

Aus der Universitätsklinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie sowie  
der Universitätsklinik für Radiologie und Nuklearmedizin der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

**Charakterisierung von microRNA Dynamik durch lokalablative Therapie bei  
Patienten mit metastasiertem kolorektalen Karzinom**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades Dr. med.  
(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von

Malte Schmelter

aus

Bremen

Magdeburg

2023

## **Dokumentationsblatt**

### **Bibliografische Beschreibung:**

Schmelter, Malte

Charakterisierung von microRNA Dynamik durch lokalablative Therapie bei Patienten mit metastasiertem kolorektalen Karzinom – 85 Blatt (Bl.) 11 Abbildungen (Abb.), 12 Tabellen (Tab.), 0 Anlagen (Anl.)

### **Kurzreferat:**

Das kolorektale Karzinom (KRK) ist eine der häufigsten tumorbedingten Todesursachen weltweit. Im Hinblick auf die Beurteilung des Krankheitsverlaufs fehlen noch prognostische/prädiktive nicht invasive Biomarker. MicroRNA (miRNA) sind kleine Moleküle, die nützliche Biomarker-Eigenschaften besitzen. MiR-21-5p (miR-21) gilt als eine der am höchsten exprimierten miRNA, sowie als eine der miRNA mit dem höchsten onkogenen Potential des KRK. Es wird postuliert, dass miR-21 als Biomarker zur Tumorfrüherkennung, wie auch zur Verlaufskontrolle genutzt werden könnte.

In der vorliegenden Arbeit wurden die miRNA Veränderungen am Beispiel von miR-21 Serumkonzentration von Patienten mit metastasiertem kolorektalen Karzinom (mKRK) vor und nach einer lokalablativen Therapie systematisch evaluiert. Insgesamt konnte eine signifikant erhöhte miR-21 Konzentration in den mKRK Patienten gegenüber der gesunden Vergleichskohorte nachgewiesen werden. Die mKRK Patientenkohorte zeigte nach lokalablativer Therapie keine signifikanten Veränderungen der miR-21 Konzentration. Das war unabhängig von Stadium, gewählten Therapieart, oder anderen Tumor-assoziierte Faktoren. Es erfolgte die Subgruppenbildung mit ansteigender bzw. verringerter miRNA Konzentration. Die Unterschiede der miR-21 Konzentration bzw. Dynamik unter lokalablativen Therapie konnten durch weitere herangezogene klinische wie laborchemische Daten nicht begründet werden. Zusammenfassend hatte die Destruktion des Tumorgewebes keinen Einfluss auf die miR-21 Konzentration weder im kurz- noch im langfristigen Verlauf.

**Schlüsselwörter:** MicroRNA, miR-21, Brachytherapie, Radiofrequenzablation, Kolorektales Karzinom (KRK), Korrelation mit klinisch laborchemischen Parametern, Serumbiomarker

# Indexverzeichnis

Dokumentationsblatt .....	II
Indexverzeichnis .....	III
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
1 Einführung .....	1
Das kolorektale Karzinom.....	1
Karzinogenese und Ätiologie .....	1
Screening und Diagnosestellung.....	2
Nachsorge .....	5
Therapie des kolorektalen Karzinoms .....	5
Adjuvante Chemotherapie des kolorektalen Karzinoms .....	6
Neoadjuvante Therapie .....	6
Adjuvante Therapie des Rektumkarzinoms.....	7
Metastasiertes kolorektales Karzinom (mKRK) .....	7
Chemotherapie.....	7
Lokalablative Verfahren.....	9
Biomarker zur Verlaufskontrolle.....	10
Blutbasierte Biomarker des KRK .....	10
MicroRNA .....	12
Biogenese und Wirkung von miRNA .....	13
Funktion der miRNA in der Onkogenese .....	15
Herkunft der im Blut zirkulierenden miRNA.....	15
miRNA und das KRK.....	16
miR-21 und das KRK.....	17
miRNA und lokalablative Therapie .....	18
2 Ziel der Arbeit .....	19
3 Material und Methoden.....	20

Materialien.....	20
Geräte und Utensilien.....	20
Verbrauchsmaterial .....	20
Chemikalien/Reagenzien .....	21
Kits/Enzyme.....	21
Methoden.....	22
Studiendesign.....	22
Eigenanteil.....	23
Patientenkollektiv .....	23
Einschlusskriterien.....	23
Ausschlusskriterien.....	24
Kontrollkohorte .....	24
Vor- und Verlaufsuntersuchungen.....	25
Brachytherapie .....	26
Radiofrequenzablation .....	27
Mikrowellenablation.....	28
Blutentnahme – venöse Punktion.....	29
Isolierung der miRNA.....	29
Reverse Transkription.....	30
Quantitative Real-Time PCR .....	31
Statistische Auswertung.....	34
4 Ergebnisse.....	35
Charakterisierung der Studienkohorte.....	35
Analyse der Studienkohorte mit einer Kontrollgruppe .....	37
Gruppenanalysen von miR-21 und klinischen sowie laborchemischen Parametern .....	38
Vergleich der Patienten mit initial höheren und niedrigeren miR-21 Konzentrationen .....	40

Sekundär hochregulierte und tiefregulierte miR-21 Gruppen.....	45
Überlebenszeitanalyse der Patienten nach Therapieeinschluss.....	50
5 Diskussion .....	51
Studiendesign.....	51
Höhere miR-21 Konzentration in Interventionsgruppe.....	53
Beeinflussende Faktoren auf die miR-21 Konzentration .....	53
Einfluss der Metastasengröße und -lokalisierung auf die miR-21 Konzentration .....	56
miR-21 Konzentration im Verlauf der Therapie.....	57
Überlebenszeitanalyse.....	59
Limitationen der Arbeit .....	60
Ausblick .....	62
6. Zusammenfassung .....	64
7. Literaturverzeichnis: .....	65

## Abkürzungsverzeichnis

AGO	<i>Engl. Abkürzung Argonaute Protein(s)</i>
AL	<i>Engl. Abkürzung Afterloading-Brachytherapie</i>
ALAT	Alanin-Amino-Transferase
Anti-EGFR	<i>Engl. Abkürzung anti epidermal growth factor receptor</i>
Anti-VEGF	<i>Engl. Abkürzung anti vascular endothelial growth factor A/B</i>
AP	Alkalische Phosphatase
APC Gen	Adenomatous-poliposis-coli Gen
ASAT	Aspartat-Amino-Transferase
BMP3	<i>Engl. Abkürzung Bone morphogentic protein 3</i>
BRAF-Gen	<i>Engl. Abkürzung B-rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
CA 19-9	Carbohydrate Antigen 19-9
CEA	Carcinoembryonales Antigen (CEA)
cel-miR-39	<i>Caenorhabditis elegans miR 39 stem-loop</i>
CIMP	<i>Engl. Abkürzung CPG island methylator phenotype</i>
CIN	Chromosomale Instabilität
CRP	C-reaktives Protein
CSC	<i>Engl. Abkürzung Cancer stem Cells</i>
CT	Computertomographie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DDC	<i>Engl. Abkürzung Deleted in Colorectal Carcinoma-Gen</i>
ECOG Score	<i>Engl. Abkürzung Eastern Cooperative Oncology Group Score</i>
EDTA	Ethyldiamintetraacetat
EGFR	<i>Engl. Abkürzung epidermal growth factor receptor</i>
EMT	<i>Engl. Abkürzung epithelial mesenchymal transition</i>
ERK	<i>Engl. Abkürzung extracellular-signal regulated kinases</i>
FAP	Familiäre Adenomatöse Polyposis

FDA	Engl. Abkürzung Food and Drug Administration
GGT	Gamma-Glutamyltransferase
GLDH	Glutamat-dehydrogenase
HAI	Hepatisch intraarterielle Chemotherapie
HDL	Engl. Abkürzung <i>High density lipoprotein</i>
HNPCCS	Hereditäres, nichtpolypöses Kolonkarzinom-Syndrom
IEN	Intraepitheliale Neoplasie
iFOBT	Immunologischer fäkaler okkultur Bluttest
KRAS	Engl. Abkürzung <i>V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
KRK	Kolorektales Karzinom
let-7	Regulatorische miRNA mit 21 Nukleotiden, vom Engl. Abkürzung „ <i>Letal 7</i> “
lncRNAs	Engl. Abkürzung <i>long non coding RNAs</i>
MAP	Engl. Abkürzung <i>mitogen activated protein</i>
miR-21 / hsa-mir-21-5p	MicroRNA- 21 / Homo sapiens miR-21-5p
miRISC	Engl. Abkürzung <i>miRNA induced silencing complex</i>
miRNA	MicroRibonukleinsäure
mKRK	Metastasiertes Kolorektales Karzinom
MMR	Engl. Abkürzung <i>Missmatch repair</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MWA	Mikrowellenablation
NDRG5	Engl. Abkürzung <i>N-myc-downstream-regulated gene 5</i>
NRAS-Gen	Engl. Abkürzung <i>Neuroblastoma rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
NSAR UV	Nicht steroidale Antirheumatika Unverträglichkeit
o.A.	ohne Angabe
oncomiRS	Engl. Abkürzung <i>miRNA associated with cancer</i>
p53	Tumorsuppressorgen 53
PCR	Engl. Abkürzung <i>Polymerase chain reaction</i>

PIGF	Engl. Abkürzung <i>Placental growth factor</i>
PPI	Protonenpumpen-Inhibitor
pre-miRNA	Engl. Abkürzung <i>Precursor-miRNA</i>
pri-miRNA	Engl. Abkürzung <i>Primary transcripts miRNA</i>
qRT-PCR	Engl. Abkürzung <i>Quantitative Real-Time Polymerase chain reaction</i>
RAF-Gen	Engl. Abkürzung <i>Rat fibrosarcoma Gen</i>
RAS	Engl. Abkürzung <i>Rat sarcoma Onkogen</i>
RFA	Radiofrequenzablation
RNA	Eng. Abkürzung <i>ribonucleic acid</i>
RT-PCR	Engl. Abkürzung <i>Real-Time Polymerase chain reaction</i>
TACE	Transarterielle Chemoembolisation
UICC	Franz. Abkürzung <i>Union internationale contre le cancer</i>
VEGF (A/B)	Engl. Abkürzung. <i>Vascular endothelial growth factor A/B</i>
VEGFR	Engl. Abkürzung <i>Vascular endothelial growth factor receptor</i>
WHO	Engl. Abkürzung <i>World Health organization</i>
XPO-5	Engl. Abkürzung <i>Exportin-5</i>
Z. n.	Zustand nach



# 1 Einführung

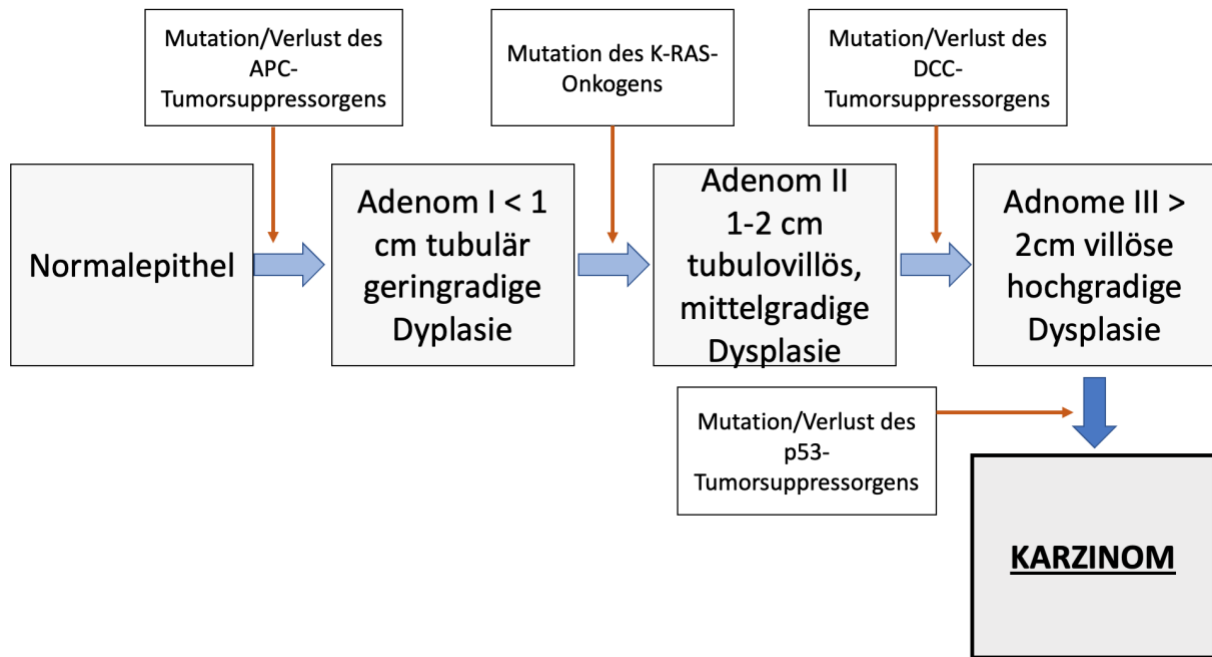
## Das kolorektale Karzinom

Die Mortalität durch maligne Neoplasien ist eine der häufigsten Todesursachen weltweit. In Deutschland waren Krebserkrankungen für 24,5% der krankheitsbedingten Todesursachen 2015 verantwortlich. Somit stellen Tumorerkrankungen in Deutschland die zweithäufigste Todesursache dar [1].

Mit über 73.000 Neuerkrankungen sowie 27.000 Todesfällen pro Jahr in Deutschland ist das kolorektale Karzinom (KRK) einer der häufigsten malignen Tumoren [2]. Die 5-Jahres-Überlebensrate nach Diagnosestellung liegt bei ca. 64% [3]. Mit einer Inzidenz in Deutschland von > 40/100.000/Jahr ist das KRK die zweithäufigste krebssbedingte Todesursache bei Männern (nach Lungenkarzinom) und dritthäufigste bei Frauen (nach Mamma- & Lungenkarzinom) [4]. Der größte Teil, 90% der kolorektalen Karzinome, werden nach dem 50. Lebensjahr diagnostiziert [5].

## Karzinogenese und Ätiologie

Die Karzinogenese des KRK ist in verschiedenen Tumorprogressions-Modellen erklärt. Eines der gängigsten Tumorprogressions-Modelle ist das Modell nach Vogelstein, dargestellt in **Abbildung 1**. Durch eine Akkumulation von Aktivierungen verschiedener Onkogene und/oder Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen kommt es zur Tumorprogression. Unter anderem Mutationen oder Verlust des *adenomatous-polyposis-coli-Tumorsuppressorgens* (APC), Mutation des *V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog* (KRAS), Mutation-/Verlust des *Deleted in colorectal carcinoma Tumorsuppressorgens* (DDC) sowie Mutation/Verlust des p53-Tumorsuppressorgens (p53) tragen zur Karzinomentstehung maßgeblich bei. Ist eine kritische Gesamtanzahl an Mutationen erreicht, kann das Gewebe zum unkontrollierten Zellwachstum übergehen [5][6].



**Abbildung 1: Schematische Darstellung des Tumorprogressionsmodells nach Vogelstein [6]**

Es gibt verschiedene tumorbegünstigende Faktoren, die ätiologisch in 4 Gruppen unterteilt werden können: Genetische Faktoren, wie z. B. familiäre adenomatöse Polyposis (FAP), positive Familienanamnese für KRK, hereditäres nicht-polypöses Kolonkarzinom-Syndrom (HNPCCS) (auch als Lynch-Syndrom bezeichnet), Ernährungsfaktoren wie z. B. fettreiche, ballaststoffarme und fleischreiche Ernährung, Risikoerkrankungen, wie z. B. langzeitige entzündliche Darmerkrankungen oder Zustand nach (Z. n.) *Mamma*-, *Ovar*- oder *Corpus-Uteri*-Karzinome und sonstige Faktoren, wie z. B. langjähriger Nikotinkonsum und hoher Alkoholkonsum [5].

## Screening und Diagnosestellung

Im Vergleich zu anderen Erkrankungen, existiert für KRK ein effektives Screening-Programm. Das Standard-Screeningverfahren zur Detektion kolorektaler Polypen und Karzinome ist in Deutschland die komplette Koloskopie, die in der asymptomatischen Bevölkerung ab dem 50. Lebensjahr bei Männern und bei Frauen ab dem 55. Lebensjahr durchgeführt werden sollte. Im Vergleich zu anderen

Untersuchungsmethoden, wie Rektosigmoidoskopie, genetische und andere Stuhltests, Computertomographie-Kolonographie und der Kapselendoskopie, besitzt die Koloskopie die höchste Sensitivität und Spezifität und stellt den Goldstandard für das Auffinden eines KRK und von kolorektalen Polypen dar [7]. Bei unauffälligem Koloskopiebefund wird eine erneute Untersuchung basierend auf aktuellen S3-Leitliniennach 10 Jahren empfohlen. Bei auffälligen Befunden wird zwischen Divertikeln, Polypen, Entzündungen, Ulcera, Tumoren, Stenosen, Schleimhautblutungen, Fremdkörpern, Parasiten o. a. unterschieden. Bei Polypen erfolgt, wenn möglich, in der gleichen Sitzung die Abtragung. Entzündungen und Tumoren werden biopsiert, histologisch untersucht und es wird ein Therapiekonzept festgelegt [2].

Wird die Koloskopie von dem Patienten abgelehnt, sollte alle 5 Jahre eine Sigmoidoskopie und eine jährliche Stuhluntersuchung auf okkultes Blut immunologischer fäkaler okkultes Bluttest (iFOBT) durchgeführt werden. Wenn die Sigmoidoskopie ebenfalls abgelehnt wird, dann wird eine jährliche Stuhluntersuchung auf okkultes Blut im Stuhl mittels iFOBT empfohlen. Zeigt sich ein Stuhltest positiv, so ist eine endoskopische Kontrolluntersuchung durchzuführen [2], [8].

Besondere Risikogruppen sollten sich einer intensiveren Vorsorge unterziehen. Bei Patienten mit Angehörigen ersten Grades mit KRK wird eine komplette Koloskopie, ca. 10 Jahre vor Erstdiagnose des KRK bei dem Verwandten empfohlen, spätestens allerdings im Alter von 40 - 45 Jahren. Bei unauffälligem Befund wird eine 10-jährige Wiederholung empfohlen [9].

Bei genetischen Vorbelastungen wie der familiären adenomatösen Polyposis (FAP) werden Vorsorgeuntersuchungen mittels jährlicher Rektosigmoidoskopie, bei Adenomnachweis mittels jährlicher kompletter Koloskopie ab dem 10. Lebensjahr empfohlen, sowie ggf. eine prophylaktische Proktokolektomie [10].

Bei Familienmitgliedern von Patienten, die an hereditärem, nicht polypösen Kolonkarzinom (HNPCC) leiden, wird bei Volljährigkeit eine genetische Beratung empfohlen. Ab dem 25. Lebensjahr werden eine jährliche Koloskopie, jährliche gynäkologische Untersuchungen mit transvaginaler Sonographie sowie jährliche Abdomensonographie empfohlen. Ab dem 35. Lebensjahr werden bei Patienten mit

HNPCCS zusätzlich eine jährliche Ösophagogastroduodenoskopie sowie jährliche Endometriumbiopsien empfohlen, falls es in der Familie zu Magen-Karzinom gekommen ist.

Trotz der effektiven Screening Methoden nehmen immer noch viele Menschen nicht an den Screeninguntersuchungen teil bzw. entwickeln ein KRK trotz durchgeführter Koloskopie im Verlauf. Die Diagnosestellung erfolgt durch eine histologische Sicherung des Tumors. Histologisch werden verschiedene Tumorstadien unterteilt. Die Einteilung erfolgt nach der TNM bzw. Union internationale contre le cancer (UICC) Klassifikation (siehe Tabelle 1). Vor einer Therapiefestlegung ist ein Staging (CT des Thorax, MRT des Abdomens) notwendig.

**Tabelle 1: Vereinfachte TNM-Klassifikation des Kolonkarzinoms nach AJCC Cancer Staging manual [11]**

UICC-Stadium	TNM-Stadium	5-Jahres-Überlebensrate
Stadium I	T1 -T2 N0 M0	74 – 78%
Stadium II	T3 - T4 N0 M0	37% (IIC) – 58% (IIB) – 67% (IIA)
Stadium III	N+	28% (IIIC) – 46% (IIIB) – 73% (IIIA)
Stadium IV	M+	6%

T1 = Infiltration der Submukosa; T2 = Infiltration der Muscularis propria;  
T3 = Infiltration über die Muscularis propria hinaus in das perikolorektale Gewebe;  
T4 = Infiltration des viszeralen Peritoneums (T4a), Infiltration von Nachbarorganen (T4b);  
N+ = regionäre Lymphknotenmetastase(n); M+ = Fernmetastase(n)

Die Grenze zwischen Kolon und Rektum wird, je nach Autor, unterschiedlich definiert. Bei Höhenangaben des Tumors ist die Messung mit dem starren Rektoskop am zuverlässigsten. Dabei dient die Anokutanlinie als distaler Messpunkt [2].

Eine Unterteilung nach der UICC erfolgt beim Rektumkarzinom anhand des Abstandes zur Anokutanlinie. Rektumkarzinome werden als Karzinome des oberen Rektumdrittels mit einem Abstand von 12 - 16 cm, des mittleren Rektumdrittels mit 6 - < 12 cm und des unteren Rektumdrittels mit < 6 cm Abstand zur Anokutanlinie, klassifiziert [12].

## Nachsorge

Es erfolgt eine, dem Tumorstadium angepasste, regelmäßige Nachsorge. Die ersten zwei Jahre erfolgt im Stadium II & III eine intensiviertere Nachsorge mittels 6 monatlicher Anamnese, körperlicher Untersuchung, Abdomensonographie sowie Laboruntersuchung. Es sollte eine einmalige Koloskopie innerhalb von 6 - 12 Monaten nach der Therapie sowie bei Rektumkarzinomen ggf. eine Rektoskopie erfolgen [13], [14].

Zur Früherkennung ist die *Carcinoembryonales Antigen* (CEA) Bestimmung nicht geeignet. Zur strukturierten Nachsorge nach chirurgischer Resektion des Primarius wird die Bestimmung des CEA Wertes als Tumormarker alle 6 Monate für mindestens 2 Jahre empfohlen. Ein auffällig erhöhter CEA-Wert rechtfertigt nicht den Beginn einer Chemotherapie, indiziert aber weitere Diagnostik [15], [16].

## Therapie des kolorektalen Karzinoms

Die Therapie des KRK wird im Rahmen eines Tumorboards interdisziplinär festgelegt und richtet sich nach Lokalisation, Ausmaß, Metastasierungsmuster sowie Infiltrationstiefe des Karzinoms. Primäres Ziel ist die vollständige Resektion (R0) des Tumors. Wenn eine R0-Resektion erreicht werden kann, dann wird eine operative Resektion durchgeführt. Ggf. muss eine neoadjuvante Radiotherapie oder Radiochemotherapie erfolgen [17]. Eine neoadjuvante Therapie bedeutet, dass eine Therapie z.B. Chemotherapie, Radiatio oder Hormontherapie vor der Haupttherapie, in aller Regel Operation, stattfindet. Ziel ist eine Tumorreduktion, zur vereinfachten Resektion. Im Anschluss an die operative Resektion kann eine adjuvante Chemotherapie indiziert sein [2]. Als Adjuvante Therapie bezeichnet man eine unterstützende Therapie zur Haupttherapie. Diese Therapie z.B. Chemotherapie, Radiatio oder Hormontherapie kann parallel oder zeitlich versetzt stattfinden. Die Chemotherapie ist individuell und sehr spezifisch. Im Folgenden werden die Grundlagen der Chemotherapie erläutert. Für das genaue Behandlungsschema dienen die S3-Leitlinien als Orientierungshilfe.

## **Adjuvante Chemotherapie des kolorektalen Karzinoms**

Die Chemotherapie nimmt einen hohen Stellenwert bei der Behandlung des KRK ein [18]. Die Voraussetzung für eine adjuvante Chemotherapie ist eine R0-Resektion des Primarius. Patienten mit einem kurativ resezierten Kolonkarzinom im UICC Stadium I haben keine Indikation für eine adjuvante Chemotherapie. Im Stadium II kann und im Stadium III soll eine adjuvante Therapie, wenn möglich im Rahmen kontrollierter Studien, durchgeführt werden. Liegt bei Patienten in Stadium II eine nachgewiesene Mikrosatelliteninstabilität (MSI) vor, sollte von der Durchführung einer adjuvanten Chemotherapie abgesehen werden [2].

Die Dauer der Durchführung einer adjuvanten Chemotherapie wird durch das persönliche Rezidivrisiko (niedriges Risiko: T1-3, N1; hohes Risiko: T4, N2) sowie die akkumulierende Toxizität bestimmt [19]–[22].

