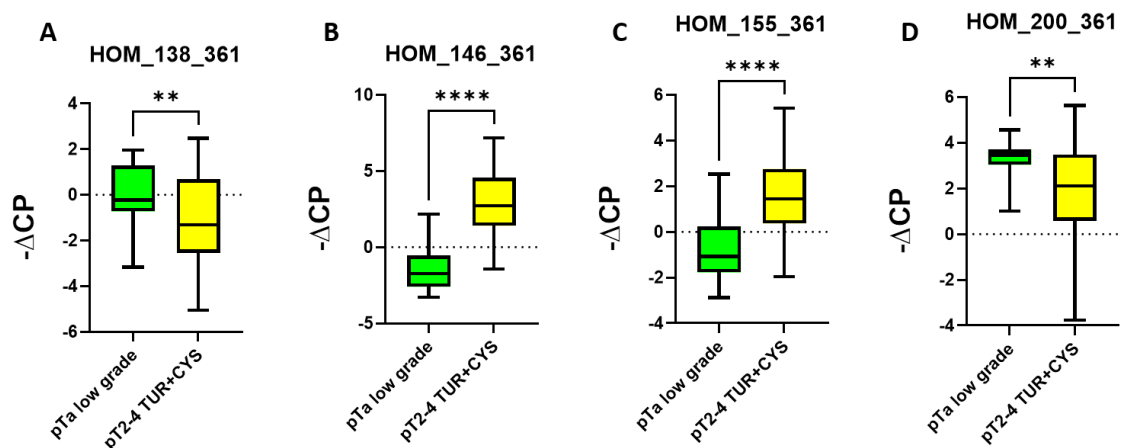


Abb.15: Die Expressionslevel der vier ausgewählten miRNAs miR-138-5p (A), miR-146b-5p (B), miR-155-5p (C) und miR-200a-3p (D) in NMIBC (pTa low grade; TUR n = 27) im Vergleich zu MIBC (pT2-4; TUR n=16; CYS n=23) wurden in der Trainingskohorte HOM mittels qPCR analysiert. Angegebene p-Werte wurden mit dem Man Whitney Test via GraphPad Prism erstellt, die p-Werte wurden mittels exakten, two tailed t-tests ermittelt.

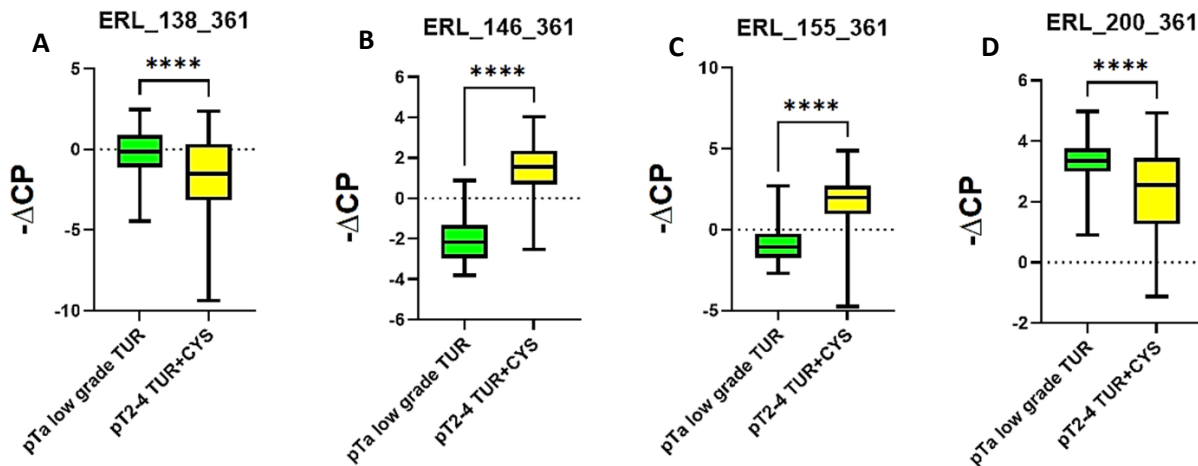


Abb.16: Die Expressionslevel der vier ausgewählten miRNAs miR-138-5p (A), miR-146b-5p (B), miR-155-5p (C) und miR-200a-3p (D) in NMIBC (pTa low grade; n = 86; TUR) im Vergleich zu MIBC (pT2-4; n = 90; TUR+CYS) wurden an der Testkohorte ERL mittels qPCR analysiert. Die Normalisierung erfolgte über die Referenz miR-361-5p. Angegebene p-Werte wurden mit dem Man Whitney Test via GraphPad Prism erstellt, die p-Werte entspringen exakten, two tailed t-tests.

5.3 Vergleich der miRNA-Expression von TUR- und Zystektomiepräparaten

Um zu prüfen, ob eine Vorhersage des Invasionspotentials bereits an TUR-Präparaten möglich ist, wurden die Expressionslevel aller vier miRNAs von TUR-Präparaten mit denen von Zystektomiepräparaten der Trainingskohorte verglichen. Untersucht wurden die Gruppen pT1G3 (TUR n=28; Cys n=15) und pT2-4 (TUR n=16; Cys n=23).

Die statistischen Analysen (Abb.17) wiesen keine signifikanten Expressionsunterschiede auf zwischen TUR- und Zystektomiepräparaten, weder in den pT1G3 Tumoren, noch in den MIBC pT2-4 Tumoren. Man kann eine leichte Tendenz einer höheren miR-146b-5p Expression in den MIBC-Zystektomiepräparaten relativ zu den MIBC-TUR-Präparaten erkennen (Abb.17, 2B).

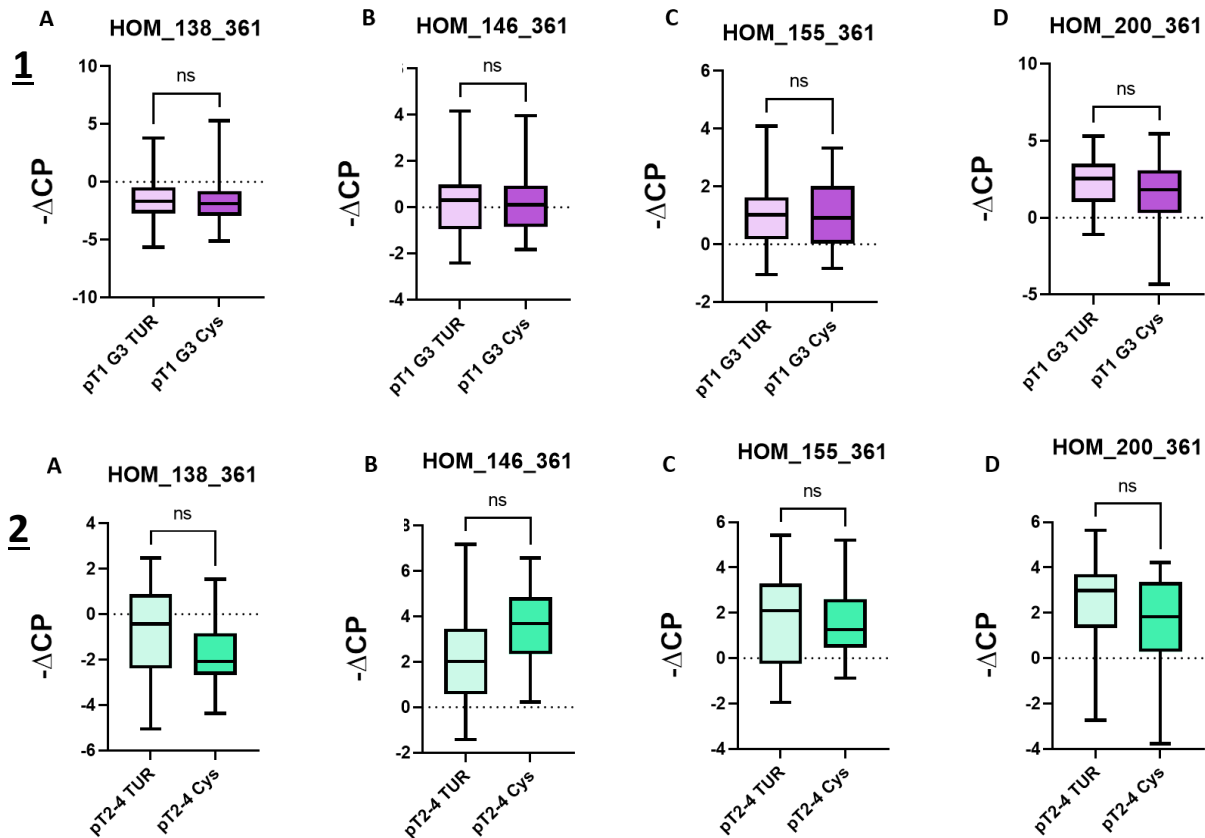


Abb.17: Die Expressionslevel der vier miRNAs miR-138-5p (A), miR-146b-5p (B), miR-155-5p (C) und miR-200a-3p (D) in pT1G3 (1 A-D: TUR n=28; Cys n=15) und pT2-4 (2 A-D: TUR n=16; Cys n=23) wurden anhand der Trainingskohorte HOM mittels qPCR analysiert. Die Normalisierung erfolgte über die Referenz miR-361-5p. Angegebene p-Werte wurden mit dem Man Whitney Test via GraphPad Prism erstellt, die p-Werte entspringen exakten, two tailed t-tests.

Anschließend wurden miRNA-Expressionsdaten von pT2-4 TUR- und Zystektomiepräparaten (TUR n=16; Cys n=74) der ERL-Kohorte erhoben und ausgewertet. Für die pT1G3 Gruppe lagen keine Zystektomiepräparate vor, sodass der TUR vs. Cys Vergleich für diese Gruppe entfiel.

Die Daten (Abb.18) zeigten keinen signifikanten Expressionsunterschied in den miR-138-5p (p=0.137) und miR-155-5p (p=0.380). MiR-146b-5p (p=0.0004) war in den pT2-4 Zystektomiepräparaten der ERL-Kohorte signifikant höher exprimiert, miR-200a-3p (p=0.038) signifikant niedriger exprimiert als in den TUR-Präparaten.

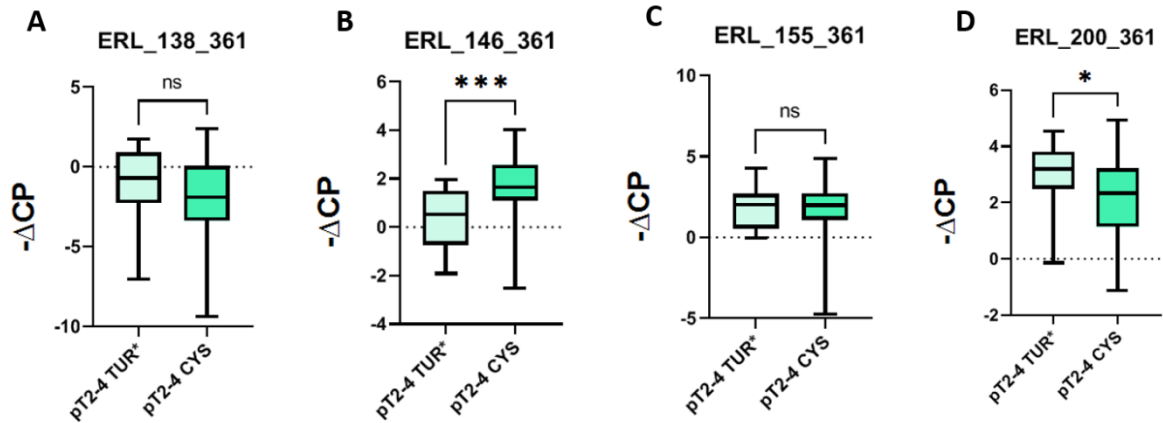
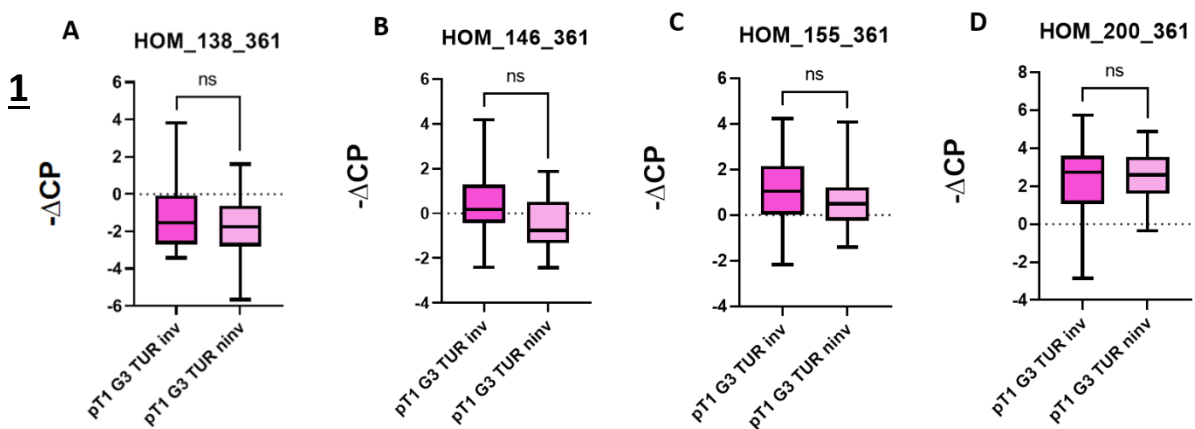


Abb.18: Die Expressionslevel der vier miRNAs miR-138-5p (A), miR-146b-5p (B), miR-155-5p (C) und miR-200a-3p (D) in pT2-4 (A-D: TUR n=16; Cys n=74) wurden anhand der Testkohorte ERL mittels qPCR analysiert. Die Normalisierung erfolgte über die Referenz miR-361-5p. Angegebene p-Werte wurden mit dem Man Whitney Test via GraphPad Prism erstellt, die p-Werte entspringen exakten, two tailed t-tests.

5.4 Expression der miRNA in invasiven vs. nicht-invasiven Tumorarealen

Um die Hypothese einer potenziellen intratumoralen Heterogenität zu klären, wurden aus pT1G3 und pT2-4 Fällen der Trainingskohorte HOM je Probe invasive und nicht-invasive Areale von TUR- und Zystektomiepräparaten separat extrahiert, analysiert und ausgewertet. Anhand der Daten in Abb.18 können keine signifikanten Unterschiede zwischen invasiven und nicht-invasiven Arealen festgestellt werden, weder in TUR- noch in Zystektomiepräparaten von pT1G3 oder pT2-4 Tumoren. Man kann jedoch einen Trend erkennen, dass in invasiven Arealen miRNA-146b höher exprimiert wird als in nicht invasiven Arealen (Abb. 19 1B, , 3B, 4B).



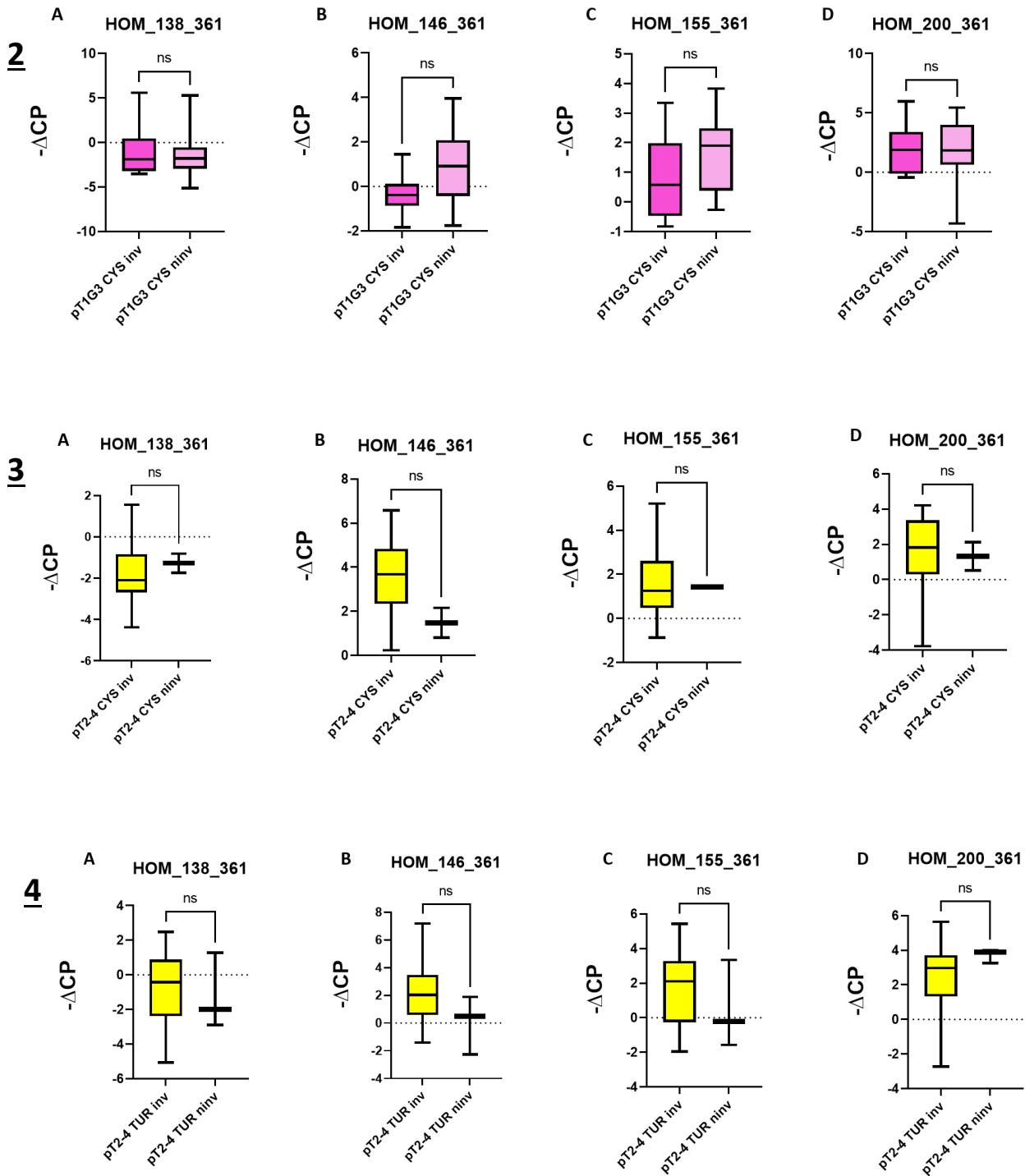


Abb.19: Die Expressionslevel der vier miRNAs miR-138-5p (A), miR-146b-5p (B), miR-155-5p (C) und miR-200a-3p (D) in pT1hg (TUR ninv n=21, inv n=24; Cys ninv n=11, inv n=8) und pT2-4 (TUR ninv n=3, inv n=16; Cys ninv n=2, inv n=22) wurden anhand der Trainingskohorte HOM mittels qPCR analysiert. Die Normalisierung erfolgte über die Referenz miR-361-5p. Angegebene p-Werte wurden mit dem Man Whitney Test via GraphPad Prism erstellt, die p-Werte entspringen exakten, two tailed t-tests.

5.5 MiRNA-Expressionsprofil von pT1 G3 Tumoren in Relation zu NMIBC und MIBC

5.5.1 HOM-Kohorte

PT1G3 Tumore stellen eine besondere Herausforderung dar hinsichtlich der Therapieentscheidung zwischen radikaler Zystektomie und blasenerhaltender Therapie. Das miRNA-Expressionsprofil soll der molekularen Charakterisierung des Invasionspotentials in die Muskelschicht dienen. Anhand der Expressionsdaten der Trainingskohorte wurden die Gruppen pTa low grade, pT1G3 und pT2-4 verglichen. Von der Testkohorte wurden pTa low grade, pT1 high grade, und pT2-4 verglichen.

PT1G3 Tumore unterscheiden sich in miR-138-5p ($p=0.0004$), miR-146b-5p ($p=0.005$), miR-155-5p ($p<0.0001$) und miR-200a-3p ($p=0.0052$) signifikant von pTa low grade Tumoren (Abb. 19). Im Vergleich zu MIBC-Tumoren unterschieden sich die Expressionslevel von pT1G3 Tumoren nicht signifikant für miR-138-5p ($p>0.999$), miR-155-5p ($p>0.999$), miR-200a-3p ($p>0.999$) und signifikant für miR-146b-5p ($p<0.0001$) (Abb.20).

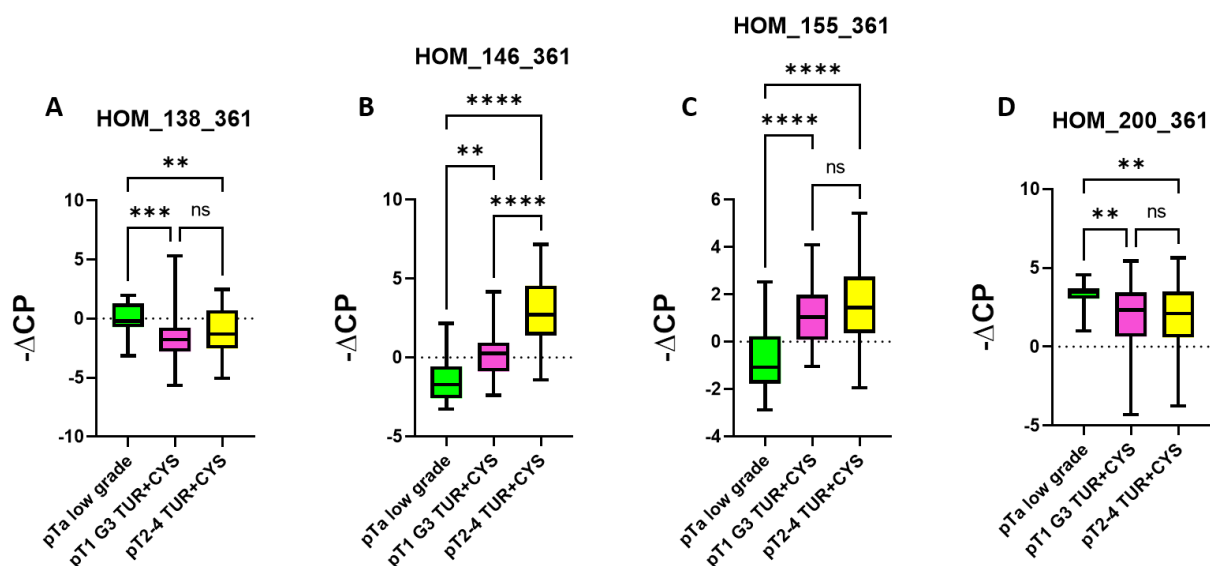


Abb.20: Die Expressionslevel der vier ausgewählten miRNAs miR-138-5p (A), miR-146b-5p (B), miR-155-5p (C) und miR-200a-3p (D) in pTa low grade (TUR n=27), pT1G3 (TUR n=28; CYS n=15) und pT2-4 (TUR n=16; CYS n=23) wurden an der Trainingskohorte mittels qPCR analysiert. Die Normalisierung erfolgte über die Referenz miR-361-5p. Angegebene p-Werte wurden via GraphPad Prism mit dem Kruskal-Wallis Test (Dunn's multiple comparison) erstellt, die p-Werte sind via approximate t-test ermittelt.

5.5.2 ERL-Kohorte

pTa low grade und pT2-4 Tumoren der ERL Kohorte unterschieden sich in allen vier miRNAs signifikant. PT1G3 Tumore unterscheiden sich in miR-146b-5p ($p<0.0001$) und miR-155-5p signifikant von pTa low grade Tumoren ($p<0.0001$), in miR-138-5p ($p=0.1283$) und miR-200a-

3p ($p=0.3781$) unterscheiden sich pT1G3 nicht signifikant von pTa low grade Tumoren. Im Vergleich zu MIBC Tumoren unterschieden sich die Expressionslevel von pT1G3 Tumoren nicht signifikant für miR-138-5p ($p=0.0621$) und miR-155-5p ($p>0.999$), und signifikant für miR-146b-5p ($p<0.0001$) und miR-200a-3p ($p<0.0001$) (Abb.21).

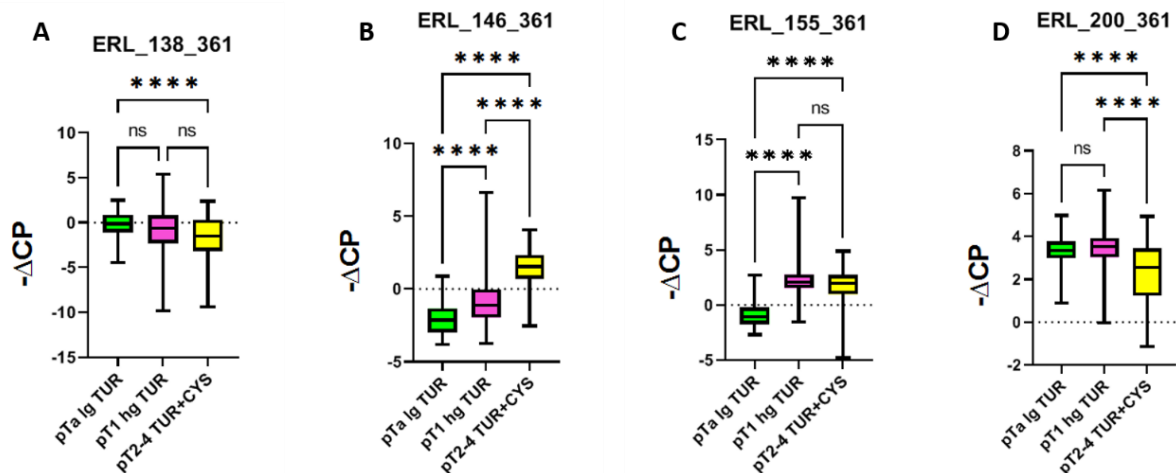


Abb.21: Die Expressionslevel der vier miRNAs miR-138-5p (A), miR-146b-5p (B), miR-155-5p (C) und miR-200a-3p (D) in pTa low grade (TUR n=86), pT1 high grade (TUR n=108) und pT2-4 (TUR n=16; Cys n=74) wurden anhand der Testkohorte mittels qPCR analysiert. Die Normalisierung erfolgte über die Referenz miR-361-5p. Angegebene p-Werte wurden via GraphPad Prism mit dem Kruskal-Wallis Test (Dunn's multiple comparison) erstellt, die p-Werte entspringen approximate t-tests.

5.6 Korrelation von T-Kategorie und Differenzierungsgrad mit dem miRNA-Profil

Es sollte überprüft werden, ob ein Zusammenhang zwischen miRNA-Expression und den Tumoreigenschaften T-Kategorie und Differenzierungsgrad (Grading) besteht. Das histologische Grading erfolgte in Homburg sowohl nach dem Grading System G1-G3 als auch nach dem neuen Grading low vs. high grade. Es wurden NMBIC- und MIBC-Proben analysiert.

Die Expressionslevel nach T-Kategorien wurden an der ERL- und HOM-Kohorte gemeinsam überprüft (Abb.22, 2 A-D). Die Daten belegen, dass innerhalb der MIBC kein signifikanter Expressionsunterschied zwischen T2, T3 und T4 Tumoren für keine der vier miRNA vorlag. Die NMIBC Gruppe (Ta, T1) zeigte signifikante Expressionsunterschiede für miR-138-5p ($p=0.0027$), miR-146b-5p ($p<0.0001$) und miR-155-5p ($p<0.0001$), nicht aber für miR-200a-3p. MiR-138-5p unterschied sich signifikant zwischen Ta und T3 ($p=0.0003$), T4 ($p=0.0073$). Ta und T1 unterschieden sich signifikant von T2, T3 und T4 in der Expression von miR-146b-5p (alle: $p<0.0001$). MiR-155-5p zeigte signifikante Unterschiede zwischen Ta und T2, T3 und T4 (alle: $p<0.0001$), aber nicht zwischen T1 und T2, T3 und T4. Für miR-200a-3p gab es signifikante Unterschiede zwischen Ta und T2, T3 ($p<0.0001$) und T4 ($p=0.0143$) und zwischen T1 und T3 ($p<0.0001$), nicht aber zwischen T1 und T2 oder T4.

Die NMIBC-Gruppe der HOM-Kohorte enthielt Proben aller drei Malignitätsgrade (G1, G2, G3). Die Graphik (Abb.21, 1 A-D) zeigt, dass es keinen signifikanten Unterschied in der G3 Gruppe zwischen pTa und pT1 gab, allerdings kann man bei miR-146b-5p, miR155-5p und miR-200a-3p eine Tendenz erkennen, dass in den pT1 G3 Proben die Expressionslevel mehr in Richtung der MIBC gehen als die pTa G3. MiR-138-5p unterschied sich nicht signifikant zwischen G1 und G2 und G1 und G3, aber signifikant zwischen pTa G2 und G3 ($p=0.0261$). Für miR-146b-5p und miR-155-5p zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen pTa G1 und pT1 G3 ($p=0.0018$), zwischen pTa G2 und pT1 G3 ($p=0.0007$), nicht aber zwischen G1 und G2, pTa G1 und G3 und pTa G2 und G3. Die Expression der miR-200a-3p unterschied sich nicht signifikant hinsichtlich des Gradings.

