

Aus dem Institut für Pathologie  
der Universität zu Lübeck  
Direktorin: Prof. Dr. med. Verena-Wilbeth Sailer

**MicroRNAs als potenzielle Biomarker für Chemoresistenz in  
Adenokarzinomen des ösophagogastralen Übergangs**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde der Universität zu Lübeck  
- Sektion Medizin –

Vorgelegt von

**Christina Block (geb. Just)**  
aus Crivitz

Lübeck 2025

1.Berichterstatter\*in: PD Dr. med. Juliana Knief

Ko-Betreuer\*in: Prof. Dr. med. Karl-Friedrich Klotz

2.Berichterstatter\*in: Prof. Dr. med. Hendrik Schimmelpenning

Tag der mündlichen Prüfung: 12.02.2025

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 17.02.2025

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

Andy und Madlen

In Liebe und Dankbarkeit

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	I
Abkürzungsverzeichnis .....	III
Tabellen- und Auflistungsverzeichnis .....	V
Abbildungsverzeichnis .....	V
1. Einleitung .....	1
1.1. AEG .....	1
1.1.1. Definition, Epidemiologie, Ätiologie.....	1
1.1.2. Diagnostik und Staging .....	4
1.1.3. Therapie.....	5
1.1.3.1. Chemotherapie(CT)/Chemoradiotherapie(CRT).....	6
1.1.3.2. Endoskopische Resektion .....	7
1.1.3.3. Chirurgische Therapie .....	7
1.1.4. Biomarker.....	8
1.2. microRNA.....	11
1.2.1. Entdeckung und Nomenklatur.....	11
1.2.2. Biogenese und Funktion.....	12
1.2.3. Regulation der microRNA-Biogenese .....	15
1.2.4. microRNA im klinischen Zukunftsalltag .....	16
1.3. Fragestellung.....	17
2. Methoden .....	18
2.1. Patientenproben .....	18
2.2. Histologische Begutachtung und Studiengruppierung.....	18
2.3. Korrelation mit klinischen Merkmalen .....	19
2.4. Extraktion von Tumorgewebe .....	20
2.5. RNA-Isolation und Konzentrationsbestimmung.....	20
2.6. Synthese komplementärer DNA (cDNA) .....	22
2.7. Beladen der PCR-Platten und Durchführung einer real-time-PCR .....	23
2.8. Normalisierung .....	26
2.9. Subgruppenanalyse .....	27
2.10. Patientenprognose .....	27
3. Ergebnisse.....	28

3.1. Histologie.....	28
3.2. Korrelation der Responder und Non-Responder zu klinischen Merkmalen.....	29
3.3. Therapieregime .....	30
3.4. miRNA-Analysen .....	31
3.5. miRNAs und Tumordifferenzierung.....	33
3.6. miRNAs und dessen prognostische Aussage.....	34
4. Diskussion .....	36
4.1. Hsa-let-7f-5p.....	37
4.2. Hsa-miR-221-3p .....	39
4.3. Hsa-miR-31-5p .....	40
4.4. miR-191-5p.....	42
4.5. Assoziation von hsa-miR-194-5p mit dem Gesamtüberleben .....	44
4.6. Gesamteinordnung der Ergebnisse .....	44
5. Zusammenfassung .....	48
6. Anhang .....	50
6.1. Ergänzende Tabellen und Auflistungen.....	50
6.2. Materialien.....	52
7. Literaturverzeichnis .....	55
8. Danksagung .....	74
9. Erklärung und Publikation.....	75

## Abkürzungsverzeichnis

3'/5'UTR	3' /5' untranslatierte Region
ABCG"	ATP binding cassette subfamily G member 2
AEG	Adenokarzinom des ösophagogastralen Übergangs
Ago2	Argonaute-2-protein
Akt	alpha serinethreonine protein kinase
ATP	Adenosintriphosphat
CA	Carbohydrate-Antigen
cagA	cytotoxin-associated gene A
CD	Cluster of Differentiation
CDH1	Cadherin 1
cDNA	complementary desoxyribonucleic acid
CI	confidence interval
cm	Zentimeter
CRT	Chemoradiotherapie
Ct	cycle threshold
CT	Computertomographie; Chemotherapie
CTP	Cytosintriphosphat
DKK2	Dickkopf-related protein 2
DNA	desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonucleotidtriphosphat
DGR8	DiGeorge syndrome critical region 8
ds	doppelsträngig (bzgl. RNA und DNA)
EGFR	epidermal growth factor receptor
EUS	endoscopic ultrasound
FDG	Fluor(-18-)desoxyglucose
FFPE	formalin-fixed paraffin-embedded
FLOT	Therapiekomb.: Fluorouracil, Leukovorin, Oxaliplatin, Docetaxel
FU	Fluorouracil
GERD	gastroesophagela reflux disease
GTP	Guanosintriphosphat
Gy	Gray
HE	Hämatoxylin-Eosin
Her-2/neu	human epidermal growth factor receptor 2
hsa	homo sapiens
ICD-10	international statistical classification of diseases
let-7	letal 7
LIN	lineage
LNA	locked nucleic acid
MALT	mucosa associated lymphoid tissue
MDR	Multi drug resistance
miRNA/miR	micro ribonucleic acid
ml	Milliliter

MMP9	Matrix Metallopeptidase 9
mRNA	messenger ribonucleic acid
MRT	Magnetresonanztomographie
Mcy	Myelocytomatose (Gen, welches mit dieser Krankheit assoziiert)
ng	Nanogramm
NSCLC	non-small cell lung cancer
nt	Nukleotide
OP	Operation
OR	odds ratio
OS	overall survival
p53	tumor protein 53 (Tumorsuppressor)
PAK1	p21-activated Kinase 1
PACT	doppelsträngiges RNA-bindendes Protein
PC	personal computer
PCR	polymerase chain reaction
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PIWI	P-element induced wimpy testis
pre-miRNA	precursor micro ribonucleic acid
pri-miRNA	primary micro ribonucleic acid
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
<i>p</i> -Wert	Signifikanzwert, <i>p</i> =probabilitas
qPCR	quantitative real-time PCR
R0-2	Resektionseinteilung Tumore
RAN	Ras-related nuclear protein
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	ribonucleic acid
RNase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute
S100	Familie calciumbindender Proteine
sec	Sekunden
snRNA	small nuclear ribonucleic acid
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3
TIMP3	tissue inhibitor of metalloproteinkinase 3
TNM	Tumor, Nodus, Metastasis (Klassifikation)
TRBP	TAR RNA binding Protein
TTP	Thymidintriphosphat
UICC	union internationale contre le cancer
uPAR	urokinase plasminogen activator receptor
VEGF	vascular endothelial growth factor
WHO	world health organisation
Wnt	wingless Int
°C	Grad Celsius
$\chi^2$	Chi-Quadrat-Verteilung
$\mu$ l	Mikroliter

