

Aus der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie
der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

MicroRNA in Aszites als potentielle Biomarker für
Peritonealkarzinose und Peritonitis.

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

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

vorgelegt von	Philipp Schindler
aus	Magdeburg
Magdeburg	2017

Dokumentationsblatt

Bibliographische Beschreibung:

Schindler, Philipp

MicroRNA in Aszites als potentielle Biomarker für Peritonealkarzinose und Peritonitis.
- 2017. – 76 Bl., 10 Abb., 5 Tab., 5 Anl.

Kurzreferat

Die Peritonealkarzinose (PCA) ist ein häufiges Ereignis bei gastrointestinalen Tumoren mit entscheidender prognostischer und therapeutischer Relevanz für die Patienten. Die Differentialdiagnose zur spontan bakteriellen Peritonitis (SBP) oder zu unkompliziertem Aszites durch portale Hypertonie (PHT) ist nicht immer einfach, wobei die Zytologie trotz ihrer geringen Sensitivität den Goldstandard bildet. MicroRNA (miRNA) gelten als vielversprechende Biomarker und sind bei Tumoren oftmals fehlreguliert. Die vorliegende Arbeit evaluiert das Potential von miRNA als Aszites-Biomarker für die PCA. Alle ausgewählten miRNA waren relativ einfach und reproduzierbar in den Aszitesproben nachweisbar und zeigten signifikante Expressionsunterschiede bei Patienten mit PCA und SBP. Basierend auf diesen Ergebnissen kann die Analyse von miRNA in Aszites neue Ansätze für die Diagnose und Therapie der PCA bieten.

Schlüsselwörter: Aszites, miRNA, Peritonealkarzinose, Peritonitis

Indexverzeichnis

Dokumentationsblatt	I
Indexverzeichnis	II
Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einführung	1
1.1 Peritonealkarzinose	1
1.1.1 Ätiologie und Epidemiologie	1
1.1.2 Klinik und Diagnose	2
1.1.3 Therapie	3
1.2 Spontan bakterielle Peritonitis	5
1.2.1 Ätiologie und Epidemiologie	5
1.2.2 Klinik und Diagnose	6
1.2.3 Therapie	7
1.3 Herausforderungen in der Diagnostik von PCA und SBP	8
1.4 MiRNA als Biomarker	9
1.4.1 Biogenese und Funktion	9
1.4.2 MiRNA und ihre Rolle in der Karzinogenese	11
1.5 Ziel der Studie	14
2 Material und Methoden	15
2.1 Studiendesign	15
2.1.1 Teil 1 – Präanalytik	15
2.1.2 Teil 2 – Charakterisierung der miRNA-Expression bei Patienten mit Aszites	16
2.2 Eigenanteil	16
2.3 Patienten und Proben	17
2.3.1 Patientencharakterisierung	17
2.3.2 Zytologie und klinische Chemie	18
2.3.3 Probengewinnung und –verarbeitung	19
2.4 miRNA-Extraktion	19
2.4.1 Extraktion mit dem miRNeasy-Kit	20
2.4.2 Extraktion mit dem mirVana-Kit	20
2.4.3 Extraktion mit der TRIzol-Reagenz	20
2.5 MiRNA profiling per TaqMan low density array (TLDA)	21

2.6	qRT-PCR-Analyse	22
2.7	Statistische Analyse.....	23
3	Ergebnisse	24
3.1	Extraktion und Reproduzierbarkeit	24
3.2	MiRNA-Stabilität	26
3.3	MiRNA-Gehalt in verschiedenen Probenquellen	26
3.4	MiRNA-Profilung in Aszitesproben.....	28
3.5	Validierung der miRNA-Expressionsveränderungen	30
4	Diskussion	33
4.1	Studiendesign	33
4.2	Nachweis und Eigenschaften von miRNA in Aszites.....	34
4.3	Aszites miRNA als diagnostische und prognostische Biomarker für Peritonealkarzinose und Peritonitis	37
4.4	Offene Fragen und klinische Umsetzung.....	40
5	Zusammenfassung.....	43
6	Literaturverzeichnis	44
	Danksagung.....	58
	Ehrenerklärung	59
	Darstellung des Bildungsweges.....	60
	Anlagen.....	62

Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung(en)
AGO	Argonaute
Anl.	Anlage(n)
Bl	Blätter
bp	Basenpaare
bzw	beziehungsweise
cDNA	komplementäre Desoxyribonucleinsäure
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CRC	Kolorektales Karzinom
CRS	zytoreduktive Chirurgie
Ct	<i>cycle threshold</i>
CT	Computertomographie
CUP	<i>cancer of unknown primary</i>
DGCR8	<i>DiGeorge syndrome critical region gene 8</i>
ds	Doppelstrang
E. coli	Escherichia coli
g	Beschleunigungskonstante
h	Stunde(n)
HBV	Hepatitis B-Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HDL	<i>high-density lipoprotein</i>
HIPEC	hypertherme intraperitoneale Chemotherapie
HTqPCR	<i>high-throughput quantitative Polymerase-Kettenreaktion</i>
l	Liter
LDH	Laktatdehydrogenase
MELD	<i>model of end-stage liver disease</i>
min	Minuten
miRNA	microRNA
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MRT	Magnetresonanztomographie
nM	nanomolar

NOD	<i>nucleotide-binding oligomerization domain</i>
OP	Operation
PCA	Peritonealkarzinose
PCI	<i>peritoneal cancer index</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PET-CT	Positronenemissionstomographie
PHT	unkomplizierte portale Hypertension
PMNs	neutrophile Granulozyten
qRT-PCR	quantitative <i>real-time</i> Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonucleinsäure
RT	reverse Transkriptase
SBP	spontan bakterielle Peritonitis
SD	Standardabweichung
snRNA	<i>small nucleolar RNA</i>
Tab	Tabelle(n)
TLDA	TaqMan low density array
TLR	Toll-like-rezeptor
TRBP	<i>transactive response RNA-binding protein</i>
u.a.	unter anderem
VEGF	Vascular endothelial growth factor
XPO5	RanGTP-abhängiges dsRNA-bindendes Protein Exportin 5
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
µl	Mikroliter

1 Einführung

1.1 Peritonealkarzinose

Gastrointestinale Tumoren gehören trotz großem Fortschritt in unserem Verständnis ihrer Ätiologie und Molekulargenetik zu den führenden Ursachen der weltweiten Krebsbelastung [1,2]. Nahezu alle gastrointestinalen Neoplasien (insbesondere Magenkarzinome, Pankreaskarzinome, Kolorektale Karzinome und Hepatozelluläre Karzinome) entwickeln sich dabei über viele Jahre ohne das Auftreten von kritischen Symptomen. Dadurch erfolgt die Diagnosestellung oftmals erst im fortgeschrittenen Tumorstadium verbunden mit schlechten Überlebensraten und der Gefahr der weiteren Ausbreitung in die Peritonealhöhle [3,4].

1.1.1 Ätiologie und Epidemiologie

Die Peritonealkarzinose (PCA) als flächenhafte Ausbreitung von Tumorzellen über das Peritoneum wurde erstmals von Sampson im Jahre 1931 anhand des Ovarialkarzinoms beschrieben [5]. Heutzutage unterscheidet man primäre (peritoneales Mesotheliom oder papilläres seröses Peritonealkarzinom) von den viel häufiger auftretenden sekundären peritonealen Neoplasien, die im Rahmen der Metastasierung gynäkologischer und gastrointestinaler Tumoren in die Peritonealhöhle entstehen [6]. Eine Sonderform stellt das *Pseudomyxoma peritonei* als von der Appendix ausgehendes muzinöses Adenokarzinom dar [7]. Pathophysiologisch erfolgt die peritoneale Tumorzellaussaat meist nach expansivem, kapselüberschreitendem Tumorwachstum und Infiltration der Serosa [8]. Begünstigt wird dies durch das reichliche Vorkommen von Wachstumsfaktoren und Chemokinen im (sub-)peritonealen Stroma [9]. Daneben können eine iatrogene Tumorzellverschleppung bei Resektion des Primärtumors sowie die hämatogene und lymphogene Metastasierung der Entstehung einer PCA zu Grunde liegen [8].

Tabelle 1 zeigt die Inzidenz der PCA für verschiedene Tumoren nach Piso *et al.* 2011 [10].

Tabelle 1: Inzidenz der PCA für verschiedene Tumoren

Tumor	Inzidenz der PCA
Kolorektales Karzinom	15 – 20% wenn isoliert 20 – 30% wenn metastasiert, z.B. Leber
Magenkarzinom	10 – 20% bei Erstdiagnose 30 – 40% für T3N+ Primärtumor 40 – 50% bei Rezidiv
Ovarialkarzinom	60 – 80% bei Erstdiagnose 55 – 75% bei Rezidiv
Pankreaskarzinom und cholangiozelluläres Karzinom	5 – 10%
Cancer of unknown primary (CUP), Mammakarzinom, Nierenzellkarzinom, retroperitoneales Sarkom	< 5%

(modifiziert nach Piso *et al.* [10])

Dabei geht der natürliche Verlauf einer PCA mit einer infausten Prognose einher. Chu *et al.* zeigten in ihrer prospektiven Studie von 100 Tumorpatienten mit PCA ein mittleres Überleben von 6 Monaten für Patienten mit Kolorektalem Karzinom, 1 Monat für Patienten mit Magenkarzinom und 0,7 Monaten für Patienten mit Pankreaskarzinom [11]. Ähnlich schlecht war die Prognose der französischen EVOCAPE-1-Studie, die 370 Patienten mit PCA von nicht gynäkologischen Neoplasien evaluierte, wobei die mittlere Gesamtüberlebenszeit 3,1 Monate betrug [6].

1.1.2 Klinik und Diagnose

Das Anfangsstadium der PCA bleibt klinisch meist inapparent und geht lediglich mit unspezifischen abdominellen Beschwerden einher. Mit fortgeschrittenem Krankheitsverlauf und Zunahme der Tumormasse können Aszites und eine reduzierte Darmmotilität bis zum Ileus auf eine PCA hindeuten. Lassen sich beim Vorhandensein von Aszites Tumorzellen zytologisch nachweisen, gilt die Diagnose einer PCA als nahezu sicher [12]. Darüber hinaus stehen bildgebende Verfahren wie die Computertomographie (CT), Magnetresonanztomographie (MRT) und

Positronenemissionstomographie (PET-CT) zur ergänzenden Diagnostik, vor allem in fortgeschrittenen Stadien, sowie zur OP-Planung zur Verfügung [13,14]. Letztlich bedarf es in einigen Fällen der diagnostischen Laparoskopie, um die Diagnose einer PCA histologisch zu sichern und das genaue Ausmaß der Tumordissemination zu bestimmen [15]. In diesem Zusammenhang hat sich der *peritoneal cancer index* (**Abbildung 1**) etabliert [16]. Vor allem beim Magenkarzinom wird er sehr häufig z.B. im Rahmen von Studien zur Prognoseabschätzung angewendet [17].

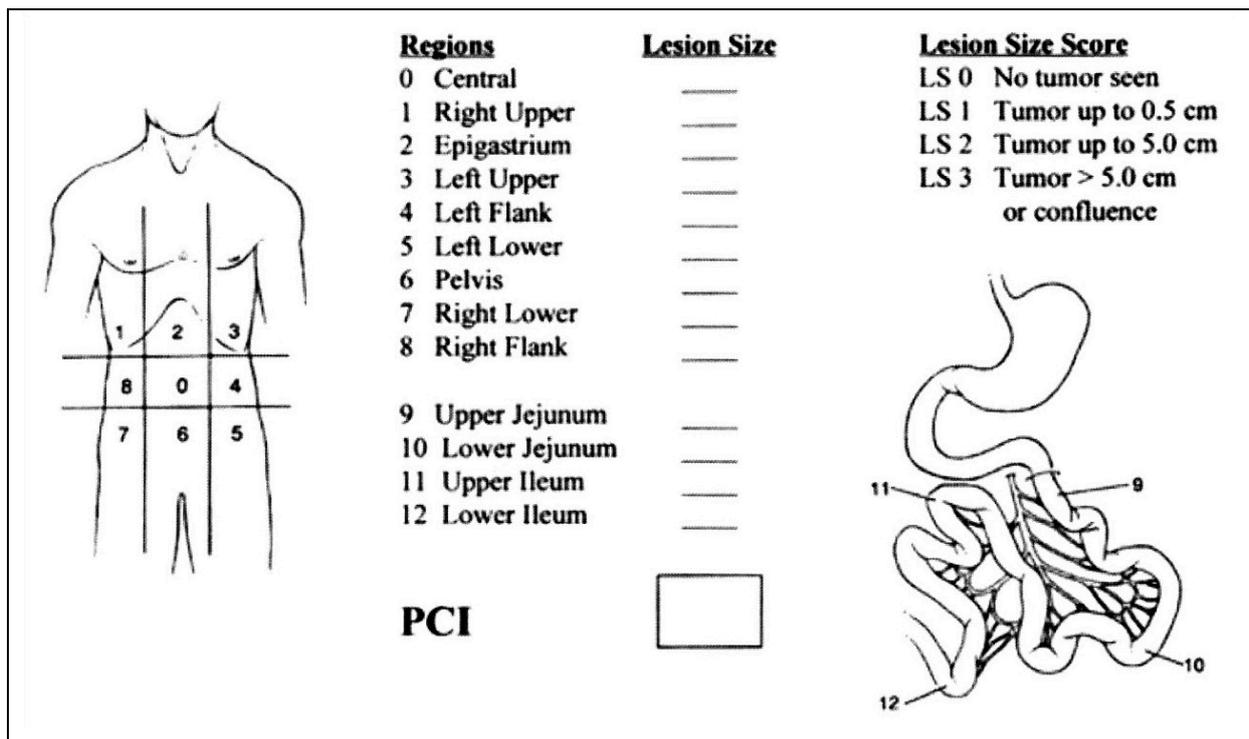


Abbildung 1: peritoneal cancer index (PCI). Die Peritonealhöhle ist in 13 Abschnitte unterteilt (0-12), wobei jede Region 0-3 Punkte je nach Größe der Tumorknoten erhält. Aufsummiert (0-39 Punkte) quantifiziert dieser Score die Ausdehnung der PCA. (nach Sugarbaker *et al.* [18])

1.1.3 Therapie

Lange Zeit wurde die PCA als Endstadium einer metastasierten Tumorerkrankung mit infauster Prognose aufgefasst, während lediglich palliative Therapieansätze wie eine systemische Chemotherapie erprobt waren. Neue Hoffnung keimte mit der Entdeckung der zytoreduktiven Chirurgie (CRS) und der hyperthermen intraperitonealen Chemotherapie (HIPEC) auf. Spratt *et al.* beschrieben erstmals 1980 die Kombination von CRS und HIPEC als neuen Therapieansatz bei einem Patienten mit peritoneal disseminiertem, muzinösen Appendixkarzinom [19]. Folglich

prägte besonders Sugarbaker dieses neue Therapiekonzept und etablierte die Sichtweise, dass das Auftreten einer PCA als lokal begrenzte Tumorerkrankung mit potentiell kurativem Therapieansatz zu betrachten ist [20,21]. Das Konzept dieser Therapie besteht darin, mit der CRS die vollständige Resektion der makroskopisch sichtbaren Tumormasse zu erreichen, ehe die direkt in die Peritonealhöhle applizierte HIPEC die nur noch mikroskopisch sichtbaren Residuen eliminiert. Mittlerweile ist die Kombination aus CRS und HIPEC weltweit anerkannt und als Standardtherapie für das peritoneal disseminierte, muzinöse Appendixkarzinom etabliert [22]. Darüberhinaus zeigten diverse Studien kürzlich signifikant verlängerte Überlebenszeiten für Patienten mit PCA, die sich einer CRS und HIPEC unterzogen, gegenüber denjenigen, die nur systemisch chemotherapiert wurden (**Tabelle 2**).

Tabelle 2: Mittleres Überleben von Patienten mit PCA unter intraperitonealer Therapie (CRS/HIPEC) gegenüber systemischer Therapie

Tumor	Mittleres Überleben [Monate]		Studien
	CRS/HIPEC	Systemisch	
Appendixkarzinom	196	117,6*	Chua 2012 [23], Miner 2005 [24]
Kolorektales Karzinom	62,7	23,9	Esquivel 2014 [25]
Magenkarzinom	11,3	4,3	Rudloff 2014 [26]
Mesotheliom	92	12,1	Feldman 2003 [27], Vogelzang 2003 [28]

* mehrfache CRS allein, (modifiziert nach Lambert *et al.* [29])

Trotz dieser vielversprechenden Zahlen ist das multimodale Therapiekonzept aus CRS und HIPEC für die Mehrheit der Patienten wegen des Vorliegens von extraperitonealen Metastasen, ausgedehntem Tumorbefall des Dünndarms und schlechtem Allgemeinzustand häufig nicht geeignet [29]. In diesem Falle stellen die palliative Chemotherapie und *best supportive care*-Maßnahmen die einzigen Behandlungsoptionen dar.

1.2 Spontan bakterielle Peritonitis

Zu den wichtigsten Differentialdiagnosen für Aszites unter Patienten mit malignen Erkrankungen zählen neben der PCA u.a. die infektiöse Peritonitis und portale Hypertension bei vorhandener oder fehlender primärer Lebererkrankung. Die spontan bakterielle Peritonitis (SBP) ist dabei einer der häufigsten, wobei insbesondere Patienten mit Leberzirrhose und Aszites die Risikogruppe einer SBP stellen.

1.2.1 Ätiologie und Epidemiologie

Die SBP wurde 1907 erstmals von Krencker beschrieben und als derartiger Begriff von Conn im Jahre 1964 als Infektion von Aszites ohne Vorliegen einer intestinalen Läsion definiert [30,31]. Sie gilt als potenziell lebensbedrohliches Krankheitsbild mit einer Mortalität von bis zu 50%, während die Prävalenz zwischen 10 – 30% unter hospitalisierten Patienten liegt [32–34]. **Abbildung 2** skizziert die Pathophysiologie der SBP.

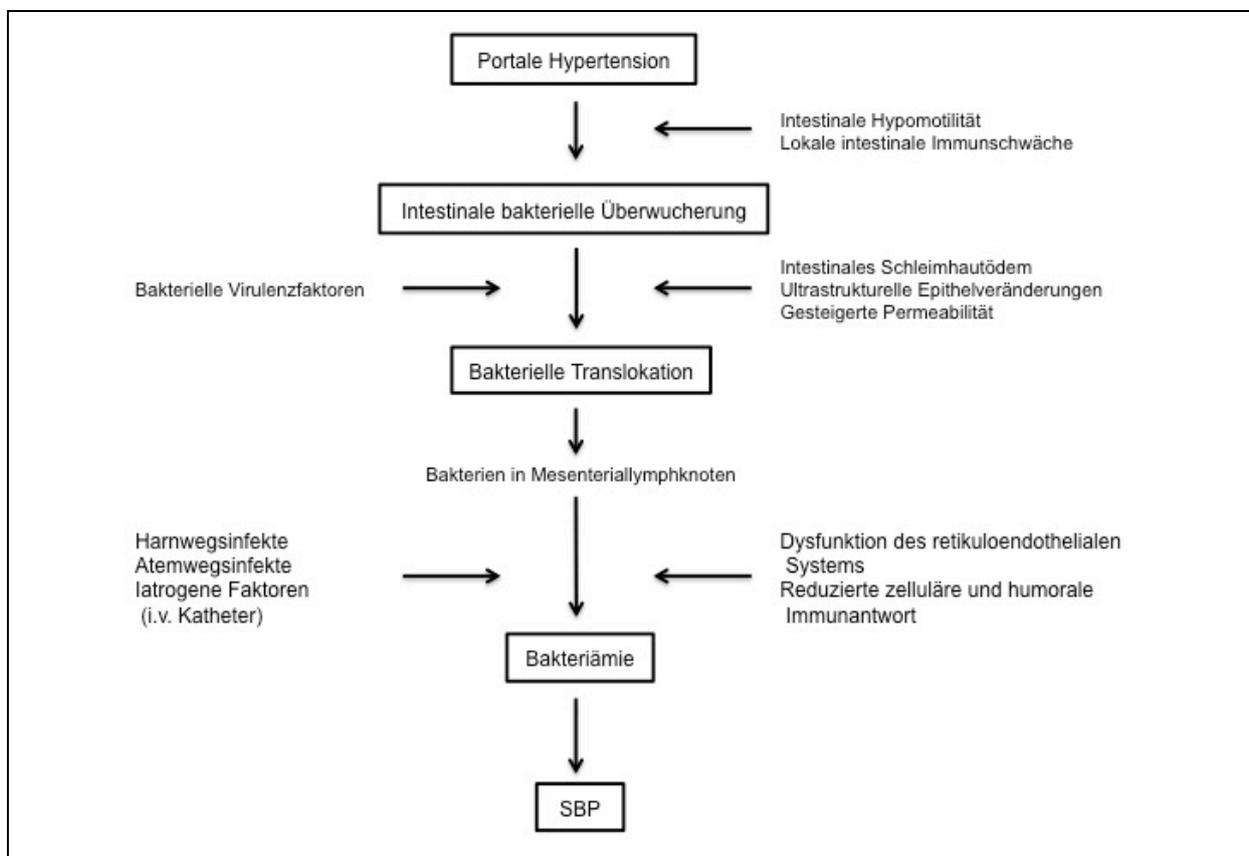


Abbildung 2: Pathophysiologie der spontan bakteriellen Peritonitis (SBP) (modifiziert nach Such *et al.* [35] und Schmid *et al.* [36])

In einem der ersten Schritte in der Pathogenese der SBP begünstigt die intestinale Hypomotilität bei Patienten mit Leberzirrhose und portaler Hypertension die bakterielle Überwucherung des Darms [37]. Die erhöhte Permeabilität der intestinalen Schleimhaut bei Patienten mit Leberzirrhose erleichtert den als Transformation bezeichneten Durchtritt der Bakterien vom Darm in die mesenterialen Lymphknoten, wobei am häufigsten *E. coli* nachzuweisen ist [38–40]. Während eine verminderte Aktivität des retikuloendothelialen Systems die Ausbildung einer Bakteriämie fördert, können auch andere Infektionsherde, z.B. innerhalb der Harn- und Atemwege, eine Bakteriämie hervorrufen [33,41]. Im Zuge einer fortschreitenden Bakteriämie dringen die Bakterien in den Aszites ein und führen zur Entwicklung einer SBP, wenngleich der Bakteriennachweis bei z.B. niedriger Keimzahl oder schlechten Kulturbedingungen nicht immer gelingt [40]. Prädisponierende Faktoren sind insbesondere die gastrointestinale Blutung, erniedrigte Aszites-Protein-Spiegel neben erhöhten Bilirubin-Spiegeln bei fortgeschrittener Leberzirrhose sowie u.a. genetische Variationen in den TLR- oder NOD-Genen [40].

