

• **Dr. med. Anna Katharina Seitz**

Fördernummer: SeA1/FE-13

Heimatklinik: Urologische Klinik und Poliklinik, Klinikum rechts der Isar, TU München

Gastlabor: Department of Molecular Medicine, Aarhus University Hospital Skejby, DK

Betreuer: Prof. Torben Falck Ørntoft, MD

Projekt: „Charakterisierung von Long non-coding RNAs (lncRNAs) als Biomarker und deren funktionale Bedeutung in der Entstehung und Progression des Urothelkarzinoms der Harnblase“

Projektbeschreibung (Zusammenfassung):

Durch den Einsatz von Hochdurchsatz-Sequenzierungstechnologien (Next generation sequencing technology, NGS) sind sogenannte lange nicht-codierende RNAs (lncRNAs) in den Fokus der molekularbiologischen Forschung gerückt. Obwohl über die funktionelle Bedeutung dieser Moleküle zum jetzigen Zeitpunkt noch wenig bekannt ist, konnten lncRNA bereits eine tragende Rolle in der Aufrechterhaltung des zellulären Equilibriums zugesprochen werden. So sind sie beispielsweise maßgeblich an der Regulation der Genexpression auf transkriptionaler, post-transkriptionaler und epigenetischer Ebene beteiligt. Jüngste Studien konnten darüber hinaus sowohl eine gewebe- als auch progressionspezifische Dysregulation der lncRNA-Expression in verschiedenen Malignomen nachweisen und damit Rückschlüsse auf den Krankheitsverlauf der Patienten ziehen. Diese Erkenntnis qualifiziert lncRNAs als potentielle Biomarker zur Diagnose- und Prognosestellung. Die hohe Rezidiv- und Progressionsrate der nicht-muskelinvasiven Blasen Tumore einerseits sowie die Progredienz der muskelinvasiven Urothelkarzinome der Harnblase andererseits lassen der Identifikation prädiktiver und prognostischer Biomarker eine besondere Bedeutung zukommen. Hierbei ist insbesondere eine frühzeitige Unterscheidung in aggressive und nicht aggressive Subgruppen des Harnblasenkarzinoms nicht nur hinsichtlich des patientenindividuellen Krankheitsverlaufes, sondern auch des Therapieansprechens von Bedeutung. Die bislang in der klinischen Routine eingesetzten klinisch-pathologischen Parameter konnten dieser Anforderung jedoch nur ungenügend gerecht werden und sich daher nicht als valide Biomarker etablieren.

Ziel des beantragten Projekts soll daher die Identifizierung von Schlüssel-lncRNAs sein, die maßgeblich an der Entstehung und Progression des nicht-muskelinvasiven als auch muskelinvasiven Urothelkarzinoms der Harnblase beteiligt sind. Anschließend soll deren Eignung als Biomarker evaluiert werden. Damit soll die Basis für die Entwicklung von Testverfahren geschaffen werden, die im klinischen Alltag als einfaches Werkzeug zur Prognosestellung sowie zur Entwicklung individualisierter Therapiekonzepte eingesetzt werden können.

Methodisch werden primär Gesamt-Transkriptom-Shotgun-Sequenzierungen (RNA-seq) für die Identifikation der Expressionsmuster von lncRNAs zur Anwendung kommen. Nach Annotation der lnc-RNA-Sequenzen und deren statistischer Auswertung sollen mögliche relevante lnc-RNA-Kandidaten mittels real-time-PCR sowie in situ-Hybridisierung weiter validiert werden. Hierzu werden die lncRNA-Expressionsmuster in normalem Gewebe und Tumorgewebe der Harnblase miteinander verglichen, um tumorspezifische Änderungen der lnc-Expressionsmuster aufzudecken. Während das Gewebematerial nicht-muskelinvasiver

Tumoren aus transurethralen Resektionen der Harnblase stammt, wird Gewebematerial muskelinvasiver Tumoren aus Zystektomiepräparaten gewonnen. In einem nächsten Schritt soll im Rahmen von Funktionsanalysen in etablierten Blasenkarzinomzelllinien die Bedeutung von lncRNAs im pathophysiologischen Kontext charakterisiert werden. Hierzu wird ein erst kürzlich entwickeltes und durch das gastgebende Labor weiter modifiziertes pINDUCERVektor-System zum Einsatz kommen, mit dessen Hilfe selektiv Einfluss auf die lncRNA-Expressionslevel in Blasenkarzinomzelllinien genommen werden kann. Mit diesem Vektorsystem kann sowohl eine induzierbare Expression einer lncRNA („gain-of-function“-Analysen) als auch eine Inhibition von lncRNAs durch RNA-Interferenz (siRNAs) mit kurzen RNAMolekülen („loss-of-function“-Analysen) vermittelt werden. Die daraus resultierenden phänotypischen Änderungen werden mit Hilfe der Standardverfahren zur Messung von Zellviabilität, -migration und -invasion weiter untersucht.

Der Kooperationspartner, das Institut für molekulare Medizin (MOMA) der Universität Aarhus, verfügt über eine Blasenkarzinombiobank mit Urin-, Blut- und Gewebeproben von mehr als 3000 Patienten sowie ein eigenes Kompetenzzentrum für Next Generation Sequencing. Komplettiert wird dies durch eine Datenbank mit Informationen über Patientennachsoorgedaten, Behandlungsregimen und kompletten pathologischen Aufarbeitungen. Darüber hinaus besteht zwischen der Urologischen Klinik der Technischen Universität München und dem MOMA seit Jahren eine erfolgreiche Kooperation, z.B. im Rahmen der multizentrischen prospektiven UROMOL-Studie (Projektnummer: FP7-201663).

Durch weiterführende molekularbiologische Untersuchungen am Urologischen Forschungslabor der Technischen Universität München ist die Nachhaltigkeit des Projektes auch nach Ablauf des Stipendiums garantiert. Während das geplante Forschungsprojekt im gastgebenden Labor sowohl auf nicht-muskelinvasive als auch muskelinvasive Blasentumore ausgelegt ist, soll der Fokus weiterer Anschlussprojekte im Heimatlabor auf den muskelinvasiven Urothelkarzinomen der Harnblase liegen. Ein Folgeprojekt stellt die in-vivo Charakterisierung potentieller lncRNA-Kandidaten an einem Chorion-Allantois-Membran (CAM) - Modell an unbehandelten Hühnerembryonen dar.