## **Tabellen- und Auflistungsverzeichnis**

<b>Tabelle 1:</b> molekulare Marker bei Adenokarzinomen des ösophagogastralen Übergangs.	10
<b>Tabelle 2:</b> Übersicht Regressionsgrade nach Becker et al.	19
<b>Tabelle 3:</b> Ansatz für cDNA-Synthese	22
<b>Tabelle 4:</b> Zusammensetzung des Reaktionsgemisches für Real-time-PCR	23
<b>Tabelle 5:</b> Ablauf der qPCR	25
<b>Tabelle 6:</b> Merkmale der Adenokarzinome des ösophagogastralen Übergangs nach Responder- und Non-Responder-Status.	30
<b>Tabelle 7:</b> <i>p</i> -Werte angewendeter Normalisierungsmethoden	32
<b>Tabelle 8:</b> Durchschnittliche Überlebenszeiten gemäß hoher oder niedriger Expression von hsa-miR-194-5p.	35
<b>Tabelle 9:</b> normalisierte Ct-Werte (Global mean) aberrant exprimierter miRNAs in der Non-Responder-Gruppe	51
<b>Tabelle 10:</b> normalisierte Ct-Werte (Global mean) aberrant exprimierter miRNAs in der Responder-Gruppe	51
<b>Tabelle 11:</b> Kits	52
<b>Tabelle 12:</b> nicht in Kits enthaltene Reagenzien	52
<b>Tabelle 13:</b> Geräte	53
<b>Tabelle 14:</b> Verbrauchsmaterialien	54
<b>Tabelle 15:</b> Software	54
<b>Tabelle 16:</b> In silico Ressourcen	54
<b>Auflistung 1:</b> mit Cancer Focus Panel V4 (Exiqon, Denmark) erfasste microRNAs	50

## **Abbildungsverzeichnis**

<b>Abbildung 1:</b> schematische Darstellung der miRNA-Biogenese und mRNA-Bindung (modifiziert nach Cornelius Courts, UKSH Kiel)	15
<b>Abbildung 2:</b> exemplarische Darstellung eines 4x4-Ausschnittes einer 384-well-Platte (Cancer Focus microRNA Panel, V4.R,Exiqon)	25
<b>Abbildung 3:</b> Beispiele histologischer Tumorregression.	28
<b>Abbildung 4:</b> Ct-Werte der differenziell exprimierten miRNAs in Responder- und Non-Responder-Gruppe	33
<b>Abbildung 5:</b> Kaplan-Meier-Kurve zur Darstellung von Überlebensraten in Abhängigkeit von hohen und geringen Expressionsniveaus von hsa-miR-194-5p	34



# **1. Einleitung**

## **1.1. AEG**

### **1.1.1. Definition, Epidemiologie, Ätiologie**

Adenokarzinome des ösophagogastralen Übergangs (AEG) haben in den vergangenen Jahrzehnten global an klinischer Relevanz zugenommen. Insbesondere in der westlichen Welt ist eine Häufung von Fällen zu verzeichnen. Die Inzidenz anatomischer Sublokalisationen von AEGs, auf die im weiteren genauer eingegangen wird, unterscheidet sich jedoch zwischen westlichen und östlichen Nationen und führt somit teilweise zu regional unterschiedlicher Schwerpunktforschung [19, 20]. Um eine weltweit einheitliche Kommunikation und adäquate Versorgung zu gewährleisten, schlugen Siewert und Stein bereits 1996 eine Typisierung von Tumoren dieses Bereiches vor, welche bei einer Konsensuskonferenz der International Society for Disease of the Esophagus (ISDE) und International Gastric Cancer Association (IGCA) 1997 empfohlen wurde und gegenwärtig angewandt, jedoch in der ICD-10 und UICC nicht eigenständig erfasst wird. So werden AEG nach Siewert anatomisch-topographisch klassifiziert und in drei Typen unterteilt, die sich hinsichtlich epidemiologischer, klinisch-pathologischer und prognostischer Faktoren unterscheiden [73, 180]. Für diese Einteilung orientiert man sich anatomisch an der Kardia, dem Übergang von zweischichtiger Ösophagus- zu dreischichtiger Magenwandmuskulatur bzw. am makroskopisch sichtbaren oralen Beginn der Magenschleimhautfalten. Die anatomische Orientierung an der Z-Linie, welche den histologischen Übergang von Platten- zu Zylinderepithel darstellt, hat sich als nicht empfehlenswert herausgestellt, da diese Grenze, z.B. im Rahmen von bereits diskreten metaplastischen Veränderungen des distalen Ösophagus aber auch als Normvariante, verzogen sein kann [136, 160].

Beim AEG Typ I (Barrett-Karzinom) befindet sich über die Hälfte der Tumormasse bzw. das Zentrum des Tumors im Bereich zwischen >1cm bis 5cm oralwärts der Kardia. Es handelt sich hierbei um eine intestinale Metaplasie des distalen Ösophagus, welche zumeist im Rahmen einer Refluxösophagitis (Barrettösophagus) entsteht. Das AEG Typ II (Kardiakarzinom) befindet sich bzgl. seiner Hauptmasse (größer 50%) zwischen <1 cm nach oral bis <2cm nach aboral der Kardia. Das Typ III AEG wird auch als subkardiales

Magenkarzinom bezeichnet und befindet sich >2cm bis 5cm aboral der anatomischen Orientierungsmarke Kardia [181–183, 193].

Die aktuell achte Auflage der UICC (Union for international cancer control) zur TNM-Klassifikation maligner Tumore erfasst Adenokarzinome des ösophagogastralen Überganges nicht als eigenständige Erkrankung sondern kategorisiert diese je nach Epizentrum der Tumormasse als Ösophaguskarzinom oder als Magenkarzinom. Ein Tumor, dessen Zentrum innerhalb eines Abstandes von 2 cm ober- oder unterhalb des ösophagogastralen Übergangs liegt und ggf. in den ösophagogastralen Übergang hineinreicht, wird nach dem Schema der Ösophaguskarzinome klassifiziert. Entsprechend der Einteilung der AEG nach Siewert handelt es sich also um Typ I und II. Tumoren mit lokalisierter Hauptmasse >2cm aboral vom ösophagogastralen Übergang werden entsprechend des Schema für Magenkarzinome gestaget [214]. Ein weiterer Umstand der gesplitteten Zuweisung der AEG zu Ösophagus- bzw. Magenkarzinomen erschwert leider die Datenfindung hinsichtlich seiner exakten Epidemiologie: So wird das Barrett-Karzinom (AEG I) in der aktuellen ICD-10-GM (Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme, German Modification) von 2021 entsprechend des Codes C15.9 zum Ösophaguskarzinom gezählt. Zudem werden unter C15.9 noch weitere Tumorentitäten wie z.B. gastrointestinale Stromatumoren, das Plattenepithelkarzinom oder das Ösophagusbasaliom subsummiert. AEG Typ II und III hingegen werden als Kardiakarzinom unter dem Code C16.0 zusammengefasst. Krebsregisterdaten in Deutschland erfassen jedoch in der Regel nur das Ösophaguskarzinom als ICD-10 C15 bzw. das Magenkarzinom als ICD-10 C16 [246] [92].