1.2.2 Klinik und Diagnose

Patienten mit SBP befinden sich meist in einem fortgeschrittenen Stadium ihrer Leberzirrhose, wobei die Höhe des *model of end-stage liver disease* (MELD) score mit dem Risiko, eine SBP zu entwickeln, korreliert [42].

Tabelle 3: Diagnose der SBP und anderer Varianten

Klassifikation	Aszitesuntersuchung
<u>Varianten der SBP</u>	
SBP (Kultur positiv)	PMNs \geq 250/mm ³ , positive Kultur
SBP (Kultur negativ)	PMNs \geq 250/mm ³ , negative Kultur
Bakteraszites	PMNs \leq 250/mm ³ , positive Kultur
<u>Differentialdiagnose bei Vorliegen eines abdominellen Infektfokus</u>	
Sekundäre Peritonitis	PMNs \geq 250/mm ³ , positive Kultur

Abkürzungen: PMNs, neutrophile Granulozyten; (modifiziert nach Dever *et al.* [40])

Klinisch können Fieber, Abdominalschmerzen, hepatische Enzephalopathie, Verschlechterung der Nierenfunktion, aber auch eine reduzierte Darmmotilität auf

eine SBP hinweisen. Dennoch wird die Diagnose im Rahmen der laborchemischen Untersuchung des Aszitespunktats basierend auf der Zahl der neutrophilen Granulozyten (PMNs) und dem Ergebnis der Asziteskultur gestellt (**Tabelle 3**).

Dabei unterscheidet man die SBP im klassischen Sinne mit $\text{PMNs} \geq 250/\text{mm}^3$ und einer positiven Asziteskultur von der kulturnegativen SBP. Letztere ist Ergebnis schlechter Kulturbedingungen, bereits begonnener Antibiotikatherapie oder einer reduzierten Aktivität des Komplementsystems im Aszites [40]. Eine Sonderform stellt der Bakteraszites dar. Dieser beschreibt die bakterielle Besiedlung des Aszites ohne entzündliche Reaktion und erfordert wie die SBP gleichermaßen eine Antibiotikatherapie [43]. Davon abzugrenzen ist die sekundäre Peritonitis, ausgehend von einem abdominellen Infektfokus bzw. einer Läsion (z.B. perforierende Divertikulitis, Cholezystitis, Abszess, Appendizitis).

1.2.3 Therapie

Bei klinischem Verdacht auf eine SBP (Fieber, Abdominalschmerzen, hepatische Enzephalopathie) oder andernfalls bei $\text{PMNs} \geq 250/\text{mm}^3$ sollte umgehend mit einer empirischen, intravenösen Antibiotikatherapie aus Cephalosporinen der 3. Generation oder alternativ Fluorchinolonen begonnen werden, um Komplikationen wie Nierenversagen, Schock und Enzephalopathien und damit einhergehende schlechtere Überlebensraten zu verhindern [40]. Entsprechend der Asziteskultur und Resistogramm kann das Therapieregime gegebenenfalls umgestellt werden [44]. Darüberhinaus zeigten Sort *et al.* in ihrer Arbeit, dass eine um Albumin ergänzte Antibiotikatherapie zu niedrigeren Raten von Niereninsuffizienz und Mortalität gegenüber Patienten führte, die ausschließlich Antibiotika erhielten [45]. Nichtsdestotrotz erfordert die hohe Rezidivrate von 40 bis zu 70% innerhalb eines Jahres eine Langzeit- oder bis zur Lebertransplantation andauernde antibiotische Sekundärprophylaxe [46,47]. Zudem bleibt die Prognose nach stattgehabter SBP mit einer 1-Jahres-Überlebensrate von ca. 30% schlecht [48].

1.3 Herausforderungen in der Diagnostik von PCA und SBP

Neben der PCA kommen wie bereits erwähnt einige Differentialdiagnosen bei vorliegendem Aszites unter Tumorpatienten in Betracht, insbesondere die SBP und unkomplizierte portale Hypertension (PHT) bei ggf. vorbestehender Lebererkrankung. Zur Diagnostik eines malignen Aszites bei bestehender PCA haben sich die in **Tabelle 4** genannten Parameter etabliert.

Tabelle 4: Parameter zur Aszitesdiagnostik bei PCA

Parameter	Spezifität (%)	Sensitivität (%)
Zytologie	100	60
Tumormarker, z.B. CEA	100	60
Aszites-Gesamteiweiß	70	75
Aszites-Cholesterin	70	80
Aszites/Serum-LDH	75	60

Abkürzungen: CEA, carcinoembryonales Antigen; LDH, Laktatdehydrogenase; alle Werte entsprechend gerundet. (modifiziert nach Wiest *et al.* [49])

Die Aszites-Zytologie bildet den Goldstandard und ermöglicht die definitive Diagnose mit hoher Spezifität. Nichtsdestotrotz liegt die Sensitivität dieser Methode bei nur ungefähr 60% und offenbart potentielle diagnostische Schwächen, wobei nicht alle Peritonealkarzinome ihre Zellen in das Peritoneum absondern [44,50]. Zusätzlich kann eine erhöhte Anzahl von reaktiv veränderten Mesothel- und Entzündungszellen (Granulozyten, Lymphozyten, Makrophagen) die Diskrimination zwischen PCA und SBP bei negativer Zytologie erschweren. Mit ähnlich hoher Spezifität, aber ebenso eingeschränkter Sensitivität, kann die Bestimmung von Tumormarkern zur Diagnosesicherung herangezogen werden [50]. Der Einsatz der übrigen Laborparameter wie Gesamteiweiß, Cholesterin oder LDH erlaubt keine sichere Unterscheidung zwischen PCA und nichtmalignem Aszites und wird aktuell nicht mehr empfohlen [44]. Allerdings ist die definitive Diagnose von größter Bedeutung, insbesondere vor dem Hintergrund der Konsequenzen hinsichtlich eines Tumorprogresses oder einer erforderlichen Langzeit-Antibiotikatherapie [51]. Trotz intensiver Forschung besteht nur geringer Fortschritt in der Entwicklung von alternativen molekularbasierten Methoden zur Diagnose von PCA und SBP. Neue Ansätze bilden die Bestimmung von Zytokinen bzw. Signalmolekülen wie dem

vascular endothelial growth factor (VEGF). Unter der Annahme, dass diese Moleküle vom peritoneal infiltrierenden Tumor freigesetzt werden und neben der mechanischen Okklusion der Lymphabflusswege durch die Zytokin- bzw. VEGF-vermittelte Neovaskularisation und Steigerung der Gefäßpermeabilität die Aszitesbildung unterhalten, konnten bereits höhere VEGF-Spiegel in malignem Aszites nachgewiesen werden [52]. Allerdings ist dieses Verfahren noch nicht in die klinische Routine implementierbar und so verbleibt die Herausforderung nach neuen nicht-invasiven Diagnostiktools zur Differenzierung von PCA und SBP.

1.4 MiRNA als Biomarker

Sowohl PCA als auch SBP sind assoziiert mit stark erniedrigten Überlebensraten, wobei die deutlich beschränkten diagnostischen und vor allem therapeutischen Möglichkeiten die klinische Relevanz dieser Problematik verdeutlichen. Daher ergibt sich zwangsläufig die Notwendigkeit neue nicht-invasive Biomarker zu identifizieren, die der Früherkennung von Krankheiten und der Entwicklung neuer Behandlungsstrategien dienen. Ein Biomarker wird definiert als charakteristisches Merkmal, das objektiv messbar ist und sich als Indikator für physiologische und pathologische Prozesse sowie die pharmakologische Wirksamkeit in Abhängigkeit von therapeutischen Interventionen eignet [53]. Idealerweise sind Biomarker einfach und nicht-invasiv in Körperflüssigkeiten nachweisbar und weisen ein zell- und gewebespezifisches Expressionsmuster auf.

1.4.1 Biogenese und Funktion

Im Jahre 1993 beschrieben Ambros und Ruvkun erstmals kurze, nicht-kodierende RNA Moleküle, die 2001 als microRNA (miRNA) definiert wurden [54–57]. MiRNA wurden als essentielle Regulatoren von physiologischen und pathologischen Prozessen identifiziert, in dem sie zahlreiche mRNA kontrollieren und folglich einen enormen Einfluss auf die Expression Protein-kodierender Gene haben [58–60]. **Abbildung 3** illustriert exemplarisch die miRNA-Biogenese [61]. Die Biogenese des Primärtranskripts pri-miRNA beginnt im Zellkern vom Genom der Zelle durch die RNA-Polymerase II. Die pri-miRNA wird dann von einem Komplex bestehend aus dem RNase-III-Protein Drosha und dem *DiGeorge syndrome critical region gene 8* (DGCR8) RNA-bindendem Protein zu dem Vorläufermolekül pre-miRNA mit einer

Länge von ca. 70-80 Basenpaaren (bp) gespalten [62,63]. Die pre-miRNA wird daraufhin aktiv über das RanGTP-abhängige dsRNA-bindende Protein Exportin 5 (XPO5) in das Zytoplasma transportiert und dort von einem Komplex aus RNase-III-Protein Dicer und dem TAR RNA-bindendem Protein (TRBP) in die ca. 22bp lange, reife miRNA in Doppelstrangform gespalten, wobei letztendlich nur ein Strang funktionell aktiv bleibt [62,64,65]. Die miRNA bildet schließlich einen Komplex mit einem Protein aus der Argonaute (AGO) Familie und bindet als solche spezifisch ihre Ziel-mRNA, um in Abhängigkeit des gebundenen AGO-Proteins die mRNA zu spalten (AGO2) oder die Translation zu unterdrücken (AGO1-4) oder mRNA-unabhängig im Sinne eines positiven feedback-Mechanismus in die Autoregulation der Biogenese einzugreifen [62,66,67].

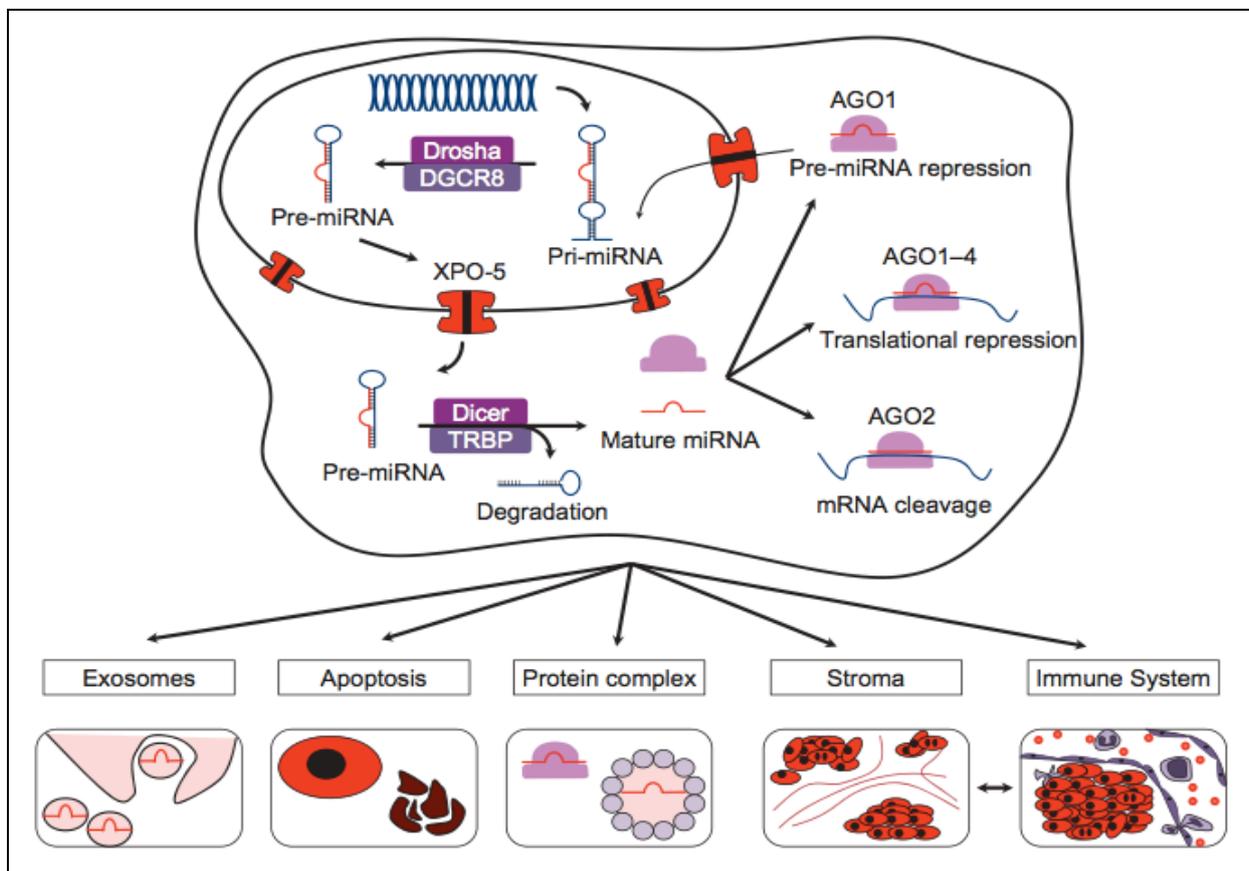


Abbildung 3: miRNA Biogenese und extrazelluläre Zell-Zell-Kommunikation (adaptiert nach Link *et al.* [61])

Vor diesem Hintergrund erscheint es nicht überraschend, dass miRNA zahlreiche intrazelluläre Vorgänge wie Differenzierung, Proliferation und Apoptose beeinflussen [68]. Neben der unmittelbaren aktiven funktionellen Rolle in den Zellen können die

miRNA weiterhin sezerniert werden und ihre Funktion, die Regulation der Geneexpression, in entfernten Zellen ähnlich wie Hormone ausüben. So wurden zahlreiche Zellen beschrieben, die in Exosomen eingehüllte miRNA freisetzen [69,70]. Demgegenüber zirkulieren miRNA auch proteingebunden an AGO2 im Extrazellularraum, vermutlich aktiv sezerniert oder freigesetzt durch Apoptose [71,72]. Interessanterweise werden miRNA auch in Assoziation mit HDL-Proteinen transportiert [73]. Insgesamt vermitteln miRNA darüber die Zell-Zell-Kommunikation und regulieren die Genexpression von anderen Zellen, wobei die zirkulierenden miRNA sowohl direkt den sezernierenden Zellen, z.B. eines Tumors, als auch dem umgebenden und damit assoziierten Stroma und Immunsystem entstammen können, wie in **Abbildung 3** dargestellt.

Mit zunehmendem Verständnis über die Freisetzung von miRNA aus der Zelle beschäftigten sich zahlreiche Forschungsgruppen mit im Extrazellularraum zirkulierenden miRNAs. Lawrie *et al.* beschrieben als erste zirkulierende miRNAs als potentielle diagnostische Marker im Serum von Patienten mit diffusem großzelligem B-Zell-Lymphom [74]. Fast zeitgleich illustrierten Mitchell *et al.* an xenotransplantierten Mäusen mit implantiertem humanen Prostatakarzinom unterschiedliche miRNA-Expressionslevel im Plasma [75]. Seit der Entdeckung von zirkulierender miRNA in Serum und Plasma erbrachten viele Studien den Nachweis von miRNAs in sämtlichen Körperflüssigkeiten und Geweben, wie Fruchtwasser, Muttermilch, Bronchiallavage, Sputum, Liquor, Aszites, Pleuraflüssigkeit, Speichel, Samenflüssigkeit, Urin, Tränenflüssigkeit, Stuhl und Synovia [76–80]. Dabei zeigen miRNAs eine herausragende Stabilität und Schutz vor Abbau im Extrazellularraum wegen ihrer geringen Größe und besonders wegen ihrer Anreicherung in Exosomen und Bindung an Proteinkomplexe [72,75,81].

1.4.2 MiRNA und ihre Rolle in der Karzinogenese

Fehlregulierte miRNA nehmen eine bedeutende Rolle in der Pathogenese von Tumoren und anderen Krankheiten ein [81,82]. Calin *et al.* zeigten anhand der Down-Regulation der miRNA-Gene miR-15 und miR-16 unter Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie erstmals einen Zusammenhang zwischen veränderten miRNA-Genen und der Karzinogenese [83]. Kurze Zeit später erbrachte die gleiche Arbeitsgruppe den ersten Nachweis von somatischen und Keimbahnmutationen in miRNA-Genen abermals an Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie [84].

Viel mehr zeigte die bedeutende Arbeit von Lu *et al.* substantielle Unterschiede im Expressionsmuster von verschiedenen Tumorentitäten auf [85].

Abbildung 4 richtet den Fokus auf fehlregulierte miRNA in gastrointestinalen Tumoren. Interessanterweise existieren miRNA, insbesondere miR-21, die in sämtlichen Tumorentitäten fehlreguliert sind [61]. Für das Magenkarzinom beschrieben Tsujiura *et al.* als eine der ersten vier fehlregulierte miRNA (miR-17-5p, miR-21, miR-106a/b und let-7a) in Plasmaproben von Patienten mit Magenkarzinom gegenüber gesunden Kontrollen [86]. In einer der größten Arbeiten analysierten Liu *et al.* die miRNA-Expression in Serumproben von 164 Magenkarzinompatienten und zeigten dabei erhöhte Expressionslevel von miR-1, miR-20a, miR-27a, miR-34 und miR-423-5p [87].

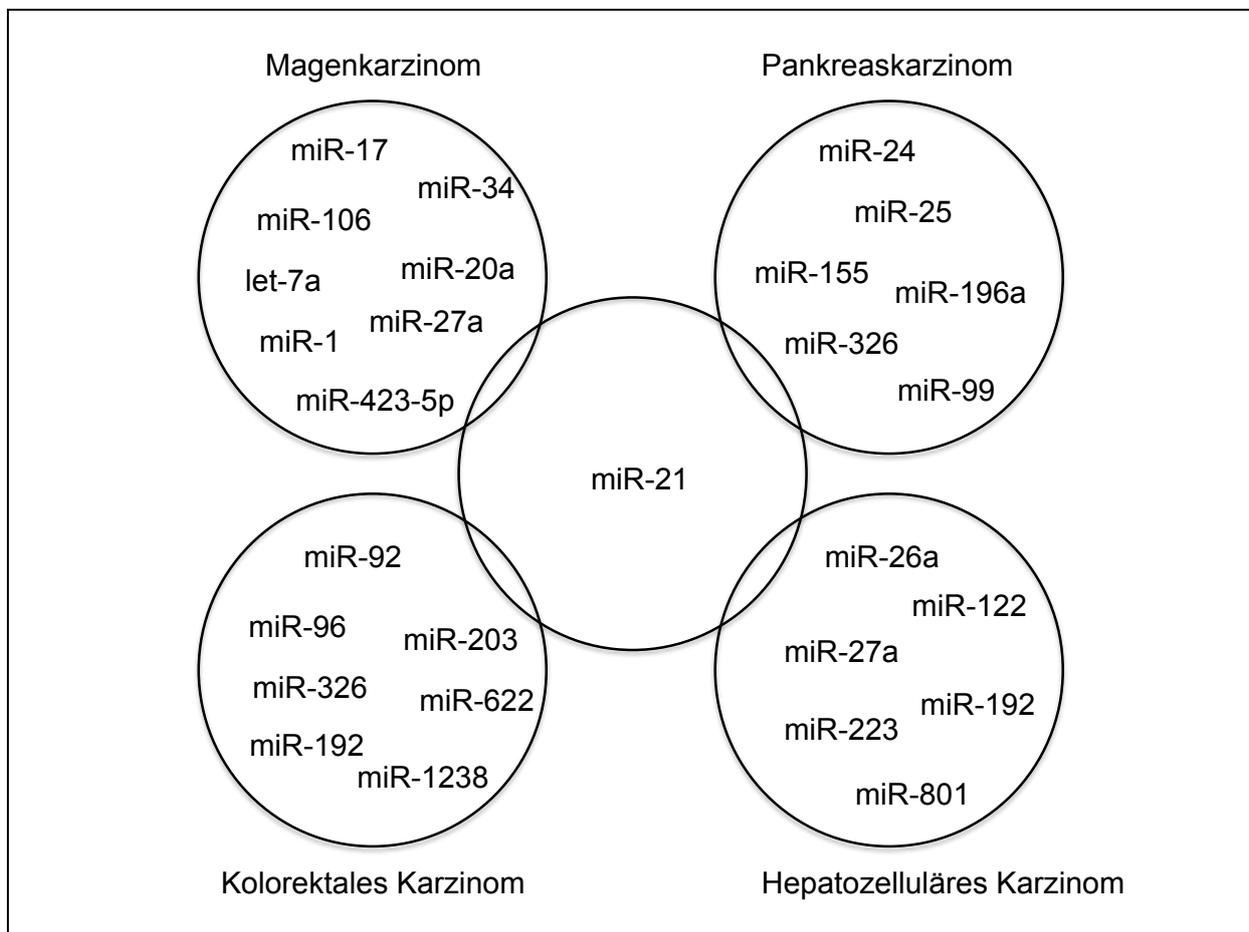


Abbildung 4: Kompendium ausgewählter, fehlregulierter miRNA in gastrointestinalen Tumoren und die zentrale Rolle von miR-21 [61,86–93]

Das Kolorektale Karzinom (CRC) war eines der ersten untersuchten Malignome hinsichtlich der miRNA-Expression [88]. Exemplarisch untersuchten Ahmed *et al.* erstmals die miRNA-Expression von CRC-Patienten anhand ihrer Stuhlproben und beschrieben 15 miRNA (u.a. miR-21, miR-92, miR-96, miR-203, miR-326) als fehlreguliert gegenüber gesunden Probanden [94]. Auch für das Pankreaskarzinom zeigten sich in diversen Arbeiten deutliche Unterschiede im Expressionsmuster von Plasmaproben ausgewählter Tumorpatienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen, so z.B. Wang *et al.* als eine der ersten Arbeitsgruppe miR-21, miR-155, miR-196a und miR-210 [90]. Interessanterweise identifizierten Liu *et al.* in einer weiteren Arbeit u.a. miR-21 als prognostischen Biomarker für das Patientenüberleben, da die miR-21 Expressionsspiegel umgekehrt mit der Überlebenszeit korrelierten [91]. Letztlich beleuchten auch diverse Arbeiten die miRNA-Expression für das Hepatozelluläre Karzinom (HCC). Eine der größten Studien untersuchte Expressionsunterschiede für Hepatitis B-Virus (HBV) assoziierte HCCs in Plasmaproben von nahezu 1000 Probanden [92]. Dabei ergab ein Panel aus 7 miRNA (miR-21, miR-26a, miR-27a, miR-122, miR-192, miR-223 und miR-801) entscheidende Expressionsunterschiede für HCC-Patienten gegenüber gesunden Probanden bzw. Patienten mit Leberzirrhose oder HBV. Darüberhinaus besitzen diverse Tumorsubgruppen eigene spezifische miRNA-Expressionsmuster innerhalb einer bestimmten Tumorentität. So illustrierten Balaguer *et al.* eine Gruppe von miRNA, deren Expressionsmuster zwischen CRC-Patienten mit Lynch-Syndrom und solchen mit mikrosatellitenstabilem bzw. -instabilem CRC deutlich variierten [93].

