

Aus dem Zentrum für Pathologie der Universität zu Köln
Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. H. P. Dienes

**Veränderte Expressionslevels der Onco-miRNA-21,
-31, und der Tumorsuppressor-miRNA-143 und -
145 im Verlauf der neoadjuvanten Therapie bei
fortgeschrittenem Rektumkarzinom**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von

Max Lay

aus Freiburg

promoviert am: 14.09.2011

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. Dr. h.c. Th. Krieg
1. Berichterstatterin: Frau Privatdozentin Dr. med. U.G. J. Drebber
2. Berichterstatter: Universitätsprofessor Dr. med. A. Hölscher

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie der Herstellung des vorliegenden Manuskripts habe ich, außer von Frau Privatdozentin Dr. med. U. G. J. Drebber, Frau Privatdozentin Dr. rer. nat. M. Odenthal und Frau Professor E. Bollschweiler, keine Unterstützungsleistungen erhalten.

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Max Lay

Köln, den 03. Februar 2011

Die dieser Arbeit zugrundeliegenden Experimente sind von mir mit Unterstützung von Frau Privatdozentin Dr. rer. nat. M. Odenthal und den medizinisch-technischen Assistenten Frau Melanie Scheffler, Frau Katharina Wendland und Herrn Ali Manav ausgeführt worden.

Danksagung

Herrn Universitätsprofessor Dr. med. H.P. Dienes möchte ich für das Ermöglichen meiner Promotion am Institut für Pathologie der Universität zu Köln danken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Privatdozentin Dr. med. U. G. J. Drebber für die Bereitstellung des interessanten Themas und für die hilfsbereite und freundliche Unterstützung bei der Durchführung.

Danken möchte ich gleichermaßen Frau Privatdozentin Dr. rer. nat. M. Odenthal für ihr unermüdliches Engagement. Ihre fachkundige und freundliche Betreuung waren mir eine große Unterstützung und Quelle der Motivation bei der Durchführung dieser Arbeit.

Bei Frau Professor E. Bollschweiler, Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-, und Tumorchirurgie, bedanke ich mich für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Daten.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei den medizinisch-technischen Assistenten Frau Melanie Scheffler, Frau Katharina Wendland, Frau Desirée Kaptein und Herrn Ali Manav für ihre fachkundige und freundschaftliche Unterstützung auf allen Ebenen der praktischen Umsetzung der Laborarbeit.

Meiner Familie ist diese Arbeit gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1	Das Rektumkarzinom	1
1.1.1	Epidemiologie	1
1.1.2	Lokalisation	3
1.1.3	Ätiologie.....	3
1.1.4	Pathogenese	5
1.1.5	Histologische Subtypen und histopathologische Klassifikationen.....	10
1.1.6	Klinisches Bild und Diagnostik	14
1.1.7	Therapeutische Aspekte	16
1.2	Micro-RNAs (miRNAs)	19
1.2.1	Einführung	19
1.2.2	Biogenese und Funktionsweise der miRNA	20
1.2.3	MiRNA und Tumorgenese.....	23
1.2.4	Bedeutung der miRNAs -21, -31, -143 und -145 für das kolorektale Karzinom.....	25
1.2.5	Auswirkung der Chemotherapie mit 5-FU auf miRNA	27
1.2.6	Zusammenhang von miRNA mit Prognose und Überlebensrate	28
1.2.7	MiRNA als Möglichkeit der therapeutischen Intervention	28
1.3	Fragestellung der Arbeit.....	30
2.	Material und Methoden	31
2.1	Materialien	31
2.2	Patientenkollektiv, Untersuchungsmaterial, Datenerhebung.....	31
2.2.1	Patientenkollektiv	31
2.2.2	Untersuchungsmaterial	32
2.2.3	Datenerhebung.....	32
2.3	Makrodissektion.....	33
2.4	RNA-Extraktion aus kolorektalem Gewebe	34
2.4.1	Entparaffinierung.....	34
2.4.2	Lyse des kolorektalen Gewebes.....	35
2.4.3	Phenol-Chloroform-Extraktion	35
2.5	Photometrische Bestimmung von Gesamt-RNA	36
2.6	Real-Time-PCR.....	37
2.6.1	CDNA-Synthese aus Gesamt-RNA.....	37
2.6.2	Real-Time-PCR	38
2.6.3	Anfertigung einer Standardreihe	43

Inhaltsverzeichnis

2.7	Normalisierung der Messung mit RNU6b	45
2.8	Pipettierung mittels Biomek Robotik Transport	45
2.9	Statistische Auswertung der Daten mit SPSS	46
3.	Ergebnisse	47
3.1	Allgemeine Beschreibung des Gesamtpatientenkollektivs	47
3.1.1	Alters- und Geschlechtsverteilung.....	48
3.1.2	Histopathologischer Differenzierungsgrad	48
3.1.3	Staging des Gesamtkollektivs	48
3.1.4	Häufigkeitsverteilung der Regressionsgrade	50
3.2	Analyse der miRNAs im Hinblick auf untersuchte Gewebe.....	52
3.2.1	Expressionslevels der miRNAs vor und nach neoadjuvanter Therapie.....	52
3.2.2	Gibt es Unterschiede der miRNAs nach Radiochemotherapie im Bezug auf das Therapieansprechen (Tumorregression)?	58
3.2.3	Gibt es einen prädiktiven Marker für das Therapieansprechen?	63
3.2.4	Zusammenhang von miRNAs mit der Prognose der Patienten	64
4.	Diskussion	67
4.1	Technische Mängel und Einfluss auf das Kollektiv	67
4.2	Expressionslevels der micro-RNAs miR-21, -143, -145 vor und nach neoadjuvanter Therapie mit 5-FU	68
4.3	Gibt es Unterschiede der miRNA nach Radiochemotherapie im Bezug auf das Therapieansprechen (Tumorregression)?	72
4.4	Gibt es einen prädiktiven Marker für das Therapieansprechen?.....	73
4.5	Zusammenhang von miRNA mit der Prognose der Patienten	73
4.6	Ausblick: MiRNA als Möglichkeit der therapeutischen Intervention	74
5.	Zusammenfassung.....	76
6.	Literaturverzeichnis	78
7.	Lebenslauf	87

Abkürzungsverzeichnis

5-FU	5-Fluorouracil
Abb	Abbildung
Ago 2	Argonaute 2
AJCC	American Joint Committee on Cancer
APC	Adenomatosis polyposis coli
BCL-2	B-cell lymphoma 2
BIC	B-cell-integration-cluster
cDNA	Complementary DNA
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
DCC	Deleted in colorectal cancer
DGCR8	DiGeorge syndrome critical region gene 8
EGF	Epidermal growth factor receptor
eIF4E	Eucaryotic initiation factor4E
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
Gy	Gray
HNPCC	Hereditäres nichtpolypöses kolorektales Karzinom
IGF-1	Insulin-like-growth-factor type 1
IRS-1	Insulin receptor substrate 1

KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
MCC	Mutated in colorectal cancer
mg/ng	Milligramm/Nanogramm
MiRNAs (miR)	Micro-RNAs
µm	Mikrometer
ml	Milliliter
nm	Nanometer
NSAID	Non-steroidal anti-inflammatory drug
PDCD4	Programmed cell death protein 4
PME	Partiellen Mesorektumexzision
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
RISC	RNA-induced silencing-complex
ROC	Receiver-operator-curve
TME	Totale Mesorektumexzision
TNM	Tumor, Lymphknoten (N), Metastase
TRBP	Trans-activation-responsive RNA-binding protein
U	Units
UICC	Union International Contre le Cancer
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WHO	World Health Organization

1. Einleitung

1.1 Das Rektumkarzinom

Es muss im Allgemeinen angemerkt werden, dass es in den folgenden Kapiteln über das Rektumkarzinom nicht immer möglich ist, selbiges gänzlich vom Kolonkarzinom zu trennen, da diese beiden Entitäten in der Literatur häufig gemeinsam unter dem Begriff des kolorektalen Karzinoms abgehandelt werden (62). Aus diesem Grund werden beide Tumoren in den folgenden einleitenden Kapiteln gemeinsam beschrieben. Wenn immer es die Literatur erlaubt, erfährt das Rektumkarzinom eine gesonderte Betrachtung.

1.1.1 Epidemiologie

Im Jahre 2002 erkrankten laut Global Cancer Statistics (66) ungefähr eine Million Menschen weltweit am kolorektalen Karzinom. Die Erkrankung macht damit 9,4% aller Krebserkrankungen weltweit aus. Bei Männern stellt das kolorektale Karzinom die vierthäufigste Krebserkrankung dar (nach Lungen-, Prostata-, und Magenkrebs), bei Frauen die dritthäufigste (nach Brustkrebs und Zervixkarzinom). Das genaue Verhältnis der an kolorektalem Karzinom erkrankten Männer zu den erkrankten Frauen ist laut Parkin et al. 1,2:1 (66).

Nach einem Bericht über Krebs in Deutschland des Robert-Koch-Institutes aus dem Jahr 2008 erkrankten in der Bundesrepublik jährlich ungefähr 37000 Männer und 36000 Frauen am kolorektalen Karzinom. Es stellt damit hierzulande, im Gegensatz zur weltweiten Statistik, bei beiden Geschlechtern die zweithäufigste Krebserkrankung dar. Männer erkranken im Mittel mit 69 Jahren während Frauen später, nämlich mit 75 Jahren erkranken. Für beide Geschlechter steht die Tumorerkrankung nicht nur ihrer

Häufigkeit nach an zweiter Stelle, sondern ist auch unter den Krebstodesursachen am zweithäufigsten vertreten (10).

Weltweit ist ein großer Unterschied im Auftreten des kolorektalen Karzinoms zu beobachten. 65% aller Neuerkrankungen sind in entwickelten Ländern mit einem sogenannten „westlichen Lebensstil“ zu verzeichnen (wodurch sich dieser Lebensstil auszeichnet wird im Abschnitt Ätiologie und Pathogenese näher erläutert). Die Inzidenz in Entwicklungsländern, besonders in West-Afrika und Süd-Asien, ist wesentlich niedriger als in entwickelten Ländern wie Nord-Amerika, Australien und West-Europa. Allerdings ist eine steigende Tendenz der Inzidenz des kolorektalen Karzinoms in vielen Entwicklungsländern, besonders im asiatischen Raum, zu beobachten (87). Man weiß, dass sich die Inzidenz bei Migranten aus Entwicklungsländern innerhalb einer Generation an die vorherrschende Inzidenz des Landes anpasst in dem sie leben (66).

Das kolorektale Karzinom ist eine Erkrankung des fortgeschrittenen Lebensalters. Nur 10% der Erkrankten ist jünger als 50 Jahre (36). Da es in Gesellschaften der westlichen Länder immer mehr ältere Menschen geben wird, kann man laut Boyle et al. davon ausgehen, dass auch die Krebslast in den kommenden Jahren weiter ansteigen wird. Boyle et al. (2005) rechnen damit, dass 2015 die Anzahl der Menschen über 65 Jahre um 22% und die der über 80jährigen um 50% ansteigen wird (13). Unter der Annahme, dass das Krebsrisiko mit dem Alter stetig zunimmt, kann man auch davon ausgehen, dass das Auftreten von Krebserkrankungen in Zukunft weiter ansteigen wird.

Mortalität und Überlebenschancen

Jährlich sterben ca. eine halbe Million Menschen weltweit am kolorektalen Karzinom. Dies entspricht etwa 50% der Neuerkrankungen (87). In Europa konnte die Mortalität im Zeitraum von 1985 – 2000 bei Männern um 10% und bei Frauen um 8% gesenkt werden (12). Auch in Deutschland ist eine stetige Abnahme der Sterberate bei beiden Geschlechtern zu verzeichnen (10).

In Deutschland liegt die kumulierte 5-Jahres-Überlebenschancen für Männer und Frauen bei 60% (10). Im Vergleich dazu beträgt sie beispielsweise in Nord-

Amerika, wo die medizinische Versorgung ebenso gut ist wie in Europa, 65%. In Osteuropa hingegen liegt die kumulierte 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit nur bei 34% und in Indien bei 30% (66).

1.1.2 Lokalisation

Laut Delaini et al. sind ca. 20 – 30% der kolorektalen Karzinome im Rektum lokalisiert (87). Ungefähr die Hälfte der rektalen Karzinome liegen in einer Entfernung von weniger als 7,5 cm zum Analsaum (9). Dies ist vor allem im Zusammenhang mit der digital-rektalen Untersuchung von Bedeutung und untermauert deren Bedeutung bei der klinischen Untersuchung. Weitere 20 – 26% der Tumoren sind im Sigmoid lokalisiert, 10% im Kolon deszendens, 13% im Kolon transversum und ca. 15 -20% sind im proximalen Kolon (Kolon ascendens und Appendix) anzutreffen (87). Vereinfacht betrachtet liegt, laut Parkin et al., somit in ca. zwei Drittel der Fälle ein Kolonkarzinom vor und in ca. einem Drittel der Fälle ein Rektumkarzinom (66). Dieses Verteilungsmuster trifft allerdings nur auf die sogenannten high-risk countries – also auf Länder mit einem „westlichen Ernährungs – und Lebensstil“ zu. In den low-risk countries – den Entwicklungsländern - treten beide Tumorentitäten hingegen gleich oft auf (87).

1.1.3 Ätiologie

Die Entstehung des kolorektalen Karzinoms ist in der Mehrzahl der Fälle multifaktoriell. Dies bedeutet, dass sowohl genetische Einflüsse als auch die verschiedensten Umweltfaktoren, sogenannte Risikofaktoren, bei der malignen Entartung eine Rolle spielen. Wie hoch der Anteil der einzelnen Faktoren an der Entstehung des Krebses ist, kann nicht abschließend beurteilt werden und wird von verschiedenen Autoren unterschiedlich angegeben. Im nun Folgenden wird zunächst auf verschiedene vermeidbare sowie unvermeidbare Risikofaktoren und im weiteren Verlauf dann auf genetische Ursachen des kolorektalen Karzinoms eingegangen.

Es ist seit längerem bekannt, dass eine besonders hohe Inzidenz an Rektumkarzinomen in Populationen mit einem sogenannten „westlichen“ Ernährungsstil zu beobachten ist. Dieser Ernährungsstil zeichnet sich durch sehr hochkalorische Kost aus, die reich an tierischen Fetten und arm an Ballaststoffen ist. Fleisch-, Alkohol- und Zigarettenkonsum sind Risikofaktoren, die bei der Karzinogenese des Rektumkarzinoms ebenfalls von Bedeutung sind. Adipositas, insbesondere die stammbetonte Adipositas mit einem erhöhten Bauchumfang (9) gilt als weiterer Risikofaktor für die Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms (45). In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass Adipositas zu einer Insulinresistenz mit erhöhten Insulinwerten im Serum führt. Dies bedingt einen höheren Serumspiegel von IGF-I (insulin-like growth factor type I), der die Proliferation der intestinalen Schleimhaut zu fördern scheint (78). Auf der anderen Seite wirkt sich der Verzehr von Gemüse, die chronische Einnahme von NSAIDs (non-steroidal anti-inflammatory drugs) sowie ausreichend physische Aktivität protektiv auf die Krebsentstehung aus (35). Auch die in letzter Zeit kontrovers diskutierte Einnahme von Hormonen bei Frauen in der postmenopausalen Phase scheint einen günstigen Effekt auf die Krebsentstehung im kolorektalen Bereich zu haben (33).

Wie schon im Absatz Epidemiologie beschrieben, ist das kolorektale Karzinom, abgesehen von der geringen Anzahl an erblichen Tumorerkrankungen, eine Erkrankung des alten Menschen. Alter ist deshalb ein bedeutender Risikofaktor für die Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms (88).

Sowohl Morbus Crohn als auch Kolitis Ulzerosa gelten als Präkanzerosen, die eine Entwicklung der Schleimhaut hin zum Rektumkarzinom begünstigen. Die Inzidenz des Rektumkarzinoms bei Kolitis Ulzerosa ist um das 20-fache im Vergleich zu Gesunden erhöht. Beim Morbus Crohn ist sowohl das Risiko für die Ausbildung eines Dünndarmkarzinoms als auch für das kolorektale Karzinom erhöht (35).

Auch die therapiebedingte Bestrahlung des Beckens bei verschiedenen Tumoren anderer Art gilt als gesicherter Risikofaktor für die Entwicklung einer Neoplasie des Kolons und Rektums (35).

Zu den erblich bedingten Formen des kolorektalen Karzinoms, die ungefähr 5 - 6% der Gesamtheit ausmachen (16), ist zu sagen, dass die Erkrankung hier schon im jüngeren Patientenalter auftritt. Das mittlere Erkrankungsalter bei der seltenen autosomal-dominant vererbten familiären adenomatösen Polyposis (FAP) liegt zum Beispiel im frühen dritten Lebensjahrzehnt (5). Oftmals tritt die Erkrankung jedoch bereits im Jugendalter auf (38). Bei der FAP entwickeln sich ab der Adoleszenz multiple (500 – 2500) adenomatöse Polypen im Kolon. Ohne medizinische Intervention bildet sich bei allen Erkrankten im Laufe des Lebens ein kolorektales Karzinom aus (87). Ursächlich für die Erkrankung ist eine Keimbahnmutation des APC-Gens. (Die Entwicklung von adenomatösen Polypen hin zu kolorektalen Karzinomen wird im Abschnitt Pathogenese genauer erläutert).

Eine weitere Gruppe erblicher Syndrome sind die nicht-polypösen kolorektalen Krebs-syndrome (HNPCC). Diese zeichnen sich, wie die oben beschriebene FAP, durch einen frühen Krankheitsbeginn aus, der meist schon im vierten Lebensjahrzehnt auftritt (91). Autosomal-dominant vererbte Formen der HNPCCs unterteilt man in Lynch I- und Lynch II-Syndrome (53). Beim Lynch I-Syndrom ist das Kolon wesentlich häufiger befallen als das Rektum. Das Lynch II-Syndrom hingegen ist charakterisiert durch das Auftreten von multiplen adenomatösen Karzinomen in betroffenen Familien. Hierbei treten Karzinome sowohl im Kolon als auch in diversen weiteren Organen wie zum Beispiel im Pankreas, Magen, Ductus Choledochus und den ableitenden Harnwegen auf. Bei Frauen in erkrankten Familien können außerdem Karzinome des Endometriums, der Brust und des Ovars auftreten (75).

Weiter sind die seltenen erblichen Erkrankungen des Peutz-Jeghers-Syndroms und der juvenilen Polyposis mit einem erhöhten Risiko für den Erwerb eines kolorektalen Karzinoms verbunden (70).

1.1.4 Pathogenese

Um die Entstehung von kolorektalen Karzinomen zu verstehen muss man wissen, dass Tumoren des Gastrointestinaltraktes aus pathologischer Sicht in drei große Gruppen

eingeteilt werden. Nämlich den nicht-neoplastischen Polypen, den neoplastischen Adenomen und den Malignomen, die wiederum zu 95% aus Karzinomen bestehen (16). Dies ist wichtig zu erwähnen, weil man seit längerem der Annahme verhaftet ist, dass sich kolorektale Karzinome aus einer Vorstufe des Krebses, nämlich den kolorektalen Adenomen entwickeln. Man nennt dieses Paradigma die „Adenom-Karzinom Sequenz“. Gestützt wird diese These durch eine Vielzahl von Erkenntnissen, von denen einige wichtige im nun Folgenden ihre Erwähnung finden sollen. Im Anschluss werden kurz die Charakteristika von Adenomen im Gegensatz zu Polypen erläutert.

Zwei wichtige Argumente, die für die Annahme der „Adenom-Karzinom-Sequenz“ sprechen ergeben sich aus folgenden Beobachtungen. Verfolgt man Patienten mit Adenomen über einen Zeitraum von 20 Jahren, so entwickelt sich in 25% der Fälle ein Karzinom am Ort des bereits vorhandenen Adenoms. Diese Erkrankungsrate ist wesentlich höher als in der Normalbevölkerung (92). Umgekehrt weiß man, dass sich die Wahrscheinlichkeit einen Krebs zu entwickeln verringert, wenn endoskopisch entdeckte Adenome entfernt werden (93). Man kann daraus also folgern, dass das Vorliegen eines Adenoms im Kolorektum, die Wahrscheinlichkeit des Patienten im Verlauf seines Lebens ein kolorektales Karzinom zu entwickeln erhöht. Diese These kann außerdem durch die Beobachtung an der familiären adenomatösen Polyposis (FAP) untermauert werden. Denn Patienten, die an einer FAP leiden entwickeln mit Sicherheit im Laufe ihres Lebens ein kolorektales Karzinom - wurde das Kolon nicht zuvor operativ entfernt (29).

Weiter konnte man Hinweise für ein neoplastisches Kontinuum vom Adenom bis hin zum Karzinom durch in vitro Versuche mit adenomatösen Zellen finden. Denn diese erwarben im Zuge ihres Wachstums Eigenschaften von Zellen eines Karzinoma in situ oder eines invasiven Karzinoms (29).

Adenome

Adenome sind charakterisiert durch eine intraepitheliale Neoplasie, die sich vor allem durch folgende zwei Merkmale auszeichnet: Das Epithel verliert die Fähigkeit sich vollständig zu differenzieren und ist in seiner Proliferationsrate dysreguliert (29). Adenome scheinen als Folge einer Mutation im APC-Gen zu wachsen. Eine Inaktivierung des

APC/betacatenin-Pfades verursacht eine Ausweitung der epithelialen Proliferation in dysplastischem Epithel von den Krypten hin zu den oberflächlichen, dem Lumen zugewandten Abschnitten der Schleimhaut.

Mikroskopische Charakteristika sind: Hyperzellularität mit vergrößerten, hyperchromatischen Kernen, die in diversen Schichtungen vorkommen und ihre Polarität verloren haben. In ihrem Aussehen können die Kerne spindelzellförmig, vergrößert und oval sein. Je nachdem wie schwer diese Charakteristika ausgeprägt sind teilt man die Adenome in low-grade oder high-grade ein. Des Weiteren werden sie histopathologisch je nach Wachstumsmuster in tubuläre, villöse und tubulovillöse Adenome eingeteilt (35). Drei der genannten Merkmale stehen besonders mit einer malignen Entartung in Zusammenhang, und zwar die Größe des Adenoms, ein villöses Erscheinungsbild und der Grad der Dysplasie der adenomatösen Zellen (64). Insgesamt entarten weniger als 1% der Adenome maligne (78).

Polypen

Schleimhaut-Wucherungen durch Proliferation des Epithels der gastrointestinalen Mukosa bezeichnet man als Polypen. In der basal gelegenen Proliferationszone der Krypten in der Kolonmukosa ist hierbei die Proliferationsrate erhöht, wodurch es zu diesen Schleimhautwucherungen kommt. Traditionellerweise werden Polypen, im Gegensatz zu Adenomen, nicht als Neoplasien bezeichnet. Neuere Studien zeigen jedoch, dass Polypen eventuell auch neoplastisch sein könnten, aber durch andere molekularpathologische Mechanismen als die Adenom-Karzinom-Sequenz zu erklären sind (35). Zu den Polypen zählt man auch: hyperplastische-, juvenile-, hamartomatöse-, entzündliche- (wie sie bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen vorkommen können) und lymphoide Polypen (16).

Molekularpathogenese

Auch auf molekularpathologischer Ebene liegen Argumente vor, die das Paradigma der „Adenom-Karzinom-Sequenz“ bekräftigen. Diese werden im Folgenden näher erläutert. Erstens konnte man beim Vergleich von Adenomen mit Karzinomen in beiden

tumorösen Veränderungen dieselben Onkogene identifizieren, was für einen gemeinsamen Ursprung der beiden Läsionen spricht. Zweitens hat man festgestellt, dass sowohl Adenome als auch Karzinome über die gleiche chromosomale Beschaffenheit verfügen, was wiederum auf einen identischen genetischen Ursprung der beiden Tumoren unterschiedlicher Ausprägung schließen lässt. Zusammengefasst sprechen beide Argumente dafür, dass sich bei der Akkumulierung bestimmter genetischer Mutationen zuerst ein Adenom und dann im Verlauf ein Karzinom entwickeln kann (29). Wie dies im Einzelnen vonstatten geht ist noch nicht abschließend aufgedeckt, es ist aber gewiss, dass es sich hierbei um komplizierte genetische und epigenetische Vorgänge handelt, bei denen eine Vielzahl von Genen involviert zu sein scheint, worauf im kommenden Absatz genauer eingegangen werden soll.