Nichtsdestotrotz haben sich einige Studien in der Vergangenheit mit der Epidemiologie von Adenokarzinomen des ösophagogastralen Überganges beschäftigt und einheitlich eine deutliche Zunahme, so beispielsweise in den USA, Großbritannien und der Schweiz, dokumentieren können [20, 44, 178, 190]. Insbesondere in den westlichen Industrieländern hat die Inzidenz von Barrettkarzinomen in den vergangenen drei Jahrzehnten einen merklichen Anstieg verzeichnet. Jährliche Steigerungsraten von 3,5% bis 8,1% machen es zu einem der Karzinome mit höchsten Zuwachsraten [50]. Beispielsweise hat sich die Inzidenz in den USA zwischen 1973 (3,8/1.000.000) bis 2001 (23,3/1.000.000) annähernd versechsfacht [155, 156]. In Deutschland ist der Anteil an Adenokarzinomen des distalen Ösophagus in den vergangenen Jahren von etwa 10% Anfang der 90er Jahre auf heute über

30% angestiegen [92, 171]. Die Rate der jährlichen Neuerkrankungen in Deutschland betrug 2012 etwa 2,2 -3,1/100.000.

Das prozentuale Auftreten der einzelnen AEG-Subtypen variiert regional stark. Das Barrettkarzinom ist v.a. in ostasiatischen Ländern kaum vorzufinden, während es in westlichen Industrienationen, wie bereits erwähnt, eine beachtliche Zunahme erfährt. Siewert et al. gaben 2006 die AEG-Subtypen mit anteilig 38,8%, 30,3%, 31,0% (I,II,III) an [184]. Im Vergleich hierzu lagen die AEG-Subtypenangaben in Japan bei 3,4%, 55,8%, 40,8% (I,II,III) [66]. Weiterhin zeigte der Vergleich dieser beiden Regionen in erwähnten Studien, dass unter allen AEG stets das männliche Geschlecht epidemiologisch dominiert, wenn auch dieser Umstand in Deutschland deutlicher ( $p < 0.01$ ) ist als in Japan. Das durchschnittliche Erkrankungsalter lag in beiden Regionen um das 60. Lebensjahr. Die 5-Jahres-Überlebensrate zeigte einen vermeintlichen Unterschied hinsichtlich AEG I, da hier aufgrund der geringen Fallzahl in Japan keine sichere Angabe gemacht werden konnte. Für Japan betragen diese Angaben -/44,2%/31,0%, für Deutschland 40-50%/40-50%/20-30% (I,II,III) [66, 184].

Ätiologischer Risikofaktor für das Adenokarzinom des distalen Ösophagus ist insbesondere die gastroösophageale Refluxkrankheit, bei der es durch repetitive chemische Irritation und Schädigung zur Entwicklung einer intestinalen Metaplasie des ursprünglichen Plattenepithels, also zum sog. Barrett-Ösophagus, kommt [164, 187]. Es konnte gezeigt werden, dass in bis zu 97% aller AEG Typ I-Fälle ein Barrett-Ösophagus zugrunde liegt [196]. Weiterhin stellen eine erhöhte Prävalenz von Adipositas sowie Hiatusherniation bei Patienten mit intestinaler Metaplasie Risikofaktoren für das Barrettkarzinom dar [9, 36, 197]. Andererseits nimmt die ätiologische Relevanz von Adipositas und Hiatushernien sowie intestinaler Metaplasie bei den weiter aboral gelegenen AEG Typen II und III ab [216]. Hier wird eher eine Assoziation mit *Helicobacter pylori*, wie es auch beim Magenkarzinom der Fall ist, angenommen [61]. Dieser Zusammenhang ist bisher jedoch nicht sicher belegt. Angenommen wird hier eine bakteriell bedingte Entzündungsreaktion, welche, wie beim Magenkarzinom, eine neoplastische Degeneration des Zylinderepithels hervorrufen kann. Interessanterweise wurde für das AEG Typ I ein inverser Zusammenhang beobachtet. So stellt eine Besiedlung mit dem *cagA+* (cytotoxin-associated gene A positive) *Helicobacter pylori* Stamm scheinbar einen protektiven Effekt dar. Man nimmt an, dass dies durch die zunehmende Neutralisierung des Magensaftes bedingt ist, was folglich zu einem

Ausbleiben der Schädigung des Plattenepithels bei Bestehen einer chronischen gastroösophagealen Refluxkrankheit (GERD) führt [35, 212].

Als weitere potentielle Risikofaktoren für Adenokarzinome des ösophagogastralen Überganges wurden in verschiedenen Studien der Konsum von Zigaretten, Alkohol sowie Ernährungsgewohnheiten analysiert. Diese deuten darauf hin, dass, trotz rückläufiger Raucherzahlen, eine Assoziation zwischen langjährigem Tabakkonsum, erfasst in pack-years, und der Auftretenswahrscheinlichkeit von AEG I-III gegeben sei (OR 1,5-3,5) [86, 99, 217]. Bezüglich des Alkoholkonsums waren die Ergebnisse überraschender. 2011 konnte durch eine gepoolte Analyse von neun Fallstudien und zwei Kohortenstudien kein erhöhtes Risiko im Zusammenhang mit hohem Alkoholkonsum, definiert als mindestens sieben Gläser unklarer Menge eines nicht genauer definierten alkoholischen Getränks, beobachtet werden (OR 0,77; 95% CI 0,54-1,1). Evtl. sei sogar ein protektiver Effekt bei mäßigem Konsum von maximal einem Glas pro Tag zu beobachten [57]. In Hinblick auf Ernährungsmusteranalysen legten vergangene Studien nahe, dass z.B. der Verzehr ballaststoffhaltiger Lebensmittel (OR 0,43; 95% CI 0,3-0,61) sowie Lutein, Niacin, Vitamin B6, Eisen und Zink das Risiko für Adenokarzinome des ösophagogastralen Überganges signifikant senkt, während der Verzehr fetthaltiger Lebensmittel, sowie roten und verarbeiteten Fleisches und Süßigkeiten das Risiko erhöht (OR 1,8; 95% CI 1,1-2,9) [130], [86, 234]. Durch eine gesunde Ernährung mit viel Fisch, Obst und Gemüse konnte bisher keinen sicheren Vorteil belegt werden [10].

### **1.1.2. Diagnostik und Staging**

Bei Verdacht auf ein tumoröses Geschehen des gastroösophagealen Übergangs wird zunächst eine Endoskopie veranlasst. Durch diese kann einerseits eine genauere Aussage über die Lokalisation, inklusive einer Zuordnung entsprechend der chirurgisch relevanten Klassifikation nach Siewert erfolgen, andererseits kann durch Zangenbiopsie entnommenes Gewebe histologisch aufgearbeitet werden. Die Histologie beinhaltet zunächst eine Differenzierung zum v.a. im AEG I-Bereich vorkommenden Plattenepithelkarzinom sowie anderen eher seltenen Tumorarten, wie z.B. gastrointestinalen Stromatumoren oder dem MALT-Lymphom. Wurde ein Adenokarzinom im gastroösophagealen Übergang diagnostiziert, erfolgt eine weitere Differenzierung entsprechend der Laurén-Klassifikation in den intestinalen, diffusen oder gemischten Typ und ggf. eine Klassifikation

entsprechend der WHO (2019) in tubulär, papillär, muzinös und gering kohäsiv (einschließlich Siegelringtyp) [144]. Aus der Laurén-Klassifikation leiten sich zudem Empfehlungen hinsichtlich des Sicherheitsabstandes bei Resektion ab und lassen sich Aussagen bezüglich der Prognose tätigen. Des Weiteren wird ein Grading entsprechend vorliegender Kernpleomorphie, -hyperchromasie und Mitosen pro Gesichtsfeld in gut differenziert (G1), mäßig differenziert (G2), schlecht differenziert (G3) oder undifferenziert (G4) vorgenommen. Alternativ erfolgt ein zweistufiges Grading, wodurch G1 und G2 als "low grade" und G3 und G4 als "high grade" zusammengefasst werden [85].