In verschiedenen Situationen kann eine Kontraindikation bezüglich des Einsatzes einer adjuvanten Chemotherapie bestehen, wie u. a. bei einem Allgemeinzustand schlechter als 2 (*Eastern Cooperative Oncology Group Score (ECOG-Score)*), unkontrollierten Infektionen, Leberzirrhose Child B und C, schwere koronare Herzkrankheit, Herzinsuffizienz (NYHA III und IV) oder präterminale und terminale Niereninsuffizienz [2].

## **Neoadjuvante Therapie**

Bei Patienten mit Rektumkarzinomen im unteren und mittleren Rektumdrittel im UICC-Stadium II und III sollte eine neoadjuvante Radiochemotherapie oder Kurzzeit-Radiotherapie erfolgen. Die Kurzzeit-Radiotherapie ist in der Regel direkt von einer Operation gefolgt. Der konventionell fraktionierten Radiochemotherapie folgt in einem Zeitraum von 6 - 8 Wochen nach der Therapie die Exzision des Tumors. Im Stadium IV muss eine individuelle Abwägung erfolgen. Kolonkarzinome sowie Rektumkarzinome des oberen Rektumdrittels sprechen in der Regel schlecht auf Radiotherapie an, daher erfolgt hier keine neoadjuvante Radiotherapie [23]–[28].

## **Adjuvante Therapie des Rektumkarzinoms**

Analog zu den Kolonkarzinom-Patienten haben Rektumkarzinom-Patienten in UICC-Stadium I mit erfolgter R0-Resektion keine Indikation für eine adjuvante Therapie. Ist vor Operation keine neoadjuvante Radio/Chemotherapie erfolgt, ist in den Stadien II & III wie bei dem Kolonkarzinom eine adjuvante Therapie durchzuführen [29].

## **Metastasiertes kolorektales Karzinom (mKRK)**

### **Chemotherapie**

Die Therapie von fortgeschrittenen Karzinomen ist eine interdisziplinäre Herausforderung. Das Hauptorgan, in das das KRK metastasiert ist die Leber, gefolgt von der Lunge. Das Prozedere wird in der Regel in einem interdisziplinären Tumorboard festgelegt. Zunächst erfolgt bei Patienten in gutem Allgemeinzustand und bei gut zugänglichen Metastasen zur Reduktion der allgemeinen Tumorlast die Metastasenresektion. Die Entscheidungsfindung bezüglich des weiteren Vorgehens erfolgt anhand eines Therapiealgorithmus für die Erstlinientherapie des mKRK. Vor Einleitung einer Therapie erfolgt eine molekulare Diagnostik, die die Analyse des Mutationszustands der *Rat sarcoma Onkogene* (RAS-Gene), KRAS und *Neuroblastoma rat sarcoma viral oncogene homolog* (NRAS), des *B-rapidly accelerated fibrosarcoma* Gens (BRAF-Gens) sowie den Status der MSI umfasst [30]–[33].

Es erfolgt eine Erstlinientherapie, die sich nach dem Allgemeinzustand des Patienten richtet. Vereinfacht dargestellt wird bei gutem Allgemeinzustand ein Fluoropyrimidin-basiertes Kombinationsregime empfohlen ggf. in Kombination mit zielgerichteten *anti-epidermal growth factor receptor* (antiEGFR) oder *anti-vascular endothelial growth factor* (antiVEGF) Substanzen. Kommt es zu einem fehlenden Ansprechen der Therapie oder Progress unter der Therapie, ist eine Zweitlinientherapie zu diskutieren. Die Wahl des Therapeutikums richtet sich nach dem Ansprechen und der Toxizität der Erstlinientherapie, der Molekularbiologie sowie der Lokalisation und der Ausdehnung des Tumors [34].

Der rasche Forschungsfortschritt der letzten Jahre bringt den Einzug monoklonaler Antikörper in die Therapie des KRK mit sich. Unter anderem *Checkpointinhibitoren* Inhibitoren (Ipilimumab, Nivolumab, Pembrolizumab), *Hedgehog* Inhibitoren sowie BRAF-/MEK-Inhibitoren finden im Rahmen von Studien Anwendungen in der Therapie des KRK [35].

Für die adjuvante Therapie kommen beim mKRK im Wesentlichen die in Tabelle 2 aufgelisteten Substanzen zum Einsatz.

**Tabelle 2: Chemo- und Immuntherapeutika des mKRK [36]**

<b>Wirkstoff</b>	<b>Wirkmechanismus/ Angriffspunkt</b>
Fluoropyrimidine (5-FU, Capecitabin)	Hemmung der Thymidylat-Synthese und Bildung fehlerhafter RNA
Irinotecan	Spezifische Hemmung der DNA-Topoisomerase
Oxaliplatin	Inter- und intramolekulare Bindung zwischen den DNA-Strängen
Cetuximab (Erbix®)	Monoklonale Anti-EGFR-Antikörper
Panitumumab (Vectibix®)	
Bevacizumab (Avastin®)	Monoklonaler Anti-VEGF-Antikörper
Aflibercept (Zaltrap®)	Rekombinantes, durch Fusion entstandenes Protein, das an <i>vascular endothelial growth factor A/B</i> (VEGF-A/B) und <i>placental growth factor</i> (PlGF) bindet
Regorafenib (Stivarga®)	Hemmer von Proteinkinasen, speziell VEGFR-1, -2 und -3



## Lokalablative Verfahren

Bei Patienten, bei denen ein mKRK mit nicht-resektablen Metastasen vorliegt, nehmen lokalablative Therapieverfahren (siehe 3.7 & 3.8) einen zunehmend größeren Stellenwert ein. Insbesondere dann, wenn nicht-resektable Leber- oder Lungenmetastasen vorliegen, zuvor bereits eine Leber-/Lungenresektion durchgeführt wurde oder der Allgemeinzustand des Patienten eine Resektion nicht zulässt, wird auf lokalablative Therapieverfahren, wie die Radiofrequenzablation (RFA) oder Afterloading-Brachytherapie (kurz Brachytherapie) (AL) zurückgegriffen. Bei der Radiofrequenzablation wird ein Katheter, meist CT-gesteuert, bis in den Tumor vorgeschoben. Dann wird durch fokussierte, hochfrequente elektromagnetische Wellen eine Hitze erzeugt, die eine Gewebeerstörung induziert [37], [38].

Bei der Brachytherapie, unter CT- oder MRT-Bildgebung, werden ein oder mehrere Katheter über ein Vorschiebesystem bis in das Zentrum der Metastasen vorgeschoben. Im Anschluss wird über ein Nachladegerät (*Afterloading*) eine Strahlenquelle, in der vorliegenden Arbeit Iridium 192, für eine definierte Zeit in die Metastase eingeführt so dass die Tumorzellen im Verlauf zerfallen [39]. Weitere klinisch angewendete lokoregionäre Therapieverfahren sind die selektive interne Radioembolisation (SIRT), die Mikrowellenablation (MWA), die intraarterielle Chemotherapie der Leber, die hepatisch intraarterielle Chemotherapie (HAI) und die transarterielle Chemoembolisation (TACE). Die Entscheidung für oder gegen lokoregionäre Therapieverfahren wird immer von einem interdisziplinären Tumorboard getroffen. Dabei ist es sehr standort- bzw. klinik-spezifisch, wie etabliert die verschiedenen Methoden sind und wie viele Patienten mit lokoregionären Therapieverfahren behandelt werden [2].

Die Herausforderung, die allen lokalablativen Therapieverfahren gemeinsam ist, ist die direkte Erfolgskontrolle. Eine im zeitlichen Zusammenhang direkt auf die Intervention folgende Bildgebung mittels MRT oder CT kann nur limitierte Aussagen über den Erfolg der Intervention geben. Auch eine Feinnadelbiopsie aus dem Randbereich des behandelten Areals bringt Herausforderungen wie u. a. mangelnde Aussagekraft auf

Grund thermischen Schadens sowie zum Teil schwierige Gewinnung mit sich [40], [41]. Eine, mit hohem Aufwand und Kosten verbundene <sup>18</sup>F-FDG PET-/CT-Bildgebung unmittelbar nach der Intervention zeigt sich nützlich in der frühzeitigen Erkennung von Tumorresiduen und ermöglicht zumindest theoretisch bei unvollständiger Ablation eine direkte Wiederholung der Intervention durch die gleichen Strahlenkanäle [42]. Die Erfolgsbewertung einer lokalablativen Therapie erfolgt in der Regel im Rahmen der nächsten Bildgebung in der regulären Nachsorge.

### **Biomarker zur Verlaufskontrolle**

Im Rahmen der Therapieerfolgskontrolle, der Nachsorge, der Verlaufskontrolle und auch im Rahmen der Früherkennung fehlt es derzeit noch an spezifischen laborchemisch nachweisbaren Tumormarkern zur frühzeitigen Detektion des Auftretens von Rezidiven bzw. dem initialen Auftreten von Karzinomen. Es wird intensiv an nicht-/minimalinvasiven Tumormarkern geforscht. Ins Zentrum der Suche rücken dabei verschiedene Proteine, *Desoxyribonukleinsäure* (DNA) (Mutationen und Methylierungsmarker), *Ribonukleinsäure* (RNA) (insbesondere MicroRNAs [miRNAs]), niedermolekulare Metabolite, sowie Veränderungen des Mikrobioms vom Darm [43].

### **Blutbasierte Biomarker des KRK**

Die blutbasierten Biomarker, wie CEA, *Carbohydrate-Antigen* 19-9 (CA 19-9), die in dem aktuellen Screeningverfahren des KRK eine Rolle spielen, haben nur eine geringe Sensitivität sowie Spezifität [44]. Andere Verfahren, wie unter Abschnitt 1.3. beschrieben, stehen bei der Diagnosefindung im Vordergrund, sind allerdings z. T. mit deutlich höheren Kosten oder Invasivität verbunden.

Epigenetische Veränderungen spielen eine zentrale Rolle in der Entstehung des KRK. Bei den epigenetischen Veränderungen des KRK geht es im Wesentlichen um die nachfolgend benannten Mechanismen:

DNA-Methylierung (insbesondere Hypomethylierung), Histon-Modifikationen in Form von Histon-Acetylierung und Histon-Methylierung. Pathophysiologisch wurden den traditionell betrachteten drei Untergruppen der Karzinomentstehung, chromosomale Instabilität (CIN), MSI und *CpG island methylator phenotyp* (CIMP), spezifische molekulare Pfade zugeordnet.[45]

- **Chromosomeninstabilität:** Tumore, die in der Regel von adenomatösen Polypen ausgehen. Die Basis hierfür bietet eine deaktivierende Mutation des APC Gen. Der WNT-Pfadweg wird hierdurch aktiviert. Durch weitere aktivierende Mutationen in KRAS und deaktivierende Mutationen in SMAD4 und in Tumorsuppressorgen 53 entstehen Adenokarzinome. Durch die initiale Mutation des APC-Gens wird dieser Signalweg auch APC-Pfad genannt [6], [46].
- **Mikrosatelliteninstabilität:** Bedingt durch eine fehlerhafte DNA-Reparatur *Mismatch repair (MMR)* sind insbesondere die Gene MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 betroffen. Keimbahnmutationen in diesen Genen verursachen die häufigste hereditäre Form des KRK, das Lynch-Syndrom [47].
- **CpG island methylator phenotype:** Die Subgruppe ist durch eine hohe Anzahl an CpG-Inseln-Hypermethylierung, an bestimmten Promoter Regionen verschiedener Tumorsuppressorgene, charakterisiert. MLH1 Hypermethylierung sowie BRAF Mutationen sind mit CIMP assoziiert [48].

Ebenso können *Non-coding RNAs*, miRNAs sowie *Long non coding RNAs* (LncRNAs) verschiedene tumorassoziierte Signalwege regulieren und spielen in allen Stadien des KRK - von der Entstehung bis zur Metastasierung - eine Rolle. Es kommt entweder zur Regulierung spezifischer Ziel-mRNAs oder breitgestreuter Genregulierung, sowie zur Expression und/oder Suppression von Tumoronkogenen/Tumorsuppressorgenen. LncRNAs regulieren den Transkriptionsprozess auf verschiedene Wege [49]–[51].

Im Stuhl, im Blut oder im Gewebe werden mRNA-Expression, Genmutation (KRAS, APC, p53), MSI und Methylierungsmuster, insbesondere zur Auswahl der

Chemotherapie oder bei familiärer Genese des KRK analysiert [52]. Im Standard-Screening zur Früherkennung - ohne besondere familiäre Belastung - finden die meisten Marker keine Anwendung.

Die o. g. Gene, Proteine und Methylierungsmuster sind Gegenstand der aktuellen Forschung der minimalinvasiven Karzinomfrüherkennung. Besonders vielversprechend erscheinen miRNA-Analysen, sowie der Ansatz, mehrere miRNA in Kombination zu analysieren [53].

Zusätzlich zu dem unter 1.2. beschriebenen iFOBT, bestehen in den USA erste *Food and Drug Administration* (FDA)-Zulassungen für Testsysteme, die auf molekularer Ebene als Screeninginstrumente dienen, wie der *Epi proColon* sowie *Cologuard*.

Der *Epi proColon* (*Epigenomics, Seattle, USA*) analysiert blutbasiert Septin9-Methylierung mit einer Sensitivität von 73,7% und einer Spezifität von 97% in der KRK-Erkennung [54].

Der *Cologuard* (*Exact Science, Madison, USA*) analysiert stuhlbasierend *N-myc-downstream-regulated gene 5* (NDRG5) und *Bone morphogenetic protein 3* (BMP3) Methylierungen sowie KRAS Mutationen mit einer Sensitivität von 92,3% in der Erkennung von KRK. Die Sensitivität für Krebsvorstufen liegt bei 42,4%, die Spezifität bei 89,8% [55].

## **MicroRNA**

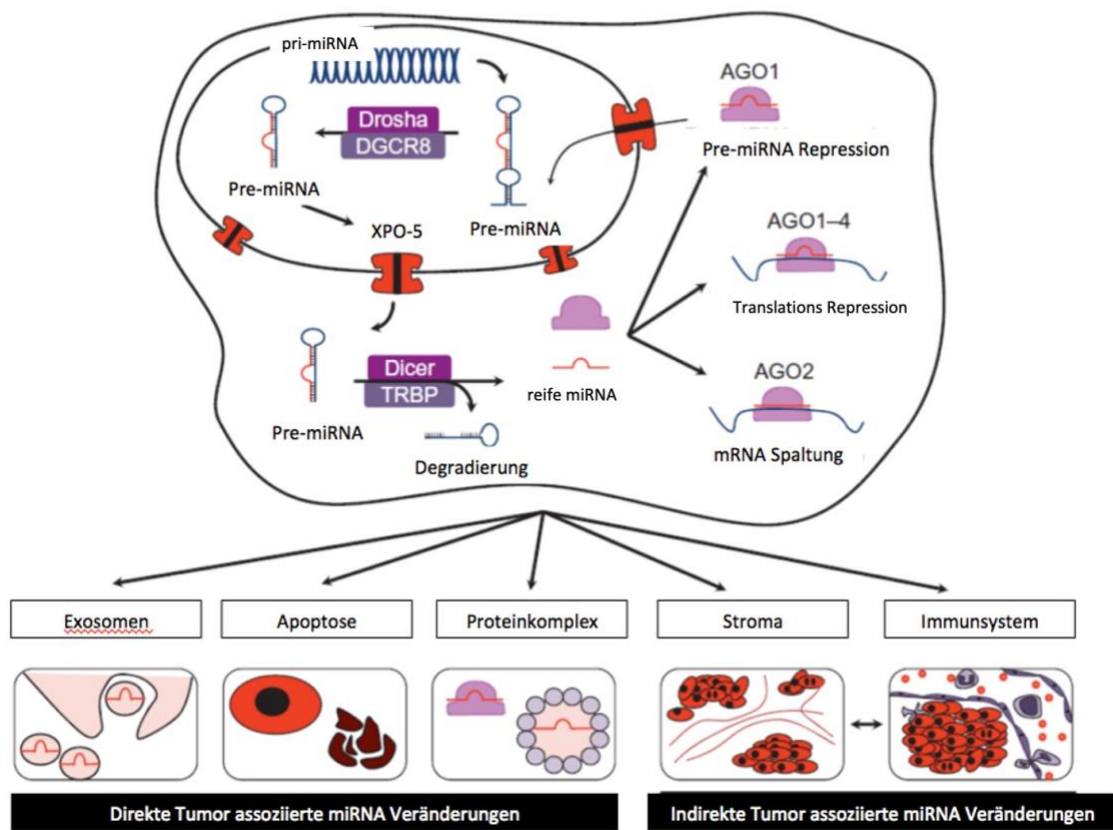
MicroRNA sind kurze, nicht kodierende Ribonukleinsäuren und spielen eine wichtige Rolle in der Genregulation, insbesondere dem *Gen-Silencing*. Erstmals wurde miRNA in *Caenorhabditis elegans* im Jahr 1993 beschrieben. Seitdem wurden mit Hilfe intensiver Forschungsarbeit und der Entwicklung zahlreicher neuer Methoden weitreichende Erkenntnisse über die Biogenese von miRNA, ihre Interaktion mit mRNAs sowie ihre Auswirkungen auf die Proteinsynthese gewonnen [56][57].

Mittlerweile wurden über 60% der humanen Protein-kodierenden Gene als konservierte Ziele von miRNAs identifiziert [58].

### **Biogenese und Wirkung von miRNA**

Die Biogenese der miRNA (dargestellt in Abbildung 2) kann von polycistronischen oder monocistronischen miRNA-Genen ausgehen. Ein miRNA Gen wird durch Pol II in ein langes Primärtranskript (pri-miRNA) transkribiert und kann als Klasse 2 Gene klassifiziert werden, wie auch alle Protein-kodierenden Gene [59]. Das Primärtranskript (pri-miRNA) wird durch die nukleäre RNase III Drosha zu einer haarnadelförmigen Precursor miRNA (pre-miRNA) geformt [60]. Die pre-miRNA wird durch das Transportprotein Exportin-5/ranGTP (XPO-5) aus dem Nukleus exportiert [61]. Im Anschluss wird die haarnadelförmige pre-miRNA durch die zytoplasmatische RNase III Dicer/TRBP in einen reifen ~22-nt miRNA Duplex gespalten. Beide Stränge des miRNA Duplex könnten weiterverarbeitet werden, um den *miRNA-induced silencing complex* (miRISC) zu bilden. Doch in der Regel wird nur einer der beiden Stränge funktional aktiv [62].

Aktuelle Studien suggerieren verschiedene Wirkungen, je nach Beteiligung des Argonaute Proteins (AGO) 1-4 bei der miRISC-Komplexbildung: Mit dem Protein AGO2 im Komplex wird dem miRISC überwiegend endonukleolytische Spaltung zugesprochen. Ist der miRISC im Komplex mit den Proteinen AGO 1,3 oder 4, zielt er auf die 3'-UTR der mRNA um Deadenylation und/oder Translation Repression des Transkripts zu bewirken [63], [64].



**Abbildung 2: Biogenese der miRNA und extrazelluläre Zell-Zell-Kommunikation [65]. Minimal modifiziert und ins Deutsche übersetzt.**

miRNA-induziertes Gen-Silencing wird durch teilkomplementäre oder vollkommene Komplementarität mit dem Transkript ermöglicht und reguliert so eine Reihe von zellulären Prozessen, unter anderem Embryogenese, Zelldifferenzierung, Proliferation, Metabolismus und jeden Schritt der Karzinogenese [66], [67]. Zusätzlich zu der klassischen Repression suggerieren aktuelle Studien weitere Funktionen der miRNAs. miRNAs können die Translation von Ziel mRNAs hochregulieren, wenn sich die Zelle im Zell-Zyklus-Arrest befindet. Befindet sich die Zelle in der Proliferation, führen miRNAs zu einer Repression der Translation [68]. Auch wird angenommen, dass der miRISC über einen positiven Feedback-Loop direkt an der Autoregulation der miRNA involviert ist [69]. Die intrazelluläre Konzentration der miRNAs hat einen signifikanten Einfluss auf die Regulation der Genexpression. Studien haben gezeigt, dass für gewisse Gene eine Schwelle der Ziel-mRNAs vorliegt. Unterhalb dieser

mRNA-Schwelle unterdrücken die miRNAs die Proteinproduktion stark. An der Schwelle reagiert die Proteinexpression sehr viel sensitiver auf den Ziel mRNA Input [70]. Die Autoren suggerieren mit den Ergebnissen, dass miRNA nicht nur, wie bisher angenommen, als An- oder Ausschalter der Translation von mRNA fungieren, sondern auch maßgeblich an der Feinabstimmung beteiligt sind [70], [71].

### **Funktion der miRNA in der Onkogenese**

miRNAs können eine onkogene (auch oncomiRs genannt) oder eine tumorsuppressive Rolle in der Regulation der verschiedenen Wege der Karzinogenese einnehmen. OncomiRs haben typischerweise endogene Tumorsuppressorgene als Ziel und regulieren diese herunter. Tumorsuppressive miRNAs regulieren Gene herunter, die mit Zellwachstum und Metastasierung in Zusammenhang stehen. Sind nun oncomiRs hochreguliert und tumorsuppressive miRNAs herunter reguliert, hat dies eine stark prokarzinogene Wirkung zur Folge [72].

### **Herkunft der im Blut zirkulierenden miRNA**

Es wurde nachgewiesen, dass miRNA in einem stabilen Zustand in Gewebe, Körperflüssigkeiten, Faeces, Plasma und Serum vorkommt [73]. Noch ist nicht vollends geklärt, wie miRNA ins Blut gelangt, doch einige Mechanismen konnten identifiziert werden. Es wurde beschrieben, dass Vesikel assoziierte miRNA (e.g., let-7a) aktiv von Exosomen oder spezifische Proteine aus Zellen exportiert werden [74]. Exosomen sind von einer Zellmembran umgeben. Durch diese Zellmembran ist die miRNA vor dem Abbau durch RNAsen geschützt. Mit Hilfe der Exosomen kann ein lokaler wie auch ein systemischer Austausch funktioneller miRNA zwischen den Zellen ablaufen [75]–[78].

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass nicht-Vesikel-assoziierte miRNA (e.g., miR-16 und miR-92a) ins Blut gelangen. Im zellulären Kompartiment liegen diese miRNAs in einem Komplex mit Proteinen des miRISC Komplexes vor. Außerhalb der Zellen formen miRNA Komplexe mit dem AGO2 Protein, sowie mit verschiedenen *High density Lipoproteinen* (HDL) [79]–[81]. Die Proteinkomplexbildung, die Vesikelbildung

und ebenso die geringe Länge der miRNAs schützt sie vor einem Abbau durch RNAsen [73], [79], [82].

Des Weiteren wurde gezeigt, dass es zu dramatischen Unterschieden der miRNA Expression in Folge von Tumorresektion kam [83]. Aus den bisher vorliegenden Erkenntnissen wurde geschlussfolgert, dass zirkulierende miRNA in „*tumor-related miRNA*“ und „*tumor-independent-miRNA*“ zu unterteilen ist [65].

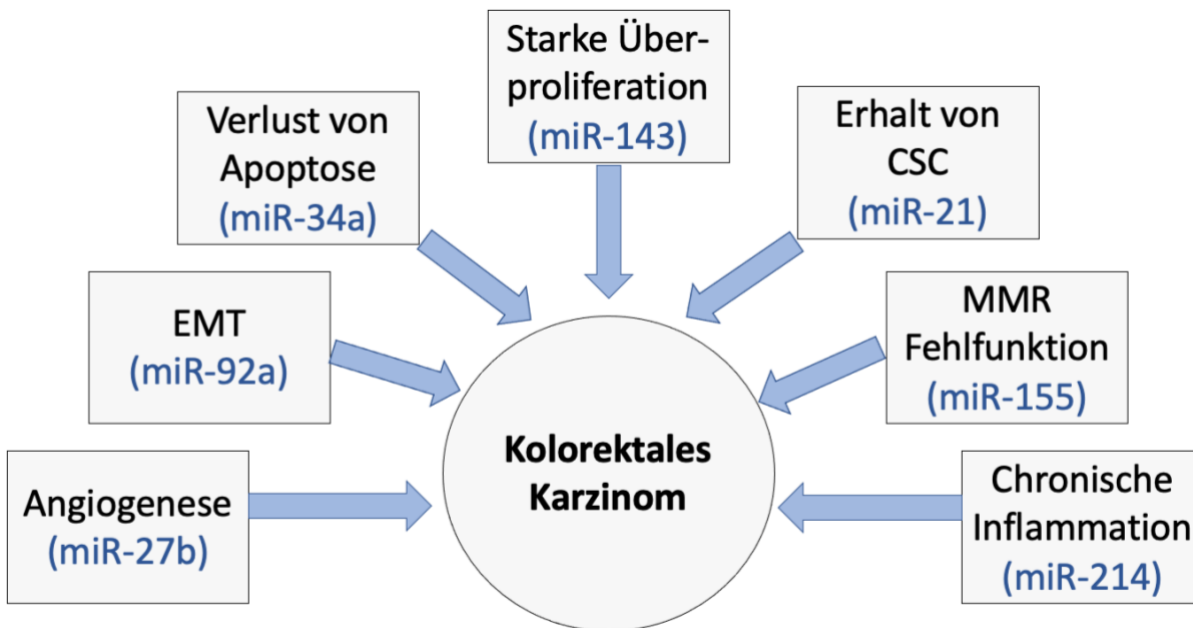
miRNA gelten als vielversprechend als Karzinomfrüherkennungsmarker sowie Marker in der Verlaufskontrolle und zum Monitoring des Therapieansprechens von malignen Erkrankungen [84]. Die Antwort auf die Frage, ob miRNA als Biomarker Anwendung finden kann bzw. wie ist die Dynamik der miRNA Veränderungen unter lokalablativen Therapie, soll in der vorliegenden Arbeit geklärt werden.