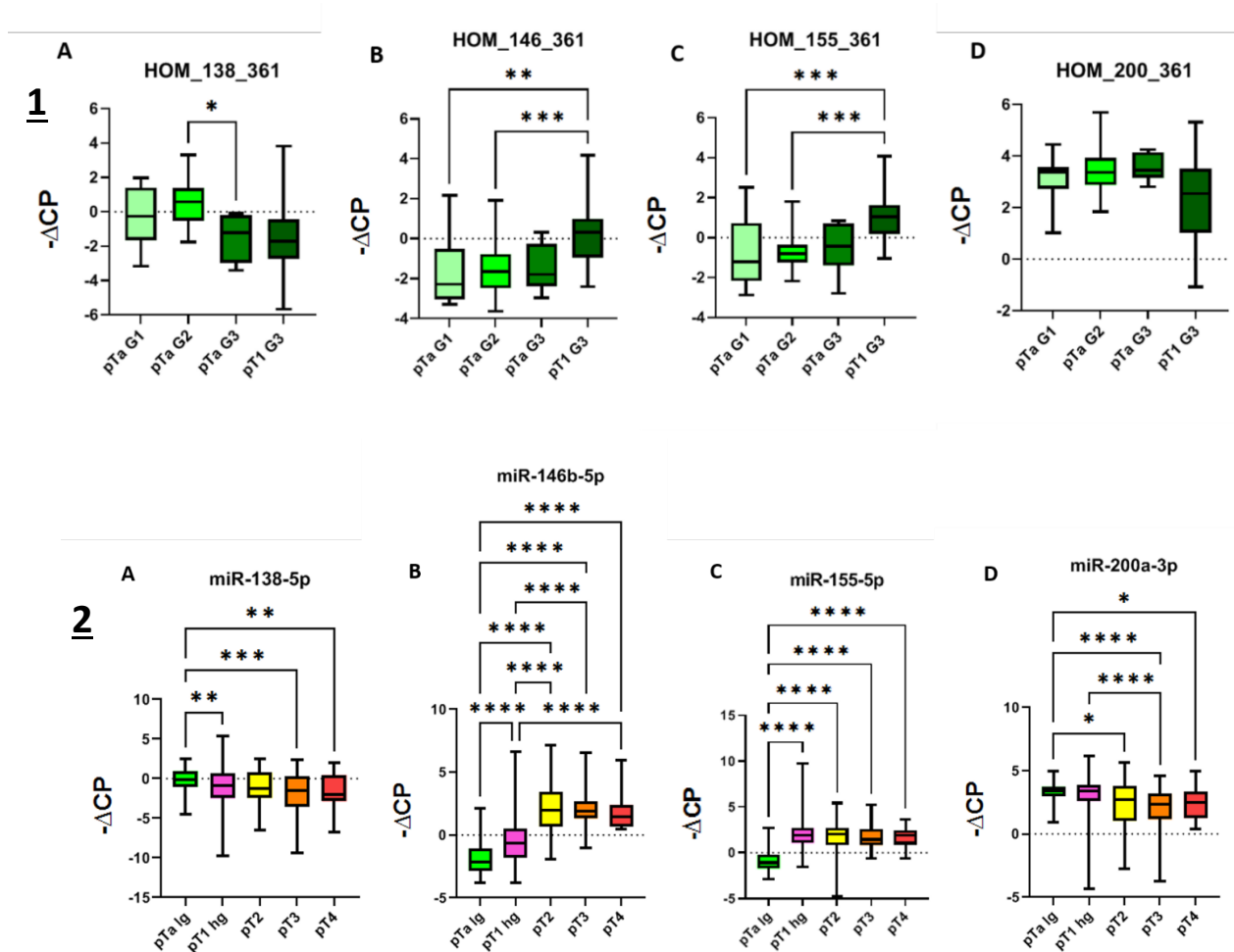


Abb.22: **1:** Die TUR-Expressionslevel der vier miRNAs miR-138-5p (A), miR-146b-5p (B), miR-155-5p (C) und miR-200a-3p (D) in pTa G1 (n=14), pTa G2 (n=21), pTa G3 (n=6), pT1 G3 (n=28) der HOM Kohorte.

2: Analyse der TUR- und Cys-Expressionslevel der vier ausgewählten miRNAs miR-138-5p (A), miR-146b-5p (B), miR-155-5p (C) und miR-200a-3p (D) in pTa low grade (n=113), pT1 high grade (n=151), pT2 (n=36), pT3 (n=57) und pT4 (n=26) der ERL und HOM Kohorte nach T-Kategorien.

Die Expressionslevel wurden mittels qPCR analysiert. Die Normalisierung erfolgte über die Referenz miR-361-5p. Angegebene Signifikanzniveaus wurden via GraphPad Prism mit dem Kruskal-Wallis Test (Dunn's multiple comparison) erstellt.

Um innerhalb einer Gruppe Heterogenität auszuschließen, wurden die Expressionslevel der vier miRNA von low und high grade verglichen, ohne signifikante Unterscheidung in keiner miRNA (Anhang Abb.29).

5.7 Molekulare Subtypisierung

Die Eingruppierung der MIBC-Fälle der Testkohorte hinsichtlich molekularer Subtypen erfolgte durch PD Dr. med. Markus Eckstein am Institut für Pathologie des Uniklinikums Erlangen. Von 96 Fällen konnten 60 pT2-4 Fälle dem luminalen, 36 dem basalen Subtypen zugeordnet werden. Mir-138-5p ($p=0.897$) zeigte keinen signifikanten Expressionsunterschied zwischen luminalem und basalem Subtyp (Abb.23). MiR-146b-5p ($p<0.0001$) und miR-155-5p ($p=0.005$) waren signifikant höher exprimiert, und miR-200a-3p ($p<0.0001$) war signifikant niedriger exprimiert im basalen Subtyp von MIBC.

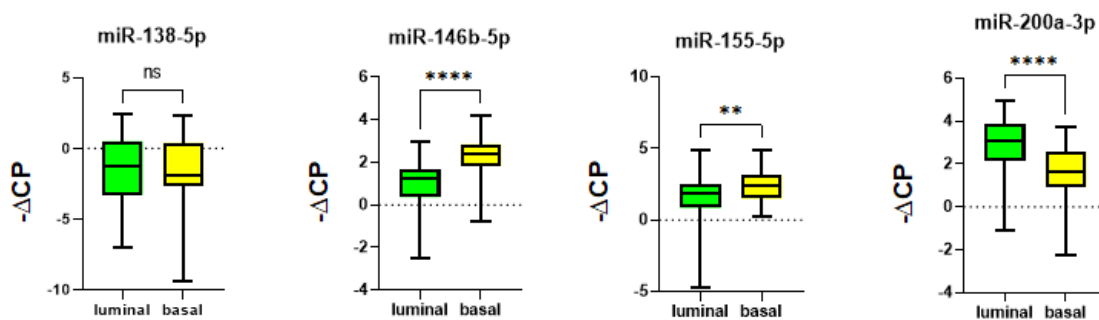


Abb.23: Die Expressionslevel der vier miRNAs miR-138-5p (A), miR-146b-5p (B), miR-155-5p (C) und miR-200a-3p (D) in MIBC (pT2-4; luminal n=60; basal n=36) wurden anhand der Testkohorte ERL mittels qPCR analysiert. Die Normalisierung erfolgte über die Referenz miR-361-5p. Angegebene p-Werte wurden mit dem Man Whitney Test via GraphPad Prism erstellt, die p-Werte entspringen exakten, two tailed t-tests.

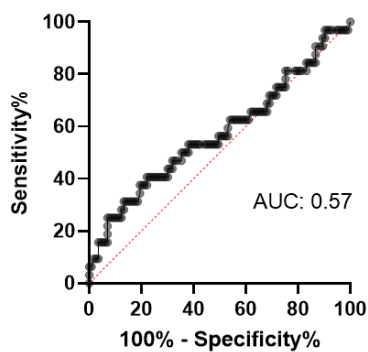
5.8 ROC Kurven-Analyse und Definition der cut-off-Werte

Zur Bewertung der diagnostischen Güte, d.h., wie sicher das Expressionsprofil der einzelnen miRNAs NMIBC von MIBC trennen kann, wurden ROC-Kurven mittels TUR-Expressionsdaten für alle vier miRNAs erstellt (Abb.24). Um die statistische Qualität des Tests durch eine höchstmögliche Anzahl an Fällen zu maximieren, wurden die Trainings- und die Testkohortendaten zusammen getestet. Die ROC-Kurven ergaben in Tabelle 15 angegebene Werte für AUC, Sensitivität (Sens) und Spezifität (Spez). Basierend auf den ROC-Kurven und unter Anwendung des Youden-Index konnten cut-off-Werte für alle vier miRNAs definiert werden (Anhang Abb.35; Tab. 15).

miRNA	AUC	Sensitivität	Spezifität	Cut-off
miR-138-5p	0,57 (p=0,20)	40.63%	77.8%	< -1.185
miR-146b-5p	0.92 (p<0,0001)	93.55%	76.11%	> -1.050
miR-155-5p	0.88 (p<0,0001)	93.75%	70.8%;	> -0.040
miR-200a-3p	0.60 (p=0,07)	46.88%	80.53%	< 2.855

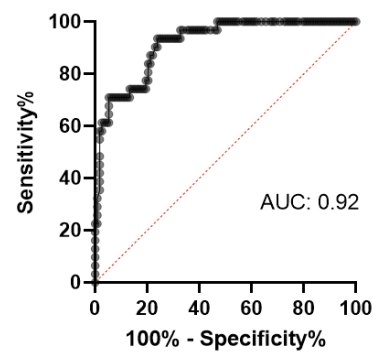
Tabelle 15: AUC, Sensitivität und Spezifität der getesteten miRNA basierend auf ROC-Kurven; Cut-off basierend auf ROC-Kurven und Youden-Index

A ROC curve: ROC of miR-138-5p



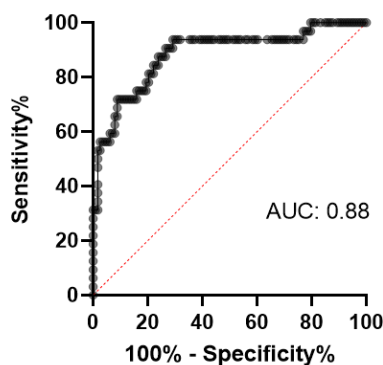
cut-off	Sensitivity%	Specificity%
< -1.185	40,63	77,88

B ROC curve: ROC of miR-146b-5p



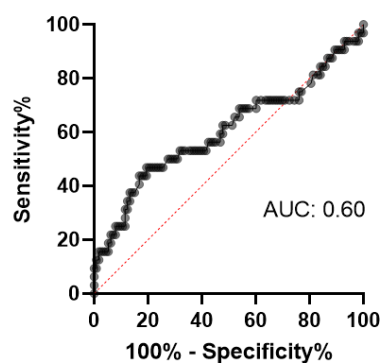
cut-off	Sensitivity%	Specificity%
> -1.050	93,55	76,11

C ROC curve: ROC of miR-155-5p



cut-off	Sensitivity%	Specificity%
> -0.4000	93,75	70,8

D ROC curve: ROC of miR-200a-3p



cut-off	Sensitivity%	Specificity%
< 2.855	46,88	80,53

Abb.24: ROC-Kurven wurden aus den Daten von TUR-Präparaten der Gruppen NMIBC (pTa Ig n=113) und MIBC (pT2-4 n=32) der Trainings- und Testkohorte erstellt. AUC 0.57 für miR-138-5p (p=0,20), Sensitivität (Sens) 40.63%, Spezifität (Spez) 77.8%; AUC 0.92 für miR-146b-5p (p<0,0001), Sens 93.55%, Spez 76.11%; AUC 0.88 für miR-155-5p (p<0,0001), Sens 93.75%, Spez 70.8%; AUC 0.60 für miR-200a-3p (p=0,07) Sens 46.88%, Spez 80.53%. Unter Anwendung des Youden-Index konnten Cut-off-Werte für miR-138-5p (< -1.185), miR-146b-5p (> -1.050), miR-155-5p (> -0.040) und miR-200a-3p (< 2.855) definiert werden. ROC Kurven wurden mit GraphPad Prism 9 erstellt, die Berechnung des Konfidenzintervalls (95%) erfolgte mit der Wilson/Brown Methode. Der Youden-Index wurde manuell in Excel Tabellen erstellt.

5.8.1 Testanwendung der cut-off-Werte: Fallbeispiel Upstaging des Tumors

Ein zum Zeitpunkt der Diagnosestellung 74-jähriger männlicher Patient wurde erstmals im März 2016 in der Universitätsklinik für Urologie und Kinderurologie in Homburg mit Verdacht auf ein Harnblasenkarzinom transurethral reseziert. Der pathologische Befund ergab ein Urothelkarzinom der Harnblase, klassifiziert als pT1 G2/3 (*TUR 1 inv, ninv*). 11 Wochen später wurde der Patient erneut reseziert; das Gewebe sicherte den pathologischen Befund pT1 G2/3 (*TUR 2 inv, ninv*). Aufgrund des erhöhten Risikos einer Muskelinvasion wurde der Patient im Juli einer in domo DaVinci-Zystektomie zugeführt (*Cys inv, ninv*). Die pathologische Untersuchung der urotheltragenden Harnblase ergab ein Upstaging: einen pT3a Tumor mit begleitendem Cis und Fernmetastasen (pT3a, pN0, pM1, Cis). Alle drei Präparate lagen zur miRNA-Profil-Analyse vor und ergaben folgende Daten (*Tab.16*):

	<u>-ΔCP (138-361)</u>	<u>-ΔCP (146-361)</u>	<u>-ΔCP (155-361)</u>	<u>-ΔCP (200a-361)</u>
Patient TUR1 inv	1,27	0,71	2,31	5,73
Patient TUR1 ninv	-1,40	1,00	2,35	3,52
Patient TUR2 inv	-3,23	-0,12	1,13	3,99
Patient TUR2 ninv	-0,88	0,94	3,25	-0,36
Patient Cys inv	-3,55	0,47	-0,37	3,20
Patient Cys ninv	-1,74	0,81	1,38	0,52

Tabelle 16: Invasive und nicht-invasive Areale aus zwei TUR- und einem Zystektomiepräparat eines Patienten mit upstaging in der Zystektomie. Die Expressionslevel der vier miRNAs miR-138-5p, miR-146b-5p, miR-155-5p und miR-200a-3p wurden mittels qPCR analysiert und ausgewertet. Die Normalisierung erfolgte über die Referenz miR-361-5p. Auf die Patientendaten wurden die zuvor definierten cut-off Werte angewandt und damit eine Risikobewertung hinsichtlich potentieller Muskelinvasion überprüft. Gelb markierte Werte zeigen laut cut-off ein potentielles Muskelinvasionsrisiko an.

Die zuvor definierten cut-off-Werte sollen der frühzeitigen Risikobewertung hinsichtlich eines potenziellen Invasionsrisikos dienen. Angewandt auf die Expressionsdaten dieses Patienten zeigte miR-138-5p eine potenzielle Muskelinvasion an in 3 von 4 TUR-Arealen und in 2 von 2 Cys-Arealen, miR-146b-5p und miR-155-5p in 4 von 4 TUR-Arealen und 2 von 2 Cys-Arealen, und miR-200a-3p in 1 von 4 TUR-Arealen und 1 von 2 Cys-Arealen an. In *Tabelle 6* sind die Werte gelb markiert, die laut cut-off eine positive Vorhersage hinsichtlich des Invasionspotentials treffen. Das Fallbeispiel macht klar ersichtlich, dass das hier erstellte miRNA-Profil bereits an den TUR-Präparaten die Invasion angezeigt hat. Das lässt den Schluss zu, dass die cut-off-Werte die Bewertung einer potenziellen Muskelinvasion bereits am TUR-Präparat möglich machen.

5.9 Bioinformatische Analysen

Die folgenden Analysen wurden von Frau Lea Eckhart aus der Arbeitsgruppe von Prof. Lenhof am Zentrum für Bioinformatik der Universität des Saarlandes erstellt⁹⁸. In dieser Arbeit dienen ihre Analysen der bioinformatikgestützten Beurteilung der diagnostischen Power der vier miRNAs.

Mit den Daten der ERL-Kohorte wurden verschiedene KI-Modelle trainiert. Die Klassifizierungen wurden dann anhand der HOM-Kohorte getestet. Die verwendeten Daten entsprechen den gegen miR-361-5p normalisierten $\Delta\Delta\text{CP}$ -Daten aus Kapitel 1.2.

5.9.1 Principle component analysis (PCA)

Die PCA diente der Darstellung der Daten der drei BC-Gruppen pTa Ig, pT1 hg und MIBC (pT2-4) (*Abb.25 A*), sowie der HOM- und ERL-Daten (*Abb.25 B*) im zweidimensionalen Raum. Die Daten wurden zur besseren Unterscheidung farblich sortiert. Die Sortierung nach Gruppe ließ eine gute Trennung der BC-Gruppen erkennen. Das Auftragen der ERL- und HOM-Daten zeigte eine gute Homogenisierung beider Kohorten. Die Daten von TUR-B und Zystektomie zeigten eine leichte Homogenisierung (*Anhang Abb.39*).

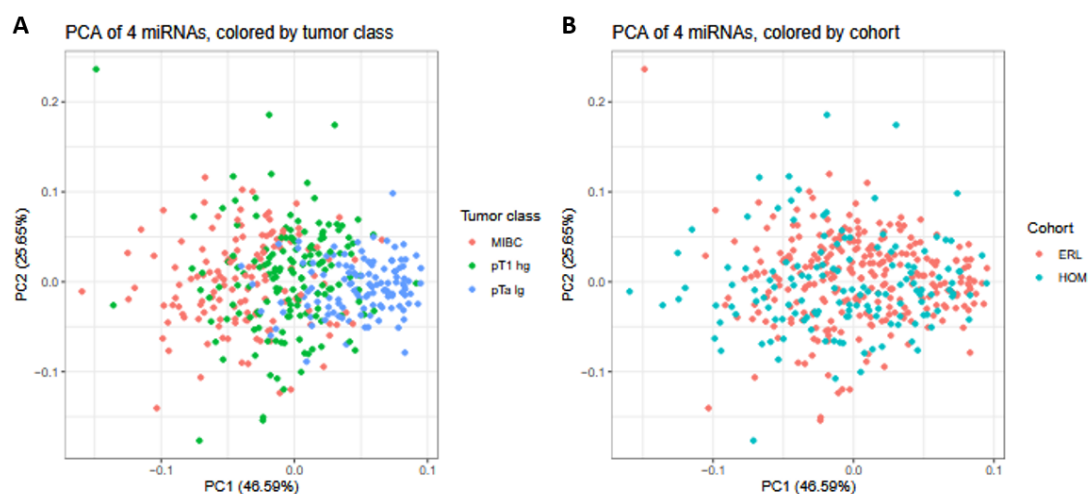


Abb.25: (A) Principle component analysis (PCA) der vier miRNAs nach Gruppen pTa Ig (blau), pT1 hg (grün) und MIBC (pT2-4, rot) (B) Principle component analysis (PCA) der vier miRNAs nach Kohorten HOM (blau) und ERL (rot)

5.9.2 Gruppentrennung durch Kombination verschiedener miRNA Paare

Folgende Graphiken zeigen die zweidimensional aufgetragenen Daten der drei Gruppen nach miRNA-Paarungen. Es wurden alle vier miRNA in allen möglichen Zweierkombinationen separat aufgetragen, um herauszufinden, welche Kombination zur besten Trennung der

Gruppen führt. Die Paarung aus miR-146b-5p und 155-5p (*Abb.25 D*) erzielte die sauberste Trennung. MiR-155-p trennt die pTa Proben von den pT1hg und MIBC sehr gut, jedoch weniger die pT1hg von den MIBC (*Abb.26 B, F*).

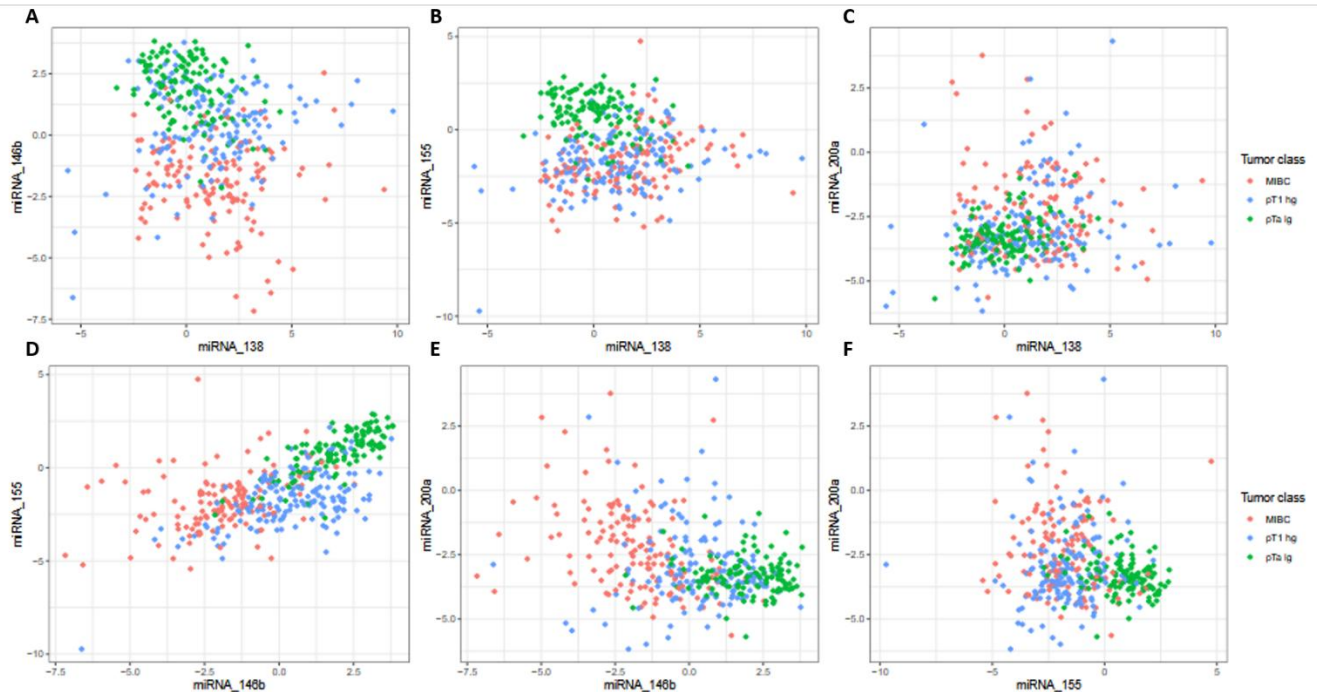


Abb.26: Die Gruppen pTa Ig (blau), pT1 hg (grün) und MIBC (pT2-4, rot) wurden hinsichtlich ihrer Expression zweier miRNA aufgetragen.

A: miR-138-5p + miR-146b-5p; **B:** miR-138-5p + miR-155-5p; **C:** miR-138-5p + miR-200a-3p

D: miR-146b-5p + miR-155-5p; **E:** miR-146b-5p + miR-200a-3p; **F:** miR-155-5p + miR-200a-3p

5.9.3 Diagnostische Güte: Accuracy, Sensitivität & Spezifität

Anhand der vier KI-Modelle AdaBoost, KNN, Random Forest und Vanilla Neural Network wurden zur Differenzierung der pTa Ig vs. MIBC Werte für Accuracy, Sensitivität und Spezifität der miRNAs einzeln oder in verschiedenen Kombinationen erhoben, einmal inklusive der Zystektomiedaten (*Abb.27*), einmal ohne (*Anhang Abb.40*). Ohne Zystektomiedaten verblieben lediglich noch 23 Samples in der MIBC-Gruppe verglichen mit 88 Samples der pTa Ig Gruppe, was zu Einbußen in der Sensitivität führte. Frau Eckhart hat daraufhin durch zwei Sampling-Techniken die Sample-Balance künstlich wiederhergestellt, was die Sensitivitätswerte steigern konnte, allerdings auf Kosten der Spezifitätswerte.

Das Vanilla Neural Network wurde als bestes Klassifizierungsmodell beurteilt. Dieses Modell stellte dar, dass die miR-146b-5p sowohl allein als auch in Kombination mit anderen miRNA, z.B. mit miR-155-5p die besten Werte hinsichtlich Accuracy, Sensitivität und Spezifität lieferte (*Abb.27*).

Abbildung 28 zeigt das Vanilla Neural Network Modell für die Klassifizierung der drei BC Gruppen anhand einer Kombination aus den drei miRNAs miR-138-5p, miR-146b-5p und miR-155-5p. Ein weiteres Merkmal dieser Analyse war der Vergleich der histopathologischen Diagnose (*actual class*) und der vorhergesagten Gruppe. In der Gruppe der MIBC wurden durch den Algorithmus von 43 Fällen 36 (83.7%) als MIBC, 5 (11.6 %) als pT1 hg und 2 (4.6 %) als pTa lg vorhergesagt. Die Gruppe pT1 hg war heterogener, hier wurden von 61 Fällen ca. 32 (52.5 %) als pT1 hg vorhergesagt, 22 (36.0 %) als MIBC und 7 (11.5 %) als pTa lg. In der pTa lg Gruppe wurden 27 (77.1 %) Fälle von 35 als pTa lg ermittelt, 5 (11.3 %) als pT1 hg und 3 (8.6 %) als MIBC.

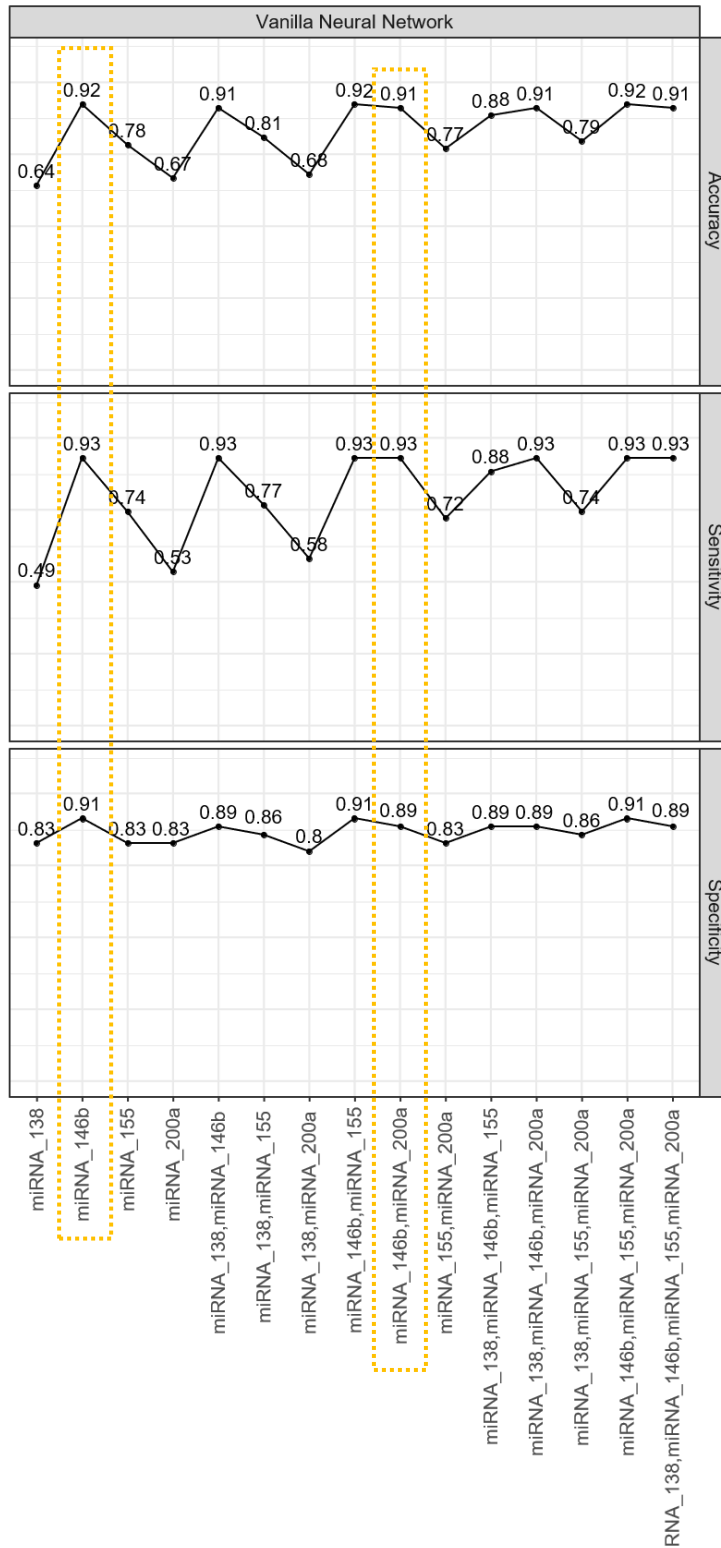


Abb.27: Maschineller Lernalgorithmus Vanilla Neural Network zur Beurteilung der diagnostischen Güte anhand der Parameter Accuracy, Sensitivität und Spezifität hinsichtlich der Differenzierung von NMIBC und MIBC. Das Modell wurde auf den ERL Daten trainiert und auf den HOM Daten getestet.

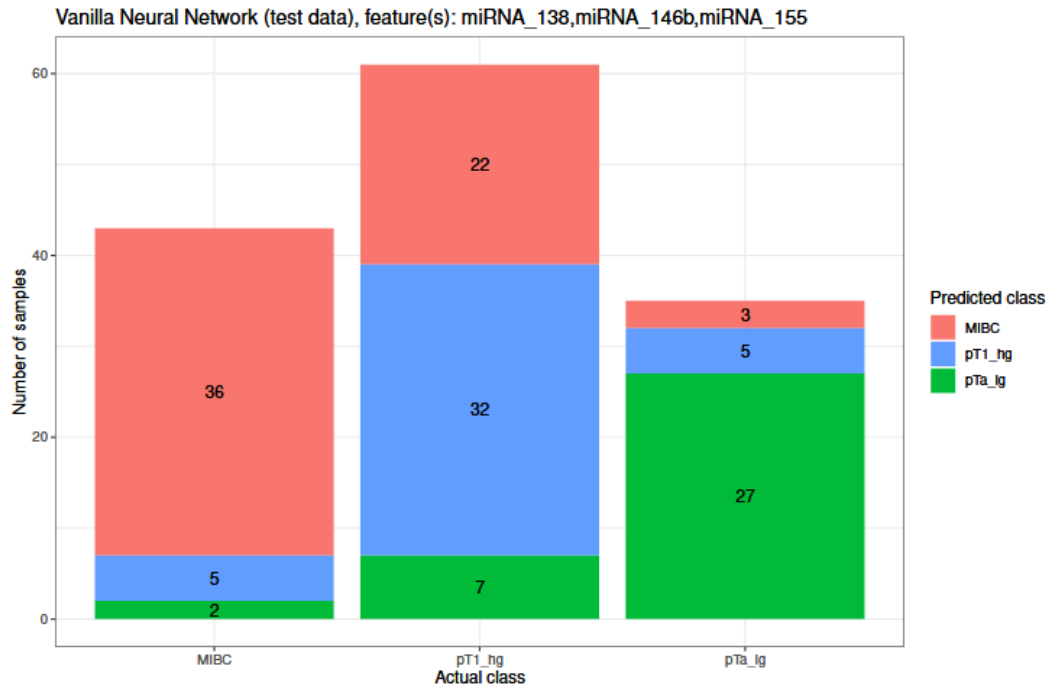


Abb.28: Vanilla Neural Network der kombinierten Expressionsdaten von miR-138-5p, miR-146b-5p, miR-155-5p der Gruppen pTa lg (n=35), pT1 hg (n=61) und MIBC (n=43). Trainiert wurde das Modell auf den ERL Daten, getestet auf den HOM Daten. Das Modell vergleicht die histopathologische Klasse (actual class) mit der bioinformatisch vorausgesagten Klasse (predicted class).