Obwohl zunehmende Evidenz den potentiellen Nutzen von miRNA als Biomarker sowohl in Blut, Urin und Stuhl als auch in anderen Körperflüssigkeiten und Geweben aufzeigt, stehen nur sehr wenig Daten über den Nutzen von miRNA in Aszites in diesem Zusammenhang zur Verfügung. Weber *et al.* beschrieben als erstes das Vorkommen von miRNA in Aszites innerhalb einer Analyse der miRNA-Expression in sämtlichen Körperflüssigkeiten [76]. Kürzlich publizierten Tokuhisa *et al.* die ersten Daten über die miRNA Expression in Peritonealspülflüssigkeit und Aszites anhand Patienten mit peritoneal metastasiertem Magenkarzinom [95]. Da sich die Arbeit jedoch hauptsächlich auf die Peritonealspülung fokussiert, existieren bis jetzt keine systematischen Analysen von miRNA in Aszites.

1.5 Ziel der Studie

Die vorliegende Arbeit untersucht das Potential von miRNA als Aszites-Biomarker für die PCA und SBP. Vor diesem Hintergrund wurden folgende zwei Teilaspekte untersucht:

1. Einfluss von präanalytischen Faktoren auf miRNA in Aszites

Hierzu wurden die Stabilität von miRNA in Aszites, verschiedene Extraktionsmethoden und weitere bedeutende präanalytische Parameter und deren Einfluss auf die miRNA-Expression systematisch analysiert.

2. MiRNA als Biomarker in Aszites für maligne und entzündliche GI-Erkrankungen

Nachfolgend wurden mit Hilfe von miRNA Array-basiertem Profiling die miRNA-Analyse bei Patienten mit PCA und PHT (nicht-PCA/SBP) durchgeführt und die ausgewählten identifizierten miRNA in unabhängigen Expressionsmessungen validiert.

2 Material und Methoden

Die Doktorarbeit wurde an der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg durchgeführt. Unter Berücksichtigung der Deklaration von Helsinki und den Empfehlungen zur klinischen Forschung an gesunden Probanden wurde dem Studienprotokoll (85/10) von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg zugestimmt und jeder Teilnehmer unterschrieb eine schriftliche Einverständniserklärung vor Studieneinschluss.

2.1 Studiendesign

Die Studie lässt sich generell in 2 große Abschnitte gliedern. Dabei wurde in einem ersten präanalytischen Teil der Einfluss unterschiedlicher Extraktionsmethoden, verschiedener Aszitesbestandteile sowie verschiedener Kurz- und Langzeitlagerungsbedingungen auf die miRNA-Expression in Aszites evaluiert. Darauf aufbauend wurden im zweiten Teil der Arbeit mit einem miRNA Array-basierten Profiling mehrere miRNA identifiziert, die eine unterschiedliche Expression bei Patienten mit und ohne PCA zeigen, und im Folgenden in unabhängigen Experimenten validiert.

2.1.1 Teil 1 – Präanalytik

Das Ziel dieses Abschnitts bestand darin, bei insgesamt 4 Patienten mit Aszites miRNA-Extrahierbarkeit und Stabilität, Reproduzierbarkeit der Messungen sowie die beste Probenquelle und Extraktionsmethode zu evaluieren (**Abbildung 5**). Dazu wurden zur miRNA-Extraktion aus den Aszitesproben sowohl das miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) als auch das mirVana miRNA Isolation Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) und die TRIzol Reagenz (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) verwendet. Darüber hinaus erfolgte die Inkubation eines Teils der Aszitesproben bei Raumtemperatur über jeweils 0 h, 12 h, 24 h und 48 h nach Aszitespunktion bis zur anschließenden Extraktion. Ein anderer Teil wurde sowohl bei -30°C als auch bei -80°C unmittelbar nach Punktion über einen Zeitraum von bis zu 2 Jahren aufbewahrt. Weiterhin wurden den nativen, unverarbeiteten Aszitespunktaten nach entsprechender Verarbeitung die Bestandteile Überstand und Pellet gegenübergestellt.

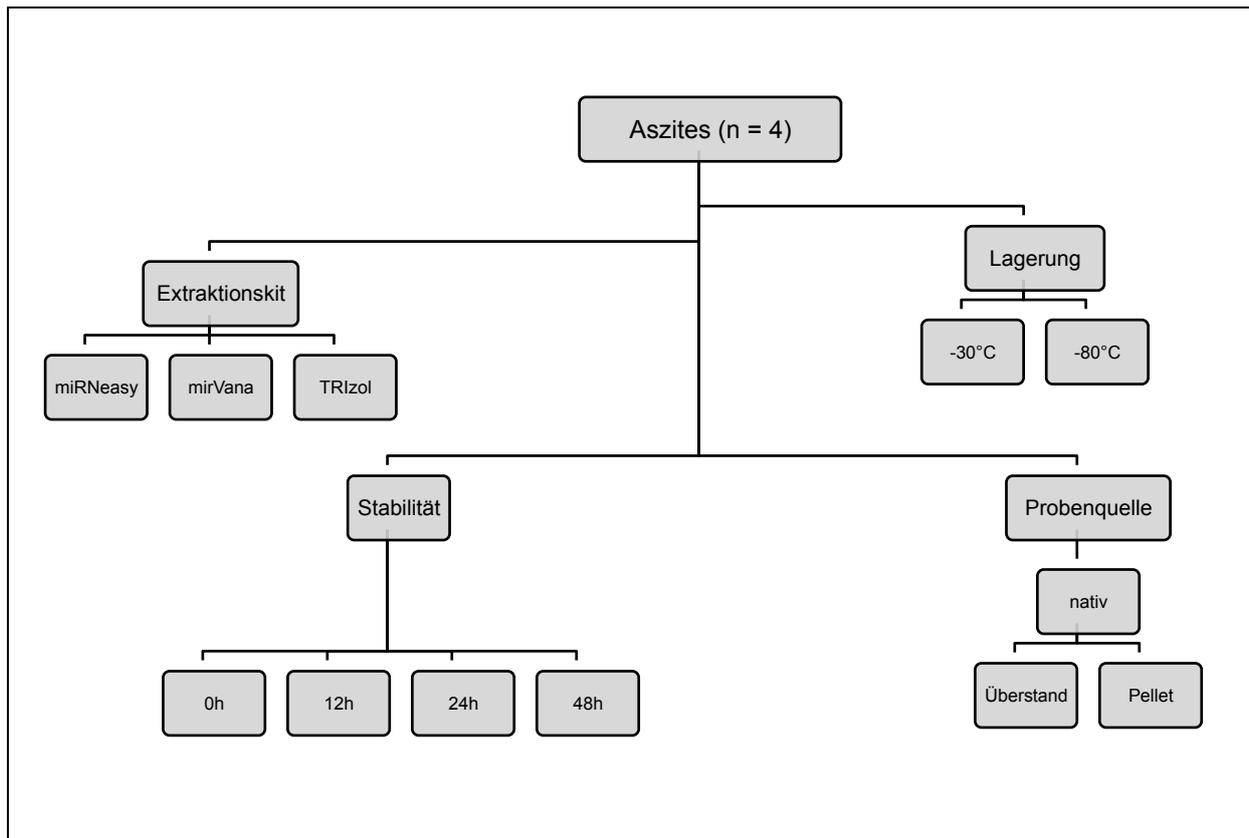


Abbildung 5: Schematische Darstellung der präanalytischen Experimente

2.1.2 Teil 2 – Charakterisierung der miRNA-Expression bei Patienten mit Aszites

Basierend auf den Erkenntnissen aus Teil 1 wurde ein miRNA-Profilung von 23 Aszitesproben durchgeführt. Die dabei identifizierten, unterschiedlich exprimierten miRNA wurden anschließend in unabhängigen Expressionsanalysen weiter validiert. Dazu konnten 45 Patienten mit Aszites eingeschlossen und in 3 Gruppen zu jeweils 15 Patienten mit PCA, SBP und PHT eingeteilt werden. Die Extraktion der nativen und unter -30°C gelagerten Proben erfolgte mit dem miRNeasy-Kit.

2.2 Eigenanteil

Im Rahmen der Promotionsarbeit wurden folgende Teilversuche eigenständig von mir durchgeführt:

- Verarbeitung und Lagerung der Aszitesproben bei Ankunft im Labor (z.T. unterstützend mit Frau U. Stolz)
- RNA-Extraktion (inkl. miRNA) aus den Aszitesproben beider Studienteile

- Quantifizierung der miRNA-Transkriptmengen
- Statistische Auswertung der Ergebnisse (z.T. unterstützend mit PD. Dr. med. A. Link)
- Probenvorbereitung für das miRNA-Profilung in Kaunas in Kollaboration mit Dr. Juozas Kupcinskas
- Mitverfassen des Manuskripts

2.3 Patienten und Proben

Der Einschluss in die prospektive Studie erfolgte, wenn aus medizinischen Gründen eine Indikation zur diagnostischen oder therapeutischen Aszitespunktion bestand sowie nach umfassender Aufklärung über Vorhaben, Nutzen und mögliche Risiken der Studie und anschließender schriftlicher Einwilligung der Patienten.

2.3.1 Patientencharakterisierung

Die Aszitesproben (ca. 25 ml) wurden prospektiv von 45 Patienten mit den folgenden Kriterien während der diagnostischen oder therapeutischen Parazentese gesammelt:

- a) 15 Patienten mit PCA (Nachweis von neoplastischen Zellen in der Zytologie)
- b) 15 Patienten mit SBP (PMNs $\geq 250/\text{mm}^3$ bzw. Gesamtzellzahl $\geq 400/\text{mm}^3$ und/oder positive Bakterienkultur)
- c) 15 Patienten mit PHT (negative Zytologie, PMNs $\leq 250/\text{mm}^3$ und negative Bakterienkultur) [12,40,44,96,97].

Detaillierte Patientenmerkmale sind **Tabelle 5** zu entnehmen. Darüber hinaus wurden Aszitesproben von weiteren 4 Patienten mit verschiedenen Bedingungen für die präanalytischen Untersuchungen verwendet.

Tabelle 5: Klinische Charakterisierung der Patienten

		Peritoneal- karzinose (%)	Spontan bakterielle Peritonitis (%)	Portale Hypertension (%)
Total	45 (100)	15 (33,3)	15 (33,3)	15 (33,3)
Geschlecht				
Weiblich	7 (15,6)	4 (26,7)	2 (13,3)	1 (6,7)
Männlich	38 (84,4)	11 (73,3)	13 (86,7)	14 (93,3)
Alter				
<i>mean</i> ± SD	61,6 ± 10,4	64,4 ± 8,0	62,9 ± 12,2	57,5 ± 10,0
Diagnose				
Pankreaskarzinom	5 (11,1)	5 (33,3)	0 (0)	0 (0)
Magenkarzinom	4 (8,9)	4 (26,7)	0 (0)	0 (0)
Bronchialkarzinom	1 (2,2)	1 (6,7)	0 (0)	0 (0)
Hepatozelluläres Karzinom	6 (13,3)	2 (13,3)	4 (26,7)	0 (0)
Cholangiozelluläres Karzinom	2 (4,4)	1 (6,7)	1 (6,7)	0 (0)
Kolorektales Karzinom	1 (2,2)	1 (6,7)	0 (0)	0 (0)
Ovarialkarzinom	1 (2,2)	1 (6,7)	0 (0)	0 (0)
Chronische Pankreatitis	3 (6,7)	0 (0)	3 (20,0)	0 (0)
Non-Hodgkin Lymphom	1 (2,2)	0 (0)	1 (6,7)	0 (0)
Leberzirrhose	20 (44,4)	0 (0)	5 (33,3)	15 (100,0)
Hepatisch metastasiertes malignes Melanom	1 (2,2)	0 (0)	1 (6,7)	0 (0)

2.3.2 Zytologie und klinische Chemie

Die Aszitesproben wurden hinsichtlich ihrer Zytologie, PMNs und Bakterienkultur von den Instituten für Pathologie, Klinische Chemie und Pathobiochemie sowie Medizinische Mikrobiologie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg im Rahmen der klinischen Routinediagnostik analysiert.

2.3.3 Probengewinnung und –verarbeitung

Während der Aszitespunktion im Rahmen der klinischen Routine erfolgte die Abnahme von etwa 25 ml Aszites direkt in 2 Vacutainer-Röhrchen ohne Zusatzstoff und 1 Vacutainer-Röhrchen mit Trenngel (BD, Heidelberg, Deutschland). Diese wurden innerhalb von einer Stunde ungekühlt ins Labor transportiert.

Zur Vorbereitung der miRNA-Extraktion wurden sämtliche Aszitesproben nach entsprechender Verarbeitung wie unten beschrieben in 1,5 ml *safe-lock tubes* (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) überführt.

Um eine optimale Probenlagerung zu bewerten, wurden jeweils 1,5 ml Aszites dem Vacutainer ohne Zusatzstoffe entnommen und bei -30°C und -80°C für bis zu 2 Jahre bis zur weiteren miRNA-Extraktion gelagert. Zur Stabilitätsanalyse wurden 1,5 ml Aszites sofort bei Ankunft im Labor (Zeitpunkt 0 h) bei -30°C gelagert, während die verbliebene Probe bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Zu jedem Zeitpunkt nach 12 h, 24 h und 48 h wurden dem Probenrest jeweils 1,5 ml Aszites entnommen und bei -30°C gelagert. Zur Evaluation der besten Probenquelle wurden einerseits 1,5 ml natives, unverarbeitetes Aszitespunktat bei -30°C gelagert. Andererseits wurden die Aszitesproben im Vacutainer mit Trenngel bei 3.000 x g für 10 min bei 20°C zentrifugiert, um Zelltrümmer zu entfernen, und 1,5 ml Überstand wiederum bei -30°C bis zur miRNA-Extraktion gelagert. Um Zellen zu pelletieren, wurden die Aszitesproben im zweiten Vacutainer ohne Zusatzstoffe bei 10.000 x g für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das verbliebene Zellpellet mit 100 µl RNase freiem Wasser aufgenommen und bei -30°C gelagert.

Sämtliche Proben für die Evaluierung der besten Extraktionsmethode und Charakterisierung der Patienten mit PCA, SBP und PHT wurden aus Vacutainern ohne Zusatzstoff zu je 1,5 ml entnommen und bei -30°C bis zur weiteren Extraktion aufbewahrt.

2.4 miRNA-Extraktion

Die Gesamt-RNA, einschließlich miRNA, wurde aus den Aszitesproben mit unterschiedlichen etablierten Extraktionskits zur Beurteilung der Variation extrahiert. So erfolgte die Extraktion sowohl mit dem miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) als auch mit dem mirVana miRNA Isolation Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) und der TRIzol Reagenz (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) laut Herstellerprotokoll mit eigenen Modifikationen. Für sämtliche weitere

Extraktionen im Rahmen des präanalytischen Teils und der Charakterisierung der Patienten mit PCA, SBP und PHT wurde das miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet.

2.4.1 Extraktion mit dem miRNeasy-Kit

Das ausführliche Protokoll kann **Anlage 1** entnommen werden. Zusammengefasst wurden 100 µl Aszites mit 500 µl QIAzol Lysis Reagenz (Qiagen, Hilden, Deutschland) homogenisiert. Nach Zugabe von 5 µl synthetischem 5 nM cel-miR-39 zur späteren Normalisierung erfolgte die Phasentrennung mit 100 µl Chloroform. Die flüssige Phase (~ 300 µl) wurde anschließend mit 450 µl Ethanol (100%) vermischt. Nach dem Waschen mit RWT- bzw. RPE-Puffer (Qiagen, Hilden, Deutschland) und der Eluierung mit 100 µl RNase-freiem Wasser konnte die RNA-Qualität durch Photometrie unter Berücksichtigung des A260/A280-Ratios bestimmt werden. Die Aufbewahrung der Proben erfolgte bei -80°C bis zur qRT-PCR-Analyse.

2.4.2 Extraktion mit dem mirVana-Kit

Eine detaillierte Ausführung zeigt **Anlage 2**. In Kürze zusammengefasst, erfolgte die Homogenisierung von 100 µl Aszites mit 400 µl Lysis/Binding Puffer (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Nach Zugabe von 40 µl miRNA homogenate *additive* (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) und 5 µl synthetischem 5 nM cel-miR-39 zur späteren Normalisierung wurde die RNA mit 450 µl Acid-Phenol:Chloroform (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) ausgefällt. Nach dem Mischen der flüssigen Phase mit 375 µl Ethanol (100%) und anschließendem Waschen mit miRNA *wash solution* (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) sowie der Elution mit 100µl *elution solution* (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) erfolgte die Qualitätsbestimmung der RNA über das A260/A280-Ratio durch photometrische Messung. Bis zur qRT-PCR-Analyse wurden die Proben bei -80°C asserviert.

2.4.3 Extraktion mit der TRIzol-Reagenz

Eine ausführliche Darstellung ist in **Anlage 3** beschrieben. Kurz skizziert, wurden 100 µl Aszites mit 1 ml TRIzol Reagenz (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) homogenisiert. Nach Zugabe von 5 µl synthetischem 5 nM cel-miR-39 zur späteren Normalisierung konnte mit 0,2 ml Chloroform RNA ausgefällt werden. Die flüssige

Phase wurde dann mit 0,5 ml Isopropanol (100%) homogenisiert, ehe nach Entfernung des Überstands die Waschung mit 1 ml Ethanol (100%) und Lufttrocknung des RNA-Pellets erfolgte. Im Anschluss an die Resuspendierung mit 100 µl RNase-freiem Wasser wurden die Proben nach photometrischer Bestimmung der RNA-Qualität über das A260/A280-Ratio bei -80°C bis zur qRT-PCR-Analyse gelagert.

2.5 MiRNA profiling per TaqMan low density array (TLDA)

Aszites miRNA-Profilung von 13 PCA- und 10 Leberzirrhose-Patienten wurde unter Verwendung der TaqMan Array Human MiRNA Card A v2.1 durchgeführt, die es ermöglicht, 377 miRNA zu quantifizieren, die in miRBase v21 aufgeführt sind [98]. Sämtliche Proben wurden nach der Parazentese bei -30°C ohne weitere Verarbeitung bis zur weiteren Extraktion gelagert. Zunächst wurden 3 µl Gesamt-RNA nach dem miRNeasy-Protokoll aus Aszites extrahiert und mit dem Megaplex RT set pool A v2.1 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) reverse transkribiert. 6 µl cDNA-Produkt, 450 µl Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) und 444 µl Nuklease-freies Wasser (Ambion, Carlsbad, CA, USA) wurden homogenisiert, auf den TaqMan Low Density Array (TLDA) geladen und per ViiA 7 Real-Time PCR System (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) amplifiziert. Die Expressionsniveaus in Form von Ct-Werten wurden mit der ViiA 7 Software (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) mit automatisch erstellter Baseline analysiert. MiRNA mit einem Ct-Wert > 39 in mehr als 25% der Proben wurden als zu gering exprimiert gewertet und daher von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Die TLDA-Expressionsdaten wurden unter Verwendung der delta-delta-Ct- (RNU6b als Referenz) und rang-invariant-Methode normalisiert [99,100]. Der Vergleich zweier Gruppen wurde mit dem t-Test durchgeführt, wobei miRNA mit einem p-Wert < 0,05 als signifikant unterschiedlich exprimiert galten. Die TLDA-Datenanalyse wurde mit dem HTqPCR-Paket durchgeführt [101].