### **miRNA und das KRK**

Der erste Zusammenhang zwischen miRNA und KRK wurde 2003 beschrieben. Es konnte im Vergleich mit gesundem kolorektalem Gewebe verringerte Konzentrationen von miR-143 und miR-145 in kolorektalem karzinomatösem Gewebe nachgewiesen werden [85]. In der Entwicklung zum KRK, ausgehend von Polypen oder benignem Adenom, spielen verschiedene Mechanismen eine Rolle. Die wichtigsten sind Überproliferation, Verlust von Apoptoseregulation, Erlangen eines invasiven Phänotypen, verstärkte Angiogenese und Erhalt von Krebsstammzellen [84]. In **Abbildung 3** sind die mit miRNA assoziierten Mechanismen, die bei der Entwicklung des KRK eine Rolle spielen, exemplarisch dargestellt.

Einer der Hauptwege für unkontrolliertes Zellwachstum/Proliferation beim KRK geht über die *Mitogen-activated-protein Kinase* (MAP Kinase), die mit den *Proteinen Rat Sarkoma* (RAS), *rapidly accelerated fibrosarcoma* (RAF) und *extracellular signal-Regulated Kinases* (ERK) assoziiert ist. Unter anderem Let-7, miR-143, miR-18a\* wie auch miR-145 regulieren RAS herunter und agieren somit als Tumorsuppressoren im KRK [67], [69], [74], [77].





EMT – epithelial mesenchymal transition, CSC = cancer stem cells, MMR = mismatch repair

**Abbildung 3: Schematische Darstellung der miRNA-Funktion mit Auswahl exemplarischer miRNA im KRK, Darstellung und Farbschema modifiziert [86].**

### miR-21 und das KRK

Während viele miRNA bei der Entstehung des KRK tumorsuppressiv agieren [87], [88], wurde miR-21 als eine potentiell onkogene miRNA genannt. miR-21 wird als eine der am stärksten hochregulierten miRNA im KRK beschrieben. Über Regulation der Proliferation, Apoptoseeinleitung, Invasion, Migration sowie *Cancer Stem Cell* (CSC) Erhaltung unterstützt miR-21 die Karzinogenese des KRK [84], [89]–[93].

Aktuelle Studienergebnisse konnten zeigen, dass es zu einer schrittweisen Erhöhung der miR-21 Konzentration parallel in Abhängigkeit zum Progress des Tumorstadiums kommt [94]. Nach Resektion des Primarius zeigt sich ein deutlicher Abfall der miRNA-Konzentration [95]. Unterschiede der miR-21-Konzentration in Abhängigkeit zu der Tumorlokalisierung des Primarius konnten nicht nachgewiesen werden [75].

Wegen der vielfältigen Ansatzpunkte der Regulation durch miR-21 wird neben ihrer Rolle als Tumormarker/Verlaufsmarker an einer externen Hemmung als Therapiekonzept geforscht [84].

## **miRNA und lokalablative Therapie**

Wie bereits erwähnt, wurde in verschiedenen Studien gezeigt, dass es mit dem Tumorwachstum des KRK zu einem Anstieg der miR-21 Serumkonzentration und nach Resektion des Primarius zu einem deutlichen Abfall kommt [94]. Bisher liegen keine Studien vor, die sich mit der miR-21-Konzentration um den Zeitraum einer interventionellen Radiofrequenzablation oder Brachytherapie befassen. Da es nach einer Resektion des Primarius zu einem Abfall der miR-21 Konzentration kommt, könnte angenommen werden, dass ebenfalls nach ablativer Therapie der Metastasen, und damit der Tumorreduktion, ein Konzentrationsunterschied der miR-21 auffällt und die miR-21 als Verlaufsparemeter bzw. Erfolgsparemeter genutzt werden könnte. Die minimalinvasive Bestimmung der miR-21 mittels im Serum würde einen deutlichen Zeit- sowie Kostenvorteil im Vergleich zu bildgebenden Verfahren wie Computertomographie oder Magnetresonanztomographie bringen, die im Rahmen des Stagings derzeit angewendet werden.

## 2 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, die Wertigkeit von zirkulierender miRNA am Beispiel von miR-21-5p als Biomarker bei Patienten mit mKRK unter einer lokalablativen Therapie zu charakterisieren und zu evaluieren.

Die Arbeit analysiert die Frage der prädiktiven bzw. prognostischen Wertigkeit der miR-21-Serumkonzentration bei Patienten mit mKRK, die mittels lokalablativen Therapiemethoden behandelt wurden, in Abhängigkeit von klinischen, ätiologischen sowie laborchemischen Parametern.

Insbesondere werden folgende Fragen bearbeitet:

- Charakterisierung von miR-21 bei Patienten unter lokalablativer Therapie
- Zeitliche Beurteilung von miR-21 nach lokalablativer Therapie
- Evaluation von potenziellen Einflussfaktoren auf die miR-21 in mKRK Patienten
- Vergleich von unterschiedlichen lokalablativen Verfahren (Radiofrequenzablation sowie Brachytherapie) und Auswirkung auf die miR-21 Konzentration
- Evaluation von prädiktiver bzw. prognostischer Wertigkeit von miR-21 bei Patienten mit mKRK und lokalablativer Therapie
- Analyse der miR-21 Konzentration als direkter Verlaufsparemeter zur Bestimmung der Effektivität des lokalablativen Verfahrens (Brachytherapie, Radiofrequenzablation) in der Behandlung des mKRK

### 3 Material und Methoden

#### Materialien

#### Geräte und Utensilien

In den folgenden Tabellen sind die Geräte und Utensilien sowie Verbrauchsmaterialien aufgelistet.

**Tabelle 3: Geräte**

<u>Geräte und Utensilien</u>	<u>Hersteller und Herkunftsland</u>
BioPhotometer	Eppendorf, D-Hamburg
CFX96™ Real-Time PCR Detection System, C1000™ Thermal Cycler	BIO-RAD, USA-Hercules, California
Hettich Zentrifugen EBA 12R	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, D – 78532 Tuttlingen
Pipetten, einstellbar (5, 10, 20, 200, 1000 µl)	Eppendorf, D-Hamburg
Schüttelgerät RS-VA10	Phoenix Instrument, D-Garbsen
T3 Thermocycler	Biometra, D-Göttingen
Zentrifuge Multifuge 3 S-R /Heraeus	ThermoFisher Scientific, USA-Waltham, MA
Zentrifuge Heraeus Fresco™ 17	ThermoFisher Scientific, USA-Waltham, MA
Zentrifuge, Sprout Minizentrifuge	Biozym, D-Hessisch Oldendorf

#### Verbrauchsmaterial

**Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien**

<u>Verbrauchsmaterialien</u>	<u>Hersteller und Herkunftsland</u>
BD Vacutainer® Safety-Lok™ Blutentnahmeset	BD, USA-Franklin Lakes, NJ

BD Vacutainer® EDTA-Röhrchen	BD, USA-Franklin Lakes, NJ
BD Vacutainer® Serumröhrchen	BD, USA-Franklin Lakes, NJ
kodan® Tinktur forte farblos, Hautantiseptikum	Schülke & Mayr GmbH, D-22840 Norderstedt
1,5 ml RNase-freies Reaktionsgefäß	ThermoFisher Scientific, USA-Waltham, MA

## Chemikalien/Reagenzien

**Tabelle 5: Chemikalien/Reagenzien**

<u>Chemikalien/Reagenzien</u>	<u>Hersteller und Herkunftsland</u>
cel-miR-39 TaqMan MicroRNA Assay (AssayID: 0002000)	Qiagen, D-Hilden miRBase Accession: MIMAT0020306
Ethanol entwässert 100%	Universitätsklinikum Magdeburg A.ö.R. Zentralapotheke, D-Magdeburg
Primer: miR – 21, SYBR Green	miRBase Accession: MIMAT0000076
Power SYBR Green PCR Master Mix	ThermoFisher Scientific, USA-Waltham, MA
Syn-cel-miR-39 miScript miRNA Mimic, Catalog#MSY0000010, (5nmol)	Qiagen, D-Hilden
Trichlormethan/Chloroform, Rotipuran® ≥99%, p.a.	Carl Roth GmbH + Co. KG,

## Kits/Enzyme

**Tabelle 6: Kits**

<u>Kits/Enzyme</u>	<u>Hersteller und Herkunftsland</u>
miRNeasy®Mini Kit (50)	Qiagen, D-Hilden
<i>Nuclease-Free Water</i> 50 ml	Qiagen, D-Hilden

TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit 1000 Reactions	ThermoFisher Scientific, USA-Waltham, MA
TaqMan® Universal Master Mix II UNG (Katalognummer: 4440047)	Applied Biosystems, Forster City, Kalifornien

## Methoden

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen eines Forschungsprojektes der Klinik für Radiologie und Nuklearmedizin in Kooperation mit der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie der Universitätsklinik der Otto-von-Guericke Universität in Magdeburg erstellt. Die vorliegende Arbeit war ein Teilaspekt des Projektes (Locomotive Studie) zum Thema „Lokale Ablation von Leber- und Lungenmetastasen bei Patienten mit KRK nach Versagen der systemischen Erstlinien-Chemotherapie“.

Die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke Universitätsklinikum Magdeburg hat dem Forschungsvorhaben mit der Nummer 150/13 (interne Nummer: RAD229) am 04.11.2013 zugestimmt. Alle Patienten wurden vor dem Einschluss in die Studie aufgeklärt und eine schriftliche Einwilligung wurde eingeholt. Die Analyse erfolgte u.a. durch das Heranziehen einer gesunden Kontrollgruppe ohne Hinweise für Leberpathologien und ohne sonstige neoplastische Erkrankungen. Die Patientendaten der Kontrollgruppe wurden aus der Studie „Stuhl-microRNA – neuartige Biomarker für gastrointestinale Erkrankungen“ mit Ethiknummer 99/10 rekrutiert.

## Studiendesign

Die vorliegende Arbeit wurde in zwei aufeinanderfolgenden Abschnitten durchgeführt. Im ersten Abschnitt erfolgte die Rekrutierung und Therapie der Patienten mitsamt Blutentnahmen und zum Teil Stanzbiopsie der Läsionen zur Materialgewinnung.

Im zweiten Abschnitt wurde im Labor der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie das Blut analysiert. Im Institut für Pathologie der Uniklinik Magdeburg wurde das Gewebe aus den Stanzbiopsien der behandelten Patienten analysiert. Die

Analyseergebnisse dieser Stanzbiopsien wurden im Rahmen der anderen Forschungsarbeit evaluiert.

## **Eigenanteil**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden folgende Aufgaben bearbeitet:

- Vorbereitung und Durchführung von Blutentnahmen.
- Extraktion sowie Quantifizierung der miRNA-Analyse in Serumaliquots der gewonnenen Blutproben.
- Akquirieren der klinischen Daten.
- Statistische Auswertung und kritische Beurteilung der Ergebnisse der Studie.

## **Patientenkollektiv**

Es wurden Patienten, die an mKRK erkrankten und mit Brachytherapie, RFA oder MWA lokal behandelt wurden, in die Studie eingeschlossen und in der Arbeit evaluiert.

## **Einschlusskriterien**

Für den Studieneinschluss durfte keines der folgenden Einschlusskriterien mit **Nein** beantwortet werden:

1. Alter zum Studienzeitpunkt zwischen 18 und 85 Jahren
2. Ausgeschlossene Schwangerschaft
3. Lebenserwartung über 6 Monate
4. Einwilligung und Befähigung zu allen studienspezifischen Maßnahmen
5. Freiwillige, vollständig informierte Einwilligung
6. Histopathologisch gesichertes kolorektales Karzinom, Rezidiv in Metastasenform in Leber, Lunge und/oder Lymphknoten
7. Progression nach durchgeführter Chemotherapie
8. Nicht mehr als zwei Organe mit aktiver Erkrankung
9. Primärtumor reseziert, kein Nachweis eines Lokalrezidivs
  - A) Durchmesser der größten Leberläsion beträgt max. 5 cm sowie nicht mehr als fünf Metastasen

ODER

B) Durchmesser der größten Läsion 15 cm, und nicht mehr als drei Lebermetastasen (Satellitenmetastasen nahe dem Läsionsrand nicht berücksichtigt)

10. Nicht mehr als drei Lungenmetastasen mit einem Durchmesser bis zu 5 cm  
ODER nicht mehr als fünf Läsionen mit einem Durchmesser bis zu 3 cm.

11. Nicht mehr als zwei Metastasen außerhalb von Lunge oder Leber (ausgeschlossen sind Knochenmetastasen)

12. ECOG Score  $\geq 1$

13. Karnofsky-Index  $\geq 70\%$

### **Ausschlusskriterien**

Für den Studieneinschluss durfte keines der folgenden Ausschlusskriterien mit **Ja** beantwortet werden:

1. Kontraindikation für die Radiofrequenzablation oder Brachytherapie
2. Schwangere oder stillende Frauen
3. Patient ist klinisch instabil
4. Unkooperativer Patient
5. Begleitende Chemotherapie
6. Zerebrale Metastasen
7. Symptomatische Knochenmetastasen
8. Peritonealkarzinose, Pleurakarzinose
9. Andere aktive maligne Erkrankungen
10. Lebenserwartung unter 6 Monaten

### **Kontrollkohorte**

Die Kontrollgruppe besteht aus 20 Patienten (12 männlich, 8 weiblich) ohne Hinweise für Leberpathologien und ohne sonstige neoplastische Erkrankungen. Die Patientendaten der Kontrollgruppe wurden aus der Studie „Stuhl-microRNA – neuartige Biomarker für gastrointestinale Erkrankungen“, mit der Ethikantragsnummer 992010 und der Nummer 99/10 herangezogen. Eine genauere Charakterisierung ist unter 4.1. Charakterisierung der Studienkohorte zu finden.



## **Vor- und Verlaufsuntersuchungen**

Bevor die Patienten im Rahmen der Locomotive Studie zur geplanten lokalablativen Therapie zur Behandlung der Metastasen elektiv stationär aufgenommen wurden, fand eine ambulante Bildgebung in Form von MRT/CT statt. Diese Bildgebung erfolgte, je nach Herkunft des Patienten, entweder in einer externen Einrichtung oder in der Klinik für Radiologie und Nuklearmedizin des Universitätsklinikums Magdeburg. Die Dauer des stationären Aufenthalts betrug in der Regel ca. 4 - 5 Tage.

In **Abbildung 4** ist der Ablauf der stationären Aufnahme dargestellt. Am Aufnahmetag in der Klinik für Radiologie und Nuklearmedizin des Universitätsklinikums Magdeburg fand, abhängig vom zeitlichen Abstand der vorhergegangenen Bildgebung, eventuell eine erneute Bildgebung statt. Des Weiteren wurde am ersten stationären Aufnahmetag venöses Blut für die Studie (1x Ethyldiamintetraacetat (EDTA)/1x Serum) und für das Labor abgenommen. Im Folgenden kam es zur Erstellung des Behandlungsplans. Am zweiten stationären Tag erfolgte die auf den Patienten individuell abgestimmte interventionelle lokalablativ Therapie (Brachytherapie, RFA, MWA). Am dritten stationären Tag wurde den Patienten ein weiteres Mal Blut für die Studie (1x EDTA/1x Serum) abgenommen. Bei komplikationslosem Verlauf wurden die Patienten am vierten Tag des stationären Aufenthaltes nachmittags, nach einer weiteren Blutentnahme für die Studie und einer Blutentnahme für das Labor, entlassen.

Zum Teil sind die Patienten mehrfach in die Studie eingeschlossen worden, weil verschiedene oder im Verlauf neu aufgetretene Metastasen zu unterschiedlichen Zeitpunkten therapiert wurden. Bei der Auswertung ging es vor allem darum den jeweiligen Therapiezeitpunkt mit Auswirkung auf die miRNA zu bewerten.

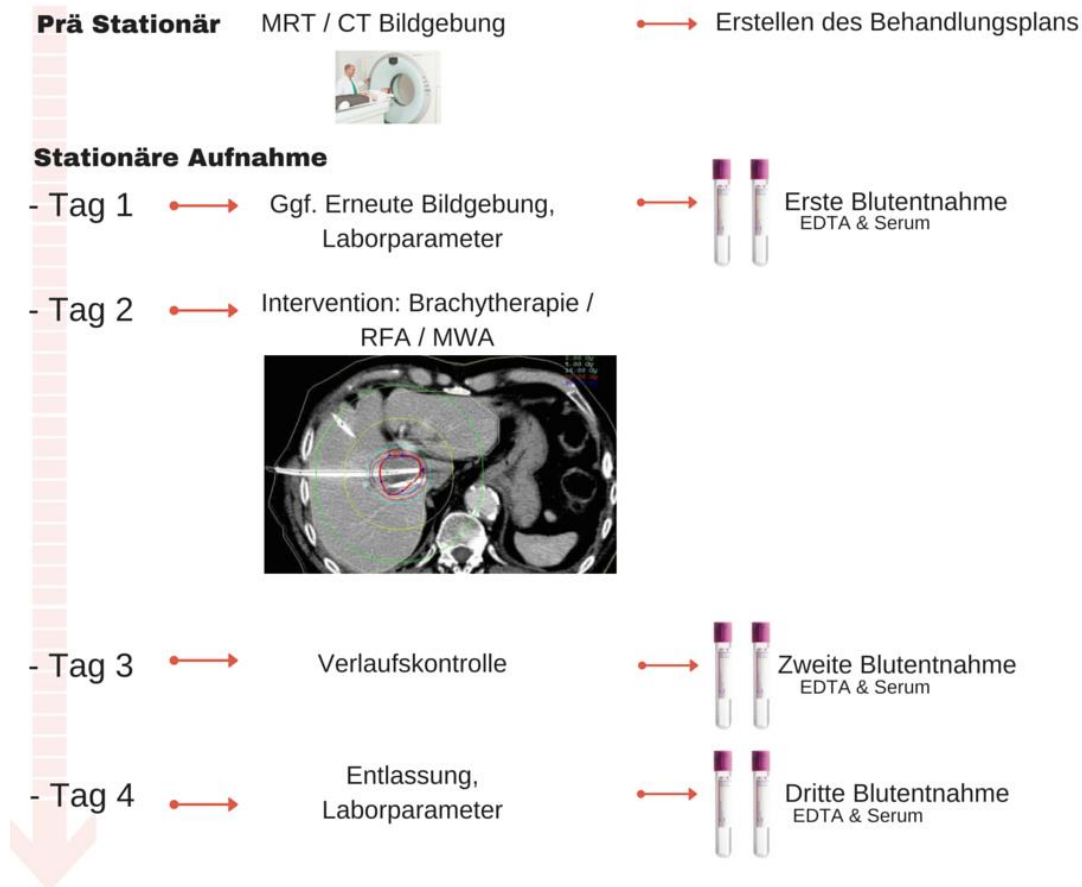


Abbildung 4: Ablauf des stationären Aufenthaltes (eigene Darstellung).

## Brachytherapie

Brachytherapie ist eine der beiden Therapieoptionen, mit denen das Patientenkollektiv behandelt wurde. Die Brachytherapie ist eine invasive Therapieoption. Im Vergleich zu anderen Therapieoptionen wie Chemotherapie oder chirurgischer Resektion erfährt der Patient allerdings hierdurch eine geringere Belastung. Für die Brachytherapie werden radioaktive Strahlenquellen mit einem sehr steilen Dosisabfall genutzt. Es wird eine räumlich eng begrenzte Dosisverteilung erzeugt. Somit kann eine hohe Dosis direkt in das Zielgebiet gebracht werden, mit geringer Strahlenbelastung des umliegenden Gewebes [39]. Die interstitielle Brachytherapie erfordert das Einbringen von Strahlenträgern in den Tumor. Im Gegensatz dazu, wird bei der Kontakttherapie

der Strahler direkt auf den Tumor aufgelegt, z. B. bei der klassischen Kontakttherapie von Hauttumoren.

Im Rahmen der Locomotive Studie wurde die interstitielle Brachytherapie angewandt. Dies geschieht in 2 Phasen. In der ersten Phase werden dem Patienten in der Klinik für Radiologie unter CT oder MRT Bildgebung ein oder mehrere Katheter über ein Vorschiebesystem in das Zielvolumen eingeführt und anschließend, bei korrekter Lage, kutan fixiert. In der zweiten Phase wird der Patient in der *Klinik für Strahlenmedizin OVGU Magdeburg* an ein ferngesteuertes Nachladegerät angeschlossen. Nach der Positionierung eines Applikators und Dokumentation der richtigen Lage am Tumor wird eine Schlauchverbindung mit dem Nachladegerät hergestellt und die Strahlenquelle (Iridium 192) in den Applikator eingefahren unter Berücksichtigung des Strahlenschutzes. Eine Strahlenquelle am Ende des Ausfahrdrachts des Nachladegeräts tastet nach dem vorausberechneten Bestrahlungsplan das Zielvolumen in Schritten von wenigen Millimetern ab [39].

## **Radiofrequenzablation**

Die zweite Therapieoption für Patienten der vorliegenden Arbeit war die Radiofrequenzablation, ein thermisches Ablationsverfahren.

Das Verfahren beruht auf der biophysikalischen Wechselwirkung hochfrequenter Wechselstromfelder mit dem therapierten Gewebe [39]. In Situ erzeugen die hochfrequenten, sinusoidalen elektromagnetischen Ströme (375 bis 500kHz), die durch eine oder mehrere Elektroden generiert werden, eine Gewebeerwärmung von 55 - 60°C. Dieser Gewebeerwärmung folgt eine irreversible Gewebeerstörung durch DNA Denaturierung [37], [38]. Gewebetemperaturen zwischen 60 und 100°C führen zu Koagulationsnekrosen. Gewebetemperaturen über 100°C sind wegen Gewebeerwärmung und -verkohlungs nicht erwünscht, denn hierdurch wird der Effekt der RFA abgeschwächt. Grundsätzlich existieren zwei Möglichkeiten der RFA-Anwendung: monopolar oder bipolar. Wegen der höheren Kosten und technischen Voraussetzungen ist die bipolare Methode in der Praxis seltener anzufinden. Die

monopolare Methode ist weitaus verbreiteter. Bei der monopolaren Methode wird der elektrische Kreis durch eine Erdungsplatte auf der Haut geschlossen. Für Metastasen bis zu 3,0 cm liefert die monopolare Methode zuverlässige, reproduzierbare sphärisch nekrotische Zonen. Bei größeren Metastasen können multifokale und/oder multiple überlappende Anwendungen notwendig sein [96]. Die Anwendung der RFA wird beendet, wenn der Strom auf Grund von Zellkoagulation oder Austrocknung nicht mehr fließen kann. Die durchschnittliche Anwendungsdauer beträgt 15 Minuten, abhängig von den genutzten Elektroden und der Größe des Zielvolumens [97].

Ein Behandlungsplan wird sowohl für die RFA, die AL als auch die MWA für jeden Patienten individuell erstellt. Zieldosen werden ermittelt, so dass eine Metastasenspezifische Therapie erfolgen kann.

### **Mikrowellenablation**

Die dritte Therapieoption, die in der Studie angewendet wurde, war die Mikrowellenablation.

Bei der MWA erfolgt über ein Kathetersystem die perkutane Applikation einer dünnen Sonde direkt in den Tumor. Es wird über einen Generator eine elektromagnetische Energie erzeugt, die über ein Kabel an die Sonde weitergeleitet wird. Aus einem Teil der Sonde, dem nicht isolierten Part, werden Mikrowellen ausgestrahlt, die Hitze erzeugen. Die Mikrowellen, die im medizinischen Bereich Anwendung finden, reichen von 915MHz bis 2,45GHz [98]. Die Hitze entsteht durch einen Prozess, der Dielektrische Hysterese genannt wird [99].