5.9.4 Vorhersage der potenziellen Invasionsfähigkeit von pT1 high grade Tumoren

Im nächsten Schritt wurde untersucht, inwiefern sich bioinformatisch eine Aussage über die potenzielle Invasionsfähigkeit treffen lässt. Dazu wurde ein Modell auf den kombinierten miR-146b-5p und miR-200a-3p-Expressionsdaten der pTa lg und MIBC (ohne Zystektomien) der ERL-Kohorte trainiert und auf den pT1 hg Daten der ERL- und der HOM-Kohorte getestet. Dabei ist ein wahrscheinliches Invasionspotential, also eine Eingruppierung in MIBC, ab einem Wert von 0.5 gegeben. Die Wahrscheinlichkeit, dass die Probe der pTa lg angehören könnte, wäre als $1 - \text{Wahrscheinlichkeit}$ zu berechnen.

Abb.29 A zeigt die Streuung der pT1 hg Fälle im zweidimensionalen Raum hinsichtlich ihrer Wahrscheinlichkeit, dass sie invasiv sind bzw. werden (A). Diese Fälle sind ab einem Wert von 0.5 (50%) potentiell MIBC zuzuordnen und in rot aufgetragen.

Abb. 29 B zeigt pT1 hg ERL- und HOM-Fälle separat aufgetragen. Ab einer Wahrscheinlichkeit von 0.5 würden 21/91 (23.1 %) der ERL-Kohorte und 21/44 (47.7 %) der HOM-Kohorte einer potenziellen Muskelinvasion zugeordnet.

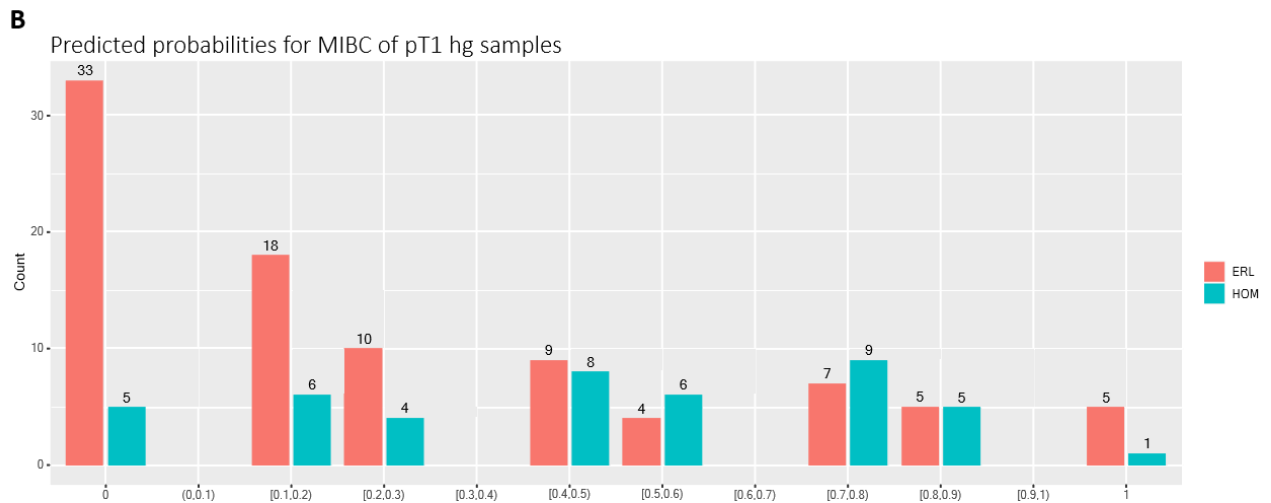
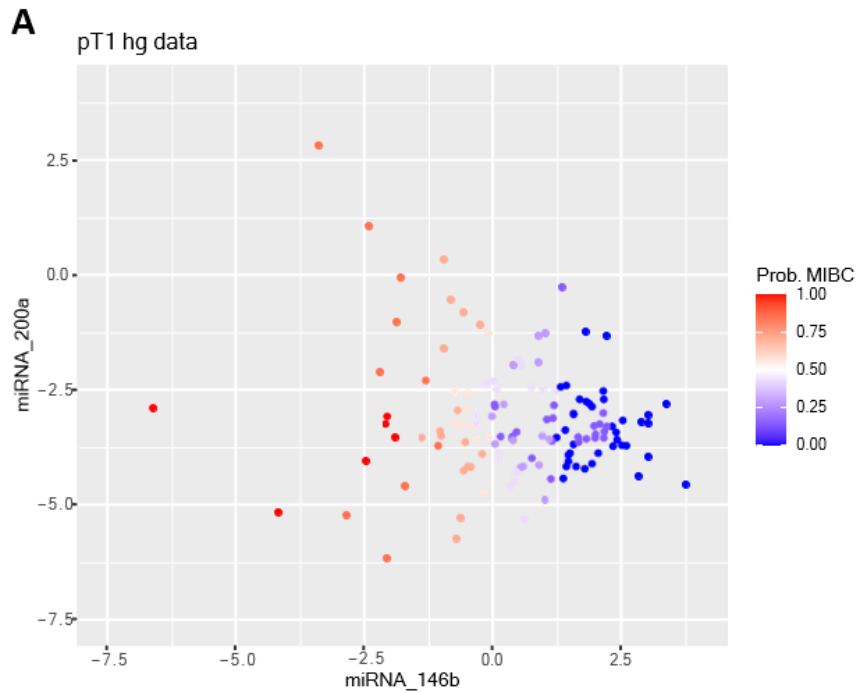


Abb.29: Vanilla Neural Network Modell zur Vorhersage einer potentiellen Muskelinvasion (MIBC) von pT1 hg Tumoren aus kombinierten miRNA-Expressionsdaten von miR-146b-5p und miR-200a-3p. Trainiert wurde auf pTa Ig und MIBC der ERL Kohorte, getestet auf pT1 hg der ERL und HOM Kohorte.

A: 2D-Modell der Streuung der pT1 hg Daten von ERL und HOM (MIBC rot ≥ 0.5 ; NMIBC blau ≤ 0.5).

B: Balkendiagramm der pT1 hg der ERL (rot; n=91) und HOM Kohorte (blau; n=44) zur Vorhersage einer potentiellen Muskelinvasion.

5.10 Funktionelle Analysen

5.10.1 MiRNA-Expressionslevel in Zelllinien

Die Expressionslevel der vier miRNAs wurden in den muskelinvasiven Zelllinien T24 und J82, in den nicht-muskelinvasiven Zelllinien RT112 und 5637 und der nicht-tumorösen Urothel-Zelllinie HCV-29 analysiert. Weiterhin sollte überprüft werden, ob die jeweiligen Zelllinien die Expressionslevel der Gewebeproben reflektieren und damit geeignete funktionelle Modelle darstellen. Alle miRNA wurden in Relation zu den Referenzen RNU48, miR-191-5p und miR-361-5p gesetzt. Für miR-138-5p konnten für T24, J82, RT112 und HVC-29 ähnlich hohe Expressionslevel festgestellt werden, eine niedrigere Expression in 5637. MiR-146b-5p war in T24, J82 und RT112 niedriger exprimiert als in 5637 und HCV-29, welche beide ähnliche Expressionslevel zeigten. MiR-155-5p zeigt in T24, J82 und 5637 höhere Expressionslevel als in RT112 und HCV-29, während sie in RT112 niedriger exprimiert war als in HCV-29. Mir-200a-3p war in T24, J82 und HCV-29 ähnlich exprimiert und deutlich niedriger als in RT112 und 5637. Die Daten für miR-155-5p, wonach die Expression in den muskelinvasiven Zellen höher war als in der nicht-muskelinvasiven Zelllinie RT112 und die Daten für miR-200a-3p, wonach diese in beiden muskelinvasiven Zelllinien niedriger exprimiert war als in den beiden nicht-muskelinvasiven Zelllinien, reflektieren die beobachteten Daten in den Gewebeproben und werden daher als funktionelle Modelle verwendet (Abb.30).

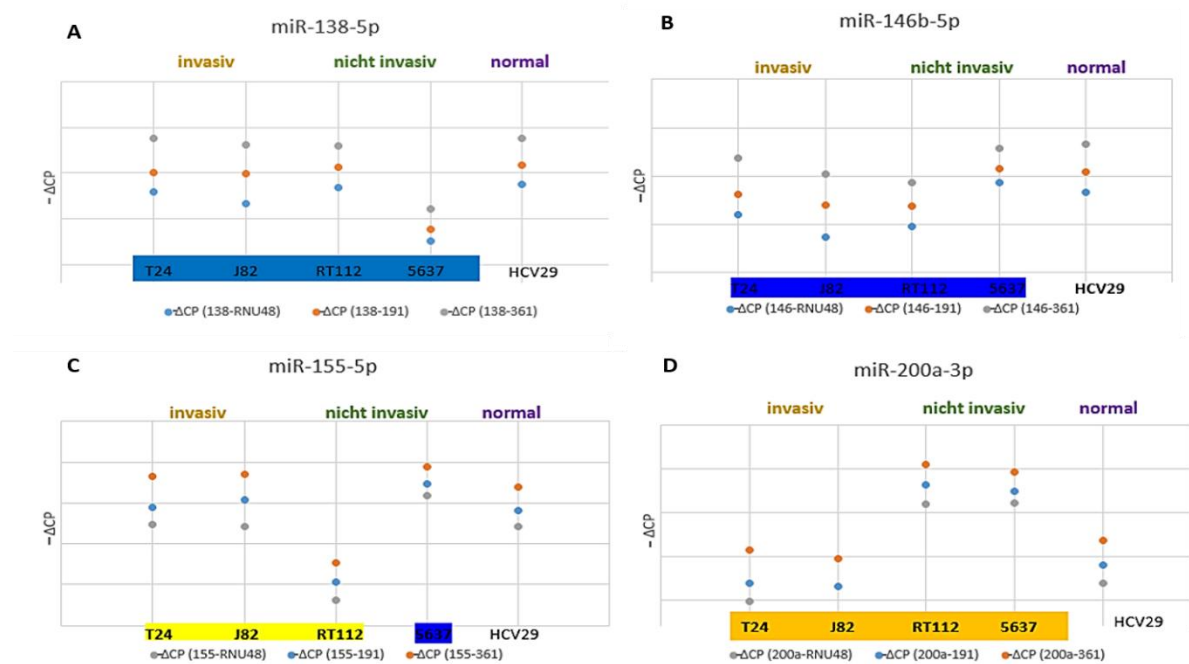


Abb.30: Die Expressionslevel der vier miRNAs miR-138-5p (A), miR-146b-5p (B), miR-155-5p (C) und miR-200a-3p (D) in den muskelinvasiven (invasiven) Zelllinien T24 und J82, in den nicht-muskelinvasiven (nicht invasiven) Zelllinien RT112 und 5637 und der nicht tumorösen Urothel Zelllinie HCV-29 wurden mittels qPCR analysiert. Die Normalisierung erfolgte über die Referenzen RNU48, miR-191-5p und miR-361-5p. Blaue Markierung beschreibt eine Abweichung zu den Gewebedaten, gelb beschreibt eine Übereinstimmung mit den Gewebedaten.

5.10.2 Überexpression der miRNA mimics miR-200a-3p und miR-155-5p

5.10.2.1 Proliferation

Die Proliferation der Zelllinien T24 und J82 wurde nach Überexpression mit miR-200a-3p mimic, RT112 wurde nach Überexpression von miR-155-5p-mimic über 18h mittels BrdU-Assay (*Anhang Abb.36*) und über 72h via RTCA analysiert (*Abb.31*). HCV-29 wurde nach Überexpression von miR-200a-3p hinsichtlich ihres Proliferationsverhaltens über 72h via RTCA untersucht.

Nach Überexpression mit 20nM miR-200a-3p-mimic wurde die Proliferation der T24 Zellen gehemmt. Nach Transfektion mit dem Kontrollmimic bleibt die Proliferationsrate in den T24-Zellen gleich der Rate der Zellen im nativen Zustand. Nach Zugabe des Transfektionsreagenz zeigen die T24-Zellen eine Zunahme der Proliferation. In J82 Zellen wurde durch miR-200a-3p die Proliferation gehemmt, ebenso bei Zugabe des Kontrollmimic. Die Proliferation der J82 wurde durch reine Zugabe des Transfektionsreagenz gefördert. Die Proliferation der RT112 wurde durch miR-155-5p inhibiert, während die Transfektionsreagenzkontrolle und die Mimickontrolle die Proliferation leicht hemmten. Die Proliferation von HCV-29-Zellen wurde durch miR-200a-3p reduziert, durch das Transfektionsreagenz und durch das Kontrollmimic in ihrer Proliferation gefördert.

5.10.2.2 Migration

Das Migrationsverhalten der Zelllinien T24, J82 und HCV-29 wurde nach Überexpression mit miR-200a-3p-mimic, RT112 wurde nach Überexpression von miR-155-5p-mimic über 18h mittels Fluoroblok-Transwell-Inserts (*Anhang Abb.38*) und über 36h via RTCA beobachtet (*Abb.32*). Die Mimickontrolle wurde in den RTCA-Experimenten mitgeführt.

Die Migration von T24-Zellen wurde nach Überexpression von miR-200a-3p komplett inhibiert, nach Behandlung mit Transfektionsreagenz und nach Transfektion mit Kontrollmimic gehemmt (*Abb.32 A*). J82-Zellen wurden nach Überexpression von miR-200a-3p in ihrer Migration gehemmt, durch Transfektionsreagenz allein in ihrer Migration gefördert und durch Transfektion mit Kontrollmimic gehemmt (*Abb.32 B*). Das Migrationsverhalten von RT112 wurde durch Überexpression von miR-155-5p fast komplett inhibiert, durch Transfektionsreagenz und Kontrollmimic stark reduziert (*Abb.32 C*). HCV-29-Zellen zeigten nach Überexpression von miR-200a-3p einen ungewöhnlichen Kurvenverlauf und durch die beiden Kontrollen ein reduziertes Migrationsverhalten (*Abb.32 D*). Es ist möglich, dass einige Zellen migriert sind, aber nicht dauerhaft an der Membran adhären konnten und somit das Signal an der Membran sukzessive verloren ging.

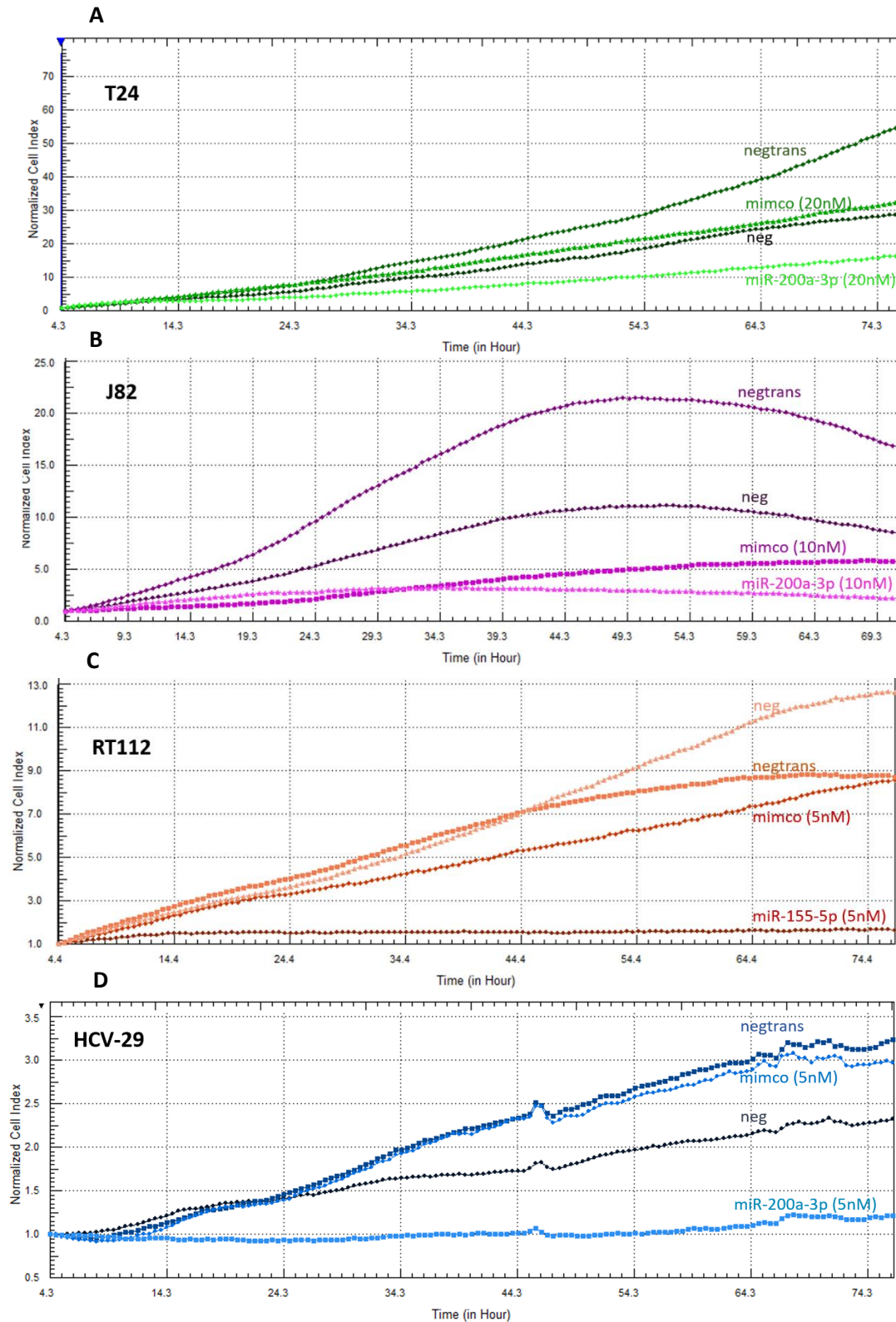


Abb.31: Proliferationsverhalten der Zelllinien T24 (A), J82 (B), RT112 (C) und HCV-29 (D) im unbehandelten Zustand (neg), nach Behandlung mit Transfektionsreagenz (negtrans), nach Behandlung mit Transfektionsreagenz und Kontrollmimic (mimco) und nach transienter Transfektion von miR-200a-3p mimic oder miR-155-5p mimic, erstellt via RTCA xCelligence System. Die Graphen zeigen einen Zeitraum von 72h. Zellinokulation A: 1×10^4 ; B: 1×10^4 ; C: 3×10^3 ; D: 4×10^3 .

5.10.2.3 Invasion

T24-Zellen nach Überexpression mit miR-200a-3p wurden fast vollständig in ihrem Invasionsverhalten inhibiert (miR-200a-3p: 1.9 %). Die Zellen zeigten nach 24h im Vergleich zu den nativen Zellen in den beiden Kontrollen ein gemindertes Invasionsverhalten (negtrans: 67.4 %; mimco: 75.6 %) (*Abb.33 A*).

J82-Zellen zeigten nach Überexpression mit miR-200a-3p noch 40.9 % Invasion im Vergleich zu den unbehandelten Zellen, durch das Transfektionsreagenz noch 69.7 % Invasion und mit Kontrollmimic 31.8 % (*Abb.33 B*).

Das Invasionsverhalten von RT112 wurde durch miR-155-5p total inhibiert (miR-155-5p: 0.0 %), nahm durch Zugabe von Transfektionsreagenz deutlich zu (negtrans: 184.6 %), während die Invasion durch Kontrollmimic (mimco: 61.5 %) reduziert wurde (*Abb.33 C*).

HCV-29 Zellen zeigten eine Invasionsminderung nach Behandlung mit miR-200a-3p (24.8 %) und mit Reagenz (negtrans: 77.2 %), durch das Kontrollmimic wurde das Invasionsverhalten gesteigert (mimco: 153.5 %) (*Abb.33 D*).

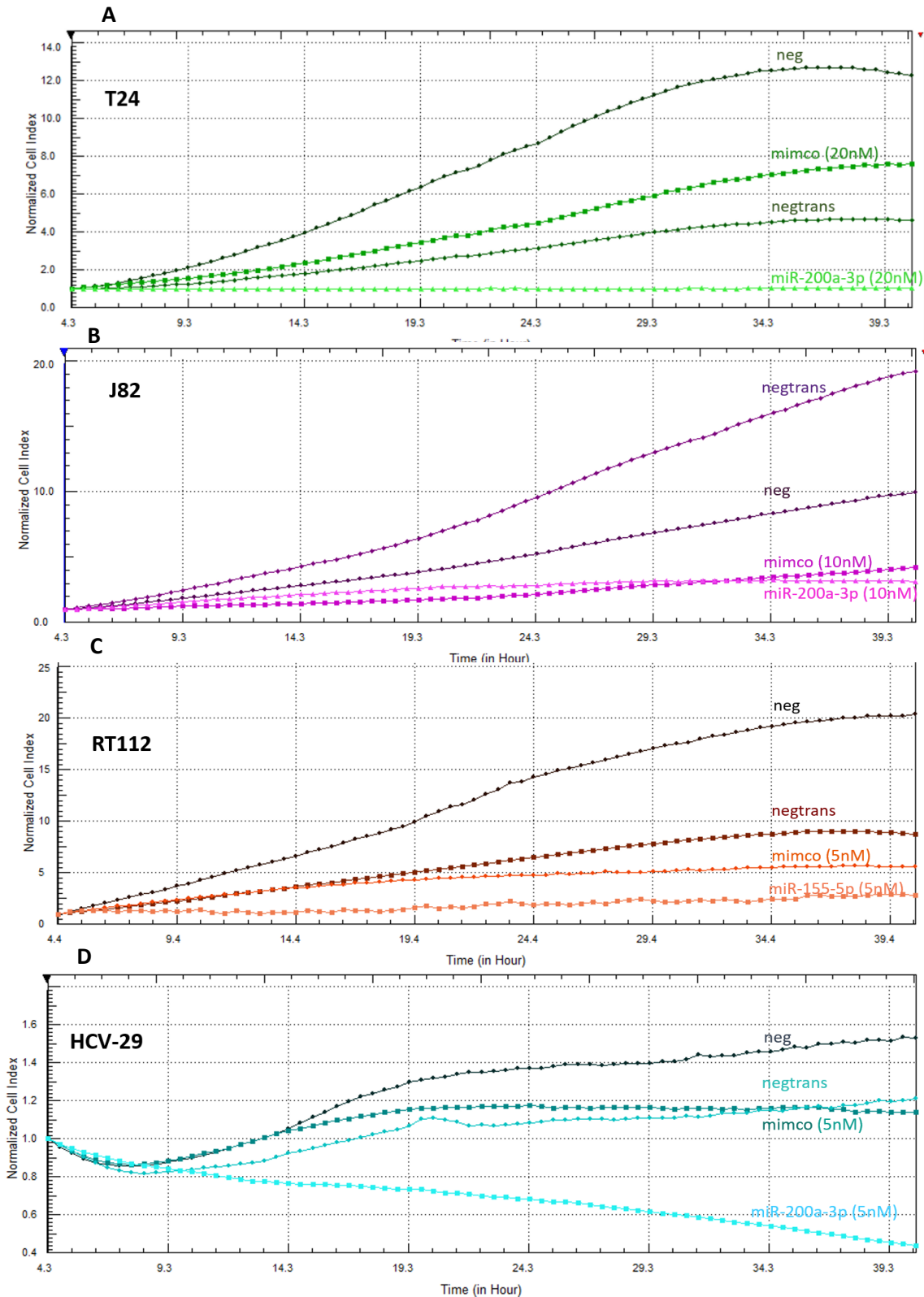


Abb.32: Migrationsverhalten der Zelllinien T24 (A), J82 (B), RT112 (C) und HCV-29 (D) im unbehandelten Zustand (neg), nach Behandlung mit Transfektionsreagenz (negtrans), nach Behandlung mit Transfektionsreagenz und Kontrollmimic (mimco) und nach transients Transfektion von miR-200a-3p mimic oder miR-155-5p mimic, erstellt via RTCA xCelligence System. Die Graphen zeigen einen Zeitraum von 36h. Zellinokulation A: 3×10^4 ; B: 3×10^4 ; C: 5×10^4 ; D: 6×10^4 .

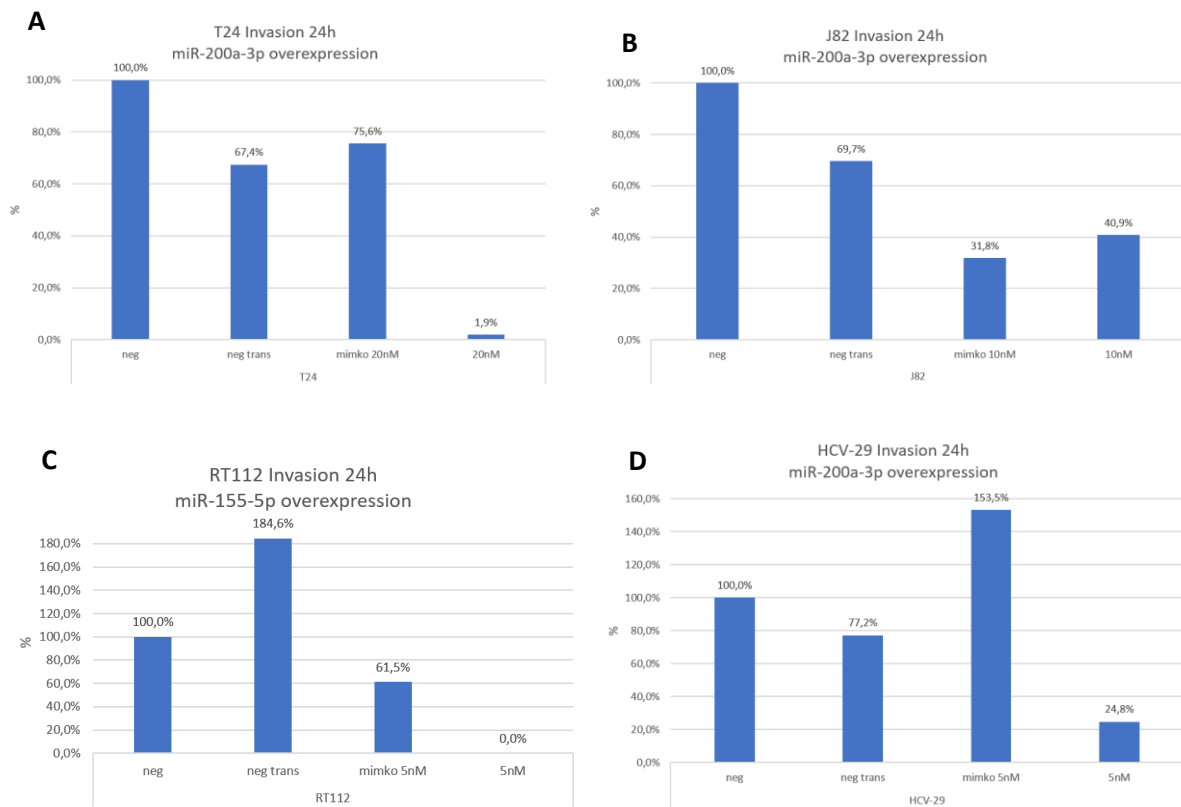


Abb.33: Invasionsverhalten der Zelllinien T24 (A), J82 (B), RT112 (C) und HCV-29 (D) im unbehandelten Zustand (neg), nach Behandlung mit Transfektionsreagenz (negtrans), nach Behandlung mit Transfektionsreagenz und Kontrollmimic (mimco) und nach transienter Transfektion von miR-200a-3p mimic oder miR-155-5p mimic. Zellen wurden in Fluoroblok Invasionsplatten inokuliert, nach 24h wurden die Zellen fixiert, mit DAPI (1:1000) gefärbt und mikroskopisch dargestellt. Quantifizierung erfolgte mittels ImageJ Software, Berechnung mittels Excel Software. Zellinokulation A: 5×10^4 ; B: 3×10^4 ; C: 7×10^4 ; D: 5×10^4 .

6. Diskussion

Das Harnblasenkarzinom ist die zehnthäufigste Tumorerkrankung weltweit, sowie der zweithäufigste Urogenitaltumor. 30 % der nicht-muskelinvasiven Tumore durchlaufen eine Progression hin zum muskelinvasiven Stadium, was mit schlechter Prognose hinsichtlich Metastasierung und Langzeitüberleben sowie verringerter Lebensqualität durch Verlust der Harnblase einhergeht. Die Früherkennung des Invasionspotentials ist essenziell für die Diagnostik und könnte einerseits eine frühe, radikale Zystektomie rechtfertigen, um weitere Progression zur Muskelinvasion und Metastasierung zu verhindern. Weiterhin könnte ein sehr geringes Invasionspotenzial eine Überbehandlung durch potenziell unnötige, frühe radikale Zystektomie verhindern und eine organerhaltende Therapiestrategie rechtfertigen. Die Risikobewertungsstrategie nach bisheriger Leitlinie ist begrenzt und eröffnet einen unerfüllten medizinischen Bedarf für molekulare Biomarker, die eine sichere Risikobewertung hinsichtlich des individuellen Invasionspotentials zulassen. Dysregulierte miRNA sind an der Karzinogenese von BC maßgeblich beteiligt und können im klinischen Alltag potenziell einen prädiktiven und prognostischen Mehrwert haben.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, die Expression von spezifischen miRNA in verschiedenen Stadien des Harnblasenkarzinoms zu analysieren und als potenzielle Biomarker für Invasivität zu etablieren bzw. zu bestätigen.

6.1 Methodenetablierung und Vorergebnisse

Die RT-qPCR stellt eine essenzielle Methode zur Detektion minimalster Mengen von Nukleinsäuren in einem weiten Spektrum von Ausgangsmaterialien dar und ist im Laboralltag der naturwissenschaftlichen Forschung sowie medizinischer Diagnostik unverzichtbar geworden.