Als Basisinstrument und Mittel der Wahl für Diagnostik und Staging von Tumoren im oberen Gastrointestinaltrakt dient die bereits erwähnte Endoskopie. Diese gewährleistet eine direkte Bildgebung, Lokalisation, Einschätzung eines Siewert-Typs und Sicherung bioptischen Materials [129]. Um eine Aussage über Invasionsstiefe, Nodalstatus und Fernmetastasierung für eine Kategorisierung entsprechend der TNM-Klassifikation tätigen zu können, werden neben Histologie, endoskopischer Ultraschall (EUS), CT sowie ggf. Laparoskopie, MRT und FDG-PET-CT angewandt. Insbesondere EUS hat sich hier als valides und kostengünstiges Instrument für das T-Staging erwiesen [157]. Kontrastmittelgestützte Computertomographie dient als bevorzugte Methode, um eine systemische Filialisierung zu erfassen, wohingegen die Anwendung von aufwändigerer MRT und FDG-PET-CT unklaren Fragestellungen oder dem Ausschluss lymphatischer und systemischer Ausbreitung in v.a. frühen Tumorstadien (T1) vorbehalten ist [165, 166]. Bei lokal fortgeschrittenen Karzinomen (T3, T4) empfiehlt sich die Durchführung einer diagnostischen Laparoskopie zum Ausschluss bzw. Nachweis einer Peritonealkarzinose [244]. Die früher häufiger durchgeführte Ösophagus-Breischluck-Untersuchung mit Bariumsulfat spielt heute bei der Diagnostik von Adenokarzinomen des ösophagogastralen Überganges kaum noch eine Rolle und ist im Wesentlichen der funktionellen Erfassung von Stenosen dieses Bereiches dienlich [107].

### **1.1.3. Therapie**

Die Behandlung von Adenokarzinomen des ösophagogastralen Überganges umfasst neoadjuvante Chemotherapie (CT) oder kombinierte Chemoradiotherapie (CRT) sowie als wichtigstes Konzept die chirurgische Resektion mit dem prognostisch bedeutsamsten Ziel

der R0-Resektion. In sehr fortgeschrittenen Stadien mit multipler Metastasierung werden palliative Konzepte angewandt.

#### **1.1.3.1. Chemotherapie(CT)/Chemoradiotherapie(CRT)**

Neoadjuvante CT bzw. CRT wird angewandt, um Patienten mit fortgeschrittenen und nicht primär resektablen Tumorstadien, wie es zumeist der Fall ist, in einen operablen Status zu überführen. In westlichen Ländern werden neoadjuvante Konzepte den adjuvanten vorgezogen [165]. Ziel ist hierbei das "downsizing" des Tumors, sowie die Elimination von lymphogenen und hämatogenen (Mikro-)Metastasen, um anschließend, wenn möglich, eine R0-Resektion durchzuführen. Siewert et al. berichten von einer Responderrate durch neoadjuvante Regime in 30-60% [121, 185]. Durch Chemoradiotherapie können komplette Remissionen bei 11-25% aller Patienten erzielt werden [3]. In der niederländischen CROSS-Studie (Chemoradiotherapy for Oesophageal Cancer followed by Surgery Study Group) steigerte neoadjuvante CRT in Verbindung mit operativer Resektion das mediane Gesamtüberleben bei Patienten mit Adenokarzinom des ösophagogastralen Überganges von 27,1 Monaten auf 43,2 Monate im Vergleich zu einer alleinigen Operation [177]. Am häufigsten kommen chemotherapeutische Kombinationen von 5-Fluorouracil (5-FU), Cisplatin, Oxaliplatin oder Carboplatin und Paclitaxel zur Anwendung, ggf. ergänzt durch Leukovorin, Epirubicin oder Etoposid [244, 245]. Die angewandten Schemata sind vielfältig und orientieren sich an denen von Ösophagus- und Magenkarzinomen. Im Rahmen einer kombinierten Chemoradiotherapie werden diese durch Strahlendosen von 30-40 Gy ergänzt. Diverse Einzelstudien und Metaanalysen haben sich in der Vergangenheit mit dem Outcome und dem Vergleich verschiedener neoadjuvanter chemo- bzw. chemoradiotherapeutischer Schemata befasst. Viele dieser Studien schließen allerdings auch die Behandlung von Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus oder Adenokarzinomen des distalen Magens mit ein, was explizite Aussagen für die Behandlung von AEG erschwert. Ursächlich hierfür ist die immer noch uneinheitliche Klassifikation. Erwähnt sei die deutsche POET-Studie (Preoperative Chemotherapy or Radiotherapy in Esophagogastric Adenocarcinoma Trail), die sich auf Patienten mit lokal fortgeschrittenen (T3/4 Nx M0) Adenokarzinomen des ösophagogastralen Überganges beschränkt und randomisiert eine CT-OP-Gruppe gegenüber einer CRT-OP-Gruppe vergleicht [188, 189]. Hier zeigte sich ein Vorteil der CRT-Gruppe bezüglich signifikant höherer Raten an kompletten Respondern (CRT:15,6%;

CT:2,0%), tumorfreier Lymphknoten (CRT:64,4%; CT:37,7%) sowie verbessertem 3-Jahres- (CRT:46,7%; CT:26,1%) und 5-Jahres-Überleben (CRT:39,5%; CT:24,4%), trotz höherer postoperativer Krankenhaussterblichkeit in der CRT-Gruppe (CRT:10,2%; CT:3,8%). Das lokale 5-Jahres rezidivfreie Überleben nach operativer Resektion konnte durch CRT gegenüber alleiniger CT signifikant verbessert werden ( $p=0.03$ ).

### **1.1.3.2. Endoskopische Resektion**

Entsprechend der Leitlinien zur Therapie von Ösophagus- und Magenkarzinomen können frühe Adenokarzinome des ösophagogastralen Überganges eines Tumorstadiums gemäß T1aN0M0, V0, L0, G1/2 bei einem Durchmesser kleiner als 10 mm (flache Läsionen) bzw. 20 mm (erhabene Läsionen) und ohne Vorliegen einer Ulzeration endoskopisch reseziert werden [244, 245]. Sofern das Karzinom die Submukosa infiltriert (T1b) liegen in mindestens 20-35% der Fälle Lymphknotenmetastasen vor, wodurch ein kurativer Ansatz nur mittels einer radikalen chirurgischen Resektion gewährleistet werden kann [81]. Die endoskopische Resektion sollte en Bloc unter anschließender gewissenhafter histologischer Aufarbeitung des Präparates erfolgen. Der Vorteil liegt hier in einer Verhinderung einer radikalen Ösophagus- und/oder Magen(-teil-)resektion, welche mit einer erhöhten Morbiditäts- und Mortalitätsrate sowie verminderter Lebensqualität verbunden ist. Des Weiteren kann im Falle eines durch den Pathologen festgestellten schlechteren T-, V- oder L-Status oder einem Grading G3 eine erweiterte chirurgische Resektion angeschlossen werden. Sofern unter erstmaliger endoskopischer Therapie kein R0-Status erreicht werden konnte, ist in bis zu 90% ein erneuter endoskopischer Ansatz durchführbar [230].