Hierbei kommt es zu einer Interaktion zwischen den Mikrowellen und polaren Molekülen, im Gewebe zum größten Teil Wassermolekülen. Die elektrische Ladung der Moleküle wird durch die Mikrowellen mehrere Millionen Mal pro Sekunde geändert. Bei jeder Änderung der Ladung werden die Moleküle gezwungen ihre Polarität, entsprechend der Polarität der Welle, neu auszurichten. Gelingt dies nicht, wird ein Teil der Mikrowellen-Energie absorbiert und konsekutiv in Hitze umgewandelt und es kommt zur thermischen Zellzerstörung[100].

Insgesamt erfolgte die Therapie mit der MWA im Rahmen der vorliegenden Arbeit nur zwei Mal, sodass in der weiteren Analyse auf diese Methode nicht weiter eingegangen wird.

### **Blutentnahme – venöse Punktion**

Den Studienteilnehmern wurde zu den jeweiligen Zeitpunkten venöses Blut, aus einer möglichst peripher gelegenen Arm- oder Handrückenvene, mithilfe eines Butterfly-Blutentnahmesets (*BD Vacutainer®Safety-Lok 21G (0,8 x 19 mm), 305 mm Schlauch*) entnommen. Es wurden je ein Serum-Vacutainer (10ml) und ein EDTA-Vacutainer (10 ml) mit venösem Blut gefüllt.

Die Serumfraktion wurde durch Zentrifugation (10 min bei 2500 x g) gewonnen und in drei „Aliquots“ (200 µl Aliquot und Kryoröhrchen je 1 - 2 ml Serum) bei -80°C asserviert.

Vor der Zentrifugation des EDTA-Röhrchens wurde es vorsichtig geschwenkt und dabei gemischt. Dann wurden 2 x 200 µl EDTA-Blut in 2 Eppendorf-Röhrchen für spätere DNA-Analysen pipettiert. Im Anschluss wurden die Röhrchen 10 min bei 2500xg zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde die obere Plasmaschicht auf 2 Kryoröhrchen verteilt, ca. 1 - 2 ml je Röhrchen. Dann wurde die Zellschicht über den Erythrozyten, die weiße Leukozyten-Schicht, in ein Kryoröhrchen pipettiert und der Rest verworfen. Alles wurde bei -80°C asserviert.

### **Isolierung der miRNA**

Die Isolierung der miRNA erfolgte mittels dem miRNeasy Mini Kit (Qiagen) nach minimal modifizierten Anweisungen des Herstellers. 200 µl Patientenserum wurden in 800 µl Qiazol Lyse-Reagenz lysiert und gevortext, so dass in der makroskopischen Ansicht keine Zellreste mehr erkennbar waren. Anschließend wurden 200 µl Chloroform und 5 µl des Referenzgens cel-miR-39 zugefügt, gevortext, für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 4°C, 12000 g für 15 min zentrifugiert. Es bildeten sich drei Schichten/Phasen. Eine rosafarbene Chloroform- und Qiazol-

haltige Schicht, eine weiße zell- und proteinhaltige Schicht und die oberste wässrige Schicht.

Von der obersten, wässrigen Schicht wurden 500 µl abpipettiert, dann in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1,5 x Volumen 99,99% Ethanol versetzt. Nach gründlichem Durchmischen wurde die Lösung auf eine RNeasy Mini Spin Column (Säule) gegeben. Durch mehrere Waschschriffe wurde die RNA, die selektiv an die Silika-Membran der Säule bindet, aufgereinigt. Anschließend wurde die RNA zweimal mit 50 µl RNase-freiem Wasser eluiert.

Für die nachfolgende Polymerase Kettenreaktion (PCR) wurde eine 1:30 Verdünnung mit 3 µl Eluat und 87 µl RNase freiem Wasser erstellt. Für die photometrische Messung wurde mit 3 µl Eluat und 67 µl verdünnt. Abschließend wurde mit dem BioPhotometer bei 260 nm Wellenlänge die Konzentrationsbestimmung durchgeführt.

### **Reverse Transkription**

Zur Durchführung einer PCR wird die RNA zunächst in cDNA umgeschrieben. Da die Sensitivität höher ist, wenn die cDNA Synthese und quantitative *real-time PCR* (qRT-PCR) in voneinander getrennten Schritten durchgeführt werden, erfolgte zunächst die Umschreibung in die cDNA und im Anschluss die qRT-PCR. Mit Hilfe des freien 3'-OH Endes eines Primers, der an eine spezifische Sequenz der miRNA bindet, synthetisiert das Enzym Reverse Transkriptase die komplementäre DNA. Im nachfolgenden Pipettierschema in **Tabelle 7** ist die Herstellung der verschiedenen Ansätze beschrieben.

**Tabelle 7: Pipetierschema Umschreibung miRNA in cDNA**

Reagenzien	SYBR-Green	TaqMan
	miR-21-5p eine Reaktion	cel-miR-39 eine Reaktion
RNase freies Wasser	5,66 µl	5,91 µl
10x RT Buffer	1,5 µl	1,5 µl
MultiScribe RT enzyme (50 U/ µl)	1,0 µl	1,0 µl
RNase Inhibitor (20 U/ µl)	0,19 µl	0,19 µl
100 mM dNTP´s	0,15 µl	0,15 µl
3 pM RT-Primer (SYBR-Green)	1,5 µl	/
5x RT-Primer (TaqMan)	/	1,25 µl
RNA (20 ng/5 µl)	5,0 µl	5,0 µl
Gesamt	15 µl	15 µl

Um Pipettierfehler zu minimieren, wurden für die cDNA-Synthese der verschiedenen miRNA jeweils Ansätze für 48 Proben pipettiert und die Menge dementsprechend angeglichen. Die Umschreibung erfolgte im T3 Thermocycler. Der Programmablauf begann zunächst bei 16°C für 30 Minuten und die Umschreibung erfolgte bei 42°C für 45 Minuten. Anschließend wurde der Ansatz für 5 Minuten auf 85°C erhitzt, um die Reaktion durch Denaturierung der reversen Transkriptase zu stoppen.

### Quantitative Real-Time PCR

Nachdem aus cel-miR-39 und miR-21 eine komplementäre DNA synthetisiert wurde, kann diese cDNA als Template für die PCR verwendet werden. Die PCR-Reaktion basiert auf einem Zyklus aus drei Schritten mit unterschiedlichen Temperaturen – Denaturierung, Annealing und Elongation. In **Tabelle 8** ist das Pipetierschema der RT-PCR mit SYBR-Green und TaqMan dargestellt. In **Tabelle 9** ist der Ablauf der Reaktion dargestellt. Zunächst erfolgt die Vorbereitung bei 50°C über 2 Minuten, die Enzymaktivierung bei 95°C für 10 Minuten. Der folgende Denaturierungsschritt über 15 Sekunden bei 95°C dient dem Trennen der DNA-Stränge durch das Aufbrechen der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den DNA-Strängen. Es folgt der Annealing/Elongations-Schritt in einem Schritt, da die miRNA-DNA-Stränge

verhältnismäßig sehr kurz sind. Im Annealingschritt werden die Primer, bei 60°C, für 60 Sekunden für SYBR Green (bei miR-21) und für 30 Sekunden für TaqMan (bei cel-miR-39), an ihre komplementäre Sequenz auf den getrennten Einzelsträngen der DNA gebunden und hybridisieren.

Im Elongationsschritt, im gleichen Schritt bei gleicher Temperatur und gleichen Zeiten wie oben angegeben, setzt die Polymerase an die Primer an und verlängert diese mit den freien Nukleotiden zu einem Doppelstrang. Es kommt zur Verdopplung der vorhandenen Template-DNA.

Da nur die Abschnitte zwischen den Primern amplifiziert werden, ist die Primerwahl entscheidend für das Ergebnis. Im Verlauf werden 45 der dreiphasigen Zyklen durchlaufen und es kommt zu einer exponentiellen Vermehrung der Ausgangs-DNA. Das Produkt der klassischen PCR kann erst nach Ablauf quantifiziert werden. Mit der Methode der qRT-PCR kann die Produktmenge schon im Verlauf der PCR quantifiziert werden.

Vor Beginn der qRT-PCR wird mit dem Mastermix für die Quantifizierung der miR-21 auch ein interkalierendes Fluorchrom, hier SyBR®Green 1 (bei miR-21), zugegeben. SyBR®Green 1 lagert sich als interkalierendes Fluorchrom in die doppelsträngige DNA ein. Nach jedem Zyklus findet eine spezifische Fluoreszenz-Messung statt. Die Intensität der Fluoreszenz nimmt proportional zur steigenden Anzahl der Polymerase Endprodukte zu. SyBR®Green 1 weist eine sehr hohe Sensitivität auf, aber nur eine geringe Spezifität. Die sehr geringe Spezifität kann durch eine Schmelzkurvenanalyse ausgeglichen werden, die im Anschluss durchgeführt wird. Hierbei wird bei SyBR®Green 1 die DNA schrittweise um 0,5°C für je 5 Sekunden von 65°C bis 95°C aufgeschmolzen. Das interkalierende Fluorchrom SyBR®Green 1 wird freigesetzt und eine Änderung der Fluoreszenz gemessen. Spezifische Primerprodukte besitzen einen höheren Schmelzpunkt als unspezifische, wodurch anhand von primerspezifischen Schmelzkurvenpeaks eine spezifische Analyse erfolgen kann.

TaqMan-Sonden (bei cel-miR-39) sind Hydrolyse Sonden mit einem *Quencher* an einem Ende und einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff am anderen Ende. Wenn die



Taq-Polymerase die Sonde während der Synthese des Gegenstranges am 5'-Ende abbaut, entfernen sich dadurch Quencher und Fluorophor voneinander. Eine erhöhte Fluoreszenz ist am Ende der Elongation des Zyklus messbar. TaqMan weist eine sehr hohe Spezifität auf.

Eine Blau-Licht emittierende Diode (FAM 495 nm / SYBR Green 494 nm) regt den Fluoreszenzfarbstoff spezifisch an. Von dem angeregten Zustand geht das Atom wieder in einen energieärmeren Zustand über und sendet hierbei Emissionsstrahlen aus. Diese werden von einer Silikon Photodiode mit einem spezifischen Wellenlängenfilter (FAM 520 nm / SYBR Green 510 nm) gemessen. Die gemessene emittierte Fluoreszenz entspricht der zu diesem Zeitpunkt amplifizierten Probenmenge. Die Quantifizierungsmessungen werden nur in der exponentiellen Phase erhoben. In **Tabelle 8** sind die Pipettierschema zur RT-PCR für cel-miR-39/miR-21 dargestellt.

**Tabelle 8: Pipettierschema RT-PCR Sybr-Green / TaqMan.**

<b>Reagenzien</b>	<b>SYBR-Green Eine Reaktion</b>	<b>TaqMan Eine Reaktion</b>
Power SYBR® Green PCR Master	12,5 µl	/
TaqMan Universal Master Mix II	/	10,0 µl
10 pM RNU6b Primer	1,0 µl	/
Primer + Sonde (TaqMan)	/	0,75 µl
Nuklease-freie Wasser	6,5 µl	4,25 µl
cDNA	5,0 µl	5,0 µl
<b>Gesamt</b>	<b>25 µl</b>	<b>20 µl</b>

**Tabelle 9: Ablauf der qRT-PCR.**

Schritt	Temperatur	Zeit SYBR-Green	Zeit TaqMan
Vorbereitung	50°C	2 min	2 min
Enzymaktivierung	95°C	10 min	10 min
Denaturierung	95°C	15 sek	15 sek
Annealing/Elongation	60°C	60 sek	30 sek
Signaldetektion			
Denaturierung	95°C	10 sek	/
Schmelzkurve 65°C bis 95°C, schrittweise 0,5°C für 5 sek			/
Kühlung	20°C	unendlich	unendlich

} 45 Zyklen

### Statistische Auswertung

Die Datensammlung erfolgte in einer „Microsoft Excel-Tabelle“. Die Auswertung wurde mit Prism 6.0 bis 8.0 (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA) durchgeführt. Gepaarte und ungepaarte Proben mit Normalverteilung wurden mit dem t-Test analysiert. Nicht normalverteilte Gruppen wurden mit dem *Mann-Whitney*- und *Wilcoxon*-Test analysiert. Die Multivarianzanalyse ANOVA wurde angewendet, um Unterschiede zwischen mehreren korrespondierenden Gruppen über die Zeit zu analysieren. Für alle Tests wurde der p-Wert < 0,05 als statistisch signifikant angenommen.

Alle Ergebnisse sind als „Boxplot“ oder „Scattered Plot“ welcher die 25%-, 50%-(Median) und 75%-Perzentile repräsentiert, dargestellt. Die Überlebenszeitanalyse wurde mithilfe von Überlebenskurven nach Kaplan-Meier erstellt. Für die Analyse wurde der nicht parametrische Log-Rank Test (*Mantel-Cox* Test) genutzt.

## 4 Ergebnisse

In den nächsten Abschnitten ist zunächst die Charakterisierung der Studienkohorte dargestellt. Der Vergleich der miR-21-Konzentration der Studiengruppe und der Kontrollgruppe stellt den Ausgangspunkt der Studie dar. Es wird untersucht, ob anhand von bestimmten laborchemischen Parametern, Therapiemodalitäten, Tumorlokalisationen und anderen klinischen Daten miR-21-Konzentrationsunterschiede erklärt werden können. Nachfolgend erfolgt die Subgruppenzuordnung. Im letzten Abschnitt erfolgt die Analyse der Überlebenszeit.

### Charakterisierung der Studienkohorte

In der Arbeit wurde eine tumorfreie Kontrollgruppe mit Patienten mit mKRK verglichen. Die Kontrollgruppe besteht aus 20 Patienten (12 männlich, 8 weiblich) ohne Leberzirrhose und ohne KRK. Die Laborparameter Bilirubin, Alanin-Aminotransferase (ALAT), Aspartat-Amino-Transferase (ASAT), Gamma-Glutaryltransferase (gGT), Alkalische Phosphatase (AP) und Creatinin waren annähernd normwertig.

Bei dem untersuchten Patientenkollektiv mit mKRK handelt es sich überwiegend um Patienten mit Lebermetastasen. Insgesamt wurden 82 Metastasen bei 52 Patienten behandelt. In **Tabelle 10** ist die Charakterisierung der Studienkohorte dargestellt. Davon zeigten sich 68,3% in der Leber, 23,2% in der Lunge und 8,5% in sonstigen Organen. Die häufigste Therapiemodalität stellte die Brachytherapie (84,1%) dar, gefolgt von der Radiofrequenzablation (13,4%) und der Mikrowellenablation (2,4%). 46,2% der Patienten erhielten eine Therapie, 36,5% zwei, 7,7% drei und 9,6% erhielten vier Therapien innerhalb der Studie.

Der Primärtumor befand sich bei 13 Patienten im Kolon (weiter unterteilt in *Colon ascendens*, *Colons transversum* und *Colon descendes*), bei 18 Patienten im Sigma, bei 3 Patienten im Zökum und bei 18 Patienten im Rektum. Das Durchschnittsalter betrug 67,9 Jahre ( $\pm 10,8$  Jahre).

**Tabelle 10: Charakterisierung der Patienten mit mKRK**

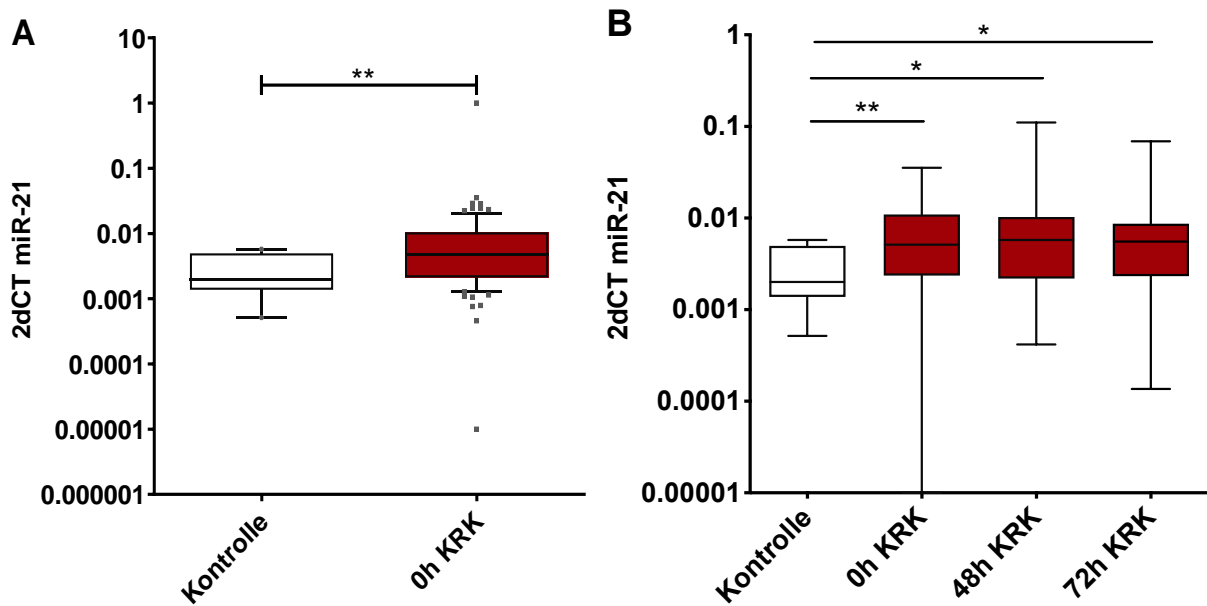
<b>Alter</b>	<b>Anzahl n = 52</b>
40 – 60	11 (21,2%)
61 – 70	19 (36,5%)
71 – 80	15 (28,8%)
> 80	7 (13,5%)
<b>Geschlecht</b>	
Weiblich	23 (44,2%)
Männlich	29 (55,8%)
<b>Lokalisation Primum</b>	
<i>Colon ascendens</i>	7 (13,5%)
<i>Colon transversum</i>	2 (3,8%)
<i>Colon descendens</i>	3 (5,8%)
Sigma	18 (34,6%)
Zökum	3 (5,8%)
Rektum	18 (34,6%)
Rektum + Sigma	1 (1,9%)
<b>Therapien innerhalb der Studie</b>	n gesamt = 82
Radiofrequenzablation	11 (13,4%)
Brachytherapie	69 (84,1%)
Mikrowellenablation	2 (2,4%)
<b>Lokalisation der Metastasen</b>	n gesamt = 82
Leber	56 (68,3%)
Lunge	19 (23,2%)
Sonstiges	7 (8,5%)
<b>Metastasendurchmesser</b>	n gesamt = 82
40 mm	55 (67,1%)
41 - 80 mm	17 (20,7%)
81 - 120 mm	7 (8,5%)
> 120 mm	3 (3,7%)
<b>KRAS Mutationsstatus</b>	
Mutation (MUT)	10 (19,2%)
Wildtyp (WT)	23 (44,2%)
Ohne Angaben	19 (36,5%)
<b>Chemotherapieanzahl vor Studieneinschluss</b>	
0	10 (19,2%)
1	14 (26,9%)
2	18 (34,6%)
3	7 (13,5%)
4	1 (1,9%)
5	2 (3,8%)
<b>Therapieanzahl innerhalb der Studie</b>	
1	24 (46,2%)
2	19 (36,5%)
3	4 (7,7%)
4	5 (9,6%)

**Legende:** Charakterisierung der Patienten mit mKRK, n=52 (entspricht Anzahl der Patienten), n gesamt=82 (entspricht der Anzahl der behandelten Metastasen innerhalb der Studie)

Zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses zeigten sich 67% der Metastasen kleiner oder gleich 40 mm, 20,7% zwischen 41 - 80 mm, 8,5% zwischen 81 - 120 mm und lediglich 3,7% waren größer als 120 mm. Zum Zeitpunkt der letzten Datenerhebung innerhalb der Studie waren 38 von den insgesamt 52 Patienten verstorben. Der letzte Patientenkontakt ist nicht als klares Datum definiert, entspricht zum Teil dem Datum der letzten Intervention, zum Teil eines poststationären Kontrolltermines. Jedoch fand er nicht später als 2 Jahre nach dem Therapieeinschluss statt. Zum Teil sind die Patienten mit mehreren Therapiesitzungen in der Studie wiederzufinden, da verschiedene oder im Verlauf neu aufgetretene Metastasen zu unterschiedlichen Zeitpunkten therapiert wurden. Hier geht es bei der Analyse vor allem darum, den jeweiligen Therapiezeitpunkt mit den Auswirkungen auf die miR-21 zu auswerten. So kommt es zu dazu, dass in den Subgruppenanalysen  $n=58$  grösser ist als in der Gesamtanalyse  $n=52$ . In den Subgruppenanalysen wurden die einzelnen/verschiedenen Therapiesitzungen analysiert, in der Gesamtanalyse nur die jeweils erste Therapiesitzung.

### **Analyse der Studienkohorte mit einer Kontrollgruppe**

Ausgangspunkt der Studie ist der Vergleich der Studienkohorte von Patienten mit KRK mit der Kohorte von Patienten ohne KRK (Kontrollkohorte). Dabei zeigte sich eine signifikant erhöhte miR-21 Konzentration ( $p < 0,01$ ) in der KRK-Kohorte gegenüber der Kontrollgruppe (**Abbildung 5A**). In **Abbildung 5B** wird die miR-21 Konzentration der Kontrollgruppe und die miR-21 Konzentration der Interventionsgruppe im zeitlichen Ablauf dargestellt. Es zeigte sich eine signifikant erhöhte miR-21 Konzentration in der Interventionsgruppe zu dem Zeitpunkt 0 h ( $p < 0,01$ ) sowie 48 h und 72 h ( $p < 0,05$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe.



**Abbildung 5: miR-21 Konzentration im Serum in KRK im Vergleich zur Kontrollgruppe und im zeitlichen Verlauf.**

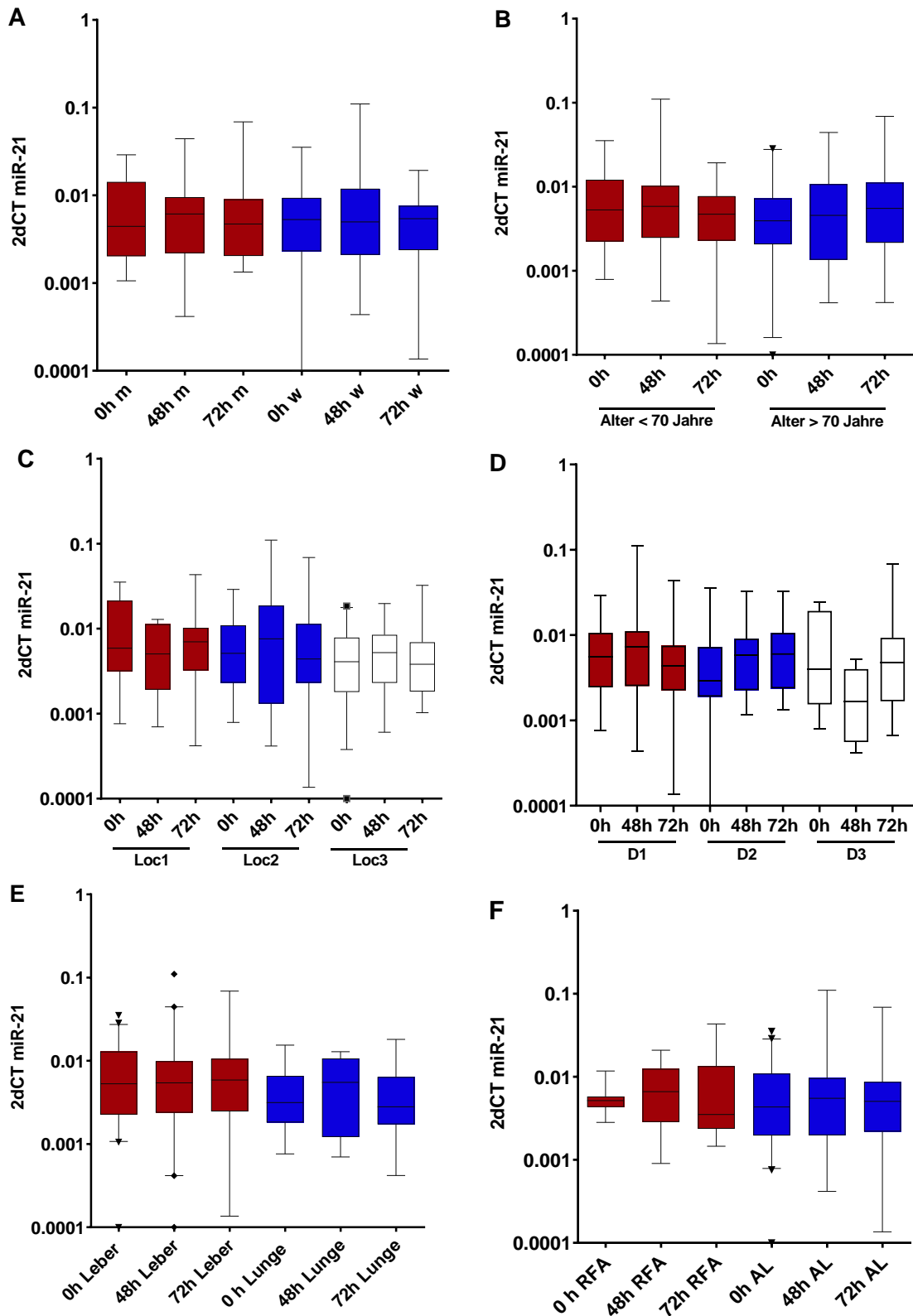
(A) miR-21 Konzentration in der Kontrollgruppe (n=20) und in KRK (n=58) zum Ausgangszeitpunkt vor der Intervention. Statistische Analyse mit dem *Mann-Whitney* Test. \*\* p<0,01

(B) Konzentration von miR-21 in der KRK-Kohorte (n=58) im zeitlichen Verlauf der Intervention. 0h = vor der Intervention. 48h und 72h nach der Intervention. Die Analyse erfolgte mittels *Kruskal-Wallis* Test mit *Dunns multiple comparison post* Test. \*p<0,05, \*\*p<0,01

Das relative miR-21 Level ist normalisiert auf cel-miR-39 mittels  $2^{\text{dCT}}$ -Methode.

