

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie

Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Jens Werner

Differentielle miRNS-Expression bei kolorektalen Karzinomen:
Vergleich zwischen hepatischer und peritonealer Metastasierung

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von David Pfeifer

aus Bayreuth

2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Martin K. Angele

Mitberichterstatter: PD Dr. med. Hendrik Seeliger MHBA

PD Dr. med. Jutta Nagel

Mitbetreuung durch die

promovierten Mitarbeiter:

PD Dr. med. Markus Albertsmeier

Dr. med. Dr. rer. nat. Sabine Heublein

Dekan:

Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung:

10.12.2020

Für meine Eltern

Inhalt

1. Einführung	8
1.1 Das kolorektale Karzinom	8
1.1.1 Metastasierung	8
1.1.2 Prognosefaktoren	8
1.1.3 Epithelio-mesenchymale Transition und Fernmetastasierung	9
1.1.4 CSC und Tumorstammzellmarker	13
1.1.5 Peritonealkarzinose und hepatische Metastasierung	14
1.2 MicroRNS	15
1.2.1 Was sind MicroRNS (miRNS)?	15
1.2.2 Einfluss von miRNS auf das KRK – Überblick	17
1.2.3 Rezeptortyrosinkinase c-MET und deren Einfluss auf das KRK	18
1.3 Fragestellungen	20
2. Material und Methoden	21
2.1 Probanden, Tumorsektate und Zelllinien	21
2.1.1 Probanden/Resektate	21
2.1.2 Zelllinien	21
2.2 Methoden	22
2.2.1 Resektataufbearbeitung und RNS-Isolation I	22
2.2.2 miRNS-TLD-Array der Tumorproben	22
2.2.3 Zelllinien und Zellkultur	26
2.2.4 RNS-Isolation Zellkultur	26
2.2.5 miR-31-5p-cDNS-Synthese	27
2.2.6 c-MET-cDNS-Synthese	28

2.2.7	miR-31-5p und c-MET-PCR	29
2.2.8	Proteinmengenbestimmung	31
2.2.9	Western Blot	31
2.2.10	Transfektion	34
2.2.11	Plasmidvermehrung	34
2.3	Statistische Analyse	35
3.	Ergebnisse	36
3.1	Patientenkollektiv	36
3.2	miRNS-Differenzierung	37
3.2.1	Vergleich der miRNS-Expression bei hepatischer (LM) und peritonealer Metastasierung (PER)	37
3.2.2	Vergleich der miRNS-Expression bei peritonealer Metastasierung (PER) und Tumoren ohne Metastasierung (M0)	38
3.2.3	Vergleich der miRNS-Expression bei hepatischer Metastasierung (LM) und Tumoren ohne Metastasierung (M0)	39
3.2.4	Differentielle Expression – Vergleich LM zu PER zu M0	39
3.2.5	Validierung am Patientenkollektiv	41
3.3	Regulierung des Zielgens c-MET durch miR-31-5p	44
3.3.1	Endogene miR-31-5p-Expression möglicher Zelllinien	44
3.3.2	Maximale Überexpression 14 Stunden nach Transfektion	45
3.3.3	miR-31-5p beeinflusst c-MET auf Proteinebene	46

4. Diskussion	47
4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse	47
4.2 Interpretationen	49
4.2.1 Patientenkollektiv und TLD-Array	49
4.2.2 miR-215-5p	51
4.2.3 miR-483-5p	52
4.2.4 miR-31-5p	53
4.2.5 MiRNS - Prädiktion bei kolorektalen Karzinomen	55
4.2.6 c-MET	55
4.3 Diskussion der Methoden	57
4.3.1 Patientenkollektiv und Probengewinnung	57
4.3.2 TLD-Array	57
4.4 Fazit und Ausblick	59
5. Literaturverzeichnis	61
6. Veröffentlichungen	67
7. Material	68
7.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien	68
7.2 Chemikalien	69
7.3 Puffer, Lösungen, Medien und Reagenzien	70
7.4 Kits, Primer, Antikörper und Plasmide	72
8. Danksagung	75
9. Lebenslauf	76

1. Einführung

1.1 Das kolorektale Karzinom

1.1.1 Metastasierung

Das kolorektale Karzinom (KRK) ist die dritthäufigste Krebserkrankung weltweit und führte geschlechterübergreifend zu 1,2 Millionen Neuerkrankungen und über 700 000 Todesfällen im Jahr 2015 [1]. Hierbei hängt die Prognose für das Fünfjahresüberleben maßgeblich von der Tumorausbreitung bei Diagnose ab; dieses liegt bei Patienten mit UICC-Stadium I bei über 90 %, wohingegen nur circa 10 % der Patienten im UICC-Stadium IV langfristig überleben [2]. Während der Primärtumor häufig kontrollierbar ist, stellt das Auftreten von Fernmetastasen hingegen einen prognostisch ungünstigen Faktor dar [3].

Bei ungefähr einem Drittel aller am KRK erkrankten Patienten treten im Verlauf hämatogene Metastasierungen in die Leber (LM) auf [4]. Ein Viertel der Patienten zeigt Metastasierung in das Peritoneum und die Bauchhöhle (PER) [5], wobei es sich hierbei, wie später beschrieben, eher um einen „lokalen“ Prozess handelt. Selten tritt peritoneale Metastasierung zusammen mit synchroner hämatogener Fernmetastasierung auf, häufig handelt es sich also entweder um exklusive Lebermetastasierung oder exklusive peritoneale Metastasierung [6, 7].

1.1.2 Prognosefaktoren

In Anbetracht dessen erlangt die Frage, weshalb in einigen Fällen das Tumorstadium lokal begrenzt bleibt, während es in anderen Fällen zu einer Metastasierung in entfernte Organe kommt, eine besondere Bedeutung. Sollten Risikofaktoren für eine prognostisch ungünstige Fernmetastasierung bereits im Primärtumor vorhanden sein, könnte bei Nachweis dieser Risikofaktoren frühzeitig eine intensivere Systemtherapie zur Behandlung okkulten Fernmetastasen durchgeführt werden.

Zudem könnte die Kenntnis von molekularen Risikosignaturen eines lokal aggressiven Tumorstadiums in einzelnen Fällen eine radikalere chirurgische Therapie begründen.

Zurzeit gilt das UICC-Stadium als wichtigster und robustester Prognosefaktor des KRK [8]. Weitere prognostisch wie auch prädiktiv relevante Parameter sind unter anderem das Alkaline

Phosphatase Level (ALP), der KRAS/NRAS/BRAF Status sowie Höhe der Tumormarker CEA und CA19-9. Allerdings fehlt zum heutigen Zeitpunkt noch die nötige Validität, um mit diesen Parametern präzise den wahrscheinlichen Krankheitsverlauf zu beurteilen und Therapiemaßnahmen begründen zu können [9].

Ein weiterer noch nicht in die Klinik integrierter Parameter ist die Tumorzellsprossung („Tumour-Budding“, TBU), definiert als morphologisch sichtbare, aktive Tumorzellnester an der Tumorinvasionsfront, welche nicht mehr als fünf Tumorzellen beinhalten [10, 11]. Histologisch kann die Tumorzellsprossung an Biopaten oder Resektaten beurteilt werden, beispielsweise an koloskopisch abgetragenen Polypen [12]. Aufgrund eines fehlenden einheitlichen Score-Systems findet der Parameter noch keine Anwendung im klinischen Alltag. Das größte Interesse gilt dabei der Unabhängigkeit vom TNM-System [13], insbesondere in niedrigen UICC-Stadien mit guter Prognose (UICC-Stadium I, II) können durch die Beurteilung der Tumorzellsprossung Hochrisiko-Patienten erkannt und dadurch frühzeitig einer geeigneten Therapie zugeführt werden. Beispielsweise ist das Fünfjahresüberleben eines Patienten mit Stadium II und hoher Tumorzellsprossung gleich dem eines Stadium-III-Patienten mit geringerer TBU [14]. Bei solchen Stadium II Patienten kann die alleinige Tumorresektion nicht als suffiziente Therapie gesehen werden und eine adjuvante Radio-/Chemotherapie sollte folgen [15].

Eine hohe TBU-Aktivität ist folglich mit schlechter Überlebensprognose assoziiert [15]. Dies liegt an aggressiverer Lymphgefäß- oder Blutgefäßinvasion des Tumors und daraus resultierender Metastasierung. Hinter der histologisch-morphologischen Tumorzellsprossung steht der zellbiologische Prozess der epithelio-mesenchymalen Transition (EMT) [8, 12].

1.1.3 Epithelio-mesenchymale Transition und Fernmetastasierung

Zum heutigen Zeitpunkt ist nur teilweise bekannt, warum manche Tumoren lokal begrenzt wachsen, während andere durch invasives Verhalten zu Fernmetastasen führen. Tumorstammzellen (Cancer Stem Cells, CSC) und die EMT sind an diesen Prozessen vermutlich zentral beteiligt.

CSC zeigen ähnliche Eigenschaften wie normale Stammzellen. Hierzu zählen unbegrenzte Regeneration, Pluripotenz und die Fähigkeit, als Keimzelle eines Malignoms zu dienen [16]. Verlassen solche CSC den Primarius, können sie in entfernten Organen neue Zellkolonien initiieren. Man spricht deshalb von migrierenden Tumorstammzellen (Migrating Cancer Stem Cells, MSCS) [17].

Entscheidend für das „Lösen“ der MSCS aus dem Tumorzellverband ist der Prozess der EMT. Zellen verlieren dabei Ihre epitheliale Differenzierung und nehmen einen mesenchymalen Phänotyp an [18, 19]. Durch biochemische Veränderungen werden die apikal-basale Ausrichtung sowie Zell-Zell-Verbindungen und Verbindungen zur Basalmembran aufgelöst. Außerdem verändert sich das Zytoskelett; Fähigkeiten zu Migration, Invasion und Widerstand gegen Apoptose werden erworben [20, 21]. Diese Vorgänge spielen sich an der Tumordinvasionsfront ab und führen dort zur erwähnten mikroskopisch beurteilbaren Tumorzellsprossung, deren prognostische Relevanz schon in den 1980er Jahren beschrieben wurde [16].

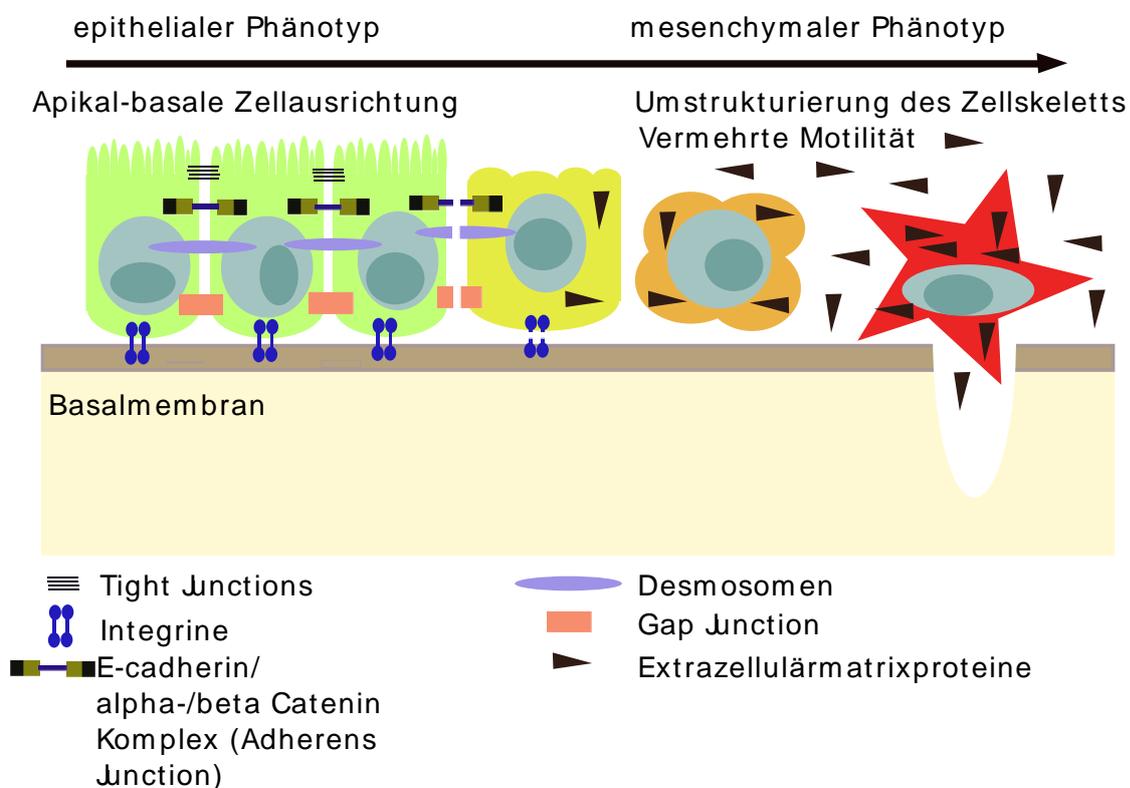


Abbildung 1: vereinfachte Darstellung der Epithelio-mesenchymalen Transition [22, 23].

Die EMT wird durch komplexe Mechanismen reguliert, welche sich auf verschiedenen molekularen Ebenen abspielen:

- Regulation auf Transkriptionsebene

Die Transkriptionsfaktoren (TF) SNAI1, SNAI2 („Snail zinc-finger“-Familie), ZEB1, ZEB2 („zinc-finger E-box-binding homeobox“ Familie) und TWIST1, TWIST2, E12/E47 („basic Helix-Loop-Helix“-Familie) hemmen die Expression von E-cadherin, welches Zell-Zell-Verbindungen stabilisiert. E-cadherin wird auch als „Gatekeeper“ des epithelialen Stadiums in Karzinomen bezeichnet. Neben diesen Kerngruppen beeinflussen zahlreiche weitere TF die EMT [20].

- Regulation auf Signalübertragungsebene

Eine wichtige Rolle spielt der TGF- β /Smad-Signalweg; wird dieser durch Mutation beschädigt, sinkt auch hier der E-cadherin-Anteil, wohingegen das onkogen wirksame β -Catenin vermehrt exprimiert wird. Der Wnt-Signalweg führt ebenfalls zu einer Vermehrung von β -Catenin im Zellkern. Auch der RAS/ERK1/2- und der PI3K/AKT-Signalweg fördern EMT durch Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und onkogenen Effektorproteinen, wie z. B. PRL-3, einer mit Metastasierung assoziierten Phosphatase [20].

- Regulation durch nicht-kodierende Ribonukleinsäuren (RNS)

Kleine, nicht-kodierende RNS oder microRNS (miRNS, miR) mit einer Länge von 18-25 Nukleotiden können die Proteinbiosynthese posttranskriptionell steuern, indem sie einerseits mit mRNA interagieren oder andererseits die Translation an den Ribosomen beeinflussen. Auf detaillierte Wirkmechanismen wird im Folgenden eingegangen [20].

- Tumorumgebung und Mikromilieu

In der Tumorloge findet man ein verzweigtes Netzwerk aus Entzündungsmediatoren, Entzündungszellen und Strukturen der Extrazellulärmatrix. Auch pH-Wert, Sauerstoffverfügbarkeit und lösliche Faktoren spielen eine Rolle in der EMT. „Carcinoma-associated fibroblasts“ (CAF) fördern beispielsweise Migration und Invasion durch Produktion von Matrix-Metalloproteasen und deren Inhibitoren. Auch

CCR1⁺-Myeloidzellen und Thrombozyten fördern die Tumorprogression, genauso wie die Zytokine IL-1 β , IL-8, IL-6 und TNF α [20].

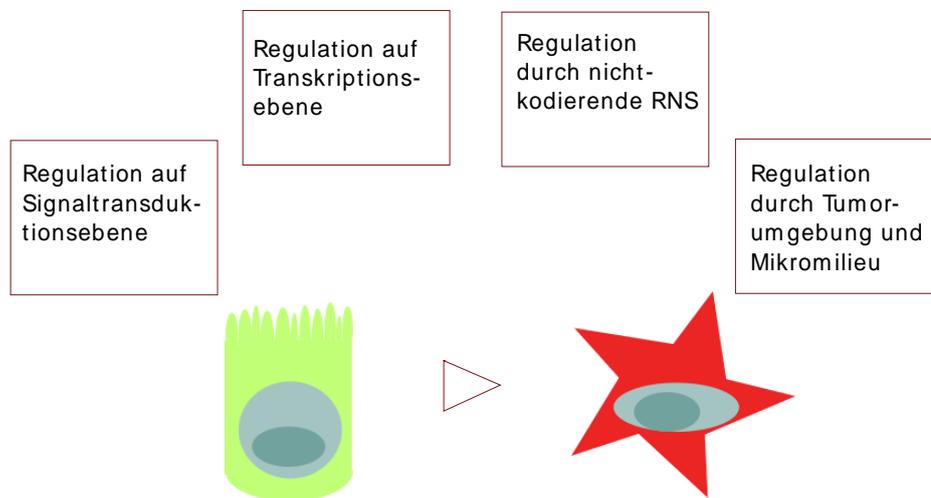


Abbildung 2: verschiedene Ebenen der EMT-Regulation [20]. Aus jeder dieser Ebenen können EMT-Mediatoren als Prognosefaktoren bestimmt werden.

Alle Faktoren, Proteine und Nukleinsäuren, welche die EMT beeinflussen, werden als EMT-Mediatoren bezeichnet. Wahrscheinlich finden Disregulationen dieser EMT-Mediatoren schon zu einem Zeitpunkt statt, in dem sich das Tumorwachstum noch im Anfangsstadium befindet.

Um hierfür messbare Prognosefaktoren zu generieren, sind Bestimmungen von EMT-Mediatoren auf allen der genannten Ebenen denkbar. Dies kann entweder in Blut, Aszites, Stuhl, Urin oder nach Tumorresektion am Resektat/Bioptat erfolgen. Zusammen mit der TNM-Klassifikation sollen aussagekräftigere Score-Systeme erstellt werden, welche die möglichst frühzeitige Erkennung von Hochrisiko-Patienten, also von Patienten, bei denen ein stark zu Metastasierung neigender Tumor vorliegt, zum Ziel haben. Ein zuletzt identifiziertes Beispiel für einen solchen Prognosefaktor ist β -Catenin, welches als Effektorprotein zahlreicher Signaltransduktionsvorgänge mit schlechter Prognose assoziiert ist [24].

1.1.4 CSC und Tumorstammzellmarker

Dick et al. widmeten sich erstmalig ausführlich dem Tumorstammzellkonzept in hämatologischen Malignomen [25]. Obwohl CSC nur weniger als 1 % der Tumorzellen ausmachen, spielen sie durch Ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Tumorigenität nicht nur in der Entstehung des Primärtumors, sondern auch als beschriebene MCSCs in der Fernmetastasierung eine wichtige Rolle.

Außerdem können CSC-Therapieresistenzen durch Aktivierung der Notch, wnt/ β -Catenin, TGF- β , Hedgehog, PI3K/Akt/mTOR, JAK/STAT Signalkaskaden erzeugen [26].

Ähnlich anderen Stammzellen besitzen sie spezifische Oberflächenmarker (Cancer Stem Cell Markers, CSCM); hier sind vor allem CD133 und CD44 zu nennen [27].

In einer Vorarbeit (Neumann et al. 2015) wurden Unterschiede zwischen peritonealer und hepatischer Metastasierung beim rechtsseitigen KRK untersucht [28]. Hierzu wurde ein immunhistochemischer Algorithmus geschaffen, welcher CD133, CD44, nukleäres β -Catenin und DNS-mismatch-Reparatur betrachtet [29, 30]. Proben von 68 resezierten kolorektalen Karzinomen (26,5 % exklusive Peritonealkarzinose, 54,4 % Lebermetastasen , 19,1 % kombinierte PER und LM) wurden histopathologisch untersucht, mit dem Ergebnis, dass insbesondere die Expression von CD133 und nukleärem β -Catenin mit einer signifikant erhöhten Lebermetastasierung einhergeht, aber nicht mit exklusiver Peritonealkarzinose. (Abbildung 3)

Hepatisch metastasierte Tumoren zeigten also schon im Primarius Stammzeleigenschaften, welche peritoneal metastasierte Tumoren nicht zeigen. Eine histopathologische Untersuchung der Tumorstammzellen in Primärtumoren zu prognostischen Zwecken erscheint in der Klinik allerdings nicht praktikabel. Die Bestimmung von EMT-Mediatoren, welche direkt an der Migration von Tumorstammzellen beteiligt sind, in z.B. Blut, Aszites, Faeces oder Biptaten kommt aufgrund der besseren Handhabung dafür eher in Frage [28]. Es konnten z.B. bereits regulierende Einflüsse von miR-21 und miR-145 auf CSC aufgezeigt werden [31].