### **1.1.3.3. Chirurgische Therapie**

Sofern funktionell operabel wird bei AEG im Status T1-T4 ein kurativer Ansatz mit R0-Resektion als oberstes Ziel verfolgt. Die Resektion sollte entsprechend der präoperativ bioptischen Histologie mit einem Sicherheitsabstand von 5 cm bei intestinalem Typ oder 8 cm bei diffusem Typ nach Laurén erfolgen. Liegt bereits ein T4b-Status mit Infiltration nicht-resektabler Strukturen oder M1-Status vor, wird i.d.R. von einem radikal-chirurgischen Vorgehen abgesehen und eine Radiochemotherapie sowie eine

gastroenterologische Behandlung mit z.B. Stents und PEG (perkutane endoskopische Gastrostomie) zur palliativen Versorgung vorgenommen [71, 244].

AEG Typ I werden entsprechend S3-Leitlinie mittels transthorakaler subtotaler Ösophagektomie mit en Bloc Resektion direkt angrenzender sowie kranial mediastinaler Lymphknoten behandelt, in welche Barrettkarzinome bevorzugt metastasieren [54]. Alternativ kann ein transhiataler Eingriff mit weniger ausgedehnter Entfernung mediastinaler Lymphknoten bei frühen Adenokarzinomen vorgenommen werden, sofern eine geringe Wahrscheinlichkeit für Lymphknoten-Metastasen besteht oder eine Multimorbidität des Patienten vorliegt, welche ihn durch einen transthorakalen Eingriff zur stark gefährden würde [192]. Die Wiederherstellung der Kontinuität erfolgt zumeist durch Magenhochzug mit hoch intrathorakaler Anastomose [74].

Bei AEG II und III ist eine Gastrektomie mit transhiataler distaler Ösophagusresektion Standard [23, 244]. In Einzelfällen erfolgt die Resektion entsprechend fortgeschrittener Tumorausdehnung durch eine transthorakale, subtotale Ösophagektomie mit proximaler Magenresektion oder sogar Ösophagogastrektomie. Die Methoden der Kontinuitätswiederherstellung sind bisher uneinheitlich und erfolgen durch Roux-Y-Rekonstruktion oder alternativ durch Jejunum- oder Colon-Interponat [244].

Die chirurgische Entfernung thorakaler und abdominaler Lymphknoten (D2-Lymphadenektomie) bei Resektionen von Adenokarzinomen des ösophagogastralen Überganges, sollte ca. 20 Lymphknoten umfassen. Dies wurde als Konsens festgelegt, da das AEG eine Überschneidung von Ösophagus- und Magenkarzinomen darstellt, für die individuelle Mindestanzahlen bezüglich der histologischen Aufarbeitung festgelegt wurden (Ösophaguskarzinom mind. 7; Magenkarzinom mind. 16) [245].

#### **1.1.4. Biomarker**

In Zusammenhang mit Adenokarzinomen des ösophagogastralen Überganges wurden bereits diverse molekulare Marker, wie z.B. Rezeptoren, Wachstumsfaktoren oder Zelladhäsionsfaktoren und deren veränderte Expression durch z.B. genetische Mutation untersucht und beschrieben (siehe Tabelle 1). Die Intention hinter diesen Forschungen liegt in der Auffindung von Faktoren, die zum einen in der Lage sind möglichst sichere Aussagen über Tumoreigenschaften für Diagnostik und Prognostik zu tätigen und zum



anderen einen potentiellen Angriffspunkt für zielgerichtete Therapien darstellen. Bisher konnte insbesondere für die Expression von Her-2/neu eine realistische klinische Relevanz beschrieben werden, da sich hier ein therapeutischer Ansatz mittels Trastuzumab ergibt [11]. Die Häufigkeit von Her-2/neu-Positivität bei AEG liegt bei ca. 2-45% [5, 70].

Tabelle 1 soll einen Überblick über AEG-relevante Biomarker verschaffen, stellt jedoch nur eine Auswahl häufiger Forschungsthemen dar.

**Tabelle 1:molekulare Marker bei Adenokarzinomen des ösophagogastralen Übergangs**

Art des molekularen Markers	molekularer Marker	Assoziation	Referenz:
<b>Tumorsuppressor</b>	p53↑	in bis zu 60% mutiert keine prognostische Relevanz	[161, 175]
<b>Wachstumsfaktor-Rezeptoren</b>	EGFR↑	korreliert mit höherem T- u. N-Status, schlechterer Prognose, geringere rezidivfreie Zeit	[204]
	Her-2↑	häufiger Lebermetastasen; schlechtere Gewebedifferenzierung u. Prognose	[27, 88, 154]
	VEGF-A↑	schlechtere Gewebedifferenzierung, fortgeschrittene Stadien	[147]
	VEGF-C↑	häufiger Lymphknotenmetastasen; schlechtere Prognose	[226]
	S100 A4↑	stärkere Angiogenese, schlechtere Prognose ( $p=0.01-0.02$ )	[137]
<b>Zellzyklusregulatoren</b>	uPAR↑	stärkere Invasivität bei AEG II +III, kürzeres Gesamtüberleben	[98]
	pAK1↑	höhere Tumorstadien; häufiger Lymphknotenmetastasen; schlechtere Prognose	[112]
<b>Tumormarker</b>	CA 19-9	höherer TNM-Status; schlechtere Prognose	[199]
<b>Immunglobulin Superfamilie</b>	CD147↑	aggressiv wachsende Tumoren; v.a. bei UICC III-IV( $p<0.01$ ); Gewebedifferenzierung↓ ( $p<0.05$ ); reduziertes 5-Jahres-Gesamtüberleben ( $p<0.05$ )	[77]
<b>Matrix-Metalloproteinasen</b>	MMP9↑	aggressiv wachsende Tumoren; v.a. bei UICC III-IV( $p<0.01$ ); schlechtere Gewebedifferenzierung ( $p<0.05$ ); reduziertes 5-Jahres-Gesamtüberleben ( $p<0.05$ )	[77]
<b>Zelladhäsionsfaktoren</b>	E-Cadherin↓	Assoziation mit Tumorentstehung und Tumorprogression	[210]
	alpha-Catenin↓ beta-Catenin↓	Assoziation mit Tumorentstehung und Tumorprogression	[210, 215]