Die *Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments* (MIQE)-Guidelines stellen einen Richtlinienatz aus 85 Einzelpunkten zur Durchführung und Publikation quantitativer Real-Time-PCR-Experimente und -daten dar. Sie wurden entwickelt, nachdem im Jahr 2002 eine Arbeit veröffentlicht worden war, in der behauptet wurde, es könnten Masernviren bei Kindern mit Autismus durch die Verwendung von RT-qPCR nachgewiesen werden. Aber: die publizierten Daten waren vollständig unreproduzierbar, die Autoren hatten selbst nicht versucht, sie zu reproduzieren^{99–102}. Nach eingehender Analyse wurde offensichtlich, dass die Rohdaten eine Vielzahl an grundlegenden Fehlern in der Datenanalyse aufwiesen. Dieser Vorfall veranlasste Stephen Bustin dazu, die MIQE-Richtlinien zu erstellen, um ein grundlegendes Qualitätsniveau für die Publikation von qPCR-Daten bereitzustellen^{89,103,104}. Diese Richtlinien sollen unter allen Laboren Datenkonsistenz, methodische Transparenz, sowie Integrität innerhalb der vielfältigen wissenschaftlichen Literatur gewährleisten. Besonders die Methodik der Normalisierung schließt potenzielle, die wissenschaftliche Interpretation verzerrende inter-run-variations aus.

In dieser Arbeit wurden essenzielle Kriterien dieser Guidelines erfüllt. Neben der Normalisierung der Probenqualität, -prozessierung und -quantifizierung wurde die Datenanalyse optimal normalisiert. Geeignete Kalibratoren in dieser Arbeit, die sogenannten Referenzen, sind miRNA, deren Expression sich unter sich verändernden biologischen Konditionen nicht verändert, also in unterschiedlichen Tumorstadien unreguliert bleibt. Eine Vorabauswahl geeigneter Referenzen wurde bereits durch vorangegangene laborinterne Arbeit mittels Array-Analyse getroffen, die über verschiedene BC-Tumorstadien stabile Expressionswerte zeigte. Diese miRNA wurden mit der Literatur sowie Empfehlungen der Firma Thermofisher⁹¹ verglichen und auf Basis der Literaturrecherche⁹²⁻⁹⁴ vier miRNA und eine small nucleolar RNA als Referenzkandidaten ausgewählt: RNU48, miR-191-5p, miR-361-5p, miR-16-5p, miR-29c-5p. Diese wurden vorab mit der Etablierungskohorte hinsichtlich ihrer Expressionsstabilität in NMIBC und MIBC untersucht. MiR-16-5p und miR-29c-5p wurden wegen der schlechtesten STD- und SEM-Werte in der ersten Testreihe von weiteren Tests ausgeschlossen. Die drei übrigen Referenzen wurden zusammen mit jeder Probe aus den zwei Patientenkohorten mitgeführt. So ergaben sich n=417 Daten, die über einen hochkomplexen mathematischen Algorithmus⁹⁵ ausgewertet und miR-361-5p als stabilste Referenz identifiziert werden konnten.

„Die effizienzkorrigierte relative Quantifizierung mittels Real-time RT-PCR stellt bis dato die genaueste Form der mRNA-Quantifizierung dar [Pfaffl et al]“^{88,90}. Die in der wissenschaftlichen Landschaft gängigste Methode zur Analyse von qPCR-Daten ist die $\Delta\Delta C_P$ -Methode nach Livak⁹⁷. Dementsprechend wurde aus den Mittelwerten der Triplikate ein ΔC_P aus der Differenz $C_P (\text{Target}) - C_P (\text{Referenz})$ gebildet. Die relative Expression ($\Delta\Delta C_P$) wurde via $\Delta\Delta C_P = MW \Delta C_P (\text{NMIBC}) - MW \Delta C_P (\text{MIBC})$ ermittelt. Die $\Delta\Delta C_P$ -Methode setzt eine akkurate Verdopplung der Moleküle pro Zyklus voraus, das entspricht einer Effizienz von 2 ($E = 2$). Die reale Effizienz der qPCR erreicht jedoch unter optimierten Bedingungen Werte von $E = 1,7 - 1,9$ mit einer Schwankungsbreite von $1,5 - 2,1$. MIQE-konform⁸⁸⁻⁹⁰ wurden daher die Effizienzen aller Primer via Standardkurve ermittelt. Eine perfekte Amplifikation würde eine Standardkurve mit einer Steigung von "2" erzeugen, was bedeutet, dass sich mit jedem Zyklus die Templatmenge optimal verdoppelt. Die Effizienzen von 6/8 Primern bewegen sich in einem engen Bereich um 2.0. Der Referenzprimer miR-191-5p erzielte 1.85, der Targetprimer miR-146b-5p 2.13. Diese Werte konnten experimentell bestätigen, dass die qPCR-Amplifikationen in dieser Arbeit optimal verliefen und damit die Qualität der Daten sicherstellten. Von einer Effizienzkorrektur konnte daher abgesehen werden. Das hat zugleich mehrere Vorteile: als die Effizienzen ermittelt wurden, war bereits ein großer Datensatz ermittelt, ohne die Effizienzen zu berücksichtigen. Die Wiederholungsmessungen dieser Proben hätten einen massiven Mehraufwand sowohl zeitlich als auch finanziell bedeutet, da die Proben unter veränderten Softwaresettings erneut hätten gemessen werden müssen, denn die LightCycler480-Software benötigt dazu veränderte Settings. Weiterhin wären damit die jeweiligen Probenvolumina verringert worden, die für weiterführende experimentelle Analysen und durch erneutes Auftauen die Qualität der gefrorenen Proben potenziell gefährdet worden. Des Weiteren erleichtert die Datenanalyse via $\Delta\Delta C_P$ die Vergleichbarkeit mit anderen Arbeiten, da, wie oben beschrieben, diese Methode international die gängigste ist. Alle in dieser Arbeit dargestellten

Expressionsauswertungen basieren demzufolge auf komplexen und gleichzeitig transparenten und reproduzierbaren Analysemethoden.

Die spektrometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren ist in einer Range von 10-100 ng/μl am zuverlässigsten. Zu diesem Zweck wurden die RNA-Mengen zunächst auf 50ng/μl eingestellt und dann auf 2 ng/μl verdünnt und durch erneute Messung validiert. Die Quantifizierung von RNA kann durch den Einsatz des Qubit-Systems weiter optimiert werden. Das Qubit-System kann durch interkalierende Farbstoffe eine LOD von bis zu 10pg/μl zuverlässig detektieren. Des Weiteren kann das Spektrometer lediglich eine UV-Absorption messen, was eine Unterscheidung von Nukleinsäuren nicht erlaubt. Das Qubit-Fluorometer jedoch nutzt targetspezifische Reagenzien, was die Konzentrationsmessung valider macht, da die Konzentration möglicher Verunreinigungen sowie das Vorhandensein weiterer Nukleinsäuren keine Rolle spielt. Zwar ist sowohl die Probenvorbereitungszeit länger als auch die Kosten pro Reaktion deutlich höher, jedoch lohnt sich diese Optimierung im Sinne der experimentellen Qualität und könnte zum Standard in der Diagnostik werden.

6.2 Validierung der Vordaten: miRNA-Expressionsprofil trennt NMIBC von MIBC mit hoher Genauigkeit

Nachdem das TaqMan-Advanced-System im Labor verwendet wurde, die Primer jedoch instabile Amplifikationskurven aufwiesen, wurde das klassische TaqMan-System mittels Etablierungskohorte reetabliert. Bereits die Daten der Re-Etablierung zeigten – neben stabilen Amplifikationskurven – eine Bestätigung der Vorarbeiten, dass die differenten Expressionsmuster dreier miRNA NMIBC und MIBC signifikant trennen können (*Abb.14*).

Baumgart et. al beschrieb 2019 in ihrer Arbeit die relative Expression der vier spezifischen, in BC dysregulierten miRNA miR-138-5p, miR-146b-5p, miR-155-5p, und miR-200a-3p, die in NMIBC und MIBC unterschiedlich hoch exprimiert waren. Während miR-138-5p und miR-200a-3p in MIBC niedriger exprimiert sind als in NMIBC, zeigen miR-146b-5p und miR-155-5p höhere Expressionslevel in MIBC verglichen mit NMIBC (*Abb. 13*)⁷⁵.

In der Etablierungskohorte war das Expressionsprofil von miR-138-5p nicht signifikant unterschiedlich in NMIBC vs. MIBC und der fold change lediglich fch=1,10. Trainingskohorte wie auch Testkohorte konnten ausnahmslos für alle vier miRNA signifikante Expressionsunterschiede zwischen NMIBC und MIBC detektieren und somit die Daten der Vorarbeiten bestätigen. Dass miR-138-5p in der Etablierungskohorte keine statistische Signifikanz aufwies, kann auf die geringe Probenzahl von n=13 zurückgeführt werden. Weiterhin fiel auf, dass in der Vorarbeit von *Baumgart et al.* mit einem höheren Input an miRNA in die reverse Transkriptionsreaktion gearbeitet wurde, was ebenfalls zu einer Diskrepanz in Signifikanzniveau und fold change geführt haben kann. In dieser Arbeit wurde gemäß Herstellerprotokoll gearbeitet, um die Stabilität der Reaktionen gewährleisten zu können. Dieser Unterschied schlägt sich jedoch nicht auf die Aussagekraft der Auswertung nieder, da mehr Nukleinsäure-Input lediglich zu stärkerem Signifikanzniveau führt, das Expressionsprofil aller vier untersuchten miRNA jedoch in beiden Arbeiten einander

reflektiert. Drei voneinander unabhängige Patientenkohorten belegen damit, dass NMIBC und MIBC mittels dieser vier miRNA signifikant differenziert werden können.

Studien haben die tumorsuppressive Wirkung von miR-138 untersucht und fanden die Regulierung diverser Zielgene, die an zellulären Prozessen wie Proliferation, Apoptose, Migration und Invasion beteiligt sind. Dabei ist besonders für Migration, Invasion und Metastasierung die epidermal-mesenchymale Transition (EMT) essenziell, indem epitheliale Zellen ihre Morphologie und ihr Motilitätsverhalten derart verändern, dass es zu vermehrter Überwindung physiologischer Barrieren kommt. MiR-138 inhibiert über Vimentin, ZEB1 und ZEB2 die EMT^{79,105,106}. In BC ist die Expression von miR-138 niedriger als in gepaartem Normalgewebe¹⁰⁶ sowie in MIBC niedriger als in NMIBC⁷⁵, was eine Beteiligung am Invasionsprozess nahelegt. Bei Hals-Kopf- und bei Thyreoidtumoren wurde eine erniedrigte miR-138-Expression mit erhöhter Expression der Telomerase-Reverse-Transkriptase (TERT) assoziiert¹⁰⁷. Survivin spielt eine Rolle bei abnormen Proliferations- und Invasionsprozessen. Im Zusammenhang mit unphysiologischer Survivin-Expression in BC wurde miR-138 mit der posttranskriptionellen Dysregulation der Survivin-mRNA assoziiert¹⁰⁵. Weiterhin wurde beschrieben, dass miR-138 via EMT Lungenkarzinomzellen für Adriamycin sensibilisierte¹⁰⁸. Cisplatin ist ein Standardtherapeutikum bei BC. Neuere Daten liefern Hinweise darauf, dass miR-138 eine Schlüsselrolle bei der Entstehung von Cisplatin-Resistenz bei nichtkleinzelligem Lungenkarzinom spielen könnte^{109,110}. *Wang et al.* haben die Korrelation von miR-138 und DNA damage beschrieben, was die zelluläre Sensitivität gegenüber therapeutischen Agenzien beeinflusst¹¹¹. Das lässt die miRNA-138 als potenzielle diagnostische, sowie therapeutische Zielstruktur erscheinen.

Das Expressionslevel der miR-200a-3p wird bei *Baumgart et al.* als signifikant niedriger in MIBC beschrieben als in NMIBC. Mitglieder der miR-200-Familie (miR-200a/b/c-3p/5p, miR-141, miR-429) wurden in unterschiedlichsten untersuchten Tumortypen als dysreguliert beschrieben. MiR-200a ist nachweislich ein Schlüsselement in der Inhibition der Histon-Lysin-N-Methyltransferase EZH2, einer epigenetischen Einheit, die in embryonalen Stammzellen Prozesse wie Proliferation und Zelldifferenzierung reguliert¹¹². *Pignot et al.* stellten einen Zusammenhang her zwischen Aggressivität und herunterregulierten Mitgliedern der miR-200-Familie, ebenso wie Assoziationen zu schlechterer Prognose¹¹⁰. Eine Arbeit aus 2019 von *Yang et al.* zeigt im BC, dass miR-200a über direkte Regulierung der Dicer/miR-16/JNK2-Achse zu vermehrter Expression von MMP2 führt, was eine Barriere-Degradation der extrazellulären Matrix (EZM) auslöst und so die Invasion initiiert¹¹³. Weiterhin zeigen Arbeiten, wie die Herunterregulation zu vermehrter Expression der EMT-charakteristischen Proteine ZEB1 und ZEB2. im BC führt¹¹⁴. Diese Erkenntnisse legen einen tumorsuppressiven Charakter von miR-200a nahe⁵²⁻⁵³.

MiR-146b wurde als dysreguliert in verschiedenen Tumorarten gefunden: In Mamma Karzinomen ist die Überexpression als tumorsuppressiv durch Inhibition von Invasion, Migration und Metastasierung beschrieben¹¹⁷, während erhöhte miR-146b Expressionslevel in Kolon- und Prostatatumoren zu einer Förderung von Proliferation, Migration und Invasion führen können^{118,119}. Wie oben erwähnt, beschrieben Baumgart et al. 2019, dass miR-146b-5p im BC höher exprimiert ist als in Normalgewebe, sowie in MIBC höher exprimiert als im

NMIBC⁷⁵. Diese miRNA steht somit im Verdacht, an der Muskelinvasion beteiligt zu sein. Gao et al. beschreiben, dass miR-146b die Autophagie in PCa-Zellen über die Aktivierung des PTEN/AKT/mTOR-Signalwegs hemmen kann. Zhu et al. untersuchten kürzlich die Rolle von miR-146b in BC anhand von Geweben und Zelllinien. In ihrer 2019 veröffentlichten Arbeit beschreiben sie eindrücklich folgenden Mechanismus: miR-146b inhibiert (AU)-rich element/poly(U)-binding/degradation factor 1 (AUF1), einen posttranskriptionalen mRNA-Destabilisator, was in der Folge zur Stabilisierung von Erythroblast Transformation specific-2 (ets2) mRNA und somit zu vermehrter Translation führt. ETS2 ist ein Transkriptionsfaktor, der wiederum die Transkription von Matrix-Metallo-Proteasen (MMP) triggert. MMPs, vornehmlich MMP2 und MMP9, dienen der Degradation nahezu jeder EZM-Komponente, darunter Kollagene, Laminin und Proteoglykanen. Der Abbau physiologischer Zellbarrieren ist der erste Schritt zur Invasion^{120,121}. Die Inhibition von miR-146b reduzierte die Invasionsfähigkeit von BC signifikant, wodurch diese miRNA als potenzielles Therapietarget in den Fokus der Wissenschaft rückt. Die Tatsache, dass sich das Expressionslevel von miR-146b proportional zum Tumorstadium verhält, macht es zu einem potenziellen Biomarker in der Diagnostik, Verlaufskontrolle sowie der Risikobewertung des BC hinsichtlich des Muskelinvasionsverhaltens.

Einige Arbeiten haben gezeigt, dass die Überexpression von miR-155 auffällig häufig in onkologischen Prozessen von hämatopoetischen malignen Neoplasien und soliden Tumoren auftritt, sowohl bei Leukämie-, Schilddrüsen-, Mamma-, Uterus-, Colon-, Pankreas-, Lungen-, als auch bei hepatozellulären Tumoren¹²². An Mammakarzinomzellen wurde beschrieben, dass miR-155 den Tumorsuppressor Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) negativ reguliert. Die Überexpression von miR-155 triggert weiterhin die Aktivierung des JAK-STAT3 Signalweg¹²³, welcher an onkogener Signaltransduktion in diversen soliden Tumoren und hämatologischen Neoplasien beschrieben ist¹²⁴, und weiterhin zur Therapieresistenz in BC führen kann¹²⁵. Die Überexpression steht in Mammakarzinomen in Korrelation zu höherem Tumorgrad, fortgeschrittenem Tumorstadium und Lymphknotenmetastasierung. MiR-155-5p ist in BC höher exprimiert als im gesunden Blasengewebe¹²² und das Expressionslevel steigt proportional mit dem Krankheitsverlauf, in MIBC ist miR-155 höher exprimiert beschrieben als in NMIBC⁷⁵.

6.3 MiRNA-Expression von muskelinvasiven im Vergleich zu nicht-muskelinvasiven Arealen der Resektate

Die transurethrale Resektion ist Goldstandard zur Therapie und Diagnosestellung von Harnblasentumoren. Dabei ist die Schnitttiefe essenziell, denn um das Tumorstadium histologisch sicher beurteilen zu können, muss der Detrusormuskel mit erfasst sein¹²⁶. TUR-B-Präparate bestehen aus nichtinvasiven (ninv) und ggf. invasiven (inv) Anteilen, die in die Mukosa und möglicherweise weiter in die Muskelschicht eingewachsen sind. Um eine potenzielle Heterogenität der miRNA-Expressionsprofile beurteilen zu können, wurden in

dieser Arbeit aus den Tumorproben beide Areale extrahiert, soweit vorhanden, und verglichen. Die Daten zeigen keine signifikanten Unterschiede im Expressionsprofil der vier miRNA, weder in TUR- noch in Zystektomiepräparaten von sowohl pT1G3 als auch pT2-4 Tumoren. Diese Feststellung erlaubt die Analyse der gesamten Tumormasse je Probe und gilt weiterhin als erster Hinweis hinsichtlich der Tauglichkeit von TUR-B-Resektaten zur Bewertung des Muskelinvasionspotentials. Da Zystektomiepräparate aufgrund von vorab erfolgten transurethralen Resektionen i.d.R. kaum bis keine nicht-invasiven Anteile mehr aufweisen, war die Probenanzahl hierfür gering, was bei der Bewertung nicht außer Acht gelassen werden kann. Jedoch gibt es hinsichtlich der erhobenen Daten keinerlei Hinweis auf ein abweichendes Expressionsprofil, weswegen eine Heterogenität der Gewebeanteile theoretisch ausgeschlossen werden kann.

6.4 TUR-Präparate als geeignetes Probenmaterial zur Risikovorhersage

Um die Frage zu klären, ob das TUR-B-Resektat zur sicheren Bewertung des Invasionspotentials eingesetzt werden kann, wurden im nächsten Schritt TUR- und Zystektomiepräparate hinsichtlich ihrer Expressionslevel der vier miRNA miteinander verglichen und innerhalb der pT1G3 und der MIBC pT2-4 Gruppen der Trainingskohorte konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Dies lässt darauf schließen, dass TUR-Resektate als Probenmaterial zur Risikobewertung geeignet sein können. Die Vergleiche der Gruppen aus der Testkohorte zeigten keine signifikanten Expressionsunterschiede für miR-138-5p und miR-155-5p, und signifikante Unterschiede für miR-146b-5p und miR-200a-3p. Unterschiede in den Daten der beiden Kohorten könnten auf die unterschiedliche Anzahl an Proben zurückzuführen sein, da die ERL Testkohorte umfangreicher war als die HOM-Trainingskohorte. Ein weiterer gravierender Unterschied ist die Tatsache, dass die Markierung der Tumorareale beider Kohorten von zwei verschiedenen Pathologen durchgeführt wurde. Gleichwohl reflektieren miR-138-5p und miR-155-5p bereits im TUR-Präparat das Expressionsprofil des invasiven Tumors. Die Daten der HOM-Kohorte legen bereits nahe, dass alle vier miRNA geeignet sind, was weiterführend mittels komplexerer mathematischer Systeme getestet wurde.

6.5 Analyse der pT1G3-Tumore

pT1G3 Tumore stellen eine besondere Herausforderung dar hinsichtlich der Therapieentscheidung zwischen radikaler Zystektomie und blasenerhaltender Therapie. Das miRNA-Expressionsprofil soll in den pT1G3 Tumoren der molekularen Charakterisierung des Invasionspotentials in die Muskelschicht dienen. Im Vergleich der pT1G3/pT1hg Fälle mit den muskelinvasiven Fällen zeigte sich in der Trainingskohorte kein signifikanter Unterschied in den Expressionsleveln der miRNA 138-5p, miRNA-155-5p und miRNA 200a-3p, in der Testkohorte kein signifikanter Unterschied in der Expression von miRNA-138-5p und miRNA-155-5p. In beiden Kohorten unterschieden sich die pT1G3/pT1 hg Expressionslevel der

miRNA-146b-5p signifikant von der NMIBC- und von der MIBC-Gruppe und zeigten einen Trend im Expressionslevel hin zur MIBC-Gruppe. Der Anstieg der miRNA 146b-5p und miRNA 155-5p ist in Harnblasenkarzinomen sowie Mammakarzinomen mit Invasion und Metastasierung assoziiert^{110,119,120,122,127,128}.

Die Daten deuten darauf hin, dass die miRNA-Erhöhung bzw. Erniedrigung relativ zu NMIBC betrachtet mit EMT- und Invasionsprozessen assoziiert werden kann. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass spezifische miRNA ein Invasionspotential in die Muskelschicht bereits im pT1G3/pT1hg widerspiegeln, da ihre Expressionslevel bereits auf molekularer Ebene denen von muskelinvasiven Tumoren ähneln.

6.6 Korrelation mit histopathologischen und klinischen Merkmalen

Die Daten zeigen keinen signifikanten Unterschied zwischen G1 und G2 der pTa Gruppe, und keinen signifikanten Unterschied zwischen pTaG3 und pT1G3 in keiner der vier miRNA. Die Vorarbeit von Baumgart et al. zeigte in pT1 eine nicht signifikant geringere Expression von miR-138-5p als in pTa. MiR-146b-5p-, miR-155-5p- und miR-200a-5p-Level waren nicht signifikant unterschiedlich zu denen in pTa. Die Expression aller vier miRNA war in den untersuchten Kohorten beider Arbeiten signifikant mit einem höheren Tumorgrad assoziiert: niedrigere Expression von miR-138-5p und miR-200a-3p, höhere Expression von miR-146b-5p und miR-155-5p waren in G3-Tumoren verglichen mit G1 und G2. Die Daten beider Arbeiten bestätigen einander.

6.7 Molekulare Subtypen sind mit dem miRNA-Expressionsprofil assoziiert

Die Klassifizierung von Tumoren in luminal und basal wurde intensiv erforscht und basiert auf der Expression von luminalen und basalen Markern wie den Zytokeratinen. KRT20 wird vermehrt im luminalen, KRT5 im basalen Subtyp identifiziert. In muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen und in Mammakarzinomen konnte diese Typisierung mit unterschiedlicher Tumorbiologie und klinischem Outcome, besonders hinsichtlich des Ansprechens auf Erstlinien Chemotherapie assoziiert werden. Muskelinvasive Harnblasentumore wurden in einer Konsensusklassifikation in 6 molekulare Subtypen eingeteilt: luminal-papillär, luminal nicht spezifiziert, luminal instabil, stromareich, basal-squamös und neuroendokrin-ähnlich³⁰. Der Großteil der muskelinvasiven Urothelkarzinome kann dem „luminalen“ oder dem „basal-squamösen“ Subtyp zugeordnet werden. Luminale Tumore sind in der Regel gut differenziert und haben eine bessere Prognose. Basale Tumore sind assoziiert mit schlechter Differenzierung und aggressiverem Progressionsverhalten^{26,30,32–37}. Breyer et al. untersuchten, ob das Risikoverhalten auch auf pT1 high grade Tumore anwendbar ist. Die Gruppe zeigte, dass pT1 high grade Tumore bei hoher KRT20 (CK20) und niedriger KRT50 (CK50) Expression dem luminalen Subtyp zugeordnet und in die Risikogruppen high risk und low risk eingeordnet werden konnten²⁶.

Die molekulare Subtypisierung der ERL MIBC erfolgte anhand der immunhistochemischen Auswertung der Expression von CK5, CK14, CD44, GATA3, FOXA1 und CK20, welche eine Einteilung in luminal und basale Typen zulassen. Die Zuordnung wurde mit den Expressionsdaten der vier miRNA in Korrelation gesetzt und eine Assoziation identifiziert. Die analysierten miRNA-Expressionslevel sind mit EMT und Invasionsverhalten assoziiert. Die Korrelation mit der Subtypisierung kann diese Hypothese klar bestätigen. *Ochoa et al.* (2016) untersuchten den Zusammenhang zwischen miRNA und den molekularen Subtypen. Sie identifizierten 63 miRNA, die bei luminalen und basalen Tumoren so exprimiert wurden, dass sie einander ausschlossen. Die in basalen Tumoren gefundenen miRNA regulieren Gene, deren Expression typischerweise in der luminalen Tumorbilogie verändert ist, wie FOXA1, ERBB2, FGFR2, FGFR3 und der Urotheldifferenzierung (HOX5/8/13). Im Gegensatz dazu regulieren die miRNA in luminalen Tumoren Transkriptionsfaktoren der EMT wie ZEB1/2, außerdem Proteine, die mit Fibrose und dem Zytoskelett (Kollagene) assoziiert sind, sowie Gene, die typischerweise in der basalen Tumorbilogie veränderte Expressionen aufweisen, wie EGFR und STAT3³⁸. *Ochoa et al.* beschrieben, dass mehrere miRNA der basalen Tumore, darunter miR-146b, auf für luminal Tumore typische Gene ausgerichtet sind, die zuvor beim Mammakarzinom identifiziert wurden, darunter ERBB2-4 und FOXA1. Basale Tumoren überexprimierten miRNA, die bei verschiedenen soliden Tumoren häufig mit Aggressivität und einer schlechten Prognose verbunden sind, darunter miR-155. Luminal Tumoren exprimierten hohe Konzentrationen aller Mitglieder der miR-200-Familie (miR-200a/b/c) was mit früheren Erkenntnissen übereinstimmt³⁸. *Ochoa et al.* korrelierten ihre miRNA-Signatur mit Überlebensdaten und stellten fest, dass Patienten mit Basaltumoren in allen Fällen die schlechtesten klinischen Überlebensraten und Prognosen zeigten.³⁸ Leider konnten anhand der vorliegenden Patientendaten keine Rückschlüsse auf einen Zusammenhang zwischen den miRNA Expressionsdaten und Überlebensparametern gezogen werden, da die Patienten zwar in domo reseziert und/oder operiert wurden, die Nachsorge jedoch bei den niedergelassenen Urologen erfolgte und uns nicht vorlag. Die Literatur beschreibt in diversen Arbeiten zum Harnblasenkarzinom und zu anderen Tumoren den prognostischen Charakter von miRNA^{116,122,124,129–133}.

6.8 Diagnostische Anwendbarkeit der miRNA-Expressionsdaten

Zur Bewertung der diagnostischen Güte wurden anhand der TUR-Expressionsdaten von Trainings- und Testkohorte für alle vier miRNA ROC-Kurven erstellt (*Abb.18*). Die ROC-Kurven demonstrieren eine hohe und auch statistisch signifikante Diskriminierungsgenauigkeit für NMIBC vs. MIBC anhand hoher AUC-Werte für miR-146b und miR-155 bei gleichzeitig hohen Werten für Sensitivität und Spezifität in allen vier analysierten miRNA. Eine weit komplexere Bewertung der diagnostischen Güte der miRNA Expressionsdaten lieferten die bioinformatischen Analysen.

6.9 Validation der Aussagekraft der miRNA-Profile durch komplexe bioinformatische Analysen

Das Klassifizierungsmodell Vanilla Neural Network ergab die genaueste Trennung von NMIBC und MIBC mittels miR-146b. Die Gruppentrennung anhand kombinierter miRNA Expressionsdaten ergab die beste Trennung in der Paarung miR-146b und miR-155 und zeigte die besten Werte hinsichtlich Accuracy, Sensitivität und Spezifität (Abb.26).

Die bioinformatische principle component analysis (PCA) stellte grafisch eine gute Trennbarkeit zwischen den Gruppen NMIBC (pTa Ig), pT1 hg und MIBC dar.

Der bioinformatische Vergleich der histologischen Klasse und der nach Expressionsdaten geclusterten, vorhergesagten Klasse belegte eine gute Übereinstimmung bei pTa Ig und MIBC. Den pT1 hg Fällen wurde zur Hälfte die histologische pT1 hg Gruppe vorhergesagt, wenigen Fällen wurde das nicht-muskelinvasive Stadium pTa Ig vorhergesagt, und einem Drittel der pT1 hg Fälle wurde eine Muskelinvasion vorhergesagt. Diese Analyse unterstreicht die Notwendigkeit einer akkurateren, über die histopathologische Stratifizierung hinausgehenden Analyse zur Risikobewertung und zeigt weiterhin, dass die Risikobewertung durch die kombinierten miRNA-Daten möglich ist. Diagnostisch angewendet könnten damit frühzeitig die Patienten identifiziert werden, die bereits vor klinischem Progress einer wahrscheinlichen Muskelinvasion zugeordnet werden können, die dann von einer frühen radikalen Zystektomie profitieren.

Das auf miR-146b und miR-200a kombiniert trainiert Modell sagte 47.7 % (HOM) und 21.3 % (ERL) der pT1G3 Fälle einen aggressiven Progress voraus. Das bildet die Daten der Literatur ab, wonach ca. 30 % aller pT1G3 Tumore muskelinvasiv werden.

6.10 Funktionelle Analysen

6.10.1 Methodenoptimierung

Um herauszufinden, welche funktionelle Rolle die vier miRNA im Muskelinvasionsprozess von Harnblasenkarzinomen haben, wurden, zusätzlich zu den Expressionsanalysen an FFPE-Proben, funktionelle Assays durchgeführt. Die beiden Transfektionskontrollen belegen nicht nur, dass das methodische Einbringen der mimics stabil funktioniert, sondern auch, dass die mimics über einen Zeitraum von mindestens 4 Tagen (mikroskopische Kontrolle) in der Zelle verbleibt. Das gewährleistet real abbildbare funktionelle Assays, bevor regulatorische intrazelluläre Mechanismen die mimics abbauen^{56,134,135}.

Die Zelllinien wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an mimics behandelt, da sie sehr individuell auf die Transfektion reagierten. Das ist anhand der individuellen Dosisfindungsexperimente darin begründet, dass ein Effekt auf die zellulären Prozesse bei T24 erst ab 20nM erzielt wurde. Für J82 waren 10nM geeignet, RT112 und HCV-29 reagierten sehr empfindlich auf die Transfektion mit vermehrtem Zelltod, sodass die

Konzentration von 5nM genutzt wurde. In dieser Arbeit wurden durch die Überexpression unphysiologisch hohe miRNA-Konzentrationen in die Zelle eingebracht, was zu veränderter Expression der Gene und folglich zu Veränderungen in den zellulären Prozessen führte. Die eingebrachten miRNA-Konzentrationen waren jedoch nicht so hoch, dass unspezifische Reaktionen oder Zelltod zu erwarten wären, die bei hohen Konzentrationen durch Akkumulation der mimics oder Generierung von Molekülen mit hohem Molekulargewicht ausgelöst werden können⁹⁶. *Jin et al.* beschrieben diese Phänomene anhand von Transfektionsversuchen mit synthetischen mimics an HeLa Zellen. Sie postulierten, dass der Einsatz der gängigsten Experimentkonditionen von 25 bis 100 nM mimics zu den genannten side effects führt⁹⁶, weswegen in dieser Arbeit die Maximalkonzentration von 20nM in den funktionellen Assays nicht überschritten wurde.