2.6 qRT-PCR-Analyse

Die Auswahl der verwendeten miRNA erfolgte nach folgenden Kriterien:

- a) unterschiedliche Expression in der miRNA-TLDA Analyse (miR-21, miR-186)
- b) kürzlich beschrieben als fehlreguliert in gastrointestinalen Tumoren (miR-21) [102–105]
- c) häufig als Normalisierungsgen verwendet (miR-16) [106–108]
- d) kürzlich beschrieben als leberspezifisch und fehlreguliert im HCC (miR-122) [109–111]
- e) assoziiert mit der Produktion und Differenzierung von Granulozyten und Entzündungsreaktionen (miR-223) [112–114]

Die qRT-PCR ermittelt die relative Expression ausgewählter miRNA gegenüber einem stabil exprimierten Normalisierungsgen. Die Normalisierung ist erforderlich, um etwaige Abweichungen in der miRNA-Extraktion und/oder cDNA-Synthese zu berücksichtigen. Vor diesem Hintergrund wurde der jeweiligen Probenlösung 5µl der synthetischen miRNA cel-miR-39 (5 nM) vor jedem Extraktionsvorgang zur späteren Normalisierung auf Volumen hinzugefügt. RNU6b gehört zur Klasse der *small nucleolar RNA* (snRNA) und wurde zur Abschätzung der Stabilität der RNA evaluiert [115]. Die miRNA-Expressionsanalyse erfolgte entweder nach dem TaqMan miRNA Assay-Protokoll (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) für cel-miR-39, miR-16, miR-186, miR-223 und miR-122 oder nach der SYBRgreen-Methode für miR-21 und RNU6b nach etabliertem und validiertem Protokoll. Die ausführlichen Protokolle können **Anlage 4 und 5** entnommen werden. Die reverse Transkription wurde mit dem SYBRgreen RT-PCR Kit oder TaqMan miRNA RT Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) wie folgt durchgeführt: 30 min bei 16°C, 30 min bei 42°C und 5 min bei 85°C. Nach reverser Transkription wurde die quantitative real-time PCR auf dem CFX96 real-time PCR-Cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) für alle Proben auf einem 96-well PCR-Plate in Doppelbestimmung durchgeführt.

2.7 Statistische Analyse

Die Messung und Ausgabe der Ct-Werte erfolgte durch das Programm CFX-Manager 3.0 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Der Ct-Wert beschreibt dabei den Zyklus der PCR, in dem die Fluoreszenz aus dem PCR-Ansatz erstmals signifikant über einen Schwellenwert ansteigt. Je höher die miRNA im PCR-Ansatz exprimiert ist, desto schneller wird ein signifikantes Fluoreszenzsignal erreicht und dementsprechend niedrig ist der Ct-Wert. Als Nachweisgrenze wurde für sämtliche miRNA ein Ct-Wert < 40 festgelegt. Die Ct-Werte sind im Folgenden als Mittelwert der Doppelbestimmung (\pm der Standardabweichung (SD)) dargestellt. Unterschiede zwischen einzelnen Gruppen werden als Δ Ct-Wert (\pm SD), errechnet aus der Differenz zwischen dem Mittelwert der zur Normalisierung verwendeten miRNA und dem Mittelwert der betrachteten miRNA, beschrieben.

Alle Daten wurden nach Überführung in Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA)-Tabellen mit GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) ausgewertet. Chi-Quadrat-Test und Fisher's exakter Test wurden für Kontingenztabellen verwendet. Der gepaarte t-Test, der ungepaarte t-Test und die ANOVA-Tests wurden verwendet, um die statistische Signifikanz für zwei gepaarte, ungepaarte Gruppen bzw. mehrere Gruppen, entsprechend, zu analysieren. Post-hoc-Analysen wurden mit dem Holm-Sidak-Test durchgeführt. Korrelationsanalysen wurden unter Verwendung des Spearman-Tests durchgeführt. *Box-* und *whisker-plots* wurden zur besseren Darstellung der Datenverteilung in den Abbildungen verwendet. P-Werte $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

Um die Machbarkeit der miRNA-Analyse in Aszites zu bewerten, wurde die Arbeit in mehrere Untersuchungsabschnitte unterteilt. Zuerst wurde der Einfluss präanalytischer Faktoren wie Extraktionsmethode und Reproduzierbarkeit, Probenverarbeitung und Kurz- und Langzeitlagerung evaluiert (**Abbildung 6A**). Im zweiten Teil erfolgte ein miRNA-Profilung von ausgewählten Aszitesproben, während die Ergebnisse dann in eigenständigen Experimenten validiert wurden.

3.1 Extraktion und Reproduzierbarkeit

Vor dem Hintergrund, dass miRNA bereits in diversen Körperflüssigkeiten, Stuhl und Geweben nachweisbar sind, prüften wir zuerst das Vorkommen von miRNA in Aszites. Dazu wurden im Rahmen der Präanalytik weit verbreitete miRNA und RNU6b ausgewählt (**Abbildung 6B**). Mit leicht modifizierten Protokollen kommerzieller RNA-Extraktionskits konnte jeweils eine ausreichende Menge an Gesamt-RNA isoliert und erfolgreich eine miRNA-Expression nachgewiesen werden. Der höchste Expressionsgrad wurde für miR-21 und der niedrigste für RNU6b beobachtet. Um die Reproduzierbarkeit der Analyse zu validieren und den Unterschied zwischen den verschiedenen Extraktionsmethoden zu bewerten, wurden eine Reihe von Extraktionen mit dem miRNeasy-, mirVana- oder TRIzol-Kit durchgeführt. Jedes Verfahren zeigte unabhängig eine sehr gute Reproduzierbarkeit der miRNA Expression (**Abbildung 6C-E**). Allerdings wiesen die Extraktionkits im Vergleich untereinander einige Expressionsunterschiede auf. MiRNeasy und mirVana lieferten dabei die stabilsten und gegenseitig vergleichbarsten Ergebnisse (**Abbildung 6F-H**). Basierend auf diesen Erkenntnissen und der leichten Verwendung wurde die Arbeit mit dem miRNeasy-Kit fortgesetzt.

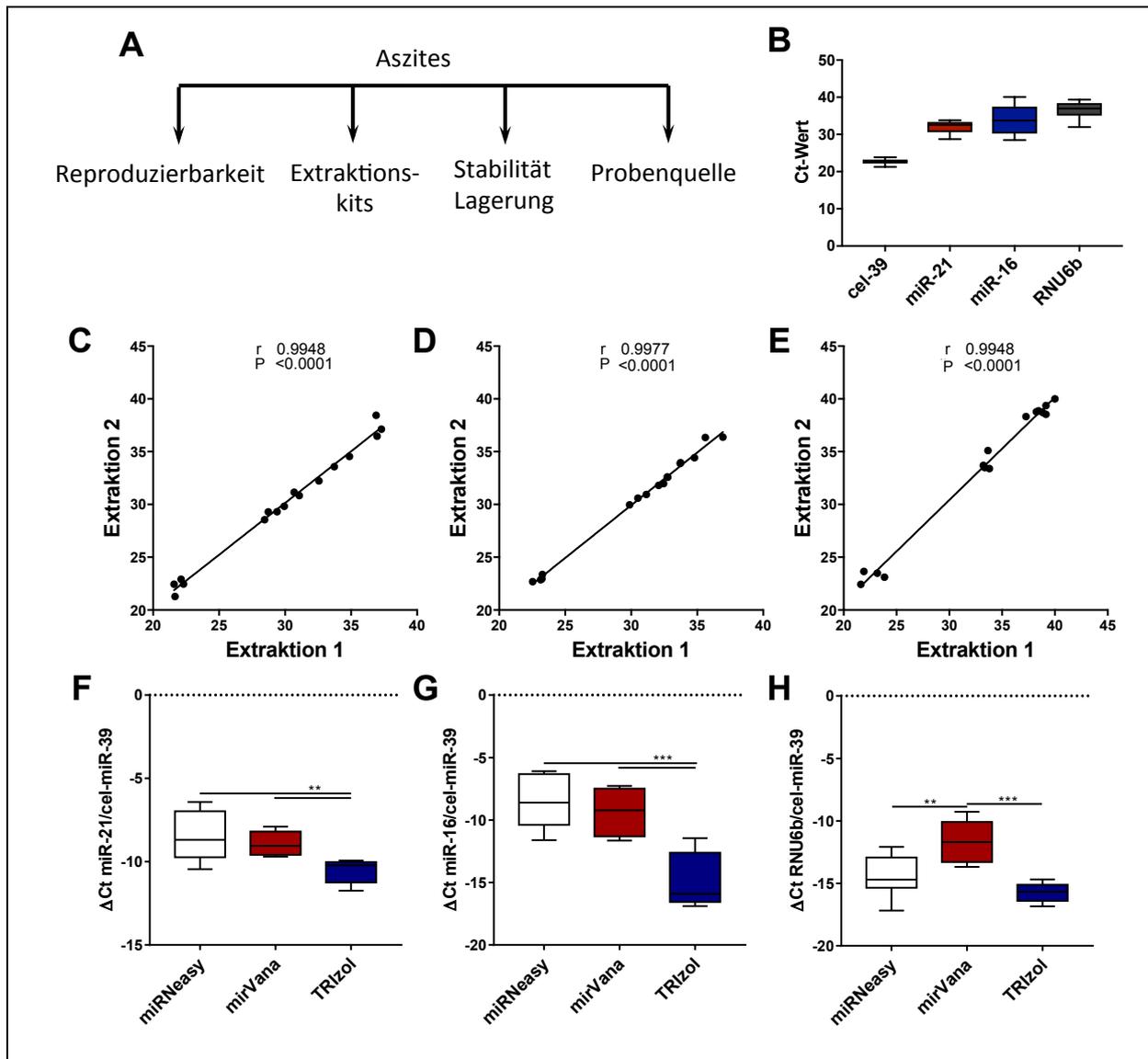


Abbildung 6: Nachweis von miRNA in Aszites und Vergleich zwischen verschiedenen Extraktionskits. (A) Studiendesign. (B) MiRNA-Expressionslevel in Aszitesproben (n=4). Reproduzierbarkeit der miRNA-Expression unter Verwendung der Extraktionskits (C) miRNeasy, (D) mirVana und (E) TRizol. Vergleich der miRNA-Expression zwischen verschiedenen Extraktionsmethoden für (F) miR-21, (G) miR-16 und (H) RNU6b. Die Daten sind entweder als Ct-Rohwert oder als ΔCt -Wert volumennormalisiert auf cel-miR-39 angegeben. ANOVA-Test mit Holm-Sidak post Test, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

3.2 MiRNA-Stabilität

Es ist bekannt, dass miRNA relativ stabil gegen den Abbau in den verschiedensten Proben sind. Um die Stabilität von miRNA in Aszites und den potentiellen Einfluss des Probentransportes in das Labor zu bewerten, wurde eine Reihe von Expressionsanalysen durchgeführt, wobei die Proben zu unterschiedlichen Wartezeiten bei Raumtemperatur inkubiert wurden. MiR-16 und das häufig zur Normalisierung verwendete RNU6b zeigten ein vergleichbares Expressionsmuster zwischen den Zeitpunkten, welches auf eine ausreichende Stabilität von miRNA in Aszitesproben hindeutet (**Abbildung 7A und B**). Die große Standardabweichung war dabei eher mit der interindividuellen Abweichung zwischen den Probanden und weniger mit der Stabilität zu den verschiedenen Zeitpunkten verbunden.

Als nächstes wurde der Einfluss der Langzeitlagerung (-30 °C gegenüber -80 °C für 2 Jahre) auf die miRNA-Expression untersucht. Obwohl sich ein leichter Trend für erhöhte miR-16-Expressionslevel unter den bei -80 °C gelagerten Proben andeutete, erreichte die Differenz keine statistische Signifikanz (**Abbildung 7C und D**). Dies deutet darauf hin, dass -30 °C für eine temporäre Lagerung der miRNA ausreichen.

3.3 MiRNA-Gehalt in verschiedenen Probenquellen

Aszites besteht aus mehreren Komponenten einschließlich Zellen sowie Transsudat oder Exsudat je nach Pathogenese. Wir hinterfragten, ob nativer, unverarbeiteter Aszites (ungefiltert, nicht zentrifugiert) Unterschiede in der miRNA-Expression gegenüber zentrifugiertem Aszites (Überstand) oder dem erhaltenen Zellpellet aufweist. Um technische Bias auszuschließen, wurde jeder Probe cel-miR-39 wie auch in den anderen Experimenten zur Extraktions- und Volumennormalisierung hinzugefügt. Im Allgemeinen waren sämtliche ausgewählte miRNA in allen Proben nachweisbar. Wie erwartet waren die höchsten Expressionslevel von miR-16 und RNU6b im Zellpellet, die niedrigsten im Überstand nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Nach Normalisierung auf cel-miR-39 konnten die höchsten Expressionsspiegel im Zellpellet bestätigt werden, wobei die miRNA-Expression zwischen den nativen Proben und den Probenüberständen keine Unterschiede zeigte (**Abbildung 7E und F**). Unter der Annahme, dass sowohl Tumorzellen als auch zirkulierende Exosomen wertvoll für die Expressionsanalyse sein können, konzentrierten wir uns im Folgenden auf den nativen, unbehandelten Aszites.

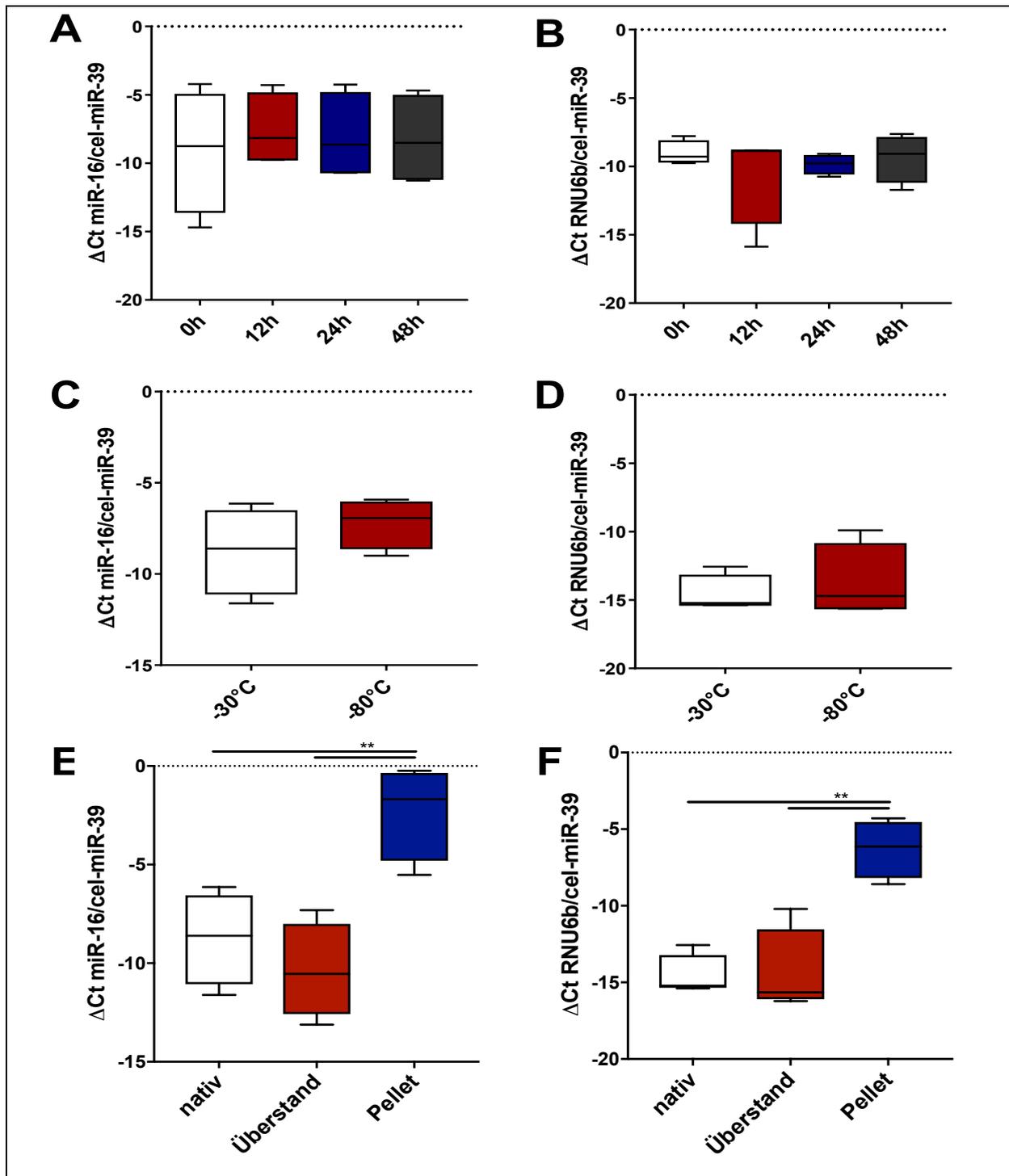


Abbildung 7: Einfluss der Lagerung, Stabilität und Probenquelle auf die miRNA-Expression in Aszites. Stabilität der miRNA nach Inkubation bei Raumtemperatur vor späterer Lagerung bei -80 °C für (A) miR-16 und (B) RNU6b. Vergleich der Aszitesproben nach Lagerung sowohl bei -30 °C als auch bei -80 °C über bis zu 2 Jahre für (C) miR-16 und (D) RNU6b. Vergleich der miRNA-Expression nach unterschiedlicher Probenverarbeitung: nativ (unverarbeitet), Überstand und Zellpellet nach Zentrifugation für (E) miR-16 und (F) RNU6b. Die Daten sind entweder als Ct-Rohwert oder als deltaCt-Wert volumennormalisiert auf cel-miR-39 angegeben. Gepaarter t-Test oder ANOVA-Test mit Holm-Sidak post Test, *p < 0,05; **p < 0,01, ***p < 0,001.

3.4 MiRNA-Profilung in Aszitesproben

Um das diagnostische Potential von miRNA als Aszites-Biomarker zu evaluieren, führten wir in Kollaboration mit der Arbeitsgruppe um Juozas Kupcinskas ein miRNA-Profilung per TLDA in Aszitesproben von Patienten mit PCA durch und verglichen sie mit unkompliziertem Aszites von Patienten mit Leberzirrhose (**PHT, detaillierte Patientencharakterisierung in Tabelle 5**). Nach dem Herausfiltern von miRNA mit relativ geringer Konzentration (Ct-Wert > 39 in über 25% der Proben), erhielten wir 43 von 377 miRNA für die weitere Analyse. Die Expressionslevel dieser miRNA wurden im Folgenden nach der delta-delta-Ct- (RNU6b als Referenz) oder rang-invariant-Methode normalisiert. So zeigte die Analyse nach Normalisierung auf RNU6b erhöhte Expressionslevel von miR-186, miR-222 und miR-483-5p unter Patienten mit PCA gegenüber PHT (**Abbildung 8A**). Unter Berücksichtigung der rang-invariant-normalisierten Expressionsanalyse konnten zusätzlich erhöhte miR-21- und erniedrigte miR-26b-Level in den Aszitesproben der Patienten mit PCA im Vergleich zu denen mit PHT nachgewiesen werden (**Abbildung 8B**).

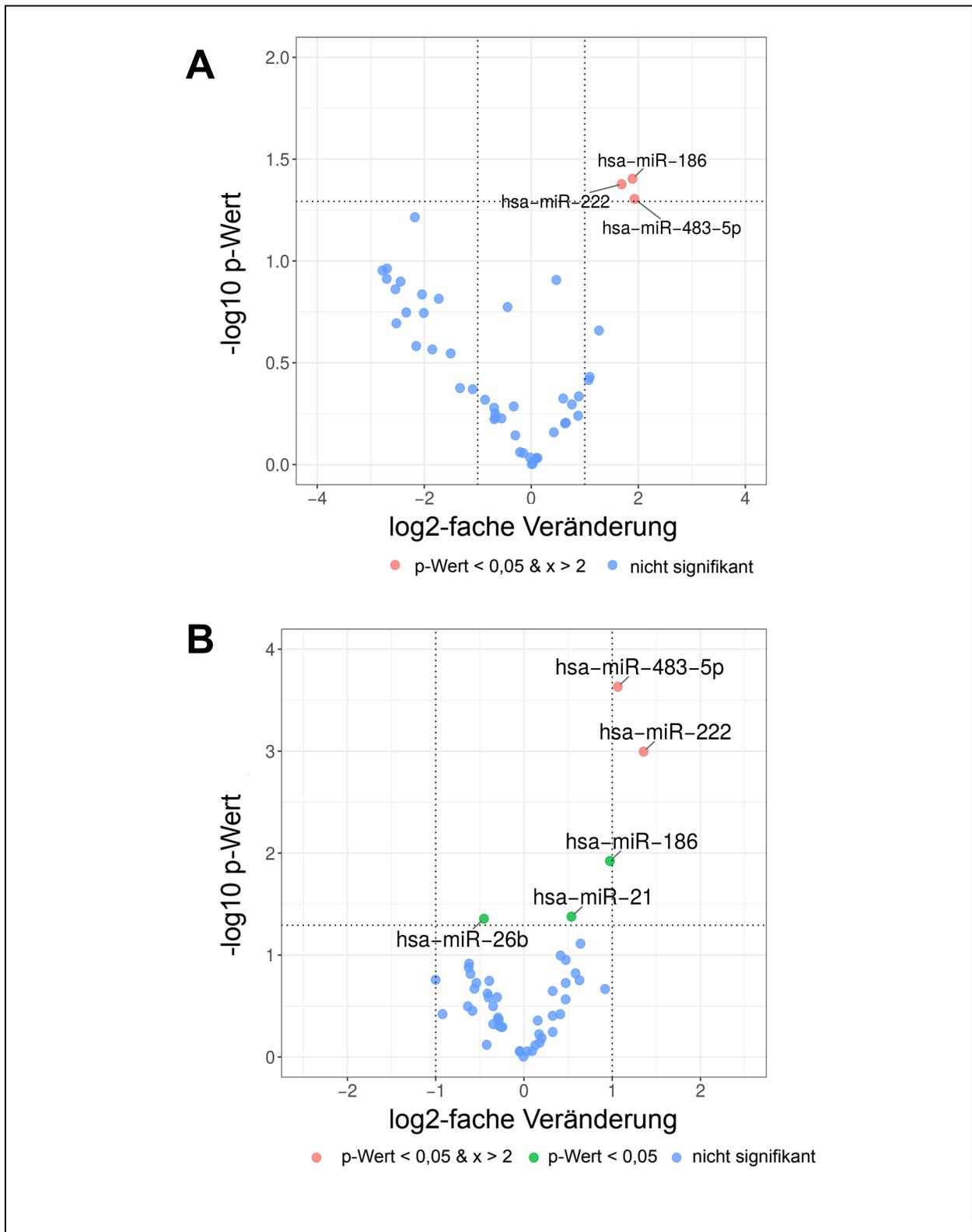


Abbildung 8: MiRNA-profiling per TaqMan Low Density Array. Die Volcano Plots zeigen abweichend exprimierte miRNA in Aszites von Patienten mit PCA (n=13) im Vergleich zu PHT (n=10) nach delta-delta-Ct- (A, RNU6b als Referenz) oder rang-invariant-Normalisierung (B). Die roten Punkte repräsentieren in logarithmischer Darstellung signifikante Expressionsunterschiede ($p < 0,05$) $>$ Faktor 2. Die grünen Punkte zeigen signifikante Expressionsunterschiede $<$ Faktor 2, wobei die blauen Punkte keine signifikanten Unterschiede anzeigen.