## 1.2. microRNA

### 1.2.1. Entdeckung und Nomenklatur

MicroRNAs (miRNAs) sind kurze RNAs mit einer Länge von ca. 19-24 Nukleotiden (nt), die in der Lage sind auf posttranskriptioneller Ebene, durch Beeinflussung von Messenger-RNA (mRNA), die Proteinexpression zu inhibieren oder sogar komplett zu unterbinden [103, 213]. Ihre Entdeckung 1993 durch Lee et al. im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* veränderte in den Folgejahren beachtlich die bisher bestehenden Annahmen über Genregulation. Lee et al. stellten fest, dass ein für die Entwicklung des Fadenwurms im Larvenstadium wichtiges Protein namens LIN-14 durch ein weiteres Gen namens Lin-4 herunterreguliert werden kann. Lin-4 wurde jedoch nicht zu einem biologisch aktiven Protein translatiert, sondern verblieb in Form zwei kleiner RNAs mit einer Länge von 21 nt und 61 nt [103]. Noch im gleichen Jahr konnte durch Wightman et al. entdeckt werden, dass die kürzere der beiden RNAs eine Antisense-Komplementarität zur 3'UTR (3' untranslatierten Region) der lin-14-m-RNA besitzt, die offenbar in der Lage war, die Proteinexpression von Lin-14 bei konstantem mRNA-Niveau zu verringern [213]. Erst ab dem Jahr 2000, in dem eine weitere kurze regulatorische RNA namens let-7 in *C. elegans* entdeckt wurde, schritten auch die Forschungen und Detektionen weiterer, nun microRNA genannter Äquivalente, unter anderem im Menschen voran [100, 150, 167]. Die Entdeckung weiterer miRNAs in Pflanzen und Tieren ließ darauf schließen, dass sie evolutionär hoch konserviert und spezifisch für Zelltypen zu sein schienen [29, 75, 101]. Überdies stellte man fest, dass sie durch posttranskriptionelle Genregulation eine bedeutende Rolle sowohl bei physiologischen als auch bei der Entstehung von pathologischen Prozessen, wie Autoimmun- und Krebserkrankungen, spielen [4, 91, 170]. Man erkannte so das Potential von miRNAs als molekulare Biomarker für diagnostische, prognostische und bestenfalls therapeutische Zwecke [122, 219]. 2002 wurde ein online verfügbares miRNA-Register namens miRBase erstellt, welches heute (Stand November 2021) 38.589 registrierte miRNAs in 271 Spezies beinhaltet und unter anderem über dessen genetische Sequenzen und Zielgene informiert [248]. Die 2003 durch Ambros et al. in Konvention beschriebene Nomenklatur dieser zahlreichen miRNAs, erfolgt zum einen entsprechend der Spezies, in der sie gefunden und beschrieben wurde und zum anderen gemäß der Reihenfolge, in der sie entdeckt bzw. publiziert wurden [8]. So lässt sich z.B. der microRNA "hsa-miR-121" entnehmen, dass sie der Spezies Mensch (hsa = Homo

sapiens) angehört und als 121. miRNA gefunden wurde. Von der Benennung entsprechend der Reihenfolge wird Abstand genommen, wenn die identische miRNA in einer anderen Spezies entdeckt wurde. In diesem Fall wird die Nummer der miRNA übernommen, in der die Erstbeschreibung erfolgte und mit den ersten drei Buchstaben des neuen Organismus, z.B. "rno" für "Rattus norvegicus" (gewöhnliche Ratte) oder "ggo" für "Gorilla", versehen. Wenn mehrere miRNA evolutionär verwandt sind, wird ein zusätzlicher kleiner Buchstabe nach der Zahl verwendet, um zwischen mehreren Mitgliedern derselben Familie zu differenzieren (z.B. hsa-miR-29a und hsa-miR-29b). Einige identische miRNAs werden durch zwei oder mehr verschiedene genetische Loci kodiert. In diesem Fall wird eine zusätzliche Nummer nach dem vollständigen Namen angegeben. Zum Beispiel bringen hsa-miR-138-1 und hsa-miR-138-2 das gleiche microRNA-Produkt, nämlich hsa-miR-138, hervor. Zumeist wird einer miRNA auch der Zusatz "3p" oder "5p" angehängt (z.B. hsa-miR-132-3p und hsa-miR-132-5p), welche angibt von welchem Arm, 3p-Arm oder 5p-Arm, des ursprünglichen RNA-Doppelstrangs die reife miRNA abstammt. Eine Besonderheit hinsichtlich der Nomenklatur haben lin-4 und let-7. Denn diese, wie auch ihre nachfolgend entdeckten Familienmitglieder, haben aus historischen Gründen ihre nicht eindeutig zuzuordnenden Namen beibehalten.

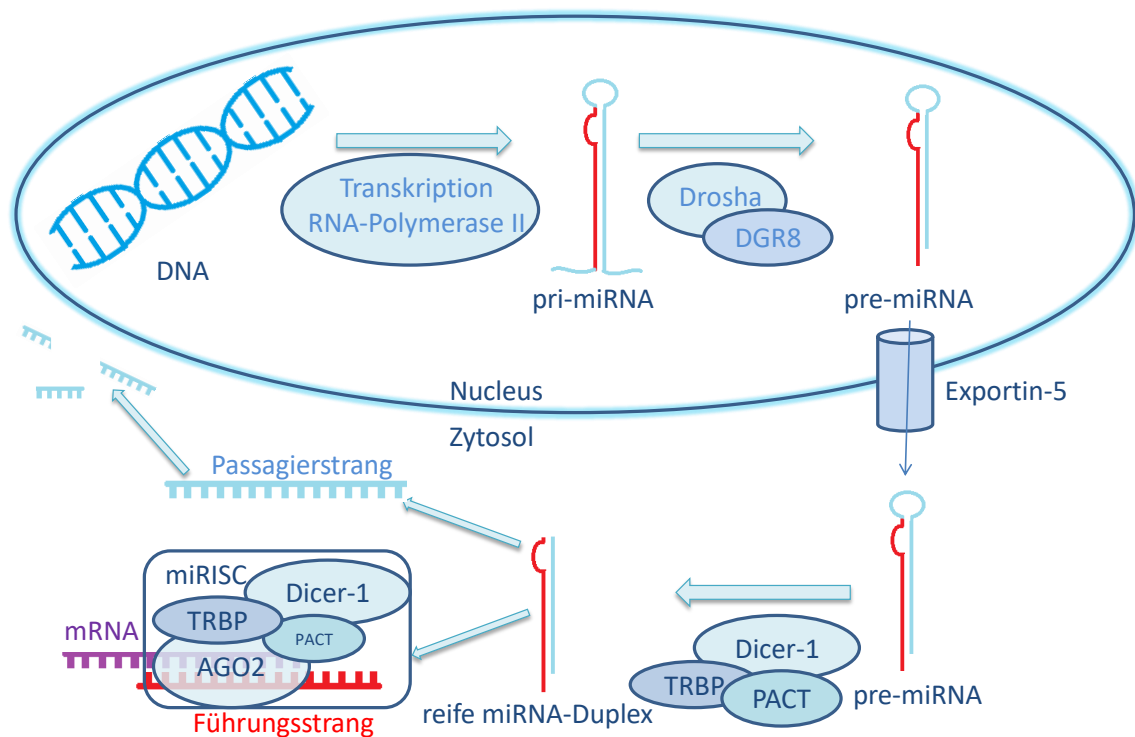
### **1.2.2. Biogenese und Funktion**

Die miRNA-kodierenden Sequenzen sind, bis auf ein sehr geringes Vorkommen im Y-Chromosom, überall im menschlichen Genom verteilt. Sie befinden sich einzeln oder in Form von Clustern in Introns - von denen man lange annahm, dass sie genetisch irrelevant seien-, Exons, sowie zwischen proteinkodierenden Sequenzen [7, 60]. Abbildung 1 (Seite 15) stellt die miRNA-Biogenese in schematischer Form dar. Die Initialisierung der Biogenese erfolgt durch Transkription mittels einer RNA-Polymerase II oder seltener einer RNA-Polymerase III [21, 106]. Das entstandene primäre Transkript ist eine etwa 500-3000 Nukleotide lange Vorstufe und wird als pri-miRNA (primary micro-RNA) bezeichnet. Sie besteht aus einem langen Haarnadelschaft, einer terminalen sowie einer seitlichen einzelsträngigen Schleife und trägt einen 3'Poly-A-Schwanz sowie ein 7-Methylguanosin-Cap am 5'-Ende [26, 106]. Noch im Zellkern wird die pri-miRNA mittels eines Mikroprozessorkomplexes, bestehend aus einer RNase III namens Drosha und einem doppelsträngigen RNA-Bindungsprotein namens DGCR8 (DiGeorge-Syndrome-Critical-