Um zu verhindern, dass am Ende der Assays aufgrund von Proliferation der migrierten und invadierten Zellen falsch hohe Zellzahlen detektiert werden, wurde der Proliferationshemmer Aphidikulin in das Medium der unteren Zellkammern gegeben. In Vorversuchen konnte ein Effekt auf das Zellverhalten durch Aphidikulin ausgeschlossen werden.

Um die Effekte der transienten Transfektion methodisch zu validieren, wurden für Proliferation, Migration und Invasion jeweils zwei unterschiedliche methodische Ansätze verfolgt, und diese anschließend verglichen.

6.10.2 qPCR-Expression der miRNA in den Zellen

Die Messung der nativen miRNA-Level der Zelllinie ergab, bezogen auf das Invasionspotential, ähnliche Expressionslevel hinsichtlich muskelinvasiv und nicht-muskelinvasiv zu den Gewebedaten bei miRNA 155-5p und 200a-3p, weswegen diese Zelllinien als funktionelle Modelle mit der jeweiligen miRNA weiter untersucht wurden.

Die Auswertung der qPCR nach transienter Überexpression der mimics belegte, dass mit steigender Konzentration der transfizierten Mimics das intrazelluläre miRNA-Level proportional steigt und dass das Transfektionsreagenz allein nicht zu signifikanten Veränderungen in der miRNA-Expression führt. Der Versuch, miR-146b-5p mittels Anti-miR-146b-5p zu inhibieren, resultierte in der qPCR nicht in einer veränderten Konzentration, bei keiner gewählten Dosis. Die Literatur beschreibt, dass dazu hohe Konzentrationen ab 100nM nötig seien, was ebenfalls zu keiner Veränderung führte und bei weiter steigender Konzentration zum vollständigen Zellsterben unmittelbar nach der Transfektion führte. Daher konnten keine funktionellen Inhibitionsversuche durchgeführt werden.

6.10.3 Überexpression von miR-200a-3p und miR-155-5p

Die Überexpression von miR-200a-3p führte in T24 im BrdU- und RTCA-Assay zu verminderter Proliferation. Das bestätigt die Arbeit von *Li et al.*, die eine antiproliferative Wirkung von miR-200a-3p auf T24-Zellen mit der onkogenen Funktion von STAT4

assoziierten und nachwiesen, dass miR-200a-3p als Regulator von STAT4 fungiert¹²⁹. MiR-200a-3p-Überexpression führte in J82 im BrdU-Assay zu geringfügiger und im RTCA Assay zu deutlich ausgeprägter Proliferationshemmung. Auch das Einbringen des Kontrollmimic führt bereits zur Proliferationshemmung, jedoch nicht so stark, wie das funktionelle miR-200a-3p mimic. Der Effekt des Mimics an sich wurde bis dato noch nicht beschrieben. Die Daten weisen darauf hin, dass die im physiologischen Zustand antiproliferative Wirkung durch die Herunterregulation reduziert wird.

Das Transfektionsreagenz führte in beiden Zelllinien zu einer Förderung des Zellwachstums. Dieser Effekt ist bisher nicht beschrieben. Die Transfektion mittels Lipid-miRNA-Komplexen hängt mit der Ladung zusammen: kationische Lipide bilden mit anionischen Nukleinsäuren stabile Komplexe, die von der Zelle über Fusion eingeschleust werden können. Gibt es keinen Überschuss an negativ geladenen Teilchen, so wie im negativen Transfektionsansatz, bilden die Lipide womöglich Komplexe mit anderen negativ geladenen Molekülen im Reagenz, z.B. Wachstumsfaktoren, die proliferationsfördernd sind und so in die Zelle eingeschleust werden.

Die Überexpression von miR-200a-3p führte in T24 und J82 in beiden Assays zu verminderter Migration und Invasion. *Liu et al.* beschrieben ebenfalls eine signifikant antiproliferative Wirkung, sowie Inhibition von Migration und Invasion nach Überexpression mit miR-200c in den invasiven T24- und UMUC3-Zelllinien. Sie zeigten weiterhin eine direkte Korrelation zwischen miR-200c-Überexpression und der verminderten Expression der miR-200c-Targetstrukturen BMI-1 und E2F3, die als Regulatoren des EMT und der Zellzykluskontrolle bekannt sind¹³⁶.

Die Überexpression von miR-155-5p führte in RT112 zu verminderter Proliferation im BrdU-Assay und im RTCA-Assay, und zu verminderter Migration im Transwell-Assay sowie im RTCA-Assay und zu verminderter Invasion im Transwell-Assay. Zhang *et al.* beschrieben in humanen papillären Schilddrüsentumorzelllinien nach Überexpression von miR-155 eine proliferationsfördernde Wirkung durch Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs.

In HCV-29 führt die Überexpression von miR-155-5p zu verminderter Proliferation, Migration und Invasion. Diese Ergebnisse waren unerwartet, zumal miR-155-5p diese zellulären Prozesse nachweislich fördert. Es ist nicht auszuschließen, dass die mimics trotz niedriger Konzentration auf die - im Vergleich zu den invasiven Zelllinien - sensibleren Zelllinien RT112 und HCV-29 einen apoptoseinduzierenden Effekt ausüben. Dies kann in einer Folgearbeit unterstützend mit einem Tunel-Assay oder einem Viabilitäts-WST-Assay überprüft werden.

Die funktionellen Zellexperimente in dieser und diversen anderen wissenschaftlichen Arbeiten geben einen guten Hinweis auf die Rolle, die die untersuchten miRNA bei der Entstehung und Progression von Tumoren spielt. Generell fehlt den Zellen in diesen Experimenten jedoch das für einen komplexeren Gewebeverbund essenzielle Tumormikroenvironment (TME). Dysregulierte miRNA führen über unterschiedliche Interaktionskaskaden zu EMT und Invasion von Tumorzellen, woran das TME beteiligt ist. Die Zellen des TME reagieren auf veränderte miRNA-Level mit Abbau von zellulären

Barrieren, Tumorzellen selbst werden zu verstärkter Motilität befähigt. Ein in den vergangenen Jahren intensiv genutztes Modell der onkologischen Forschung ist die Bildung von Sphäroiden. Sphäroide sind dreidimensionale Modelle mit extrazellulärer Matrix (ECM), die einem Gewebesystem ähneln und das Mikroenvironment mit verschiedenen Zelltypen und für Gewebe typischen Sauerstoff- und Nährstoffgradienten enthalten können^{137,138}. Tumorsphäroide aus BC-Zellen könnten als Modell dienen, um die Konsequenz einer miRNA-Dysregulation auf das TME besser zu verstehen. Tumorzellen könnten aus den Aggregaten auswandern, was die Fähigkeit zur Metastasierung beschreibt. Der invasive Charakter von Tumorzellen könnte durch Eindringen in eine umgebende Matrix dargestellt werden, wenn durch experimentell erzeugte Überexpression von Metalloproteasen die ECM abgebaut wird. Die Arbeit von *Yoshida et al.* beschreibt den Einfluss der Sphäroidkultur auf molekulare und funktionelle Eigenschaften von Blasenkrebszelllinien an RT4- und 5637-BC-Zellen und vergleicht dieses Modell mit herkömmlicher 2D-Kultur, die in beiden Modellen unterschiedliche Proteinexpressionen aufwiesen sowie unterschiedliche Resistenzcharakteristika nach Cisplatintherapie zeigten¹³⁹.

6.11 Limitierungen der Arbeit

Die manuelle Extraktion der Tumoranteile aus den Gewebeproben ist kritisch betrachtet nicht hoch präzise, da mit dieser Methode nicht-tumoröse Gewebepartikel makroskopisch nicht unterschieden werden können, während die Markierungen der Pathologen auch recht grob ausfallen können. Zusätzlich zu Tumorzellen kann sich Tumormikroenvironment (TME) in Form einzelner Zellen in den extrahierten Gewebeanteilen befinden; das bedeutet, dass auch die miRNA des TME, also von Zellen wie Fibroblasten und Immunzellen mit bewertet werden könnten. Dies verwässert möglicherweise die Ergebnisse. Eine mögliche Alternative wäre die präzise Extraktion reiner Tumorzellen, die mittels spezifischer Antikörper markiert und über FACS basiertes cell sorting purifiziert werden können¹⁴⁰, was jedoch in der Routinediagnostik vorerst nicht umsetzbar sein wird. Die Lasermikrodissektion ermöglicht eine sehr hohe Genauigkeit und minimiert die potenzielle Kontamination mit gesundem Gewebe.

7. Schlussfolgerung

Die Risikostratifizierung von Harnblasentumoren hinsichtlich der Invasion in die Muskelschicht bleibt bis dato limitiert und eröffnet die unerfüllte medizinische Notwendigkeit präziser molekularer Marker zur Früherkennung von pT1G3 Tumoren, die im Krankheitsverlauf zur Invasion in die Muskelschicht fähig sind. Diese Arbeit untersuchte die Rolle der miRNA 138-5p, 146b-5p, 155-5p und 200a-3p hinsichtlich ihrer diagnostischen Eignung als Biomarker, die das Potenzial zur Muskelinvasion anzeigen sollen.

Das Zusammenspiel verschiedener dysregulierter Faktoren in Kombination löst den spezifischen Invasionsprozess in die Muskelschicht aus. Die in dieser Arbeit untersuchten miRNA miR-146b-5p und miR-155-5p sind assoziiert mit Invasion, miR-138-5p und miR-200a-3p sind assoziiert mit EMT, Migration und Invasion.

Die Ergebnisse der Vorarbeiten konnten an zwei unabhängigen Kohorten bestätigt werden.

Das Potential zur Muskelinvasion von pT1G3 Tumoren kann bereits am TUR-B Präparat bewertet werden, auch oberflächliche (nicht invasive Areale) dienen der Bewertung.

Eine Differenzierung der pT1 high grade Tumore hinsichtlich ihres Muskelinvasionsrisikos kann mittels miRNA-Profil erzielt werden, da ihre Expressionslevel denen von muskelinvasiven Fällen ähneln. Somit könnte man ein Invasionsrisiko bereits im nicht-muskelinvasiven Stadium detektieren.

Das miRNA Profil spiegelt tumorbiologische Eigenschaften wieder, die Expressionsdaten der vier miRNA waren mit einem höheren Tumorgrad assoziiert. So kann auf molekularer Ebene die diagnostische Aussagekraft der klassischen Histologie validiert und optimiert werden.

Drei von vier miRNA konnten anhand ihres Expressionsprofils mit den molekularen Subtypen assoziiert werden.

Die ROC-Kurven zeigten eine signifikante Diskriminierungsgenauigkeit zwischen TUR-Präparaten von nicht-muskelinvasiven und muskelinvasiven Harnblasentumoren anhand der AUC zweier miRNA mit gleichzeitig hohen Werten für Sensitivität und Spezifität in allen vier analysierten miRNA.

Die Trennbarkeit der unterschiedlichen Tumorstadien mittels miRNA-Profil konnte durch komplexe bioinformatische Analysen validiert werden. Weiterhin legen die Daten nahe, dass anhand bioinformatischer Analysen das Muskelinvasionsrisiko von pT1 hg Tumoren vorhergesagt werden kann.

Die miRNA 155-5p zeigte in den Zellversuchen widersprüchliche Ergebnisse zu den Gewebedaten. Anhand der muskelinvasiven Zelllinien konnte eine Invasionshemmung durch Überexpression der tumorsuppressiven miRNA 200a-3p gezeigt werden.

8. Ausblick

Das hier untersuchte miRNA-Profil hat prognostischen Charakter, kann diagnostische Unsicherheiten sensitiv und spezifisch überwinden und bietet damit einen vielversprechenden Ansatz, künftig sowohl die Diagnostik als auch die Therapieentscheidung im uroonkologischen Alltag zu unterstützen.

Vorarbeiten dieser Arbeitsgruppe geben Hinweise darauf, dass das Profil auch anhand von miRNA aus Exomen von liquid biopsies bestimmt werden kann⁷⁵. Diese minimalinvasive Möglichkeit der Diagnostik aus Urin und Blut stellt für den Patienten eine schmerzfreie und zeitsparende Alternative dar und könnte die kostenintensive Zystoskopie ersetzen.

9. Literatur

1. EAU Guidelines on MIBC - Introduction - Uroweb. *Uroweb - European Association of Urology* <https://uroweb.org/guidelines/muscle-invasive-and-metastatic-bladder-cancer>.
2. Kraywinkel, K., Fiebig, J. & Schulz, G. B. Epidemiologie des Harnblasenkarzinoms in Deutschland. *Onkol.* **24**, 6–13 (2018).
3. Harnblasenkarzinom (Blasenkrebs): Epidemiologie und Ursachen. <https://www.urologielehrbuch.de/harnblasenkarzinom.html>.
4. EPIDEMIOLOGY AETIOLOGY AND PATHOLOGY - Uroweb. *Uroweb - European Association of Urology* <https://uroweb.org/guidelines/non-muscle-invasive-bladder-cancer/chapter/epidemiology-aetiology-and-pathology>.
5. Spachmann, P. J. *et al.* Loss of CHEK2 Predicts Progression in Stage pT1 Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer (NMIBC). *Pathol. Oncol. Res. POR* **26**, 1625–1632 (2020).
6. Breyer, J., Denzinger, S., Hartmann, A. & Otto, W. Downregulation of Checkpoint Protein Kinase 2 in the Urothelium of Healthy Male Tobacco Smokers. *Urol. Int.* **97**, 480–481 (2016).
7. Li, Y. *et al.* Frontiers in Bladder Cancer Genomic Research. *Front. Oncol.* **11**, (2021).
8. S3-Leitlinie Harnblasenkarzinom. 400 (2020).
9. Bakkar, A. A. *et al.* FGFR3 and TP53 gene mutations define two distinct pathways in urothelial cell carcinoma of the bladder. *Cancer Res.* **63**, 8108–8112 (2003).
10. Mertens, L. S. *et al.* Prognostic markers in invasive bladder cancer: FGFR3 mutation status versus P53 and KI-67 expression: a multi-center, multi-laboratory analysis in 1058 radical cystectomy patients. *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.* **40**, 110.e1-110.e9 (2022).
11. Akanksha, M. & Sandhya, S. Role of FGFR3 in Urothelial Carcinoma. *Iran. J. Pathol.* **14**, 148–155 (2019).
12. Cordon-Cardo, C. Molecular alterations associated with bladder cancer initiation and progression. *Scand. J. Urol. Nephrol. Suppl.* 154–165 (2008) doi:10.1080/03008880802291915.
13. Knowles, M. A. Molecular pathogenesis of bladder cancer. *Int. J. Clin. Oncol.* **13**, 287–297 (2008).
14. Apostolou, P. & Papasotiriou, I. Current perspectives on CHEK2 mutations in breast cancer. *Breast Cancer Targets Ther.* **9**, 331–335 (2017).
15. Zhao, H., Albino, A. P., Jorgensen, E., Traganos, F. & Darzynkiewicz, Z. DNA damage response induced by tobacco smoke in normal human bronchial epithelial and A549 pulmonary adenocarcinoma cells assessed by laser scanning cytometry. *Cytometry A* **75A**, 840–847 (2009).
16. Babjuk, M. *et al.* EAU Guidelines on Non–Muscle-invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder: Update 2016. *Eur. Urol.* **71**, 447–461 (2017).
17. Sanli, O. *et al.* Bladder cancer. *Nat. Rev. Dis. Primer* **3**, 17022 (2017).

18. Urothelkarzinom der Harnblase: Diagnostik - Die Urologie - eMedpedia.
https://www.springermedizin.de/emedpedia/die-urologie/urothelkarzinom-der-harnblase-diagnostik?epediaDoi=10.1007%2F978-3-642-41168-7_103&q=urothelkarzinom%20survivin.
19. Blasenkarzinom (Urothelkarzinom). *Onkopedia*
<https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/blasenkarzinom-urothelkarzinom>.
20. Sylvester, R. J. *et al.* High-grade Ta urothelial carcinoma and carcinoma in situ of the bladder. *Urology* **66**, 90–107 (2005).
21. Harnblasenkarzinom | Universitätsklinikum Ulm. <https://www.uniklinik-ulm.de/comprehensive-cancer-center-ulm-cccu/fuer-patienten-und-angehoerige/krebserkrankungen/harnblasenkarzinom.html>.
22. Sylvester, R. J. *et al.* Predicting Recurrence and Progression in Individual Patients with Stage Ta T1 Bladder Cancer Using EORTC Risk Tables: A Combined Analysis of 2596 Patients from Seven EORTC Trials. *Eur. Urol.* **49**, 466–477 (2006).
23. Breyer, J. *et al.* High CDKN2A/p16 and Low FGFR3 Expression Predict Progressive Potential of Stage pT1 Urothelial Bladder Carcinoma. *Clin. Genitourin. Cancer* **16**, 248–256.e2 (2018).
24. Urothelkarzinom der Harnblase: Diagnostik - Die Urologie - eMedpedia.
https://www.springermedizin.de/emedpedia/die-urologie/urothelkarzinom-der-harnblase-diagnostik?epediaDoi=10.1007%2F978-3-642-41168-7_103&q=harnblasenkarzinom%20symptome.
25. Abogunrin, F. *et al.* The impact of biomarkers in multivariate algorithms for bladder cancer diagnosis in patients with hematuria. *Cancer* **118**, 2641–2650 (2012).
26. on behalf of the BRIDGE Consortium *et al.* In stage pT1 non-muscle-invasive bladder cancer (NMIBC), high KRT20 and low KRT5 mRNA expression identify the luminal subtype and predict recurrence and survival. *Virchows Arch.* **470**, 267–274 (2017).
27. Wirtz, R. M. *et al.* FGFR testing and urine-based risk stratification from matched tissue and urine samples within the prospective real-world clinicopathological register trial: BRIDGister. *J. Clin. Oncol.* **40**, 469–469 (2022).
28. Mayr, R. *et al.* Prognostic and Predictive Value of Fibroblast Growth Factor Receptor Alterations in High-grade Non-muscle-invasive Bladder Cancer Treated with and Without Bacillus Calmette-Guérin Immunotherapy. *Eur. Urol.* **81**, 606–614 (2022).
29. Targeting FGFR3 alterations with adjuvant infigratinib in invasive urothelial carcinoma: the phase III PROOF 302 trial | Future Oncology. <https://www.futuremedicine.com/doi/full/10.2217/fon-2021-1629>.
30. Hommerding, O. *et al.* Molekularpathologie bei urologischen Tumoren: Empfehlungen der Konsenskonferenz der Internationalen Gesellschaft für Uropathologie (ISUP) 2019. *Pathol.* **42**, 310–318 (2021).
31. Fachgruppe Molekulare Urologie der Arbeitsgruppe urologische Forschung (AuF) der Deutschen Gesellschaft für Urologie *et al.* Molekulare Subtypen des Urothelkarzinoms der Harnblase – Hintergründe und klinische Relevanz. *Urol.* **60**, 81–88 (2021).
32. Choi, W. *et al.* Intrinsic basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer. *Nat. Rev. Urol.* **11**, 400–410 (2014).

33. Dadhania, V. *et al.* Meta-Analysis of the Luminal and Basal Subtypes of Bladder Cancer and the Identification of Signature Immunohistochemical Markers for Clinical Use. *eBioMedicine* **12**, 105–117 (2016).
34. Guo, C. C. *et al.* Assessment of Luminal and Basal Phenotypes in Bladder Cancer. *Sci. Rep.* **10**, 9743 (2020).
35. Choi, W. *et al.* Identification of distinct basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer with different sensitivities to frontline chemotherapy. *Cancer Cell* **25**, 152–165 (2014).
36. Guo, C. C. & Czerniak, B. Bladder Cancer in the Genomic Era. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **143**, 695–704 (2019).
37. Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. *Nature* **507**, 315–322 (2014).
38. Ochoa, A. E. *et al.* Specific micro-RNA expression patterns distinguish the basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer. *Oncotarget* **7**, 80164–80174 (2016).
39. Böhle, A. & Bock, P. R. Intravesical bacille calmette-guérin versus mitomycin c in superficial bladder cancer: formal meta-analysis of comparative studies on tumor progression. *Urology* **63**, 682–686 (2004).
40. Sylvester, R. J., Van Der Meijden, A. P. M. & Lamm, D. L. Intravesical Bacillus Calmette-Guerin Reduces the Risk of Progression in Patients with Superficial Bladder Cancer: A Meta-analysis of the Published Results of Randomized Clinical Trials. *J. Urol.* **168**, 1964–1970 (2002).
41. *Uroonkologie*. (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2009). doi:10.1007/978-3-642-01382-9.
42. Denzinger, S. *et al.* Early Versus Deferred Cystectomy for Initial High-Risk pT1G3 Urothelial Carcinoma of the Bladder: Do Risk Factors Define Feasibility of Bladder-Sparing Approach? *Eur. Urol.* **53**, 146–152 (2008).
43. Lee, R. C., Feinbaum, R. L. & Ambros, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* **75**, 843–854 (1993).
44. Ruvkun, G. & Giusto, J. The *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene *lin-14* encodes a nuclear protein that forms a temporal developmental switch. *Nature* **338**, 313–319 (1989).
45. advanced-medicineprize2024-2.pdf.
46. Ambros, V. The functions of animal microRNAs. *Nature* **431**, 350–355 (2004).
47. Shi, Y. *et al.* MiRNAs and Cancer: Key Link in Diagnosis and Therapy. *Genes* **12**, 1289 (2021).
48. Mishra, S., Yadav, T. & Rani, V. Exploring miRNA based approaches in cancer diagnostics and therapeutics. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **98**, 12–23 (2016).
49. Fabian, M. R. & Sonenberg, N. The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**, 586–593 (2012).
50. Choo, K. B., Soon, Y. L., Nguyen, P. N. N., Hiew, M. S. Y. & Huang, C.-J. MicroRNA-5p and -3p co-expression and cross-targeting in colon cancer cells. *J. Biomed. Sci.* **21**, 95 (2014).
51. O’Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y. & Peng, C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front. Endocrinol.* **9**, (2018).

52. Pisarello, M. J. L., Loarca, L., Ivanics, T., Morton, L. & LaRusso, N. MicroRNAs in the Cholangiopathies: Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment. *J. Clin. Med.* **4**, 1688–1712 (2015).
53. Griffiths-Jones, S., Hui, J. H. L., Marco, A. & Ronshaugen, M. MicroRNA evolution by arm switching. *EMBO Rep.* **12**, 172–177 (2011).
54. Ha, M. & Kim, V. N. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 509–524 (2014).
55. Treiber, T., Treiber, N. & Meister, G. Regulation of microRNA biogenesis and function. *Thromb. Haemost.* **107**, 605–610 (2012).
56. Ghini, F. *et al.* Endogenous transcripts control miRNA levels and activity in mammalian cells by target-directed miRNA degradation. *Nat. Commun.* **9**, 3119 (2018).
57. Jonas, S. & Izaurralde, E. Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nat. Rev. Genet.* **16**, 421–433 (2015).
58. Dharap, A., Pokrzywa, C., Murali, S., Pandi, G. & Vemuganti, R. MicroRNA miR-324-3p induces promoter-mediated expression of RelA gene. *PloS One* **8**, e79467 (2013).
59. Sun, M. *et al.* The Regulatory Roles of MicroRNAs in Bone Remodeling and Perspectives as Biomarkers in Osteoporosis. *BioMed Res. Int.* **2016**, 1652417 (2016).
60. Croce, C. M. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat. Rev. Genet.* **10**, 704–714 (2009).
61. Iorio, M. V. & Croce, C. M. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO Mol. Med.* **4**, 143–159 (2012).
62. Kim, T. & Croce, C. M. MicroRNA: trends in clinical trials of cancer diagnosis and therapy strategies. *Exp. Mol. Med.* **55**, 1314–1321 (2023).
63. Ali Syeda, Z., Langden, S. S. S., Munkhzul, C., Lee, M. & Song, S. J. Regulatory Mechanism of MicroRNA Expression in Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1723 (2020).
64. Keniry, A. *et al.* The H19 lincRNA is a developmental reservoir of miR-675 that suppresses growth and Igf1r. *Nat. Cell Biol.* **14**, 659–665 (2012).
65. Tripathi, V. *et al.* The Nuclear-Retained Noncoding RNA MALAT1 Regulates Alternative Splicing by Modulating SR Splicing Factor Phosphorylation. *Mol. Cell* **39**, 925–938 (2010).
66. Kino, T., Hurt, D. E., Ichijo, T., Nader, N. & Chrousos, G. P. Noncoding RNA Gas5 Is a Growth Arrest– and Starvation-Associated Repressor of the Glucocorticoid Receptor. *Sci. Signal.* **3**, (2010).
67. Poliseno, L. *et al.* A coding-independent function of gene and pseudogene mRNAs regulates tumour biology. *Nature* **465**, 1033–1038 (2010).
68. Gupta, R. A. *et al.* Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature* **464**, 1071–1076 (2010).
69. Sampson, V. B. *et al.* MicroRNA Let-7a Down-regulates MYC and Reverts MYC-Induced Growth in Burkitt Lymphoma Cells. *Cancer Res.* **67**, 9762–9770 (2007).
70. Johnson, S. M. *et al.* RAS Is Regulated by the let-7 MicroRNA Family. *Cell* **120**, 635–647 (2005).

71. Esquela-Kerscher, A. *et al.* The *let-7* microRNA reduces tumor growth in mouse models of lung cancer. *Cell Cycle* **7**, 759–764 (2008).
72. Mayr, C., Hemann, M. T. & Bartel, D. P. Disrupting the Pairing Between *let-7* and *Hmga2* Enhances Oncogenic Transformation. *Science* **315**, 1576–1579 (2007).
73. Volinia, S. *et al.* A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 2257–2261 (2006).
74. Catto, J. W. F. *et al.* Distinct microRNA alterations characterize high- and low-grade bladder cancer. *Cancer Res.* **69**, 8472–8481 (2009).
75. Baumgart, S. *et al.* MicroRNAs in tumor samples and urinary extracellular vesicles as a putative diagnostic tool for muscle-invasive bladder cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **145**, 2725–2736 (2019).
76. Rufino-Ramos, D. *et al.* Extracellular vesicles: Novel promising delivery systems for therapy of brain diseases. *J. Controlled Release* **262**, 247–258 (2017).
77. Panda, S. S., Sahoo, R. K., Patra, S. K., Biswal, S. & Biswal, B. K. Molecular insights to therapeutic in cancer: role of exosomes in tumor microenvironment, metastatic progression and drug resistance. *Drug Discov. Today* **29**, 104061 (2024).
78. Baumgart, S. *et al.* Exosomes of invasive urothelial carcinoma cells are characterized by a specific miRNA expression signature. *Oncotarget* **8**, 58278–58291 (2017).
79. Sha, H.-H. *et al.* MiR-138: A promising therapeutic target for cancer. *Tumor Biol.* **39**, 1010428317697575 (2017).
80. Bandres, E. *et al.* microRNA-451 regulates macrophage migration inhibitory factor production and proliferation of gastrointestinal cancer cells. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **15**, 2281–2290 (2009).
81. Pan, C. *et al.* Exosomal microRNAs as tumor markers in epithelial ovarian cancer. *Mol. Oncol.* **12**, 1935–1948 (2018).
82. Janssen, H. L. A. *et al.* Treatment of HCV Infection by Targeting MicroRNA. *N. Engl. J. Med.* **368**, 1685–1694 (2013).
83. Rupaimoole, R. & Slack, F. J. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* **16**, 203–222 (2017).
84. Grimaldi, A. M., Lapucci, C., Salvatore, M., Incoronato, M. & Ferrari, M. Urinary miRNAs as a Diagnostic Tool for Bladder Cancer: A Systematic Review. *Biomedicines* **10**, 2766 (2022).
85. Long, C. *et al.* The diagnostic accuracy of urine-derived exosomes for bladder cancer: a systematic review and meta-analysis. *World J. Surg. Oncol.* **22**, 285 (2024).
86. Zuiverloon, T. C. M., de Jong, F. C., Costello, J. C. & Theodorescu, D. Systematic Review: Characteristics and Preclinical Uses of Bladder Cancer Cell Lines. *Bladder Cancer Amst. Neth.* **4**, 169–183.
87. miRNeasy Kits. <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/rna-purification/mirna/mirneasy-kits/>.
88. Pfaffl, M. W. & Riedmaier, I. Die Real-Time-RT-PCR-Datenanalyse im Fokus der MIQE-Richtlinie. *BIOspektrum* **17**, 295–297 (2011).