## Gruppenanalysen von miR-21 und klinischen sowie laborchemischen Parametern

Aufbauend auf der Grundaussage, dass in der an KRK erkrankten Interventionsgruppe signifikant ( $p < 0,01$ ) höhere Konzentrationen an miR-21 zu finden waren, wurde im Folgenden nach Korrelationen zu anderen Bioparametern des Patientenkollektivs gesucht. Dabei erfolgte die Einteilung der Patienten in Subgruppen anhand verschiedener klinischer und laborchemischer Parameter. Für die Auswertung wurde die miR-21 Konzentration in Abhängigkeit des Geschlechts, Alters < 70 Jahre/ > 70 Jahre, Lokalisation des Primums (Loc 1 – Loc 3), der Metastasengröße (D1 – D3), der Metastasenlokalisierung (Lunge / Leber) sowie der Behandlungsmodalität verglichen. Anhand der erhobenen Daten und Subgruppeneinteilung konnte keine signifikant erhöhte Konzentration von miR-21 nachgewiesen werden (**Abbildung 6 A-F**).



**Abbildung 6: miR-21 Konzentration in Abhängigkeit des Geschlechts, KRAS-Mutationsstatus, Lokalisation des Primums, Metastasengröße, Metastasenlokalisation & Behandlungsmodalität**

#### **Fortsetzung Legende zur Abbildung 6:**

**(A)** miR-21 Konzentration in Abhängigkeit vom Geschlecht (w=weiblich, m=männlich) und Zeitpunkt. Männlich 0h & 72h n=37; 48h n=29; Weiblich 0h & 72h n=31; 48h n=29; p=0,9961.

**(B)** miR-21 Vergleich zwischen Alter <70 Jahren & > 70 Jahren. Alter < 70 Jahre 0h & 72h n=45; 48h n=38; Alter > 70 Jahre 0h & 72h n=23; 48h n=20; p = 0,08075.

**(C)** Konzentration von miR-21 in Abhängigkeit der Lokalisation *Primum*: 0h & 72h loc=1: n=12; 48 loc=1: n=11; 0h & 72h loc=2: n=30; 48 loc=2: n=25; 0h&72h loc=3: n=26, 48h loc=3: n=22; Loc=1: *Zoecum & Colon ascendens & Colon transversum*; Loc=2: *Colon descendens & Sigma*; Loc=3: *Rektum*; p=0,9779

**(D)** Konzentration von miR-21 in Abhängigkeit der Metastasengröße, D1: Durchmesser unter 40mm; D2: Durchmesser 41-80mm, D3: Durchmesser über 80mm; D1 0h & 72h n=44; D1 48h n= 39; D2 0h & 72h n=15; D2 48h n= 13, D3 0h & 72h n=9; D3 48h n= 6; p=0,3338

**(E)** Konzentration von miR-21 in Abhängigkeit der Metastasenlokalisierung (Leber/Lunge): Leber 0h n=45; 48h n=40; 72h n=47; Lunge 0h n=17; 48h n=12; 72h n=15; Test p=0,2552

**(F)** miR-21 Konzentration von miR-21 in Abhängigkeit der Therapiemodalität (RFA/AL); RFA 0h & 48h: n=8; 72h: n=9; AL 0h&72h: n=58; 48h: n=49; p=0,9779

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem "One-Way ANOVA", non-parametrisch, nicht gepaart (*Kruskal-Wallis test & Dunn's multiple comparison test*).

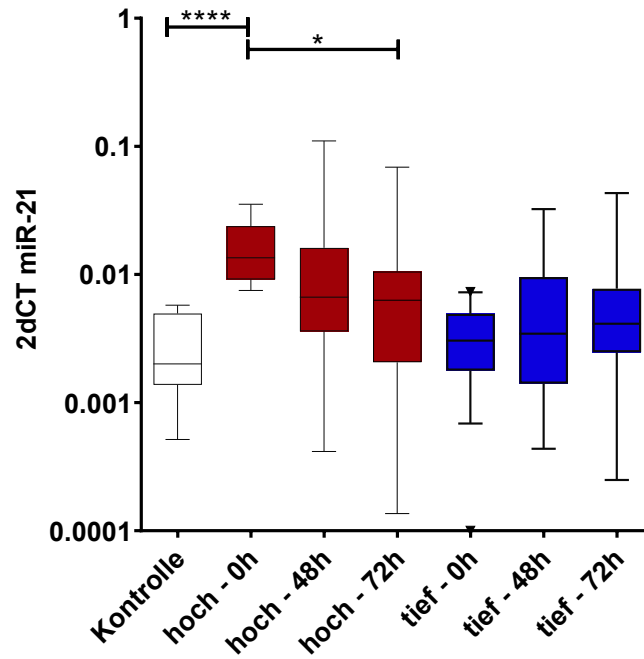
Das relative miR-21 Level wurde auf cel-miR-39 mittels  $2^{\text{dCT}}$ -Methode normalisiert.

### **Vergleich der Patienten mit initial höheren und niedrigeren miR-21 Konzentrationen**

Zum initialen Blutentnahmezeitpunkt einer Therapiesitzung ließen sich die Patienten mit hohen und niedrigeren miR-21 Konzentrationen einteilen. Nachfolgend "initial hochregulierte Gruppe" und "initial tiefregulierte Gruppe" betitelt. Die Einteilung erfolgte anhand des Mittelwertes von delta CT miR-21 zum Blutentnahmezeitpunkt 0 h.

In **Abbildung 7** sind die beiden Subgruppen mit der Kontrollgruppe dargestellt. Es zeigt sich ein signifikanter ( $p < 0,0001$ ) Unterschied zwischen der miR-21 Konzentration der Kontrollgruppe und der initial hochregulierten Gruppe zum Blutentnahme-Zeitpunkt 0 h. Ebenfalls zeigte sich ein signifikanter Unterschied der miR-21 Konzentration der initial erhöhten 0 h und initial erhöhten 72 h ( $p < 0,05$ ).





**Abbildung 7: miR-21 Konzentration im zeitlichen Verlauf anhand der Subgruppeneinteilung in initial hochregulierte und tiefregulierte Gruppen.**

Kontrolle n=20; hochregulierte Subgruppe n=21; tiefregulierte Subgruppe n=37; Die Analyse erfolgte mittels *Kruskal-Wallis* Test & *Dunn's multiple comparison* Test, \*p<0,05 und \*\*\*\*p<0,0001.

Relative miR-21 Level ist normalisiert auf cel-miR-39 mittels  $2^{\text{dCT}}$ -Methode.

In **Tabelle 11** werden die initial hochregulierte und initial tiefregulierte Subgruppen anhand des Alters, Geschlechts, Lokalisation des Primums, KRAS-Mutationsstatus, Chemotherapieanzahl, Metastasengröße, Lokalisation der Metastasen sowie Interventionsmethode charakterisiert.

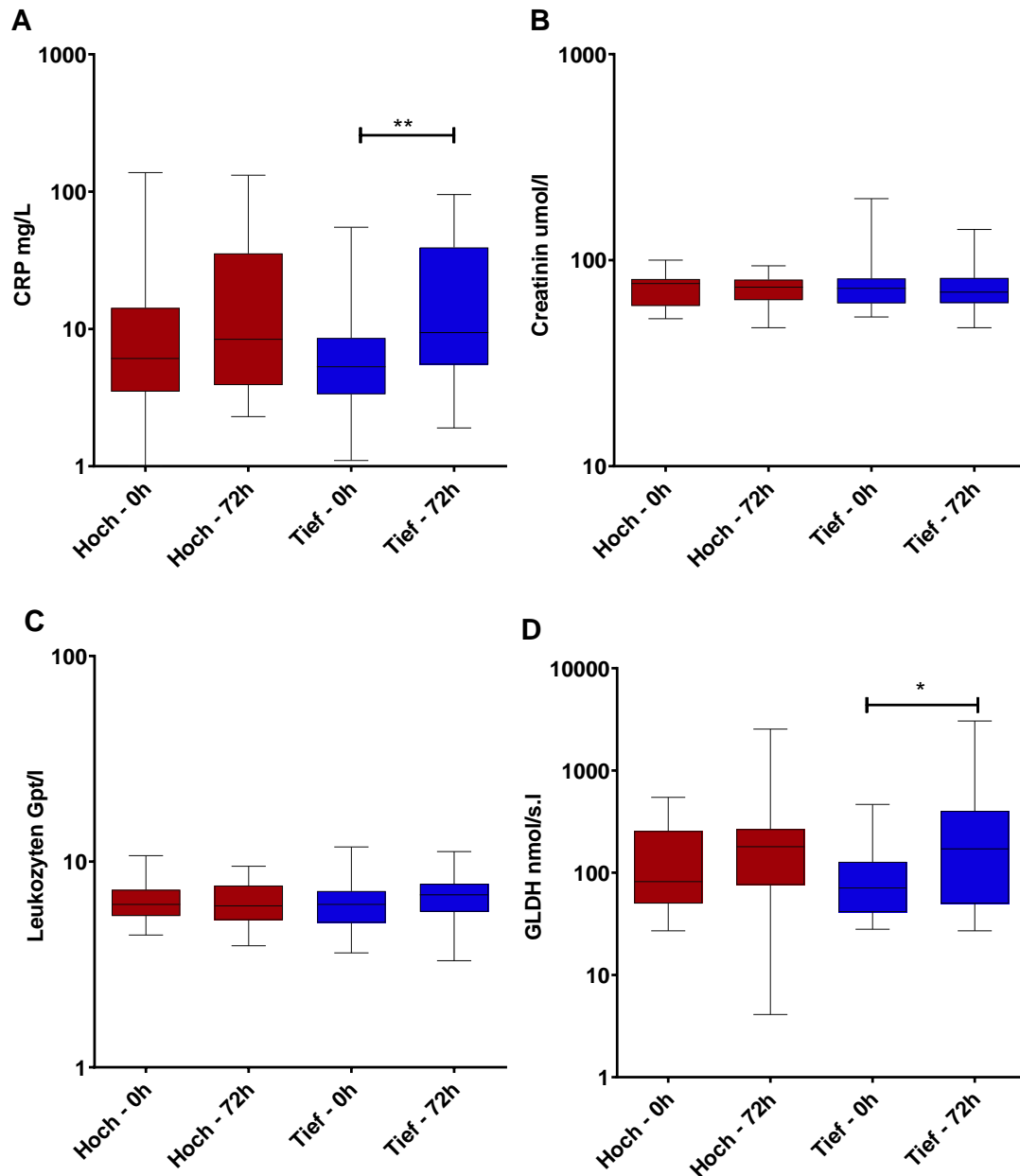
**Tabelle 11: Charakterisierung von Patienten nach initialem miR-21 Status**

	<b>Hohe miR-21 Konzentration</b>	<b>Niedrige miR-21 Konzentration</b>
<b>Gesamt</b>	n = 21	n = 37
<b>Alter</b>		
40 - 60	6 (28,6%)	6 (16,2%)
61 - 70	10 (47,6%)	15 (40,5%)
71 - 80	3 (14,3%)	12 (32,4%)
> 80	2 (9,5%)	4 (10,8%)
<b>Geschlecht</b>		
Weiblich	10 (47,6%)	19 (51,4%)
Männlich	11 (52,4%)	18 (48,6%)
<b>Lokalisation Primum</b>		
<i>Colon ascendens</i>	2 (9,5%)	3 (8,1%)
<i>Colon transversum</i>	1 (4,8%)	2 (5,4%)
<i>Colon descendens</i>	2 (9,5%)	1 (2,7%)
Sigma	9 (42,9%)	12 (32,4%)
Zökum	2 (9,5%)	2 (5,4%)
Rektum	5 (23,8%)	16 (43,2%)
Rektum + Sigma	0	1 (2,7%)
<b>KRAS</b>		
Mutation	3 (14,3%)	8 (21,6%)
Wildtyp	12 (57,1%)	16 (43,2%)
Ohne Angaben	6 (28,6%)	13 (35,1%)
<b>Chemotherapieanzahl</b>		
1	8 (38,1%)	13 (35,1%)
2	8 (38,1%)	16 (43,2%)
3	5 (23,8%)	3 (8,1%)
4	0	4 (10,8%)
5	0	1 (2,7%)
<b>Metastasengröße</b>		
< = 40mm	17 (81%)	22 (59,5%)
41 - 80mm	2 (9,5%)	11 (29,7%)
81 - 120mm	1 (4,8%)	4 (10,8%)
> 120mm	1 (4,8%)	0
<b>Therapie</b>		
Radiofrequenzablation	1 (4,8%)	6 (16,2%)
Brachytherapie	19 (90,5%)	30 (81,0%)
Mikrowellenablation	1 (4,8%)	1 (2,7%)
<b>Lokalisation</b>		
Leber	15 (71,4%)	23 (62,1%)
Lunge	3 (14,2%)	11 (29,7%)
Sonstige	3 (14,2%)	3 (8,1%)

**Legende:** n = Therapiesitzungen innerhalb der Studie, anhand derer die Einteilung erfolgte.  
Chi Square p < 0,0001

Im folgenden Abschnitt wird auf diese Subgruppenzuordnung weiter eingegangen und versucht, anhand von Blutparametern und klinischen Daten eine Erklärung zu finden, weshalb die miR-21 erhöht oder verringert ist.

In **Abbildung 8** sind exemplarisch ausgewählte Blutparameter dargestellt. In **Abbildung 8A** zeigt sich in der initial tiefregulierten Subgruppe ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,01$ ) in der C-reaktives Protein (CRP) Konzentration vor und nach der Intervention. In **Abbildung 8B** ist die Creatinin Konzentration im Serum und in **Abbildung 8C** die Leukozyten dargestellt, hier finden sich keine Unterschiede im Vergleich der Subgruppen. In **Abbildung 8D** wird die *Glutamat-Dehydrogenase* (GLDH) Konzentration mmol/l als Korrelationsparameter herangezogen. Hier zeigt sich in der tiefregulierten Subgruppe ein signifikanter ( $p < 0,01$ ) Unterschied in der GLDH Konzentration vor und nach Intervention.



**Abbildung 8: miR-21 Konzentration der initial hochregulierten und tiefregulierten Gruppen im Vergleich anhand verschiedener Blutparameter**

**(A)** Konzentration miR-21 der initial hochregulierten und tiefregulierten Gruppen im Vergleich mit CRP: hoch - 0h & 72h n=21; tief - 0h n=37; tief - 72h n=35 \*\*p<0,01;

**(B)** Konzentration miR-21 der initial hochregulierten und tiefregulierten Gruppen im Vergleich mit Creatinin hoch - 0h & 72h n=21; tief - 0h n=36; tief - 72h n=35

**(C)** Konzentration miR-21 der initial hochregulierten und tiefregulierten Gruppen im Vergleich mit Leukozyten: hoch - 0h & -72h n=21; tief - 0h n=37; tief -72h n=34

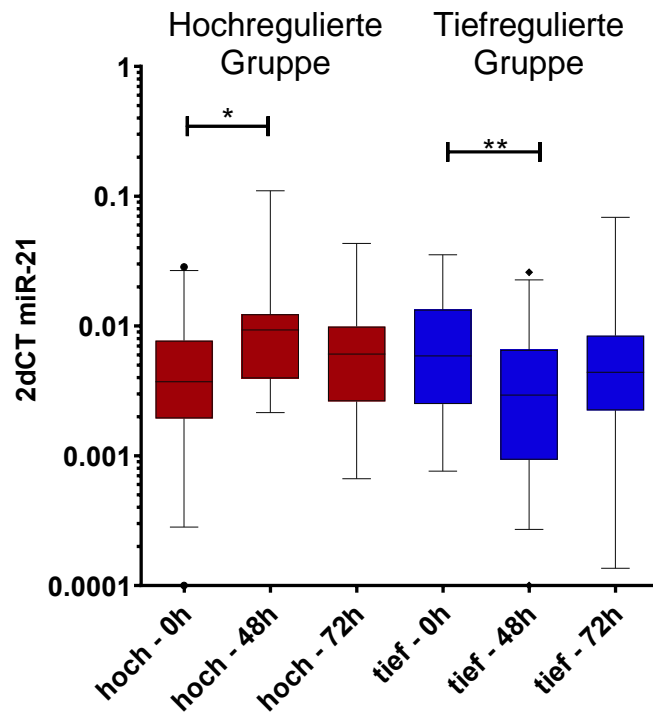
**(D)** Konzentration miR-21 der initial hochregulierten und tiefregulierten Gruppen im Vergleich mit GLDH: hoch - 0h & 72h n=21; tief - 0h n=36; tief -72h n=35 \*p<0,05

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem "One-Way ANOVA", non-parametrisch, nicht gepaart (*Kruskal-Wallis test* & *Dunn's multiple comparison test*). Relative miR-21 Level ist normalisiert auf cel-miR-39 mittels  $2^{\text{dCT}}$ -Methode

## Sekundär hochregulierte und tiefregulierte miR-21 Gruppen

In vorherigen Studien wurde berichtet, dass miR-21 eine prognostische bzw. prädiktiven Bedeutung besitzt, deshalb fokussierten wir uns im nächsten Schritt auf die dynamischen Veränderungen der miR-21 nach lokalablativen Therapie. Ob Patienten mit postinterventionell höheren bzw. niedrigeren Konzentration eine bessere oder schlechtere Prognose haben, bedingt theoretisch durch höhere Gewebszerstörung, wurde bisher nicht untersucht. Basierend auf der Dynamik der Veränderungen nach 48h wurden die Patienten in 2 Gruppen aufgeteilt. Wie in **Abbildung 9** dargestellt, zeigt sich ein signifikanter Unterschied der hochregulierten Gruppe zum Zeitpunkt 0 h & 48 h ( $p < 0,05$ ), sowie in der tiefregulierten Gruppe zum Zeitpunkt 0 h & 48 h ( $p < 0,01$ ). Im Weiteren erfolgte eine Subgruppenbildung anhand der miR-21-Konzentration. Ausschlaggebend für die Zuordnung war die miR-21-Konzentration zum Zeitpunkt 48 h im Vergleich zu dem Zeitpunkt 0 h. Die Interventionsgruppe konnte so in eine „sekundär hochregulierte Gruppe“ und eine „tiefregulierte Gruppe“ unterteilt werden.

War die miR-21-Konzentration zu dem Zeitpunkt 48 h höher als zum Zeitpunkt 0 h, wurde das SET des Patienten der Subgruppe „sekundär hochregulierte Gruppe“ zugeordnet. Ein SET entspricht den 3 Blutabnahmen (Zeitpunkt 0h, 48h und 72h) eines Patienten im Rahmen der Therapie. War die miR-21-Konzentration zum Zeitpunkt 48 h niedriger als zum Zeitpunkt 0 h, wurde das SET des Patienten der Subgruppe „tiefregulierte Gruppe“ zugeordnet.



**Abbildung 9: MiR-21 Konzentration im zeitlichen Verlauf anhand der Subgruppeneinteilung in sekundär hochregulierte und tiefregulierte Gruppe.**

Hochregulierte Gruppe n=26, tiefregulierte Gruppe n=32; Die Analyse erfolgte mittels *Kruskal-Wallis Test & Dunn's multiple comparison Test*, \*p<0,05; \*\*p<0,01.

Relative Level von miR-21 normalisiert zur cel-miR-39 mit 2dCT-Methode.

In **Tabelle 12** werden die sekundär hochregulierten und sekundär tiefregulierten Subgruppen anhand des Alters, Geschlechts, Lokalisation des Primums, KRAS-Mutationsstatus, Chemotherapieanzahl, Metastasengröße, Lokalisation der Metastasen sowie Interventionsmethode charakterisiert.

**Tabelle 12: Charakterisierung von Patienten nach sekundärem miR-21 Status**

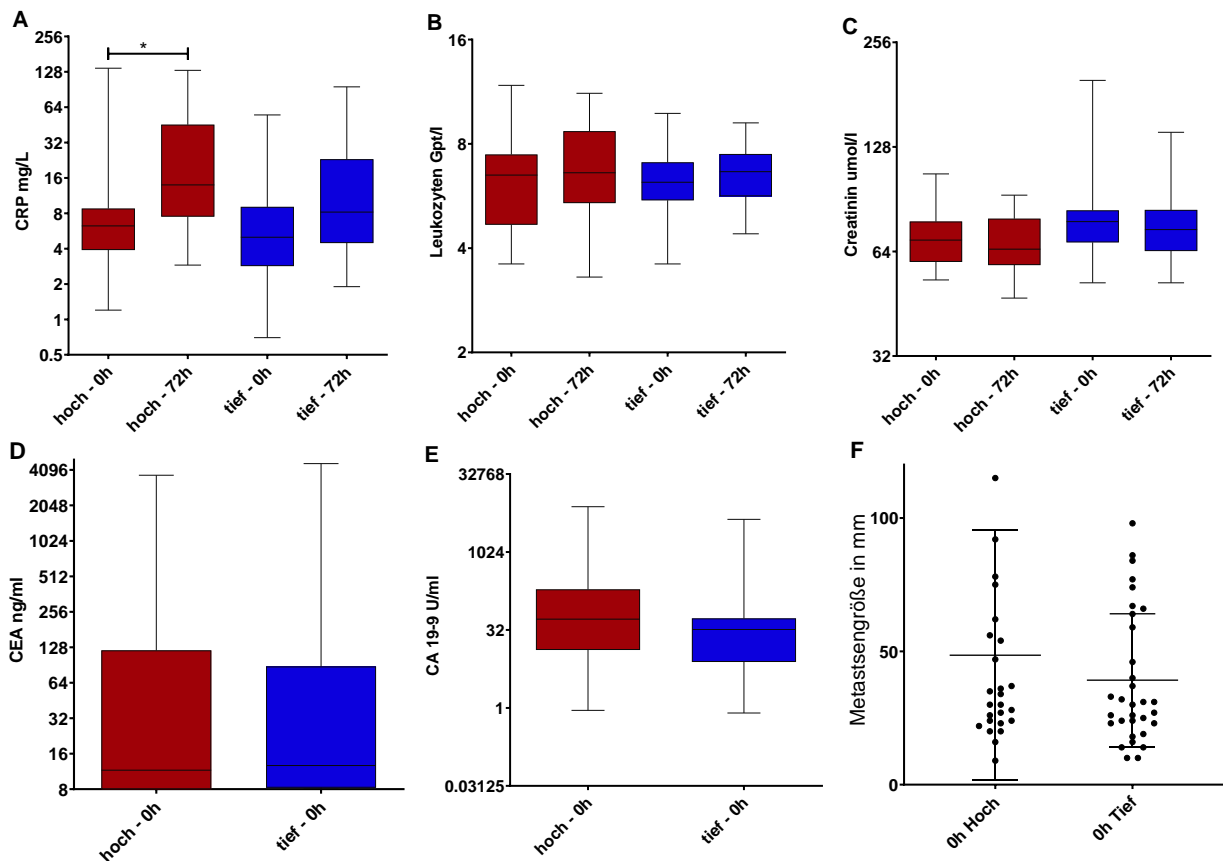
	<b>Sekundär hochregulierte Gruppe</b>	<b>Sekundär tiefregulierte Gruppe</b>
<b>Gesamt</b>	n = 26	n = 32
<b>Alter</b>		
40 - 60	7 (26,9%)	6 (18,8%)
61 - 70	7 (26,9%)	18 (56,3%)
71 - 80	11(42,3%)	5 (15,6%)
> 80	1 (3,8%)	3 (9,4%)
<b>Geschlecht</b>		
Weiblich	10 (38,5%)	19 (59,4%)
Männlich	16 (61,5%)	13 (40,6%)
<b>Lokalisation Primum</b>		
Colon ascendens	2 (7,7%)	3 (9,4%)
Colon transversum	1 (3,8%)	1 (3,1%)
Colon descendens	1 (3,8%)	3 (9,4%)
Sigma	8 (30,8%)	13 (40,6%)
Zökum	2 (7,7%)	2 (6,3%)
Rektum	11 (42,3%)	10 (31,3%)
Rektum + Sigma	1 (3,8%)	0
<b>KRAS</b>		
Mutation	5 (19,2%)	6 (18,8%)
Wildtyp	12 (46,2%)	16 (50%)
Ohne Angaben	9 (34,6%)	10 (31,3%)
<b>Chemotherapieanzahl</b>		
1	9 (34,6%)	12 (37,5%)
2	9 (34,6%)	16 (50%)
3	3 (11,5%)	4 (12,5%)
4	4 (15,4%)	0
5	1 (3,8%)	0
<b>Metastasengröße</b>		
< = 40 mm	17 (65,4%)	22 (68,8%)
41 – 80 mm	6 (23,1%)	7 (21,9%)
81 – 120 mm	2 (7,7%)	3 (9,4%)
> 120 mm	1 (3,8%)	0
<b>Therapien</b>		
Radiofrequenzablation	2 (7,7%)	5 (15,6%)
Brachytherapie	23 (88,5%)	26 (81,3%)
Mikrowellenablation	1 (3,8%)	1 (3,1%)

<b>Lokalisation</b>		
Leber	17 (65,4%)	21 (65,6%)
Lunge	8 (30,8%)	6 (18,7%)
Sonstige	1 (3,8%)	5 (15,6%)

**Legende:** n = Anzahl der Therapiesitzungen innerhalb der Studie, anhand derer die Einteilung erfolgte. Chi Square  $p=0,67$  (ns).