Region-Gen 8) zu der etwa 70 bis 80 nt langen pre-miRNA (precursor micro-RNA) prozessiert [65, 104]. Als weitere Möglichkeit, die vermutlich sogar bis zu 25% aller miRNAs generiert, können pre-miRNAs Drosha-unabhängig direkt aus den Introns, die beim Spleißen der mRNA entstehen, generiert werden. Dabei stellt das ursprünglich transkribierte Gen häufig sogar das mRNA-Zielgen der miRNA, die man dann auch als "miRtrons" bezeichnet, dar [13, 17]. Die pre-miRNA muss nun zur weiteren Verarbeitung den Zellkern verlassen. Die Ausschleusung in das Zytosol erfolgt über ein Ran-GTP-abhängiges, doppelsträngige RNA(dsRNA)-bindendes Rezeptorprotein namens Exportin-5, das außerdem in der Lage ist, die pre-miRNA vor Abbau zu schützen [229, 231]. Im Zytoplasma befindet sich eine weitere RNase III (Dicer-1), die mit PACT, einem dsRNA-bindenden Protein, und TRBP (TAR-RNA-bindendes Protein) assoziiert ist, um ihr Stabilität und eine höhere Prozessierungsaktivität zu verleihen [34, 105]. Dicer-1 spaltet mit Hilfe von TRBP und PACT die Schleifensegmente von der pre-miRNA und es entsteht reife 18-23 nt lange Duplex-miRNA (dsRNA), welche auch als "miRNA:miRNA\*" bezeichnet wird [55]. Durch noch nicht endgültig verstandene Vorgänge, die vermutlich thermodynamischer Natur sind bzw. die Basenpaarungsstabilität/-instabilität des 5'-Endes betreffen, trennt sich der Duplex-miRNA-Strang in einen Führungsstrang, auch Positivstrang oder 5p genannt, und einen Passagierstrang, der auch als Negativstrang oder 3p bezeichnet wird. Dieser Vorgang kann direkt durch Ago2 (Argonaute 2), ein katalytisches Protein, vermittelt werden, das - assoziiert mit Dicer-1, TRBP und PACT-einen Komplex bildet, der als RISC oder auch miRISC (miRNA-induzierter Silencing-Komplex) bezeichnet wird [125, 148]. Zumeist wird, bedingt durch eine geringere thermodynamische Stabilität am 5'-Ende, der Führungsstrang 5p in den RISC-Komplex integriert, während der Passagierstrang 3p nicht selten degeneriert [90, 173]. Aber neuere Forschungsergebnisse zeigen, dass auch der 3p-Strang in den RISC eingebaut werden kann und somit aus einem miRNA-Duplex-Strang letztlich zwei miRNAs mit potentiell unterschiedlichen mRNA-Zielen entstehen [6, 127]. Der miRISC-Komplex spielt nun eine zentrale Rolle bei der Erkennung und Inhibierung der Ziel-mRNA. Geleitet durch die sogenannte "seed-Sequenz", eine Schlüsselsequenz, die sich in Position 2-5 vom 5'-Ende der integrierten miRNA befindet, detektiert die miRNA ihre Ziel-mRNA durch Erkennung einer komplementären Basenregion am 3'-UTR (3'-untranslatierte Region)-Ende der mRNA. In Abhängigkeit des Grades der Komplementarität der seed-Sequenz zur 3'-UTR wird die mRNA negativ reguliert. Perfekte Komplementarität, die beim Menschen selten vorkommt, führt zur absoluten Hemmung oder sogar zum Abbau durch Ago2, genauer

durch dessen RNA-schneidende PIWI-Domänen, während inkomplette Übereinstimmung der Sequenzen eine abgestufte Inhibition bedingt [80, 131, 149]. Zudem führt diese Semikomplementarität einerseits dazu, dass die seed-Sequenz zu mehreren mRNAs kompatibel sein kann und andererseits eine mRNA durch mehrere miRNAs reguliert werden könnte [108, 145]. 2005 wurde bei unabhängigen Studien, die sich mit der Lokalisation von Ago-Proteinen befassten, gezeigt, dass sich Ago2 zusammen mit gebundener miRNA und dessen komplementärer mRNA innerhalb mehrerer zytoplasmatischer Foci akkumuliert. Diese, als P-bodies (processing-bodies) bezeichneten Körper stellen eine Art Sammelstelle der von der Translation reprimierten und zum Abbau aggregierten mRNA dar [116, 174].

Die Beeinflussung der Messenger-RNA gelingt jedoch noch auf weiteren Wegen. So gehen einige Studien davon aus, dass durch Interferenz der miRNAs eine Deadenylierung der mRNA stattfindet, die zu einem mRNA-Stabilitätsverlust, dessen beschleunigten Abbau sowie folglich zu messbar verringerten mRNA-Spiegeln führt [16, 218]. Andere Forschungsergebnisse zeigten, dass es nicht immer nur die 3'-UTR ist, die die miRNA-Zielsequenz beinhalten muss. Sowohl die 5'-UTR als auch Sequenzen, die innerhalb des kodierenden Abschnittes liegen, können ein miRNA-Ziel darstellen [124, 128, 163]. Vasudevan et al. zeigten 2007, dass sogar eine kontextabhängige, unübliche Aktivierung der mRNA-Translation im Zellzyklusarrest stattfinden kann [201]. Auch eine seed-Region-unabhängige Regulation, durch direkten Einfluss von miRNA auf mRNA-bindende Proteine, die für die Translation erforderlich sind, wurde bereits beschrieben [51]. Die beiden letztgenannten Beobachtungen stehen jedoch noch am Anfang ihrer Bedeutungserforschung und scheinen eher selten vorzukommen.



**Abbildung 1: schematische Darstellung der miRNA-Biogenese und mRNA-Bindung (modifiziert nach Cornelius Courts, UKSH Kiel)**

### 1.2.3. Regulation der microRNA-Biogenese

Heute steht die veränderte Expression von miRNA im Fokus zahlreicher Untersuchungen, durch die man erhofft eine Ursache für die Entstehung verschiedener Krankheiten aufzudecken. Und in der Tat konnten diverse Mechanismen identifiziert werden, die zu einer Hoch- oder Herunterregulation beitragen.

So haben zum Beispiel bekannte Transkriptionsfaktoren, wie das Onkogen Myc oder der Tumorsuppressor p53, die Möglichkeit, auch die Expression von miRNAs, die ihrerseits onkogen oder tumorsupprimierend wirken können, zu regulieren [42, 68]. MiRNAs, die eine enthemmte neoplastische Proliferation begünstigen, werden deshalb auch als "OncomiR" bezeichnet. Pri-miRNA-Transkriptionsinduktion konnte auch im Zusammenhang mit Stimulation durch Wachstumsfaktoren, wie PDGF (platelet derived growth factor) oder TGF (transforming growth factor)-beta beobachtet werden [25, 176].