3.5 Validierung der miRNA-Expressionsveränderungen

Um die Ergebnisse zu validieren, führten wir eine miRNA-Expressionsanalyse für miR-21, miR-16, miR-223, miR-186 und miR-122 durch. Die Auswahl der miRNA basierte auf den Kriterien: Ergebnisse des miRNA-Profilings (miR-21, miR-186), häufige Verwendung zur Normalisierung (miR-16), Leberspezifität und fehlreguliert im HCC (miR-122) sowie entzündungsassoziiert (miR-223). Zur Validierung wurde die Studienpopulation um Proben von Patienten mit SBP erweitert.

Eine erste Gegenüberstellung der Expressionslevel von miR-21 und miR-16 zeigte eine signifikante Korrelation zwischen den miRNA ($r^2 = 0,8529$, $p < 0,0001$), sodass wir miR-16 nicht zur Normalisierung verwendeten (**Abbildung 9**).

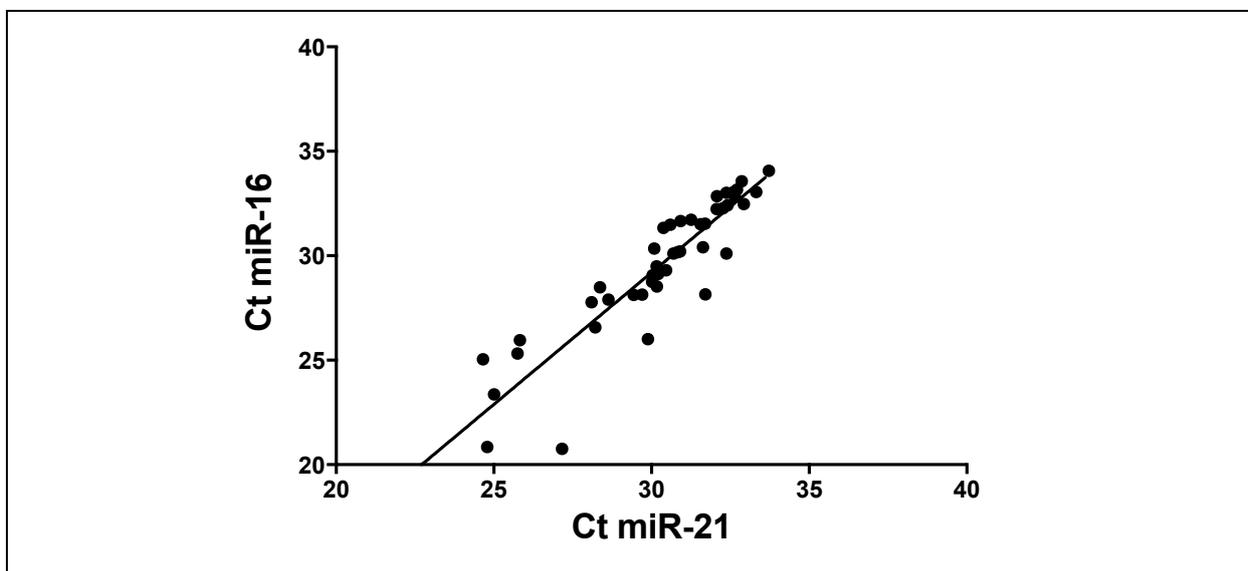


Abbildung 9: Korrelation der miR-16- und miR-21-Expression zwischen Patienten mit PCA, SBP und PHT. Für die Korrelationsanalyse wurde die miRNA-Expression von miR-16 und miR-21 der gesamten Studienpopulation ($n=45$) analysiert ($r^2 = 0,8529$, $p < 0,0001$). Die Daten sind als Ct-Rohwert angegeben.

Abbildung 10 gibt einen Überblick über die miRNA-Expressionsmuster der jeweils untersuchten Patientenkollektive nach Normalisierung. Im Allgemeinen waren hierbei miR-21 und miR-186 in Korrelation zu den TLDA-Daten bei Patienten mit PCA und miR-223 bei Patienten mit SBP am stärksten exprimiert, wobei sich beide Kollektive bei der Betrachtung von miR-16 und miR-122 kaum unterschieden.

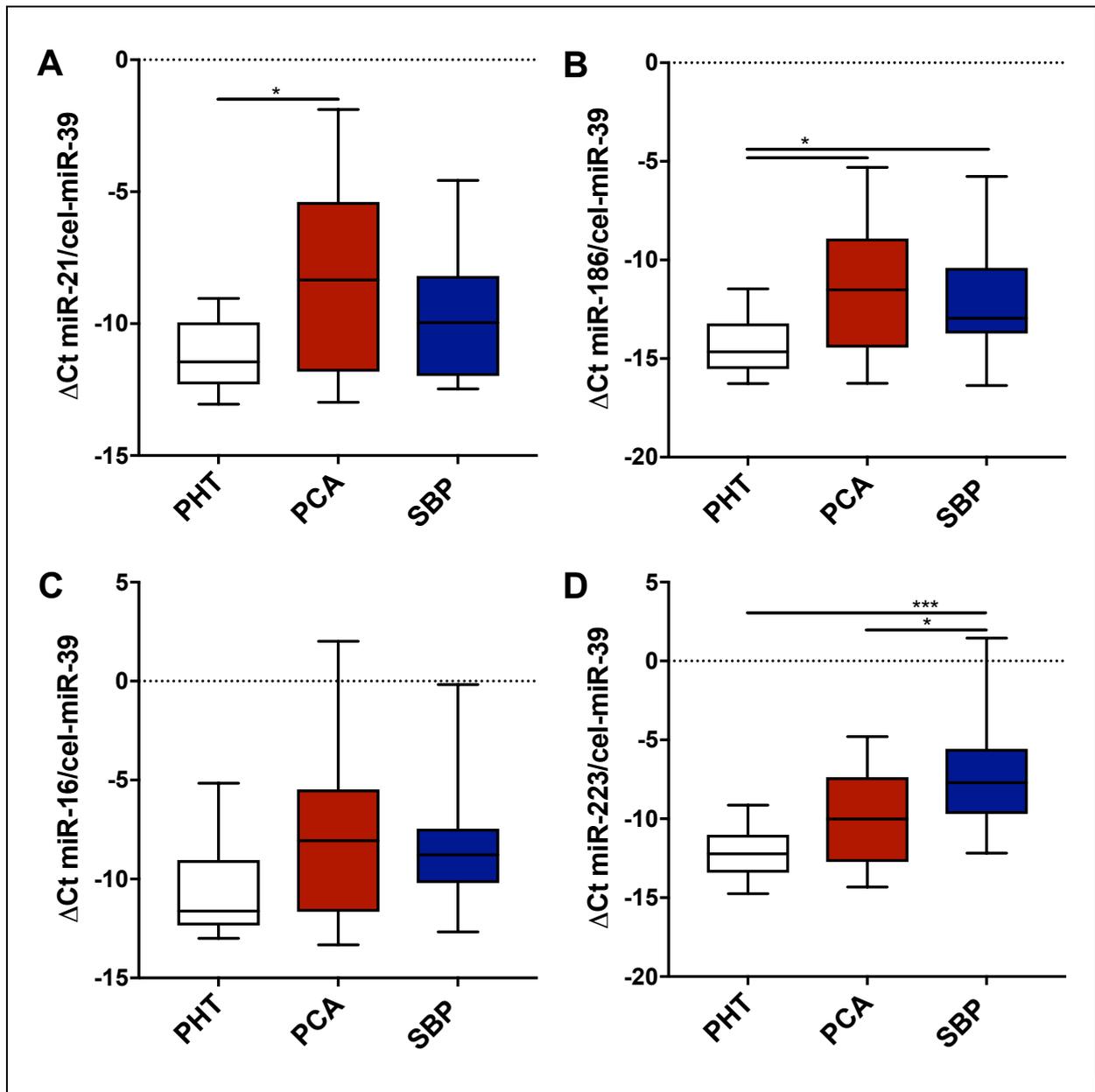


Abbildung 10: Expression ausgewählter miRNA zwischen Patienten mit unkompliziertem Aszites bei portaler Hypertension (PHT), Peritonealkarzinose (PCA) und spontan bakterieller Peritonitis (SBP). Expression von (A) miR-21, (B) miR-186, (C) miR-16 und (D) miR-223. Die Daten sind entweder als Ct-Rohwert oder als deltaCt-Wert volumennormalisiert auf cel-miR-39 angegeben. Gepaarter t-Test oder ANOVA-Test mit Holm-Sidak post Test, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Im Detail lies sich bei Patienten mit PCA mit einem $\Delta\text{Ct} \pm \text{SD}$ von $-8,46 \pm 3,46$ eine höhere miR-21-Expression gegenüber denen mit SBP mit $-9,65 \pm 2,55$ und denen mit PHT mit $-11,11 \pm 1,22$ in statistisch signifikantem Ausmaß feststellen (ANOVA, $p = 0,026$; Holm-Sidak post Test PCA vs. PHT, $p < 0,05$; **Abbildung 10A**).

In ähnlicher Weise und korrelierend zum Profiling zeigte sich jeweils eine signifikant höhere miR-186-Expression unter den PCA-Proben mit einem $\Delta\text{Ct} \pm \text{SD}$ von $-11,66 \pm 3,12$ gegenüber den SBP-Proben mit $-11,95 \pm 3,14$ und den PHT-Proben mit $-14,29 \pm 1,59$ (ANOVA, $p = 0,022$; Holm-Sidak post Test PCA vs. PHT, $p < 0,05$; PCA vs. SBP, $p < 0,05$; **Abbildung 10B**).

Während die miR-16-Expression zwischen Patienten mit PCA mit $\Delta\text{Ct} \pm \text{SD}$ von $-8,02 \pm 4,14$ und denen mit SBP mit $-7,95 \pm 3,77$ nahezu keinen Unterschied zeigte, so war miR-16 mit $-10,93 \pm 2,19$ unter dem Kollektiv mit PHT niedriger exprimiert, wenngleich ohne statistische Signifikanz (**Abbildung 10C**). Darüber hinaus ergab die Analyse, dass miR-223 mit einem $\Delta\text{Ct} \pm \text{SD}$ von $-6,95 \pm 3,56$ von dem Patientenkollektiv mit SBP signifikant höher exprimiert wurde im Gegensatz zu dem mit PCA mit $-10,05 \pm 3,19$ und sogar hoch signifikant zu dem mit PHT mit $-12,16 \pm 1,56$ (ANOVA, $p = 0,031$; Holm-Sidak post Test SBP vs. PCA, $p < 0,05$; SBP vs. PHT, $p < 0,001$; **Abbildung 10D**). Dies deutet auf eine gute Korrelation zwischen miR-223 und dem Entzündungsstatus von Aszites hin.

Unter allen miRNA wurde die niedrigste miRNA-Varianz für miR-122 beobachtet, wobei kein Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen auf der Grundlage eines relativ konstanten leberspezifischen miRNA-Spiegels in Aszites zu beobachten war (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend konnten wir in den Validierungsexperimenten verdeutlichen, dass ausgewählte miRNA (miR-21, miR-186) tatsächlich signifikante Expressionsunterschiede zwischen Patienten mit PCA und PHT aufweisen, wobei die Gruppe der Patienten mit SBP eine deutliche Überlappung zu denen mit PCA zeigte. Nichtsdestotrotz war miR-223 vor allem unter Patienten mit SBP überexprimiert und wäre hilfreich bei der Differenzierung von SBP und PCA.

4 Diskussion

In der vorliegenden *proof-of-principle* Studie wurde die Möglichkeit eines miRNA-Nachweises in Aszites systematisch untersucht und die potentielle Nutzung von miRNA als Aszites-Biomarker in Pilot-Analysen bewertet. Wir konnten zeigen, dass miRNA in Aszites leicht und reproduzierbar nachzuweisen sind. Die systematische Analyse der miRNA-Stabilität bestätigt einen guten Schutz der miRNA vor Abbau oder Zerfall. Darüber hinaus offenbaren die Profiling- und Validierungsanalysen unterschiedliche Expressionsmuster von miRNA in Aszites bei Patienten mit PCA und SBP und deuten damit das Potential von miRNA als potentielle Biomarker für maligne und entzündliche Erkrankungen an.

4.1 Studiendesign

Seit der Entdeckung der miRNA im Jahre 1993 existieren vielversprechende Erkenntnisse über die Biologie von miRNA und ihr Potential als neue Generation von Biomarkern. Veränderungen der miRNA-Expressionslevel in Serum, Plasma und anderen Geweben wurden bereits im Kontext vieler Krankheiten diskutiert. Link *et al.* fokussierten sich dabei auf fehlregulierte miRNA in gastrointestinalen Tumoren und charakterisierten sämtliche Tumorentitäten anhand ihres miRNA-Profiles [61]. Entsprechend zeigten sich u.a. für das HCC, CRC sowie Magen- und Pankreaskarzinom spezifische Expressionsmuster, wobei miR-21 eine zentrale Rolle, weil fehlreguliert in nahezu allen Tumoren, einnimmt (**Abbildung 4**). Obwohl eine Vielzahl von Studien das Potential von miRNA als Biomarker für gastrointestinale Tumoren in Tumorgewebe, Blut und Stuhl aufzeigt, besteht bis heute nur wenig Evidenz über miRNA in Aszites [78,86–88,90–92,94,116].

Aszites gehört zu den Hauptsymptomen der PCA, welche ein häufiges Ereignis bei gastrointestinalen Tumoren darstellt. Wie bereits in der Einleitung dargestellt, kann sich die Differentialdiagnose zur SBP oder PHT als schwierig erweisen, wobei die Aszites-Zytologie nach wie vor den diagnostischen Goldstandard bildet. Allerdings ist die geringe Sensitivität unverändert eine der größten Herausforderungen im klinischen Einsatz [6,9,11]. Da das Auftreten einer PCA einen beträchtlichen prognostischen Einfluss für den Patienten aufweist, besteht ein dringender Bedarf an alternativen diagnostischen Ansätzen.

Vor diesem Hintergrund wurden in ausgewählten Aszitesproben miRNA-Profilings-Analysen durchgeführt und die Ergebnisse in miRNA-Expressionsanalysen von jeweils 15 Patienten mit PCA, SBP und PHT validiert. Es sollte gezeigt werden, ob Unterschiede im miRNA-Expressionslevel in Aszites unterschiedlicher Ätiologie vorliegen und darüberhinaus einzelne miRNA ein spezifisches Expressionsmuster in mit PCA- oder SBP-assoziierten Aszitesproben aufweisen. Dazu wurde die Expression entsprechend der Profiling-Ergebnisse von miR-21 und miR-186 bzw. der in gastrointestinalen Tumoren fehlregulierten miRNA (miR-21) sowie der leberspezifischen und im HCC fehlregulierten miR-122, der häufig als Normalisierungsgen verwendeten miR-16 und der mit der Produktion und Differenzierung von Granulozyten und Entzündungsreaktionen assoziierten miR-223 analysiert [102–114].

Da die Implementierung neuer diagnostischer Marker in die klinische Routine die Charakterisierung diverser präanalytischer Parameter und Störfaktoren erfordert, wurden im ersten Teil der Arbeit Aszitesproben von 4 Patienten mit verschiedenen Konditionen hinsichtlich miRNA-Extrahierbarkeit, Reproduzierbarkeit der Messungen, miRNA-Stabilität sowie bester Probenquelle und Extraktionsmethode evaluiert (**Abbildung 5 und 6**). Dazu wurden weit verbreitete miRNA sowie RNU6b (snRNA) zur Abschätzung der Stabilität der RNA analysiert. Dies sollte modellhaft den klinischen Ablauf von einer Aszitespunktion bis zur Verarbeitung und Analyse im Labor symbolisieren und Grundlage für den Hauptteil dieser Arbeit bilden.

4.2 Nachweis und Eigenschaften von miRNA in Aszites

Im Allgemeinen wurden bereits einige interessante Daten für miRNA in Blut und Stuhl veröffentlicht, wobei unsere Ergebnisse diese Daten unterstützen [78,81,94]. Der Nachweis von miRNA in Aszites in der vorliegenden Arbeit geht einher mit den Ergebnissen von Weber *et al.*, die erstmals miRNA aus Aszites isolieren konnten [76]. Dabei untersuchten sie das miRNA-Spektrum in 12 Körperflüssigkeiten (Blut, Speichel, Tränenflüssigkeit, Urin, Fruchtwasser, Vor- und Muttermilch, Bronchiallavage, Liquor, Aszites sowie Pleura- und Samenflüssigkeit). Die Aszitesproben wurden, wie auch in einigen unserer Teilversuche, zentrifugiert und miRNA aus dem verbliebenen Überstand extrahiert und analysiert. Insgesamt konnten 775 µg/l RNA aus Aszites extrahiert und 397 miRNAs identifiziert werden. Interessanterweise lag die extrahierbare RNA-Gesamtmenge mehr als doppelt so

hoch als in den entsprechenden Plasmaproben (308 µg/l), wobei im Plasma auch weniger miRNA (349) nachweisbar waren. Darüber hinaus waren bestimmte miRNA spezifisch für die Aszitesproben und in den anderen 11 Probenarten nicht nachweisbar (miR-129, miR-583, miR-223, miR-627, miR-29b-1). Dies deutet darauf hin, dass Aszites neben bereits etablierten Ausgangsmaterialien wie z.B. Blut als Probenquelle für miRNA-Expressionsanalysen dienen kann.

Für den potentiellen Einsatz von miRNA als Biomarker im klinischen Alltag ist es von großer Bedeutung, eine möglichst effektive Extraktionsmethode zu etablieren und zu überprüfen wie reproduzierbar die Extraktionswerte zwischen unterschiedlichen Messungen und Methoden sind. El-Khoury *et al.* verglichen mehrere RNA-Extraktionskits hinsichtlich der Isolierung von miRNAs aus Plasma, wobei das miRNeasy-Kit dabei die größte Effektivität gegenüber anderen Methoden, u.a. TRIzol, aufzeigte [117]. In ähnlicher Weise, aber erstmalig für die Aszitesdiagnostik haben wir die Extraktionskits miRNeasy, mirVana und TRIzol gegenübergestellt. Alle Methoden wiesen eine herausragende Reproduzierbarkeit zwischen den unabhängigen Extraktionen auf und kennzeichnen Aszites damit als ertragreiche Quelle von miRNAs auf stabilem Expressionsniveau. Insgesamt zeigten sowohl das miRNeasy- als auch mirVana-Kit die größte Effektivität in unseren Analysen, weshalb in Zukunft unterschiedliche Extraktionskits berücksichtigt werden müssen. Vielmehr bedarf es jedoch einheitlicher Protokolle unter den Extraktionsmethoden, um vergleichbare Ergebnisse im Rahmen der klinischen Routine zu erzielen, da verschiedene Labore meist eigens modifizierte Protokolle der kommerziellen Extraktionskits verwenden.

Die Stabilität und der Schutz vor dem Abbau durch endogene RNasen sind herausragende Eigenschaften von miRNA bedingt durch ihre geringe Größe und Assoziation mit Exosomen und Proteinkomplexen [72,75,81]. Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass verschiedene Lagerungsbedingungen und -zeiten zwischen Probengewinn und miRNA-Extraktion erheblichen Einfluss auf die miRNA-Expressionslevel haben können. Pritchard *et al.* beschrieben, dass z.B. unter Hämolyse Änderungen im Plasma miRNA-Expressionsniveau um das Fünfzigfache hervorgerufen werden können [118]. Weiterhin berichteten Sourvinou *et al.*, dass die miRNA-Extraktion aus Plasmaproben innerhalb von 48h nach Probenentnahme unter Aufbewahrung bei -20°C oder -70°C erfolgen soll, wobei die Inkubation bei 4°C

schon nach 24h zu signifikant niedrigeren miRNA-Expressionsleveln führt [119]. Angesichts dessen wurde die miRNA-Stabilität in Aszites erstmalig in diesem Umfang untersucht, in dem diverse Aszitesproben bei unterschiedlichen Lagerungstemperaturen über variable Zeiträume bis zur miRNA-Extraktion aufbewahrt wurden. Dabei erfolgte die miRNA-Extraktion sofort nach Aszitespunktion und Ankunft der Proben im Labor sowie nach Inkubation über 12 h, 24 h und 48 h bei Raumtemperatur oder nach Langzeitlagerung über bis zu 2 Jahre bei -30°C und -80°C. Diese Zeiten und Lagerungsbedingungen wurden bewusst gewählt, um die klinische Stations- und Laborroutine bzw. Langzeitlagerungsbedingungen für eine mögliche spätere Extraktion zu repräsentieren. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass Aszites miRNA-Expressionslevel auch nach über 48h Inkubation bei Raumtemperatur und unter Langzeitlagerungsbedingungen stabil bleiben und so den Anforderungen der üblichen klinischen Routine hinsichtlich Stabilität durchaus gerecht werden.