Um im Weiteren eine Erklärung für die miR-21 Dynamik und assoziierten Faktoren zu untersuchen, wurden, wie in **Abbildung 10A-F** für die Subgruppen exemplarisch dargestellt, ausgewählte Labor- sowie klinischen Parametern verglichen. Es zeigt sich eine signifikant ( $p<0,05$ ) erhöhte postinterventionelle CRP-Konzentration in der miR-21 hochregulierten Gruppe welche eine stärkere Gewebeschädigung suggeriert. Es konnte keine signifikanten Veränderungen für Leukozytenanzahl (**Abbildung 10B**), Creatininkonzentration (**Abbildung 10C**), CEA (**Abbildung 10D**), Ca19-9 (**Abbildung 10E**), oder Metastasengröße (**Abbildung 10F**) dargestellt werden.





**Abbildung 10: miR-21 Konzentration der sekundär hochregulierten und tiefregulierten Gruppen im Vergleich anhand verschiedener Blutparameter und klinischer Daten**

(A) Konzentration miR-21 Level von sekundär tief- und hochregulierten Gruppen im Vergleich mit CRP, hochregulierte Gruppe 0h, n= 26, 72h n=24, tiefregulierte Gruppe 0h&72h, n=32, \*p=<0,05;

(B): Konzentration miR-21 Level von sekundär tief- und hochregulierten Gruppen im Vergleich mit Leukozyten, n-hoch (0h)=26; n-hoch (72h)=23; n-tief=32, p=0,8143;

(C) Konzentration miR-21 Level von sekundär tief- und hochregulierten Gruppen im Vergleich mit Creatinin, hochregulierte Gruppe 0h n= 26, 72h n=24, tiefregulierte Gruppe 0h n= 31, 72h n=32, p=0,0687;

Die statistische Auswertung (A-C) erfolgte mit dem "One-Way ANOVA", nicht-parametrisch, nicht gepaart (*Kruskal-Wallis test & Dunn`s multiple comparison test*). Relative Level von miR-21 normalisiert zur cel-miR-39 mit 2<sup>d</sup>CT-Methode.

(D) Konzentration miR-21 Level von sekundär tief- und hochregulierten Gruppen im Vergleich mit CEA, hochregulierte Gruppe n=25, tiefregulierte Gruppe n=29, p=0,9076;

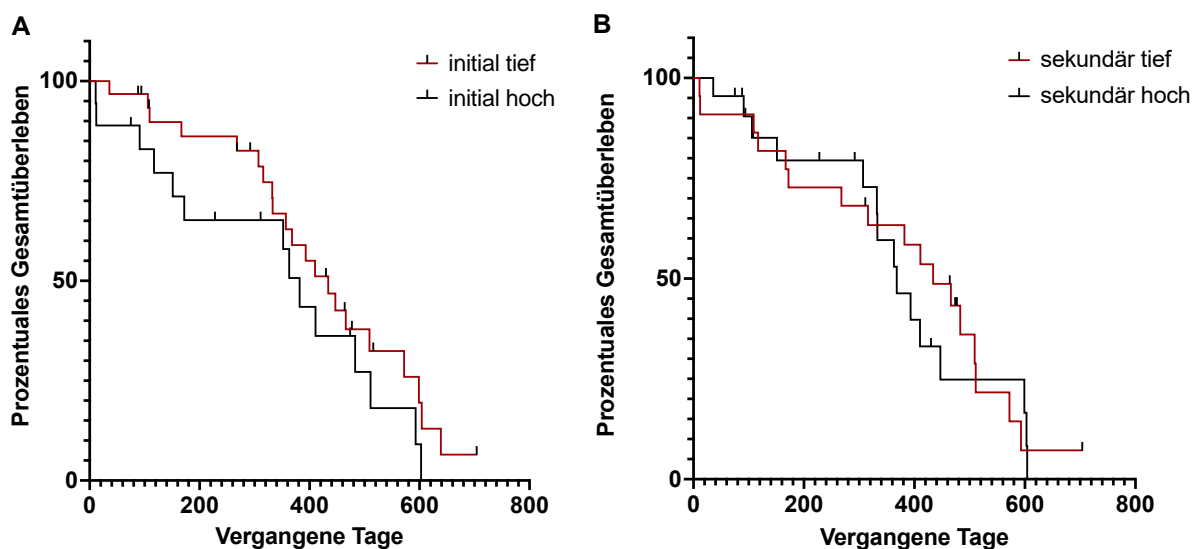
(E) Konzentration miR-21 Level von sekundär tief- und hochregulierten Gruppen im Vergleich mit CA19-9, hochregulierte Gruppe n=25, tiefregulierte Gruppe n=30, p=0,3234;

(F) Sekundär tief- und hochregulierten Gruppen im Vergleich mit der Metastasengröße, hochregulierte Gruppe = 26; tiefregulierte Gruppe n= 32, p=0,5734,

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem nicht-parametrischen "ungepaarten t test" (*Mann-Whitney Test*) Relative Level von miR-21 normalisiert zur cel-miR-39 mit 2<sup>d</sup>CT-Methode.

## Überlebenszeitanalyse der Patienten nach Therapieeinschluss

Als eine weitere wichtige Analyse untersuchten wir, ob miR-21 Dynamik mit KRK-Prognose assoziiert sein könnten. Die Überlebenszeitanalyse der Patienten erfolgte in den zuvor eingeteilten Subgruppen der initial tief-/hochregulierten miR-21-Subgruppe sowie der sekundär tief-/hochregulierten miR-21-Subgruppe (**Abbildung 11A/B**) hierbei wurden die Patienten jeweils nur zum Zeitpunkt der ersten Therapiesitzung in die Auswertung eingeschlossen. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in dem Gesamtüberleben.



**Abbildung 11: Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit der Gruppenzuordnung anhand der miRNA Level im Serum**

**(A)** Initial tief-/hochregulierte miR-21 Gruppe,  $p = 0,2009$ ; initial low  $n=32$ , initial high  $n=18$  (*Log-rank (Mantel-Cox) Test*)

**(B)** Sekundär tief-/hochregulierte miR-21 Gruppe,  $p = 0,7190$ ; sekundär low  $n = 22$ , sekundär high  $n = 22$  (*Log-rank (Mantel-Cox) Test*)

## **5 Diskussion**

In der vorliegenden Studie wurde die Dynamik und die Wertigkeit der zirkulierenden miRNA im Serum am Beispiel von miR-21 als Biomarker bei Patienten mit mKRK unter einer lokalablativen Therapie analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass erhöhte Serum-miR-21 Konzentrationen bei mKRK Patienten gegenüber einer gesunden Vergleichskohorte, reproduzierbar nachzuweisen sind. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die miR-21 Serumkonzentration um den Zeitpunkt einer lokalablativen Therapie herum einer gewissen Dynamik unterliegt die jedoch nicht mit der Ablation des Tumorgewebes korreliert. Der postinterventionelle Anstieg oder die Reduktion von miR-21 korrelierte zwar mit Anstieg von CRP was möglicherweise für erhöhte Gewebszerstörung spricht, hatte jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die Prognose von Patienten in diesem Erkrankungsstadium.

### **Studiendesign**

Die Bedeutung und der Zusammenhang zwischen miR-21 und der Entstehung, dem Verlauf und der Metastasierung des KRKs ist Gegenstand des intensiven Forschungsfeldes der miRNA. Es konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass die miR-21 Serumkonzentration mit der Zunahme der Tumorgröße, Proliferation, Invasion, sowie Metastasenbildung ansteigt [89]. Ebenso wurde gezeigt, dass die miR-21 Serumkonzentration in der Transition von gesundem Gewebe hin zum KRK schrittweise ansteigt [94]. Zwar liegen bereits einige Erkenntnisse vor, doch das vielversprechende Forschungsfeld ist noch nicht abgeschlossen. Insbesondere der Nutzen von miR-21 als Biomarker sollte weiter evaluiert werden [72], [87], [88].

Da miR-21 in der Literatur als eine der vielversprechendsten miRNA unter den miRNA-Biomarkern im Tumorverlauf des KRK angegeben wird [101], hat sich die vorliegende Arbeit mit der miR-21 Serumkonzentration in dieser modelhaften therapeutischen Anwendung befasst.

Der Zusammenhang zwischen der im Blut zirkulierenden miRNA und tumorgewebespezifischer miRNA ist nicht vollends geklärt. In zahlreichen Studien wurden allerdings

für bestimmte miRNA wiederholt gleichgerichtete Zusammenhänge zwischen der miRNA Konzentration aus Gewebeproben und aus Blutproben/ Serumproben beschrieben [102]–[104]. Insbesondere im Hinblick auf die miR-21 konnten mehrfach analoge Zusammenhänge zwischen der miR-21 Konzentration aus Gewebeproben und aus Serumproben festgestellt werden. Die im Blut zirkulierende miR-21 spiegelt die gewebespezifische miR-21 Konzentration in gewissem Ausmaß wider [105], [106]. Aufgrund der schnellen und einfachen Probengewinnung mittels venöser Punktion, sowie des stabilen Zustands der im Blut zirkulierenden miRNA, wurde in dieser Arbeit Serum zur Analyse verwendet [107], [108]. Da die zellulären Bestandteile des Vollbluts auch miRNA enthalten, sind Vollblutpräparate für die Analyse der miRNA aus unserer Sicht eher weniger geeignet und deshalb wurde Serum für die Analyse verwendet [107].

In der vorliegenden Studie erfolgte erstmalig die Charakterisierung der Dynamik der miRNA Veränderungen unter lokalablative Therapie sowie der potenzielle Nutzen der miR-21 als Biomarker für das Therapieansprechen einer lokalablativen Therapie (RFA, Brachytherapie, MWA) beim mKRK untersucht. Insbesondere wurde hier erstmals analysiert, wie sich die miRNA-21 Serumkonzentration bei Tumorzerstörung unter lokalablativer Therapie verändert. Es konnten keine signifikanten prä- und postinterventionelle Unterschiede der miR-21 Konzentration festgestellt werden. Die meisten vorliegenden Studien zu miRNA im Serum und dem KRK beschränken sich auf die miRNA Serumkonzentration zu einem bestimmten Zeitpunkt im Vergleich mit einer gesunden Kontrollgruppe. Wenn in Studien mehrere Zeitpunkte untersucht wurden, liegen diese meist in großem zeitlichem Abstand von mehreren Wochen/Monaten zueinander. In der vorliegenden Arbeit wurde die miR-21 Konzentration im Serum der Interventionsgruppe sowohl zu drei Zeitpunkten innerhalb von vier aufeinanderfolgenden Tagen vor und nach einer Intervention als auch für die Subkohorte im längeren Verlauf analysiert. Dies ist bisher nicht untersucht worden und gibt erstmalige Einblicke in interventionsabhängige wie auch zeitliche Schwankungen der miR-21 Konzentration und deren Dynamik. Es konnte in der Subgruppenanalyse gezeigt werden, dass zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Therapieverlauf die miR-21

Serumkonzentrationen gewissen, vermutlich individuellen und therapie-assoziierten, Schwankungen unterliegen. Somit konnte in dieser Arbeit erstmals der Effekt einer lokalablativen Therapie auf die miR-21 Serumkonzentration systematisch untersucht werden.

### **Höhere miR-21 Konzentration in Interventionsgruppe**

Eine erhöhte miR-21 Serumkonzentration bzw. Gewebeexpression bei Patienten mit KRK konnte bereits in zahlreichen Metaanalysen gezeigt werden [109], [110]. Auch ausgewählte monozentrische Studien, wie von Freiersinger et al., die anhand von 29 Gewebeproben von lebermetastasierten KRK Patienten erhöhte miR-21 Konzentrationen nachwies [111], sowie Koga et al., die anhand von 197 Stuhlproben von KRK Patienten erhöhte miR-21 Konzentrationen nachwies, zeigten vergleichbare Ergebnisse [112]. Die in der Arbeit vorliegenden Ergebnisse sind konkordant mit den publizierten Ergebnissen, was für die Validität und Eignung der Gruppe für die Analysen spricht.

Zur Auswertung der vorliegenden Arbeit wurden 52 an KRK erkrankte Patienten mit Leber- und Lungenmetastasen herangezogen, die zum Teil zu verschiedenen Therapiezeitpunkten mehrfach in die Auswertung eingegangen sind, da wir primär die Therapieauswirkung auf die miR-21 Serumkonzentration analysieren wollten.

Als Ausgangspunkt konnte bei Patienten mit mKRK eine erhöhte miR-21 Konzentration gegenüber einer gesunden Kontrollkohorte nachgewiesen werden. Allerdings konnten anhand von Serumanalysen zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten keine signifikante miR-21 Veränderungen im Zusammenhang mit der Intervention nachgewiesen werden.

### **Beeinflussende Faktoren auf die miR-21 Konzentration**

In den folgenden Abschnitten wird der Einfluss der klinisch sowie laborchemisch erhobenen Parameter auf die miR-21 Serumkonzentration diskutiert und es werden Erklärungsansätze gesucht.

Demographische Daten, wie Alter und Geschlecht, wurden bei der Patientenaufnahme standardisiert erhoben. Da dem Ansatz der geschlechtsspezifischen Medizin immer mehr Bedeutung zukommt, wurden auch geschlechtsspezifische miR-21 Konzentrationsunterschiede untersucht. Guo, et al. haben in ihrer Studie einen Einfluss des Geschlechts auf die Serumkonzentration verschiedener miRNAs nachgewiesen u. a. miR-30a und miR-221 [113]. In der vorliegenden Arbeit konnten, wie auch Toiyama, et al. in ihrer Arbeit, keine geschlechtsabhängigen Konzentrationsunterschiede der miR-21 Konzentration festgestellt werden [94].

Es erfolgte eine weitere Analyse anhand des Patientenalters. Almeida et al. wiesen in ihrer Studie eine niedrigere Serumkonzentration von miR-21 an KRK Patienten mit einem Alter von über 60 Jahren im Vergleich zu Patienten mit einem Alter von unter 60 Jahren nach [114]. Angelehnt an die Studie von Almeida et al. wurde in der vorliegenden Studie eine Einteilung der Interventionsgruppe von unter 60 und über 60 Jahren vorgenommen. Die Daten der vorliegenden Arbeit ergaben zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede der miR-21 Konzentration in Abhängigkeit des Alters. Auch die Arbeitsgruppe von Toiyama, et al., die von einer Altersgrenze von 67 Jahren ausgehen, konnten, konkordant zu unseren Ergebnissen, keine Unterschiede der miR-21 Serumkonzentration in Abhängigkeit zum Alter nachweisen [94]. Diese, sowie die in dieser Arbeit erhobenen Daten, decken sich mit einer Metaanalyse von Liu et al. Hier wurden 1129 Blutanalysen von KRK-Patienten und 951 Kontrollblutproben aus 18 Studien in die Auswertung eingeschlossen und es konnten keine Unterschiede der miR-21 Serumkonzentration anhand des Alters oder Geschlechts gezeigt werden [110].

Interessant erscheint weiterhin der Einfluss der Nierenfunktion, gemessen an der Creatininkonzentration, auf die miR-21 Serumkonzentration. Hohe Creatininkonzentrationen und damit konsekutiv einhergehende verschlechterte Nierenfunktion sind in der Literatur teilweise mit niedrigen miRNA Konzentrationen beschrieben worden [115]. Fujii R. et al. konnten einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Nierenfunktion und der miR-21 Konzentration im Serum aufzeigen. [116]. Auch Franck et al. konnten zeigen, dass pathologische Nierenwerte mit einer

signifikant verringerten miR-122 sowie miR-21 Konzentration beim Hepatozellulären Karzinom einhergehen [117], [118]. In dieser Arbeit konnte kein Zusammenhang zwischen der Creatininkonzentration und miR-21 Konzentration repliziert werden (Abbildung 8B, 10C). Ein Grund hierfür kann sein, dass nur 5 „Ausreißer“ mit z. T. marginal erhöhter Creatininkonzentration in die Endauswertung eingegangen sind und diese somit statistisch nicht berücksichtigt wurden und die Daten daher nicht mit den in der Literaturrecherche beschriebenen Ergebnissen übereinstimmen.

Klassische Tumormarker wie CEA oder CA19-9 finden in der Literatur wie auch in den Leitlinien des KHK immer wieder Erwähnung. CEA findet gerade in frühem Krebsstadium Verwendung. Allerdings ist die Sensitivität des Markers nicht besonders hoch. Toiyama et al. konnte eine schlechte Überlebensprognose mit hohen miR-21 Konzentrationen im Serum und Gewebe und erhöhten CEA Konzentrationen (CEA > 5ng/ml), sowie hohen Tumorstadien des KHK und Metastasierung feststellen [94]. Pesta et al. beschrieben bereits 2010 eine prognostische Wertigkeit in Bezug auf Metastasierung und Gesamtüberleben von erhöhten Gewebekonzentrationen von miR-21 [119].

In einer aktuelleren Studie konnten Pesta et al. einen prognosebestimmenden Vorteil in der Genauigkeit aufzeigen, wenn verschiedene miRNA (miR-21, miR-20a, miR-23a) sowie CEA und CA19-9 Serumkonzentrationen kombiniert zur Bewertung herangezogen wurden [53]. Es konnten in den Analysen dieser Arbeit zu keinem Zeitpunkt signifikante Zusammenhänge zwischen der CEA Konzentrationen oder CA19-9 Konzentrationen und der miR-21 Konzentration festgestellt werden.

Perspektivisch erscheint, auf Grund der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit, die alleinige Nutzung von miR-21 als Tumormarker als nicht sinnvoll. Auf Grund der Studienlage erscheint allerdings eine kombinierte Analyse von Tumormarkern und miRNA-Markerprofilen in der Diagnostik sowie zur Therapiekontrolle vorteilhaft [53], [120], [121].

## **Einfluss der Metastasengröße und -lokalisierung auf die miR-21 Konzentration**

Gleichgerichtete Zusammenhänge zwischen der miR-21 Serumkonzentration und Läsionsgröße/Tumorgröße konnten durch zahlreiche Autoren anhand von verschiedenen gastrointestinalen Tumoren nachgewiesen werden, u. a. auch dem KRK. Auch Y. Toyama et al. konnten zeigen, dass es zu einer schrittweisen Erhöhung der miR-21 Konzentration gleichgerichtet mit dem Progress des Tumorstadiums des KRKs kommt. Allerdings fanden sie in der gleichen Studie keinen Zusammenhang zwischen der Lokalisation innerhalb des Kolons/Rektums des Tumors und der miR-21 Konzentration [94]. Song et al. konnten erhöhte miR-21 Konzentrationen im Serum von an Magenkarzinom erkrankten Patienten feststellen. Mit steigender Tumorgröße, sowie aufsteigender pTNM-Klassifikation (pathologische Klassifikation) konnte eine signifikant erhöhte miR-21 Konzentration beschrieben werden [122]. Ogata-Kawata et al. untersuchten in ihrer Studie 88 KRK Patienten und analysierten mehrere Markerprofile, wie auch miRNA. Sie zeigten eindrücklich nach Primarius Resektion/Teilresektion einen signifikanten Abfall der miR-21, miR-223, miR-23a, miR-1229, miR-1246, miR-1224-5p sowie let-7a Serumkonzentrationen [123].

Abhängig von der Metastasengröße, der Lokalisation der Metastase oder des Primarius ließen sich in der vorliegenden Arbeit keine signifikanten Unterschiede darstellen. Dies kann unter anderem damit zusammenhängen, dass der Primarius häufig deutlich größer als die Metastase/-n ist. Ebenso kann dies dadurch begründet werden, dass ca. 67% der durch uns behandelten Metastasen unter 40 mm maßen, weitere ca. 21% zwischen 41 - 80 mm maßen (zusammen ca. 88%) und nur wenige deutlich größere Ausreißer in dem Studienkollektiv vorhanden waren. Es erfolgte im Vergleich zu den o. g. Studien keine Resektion, sondern eine Brachytherapie bzw. Radiofrequenzablation. Das heißt, dass die Tumormasse zwar therapiert wurde, aber zunächst im Körper belassen wurde und im Falle der Brachytherapie der Tumorzerfall erst in den auf die Intervention folgenden Tagen bis Wochen geschah.

Zusätzlich wurden in der vorliegenden Studie lediglich KRK-Patienten im metastasierten Tumorstadium IV eingeschlossen, so dass hier ggf. die Gesamttumorlast im Körper, einschließlich Mikrometastasen, deutlich höher ist und die



vorliegenden Ergebnisse aus der Literaturrecherche nicht auf das Patientenkollektiv zu übertragen sind.

Für aussagekräftige Ergebnisse in Hinblick auf die miR-21 Konzentration und Metastasengröße erscheint eine langfristige Analyse der Serumkonzentration bei der Erstdiagnose der Tumorerkrankung sowie den regelmäßige Verlaufskontrollen der Serumkonzentration als sinnvoll. Hierdurch könnte validiert werden, ob die erhöhte miR-21 Konzentration tatsächlich mit der Metastasierung zusammenhängt oder die Gesamtumorlast inklusive noch nicht detektierbarer Mikrometastasen die erhöhte miR-21 Konzentration verursacht.

### **miR-21 Konzentration im Verlauf der Therapie**

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen im Verlauf der Therapie, in Betrachtung der gesamten Studienkohorte, keinen signifikanten Konzentrationsunterschied der miR-21 Serumkonzentration.

Es zeigt sich jedoch eine gewisse Dynamik im Verlauf der Therapie, entweder in Form von präinterventionell erhöhter oder verringerter sowie postinterventionell ansteigender oder abfallender miR-21 Serumkonzentration.

Erst durch eine Subgruppenbildung anhand des Mittelwertes von delta CT miR-21 zum Blutentnahmezeitpunkt 0 h ließen sich signifikante Konzentrationsunterschiede innerhalb der Subgruppen darstellen („initial hoch-/tiefregulierte Gruppe“ & „sekundär hoch-/tiefregulierte Gruppe“).

Die miR-21 Konzentrationsunterschiede der Subgruppen konnten mit den für die Analyse erhobenen Blutparametern (GLDH, CRP, Hb, CA 19-9, CEA, Creatinin, Leukozyten) nicht ausreichend begründet werden. Ebenso können mit der Literatur die schwankenden Verläufe der miR-21 Konzentration nicht vollends begründet werden.

Für die postinterventionellen Konzentrationsunterschiede der miR-21 liegen vereinzelte Erklärungsansätze in der Literatur vor. Die postinterventionelle Änderung der miR-21 Konzentration könnte zum einen als Stressreaktion des Körpers auf die Intervention gewertet werden und zum anderen durch die Zellverletzung durch die Therapie auftreten [124]–[126].

Phay, et al. haben nach manuell zugefügter Nervenverletzung im Mausmodell die axonspezifische miRNA-Konzentration an Tag 1, 4, 7 und 14 nach Verletzung analysiert und konnten zwischen den Zeitpunkten signifikante Unterschiede darstellen [124]. Ähnliche Ergebnisse konnten Rinaldi, et al. nachweisen. Es wurde nach Stressexposition zu vier Zeitpunkten miRNA bestimmt. Für bestimmte miRNAs, u.a. miR-9 und miR-26a/b, konnten im akuten Stresszustand erhöhte miRNA Konzentrationen nachgewiesen werden. Zu den anderen gemessenen Zeitpunkten konnten allerdings keine signifikanten Unterschiede identifiziert werden [125].

