

Alice Blandino  
Dr. sc. hum.

## **Identification and validation of circulating small non-coding RNAs associated with gallbladder cancer risk**

Fach/Einrichtung: Medizinische Biometrie  
Doktorvater: Prof. Dr. Justo Lorenzo Bermejo

Diese Doktorarbeit befasst sich mit der Charakterisierung von zirkulierenden nicht-kodierenden RNAs, die mit dem Risiko der Entwicklung von Gallenblasenkrebs, einer aggressiven Erkrankung mit schlechter Prognose, verbunden sind. Weltweit weist Gallenblasenkrebs in bestimmten geographischen Regionen wie Lateinamerika eine hohe Prävalenz und eine hohe Sterblichkeitsrate auf, während die Erkrankung in europäischen Ländern relativ selten vorkommt. Die molekularen und genetischen Mechanismen, die dem Gallenblasenkrebs zugrunde liegen, sind zum Teil erforscht, doch die genauen Beiträge spezifischer Biomarker sind noch unzureichend bekannt. Nichtcodierende RNAs spielen eine zentrale Rolle bei der Regulierung abnormaler Zellprozesse und versprechen wertvolle Biomarker für die Früherkennung von Krankheiten zu sein.

In dieser Doktorarbeit wurden zwei verschiedene Arten von nicht-kodierenden RNAs untersucht: lange nicht-kodierende RNAs und microRNAs. Die Expressionsniveaus von langen nichtkodierenden RNAs wurden in der chilenischen Bevölkerung bewertet, während die Regulierung von microRNAs bei Personen europäischer Abstammung untersucht wurde. Beide Studien stützten sich auf die Kombination von Daten von nicht codierenden RNAs aus Gewebe und Serum.

In der ersten Studie wurden drei separate Datensätze zusammengeführt: Der erste Datensatz enthielt ausschließlich Daten zur Expression langer nichtkodierender RNAs (Gallenstein  $n = 31$ , Dysplasie  $n = 35$ , Gallenblasenkrebs  $n = 32$ ), der zweite Datensatz umfasste sowohl Daten zur Expression langer nichtkodierender RNAs als auch Genotypdaten (Kontrollen  $n = 110$ ) und der letzte Datensatz enthielt nur Genotypinformationen (Kontrollen  $n = 2397$ , Gallenblasenkrebsfälle  $n = 540$ ). Zunächst wurden die unterschiedlich exprimierten langen nichtkodierenden RNAs entlang der Progression von Gallensteinen über Dysplasie bis hin zu Gallenblasenkrebs vorselektiert. Im zweiten Datensatz wurden danach die Assoziationen zwischen Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs) und der Serumexpression der vorselektierten langen nicht-kodierenden RNAs bewertet und die besten Modelle für die Prediktion ausgewählt. Schließlich wurden die Ausprägungen der langen nicht-kodierenden RNAs im Serum auf der Grundlage der einzelnen Genotypen vorhergesagt, und der Zusammenhang mit Gallenblasenkrebsrisiko wurde bestimmt. AC084082.3 und LINC00662 wiesen erhöhte Expressionswerte auf ( $p$ -Wert = 0.009), während C22orf34 bei der Entwicklung von Gallensteinen zu Gallenblasenkrebs herunterreguliert war ( $p$ -Wert = 0.04). Zwei SNPs wurden für LINC00662 ( $r^2 = 0.26$ ) und drei für C22orf34 ( $r^2 = 0.24$ ) identifiziert und validiert. Bemerkenswert ist, dass nur die vorhergesagte Serumexpression von LINC00662 signifikant mit dem Gallenblasenkrebsrisiko assoziiert und mit einem 25% höheren Krebsrisiko verbunden war (Odds Ratio = 1.25,  $p$ -Wert = 0.02).

In der zweiten Studie wurde ein dreistufiger Ansatz angewandt, um microRNAs aus deutschen formalinfixierten Gewebeproben (Gallenstein  $n = 8$ , Gallenblasenkrebs  $n = 40$ ) vorzuselektieren,

Screening der microRNA-Expressionsniveaus in prospektiven Serumproben aus drei europäischen Kohorten (n = 37 Gallenblasenkrebs-Fall-Kontroll-Paare) durchzuführen, und die identifizierten microRNA-Kandidaten in Serumproben aus drei weiteren prospektiven Kohorten (Kontrollen n = 36, Gallenblasenkrebs-Fälle n = 31) zu validieren. Die statistischen Analysen umfassten auch Pathway- und Meta-Analyse sowie eine Untersuchung der Expressionskorrelation zwischen mikroRNAs und Zielgenen. miR-4533 und miR-671-5p waren sowohl im Gallenblasenkrebsgewebe als auch in der ersten Gruppe von Serumproben über exprimiert. Allerdings wurde nur die Überexpression von miR-4533 sowohl im zweiten Satz prospektiver Serumproben als auch durch Meta-Analyse validiert (p-Wert =  $4.1 \times 10^{-4}$ ). miR 4533 war besonders bei Personen unter 63.5 Jahren und mit einem Body-Mass-Index unter 26.2 kg/m<sup>2</sup> hochreguliert. Pathway- und Korrelationsanalysen ergaben außerdem, dass miR 4533 auf SIPA1L2 im Rap1-Signalweg abzielt.

Die Ergebnisse dieser Dissertation zeigen, wie heterogen die Genetik von Gallenblasenkrebs ist. Die Ergebnisse der ersten Studie deuten darauf hin, dass die Vorauswahl langer nichtkodierender RNAs auf der Grundlage von Gewebeproben und die Nutzung verwandter genetischer Varianten die Identifizierung zirkulierender langer nichtkodierender RNAs, die mit dem Krebsrisiko verbunden sind, ermöglicht. Die zweite Studie weist auf die Bedeutung der Integration von Gewebe- und Serum-Biomarkern für die Vorauswahl, das Screening und die Validierung von unterschiedlich exprimierten microRNAs hin. Beide Studien unterstreichen die Notwendigkeit internationaler Forschungsk Kooperationen zur Identifizierung und Validierung von Biomarkern für die Sekundärprävention von seltenen Tumorerkrankungen wie Gallenblasenkrebs. Diese vielversprechenden Ergebnisse müssen in künftigen Studien validiert und weiter verfeinert werden, auch im Hinblick auf ihre Übertragbarkeit auf andere Probenarten und Populationen.