Man hat erkannt, dass sich bei der Entwicklung von einer gesunden epithelialen Zelle hin zu einer maligne entarteten Zelle zahlreiche molekulargenetische Veränderungen schrittweise akkumulieren. Wahrscheinlich sind mindestens sieben genetische Ereignisse (eine Onkogenmutation und 6 weitere Mutationen, um drei Tumorsuppressorgene zu inaktivieren) verantwortlich, um die Entwicklung einer einzelnen veränderten Zelle hin zu einem Tumor zu begünstigen (43). Es scheinen hierbei hauptsächlich zwei Ursachen, die einer malignen Entartung zugrunde liegen, von Bedeutung zu sein. Die häufigste genetische Ursache für kolorektale Karzinome resultiert aus einer chromosomalen Instabilität. Dies ist bei 85% der Tumoren zu finden. Die verbleibenden 15% entstehen aufgrund von Mikrosatelliteninstabilität (42, 50, 52). Molekulargenetisch kennzeichnen sich Neoplasien mit Mikrosatelliteninstabilität durch Veränderungen in nicht-kodierenden DNA-Sequenzen, die normalerweise in jedem Genom zu finden sind, sich oft wiederholen und als Mikrosatelliten bezeichnet werden (16).

Zunächst zur chromosomalen Instabilität als mögliche genetische Bedingung für die Genese eines Karzinoms: Unter diesem Begriff subsumiert man vor allem verschiedenste Veränderungen der Chromosomenanzahl (Aneuploidie), weiter Verluste auf molekularer Ebene von Teilen der Chromosomen 5q, 18q und 17p, sowie Mutationen des K-ras Onkogens. Zu den durch chromosomale Instabilität beeinträchtigten Genen zählen insbesondere das APC-Tumorsuppressorgen (5q) (siehe FAP im Abschnitt Ätio-

logie), das p 53-Tumorsuppressorgen (17p), sowie die Tumorsuppressoren MCC (mutated in colorectal cancer) und DCC (deleted in colorectal cancer) (18q) (43). Unter den initialen Schritten, die für die Tumorgenese von Bedeutung sind scheint immer die Inaktivierung des APC-Gens zu sein (14, 34, 41, 44). Welche spezifischen Gene von einer somatischen Mutation betroffen sind und in welcher Art und Weise sie mutieren scheint für das Ausmaß des Tumorwachstums und für die Art der pathologischen Veränderung des Tumors mitverantwortlich zu sein (43).

Bei Tumoren hingegen, denen eine Mikrosatelliteninstabilität zugrunde liegt ist vor allem das DNA-mismatch Reparatursystem defekt wobei die chromosomale Struktur an sich intakt sein kann. Aufgrund der fehlenden DNA-Reparatur-Mechanismen erwirbt die Zelle vermehrt Mutationen in krebsassoziierten Genen. Diese Veränderungen werden, im Vergleich zu einer gesunden Zelle, wo Genmutationen durch DNA-Reparatur-Systeme behoben werden können, nicht beseitigt und es kommt daraufhin zur malignen Transformation der Zelle. Auch bei Tumoren aufgrund von Mikrosatelliteninstabilität scheint der initiale Schritt ein Funktionsverlust der Produkte des APC-Gens zu sein (16).

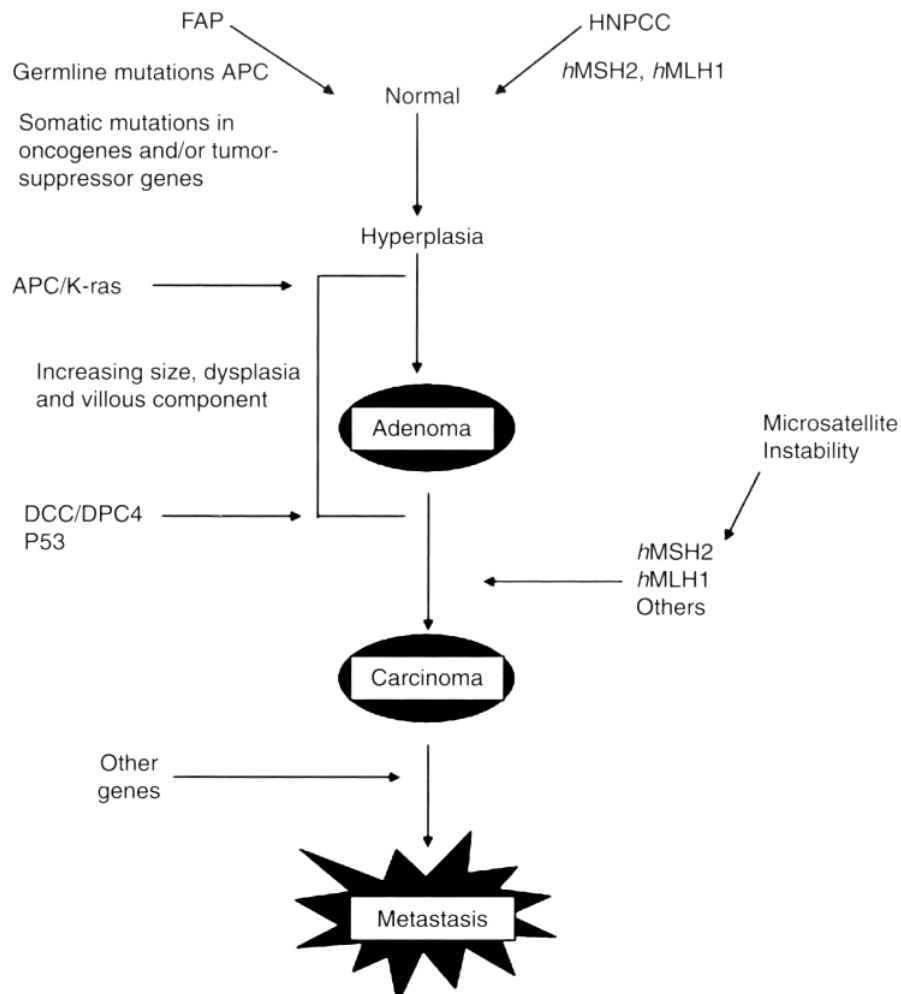


Abb. 1: Darstellung der Entwicklung von Normalgewebe hin zu kolorektalem Karzinom auf molekularer Ebene (30).

1.1.5 Histologische Subtypen und histopathologische Klassifikationen

Histologische Subtypen

Das *Adenokarzinom* ist der häufigste maligne Tumor des Kolorektums. Über 95% der malignen Neoplasien im Kolorektum werden als Karzinome klassifiziert, wovon wiederum Adenokarzinome mit 95% den Hauptanteil ausmachen (16). Man untergliedert Adenokarzinome weiter nach ihrem Differenzierungsgrad. Als entscheidendes Charak-

teristikum des Adenokarzinoms im Gegensatz zur intraepithelialen Neoplasie definiert man die Invasion der Epithelzellen durch die Muscularis mucosae in die Submukosa.

Muzinöses Adenokarzinom: Man bezeichnet einen Adenokarzinom als muzinös wenn mehr als 50% der Läsion durch extrazelluläres Muzin gebildet wird. Dieses Muzin besteht aus malignen Epithelzellen, die als Zellreste einzeln oder zu mehreren gruppiert als Azinus vorliegen können. Viele der mikrosatelliteninstabilen Karzinome gehören diesem histologischen Typ an.

Adenosquamöses Karzinom: Dieser seltene Tumor zeigt Charakteristika von squamösen Karzinomen und von Adenokarzinomen entweder in getrennten Arealen oder auch vermischt.

Medulläres Karzinom: Diese Krebsart zeichnet sich durch schichtartig angeordnete uniforme, maligne Zellen mit vesikulären Zellkernen, prominenten Nukleoli und reichlich pink gefärbtem Zytoplasma. Das medulläre Karzinom zeichnet sich weiter durch ein solides Wachstumsmuster und durch eine lymphozytäre Infiltration aus. Die Prognose ist im Vergleich zu anderen wenig differenzierten und undifferenzierten Karzinomen relativ gut.

Siegelringzell-Karzinom: Hierbei handelt es sich um ein Adenokarzinom mit einem Anteil von mehr als 50% intrazytoplasmatisch gelegenen Muzin. Dieses Muzin liegt typischerweise in einer großen Vakuole vor, die den Zellkern verdrängt. Siegelringzell-Karzinome können auch im Rahmen von muzinösen Adenokarzinomen oder als diffus-infiltrativer Prozess mit einer minimalen Ansammlung extrazellulär gelegenen Muzins vorkommen.

Undifferenziertes Karzinom: Kennzeichnendes Merkmal des undifferenzierten Karzinoms ist, wie der Name schon sagt, dass sich die Tumorzellen kaum oder gar nicht mehr gewebespezifisch differenzieren. Typischerweise sind sie mit Mikrosatelliteninstabilität assoziiert (35).

Weiter gibt es seltene Tumorformen, die hier aber wegen ihrer geringeren Bedeutung keine Erwähnung finden sollen.

Histopathologische Klassifikationen

Das Grading und das Staging sind, neben der histopathologischen Klassifikation, zwei weitere wichtige Klassifikationsformen, um tumoröses Gewebe genauer zu beschreiben und einteilen zu können. Besondere Bedeutung im klinischen Alltag haben diese Klassifikationen wegen ihrer großen prognostischen und therapeutischen Relevanz. Das Staging beschreibt das Ausbreitungsstadium des Tumors im jeweiligen Organ und im Körper und wird in den folgenden Absätzen genauer behandelt, während das Grading den Differenzierungsgrad des Tumorgewebes genauer einteilt. Es werden nach der WHO-Klassifikation drei Differenzierungsgrade von: G1 = differenziert, G2 = mäßig differenziert und G3 = gering differenziert unterschieden.

Die Grundlage aller gängigen Klassifikationssysteme für das kolorektale Karzinom hinsichtlich der Ausbreitung des Tumors ist die Klassifikation von C. Dukes aus den Jahren 1929 – 1935 (35). Ursprünglich wurde sie ausschließlich zum Staging des Rektumkarzinoms entwickelt, wurde dann aber 1945 von Dukes für das Kolonkarzinom erweitert (81). Ihr zu Grunde liegen folgende histologische Kennzeichen eines Tumors: Erstens die Eindringtiefe der Läsion in die Organwand und zweitens die An- oder Abwesenheit von Metastasen in regionären Lymphknoten. Auch die heute gängige TNM – Klassifikation fußt auf diesen histologischen Merkmalen und hat die Dukes – Klassifikation weitestgehend ersetzt (35). Die TNM-Klassifikation wird sowohl für das klinische Staging als auch für das pathologische Staging verwendet und ist beim kolorektalen Karzinom für beide identisch.

Tabelle 1: Dukes-Klassifikation (81)

A	Karzinom ohne Infiltration der Lamina propria, keine Lymphknotenmetastasen
B	Infiltration per continuitatem aller Darmwandschichten, des perikolischen und des perirektalen Weichgewebes, keine Lymphknotenmetastasen
C1	Befall der regionären perikolischen und perirektalen Lymphknoten
C2	Infiltration auch der höher gelegenen Lymphknoten entlang des resezierten Gefäßes bzw. Lymphknoten im Bereich der Gefäßligatur (sog. Grenzlymphknoten)
D	Fernmetastasen

Aus der Einteilung der TNM-Stadien ergeben sich die UICC-Stadien, die in Übereinstimmung mit der AJCC (American Joint Committee on Cancer) von der UICC (Union International Contre le Cancer) ausgearbeitet wurden.

Tabelle 2: TNM-Klassifikation, WHO 2000 (35).

Primärtumor (T)	
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ: intraepithelial oder Invasion der Lamina propria
T1	Tumor infiltriert Submukosa
T2	Tumor infiltriert Muscularis propria
T3	Tumor infiltriert durch die Muscularis propria in die Subserosa oder in nicht peritonealisiertes perikolisches oder perirektales Gewebe
T4	Tumor infiltriert direkt andere Organe oder Strukturen und / oder perforiert das viszerale Peritoneum
Regionäre Lymphknoten (N)	
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastasen in 1 bis 3 regionären Lymphknoten
N2	Metastasen in 4 oder mehr regionären Lymphknoten
Fernmetastasen (M)	
MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Tabelle 3: Zusammenhang der UICC-Stadien mit der TNM-Klassifikation und der Dukes-Klassifikation, WHO 2000 (35, 81).

UICC	Definition	T	N	M	Dukes
0	Carcinoma in situ	Tis	N0	M0	
I	Ia: Beschränkung auf Mukosa und Submukosa Ib: Infiltration der Muscularis propria	T1 T2	N0 N0	M0	A
II	Infiltration aller Wandschichten Überschreitung der Darmwand	T3 T4	N0 N0	M0	B
III	Regionäre Lymphknoten oder Infiltration der Umgebung	T1-4	N1- N2	M0	C
IV	Fernmetastasen	T1-4	N0-2	M1	D

1.1.6 Klinisches Bild und Diagnostik

Die *Symptome* des kolorektalen Karzinoms manifestieren sich relativ unspezifisch, weshalb Patienten oftmals erst in einem relativ weit fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung einen Arzt aufsuchen. Allgemeinsymptome können Leistungsminderung, Müdigkeit, Gewichtsverlust, eventuell Fieber sowie eine Anämie sein. Weitere Beschwerden treten häufig in Abhängigkeit der Tumorlokalisation auf. Dies bedeutet, dass rechtseitige Tumoren eher zu ulzerativem Wachstum neigen und deshalb bei vielen Patienten zu chronisch okkulten Blutungen führen. Sie rufen jedoch relativ selten Stuhlnunregelmäßigkeiten, wie Obstipation und Diarrhoe hervor. Als Folge des chronischen Blutverlustes kommt es in aller Regel zu einer hypochromen, mikrozytären Anämie mit Eisenmangel. Karzinome im Kolon transversum und Kolon deszendens neigen hingegen zu einem stenosierenden Wachstum, was zu einer Behinderung der Stuhlpassage mit der Folge von Stuhlnunregelmäßigkeiten, abdominalen Krämpfen führen kann. Tumoren im Rektum und im Sigmoid treten oft durch Tenesmen, „Bleistiftstühlen“ und Blutbeimengung im Stuhl hervor, meist jedoch ohne von einer Anämie begleitet zu sein. Auch bei Vorliegen von Hämorrhoidenblutungen muss ein

kolorektales Karzinom als Ursache der Blutung ausgeschlossen werden, denn in Einzelfällen kann sowohl ein Tumor als auch Hämorrhoiden gleichzeitig vorliegen (78).

Am Anfang einer guten Diagnostik sollte immer eine ausführliche Anamneseerhebung stehen. Diese sollte auch Risikofaktoren und Familienanamnese beinhalten. Einer gründlichen Anamnese folgt dann die eingehende körperliche Untersuchung inklusive der rektal-digitalen Tastuntersuchung. Dies ist besonders im Zusammenhang mit rektalen Tumoren von großer Bedeutung, weil man durch diese einfache Methode schon 10% aller kolorektalen Tumoren aufdecken kann. Weiter sollte zusätzlich ein Haemocult-Test erfolgen, der jedoch aufgrund unregelmäßiger Blutungen beim Patienten fälschlicherweise negativ ausfallen kann. Außerdem ist der sogenannte Guajak-Test aufgrund seiner geringen Spezifität und Sensitivität zur Entdeckung von kolorektalen Neoplasien nicht unumstritten (59). Um das Rektum genauer einsehen zu können kann im Anschluss eine Proktoskopie durchgeführt werden oder, um gleich den ganzen Dickdarm beurteilen zu können, sofort mit einer Koloskopie weiterverfahren werden. Falls nötig besteht die Möglichkeit bildgebende Verfahren, wie zum Beispiel das Spiral-CT oder das 3D-MRT zum Einsatz kommen zu lassen.

Wichtig für die Wahl der Therapie und für die Prognose des Patienten ist in diesem Zusammenhang das Staging. Hierfür wird zusätzlich zum CT und zum MRT ein transrektaler Ultraschall angefertigt mit dem die Tumorausdehnung besser beurteilt werden kann. Außerdem werden im Rahmen einer Koloskopie Biopsien entnommen, um die Ausbreitung des Tumors histopathologisch bestimmen und absichern zu können. Abschließend wird eine ausführliche Suche nach Metastasen betrieben, wozu auch die Sonographie der Leber, ein Röntgenbild des Thorax, die Bestimmung der Leberenzyme sowie des Plasma-CEAs (carcino-embryonic-antigen) zählen. Im Abschnitt „histopathologische Klassifikationen“ wurde auf die besondere Bedeutung des Stagings beim kolorektalen Karzinom genauer eingegangen.

1.1.7 Therapeutische Aspekte

Durch die anatomischen Gegebenheiten des Rektums mit der Lage im kleinen Becken und der unmittelbaren Nähe zum Anus, vor allem zum Sphinkter ani, resultieren einige Besonderheiten für die Therapie des Rektumkarzinoms im Gegensatz zur Therapie des Kolonkarzinoms. Dies wird im folgenden Abschnitt genauer erläutert.

Die kurative Therapie des Rektumkarzinoms besteht in erster Linie in der chirurgischen *en bloc*-Resektion des Tumors (57), wobei hier vor allem drei verschiedene Verfahren, je nach Tumorlokalisation und – Ausdehnung zum Einsatz kommen. Karzinome, die im oberen und mittleren Drittel des Rektums liegen, werden durch eine Sphinkter-erhaltende, anteriore Rektumresektion therapiert. Die Konservierung der Sphinkterfunktion garantiert eine erheblich verbesserte Lebensqualität des Patienten postoperativ. Bei Tumoren des unteren Drittels kann dieses Operationsverfahren nur angewendet werden, wenn der Sphinkter ani nicht von Tumormasse infiltriert ist und ein minimaler Sicherheitsabstand von 2 cm zum Anus gewahrt werden kann. Ist es jedoch nicht möglich den distalen Sicherheitsabstand zu garantieren, wird die Tumormasse mittels der Abdominoperinealen Rektumextirpation (APR) - samt Anlage eines endständigen Anus praeter sigmoidalis - exzidiert. Bei Tumoren des mittleren und unteren Drittels wird in jedem Fall zusätzlich eine totale Entfernung des Mesorektums mit dem regionären Lymphabflussgebiet durchgeführt (totale Mesorektumexzision = TME). Karzinome des oberen Drittels werden gemeinsam mit einer partiellen Mesorektumexzision = PME chirurgisch entfernt (39). Die transanale Lokalexzision kann nur bei Low-grade-T1-Karzinomen ohne Lymphgefäßinvasion durchgeführt werden.

Eine neoadjuvante (präoperative) Radiochemotherapie mit 5- Fluorouracil (5-FU) dient der präoperativen Verkleinerung potentiell inoperabler Tumoren (downstaging), um in fortgeschrittenen Stadien noch eine R0-Resektion (vollständige Entfernung des Tumors im gesunden Gewebe) zu ermöglichen und somit eine eventuell Sphinkter-erhaltende, anteriore Rektumresektion als chirurgische Therapiealternative wählen zu können. 5-FU dient dabei als sogenannter „Radiosensibilisator“ und soll die Wirkung der Strahlentherapie verbessern (78). Dennoch identifizierten Rimkus et al. zwei Untergruppen im

Bezug auf das Ansprechen einer präoperativen Radiochemotherapie. Und zwar eine Responder-Gruppe, die von der Therapie profitiert und eine Non-Responder-Gruppe, die resistent gegenüber einer neoadjuvanten Therapie zu sein scheint (10). Auf jeden Fall sollten sich Patienten, die vor einer chirurgischen Therapie neoadjuvant behandelt wurden, nach Tumorentfernung einer adjuvanten Therapie unterziehen, auch wenn unter neoadjuvanter Therapie bereits eine vollständige Remission stattgefunden hat (80).

Voraussetzung für eine adjuvante (postoperative) Therapie des Rektumkarzinoms ist die R0-Resektion (s.o.) des Tumors. Gelingt dies nicht oder liegt bereits ein metastasiertes Stadium der Erkrankung (UICC IV) vor, wird ein palliativer Ansatz gewählt (20). Die Tumorstadien UICC II und UICCIII werden stadienadaptiert, adjuvant mit einer Radiochemotherapie behandelt. Die alleinige Bestrahlung des Beckens verringert hierbei schon das Risiko ein Lokalrezidiv zu erleiden um 20-25% (78). Der Überlebensvorteil durch die kombinierte Radiochemotherapie konnte zu Beginn der 1990er Jahre trotz hoher Nebenwirkungen der Therapie bereits um 20% erhöht werden im Gegensatz zu Patienten, die keine adjuvante Therapie erhielten (65). In den 1990er Jahren etablierte man daraufhin in mehreren prospektiven, randomisierten klinischen Studien die postoperative Bestrahlung in Kombination mit einer auf 5-Fluorouracil (5-FU) basierenden Chemotherapie für Rektumkarzinome der Stadien UICC II und UICC III (27, 47, 90, 94). Seither ist 5-FU obligater Bestandteil der postoperativen Radiochemotherapie, obwohl neue Substanzen zur Verbesserung der Überlebensrate besonders beim fortgeschrittenen Rektumkarzinom hinzugekommen sind. Hierzu zählen Irinotecan (ein Topoisomerase-1-Inhibitor), Oxaliplatin (ein Platinanalogon), sowie die sogenannten „Biologicals“ Bevacizumab (ein monoklonaler Antikörper gegen den Gefäß-Wachstumsfaktor VEGF) und Cetuximab (ein Antikörper gegen den EGF-Rezeptor (epidermal growth factor receptor)) (24).

In einer palliativen Situation können Kryo-, Laser-, und Elektrotherapie zum Einsatz kommen, um die Symptome der Erkrankung zu lindern. Liegen bereits multiple Lebermetastasen vor, kommt eine Chemotherapie mit 5-Fluorouracil (5-FU) in Kombination mit Oxaliplatin oder Irinotecan plus Bevacizumab (ein monoklonaler Antikörper

gegen den Gefäß-Wachstumsfaktor VEGF) und Cetuximab (ein Antikörper gegen den EGF-Rezeptor (epidermal growth factor receptor) zum Einsatz (20).

Nach stattgehabter Therapie wird der Resttumor anhand des Operationspräparates nach seiner Größe im Vergleich zur ursprünglichen Tumorausdehnung beurteilt. Dies geschieht mit Hilfe der Kölner Klassifizierung (7) oder der Einteilung nach Junker-Müller jeweils in vier Regressionsgrade.

Tabelle 4: Vergleich der Regressionsgrade (Köln und Junker-Müller)

Vitaler Resttumor	Kölner Regressionsgrade	Junker-Müller
0	IV	III
<10%	III	IIB
10-15%	II	IIA
50-90%	I	IIA
>90%	I	I

1.2 Micro-RNAs (miRNAs)

1.2.1 Einführung

MiRNAs sind kleine, einzelsträngige RNA-Moleküle bestehend aus 22 bis 25 Nukleotiden, die die Genexpression in Eukaryonten regulieren. Neuere Computerberechnungen ergaben, dass sie ca. 60% der Protein-kodierenden Gene im menschlichen Genom regulieren (82). Man bezeichnet sie, ebenso wie transfer-RNAs (tRNAs), als nicht-kodierende RNAs, weil sie, im Gegensatz zu mRNAs (messenger-RNAs), nicht für Proteine kodieren. Ihre Entdeckung liegt erst wenige Jahre zurück, weshalb man immer noch relativ wenig über ihre Funktion weiß. Allerdings nimmt der Wissensstand auf dem Gebiet der miRNAs stetig zu, denn die kleinen RNA-Moleküle sind in letzter Zeit Gegenstand intensiver Forschung geworden.