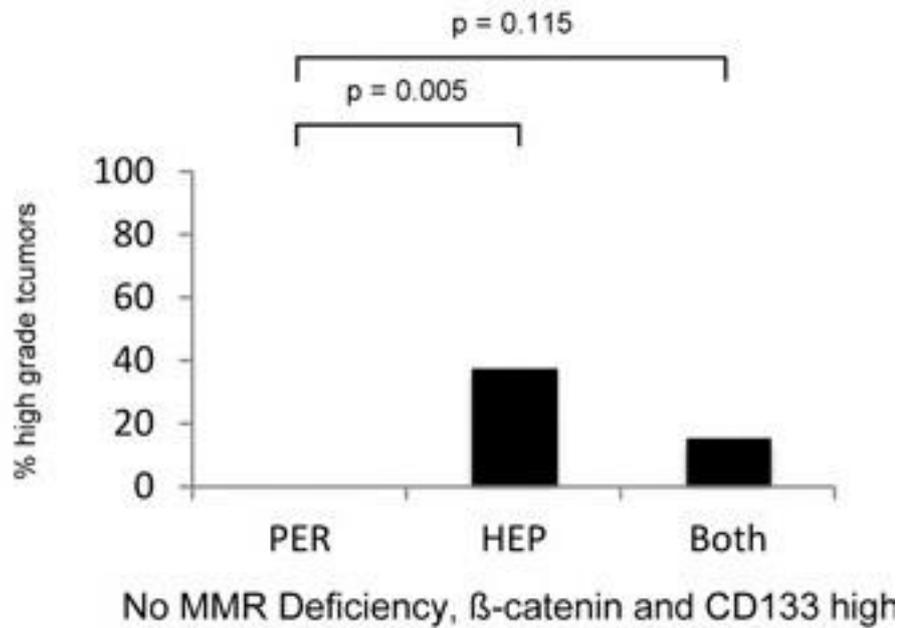


Abbildung 3: Neumann et al. zeigten 2015, dass bei hepatischer Metastasierung im Primärtumor signifikant mehr Zellen mit Stammzeleigenschaften vorliegen als bei peritonealer Metastasierung. Stammzellen wurden durch MMR-Deficiency, β -Catenin und CD133 identifiziert. Diese Grafik stammt aus der Originalveröffentlichung [28].

1.1.5 Peritonealkarzinose und hepatische Metastasierung

Die Ansicht, Peritonealkarzinose entwickle sich im fortgeschrittenen Stadium einer Tumorerkrankung durch hämatogene Zellstreuung, wurde in den letzten Jahren zunehmend revidiert [32]. Man vermutet heute einen lokalen Vorgang als Ursache der Peritonealkarzinose, welche sich bei ungefähr einem Viertel aller KRK-Patienten im fortgeschrittenem Stadium ausprägt [5]. Das Ablösen freier Tumorzellen vom Primärtumor ist demnach die Folge eines hohen interstitiellen Drucks, welcher in den meisten soliden Tumoren vorherrscht. Hierzu kommt es unter anderem durch schnelle Zellproliferation und schlechten lymphatischen Abfluss. Wird die Serosa des Darms erreicht oder reißt die den Tumor umgebende Kapsel ein, können Tumorzellen in die Peritonealhöhle „abtropfen“ [33].

Um anschließend in die Serosa einzuwachsen und eine neue Tumorkolonie initiieren zu können, müssen auch hier pluripotente CSCs vorhanden sein. Eine histopathologische Aufarbeitung von KRK-Proben durch Neumann et al erbrachte allerdings signifikant unterschiedliche CSC-

Marker-Profile im Vergleich zwischen peritonealer und hepatischer Metastasierung (Abbildung 3). EMT bzw. TBU scheinen bei der Entwicklung der Peritonealkarzinose nicht der entscheidende Prozess zu sein. Außerdem unterscheiden sich peritoneale und hepatische Metastasen auch auf genetischer Ebene [28, 34].

1.2. MicroRNS

1.2.1 Was sind MicroRNS?

MicroRNS (miRNS, miR) sind kleine, 18-25 Nukleotid lange RNS-Moleküle, welche an der posttranskriptionellen Regulation der Proteinbiosynthese beteiligt sind. Sie zählen zu den nicht-kodierenden RNS; die inhibitorisch-regulatorische Wirkung erfolgt durch Bindung an die „3'-untranslated region“ (3'-UTR) der kodierenden mRNA [35, 36]. Der Vorsatz „hsa“ gibt an, dass es sich um menschliche miRNS handelt.

Die Datenplattform miRBASE.org gibt einen Überblick über bekannte und neu erkannte miRNS und zählt zur Zeit (2019) 38589 miRNS von über 70 Spezies [37]. Man schätzt, dass die Expression von ungefähr 60 % aller kodierenden Gene von miRNS beeinflusst wird [38].

Eine miRNS kann hierbei die Expression einer Vielzahl von unterschiedlichen Genen in diversen Geweben beeinflussen. Physiologischerweise werden durch miRNS z. B. Abläufe in der Embryonalentwicklung gesteuert [39].

Bei Disregulation werden sowohl onkogene als auch tumorsuppressive Eigenschaften beschrieben [40]. MiRNS-Gene unterliegen denselben Mechanismen wie proteinkodierende Gene. Eine Dysregulation der epigenetischen Kontrolle kann zu Vermehrung oder Verminderung der miRNS-Expression führen. Durch Wegfall einer physiologischen Inhibition durch miRNS und des hierin enthaltenen Schutzmechanismus können onkogene Signaltransduktionskaskaden in Gang gesetzt werden [41].

Es konnte beispielsweise bereits gezeigt werden, dass miR-15 und miR-16 bei der chronischen lymphatischen Leukämie (CLL) vermindert exprimiert werden [42]. Bei Glioblastomen kommt es zu einer vermehrten Expression von miR-21 [43]. Da miRNS als EMT-Mediatoren Einfluss

auf Tumorentstehung haben und vergleichsweise gut messbar sind, versucht man, sie als Prognosefaktoren zu nutzen.

Nützlich ist zudem, dass miRNS eine hohe Gewebespezifität, Stabilität und differenzierte Expression während des Tumorprogresses aufweisen. Die komplexen Wirkungen der miRNS auf verschiedenste Signalübertragungswege sind aber noch nicht soweit aufgedeckt, dass prognostisch aussagekräftige Einzel-miRNS-Spiegel oder miRNS-Gruppen bestimmt werden können. [38, 41]

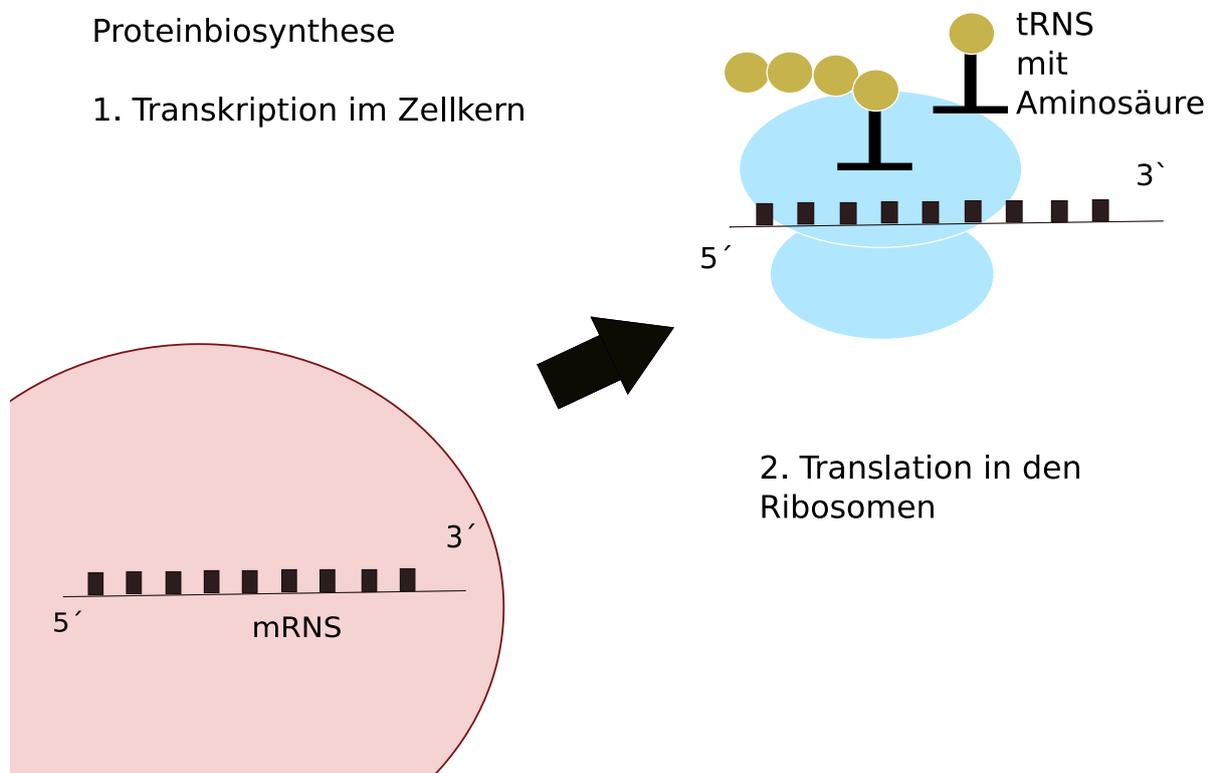


Abbildung 4a: Die physiologische Proteinbiosynthese ist in zwei Schritte unterteilt, wobei die Transkription im Zellkern und die Translation in den Ribosomen stattfindet. Auch hierbei können miRNS beteiligt sein, beispielsweise in der Embryonalentwicklung.

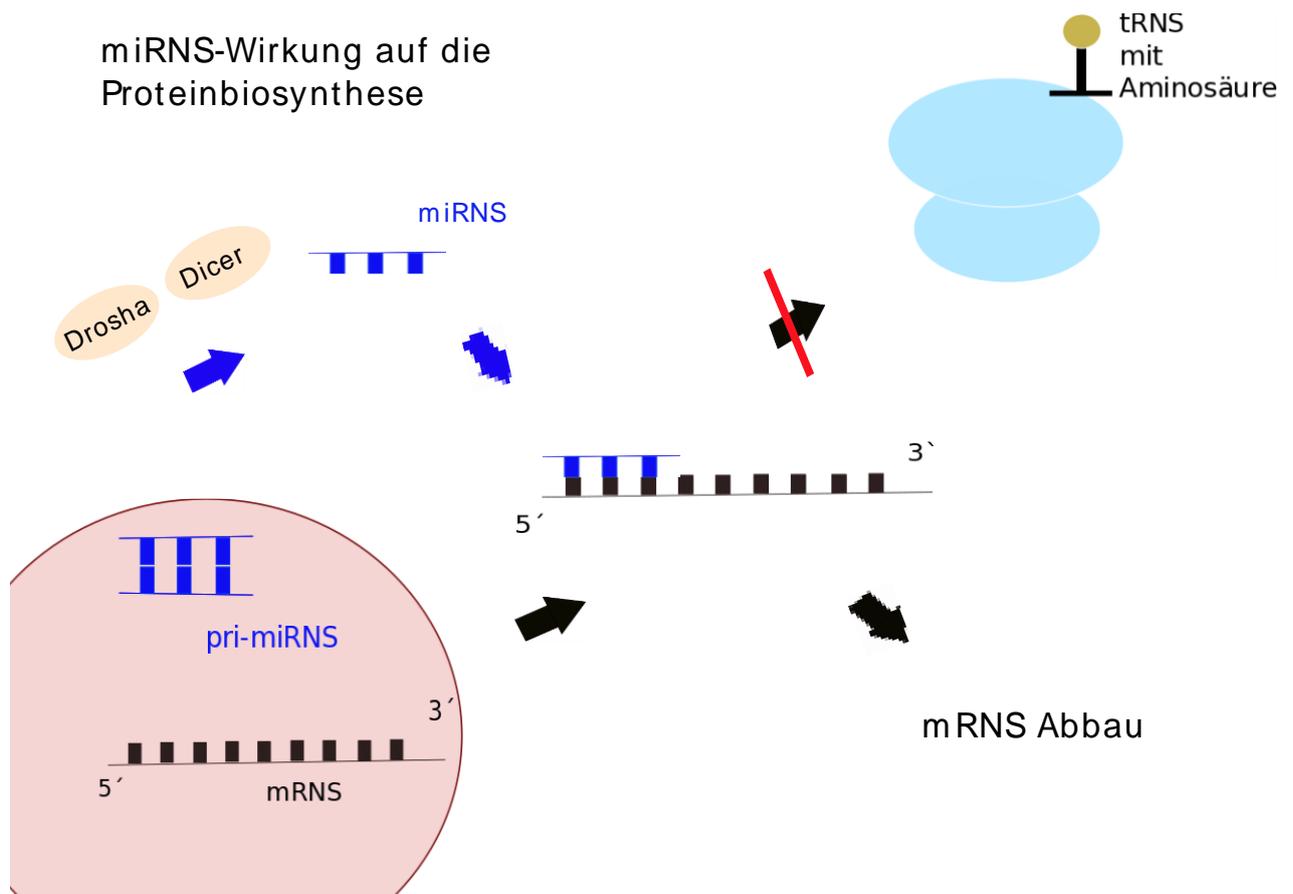


Abbildung 4b: MiRNS können die Translation unterbinden und führen zu einem Abbau der mRNA. Der Umbau der anfänglich in Haarnadelstruktur vorliegenden pri-miRNS zu aktiven miRNS geschieht durch die Enzyme Drosha und Dicer [44].

1.2.2 Einfluss von miRNS auf das kolorektale Karzinom - Überblick

In den vergangenen Jahren konnten viele neue Erkenntnisse über miRNS im Allgemeinen, aber auch in Bezug auf die Entwicklung und Metastasierung des KKR gewonnen werden:

Die Untersuchungen von Gao et al. zeigten, dass miR-34a-5p in KKR-Primärtumoren niedriger exprimiert wird als in entsprechenden Vergleichsgruppen. MiR-34a-5p ist ein direktes Transkriptionsziel des p53-Zellsignalwegs und beeinflusst über einen Rückkopplungsmechanismus (miR34a-5p/SIRT1/p53-Loop) dessen Aktivität, was zu Stabilität im Zellzyklus führt. Die Autoren sprechen dieser miRNS daher eine hohe prognostische Bedeutung zu. Es konnte zudem gezeigt werden, dass niedrige miR-34a-5p-Expression, insbesondere in den Stadien II und III, mit vermehrten Rezidiven einhergeht. [45, 46]

Besonders hervorheben möchte ich miR-34a-5p außerdem, da mit MRX34 ein erstes, auf Vermehrung dieser miRNS ausgerichtetes Therapeutikum bei metastasierten Lebertumoren in Phase-1-Studien am Patienten zum Einsatz kommt [38].

Mitglieder der miR-200-Familie (miR-200a/b, miR-429, miR-200c, miR-141) wirken an der Tumorinvasionsfront direkt auf die Tumorsprossung ein. Prognostisch interessant ist hierbei der CPG-Insel-Methylierungsstatus [47].

Der Wnt-Signalweg unterliegt der Regulation durch verschiedene miRNS. Beispielsweise führt vermehrte miR-135a/b-Expression zu verminderter Expression des APC-Tumorsuppressorgens [48, 49]. MiR-143/145 stört die Translokation von β -Catenin in den Zellkern, eine Verminderung ihrer Expression geht daher mit schlechter Prognose einher [50]. Außerdem unterdrücken diese miRNS KRAS; ähnlich wie bei MRX34 könnten miR-143/145 also auch therapeutisch genutzt werden [38].

Die beschriebenen Beispiele zeigen das Potential, das hinter der Entschlüsselung des Wirkungsnetzwerks der miRNS steht. Sowohl diagnostische/prognostische Bestimmungen als auch ein therapeutischer Einsatz sind denkbar [35].

1.2.3 Rezeptortyrosinkinase c-MET und deren Einfluss auf das KRK

Der Entstehung von Karzinomen liegen Fehlsteuerungen in Signalübertragungskaskaden zugrunde. Bei kolorektalen Karzinomen sind meist verschiedene Signalwege betroffen:

Einen wesentlichen Einfluss auf die Tumorentwicklung hat die Überexpression des Epidermal Growth Factors (EGF). Der RAS/RAF/MAPK/ERK-Weg und der PI3K/AKT/PTEN/mTOR-Weg beeinflussen dieses Effektorprotein. Viele dieser Parameter/Moleküle werden bereits prognostisch (z. B. RAS-Status) oder therapeutisch (z. B. mTOR-Inhibitoren) genutzt [51]. Auch chronische Entzündungen wie Colitis Ulcerosa können zu Karzinomen führen, hierbei wird der NF- κ B-Signalweg aktiviert [52].

Die Mutation des Tumorsuppressorgens Adenomatous-polyposis-coli-Protein (APC) ist häufig ein erster Schritt der Karzinogenese. Diese Mutation, welche unter anderem zur Erkrankung

familiärer adenomatöser Polyposis (FAP) führt, ist Teil des Wnt-Signalwegs, welcher letztendlich zu einem Anstieg von β -Catenin im Zellkern führt [53].

Die genannten Signaltransduktionswege können durch die Rezeptortyrosinkinase c-MET aktiviert werden. Der Name MET leitet sich von *mesenchymal-epitheliale-Transition* ab, welches der komplementäre Vorgang zur EMT bei der Entstehung von Fernmetastasen ist. Das MET-Gen kodiert für das Rezeptorprotein c-MET, dessen einziger Ligand HGF (*Hepatocyte-Growth-Factor*) ist. Der HGF/c-MET Signalweg wirkt physiologischweise bei der Embryogenese, Geweberegeneration, Zellproliferation, Zellskelettentwicklung und Zellmortalität. [54, 55]

Mutationen im MET-Gen und die damit einhergehende unkontrollierte Kinaseaktivität des aktivierten Rezeptors führen zu Karzinogenese, Angiogenese und Fernmetastasierung [56, 57]. Beim KRK spielt die c-MET/HGF-Achse besonders bei der hämatogenen Metastasierung in fortgeschrittenen Tumorstadien eine Rolle. In Lebermetastasen konnte eine höhere c-MET-Expression als im zugehörigen Primärtumor gezeigt werden. Besonders interessant für diese Arbeit ist c-MET, weil hier eine Regulation durch diverse miRNS vorbeschrieben ist [54, 58, 59].

1.3 Fragestellungen

Es besteht bereits eine Vielzahl an Veröffentlichungen zu der Frage, ob und wie stark miRNS-/EMT-Mediatoren Tumorwachstum beeinflussen. Hier wird aber meistens der Einfluss auf den Primärtumor untersucht.

Diese Arbeit widmet sich folgenden Fragestellungen:

- Wie unterscheiden sich KRK-Primärtumore, welche hepatisch metastasieren von denen, die peritoneal metastasieren, auf molekularer/miRNS-Ebene?
- Lassen sich bereits im Primärtumor molekulare Marker/miRNS für die Metastasierungstendenz finden?
- Durch welche Signaltransduktionsmechanismen kommt es zur Metastasierung in die eine oder die andere Richtung?

Hinsichtlich dieser Fragestellungen wurden jeweils Primärtumore von im Laufe der Erkrankung metachron hepatisch metastasierten Patienten mit metachron peritoneal metastasierten Patienten sowie Patienten, welche keine Metastasen bildeten, untersucht und verglichen.