89. Bustin, S. A. *et al.* The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin. Chem.* **55**, 611–622 (2009).
90. Pfaffl, M. W. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. 4.
91. Tools for miRNA Profiling - DE. <https://www.thermofisher.com/de/de/home/references/ambion-tech-support/microrna-studies/tech-notes/simple--rapid--quantitative.html>.
92. Han, Y. *et al.* MicroRNA Expression Signatures of Bladder Cancer Revealed by Deep Sequencing. *PLOS ONE* **6**, e18286 (2011).
93. Inada, K. *et al.* Endogenous reference RNAs for microRNA quantitation in formalin-fixed, paraffin-embedded lymph node tissue. *Sci. Rep.* **8**, 5918 (2018).
94. Puerta-Gil, P. *et al.* miR-143, miR-222, and miR-452 Are Useful as Tumor Stratification and Noninvasive Diagnostic Biomarkers for Bladder Cancer. *Am. J. Pathol.* **180**, 1808–1815 (2012).
95. NormFinder software. <https://moma.dk/normfinder-software>.
96. Jin, H. Y. *et al.* Transfection of microRNA Mimics Should Be Used with Caution. *Front. Genet.* **6**, (2015).
97. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods San Diego Calif* **25**, 402–408 (2001).
98. Eckhart, L. *et al.* Machine Learning Accurately Predicts Muscle Invasion of Bladder Cancer Based on Three miRNAs. *J. Cell. Mol. Med.* **29**, e70361 (2025).
99. Afzal, M. A. *et al.* Absence of detectable measles virus genome sequence in blood of autistic children who have had their MMR vaccination during the routine childhood immunization schedule of UK. *J. Med. Virol.* **78**, 623–630 (2006).
100. D'Souza, Y., Fombonne, E. & Ward, B. J. No evidence of persisting measles virus in peripheral blood mononuclear cells from children with autism spectrum disorder. *Pediatrics* **118**, 1664–1675 (2006).
101. D'Souza, Y., Dionne, S., Seidman, E. G., Bitton, A. & Ward, B. J. No evidence of persisting measles virus in the intestinal tissues of patients with inflammatory bowel disease. *Gut* **56**, 886–888 (2007).
102. Hornig, M. *et al.* Lack of association between measles virus vaccine and autism with enteropathy: a case-control study. *PloS One* **3**, e3140 (2008).
103. Bustin, S. A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J. Mol. Endocrinol.* **29**, 23–39 (2002).
104. Bustin, S. A. The reproducibility of biomedical research: Sleepers awake! *Biomol. Detect. Quantif.* **2**, 35–42 (2014).
105. Yang, R. *et al.* miR-138-5p contributes to cell proliferation and invasion by targeting Survivin in bladder cancer cells. *Mol. Cancer* **15**, 82 (2016).
106. Sun, D.-K., Wang, J.-M., Zhang, P. & Wang, Y.-Q. MicroRNA-138 Regulates Metastatic Potential of Bladder Cancer Through ZEB2. *Cell. Physiol. Biochem.* **37**, 2366–2374 (2015).
107. MicroRNA Profiling and Head and Neck Cancer. <https://www.hindawi.com/journals/ijg/2009/837514/>.

108. Jin, Z., Guan, L. & Song, Y. MicroRNA-138 regulates chemoresistance in human non-small cell lung cancer via epithelial mesenchymal transition. *7*.
109. Alterations of microRNAs in cisplatin-resistant human non-small cell lung cancer cells (A549/DDP) - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21787234/>.
110. Pignot, G. *et al.* microRNA expression profile in a large series of bladder tumors: Identification of a 3-miRNA signature associated with aggressiveness of muscle-invasive bladder cancer. *Int. J. Cancer* **132**, 2479–2491 (2013).
111. Wang, Y. & Taniguchi, T. MicroRNAs and DNA damage response. *Cell Cycle* **12**, 32–42 (2013).
112. Martínez-Fernández, M. *et al.* EZH2 in Bladder Cancer, a Promising Therapeutic Target. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 27107–27132 (2015).
113. Yang, R. *et al.* Overexpressed miR-200a promotes bladder cancer invasion through direct regulating Dicer/miR-16/JNK2/MMP-2 axis. *Oncogene* **39**, 1983–1996 (2020).
114. Wiklund, E. D. *et al.* Coordinated epigenetic repression of the miR-200 family and miR-205 in invasive bladder cancer. *Int. J. Cancer* **128**, 1327–1334 (2011).
115. Gregory, P. A. *et al.* The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat. Cell Biol.* **10**, 593–601 (2008).
116. Baumgart, E. *et al.* Identification and prognostic significance of an epithelial-mesenchymal transition expression profile in human bladder tumors. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **13**, 1685–1694 (2007).
117. Hurst, D. R. *et al.* Breast Cancer Metastasis Suppressor 1 Up-regulates miR-146, Which Suppresses Breast Cancer Metastasis. *Cancer Res.* **69**, 1279–1283 (2009).
118. Gao, S. *et al.* MiR-146b inhibits autophagy in prostate cancer by targeting the PTEN/Akt/mTOR signaling pathway. *Aging* **10**, 2113–2121 (2018).
119. Zhu, Y., Wu, G., Yan, W., Zhan, H. & Sun, P. miR-146b-5p regulates cell growth, invasion, and metabolism by targeting PDHB in colorectal cancer. *Am. J. Cancer Res.* **7**, 1136–1150 (2017).
120. Zhu, J. *et al.* MicroRNA-146b Overexpression Promotes Human Bladder Cancer Invasion via Enhancing ETS2-Mediated mmp2 mRNA Transcription. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **16**, 531–542 (2019).
121. Cabral-Pacheco, G. A. *et al.* The Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Human Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 9739 (2020).
122. Wang, H. & Men, C.-P. Correlation of Increased Expression of MicroRNA-155 in Bladder Cancer and Prognosis. *Lab. Med.* **46**, 118–122 (2015).
123. S, J. *et al.* MicroRNA-155 functions as an OncomiR in breast cancer by targeting the suppressor of cytokine signaling 1 gene. *Cancer Res.* **70**, (2010).
124. Thomas, S. J., Snowden, J. A., Zeidler, M. P. & Danson, S. J. The role of JAK/STAT signalling in the pathogenesis, prognosis and treatment of solid tumours. *Br. J. Cancer* **113**, 365–371 (2015).
125. Jiang, X., Lei, T. & Zhang, M. Expression and Functions of Formyl Peptide Receptor 1 in Drug-Resistant Bladder Cancer. *Technol. Cancer Res. Treat.* **17**, 153303461876941 (2018).

126. Oswald, D. *et al.* Transurethrale Resektion von Blasentumoren (TUR-B). *Urol. Ausg A* **61**, 71–82 (2022).
127. Mattiske, S., Suetani, R. J., Neilsen, P. M. & Callen, D. F. The oncogenic role of miR-155 in breast cancer. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* **21**, 1236–1243 (2012).
128. Chen, J., Wang, B.-C. & Tang, J.-H. Clinical significance of microRNA-155 expression in human breast cancer. *J. Surg. Oncol.* **106**, 260–266 (2012).
129. Li, M., Li, J., Ye, C., Wu, W. & Cheng, Y. miR-200a-3p predicts prognosis and inhibits bladder cancer cell proliferation by targeting STAT4. *Arch. Med. Sci. AMS* **19**, 724–735 (2019).
130. Liu, W.-J. *et al.* MLH1 as a direct target of MiR-155 and a potential predictor of favorable prognosis in pancreatic cancer. *J. Gastrointest. Surg. Off. J. Soc. Surg. Aliment. Tract* **17**, 1399–1405 (2013).
131. Rüschoff, J. H. & Moch, H. Molekularpathologische Diagnostik des Harnblasenkarzinoms – prädiktive und prognostische Marker. *Onkol.* **28**, 742–752 (2022).
132. Xie, Y. *et al.* MicroRNAs with prognostic significance in bladder cancer: a systematic review and meta-analysis. *Sci. Rep.* **7**, 5619 (2017).
133. Zhang, X. *et al.* Direct quantitative detection for cell-free miR-155 in urine: a potential role in diagnosis and prognosis for non-muscle invasive bladder cancer. *Oncotarget* **7**, 3255–3266 (2015).
134. Zhang, Z., Qin, Y.-W., Brewer, G. & Jing, Q. MicroRNA degradation and turnover: regulating the regulators. *WIREs RNA* **3**, 593–600 (2012).
135. Gommans, W. M. & Berezikov, E. Controlling miRNA Regulation in Disease. in *Next-Generation MicroRNA Expression Profiling Technology: Methods and Protocols* (ed. Fan, J.-B.) 1–18 (Humana Press, Totowa, NJ, 2012). doi:10.1007/978-1-61779-427-8_1.
136. Liu, L. *et al.* miR-200c Inhibits invasion, migration and proliferation of bladder cancer cells through down-regulation of BMI-1 and E2F3. *J. Transl. Med.* **12**, 305 (2014).
137. Moleculardevices. <https://www.moleculardevices.com/applications/3d-cell-models/spheroids>.
138. Bastian, J., Zeuschner, P., Stöckle, M., Junker, K. & Linxweiler, J. Monolayer versus spheroid: An in-vivo comparison regarding local progression and metastasis in prostate cancer. *Eur. Urol.* **81**, S629 (2022).
139. Yoshida, T. *et al.* Impact of spheroid culture on molecular and functional characteristics of bladder cancer cell lines. *Oncol. Lett.* **18**, 4923–4929 (2019).
140. Lorber, T. *et al.* Multiparameter Ploidy Profiling: a Powerful Tool to Investigate the Genomics of Diploid Tumor Populations. *Ann. Oncol.* **26**, i10 (2015).

10. Publikationen

- **Tracking the Evolution of Cutaneous Melanoma by Multiparameter Flow Sorting and Genomic Profiling**

*Luca Roma *†, Thomas Lorber †, **Sabrina Rau**, Michael T. Barrett‡, Caner Ercan, Federica Panebianco, Salvatore Piscuoglio, Katharina Glatz, Lukas Bubendorf § and Christian Ruiz §*

February 2025 - International Journal of Molecular Sciences (IJMS) 26(4):1758

DOI: 10.3390/ijms26041758

- **Machine Learning Accurately Predicts Muscle Invasion of Bladder Cancer Based on Three miRNAs**

*Lea Eckhart, **Sabrina Rau**, Markus Eckstein, Phillip R. Stahl, Hires Ayoubian, Julia Heinzlbecker, Farzaneh Zohari, Arndt Hartmann, Michael Stöckle, Hans-Peter Lenhof, Kerstin Junker*

February 2025 - Journal of Cellular and Molecular Medicine

DOI: 10.1111/jcmm.70361

11. Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Beschreibung	Seite
Abb. 1	Arten und Stadien von Harnblasentumoren	12
Abb. 2	Schematische Darstellung der miRNA Biogenese	17
Abb. 3	Darstellung der Mutationshäufigkeit	18
Abb. 4	Struktur und Funktion extrazellulärer Vesikel (EV)	19
Abb. 5	Heatmap der Microarray-Analyse von miRNA in NMIBC im Vergleich zu MIBC	20
Abb. 6	Schematische Darstellung des Workflows für die miRNA-Isolation aus FFPE-Gewebeproben und Zelllinien.	27
Abb. 7	Vergleich der qPCR-Effizienzkurven	29
Abb. 8	Fluoreszenzmikroskopie-Bilder der transienten Transfektion mit fluoreszenzmarkiertem miRNA-Mimic	30
Abb. 9	Dosisabhängige Expressionslevel von miR-200a-3p nach transienter Transfektion in J82-Zellen	31
Abb. 10	Schematische Darstellung des Transwell-Assay-Setups	36
Abb. 11	Stabilitätsanalyse der Referenz-miRNAs (RNU48, miR-191-5p, miR-361-5p)	41
Abb. 12	qPCR-Daten zur Validierung des Transfektionserfolgs von miR-155-5p in RT112-Zellen nach transienter Transfektion.	43
Abb. 13	Boxplot der miRNA-Expressionslevel (miR-138-5p, miR-146b-5p, miR-155-5p, miR-200a-3p) in NMIBC vs. MIBC in der Etablierungskohorte.	45
Abb. 14	Vergleich der miRNA-Expressionslevel zwischen TUR- und Zystektomiepräparaten in der HOM-Kohorte.	49
Abb. 15	Differenzielle Expression von miR-155-5p in invasiven vs. nicht-invasiven Tumorarealen von MIBC-Proben.	50
Abb. 16	miRNA-Expressionsprofile von pT1 G3 Tumoren im Vergleich zu NMIBC und MIBC in der HOM-Kohorte.	52
Abb. 17	miRNA-Expressionsprofile von pT1 G3 Tumoren im Vergleich zu NMIBC und MIBC in der ERL-Kohorte.	53

Abb. 18	Korrelationsmatrix zwischen T-Kategorie, Differenzierungsgrad und miRNA-Expressionsleveln in der HOM-Kohorte.	54
Abb. 19	Immunhistochemische Färbungen von CK5 und CK20 zur molekularen Subtypisierung (luminal vs. basal) in NMIBC und MIBC.	56
Abb. 20	ROC-Kurven für die einzelnen miRNAs (miR-138-5p, miR-146b-5p, miR-155-5p, miR-200a-3p) zur Unterscheidung von NMIBC und MIBC.	57
Abb. 21	Fallbeispiel: miRNA-Expressionsprofile eines pT1 high-grade Tumors vor und nach Upstaging zu MIBC.	58
Abb. 22	PCA-Darstellung der miRNA-Expressionsdaten zur Gruppentrennung von NMIBC und MIBC in der HOM-Kohorte.	59
Abb. 23	Heatmap der diagnostischen Güte (Accuracy, Sensitivität, Spezifität) für verschiedene miRNA-Kombinationen.	60
Abb. 24	Vorhersagemodell für das Invasionsrisiko von pT1 high-grade Tumoren basierend auf miRNA-Expressionsdaten.	63
Abb. 25	miRNA-Expressionslevel in den Zelllinien T24, J82, RT112 und HCV-29 im unbehandelten Zustand.	65
Abb. 26	Proliferationskurven der Zelllinie T24 nach Überexpression von miR-200a-3p im RTCA-Assay.	66
Abb. 27	Migrationsverhalten der Zelllinie J82 nach Überexpression von miR-200a-3p im Transwell-Assay.	68
Abb. 28	Invasionsverhalten der Zelllinie RT112 nach Überexpression von miR-155-5p im Transwell-Assay.	69
Abb. 29	Vergleich der Proliferationsraten in T24-Zellen nach Überexpression von miR-200a-3p und Kontrollmimic (BrdU-Assay).	70
Abb. 30	Zeitliche Verläufe der Zellmigration in J82-Zellen nach Überexpression von miR-200a-3p im RTCA-Assay.	71
Abb. 31	Boxplot der miRNA-Expressionslevel in muskelinvasiven vs. nicht-muskelinvasiven Tumorarealen der HOM-Kohorte.	75
Abb. 32	Vergleich der miRNA-Expressionsprofile von pT1 G3 Tumoren mit hohem vs. niedrigem Invasionsrisiko.	76

Abb. 33	Korrelation der miRNA-Expressionsdaten mit molekularen Subtypen (luminal vs. basal) in der ERL-Kohorte.	77
Abb. 34	Diagnostische Genauigkeit der miRNA-Signatur im Vergleich zu histopathologischen Merkmalen.	78
Abb. 35	cut-off-Werte	111
Abb. 36	Proliferationsverhalten der Zelllinien	112
Abb. 37	RTCA xCelligence System: Proliferationsverhalten der Zelllinien T24 (A), J82 (B), RT112 (C) und HCV-29 (D)	113
Abb. 38	Migrationsverhalten der Zelllinien T24 (A), J82 (B), RT112 (C)	114
Abb. 39	Hauptkomponentenanalyse (PCA) der vier miRNAs	115
Abb. 40	KI-Modelle AdaBoost, KNN, Random Forest und Vanilla Neural Network	117

12. Tabellenverzeichnis

Tabelle	Beschreibung	Seite
Tab. 1	Verbrauchsmaterialien für die experimentellen Untersuchungen.	23
Tab. 2	Reagenzien und Gebrauchslösungen,	24
Tab. 3	Kits	25
Tab. 4	Geräte und Software.	26
Tab. 5	Zusammenstellung der Patientenkohorten	27
Tab. 6	Effizienzwerte der qPCR für die untersuchten miRNAs (miR-138-5p, miR-146b-5p, miR-155-5p, miR-200a-3p) in der Etablierungskohorte.	29
Tab. 7	Referenzstabilitätswerte der miRNAs (RNU48, miR-191-5p, miR-361-5p) in der HOM-Kohorte, berechnet mit NormFinder.	30
Tab. 8	Statistische Tests und deren Anwendung zur Analyse der miRNA-Expressionsdaten (z. B. t-Test, ANOVA, Mann-Whitney U-Test).	31
Tab. 9	miRNA-Expressionslevel in NMIBC vs. MIBC in der Etablierungskohorte	45
Tab. 10	Vergleich der miRNA-Expressionslevel zwischen TUR- und Zystektomiepräparaten in der HOM-Kohorte.	49
Tab. 11	Differenzielle Expression von miRNAs in invasiven vs. nicht-invasiven Tumorearealen in der ERL-Kohorte.	50
Tab. 12	miRNA-Expressionsprofile von pT1 G3 Tumoren in der HOM-Kohorte im Vergleich zu NMIBC und MIBC.	52
Tab. 13	miRNA-Expressionsprofile von pT1 G3 Tumoren in der ERL-Kohorte im Vergleich zu NMIBC und MIBC.	53
Tab. 14	Korrelationskoeffizienten zwischen T-Kategorie, Differenzierungsgrad und miRNA-Expressionsleveln in der HOM-Kohorte.	54
Tab. 15	Molekulare Subtypisierung (luminal vs. basal) basierend auf CK5- und CK20-Expression in NMIBC und MIBC.	56

Tab. 16	Diagnostische Güte (Accuracy, Sensitivität, Spezifität) verschiedener miRNA-Kombinationen zur Unterscheidung von NMIBC und MIBC.	60
Tab. 17	Vorhersagewerte für das Invasionsrisiko von pT1 high-grade Tumoren basierend auf miRNA-Expressionsdaten.	63
Tab. 18	miRNA-Expressionslevel in den Zelllinien T24, J82, RT112 und HCV-29 im unbehandelten Zustand.	65
Tab. 19	Proliferationsraten der Zelllinien nach Überexpression von miR-200a-3p und miR-155-5p (BrdU- und RTCA-Assay-Daten).	66
Tab. 20	Migrationsraten der Zelllinien nach Überexpression von miR-200a-3p und miR-155-5p im Transwell-Assay.	68
Tab. 21	Invasionsraten der Zelllinien nach Überexpression von miR-200a-3p und miR-155-5p im Transwell-Assay.	69
Tab. 22	Vergleich der miRNA-Expressionslevel in muskelinvasiven vs. nicht-muskelinvasiven Tumorarealen in der HOM-Kohorte.	75
Tab. 23	miRNA-Expressionsprofile von pT1 G3 Tumoren mit hohem vs. niedrigem Invasionsrisiko in der ERL-Kohorte.	76
Tab. 24	Korrelation der miRNA-Expressionsdaten mit molekularen Subtypen (luminal vs. basal) in der HOM-Kohorte.	77
Tab. 25	Diagnostische Genauigkeit der miRNA-Signatur im Vergleich zu histopathologischen Merkmalen.	78
Tab. A	ROC-Kurven-Analyse für miR-138-5p: Cut-off-Werte, Sensitivität, Spezifität und Youden-Index.	105
Tab. B	ROC-Kurven-Analyse für miR-146b-5p: Cut-off-Werte, Sensitivität, Spezifität und Youden-Index.	106
Tab. C	ROC-Kurven-Analyse für miR-155-5p: Cut-off-Werte, Sensitivität, Spezifität und Youden-Index.	107
Tab. D	ROC-Kurven-Analyse für miR-200a-3p: Cut-off-Werte, Sensitivität, Spezifität und Youden-Index.	108–110

13. Abkürzungsverzeichnis

<u>Abkürzung</u>	<u>Bedeutung</u>
AGO	Argonaute
BC	Harnblasenkarzinom (Bladder Cancer)
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
BrdU	Bromdesoxyuridin
BTA	Bladder Tumor Antigen
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CHEK2	Checkpoint Kinase 2
CIS	Carcinoma in situ
CK	Zytokeratin (Cytokeratin)
DGCR8	DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8
DDX6	DEAD Box Protein 6
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
eIF4A	Eukaryotic Translation Initiation Factor 4A
EMT	Epithelial-Mesenchymaler Übergang
EORTC	European Organisation for Research and Treatment of Cancer
EV	Extrazelluläre Vesikel
FGFR3	Fibroblast Growth Factor Receptor 3
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
GATA-3	GATA-Binding Protein 3
GW182	Glycine-Tryptophan Repeat-Containing Protein
HOM	Homburg-Kohorte
HRAS	Harvey Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog
IRAK1	Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase 1

KRAS	Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog
lncRNA	Long Non-Coding RNA
MIBC	Muskelinvasiver Blasenkrebs (Muscle-Invasive Bladder Cancer)
miRISC	miRNA-Induced Silencing Complex
miRNA	MicroRNA
MRE	miRNA Response Element
MYC	Myelocytomatosis Oncogene
NF- κ B	Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NMIBC	Nicht-Muskelinvasiver Blasenkrebs (Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer)
NMP22	Nuclear Matrix Protein 22
NRAS	Neuroblastoma RAS Viral Oncogene Homolog
OS	Gesamtüberleben (Overall Survival)
PCA	Hauptkomponentenanalyse (Principal Component Analysis)
PD-L1	Programmed Death-Ligand 1
PFS	Progressionsfreies Überleben (Progression-Free Survival)
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog
PUNLMP	Papilläre Urothelmalignität mit niedrigem malignem Potenzial (Papillary Urothelial Neoplasm of Low Malignant Potential)
qPCR	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RB1	Retinoblastoma 1
RFS	Rezidivfreies Überleben (Recurrence-Free Survival)
RISC	RNA-Induced Silencing Complex
ROC	Receiver Operating Characteristic
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion

RTCA	Real-Time Cell Analysis
SHIP1	SH2 Domain-Containing Inositol Phosphatase 1
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus (Single Nucleotide Polymorphism)
SOCS1	Suppressor of Cytokine Signaling 1
SOX4	SRY-Box Transcription Factor 4
STAG2	Stromal Antigen 2
TNM	Tumor, Nodus, Metastase (Tissue Node Metastasis)
TP53	Tumor Protein p53
TP53INP1	Tumor Protein p53 Inducible Nuclear Protein 1
TRBP	TAR RNA-Binding Protein
TUR-B	Transurethrale Resektion der Blase
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
UTR	Untranslated Region
ZEB1/2	Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1/2

14. Anhang

14.1 Gewebeexpression

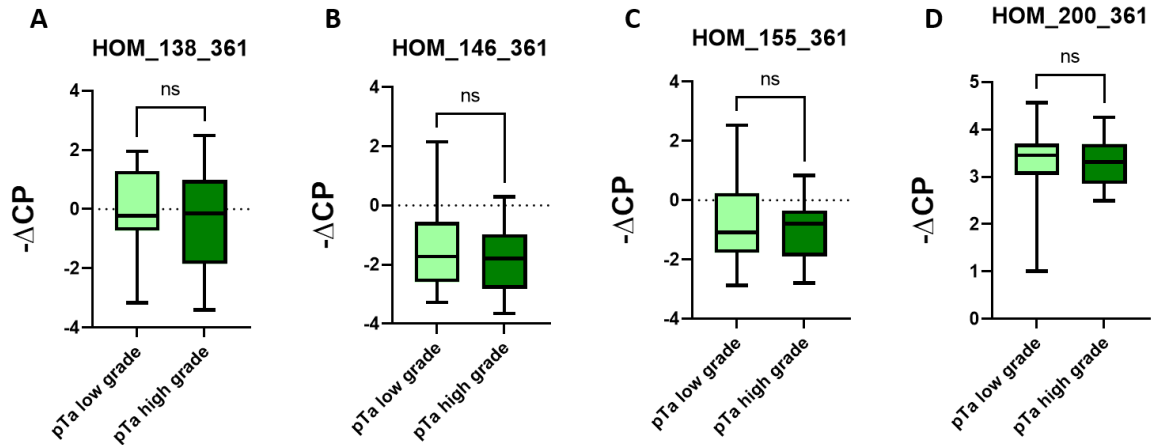


Abb.33: Die Expressionslevel der vier miRNAs miR-138-5p (A), miR-146b-5p (B), miR-155-5p (C) und miR-200a-3p (D) in pTa low grade (TUR n=27) und pTa high grade (TUR n=12) wurden anhand der Trainingskohorte mittels qPCR analysiert. Die Normalisierung erfolgte über die Referenz miR-361-5p. Angegebene p-Werte wurden mit dem Man Whitney Test via GraphPad Prism erstellt, die p-Werte entspringen exakten, two tailed t-tests.

pTa lg vs. hg: miR-138-5p ($p=0.6634$), miR-146b-5p ($p=0.6908$), miR-155-5p ($p>0.9999$), miR-200a-3p ($p=0.6150$).

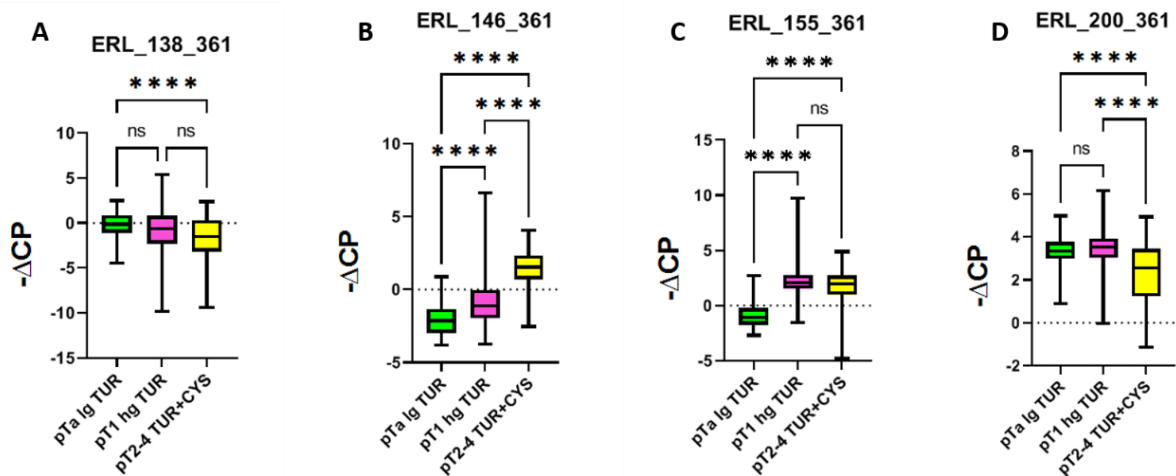


Abb.34: Die Expressionslevel der vier miRNAs miR-138-5p (A), miR-146b-5p (B), miR-155-5p (C) und miR-200a-3p (D) in pTa low grade (TUR n=86), pT1 high grade (TUR n=108) und pT2-4 (TUR n=16; Cys n=74) wurden anhand der Testkohorte mittels qPCR analysiert. Die Normalisierung erfolgte über die Referenz miR-361-5p. Angegebene p-Werte wurden via GraphPad Prism mit dem Kruskal-Wallis Test (Dunn's multiple comparison) erstellt, die p-Werte entspringen approximate t-tests.

pTa lg vs. pT1 hg: miR-138-5p ($p=0.1093$), miR-146b-5p ($p<0.0001$), miR-155-5p ($p<0.0001$), miR-200a-3p ($p=0.6307$).

pT1 hg vs. pT2-4: 138-5p ($p=0.0621$), miR-146b-5p ($p<0.0001$), miR-155-5p ($p>0.999$), miR-200a-3p ($p<0.0001$).

pTa lg vs. pT2-4: miR-138-5p ($p<0.0001$), miR-146b-5p ($p<0.0001$), miR-155-5p ($p<0.0001$), miR-200a-3p ($p<0.0001$).