Die Tatsache, dass miRNA auch nach Zentrifugation der Aszitesproben im Überstand und Zellpellet nachgewiesen werden konnten, deckt sich mit den Angaben der Literatur, dass miRNA sowohl Bestandteil von Zellen als auch zellfreien Komponenten wie Exosomen oder Proteinkomplexen sind. Hunter *et al.* identifizierten im Plasma gesunder Probanden erstmalig miRNA in Mikrovesikeln [70]. Darüberhinaus zeigten Arroyo *et al.* in ultrazentrifugierten Plasmaproben von gesunden Probanden, dass die Mehrheit der extrazellulären miRNA nicht nur eingehüllt in Mikrovesikeln oder Exosomen vorliegt, wie lange angenommen, sondern unabhängig davon eher als miRNA-Proteinkomplex [72]. Es verwundert nicht, dass die miRNA-Konzentration in den Zellpellets viel höher war, als in den nativen, unverarbeiteten Proben oder nach Zentrifugation im verbliebenen Überstand. Überraschenderweise zeigt sich zumindest für miR-16 ein unterschiedliches Expressionsmuster für die Zellpellets bei weitgehend ähnlicher Darstellung der Expression von nativen Proben und Überstand. Obwohl die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit signifikant höhere miRNA-Expressionslevel in den Pellet-Proben offenbaren, liegt die Überlegung nahe, native, unverarbeitete Aszitesproben als Probenquelle zu verwenden, da sowohl Tumorzellen- als auch Exosomen-assoziierte miRNA wertvoller Bestandteil der Expressionsanalyse sein können und somit die diagnostische und prognostische Aussagekraft größer ist. Auf

der anderen Seite deuten die Ergebnisse darauf hin, dass der größte Anteil der Tumorzellen in Pellet-Proben nachzuweisen ist, die dadurch eine potentielle Einsetzbarkeit in der PCA-Diagnostik bieten. Solange die Frage nach der besten Normalisierungsmethode jedoch noch nicht eindeutig geklärt ist, erschweren nicht-volumenbasierte Testungen im Gegensatz zum Umgang mit nativen Proben ohne weitere Bearbeitung die Implementierung in die klinische Routine.

4.3 Aszites miRNA als diagnostische und prognostische Biomarker für Peritonealkarzinose und Peritonitis

Nach dem Einblick in die Biologie von miRNA in Aszites und der Charakterisierung von wichtigen präanalytischen Parametern wurden die miRNA-Expressionslevel in Aszites unterschiedlicher Ätiologie analysiert. Erwartungsgemäß konnten Unterschiede in der miRNA-Expression unter Patienten mit PCA, SBP und PHT nachgewiesen werden.

Tokuhisa *et al.* veröffentlichten kürzlich nach unserer Kenntnis die erste Studie über die miRNA-Expression in Aszites und Peritoneallavage unter Patienten mit peritonealer Metastasierung als Folge eines Magenkarzinoms [95]. Obwohl sich die Studie auf die Peritoneallavage fokussierte, wurden auch 6 Patienten mit Aszites eingeschlossen. Dazu wurden u.a. zentrifugierte Aszitesproben zur Extraktion verwendet und dann schrittweise per Microarray unterschiedlich exprimierte miRNA detektiert und per PCR validiert. Dabei zeigten miR-21 und miR-1225-5p signifikant höhere Expressionslevel unter Patienten mit Magenkarzinom im Stadium T4 gegenüber Patienten im Stadium T1-T3.

In ähnlicher Weise wählten wir einen explorativen Ansatz unter Verwendung von TLDA und bestätigten die Daten per TaqMan-PCR. Wir zeigten, dass die miR-21 und miR-186-Expressionsniveaus nicht nur bei Patienten mit Magenkarzinom signifikant erhöht waren, sondern insgesamt bei Patienten mit PCA im Vergleich zu denen mit PHT. MiR-21 ist wie bereits erwähnt eine der am häufigsten beschriebenen, fehlregulierten miRNA in gastrointestinalen Tumoren, wie dem hepatozellulären Karzinom, Magenkarzinom, Pankreaskarzinom und Kolonkarzinom [102–105]. Überdies beschreibt die aktuelle Literatur partielle Fehlregulationen von miR-186, sowie wenn nicht fehlreguliert zumindest eine gewisse Beteiligung in der Karzinogenese von eben diesen gastrointestinalen Tumoren, wenngleich noch nicht in dieser Vielzahl wie für miR-21 [120–123]. So illustrierte die Arbeitsgruppe um

Islam *et al.* kürzlich eindrucksvoll anhand von Gewebeproben aus Operationspräparaten von 126 Patienten mit CRC eine signifikante Überexpression von miR-186 gegenüber gesunden Gewebeproben der gleichen Probanden unmittelbar am Resektionsrand [120]. Zudem konnte das Wachstum bestimmter CRC-Zelllinien unter Inhibition von miR-186 durch Gabe der entsprechenden anti-miR erfolgreich gehemmt werden. Calatayud *et al.* zeigten in analoger Weise anhand von 165 Resektionspräparaten von Patienten mit duktalem Pankreaskarzinom eine Überexpression von sowohl miR-186 als auch miR-21 im Vergleich zu Gewebeproben von Patienten mit chronischer Pankreatitis und normalem Pankreasgewebe [121]. Cao *et al.* analysierten die miR-186-Expression in 90 Resektionspräparaten von Patienten mit Magenkarzinom [122]. Während bei den beiden erst genannten Arbeiten für das CRC sowie Pankreaskarzinom miR-186 im Tumorgewebe überexprimiert war, zeigten sich für das Magenkarzinom erniedrigte Expressionsspiegel für miR-186. Ergänzend konnten im Rahmen von in-vitro-Experimenten Magenkarzinom-Zelllinien mit miR-186 bestückt und konsekutiv im Wachstum gehemmt werden. Schließlich illustrierten auch Ruan *et al.* in analoger Weise erniedrigte miR-186-Expressionslevel in HCC-Zelllinien [123].

Insgesamt deuten die Arbeiten darauf hin, dass potentielle Unterschiede zwischen verschiedenen Tumorentitäten hinsichtlich des Expressionslevels einer betrachteten miRNA existieren. Wir haben in der vorliegenden *proof-of-principle* Studie jedoch sämtliche Tumorentitäten zusammengeführt. Ein ergänzender Ansatz wären neue prospektive Untersuchungen spezifischer miRNA hinsichtlich einer bestimmten Tumorentität.

Dennoch liegt die Vermutung nahe, dass miRNA von metastasierenden Tumoren, z.B. in Exosomen, sezerniert werden, und diese miRNA dann noch nicht transformierte, prämetastatische Zellen über den Einfluss auf Proteasen, Adhäsionsmolekülen, Chemokinen, u.a. für die Infiltration von Tumorzellen vorbereiten, wie Rana *et al.* eindrucksvoll illustrierten [124]. Während sich Tumorzellen in Aszites zytologisch nachweisen lassen, könnte die Analyse der miRNA-Expression über die Diagnose hinaus wichtige Hinweise hinsichtlich Biologie des Tumors sowie Zustand des Peritoneums geben. Sofern nicht jeder Patient mit Peritonealkarzinose auch Aszites entwickelt, besteht eine gewisse begrenzte klinische Umsetzbarkeit [6,11].

Bezüglich der Biologie des Aszites ist es wichtig nicht nur die PCA, sondern auch andere Aszitesformen zu unterscheiden. So haben wir die SBP als wichtige Differentialdiagnose bewusst in unsere Untersuchungen miteinbezogen. Aus den Analysen unserer Arbeitsgruppe geht hervor, dass miR-223 in entzündlichen Erkrankungen überexprimiert ist [125]. Zudem wurde miR-223 bereits als spezifische hämatopoetische miRNA mit besonderer Rolle in der Myelopoese identifiziert [126]. Weiterhin ist miR-223 beteiligt an der Differenzierung von Granulozyten und assoziiert mit Entzündungsreaktionen, u.a. im Sinne der Makrophagenaktivierung [112,114]. Daher ist es nicht überraschend, dass miR-223 wie bereits erwähnt in entzündlichen und infektiösen Erkrankungen, wie z.B. chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen, Dermatomyositis, rheumatoide Arthritis und Sepsis, veränderte Expressionsmuster aufweist [127–130]. In der vorliegenden Studie wiesen Patienten mit SBP eine signifikant höhere miR-223-Expression auf gegenüber denen mit PCA und PHT. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass miR-223 für die Etablierung einer individuellen Risikostratifizierung im Falle der SBP genutzt werden kann. Überdies könnte miR-223 als Biomarker für das Therapieansprechen dienen und in diesem Zusammenhang die Indikation für eine Langzeit-Antibiotikasekundärprophylaxe in Frage stellen.

Zudem erlaubt die erhöhte miR-223-Expression unter Patienten mit SBP eine bessere Differenzierung zwischen den einzelnen Studiengruppen. Dies führt uns zu der Annahme, dass spezifische miRNA-Muster größeres Potential als Biomarker besitzen als einzeln betrachtete miRNA. So zeigten Zuo *et al.* in ähnlicher Weise im Serum von Patienten mit HCC gegenüber gesunden Probanden, dass ein Panel aus miR-125b und miR-27a in Kombination mit AFP zu höherer Sensitivität und Spezifität in der Diagnostik des HCC führt, als wenn nur ein einzelner Marker verwendet wird [131]. In gleicher Weise berichteten Lu *et al.* anhand Patienten mit Mundhöhlenkarzinom, dass ein Panel aus miR-196a und miR-196b in Plasma die Früherkennung eines Mundhöhlenkarzinoms mit hoher Sensitivität und Spezifität erlaubt [132].

In diesem Gesamtkontext wurde auch miR-122 betrachtet. MiR-122 gilt als leberspezifisch und ist im HCC häufig unterexprimiert [109]. Coulouarn *et al.* beschrieben, dass erniedrigte miR-122-Expressionslevel mit klinisch relevanten Parametern wie Ätiologie, Entzündungsaktivität, Tumorgröße und

Differenzierungsgrad korrelieren. Darüber hinaus weist miR-122 ein spezifisches Expressionsmuster gerade für Lebertumoren, die molekulargenetisch als Tumoren mit schlechter Prognose und hoher Metastasierungsneigung klassifiziert wurden, auf. In der vorliegenden Arbeit wählten wir miR-122, weil auch die PHT eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Aszites spielt und die Vermutung nahe lag, dass miR-122 etwas höher exprimiert sein könnte. Das konnten wir so jedoch nicht feststellen, wengleich die Inflammation der Leber hier nicht berücksichtigt wurde.

Nichtsdestotrotz liefern unsere Ergebnisse neue Hinweise für die unterschiedliche miRNA-Expression in Aszites bei Patienten mit PCA und SBP, wengleich in künftigen prospektiven Studien einzelne Tumorentitäten isoliert analysiert werden sollten.

4.4 Offene Fragen und klinische Umsetzung

Obwohl die Daten der vorliegenden Arbeit einer geringen Fallzahl entstammen, decken sich ihre Ergebnisse mit denen vergangener Studien, in denen das Potential der miRNA als Biomarker in Blut und Stuhl bereits etabliert wurde [78,81,94]. Gleichwohl ergeben sich noch einige offene Fragen, die vor der klinischen Umsetzung von miRNA als Biomarker zu beantworten sind. Die Ergebnisse zeigen, dass miRNA relativ unkompliziert und reproduzierbar aus Aszites zu isolieren sind. Dennoch herrschen derzeit immer noch nahezu beträchtliche Unterschiede in den Ergebnissen zwischen verschiedenen Laboren. Während die meisten Daten von einzelnen Zentren erhoben wurden, bedarf es standardisierter Protokolle der kommerziellen Extraktionskits und einheitlicher Bearbeitungsformen und Lagerungsbedingungen der klinischen Proben, um eine hohe Reproduzierbarkeit zwischen verschiedenen Laboren zu gewährleisten.

Eine weitere Herausforderung in der miRNA-Expressionsanalyse ist die Normalisierung, da auch für die Normalisierung der Expressionslevel derzeit keine standardisierte Methode existiert. Die Normalisierung ist erforderlich, um etwaige Abweichungen in der miRNA-Extraktion und/oder cDNA-Synthese zu berücksichtigen. Dabei herrschte lange Zeit genereller Konsens, RNU6b als Normalisierungsgen zu verwenden [88,133]. Die Arbeitsgruppen um Gee *et al.* und Xiang *et al.* beschrieben jedoch, dass RNU6b in diesem Kontext eher nicht geeignet ist, da es selbst mit Tumorprogression und Prognose korreliert und eine erhebliche

Variationsbreite in der Expression aufweist [115,134]. Multiple vergangene Studien haben miR-16 zur Normalisierung in Blut, Stuhl, usw. verwendet, wobei miR-16 mehrfach eine Fehlregulation unter bestimmten pathologischen Bedingungen zugeschrieben und seine Eignung als Normalisierungsgen in Frage gestellt wurde [61,135–137]. Trotzdem wird es weiter in großem Maße genutzt, u.a. in der kürzlich erschienenen Arbeit von Tokuhsa *et al.* zur Normalisierung in Peritoneallavage bei Patienten mit Magenkarzinom. In dieser Studie beobachteten wir eine starke Korrelation zwischen der miR-21- und miR-16 Expression. Dies deutet darauf hin, dass miR-16 eher ungeeignet für die Normalisierung ist. Vor diesem Hintergrund könnte die Normalisierung mit cel-39 auf Volumen- und Extraktionsunterschiede, in dem der jeweiligen Probenlösung stets die gleiche Menge der synthetischen miRNA cel-miR-39 vor jedem Extraktionsvorgang zur späteren Normalisierung hinzugefügt wird, als standardisierte Normalisierungsmethode etabliert werden.

Letztlich verdeutlichen die unterschiedlichen miRNA-Expressionsmuster in Aszitesproben von Patienten mit PCA, SBP und PHT das Potential von miRNAs als Biomarker. Dennoch sei an dieser Stelle festzuhalten, dass die Erwartungshaltung an eine definierte miRNA als Biomarker für eine spezielle Krankheit nicht erfüllt werden kann. Vielmehr liegt das unzweifelhaft vorhandene Potential der miRNA als Biomarker in der Verwendung sogenannter Panels, als eine Kombination mehrerer miRNAs, um mit einer höheren Sensitivität und Spezifität gängige klinische Verfahren abzulösen. Das beste Beispiel aus unseren Daten bildet miR-21, welche sowohl bei Patienten mit PCA als auch mit SBP erhöht war. Nimmt man jedoch miR-223 ins Gewicht, so wäre es möglich auch zwischen diesen Gruppen zu unterscheiden und tatsächlich einen diagnostischen Gewinn zu erbringen.

Die vorliegende Arbeit wurde als explorative Studie durchgeführt und multiple Verfahren evaluiert, um den besten Ansatz für eine miRNA-Analyse zu finden. In unserer Studie haben wir vor allem nativen, unverarbeiteten Aszites analysiert. Obwohl wir einen signifikanten Unterschied in der Expression auch bei dieser kleinen Anzahl von Patienten beobachteten, könnte eine spezifischere RNA-Quelle wie exosomale miRNA einen zusätzlichen Nutzen und eine höhere Spezifität bieten. Eine weitere Einschränkung der Studie ist die Verwendung der TaqMan-basierten TLDA. Hier wäre die *next-generation* Sequenzierung aller miRNA von größtem Wert.

Schließlich haben wir uns auf das diagnostische Potential von miRNA in Aszites fokussiert. Es wäre jedoch spannend auch therapeutische Anwendungen wie antago-miR oder miRNA-like zu vertiefen. Die Anatomie der Peritonealregion würde eine sichere und kontinuierliche Anwendung solcher Verbindungen ermöglichen und möglicherweise so zu einem verbesserten Gesamtüberleben beitragen.

Schlussendlich konnte gezeigt werden, dass miRNA einfach, stabil und reproduzierbar aus Aszitesproben zu extrahieren sind. Unterschiedliche miRNA-Expressionsmuster unter Patienten mit PCA, SBP und PHT illustrieren, dass miRNA in Aszites als potentielle Biomarker genutzt werden können. Darüber hinaus kann ein kombiniertes Panel aus mehreren miRNA Sensitivität, Spezifität und die diagnostische Aussagekraft erhöhen. Die Daten benötigen eine weitere Validierung in großen prospektiven Studien, während die Mehrheit der gegenwärtigen Ergebnisse aus kleinen Fallzahlen hervorgeht. Nichtsdestotrotz, besteht vielversprechendes Potential von miRNA als Biomarker in Aszites, sodass die miRNA-Expressionsanalyse in Zukunft als wichtige klinische Methode für Diagnostik und Prognoseabschätzung etabliert und neue Therapieansätze bieten kann.

5 Zusammenfassung

Die Peritonealkarzinose (PCA) ist ein häufiges Ereignis bei gastrointestinalen Tumoren mit entscheidender prognostischer und therapeutischer Relevanz für die Patienten. Die Differentialdiagnose zur spontan bakteriellen Peritonitis (SBP) oder zu unkompliziertem Aszites durch portale Hypertonie (PHT) ist nicht immer einfach, wobei die Zytologie trotz ihrer geringen Sensitivität den Goldstandard bildet. MicroRNA (miRNA) gelten als vielversprechende Biomarker und sind bei Tumoren oftmals fehlreguliert. In der vorliegenden *proof-of-principle* Studie evaluierten wir das Potential von miRNA als Aszites-Biomarker für die PCA.

Wir haben prospektiv Proben von Patienten mit Aszites unterschiedlicher Genese gesammelt: Patienten mit PCA (n = 15), SBP (n = 15) und PHT (keine PCA/SBP, n = 15). Verschiedene Extraktionskits wurden verwendet, um die RNA-Extraktionsmenge zu vergleichen. Darüber hinaus haben wir systematisch den Einfluss der Lagerung, Stabilität und Probenverarbeitung auf die miRNA-Expression analysiert. MiRNA-Expressionsprofiling mittels TaqMan Low Density Array (TLDA) und quantitativer RT-PCR (TaqMan/SYBRgreen) wurden zur Evaluation der miRNA-Expression verwendet.

Alle ausgewählten miRNA konnten leicht und reproduzierbar in den Aszitesproben nachgewiesen werden. Die systematische Analyse der miRNA-Stabilität bestätigte den suffizienten Schutz vor Abbau und damit verbunden eine gute Kurz- und Langzeitstabilität. Das miRNA-Expressionsprofiling bei Patienten mit PCA gegenüber denen mit PHT zeigte, dass miR-21, miR-186, miR-222 und miR 483-5p hochreguliert und miR-26b herunterreguliert waren. Die miRNA-Expressionsanalyse zur Validierung bestätigte eine höhere Expression von miR-21 und miR-186 bei Patienten mit PCA im Vergleich zu der PHT-Gruppe, während miR-223 bei SBP signifikant hochreguliert wurde.

Unsere Daten liefern neue Hinweise für die unterschiedliche miRNA-Expression in Aszites bei Patienten mit PCA und SBP. Basierend auf diesen Ergebnissen kann die Analyse von miRNA in Aszites neue Ansätze für Diagnose und Therapie der PCA bieten.

6 Literaturverzeichnis

- 1 Siegel RL, Miller KD, Jemal A: Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin* 2015;65:5–29.
- 2 Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al.: Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2014;136:E359-86.
- 3 Tiwari AK, Laird-Fick HS, Wali RK, Roy HK: Surveillance for gastrointestinal malignancies. *World J Gastroenterol* 2012;18:4507–16.
- 4 Coccolini F: Peritoneal carcinomatosis. *World J Gastroenterol* 2013;19:6979.
- 5 Sampson JA: Implantation Peritoneal Carcinomatosis of Ovarian Origin. *Am J Pathol* 1931 [cited 2016 Feb 23];7:423–444.39.
- 6 Sadeghi B, Arvieux C, Glehen O, Beaujard AC, Rivoire M, Baulieux J, et al.: Peritoneal carcinomatosis from non-gynecologic malignancies: results of the EVOCAPE 1 multicentric prospective study. *Cancer* 2000 [cited 2016 Jan 12];88:358–63.
- 7 Sugarbaker PH: Pseudomyxoma peritonei. *Cancer Treat Res* 1996 [cited 2016 Feb 29];81:105–19.
- 8 Kusamura S, Baratti D, Zaffaroni N, Villa R, Laterza B, Balestra MR, et al.: Pathophysiology and biology of peritoneal carcinomatosis. *World J Gastrointest Oncol* 2010;2:12–8.
- 9 Terzi C, Arslan NC, Canda AE: Peritoneal carcinomatosis of gastrointestinal tumors: where are we now? *World J Gastroenterol* 2014;20:14371–80.
- 10 Piso P, Arnold D: Multimodal treatment approaches for peritoneal carcinosis in colorectal cancer. *Dtsch Arzteblatt Int* 2011;108:802–8.
- 11 Chu DZ, Lang NP, Thompson C, Osteen PK, Westbrook KC: Peritoneal carcinomatosis in nongynecologic malignancy. A prospective study of prognostic factors. *Cancer* 1989 [cited 2016 Jan 13];63:364–7.

- 12 Runyon BA, Hoefs JC, Morgan TR: Ascitic fluid analysis in malignancy-related ascites. *Hepatology* [cited 2016 Feb 2];8:1104–9.
- 13 Berthelot C, Morel O, Girault S, Verrièle V, Poirier A-L, Moroch J, et al.: Use of FDG-PET/CT for peritoneal carcinomatosis before hyperthermic intraperitoneal chemotherapy. *Nucl Med Commun* 2011;32:23–9.
- 14 Klumpp BD, Schwenger N, Aschoff P, Miller S, Kramer U, Claussen CD, et al.: Preoperative assessment of peritoneal carcinomatosis: intraindividual comparison of 18F-FDG PET/CT and MRI. *Abdom Imaging* 2013;38:64–71.
- 15 Yan TD, Morris DL, Shigeki K, Dario B, Marcello D: Preoperative investigations in the management of peritoneal surface malignancy with cytoreductive surgery and perioperative intraperitoneal chemotherapy: Expert consensus statement. *J Surg Oncol* 2008;98:224–7.
- 16 Jacquet P, Sugarbaker PH: Clinical research methodologies in diagnosis and staging of patients with peritoneal carcinomatosis. *Cancer Treat Res* 1996 [cited 2016 Mar 1];82:359–74.
- 17 Chia CS, You B, Decullier E, Vaudoyer D, Lorimier G, Abboud K, et al.: Patients with Peritoneal Carcinomatosis from Gastric Cancer Treated with Cytoreductive Surgery and Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy: Is Cure a Possibility? *Ann Surg Oncol* 2016;23:1971–9.
- 18 Sugarbaker PH, Jablonski KA: Prognostic features of 51 colorectal and 130 appendiceal cancer patients with peritoneal carcinomatosis treated by cytoreductive surgery and intraperitoneal chemotherapy. *Ann Surg* 1995 [cited 2016 Mar 1];221:124–32.
- 19 Spratt JS, Adcock RA, Muskovin M, Sherrill W, McKeown J: Clinical delivery system for intraperitoneal hyperthermic chemotherapy. *Cancer Res* 1980 [cited 2016 Feb 24];40:256–60.
- 20 Sugarbaker PH: Surgical treatment of peritoneal carcinomatosis: 1988 Du Pont lecture. *Can J Surg* 1989 [cited 2016 Feb 24];32:164–70.
- 21 Sugarbaker PH: Peritonectomy procedures. *Surg Oncol Clin N Am* 2003 [cited 2016 Feb 24];12:703–27, xiii.