2. Material und Methoden

2.1. Patienten, Tumorresektate und Zelllinien

2.1.1 Patienten

Patienten mit der Erstdiagnose eines kolorektalen Karzinoms zwischen 1988 und 2012 wurden in die Studie eingeschlossen (n=23). Das Patientenkollektiv, aus welchem diese stammen, wurde bereits von Neumann et al. 2015 verwendet. Zum Zeitpunkt Ihrer Diagnosestellung waren die eingeschlossenen Patienten nicht metastasiert. Es erfolgte dann eine Einteilung in drei Gruppen, je nach Lokalisation der im weiteren Verlauf auftretenden Metastasierung (LM = Lebermetastasen, PER = peritoneale Metastasen, M0 = keine Metastasen). Die Gruppen LM und PER umfassten jeweils zehn Patienten, die Kontrollgruppe M0 drei Patienten.

Alle Karzinome wurden in der Klinik für Allgemein-, Viszeral-, und Transplantationschirurgie der Universität München reseziert. Proben der Primärtumore wurden in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet; die histopathologische Begutachtung der Proben erfolgte routinemäßig.

2.1.2 Zelllinien

<i>HT29</i>	Kolorektales Adenokarzinom (adhärent)
<i>Caco2</i>	Kolorektales Adenokarzinom (adhärent)
<i>DLD1</i>	Kolorektales Adenokarzinom (adhärent)
<i>HCT116</i>	Kolorektales Adenokarzinom (adhärent)
<i>Colo205</i>	Kolorektales Adenokarzinom (semiadhärent)

Tabelle 2: Übersicht Zelllinien.

Die Zelllinien (Tabelle 2) wurden von ATCC (LGC Standards GmbH, Wesel, D) bezogen, es handelte sich um gängige Kolorektale Adenokarzinomzellen.

2.2 Methoden

2.2.1 Resektataufbearbeitung und RNS-Isolation I

Die Grundlage der Versuche bildeten 23 KRK-Primariusproben. Die Aufarbeitung und Beurteilung erfolgte unter Supervision eines erfahrenen Pathologen unter sterilen Bedingungen. Repräsentative Tumorareale wurden mikroskopisch disseziert. Anschließend wurde RNS aus den in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeproben isoliert. Hierbei wurde mit Xylol entwacht und mit Ethanol (99,9%) gespült. Die eigentliche Isolation der RNS erfolgte mit dem RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit nach dem zugehörigen Anwendungsprotokoll.

Die RNS-Isolate wurden in 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und, wie alle im Folgenden genannten RNS-Proben, kryokonserviert eingelagert. Alle Arbeiten mit DNS/RNS fanden in DNase-/RNase-freier Umgebung statt.

2.2.2 MiRNS-TLD-Array der Tumorproben

cDNS-Synthese

Vor der cDNS-Synthese wurde die Reinheit sowie die Menge der RNS-Proben mit dem Nanodrop via Absorptionsphotometrie bei 260 nm ermittelt. Der A260/280-Absorptions-Quotient lag bei allen Proben über 2, zudem zeigte sich ein eindeutiger einzelner RNS-Gipfel, womit Verunreinigungen der RNS-Proben, durch beispielsweise Proteine, ausgeschlossen wurden.

Reverse Transkriptase (RT) schreibt die gesuchten RNS-Einzelstrang-Moleküle in doppelsträngige cDNS um, welche für die exponentielle Vermehrung in der folgenden quantitativen Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) benötigt wurden. Mittels Thermocycler wurden die Temperaturetappen für die RT-Reaktion generiert.

Die cDNS-Synthese wurde mit 300 ng RNS pro Probe durchgeführt. Dies geschah in Eppendorf-Reaktionsgefäßen mithilfe des TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit und des Mastercycler Gradient nach dem zugehörigen Anwendungsprotokoll und unten angegebenem

Erwärmungszyklus. Als Primer wurden die Megaplex RT-Primer aus dem Megaplex Primer Pools, Human Pools Set v3.0 verwendet.

Komponente	Volumen
Megaplex RT-Primer	0,8µl
dNTPs with dTTP	0,2µl
MultiScribe Reverse Transcriptase	1,5µl
10x RT Buffer	0,8µl
MgCl ₂	0,9µl
RNase Inhibitor	0,1µl
Nuclease-free water	Variabel
Endvolumen	7,5µl

Tabelle 3: Zusammensetzung des Reaktionsgemisches cDNS-Synthese.

Zeit (min)	°C	Phase
2	16	40 Zyklen
1	42	
1	50	
5	85	Halten
∞	4	Halten

Tabelle 4: Reaktionszeiten der cDNS-Synthese, durchgeführt mit Master Cycler Gradient.

Voramplifikation

Vor dem eigentlichen TaqMan Low Density Array (TLDA) wurde die cDNS voramplifiziert. Durch diesen Schritt können auch kleinere Mengen miRNS besser quantifiziert werden. Die zugehörigen Erwärmungszyklen wurden ebenfalls im Mastercycler Gradient mit TaqMan PreAmp Master Mix durchgeführt; die spezifischen PreAmp Primer für diese Reaktion

entstammen auch dem Megaplex Primer Pools, Human Pools Set v3.0. Anschließend wurden die Reaktionsgemische mit 75 µl TE-Puffer (0,1) vermengt.

Komponente	Volumen/Menge
TaqMan PreAmp MasteMix	12,5µl
Megaplex PreAmp Primer	2,5µl
Nuklease-freies Wasser	7,5µl
cDNS (Vorreaktion)	7,5µl

Tabelle 5: Zusammensetzung des Reaktionsgemisches Voramplifikation.

Zeit (min)	°C	Phase
10	95	Halten
2	55	Halten
2	72	Halten
0,25	95	12 Zyklen
4	60	
10	99,9	Halten
∞	4	Halten

Tabelle 6: Reaktionszeiten der Voramplifikation, durchgeführt mit Master Cycler Gradient.

Durchführung des TaqMan Low Density Arrays

Das Prinzip der quantitativen real-time Polymerase-chain-reaction (RTQ-PCR) basiert auf der kontinuierlichen Detektion eines Fluoreszenz-Signals, welches proportional zur exponentiellen Amplifikation der DNA-Stränge ansteigt. Im Gegensatz zur konventionellen Endpunkt-PCR ermöglicht dieses Verfahren eine Templatequantifizierung (absolute Quantifizierung) durch Detektion der emittierten Fluoreszenz während jedes Zyklus [60-62].

Verwendet wurden TaqMan Array Human MicroRNA A+B Cards Set v3.0 um ein aussagekräftiges miRNS-Profil der Tumorproben zu erstellen. Hierbei untersuchte man das Vorhandensein von 754 verschiedenen miRNS. Drei cDNS-Proben der beschriebenen Gruppen M0, LM und PER (M0=keine Metastasierung, LM=Lebermetastasierung, PER=Peritonealmetastasierung) wurden gepoolt. Um die Korrektheit der cDNS-Synthese zu kontrollieren, wurden qPCR mit miR-185 und RNU als Referenz durchgeführt.

Für die eigentlichen Arrays wurden 100 µl des angeführten Reaktionsgemisches in jede der Einfüllöffnungen der Array-Karten pipettiert. Diese enthielten bereits die Primer und weiteren nötigen Reaktionskomponenten. Die Durchführung erfolgte nach dem Megaplex Pools Reaktionsprotokoll und mithilfe der zugehörigen Software.

Komponente	Volumen/Menge
Taqman Universal PCR Master Mix, No AmpErase	450µl
Gepooltes, voramplifiziertes cDNS- Reaktionsgemisch	9µl
Nuklease-freies Wasser	441µl

Tabelle 7: Zusammensetzung der Reaktionsgemische miRNS-Array.

Im Anschluss wurden die fünf miRNS in Einzelproben erneut analysiert, deren Expression im gepoolten Array die größten Unterschiede zeigte. Zusätzlich erfolgte eine Validierung der restlichen sieben Proben aller Gruppen als Einzel-qPCR. RNU44, RNU48 und U6-snRNS dienten als *Housekeeping* Gene, ath-miR159a als Negativkontrolle.

2.2.3 Zelllinien und Zellkultur

Die Ergebnisse des miRNS-Arrays führten zu den folgenden Zellkulturversuchen. In diesen wurden Zusammenhänge zwischen miRNS und der Tyrosinkinase c-MET untersucht.

Die Zellkultivierung aller Zelllinien erfolgte bei 37 °C und einem CO₂-Gehalt von 5 % in 22 ml entsprechendem Nährmedium im Brutschrank. Adhärente Zellen wuchsen als einlagige Schicht am Boden der Kulturflasche T175.

Für eine nicht limitierte Zellkultivierung war ein kontinuierliches Ausdünnen des Zellrasens nötig. Die Konfluenz der Zellen betrug optimalerweise unter 100 %. Zweimal wöchentlich wurden die Zellen mit 5 ml EDTA/Trypsin-Lösung abgelöst und in niedrigerer Konzentration in neue Flaschen überführt, alternierend hierzu wurde das Nährmedium einmal in der Woche erneuert. Differenzen in der Zellteilungsrate wurden zwischen den einzelnen Zelllinien bei der Konzentrationsberechnung prozentual bedacht. Zur Zellzahlbestimmung kam das lichtmikroskopische Prinzip der Neubauer'schen Zählkammer zum Einsatz. Durch Anfärbung mit Trypanblau konnte zudem die Vitalität der Zellen beurteilt werden. Für die Versuche wurden Zellen verwendet, die mindestens 4- und maximal 15-mal passagiert wurden.

2.2.4 RNS-Isolation Zellkultur

Zur Auswahl der am besten geeigneten Zelllinie für die Transfektionsversuche wurde die native miR-31-Expression der fünf kolorektalen Adenokarzinomzelllinien mit Hilfe quantitativer Real-Time PCR untersucht.

4×10^5 Zellen der jeweiligen Zelllinie wurden in einer 6-Loch-Platte in 2 ml Medium ausgesät, hierbei wurde eine entsprechende Abweichung der Zellteilungsrate prozentual einberechnet. Anschließend wurde eine 2-tägige Inkubationszeit gewährt, nach der die Konfluenz circa 90 % betrug. Die Isolation der miRNS erfolgte mithilfe des mirVana miRNA Isolation Kits. Nach Abnahme des Mediums und Zugabe von 1000 µl Trifast konnten die Zellen mit einem Zellkratzer gelöst und in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt werden. Hierauf folgte Vermengung mit 200 µl Chloroform und nach 3-minütiger Inkubation eine 15-minütige Zentrifugation bei 12.000 g und 4 °C. Es bildeten sich drei Phasen aus, wobei die obere die gesuchte RNS enthielt. Sie wurde mit einer 1,25-fachen Menge 100-prozentigen Ethanol

verdünnt und in die hierfür vorgesehenen Filter auf den zugehörigen Sammelgefäßen pipettiert. Durch Zentrifugation (10.000 g, 1 Minute, Raumtemperatur) wurde die RNS von der Flüssigkeit getrennt und verblieb im Filter. Es folgten drei Waschvorgänge mit den bereitgestellten Waschpuffern unter selbigen Zentrifugationsbedingungen. Die RNS konnte anschließend mit 50 µl vorgeheiztem (90 °C), nukleasefreiem Wasser eluiert werden.

2.2.5 miR-31-5p-cDNS-Synthese

Nachdem fotospektrometrisch die Reinheit der RNS geprüft wurde ($A_{260}/A_{280} > 2,0$), wurden die Proben so verdünnt, dass 10 ng RNS in 5 µl Wasser vorlagen. Die Komponenten für den Mastermix wurden dem TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit entnommen.

Es wurde mit zwei unterschiedlichen spezifischen Taqman Primern gearbeitet, somit wurden nur die gesuchte miR-31-5p und das Housekeeping Gen RNU44 umgeschrieben.

Das Reaktionsgemisch bestand aus 7 µl Mastermix, 3 µl Primer und 5 µl der RNS-Probe. Aus jeder RNS-Isolation wurden zwei miR-31-5p bzw. RNU44-cDNA-Proben erzeugt, hinzu kam noch eine Negativkontrolle bei der die RNS durch nukleasefreies Wasser ersetzt wurde. Die stabilere Doppelstrang-Struktur der cDNS ermöglichte eine Lagerung bei -20 °C .

Pro Reaktion	
100 mM dNTPs (mit DTTP)	0,15 µl
MultiScribe Reverse Transkriptase	1,00 µl
10X Reverse Transcription Buffer	1,50 µl
RNase Inhibitor, 20 U/µL	0,19 µl
Nuklease-freies Wasser	4,16 µl

Tabelle 8: Zusammensetzung des Reaktionsgemisches cDNS-Synthese miR-31-5p.

Zeit (min)	°C
30	16
30	42
5	85

Tabelle 9: Reaktionszeiten der cDNS-Synthese, durchgeführt mit Master Cycler Gradient.

2.2.6 c-MET-cDNS-Synthese

Im Gegensatz zur miR-31-cDNS-Synthese wurde hier die komplette RNS in cDNS umgeschrieben. Im ersten Schritt erfolgte eine Aufreinigung der Probe durch den im QuantiTect Reverse Transcription Kit enthaltenen gDNA Wipeout Buffer. Das Reaktionsgemisch wurde für zwei Minuten auf 42 °C erwärmt und anschließend auf Eis platziert.

Komponente	Volumen/Menge
gDNA Wipeout Buffer	2 µl
RNA	500 ng
Nuklease-reies Wasser	Variabel
Endvolumen	14 µl

Tabelle 9: Zusammensetzung des Reaktionsgemisches cDNS-Synthese c-MET1.

Für die Reverse-Transkriptase-Reaktion wurden die gesamten 14 µl des vorherigen Schrittes mit dem RT-Mastermix vermischt, anschließend lief die Reaktion im Thermocycler nach nachfolgendem Zeitschema ab.

Komponente	Volumen
Quantiscript Reverse Transcriptase	1 μ l
Quantiscript RT Buffer	4 μ l
RT Primer Mix	1 μ l
RNA	14 μ l

Tabelle 10: Zusammensetzung des Reaktionsgemisches cDNS-Synthese c-MET2.

Zeit (min)	$^{\circ}$ C
15	42
3	95

Tabelle 11: Reaktionszeiten der cDNS-Synthese, durchgeführt mit Master Cycler Gradient.

2.2.7 MiR-31-5p- und c-MET-PCR

MiR-31-5p-PCR

In einer 96-Loch-Platte wurden dem Mastermix 1 μ l der generierten cDNS zugegeben, sowohl RNU44 (Housekeeper) als auch miR-31-5p. Alle Proben wurden doppelt aufgetragen, als Negativkontrolle dienten die bereits angefertigte cDNS-Negativkontrolle und Wasser.

Komponente	Pro Reaktion
Master Mix	10,00 μ l
Primer	1,00 μ l
Nukleasefreies Wasser	8,00 μ l
cDNA	1,00 μ l

Tabelle 12: Zusammensetzung des Reaktionsgemisches miR-31-5p PCR.

Die PCR-Reaktion lief nach den für TaqMan Reagenzien von StepOne Real Time PCR Systems vorgegebenen Reaktionszyklen ab. Als Reporter dienten hierbei 6-FAM-phosphoramidit, als Quencher NFQ-MGB.

C-MET-PCR

Im Gegensatz zur miR-31-5p PCR wurde hier mit SYBR-Green-Reagenzien gearbeitet. Als Housekeeper wurden Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und Beta-Actin (ACTB) verwendet. Der weitere Ablauf erfolgte nach vorherigem Procedere.

Komponente	Pro Reaktion
Master Mix	10,00 µl
Primer	2,00 µl
Nukleasefreies Wasser	2,00 µl
cDNA	1,00 µl

Tabelle 11: Zusammensetzung des Reaktionsgemisches c-MET-PCR.

Relative Quantifizierung

Dieser Schritt diente der Quantifizierung von miR-31-5p und c-MET, um die Expressionsunterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien vergleichen zu können. Da hierfür nicht die Ermittlung der exakten Kopienzahlen der Proben, sondern nur das Verhältnis der Gruppen zueinander entscheidend war, wurde entsprechend der Delta-Delta-C_t-Methode relativ quantifiziert. Hierbei wird die Expression eines Zielgens auf die Expression eines nicht regulierten, konstant exprimierten Referenzgens (housekeeping gene) bezogen und aus den Delta-C_t-Werten beider Gruppen anschließend der Delta-Delta-C_t-Wert gebildet. Um den Expressionsunterschied zwischen beiden Gruppen zu ermitteln, wird dieser Wert anschließend in die Formel $2^{-\Delta\Delta C_t}$ eingesetzt.

$$\Delta C_t = C_{t \text{ Zielgen}} - C_{t \text{ Referenzgen}}$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t \text{ Patienten}} - \Delta C_{t \text{ Kontrollen}}$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

Abbildung 5: Delta-Delta-C_t-Methode.

Der C_t-Wert (Cycle of threshold) entspricht dem Zeitpunkt bzw. dem Zyklus der PCR, in dem sich das Fluoreszenzsignal gerade deutlich von der Hintergrundstrahlung abhebt. Je niedriger der C_t-Wert ist, also je eher sich das Fluoreszenzsignal von der Hintergrundstrahlung abhebt, desto mehr Kopien des Zielgens sind zu Beginn in der Probe enthalten [63].

2.2.8 Proteinmengenbestimmung

Um in den Westernblots mit vergleichbaren Proteinmengen arbeiten zu können, wurden diese mit der BCA-Methode nach Pierce bestimmt, sowohl bei transfizierten als auch untransfizierten Zellen. Die Zellen wurden mit einem Zellkratzer in der 6-Loch-Platte vom Untergrund abgelöst, durch Zentrifugation (1000 g, 5 min) vom Nährmedium getrennt und durch die Zugabe eines Zelllysepuffers lysiert.

Der Pierce BCA Protein Assay Kit diente der Durchführung der eigentlichen Konzentrationsbestimmung nach Protokoll.

Bei dieser Methode erfolgt die Reduktion zweiwertiger Kupferionen bei der Reaktion mit Proteinen. Die einwertigen Kupferionen reagieren mit der Bicinchoninsäure (BCA) zu einem violetten Farbstoff. Deren Absorption kann bei einer Wellenlänge von 562 nm photometrisch mit VersaMax ELISA Microplate bestimmt werden. Die somit ermittelten Proteinkonzentrationen in Dreifachbestimmung wurden dann in Relation zu einer im gleichen Ansatz erstellten Eichkurve gesetzt.

2.2.9 Western Blot

Western Blot stellt ein Verfahren zum Nachweis von bestimmten Proteinen in einem Proteingemisch dar. Im ersten Schritt wurde das Proteingemisch mittels Gel-Elektrophorese in einer Trägermatrix (SDS-PAGE) entsprechend der Proteingröße (c-MET 140 bzw. 170 kDa) in einzelne Proteinbanden aufgetrennt. Der Western Blot diente in dieser Arbeit dem

Nachweis und der Quantifizierung des „Zielproteins“ c-MET und dem Vergleich der Expression dessen vor bzw. nach Transfektion der DLD1-Zelllinie. Als Referenzprotein wird wiederum GAPDH verwendet, welches 37 kDa groß ist.

SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese)

Zur Durchführung der Gelelektrophoresen wurde das Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis System der Firma Bio-Rad benutzt. Zwei Gellösungen, welche sich durch ihren PH-Wert unterscheiden, wurden zwischen die vorgesehenen Glasplatten eingebracht. Als erstes das Trenngel, in welchem sich die Proteine später nach ihrer Größe auftrennen. Während des Aushärtungsvorgangs, welcher 20 Minuten dauerte, wurde das Gel mit 70-prozentigem Isopropanol bedeckt. Anschließend wurde auf das Trenngel eine dünne Schicht Sammelgel aufgetragen, welches den Kamm für die Proteintaschen beinhaltet. Alle Gele härteten vor Verwendung eine Nacht bei 4 °C aus.

Komponente	Pro Reaktion
Wasser	4,8 ml
1,5 M Tris pH 8,8	2,5 ml
Polyacrylamid	2,5 ml
10 % SDS	100 µl
10 % APS	100 µl
Temed	5 µl

Tabelle 12: Zusammensetzung Trenngel.

Komponente	Pro Reaktion
Wasser	2,3 ml
1M Tris pH 6,8	380 µl
Polyacrylamid	380 µl
10 % SDS	30 µl
10 % APS	30 µl
Temed	5 µl

Tabelle 13: Zusammensetzung Sammelgel.