Bezüglich der Behandlungsmodalität und dem Zusammenhang der miR-21 Konzentration liegen derzeit in der Literatur keine Studien vor. Vereinzelt konnten Autoren zeigen, dass ein erneuter postinterventioneller Anstieg einer bestimmten miRNA mit einem erhöhten Tumor-Rezidivrisiko der Patienten einhergeht [127]. So stellen z. B. Cui X et. al. fest, dass ein erneuter Anstieg von miR-34a nach erfolgter Brachytherapie mit einem erhöhten Rezidivrisiko bei hepatozellulärem Karzinom assoziiert ist [128]. In Metaanalysen konnte gezeigt werden, dass nach Tumorresektion ein erneuter Anstieg der miR-21 Serumkonzentration mit einem Tumorprogress und reduziertem Gesamtüberleben einher geht [129].

Zum Teil erhielten die Patienten innerhalb der vorliegenden Studie mehrere Therapien zu verschiedenen Zeitpunkten. So kann ein Patient in der ersten Therapiesitzung z. B. in der hochregulierten Gruppe auftauchen und in der zweiten Therapiesitzung in der tiefregulierten Gruppe. Daher ist davon auszugehen, dass die postinterventionelle miR-21 Konzentration und damit die postulierte Stressreaktion nicht personenspezifisch ist.

Es konnten keine Unterschiede zwischen den Therapiemodalitäten Brachytherapie oder Radiofrequenzablation gezeigt werden. Die fehlenden Unterschiede zwischen den Therapiemodalitäten deuten darauf hin, dass die erhöhte miR-21 Konzentration nicht ausschließlich, wie bisher angenommen, von dem Tumor/der Metastase ausgeht. Nach der Radiofrequenzablation kommt es zu einem direkten Zerfall der Tumorzelle durch die Erhitzung, so dass hier ein miR-21 Konzentrationsanstieg zu erwarten wäre.

Nach der Brachytherapie ist kein direkter Effekt anzunehmen, da die eingebrachte Strahlenquelle erst über die nächsten Tage und Wochen wirken wird und die Tumorzellen erst im Verlauf zerfallen.

## **Überlebenszeitanalyse**

Mit einer erhöhten miR-21 Konzentration wird in der Literatur eine verringerte Überlebenszeitprognose (*Overall-Survival*) bei an KRK erkrankten Patienten beschrieben [94], [130]. Allerdings konnte bisher keine genaue Vorhersage der Überlebensprognose getroffen werden. In einer Metaanalyse von Sharif-Askari et al. konnte gezeigt werden, dass eine hohe miR-21 Konzentration in den analysierten KRK-Studien mit schlechtem Gesamtüberleben einherging. Insbesondere konnte gezeigt werden, dass eine hohe gewebespezifische miR-21-Konzentration mit schlechtem Gesamtüberleben einhergeht. Ein signifikant schlechteres Gesamtüberleben konnte für erhöhte Serum miR-21 nicht nachgewiesen werden, sondern es zeigte sich nur ein Trend zu einem schlechterem Gesamtüberleben [129]. Zu nennen ist zum Beispiel die Arbeit von Pesta et al., deren Studienkohorte den hier untersuchten Patienten zumindest ähnelt. Sie konnten bei Patienten mit hohen postoperativen (nach Resektion des Primarius) Plasmakonzentrationen von miR-21, miR-20a und miR-23a eine signifikant geringere Überlebenszeitprognose beobachten. In die Analyse wurden nur Patienten im palliativen Setting mit Tumorresektion einbezogen. Gleichzeitig konnte die Studiengruppe zeigen, dass eine genauere Überlebenszeitprognose getroffen werden konnte, wenn mehrere Biomarker, verschiedene miRNA sowie CEA, CA19-9, einbezogen werden [53], [120], [121].

In vorliegender Studie haben wir uns intensiv mit diesem Thema auseinandergesetzt und Subgruppenanalysen durchgeführt. Ebenso haben wir Tumorparameter (CEA, CA 19-9) zur Verlaufskontrolle in die Auswertung miteinbezogen. Weder durch die alleinige Betrachtung der miR-21 Serumkonzentration noch durch das Hinzuziehen weiterer Tumorparameter oder klinischer Daten konnte eine Prognose für das Gesamtüberleben getroffen werden.

Hier ist anzumerken, dass die Nachsorge von nur wenigen Patienten, sehr inkonstant, wahrgenommen wurde und das primäre Ziel der Arbeit nicht die Überlebensprognosebestimmung war. Zusätzlich ist anzumerken, dass die Patienten sich alle im metastasierten Tumorstadium IV, mit Z. n. Chemotherapie/n, befanden und die Gesamtüberlebensprognose im Hinblick auf die oben angeführten Vergleichsstudien generell deutlich schlechter war.

### **Limitationen der Arbeit**

Eine der wichtigsten Limitation der Arbeit ist leider die Anzahl von Patienten, die in die Studie eingeschlossen wurden. Der größte Teil der vorliegenden Studien befasst sich, wie auch die vorliegende Arbeit, mit relativ kleinen Patientengruppen von (10 - 200) Patienten. Auch wenn hier ein systematisches Protokoll angewendet wurde, ist unklar, ob die Heterogenität der lokalablativen Therapie sowie der Diagnosen zu einer Variabilität der Ergebnisse geführt hat. Auch wenn die hier festgestellten Ergebnisse sehr plausibel erscheinen, würden weitere Studien mit größeren Kohorten vertiefte Einblicke in die Biogenese und Dynamik von miRNA unter lokalablativer Therapie bringen.

Ein Störfaktor vor der Aufbereitung der Proben kann eine Beeinflussung der miR-21 Konzentration durch die mögliche Hämolyse des Probenmaterials sein. Kirschner et al. zeigten, dass unterschiedliche miRNAs von Hämolyse des Probenmaterials beeinflusst werden. Auch miR-21 kann durch hohe Grade von Hämolyse beeinflusst werden [131]. Es ist in der vorliegenden Arbeit nicht von einem hohen Grad der Hämolyse auszugehen, da bei vorliegender Hämolyse eine entsprechende Rückmeldung des Instituts für Klinische Chemie und Pathobiochemie erfolgte. Der Probenversand ins Institut erfolgte nur wenige Minuten nach der Probenablieferung ins Labor. Hämolytische Proben wurden aussortiert und nicht in die Auswertung einbezogen. Ein gewisser Grad an Hämolyse ist aber auch bei unseren standardisierten und möglichst zügigen Abläufen nicht vollständig auszuschließen, wodurch die Interpretierbarkeit der miR-21 Konzentration ggf. erschwert wird.

Als weitere Limitation der Studie könnte die Charakterisierung der Patientenkohorte angegeben werden. Die Kohorte besteht aus Patienten, die sich alle im Stadium IV

des KRK befinden, allerdings unterschiedliche Vortherapien, sowie unterschiedliche Chemotherapien erhalten haben und unterschiedliche Metastasierungsmuster aufweisen. In die Studie wurden keine Chemotherapie-naiven Patienten eingeschlossen. Die in der Tumorerkrankung weit fortgeschrittene Patientenkohorte bringt so, auf Grund der diversen Vortherapien, viele mögliche Störfaktoren in der Interpretation der Ergebnisse mit sich. Zudem sind Patienten vereinzelt mehrfach in die Studie aufgenommen worden, da sie zu unterschiedlichen Zeitpunkten an unterschiedlichen Lokalisationen therapiert wurden.

Bei der Beurteilung von miRNA wurden validierte Methoden genutzt, die standardmäßig in dem Forschungslabor der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie des Universitätsklinikums der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg angewendet werden [117], [132]. Die Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Studien ist jedoch schwierig, da nicht alle Forschungsgruppen einheitliche Methoden zur Normalisierung anwenden. Beispielsweise wurde in der vorliegenden Studie die *spiked-in* cel-miR-39 Methode genutzt, die derzeit als sinnvollste Normalisierungsmethode erscheint [133], [134].

Eine weitere Limitation stellt die Wahl der Analysetage dar. Alle Blutentnahmen wurden innerhalb von 72 Stunden durchgeführt. Da die Patienten sich für diese 72 Stunden im stationären Aufenthalt befanden, wurde dieses Studiendesign gewählt. Eine Verlaufskontrolle mehrere Tage, Wochen oder gar Monate später hätte weitere interessante Einblicke in das Verhalten der miR-21 Serumkonzentration bringen können. Ebenso sind die Patienten unregelmäßig und nur vereinzelt zur Nachsorge erschienen. Ein aussagekräftiges *Follow-up* war dadurch nur sehr eingeschränkt möglich.

In dieser Studie wurde der Hauptfokus auf die nicht-invasive Analyse mittels Serum gelegt, da die Gewinnung unkompliziert und mehrfach durchführbar ist. Analysen von Gewebeproben würden sehr wertvolle Einblicke in die Veränderungen von miRNA im Tumorgewebe unter lokalablativer Therapie geben. Dieses Vorgehen ist jedoch an Patienten nicht möglich und nur im tierexperimentellen Modell durchführbar.

## Ausblick

In der hier vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss lokalablativer Therapien, wie Brachytherapie und Radiofrequenzablation, auf die miR-21-Serumkonzentration darzustellen, sowie ein Therapieansprechen hieraus abzuleiten. Die postinterventionellen miR-21 Serumkonzentrationsunterschiede bei Tumorzerstörung unter lokalablativer Therapie wurde in der vorliegenden Studie erstmalig untersucht. Es zeigte sich, dass anhand von klinischen sowie laborchemischen Parametern keine Erklärungen für die Konzentrationsunterschiede gefunden werden konnten.

Die Ergebnisse dieser Studie legen nahe, dass die miR-21 Serumkonzentration sich anders verhält, als bisher vermutet. Es zeigen sich keine gleichgerichteten Zusammenhänge zwischen Tumorzerstörung (Therapie) und miR-21 Serumveränderungen, so dass der Ursprung der erhöhten miR-21 im metastasierten Stadium ggf. auch anderweitig zu erklären wäre. Im Hinblick auf die miRNA Serumkonzentrationsunterschiede nach einer Intervention und zur Bewertung des Therapieansprechens sollten weitere Untersuchungen stattfinden.

Insbesondere im Hinblick auf die heterogene Patientengruppe könnte zukünftig in einem homogenem *in vivo* Mausmodell oder in einer Chemotherapie-naive Kohorte ohne sonstige mögliche Vorerkrankungen analysiert werden.

Es bleibt zu eruieren, auch wenn unwahrscheinlich, ob die miR-21 durch den thermischen Schaden der Radiofrequenzablation zumindest teilweise zerstört wird und somit möglicherweise gar nicht zur Analyse geeignet ist. Ebenso sollte untersucht werden, wann der Tumorzerfall, und damit einhergehend die miR-21 Freisetzung, nach der Brachytherapie genau stattfindet, um dann zielgerichtet eine miR-21 Serumanalyse durchzuführen.

Weiterhin wurde gezeigt, dass verschiedene Normalisierungsmethoden nicht ohne Weiteres miteinander verglichen werden können. Insbesondere miR-16-basierte Normalisierungsmethoden unterliegen einer statistischen Verzerrung/Bias, da die miR-16-Serumkonzentration sowohl durch die karzinogenen Zellen der Tumoren als auch durch andere Faktoren wie z. B. Anämie oder auch Hämolyse beeinflusst wird [133], [134].

Vandesompele et al. beschreiben mögliche größere Abweichung von der tatsächlichen miRNA Serumkonzentration, wenn zur Normalisierung nur eine endogene oder eine exogene Kontrolle herangezogen wird [135]. Die Studienlage bezüglich Serum-miRNA zeigt allerdings, dass die absolute Mehrheit der Studien nur entweder eine endogene oder eine exogene Kontrolle zur Normalisierung herangezogen hat und nicht mehrere Methoden [129]. Zur besseren Vergleichbarkeit verschiedener Studien kann zusammenfassend gesagt werden, dass cel-miR-39 der derzeit sinnvollste Normalisierungsmarker ist und dieser weiterhin sowie ausschließlich genutzt werden sollte.

Anhand der Studienlage erscheint eine multifaktorielle Analyse der Serumkonzentration von miR-21 sowie der Zielgene von miR-21 entscheidende Vorteile in der Früherkennung sowie auch in der Verlaufskontrolle und postoperativen Kontrolle zu bringen [136]. Einige Autoren schlagen ein *miRNA-Panel* verschiedener miRNA vor, andere Autoren empfehlen die Nutzung von miR-21 mit deren Zielgenen zur Risikoabschätzung [53]. Der Nutzen von miR-21 als Addition zur Koloskopie, insbesondere in Kombination mit anderen miRNA oder Genen, kann in der Früherkennung von KRK sowie im Verlauf, zum Zeitpunkt therapeutischer Eingriffe im fortgeschrittenen Tumorstadium zur Therapieerfolgskontrolle, einen entscheidenden Vorteil bringen. Dies konnten wir in der vorliegenden Arbeit in dem Setting einer lokalablativen Therapie bei Patienten mit einem fortgeschrittenem Tumorleiden mit miR-21 als alleinigem Serummarker allerdings nicht bestätigen.

## 6. Zusammenfassung

miRNA ist Gegenstand der intensiven Forschung und das Interesse an der Bedeutung, Funktion und der klinischen Anwendung der miRNA wächst stetig. Besondere Bedeutung kommt u. a. dem Nutzen von miRNA als potenzieller Biomarker und miRNA als potenziell therapeutischer Angriffspunkt in der Karzinogenese zu. Insbesondere für miR-21-5p wurde in den letzten Jahren eine vielversprechende Rolle als Biomarker in der Früherkennung von KRK und als Tumorverlaufsmarker in Aussicht gestellt.

In der vorliegenden Studie wurde erstmals untersucht, ob eine lokalablative Intervention an mKRK-Patienten mit miR-21-5p Serumkonzentrationsveränderungen assoziiert ist. Weiterhin wurde untersucht, ob diese Veränderungen bei der Beurteilung des Therapieansprechens helfen können. Die miR-21 Serumkonzentration wurde mehrmals vor und nach einer lokalen Intervention (Brachytherapie / Radiofrequenzablation / Mikrowellenablation) an Leber- & Lungenmetastasen von Patienten mit resezierten KRK Primärtumor mittels qRT-PCR analysiert.

Die Analyse zeigte, dass die miR-21 Serumkonzentration bei den Patienten dieser Studie, unabhängig von der Intervention, höher als in der Kontrollgruppe war, was für die Validität der ausgewählten Kohorte spricht. Es konnte festgestellt werden, dass die miR-21 Serumkonzentration von mKRK-Patienten, im Zeitraum um eine lokalablativen Intervention keiner eindeutigen Dynamik unterliegt. Sowohl Therapiemodalität als auch Lokalisation der Metastasen hatten keinen Einfluss auf miR-21 Veränderungen. Die Dynamik der miRNA nach Intervention hatte keine Assoziation mit der Prognose der untersuchten Patienten. Laborchemische Parameter wie CRP, Creatinin, Hämoglobin, sowie ätiologische und klinische Parameter wie Alter, Geschlecht, Metastasengröße und Behandlungsmodalität zeigten keinen signifikanten Einfluss auf die miR-21 Konzentration.

Zusammenfassend liefern die Ergebnisse dieser Arbeit erstmalig eine detaillierte Charakterisierung von miRNA-Veränderungen bei Patienten mit mKRK, unter einzigartigen Settings, nach durchgeführter lokalablativer Therapie. Die fehlende Reduktion der miRNA Konzentration nach gezielter Tumorablation hinterfragt das aktuelle Verständnis der miRNA Dynamik in der Tumorbilogie und eröffnet weitere Fragen zum Verständnis der miRNA Veränderungen bei Tumorerkrankungen.



## 7. Literaturverzeichnis:

- [1] D.-S. Bundesamt, "Zahl der Todesfälle im Jahr 2015 um 6,5% gestiegen." DESTATIS - Statistisches Bundesamt, 2017.
- [2] S3-Leitlinie, "S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom," *Version 2.1, 2019*, vol. AWMF-Regis. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften, 2019.
- [3] H. und T. D. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland / Robert - Koch Institut: Krebs in Deutschland 2007 - 2008 8. Auflage 2012; 36 – 39, 2012., "Häufigkeiten und Trends: Darm," vol. 8. Auflage. pp. 36–39.
- [4] S. H. Nikolaus Becker, "Die 20 häufigsten Krebstodesursachen in Deutschland im Jahr 2012 (aktualisierte Graphik)," vol. 2016. Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg, 2012.
- [5] G. Herold, *Innere Medizin 2015*. Köln: Herold, Gerd, 2015.
- [6] E. R. Fearon and B. Vogelstein, "A genetic model for colorectal tumorigenesis," *Cell*, vol. 61, no. 5, pp. 759–767, 1990,
- [7] M. C. de Haan, R. E. van Gelder, A. Graser, S. Bipat, and J. Stoker, "Diagnostic value of CT-colonography as compared to colonoscopy in an asymptomatic screening population: a meta-analysis.," *Eur. Radiol.*, vol. 21, no. 8, pp. 1747–63, Aug. 2011,
- [8] C. A. Burke, K. Elder, and R. Lopez, "Screening for Colorectal Cancer with Flexible Sigmoidoscopy: Is a 5-Yr Interval Appropriate? A Comparison of the Detection of Neoplasia 3 Yr versus 5 Yr After a Normal Examination," *Am. J. Gastroenterol.*, vol. 101, no. 6, pp. 1329–1332, Jun. 2006,
- [9] B. Levin *et al.*, "Screening and Surveillance for the Early Detection of Colorectal Cancer and Adenomatous Polyps, 2008: A Joint Guideline from the American Cancer Society, the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer, and the American College of Radiology," *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 58, no. 3, pp. 130–160, May 2008,
- [10] J. M. Church, E. McGannon, C. Burke, and B. Clark, "Teenagers With Familial Adenomatous Polyposis," *Dis. Colon Rectum*, vol. 45, no. 7, pp. 887–889, Jul. 2002,
- [11] B. D. R. Edge SB Compton CC, et al: AJCC (American and an J. C. on Cancer), *Cancer Staging Manual*, vol. 7th editio. Springer, New York .
- [12] C. W. Editors: L.H. Sobin, *The TNM system is the most widely used means for classifying the extent of cancer spread*, vol. 6th editio. New York: John Wiley, 2002.
- [13] J. Kievit, "Colorectal cancer follow-up: a reassessment of empirical evidence on effectiveness," *Eur. J. Surg. Oncol.*, vol. 26, no. 4, pp. 322–328, Jun. 2000,
- [14] J. Kievit, "Follow-up of patients with colorectal cancer," *Eur. J. Cancer*, vol. 38, no. 7, pp. 986–999, May 2002,
- [15] N. Pietra, L. Sarli, R. Costi, C. Ouchemi, M. Grattarola, and A. Peracchia, "Role of follow-up in management of local recurrences of colorectal cancer," *Dis. Colon Rectum*, vol. 41, no. 9, pp. 1127–1133, Sep. 1998,
- [16] M. . Duffy *et al.*, "Clinical utility of biochemical markers in colorectal cancer," *Eur. J. Cancer*, vol. 39, no. 6, pp. 718–727, Apr. 2003,

- [17] R. Sauer *et al.*, "Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer," *N Engl J Med*, vol. 351, no. 17, pp. 1731–1740, 2004,
- [18] D. A. Ralf-Dieter Hofheinz Markus Borner, Gunnar Folprecht, Ullrich Graeven, Holger Hebart, Susanna Hegewisch-Becker, Thomas Meybier, Ron Pritzkeleit, Werner Scheithauer, Hans-Joachim Schmoll, Josef Thaler, Jürgen Weitz, Bernhard Wörmann, "Kolonkarzinom ." *Onkopedia* , 2016.
- [19] A. Grothey *et al.*, "Duration of Adjuvant Chemotherapy for Stage III Colon Cancer," *N. Engl. J. Med.*, 2018,
- [20] "Erratum: Three versus 6 months of oxaliplatin-based adjuvant chemotherapy for patients with stage III colon cancer: Disease-free survival results from a randomized, open-label, international duration evaluation of adjuvant (IDEA) France, phase III trial (," *Journal of Clinical Oncology*. 2018.
- [21] Sobrero, "Erratum: 'FOLFOX or CAPOX in stage II to III colon cancer: Efficacy results of the Italian three or six colon adjuvant trial' (J Clin Oncol (2018) 36 (1478-1485)," *J. Clin. Oncol.*, 2018,
- [22] P. J. Iveson TJ, Kerr RS, Saunders MP, Cassidy J, Hollander NH, Tabernero J, Haydon A, Glimelius B, Harkin A, Allan K, McQueen J, Scudder C, Boyd KA, Briggs A, Waterston A, Medley L, Wilson C, Ellis R, Essapen S, Dhadda AS, Harrison M, Falk S, Raouf S, Rees C, "3 versus 6 months of adjuvant oxaliplatin-fluoropyrimidine combination therapy for colorectal cancer (SCOT): an international, randomised, phase 3, non-inferiority trial.," *Lancet Oncol.*, vol. April, no. 19(4), pp. 562–578, 2018.
- [23] W. van Gijn *et al.*, "Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer: 12-year follow-up of the multicentre, randomised controlled TME trial.," *Lancet. Oncol.*, vol. 12, no. 6, pp. 575–82, Jun. 2011,
- [24] R. Sauer *et al.*, "Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer: Results of the German CAO/ARO/AIO-94 randomized phase III trial after a median follow-up of 11 years.," *J. Clin. Oncol.*, 2011,
- [25] U. Graeven *et al.*, "Preoperative Chemoradiotherapy and Postoperative Chemotherapy with 5-Fluorouracil and Oxaliplatin Versus 5-Fluorouracil Alone in Locally Advanced Rectal Cancer: Results of the German CAO/ARO/AIO-04 Randomized Phase III Trial," *Ann. Oncol.*, 2014,
- [26] R. K. S. Wong, V. Tandan, S. De Silva, and A. Figueredo, "Pre-operative radiotherapy and curative surgery for the management of localized rectal carcinoma.," *Cochrane database Syst. Rev.*, vol. Apr 18, no. 2, p. CD002102, Apr. 2007,
- [27] F. Fiorica *et al.*, "Can chemotherapy concomitantly delivered with radiotherapy improve survival of patients with resectable rectal cancer? A meta-analysis of literature data.," *Cancer Treat. Rev.*, vol. 36, no. 7, pp. 539–549, Nov. 2010,
- [28] W. P. Ceelen, Y. Van Nieuwenhove, and K. Fierens, "Preoperative chemoradiation versus radiation alone for stage II and III resectable rectal cancer.," *Cochrane database Syst. Rev.*, no. 1, p. CD006041, Jan. 2009,
- [29] D. Sebag-Montefiore *et al.*, "Preoperative radiotherapy versus selective postoperative chemoradiotherapy in patients with rectal cancer (MRC CR07 and NCIC-CTG C016): a multicentre, randomised trial.," *Lancet (London)*,