Die erste miRNA wurde 1993 in der Spezies *Caenorhabditis elegans* von Victor Ambros und seinen Mitarbeitern entdeckt. Es handelte sich hierbei um die miRNA lin-4. Etwa zur gleichen Zeit identifizierte Gary Ruvkun und sein Team das erste miRNA Ziel-Gen lin-14. Diese beiden Entdeckungen führten zu einem neuen Verständnis der post-transkriptionalen Gen-Regulation (4). Obwohl man miRNAs 1993 völlig unerwartet identifizierte, muss hinzugefügt werden, dass Jacob und Monod schon 1961 ein theoretisches Konzept postulierten, das einen miRNA-ähnlichen Mechanismus des lac-Repressors bei der Regulation der Protein-Synthese beschreibt. Im Bezug auf den lac-Repressor erwies sich diese Annahme als falsch, das theoretische Konzept der post-translationalen Gen-Regulierung bestätigte sich jedoch durch neuere Erkenntnisse im Zusammenhang mit miRNAs (4). Im Gegensatz zur post-translationalen Gen-Regulierung postuliert das klassische Dogma der Molekularbiologie, dass DNA in messenger-RNA transkribiert wird, welche wiederum als Vorlage für die Translation der Proteine bei der Proteinbiosynthese dient (3). Eine darüber hinausgehende epigeneti-

sche Regulierung findet im klassischen Konzept der Molekularbiologie noch keinen Platz.

Kurz nach der Entdeckung von *lin-4* identifizierten Reinhard et al. die zweite wichtige miRNA in *C. elegans*, nämlich *let-7* (71). Daraufhin folgten diverse weitere miRNA-Moleküle in Fliegen, Würmern, Vertebraten und Pflanzen. Mittlerweile geht man davon aus, dass ungefähr 800 miRNA-Gene im menschlichen Genom vorkommen. Sie regulieren insgesamt über 5300 weitere Gene, die in verschiedenste Prozesse, wie zum Beispiel Zell-Proliferation, Zell-Metabolismus, Zell-Tod, Hämatopoese, Nervenentwicklung und nicht zuletzt der Tumorgenese einbezogen sind. (4)

Bei miRNAs handelt es sich um hoch konservierte Moleküle, die, wie Pasquinelli und seine Mitarbeiter am Beispiel der miRNA *let-7* herausgefunden haben, in verschiedensten Spezies in fast identischer Form vorkommen (67). Hieraus kann rückgefolgert werden, dass sich *let-7* im Laufe der phylogenetischen Entwicklung über viele Millionen Jahren in seiner 21-Nukleotid-langen Struktur erhalten haben muss (76).

Einige miRNAs werden ubiquitär exprimiert, so wie zum Beispiel die miRNA RNU6b, während hingegen andere sehr gewebespezifisch vorkommen. Auch die Anzahl der Kopien einzelner miRNAs variiert von 10 bis 50.000 pro Zelle (51). Enders et al. konnten in aktuellen Untersuchungen zeigen, dass bestimmte miRNAs auch im Plasma vorhanden sind. Sie fanden heraus, dass miRNA-92 und miRNA 17-3p zum Beispiel im Plasma von Patienten mit kolorektalem Karzinom erhöht exprimiert werden und schlugen diese miRNAs deshalb als mögliche molekulare Marker einer nicht-invasiven Tumordiagnostik vor (63).

1.2.2 Biogenese und Funktionsweise der miRNA

Biogenese der miRNA

Etwa 70% der MiRNA-Gene liegen entweder in Introns oder in Exons von Proteinkodierenden Genen. Sie sind in paralleler Anordnung zu ihren host-gens (pre-mRNA-transcripts) lokalisiert, was darauf schließen lässt, dass sie auch in derselben Richtung

wie diese abgelesen werden (32). Die verbleibenden 30% der miRNA-Gene befinden sich in Regionen zwischen Protein-kodierenden Genen (72). Es ist anzunehmen, dass Letztere ihre eigenen Transkriptionseinheiten besitzen. Nur sehr wenige miRNA-Gene befinden sich in untranslatierten Regionen von Protein-kodierenden mRNAs (28). Aller Wahrscheinlichkeit nach kann aus einem mRNA-Molekül entweder eine miRNA oder ein Protein hervorgehen – nicht aber beides gleichzeitig (22).

Die Biogenese der miRNAs erfolgt schrittweise. Anfänglich transkribiert das Enzym Polymerase II Vorläufermoleküle, die eine Länge von mehreren Kilobasen erreichen. Diese Vorläufermoleküle bezeichnet man als pri-miRNAs. Sie haben einen Poly-(A)-Schwanz und eine Cap-Struktur, welche unter anderem ein Charakteristikum auch von mRNAs sind. Ihrem Aussehen nach erinnern pri-miRNAs an Haarnadeln (s. Abb.2). Im darauf folgenden Synthese-Schritt werden pri-miRNAs dann von einem weiteren Enzym namens Drosha und seinem Kofaktor DGCR8 in Stücke geschnitten, die dann nur noch ca. 70 Nukleotide lang sind und pre-miRNAs genannt werden (2). Alle bisherigen Vorgänge finden im Nukleus der Zelle statt. Nun werden die pre-miRNAs von Exportin 5 durch einen Ran-Guanosin-Triphosphat-abhängigen Prozess ins Zytoplasma exportiert (11, 96), wo sie an die RNase Dicer sowie an den RISC (RNA-induced silencing-complex) binden. Die Aufgabe der RNase Dicer besteht darin, die bis zu diesem Biogenese-Schritt zweisträngig vorliegenden RNA in zwei Einzelstränge zu zerteilen. Auf diese Weise kann der sogenannte Führungsstrang, der jetzt als reife miRNA vorliegt, an den RISC binden. Der übrig gebliebene zweite Strang erfährt eine Degradation, da er keine Funktion mehr ausübt (2). Welcher der beiden Stränge nun in den RISC inkorporiert wird ist abhängig von der Stabilität der Basenpaare am 5'-Ende des Doppelstranges (40).

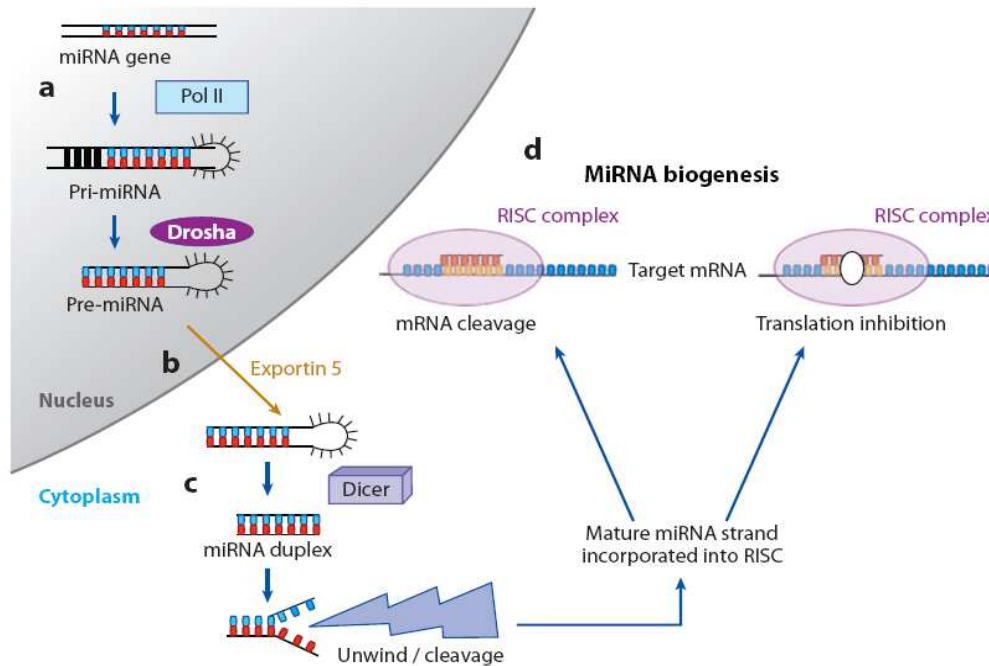


Abb. 2: Darstellung der MiRNA-Biogenese (32)

Funktionsweise der miRNA

Hat nun, wie im vorigen Abschnitt beschrieben, eine reife miRNA an den RISC gebunden, wird der gesamte Komplex dann, geführt durch die miRNA, zur komplementären Sequenz am 3' untranslatierten Ende der Ziel-mRNA im Zytoplasma geleitet. Wenn nun die miRNA perfekte oder zumindest fast perfekte Basenpaarung mit dem 3' untranslatierten Ende der Ziel-mRNA aufweist, wird diese dann durch Ago 2 (Argonaute 2) degradiert. Diese Degradation der mRNA findet im Zytoplasma, in sogenannten P-bodies (processing bodies) statt (68). Argonaute 2 ist laut Meister (54) ein Bestandteil des RISC (genauso wie Dicer, RNA-Helicase rck/p54 sowie das doppelsträngige RNA-Bindungsprotein TRB P (trans-activation-responsive RNA-binding protein)) (19). Man kennt vier verschiedene Isoformen von Ago-Proteinen, wobei nur Ago 2 in der Lage zu sein scheint mRNA zu zerteilen (54).

Weist eine miRNA im Gegensatz zum oben beschriebenen Mechanismus allerdings nur eine partielle Basenpaarung mit der Ziel-mRNA auf, wird anschließend die Translation der mRNA spezifisch unterdrückt ("gene silencing") und zwar in Abhängigkeit mit dem Grad der Übereinstimmung der Basenpaarung (97). Wie nun die Unterdrückung der

Translation, bestehend aus Initiations-, Elongations- und Terminationsphase genau vonstattengeht ist im Einzelnen noch nicht ganz aufgedeckt. Man geht jedoch davon aus, dass miRNAs in der Initiationsphase der Translation interferieren, indem sie den Initiationsfaktor eIF4E (eucaryotic initiation factor4E), die Cap-Struktur sowie den poly(A)-Schwanz der mRNA beeinflussen (37). Um den genauen Ablauf und die Funktion der mRNA-Teilung sowie der Translationsunterdrückung durch miRNAs zu verstehen, wird man auf weitere Forschung in naher Zukunft angewiesen sein.

1.2.3 MiRNA und Tumorgenese

MiRNAs spielen, wie man neuerdings weiß, eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Tumoren. Die Familie der kleinen, nicht Protein-kodierenden RNA-Moleküle hat das Spektrum der seit längerem bekannten Protein-kodierenden Gene, die man als Tumorsuppressoren und Onkogene kennt erweitert. Sie können je nach Funktion die Tumorentstehung entweder fördern - indem sie die Expression von Tumorsuppressoren negativ regulieren - oder verhindern indem sie Onkogene positiv regulieren.

MiRNA als Tumorsuppressor

Genauso wie Protein-kodierende Gene können auch miRNAs als Tumorsuppressoren fungieren. Man erkennt dies daran, dass der Funktionsverlust einer als Tumorsuppressor wirkenden miRNA zur malignen Entartung von gesunden Zellen führt. Dieser Funktionsverlust könnte auf verschiedene molekulargenetische Mechanismen wie: Mutation, Deletion, epigenetisches "gene-silencing" bzw. einer Veränderung der Prozessierung von miRNAs zurückzuführen sein (15, 61). Beispiele für miRNAs, die eine Funktion als Tumorsuppressoren inne haben sind: miR-15, miR-16, let-7, miR-143 und miR-145 (2). Herausgefunden hat man die Beteiligung von miRNAs als Tumorsuppressoren bei der Entartung maligner Zellen am Beispiel der chronisch lymphatischen Leukämie (CLL). Bei dieser Erkrankung findet man eine seit längerem bekannte homo- sowie heterozygote Deletion am Chromosomen 13q 14.3, die in über

50% der Fälle auftritt und mit einem indolenten Krankheitsverlauf assoziiert ist (26). Auf der Suche nach möglichen Tumorsuppressor-Genen, die in dieser Region lokalisiert sein könnten, stieß man schließlich auf die miRNAs miR-15a und miR-16-1. Die Annahme, dass es sich bei diesen miRNAs um Tumorsuppressoren handeln könnte wurde durch die Entdeckung bestärkt, dass das antiapoptotisch wirkende Onkogen BCL-2, welches bei CLL erhöht exprimiert wird, ein Ziel-Gen der beiden miRNAs miR-15a und miR-16-1 ist (21). Fehlen diese miRNAs wird die Menge an BCL-2 folglich erhöht und Tumorzellen können ungehindert wachsen.

Ein weiteres Beispiel für eine miRNA mit tumorsuppressivem Effekt ist let-7, welche bei vielen Tumorentitäten, wie zum Beispiel bei Lungen- und Brustkrebs herunter reguliert ist. Die Funktion von let-7 liegt vor allem in der Inhibition von Ras, welches ein gut untersuchtes Onkogen ist. Let-7 kann über diesen Mechanismus bei Überregulation einen Zellzyklusarrest (der für Reparaturvorgänge in der Zelle wichtig ist) oder eine Apoptose induzieren, was beides einem ungehinderten Zellwachstum bei der Tumorentstehung entgegenwirkt (32). Es gibt viele weitere miRNAs – unter ihnen die in dieser Arbeit untersuchten miR-143 und miR-145 - von denen man stark annimmt, dass sie eine Rolle als Tumorsuppressoren spielen.

MiRNA als Onkogen

Als Onkogene werden Moleküle bezeichnet, die in ihrer Funktion die Tumorentstehung fördern. Die Liste der miRNAs, die einen Effekt als Onkogene haben oder in Kombination mit Onkogenen funktionieren ist relativ kurz, aber ihre Evidenz ist dafür gut belegt. Hier wäre miR-155 zu nennen, welche schon früh in diesem Zusammenhang beschrieben wurde (56). MiR-155 ist in einen nicht-kodierenden RNA-Abschnitt eingebettet, den man als BIC (B-cell-integration-cluster) bezeichnet. BIC kooperiert zusammen mit dem Onkogen c-myc und trägt damit zur Tumorentstehung bei. Eine weitere wichtige miRNA, die man zu den Onkogenen zählt, ist die in dieser Arbeit untersuchte miR-21. Sie ist in einer Vielzahl von hämatologischen und soliden Tumoren inklusive dem kolorektalen Karzinom hochreguliert und steht somit im Zusammenhang mit der Entstehung von Krebs. Zuletzt seien mehrere miRNAs erwähnt, die eine Funktion als Onkogene ausüben. Es handelt sich um die miRNAs des sogenannten miR-17-92 cluster.

Zu diesem miR-17-92 cluster zählen miR-17, miR-18a, miR-20a, miR-21a, miR-19b-1, miR-91-1. Sie spielen eine Rolle bei der Proliferation von Zellen und bei der Tumorangio-genese. Desweiteren hemmen sie die Apoptose-Entstehung einer Zelle. Auch diese miRNAs kooperieren mit c-myc (32).

1.2.4 Bedeutung der miRNAs -21, -31, -143 und -145 für das kolorektale Karzinom

miR-21 und miR-31

Bereits in mehreren Veröffentlichungen wurde beschrieben, dass miR-21 und miR-31 in Tumorgewebe hoch reguliert sind. So konnte die Annahme bestätigt werden, dass eine inverse Korrelation zwischen dem miR-21-Level in der Zelle und dem Überleben der Patienten besteht (85). Meng et al. (2007) konnten am humanen hepatozellulären Karzinom zeigen, dass miR-21 das Tumorsuppressor-Gen PTEN, welches eine wichtige regulatorische Komponente des Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase-Signalweges zu sein scheint inhibiert (55). Suppression von PTEN durch miR-21 führt also im Endeffekt zu einer Zunahme des Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase-Signalweges und damit zu einer Progression des Tumorwachstums. Gleichermäßen scheint es sich beim kolorektalen Karzinom zu verhalten (85). Dies ist insbesondere deshalb von Bedeutung, da miR-21 die am häufigsten hoch regulierte miRNA beim kolorektalen Karzinom ist (46, 79, 84).

Desweiteren belegen mehrere Studien, dass miR-21 mehrere Gene beeinflusst, die eine Auswirkung auf Motilität der Zellen (wichtiger Faktor bei der Entstehung von Metastasen) und auf das remodeling der extrazellulären Matrix haben. In diesem Zusammenhang ist besonders der Einfluss von miR-21 auf das Tumorsuppressor-Gen PDCD4 zu nennen (6).

Bandres et al. identifizierten 2006 aus 156 miRNAs in 16 kolorektalen Karzinomen 13 miRNAs, die in veränderter Expression im Gegensatz zu gesunden Vergleichsproben vorkommen. Darunter ist auch die in dieser Arbeit untersuchte miRNA miR-31. Interessanterweise konnte in der selben Arbeit auch eine Korrelation von miR-31 mit dem

Tumorstadium aufgezeigt werden (8). Dies legt die Vermutung nahe, dass das miRNA Expressionslevel in einer Zelle das biologische und klinische Verhalten der kolorektalen Neoplasie widerspiegelt.

Slaby et al. konnten 2007 eine Verbindung von miR-21 und dem Lymphknotenstatus von Patienten mit kolorektalem Karzinom feststellen. Im Gegensatz zu Bandres et al. (8) brachten ihre Untersuchungen aber keinen Zusammenhang zwischen miR-31 und pathologischem Staging hervor (84).

miR-143 und miR-145

Im Rahmen von Untersuchungen mit zu diesem Zeitpunkt relativ neu entdeckten miRNAs miR-145 und miR-143 fanden Michael et al. 2003 zum ersten Mal heraus, dass reife miRNAs in normaler Mukosa des Kolons in höheren Konzentrationen vorkommen, als in tumorösem Gewebe. Gleichzeitig entdeckten sie, dass die ca. 70 Basenpaare langen miRNA-Vorläufermoleküle, genannt pre-miRNAs, sowohl in normalem Gewebe, als auch in Tumorgewebe in derselben Konzentration vorkommen. Aus diesem Ergebnis folgerten sie, dass die Kontrolle von miRNA-Levels in der Zelle post-transkriptional, also nach der Transkription, erfolgen muss (58). Akao et al. konnten 3 Jahre später die von Michael et al. 2003 beschriebene herunter Regulierung von miR-145 und miR-143 in Tumorgewebe mit ihren Untersuchungen bestätigen. Der Versuch einen Zusammenhang dieser beiden miRNAs mit zur Verfügung stehenden klinischen Daten und mit der Prognose der untersuchten Patienten herzustellen misslang bis zu diesem Zeitpunkt allerdings (1). Die gleichen Autoren konnten durch in-vitro Versuche mit DLD-1 und SW480-Zellen, die sie mit miR-145 und miR-143-Vorläufermolekülen transfizierten zeigen, dass sich die Zellproliferation durch diese Vorläufermoleküle hemmen ließ. Umgekehrt ließ sich an den gleichen Zelllinien demonstrieren, dass sich bei Zugabe von wachstumshemmenden Stoffen die Konzentrationen der genannten miRNAs erhöhten. Dies bestätigt einen negativen Zusammenhang zwischen der Proliferationsrate der untersuchten Zellen und des Expressionslevels von miR-145 und miR-143 (2). Spezifisch für die miR-143 konnten Chen et al. (2009) in diesem Zusammenhang weiterführend zeigen, dass miR-143, wie angenommen, das Zellwachstum von kolorektalen Tumorzellen

len hemmt und dabei interessanterweise das für viele Signalwege wichtige Protein KRAS inhibiert (18). Für den tumorsuppressiven Effekt von miR-145 ist laut La Rocca et al. vor allem die herunter Regulierung von Insulin-Rezeptor-Substrat-1 verantwortlich. Dieses Protein spielt eine wichtige Rolle für das Zellwachstum und für die Zellproliferation (49).

1.2.5 Auswirkung der Chemotherapie mit 5-FU auf miRNA

Im Moment liegen nur wenige Studien zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen miRNAs und einer Tumorthherapie mit Hilfe des gängigen Chemotherapeutikums 5-Fluorouracil vor.

Nakajima et al. (2006) identifizierten die miRNAs let-7g und miR-181b als prognostisch bedeutsam für das Ansprechen einer Chemotherapie mit 5-FU in vivo (60). Rossi et al. stellen ausgehend von ihren Untersuchungen über miRNAs und 5-FU in vitro die Behauptung auf, dass das miRNA-Expressionsmuster der Zelle durch eine chemotherapeutische Behandlung tiefgreifend verändert werden kann. Sie halten fest, dass miR-21 durch eine Chemotherapie in der Zelle noch weiter hoch reguliert wird als sie es in Tumorgewebe bereits ist. Diese Dysregulation erklären sie durch eine zelluläre Antwort auf die toxische Wirkung der Substanz. Eine weitere von Rossi et al. untersuchte miRNA ist die miR-200b, die in neoplastischem Gewebe in höherer Konzentration als in gesundem Gewebe vorkommt. Durch eine Behandlung mit dem Antimetabolit 5-FU kann die Expression von miR200b in vitro gesenkt werden (73). Schetter et al. veröffentlichten 2008 eine Studie, in der sie ein erhöhtes miR-21-Level in der Zelle mit einem schlechteren Therapieansprechen auf eine adjuvante Chemotherapie (vornehmlich mit 5-FU) aufzeigen konnten (79).

Eine weitere Studie zeigte Veränderungen im Expressionsmuster durch eine Chemotherapie in vivo – allerdings durch eine Therapie mit Capecitabin. Unter den hier beobachteten miRNAs waren auch miR-21 und mi-R145, die allerdings nicht in signifikantem Ausmaß verändert waren (86).

1.2.6 Zusammenhang von miRNA mit Prognose und Überlebensrate

Xi et al. beobachteten in einer Untersuchung, dass ein erhöhtes Level der miR-200c mit einer schlechteren Prognose der Patienten korreliert (95).

Schetter et al. veröffentlichten 2008 eine Studie, in der sie ein erhöhtes miR-21-Level in der Zelle mit einem schlechteren Therapieansprechen auf eine adjuvante Chemotherapie aufzeigen konnten. Außerdem war die Überlebenszeit der Patienten mit erhöhter miR-21 geringer als die Überlebenszeit der Patienten mit niedrigerer miR-21 – und zwar unabhängig vom Tumorstadium. Eine Korrelation der miRNAs mit Alter, Geschlecht und Tumorlokalisierung konnte nicht festgestellt werden. Ebenso wenig konnte ein Unterschied zwischen Populationen verschiedener Rasse und verschiedener geographischer Herkunft herausgefunden werden (79).

An 49 Gewebeproben von Patienten mit Kolonkarzinom im Stadium II konnten Schepeler et al. zeigen, dass sich die Länge der Rezidiv freien Zeit anhand der miRNAs miR-320 und miR-498 ablesen lässt. Die Wahrscheinlichkeit eines Rezidiv-freien Überlebens ist bei erhöhter Expression der beiden miRNAs deutlich vergrößert. Sie schlugen deshalb vor, miRNAs noch genauer im Hinblick auf diagnostische Relevanz hin zu untersuchen und zur Verfeinerung der Diagnostik in den klinischen Alltag einfließen zu lassen (77).

1.2.7 MiRNA als Möglichkeit der therapeutischen Intervention

Die Erkenntnisse über miRNAs im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen der letzten Jahre wecken Hoffnungen der therapeutischen Intervention in diesem Bereich. Da die Biosynthese und die Funktionsweise von miRNAs (s. Abschnitt 1.2.2) immer mehr aufgedeckt werden konnten, entstanden - zumindest theoretisch - Möglichkeiten eines therapeutischen Einschreitens auf verschiedenen Ebenen. Eine Überexpression von miRNAs könnte durch synthetisch modifizierte Oligonukleotide oder durch synthetisch erzeugte miRNA-mimics (zur Nachahmung der miRNAs) hervorgerufen werden. Das

Gegenteil (silencing) könnte durch sogenannte antagomirs (synthetische miRNA-Analoga) oder antisense-Oligonukleotide bewirkt werden (48, 98). Die Modifizierung von tumorsuppressiven oder onkogenen miRNAs könnte also ein therapeutisches Ziel zur Kontrolle des Tumorwachstums in frühen und fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung sein (89).