In der Elektrophoresekammer wurden der Kamm entfernt und die nun freiliegenden Taschen mit Laufpuffer gespült; dieser füllte auch die Kammer bis zur entsprechenden Markierung. Die durch die BCA ermittelten 9 µl Proteinproben wurden mit 3 µl Ladepuffer vermischt, auf 95 °C erhitzt und nach leichter Zentrifugation in die Geltaschen injiziert. Linie 1 beinhaltet wie üblich 2 µl eines Proteinstandards, Linie 2 dient der Negativkontrolle. Die Proteine bewegten sich nach Anlegen einer Spannung von 250 V und einer Stromstärke von 0,04 A in Richtung der Kathode. Die Auftrennung wurde makroskopisch anhand des Standards beurteilt und variiert zwischen 45 und 60 Minuten.

Geltransfer/Blotting

Da die Proteine in der Gelmatrix hochmolekularen Nachweissubstraten wie Antikörpern nicht zugänglich sind, wurden sie auf eine Nitrozellulosemembran überführt. Es wurde nach der SemiDry Methode gearbeitet. Die Nitrozellulosemembran sowie die Filterpapiere wurden mit Transferpuffer durchtränkt, der „Blot“ wurde mit Trans Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell und PowerPac HC High-Current Power Supply nach Protokoll bei 25 V, 0,3 A und in 75 Minuten durchgeführt.

Antikörper-Inkubation und -Detektion

Die Oberfläche der Nitrozellulosemembran ist für die Bindung von Proteinen und Antikörpern optimiert, deshalb müssen offene Bindungsstellen vor der Antikörperinkubation geblockt werden; dies geschah auf einem Schüttler in 60 Minuten mit 5 % Milchpulver, gelöst in 12ml TBST. Darauffolgend wurden der primäre GAPDH-Antikörper im Verhältnis 1:2000 und der primäre MET-Antikörper im Verhältnis 1:1000 in 12 ml Milch/TBST gelöst. Die Inkubation auf dem Schüttler erfolgte über 12 Stunden bei 4 °C. Im Anschluss wurde die restliche Flüssigkeit dekantiert und die Membran 4 mal 5 Minuten auf dem Schüttler mit TBST gewaschen. Der Sekundär-Antikörper wurde im Verhältnis 1:15000 in 12 ml Milch/TBST über 1h in einer lichtundurchlässigen Box inkubiert; nach erneutem Waschen erfolgte die Detektion der Proteinbanden mittels ODYSSEY CLx.

Die quantitative Auswertung der Western Blots wurde mithilfe der QuantityOne analysis software (Biorad, Hercules, USA) durchgeführt.

2.2.10 Transfektion

Die transiente Transfektion, also die vorübergehende Einbringung der miR-31-Plasmid-DNA in die Zielzelle, wurde mit Lipofectamine 2000 Transfection Reagent durchgeführt. Hierfür wurden $1-3 \times 10^5$ Zellen, je nach Wachstumsgeschwindigkeit der jeweiligen Zelllinie (DLD-1, Caco2), in 12-Loch-Platten ausgesät und für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert, sodass sich eine Konfluenz von ca 80 % ergab. Die Transfektionsreagenz (Verhältnis 1 µg Plasmid-DNS : 4 µl Lipofectamine in 200 µl MEM) wurde nach 20-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur jedem Ansatz zugesetzt. Um eine bestmögliche Transfektionseffizienz zu erzielen, wurden verschiedene Verhältnisse der Reagenzien getestet und die Effizienz durch die induzierte Immunfluoreszenz lichtmikroskopisch nach 3 h, 6 h, 14 h, 18 h und 24 h beurteilt. Je deutlicher die visuell wahrgenommenen Fluoreszenz, umso effektiver war die Transfektion zum entsprechenden Zeitpunkt.

Neben der mikroskopischen Beurteilung erfolgte die Kontrolle der Transfektion durch qPCR im Vergleich mit einer nichttransfizierten Zellprobe derselben Passage.

2.2.11 Plasmidvermehrung

Um eine bestmögliche Transfektionseffizienz zu erzielen, war das Austesten von verschiedenen Plasmid/Lipofectamin-Verhältnissen zu unterschiedlichen Zeitpunkten notwendig; um mit ausreichend Plasmid arbeiten zu können, wurde ein Teil der von Gene Copoeia erworbenen miRNS-31-5p- und mock-Plasmide mithilfe von XL10-Gold Ultracompetent Cells und des Plasmid Midi Kit vermehrt.

Transformation

Die Transformation erfolgte nach dem XL-10 Gold Ultracompetent Cells Protocol. Die Aufnahme der Plasmide wurde hierbei durch einen „Hitzeimpuls“ (42 °C, 30 s im Wasserbad) generiert. Durch Kultivierung auf LB-Ampicillin-Aggar wurden Zellen, die kein Plasmid aufnahmen, aussortiert, da die durch das Plamid induzierte Antibiotikaresistenz fehlte. Die sogenannte „Starter“-Kultur wurde durch Animpfen des SOC-Mediums mit einer über Nacht auf dem Aggar gewachsenen Kolonie erzeugt. Diese wurde anschließend bei 37 °C auf dem

Schüttler über Nacht inkubiert, wobei die mitotischen Zellteilungen eine exponentielle Vermehrung des Plasmids bewirkten.

Plasmidisolierung

Das Prinzip der alkalischen Lyse nutzend, wurden die Plasmide mit dem Plasmid Midi Kit isoliert. Hierbei wurde nach dem Midi Protokoll des QIAGEN Plasmid Purification Handbook vorgegangen. Die getrockneten DNA-Pallets wurden abschließend mit einer Konzentration von 200 ng/μl in TE-Puffer aliquotiert und DNA-Konzentration und -Reinheit bei 260 nm mit dem Nanodrop bestimmt.

2.3 Statistische Analyse

Zur statistischen Aufarbeitung der Daten wurde IBM Statistic Package SPSS (Version 22) genutzt. Signifikanzen wurden mit Fisher`s exact Test und Mann-Whitneys Test geprüft. Alle in-vitro-Experimente wurden dreifach durchgeführt, bei $p < 0,05$ wurden Unterschiede als statistisch signifikant angesehen. Die Studie wurde nach den REMARK-Kriterien durchgeführt.
[64]

3. Ergebnisse

3.1 Patientenkollektiv

	LM	PER	MO
UICC			
II	0	0	1
III	0	3	2
IV	10	7	0
Grading			
G2	6	2	1
G3	4	8	2
pT			
pT3	10	3	2
pT4	0	7	1
pN			
pN0	3	0	2
pN+	7	10	1
Geschlecht			
weiblich	4	4	3
männlich	6	6	0

Tabelle 14: Übersicht Patientendaten. Das mittlere Alter betrug $65,8 \pm 12,5$ Jahre.

Das Patientenkollektiv stammte aus einem größeren Kollektiv, welches bereits für Vorarbeiten genutzt wurde. Zielsetzung war es, molekulare Unterschiede in den Primärtumoren zu finden, welche die Metastasierung beeinflussen könnten. Es bestand aus 23 KRK Patienten. Metastasen traten nach einer mittleren Follow-up-Time von $9,6 \pm 2,2$ Jahren auf. Das mittlere Überleben betrug $8,4 \pm 2,1$ Jahre. In UICC-Stadium, Grading, pN sowie Geschlecht bestanden keine signifikanten Unterschiede. Bei peritonealer Metastasierung zeigte sich signifikant häufiger Stadium pT4 (LM 0/10, PER 7/10, $p=0,0015$).

3.2 miRNS-Differenzierung

3.2.1 Vergleich der miRNS-Expression bei hepatischer (LM) und peritonealer Metastasierung (PER)

Zu Beginn wurden die 23 Primärtumorproben auf Expression von 754 Ziel-miRNS und 4 Kontroll-RNS mittels TLD-Array untersucht. 275 miRNS konnten vor dem 30. Reaktionszyklus detektiert werden und wurden daraufhin weiter untersucht; hierbei zeigte sich eine signifikant differentielle Expression von 41 miRNS, dargestellt in Abbildung 6. D. h. die Expressionshöhe dieser miRNS unterschie sich zwischen zwei Gruppen, in diesem Fall Gruppe LM und Gruppe PER, signifikant. Eine Gruppe bildete die Referenz zu welcher die Abweichungen in der jeweils anderen Gruppe untersucht wurden. Betrachtet bzw. als signifikant angesehen wurden die miRNS, welche entweder 2-fach erhöht oder 0,5-fach vermindert exprimiert / reprimiert wurden. Im Folgenden wurden alle drei Gruppen (LM, PER, M0) miteinander verglichen.

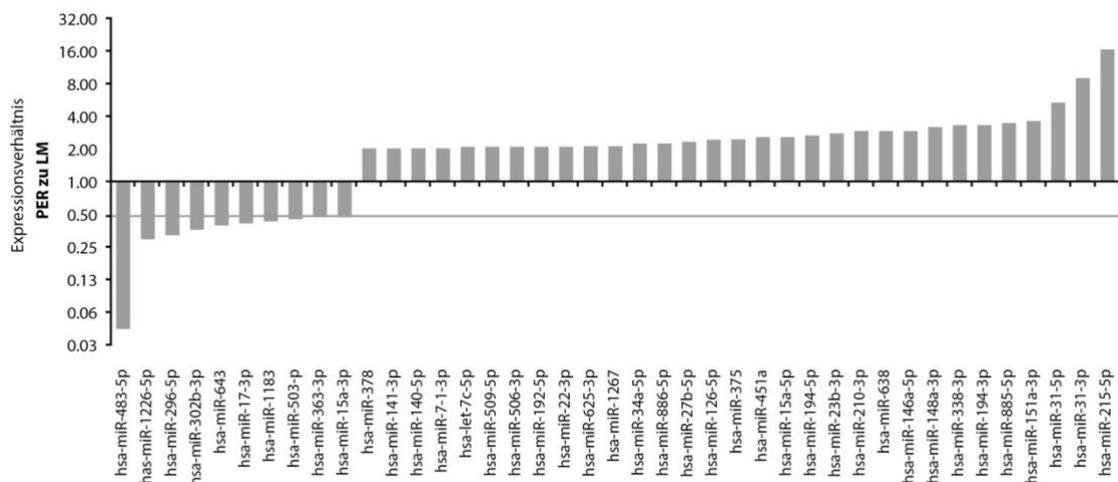


Abbildung 6: Differentielle Expression im ersten Schritt des miRNS-Arrays. 31 miRNS zeigten bei den peritoneal metastasierten Primärtumoren eine signifikant vermehrte Expression im Vergleich mit den hepatisch metastasierten, 10 miRNS zeigten sich hierbei signifikant reprimiert. Die am stärksten erhöhte Expressionen in PER zeigten miR-215-5p (17-fach) und miR-31-3p (8,9-fach) sowie miR-31-5p; miR-483-5p (0,04-fach), miR-1226-5p (0,29-fach) und miR-296-5p (0,32-fach) waren am stärksten reprimiert.

3.2.2 Vergleich der miRNS-Expression bei peritonealer Metastasierung (PER) mit Tumoren ohne Metastasierung (M0)

Im nächsten Schritt wurden die miRNS, welche spezifisch für eine Peritonealkarzinose sprechen, genauer selektioniert, indem eine zweite Bezugsebene hinzugefügt wurde. Hierzu wurde das PER-Profil mit den M0-Tumoren verglichen.

27 miRNS aus den im ersten Schritt betrachteten 41 differentiell exprimierten miRNS, zeigten auch hier eine differentielle Expression (Abbildung 7). MiR-148a-3p (2,8-fach) und miR-215-5p (3,6-fach) wurden signifikant mehr exprimiert im Vergleich zu M0, die restlichen 25 miRNS wurden reprimiert.

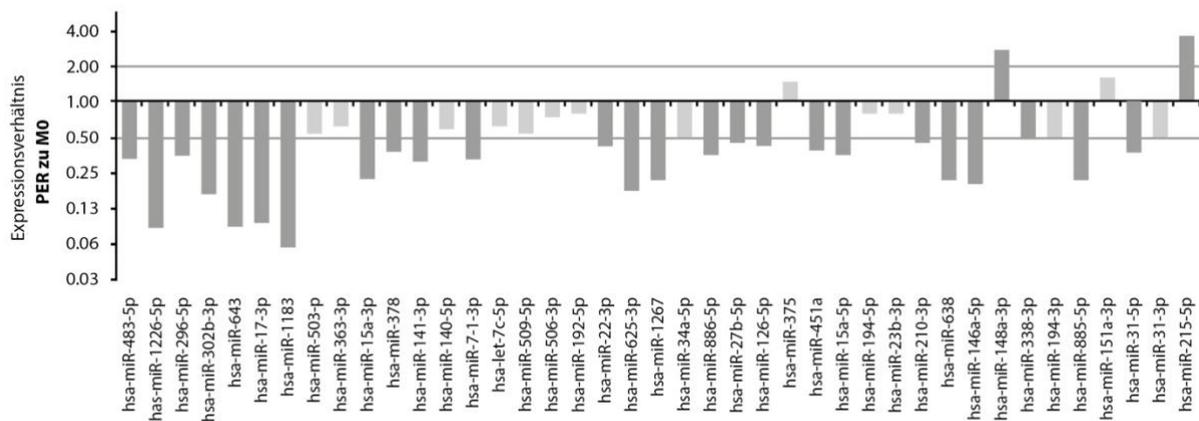


Abbildung 7: Differentielle Expression PER in Bezug zu M0. 25 miRNS wurden vermindert expimiert, 2 miRNS vermehrt.

3.2.3 Vergleich der miRNS-Expression bei hepatischer Metastasierung (LM) und Tumoren ohne Metastasierung (M0)

Im dritten Schritt erfolgte die Analyse der LM-Tumoren im Vergleich zu M0. 36 miRNS der ursprünglich 41 wurden differentiell exprimiert. MiR-483-5p (7,5-fach) zeigte eine signifikant erhöhte Expression, 35 miRNS wurden signifikant reprimiert (Abbildung 8).

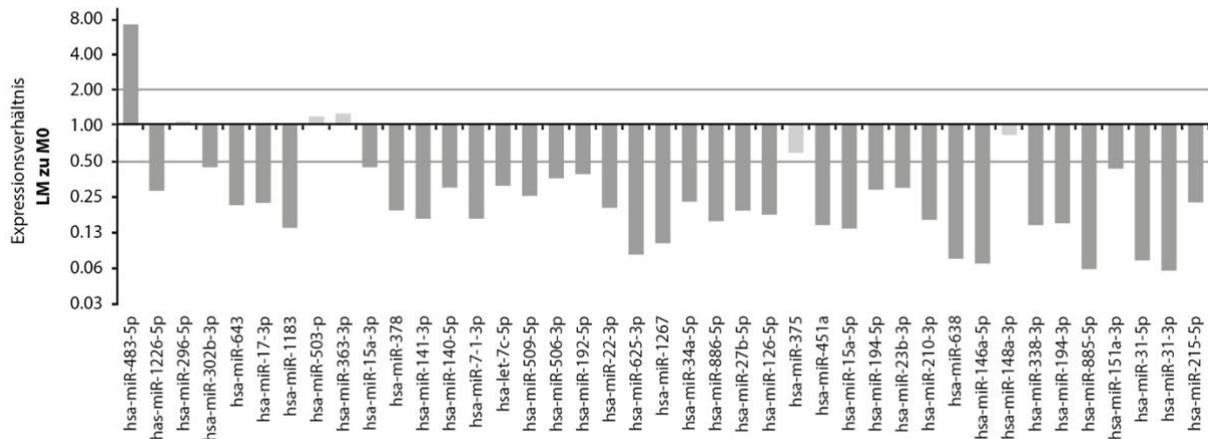


Abbildung 8: Differentielle Expression LM in Bezug zu M0. 35 miRNS wurden vermindert exprimiert, 1 miRNS vermehrt.

3.2.4 Differentielle Expression - Vergleich LM zu PER zu M0

Zusammengefasst konnte bei 25 miRNS eine „differentielle Expression“ in allen drei Vergleichen gezeigt werden.

Im ersten Schritt wurden aus 275 im miRNS-Array bestimmten miRNS (Zyklus<30) diejenigen abgegrenzt, welche sich signifikant unterschieden im Vergleich der Expression in den hepatisch metastasierten Primärtumoren (LM) zu denen, welche eine Peritonealkarzinose (PER) ausbildeten. Betrachtet wurden alle miRNS welche entweder 2-fach erhöht oder 0,5-fach vermindert exprimiert / reprimiert wurden. Zehn miRNS zeigten eine verminderte Expression, 31 eine erhöhte Expression. Insgesamt waren 41 miRNS differentiell exprimiert.

Im zweiten Schritt wurden diese 41 miRNS weiter analysiert. Gesucht wurden miRNS, welche auch in den beiden anderen Paarungen differentielle Expressionen aufwiesen, d. h. miRNS aus diesem Kollektiv, welche sich zusätzlich im Vergleich PER vs. M0 und LM vs. M0, also im

Vergleich mit der nicht metastasierten Gruppe (M0), unterschieden. Beim Vergleich peritoneale Metastasierung (PER) zu M0 konnte bei zwei miRNS eine erhöhte, bei 25 eine verminderte Expression gezeigt werden. Beim Vergleich hepatische Metastasierung (LM) zu M0 wurde nur eine miRNS vermehrt exprimiert, 35 wurden vermindert. Insgesamt 25 miRNS, zusammengefasst in Abbildung 9 sowie als „Heatmap“ dargestellt in Abbildung 10, unterschieden sich in der Expression in allen drei Beobachtungsperspektiven signifikant.

hsa-miR-483-5p	hsa-miR-1267
hsa-miR-1226-5p	hsa-miR-886-5p
hsa-miR-302b-5p	hsa-miR-27b-5p
hsa-miR-643	hsa-miR-126-5p
hsa-miR-17-3p	hsa-miR-451a
hsa-miR-1183	hsa-miR-15a-5p
hsa-miR-15a-3p	hsa-miR-210-3p
hsa-miR-378	hsa-miR-638
hsa-miR-141-3p	hsa-miR-146a-5p
hsa-miR-7-1-3p	hsa-miR-338-3p
hsa-miR-22-3p	hsa-miR-885-5p
hsa-miR-625-3p	hsa-miR-31-5p
hsa-miR-215-5p	

Abbildung 9: Übersicht 25 differentiell exprimierte miRNS LM vs. PER vs. M0.

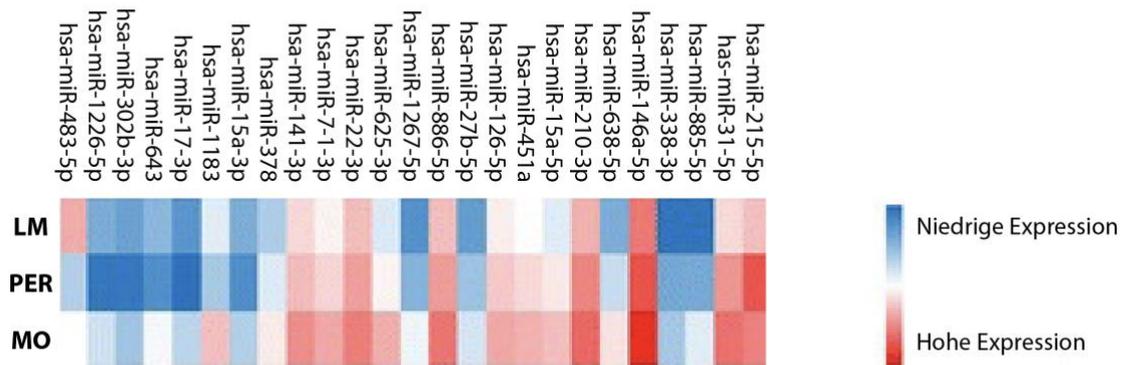


Abbildung 10: Darstellung der dreifach-differenziell exprimierten miRNS als „Heatmap“. Hierbei gibt der dCT-Wert die Signalstärke an (dCT=CT Zielgen CT „Housekeeping“ Gen). Rot steht für hohe (kleinster dCT-Wert = -2,4) und blau für niedrige (höchster dCT-Wert 11,1) Expression.