- 22 González-Moreno S: Peritoneal Surface Oncology: A progress report. *Eur J Surg Oncol* 2006;32:593–6.
- 23 Chua TC, Moran BJ, Sugarbaker PH, Levine EA, Glehen O, Gilly FN, et al.: Early- and long-term outcome data of patients with pseudomyxoma peritonei from appendiceal origin treated by a strategy of cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy. *J Clin Oncol* 2012;30:2449–56.
- 24 Miner TJ, Shia J, Jaques DP, Klimstra DS, Brennan MF, Coit DG: Long-term Survival Following Treatment of Pseudomyxoma Peritonei. *Ann Surg* 2005;241:300–308.
- 25 Esquivel J, Piso P, Verwaal V, Bachleitner-Hofmann T, Glehen O, González-Moreno S, et al.: American Society of Peritoneal Surface Malignancies opinion statement on defining expectations from cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in patients with colorectal cancer. *J Surg Oncol* 2014;110:777–8.
- 26 Rudloff U, Langan RC, Mullinax JE, Beane JD, Steinberg SM, Beresnev T, et al.: Impact of maximal cytoreductive surgery plus regional heated intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) on outcome of patients with peritoneal carcinomatosis of gastric origin: Results of the GYMSSA trial. *J Surg Oncol* 2014;110:275–284.
- 27 Feldman AL, Libutti SK, Pingpank JF, Bartlett DL, Beresnev TH, Mavroukakis SM, et al.: Analysis of factors associated with outcome in patients with malignant peritoneal mesothelioma undergoing surgical debulking and intraperitoneal chemotherapy. *J Clin Oncol* 2003;21:4560–7.
- 28 Vogelzang NJ, Rusthoven JJ, Symanowski J, Denham C, Kaukel E, Ruffie P, et al.: Phase III study of pemetrexed in combination with cisplatin versus cisplatin alone in patients with malignant pleural mesothelioma. *J Clin Oncol* 2003;21:2636–44.
- 29 Lambert LA: Looking up: Recent advances in understanding and treating peritoneal carcinomatosis. *CA Cancer J Clin* 65:284–98.
- 30 Krencker E: Bacterium coli commune als Sepsiserreger in 2 fallen von abdominalen krankungen. *Munchen Med Wschr* 1907;54:2095.

- 31 Conn HO: SPONTANEOUS PERITONITIS AND BACTEREMIA IN LAENNEC'S CIRRHOSIS CAUSED BY ENTERIC ORGANISMS. A RELATIVELY COMMON BUT RARELY RECOGNIZED SYNDROME. *Ann Intern Med* 1964 [cited 2016 Jan 16];60:568–80.
- 32 Rimola A, García-Tsao G, Navasa M, Piddock LJ, Planas R, Bernard B, et al.: Diagnosis, treatment and prophylaxis of spontaneous bacterial peritonitis: a consensus document. International Ascites Club. *J Hepatol* 2000 [cited 2016 Jan 4];32:142–53.
- 33 Guarner C, Runyon BA: Spontaneous bacterial peritonitis: pathogenesis, diagnosis, and management. *Gastroenterologist* 1995 [cited 2016 Feb 24];3:311–28.
- 34 Hurwich DB, Lindor KD, Hay JE, Gross JB, Kaese D, Rakela J: Prevalence of peritonitis and the ascitic fluid protein concentration among chronic liver disease patients. *Am J Gastroenterol* 1993 [cited 2016 Feb 24];88:1254–7.
- 35 Such J, Runyon BA: Spontaneous bacterial peritonitis. *Clin Infect Dis* 1998 [cited 2016 Feb 24];27:669-74–6.
- 36 Schmid SA, Wiest R, Salzberger B, Klebl F: Spontan bakterielle Peritonitis. *Medizinische Klin - Intensivmed und Notfallmedizin* 2012;107:548–552.
- 37 Chang CS, Chen GH, Lien HC, Yeh HZ: Small intestine dysmotility and bacterial overgrowth in cirrhotic patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology* 1998;28:1187–90.
- 38 Runyon BA, Squier S, Borzio M: Translocation of gut bacteria in rats with cirrhosis to mesenteric lymph nodes partially explains the pathogenesis of spontaneous bacterial peritonitis. *J Hepatol* 1994 [cited 2016 Feb 24];21:792–6.
- 39 Scarpellini E, Valenza V, Gabrielli M, Lauritano EC, Perotti G, Merra G, et al.: Intestinal permeability in cirrhotic patients with and without spontaneous bacterial peritonitis: is the ring closed? *Am J Gastroenterol* 2010;105:323–7.
- 40 Dever JB, Sheikh MY: Review article: spontaneous bacterial peritonitis--bacteriology, diagnosis, treatment, risk factors and prevention. *Aliment Pharmacol Ther* 2015;41:1116–31.

- 41 Ho H, Zuckerman MJ, Ho TK, Guerra LG, Verghese A, Casner PR: Prevalence of associated infections in community-acquired spontaneous bacterial peritonitis. *Am J Gastroenterol* 1996 [cited 2016 Mar 2];91:735–42.
- 42 Obstein KL, Campbell MS, Reddy KR, Yang Y-X: Association between model for end-stage liver disease and spontaneous bacterial peritonitis. *Am J Gastroenterol* 2007;102:2732–6.
- 43 Runyon BA: Monomicrobial nonneutrocytic bacterascites: a variant of spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology* 1990 [cited 2016 Mar 2];12:710–5.
- 44 Gerbes AL, Gülberg V, Sauerbruch T, Wiest R, Appenrodt B, Bahr MJ, et al.: [German S 3-guideline "ascites, spontaneous bacterial peritonitis, hepatorenal syndrome"]. *Z Gastroenterol* 2011;49:749–79.
- 45 Sort P, Navasa M, Arroyo V, Aldeguer X, Planas R, Ruiz-del-Arbol L, et al.: Effect of intravenous albumin on renal impairment and mortality in patients with cirrhosis and spontaneous bacterial peritonitis. *N Engl J Med* 1999;341:403–9.
- 46 Huang C-H, Lin C-Y, Sheen I-S, Chen W-T, Lin T-N, Ho Y-P, et al.: Recurrence of spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotic patients non-prophylactically treated with norfloxacin: serum albumin as an easy but reliable predictive factor. *Liver Int* 2011;31:184–91.
- 47 Andreu M, Sola R, Sitges-Serra A, Alia C, Gallen M, Vila MC, et al.: Risk factors for spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotic patients with ascites. *Gastroenterology* 1993 [cited 2016 Jan 3];104:1133–8.
- 48 Lim KHJ, Potts JR, Chetwood J, Goubet S, Verma S: Long-term outcomes after hospitalization with spontaneous bacterial peritonitis. *J Dig Dis* 2015;16:228–40.
- 49 Wiest R: Diagnostik und Therapie des Aszites 2006;103:1972–1981.
- 50 Liu F, Kong X, Dou Q, Ye J, Xu D, Shang H, et al.: Evaluation of tumor markers for the differential diagnosis of benign and malignant ascites. *Ann Hepatol* [cited 2017 Jan 17];13:357–63.

- 51 Lata J, Stiburek O, Kopacova M: Spontaneous bacterial peritonitis: a severe complication of liver cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2009 [cited 2016 Jan 12];15:5505–10.
- 52 Zhan N, Dong W-G, Wang J: The clinical significance of vascular endothelial growth factor in malignant ascites. *Tumor Biol* 2016;37:3719–3725.
- 53 Biomarkers Definitions Working Group: Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 2001;69:89–95.
- 54 Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V: The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993 [cited 2014 Oct 27];75:843–54.
- 55 Wightman B, Ha I, Ruvkun G: Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 1993 [cited 2014 Dec 19];75:855–62.
- 56 Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T: Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 2001;294:853–8.
- 57 Lee RC, Ambros V: An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2001;294:862–4.
- 58 He L, Hannon GJ: MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet* 2004;5:522–31.
- 59 Lewis BP, Burge CB, Bartel DP: Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 2005;120:15–20.
- 60 Friedman RC, Farh KK-H, Burge CB, Bartel DP: Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 2009;19:92–105.
- 61 Link A, Goel A: MicroRNA in gastrointestinal cancer: a step closer to reality. 2013. DOI: 10.1016/B978-0-12-800096-0.00006-8

- 62 Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N: Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* 2008;9:102–14.
- 63 Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, et al.: The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 2003;425:415–9.
- 64 Lee Y, Jeon K, Lee J-T, Kim S, Kim VN: MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J* 2002 [cited 2014 Dec 14];21:4663–70.
- 65 Filipowicz W, Jaskiewicz L, Kolb FA, Pillai RS: Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. *Curr Opin Struct Biol* 2005;15:331–41.
- 66 Liu J, Carmell MA, Rivas F V, Marsden CG, Thomson JM, Song J-J, et al.: Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 2004;305:1437–41.
- 67 Tang R, Li L, Zhu D, Hou D, Cao T, Gu H, 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* 2012;22:504–15.
- 68 Ambros V: The functions of animal microRNAs. *Nature* 2004;431:350–5.
- 69 Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO: Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 2007;9:654–9.
- 70 Hunter MP, Ismail N, Zhang X, Aguda BD, Lee EJ, Yu L, et al.: Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS One* 2008;3:e3694.
- 71 Turchinovich A, Weiz L, Langheinz A, Burwinkel B: Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res* 2011;39:7223–33.
- 72 Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, et al.: Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:5003–8.

- 73 Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT: MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol* 2011;13:423–33.
- 74 Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, Pushkaran B, Liggins AP, Pulford K, et al.: Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol* 2008;141:672–5.
- 75 Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, et al.: Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:10513–8.
- 76 Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, et al.: The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem* 2010;56:1733–41.
- 77 Kim JO, Gazala S, Razzak R, Guo L, Ghosh S, Roa WH, et al.: Non-small cell lung cancer detection using microRNA expression profiling of bronchoalveolar lavage fluid and sputum. *Anticancer Res* 2015 [cited 2016 Jan 27];35:1873–80.
- 78 Link A, Balaguer F, Shen Y, Nagasaka T, Lozano JJ, Boland CR, et al.: Fecal MicroRNAs as Novel Biomarkers for Colon Cancer Screening. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010;19:1766–1774.
- 79 Murata K, Yoshitomi H, Tanida S, Ishikawa M, Nishitani K, Ito H, et al.: Plasma and synovial fluid microRNAs as potential biomarkers of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 2010;12:R86.
- 80 Kiko T, Nakagawa K, Tsuduki T, Furukawa K, Arai H, Miyazawa T: MicroRNAs in plasma and cerebrospinal fluid as potential markers for Alzheimer’s disease. *J Alzheimers Dis* 2014;39:253–9.
- 81 Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, et al.: Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res* 2008;18:997–1006.
- 82 Jiang Q, Wang Y, Hao Y, Juan L, Teng M, Zhang X, et al.: miR2Disease: a manually curated database for microRNA deregulation in human disease. *Nucleic Acids Res* 2009;37:D98-104.

- 83 Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, et al.: Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:15524–9.
- 84 Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, et al.: A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2005;353:1793–801.
- 85 Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, et al.: MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005;435:834–8.
- 86 Tsujiura M, Ichikawa D, Komatsu S, Shiozaki A, Takeshita H, Kosuga T, et al.: Circulating microRNAs in plasma of patients with gastric cancers. *Br J Cancer* 2010;102:1174–9.
- 87 Liu R, Zhang C, Hu Z, Li G, Wang C, Yang C, et al.: A five-microRNA signature identified from genome-wide serum microRNA expression profiling serves as a fingerprint for gastric cancer diagnosis. *Eur J Cancer* 2011;47:784–91.
- 88 Ng EKO, Chong WWS, Jin H, Lam EKY, Shin VY, Yu J, et al.: Differential expression of microRNAs in plasma of patients with colorectal cancer: a potential marker for colorectal cancer screening. *Gut* 2009;58:1375–81.
- 89 Ahmed FE, Jeffries CD, Vos PW, Flake G, Nuovo GJ, Sinar DR, et al.: Diagnostic microRNA markers for screening sporadic human colon cancer and active ulcerative colitis in stool and tissue. *Cancer Genomics Proteomics* [cited 2017 Apr 15];6:281–95.
- 90 Wang J, Chen J, Chang P, LeBlanc A, Li D, Abbruzzesse JL, et al.: MicroRNAs in plasma of pancreatic ductal adenocarcinoma patients as novel blood-based biomarkers of disease. *Cancer Prev Res (Phila)* 2009;2:807–13.
- 91 Liu R, Chen X, Du Y, Yao W, Shen L, Wang C, et al.: Serum MicroRNA Expression Profile as a Biomarker in the Diagnosis and Prognosis of Pancreatic Cancer. *Clin Chem* 2012;58:610–618.
- 92 Zhou J, Yu L, Gao X, Hu J, Wang J, Dai Z, et al.: Plasma microRNA panel to diagnose hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 2011;29:4781–8.

- 93 Balaguer F, Moreira L, Lozano JJ, Link A, Ramirez G, Shen Y, et al.: Colorectal cancers with microsatellite instability display unique miRNA profiles. *Clin Cancer Res* 2011;17:6239–49.
- 94 Ahmed FE, Jeffries CD, Vos PW, Flake G, Nuovo GJ, Sinar DR, et al.: Diagnostic microRNA markers for screening sporadic human colon cancer and active ulcerative colitis in stool and tissue. *Cancer Genomics Proteomics* [cited 2016 Feb 5];6:281–95.
- 95 Tokuhisa M, Ichikawa Y, Kosaka N, Ochiya T, Yashiro M, Hirakawa K, et al.: Exosomal miRNAs from Peritoneum Lavage Fluid as Potential Prognostic Biomarkers of Peritoneal Metastasis in Gastric Cancer. *PLoS One* 2015;10:e0130472.
- 96 Runyon BA: Malignancy-related ascites and ascitic fluid “humoral tests of malignancy”. *J Clin Gastroenterol* 1994 [cited 2016 Jan 27];18:94–8.
- 97 Runyon BA, Montano AA, Akriviadis EA, Antillon MR, Irving MA, McHutchison JG: The serum-ascites albumin gradient is superior to the exudate-transudate concept in the differential diagnosis of ascites. *Ann Intern Med* 1992 [cited 2016 Feb 2];117:215–20.
- 98 Kozomara A, Griffiths-Jones S: miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res* 2014;42:D68-73.
- 99 Livak KJ, Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25:402–8.
- 100 Tseng GC, Oh MK, Rohlin L, Liao JC, Wong WH: Issues in cDNA microarray analysis: quality filtering, channel normalization, models of variations and assessment of gene effects. *Nucleic Acids Res* 2001 [cited 2017 Jan 21];29:2549–57.
- 101 Dvinge H, Bertone P: HTqPCR: high-throughput analysis and visualization of quantitative real-time PCR data in R. *Bioinformatics* 2009;25:3325–6.
- 102 Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, Ghoshal K, Jacob ST, Patel T: MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology* 2007;133:647–58.

- 103 Chan S-H, Wu C-W, Li AFY, Chi C-W, Lin W-C: miR-21 microRNA expression in human gastric carcinomas and its clinical association. *Anticancer Res* [cited 2016 Mar 7];28:907–11.
- 104 Dillhoff M, Liu J, Frankel W, Croce C, Bloomston M: MicroRNA-21 is overexpressed in pancreatic cancer and a potential predictor of survival. *J Gastrointest Surg* 2008;12:2171–6.
- 105 Schetter AJ, Leung SY, Sohn JJ, Zanetti KA, Bowman ED, Yanaihara N, et al.: MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma. *JAMA* 2008;299:425–36.
- 106 Yang J, Ma D, Fesler A, Zhai H, Leamniramit A, Li W, et al.: Expression analysis of microRNA as prognostic biomarkers in colorectal cancer. *Oncotarget* 2016; DOI: 10.18632/oncotarget.14175
- 107 Song J, Bai Z, Han W, Zhang J, Meng H, Bi J, et al.: Identification of Suitable Reference Genes for qPCR Analysis of Serum microRNA in Gastric Cancer Patients. *Dig Dis Sci* 2012;57:897–904.
- 108 Schwarzenbach H, da Silva AM, Calin G, Pantel K: Data Normalization Strategies for MicroRNA Quantification. *Clin Chem* 2015;61:1333–1342.
- 109 Lin CJ-F, Gong H-Y, Tseng H-C, Wang W-L, Wu J-L: miR-122 targets an anti-apoptotic gene, Bcl-w, in human hepatocellular carcinoma cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;375:315–20.
- 110 Coulouarn C, Factor VM, Andersen JB, Durkin ME, Thorgeirsson SS: Loss of miR-122 expression in liver cancer correlates with suppression of the hepatic phenotype and gain of metastatic properties. *Oncogene* 2009;28:3526–36.
- 111 Thakral S, Ghoshal K: miR-122 is a unique molecule with great potential in diagnosis, prognosis of liver disease, and therapy both as miRNA mimic and antimir. *Curr Gene Ther* 2015 [cited 2017 Jun 13];15:142–50.
- 112 Johnnidis JB, Harris MH, Wheeler RT, Stehling-Sun S, Lam MH, Kirak O, et al.: Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223. *Nature* 2008;451:1125–9.

- 113 Taïbi F, Metzinger-Le Meuth V, Massy ZA, Metzinger L: miR-223: An inflammatory oncomiR enters the cardiovascular field. *Biochim Biophys Acta* 2014;1842:1001–9.
- 114 Ying W, Tseng A, Chang RC-A, Morin A, Brehm T, Triff K, et al.: MicroRNA-223 is a crucial mediator of PPAR γ -regulated alternative macrophage activation. *J Clin Invest* 2015;125:4149–59.
- 115 Gee HE, Buffa FM, Camps C, Ramachandran A, Leek R, Taylor M, et al.: The small-nucleolar RNAs commonly used for microRNA normalisation correlate with tumour pathology and prognosis. *Br J Cancer* 2011;104:1168–77.
- 116 Link A, Becker V, Goel A, Wex T, Malfertheiner P: Feasibility of fecal microRNAs as novel biomarkers for pancreatic cancer. *PLoS One* 2012;7:1–9.
- 117 El-Khoury V, Pierson S, Kaoma T, Bernardin F, Berchem G: Assessing cellular and circulating miRNA recovery: the impact of the RNA isolation method and the quantity of input material. *Sci Rep* 2016;6:19529.
- 118 Pritchard CC, Kroh E, Wood B, Arroyo JD, Dougherty KJ, Miyaji MM, et al.: Blood cell origin of circulating microRNAs: a cautionary note for cancer biomarker studies. *Cancer Prev Res (Phila)* 2012;5:492–7.
- 119 Sourvinou IS, Markou A, Lianidou ES: Quantification of circulating miRNAs in plasma: effect of preanalytical and analytical parameters on their isolation and stability. *J Mol Diagn* 2013;15:827–34.
- 120 Islam F, Gopalan V, Vider J, Wahab R, Ebrahimi F, Lu C, et al.: MicroRNA-186-5p overexpression modulates colon cancer growth by repressing the expression of the FAM134B tumour inhibitor. *Exp Cell Res* 2017; DOI: 10.1016/j.yexcr.2017.05.021
- 121 Calatayud D, Dehlendorff C, Boisen MK, Hasselby JP, Schultz NA, Werner J, et al.: Tissue MicroRNA profiles as diagnostic and prognostic biomarkers in patients with resectable pancreatic ductal adenocarcinoma and periampullary cancers. *Biomark Res* 2017;5:8.
- 122 Cao C, Sun D, Zhang L, Song L: miR-186 affects the proliferation, invasion and migration of human gastric cancer by inhibition of Twist1. *Oncotarget* 2016;7:79956–79963.

- 123 Ruan T, He X, Yu J, Hang Z: MicroRNA-186 targets Yes-associated protein 1 to inhibit Hippo signaling and tumorigenesis in hepatocellular carcinoma. *Oncol Lett* 2016;11:2941–2945.
- 124 Rana S, Malinowska K, Zöller M: Exosomal tumor microRNA modulates premetastatic organ cells. *Neoplasia* 2013 [cited 2016 Mar 10];15:281–95.
- 125 Link A, Schirrmester W, Langner C, Varbanova M, Bornschein J, Wex T, et al.: Differential expression of microRNAs in preneoplastic gastric mucosa. *Sci Rep* 2015;5:8270.
- 126 Sun W, Shen W, Yang S, Hu F, Li H, Zhu T-H: miR-223 and miR-142 attenuate hematopoietic cell proliferation, and miR-223 positively regulates miR-142 through LMO2 isoforms and CEBP- β . *Cell Res* 2010;20:1158–69.
- 127 Wang H, Zhang S, Yu Q, Yang G, Guo J, Li M, et al.: Circulating MicroRNA223 is a New Biomarker for Inflammatory Bowel Disease. *Medicine (Baltimore)* 2016;95:e2703.
- 128 Eisenberg I, Eran A, Nishino I, Moggio M, Lamperti C, Amato AA, et al.: Distinctive patterns of microRNA expression in primary muscular disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:17016–21.
- 129 Filková M, Aradi B, Senolt L, Ospelt C, Vettori S, Mann H, et al.: Association of circulating miR-223 and miR-16 with disease activity in patients with early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2014;73:1898–904.
- 130 Wang J, Yu M, Yu G, Bian J, Deng X, Wan X, et al.: Serum miR-146a and miR-223 as potential new biomarkers for sepsis. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;394:184–8.
- 131 Zuo D, Chen L, Liu X, Wang X, Xi Q, Luo Y, et al.: Combination of miR-125b and miR-27a enhances sensitivity and specificity of AFP-based diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Tumour Biol* 2015; DOI: 10.1007/s13277-015-4545-1
- 132 Lu Y-C, Chang JT-C, Huang Y-C, Huang C-C, Chen W-H, Lee L-Y, et al.: Combined determination of circulating miR-196a and miR-196b levels produces high sensitivity and specificity for early detection of oral cancer. *Clin Biochem* 2015;48:115–21.