Insbesondere die Hemmung von miR-21 und miR-17-92 haben in Studien ein vermindertes Tumorwachstum, eine geringere Tumordinvasion, -angiogenese und -metastasierung bedingt (25, 46). Auf der anderen Seite hat eine Erhöhung von miR-145 in der Zelle *in vitro* ein geringeres Tumorzellwachstum durch Inhibierung von IRS-1 nach sich gezogen und die Empfindlichkeit für eine Radiochemotherapie verbessert (49). Wenn auch die Erfolge vielversprechend sind, gibt es bisher allerdings eine nur sehr geringe Anzahl an *in vivo*-Versuchen am Tiermodell und der Weg bis hin zu klinischen Versuchen mit miRNA-therapeutischen Ansätzen ist noch lang (85).

1.3 Fragestellung der Arbeit

In den vergangenen 10 Jahren sind miRNAs immer mehr in den Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses gerückt, wobei besonders der Zusammenhang von miRNAs mit Tumorerkrankungen intensiv erforscht wurde und weiterhin erforscht wird. Obwohl in diesem Bereich immer noch Vieles im Verborgenen liegt, gelang es in den letzten Jahren zunehmend die Rolle von miRNAs bei der Entstehung von Tumoren auf molekularer Ebene aufzudecken. Es wurden bereits mehrere Studien im Zusammenhang mit kolorektalen Tumoren veröffentlicht. Allerdings nicht im Hinblick auf die Auswirkungen einer neoadjuvanten Radiochemotherapie beim fortgeschrittenen Rektumkarzinom. Im Rahmen dieser Arbeit wird speziell die Bedeutung der miRNAs miR-21, miR-31, miR-143 und miR-145 beim fortgeschrittenen Rektumkarzinom nach neoadjuvanter Therapie untersucht und dabei im Einzelnen jeweils auf folgende Fragestellungen eingegangen:

1. Sind die miRNAs miR-21, miR-31, miR-143 und miR-145 in Tumorgewebe vor einer neoadjuvanten Therapie anders exprimiert als nach der Therapie?
2. Wie wirkt sich eine Chemotherapie mit 5-FU (gepaart mit einer Bestrahlung von 54 Gy) auf die untersuchten miRNAs aus?
3. Gibt es einen Zusammenhang der miRNA-Expression in Tumorgewebe nach Radiochemotherapie mit dem Therapieansprechen (Tumorregression) der Patienten?
4. Kann ein prädiktiver Marker für das Therapieansprechen identifiziert werden?
5. Gibt es einen Zusammenhang zwischen den untersuchten miRNAs und der Prognose (Überlebenszeit) der Patienten?

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

Im Rahmen der praktischen Durchführung dieser Arbeit wurden im Labor des Instituts für Pathologie routinemäßig verwendete Chemikalien von Merck in Darmstadt und Sigma-Aldrich in Deisenhofen gebraucht. Einwegplastikwaren als Zentrifugations- und Reaktionsbehältnisse wurden stets von der Firma Eppendorf in Hamburg bezogen. Alle nicht steril verpackten Materialien wurden selbstverständlich vor Gebrauch autoklaviert und im Verlauf steril aufbewahrt. Kamen spezielle Reagenzien oder Arbeitsgeräte zum Einsatz, werden diese im Text an betreffender Stelle explizit erwähnt und aufgeführt.

2.2 Patientenkollektiv, Untersuchungsmaterial, Datenerhebung

2.2.1 Patientenkollektiv

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auf Geweberesektate von 81 Patienten mit Rektumkarzinomen zurückgegriffen, die sich in den Jahren von 1997-2007 in der Chirurgischen Klinik der Universität zu Köln (Direktor: Universitätsprofessor H. A. Hölscher) in Behandlung befanden. Es wurden 58 Biopsien, 81 Tumor-Präparate, sowie die zugehörigen tumorfreien Ränder untersucht.

Die resezierten Tumoren wurden sämtlich am Institut für Pathologie der Universität zu Köln aufgearbeitet, befundet und archiviert. Zugehörige Biopsien wurden an verschiedenen Kliniken im Kölner Großraum entnommen und zum Teil vom Institut für Pathologie der Universität zu Köln, zum Teil von niedergelassenen Pathologen in näherer

Umgebung der behandelnden Klinik befundet, aufgearbeitet und archiviert. Zur Erlangung der auswärtigen Biopsie-Präparate wurden, nach Einsicht der Krankenakte im Archiv der Universitätsklinik Köln, die dort vermerkten Pathologen angeschrieben und gebeten betreffende Paraffin-Präparate zuzusenden.

2.2.2 Untersuchungsmaterial

Für diese Arbeit wurden jeweils einzelne charakteristische Paraffinblöcke eines Operations- bzw. Biopsie-Präparates gewählt. Zur Konservierung war das Untersuchungsmaterial zuvor in 5%igem Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet worden. Um die histologische Klassifizierung zu ermöglichen, wurden mit dem sogenannten Mikrotom 7,5 µm dicke Schnitte des Gewebes angefertigt. Diese dadurch erhaltenen Schnitte wurden auf Glasobjektträger (Marienfeld, Lauda-Königshofen) aufgezogen und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt.

2.2.3 Datenerhebung

Jedem Patienten des Kollektivs wurden bereits bei der für die Therapie wichtigen Befundung durch die Fachärzte für Pathologie ihre in Paraffin gebetteten Biopsie- und Tumorpräparate zugeordnet. Diese lagen in archiviertem Zustand vor. Nach Sichtung der Unterlagen und Befunde wurden relevante Daten in einer Datenbank erfasst. Bei unvollständigen oder unklaren Angaben zur histologischen Klassifikation einzelner Präparate wurden einige Hämatoxylin-Eosin-Schnitte nochmals herangezogen und von einem Facharzt abermals klassifiziert. Angaben zur Überlebenszeit der Patienten konnten zum Teil im Archiv der Chirurgischen Klinik der Universität zu Köln eingesehen werden. Bei unvollständigen Daten wurden die zuständigen Einwohnermeldeämter angeschrieben.

2.3 Makrodissektion

Bevor die eigentliche RNA-Extraktion durchgeführt werden konnte, wurde von jedem der 81 in Paraffinblöcken konservierten Tumor-Präparate sowie deren tumorfreien Exzisionsrandproben je ein 7,5µm dicker Schnitt in ein 1,5µl Eppendorf-Gefäß eingebracht. Bei den wesentlich kleineren Biopsie-Proben wurden, je nach Größe des Gewebematerials, entweder drei mal 7,5µm dicke Schnitte (bei normal großen Biopsien) oder 5 mal 7,5µm dicke Schnitte (bei kleinen Biopsien) in die Reaktionsgefäße übertragen. Zur präzisen Identifizierung der Proben wurde eine fortlaufende Nummerierung so gewählt, dass auch eine Unterscheidung in Biopsie-, Tumor- oder tumorfreies Resektionsrand-Gewebe ermöglicht wurde.

Um zu vermeiden, dass ungewollt randständiges, gesundes Normalgewebe mit in die Tumorproben gelangte, wurde das gesunde Gewebe zuvor entfernt. Hierbei kam das Verfahren der Makrodissektion zum Einsatz. Durch diesen technisch unkompliziert durchzuführenden Arbeitsschritt konnte erreicht werden, dass in den Proben keine Durchmischung der Gewebearten stattfand. Die Durchführung der Makrodissektion verlief wie folgt: Zunächst wurden die in einem vorherigen Arbeitsschritt angefertigten Hämatoxylin-Eosin-Schnitte aller Tumor- und Biopsieproben unter dem Mikroskop auf tumorfreies Resektionsrand-Gewebe hin durchsucht. Nach Markierung entsprechender Areale auf dem Objektträger wurden die Resektionsränder sorgfältig mit dem Skalpell vom Tumorgewebe separiert.

Zur Kontrolle der Reinheit aller Proben und um etwaiger Verschleppung von Untersuchungsmaterial von einem Reaktionsgefäß ins nächste vorzubeugen, wurden gewebe-freie Paraffinschnitte als Leerkontrollen in regelmäßigen Abständen in das Kollektiv eingefügt. Diese erfuhren bei der Durchführung der Experimente eine identische Behandlung.

2.4 RNA-Extraktion aus kolorektalem Gewebe

Die folgenden zur RNA-Extraktion nötigen Arbeitsschritte wurden nach laborintern standardisierten Verfahren durchgeführt.

2.4.1 Entparaffinierung

Die Extraktion von Gesamt-RNA aus kolorektalem Gewebe, welches in Paraffin gebettet vorlag, wurde mit der Entparaffinierung begonnen. Dies geschah durch Erwärmen der Tumor- und Normalgewebeproben auf 65°C für eine Dauer von genau 5 Minuten. Anschließend wurden die Proben kurz zentrifugiert, um eventuell am Deckel der Reaktionsgefäße haftendes Restmaterial von dort zu entfernen. In jedes Eppendorf-Gefäß wurde jeweils 500µl Xylol pipettiert. Die Proben wurden zur besseren Durchmischung kurz gevortext (Vortex Genie 2, Bender & Hobein AG, Zürich), dann 5 Minuten im Thermomixer (Eppendorf, Hamburg) bei 65°C geschüttelt und anschließend für 2 Minuten bei 13000 U/min zentrifugiert (Zentrifuge der Firma Eppendorf, Hamburg). Danach wurde der Xylolüberstand verworfen. Dieses Vorgehen wurde anschließend zweimal wiederholt, damit keine Paraffinreste mehr in den Proben verbleiben konnten.

Nach dem dritten Durchlauf wurde zum Waschen des Untersuchungsmaterials 500µl 100%igen Ethanol in jedes Reaktionsgefäß gegeben, anschließend gevortext und für die Dauer von 2 Minuten bei 13000 U/min zentrifugiert. Durch das Zentrifugieren bildete sich ein Überstand, der im darauf folgenden Arbeitsschritt abpipettiert und verworfen wurde. Dieser Arbeitsschritt wurde ebenfalls insgesamt dreimal durchgeführt um die Proben dann für eine Stunde bei 37°C im Brutschrank zu trocknen. Hierdurch wurde dem Verbleib von Ethanolresten vorgebeugt.

2.4.2 Lyse des kolorektalen Gewebes

Im anschließenden Schritt wurde zur Lyse des kolorektalen Gewebes jede Probe mit einem Gemisch aus 5µl Proteinase-K und 195µl Proteinase-K-Puffer (Invitrogen, Karlsruhe) versetzt. Abermals wurde das Untersuchungsmaterial durch Vortexen gut vermischt und durch kurzes Zentrifugieren vermieden, dass Gewebereste im Deckel des Eppendorf-Reaktionsgefäßes verblieben. Die nun folgende Inkubation des Reaktionsansatzes erfolgte bei 65°C im Thermomixer (Eppendorf, Hamburg) während 12 Stunden über Nacht. Nach Ablauf der benötigten Inkubationszeit wurde die Reaktion bei 95°C für die Dauer von 10 Minuten gestoppt.

2.4.3 Phenol-Chloroform-Extraktion

Zur Denaturierung der Proteine wurde im folgenden Arbeitsschritt kurz zentrifugiert und der entstandene Überstand sehr vorsichtig abpipettiert. Er wurde daraufhin, zusammen mit 200µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol und 20µl 3M Natriumacetatlösung (pH 5,2), in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Abermals wurden die Proben zentrifugiert, diesmal für einen Zeitraum von 20 Minuten mit einer Drehzahl von 13000 U/min. Hierdurch bildete sich eine aus Proteinen zusammengesetzte Zwischenphase, welche im folgenden Arbeitsschritt durch vorsichtiges Abpipettieren von der oberen Phase getrennt wurde. Die Phenol-Chloroform-Extraktion wurde, gemäß Arbeitsanweisung, dreimal wiederholt.

Zu der durch die vorherigen Arbeitsschritte gewonnenen wässrigen Phase wurde jeweils 200µl Isopropanol und 0,5µl Glykogen (20mg/ml) hinzugefügt und wieder kurz vermischt. Durch Inkubation bei -20°C über mehrere Stunden wurde die RNA in den Reaktionsansätzen ausgefällt. Anschließend wurde abermals für 20 Minuten bei 13000 U/min zentrifugiert und der Überstand präzise abpipettiert und verworfen. Es wurde insgesamt dreimal mit 70%igem eiskaltem Ethanol gewaschen. Durch dieses Verfahren bildete sich in jedem Reaktionsgefäß ein gut sichtbares Pellet, was nach Entfernung der verbliebenen Lösung im Reaktionsgefäß bei 37°C im Trockenschrank getrocknet wurde.

Schließlich wurde in jedem Eppendorf-Gefäß 25µl DNase-Mix (Invitrogen, Karlsruhe) suspendiert. Der DNase-Mix setzte sich aus 20µl RNase-freiem Wasser, 1µl RNase-Inhibitor, 3µl DNase (10 U/µl) und 1µl Magnesiumchlorid zusammen. Einer 30-minütigen Inkubationszeit folgte das Abstoppen der Reaktion bei 95°C für 3 Minuten. Zur Verhinderung einer weiteren Degradierung der RNA durch RNasen, wurde zum Abschluss 1µl RNase-Inhibitor pro Reaktionsgefäß beigemischt. Die Proben wurden bei -80°C im Gefrierschrank gelagert.

2.5 Photometrische Bestimmung von Gesamt-RNA

Die Bestimmung der Konzentration von Ribonukleinsäuren in den betreffenden Proben wurde unter Zuhilfenahme des Nanodrop ND-1000 Spektralphotometer (Peqlab Biotechnologie, Erlangen) durchgeführt. Die Absorptionsmessung der RNA-Lösung wurde bei einer Wellenlänge von 260nm und 280nm durchgeführt.

Um die RNA auf mögliche Proteinverunreinigungen zu überprüfen, wurde das Verhältnis der Absorption bei den Wellenlängen 260nm und 280nm gebildet, wobei nukleinhaltige Lösungen als sauber galten, wenn der Quotient E_{260nm}/E_{280nm} zwischen 1,8 und 2,0 lag. Das Spektralphotometer wurde nach jeder Messung mit destilliertem Wasser gereinigt, um eine Übertragung von Untersuchungsmaterial einer Messung in die nächste zu unterbinden.

2.6 Real-Time-PCR

2.6.1 cDNA-Synthese aus Gesamt-RNA

Unter verschiedenen Methoden zur Analyse von RNA wurde in dieser Arbeit das Verfahren der Real-Time-PCR gewählt. Durch sie ist eine quantitative Bestimmung der zu untersuchenden RNA möglich. Als Ausgangsmaterial für die PCR kann einzelsträngig vorliegende RNA aber nicht dienen, weil die in der PCR verwendete Taq-Polymerase einzelsträngige RNA nicht erkennen kann. Aus diesem Grund wurde zunächst normale RNA mittels MiScript Reverse Transcription Kit von Qiagen in cDNA überführt. Ein weiterer Vorteil der cDNA-Synthese liegt in der größeren Stabilität von cDNA im Gegensatz zu RNA.

Das MiScript Reverse Transcription Kit enthielt einen RT-Mix, welcher sich aus folgenden Komponenten zusammensetzte: Poly-A-Polymerase und weitere Enzyme, reverse Transkriptase, einen mit Magnesium gepaarten Puffer, der für ein Aktivitätsmaximum aller Enzyme sorgt. Desweiteren enthält der Kit desoxygenierte Nukleotidtriphosphate, Oligo-dT Primer und Random-Primer. Im Verlauf der Reversen Transkription synthetisiert die Poly-A-Polymerase einen sogenannten Poly-A-Schwanz an das 3'-Ende der RNA. Dieser Poly-A-Schwanz besteht aus einer Kette mehrerer Adenin-Basen. Die polyadenylierte RNA wird anschließend durch das Enzym Reverse Transkriptase mittels Oligo-dT- und Random-Primer in cDNA umgeschrieben.

Der Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese wurde mit einem Gesamtvolumen von 10µl angesetzt und enthielt folgende Komponenten:

Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese

Menge in (µl)	Reagenzien
2,0µl	miScript RT Buffer
0,5µl	miScript Reverse Transcriptase Mix
variabel	RNase-freies Wasser
variabel	template RNA

Je nach RNA-Konzentration der Proben wurde eine variable Menge an RNase-freiem H₂O in die Proben eingesetzt. Jede RNA-Lösung wurde zu Beginn auf eine Konzentration von 150ng/10µl (=15ng/µl) verdünnt. Diese relativ geringe Menge an RNA musste gewählt werden, da die RNA-Konzentration einiger Biopsien verhältnismäßig niedrig ausfiel. Alle weiteren Proben wurden dann entweder im Verhältnis 1:10 (bei RNA-Konzentration > 1000ng) oder im Verhältnis 1:5 (bei RNA-Konzentration > 500ng) mit H₂O verdünnt, sodass auch hier am Ende immer die Zielkonzentration von 15ng/µl erreicht wurde. Der gesamte Reaktionsansatz wurde für eine Dauer von einer Stunde bei 37°C im Thermocycler inkubiert und anschließend auf 95°C erhitzt um die Reaktion zu stoppen. Die Lagerung der frisch synthetisierten cDNA erfolgte bei -20°C im Gefrierschrank.

2.6.2 Real-Time-PCR

Das Prinzip der Real-Time-PCR entspricht weitestgehend dem der konventionellen PCR. Allerdings besteht ein wesentlicher Vorteil der Real-Time-PCR in der direkten Quantifizierung der PCR-Amplifikate mittels Fluoreszenz-Messung.

Bei der Durchführung der Real-Time-PCR kommen DNA-interkalierende Farbstoffe zum Einsatz. Diese Farbstoffe können bei Ablaufen der Reaktion in Echtzeit anhand eines Fluoreszenz-Signals quantifiziert werden. Dabei nimmt die Fluoreszenz proportional mit der Menge der PCR-Produkte (Amplifikate) zu.

Folgende miRNAs der Firma Qiagen kamen zum Einsatz:

Tabelle 5: verwendete miRNA-Sequenzen

<u>mi-RNA</u>	Gen-Sequenz	Chromosomale Lokalisation
<u>miR-21</u>	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGAC	17q23.2
<u>miR-31</u>	AGGCAAGAUGCUGGCAUAGCU	9q21.3
<u>miR-143*</u>	GGUGCAGUGCUGCAUCUCUGGU	5q32-33
<u>miR-145*</u>	GUCCAGUUUCCCAGGAAUCCCUU	5q32-33

In dieser Arbeit wurde zur Quantifizierung der miRNAs -21, -31, -143 und -145 der Biopsien im Vergleich zu den Tumorproben, sowie im Vergleich zum normalen Gewebe das MiScript SYBR Green PCR Kit der Firma Qiagen eingesetzt. Alle für die Reaktion benötigten Reagenzien werden weiter unten im Text anhand einer Tabelle einzeln aufgeführt. Der SYBR Green PCR Master Mix setzt sich im Detail aus der HotStarTaq-DNA-Polymerase, dem QuantiTec SYBR Green PCR Puffer, Desoxynukleotidtriphosphaten, dem fluoreszierendem Farbstoff SYBR Green, dem „ROX passive reference dye“ zur Ergebnisoptimierung und 2,5mM Magnesiumchlorid-Ionen zusammen.

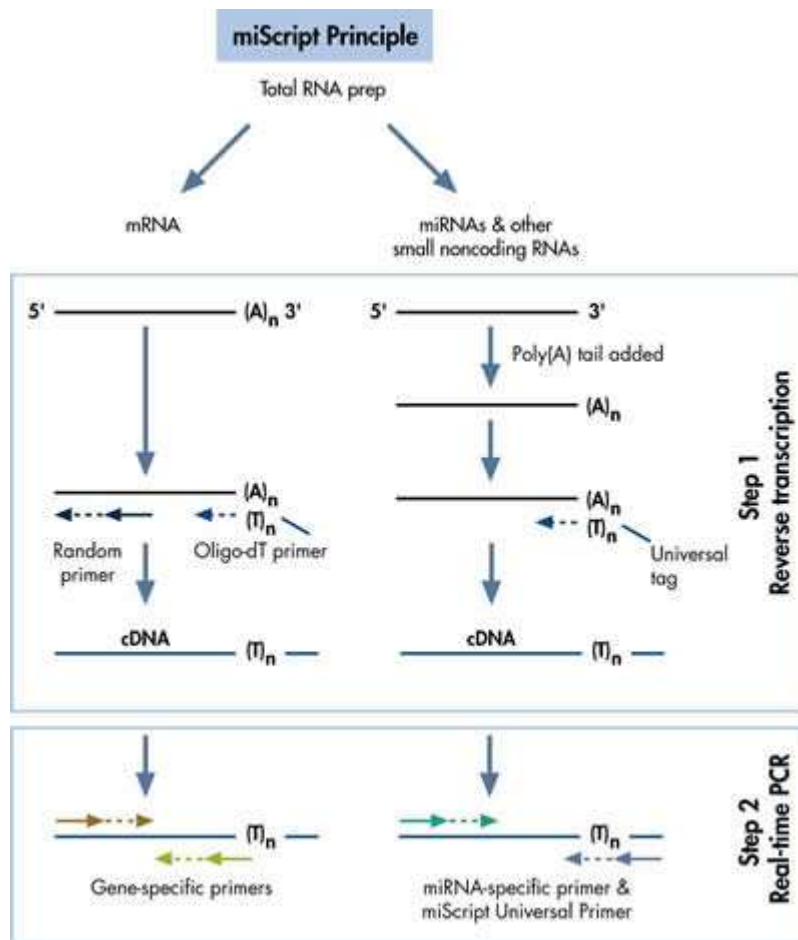


Abb. 3: Schematische Darstellung der Funktionsweise der Reversen Transkription (cDNA-Synthese und der Real-Time-PCR (69)

Der Reaktionsansatz wurde im Verhältnis 1:10 mit H₂O verdünnt. Auf diese Weise konnte die Real-Time-PCR durchgeführt werden.

Reaktionsansatz (25 μ l) für die Real-Time-PCR

Reaktionsansatz (25 μ l):	
12,5 μ l	SYBRGreen PCR MasterMix
1,0 μ l	Universal Primer
1,0 μ l	MiRNA spezifischer Primer
5,5 μ l	RNase-freies Wasser
5,0 μ l	Template-cDNA

Der Reaktionsansatz wurde anschließend in einen Thermocycler eingebracht, der nach folgendem Thermoprofil arbeitete:

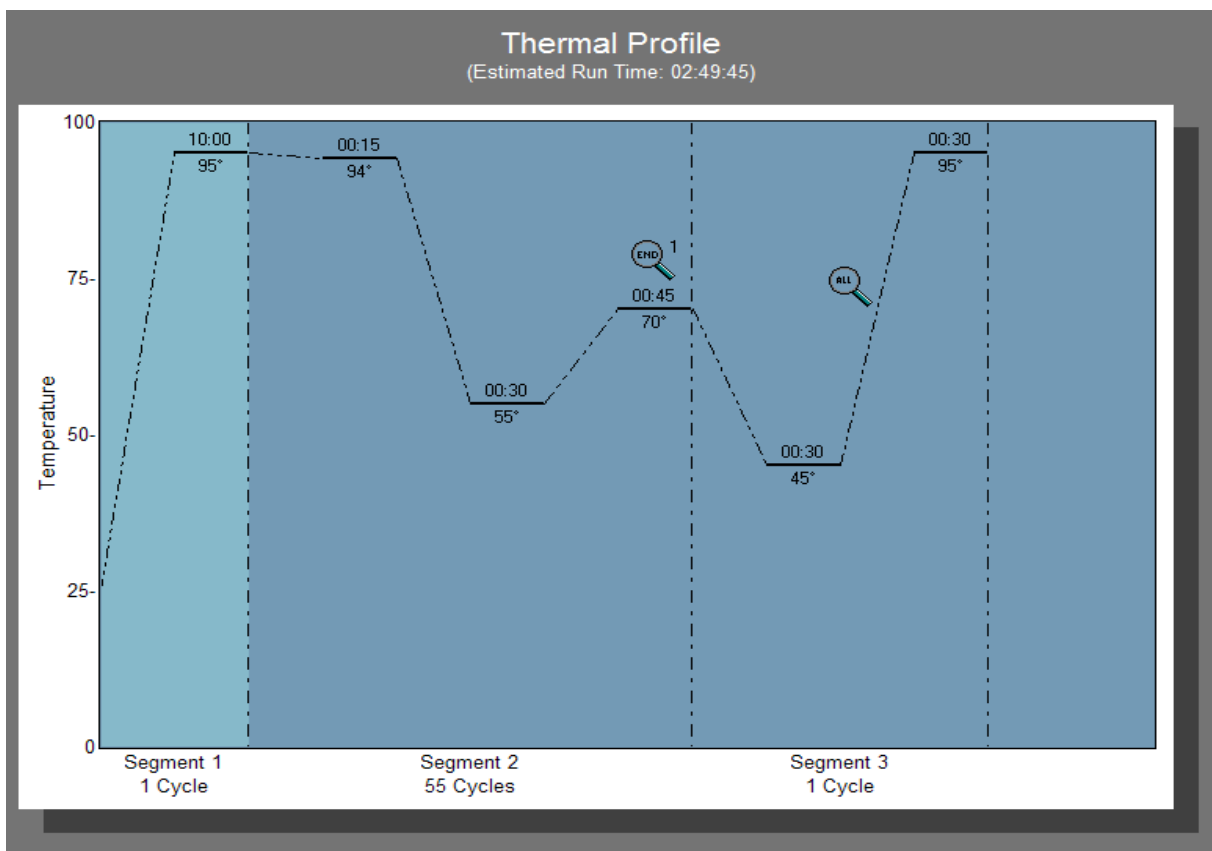


Abb. 4: Darstellung des Thermoprofils für die Synthese der Real-Time-PCR

In der folgenden Abbildung eines Testlaufes ist der Ablauf der RT-PCR graphisch anhand der farblich markierten Kurven zu erkennen. Die durchgezogene Linie bei 250 dR stellt hierbei die Begrenzung des Hintergrundrauschens dar.