3.2.5. Validierung am Patientenkollektiv

Bezüglich der im vorherigen Abschnitt beschriebenen 25 miRNS wurde anschließend eine Literaturrecherche im Hinblick auf Verbindungen zum KRK durchgeführt. Auf der Homepage „miRCancer search algorithm“ (<http://mircancer.ecu.edu/search.jsp>) ließen sich Veröffentlichungen zu 16 dieser miRNS mit Bezug zu kolorektalen Karzinomen nach entsprechender Stichwortsuche finden.

Drei dieser miRNS wurden im Anschluss durch Einzel-PCR validiert: MiR-215-5p, miR-31-5p und miR-483-5p. Hierbei ließen sich die Ergebnisse des Arrays reproduzieren, wie in den Abbildungen 11-13 dargestellt (n (LM) = 3; n (PER) = 3; n (MO) = 3).

Zudem erfolgte eine Analyse dieser drei miRNS am Gesamtkollektiv, dargestellt in Abbildung 14 (n (LM) = 10; n (PER) = 10). Ein signifikanter Unterschied mit einem p-Wert von 0,002 konnte bei miR-31-5p gezeigt werden: Hier lag im Vergleich zu den LM-Tumoren eine 12-fach erhöhte Expression bei PER-Tumoren vor. Die weiteren Versuche auf Protein-/Effektorebene wurden daher mit miR-31-5p durchgeführt.

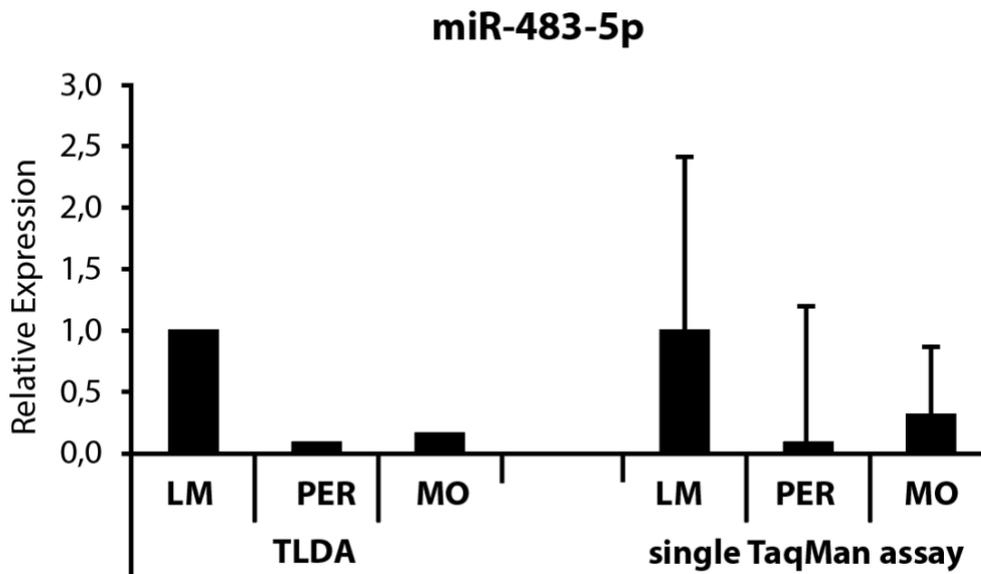


Abbildung 11: Vergleich Expression miR-483-5p im Array und als Einzel-PCR / single TaqMan assay.

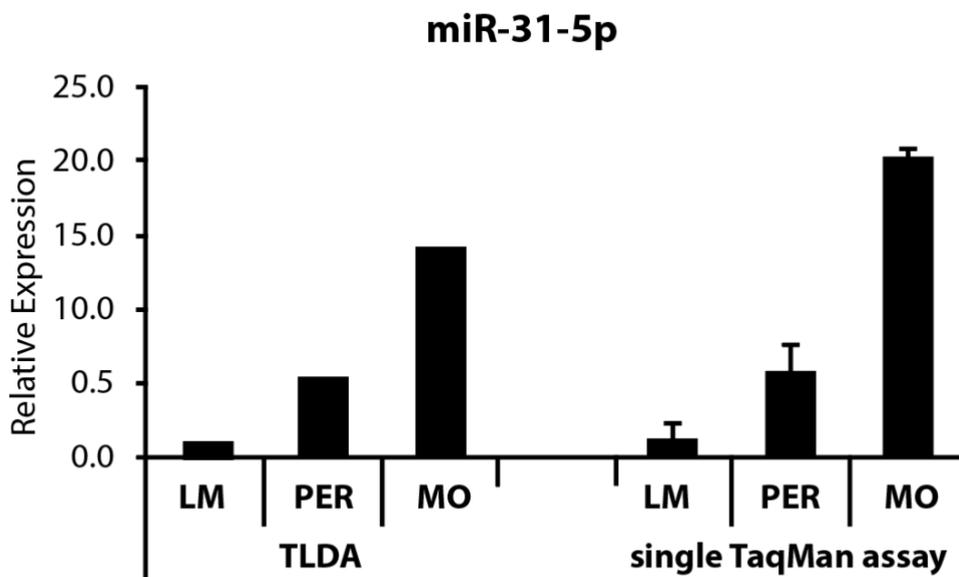


Abbildung 12: Vergleich Expression miR-31-5p im Array und als Einzel-PCR / single TaqMan Assay.

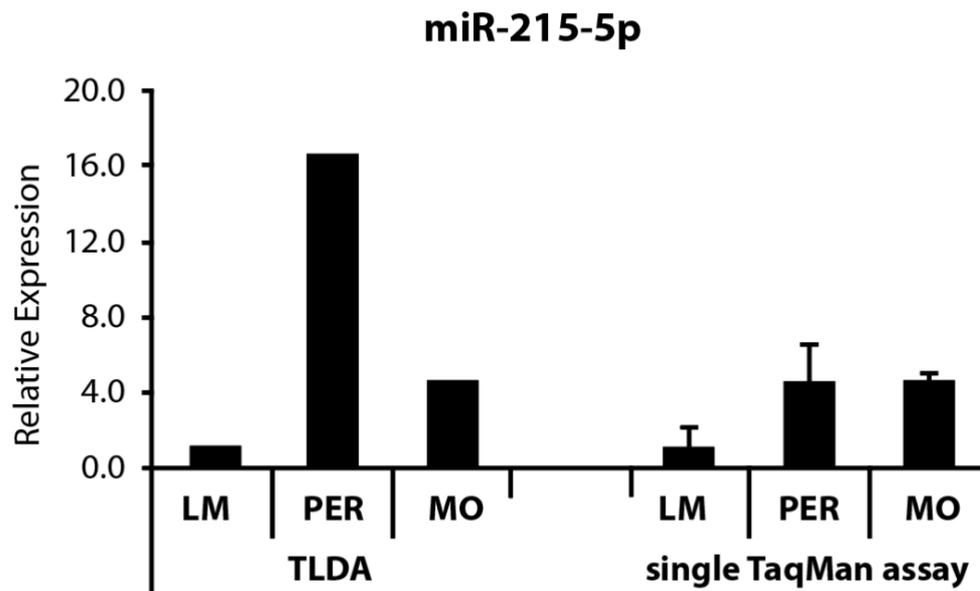


Abbildung 13: Vergleich Expression miR-215-5p im Array und als Einzel-PCR / single TaqMan Assay.

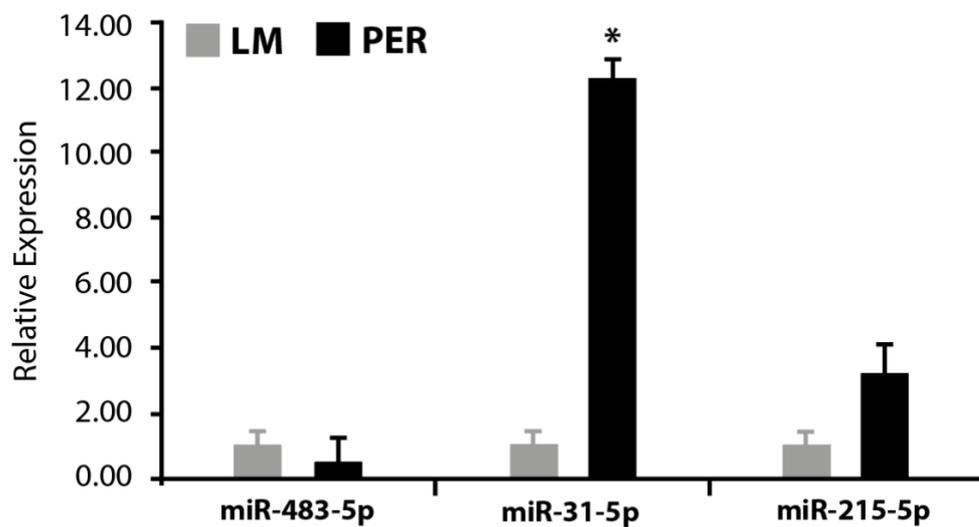


Abbildung 14: Vergleich der Expression LM vs. PER von miR-483-5p, miR-31-5p und miR-215-5p am Gesamtkollektiv. Ein signifikanter Unterschied ergibt sich bei miR-31-5p ($p=0,002$).

3.3 Regulierung des Zielgens c-MET durch miR-31-5p

3.3.1 Endogene miR-31-5p-Expression möglicher Zelllinien

Eine inverse also gegenläufige Regulation von c-MET durch miR-31-5p ist in der Literatur vorbeschrieben. In dieser Arbeit sollte dies in einer gängigen Kolonkarzinomzelllinie untersucht werden. Da die Expression von miR-31-5p in den Zellen durch transiente Transfektion verstärkt werden sollte, wurde anfangs eine Zelllinie mit vergleichsweise niedriger endogener miR-31-5p-Expression gesucht (Abbildung 15). Dies traf auf CaCo2 und DLD1 zu.

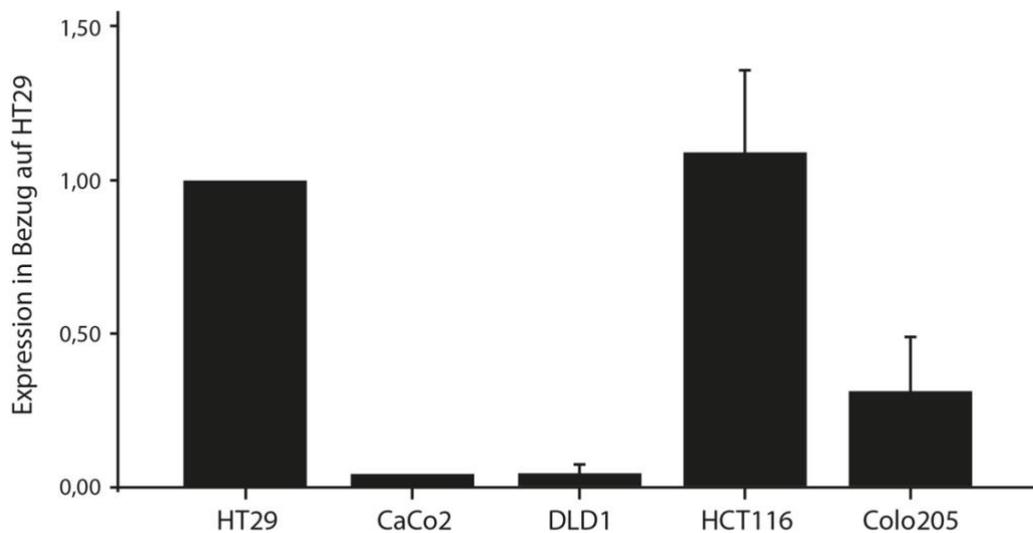


Abbildung 15: In fünf Kolonkarzinomzelllinien wurde mittels qPCR die endogene miR-31-5p-Expression bestimmt. Es handelt sich um relative Angaben, bezogen auf die Expression der Zelllinie HT29.

Die Zelllinien CaCo2 und DLD1 wurden mit einem miR-31-5p-Plasmid transfiziert, somit konnte die miR31-5p-Expression gesteigert werden. Die Transfektionseffizienz wurde mikroskopisch anhand der Immunfluoreszenz beurteilt und anschließend durch PCR bestätigt. Hierbei zeigte sich bei der DLD1-Zelllinie eine deutlich effektivere Transfektion als bei CaCo2, daher wurden DLD1-Zellen für die weiteren Versuche genutzt.

3.3.2 Maximale Überexpression 14 Stunden nach Transfektion

Die Transfektionseffizienz wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten überprüft. In Abbildung 16 sind die miR-31-5p-Expressionen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transfektion zu sehen. Es zeigte sich eine signifikante Steigerung der miR-31-Expression nach 14 Stunden im Vergleich zur nicht transfizierten Kontrollgruppe. Nach 18 Stunden war die Expression schon wieder deutlich vermindert, sodass 14 Stunden nach Transfektion der höchste miR-31-5p-Spiegel zu erwarten war.

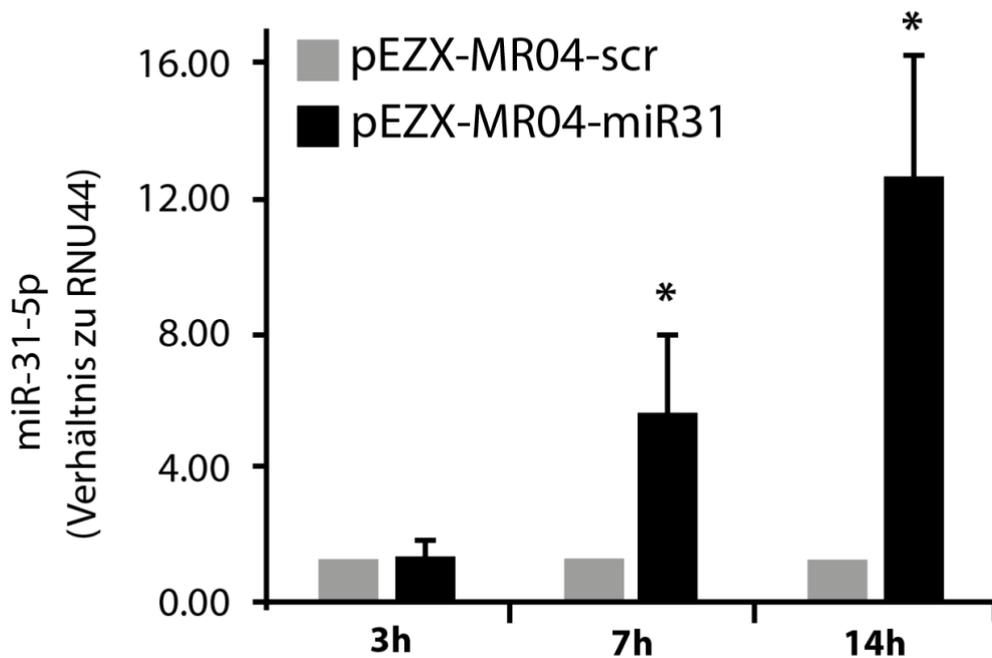


Abbildung 16: Um die Transfektionseffizienz zu optimieren, erfolgte eine Überprüfung der miR-31-5p-Expression zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transfektion. Die transfizierten DLD1-Zellen zeigten 14 Stunden nach Transfektion eine signifikant gesteigerte miR-31-5p-Expression im Vergleich zu einer mit einem „leeren“ Plasmid transfizierten, Kontrollgruppe. Es erfolgten weitere Kontrollen nach 18 und 21 h (nicht aufgetragen), wobei hier die Expression sowohl makroskopisch als auch in der PCR vermindert war.

3.3.3 miR-31-5p beeinflusst c-MET auf Proteinebene

Ein Zusammenhang zwischen miR-31-5p und c-MET wurde auf Protein-/Effektorebene mittels Western Blot überprüft. Aus der Zellcharge, aus der die miRNS 14 Stunden nach Transfektion entnommen wurde, erfolgte die Isolation des Gesamtproteins zum selben Zeitpunkt. Die Western Blots zeigten eine signifikante Verminderung von c-MET bei gesteigerter miR-31-5p-Expression (0.53 fach, $p < 0,001$), zu sehen in Abbildung 17. Es konnte damit gezeigt werden, dass miR-31-5p in DLD1 Kolonkarzinomzellen das Effektorprotein c-MET invers reguliert.

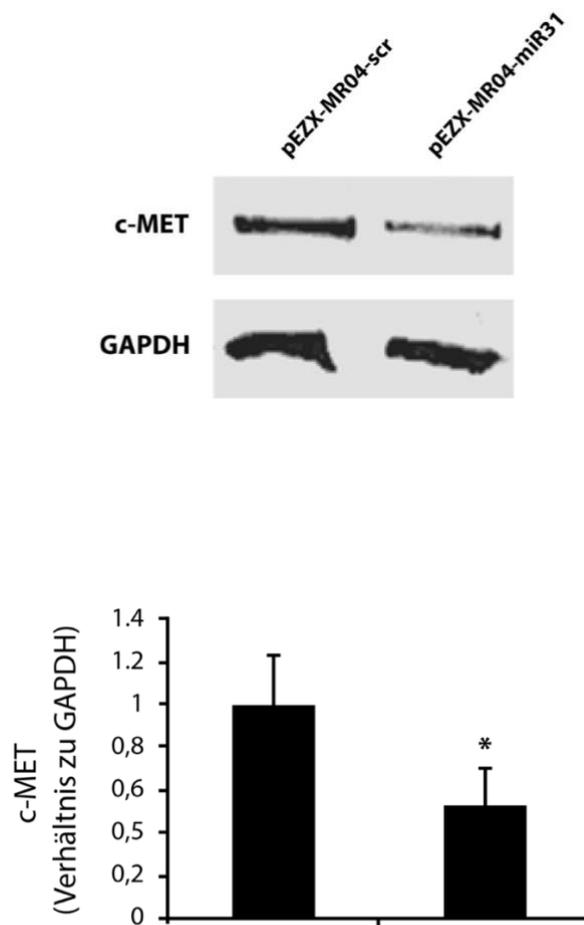


Abbildung 17: Es wurde der Einfluss von miR-31-5p auf das Effektorprotein c-MET untersucht. Im Western Blot zeigte sich im Vergleich mit dem „leeren“ Plasmid eine signifikante Verminderung von c-MET. Die DLD1-Zellen wurden wie beschrieben transfiziert, das Protein wurde resultierend durch die in 3.5.1 beschriebene Effizienzüberprüfung nach 14 h isoliert. GAPDH wurde sowohl in der PCR als auch im Western Blot als Referenzgen benutzt.

4. Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Diese Untersuchung wurde an den kolorektalen Primärtumoren von 23 Patienten durchgeführt, von denen jeweils zehn Patienten eine hepatische oder peritoneale Metastasierung (synchron oder metachron) aufwiesen; drei Patienten ohne Metastasierung wurden als Kontrollen eingeschlossen.

Es erfolgte die Erstellung von miRNS-Profilen dieser Primärtumore. Der Vergleich von peritoneal metastasierten (PER) Tumoren zu hepatisch metastasierten (LM) Tumoren zeigte 41 differentiell exprimierte miRNS. Im nächsten Schritt wurden die hepatisch metastasierten Tumore mit den M0-Tumoren verglichen. Hier unterschied sich die Expression von 27 der anfänglich 41 gefundenen miRNS. Anschließend wurden die hepatisch metastasierten Tumore mit M0-Tumoren verglichen, wobei sich eine differentielle Expression bei 35 miRNS zeigte. Insgesamt zeigten 25 miRNS eine differentielle Expression in allen drei Betrachtungen, d. h. sie unterschieden sich in den Vergleichen LM vs. PER, PER vs. LM und PER vs. M0. Hieraus kann gefolgert werden, dass diese miRNS die Metastasierungstendenz relevant beeinflussen.

Eine Literaturrecherche erbrachte Publikationen über 16 dieser 25 miRNS mit Bezug zu KRK: Bei miR-215-5p, miR-31-5p und miR-483-5p war eine Beeinflussung des Tumorprogresses in der Literatur vorbeschrieben. Diese drei miRNS wurden anschließend am Gesamtkollektiv evaluiert.