14.2 ROC Kurven: Youden Index, sens/spez, cut-off-Werte

A	cut-off	Sensitivity%	95% CI	Specificity%	95% CI	Youden
miR-138	<-1.185	40,63	25,52% to 57,74%	77,88	69,38% to 84,54%	0,1851
	<-1.265	37,5	22,93% to 54,75%	80,53	72,28% to 86,78%	0,1803
	<-1.840	31,25	17,96% to 48,57%	86,73	79,25% to 91,79%	0,1798
	<-2.300	25	13,25% to 42,11%	92,92	86,65% to 96,37%	0,1792
	<-1.175	40,63	25,52% to 57,74%	76,99	68,42% to 83,79%	0,1762
	<-1.255	37,5	22,93% to 54,75%	79,65	71,31% to 86,04%	0,1713
	<-1.760	31,25	17,96% to 48,57%	85,84	78,23% to 91,09%	0,1709
	<-2.185	25	13,25% to 42,11%	92,04	85,55% to 95,75%	0,1704
	<-1.125	40,63	25,52% to 57,74%	76,11	67,47% to 83,03%	0,1674
	<-1.230	37,5	22,93% to 54,75%	78,76	70,34% to 85,29%	0,1626
	<-1.680	31,25	17,96% to 48,57%	84,96	77,22% to 90,39%	0,1621
	<-2.165	25	13,25% to 42,11%	91,15	84,47% to 95,12%	0,1613
	<-1.060	40,63	25,52% to 57,74%	75,22	66,52% to 82,26%	0,1583
	<-1.875	28,13	15,56% to 45,37%	87,61	80,27% to 92,47%	0,1574
	<-1.200	37,5	22,93% to 54,75%	77,88	69,38% to 84,54%	0,1538
	<-1.665	31,25	17,96% to 48,57%	84,07	76,22% to 89,68%	0,1532
	<-2.125	25	13,25% to 42,11%	90,27	83,41% to 94,48%	0,1527
	<-0.5150	53,13	36,45% to 69,13%	61,95	52,74% to 70,37%	0,1508
	<-0.7700	46,88	30,87% to 63,55%	68,14	59,08% to 76,01%	0,1502
	<-1.030	40,63	25,52% to 57,74%	74,34	65,58% to 81,50%	0,1497
	<-1.290	34,38	20,41% to 51,69%	80,53	72,28% to 86,78%	0,1491
	<-1.860	28,13	15,56% to 45,37%	86,73	79,25% to 91,79%	0,1486
	<-2.485	21,88	11,02% to 38,75%	92,92	86,65% to 96,37%	0,148
	<-0.6900	50	33,63% to 66,37%	64,6	55,44% to 72,81%	0,146
	<-1.655	31,25	17,96% to 48,57%	83,19	75,23% to 88,96%	0,1444
	<-2.065	25	13,25% to 42,11%	89,38	82,35% to 93,82%	0,1438
	<-0.4850	53,13	36,45% to 69,13%	61,06	51,85% to 69,55%	0,1419
	<-0.7450	46,88	30,87% to 63,55%	67,26	58,16% to 75,22%	0,1414
	<-0.9600	40,63	25,52% to 57,74%	73,45	64,64% to 80,72%	0,1408
	<-0.6700	50	33,63% to 66,37%	63,72	54,54% to 72,00%	0,1372
	<-0.8300	43,75	28,17% to 60,67%	69,91	60,91% to 77,60%	0,1366
	<-1.600	31,25	17,96% to 48,57%	82,3	74,24% to 88,24%	0,1353
	<-2.010	25	13,25% to 42,11%	88,5	81,31% to 93,15%	0,133
	<-0.4750	53,13	36,45% to 69,13%	60,18	50,96% to 68,72%	0,1331
	<-0.7200	46,88	30,87% to 63,55%	66,37	57,25% to 74,42%	0,1323
	<-0.9350	40,63	25,52% to 57,74%	72,57	63,70% to 79,95%	0,132
	<-0.6400	50	33,63% to 66,37%	62,83	53,64% to 71,18%	0,1283
	<-0.8050	43,75	28,17% to 60,67%	69,03	59,99% to 76,81%	0,1278
	<-1.430	31,25	17,96% to 48,57%	81,42	73,25% to 87,51%	0,1267
	<-1.930	25	13,25% to 42,11%	87,61	80,27% to 92,47%	0,1261
	<-0.4450	53,13	36,45% to 69,13%	59,29	50,07% to 67,90%	0,1242
	<-0.9150	40,63	25,52% to 57,74%	71,68	62,77% to 79,17%	0,1231
	<-3.180	15,63	6,864% to 31,75%	96,46	91,25% to 98,61%	0,1209
	<-0.5800	50	33,63% to 66,37%	61,95	52,74% to 70,37%	0,1193
	<-0.7850	43,75	28,17% to 60,67%	68,14	59,08% to 76,01%	0,1189
	<-2.590	18,75	8,890% to 35,31%	92,92	86,65% to 96,37%	0,1167
	<-0.4050	53,13	36,45% to 69,13%	58,41	49,19% to 67,07%	0,1134
	<-0.7050	46,88	30,87% to 63,55%	64,6	55,44% to 72,81%	0,1148
	<-0.8750	40,63	25,52% to 57,74%	70,8	61,84% to 78,39%	0,1143

< -3.045	15,63	6,864% to 31,75%	95,58	90,06% to 98,10%	0,1121
< -0.3700	53,13	36,45% to 69,13%	57,52	48,31% to 66,24%	0,1063
< -0.8450	40,63	25,52% to 57,74%	69,91	60,91% to 77,60%	0,1054
< -2.845	15,63	6,864% to 31,75%	94,69	88,90% to 97,54%	0,1032
< -2.700	15,63	6,864% to 31,75%	93,81	87,76% to 96,97%	0,0944
< -0.3350	53,13	36,45% to 69,13%	55,75	46,56% to 64,57%	0,0888
< -2.625	15,63	6,864% to 31,75%	92,92	86,65% to 96,37%	0,0853
< -0.01000	62,5	45,25% to 77,07%	46,02	37,11% to 55,19%	0,0832
< -0.2950	53,13	36,45% to 69,13%	54,87	45,68% to 63,73%	0,08
< 0.02000	62,5	45,25% to 77,07%	45,13	36,27% to 54,32%	0,0763
< -3.740	9,375	3,240% to 24,22%	98,23	93,78% to 99,69%	0,07603
< -0.2550	53,13	36,45% to 69,13%	53,98	44,81% to 62,89%	0,0711
< 0.06000	62,5	45,25% to 77,07%	44,25	35,43% to 53,44%	0,0673
< -3.535	9,375	3,240% to 24,22%	97,35	92,48% to 99,28%	0,06723
< -0.1550	56,25	39,33% to 71,83%	50,44	41,36% to 59,49%	0,0669
< 1.775	96,88	84,26% to 99,84%	9,735	5,523% to 16,59%	0,06613
< -0.02500	59,38	42,26% to 74,48%	46,9	37,96% to 56,05%	0,0628
< -4.750	6,25	1,111% to 20,15%	100	96,71% to 100,0%	0,0623
< -0.2350	53,13	36,45% to 69,13%	53,1	43,95% to 62,04%	0,0623
< 1.010	81,25	64,69% to 91,11%	24,78	17,74% to 33,48%	0,0603
< 0.09000	62,5	45,25% to 77,07%	43,36	34,59% to 52,57%	0,0586
< -3.270	9,375	3,240% to 24,22%	96,46	91,25% to 98,61%	0,05833
< -0.1450	56,25	39,33% to 71,83%	49,56	40,51% to 58,64%	0,0581
< 1.800	96,88	84,26% to 99,84%	8,85	4,878% to 15,53%	0,0573
< -4.095	6,25	1,111% to 20,15%	99,12	95,16% to 99,95%	0,0537
< -0.2100	53,13	36,45% to 69,13%	52,21	43,08% to 61,20%	0,0534
< 1.065	81,25	64,69% to 91,11%	23,89	16,97% to 32,53%	0,0514
< 0.1150	62,5	45,25% to 77,07%	42,48	33,76% to 51,69%	0,0498
< -0.1350	56,25	39,33% to 71,83%	48,67	39,65% to 57,78%	0,0492
< 1.830	96,88	84,26% to 99,84%	7,965	4,247% to 14,45%	0,04843
< -0.1800	53,13	36,45% to 69,13%	51,33	42,22% to 60,35%	0,0446
< 1.710	93,75	79,85% to 98,89%	10,62	6,180% to 17,65%	0,0437
< 0.1500	62,5	45,25% to 77,07%	41,59	32,93% to 50,81%	0,0409
< -0.1150	56,25	39,33% to 71,83%	47,79	38,80% to 56,92%	0,0404
< 1.870	96,88	84,26% to 99,84%	7,08	3,631% to 13,35%	0,0396
< 1.595	90,63	75,78% to 96,76%	13,27	8,212% to 20,75%	0,039
< 0.3100	65,63	48,31% to 79,59%	38,05	29,63% to 47,26%	0,0368
< -0.1650	53,13	36,45% to 69,13%	50,44	41,36% to 59,49%	0,0357
< 1.740	93,75	79,85% to 98,89%	9,735	5,523% to 16,59%	0,03483
< 0.8000	75	57,89% to 86,75%	28,32	20,83% to 37,23%	0,0332
< 0.1850	62,5	45,25% to 77,07%	40,71	32,10% to 49,93%	0,0321
< -0.05500	56,25	39,33% to 71,83%	46,9	37,96% to 56,05%	0,0313
< -6.040	3,125	0,1603% to 15,74%	100	96,71% to 100,0%	0,03123
< 0.9550	78,13	61,25% to 88,98%	24,78	17,74% to 33,48%	0,0291
< 0.7000	71,88	54,63% to 84,44%	30,97	23,19% to 40,01%	0,0283
< 0.3650	65,63	48,31% to 79,59%	37,17	28,82% to 46,36%	0,028
< 1.150	81,25	64,69% to 91,11%	21,24	14,71% to 29,66%	0,0249
< 0.8250	75	57,89% to 86,75%	27,43	20,05% to 36,30%	0,0243
< 0.2250	62,5	45,25% to 77,07%	39,82	31,28% to 49,04%	0,0232
< 1.905	96,88	84,26% to 99,84%	5,31	2,456% to 11,10%	0,0219

< 1.650	90,63	75,76% to 96,76%	11,5	6,848% to 18,69%	0,0213
< 0.7150	71,88	54,63% to 84,44%	30,09	22,40% to 36,09%	0,0197
< 0.4200	65,63	48,31% to 79,59%	36,28	28,00% to 45,46%	0,0191
< 1.200	81,25	64,69% to 91,11%	20,35	13,96% to 28,69%	0,016
< 0.8400	75	57,89% to 86,75%	26,55	19,28% to 35,36%	0,0155
< 0.2550	62,5	45,25% to 77,07%	38,94	30,45% to 48,15%	0,0144
< 1.940	96,88	84,26% to 99,84%	4,425	1,905% to 9,942%	0,01305
< 1.695	90,63	75,76% to 96,76%	10,62	6,180% to 17,65%	0,0125
< 1.390	84,38	68,25% to 93,14%	16,81	11,04% to 24,77%	0,0119
< 0.7300	71,88	54,63% to 84,44%	29,2	21,61% to 38,16%	0,0108
< 0.4950	65,63	48,31% to 79,59%	35,4	27,19% to 44,56%	0,0103
< 1.565	87,5	71,93% to 95,03%	13,27	8,212% to 20,75%	0,0077
< 1.220	81,25	64,69% to 91,11%	19,47	13,22% to 27,72%	0,0072
< 0.8750	75	57,89% to 86,75%	25,66	18,50% to 34,42%	0,0066
< 0.6400	68,75	51,43% to 82,05%	31,86	23,99% to 40,92%	0,0061
< 1.990	96,88	84,26% to 99,84%	3,54	1,385% to 6,750%	0,0042
< 1.405	84,38	68,25% to 93,14%	15,93	10,32% to 23,78%	0,0031
< 0.7600	71,88	54,63% to 84,44%	28,32	20,83% to 37,23%	0,002
< 0.5350	65,63	48,31% to 79,59%	34,51	26,39% to 43,66%	0,0014
< 1.260	81,25	64,69% to 91,11%	18,58	12,49% to 26,75%	-0,0017
< 0.9050	75	57,89% to 86,75%	24,78	17,74% to 33,48%	-0,0022
< 0.6750	68,75	51,43% to 82,05%	30,97	23,19% to 40,01%	-0,0028
< 2.045	96,88	84,26% to 99,84%	2,655	0,7236% to 7,516%	-0,00465
< 1.450	84,38	68,25% to 93,14%	15,04	9,610% to 22,78%	-0,0038
< 0.5650	65,63	48,31% to 79,59%	33,63	25,58% to 42,75%	-0,0074
< 2.115	96,88	84,26% to 99,84%	1,77	0,3145% to 6,224%	-0,0135
< 1.500	84,38	68,25% to 93,14%	14,16	8,907% to 21,77%	-0,0146
< 0.5900	65,63	48,31% to 79,59%	32,74	24,78% to 41,84%	-0,0163
< 1.335	81,25	64,69% to 91,11%	16,81	11,04% to 24,77%	-0,0194
< 2.320	96,88	84,26% to 99,84%	0,885	0,04539% to 4,843%	-0,02235
< 1.530	84,38	68,25% to 93,14%	13,27	8,212% to 20,75%	-0,0235
< 0.6100	65,63	48,31% to 79,59%	31,86	23,99% to 40,92%	-0,0251

B	cut-off	Sensitivity%	95% CI	Specificity%	95% CI	Youden
miR-146b	> -1.050	93,55	79,28% to 96,85%	76,11	67,47% to 83,03%	0,6966
	> -1.085	93,55	79,28% to 96,85%	75,22	66,52% to 82,26%	0,6877
	> -1.110	93,55	79,28% to 96,85%	74,34	65,58% to 81,50%	0,6789
	> -0.9350	90,32	75,10% to 96,65%	76,99	68,42% to 83,79%	0,6731
	> -1.155	93,55	79,28% to 96,85%	73,45	64,64% to 80,72%	0,67
	> -0.9850	90,32	75,10% to 96,65%	76,11	67,47% to 83,03%	0,6643
	> -1.220	93,55	79,28% to 96,85%	72,57	63,70% to 79,96%	0,6612
	> -0.8650	87,1	71,15% to 94,87%	78,76	70,34% to 85,29%	0,6586
	> 0.2700	70,97	53,41% to 83,90%	94,69	88,90% to 97,54%	0,6566
	> -1.270	93,55	79,28% to 96,85%	71,68	62,77% to 79,17%	0,6523
	> -0.9150	87,1	71,15% to 94,87%	77,88	69,38% to 84,54%	0,6498
	> 0.2150	70,97	53,41% to 83,90%	93,81	87,76% to 96,97%	0,6478
	> -1.315	93,55	79,28% to 96,85%	70,8	61,84% to 78,39%	0,6433
	> -1.485	96,77	83,81% to 99,83%	67,26	58,16% to 75,22%	0,6403
	> 0.1050	70,97	53,41% to 83,90%	92,92	86,66% to 96,37%	0,6389
	> -0.7750	83,87	67,37% to 92,91%	79,65	71,31% to 86,04%	0,6352
	> -1.355	93,55	79,28% to 96,85%	69,91	60,91% to 77,60%	0,6346
	> -1.555	96,77	83,81% to 99,83%	66,37	57,25% to 74,42%	0,6314
	> -0.1000	70,97	53,41% to 83,90%	92,04	85,55% to 95,75%	0,6301
	> -0.8000	83,87	67,37% to 92,91%	78,76	70,34% to 85,29%	0,6263
	> -1.370	93,55	79,28% to 96,85%	69,03	59,99% to 76,81%	0,6258
	> 0.3150	67,74	50,14% to 81,43%	94,69	88,90% to 97,54%	0,6243
	> -0.2600	70,97	53,41% to 83,90%	91,15	84,47% to 95,12%	0,6212
	> -1.395	93,55	79,28% to 96,85%	68,14	59,08% to 76,01%	0,6169
	> -1.510	96,77	83,81% to 99,83%	64,6	55,44% to 72,81%	0,6137
	> -0.3150	70,97	53,41% to 83,90%	90,27	83,41% to 94,48%	0,6124
	> -0.5050	74,19	56,75% to 86,30%	86,73	79,25% to 91,79%	0,6092
	> -1.420	93,55	79,28% to 96,85%	67,26	58,16% to 75,22%	0,6081
	> -1.660	96,77	83,81% to 99,83%	63,72	54,54% to 72,00%	0,6049
	> -0.3750	70,97	53,41% to 83,90%	89,38	82,35% to 93,82%	0,6033
	> -0.7650	80,65	63,72% to 90,81%	79,65	71,31% to 86,04%	0,603
	> -0.5450	74,19	56,75% to 86,30%	85,84	78,23% to 91,09%	0,6003
	> -1.675	96,77	83,81% to 99,83%	62,83	53,64% to 71,18%	0,596
	> -0.4300	70,97	53,41% to 83,90%	88,5	81,31% to 93,15%	0,5947
	> 0.3400	64,52	46,95% to 78,88%	94,69	88,90% to 97,54%	0,5921
	> -0.5650	74,19	56,75% to 86,30%	84,96	77,22% to 90,39%	0,5913
	> -1.700	96,77	83,81% to 99,83%	61,95	52,74% to 70,37%	0,5872
	> 0.6650	61,29	43,82% to 76,27%	97,35	92,48% to 99,28%	0,5864
	> -0.4550	70,97	53,41% to 83,90%	87,61	80,27% to 92,47%	0,5838
	> -0.5800	74,19	56,75% to 86,30%	84,07	76,22% to 89,68%	0,5826
	> -0.6950	77,42	60,19% to 88,60%	80,53	72,28% to 86,78%	0,5793
	> -1.725	96,77	83,81% to 99,83%	61,06	51,85% to 69,55%	0,5783
	> 0.5900	61,29	43,82% to 76,27%	96,46	91,25% to 98,61%	0,5773
	> -0.4750	70,97	53,41% to 83,90%	86,73	79,25% to 91,79%	0,577
	> -0.5950	74,19	56,75% to 86,30%	83,19	75,23% to 88,96%	0,5738
	> -0.7350	77,42	60,19% to 88,60%	79,65	71,31% to 86,04%	0,5707
	> -1.740	96,77	83,81% to 99,83%	60,18	50,96% to 68,72%	0,5693
	> 0.4900	61,29	43,82% to 76,27%	95,58	90,06% to 98,10%	0,5687
	> -0.6200	74,19	56,75% to 86,30%	82,3	74,24% to 88,24%	0,5649

> 1.005	58,06	40,77% to 73,58%	98,23	93,78% to 99,69%	0,3629
> -1.755	96,77	83,81% to 99,83%	59,29	50,07% to 67,90%	0,3606
> 0.3800	61,29	43,82% to 76,27%	94,69	88,90% to 97,54%	0,3598
> -0.6500	74,19	56,75% to 86,30%	81,42	73,25% to 87,51%	0,3561
> 0.7950	58,06	40,77% to 73,58%	97,35	92,48% to 99,28%	0,3541
> -1.775	96,77	83,81% to 99,83%	58,41	49,19% to 67,07%	0,3518
> -0.6700	74,19	56,75% to 86,30%	80,53	72,26% to 86,78%	0,3472
> -1.810	96,77	83,81% to 99,83%	57,52	48,31% to 66,24%	0,3429
> -1.930	100	88,97% to 100,0%	53,1	43,95% to 62,04%	0,331
> 1.185	54,84	37,77% to 70,84%	98,23	93,78% to 99,69%	0,3307
> -1.840	96,77	83,81% to 99,83%	55,75	46,56% to 64,57%	0,3252
> -1.950	100	88,97% to 100,0%	52,21	43,08% to 61,20%	0,3221
> -1.990	100	88,97% to 100,0%	51,33	42,22% to 60,35%	0,3133
> -1.880	96,77	83,81% to 99,83%	53,98	44,81% to 62,89%	0,3075
> -2.070	100	88,97% to 100,0%	50,44	41,36% to 59,49%	0,3044
> -1.915	96,77	83,81% to 99,83%	53,1	43,95% to 62,04%	0,4987
> -2.135	100	88,97% to 100,0%	49,56	40,51% to 58,64%	0,4956
> -2.165	100	88,97% to 100,0%	48,67	39,65% to 57,78%	0,4867
> -2.185	100	88,97% to 100,0%	47,79	38,80% to 56,92%	0,4779
> -2.195	100	88,97% to 100,0%	46,9	37,96% to 56,05%	0,469
> 1.255	48,39	31,97% to 65,16%	98,23	93,78% to 99,69%	0,4662
> -2.215	100	88,97% to 100,0%	46,02	37,11% to 55,19%	0,4602
> -2.260	100	88,97% to 100,0%	45,13	36,27% to 54,32%	0,4513
> 1.340	45,16	29,16% to 62,23%	98,23	93,78% to 99,69%	0,4339
> -2.300	100	88,97% to 100,0%	43,36	34,59% to 52,57%	0,4336
> -2.320	100	88,97% to 100,0%	42,48	33,76% to 51,69%	0,4248
> -2.345	100	88,97% to 100,0%	41,59	32,93% to 50,81%	0,4159
> -2.395	100	88,97% to 100,0%	40,71	32,10% to 49,93%	0,4071
> 1.495	41,94	26,42% to 59,23%	98,23	93,78% to 99,69%	0,4017
> -2.465	100	88,97% to 100,0%	39,82	31,28% to 49,04%	0,3982
> -2.515	100	88,97% to 100,0%	38,94	30,45% to 48,15%	0,3894
> -2.560	100	88,97% to 100,0%	38,05	29,63% to 47,26%	0,3805
> 1.625	38,71	23,73% to 56,18%	98,23	93,78% to 99,69%	0,3694
> -2.595	100	88,97% to 100,0%	36,28	28,00% to 45,46%	0,3628
> -2.605	100	88,97% to 100,0%	34,51	26,39% to 43,66%	0,3451
> 1.780	35,48	21,12% to 53,05%	98,23	93,78% to 99,69%	0,3371
> -2.625	100	88,97% to 100,0%	32,74	24,78% to 41,84%	0,3274
> -2.705	100	88,97% to 100,0%	31,86	23,99% to 40,92%	0,3186
> 1.925	32,26	18,57% to 49,86%	99,12	95,16% to 99,95%	0,3138
> -2.775	100	88,97% to 100,0%	30,97	23,19% to 40,01%	0,3097
> -2.790	100	88,97% to 100,0%	29,2	21,61% to 38,16%	0,292
> 1.950	29,03	16,10% to 46,59%	99,12	95,16% to 99,95%	0,2815
> -2.805	100	88,97% to 100,0%	27,43	20,05% to 36,30%	0,2743
> -2.815	100	88,97% to 100,0%	26,55	19,28% to 35,36%	0,2655
> -2.830	100	88,97% to 100,0%	25,66	18,50% to 34,42%	0,2566
> 2.020	25,81	13,70% to 43,25%	99,12	95,16% to 99,95%	0,2493
> -2.845	100	88,97% to 100,0%	24,78	17,74% to 33,48%	0,2478
> -2.865	100	88,97% to 100,0%	23,89	16,97% to 32,53%	0,2389
> -2.920	100	88,97% to 100,0%	23,01	16,21% to 31,58%	0,2301
> 2.435	22,58	11,40% to 39,81%	100	96,71% to 100,0%	0,2258

> -2.975	100	88,97% to 100,0%	22,12	15,46% to 30,62%	0,2212
> 2.110	22,58	11,40% to 39,81%	99,12	95,16% to 99,96%	0,217
> -3.000	100	88,97% to 100,0%	20,35	13,96% to 28,69%	0,2035
> -3.020	100	88,97% to 100,0%	19,47	13,22% to 27,72%	0,1947
> 2.845	19,35	9,187% to 36,28%	100	96,71% to 100,0%	0,1935
> -3.045	100	88,97% to 100,0%	18,58	12,49% to 26,75%	0,1858
> -3.075	100	88,97% to 100,0%	17,7	11,76% to 25,76%	0,177
> -3.095	100	88,97% to 100,0%	16,81	11,04% to 24,77%	0,1681
> 3.095	16,13	7,093% to 32,63%	100	96,71% to 100,0%	0,1613
> -3.110	100	88,97% to 100,0%	15,93	10,32% to 23,78%	0,1593
> -3.125	100	88,97% to 100,0%	15,04	9,610% to 22,78%	0,1504
> -3.135	100	88,97% to 100,0%	14,16	8,907% to 21,77%	0,1416
> -3.170	100	88,97% to 100,0%	13,27	8,212% to 20,75%	0,1327
> 3.380	12,9	5,134% to 28,85%	100	96,71% to 100,0%	0,129
> -3.210	100	88,97% to 100,0%	12,39	7,525% to 19,73%	0,1239
> -3.225	100	88,97% to 100,0%	11,5	6,848% to 18,69%	0,115
> -3.245	100	88,97% to 100,0%	10,62	6,180% to 17,65%	0,1062
> -3.270	100	88,97% to 100,0%	9,735	5,523% to 16,59%	0,09735
> 4.005	9,677	3,346% to 24,90%	100	96,71% to 100,0%	0,09677
> -3.290	100	88,97% to 100,0%	8,85	4,878% to 15,53%	0,0885
> -3.330	100	88,97% to 100,0%	7,965	4,247% to 14,45%	0,07965
> -3.370	100	88,97% to 100,0%	7,08	3,631% to 13,35%	0,0708
> 4.970	6,452	1,146% to 20,72%	100	96,71% to 100,0%	0,06452
> -3.385	100	88,97% to 100,0%	6,195	3,033% to 12,24%	0,06195
> -3.430	100	88,97% to 100,0%	5,31	2,456% to 11,10%	0,0531
> -3.485	100	88,97% to 100,0%	4,425	1,905% to 9,942%	0,04425
> -3.515	100	88,97% to 100,0%	3,54	1,365% to 8,750%	0,0354
> 6.320	3,226	0,1655% to 16,19%	100	96,71% to 100,0%	0,03226
> -3.585	100	88,97% to 100,0%	2,655	0,7236% to 7,516%	0,02655
> -3.720	100	88,97% to 100,0%	1,77	0,3145% to 6,224%	0,0177
> -3.810	100	88,97% to 100,0%	0,885	0,04539% to 4,843%	0,00885

C

miR-155

cut-off	Sensitivity%	95% CI	Specificity%	95% CI	Youden
> -0.4000	93,75	79,85% to 98,89%	70,8	61,84% to 78,39%	0,6433
> -0.3250	90,63	75,78% to 96,76%	73,45	64,64% to 80,72%	0,6408
> -0.4250	93,75	79,85% to 98,89%	69,91	60,91% to 77,60%	0,6366
> -0.1700	87,5	71,93% to 95,03%	76,11	67,47% to 83,03%	0,6361
> -0.3600	90,63	75,78% to 96,76%	72,57	63,70% to 79,95%	0,632
> 0.8100	71,88	54,63% to 84,44%	91,15	84,47% to 95,12%	0,6303
> -0.4600	93,75	79,85% to 98,89%	69,03	59,99% to 76,81%	0,6278
> -0.2300	87,5	71,93% to 95,03%	75,22	66,52% to 82,26%	0,6272
> -0.3750	90,63	75,78% to 96,76%	71,68	62,77% to 79,17%	0,6231
> -0.05500	84,38	68,25% to 93,14%	77,88	69,38% to 84,54%	0,6226
> 0.7750	71,88	54,63% to 84,44%	90,27	83,41% to 94,48%	0,6215
> -0.4850	93,75	79,85% to 98,89%	68,14	59,08% to 76,01%	0,6189
> -0.2700	87,5	71,93% to 95,03%	74,34	65,58% to 81,50%	0,6184
> -0.3850	90,63	75,78% to 96,76%	70,8	61,84% to 78,39%	0,6143
> -0.09000	84,38	68,25% to 93,14%	76,99	68,42% to 83,79%	0,6137
> 0.7300	71,88	54,63% to 84,44%	89,38	82,35% to 93,82%	0,6126
> -0.2950	87,5	71,93% to 95,03%	73,45	64,64% to 80,72%	0,6095
> 0.2100	81,25	64,69% to 91,11%	79,65	71,31% to 86,04%	0,609
> -0.1200	84,38	68,25% to 93,14%	76,11	67,47% to 83,03%	0,6049
> 0.7050	71,88	54,63% to 84,44%	88,5	81,31% to 93,15%	0,6038
> 0.1850	81,25	64,69% to 91,11%	78,76	70,34% to 85,29%	0,6001
> 0.8250	68,75	51,43% to 82,05%	91,15	84,47% to 95,12%	0,599
> 0.6650	71,88	54,63% to 84,44%	87,61	80,27% to 92,47%	0,5949
> 0.07000	81,25	64,69% to 91,11%	77,88	69,38% to 84,54%	0,5913
> 0.4150	75	57,89% to 86,75%	84,07	76,22% to 89,68%	0,5907
> 0.2550	78,13	61,25% to 88,98%	80,53	72,28% to 86,78%	0,5866
> 0.6050	71,88	54,63% to 84,44%	86,73	79,25% to 91,79%	0,5861
> -0.5400	93,75	79,85% to 98,89%	64,6	55,44% to 72,81%	0,5833
> 0.3750	75	57,89% to 86,75%	83,19	75,23% to 88,96%	0,5819
> 0.2350	78,13	61,25% to 88,98%	79,65	71,31% to 86,04%	0,5778
> 0.5400	71,88	54,63% to 84,44%	85,84	78,23% to 91,09%	0,5772
> 0.9150	65,63	48,31% to 79,59%	92,04	85,55% to 95,75%	0,5767
> -0.6200	93,75	79,85% to 98,89%	63,72	54,54% to 72,00%	0,5747
> 0.3650	75	57,89% to 86,75%	82,3	74,24% to 88,24%	0,573
> 0.4950	71,88	54,63% to 84,44%	84,96	77,22% to 90,39%	0,5684
> 0.8700	65,63	48,31% to 79,59%	91,15	84,47% to 95,12%	0,5678
> -0.6550	93,75	79,85% to 98,89%	62,83	53,64% to 71,18%	0,5638
> 0.3400	75	57,89% to 86,75%	81,42	73,25% to 87,51%	0,5642
> 0.4700	71,88	54,63% to 84,44%	84,07	76,22% to 89,68%	0,5595
> 0.2950	75	57,89% to 86,75%	80,53	72,28% to 86,78%	0,5553
> -0.6650	93,75	79,85% to 98,89%	61,06	51,85% to 69,55%	0,5481
> 0.9300	62,5	45,25% to 77,07%	92,04	85,55% to 95,75%	0,5434
> -0.6900	93,75	79,85% to 98,89%	60,18	50,96% to 68,72%	0,5393
> 1.845	56,25	39,33% to 71,83%	97,35	92,48% to 99,28%	0,536
> 1.345	59,38	42,26% to 74,48%	93,81	87,76% to 96,97%	0,5319
> -0.7150	93,75	79,85% to 98,89%	59,29	50,07% to 67,90%	0,5304
> 1.785	56,25	39,33% to 71,83%	96,46	91,25% to 98,61%	0,5271
> 1.045	59,38	42,26% to 74,48%	92,92	86,65% to 96,37%	0,523
> -0.7250	93,75	79,85% to 98,89%	58,41	49,19% to 67,07%	0,5216

> 1.740	56,25	39,33% to 71,83%	95,58	90,06% to 98,10%	0,3183
> 0.9900	59,38	42,26% to 74,48%	92,04	85,55% to 95,75%	0,3142
> 1.995	53,13	36,45% to 69,13%	98,23	93,78% to 99,69%	0,3136
> -0.7650	93,75	79,85% to 98,89%	57,52	48,31% to 66,24%	0,3127
> 1.680	56,25	39,33% to 71,83%	94,69	88,90% to 97,54%	0,3094
> 1.920	53,13	36,45% to 69,13%	97,35	92,48% to 99,28%	0,3048
> -0.8500	93,75	79,85% to 98,89%	56,64	47,43% to 65,41%	0,3039
> 1.645	56,25	39,33% to 71,83%	93,81	87,76% to 96,97%	0,3006
> -0.9150	93,75	79,85% to 98,89%	55,75	46,56% to 64,57%	0,495
> 2.085	50	33,63% to 66,37%	98,23	93,78% to 99,69%	0,4823
> -0.9400	93,75	79,85% to 98,89%	53,98	44,81% to 62,89%	0,4773
> -0.9600	93,75	79,85% to 98,89%	53,1	43,95% to 62,04%	0,4685
> -0.9900	93,75	79,85% to 98,89%	52,21	43,08% to 61,20%	0,4596
> 2.135	46,88	30,87% to 63,55%	98,23	93,78% to 99,69%	0,4511
> -1.035	93,75	79,85% to 98,89%	51,33	42,22% to 60,35%	0,4508
> -1.070	93,75	79,85% to 98,89%	50,44	41,36% to 59,49%	0,4419
> -1.085	93,75	79,85% to 98,89%	48,67	39,65% to 57,78%	0,4242
> -1.095	93,75	79,85% to 98,89%	47,79	38,80% to 56,92%	0,4154
> -1.110	93,75	79,85% to 98,89%	46,9	37,96% to 56,05%	0,4065
> -1.145	93,75	79,85% to 98,89%	46,02	37,11% to 55,19%	0,3977
> 2.155	40,63	25,52% to 57,74%	98,23	93,78% to 99,69%	0,3886
> -1.180	93,75	79,85% to 98,89%	44,25	35,43% to 53,44%	0,38
> -1.200	93,75	79,85% to 98,89%	43,36	34,59% to 52,57%	0,3711
> 2.245	37,5	22,93% to 54,75%	98,23	93,78% to 99,69%	0,3573
> -1.215	93,75	79,85% to 98,89%	41,59	32,93% to 50,81%	0,3534
> -1.225	93,75	79,85% to 98,89%	40,71	32,10% to 49,93%	0,3446
> -1.240	93,75	79,85% to 98,89%	39,82	31,28% to 49,04%	0,3357
> 2.390	34,38	20,41% to 51,69%	98,23	93,78% to 99,69%	0,3261
> 2.720	31,25	17,95% to 48,57%	100	96,71% to 100,0%	0,3125
> 2.610	31,25	17,95% to 48,57%	99,12	95,16% to 99,95%	0,3037
> -1.260	93,75	79,85% to 98,89%	36,28	28,00% to 45,46%	0,3003
> 2.495	31,25	17,95% to 48,57%	98,23	93,78% to 99,69%	0,2948
> -1.280	93,75	79,85% to 98,89%	34,51	26,39% to 43,66%	0,2826
> 2.760	28,13	15,56% to 45,37%	100	96,71% to 100,0%	0,2813
> -1.295	93,75	79,85% to 98,89%	33,63	25,58% to 42,75%	0,2738
> -1.325	93,75	79,85% to 98,89%	32,74	24,78% to 41,84%	0,2649
> -1.380	93,75	79,85% to 98,89%	31,86	23,99% to 40,92%	0,2561
> 2.775	25	13,25% to 42,11%	100	96,71% to 100,0%	0,25
> -1.430	93,75	79,85% to 98,89%	30,97	23,19% to 40,01%	0,2472
> -1.470	93,75	79,85% to 98,89%	30,09	22,40% to 39,09%	0,2384
> -1.495	93,75	79,85% to 98,89%	29,2	21,61% to 38,16%	0,2295
> -1.575	93,75	79,85% to 98,89%	28,32	20,83% to 37,23%	0,2207
> 2.795	21,88	11,02% to 38,75%	100	96,71% to 100,0%	0,2188
> -1.955	100	89,28% to 100,0%	20,35	13,96% to 28,69%	0,2035
> -1.685	93,75	79,85% to 98,89%	26,55	19,28% to 35,36%	0,203
> -1.875	96,88	84,26% to 99,84%	23,01	16,21% to 31,58%	0,1989
> -1.965	100	89,28% to 100,0%	19,47	13,22% to 27,72%	0,1947
> -1.725	93,75	79,85% to 98,89%	25,66	18,50% to 34,42%	0,1941
> -1.910	96,88	84,26% to 99,84%	22,12	15,46% to 30,62%	0,19
> 2.975	18,75	8,890% to 35,31%	100	96,71% to 100,0%	0,1875