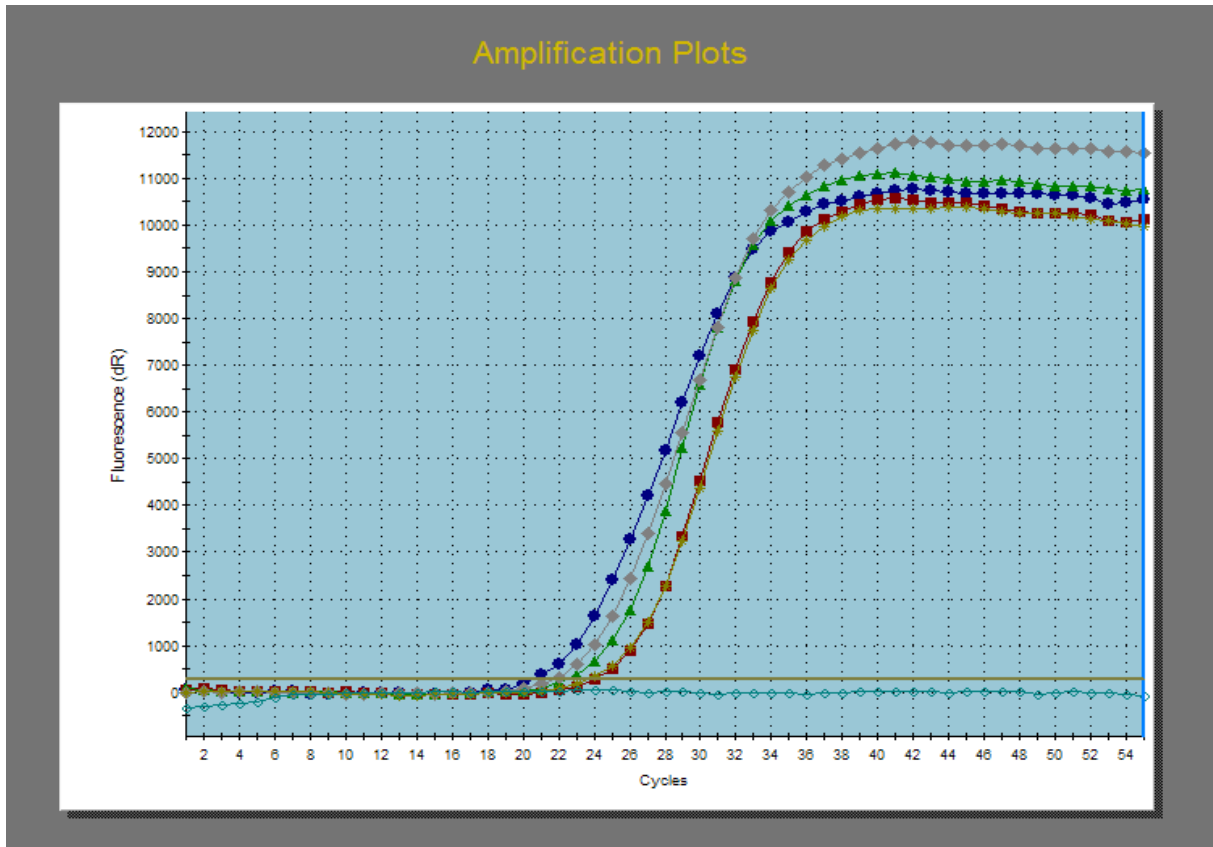


Abb.5: Darstellung der sogenannten Amplification Plots anhand eines Testlaufes.

2.6.3 Anfertigung einer Standardreihe

Möchte man unbekannte Konzentrationen an miRNAs der Patientenproben bestimmen muss man zusätzlich eine Standardreihe mit bekannten Konzentrationen anfertigen. Mithilfe dieser Standardreihe kann man anschließend über die Ct-Werte der Proben die fraglichen miRNA-Konzentrationen errechnen.

Die in dieser Arbeit angelegte Standardreihe bestand aus fünf im Vorfeld festgelegten Konzentrationen in absteigender Reihenfolge mit Werten von 20ng/μl bis 0,1ng/μl. Um aussagekräftige Standardkonzentrationen herzustellen, wurde cDNA aus 8 ausgewählten Proben des Kollektivs eingesetzt und anschließend gemittelt. Es wurden sowohl 4 tumorhaltige als auch 4 normale Proben mit in die Auswahl einbezogen (N8, N25, N36, N62, T8, T36, T62, T65, T=Tumor, N= Normalgewebe). Im Anschluss wurde aus dem Gemisch eine Standardreihe hergestellt und dabei die anfängliche Konzentration von 50ng/μl im Verhältnis 1:2,5 mit Wasser verdünnt. Die Ausgangskonzentration von 20ng/μl wurde im weiteren Verlauf zweimalig im Verhältnis 1:1 mit Wasser verdünnt, um die Konzentrationen von 10ng/μl und 5ng/μl zu erreichen. Abschließend wurde im Verhältnis 1:4 und 1:1 verdünnt, um eine Konzentration von 1ng/μl und 0,5ng/μl zu erhalten.

Im Folgenden soll die Anfertigung der Standardreihe veranschaulicht werden.



Abb. 6: Darstellung der Anfertigung einer Standardreihe

Nach jedem Arbeitsschritt wurden die Proben gevortext, zentrifugiert und gleich darauf bei -20°C im Eisschrank gelagert.

2.7 Normalisierung der Messung mit RNU6b

Die Konzentration der miRNAs in der Zelle kann mittels Real-time PCR nur indirekt anhand des sogenannten Ct-Wertes abgelesen werden. Für die bessere Quantifizierung der RNA-Abschnitte wurde deshalb ein sogenanntes housekeeping-Gen im Zuge der PCR als Referenzwert gleichermaßen mit amplifiziert. In diesem Fall handelte es sich um das housekeeping-Gen RNU6b, welches aus einer Sequenz von 107 Basen besteht und sich auf dem kurzen Arm des Chromosoms 10 befindet. Ausschlaggebend für die Verwendung als Referenz-Gen ist die Tatsache, dass es von jeder Zelle in gleicher Menge exprimiert wird. Zur Bestimmung der Konzentration an miRNAs in den Proben wurde also der gemessene Wert der zu untersuchenden miRNA ins Verhältnis gesetzt zum Messwert der RNU6b.

2.8 Pipettierung mittels Biomek Robotik Transport

Zur Pipettierung der 96-Well-Platten wurde zur vereinfachten und zeitsparenden Durchführung der Biomek Robotik Transport eingesetzt. Nach vorheriger Programmierung der gewünschten Mengenangaben und nach vorheriger Zuordnung der Probennummern lief die Pipettierung unkompliziert ab. Ein Real-Time-PCR-Ansatz enthielt in jedem Well jeweils 20,0µl Master-Mix und 5,0µl cDNA. Desweiteren wurde jede Probe dreifach in sogenannten Triplets auf eine 96-Well-Platte aufgebracht. Durch diese Verdreifachung der Probenanzahl wurde das spätere Ergebnis der PCR gleichermaßen auf Präzision hin geprüft und durch Schnittmengenbildung präzisiert. Ausreißer wurden nicht in die Berechnung mit einbezogen. Insgesamt mussten 40 der 96-Well-Platten pipettiert werden, da jede Platte 5 Triplets des zuvor angefertigten Standards enthalten musste.

2.9 Statistische Auswertung der Daten mit SPSS

Die Gesamtheit der erfassten Daten wurde mit Hilfe des Statistik- und Analyseprogramms PASW-Statistics (Version 18) erfasst. Zur Veranschaulichung der Ergebnisse in Tabellen, Diagrammen und Schemata wurde das Programm MedCalc Version 9.3 herangezogen. Unterschiede wurden als signifikant angesehen, wenn $p < 0,05$ war.

Alle Daten wurden auf Normalverteilung hin überprüft. Der Friedman-Test wurde zum Vergleich von gepaarten Proben angewandt. Dieser Test kam zum Einsatz, um eine spezifische miRNA einer Biopsie mit derselben miRNA des Tumorpräparates und des zugehörigen Normalgewebepräparates desselben Patienten zu untersuchen. Um einen idealen Cut-off-Wert herauszufinden, wurden sogenannte receiver-operator-curves (ROC) mit einem 95%igen Konfidenzintervall erstellt. Als deskriptive statistische Werte zur Beschreibung einzelner Variablen des Kollektivs kamen Mediane, Minima und Maxima, absolute Häufigkeiten, sowie untere-, und obere Quartile zum Einsatz. Unterschiede zwischen den einzelnen Patienten und den Tumor- und Therapiecharakteristika wurden unter Zuhilfenahme des Mann-Whitney-Tests, des Fisher-Tests und des Chi-Quadrat-Tests ermittelt, wobei ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ gewählt wurde.

Die mediane Beobachtungszeit des Überlebens nach Operation der Patienten war 4,4 Jahre (Minimum 2,2 Jahre, Maximum 6,4 Jahre). Kaplan-Meier-Kurven wurden zur Darstellung des Überlebens der Patienten herangezogen. Mit Hilfe des Logrank-Tests wurden Unterschiede im Überleben der Tumorkranken ermittelt.

3. Ergebnisse

3.1 Allgemeine Beschreibung des Gesamtpatientenkollektivs

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auf formalinfixierte und in Paraffin gebettete Gewebe-Resektate von 81 Patienten mit Rektumkarzinom zurückgegriffen, die sich in den Jahren von 1997-2007 in der Chirurgischen Klinik der Universität zu Köln (Direktor: Universitätsprofessor H. A. Hölscher) in Behandlung befanden. Es wurden 58 Biopsie-, und 81 Tumor-Präparate nebst zugehörigen tumorfreien Rändern untersucht. Dabei wurde darauf geachtet, dass von einem Patienten möglichst immer Biopsie- und Tumorpräparat, sowie der zugehörige Resektionsrand vorhanden waren. Nicht alle Präparate konnten in die Auswertung mit einbezogen werden (s.u.).

Die resezierten Tumoren wurden sämtlich am Institut für Pathologie der Universität zu Köln aufgearbeitet, befundet und archiviert. Zugehörige Biopsien wurden an verschiedenen Kliniken im Kölner Großraum entnommen und zum Teil vom pathologischen Institut der Universität zu Köln, zum Teil von niedergelassenen Pathologen in näherer Umgebung der behandelnden Klinik befundet, aufgearbeitet und archiviert.

Eingeschlossen wurden auch Patienten, deren Tumor sich unter der Radiochemotherapie vollständig zurückgebildet hatte (vollständige Regression) und in deren Operationspräparat nur noch eine ulzeröse Läsion ohne tumoröse Zellen an Stelle des vorherigen Tumors nachzuweisen war.

Da es im Rahmen dieser Studie nicht möglich war, von allen 81 untersuchten Patienten miRNAs sowohl der Biopsate als auch der Tumorpräparate mit zugehörigem Resektionsrand zu gewinnen, wurde zum direkten Vergleich von Biopsat mit Tumormaterial und mit Normalgewebe eine Untergruppe von genau 40 Patienten gebildet bei denen jeweils alle drei Präparate vorlagen. Dies ist für die statistische Auswertung der Ergebnisse im Folgenden von Bedeutung.

3.1.1 Alters- und Geschlechtsverteilung

Von den 40 in dieser Studie untersuchten Patienten waren 16 weiblichen und 24 männlichen Geschlechts. Der jüngste Patient war zum Zeitpunkt der Operation 35 Jahre alt, der Ältteste 79 Jahre. Der mediane Altersdurchschnitt lag bei 60,8 Jahren.

3.1.2 Histopathologischer Differenzierungsgrad

Zum Zeitpunkt der operativen Tumorentfernung wurden die Tumorpräparate des Kollektivs wie folgt nach ihrem Grading klassifiziert. Insgesamt konnten 40 Tumorpräparate mit in die Auswertung einbezogen werden. Hierbei lag bei 19 Tumoren ein G₁ – Stadium vor (47,5%), bei 16 ein G₂ – Stadium (40%) und bei 5 Präparaten ein G₃ – Stadium (12,5%).

Aus verschiedenen Gründen, die im Teil Diskussion genauer erläutert werden, konnten nur 40 Biopsien in die Auswertung einbezogen werden.

3.1.3 Staging des Gesamtkollektivs

ypT

Von den 40 Tumorpräparaten wurden 4 Resektate (10%) im Rahmen des Staging als pT₀ eingestuft. Dies waren Fälle, bei denen sich die Tumormasse unter der Therapie bereits zurückgebildet hatte. Als ypT₁ wurden nur 2 Präparate eingestuft (5%), als pT₂ 9 Gewebe-Resektate (22,5%), während die Gruppe der als pT₃ klassifizierten Tumoren mit einer Anzahl von 24 den größten Anteil ausmachte (60%). Ein weiteres Karzinom wurde dem Stadium ypT₄ zugeordnet (2,5%). Der Buchstabe y steht für eine bereits stattgefundenene Therapie.

Tabelle 6: Stadien-Einteilung des Kollektivs, **ypT**

ypT ₀	ypT ₁	ypT ₂	ypT ₃	ypT ₄	Gesamt
4 (10%)	2 (5%)	9 (22,5%)	24 (60%)	1 (2,5%)	40 (100%)

ypN

Der überwiegende Anteil der Tumoren, nämlich 30 von insgesamt 40 (75%), hatte zum Zeitpunkt der Operation entweder noch nicht in regionäre Lymphknoten metastasiert oder die Lymphknotenmetastasen haben sich unter der neoadjuvanten Therapie vollständig zurückgebildet. Im Rahmen des Staging wurde diese Gruppe als ypN₀ klassifiziert. Als ypN₁ wurden 7 (17,5%) und als ypN₂ 3 (7,5%) Tumoren eingestuft.

Tabelle 7: Einteilung des Lymphknotenstatus, **ypN**

ypN ₀	ypN ₁	ypN ₂	Gesamt
30 (75%)	7 (17,5%)	3 (7,5%)	40 (100%)

ypM

Da insgesamt nur 2 Tumoren (5%) zum Zeitpunkt der Operation metastasiert hatten (oder die Metastasen sich bereits unter der neoadjuvanten Therapie vollständig zurückgebildet hatten), konnte dieser Parameter aufgrund der geringen Anzahl nicht in die Auswertung mit einbezogen werden.

ypTNM

Die Einteilung der ypTNM-Stadien ergab für das Kollektiv von 40 Patienten folgende Verteilung: 8 Tumorpräparate (10,3%) wurden dem Stadium 0 zugeordnet (dies waren Fälle, bei denen sich die Tumormasse unter der Therapie bereits zurückgebildet hatte). 19 (24,7%) Präparate konnten dem Stadium I, weitere 29 (37,7%) dem Stadium II und 18 Tumoren (23,4%) dem Stadium III zugeordnet werden. Nur 2 Patienten wiesen zum Zeitpunkt der Operation ein metastasiertes Stadium IV auf (5%).

Tabelle 8: ypTNM-Stadien

Stadium 0	Stadium I	Stadium II	Stadium III	Stadium IV	Gesamt
4 (10%)	10 (25%)	15 (37,5%)	9 (22,5%)	2 (5%)	40 (100%)

3.1.4 Häufigkeitsverteilung der Regressionsgrade

Regressionsgrade nach Kölner Einteilung

11 von 40 Tumoren (27,5%) hatten nach stattgehabter Radiochemotherapie noch eine Größe von 50%–90% und mehr im Vergleich zur ursprünglichen Größe und wurden somit dem Regressionsgrad I zugeteilt. Die insgesamt größte Gruppe konnte mit 15 Fällen (37,5%) dem Grad II zugeordnet werden. In diesem Stadium bestand nach Therapie nur noch ein vitaler Resttumor von 10%–15%. Dem Grad III wurden 10 Tumoren (25%) mit einem Resttumor von kleiner als 10% zugeteilt. Nur 4 Tumoren (10%) haben sich unter Therapie vollständig zurückgebildet und wurden als Regressionsgrad IV klassifiziert.

Die Grade I und II werden auch als Minor Responder bezeichnet während die Grade III und IV als Major Responder zusammengefasst werden.

Tabelle 9: Regressionsgrade nach Kölner Einteilung

Grad I	Grad II	Grad III	Grad IV	Summe
11 (27,5%)	15 (37,5%)	10 (25%)	4 (10%)	40 (100%)

Regressionsgrade nach Junker-Müller

Einer von insgesamt 40 Tumoren (2,5%) bestand nach Radiochemotherapie aus mehr als 90% vitalen Resttumors (Regressionsgrad I). Die weitaus meisten Karzinome konnten mit einer Anzahl von 22 (55%) nach diesem Einteilungsschema zum Grad IIA gezählt werden. Dem Stadium IIB wurden 13 Fälle (32,5%) zugeordnet, die alle zwischen 15% und 90% Resttumormasse nach stattgehabter Therapie aufwiesen. 4 Tumoren (10%) konnten dem Regressionsgrad III zugeordnet werden, da sie zum Zeitpunkt der Operation bereits keinen vitalen Resttumor-Anteil mehr besaßen.

Tabelle 10: Regressionsgrade nach Junker-Müller-Einteilung

Grad I	Grad II A	Grad II B	Grad III	Summe
1 (2,5%)	22 (55%)	13 (32,5%)	4 (10%)	40 (100%)

3.2 Analyse der miRNAs im Hinblick auf untersuchte Gewebe

3.2.1 Expressionslevels der miRNAs vor und nach neoadjuvanter Therapie

Zur Analyse des Expressionslevels wurde die Biopsie jedes Patienten (Gewebe vor Therapiebeginn) mit dem jeweiligen Operationspräparat (Tumorgewebe nach Therapie) und dem zugehörigen gesunden Resektionsrand verglichen.

miR-21

Die miR-21 wurde in der Biopsie, also vor neoadjuvanter Therapie am höchsten exprimiert (Median 0,29, Min 0, Max 2,25). Danach folgte Normalgewebe mit einem medianen Expressionslevel von 0,24 (Min 0, Max. 2,03) und schließlich posttherapeutisches Tumorgewebe mit einem medianen Expressionslevel von 0,14 (Min. 0, Max. 1,43). Der Unterschied zwischen dem Expressionslevel der miR-21 in den verschiedenen Geweben war nicht signifikant.

Tabelle 11: Vergleich des miR-21-Expressionslevels in Tumor- vs. Biopsie- vs. Normalgewebe

Gewebe	Median	Min.	Max.	Sign. (p=)
Biopsie	0.29	0.00	2.25 vs.	vs. Tumor =0.968
Normalgewebe	0.14	0.00	1.43 vs.	vs. Normal=0.493
Tumorgewebe	0.24	0.00	2.03 vs.	vs. Biopsie=0.294

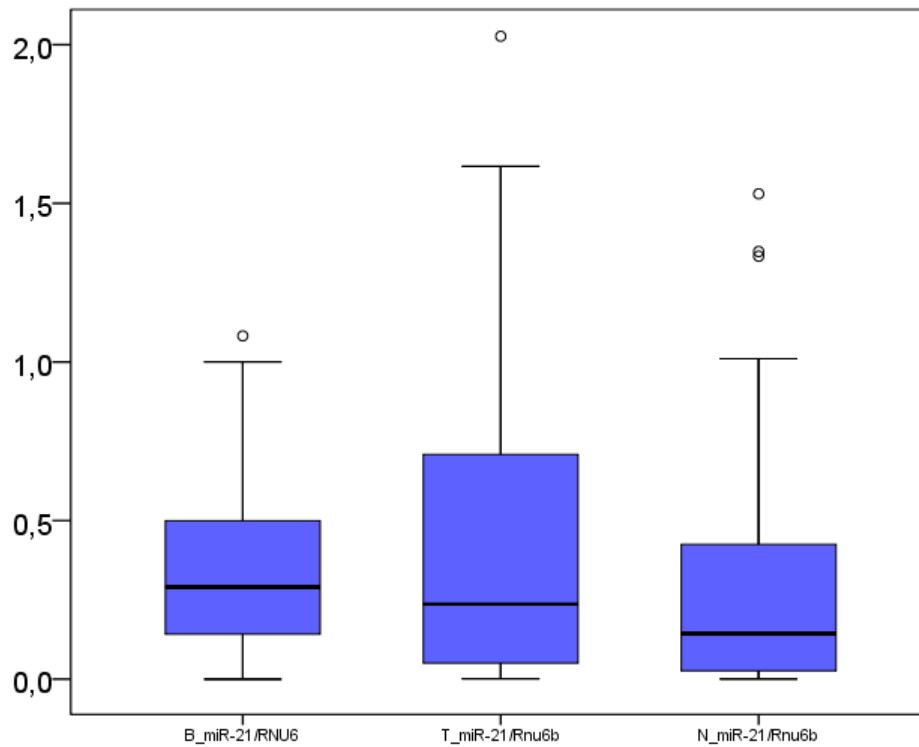


Abb. 7: Vergleich des miR-21-Expressionslevels in Tumor-, Biopsie- vs. Normalgewebe

miR-31

Das miR-31 Expressionslevel war bei miR-31 im Tumorgewebe am höchsten (Median 30,14, Min. 0,15, Max. 1433246), gefolgt vom Normalgewebe mit einem Median von 4,86 (Min 0, Max. 687500). In der Biopsie war die Expression von miR-31 am geringsten (Median 1,8, Min 0,05, Max. 1,74x10⁹).