Die Expression von miR-215-5p (3,23-fach) und miR-31-5p (12,27-fach) zeigten sich erhöht im Vergleich der peritoneal metastasierten zur hepatisch metastasierten Gruppe in der Validierung am Gesamtkollektiv, die von miR-483-5p (0,51-fach) vermindert. Die Ergebnisse der Einzel-PCRs bestätigten die des Arrays.

Einzig miR-31-5p zeigte signifikante Unterschiede in der Expression, sodass eine Analyse auf Funktionsebene folgte: In Anlehnung an das von Mitamura et al bei Ovarialkarzinomen beschriebene Vorgehen [59], wurde der Einfluss von miR-31-5p auf den Hepatocyte-Growth-Factor-Receptor c-MET in vitro untersucht. Der EMT-Mediator c-MET ist Teil des onkogenen Wnt-Signalwegs und trägt damit zur Fernmetastasierung bei Karzinomen verschiedener Entitäten bei.

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine vermehrte Expression von miR-31-5p zu einer signifikant verminderten Expression von c-MET führt. MiR-31-5p supprimiert die Expression von c-MET und könnte unter anderem dadurch die Fernmetastasierung inhibieren.

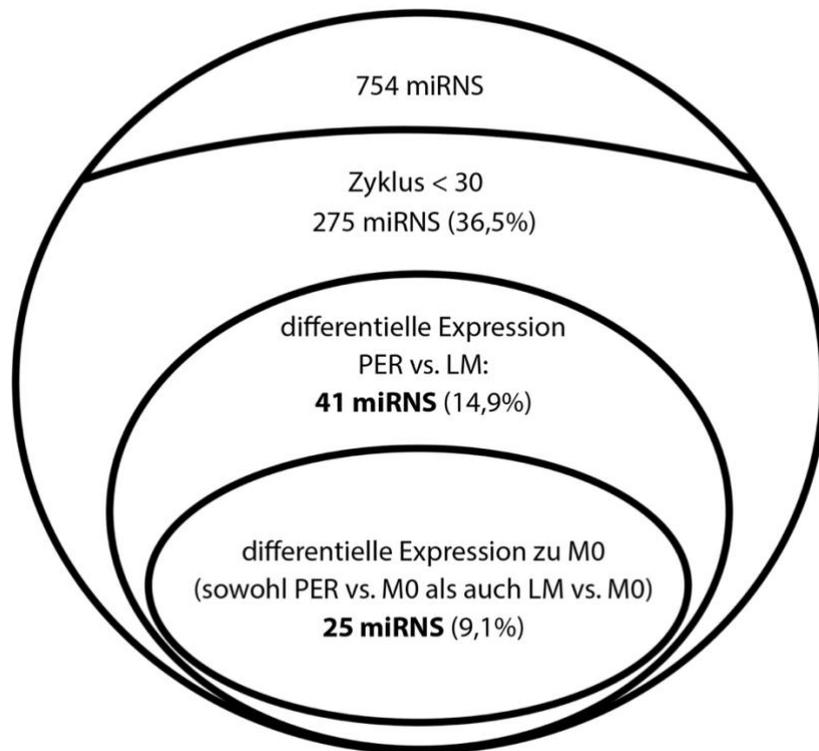


Abbildung 18: Verlauf miRNS-Array bis zur „dreifach“-differentiellen Expression.

4.2 Interpretationen

4.2.1 Patientenkollektiv und TLD-Array

Michael et al. untersuchten 2003 erstmalig Zusammenhänge zwischen miRNS und der Entwicklung von kolorektalen Karzinomen. Sie zeigten, dass miR-143 und miR-145 in Tumorgewebe verglichen mit gesundem Gewebe vermindert exprimiert werden [65, 66]. Heute kennt man beim KRK bereits ein umfangreicheres miRNS-Spektrum mit dazugehörigen Ziel-/Effektorproteinen [67].

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Hypothese, dass Tendenzen zu synchronem oder metachronem Metastasierungsverhalten bereits durch das molekulare Profil des Primarius vorhersagbar sind. Sie trägt damit zu einem seit einigen Jahren andauernden Umbruch bei: Weg von einem „Tumorzentrismus“, der geprägt ist durch die Vorstellung, dass den Patienten nur ein direkter therapeutischer Angriff auf die Tumorzelle langfristig hilft [68, 69], hin zu einer hoch individualisierten Medizin, bei der die Entstehung von Karzinomen als systemische Erkrankung gesehen wird und die Diagnostik und Therapie bereits auf genetischer Ebene beginnt [70].

Neumann et al. zeigten, dass durch Beurteilung von Stammzellmarkern am Primärtumor Aussagen zu einer möglichen Metastasierungstendenz gemacht werden konnten. Eine Erhöhung von β -Catenin sowie vermehrte Expression der Oberflächenmoleküle CD44 und/oder CD133 im Primärtumor sprechen für hepatische Metastasierung.

Auch in dem hier verwendeten Patientenkollektiv wurden diese Stammzellmarker immunhistochemisch überprüft. Bei zehn von zehn Patienten, die im Verlauf Lebermetastasen entwickelten, lag eine Erhöhung der Stammzellmarker vor. Nur zwei von zehn Patienten mit Peritonealkarzinose wiesen eine Erhöhung dieser Marker auf. Bei den drei Patienten ohne Metastasen konnte bei keinem Patienten eine Erhöhung festgestellt werden (Abbildungen 19 und 20).

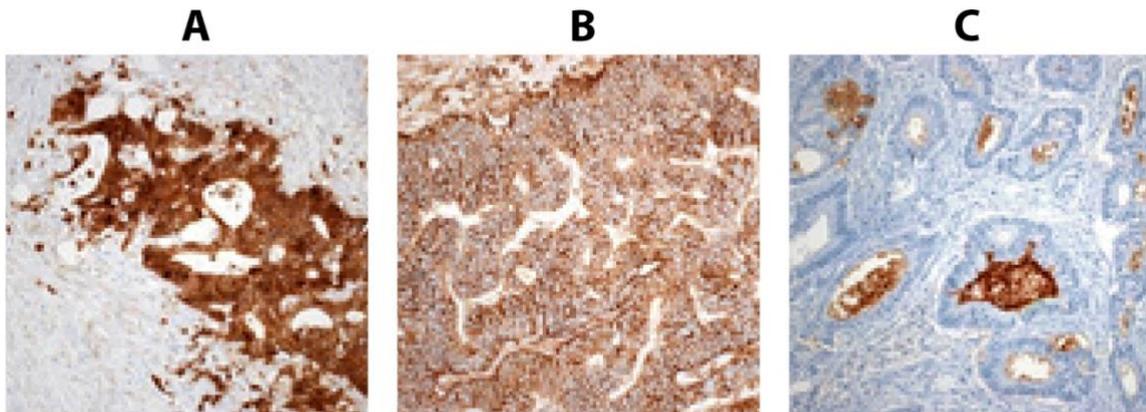


Abbildung 19: Neumann et al. beschrieben bei hepatisch metastasierenden Primärtumoren Stammzeleigenschaften, welche sich durch erhöhte Expression von β -Catenin (A), CD44 (B) und/oder CD133 (C) von peritoneal metastasierenden Tumoren unterscheiden. Dieses Kollektiv stellt eine Subgruppe der Vorarbeit dar [28].

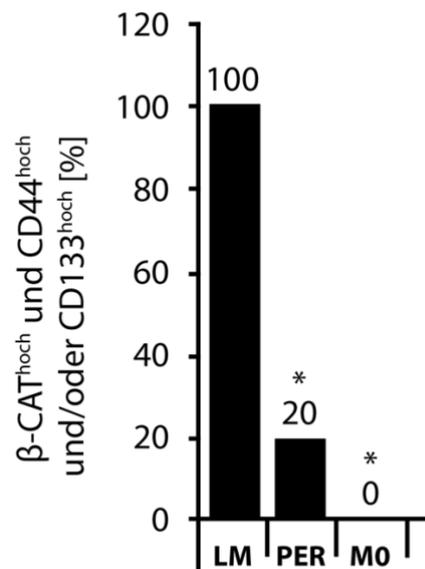


Abbildung 20: Signifikant verminderte Expression von β -Catenin, CD44 und/oder CD133 bei peritoneal metastasierten Tumoren oder Tumoren ohne Metastasen.

Die Einzelauswertungen aus diesem Kollektiv deckten sich zum Teil mit den Ergebnissen aus der, ein größeres Kollektiv umfassenden, Vorstudie (siehe Seite 10) [28].

Die Technik des TLD-Arrays erbrachte die Möglichkeit, eine große Zahl an miRNS parallel zu analysieren. Dies trug entscheidend zu dem innovativen Ansatz bei, Metastasierungswege durch molekulare Bestimmungen im Primärtumor vorhersagbar zu machen, da somit differentielle Expressionen in allen drei Vergleichsebenen dargestellt werden konnten; letztlich konnten auf diesem Weg wenige, aber signifikante miRNS-Expressionsunterschiede gefunden werden.

4.2.2 miR-215-5p

Für miR-215 konnten bereits in verschiedenen Tumorentitäten tumorsuppressive Eigenschaften nachgewiesen werden: In epithelialen Ovarialkarzinomen beschreiben Ge et al. 2016 eine Tumorsuppression durch inverse Beeinflussung des onkogenen X-Chromosome-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) [71]. Bei nicht kleinzelligen Lungenkarzinomen und Pankreaskarzinomen zeigten sich ebenfalls tumorsuppressive Eigenschaften durch Beeinflussung der zinc finger E-box-binding homeobox 2 (ZEB2) [72, 73].

MiR-215-5p lässt auch in dieser Arbeit tumorsuppressive Eigenschaften vermuten: Gezeigt werden konnte, dass erhöhte Expression dieser miRNS mit lokalem Tumorwachstum, eine Verminderung jedoch mit erhöhter Metastasierungstendenz einhergeht (LM 1, PER 4,2, M0 4,8; relatives miR-215-5p-Expressionsniveau). Khella et al. 2015 beschreiben den gleichen inversen Zusammenhang bei metastasierten Nierenzellkarzinomen [74].

Andere Arbeiten zum KRK beschreiben ebenfalls eine Suppression von Tumorwachstum durch miR-215-5p hauptsächlich in Zellkulturversuchen. Unter anderem wird sie vom Transkriptionsfaktor Caudal Type Homeobox 1 (CDX1) reguliert und zeigt inverse Wirkung auf das onkogene BMI1 und den Transkriptionsfaktor Ying-Yang 1 (YY1) [75, 76]. Allerdings können erhöhte miR-215-5p-Expressionen zu Entwicklung von Chemotherapieresistenz führen, was die Prognose wiederum verschlechtert [77]. MiR-215-5p wirkt zudem reduzierend auf die Proliferationsrate der KRK-Zelllinien RKO, LoVo und DLD1 ein und beeinflusst den Zellzyklus über den P53-Signalweg [78].

Interessanterweise scheint miR-215-5p beim Magenkarzinom onkogen zu wirken. Dies beschrieben Li et al. 2016 und Xu et al. 2015. Ein Effektorprotein hierbei ist runt-related transcription factor 1 (RUNX1) [79, 80].

Im Gegensatz zu miR-483-5p und miR-31-5p, bei welchen im Array und den Einzel-PCR ein hoher Grad an Übereinstimmung vorlag, gab es bei miR-215 eine gewisse Diskrepanz zwischen Array und Einzel-PCR in der PER-Gruppe; die Expression im Array ist höher als in der Einzel-PCR (16 vs. 4,2). Dies scheint a.e. dem relativ kleinen Patientenkollektiv und der damit einhergehenden Varianz geschuldet zu sein.

4.2.3 miR-483-5p

MiR-483-5p wird in hepatisch metastasierten Tumoren bis zu zehnfach stärker exprimiert als in M0- oder peritoneal metastasierten Tumoren, was für eine Metastasierung fördernde Wirkung spricht. Im Vergleich der Gruppen PER vs. LM war sie die am stärksten reprimierte miRNS. Es liegen bisher weniger Arbeiten zu dieser miRNS vor als zu miR-215-5p oder miR-31-5p, allerdings zeigt sie in Voruntersuchungen onkogenen Charakter. Bei Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle und Nasopharynxkarzinomen korreliert die Höhe der miR-483-5p-Expression, hier aus Primärtumorbiopsien bestimmt, mit Tumorprogress und Metastasierungstendenzen. [81, 82]. Auch beim hepatozellulären Karzinom (HCC) konnten erhöhte Spiegel von miR-483-5p im Vergleich zu Hepatitis-B-Gewebe und gesundem Lebergewebe gefunden werden. Die Autoren zeigten auch, dass die prognostische Wertigkeit der kombinierten Bestimmung von miR-483-5p und dem Tumormarker alpha-Fetoprotein (AFP) im Blutserum höher ist als die ausschließlichen Bestimmung von AFP [83]. Shen et al. 2013 beschreiben ebenfalls diesen signifikanten prognostischen Nutzen der Bestimmung von miR-483-5p im Serum bei HCC [84].

Eine vermehrte miR-483-5p-Expression und damit einhergehende schlechte Prognose konnte zudem in adrenocorticalen Karzinomen gezeigt werden [85, 86]. MiR-483-5p wird unter anderem durch den WNT/ β -Catenin Signaltransduktionsweg aktiviert, interagiert dann mit dem Rho GDP dissociation inhibitor alpha (RhoGDI1) und activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM) und begünstigt dadurch die EMT [87]. Während die o.g. Zusammenhänge für verschiedene Tumorentitäten (HCC, Lungenadenokarzinom, etc) beschrieben wurden, ist

eine die Metastasierung fördernde Wirkung von miR-483-5p für das kolorektale Karzinom bislang nicht gezeigt worden. Die Resultate dieser Arbeit lassen nun eine die EMT fördernde Wirkung von miR-483-5p annehmen.

4.2.4 miR-31-5p

Stepicheva et al. beschreiben miR-31-5p als „evolutionär hoch konservierte“ miRNS. Sie hat Einfluss auf physiologische Entwicklung - unter anderem bei der Spermatogenese, Myogenese und Embryonalentwicklung - aber auch auf die Ausbildung verschiedener Malignome. In der Tumorentwicklung hängt die Wirkweise von der jeweiligen Tumorentität ab und kann sowohl onkogener als auch tumorsuppressiver Natur sein [88].

MiR-31-5p zeigte in dieser Arbeit, als einzige aller 41 weitergehend untersuchten miRNS, einen signifikanten Unterschied im Vergleich der Expressionen hepatische vs peritonele Metastasierung bei Validierung am gesamten Patientenkollektiv.

Darüber hinaus konnte auch bei der Spleißvariante miR-31-3p eine differentielle Expression nachgewiesen werden; allerdings wurde hier das Kriterium der „dreifach“-differentiellen Expression nicht erfüllt. Diese Spleißvariante wie auch miR-31-5p scheinen prädiktive Aussagekraft bezüglich der Chemotherapieresistenz bei mit Cetuximab therapierten, metastasierten KRK-Patienten zu haben [89].

Die miR-31-5p-Expression bei KRK und daraus resultierenden Lebermetastasen betrachteten Feiersinger et al. 2016. Hier zeigte sich eine verminderte miR-31-5p Expression in den Metastasen im Vergleich zum Primärtumor. Die miR-31-5p Expression war aber in Tumorgewebe und auch in den Metastasen deutlich erhöht im Vergleich zu gesundem Kolon-/Lebergewebe. Die Autoren schließen basierend auf diesen Ergebnissen auf ein onkogenes Potential von miR-31-5p [90].

Auch in anderen Arbeiten wird eine onkogene bzw. Metastasierung fördernde Wirkung von miR-31-5p bei kolorektalen Karzinomen beschrieben. Es konnten z. B. erhöhte miR-31-5p-Expressionen bei fortgeschrittenem Tumorwachstum und schlechter Zelldifferenzierung gezeigt werden [91]. Auch eine Hemmung der Autophagozytose durch tumorassoziierte Fibroblasten wurde beschrieben [92].

Interessanterweise lassen die Ergebnisse dieser Arbeit jedoch eher tumorsuppressive bzw. „Metastasierung inhibierende“ Eigenschaften bei miR-31-5p am KRK vermuten. Sowohl in den Einzel-PCR als auch im Array liegen bei der PER-Gruppe höhere Expressionen vor als in der LM-Gruppe. Die höchste miR-31-Expression konnte bei den nicht metastasierten Tumoren (M0) gezeigt werden. Zusätzlich liegt noch die inverse Regulation des onkogenen c-MET vor.

Eine Interpretation dieser Ergebnisse bzw. ein Vergleich mit den vorher genannten Studien wird dadurch erschwert, dass diese Arbeiten Tumorgewebe mit gesundem Gewebe verglichen. Eine mögliche Erklärung besteht darin, dass miR-31-5p zwar zu Tumorstadium beitragen kann, es sich hierbei aber eher um ein lokal aggressives Wachstum handelt, welches weniger zu hämatogener Metastasierung tendiert.

Mitamura et al. haben den Zusammenhang von miR-31-5p und c-MET in Ovarialkarzinomen untersucht. Hierbei konnte auch gezeigt werden, dass miR-31-5p das onkogene c-MET invers reguliert. Hohe c-MET-Expressionen gingen mit schlechter Prognose und vermehrter Resistenz gegen Paclitaxel einher [59]. Die dortige Versuchsanordnung ähnelt der in dieser Arbeit verwendeten Anordnung und die suppressiven Eigenschaften von miR-31-5p gegen c-MET konnten in dieser Arbeit bei KRK bestätigt werden: In M0-Tumoren beträgt die miR-31-5p-Expression 20,4 mal mehr als in hepatisch metastasierten Tumoren, in peritoneal metastasierten Tumoren beträgt die Expression 5,8 mal mehr als in hepatisch metastasierten Tumoren.

In Magenkarzinomen wirkt miR-31 vermutlich auch tumorsuppressiv indem sie das zur Metastasierung beitragende RhoA-Protein supprimiert [93]. Auch bei Mammakarzinomen und Lungenkarzinomen inhibiert miR-31-5p Metastasierungen durch Regulation des onkogenen special AT-rich sequence-binding protein-2 (SATB2) und des tumorsuppressiven Hu Antigen R (HuR) [94, 95].

4.2.5 MiRNS - Prädiktion bei kolorektalen Karzinomen

Um miRNS als Prädiktoren für das Vorliegen eines kolorektalen Karzinoms oder aber auch dessen Therapieansprechen nutzen zu können, stellt die praktische Umsetzung der Probengewinnung einen limitierenden Faktor dar. Zwar ist es möglich, miRNS aus reseziertem Tumormaterial zu bestimmen, wie in diesem Versuchsaufbau geschehen. Hier ist der Nutzen aber eher eingeschränkt, da nach der Resektion keine Verlaufsbestimmungen mehr erfolgen können. Wesentlich praktikabler wäre die weniger invasive Bestimmung von miRNS in Blut, Stuhl oder Aszites, wie bereits bei anderen Entitäten beschrieben.

Bei Bestimmungen im Blut zeigten sich bei miR-92a und miR-21 annehmbare Werte für Sensitivität und Spezifität. Um die Testgüte weiter zu optimieren, ist die Bestimmung von miRNS-Gruppen effektiver als die Bestimmung einzelner miRNS [96, 97]. Zum Beispiel geben gleichzeitig erhöhte Spiegel von miR-21 und let7g und verminderte Spiegel von miR-181b, miR-92a, miR-203 und interessanterweise auch miR-31-5p im Serum Hinweise auf das Vorliegen eines kolorektales Karzinoms. Die Sensitivität beträgt hierbei 93 %, die Spezifität 91 % [98]. Speziell bei miR-21 konnte eine direkte Beeinflussung der CSCs gezeigt werden, was den Einfluss dieser miRNS nochmals unterstreicht [31].

Li et al. untersuchten im Blut miRNS-Unterschiede bei KRK-Patienten im Stadium II und III vor und nach Operation. MiR-17-3-p und miR-106a unterschieden sich hierbei signifikant und korrelierten mit vermindertem Überleben und schlechtem Ansprechen auf eine weitere Therapie. Die Autoren sprechen diesen beiden miRNS einen besonderen Stellenwert als prädiktive Biomarker zu [99].