> -1.975	100	89,28% to 100,0%	18,58	12,49% to 26,75%	0,1838
> -1.750	93,75	79,85% to 98,89%	24,78	17,74% to 33,48%	0,1833
> -1.935	96,88	84,26% to 99,84%	21,24	14,71% to 29,66%	0,1812
> -1.945	96,88	84,26% to 99,84%	20,35	13,96% to 28,69%	0,1723
> -1.990	100	89,28% to 100,0%	16,81	11,04% to 24,77%	0,1681
> -1.815	93,75	79,85% to 98,89%	23,01	16,21% to 31,58%	0,1676
> 3.300	15,63	6,864% to 31,75%	100	96,71% to 100,0%	0,1563
> -2.005	100	89,28% to 100,0%	15,04	9,610% to 22,78%	0,1504
> -2.020	100	89,28% to 100,0%	14,16	8,907% to 21,77%	0,1416
> -2.050	100	89,28% to 100,0%	13,27	8,212% to 20,75%	0,1327
> 3.855	12,5	4,970% to 28,07%	100	96,71% to 100,0%	0,125
> -2.105	100	89,28% to 100,0%	12,39	7,525% to 19,73%	0,1239
> -2.145	100	89,28% to 100,0%	10,62	6,180% to 17,65%	0,1062
> -2.185	100	89,28% to 100,0%	9,735	5,523% to 16,59%	0,09735
> 4.265	9,375	3,240% to 24,22%	100	96,71% to 100,0%	0,09375
> -2.230	100	89,28% to 100,0%	8,85	4,878% to 15,53%	0,0885
> -2.245	100	89,28% to 100,0%	7,965	4,247% to 14,45%	0,07965
> -2.285	100	89,28% to 100,0%	7,08	3,631% to 13,35%	0,0708
> 4.490	6,25	1,111% to 20,15%	100	96,71% to 100,0%	0,0625
> -2.350	100	89,28% to 100,0%	6,195	3,033% to 12,24%	0,06195
> -2.395	100	89,28% to 100,0%	5,31	2,456% to 11,10%	0,0531
> -2.425	100	89,28% to 100,0%	4,425	1,905% to 9,942%	0,04425
> -2.470	100	89,28% to 100,0%	3,54	1,385% to 8,750%	0,0354
> 5.060	3,125	0,1603% to 15,74%	100	96,71% to 100,0%	0,03125
> -2.595	100	89,28% to 100,0%	2,655	0,7236% to 7,516%	0,02655
> -2.765	100	89,28% to 100,0%	1,77	0,3145% to 6,224%	0,0177
> -2.860	100	89,28% to 100,0%	0,885	0,04539% to 4,843%	0,00885

D

miR-200a

cut-off	Sensitivity%	95% CI	Specificity%	95% CI	Youden
< 2.855	46,88	30,87% to 63,55%	80,53	72,28% to 86,78%	0,2741
< 2.715	43,75	28,17% to 60,67%	83,19	75,23% to 88,96%	0,2694
< 2.880	46,88	30,87% to 63,55%	79,65	71,31% to 86,04%	0,2653
< 2.735	43,75	28,17% to 60,67%	82,3	74,24% to 88,24%	0,2605
< 2.920	46,88	30,87% to 63,55%	78,76	70,34% to 85,29%	0,2564
< 2.770	43,75	28,17% to 60,67%	81,42	73,25% to 87,51%	0,2517
< 2.950	46,88	30,87% to 63,55%	77,88	69,38% to 84,54%	0,2476
< 2.825	43,75	28,17% to 60,67%	80,53	72,28% to 86,78%	0,2428
< 2.565	37,5	22,93% to 54,75%	86,73	79,25% to 91,79%	0,2423
< 2.970	46,88	30,87% to 63,55%	76,99	68,42% to 83,79%	0,2387
< 2.680	40,63	25,52% to 57,74%	83,19	75,23% to 88,96%	0,2382
< 2.580	37,5	22,93% to 54,75%	85,84	78,23% to 91,09%	0,2334
< 2.990	46,88	30,87% to 63,55%	76,11	67,47% to 83,03%	0,2299
< 3.045	50	33,63% to 66,37%	72,57	63,70% to 79,95%	0,2257
< 2.625	37,5	22,93% to 54,75%	84,96	77,22% to 90,39%	0,2246
< 3.005	46,88	30,87% to 63,55%	75,22	66,52% to 82,26%	0,221
< 2.545	34,38	20,41% to 51,69%	87,61	80,27% to 92,47%	0,2199
< 3.055	50	33,63% to 66,37%	71,68	62,77% to 79,17%	0,2168
< 3.120	53,13	36,45% to 69,13%	68,14	59,08% to 76,01%	0,2127
< 3.025	46,88	30,87% to 63,55%	74,34	65,58% to 81,50%	0,2122
< 2.555	34,38	20,41% to 51,69%	86,73	79,25% to 91,79%	0,2111
< 3.065	50	33,63% to 66,37%	70,8	61,84% to 78,39%	0,208
< 3.135	53,13	36,45% to 69,13%	67,26	58,16% to 75,22%	0,2039
< 3.080	50	33,63% to 66,37%	69,91	60,91% to 77,60%	0,1991
< 2.485	31,25	17,95% to 48,57%	88,5	81,31% to 93,15%	0,1975
< 3.145	53,13	36,45% to 69,13%	66,37	57,25% to 74,42%	0,195
< 3.100	50	33,63% to 66,37%	69,03	59,99% to 76,81%	0,1903
< 2.520	31,25	17,95% to 48,57%	87,61	80,27% to 92,47%	0,1886
< 3.160	53,13	36,45% to 69,13%	64,6	55,44% to 72,81%	0,1773
< 2.195	25	13,25% to 42,11%	92,04	85,55% to 95,75%	0,1704
< 3.180	53,13	36,45% to 69,13%	63,72	54,54% to 72,00%	0,1685
< 2.455	28,13	15,56% to 45,37%	88,5	81,31% to 93,15%	0,1663
< 2.245	25	13,25% to 42,11%	91,15	84,47% to 95,12%	0,1615
< 3.195	53,13	36,45% to 69,13%	62,83	53,64% to 71,18%	0,1596
< 2.125	21,88	11,02% to 38,75%	93,81	87,76% to 96,97%	0,1569
< 2.305	25	13,25% to 42,11%	90,27	83,41% to 94,48%	0,1527
< 3.205	53,13	36,45% to 69,13%	61,95	52,74% to 70,37%	0,1508
< 2.160	21,88	11,02% to 38,75%	92,92	86,65% to 96,37%	0,148
< 3.415	68,75	51,43% to 82,05%	46,02	37,11% to 55,19%	0,1477
< 3.355	62,5	45,25% to 77,07%	52,21	43,08% to 61,20%	0,1471
< 2.350	25	13,25% to 42,11%	89,38	82,35% to 93,82%	0,1438
< 3.215	53,13	36,45% to 69,13%	61,06	51,85% to 69,55%	0,1419
< 2.175	21,88	11,02% to 38,75%	92,04	85,55% to 95,75%	0,1392
< 3.430	68,75	51,43% to 82,05%	45,13	36,27% to 54,32%	0,1388
< 1.375	15,63	6,864% to 31,75%	98,23	93,78% to 99,69%	0,1386
< 3.365	62,5	45,25% to 77,07%	51,33	42,22% to 60,35%	0,1383
< 3.255	56,25	39,33% to 71,83%	57,52	48,31% to 66,24%	0,1377
< 2.405	25	13,25% to 42,11%	88,5	81,31% to 93,15%	0,135
< 1.930	18,75	8,890% to 35,31%	94,69	88,90% to 97,54%	0,1344

< 4.045	87,5	71,93% to 95,03%	11,5	6,848% to 18,69%	-0,01
< 3.785	75	57,89% to 86,75%	23,89	16,97% to 32,53%	-0,0111
< 4.555	96,88	84,26% to 99,84%	1,77	0,3145% to 6,224%	-0,0133
< 4.150	90,63	75,78% to 96,76%	7,965	4,247% to 14,45%	-0,01403
< 3.915	84,38	68,25% to 93,14%	14,16	8,907% to 21,77%	-0,0146
< 3.845	81,25	64,69% to 91,11%	16,81	11,04% to 24,77%	-0,0194
< 3.795	75	57,89% to 86,75%	23,01	16,21% to 31,58%	-0,0199
< 4.770	96,88	84,26% to 99,84%	0,885	0,04539% to 4,843%	-0,02233
< 4.200	90,63	75,78% to 96,76%	7,08	3,631% to 13,35%	-0,0229
< 3.805	78,13	61,25% to 88,98%	19,47	13,22% to 27,72%	-0,024
< 3.745	71,88	54,63% to 84,44%	25,66	18,50% to 34,42%	-0,0246
< 4.345	93,75	79,85% to 98,89%	3,54	1,385% to 6,750%	-0,0271
< 3.865	81,25	64,69% to 91,11%	15,93	10,32% to 23,78%	-0,0282
< 5.310	96,88	84,26% to 99,84%	0	0,000% to 3,288%	-0,0312
< 4.415	93,75	79,85% to 98,89%	2,655	0,7236% to 7,516%	-0,03393
< 3.765	71,88	54,63% to 84,44%	23,89	16,97% to 32,53%	-0,0423
< 4.500	93,75	79,85% to 98,89%	1,77	0,3145% to 6,224%	-0,0448

Abb.35: Basierend auf den ROC-Kurven und unter Anwendung des Youden-Index konnten cut-off-Werte für miR-138-5p (<-1.185) (A), miR-146b-5p (> -1.050) (B), miR-155-5p (> -0.040) (C) und miR-200a-3p (< 2.855) (D) definiert werden.

14.3 Funktionelle Assays:

14.3.1 Proliferation: BrdU, RTCA Säulendiagramm

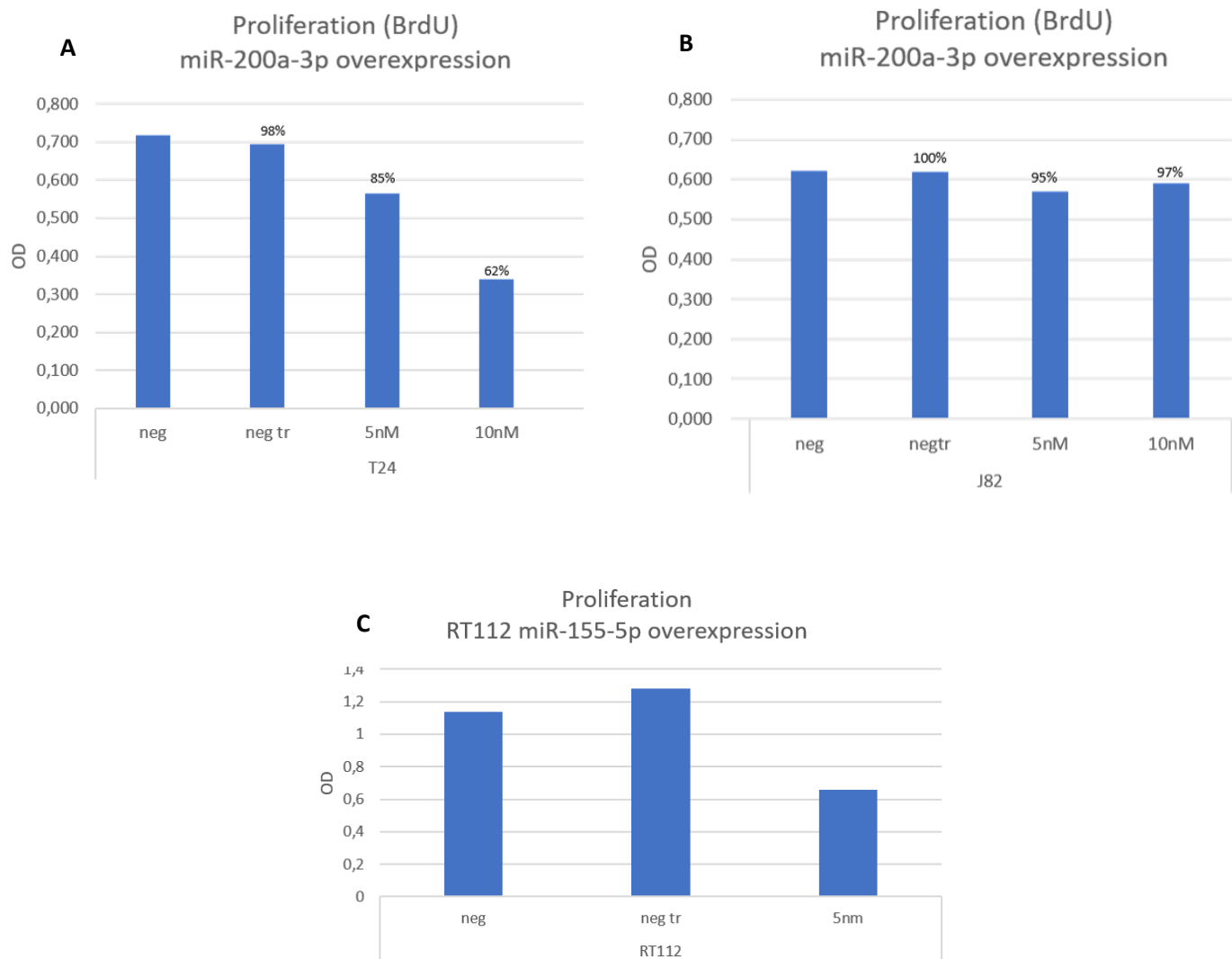


Abb.36: Proliferationsverhalten der Zelllinien T24 (A), J82 (B), RT112 (C) im unbehandelten Zustand (neg), nach Behandlung mit Transfektionsreagenz (negtrans) und nach transienter Transfektion von miR-200a-3p (A,B) bzw miR-155-5p (C) mimic.

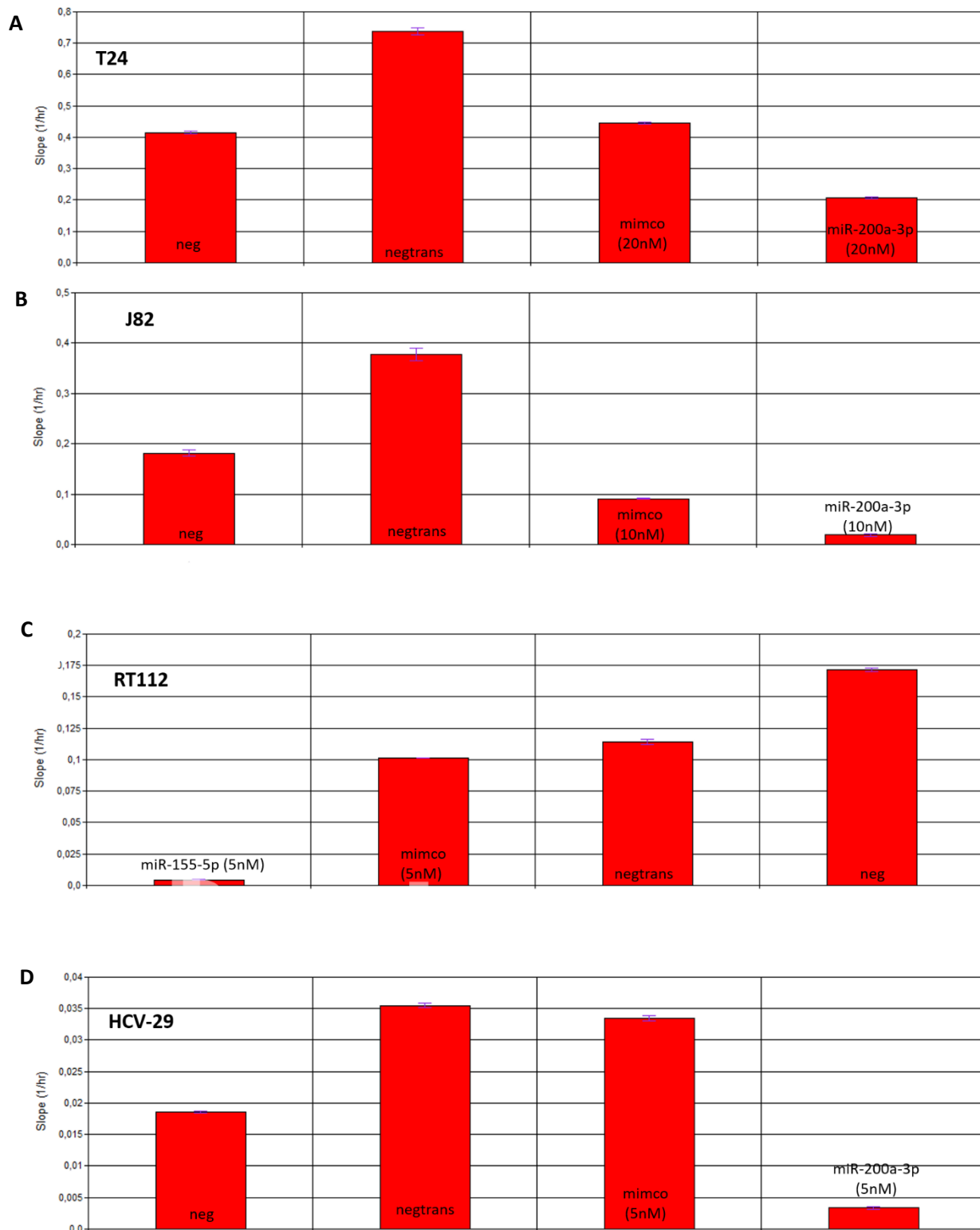


Abb.37: RTCA xCelligence System: Proliferationsverhalten der Zelllinien T24 (A), J82 (B), RT112 (C) und HCV-29 (D) im unbehandelten Zustand (neg), nach Behandlung mit Transfektionsreagenz (negtrans), nach Behandlung mit Transfektionsreagenz und Kontrollmimic (mimco) und nach transienter Transfektion von miR-200a-3p mimic oder miR-155-5p mimic. Die Graphen zeigen einen Zeitraum von 72h.

14.3.2 Migration Transwell Assay

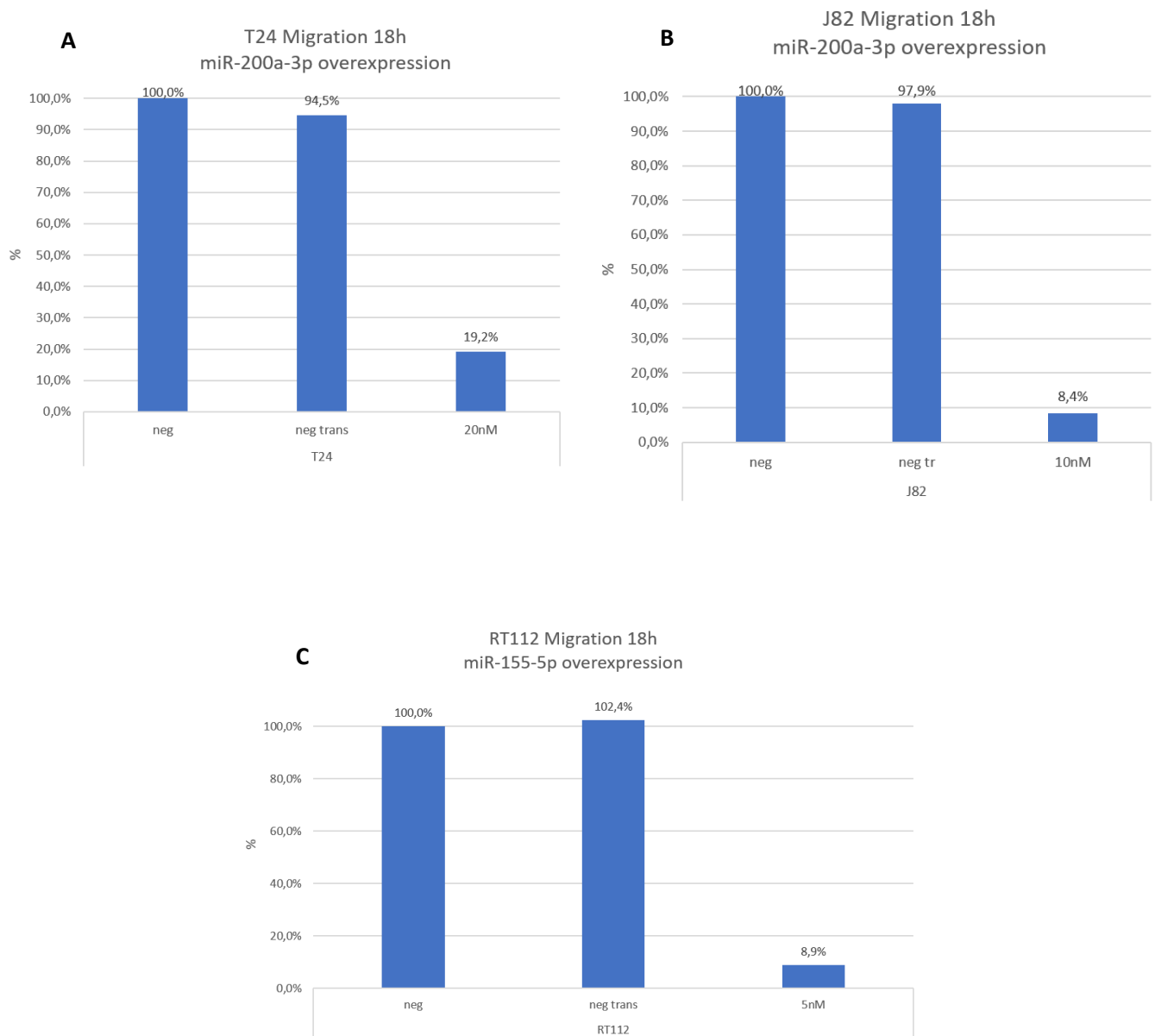


Abb.38: Migrationsverhalten der Zelllinien T24 (A), J82 (B), RT112 (C) im unbehandelten Zustand (neg), nach Behandlung mit Transfektionsreagenz (negtrans) und nach transienter Transfektion von miR-200a-3p (A,B) bzw miR-155-5p (C) mimic.

14.4 Bioinformatische Tests

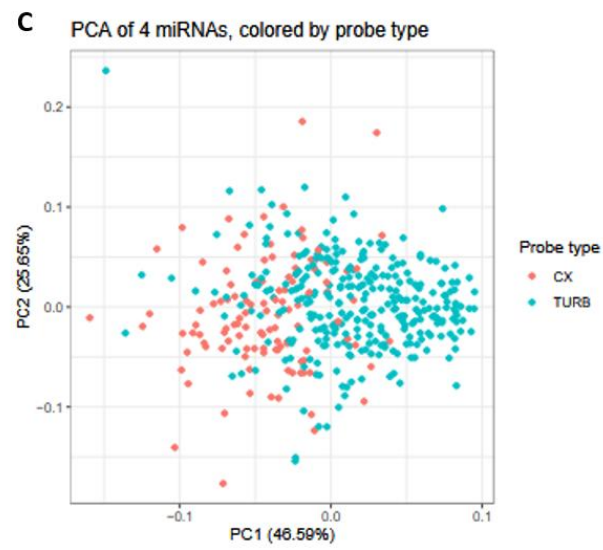


Abb.39: Principle component analysis (PCA) der vier miRNAs nach Gruppen Zystektomie (CX, rot) und TUR-B (blau).

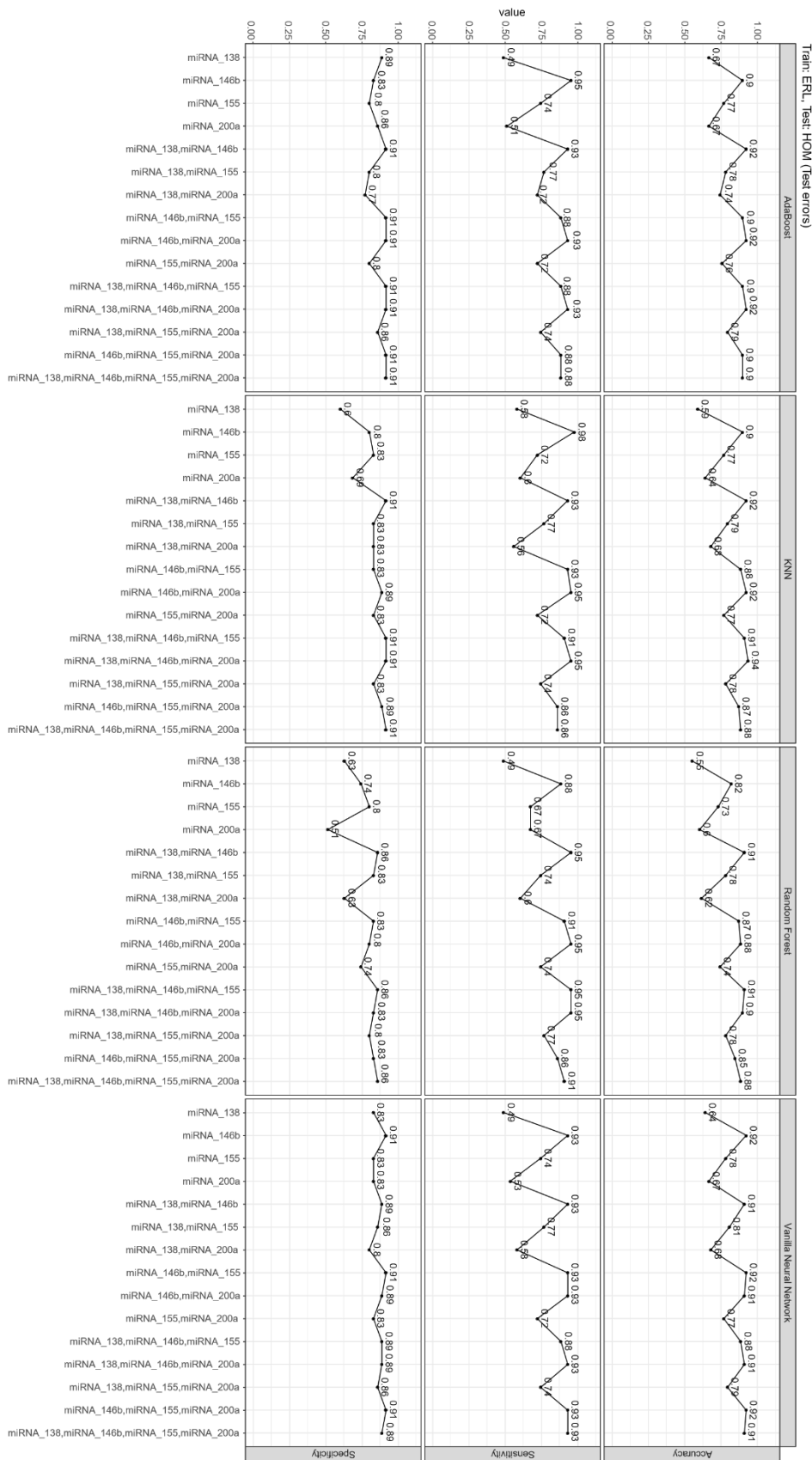


Abb.40: Anhand der vier KI Modelle AdaBoost, KNN, Random Forest und Vanilla Neural Network wurden zur Differenzierung der pTa Ig vs. MIBC Werte für Accuracy, Sensitivität und Spezifität der miRNAs einzeln, und der miRNAs in verschiedenen Kombinationen erhoben, hier ohne Zystektomiedaten.

15. Danksagung

„Ich habe gelernt, dass der Weg des Fortschritts weder kurz noch unbeschwerlich ist.“ – Marie Curie

Mein besonderer Dank gilt dem Laborteam der Klinik für Urologie und Kinderurologie, sowie dem Laborteam der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde für die umfangreiche und tatkräftigen wissenschaftlichen, technischen und mentalen Unterstützung. Besonders hervorzuheben sind dabei Dr. rer. nat. Angela Zacchanino, Maria Link, Nina Wolff und Silke Süß, Dr. rer. nat. Sandrina Körner, Dr. rer. nat. Katharina Sorg, Dres. Maximilian und Johannes Linxweiler, Prof. Julia Heinzelbecker, Prof. Friedrich Grässer, sowie die Doktormutter Prof. Kerstin Junker.

Der größte Dank gilt meiner Familie, vor allem meiner Mutter Marlies und meiner Godi Klaudia, meinen Freunden, besonders Saskia - *Sassel* - Reintgen, sowie meinen Arbeitskolleginnen Miriam da Silva Gouveia, Maxi Schuldner und Alice Lipinski, die mich auf meinem Weg begleitet, unterstützt, beraten und mental gecoacht haben.

Und natürlich Maui♥

16. Lebenslauf

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

Tag der Promotion: 18.06.2026

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. dent. M. Hannig

Berichterstatter: Prof. Dr. Kerstin Junker

Prof. Dr. Sigrun Smola