Tabelle 12: Vergleich des miR-31-Expressionslevels in Tumor-, Biopsie- vs. Normalgewebe

Gewebe	Median	Min	Max	Sign. (p=)
Biopsie	1.83	0.05	1.74 x10 ⁹	vs. Tumor =0.042
Normalgewebe	4.86	0.00	687500	vs. Biopsie =0.554
Tumorgewebe	30.14	0.15	1433246	vs. Normal =0.056

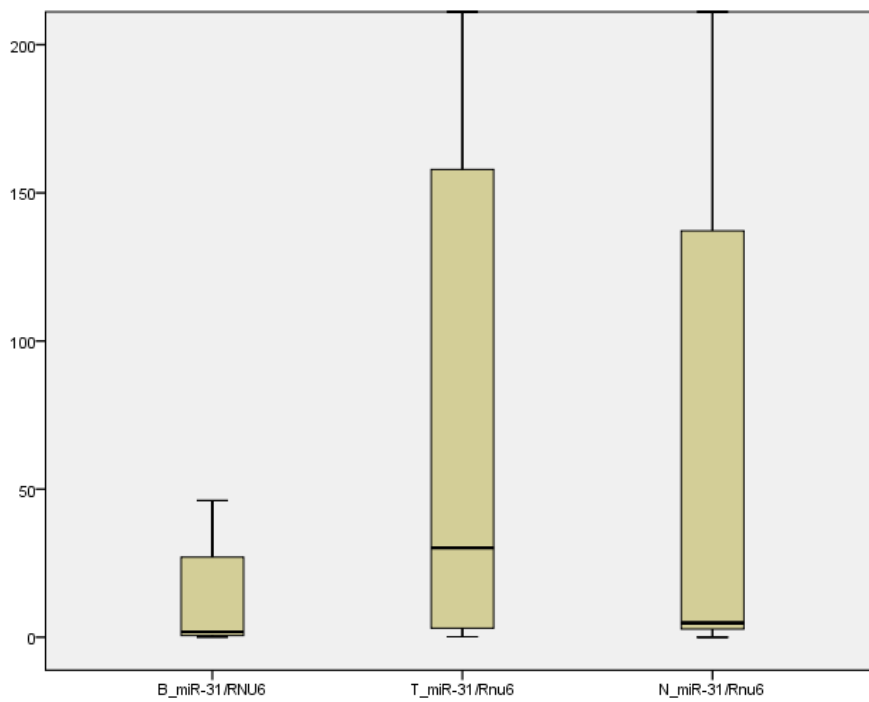


Abb. 8: Vergleich des miR-31-Expressionslevels in Tumor-, Biopsie- vs. Normalgewebe

miR-143

Im prä-therapeutischen Tumorgewebe war das Expressionslevel der miR-143 am niedrigsten (Median 0,006, Min. 0, Max 0,9), gefolgt von Tumorgewebe nach neoadjuvanter Therapie (Median 0,66, Min. 0,001, Max. 7,2) und Normalgewebe mit einem Median von 0,666 (Min. 0,001, Max. 9,9). Die Unterschiede zwischen prätherapeutischem und posttherapeutischem Tumorgewebe waren signifikant ($p < 0,0001$).

Tabelle 13: Vergleich der miR-143-Expressionslevels in Tumor-, Biopsie- vs. Normalgewebe

Gewebe	median	Min.	Max.	Sign. (p=)
Biopsie	0.006	0.000	0.9	vs.Tumor <0.0001
Normalgewebe	0.666	0.001	9.9	
Tumorgewebe	0.666	0.001	7.2	

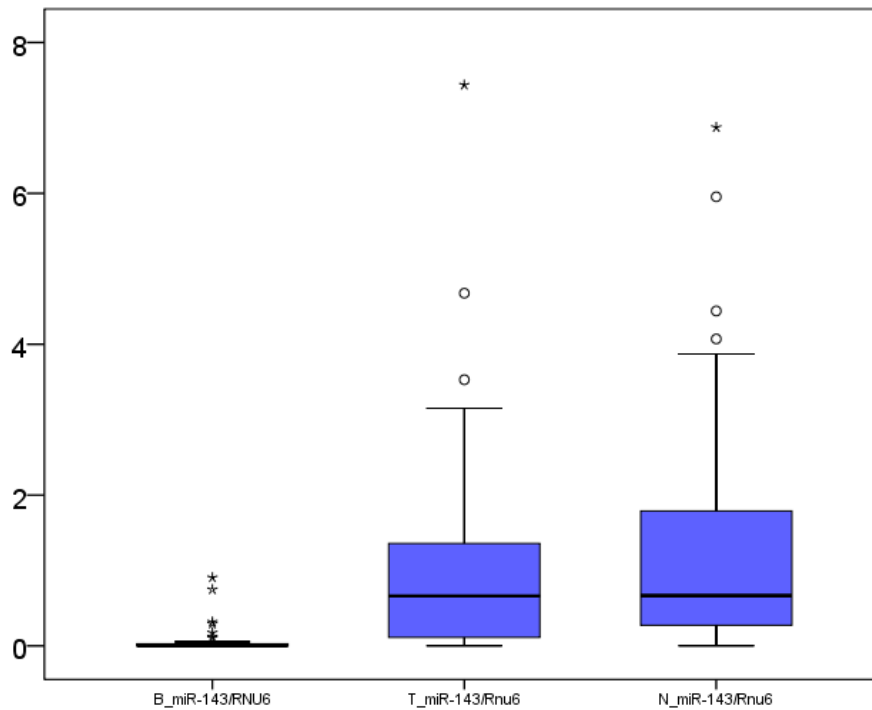


Abb. 9: Vergleich des miR-143-Expressionslevels in Tumor-, Biopsie- vs. Normalgewebe

miR-145

Vor der neoadjuvanten Therapie konnte das niedrigste miR-145-Level beobachtet werden (Median 0,007, Min. 0, Max. 0,564), gefolgt vom posttherapeutischen Tumorgewebe (Median 0,147, Min. 0, Max. 1,533). Im Normalgewebe war das miR-145-Level am höchsten mit einem Median von 0,32 (Min. 0,015, Max. 7,34). Der Unterschied zwischen der prä- und posttherapeutischen miR-145-Expression war signifikant ($p < 0,001$).

Tabelle 14: Vergleich des miR-145-Expressionslevels in Tumor-, Biopsie- vs. Normalgewebe

Gewebe	Median	Min.	Max.	Sign. (p=)
Biopsie	0.007	0.000	0.564	vs.Tumor<0.001
Normalgewebe	0.320	0.015	7.34	vs.Biopsie<0.001
Tumorgewebe	0.147	0.000	1.533	vs.Normal=0.524

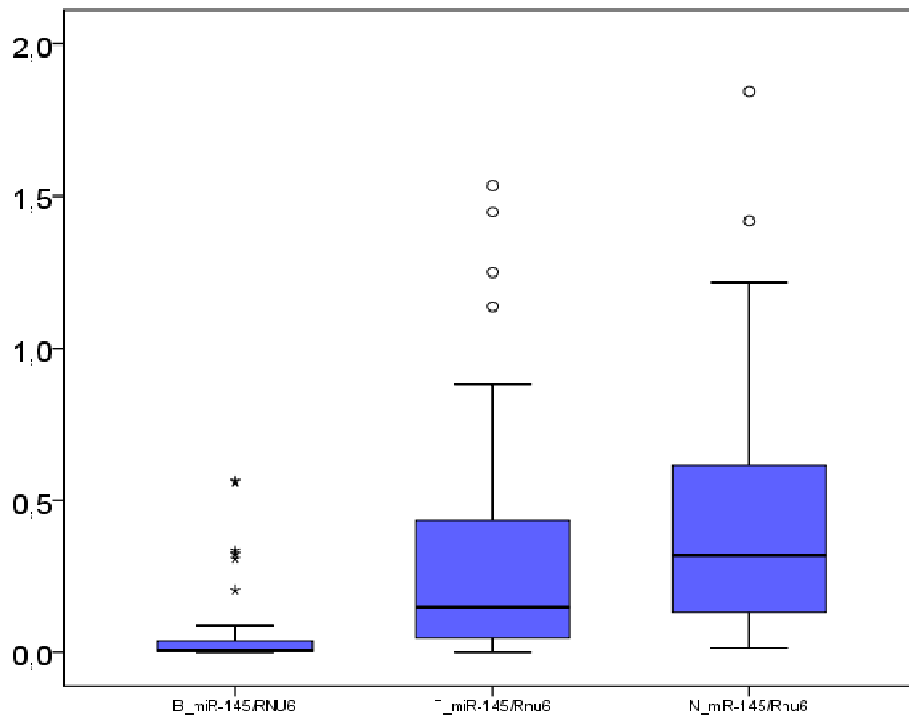


Abb. 10: Vergleich des miR-145-Expressionslevels in Tumor-, Biopsie- vs. Normalgewebe

3.2.2 Gibt es Unterschiede der miRNAs nach Radiochemotherapie im Bezug auf das Therapieansprechen (Tumorregression)?

Um das Therapieansprechen der einzelnen Patienten zu quantifizieren wurde jedes Tumorpräparat nach der Operation pathologisch aufgearbeitet und abermals befundet. Dabei wurde der zu diesem Zeitpunkt noch vorhandene Tumoranteil im Vergleich zur ursprünglichen TumorgroÙe beurteilt und anhand des verbliebenen Resttumoranteils (in Prozent) einem sogenannten Regressionsgrad zugeordnet (s. Abschnitt 3.1.4). Hierfür wurde die Einteilung der Kölner Regressionsgrade herangezogen. Um nun das Therapieansprechen im Zusammenhang mit miRNAs zu beurteilen wurde jeweils die Korrelation einer miRNA mit den einzelnen Regressionsgraden berechnet.

miR-21

Betrachtet man die miR-21 in Tumorgewebe nach neoadjuvanter Therapie, dann stellt man die niedrigste miR-21 Expression (0,120) bei Patienten mit einem Regressionsgrad von I (n=11) fest, gefolgt von Grad II-Patienten (n=15) (0,270), Grad III Patienten (n=10) (0,290) und schließlich Patienten, welche nach Therapie dem Grad IV zugeordnet werden konnten (n=4) (0,378). Die Unterschiede zwischen den einzelnen miR-21-Levels waren nicht signifikant ($p=0,657$).

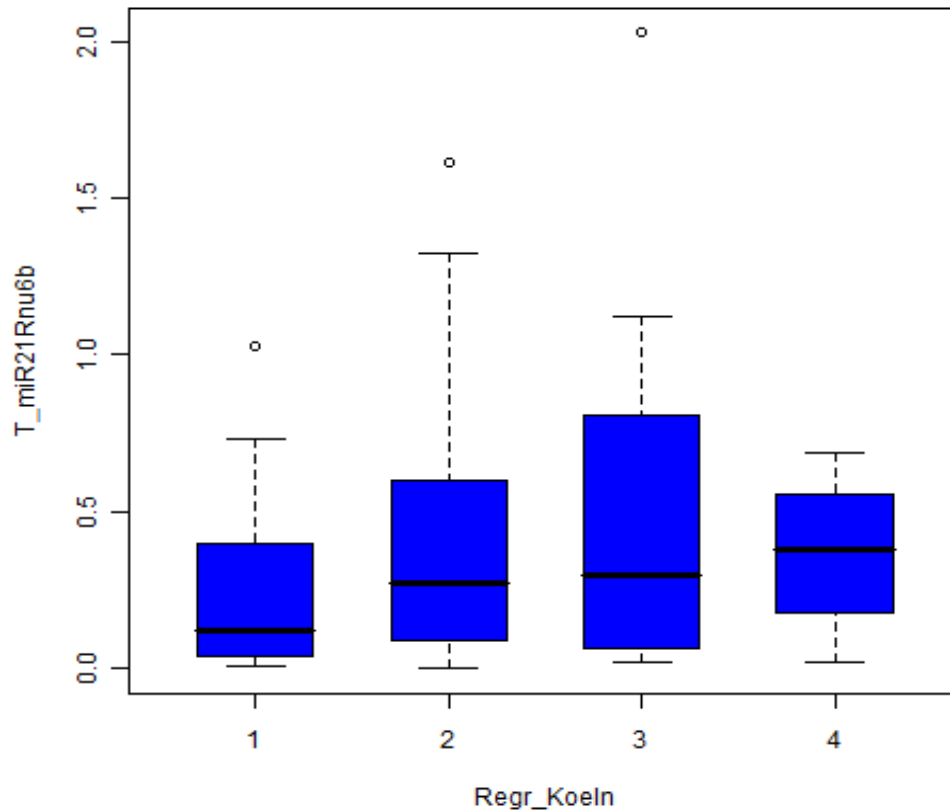


Abb. 11: miR-21-Expression und Korrelation mit Kölner Regressions-Graden

miR-31

Durch die große Streuung im Bezug auf die Expression der miR-31 konnten die miRNA-Expressionslevels nicht verglichen werden.

miR-143

Nach neoadjuvanter Therapie konnte eine hoch regulierte miR-143-Expression im Vergleich zu Tumorgewebe vor der Therapie festgestellt werden. Im Bezug auf die Tumoregression in posttherapeutischem Tumorgewebe konnte folgendes beobachtet wer-

den: Regressions-Grad I (n=11) 0,66, Regressions-Grad II (n=15) 0,35, Regressions-Grad III (n=10) 0,91 und Regressionsgrad IV (n=4) 0,70. Diese Unterschiede im Expressionslevel waren nicht signifikant (p=0,895).

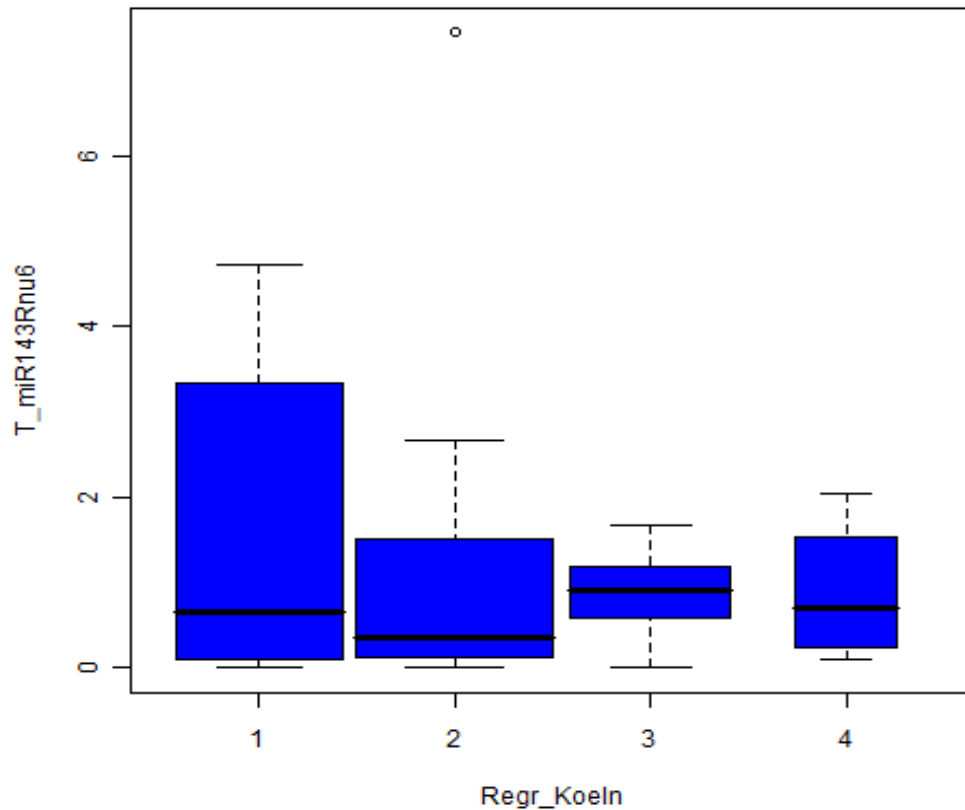


Abb.12: miR-143 nach Tumorthherapie und Korrelation mit Kölner Regressions-Graden

miR-145

Auch miR-145 war nach neoadjuvanter Therapie in Tumorgewebe hoch reguliert. Das höchste Expressionslevel nach Tumorthherapie (0,436) konnte bei Patienten mit Regressions-Grad 3 (n=10) beobachtet werden, gefolgt von Regressions-Grad II (n=15) (0,264) und Regressions-Grad IV (n=4) mit einem mi-RNA-Expressionslevel von 0,114. Das niedrigste Expressionslevel fand sich bei einem Regressions-Grad von 1 (n=11), (p=0,044).

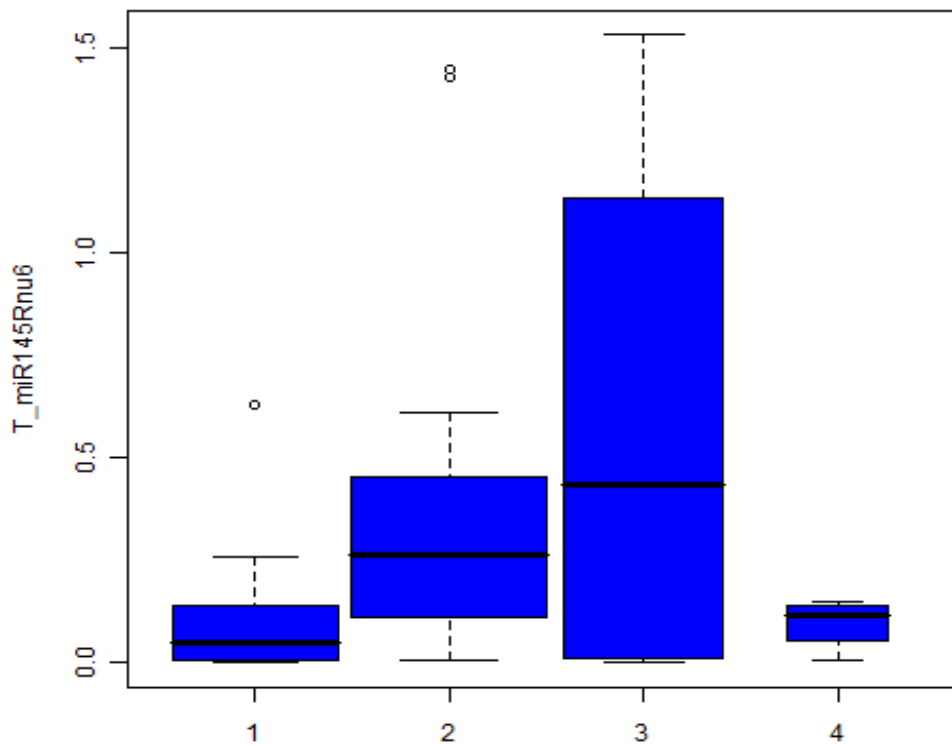


Abb. 13: miR-145 nach Therapie und Korrelation mit Kölner Regressions-Graden

Eine weitere Möglichkeit das Therapieansprechen darzustellen ist die Einteilung der Patienten in Major- und Minor-Responder (s.o.). Hierbei werden jeweils zwei Regressionsgrade zusammengefasst. Minor-Responder werden die ersten beiden Regressionsgrade (I und II nach Kölner Einteilung) bezeichnet. Dies sind Patienten bei denen sich der Tumor nur wenig verkleinert hat. Als Major-Responder werden demzufolge Patienten klassifiziert, bei denen der Resttumoranteil nur noch gering ist – entsprechend also den Regressionsgraden III und IV nach Kölner Einteilung. Die Errechnung dieser Zusammenhänge war in keinem Fall statistisch signifikant.

Die Errechnung der Korrelation mittels dichotomisierter (zweigeteilter) Regression ergab einen Trend hin zu einer erhöhten miR-145-Expression und einer Major-Response.

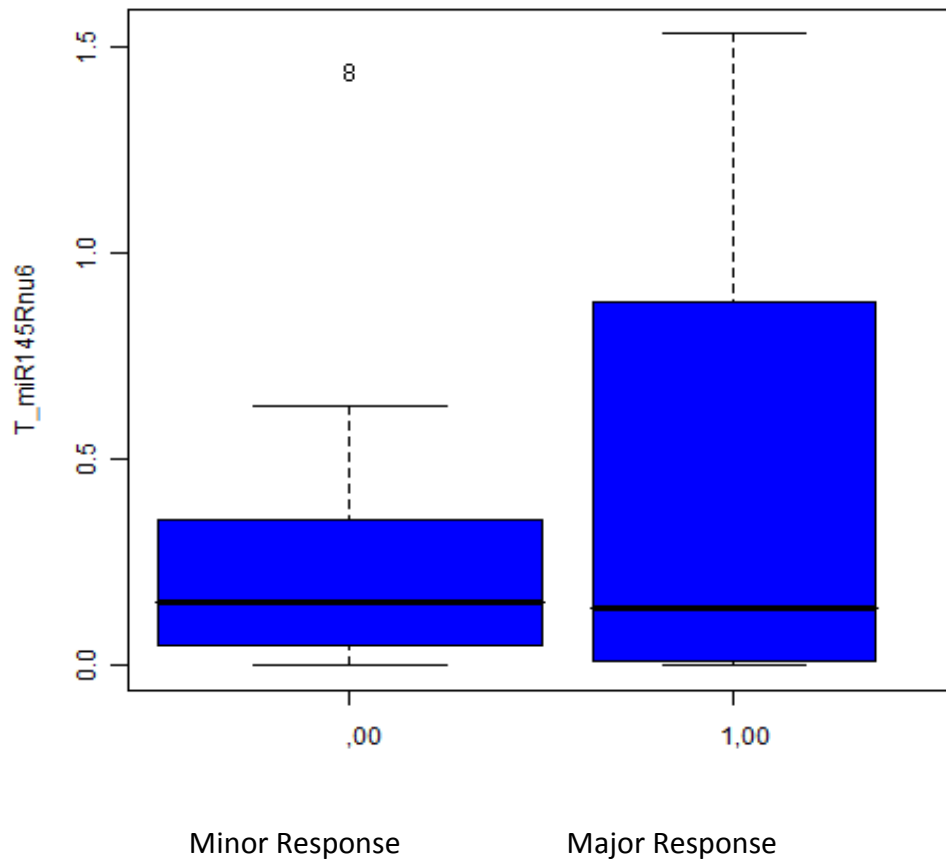


Abb. 14: Dichotomisierte Regression der miR-145 im Bezug auf Major- (Grad III und IV) und Minor-Responder (Grad I und II)

Tabelle 15: Vergleich der miRNAs im Hinblick auf das Therapieansprechen

MiRNA	Minor-Responder	Major-Responder	Sign. (p=)
miRNA 21	0,21	0,36	p=0,395
miRNA 31	12,0	87,0	p=0,281
miRNA 143	0,55	0,91	p=0,812
miRNA 145	0,15	0,14	p=0,631

3.2.3 Gibt es einen prädiktiven Marker für das Therapieansprechen?

miR-145

Im Hinblick auf die Tumorregression und der Gewebeprobe vor einer neoadjuvanten Therapie konnte Folgendes festgestellt werden: Das höchste miR-145-Level der Biopsien war bei Patienten mit einem Regressionsgrad von III gefunden werden, gefolgt von den Regressions-Graden II, I und IV.

Eine Korrelationsanalyse der prätherapeutischen miR-145-Expression und der Tumorregression zeigte einen Zusammenhang zwischen Major Response und einer höher exprimierten miR-145 bei einem cut-off-Wert von 0,004 (mit einer Signifikanz von 0.017 (Fisher Exact-Test)).

Tabelle 16: Korrelationsanalyse nach Einteilung des Kollektivs in Major- und Minor-Responder

Biopsie	Minor-Responder	Major-Responder	Sign. (p=)
miRNA 21	0,31	0,25	p=0,307
miRNA 31	1,4	3,4	p=1,00
miRNA 143	0,005	0,008	p=0,462
miRNA 145	0,003	0,016	p=0,047

3.2.4 Zusammenhang von miRNAs mit der Prognose der Patienten

miR-143

Die Analyse von Tumorgewebe nach neoadjuvanter Therapie mit der Expression von miR-143 ergab einen Trend hin zu längerem Überleben der Patienten mit einem erhöhten miR-143-Expressionslevel (cut-off-Wert=1). Dieser Wert war mit einem p von 0,231 nicht signifikant.