4.2.6 c-MET

Die Rezeptortyrosinkinase c-MET spielt, wie einleitend beschrieben, eine wesentliche Rolle in der Entwicklung diverser Tumoren, z. B. durch Tumorigenese in Tumorstammzellen, Tumorprogression durch Zellproliferation/-Überleben, Chemoresistenz sowie Metastasierung. Diese zentrale Rolle macht das Protein attraktiv für zielgerichtete Therapie auf verschiedenen Ebenen [100].

Um die Signalübertragung durch c-MET zu unterbrechen, existieren mehrere Therapieansätze:

- Mit NK4 gibt es einen spezifischen Antagonisten für den c-MET-Liganden HGF. Dessen Einsatz schränkt die Invasion und Angiogenese bei metastasierten KRK ein [101, 102].
- Antikörper wie Onartuzumab oder Rilotumumab verhindern die Bindung des Liganden und Aktivierung des Rezeptors. Der Einsatz dieser Antikörper befindet sich bei verschiedenen Tumorentitäten derzeit in der klinischen Erprobungsphase [54, 103].
- Tivantinib, Foretinib und Cabozantinib sind Tyrosinkinase-Inhibitoren, welche die Phosphorylierung durch c-MET einschränken sollen. Die Anwendung befindet sich ebenfalls in der Erprobungsphase [54, 104].
- Es sind mehr als 30 miRNS bekannt, denen regulatorische Eigenschaften in Bezug auf c-MET zugeschrieben werden. MiR-1 ist in KRKs supprimiert und korreliert invers mit der Expression von c-MET, ähnlich der in diesen Versuchen gezeigten Wirkung von miR-31-5p [105]. MiR-139-5p supprimiert MET ebenfalls in NSCLCs [106]. Mitamura et al. zeigten die Suppression durch miR-31-5p bei Ovarialkarzinomen [59].

MiRNS können im Zusammenhang mit c-MET zweifach genutzt werden: Zum einen könnte durch eine Bestimmung derjenigen „Biomarker“-miRNS, die MET direkt beeinflussen, eine frühzeitige Antirezeptortherapie begründet werden. Die Bestimmung kann hier in frühen Tumorstadien am Primärresektat oder unter Umständen auch im Blut oder Stuhl durchgeführt werden. Zum anderen könnten miRNS auch direkt als Therapeutika eingesetzt werden, um die Synthese des c-MET-Proteins zu verhindern. Diese Entwicklung befindet sich noch im Anfangsstadium, allerdings konnten Sun et al. bereits eine tumorsuppressive Wirkung von miR-139-5p im Xenograft Tiermodell nachweisen. MiR-139-5p wurde BALB/c Mäusen mit NSCLCs direkt in die Tumoren appliziert, was eine signifikante Reduktion der Tumormasse zur Folge hatte [106].

4.3 Diskussion der Methoden

4.3.1 Patientenkollektiv und Probengewinnung

Das Studiendesign bedingte, dass ungefähr die Hälfte der Tumorproben Jahre vor der eigentlichen Metastasierung (metachrone Metastasierung) bzw. vor der Diagnose der Metastasierung gewonnen wurden. Damit waren die entsprechenden miRNS-Verhältnisse nur bedingt vergleichbar, insbesondere da es sich bei dem Prozess der Metastasierung um eine dynamische Situation handelt. Um exakt vergleichen zu können, müsste eine Probengewinnung exakt zum Zeitpunkt der Metastasierung erfolgen. Dies kann praktisch nicht umsetzbar sein, exakte Vergleichbarkeit war aber auch nicht die Zielsetzung. Sinnvoll wäre eine Detektion von solchen miRNS-Gruppen, welche in noch nicht metastasierten Tumoren (M0) unabhängig vom Zeitpunkt und unabhängig vom Expressionsniveau Hinweise auf die zukünftige Metastasierungstendenz geben.

4.3.2 TLD-Array und Analyse des Effektorproteins

Zu Beginn wurde RNS aus 23 Primärtumoren isoliert und anschließend ein miRNS-Profil mit dafür vorgesehenen TLD-Array-Platten erstellt. Dies wurde anschließend bei den weiter analysierten miRNS durch qRT-PCRs validiert. Hierbei handelt es sich um ein gängiges und gut validiertes Vorgehen. Andere Arbeitsgruppen wählten bei der Erstellung von miRNS-Profilen von gastrointestinalen Stromatumoren, Vulvakarzinomen, Hodgkin-Lymphomen oder auch beim KRK ein ähnliches Procedere. Im Vergleich zu diesen Studien liegt die Anzahl der Tumorproben im unteren Bereich (23 zu 33, 30, 32 und 29) [90, 107-109]. Die gewählte Gruppengröße (LM=10, PER=10 und M0=3) ließ dennoch statistisch signifikante Aussagen zu.

Frühere Studien vergleichen hauptsächlich Tumorgewebe mit nicht pathologisch verändertem Gewebe. Der in dieser Arbeit gewählte Ansatz, bereits durch Untersuchung des Primärtumors auf das Metastasierungsverhalten schließen zu können, stellt ein innovatives Unterscheidungskriterium zu anderen Arbeiten dar. Dem gegenüber ist der Probenumfang per se weniger bedeutsam. In Zukunft werden miRNS-Gruppen/-Cluster bestimmt werden müssen, um bestmögliche prädiktive Aussagekraft zu erhalten; der hier gewählte Ansatz könnte die Basis für zukünftige Versuche auch an größeren Patientenkollektiven sein.

Zur Erstellung des miRNS-Profiles wurde ein qRT-PCR-Array durchgeführt, welcher in Sensitivität und Spezifität anderen Methoden wie dem Microchip Array überlegen ist [110]. Durch die Identifikation mehrfach differentiell exprimierter miRNS (LM vs. PER, PER vs. LM und PER vs. M0) erbrachte diese Arbeit einen relativ spezifischen miRNS-Pool. Dies liegt hauptsächlich an der Darstellung mehrerer Vergleichsebenen. Wang et al. untersuchten beispielsweise 2014 miRNS-Profile von Lymphknotenmetastasen bei Mammakarzinomen. Hier wurde lediglich die differentielle miRNS-Expression zwischen Lymphknotenmetastasen und physiologischem Lymphknotengewebe betrachtet. Es ergaben sich hierbei 13 differentiell exprimierte miRNS, Relevanz wurde den miRNS mit den größten Expressionsunterschieden beigemessen [111].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde neben der Erstellung der miRNS-Profile die Regulation der Rezeptortyrosinkinase c-MET durch miR-31-5p untersucht. Hierzu wurden DLD-1-Zellen, eine kolorektale Zelllinie, welche endogen eine geringe miR-31-5p-Expression aufweist, durch Lipofectamin mit einem miR-31-5p-Plasmid transient transfiziert. Die Transfektion hätte auch stabil durch Viren erfolgen können, wie z. B. bei einer Untersuchung von miR-204-5p und dem Mitglied der RAS-Onkogen-Familie RAB22A im KRK [112]. Bei weiteren Untersuchungen, wie beispielsweise im Tiermodell, wäre eine stabile Transfektion sicher vorteilhafter. Da hier aber die c-MET-mRNS und das c-MET-Effektorprotein zum Zeitpunkt der höchsten miR-31-5p-Konzentration gewonnen wurden, war eine transiente Transfektion ausreichend.

Die Transfektionseffizienz wurde erst mikroskopisch mittels Immunfluoreszenz kontrolliert und dann durch PCR bestätigt. Es zeigte sich 14 Stunden nach Transfektion eine signifikante Steigerung der Expression. Nach Transfektion wurde der Einfluss von miR-31-5p auf das Effektorprotein c-MET im Western Blot untersucht. Ähnlich gingen Myoshi et al. bei der Untersuchung von miR-139-5p und deren Effekt auf die EMT beeinflussenden Proteine Zinc finger E-Box-binding homebox 1 und 2 (ZEB1/ZEB2) und E-Cadherin vor. Durch Transfektion, PCR und Western Blot wurde dort gezeigt, dass eine Überexpression von miR-139-5p zu einer verminderten Expression von ZEB1 und ZEB2 sowie zu einer gesteigerten Expression von E-Cadherin führte. Die Autoren bestätigten diese Ergebnisse abschließend noch im Tiermodell: Hier führte die intraperitoneale Injektion von vermehrt miR-139-5p exprimierenden Zellen zur Ausbildung einer Peritonealkarzinose [113]. Entsprechend könnten auch die Ergebnisse dieser

Arbeit durch beispielsweise Injektion von transfizierten Zellen in den Zoecalpol und Beobachtung der Metastasierung im Mausmodell weiter verfolgt werden.

Zur Verifizierung der Ergebnisse wäre zudem ein umgekehrtes Vorgehen denkbar, wobei man die endogen hohe miR-31-5p-Expression einer entsprechenden Zelllinie (z. B. HCT116) unterdrückt, was dann einen Anstieg von c-MET zur Folge haben müsste.

4.4 Fazit und Ausblick

Diese Arbeit befasst sich mit dem Ansatz, molekulare Marker in Primärtumoren zu suchen, welche Einfluss oder Vorhersagekraft auf / für Metastasierungstendenzen haben könnten. Hinweise hierfür konnten anhand der Expressionen verschiedenener miRNS gefunden werden. Insbesondere miR-215-5p, miR-483-5p und miR-31-5p unterschieden sich im Vergleich zwischen hepatisch metastasierten und peritoneal metastasierten Karzinomen signifikant. Zudem ließ sich die Beeinflussung eines a.e. onkogen wirkenden Effektorproteins, der Rezeptortyrosinkinase c-MET, durch miR-31-5p zeigen.

Die Aussagekraft eines einzelnen Expressionsspiegels bzw. der Einfluss dessen auf ein Effektorprotein ist wahrscheinlich eher gering. Bei weit über tausend bisher bekannten miRNS geschehen Signaltransduktions-Regulationen wahrscheinlich durch eine Vielzahl von miRNS oder ganze miRNS-Gruppen/-Cluster. Die Entschlüsselung dieses komplexen Systems steht noch am Anfang, allerdings ist der EMT-Mediator „miRNS“ in den letzten Jahren zunehmend in den Fokus der Wissenschaft gerückt. Die Zahl der Veröffentlichungen zu diesem Thema steigt von Jahr zu Jahr. Der oben beschriebene Ansatz könnte in Zukunft als Basis für die Entschlüsselung solch geeigneter miRNS-Cluster dienen.

Unter Umständen haben miRNS-Cluster zukünftig mehr Aussagekraft als beispielsweise die bekannten Tumormarker PSA bei Prostatakarzinomen oder AFP bei HCC, da sie nicht nur für das Vorliegen eines Tumors sprechen sondern auch Hinweise auf die Metastasierungstendenz geben könnten. Auch eine Verwendung als Therapietargets/Therapeutika wäre denkbar.

5. Literaturverzeichnis

1. Inzidenzdaten KRK, in "Cancer Tomorrow ; International Agency for Research on Cancer". URL: http://globocan.iarc.fr/Pages/burden_sel.aspx. [abgerufen 22.11.2015].
2. Brenner, H., M. Kloor, und C.P. Pox, Colorectal cancer. *Lancet*, 2014. 383(9927): p. 1490-502.
3. Vatandoust, S., T.J. Price, und C.S. Karapetis, Colorectal cancer: Metastases to a single organ. *World J Gastroenterol*, 2015. 21(41): p. 11767-76.
4. Manfredi, S., et al., Epidemiology and management of liver metastases from colorectal cancer. *Ann Surg*, 2006. 244(2): p. 254-9.
5. Segelman, J., et al., Incidence, prevalence and risk factors for peritoneal carcinomatosis from colorectal cancer. *Br J Surg*, 2012. 99(5): p. 699-705.
6. Thomassen, I., et al., Incidence, prognosis, and treatment options for patients with synchronous peritoneal carcinomatosis and liver metastases from colorectal origin. *Dis Colon Rectum*, 2013. 56(12): p. 1373-80.
7. De Greef, K., et al., Multidisciplinary management of patients with liver metastasis from colorectal cancer. *World J Gastroenterol*, 2016. 22(32): p. 7215-25.
8. De Smedt, L., S. Palmans, und X. Sagaert, Tumour budding in colorectal cancer: what do we know and what can we do? *Virchows Arch*, 2016. 468(4): p. 397-408.
9. De Divitiis, C., et al., Prognostic and predictive response factors in colorectal cancer patients: between hope and reality. *World J Gastroenterol*, 2014. 20(41): p. 15049-59.
10. Ueno, H., et al., Tumour 'budding' as an index to estimate the potential of aggressiveness in rectal cancer. *Histopathology*, 2002. 40(2): p. 127-32.
11. Prall, F., Tumour budding in colorectal carcinoma. *Histopathology*, 2007. 50(1): p. 151-62.
12. Grigore, A.D., et al., Tumor Budding: The Name is EMT. *Partial EMT. J Clin Med*, 2016. 5(5).
13. Ueno, H., et al., Predictors of extrahepatic recurrence after resection of colorectal liver metastases. *Br J Surg*, 2004. 91(3): p. 327-33.
14. Okuyama, T., T. Nakamura, und M. Yamaguchi, Budding is useful to select high-risk patients in stage II well-differentiated or moderately differentiated colon adenocarcinoma. *Dis Colon Rectum*, 2003. 46(10): p. 1400-6.
15. Koelzer, V.H., I. Zlobec, und A. Lugli, Tumor budding in colorectal cancer--ready for diagnostic practice? *Hum Pathol*, 2016. 47(1): p. 4-19.
16. Wellner, U.F., U.T. Hopt, und T. Brabletz, [Tumour stem cells and metastasis]. *Zentralbl Chir*, 2010. 135(4): p. 318-22.
17. Gao, W., et al., Isolation and phenotypic characterization of colorectal cancer stem cells with organ-specific metastatic potential. *Gastroenterology*, 2013. 145(3): p. 636-46 e5.
18. Thiery, J.P., et al., Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, 2009. 139(5): p. 871-90.
19. Smith, B.N. und N.A. Bhowmick, Role of EMT in Metastasis and Therapy Resistance. *J Clin Med*, 2016. 5(2).
20. Cao, H., et al., Epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer metastasis: A system review. *Pathol Res Pract*, 2015. 211(8): p. 557-69.

21. Campbell, K. und J. Casanova, A common framework for EMT and collective cell migration. *Development*, 2016. 143(23): p. 4291-4300.
22. Sleeman, J.P. und J.P. Thiery, SnapShot: The epithelial-mesenchymal transition. *Cell*, 2011. 145(1): p. 162 e1.
23. Radisky, D.C., Epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Sci*, 2005. 118(Pt 19): p. 4325-6.
24. Gao, Z.H., et al., Differential beta-catenin expression levels are associated with morphological features and prognosis of colorectal cancer. *Oncol Lett*, 2014. 8(5): p. 2069-2076.
25. Dick, J.E., Stem cell concepts renew cancer research. *Blood*, 2008. 112(13): p. 4793-807.
26. Islam, F., et al., Translational potential of cancer stem cells: A review of the detection of cancer stem cells and their roles in cancer recurrence and cancer treatment. *Exp Cell Res*, 2015. 335(1): p. 135-47.
27. Bandhavkar, S., Cancer stem cells: a metastasizing menace! *Cancer Med*, 2016. 5(4): p. 649-55.
28. Neumann, J., et al., Cancer Stem Cell Markers Are Associated With Distant Hematogenous Liver Metastases But Not With Peritoneal Carcinomatosis in Colorectal Cancer. *Cancer Invest*, 2015. 33(8): p. 354-60.
29. Neumann, J., et al., A simple immunohistochemical algorithm predicts the risk of distant metastases in right-sided colon cancer. *Histopathology*, 2012. 60(3): p. 416-26.
30. Horst, D., et al., The cancer stem cell marker CD133 has high prognostic impact but unknown functional relevance for the metastasis of human colon cancer. *J Pathol*, 2009. 219(4): p. 427-34.
31. Yu, Y., et al., miR-21 and miR-145 cooperation in regulation of colon cancer stem cells. *Mol Cancer*, 2015. 14: p. 98.
32. Piso, P. und D. Arnold, Multimodal treatment approaches for peritoneal carcinosis in colorectal cancer. *Dtsch Arztebl Int*, 2011. 108(47): p. 802-8.
33. Ceelen, W.P. und M.E. Bracke, Peritoneal minimal residual disease in colorectal cancer: mechanisms, prevention, and treatment. *Lancet Oncol*, 2009. 10(1): p. 72-9.
34. Varghese, S., et al., Site-specific gene expression profiles and novel molecular prognostic factors in patients with lower gastrointestinal adenocarcinoma diffusely metastatic to liver or peritoneum. *Ann Surg Oncol*, 2007. 14(12): p. 3460-71.
35. Luo, X., et al., MicroRNA signatures: novel biomarker for colorectal cancer? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2011. 20(7): p. 1272-86.
36. Wang, J., et al., MicroRNAs as Regulator of Signaling Networks in Metastatic Colon Cancer. *Biomed Res Int*, 2015. 2015: p. 823620.
37. Mestdagh, P., et al., Evaluation of quantitative miRNA expression platforms in the microRNA quality control (miRQC) study. *Nat Methods*, 2014. 11(8): p. 809-15.
38. Cekaite, L., et al., MicroRNAs as growth regulators, their function and biomarker status in colorectal cancer. *Oncotarget*, 2016. 7(6): p. 6476-505.
39. Bartel, D.P., MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004. 116(2): p. 281-97.
40. Mamoori, A., et al., Modulatory roles of microRNAs in the regulation of different signalling pathways in large bowel cancer stem cells. *Biol Cell*, 2016. 108(3): p. 51-64.
41. Hussein, K., [Pathobiology of the microRNA system]. *Pathologe*, 2012. 33(1): p. 70-8.

42. Calin, G.A., et al., Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(24): p. 15524-9.
43. Garzon, R., G.A. Calin, and C.M. Croce, MicroRNAs in Cancer. *Annu Rev Med*, 2009. 60: p. 167-79.
44. He, L. und G.J. Hannon, MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet*, 2004. 5(7): p. 522-31.
45. Gao, J., et al., miR-34a-5p suppresses colorectal cancer metastasis and predicts recurrence in patients with stage II/III colorectal cancer. *Oncogene*, 2015. 34(31): p. 4142-52.
46. Rokavec, M., et al., IL-6R/STAT3/miR-34a feedback loop promotes EMT-mediated colorectal cancer invasion and metastasis. *J Clin Invest*, 2014. 124(4): p. 1853-67.
47. Davalos, V., et al., Dynamic epigenetic regulation of the microRNA-200 family mediates epithelial and mesenchymal transitions in human tumorigenesis. *Oncogene*, 2012. 31(16): p. 2062-74.
48. Clevers, H., K.M. Loh, und R. Nusse, Stem cell signaling. An integral program for tissue renewal and regeneration: Wnt signaling and stem cell control. *Science*, 2014. 346(6205): p. 1248012.
49. Valeri, N., et al., MicroRNA-135b promotes cancer progression by acting as a downstream effector of oncogenic pathways in colon cancer. *Cancer Cell*, 2014. 25(4): p. 469-83.
50. Yamada, N., et al., Tumor-suppressive microRNA-145 targets catenin delta-1 to regulate Wnt/beta-catenin signaling in human colon cancer cells. *Cancer Lett*, 2013. 335(2): p. 332-42.
51. Efferth, T., Signal transduction pathways of the epidermal growth factor receptor in colorectal cancer and their inhibition by small molecules. *Curr Med Chem*, 2012. 19(33): p. 5735-44.
52. Wang, S., et al., NF-kappaB signaling pathway, inflammation and colorectal cancer. *Cell Mol Immunol*, 2009. 6(5): p. 327-34.
53. Behrens, J., The role of the Wnt signalling pathway in colorectal tumorigenesis. *Biochem Soc Trans*, 2005. 33(Pt 4): p. 672-5.
54. Samame Perez-Vargas, J.C., et al., Role of cMET in the development and progression of colorectal cancer. *Int J Mol Sci*, 2013. 14(9): p. 18056-77.
55. Peruzzi, B. und D.P. Bottaro, Targeting the c-Met signaling pathway in cancer. *Clin Cancer Res*, 2006. 12(12): p. 3657-60.
56. Lorenzato, A., et al., Novel somatic mutations of the MET oncogene in human carcinoma metastases activating cell motility and invasion. *Cancer Res*, 2002. 62(23): p. 7025-30.
57. Gherardi, E., et al., Targeting MET in cancer: rationale and progress. *Nat Rev Cancer*, 2012. 12(2): p. 89-103.
58. Zeng, Z.S., et al., c-Met gene amplification is associated with advanced stage colorectal cancer and liver metastases. *Cancer Lett*, 2008. 265(2): p. 258-69.
59. Mitamura, T., et al., Downregulation of miRNA-31 induces taxane resistance in ovarian cancer cells through increase of receptor tyrosine kinase MET. *Oncogenesis*, 2013. 2: p. e40.
60. Lee, L.G., C.R. Connell, und W. Bloch, Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res*, 1993. 21(16): p. 3761-6.