- 133 Roa W, Brunet B, Guo L, Amanie J, Fairchild A, Gabos Z, et al.: Identification of a new microRNA expression profile as a potential cancer screening tool. *Clin Investig Med Médecine Clin Exp* 2010 [cited 2016 Feb 8];33:E124.
- 134 Xiang M, Zeng Y, Yang R, Xu H, Chen Z, Zhong J, et al.: U6 is not a suitable endogenous control for the quantification of circulating microRNAs. *Biochem Biophys Res Commun* 2014;454:210–4.
- 135 Xiao G, Tang H, Wei W, Li J, Ji L, Ge J: Aberrant Expression of MicroRNA-15a and MicroRNA-16 Synergistically Associates with Tumor Progression and Prognosis in Patients with Colorectal Cancer. *Gastroenterol Res Pract* 2014;2014:364549.
- 136 Zhu Y, Xia Y, Niu H, Chen Y: MiR-16 induced the suppression of cell apoptosis while promote proliferation in esophageal squamous cell carcinoma. *Cell Physiol Biochem* 2014;33:1340–8.
- 137 Shin VY, Jin H, Ng EKO, Cheng ASL, Chong WWS, Wong CYP, et al.: NF- κ B targets miR-16 and miR-21 in gastric cancer: involvement of prostaglandin E receptors. *Carcinogenesis* 2011;32:240–5.

Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Peter Malfertheiner für seine stets freundliche und motivierende Begleitung während der gesamten Bearbeitungsphase meiner Dissertation und Förderung meiner wissenschaftlichen Entwicklung. Außerdem gilt mein Dank insbesondere Herrn PD Dr. med. Alexander Link, der diese Arbeit erst ermöglichte. Vom ersten Kontakt bis zur Fertigstellung dieser Arbeit ist ein enges Vertrauensverhältnis entstanden, das durch zahlreiche Hilfestellungen, Ratschläge und auch nicht-wissenschaftliche, aufbauende Gespräche unabdingbar für die Fertigstellung meiner Dissertation war. Allen weiteren Mitarbeitern der Universitätsklinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie Magdeburg danke ich für die konstruktive Zusammenarbeit. Explizit hervorheben möchte ich dabei Frau Ursula Stolz aus dem gastroenterologischen Forschungslabor für die freundliche Einarbeitung in die Laborroutine und die leidenschaftliche Begleitung der experimentellen Arbeit. Nicht unerwähnt bleiben sollte die Studiengruppe unserer Kollegen um Juozas Kupcinskis aus Litauen für die angenehme Zusammenarbeit und Unterstützung, auch bei der Veröffentlichung unserer Studienergebnisse. Letztlich möchte ich meinen Eltern Jochen und Katrin, meinem Bruder Anton und meiner Freundin Rose für die unermüdliche Stärkung und bedingungslose Unterstützung während der Fertigstellung der Dissertation sowie für das stets offene Ohr und den Rückhalt in guten wie in schlechten Zeiten in besonderem Maße danken.

Ehrenerklärung

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

„MicroRNA in Aszites als potentielle Biomarker für Peritonealkarzinose und Peritonitis“

in der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

mit der Unterstützung durch Prof. Dr. med. Peter Malfertheiner und PD Dr. med. Alexander Link

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.

Magdeburg, den 18.07.2017

Philipp Schindler

Darstellung des Bildungsweges

Persönliches

Name Philipp Schindler
Adresse Scharnhorststr. 69,
48151 Münster
Mobil +49 (0) 174 4669109
E-Mail PhilippSchindler@gmx.net
Geburtsdaten 13.09.1989 in Magdeburg



Ausbildung

- Seit 07/2017 **Facharztweiterbildung**
Universitätsklinikum Münster, Institut für Klinische Radiologie
- 06/2016 – 06/2017 **Facharztweiterbildung**
Universitätsklinik für Radiologie und Nuklearmedizin Magdeburg
- 12/2015 – 05/2016 **Promotionssemester**
Medizinische Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
- 12/2015 **Approbation als Arzt**
- 10/2009 – 12/2015 **Medizinstudium**
Medizinische Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
Abschluss: Staatsexamen
Abschlussnote: sehr gut (1,5)
- 11/2014 – 10/2015 **Praktisches Jahr**
1. Terial: Pflichtterial Innere Medizin an der Universitätsklinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie Magdeburg sowie an der Universitätsklinik für Nieren- und Hochdruckkrankheiten, Diabetologie und Endokrinologie Magdeburg
2. Terial: Wahlterial Radiologie am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München im Institut für diagnostische und interventionelle Radiologie
3. Terial: Pflichtterial Chirurgie im Krankenhaus "Franz Tappeiner" in Meran (Italien) in der Abteilung für allgemeine Chirurgie
- 10/2008 – 06/2009 **Zivildienst**
Insitut für Pathologie der Universitätsklinik Magdeburg

08/2000 – 07/2008 **Schulbildung**
Norbertusgymnasium Magdeburg
Abschluss: Abitur
Abschlussnote: sehr gut (1,2)

Wissenschaftliche Leistungen

- Promotionsthema **MicroRNA in Aszites als potentielle Biomarker für Peritonealkarzinose und Peritonitis.**
Universitätsklinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie Magdeburg
- Originalartikel (eingereicht) Philipp Schindler, Juozas Kupcinskas, Simonas Juzenas, Jurgita Skieceviciene, Violeta Salteniene, Christian Schulz, Jochen Weigt, Peter Malfertheiner and Alexander Link. 2017. ***Expression of microRNA in ascites of patients with peritoneal carcinomatosis and peritonitis.***
- Abstract und Vortrag Philipp Schindler, Juozas Kupcinskas, Simonas Juzenas, Jurgita Skieceviciene, Violeta Salteniene, Christian Schulz, Jochen Weigt, Peter Malfertheiner und Alexander Link. **MicroRNA als potentielle Aszites-Biomarker für Peritonealkarzinose.** DGVS 2017.
- Poster Philipp Schindler, Juozas Kupcinskas, Simonas Juzenas, Jurgita Skieceviciene, Violeta Salteniene, Christian Schulz, Jochen Weigt, Peter Malfertheiner and Alexander Link. 2017. ***MicroRNAs in ascites as potential biomarkers for peritoneal carcinomatosis and peritonitis.*** UEG 2017, Barcelona.

Magdeburg, den 18.07.2017

Philipp Schindler

Anlagen

Anlage 1 – Protokoll miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach eigener Modifizierung

Vor dem ersten Gebrauch Hinzufügen von 30 ml Ethanol (96-100%) zu RWT-Puffer-Konzentrat und 44 ml Ethanol (96-100%) zu RPE-Puffer-Konzentrat.

Resuspendieren von 1 nmol Syn-cel-mir-39 miScript miRNA Mimic (cel-39) in 1ml RNase-freiem Wasser, um eine 1 μ M Ausgangslösung zu erhalten. Zur Herstellung einer 5 nM-Lösung Verdünnen von 5 μ l 1 μ M Ausgangslösung in 995 μ l RNase-freiem TE-Puffer. Lagerung über bis zu 18 Monate bei -20°C.

1. Auftauen der Proben. Pipettieren von 100 μ l Aszitesflüssigkeit in ein 1,5 ml RNase-freies Tube.
2. Hinzufügen von 500 μ l QIAzol Lysis Reagenz und Mischen durch Auf- und Abpipettieren.
3. Tube mit Homogenat bei Raumtemperatur über 5 min inkubieren.
4. Hinzufügen von 5 μ l 5 nM Syn-cel-mir-39 miScript miRNA Mimic (cel-39).
5. Hinzufügen von 100 μ l Chloroform und 15 s vortexen.
6. Tube mit Homogenat bei Raumtemperatur über 2-3 min inkubieren.
7. Zentrifugieren über 15 min bei 12.000 x g und 4°C.
8. Transferieren der oberen flüssigen Phase (~ 300 μ l) in ein neues 1,5 ml Collection Tube. Dabei jegliches Material aus der Zwischenphase vermeiden. Hinzufügen von 450 μ l Ethanol (100%) und Mischen durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren.
9. Pipettieren von 750 μ l der Probe in eine RNeasy Mini spin column (in 2 ml Collection Tube). Zentrifugieren über 15 s bei 8000 x g und Raumtemperatur. Verwerfen des Durchflusses unter Weiterverwendung des Collection Tubes.
10. Hinzufügen von 700 μ l RWT-Puffer zu der RNeasy Mini spin column. Zentrifugieren über 15 s bei 8000 x g und Raumtemperatur. Verwerfen des Durchflusses unter Weiterverwendung des Collection Tubes.
11. Hinzufügen von 500 μ l RPE-Puffer zu der RNeasy Mini spin column. Zentrifugieren über 15 s bei 8000 x g und Raumtemperatur. Verwerfen des Durchflusses unter Weiterverwendung des Collection Tubes.
12. Wiederholen von Schritt 11.

13. Platzieren der RNeasy Mini spin column in ein neues 1,5 ml RNase-freies Tube. Zentrifugieren über 2 min bei 12.000 x g und Raumtemperatur.
14. Transferieren der RNeasy Mini spin column in ein neues 1,5 ml RNase-freies Tube. Pipettieren von a) 100 µl RNase-freiem Wasser (Extraktionen Präanalytik) oder b) 50 µl RNase-freiem Wasser (Extraktionen Validierung der miRNA-Expressionsveränderungen) in die RNeasy Mini spin column. Zentrifugieren über 1 min bei 8000 x g und Raumtemperatur. Tube auf Eis lagern.

Zur Vorbereitung der Photometrie Pipettieren von 3 µl des Eluats in ein neues 1,5 ml RNase-freies Tube und Verdünnen mit 67 µl RNase-freiem TE-Puffer.

Für die qRT-PCR Pipettieren von 3 µl des Eluats in ein neues 1,5 ml RNase-freies Tube und Verdünnen (1:30) mit 87 µl RNase-freiem Wasser.

Proben bis zur weiteren Analyse bei -80°C asservieren.

Anlage 2 – Protokoll mirVana miRNA Isolation Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) nach eigener Modifizierung

Vor dem ersten Gebrauch Hinzufügen von 21 ml Ethanol (100%) zu der miRNA Wash Solution 1 und 40 ml Ethanol (100%) zu der miRNA Wash Solution 2/3.

Resuspendieren von 1 nmol Syn-cel-mir-39 miScript miRNA Mimic (cel-39) in 1 ml RNase-freiem Wasser, um eine 1 µM Ausgangslösung zu erhalten. Zur Herstellung einer 5 nM-Lösung Verdünnen von 5 µl 1µM Ausgangslösung in 995 µl RNase-freiem TE-Puffer. Lagerung über bis zu 18 Monate bei -20°C.

1. Auftauen der Proben. Pipettieren von 100 µl Aszitesflüssigkeit in ein 1,5 ml RNase-freies Tube.
2. Hinzufügen von 400 µl Lysis/Binding Puffer und kurz vortexen.
3. Hinzufügen von 40 µl miRNA Homogenate Additive und kurz vortexen. 10min auf Eis inkubieren.
4. Hinzufügen von 5 µl 5 nM Syn-cel-mir-39 miScript miRNA Mimic (cel-39).
5. Hinzufügen von 450 µl Acid-Phenol:Chloroform und 1 min vortexen. Zentrifugieren über 10 min bei 10.000 x g und Raumtemperatur.
6. Transferieren der oberen flüssigen Phase (~ 300 µl) in ein neues Collection Tube. Dabei jegliches Material aus der Zwischenphase vermeiden.
7. Vorheizen der Elution Solution auf 95°C.
8. Hinzufügen von 375 µl Ethanol (100%) zu Collection Tube (aus Schritt 6.) und kurz vortexen.
9. Pipettieren von 750 µl der Probe in ein Filter Tube. Zentrifugieren über 15 s bei 10.000 x g und Raumtemperatur. Verwerfen des Durchflusses.
10. Hinzufügen von 700 µl miRNA Wash Solution 1 zu Filter Tube. Zentrifugieren über 10 s bei 10.000 x g und Raumtemperatur. Verwerfen des Durchflusses unter Weiterverwendung des Filter Tubes.
11. Hinzufügen von 500 µl miRNA Wash Solution 2/3 zu Filter Tube. Zentrifugieren über 10 s bei 10.000 x g und Raumtemperatur. Verwerfen des Durchflusses unter Weiterverwendung des Filter Tubes.
12. Wiederholen von Schritt 11.
13. Zentrifugieren des Filter Tubes über 1 min bei 10.000 x g und Raumtemperatur.
14. Filter in neues 1,5 ml RNase-freies Tube geben. Pipettieren von 100 µl Elution Solution (95°C) auf Filter. Zentrifugieren über 30 s bei 10.000 x g und Raumtemperatur.

15. Pipettieren des Durchflusses auf den Filter. Zentrifugieren über 30 s bei 10.000 x g und Raumtemperatur. Tube auf Eis lagern.

Zur Vorbereitung der Photometrie Pipettieren von 3 µl des Eluats in ein neues 1,5 ml RNase-freies Tube und Verdünnen mit 67 µl RNase-freiem TE-Puffer.

Für die qRT-PCR Pipettieren von 3 µl des Eluats in ein neues 1,5 ml RNase-freies Tube und Verdünnen (1:30) mit 87 µl RNase-freiem Wasser.

Proben bis zur weiteren Analyse bei -80°C asservieren.

Anlage 3 – Protokoll TRIzol Reagenz (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) nach eigener Modifizierung

Vor dem ersten Gebrauch Resuspendieren von 1 nmol Syn-cel-mir-39 miScript miRNA Mimic (cel-39) in 1 ml RNase-freiem Wasser, um eine 1 μ M Ausgangslösung zu erhalten. Zur Herstellung einer 5 nM-Lösung Verdünnen von 5 μ l 1 μ M Ausgangslösung in 995 μ l RNase-freiem TE-Puffer. Lagerung über bis zu 18 Monate bei -20°C.

1. Auftauen der Proben. Pipettieren von 100 μ l Aszitesflüssigkeit in ein 1,5 ml RNase-freies Tube.
2. Hinzufügen von 1 ml TRIzol Reagenz und Mischen durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren. Zentrifugieren über 10 min bei 12.000 x g und 4°C.
3. Transferieren der flüssigen Phase in neues 1,5 ml RNase-freies Tube und 5 min bei Raumtemperatur inkubieren.
4. Hinzufügen von 5 μ l 5 nM Syn-cel-mir-39 miScript miRNA Mimic (cel-39).
5. Hinzufügen von 0,2 ml Chloroform und 15 s vortexen. 3 min bei Raumtemperatur inkubieren. Zentrifugieren über 15 min bei 12.000 x g und 4°C.
6. Transferieren der flüssigen Phase in neues 1,5 ml RNase-freies Tube.
7. Hinzufügen von 0,5 ml Isopropanol (100%) und 10 min bei Raumtemperatur inkubieren. Zentrifugieren über 10 min bei 12.000 x g und 4°C. Entfernen des Überstands.
8. Waschen des RNA-Pellets durch Hinzufügen von 1 ml Ethanol (100%). Kurz vortexen. Zentrifugieren über 5 min bei 7500 x g und 4°C. Entfernen des Überstands.
9. Lufttrocknen des RNA-Pellets über 10 min.
10. RNA-Pellet mit 100 μ l RNase-freiem Wasser resuspendieren und 15 min bei 60°C im Heizblock inkubieren. Tube auf Eis lagern.

Zur Vorbereitung der Photometrie Pipettieren von 3 μ l des Eluats in ein neues 1,5 ml RNase-freies Tube und Verdünnen mit 67 μ l RNase-freiem TE-Puffer.

Für die qRT-PCR Pipettieren von 3 μ l des Eluats in ein neues 1,5 ml RNase-freies Tube und Verdünnen (1:30) mit 87 μ l RNase-freiem Wasser.

Proben bis zur weiteren Analyse bei -80°C asservieren.

Anlage 4 – Protokoll TaqMan miRNA Assay (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) nach eigener Modifizierung

Reverse Transkription

1. Auftauen der Proben (miRNA-Extrakt in 1:30-Verdünnung) und Primer auf Eis.
2. Ansetzen des Master-Mixes in Abhängigkeit der gewünschten Anzahl an Reaktionen in einem 1,5 ml RNase-freiem Tube:

Komponente	Volumen pro 15 µl-Reaktion (µl)
100 mM dNTPs (inkl. dTTP)	0,15
Reverse Transkriptase, 50 U/µl	1,00
10 x RT-Puffer	1,5
RNase Inhibitor, 20 U/µl	0,19
RNase-freies Wasser	5,66
Primer	1,5
Gesamtvolumen	10,00

3. Kurz vortexen und auf Eis lagern.
4. Für jede 15 µl-Reaktion, Hinzufügen von 10 µl Master-Mix und 5 µl Probe in ein 0,2 ml SoftStrips-Tube (Biozym).
5. Verschließen der Tubes und Zentrifugieren über 15 s bei 3000 x g und Raumtemperatur.
6. Starten der Reversen Transkription im Thermo-Cycler nach folgendem Programm:

Schritt	Zeit (min)	Temperatur (°C)
1	30:00	16
2	30:00	42
3	5:00	85
4	∞	4

- Zentrifugieren des Reaktionsprodukts über 15 s bei 3000 x g und Raumtemperatur. Sofort PCR-Amplifikation anschließen oder Aufbewahrung bei -30°C.

PCR-Amplifikation

- RT-Reaktionsprodukte auf Eis inkubieren bzw. auftauen.
- Ansetzen des Reaktions-Mixes in Abhängigkeit der gewünschten Anzahl an Reaktionen in einem 1,5 ml RNase-freiem Tube:

Komponente	Volumen pro 20 µl-Reaktion (µl)
TaqMan Universal PCR Master-Mix	10
Primer	0,75
RNase-freies Wasser	4,25
Gesamtvolumen	15,00

- Kurz vortexen und auf Eis lagern.
- Für jede 20 µl-Reaktion, Hinzufügen von 15 µl Reaktions-Mix und 5 µl Probe in ein 96-well PCR Plate-Tube (Bio-Rad) in Doppelbestimmung.
- Verschließen des PCR-Plates und Zentrifugieren über 15 s bei 3000 x g und Raumtemperatur.
- Starten der PCR-Amplifikation im CFX96 real time PCR-Cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) nach folgendem Programm:

Schritt	Zeit (min)	Temperatur (°C)
1	2:00	50
2	10:00	95
3 (45x)	0:15	95
4 (45x)	1:00	60

Anlage 5 – Protokoll SYBRgreen Methode nach eigener Modifizierung

Reverse Transkription

1. Auftauen der Proben (miRNA-Extrakt in 1:30-Verdünnung) und Primer auf Eis.
2. Ansetzen des Master-Mixes in Abhängigkeit der gewünschten Anzahl an Reaktionen in einem 1,5 ml RNase-freiem Tube:

Komponente	Volumen pro 15 µl-Reaktion (µl)
100 mM dNTPs (inkl. dTTP)	0,15
Reverse Transkriptase, 50 U/µl	1,00
10 x RT-Puffer	1,5
RNase Inhibitor, 20 U/µl	0,19
RNase-freies Wasser	5,91
Primer	1,25
Gesamtvolumen	10,00

3. Kurz vortexen und auf Eis lagern.
4. Für jede 15 µl-Reaktion, Hinzufügen von 10 µl Master-Mix und 5 µl Probe in ein 0,2 ml SoftStrips-Tube (Biozym).
5. Verschließen der Tubes und Zentrifugieren über 15 s bei 3000 x g und Raumtemperatur.
6. Starten der Reversen Transkription im Thermo-Cycler nach folgendem Programm:

Schritt	Zeit (min)	Temperatur (°C)
1	30:00	16
2	30:00	42
3	5:00	85
4	∞	4

7. Zentrifugieren des Reaktionsprodukts über 15 s bei 3000 x g und Raumtemperatur. Sofort PCR-Amplifikation anschließen oder Aufbewahrung bei -30°C.

PCR-Amplifikation

1. RT-Reaktionsprodukte auf Eis inkubieren bzw. auftauen.
2. Ansetzen des Reaktions-Mixes in Abhängigkeit der gewünschten Anzahl an Reaktionen in einem 1,5 ml RNase-freiem Tube:

Komponente	Volumen pro 25 µl-Reaktion (µl)
SYBRgreen PCR Master-Mix	12,5
Primer	1
RNase-freies Wasser	6,5
Gesamtvolumen	20,00

3. Kurz vortexen und auf Eis lagern.
4. Für jede 25 µl-Reaktion, Hinzufügen von 20 µl Reaktions-Mix und 5 µl Probe in ein 96-well PCR Plate-Tube (Bio-Rad) in Doppelbestimmung.
5. Verschließen des PCR-Plates und Zentrifugieren über 15 s bei 3000 x g und Raumtemperatur.
6. Starten der PCR-Amplifikation im CFX96 real time PCR-Cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) nach folgendem Programm:

Schritt	Zeit (min)	Temperatur (°C)
1	2:00	50
2	10:00	95
3 (45x)	0:15	95
4 (45x)	1:00	60
5	0:10	95
6	0:05	60