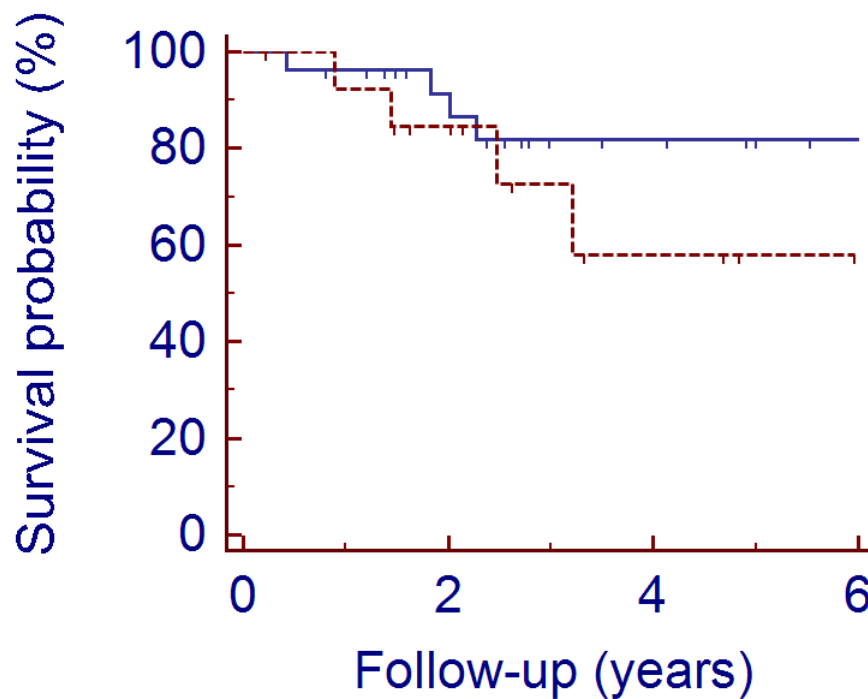


Abb. 15: Überlebenswahrscheinlichkeit in % in Tumorgewebe nach Therapie bei miR-143 >1 (blau) und miR-143 <1 (braun)

miR-145

Die Korrelation zwischen der Prognose der Patienten und einer dichotomisierten (zweigeteilten) miR-145 Expression nach Therapie ließ einen Trend hin zu längerem Überleben der Patienten und miR-145 Expression $> 0,1$ ($n=35$) versus $< 0,1$ ($n=15$) (Cut-off-Wert= $0,1$) erkennen. Zu beachten ist, dass dieser Trend nicht signifikant war ($p=0,244$).

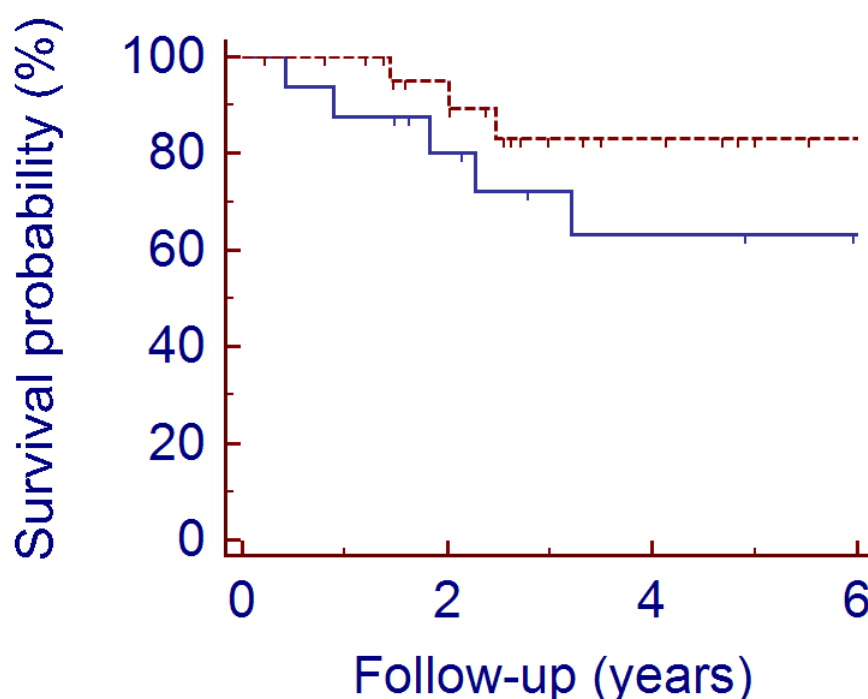


Abb. 16: Überlebenswahrscheinlichkeit in % nach Therapie bei miR-143 > 1 (blau) und miR-143 < 1 (braun)

Tabelle 17: 5-Jahresüberlebensdaten des Gesamtkollektivs

Minor-Responder	Major Responder	Gesamt
70%	82%	75%

Tabelle 18: 5-Jahresüberlebensdaten bezüglich der Regressionsgrade (Köln)

Grad I	Grad II	Grad III	Grad IV
56%	78%	89%	67%

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Zusammenhang von miRNAs -21, -31, -143, -145 mit dem kolorektalen Karzinom vor und nach einer neoadjuvanten Radiochemotherapie mit 5-FU und einer Bestrahlung von 50,4 Gy untersucht. Hierbei wurden insbesondere die miRNAs vor und nach der Therapie miteinander verglichen. Zusätzlich wurde mit gesundem Normalgewebe verglichen. Die Ergebnisse bestärken die Annahme, dass miRNAs in Tumorgewebe anders exprimiert werden als im zugehörigen gesunden Gewebe und dass eine Radiochemotherapie die Regulierung der miRNAs bei lokal fortgeschrittenem kolorektalen Karzinom in der Zelle beeinflusst.

4.1 Technische Mängel und Einfluss auf das Kollektiv

Die Methode der miRNA-Quantifizierung mittels real-time RT-PCR birgt laut Fleige et al. (31) zahlreiche Fehlerquellen, besonders im Bereich der prä-Analytik. Zur sogenannten prä-Analytik muss in diesem Fall die Gewinnung und Aufarbeitung der Proben, die RNA-Extraktion und die cDNA-Synthese gezählt werden. Diese oft übersehenen Fehlerquellen führen nach Meinung von Fleige et al. zu erheblichen Variationen in den Expressionsergebnissen. Im Falle dieser Arbeit wurde die Probengewinnung, Aufarbeitung und Lagerung professionell nach standardisierten Verfahren des Instituts für Pathologie der Universität zu Köln durchgeführt. Es ist also davon auszugehen, dass sämtliches Untersuchungsmaterial bis zu diesem Zeitpunkt von höchster Qualität war.

Die Qualität und die Quantität des Ausgangsmaterials für die RT-PCR scheinen also von maßgeblicher Bedeutung für die Präzision der späteren Ergebnisse zu sein. Bei der Durchführung der RNA-Extraktion und der cDNA-Synthese könnte eine gewisse Ungenauigkeit der vorliegenden Ergebnisse begründet sein – insbesondere im Zusammenhang mit der großen Streuung bei der Verteilung der Werte von miR-31. Da aber auch die anderen miRNAs (miR-21, -143, -145) aus demselben Ausgangsmaterial mittels RT-

PCR vervielfältigt wurden, kann hierin nicht der alleinige Grund für die Abweichungen bei der Messung von miR-31 begründet liegen.

Da die Streuung der durch die RT-PCR erhaltenen Ct-Werte bei der miR-31 zu groß und die sogenannten Ausreißer zu zahlreich waren, wurde die miR-31 nicht in die Auswertung mit einbezogen und wird in den folgenden Teilen der Diskussion auch nicht weiter aufgeführt.

Weitere Ursachen für die Ungenauigkeit in den Ergebnissen der Analyse von miR-31 könnten eine fehlerhafte Einstellung des Thermocyclers, Fehler bei der Pipettierung des Reaktionsansatzes oder eine Verunreinigung der Proben sein.

4.2 Expressionslevels der micro-RNAs miR-21, -143, -145 vor und nach neoadjuvanter Therapie mit 5-FU

MiRNAs spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Tumoren. Sie können, je nach Funktion, das Tumorstadium entweder fördern, indem sie die Expression von Tumorsuppressoren negativ regulieren, oder verhindern, indem sie Onkogene positiv regulieren (32). Mehrere Studien belegen, dass miRNAs in neoplastischem Gewebe anders exprimiert werden als in gesunden Vergleichsproben. Einige miRNAs werden in Tumorgewebe über-, andere unter exprimiert (1, 58, 85). Die Ursache für eine Hochregulierung mag in einer Aktivierung der Transkription oder in einer Amplifikation der zugrundeliegenden Gene, die für miRNAs kodieren, liegen. Eine verminderte miRNA-Expression könnte die Deletion einer spezifischen chromosomalen Region, epigenetisches silencing oder Defekte im Ablauf der Biogenese als Ursache haben (74). Die in dieser Studie untersuchten miRNAs -21, -143, -145 wurden in vorhergehenden Untersuchungen bereits als besonders relevant für das kolorektale Karzinom identifiziert. Hierbei spielt miR-21 eine Rolle als Onkogen, während miR-143 und -145 tumorsuppressive Wirkung haben (8, 23, 58).

miR-21

Bereits in mehreren Veröffentlichungen wurde beschrieben, dass miR-21 in Tumorgewebe hoch reguliert ist (6, 32, 84, 85). Dies zeigen unsere Ergebnisse ebenfalls: MiR-21 ist in den Biopsien, also vor neoadjuvanter Therapie, am höchsten exprimiert. Danach folgt die Expression in Normalgewebe und schließlich in posttherapeutischem Tumorgewebe, wo die miR-21-Expression am niedrigsten ist. Der Unterschied zwischen dem Expressionslevel der miR-21 in den jeweiligen Gewebeproben ist, im Gegensatz zu Slaby et al. (84), in dieser Arbeit allerdings nicht signifikant. Einige Studien belegen, dass miR-21 mehrere Gene beeinflusst, die eine Auswirkung auf Motilität der Zellen (wichtiger Faktor bei der Entstehung von Metastasen) und auf das remodeling der extrazellulären Matrix haben. In diesem Zusammenhang ist besonders der Einfluss von miR-21 auf das Tumorsuppressor-Gen PDCD4 zu nennen, welches auf einem posttranskriptionalen Niveau die Neovaskularisation (tumorale Gefäßneubildung) und Entwicklung von Metastasen induziert (6, 18). In der hier vorliegenden Arbeit konnte kein Zusammenhang des miR-21-Levels mit dem klinischen Tumorstadium, dem Lymphknotenstatus sowie der Fernmetastasierung gezeigt werden. Als mögliche Ursache für diese Tatsache könnte unter anderem auch die geringe Anzahl der pN1 und pN2 Stadien sowie die noch geringere Anzahl an metastasierten Karzinomen (n=2) in dem vorliegenden Kollektiv sein. Dies lässt die statistische Wahrscheinlichkeit eines signifikanten Zusammenhangs bei der Analyse sehr gering werden.

MiR-21 scheint auch im Zusammenhang mit anderen Tumorentitäten von Bedeutung zu sein. So konnten Meng et al. (2007) am humanen hepatozellulären Karzinom zeigen, dass miR-21 das Tumorsuppressor-Gen PTEN inhibiert, welches eine wichtige regulatorische Komponente des Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase-Signalweges zu sein scheint (55). Suppression von PTEN durch miR-21 führt also im Endeffekt zu einer Zunahme des Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase-Signalweges und damit zu einer Progression des Tumorwachstums. Gleichmaßen scheint es sich beim kolorektalen Karzinom zu verhalten (85). Dies ist insbesondere deshalb von Bedeutung, da miR-21 nach aktuellem Wissensstand die am häufigsten hoch regulierte miRNA beim kolorektalen Karzinom ist (46, 79, 84).

miR-143 und miR-145

Bereits seit dem Jahr 2003 weiß man, dass miRNA 143 und miR-145 in Tumorgewebe herunter reguliert ist, was die Vermutung nahe legt, dass diese beiden miRNAs eine Funktion als Tumorsuppressoren innehaben (1, 58). Ganz in Übereinstimmung mit dieser Erkenntnis zeigen die hier vorliegenden Ergebnisse eine signifikant niedrigere Expression von miR-143 in Tumorgewebe verglichen mit gesundem Normalgewebe. Diesbezüglich konnten Chen et al. (2009) spezifisch für die tumorsuppressive miR-143 zeigen, dass sie, wie angenommen, das Zellwachstum von kolorektalen Tumorzellen hemmt und dabei interessanterweise das für viele Signalwege wichtige Protein KRAS inhibiert (18).

Im Bezug auf miR-145 konnten die in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse die oben genannte theoretische Annahme, dass miR-145 einen tumorsuppressiven Effekt habe, wie folgt untermauern: MiR-145 war vor der neoadjuvanten Therapie am niedrigsten in der Zelle exprimiert, gefolgt von post-therapeutischem Tumorgewebe. Am höchsten war das miR-145-Level in gesundem Normalgewebe. Hierbei fiel der Unterschied zwischen prä- und posttherapeutischem Karzinom-Gewebe signifikant aus.

Die genannten theoretischen Annahmen leiten sich unter anderem aus Arbeiten von Akao et al. ab. Die Autoren konnten durch in vitro Versuche mit DLD-1 und SW480 – Zellen, die sie mit miR-145 und miR-143 - Vorläufermolekülen transfizierten, zeigen, dass sich die Zellproliferation durch diese Vorläufermoleküle hemmen lässt. Diese Beobachtung bestätigt die Erkenntnis, dass miR-143 und -145 eine tumorsuppressive Wirkung haben. Denn die unkontrollierte Zellproliferation ist eines der Hauptmerkmale von malignen Tumoren. Für den tumorsuppressiven Effekt von miR-145 ist laut La Rocca et al. vor allem die Herunterregulierung von Insulin Rezeptor Substrat-1 verantwortlich. Dieses Protein spielt eine wichtige Rolle für das Zellwachstum und für die Zellproliferation (49).

Auswirkungen der neoadjuvanten Therapie mit 5-FU auf die miRNAs -21, -143, -145

Die Annahme, dass eine Therapie mit einer chemotherapeutischen Substanz ihre Wirkung unter anderem dadurch entfaltet, dass sie das miRNA-Expressionsmuster der Zelle beeinflusst (73), führte zu der in dieser Arbeit untersuchten Fragestellung, inwiefern sich die Expression der miRNAs-21, -143, und -145 nach einer neoadjuvanten Radiochemotherapie mit 5-FU (gepaart mit einer Bestrahlung von 50,4 Gy) verändert. Bisher liegen nur relativ wenige Studien vor, die den Einfluss einer pharmakologischen Chemotherapie im Zusammenhang mit miRNAs untersuchen. Unter den wenigen Studien, die diesbezüglich veröffentlicht wurden ist unter anderem diejenige von Nakajima et al. (2006) zu nennen. Die Autoren identifizierten die beiden miRNAs let-7g und miR-181b als prognostisch bedeutsam für das Ansprechen einer Chemotherapie mit 5-FU in vivo (60). Eine weitere von Rossi et al. untersuchte miRNA ist die miR-200b, die laut Autoren in neoplastischem Gewebe in erhöhter Konzentration im Vergleich zum gesunden Gewebe vorkommt. Durch eine Behandlung mit dem Antimetabolit 5-FU kann die Expression von miR200b in vitro gesenkt werden (73).

Bezüglich der in dieser Arbeit untersuchten miR-21 halten Rossi et al. in einer Veröffentlichung aus dem Jahr 2007 fest, dass miR-21 durch eine Chemotherapie in der Zelle noch weiter hoch reguliert wird als sie es in Tumorgewebe bereits ist. Diese Dysregulation erklären sie durch eine zelluläre Antwort auf die toxische Wirkung der Substanz (73). Dies konnte durch die hier vorliegenden Ergebnisse nicht bestätigt werden. In dieser Arbeit ist miR-21 in den Biopsien, also vor neoadjuvanter Therapie, am höchsten exprimiert. Danach folgt die Expression in Normalgewebe und schließlich in posttherapeutischem Tumorgewebe, wo die miR-21-Expression am niedrigsten ist. Dies entspricht der Vermutung, dass die neoplastische Entartung von kolorektalem Gewebe einhergeht mit einer Hochregulierung der als Onkogen wirkenden miR-21 und dass eine Radiochemotherapie diese Entwicklung inhibieren könnte. Die genauen Ursachen hierfür sind allerdings noch nicht bekannt. Den Ansatz einer Erklärung liefert eine Studie von Si et al., die zeigt, dass sich ein vermehrtes Zellwachstum durch Inhibierung von miR-21 - in vitro - verhindern lässt (83). Man könnte annehmen, dass eine Therapie mit 5-FU durch eine Inkorporation des Therapeutikums in die DNA und die RNA der Zelle die Expression von miR-21 vermindert und dadurch das Wachstum der Zelle

hemmt. Diese Hemmung des Zellwachstums könnte wiederum durch eine erhöhte Apoptoserate verursacht sein (Chen et al. attribuieren miR-21 eine anti-apoptotische Wirkung (17)).

Betreffend miR-143 konnte durch die vorliegende Arbeit gezeigt werden, dass sie vor Beginn der neoadjuvanten Therapie niedriger exprimiert ist als post-therapeutisch. Durch die Radiochemotherapie wurde miR-143 also hoch reguliert, was wiederum im Einklang mit der Annahme steht, dass miR-143 als Tumorsuppressor funktionieren könnte und damit durch eine Chemotherapie positiv beeinflusst wird. Nakajima et al. konnten diesen Sachverhalt in ihren Untersuchungen an einem japanischen Patientenkollektiv jedoch nicht zeigen, was kontrovers diskutiert wird und mit einem eventuell vorliegenden genetischen Unterschied zwischen japanischen und europäischen Patienten erklärt wird (60).

Eine weitere Studie zeigte Veränderungen im Expressionsmuster durch eine Chemotherapie in vivo – allerdings durch eine Therapie mit Capecitabin und nicht 5-FU. Unter den in jener Arbeit beobachteten miRNAs waren auch miR-21 und miR-145, die allerdings nicht in signifikantem Ausmaß verändert waren (86).

4.3 Gibt es Unterschiede der miRNA nach Radiochemotherapie im Bezug auf das Therapieansprechen (Tumorregression)?

Die hier vorliegende Untersuchung konnte keinen signifikanten Zusammenhang der miR-21-Expressionslevel des prätherapeutischen und post-therapeutischen Tumorgewebes mit dem Therapieansprechen aufzeigen. Im Hinblick auf die miRNA-21 veröffentlichten Schetter et al. 2008 eine Studie, in der sie ein erhöhtes prätherapeutisches miR-21-Level in der Zelle mit einem schlechteren Therapieansprechen auf eine adjuvante Chemotherapie (vornehmlich mit 5-FU) aufzeigen konnten (79). Allerdings untersuchten Schetter et al. auch keine neoadjuvant vorbehandelten kolorektalen Karzinome, sondern sie verglichen in ihrer Arbeit Tumormaterial von Kolon-Adenokarzinomen nach einer adjuvanten Chemotherapie mit dem bei der Operation

erlangten gesunden Randgewebe des Resektates. Auch im Hinblick auf die miRNAs -143 und -145 konnte kein signifikanter Unterschied im Zusammenhang mit der Tumoregression nach Radiochemotherapie beobachtet werden.

4.4 Gibt es einen prädiktiven Marker für das Therapieansprechen?

Ein genaues miRNA-Expressionsprofil des Patienten zu erstellen und dies für diagnostische Zwecke nutzen zu können erscheint als mögliche Zielsetzung der wissenschaftlichen Studien im Bereich der miRNA-Forschung sinnvoll. So könnte in Zukunft eine genaue molekularbiologische Klassifizierung des zu untersuchenden Tumorgewebes durchgeführt werden mit dessen Hilfe im Anschluss eventuell prognostische Aussagen oder therapeutische Entscheidungen getroffen werden könnten (32, 79). Denn miRNAs besitzen ein ebenso großes Potential als diagnostische Marker zu dienen, wie ihre vergleichbaren messenger-RNA-Gegenstücke oder wie Proteine (85). Der Bedarf an diagnostischen Markern beim kolorektalen Karzinom ist nach wie vor sehr groß.

Einzig die miR-145 konnte in dieser Arbeit als potenzieller Marker für das Therapieansprechen der Patienten mit neoadjuvanter Radiochemotherapie identifiziert werden. Eine Korrelationsanalyse der prätherapeutischen miR-145-Expression und der Tumoregression zeigte einen signifikanten Zusammenhang zwischen Major Response (besseres Therapieansprechen im Vergleich zu Minor-Response) und einer höher exprimierten miR-145.

4.5 Zusammenhang von miRNA mit der Prognose der Patienten

In der vorliegenden Arbeit konnte kein signifikanter Zusammenhang der untersuchten mi-RNA Expressionslevels des prätherapeutischen und post-therapeutischen Tumorgewebes mit der Prognose der Patienten errechnet werden. Allerdings konnte ein

Trend hin zu längerem Überleben bei Patienten mit erhöhter miR-143 und miR-145 festgestellt werden.

Im Gegensatz zu den in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnissen im Hinblick auf den Zusammenhang von miR-21 und das Überleben der Patienten konnten Schetter et al. 2008 Folgendes feststellen: Die Überlebenszeit der Patienten mit erhöhtem miR-21-Level war geringer als die Überlebenszeit der Patienten mit niedrigerer miR-21 – und zwar unabhängig vom Tumorstadium. Ebenso weisen Slaby et al. 2009 nach, dass eine inverse Korrelation zwischen dem miR-21-Level in der Zelle und dem Überleben der Patienten besteht (85). Eine Korrelation der miRNAs mit Alter, Geschlecht und Tumorklassifikation konnten Schetter et al. jedoch nicht feststellen. Ebenso wenig konnte ein Unterschied zwischen Populationen verschiedener Rasse und verschiedener geographischer Herkunft herausgefunden werden (79).

Eine weitere interessante Entdeckung in diesem Zusammenhang machten Schepeler et al. jedoch mit anderen miRNAs. An 49 Gewebeproben von Patienten mit Kolonkarzinom im Stadium II konnten sie zeigen, dass sich die Länge der Rezidiv-freien Zeit anhand der miRNAs miR-320 und miR-498 ablesen lässt. Die Wahrscheinlichkeit eines Rezidiv-freien Überlebens ist bei erhöhter Expression der beiden miRNAs deutlich vergrößert. Sie schlugen deshalb vor, miRNAs noch genauer im Hinblick auf diagnostische und prognostische Relevanz hin zu untersuchen und in Zukunft zur Verfeinerung der Diagnostik in den klinischen Alltag einfließen zu lassen (77).

4.6 Ausblick: MiRNA als Möglichkeit der therapeutischen Intervention

Die Erkenntnisse über miRNAs im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen der letzten Jahre wecken Hoffnungen der therapeutischen Intervention in diesem Bereich. Da die Biosynthese und die Funktionsweise von miRNAs (s. Abschnitt 1.2.2) immer mehr aufgedeckt werden konnten, entstanden - zumindest theoretisch - Möglichkeiten eines

therapeutischen Einschreitens auf verschiedenen Ebenen. Eine Überexpression von miRNAs könnte durch synthetisch modifizierte Oligonucleotide oder durch synthetisch erzeugte miRNA-mimics (zur Nachahmung der miRNAs) hervorgerufen werden. Das Gegenteil (silencing) könnte durch sogenannte Antagomirs (synthetische miRNA-Analoga) oder antisense-Oligonukleotide bewirkt werden (48, 98). Die Modifizierung von tumorsuppressiven oder onkogenen miRNAs könnte also ein therapeutisches Ziel zur Kontrolle des Tumorwachstums in frühen und fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung sein (89).

Insbesondere die Hemmung von miR-21 und miR-17-92 haben in Studien ein vermindertes Tumorwachstum, eine geringere Tumorinvasion, - angiogenese und - metastasierung bewirkt (25, 46). Auf der anderen Seite hat eine Erhöhung von miR-145 in der Zelle *in vitro* ein geringeres Tumorzellwachstum durch Inhibierung von IRS-1 nach sich gezogen und die Empfindlichkeit für eine Radiochemotherapie verbessert (49). Wenn auch die hier genannten Untersuchungsergebnisse vielversprechend sind, gibt es bisher allerdings nur sehr wenige Untersuchungen *in vivo* am Tiermodell. Der Weg bis hin zu klinischen Versuchen mit miRNAs als Therapeutikum ist demzufolge noch lange (85).

5. Zusammenfassung

Seit Beginn des 21. Jahrhunderts sind miRNAs zunehmend in den Mittelpunkt intensiver wissenschaftlicher Forschung gerückt. Ein besonderes Augenmerk liegt hierbei auf dem Zusammenhang von miRNAs mit diversen Tumorerkrankungen. Bereits in zahlreichen Publikationen konnten veränderte miRNA-Expressionslevels auch in kolorektalem Karzinomgewebe nachgewiesen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde speziell die Bedeutung der miRNAs miR-21, miR-31, miR-143 und -145 beim fortgeschrittenen Rektumkarzinom untersucht. Insbesondere wurde der Einfluss einer neoadjuvanten Therapie auf die miRNA-Expression erforscht. Desweiteren wurden die jeweiligen miRNAs im Zusammenhang mit dem Überleben der Patienten und im Bezug auf eine potentielle prognostische Relevanz hin analysiert.

Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden in Paraffin gebettete Geweberesektate untersucht, wobei zuerst eine histologische Aufarbeitung und Befundung der Präparate stattfand und nach eingehender Auswahl und Überprüfung der Proben dann eine RNA-Extraktion durchgeführt wurde. Im Anschluss daran, und zur Vorbereitung für die Real-Time-PCR, wurde die RNA in cDNA umgeschrieben. Ausgehend von den cDNA-Proben wurden die miRNAs -21, -31, -143, -145 anschließend via Real-Time-PCR synthetisiert, quantifiziert und die hier erhaltenen Resultate zuletzt statistisch ausgewertet.

Die detaillierten Ergebnisse dieser Arbeit werden im Folgenden zusammenfassend dargestellt.

Die Onko-miR-21 war in den Biopsien, also vor neoadjuvanter Therapie, am höchsten exprimiert. Dem nachgestellt war die Expression in Normalgewebe und schließlich in posttherapeutischem Tumorgewebe, wo die miR-21-Expression am niedrigsten war. Die genannten Unterschiede waren nicht signifikant.

Desweiteren konnte kein signifikanter Zusammenhang des miR-21-Expressionslevels prätherapeutisch und posttherapeutisch mit dem Therapieansprechen aufgezeigt werden.

Auch im Hinblick auf die miRNAs -143 und -145 konnte in der Korrelationsanalyse kein signifikanter Unterschied im Zusammenhang mit der Tumorregression nach Radiochemotherapie beobachtet werden.

Allerdings zeigen die hier vorliegenden Ergebnisse eine signifikant niedrigere Expression von miR-143 in Tumorgewebe verglichen mit gesundem Normalgewebe. Außerdem konnte betreffend der miR-143 durch die vorliegende Arbeit gezeigt werden, dass sie vor Beginn der neoadjuvanten Therapie niedriger exprimiert ist als posttherapeutisch.

Eine Korrelationsanalyse der prätherapeutischen miR-145-Expression und der Tumorregression zeigte einen signifikanten Zusammenhang zwischen Major Response (besseres Therapieansprechen im Vergleich zu Minor-Response) und einer höher exprimierten miR-145.

In der vorliegenden Arbeit konnte kein signifikanter Zusammenhang der untersuchten miRNA Expressionslevels des prätherapeutischen und posttherapeutischen Tumorgewebes mit der Prognose der Patienten errechnet werden. Allerdings besteht ein Trend hin zu längerem Überleben bei Patienten mit erhöhter Tumorsuppressor-miR-143 und miR-145.

6. Literaturverzeichnis

1. Akao Y, Nakagawa Y, Naoe T (2006). MicroRNAs 143 and 145 are possible common onco-microRNAs in human cancers. *Oncol Rep.* 16: 845-850
2. Akao Y, Nakagawa Y, Naoe T (2007). MicroRNA-143 and -145 in colon cancer. *DNA Cell Biol.* 26: 311-320
3. Alvarez-Garcia I, Miska EA (2008). The micro RNAs of *C. elegans*. In: Appasani K (ed). *MicroRNAs: from basic science to disease biology*. Cambridge: Cambridge University Press, p. 7-21
4. Appasani K (2008). Introduction. In: Appasani K (ed). *MicroRNAs: from basic science to disease biology*. Cambridge: Cambridge University Press, p. 1-4
5. Arvanitis ML, Jagelman DG, Fazio VW, Lavery IC, Mc Gannon E (1990). Mortality in patients with familial adenomatous polyposis. *Dis Colon Rectum.* 33: 639-642
6. Asangani IA, Rasheed SA, Nikolova DA, Leupold JH, Colburn NH, Post S, Allgayer H (2008). MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor *Pdcd4* and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene.* 27: 2128-2136
7. Baldus SE, Moenig SP, Schroeder W, Metzger R, Lang S, Zirbes TK, Thiele J, Müller RP, Dienes HP, Hoelscher AH, Schneider PM (2004). Regression of oesophageal carcinomas after neoadjuvant radiochemotherapy: criteria of the histopathological evaluation. *Pathologe.* 25: 421-427
8. Bandres E, Cubedo E, Agirre X, Malumbres R, Zarate R, Ramirez N, Abajo A, Navarro A, Moreno I, Monzo M, Garcia-Foncillas J (2006). Identification by Real-time PCR of 13 mature microRNAs differentially expressed in colorectal cancer and non-tumoral tissues. *Mol Cancer.* 5: 29
9. Barbaro B, Schulsinger A, Valentini V, Marano P, Rotman M (1999). The accuracy of transrectal ultrasound in predicting the pathological stage of low-lying rectal cancer after preoperative chemoradiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 43: 1043-1047
10. Batzler WU, Giersiepen K, Hentschel S, Husmann G, Kaatsch P, Katalinic A, Kieschke J, Kraywinkel K, Meyer M, Stabenow R, Stegmaier C, Bertz J, Haberland J, Wolf U (2008). *Krebs in Deutschland 2003-2004 Häufigkeiten und Trends*. Berlin: Robert Koch Institut.
<http://www.ekr.med.uni-erlangen.de/GEKID/Doc/kid2008.pdf> (Zuletzt abgerufen am 14.01.2011)

11. Bohnsack MT, Czaplinski K, Gorlich D (2004). Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA*. 10: 185-191
12. Boyle P, d'Onofrio A, Maisonneuve P, Severi G, Robertson C, Tubiana M, Veronesi U (2003). Measuring progress against cancer in Europe: has the 15% decline targeted for 2000 come about? *Ann Oncol*. 14: 1312-1325
13. Boyle P, Ferlay J (2005). Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. *Ann Oncol*. 16: 481-488
14. Breivik J, Gaudernack G (1999). Carcinogenesis and natural selection: a new perspective to the genetics and epigenetics of colorectal cancer. *Adv Cancer Res*. 76: 187-212
15. Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, Iorio MV, Visone R, Severi NI, Fabbri M, Iuliano R, Palumbo T, Pichiorri F, Roldo C, Garzon R, Sevignani C, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM (2005). A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 353: 1793-1801
16. Calzone KA, Hay JL, Kuwada S, Lynch PM, O'Neill SM, Peterson SK, Rodriguez-Bigas MA, Turgeon DK, Vadaparampil ST, Wang C, Zbuk K (2010). *Colon Cancer Genes*. Bethesda, Maryland: National Cancer Institute.
<http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/genetics/colorectal/HealthProfessional/page2> (Zuletzt abgerufen am 14.01.2011)
17. Chen X, Guo X, Zhang H, Xiang Y, Chen J, Yin Y, Cai X, Wang K, Wang G, Ba Y, Zhu L, Wang J, Yang R, Zhang Y, Ren Z, Zen K, Zhang J, Zhang CY (2009). Role of miR-143 targeting KRAS in colorectal tumorigenesis. *Oncogene*. 28: 1385-1392
18. Chen Y, Liu W, Chao T, Zhang Y, Yan X, Gong Y, Qiang B, Yuan J, Sun M, Peng X (2008). MicroRNA-21 down-regulates the expression of tumor suppressor PDCD4 in human glioblastoma cell T98G. *Cancer Lett*. 272: 197-205
19. Chu CY, Rana TM (2006). Translation repression in human cells by microRNA-induced gene silencing requires RCK/p54. *PLoS Biol*. 4: e210
20. Chua YJ, D. C (2007). Chemotherapy. In: Brown G (ed). *Colorectal Cancer*. . Cambridge: Cambridge University Press, p. 97-109
21. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, Wojcik SE, Aqeilan RI, Zupo S, Dono M, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM (2005). miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102: 13944-13949

22. Cullen BR (2004). Transcription and processing of human microRNA precursors. *Mol Cell*. 16: 861-865
23. Cummins JM, He Y, Leary RJ, Pagliarini R, Diaz LA, Jr., Sjoblom T, Barad O, Bentwich Z, Szafranska AE, Labourier E, Raymond CK, Roberts BS, Juhl H, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE (2006). The colorectal microRNAome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103: 3687-3692
24. Delaini G, Carrara B, Marinello P, Colucci G (2006). Multimodality Therapy of Rectal Cancer. In: Delaini G (ed). *Rectal Cancer. New Frontiers in Diagnosis, Treatment and Rehabilitation*. Milan: Springer Italy, p. 203-214
25. Dews M, Homayouni A, Yu D, Murphy D, Seignani C, Wentzel E, Furth EE, Lee WM, Enders GH, Mendell JT, Thomas-Tikhonenko A (2006). Augmentation of tumor angiogenesis by a Myc-activated microRNA cluster. *Nat Genet*. 38: 1060-1065
26. Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Krober A, Bullinger L, Dohner K, Bentz M, Lichter P (2000). Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 343: 1910-1916
27. Douglass HO, Jr., Moertel CG, Mayer RJ, Thomas PR, Lindblad AS, Mittleman A, Stablein DM, Bruckner HW (1986). Survival after postoperative combination treatment of rectal cancer. *N Engl J Med*. 315: 1294-1295
28. Du T, Zamore PD (2005). microPrimer: the biogenesis and function of micro-RNA. *Development*. 132: 4645-4652
29. Fenoglio-Preiser CM, Noffsinger AE, Stemmermann GN, Lantz PE, Isaacson PG (2008). Epithelial Neoplasms of the Colon. In: Fenoglio-Preiser CM, Noffsinger AE, Stemmermann GN, Lantz PE, Isaacson PG (ed). *Gastrointestinal Pathology*. Third edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p. 899-1037
30. Fisher SE, Daniels IR (2007). The clinical presentation of colorectal cancer. In: Brown G (ed). *Colorectal Cancer*. Cambridge: Cambridge University Press, p. 1-14
31. Fleige S, Pfaffl MW (2005). Einfluss der RNA-Integrität auf die quantitative real-time RT-PCR. *Laborwelt*. Nr. 5: 1-4
32. Garzon R, Calin GA, Croce CM (2009). MicroRNAs in Cancer. *Annu Rev Med*. 60: 167-179
33. Grodstein F, Newcomb PA, Stampfer MJ (1999). Postmenopausal hormone therapy and the risk of colorectal cancer: a review and meta-analysis. *Am J Med*. 106: 574-582

34. Gryfe R, Swallow C, Bapat B, Redston M, Gallinger S, Couture J (1997). Molecular biology of colorectal cancer. *Curr Probl Cancer*. 21: 233-300
35. Hamilton SR, Vogelstein B, Kudo S, Riboli E, Nakamura S, Hainaut P, Rubio CA, Sobin LH, Fogt F, Winawer SJ, Goldgar DE, Jass JR (2000). Tumors of the colon and rectum. In: Hamilton SR, Aaltonen LA (ed). *Pathology and Genetics. Tumors of the digestive system*. Lyon IARC Press, p. 103-144
36. Hoelzel D, Schubert-Fritschle G, Schmidt M, Tretter W, Engel J (1998). Jahresbericht 1998 des klinisch-epidemiologischen Krebsregisters am Tumorzentrum München. Schwerpunkt: Kolorektale Karzinome. München: Tumorregister München.
<http://www.tumorregister-muenchen.de/annals/i1998.php> (Zuletzt abgerufen am 20.01.2011)
37. Humphreys DT, Wetmann BJ, Martin DIK, Preiss T (2008). Inhibition of translation initiation by a microRNA. In: Appasani K (ed). *MicroRNAs: from basic science to disease biology*. Cambridge: Cambridge University Press, p. 85-87
38. Jeter JM, Kohlmann W, Gruber SB (2006). Genetics of colorectal cancer. *Oncology (Williston Park)*. 20: 269-276; discussion 285-266, 288-269
39. Junginger T, Lorenz W (2004). Interdisziplinäre S3-Leitlinie: Algorithmen zur Therapie des Rektumkarzinoms. Hannover/Kaiserslautern: ONKODIN-Redaktion.
http://www.onkodin.de/zms/content/e2/e22972/e23955/e24479/index_ger.html (Zuletzt abgerufen am 20.01.2011)
40. Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*. 115: 209-216
41. Kinzler KW, Vogelstein B (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*. 87: 159-170
42. Kinzler KW, Vogelstein B (1998). Landscaping the cancer terrain. *Science*. 280: 1036-1037
43. Kinzler KW, Vogelstein B (2002). Colorectal Tumors. In: Kinzler KW, Vogelstein B (ed). *The Genetic Basis of Human Cancer*. 2nd ed. New York: The McGraw-Hill Companies, Inc, p. 583-612
44. Konishi M, Kikuchi-Yanoshita R, Tanaka K, Muraoka M, Onda A, Okumura Y, Kishi N, Iwama T, Mori T, Koike M, Ushio K, Chiba M, Nomizu S, Konishi F, Utsunomiya J, Miyaki M (1996). Molecular nature of colon tumors in hereditary nonpolyposis colon cancer, familial polyposis, and sporadic colon cancer. *Gastroenterology*. 111: 307-317

45. Kreger BE, Anderson KM, Schatzkin A, Splansky GL (1992). Serum cholesterol level, body mass index, and the risk of colon cancer. The Framingham Study. *Cancer*. 70: 1038-1043
46. Krichevsky AM, Gabriely G (2009). miR-21: a small multi-faceted RNA. *J Cell Mol Med*. 13: 39-53
47. Krook JE, Moertel CG, Gunderson LL, Wieand HS, Collins RT, Beart RW, Kubista TP, Poon MA, Meyers WC, Mailliard JA, et al. (1991). Effective surgical adjuvant therapy for high-risk rectal carcinoma. *N Engl J Med*. 324: 709-715
48. Krutzfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M, Stoffel M (2005). Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature*. 438: 685-689
49. La Rocca G, Badin M, Shi B, Xu SQ, Deangelis T, Sepp-Lorenzino L, Baserga R (2009). Mechanism of growth inhibition by MicroRNA 145: the role of the IGF-I receptor signaling pathway. *J Cell Physiol*. 220: 485-491
50. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B (1998). Genetic instabilities in human cancers. *Nature*. 396: 643-649
51. Liang Y, Wong L, Tan R, Chen C (2008). Real-time quantification of microRNAs by TaqMan assays. In: Appasani K (ed). *MicroRNAs: from basic science to disease biology*. Cambridge: Cambridge University Press, p. 269-282
52. Lindblom A (2001). Different mechanisms in the tumorigenesis of proximal and distal colon cancers. *Curr Opin Oncol*. 13: 63-69
53. Lynch HT, Lynch JF (1993). The Lynch syndromes. *Curr Opin Oncol*. 5: 687-696
54. Meister G, Landthaler M, Patkaniowska A, Dorsett Y, Teng G, Tuschl T (2004). Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell*. 15: 185-197
55. Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, Ghoshal K, Jacob ST, Patel T (2007). MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology*. 133: 647-658
56. Metzler M, Wilda M, Busch K, Viehmann S, Borkhardt A (2004). High expression of precursor microRNA-155/BIC RNA in children with Burkitt lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 39: 167-169
57. Meyerhardt J (2007). Colorectal Cancer Therapy. In: Meyerhardt J, Saunders M, Skarin AT (ed). *Colorectal Cancer*. Boston USA: Elsevier, p. 58-104
58. Michael MZ, SM OC, van Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ (2003). Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res*. 1: 882-891

59. Morikawa T, Kato J, Yamaji Y, Wada R, Mitsushima T, Shiratori Y (2005). A comparison of the immunochemical fecal occult blood test and total colonoscopy in the asymptomatic population. *Gastroenterology*. 129: 422-428
60. Nakajima G, Hayashi K, Xi Y, Kudo K, Uchida K, Takasaki K, Yamamoto M, Ju J (2006). Non-coding MicroRNAs hsa-let-7g and hsa-miR-181b are Associated with Chemoresponse to S-1 in Colon Cancer. *Cancer Genomics Proteomics*. 3: 317-324
61. Nakamura T, Canaani E, Croce CM (2007). Oncogenic All1 fusion proteins target Drosha-mediated microRNA processing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104: 10980-10985
62. Nelson RL (1998). Division of the colorectum into anatomic subsites: why and where? *J Surg Oncol*. 69: 1-3
63. Ng EK, Chong WW, Jin H, Lam EK, Shin VY, Yu J, Poon TC, Ng SS, Sung JJ (2009). Differential expression of microRNAs in plasma of patients with colorectal cancer: a potential marker for colorectal cancer screening. *Gut*. 58: 1375-1381
64. O'Brien MJ, Winawer SJ, Zauber AG, Gottlieb LS, Sternberg SS, Diaz B, Dickersin GR, Ewing S, Geller S, Kasimian D, et al. (1990). The National Polyp Study. Patient and polyp characteristics associated with high-grade dysplasia in colorectal adenomas. *Gastroenterology*. 98: 371-379
65. Padovani M, Oliani C (2006). Chemotherapy in Rectal Cancer. In: Delaini G (ed). *Rectal cancer: new frontiers in diagnosis, treatment, and rehabilitation*. Milan: Springer Italy, p. 215-220
66. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P (2005). Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*. 55: 74-108
67. Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, Hayward DC, Ball EE, Degnan B, Muller P, Spring J, Srinivasan A, Fishman M, Finnerly J, Corbo J, Levine M, Leahy P, Davidson E, Ruvkun G (2000). Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature*. 408: 86-89
68. Pillai RS, Bhattacharyya SN, Artus CG, Zoller T, Cougot N, Basyuk E, Bertrand E, Filipowicz W (2005). Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science*. 309: 1573-1576
69. Qiagen (2007). *MiScript System Handbook*. Hilden: Qiagen GmbH
70. Reid JD (1974). Intestinal carcinoma in the Peutz-Jeghers syndrome. *JAMA*. 229: 833-834

71. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 403: 901-906
72. Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A (2004). Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res*. 14: 1902-1910
73. Rossi L, Bonmassar E, Faraoni I (2007). Modification of miR gene expression pattern in human colon cancer cells following exposure to 5-fluorouracil in vitro. *Pharmacol Res*. 56: 248-253
74. Rossi S, Kopetz S, Davuluri R, Hamilton SR, Calin GA MicroRNAs, ultraconserved genes and colorectal cancers. *Int J Biochem Cell Biol*. 42: 1291-1297
75. Rustgi AK (1994). Hereditary gastrointestinal polyposis and nonpolyposis syndromes. *N Engl J Med*. 331: 1694-1702
76. Ruvkun G, Wightman B, Ha I (2004). The 20 years it took to recognize the importance of tiny RNAs. *Cell*. 116: S93-96, 92 p following S96
77. Schepeler T, Reinert JT, Ostefeld MS, Christensen LL, Silaharoglu AN, Dyrskjot L, Wiuf C, Sorensen FJ, Kruhoffer M, Laurberg S, Kauppinen S, Orntoft TF, Andersen CL (2008). Diagnostic and prognostic microRNAs in stage II colon cancer. *Cancer Res*. 68: 6416-6424
78. Scherübl H (2009). Maligne Tumoren des Gastrointestinaltrakts. In: Dietel M, Suttrop N, Zeitz M (ed). *Harrisons Innere Medizin*. 17. Auflage. Berlin: ABW Wissenschaftsverlag, p. 708-720
79. Schetter AJ, Leung SY, Sohn JJ, Zanetti KA, Bowman ED, Yanaihara N, Yuen ST, Chan TL, Kwong DL, Au GK, Liu CG, Calin GA, Croce CM, Harris CC (2008). MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma. *JAMA*. 299: 425-436
80. Schmiegel W, Reinacher-Schick A, Arnold D, Graeven U, Heinemann V, Porschen R, Riemann J, Rodel C, Sauer R, Wieser M, Schmitt W, Schmoll HJ, Seufferlein T, Kopp I, Pox C (2008). Update S3-guideline "colorectal cancer" 2008. *Z Gastroenterol*. 46: 799-840
81. Shafizadeh ST (2000). Über die Expression von Galektin-3 in kolorektalen Karzinomen: Korrelation der Immunreaktivität mit der Tumorzellproliferation und der Expression galaktosehaltiger Antigene. Köln: Universität zu Köln
82. Shomron N, Levy C (2009). MicroRNA-biogenesis and Pre-mRNA splicing cross-talk. *J Biomed Biotechnol*. 2009: 594678

83. Si ML, Zhu S, Wu H, Lu Z, Wu F, Mo YY (2007). miR-21-mediated tumor growth. *Oncogene*. 26: 2799-2803
84. Slaby O, Svoboda M, Fabian P, Smerdova T, Knoflickova D, Bednarikova M, Nenutil R, Vyzula R (2007). Altered expression of miR-21, miR-31, miR-143 and miR-145 is related to clinicopathologic features of colorectal cancer. *Oncology*. 72: 397-402
85. Slaby O, Svoboda M, Michalek J, Vyzula R (2009). MicroRNAs in colorectal cancer: translation of molecular biology into clinical application. *Mol Cancer*. 8: 102
86. Svoboda M, Izakovicova Holla L, Sefr R, Vrtkova I, Kocakova I, Tichy B, Dvorak J (2008). Micro-RNAs miR125b and miR137 are frequently upregulated in response to capecitabine chemoradiotherapy of rectal cancer. *Int J Oncol*. 33: 541-547
87. Tardivo S, Mantovani W, Torri E, Poli A (2005). Rectal Cancer. Epidemiology and Burden of Disease. In: Delaini G (ed). *Rectal Cancer. New Frontiers in Diagnosis, Treatment and Rehabilitation*. Milan: Springer, p. 8-9
88. Tardivo S, Mantovani W, Torri E, Poli A (2006). Rectal Cancer. Epidemiology and Burden of Disease. In: Delaini G (ed). *Rectal Cancer. New Frontiers in Diagnosis, Treatment and Rehabilitation*. Verona: Springer, p. 8
89. Tong AW, Nemunaitis J (2008). Modulation of miRNA activity in human cancer: a new paradigm for cancer gene therapy? *Cancer Gene Ther*. 15: 341-355
90. Tveit KM, Guldvog I, Hagen S, Trondsen E, Harbitz T, Nygaard K, Nilsen JB, Wist E, Hannisdal E (1997). Randomized controlled trial of postoperative radiotherapy and short-term time-scheduled 5-fluorouracil against surgery alone in the treatment of Dukes B and C rectal cancer. Norwegian Adjuvant Rectal Cancer Project Group. *Br J Surg*. 84: 1130-1135
91. Vasen HF (1994). What is hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC). *Anticancer Res*. 14: 1613-1615
92. Winawer SJ, Stewart ET, Zauber AG, Bond JH, Ansel H, Wayne JD, Hall D, Hamlin JA, Schapiro M, O'Brien MJ, Sternberg SS, Gottlieb LS (2000). A comparison of colonoscopy and double-contrast barium enema for surveillance after polypectomy. National Polyp Study Work Group. *N Engl J Med*. 342: 1766-1772
93. Winawer SJ, Zauber AG, Ho MN, O'Brien MJ, Gottlieb LS, Sternberg SS, Wayne JD, Schapiro M, Bond JH, Panish JF, et al. (1993). Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomy. The National Polyp Study Workgroup. *N Engl J Med*. 329: 1977-1981
94. Wolmark N, Wieand HS, Hyams DM, Colangelo L, Dimitrov NV, Romond EH, Wexler M, Prager D, Cruz AB, Jr., Gordon PH, Petrelli NJ, Deutsch M, Mamounas

- E, Wickerham DL, Fisher ER, Rockette H, Fisher B (2000). Randomized trial of postoperative adjuvant chemotherapy with or without radiotherapy for carcinoma of the rectum: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol R-02. *J Natl Cancer Inst.* 92: 388-396
95. Xi Y, Formentini A, Chien M, Weir DB, Russo JJ, Ju J, Kornmann M (2006). Prognostic Values of microRNAs in Colorectal Cancer. *Biomark Insights.* 2: 113-121
96. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* 17: 3011-3016
97. Zamore PD, Haley B (2005). Ribo-gnome: the big world of small RNAs. *Science.* 309: 1519-1524
98. Zhang B, Farwell MA (2008). microRNAs: a new emerging class of players for disease diagnostics and gene therapy. *J Cell Mol Med.* 12: 3-21

7. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Gründen des Datenschutzes in der elektronischen Fassung meiner Arbeit nicht veröffentlicht.