61. Livak, K.J., et al., Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl*, 1995. 4(6): p. 357-62.
62. Higuchi, R., et al., Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)*, 1993. 11(9): p. 1026-30.
63. Rao, X., et al., An improvement of the $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostat Bioinforma Biomath*, 2013. 3(3): p. 71-85.
64. McShane, L.M., et al., Reporting recommendations for tumor marker prognostic studies (REMARK). *J Natl Cancer Inst*, 2005. 97(16): p. 1180-4.
65. Michael, M.Z., et al., Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res*, 2003. 1(12): p. 882-91.
66. Thomas, J., et al., MicroRNAs: Clinical Relevance in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci*, 2015. 16(12): p. 28063-76.
67. Perilli, L., et al., Human miRNome profiling in colorectal cancer and liver metastasis development. *Genom Data*, 2014. 2: p. 184-8.
68. Chabner, B.A. und T.G. Roberts, Jr., Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. *Nat Rev Cancer*, 2005. 5(1): p. 65-72.
69. Kobold, S., et al., Immunotherapy in Tumors. *Dtsch Arztebl Int*, 2015. 112(48): p. 809-15.
70. Ramaswamy, S., et al., A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat Genet*, 2003. 33(1): p. 49-54.
71. Ge, G., et al., miR-215 functions as a tumor suppressor in epithelial ovarian cancer through regulation of the X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis. *Oncol Rep*, 2016. 35(3): p. 1816-22.
72. Hou, Y., et al., miR-215 functions as a tumor suppressor and directly targets ZEB2 in human non-small cell lung cancer. *Oncol Lett*, 2015. 10(4): p. 1985-1992.
73. Li, Q.W., et al., MicroRNA-215 functions as a tumor suppressor and directly targets ZEB2 in human pancreatic cancer. *Genet Mol Res*, 2015. 14(4): p. 16133-45.
74. Khella, H.W., et al., miR-192, miR-194 and miR-215: a convergent microRNA network suppressing tumor progression in renal cell carcinoma. *Carcinogenesis*, 2013. 34(10): p. 2231-9.
75. Jones, M.F., et al., The CDX1-microRNA-215 axis regulates colorectal cancer stem cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015. 112(13): p. E1550-8.
76. Chen, Z., et al., MicroRNA-215 suppresses cell proliferation, migration and invasion of colon cancer by repressing Yin-Yang 1. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016. 479(3): p. 482-488.
77. Song, B., et al., Molecular mechanism of chemoresistance by miR-215 in osteosarcoma and colon cancer cells. *Mol Cancer*, 2010. 9: p. 96.
78. Boni, V., et al., miR-192/miR-215 influence 5-fluorouracil resistance through cell cycle-mediated mechanisms complementary to its post-transcriptional thymidilate synthase regulation. *Mol Cancer Ther*, 2010. 9(8): p. 2265-75.
79. Li, N., et al., miR-215 promotes malignant progression of gastric cancer by targeting RUNX1. *Oncotarget*, 2016. 7(4): p. 4817-28.
80. Xu, Y.J. und Y. Fan, MiR-215/192 participates in gastric cancer progression. *Clin Transl Oncol*, 2015. 17(1): p. 34-40.
81. Xu, H., et al., Serum miR-483-5p: a novel diagnostic and prognostic biomarker for patients with oral squamous cell carcinoma. *Tumour Biol*, 2016. 37(1): p. 447-53.

82. Zheng, X.H., et al., Plasma microRNA profiling in nasopharyngeal carcinoma patients reveals miR-548q and miR-483-5p as potential biomarkers. *Chin J Cancer*, 2014. 33(7): p. 330-8.
83. Zhang, Z., et al., Serum miR-483-5p as a potential biomarker to detect hepatocellular carcinoma. *Hepatol Int*, 2013. 7(1): p. 199-207.
84. Shen, J., et al., Exploration of genome-wide circulating microRNA in hepatocellular carcinoma: MiR-483-5p as a potential biomarker. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2013. 22(12): p. 2364-73.
85. Soon, P.S., et al., miR-195 and miR-483-5p Identified as Predictors of Poor Prognosis in Adrenocortical Cancer. *Clin Cancer Res*, 2009. 15(24): p. 7684-7692.
86. Patel, D., et al., MiR-34a and miR-483-5p are candidate serum biomarkers for adrenocortical tumors. *Surgery*, 2013. 154(6): p. 1224-8; discussion 1229.
87. Song, Q., et al., miR-483-5p promotes invasion and metastasis of lung adenocarcinoma by targeting RhoGDI1 and ALCAM. *Cancer Res*, 2014. 74(11): p. 3031-42.
88. Stepicheva, N.A. und J.L. Song, Function and regulation of microRNA-31 in development and disease. *Mol Reprod Dev*, 2016. 83(8): p. 654-74.
89. Mlcochova, J., et al., MicroRNA expression profiling identifies miR-31-5p/3p as associated with time to progression in wild-type RAS metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *Oncotarget*, 2015. 6(36): p. 38695-704.
90. Feiersinger, F., et al., MiRNA-21 Expression Decreases from Primary Tumors to Liver Metastases in Colorectal Carcinoma. *PLoS One*, 2016. 11(2): p. e0148580.
91. Schee, K., et al., Clinical relevance of microRNA miR-21, miR-31, miR-92a, miR-101, miR-106a and miR-145 in colorectal cancer. *BMC Cancer*, 2012. 12: p. 505.
92. Yang, X., et al., miR-31 affects colorectal cancer cells by inhibiting autophagy in cancer-associated fibroblasts. *Oncotarget*, 2016.
93. Chen, Z., et al., MiR-31 Regulates Rho-Associated Kinase-Myosin Light Chain (ROCK-MLC) Pathway and Inhibits Gastric Cancer Invasion: Roles of RhoA. *Med Sci Monit*, 2016. 22: p. 4679-4691.
94. Luo, L.J., et al., MiR-31 inhibits migration and invasion by targeting SATB2 in triple negative breast cancer. *Gene*, 2016. 594(1): p. 47-58.
95. Xu, H., et al., MiR-31 Functions as a Tumor Suppressor in Lung Adenocarcinoma Mainly by Targeting HuR. *Clin Lab*, 2016. 62(4): p. 711-8.
96. Ren, A., et al., Detection of miRNA as non-invasive biomarkers of colorectal cancer. *Int J Mol Sci*, 2015. 16(2): p. 2810-23.
97. Ahmed, F.E., et al., Diagnostic microRNA markers to screen for sporadic human colon cancer in blood. *Cancer Genomics Proteomics*, 2012. 9(4): p. 179-92.
98. Wang, J., et al., Identification of a circulating microRNA signature for colorectal cancer detection. *PLoS One*, 2014. 9(4): p. e87451.
99. Li, J., et al., Serum miRNA expression profile as a prognostic biomarker of stage II/III colorectal adenocarcinoma. *Sci Rep*, 2015. 5: p. 12921.
100. Zhang, J. und A. Babic, Regulation of the MET oncogene: molecular mechanisms. *Carcinogenesis*, 2016. 37(4): p. 345-55.
101. Parr, C., et al., Nk4, a new HGF/SF variant, is an antagonist to the influence of HGF/SF on the motility and invasion of colon cancer cells. *Int J Cancer*, 2000. 85(4): p. 563-70.
102. Wen, J., et al., Hepatic gene expression of NK4, an HGF-antagonist/angiogenesis inhibitor, suppresses liver metastasis and invasive growth of colon cancer in mice. *Cancer Gene Ther*, 2004. 11(6): p. 419-30.

103. Bendell, J.C., et al., Treatment rationale and study design for a randomized, double-blind, placebo-controlled phase II study evaluating onartuzumab (MetMAB) in combination with bevacizumab plus mFOLFOX-6 in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer*, 2013. 12(3): p. 218-22.
104. Shali, H., et al., IGF1R and c-met as therapeutic targets for colorectal cancer. *Biomed Pharmacother*, 2016. 82: p. 528-36.
105. Migliore, C., et al., MiR-1 downregulation cooperates with MACC1 in promoting MET overexpression in human colon cancer. *Clin Cancer Res*, 2012. 18(3): p. 737-47.
106. Sun, C., et al., Hsa-miR-139-5p inhibits proliferation and causes apoptosis associated with down-regulation of c-Met. *Oncotarget*, 2015. 6(37): p. 39756-92.
107. Xiao, J., Q.X. Wang, and Y.Q. Zhu, Altered expression profile of micrnas in gastric stromal tumor. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2015. 35(6): p. 842-50.
108. Yang, X. und X. Wu, miRNA expression profile of vulvar squamous cell carcinoma and identification of the oncogenic role of miR-590-5p. *Oncol Rep*, 2016. 35(1): p. 398-408.
109. Paydas, S., et al., Micro-RNA (miRNA) profile in Hodgkin lymphoma: association between clinical and pathological variables. *Med Oncol*, 2016. 33(4): p. 34.
110. Chen, Y., et al., Reproducibility of quantitative RT-PCR array in miRNA expression profiling and comparison with microarray analysis. *BMC Genomics*, 2009. 10: p. 407.
111. Wang, B., et al., miRNA expression in breast cancer varies with lymph node metastasis and other clinicopathologic features. *IUBMB Life*, 2014. 66(5): p. 371-7.
112. Yin, Y., et al., miR-204-5p inhibits proliferation and invasion and enhances chemotherapeutic sensitivity of colorectal cancer cells by downregulating RAB22A. *Clin Cancer Res*, 2014. 20(23): p. 6187-99.
113. Miyoshi, J., et al., MiR-139-5p as a novel serum biomarker for recurrence and metastasis in colorectal cancer. *Sci Rep*, 2017. 7: p. 43393.

6. Veröffentlichungen

Heublein, S., et al., Association of differential miRNA expression with hepatic vs. peritoneal metastatic spread in colorectal cancer. *BMC Cancer*, 2018. 18(1): p. 201.

7. Material

7.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

ASSISTENT-Zählkammer n. Neubauer doppelt, mit CE-Zeichen	RAINER Medizintechnik, Frensdorf, D
Axiovert 40 CFL Inverse Mikroskope	Carl Zeiss, Jena, D
Binder CB 210 - CO2-Inkubator	BINDER GmbH, Tuttlingen, D
DNA-Workstation	UniEquip Laborgerätebau- und Vertriebs GmbH, Planegg, D
Eppendorf Centrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg, D
Eppendorf Centrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg, D
Eppendorf Research Plus Pipetten	Eppendorf, Hamburg, D
Eppendorf SafeLock Tubes	Eppendorf, Hamburg, D
Falcon™ 50mL Conical Centrifuge Tubes	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Falcon™ Disposable Polystyrene Serological Pipets	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
HERAsafe KS12 Sicherheitswerkbank	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
LMS Personal Mini-centrifuge GMC-060 MCF-2360	Lab Unlimited, Dublin, IR
Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg, D
MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode (0,1 ml)	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
MicroAmp Optical Adhesive Film	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
Mini-PROTEAN® Tetra Electro-phoresis System	Bio-Rad, Hercules, USA
Minitron Schüttelinkubator	Infors AG, Bottmingen, CH
Nano Drop 2000 c	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Nunc Cell-Culture Treated Multidishes	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Nunc EasYFlask 175 cm ²	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
ODYSSEY® CLx	Li-Cor Biosciences GmbH, Lincoln, USA
Odyssey® Nitrocellulose Membrane	Li-Cor Biosciences GmbH, Lincoln, USA
Pipetboy acu 2	Integra Biosciences AG, Zizers, CH

PowerPac™ HC High-Current Power Supply	Bio-Rad, München, D
Rotamax 120 Plattformschüttler	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach, D
Safe-Lock Tubes	Eppendorf, Hamburg, D
Shaker MS2	IKA-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, D
Step One Real Time PCR System	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
TipOne® Filterspitzen	Starlab GmbH, Hamburg, Deutschland
TipOne® Pipettenspitzen	Starlab GmbH, Hamburg, Deutschland
Tischwaage JL1502-G/01	Mettler-Toledo, Gießen, D
TransBlot® SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad, München, D
VersaMax ELISA Microplate Reader	Molecular Devices, Biberach, D
VX-200 Lab Vortexer	Labnet International, Edison, USA

7.2 Chemikalien

2-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, St.Louis, USA
2-Propanol (70%)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Casein Hydrolysat	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
D-(+)-Glucose	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Dimethyl Sulfoxid	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Ethanol (99,9%)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Glycin (C ₂ H ₅ NO ₂)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
LB-Agar (Luria/Miller)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl ₂ x 6H ₂ O)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Magnesiumsulfat-Heptahydrat (MgSO ₄ x 4H ₂ O)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Milchpulver	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Methanol(≥99,9 %)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA

SDS(≥ 99,5 %)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
TE Puffer	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Tris-Hydrochlorid (C ₄ H ₁₁ NO ₃ · HCl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Tris Base	BioRad, München, D
Trypton/Pepton aus Casein	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Tween® 20	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D
Xylol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D

7.3 Puffer, Lösungen, Medien und Reagenzien

Nährmedium Zellkultur	RPMI-Medium-1640-1x 10 % fötales bovines Serum	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA Biochrom, Berlin, D	Zellkultur
Einfriermedium	45% RPMI-Medium-16401x 45% fötales bovines Serum 10% Dimethyl Sulfoxid	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA Biochrom, Berlin, USA	Zellkultur
Trypsin EDTA Solution		Pan Biotech, Aidenbach, D	Zellkultur
DPBS 1x		Pan Biotech, Aidenbach, D	Zellkultur
Trypan Blue Solution 0,4 %		Sigma Aldrich, St. Louis, USA	Zellkultur
peqGOLD TriFast		Peqlab Biotechnologie, Erlangen, D	RNS-Isolation

Chloroform		Sigma Aldrich, St. Louis, USA	RNS-isolation
Zellysepuffer	89,9 % Cell lysis Buffer 10 % Protease Inhibitor Cocktail 0,1 % DL-Dithiothreitol solution	Cell Signaling Technology, Denvers, USA Sigma Aldrich, St. Louis, USA Sigma Aldrich, St. Louis, USA	Protein-mengenbestimmung
Gelladepuffer	90 % 4x Protein Sample loading buffer 10 % 2-Mercaptoethanol	Li-Cor Biosciences, Lincoln, USA Sigma Aldrich, St. Louis, USA	Western Blot
10xSDS-Gelelektrophoresepuffer	250 mM Tris Base 1,9 M Glycin 1% SDS H ₂ O ad 1L		Western Blot
Transfer-Puffer (pH8,3)	39 mM Glycin 48mM Tris-HCL 0,037 % SDS 20 % Methanol H ₂ O ad 1L		Western Blot
1x Waschpuffer (TBST) (pH 7,6)	20 mM Tris-HCL 137 mM NaCl 0,1% Tween 20 H ₂ O ad 1L		Western Blot
Blocking-Puffer	5 % Milchpulver In TBST gelöst		Western Blot

Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent		Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	Transfektion
Minimum Essential Medium		Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	Transfektion
NZY ⁺ Broth (pH 7,5)	10g casein hydrolysat 5g Hefeextrakt 5g NaCl 12,5 ml 1M mgcl 12,5ml 1M Mgso4 20ml 20% Glucose H ₂ O ad 1L		Plasmid- vermehrung
LB Medium	5 g Trypton 2,5 g Hefeextrakt 5 g NaCl		Plasmid- vermehrung
LB Agar (pH 7,0)	H ₂ O ad 1L Nach Autoklavieren Zugabe von 10 ml 10 mg/ml Ampicillin Natrium Salt	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	Plasmid- vermehrung

7.4. Kits, Primer, Antikörper und Plasmide

RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit	Applied Biosystems, Carlsbad, USA	Resektat- aufbearbeitung
Megaplex™ Primer Pools, Human Pools Set v3.0	Applied Biosystems, Carlsbad, USA	cDNS-Synthese TLDA- Array

TaqMan Array Human MicroRNA A+B Cards Set v3.0	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	TLDA-Array
mirVana™ miRNA Isolation Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	RNS-Isolation
TaqMan PreAmp Master Mix	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	RNS-Isolation
Taq Man MicroRNA Reverse Transcription Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	Mi31RT+PCR
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden, D	metRT+PCR
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	Proteinmengenbestimmung
TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	PCR
QuantiTect SYBR Green PCR Kit	Qiagen, Hilden, D	PCR
Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden, D	Plasmidvermehrung
XL10-Gold Ultracompetent Cells	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	Plasmidvermehrung

Taq Man® hsa-miRNA31 micro RNA assay	AGGCAAGAUGCUGGC AUAGCU	Applied Biosystems, Carlsbad, USA	miRNA31RT+PCR
--------------------------------------	---------------------------	-----------------------------------	---------------

Taq Man® RNU44 micro RNA assay	CCTGGATGATGATAGC AAATGCTGACTGAACA TGAAGGTCTTAATTAG CTCTAACTGACT	Applied Biosystems, Carlsbad, USA	RNU44 RT+PCR
HS_ACTB_1_SG QuantiTect Primer Assay		Qiagen, Hilden, D	Met PCR
Hs_GAPDH_1_SG QuantiTect Primer Assay		Qiagen, Hilden, D	Met PCR
Hs_MET_1_SG QuantiTect Primer Assay		Qiagen, Hilden, D	Met PCR
Met (D1C2) XP® Rabbit mAb, primär Ak		Cell Signaling Technology, Denvers, USA	Western Blot
GAPDH (D16H11) XP® Rabbit mAb, primär Ak		Cell Signaling Technology, Denvers, USA	Western Blot
926-68071 IRDye® 680RD Goat anti-Rabbit IgG, sekundär Ak		Cell Signaling Technology, Denvers, USA	Western Blot

Precursor miRNA expression clone for hsa-mir-31 (pEZX-MR04)	Gene Copoeia, Rockville, USA	Zelltransfektion
miRNA scrambled control clone for pEZX-MR04	Gene Copoeia, Rockville, USA	Zelltransfektion

8. Danksagung

Herzlich bedanken möchte ich mich bei meinem Doktorvater *Prof. Dr. med. Martin Angele* für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe diesen wertvollen Einblick in die klinisch-experimentelle Forschung einer universitären Viszeralchirurgie erlangen zu können.

Besonderer Dank gilt meinen beiden Betreuern. *PD Dr. med. Markus Albertsmeier* für die allzeit kompetente Betreuung und das immer offene Ohr auch in schwierigen Momenten der Arbeit, sowie *Dr. med. Dr. rer. nat. Sabine Heublein* für die Einführung in die Welt des wissenschaftlichen Arbeitens und die Unterstützung in der grundlegenden Konzeption der Arbeit.

Außerdem möchte ich mich bei *Prof. Dr. Alexandr Bazhin, Ph.D.* für die Unterstützung und Beratung bei Fragen insbesondere hinsichtlich der technischen und statistischen Umsetzung der Arbeit bedanken. Vielen Dank auch an *Dr. rer. nat. Natasja van den Engel* für die Einarbeitung in die wesentlichen Labormethodiken der Arbeitsgruppe.

Danke zudem an meine Freunde und Kollegen *Dr. med. Daniel Härtwig, Dominic Steinke, Adrian Keidel* sowie an meine ganze Familie für die stets aufmunternden Worte und die Hilfe und Unterstützung bei der technisch-graphischen Erstellung dieser Arbeit.

9. Lebenslauf

Eidesstattliche Versicherung

Pfeifer, David

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„Differentielle miRNS-Expression bei kolorektalen Karzinomen: Vergleich zwischen
hepatischer und peritonealer Metastasierung“

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und
alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche
kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln
nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in
ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades
eingereicht wurde.

Bayreuth, 09.02.2020

David Pfeifer