- England), vol. 373, no. 9666, pp. 811–820, Mar. 2009,
- [30] M. J. Sorich, M. D. Wiese, A. Rowland, G. Kichenadasse, R. A. McKinnon, and C. S. Karapetis, “Extended RAS mutations and anti-EGFR monoclonal antibody survival benefit in metastatic colorectal cancer: a meta-analysis of randomized, controlled trials.,” *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.*, vol. 26, no. 1, pp. 13–21, Jan. 2015,
- [31] E. Van Cutsem *et al.*, “ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer.,” *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.*, vol. 27, no. 8, pp. 1386–1422, Aug. 2016,
- [32] N. Knijn *et al.*, “KRAS mutation analysis: a comparison between primary tumours and matched liver metastases in 305 colorectal cancer patients.,” *Br. J. Cancer*, vol. 104, no. 6, pp. 1020–1026, Mar. 2011,
- [33] I. M. Løes *et al.*, “Impact of KRAS, BRAF, PIK3CA, TP53 status and intraindividual mutation heterogeneity on outcome after liver resection for colorectal cancer metastases.,” *Int. J. cancer*, vol. 139, no. 3, pp. 647–656, Aug. 2016,
- [34] M. L. Rothenberg *et al.*, “Superiority of oxaliplatin and fluorouracil-leucovorin compared with either therapy alone in patients with progressive colorectal cancer after irinotecan and fluorouracil-leucovorin: interim results of a phase III trial.,” *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 21, no. 11, pp. 2059–2069, Jun. 2003,
- [35] Y.-H. Xie, Y.-X. Chen, and J.-Y. Fang, “Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer.,” *Signal Transduct. Target. Ther.*, vol. 5, no. 1, p. 22, Mar. 2020,
- [36] B. Chevaux, “Kolonkarzinom: aktueller Stand,” *Schweiz Med Forum*, vol. 2014;14(14, no. 14, pp. 289–294, 2014,
- [37] J. P. McGahan, P. D. Browning, J. M. Brock, and H. Tesluk, “Hepatic ablation using radiofrequency electrocautery.,” *Invest. Radiol.*, vol. 25, no. 3, pp. 267–70, Mar. 1990,
- [38] M. Nikfarjam, V. Muralidharan, and C. Christophi, “Mechanisms of Focal Heat Destruction of Liver Tumors,” *J. Surg. Res.*, vol. 127, no. 2, pp. 208–223, Sep. 2015,
- [39] F. W. Michael Wannemacher Jürgen Debus, “Strahlentherapie.” Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013, 2013.
- [40] C. T. Sofocleous *et al.*, “Ki-67 is a Prognostic Biomarker of Survival after Radiofrequency Ablation of Liver Malignancies,” *Ann. Surg. Oncol.*, vol. 19, no. 13, pp. 4262–4269, Dec. 2012,
- [41] C. T. Sofocleous *et al.*, “Histopathologic and Immunohistochemical Features of Tissue Adherent to Multitined Electrodes after RF Ablation of Liver Malignancies Can Help Predict Local Tumor Progression: Initial Results,” *Radiology*, vol. 249, no. 1, pp. 364–374, Oct. 2008,
- [42] F. Cornelis *et al.*, “18 F-FDG PET/CT Is an Immediate Imaging Biomarker of Treatment Success After Liver Metastasis Ablation,” *J. Nucl. Med.*, vol. 57, no. 7, pp. 1052–1057, Jul. 2016,
- [43] A. Loktionov, “Biomarkers for detecting colorectal cancer non-invasively: DNA, RNA or proteins?,” *World J. Gastrointest. Oncol.*, vol. 12, no. 2, pp. 124–148, Feb. 2020,

- [44] A. B. Knudsen *et al.*, “Estimation of Benefits, Burden, and Harms of Colorectal Cancer Screening Strategies,” *JAMA*, vol. 315, no. 23, p. 2595, Jun. 2016,
- [45] A. Goel *et al.*, “Characterization of sporadic colon cancer by patterns of genomic instability.,” *Cancer Res.*, vol. 63, no. 7, pp. 1608–14, Apr. 2003,
- [46] J. B. Geigl, A. C. Obenauf, T. Schwarzbraun, and M. R. Speicher, “Defining ‘chromosomal instability’.,” *Trends Genet.*, vol. 24, no. 2, pp. 64–9, Feb. 2008,
- [47] H. T. Lynch, J. F. Lynch, P. M. Lynch, and T. Attard, “Hereditary colorectal cancer syndromes: molecular genetics, genetic counseling, diagnosis and management.,” *Fam. Cancer*, vol. 7, no. 1, pp. 27–39, 2008,
- [48] M. Toyota, N. Ahuja, M. Ohe-Toyota, J. G. Herman, S. B. Baylin, and J. P. Issa, “CpG island methylator phenotype in colorectal cancer.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 96, no. 15, pp. 8681–6, Jul. 1999,
- [49] M. Guttman and J. L. Rinn, “Modular regulatory principles of large non-coding RNAs.,” *Nature*, vol. 482, no. 7385, pp. 339–46, Feb. 2012,
- [50] O. Peacock *et al.*, “Inflammation and MiR-21 pathways functionally interact to downregulate PDCD4 in colorectal cancer.,” *PLoS One*, vol. 9, no. 10, p. e110267, 2014,
- [51] D. Sun *et al.*, “MicroRNA-31 activates the RAS pathway and functions as an oncogenic MicroRNA in human colorectal cancer by repressing RAS p21 GTPase activating protein 1 (RASA1).,” *J. Biol. Chem.*, vol. 288, no. 13, pp. 9508–18, Mar. 2013,
- [52] R. Villéger *et al.*, “Microbial markers in colorectal cancer detection and/or prognosis.,” *World J. Gastroenterol.*, vol. 24, no. 22, pp. 2327–2347, Jun. 2018,
- [53] M. Pesta *et al.*, “Plasma microRNA Levels Combined with CEA and CA19-9 in the Follow-Up of Colorectal Cancer Patients,” *Cancers (Basel)*, vol. 11, no. 6, p. 864, Jun. 2019,
- [54] N. He *et al.*, “The Pathological Features of Colorectal Cancer Determine the Detection Performance on Blood ctDNA.,” *Technol. Cancer Res. Treat.*, vol. 17, p. 1533033818791794, 2018,
- [55] T. F. Imperiale *et al.*, “Multitarget stool DNA testing for colorectal-cancer screening.,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 370, no. 14, pp. 1287–97, Apr. 2014,
- [56] J. Bauersachs and T. Thum, “Biogenesis and regulation of cardiovascular microRNAs,” *Circ Res*, vol. 109, no. 3, pp. 334–347, 2011,
- [57] S. K. Gupta, C. Bang, and T. Thum, “Circulating microRNAs as biomarkers and potential paracrine mediators of cardiovascular disease,” *Circ Cardiovasc Genet*, vol. 3, no. 5, pp. 484–488, 2010,
- [58] R. C. Friedman, K. K. Farh, C. B. Burge, and D. P. Bartel, “Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs,” *Genome Res*, vol. 19, no. 1, pp. 92–105, 2009,
- [59] Y. Lee *et al.*, “MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II,” *EMBO J*, vol. 23, no. 20, pp. 4051–4060, 2004,
- [60] Y. Lee *et al.*, “The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing,” *Nature*, vol. 425, no. 6956, pp. 415–419, 2003,
- [61] E. Lund, S. Guttinger, A. Calado, J. E. Dahlberg, and U. Kutay, “Nuclear export of microRNA precursors,” *Science (80- )*, vol. 303, no. 5654, pp. 95–98, 2004,
- [62] W. Filipowicz, L. Jaskiewicz, F. A. Kolb, and R. S. Pillai, “Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs,” *Curr Opin Struct Biol*, vol. 15, no. 3,

- pp. 331–341, 2005,
- [63] W. Filipowicz, S. N. Bhattacharyya, and N. Sonenberg, “Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?,” *Nat Rev Genet*, vol. 9, no. 2, pp. 102–114, 2008,
- [64] J. Liu *et al.*, “Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi,” *Science (80-. )*, vol. 305, no. 5689, pp. 1437–1441, 2004,
- [65] A. Link and A. Goel, “MicroRNA in gastrointestinal cancer: a step closer to reality.,” *Adv. Clin. Chem.*, vol. 62, pp. 221–68, 2013,
- [66] G. A. Calin and C. M. Croce, “MicroRNA signatures in human cancers,” *Nat Rev Cancer*, vol. 6, no. 11, pp. 857–866, 2006,
- [67] C. M. Croce, “Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer,” *Nat Rev Genet*, vol. 10, no. 10, pp. 704–714, 2009,
- [68] S. Vasudevan, Y. Tong, and J. A. Steitz, “Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation,” *Science (80-. )*, vol. 318, no. 5858, pp. 1931–1934, 2007,
- [69] R. Tang *et al.*, “Mouse miRNA-709 directly regulates miRNA-15a/16-1 biogenesis at the posttranscriptional level in the nucleus: evidence for a microRNA hierarchy system,” *Cell Res*, vol. 22, no. 3, pp. 504–515, 2012,
- [70] S. Mukherji, M. S. Ebert, G. X. Zheng, J. S. Tsang, P. A. Sharp, and A. van Oudenaarden, “MicroRNAs can generate thresholds in target gene expression,” *Nat Genet*, vol. 43, no. 9, pp. 854–859, 2011,
- [71] A. Goel and C. R. Boland, “Epigenetics of colorectal cancer,” *Gastroenterology*, vol. 143, no. 6, pp. 1442-1460 e1, 2012,
- [72] W. P. Tsang and T. T. Kwok, “The miR-18a\* microRNA functions as a potential tumor suppressor by targeting on K-Ras,” *Carcinogenesis*, vol. 30, no. 6, pp. 953–959, 2009,
- [73] P. S. Mitchell *et al.*, “Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 105, no. 30, pp. 10513–10518, 2008,
- [74] K. Wang, S. Zhang, J. Weber, D. Baxter, and D. J. Galas, “Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells,” *Nucleic Acids Res*, vol. 38, no. 20, pp. 7248–7259, 2010,
- [75] L. Pigati *et al.*, “Selective release of microRNA species from normal and malignant mammary epithelial cells,” *PLoS One*, vol. 5, no. 10, p. e13515, 2010,
- [76] I. Nazarenko, A. K. Rupp, and P. Altevogt, “Exosomes as a potential tool for a specific delivery of functional molecules,” *Methods Mol Biol*, vol. 1049, pp. 495–511, 2013,
- [77] H. Valadi, K. Ekstrom, A. Bossios, M. Sjostrand, J. J. Lee, and J. O. Lotvall, “Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells,” *Nat Cell Biol*, vol. 9, no. 6, pp. 654–659, 2007,
- [78] M. P. Hunter *et al.*, “Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles,” *PLoS One*, vol. 3, no. 11, p. e3694, 2008,
- [79] J. D. Arroyo *et al.*, “Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 108, no. 12, pp. 5003–5008, 2011,

- [80] A. Turchinovich, L. Weiz, A. Langheinze, and B. Burwinkel, "Characterization of extracellular circulating microRNA," *Nucleic Acids Res*, vol. 39, no. 16, pp. 7223–7233, 2011,
- [81] J. Winter and S. Diederichs, "Argonaute proteins regulate microRNA stability: Increased microRNA abundance by Argonaute proteins is due to microRNA stabilization," *RNA Biol*, vol. 8, no. 6, pp. 1149–1157, 2011,
- [82] M. A. Cortez, C. Bueso-Ramos, J. Ferdin, G. Lopez-Berestein, A. K. Sood, and G. A. Calin, "MicroRNAs in body fluids--the mix of hormones and biomarkers," *Nat Rev Clin Oncol*, vol. 8, no. 8, pp. 467–477, 2011,
- [83] N. Kosaka, H. Iguchi, Y. Yoshioka, F. Takeshita, Y. Matsuki, and T. Ochiya, "Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells," *J Biol Chem*, vol. 285, no. 23, pp. 17442–17452, 2010,
- [84] A. Fesler, J. Jiang, H. Zhai, and J. Ju, "Circulating microRNA testing for the early diagnosis and follow-up of colorectal cancer patients," *Mol Diagn Ther*, vol. 18, no. 3, pp. 303–308, 2014,
- [85] M. Z. Michael, S. M. O' Connor, N. G. van Holst Pellekaan, G. P. Young, and R. J. James, "Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia.," *Mol. Cancer Res.*, vol. 1, no. 12, pp. 882–91, Oct. 2003,
- [86] J. Thomas, M. Ohtsuka, M. Pichler, and H. Ling, "MicroRNAs: Clinical Relevance in Colorectal Cancer," *Int J Mol Sci*, vol. 16, no. 12, pp. 28063–28076, 2015,
- [87] Y. Yin *et al.*, "Downregulation of miR-145 associated with cancer progression and VEGF transcriptional activation by targeting N-RAS and IRS1," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1829, no. 2, pp. 239–247, 2013,
- [88] S. M. Johnson *et al.*, "RAS is regulated by the let-7 microRNA family," *Cell*, vol. 120, no. 5, pp. 635–647, 2005,
- [89] B. Xiong, Y. Cheng, L. Ma, and C. Zhang, "MiR-21 regulates biological behavior through the PTEN/PI-3 K/Akt signaling pathway in human colorectal cancer cells," *Int J Oncol*, vol. 42, no. 1, pp. 219–228, 2013,
- [90] C. L. Cottonham, S. Kaneko, and L. Xu, "miR-21 and miR-31 converge on TIAM1 to regulate migration and invasion of colon carcinoma cells," *J Biol Chem*, vol. 285, no. 46, pp. 35293–35302, 2010,
- [91] D. Sayed *et al.*, "MicroRNA-21 targets Sprouty2 and promotes cellular outgrowths," *Mol Biol Cell*, vol. 19, no. 8, pp. 3272–3282, 2008,
- [92] Y. Yu *et al.*, "MicroRNA-21 induces stemness by downregulating transforming growth factor beta receptor 2 (TGFbetaR2) in colon cancer cells," *Carcinogenesis*, vol. 33, no. 1, pp. 68–76, 2012,
- [93] I. A. Asangani *et al.*, "MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer," *Oncogene*, vol. 27, no. 15, pp. 2128–2136, 2008,
- [94] Y. Toiyama *et al.*, "Serum miR-21 as a diagnostic and prognostic biomarker in colorectal cancer," *J Natl Cancer Inst*, vol. 105, no. 12, pp. 849–859, 2013,
- [95] Y. Toiyama *et al.*, "Serum miR-21 as a diagnostic and prognostic biomarker in colorectal cancer.," *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 105, no. 12, pp. 849–859, 2013,
- [96] C. Min-Hua *et al.*, "Large Liver Tumors: Protocol for Radiofrequency Ablation and Its Clinical Application in 110 Patients—Mathematic Model, Overlapping

- Mode, and Electrode Placement Process,” *Radiology*, vol. 232, no. 1, pp. 260–271, 2004,
- [97] R. Cirocchi *et al.*, “Radiofrequency ablation in the treatment of liver metastases from colorectal cancer,” *Cochrane Database Syst Rev*, vol. 6, p. CD006317, 2012,
- [98] C. L. Brace, “Microwave Tissue Ablation: Biophysics, Technology, and Applications,” *Crit. Rev. Biomed. Eng.*, vol. 38, no. 1, pp. 65–78, 2010,
- [99] C. L. Brace, “Microwave Ablation Technology: What Every User Should Know,” *Curr. Probl. Diagn. Radiol.*, vol. 38, no. 2, pp. 61–67, Mar. 2009,
- [100] C. J. Simon, D. E. Dupuy, and W. W. Mayo-Smith, “Microwave Ablation: Principles and Applications,” *RadioGraphics*, vol. 25, no. suppl\_1, pp. S69–S83, Oct. 2005,
- [101] M. Hollis, K. Nair, A. Vyas, L. S. Chaturvedi, S. Gambhir, and D. Vyas, “MicroRNAs potential utility in colon cancer: Early detection, prognosis, and chemosensitivity,” *World J Gastroenterol*, vol. 21, no. 27, pp. 8284–8292, 2015,
- [102] F. Wang, Z. Zheng, J. Guo, and X. Ding, “Correlation and quantitation of microRNA aberrant expression in tissues and sera from patients with breast tumor,” *Gynecol Oncol*, vol. 119, no. 3, pp. 586–593, 2010,
- [103] J. C. Brase *et al.*, “Circulating miRNAs are correlated with tumor progression in prostate cancer,” *Int J Cancer*, vol. 128, no. 3, pp. 608–616, 2011,
- [104] D. D. Taylor and C. Gercel-Taylor, “MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer,” *Gynecol Oncol*, vol. 110, no. 1, pp. 13–21, 2008,
- [105] J. Shen *et al.*, “Diagnosis of lung cancer in individuals with solitary pulmonary nodules by plasma microRNA biomarkers,” *BMC Cancer*, vol. 11, p. 374, 2011,
- [106] M. Tsuchiura *et al.*, “Circulating microRNAs in plasma of patients with gastric cancers,” *Br J Cancer*, vol. 102, no. 7, pp. 1174–1179, 2010,
- [107] C. C. Pritchard *et al.*, “Blood cell origin of circulating microRNAs: a cautionary note for cancer biomarker studies,” *Cancer Prev Res*, vol. 5, no. 3, pp. 492–497, 2012,
- [108] J. Krützfeldt *et al.*, “Silencing of microRNAs in vivo with ‘antagomirs,’” *Nature*, vol. 438, no. 7068, pp. 685–689, Dec. 2005,
- [109] A. H. Aalami, H. Abdeahad, and M. Mesgari, “Circulating miR-21 as a potential biomarker in human digestive system carcinoma: a systematic review and diagnostic meta-analysis,” *Biomarkers*, vol. 26, no. 2, pp. 103–113, Feb. 2021,
- [110] T. Liu, D. Liu, S. Guan, and M. Dong, “Diagnostic role of circulating MiR-21 in colorectal cancer: a update meta-analysis,” *Ann. Med.*, vol. 53, no. 1, pp. 87–102, Jan. 2021,
- [111] F. Feiersinger *et al.*, “MiRNA-21 Expression Decreases from Primary Tumors to Liver Metastases in Colorectal Carcinoma,” *PLoS One*, vol. 11, no. 2, p. e0148580, 2016,
- [112] Y. Koga *et al.*, “MicroRNA expression profiling of exfoliated colonocytes isolated from feces for colorectal cancer screening,” *Cancer Prev Res*, vol. 3, no. 11, pp. 1435–1442, 2010,
- [113] L. Guo, T. Liang, J. Yu, and Q. Zou, “A Comprehensive Analysis of miRNA/isomiR Expression with Gender Difference,” *PLoS One*, vol. 11, no. 5, p. e0154955, 2016,

- [114] A. L. Almeida *et al.*, “Serological under expression of microRNA-21, microRNA-34a and microRNA-126 in colorectal cancer,” *Acta Cir Bras*, vol. 31 Suppl 1, pp. 13–18, 2016,
- [115] N. Bruno *et al.*, “MicroRNAs relate to early worsening of renal function in patients with acute heart failure,” *Int J Cardiol*, vol. 203, pp. 564–569, 2016,
- [116] R. Fujii *et al.*, “Associations of Circulating MicroRNAs (miR-17, miR-21, and miR-150) and Chronic Kidney Disease in a Japanese Population,” *J. Epidemiol.*, vol. 30, no. 4, pp. 177–182, Apr. 2020,
- [117] P. Schindler, “MicroRNA in Aszites als potentielle Biomarker für Peritonealkarzinose und Peritonitis,” Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, 2017.
- [118] M. Franck, C. Thon, K. Schütte, P. Malfertheiner, and A. Link, “Circulating miR-21-5p level has limited prognostic value in patients with hepatocellular carcinoma and is influenced by renal function,” *World J. Hepatol.*, vol. 12, no. 11, pp. 1031–1045, Nov. 2020,
- [119] D. SMID *et al.*, “Tissue microRNAs as predictive markers for gastric cancer patients undergoing palliative chemotherapy,” *Int. J. Oncol.*, vol. 48, no. 6, pp. 2693–2703, Jun. 2016,
- [120] S. Gibot *et al.*, “Combination Biomarkers to Diagnose Sepsis in the Critically Ill Patient,” *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 186, no. 1, pp. 65–71, Jul. 2012,
- [121] X. Zhang *et al.*, “Screening and Identification of Six Serum microRNAs as Novel Potential Combination Biomarkers for Pulmonary Tuberculosis Diagnosis,” *PLoS One*, vol. 8, no. 12, p. e81076, Dec. 2013,
- [122] J. SONG *et al.*, “Serum microRNA-21 levels are related to tumor size in gastric cancer patients but cannot predict prognosis,” *Oncol. Lett.*, vol. 6, no. 6, pp. 1733–1737, Dec. 2013,
- [123] H. Ogata-Kawata *et al.*, “Circulating exosomal microRNAs as biomarkers of colon cancer,” *PLoS One*, vol. 9, no. 4, 2014,
- [124] M. Phay, H. H. Kim, and S. Yoo, “Dynamic Change and Target Prediction of Axon-Specific MicroRNAs in Regenerating Sciatic Nerve,” *PLoS One*, vol. 10, no. 9, p. e0137461, 2015,
- [125] A. Rinaldi *et al.*, “Stress induces region specific alterations in microRNAs expression in mice,” *Behav Brain Res*, vol. 208, no. 1, pp. 265–269, 2010,
- [126] B. Kumari *et al.*, “Dynamic changes in global microRNAome and transcriptome reveal complex miRNA-mRNA regulated host response to Japanese Encephalitis Virus in microglial cells,” *Sci Rep*, vol. 6, p. 20263, 2016,
- [127] X.-Y. Hu, L. Li, H.-T. Wu, Y. Liu, B.-D. Wang, and Y. Tang, “Serum miR-130b level, an ideal marker for monitoring the recurrence and prognosis of primary hepatocellular carcinoma after radiofrequency ablation treatment,” *Pathol. - Res. Pract.*, vol. 214, no. 10, pp. 1655–1660, Oct. 2018,
- [128] X. Cui, Y. Wu, Z. Wang, X. Liu, S. Wang, and C. Qin, “MicroRNA-34a expression is predictive of recurrence after radiofrequency ablation in early hepatocellular carcinoma,” *Tumor Biol.*, vol. 36, no. 5, pp. 3887–3893, May 2015,
- [129] N. Saheb Sharif-Askari, F. Saheb Sharif-Askari, S. Y. Guraya, R. Bendardaf, and R. Hamoudi, “Integrative systematic review meta-analysis and bioinformatics identifies MicroRNA-21 and its target genes as biomarkers for



- colorectal adenocarcinoma," *Int. J. Surg.*, vol. 73, pp. 113–122, Jan. 2020,
- [130] S. Guraya, "Prognostic significance of circulating microRNA-21 expression in esophageal, pancreatic and colorectal cancers; a systematic review and meta-analysis," *Int. J. Surg.*, vol. 60, pp. 41–47, Dec. 2018,
- [131] M. B. Kirschner, J. J. B. Edelman, S. C.-H. Kao, M. P. Vallely, N. van Zandwijk, and G. Reid, "The Impact of Hemolysis on Cell-Free microRNA Biomarkers," *Front. Genet.*, vol. 4, 2013,
- [132] Martin Franck, "Prognostische Bedeutung und Einflussfaktoren der miR-122-Konzentration im Serum von Patienten mit hepatozellulärem Karzinom," Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, 2017.
- [133] Y. Toiyama *et al.*, "Serum miR-21 as a Diagnostic and Prognostic Biomarker in Colorectal Cancer," *JNCI J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 105, no. 12, pp. 849–859, Jun. 2013,
- [134] A. Link and J. Kupcinskis, "MicroRNAs as non-invasive diagnostic biomarkers for gastric cancer: Current insights and future perspectives," *World J. Gastroenterol.*, vol. 24, no. 30, pp. 3313–3329, Aug. 2018,
- [135] J. Vandesompele *et al.*, "Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes.," *Genome Biol.*, vol. 3, no. 7, 2002,
- [136] N. Saheb Sharif-Askari, F. Saheb Sharif-Askari, S. Y. Guraya, R. Bendardaf, and R. Hamoudi, "Integrative systematic review meta-analysis and bioinformatics identifies MicroRNA-21 and its target genes as biomarkers for colorectal adenocarcinoma," *Int. J. Surg.*, vol. 73, pp. 113–122, 2020,

## **Danksagung**

Ich widme diese Doktorarbeit den Patienten, die sich regelmäßig bereit erklären, an klinischen Studien teilzunehmen und so helfen, die medizinische Versorgung ständig weiterzuentwickeln. Ebenso all denjenigen, die konstant die Forschung vorantreiben und unzählige Stunden Arbeit in Forschungsprojekte aufwenden.

Ebenso möchte ich herzlichst bei Cosima Thon für die Betreuung im Labor, sowie bei meinem Betreuer Prof. Dr. med. Alexander Link bedanken. Auch möchte ich mich bei den Mitarbeiter/innen des Instituts für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie für die freundliche Unterstützung bedanken, hierbei insbesondere bei Frau Ursula Stolz sowie Simone Philipsen.

Ebenso gebührt ein Dank PD. Dr. med. K. Mohnike, Prof. Dr. med. J. Ricke, sowie Prof. Dr. med. Maciej Pech, die die Forschungsarbeit in Zusammenarbeit mit der Universitätsklinik für Radiologie und Nuklearmedizin der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg möglich gemacht haben.

Ebenso danke ich für das Korrekturlesen sowie Anregungen und Kritik meinen Eltern Hanna und Rudolf Schmelter und meiner Schwester Dr. med. Ulla Mersmann sowie ihrem Ehemann Dr. Tobias Mersmann. Auch möchte ich meiner Freundin und Lebenspartnerin Catrin Fock danken, für ihre unermüdlich Unterstützung in allen Lebenslagen.

## **Ehrenerklärung**

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

**„Charakterisierung von microRNA Dynamik durch lokalablative Therapie bei Patienten mit kolorektalem Karzinom“**

in der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie sowie der Klinik für Radiologie und Nuklearmedizin der Universitätsklinik der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

mit Unterstützung durch **Prof. Dr. med. Alexander Link**  
**Prof. Dr. med. Maciej Pech**  
**PD. Dr. med. K. Mohnike**  
**Prof. Dr. med. J. Ricke**

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Boniswil, 15.05.2023

## **Darstellung des Bildungsweges**

Der Lebenslauf ist in der Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.

## **Darstellung des Bildungsweges**

Der Lebenslauf ist in der Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.