Des Weiteren spielen DNA-Methylierungen und Inhibition von Histon-Deacetylasen als Mechanismen epigenetischer Veränderungen, insbesondere bei der Repression von

miRNA, eine wichtige Rolle. Auf diesem Wege können z.B. miRNAs, die als Tumorsuppressoren fungieren, durch DNA-Hypermethylierung stummgeschaltet werden und zur Krebsentstehung beitragen [2, 123]. Es wurden bereits eine Reihe solcher hypermethylierter miRNAs beschrieben, die unter anderem bei der Entstehung von Magen-, Mamma- oder Kolorektalkarzinomen von Bedeutung zu sein scheinen [31, 158, 200].

Natürlich können genetische Mutationen auch direkt die Expression von miRNAs oder der an dessen Biogenese involvierten Proteine bzw. Ribonukleoproteine modifizieren. Manchmal genügen bereits punktuelle Modifikationen des miRNA-Transkripts, um dessen Information zu verändern. Dieses sogenannte Editing geschieht, wie auch bei anderen RNAs, durch katalytische Enzyme, wie z.B. ADAR1 und ADAR2 (Adenosine Deaminase Acting on RNA 1/2), die durch Austausch einer Adenosinbase durch Inosin, die Prozessierung von pri- zu pre-miRNA behindern oder die Seed-Region so modifizieren, dass das mRNA-Ziel verändert oder zumindest die Komplementarität beeinflusst wird [89, 186]. Auch chromosomale Deletionen wurden im Zusammenhang mit einer fehlerhaften miRNA-Expression und folgender inverser Expression ihrer Ziel-Gene, beispielsweise bei der chronisch-lymphatischen Leukämie (CLL) und dem Myelodysplastischen Syndrom, beschrieben [22, 37].

Ferner sind Funktionsdefekte, erhöhte und erniedrigte Expression von Schlüsselproteinen und Cofaktoren der miRNA-Biogenese in Zusammenhang mit Karzinomentstehung entdeckt worden. So kann z.B. ein Exportin-5-Defekt zu einer intranukleären Akkumulation und Elimination von pre-miRNA führen oder eine vermehrte Ago2-Expression mit erhöhten miRNA-Spiegeln assoziiert sein [1, 47, 133, 134].

#### **1.2.4. microRNA im klinischen Zukunftsalltag**

Seit der Entdeckung von miRNA und dessen Funktion, haben die Forschungen auf diesem Feld, insbesondere seit dem Jahr 2000, sprunghaft zugenommen [247]. Diverse humanmedizinische Studien befassen sich damit, miRNA-Profile für spezifische Zellen und Gewebe und dessen Pathologien zu erfassen, um diese zukünftig für diagnostische und prognostische Zwecke nutzbar zu machen. Noch sind miRNAs nicht im klinischen Alltag angekommen, aber eine Vielzahl experimenteller Studien lassen dies, auch für therapeutische Absichten, erhoffen. So werden miRNA-Analoga bereits synthetisch in



Form von sequenzidentischer ("mimic") oder sequenzkomplementärer ("Antagomir") "small interference RNA" (siRNA), hergestellt. Mimic-miRNA ist durch ihre Sequenzanalogie in der Lage komplementäre mRNA, entsprechend der natürlichen endogenen miRNA, zu inhibieren bzw. abzubauen, während Antagomir zielgerichtet miRNA binden und blockieren [132]. Durch Antagomir kann auf diesem Wege überexprimierte miRNA gebunden und die Konzentration der korrespondierenden mRNA erhöht werden. Die Einführung solcher siRNA in Zellen gelingt im Falle von initial doppelsträngiger Mimic-miRNA z.B. durch endogene Transkription von viral oder durch Transfektion eingebrachter DNA, wohingegen die Applikation von einzelsträngiger Antagomir in tierexperimentellen Studien sogar schon intravenös möglich ist [95, 191].

### **1.3. Fragestellung**

Adenokarzinome des ösophagogastralen Übergangs stellen nach wie vor nicht universell eine eigenständig betrachtete Erkrankung dar. Die meisten Forschungsarbeiten integrieren diesen anatomischen Bereich, wie einleitend erläutert, in Studien, die sich thematisch mit Adenokarzinomen des distalen Ösophagus, des proximalen und distalen Magens oder mit korrespondierenden Zelllinien befassen. Entsprechend verhält es sich mit der Analyse molekularer Ursachen und Zustände von Chemoresistenz bzw. Chemosensitivität bei AEG.

Mit dieser explorativen Arbeit soll anhand von 33 prä-Neoadjuvanz entnommenen AEG-Fallbiopsaten ein microRNA-Profil erstellt werden, welches anschließend mit den histopathologisch bestimmten Responsedaten der entsprechenden Resektate verglichen wird. Durch die mikroskopische Ermittlung von Respondern und Non-Respondern nach Becker et al., soll eine Einteilung der Fälle in diese zwei Gruppen durchgeführt werden.

Ziel ist es, signifikante miRNAs für AEG zu identifizieren, die das Potential haben ein Ansprechen auf neoadjuvante Therapie mit gewöhnlich verwendeten Chemotherapeutika, wie Cisplatin und 5-Fluorouracil, vorherzusagen. Außerdem werden die detektierten miRNAs, entsprechend der aktuellen Studienlage mit gleicher Fragestellung, mit anderen Karzinomen, insbesondere des Ösophagus und des Magens, verglichen.

Ferner soll das miRNA-Profil mit klinischen Charakteristika wie Geschlecht, Alter, Überleben, Histomorphologie und TNM-Staging in den beiden Gruppen in Relation gesetzt und bewertet werden.

## **2. Methoden**

### **2.1. Patientenproben**

Die Generierung von letztlich 33 Patientenproben und –resektaten, die aus den Jahren 1997 bis 2013 stammen, erfolgte durch Recherche im Informationssystem des Instituts für Pathologie am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein (UKSH), Campus Lübeck. Durch Bereitstellung einer Auflistung von zuvor behandelten Patienten mit AEG durch die viszeralchirurgische Abteilung des Hauses, konnte diese Suche eingegrenzt und erleichtert sowie weitere Patientencharakteristika abgerufen werden. Erste Selektionskriterien bestanden in der Verfügbarkeit von Biopsaten und Resektat(-en) der Patienten, die einer neoadjuvanten Chemotherapie unterzogen wurden. Dies ist nicht immer realisierbar, da die Biopsien zu einem großen Teil extern ambulant erfolgen. Die unbehandelten AEG-Biopsate waren für die Erstellung eines miRNA-Profiles und die Resektate zur histologischen Beurteilung der Regression nach Chemotherapie erforderlich. In Frage kommende Gewebeproben und Organ(-teil)-resektate wurden in Form von zuvor angefertigten Gewebeschnitten und deren FFPE-Blöcken (Formalin-fixiert und in Paraffin gebettet) im Archiv des Instituts für Pathologie des UKSH-Lübeck, aufgesucht und nochmals mikroskopisch überprüft.

Sämtliche Patientenproben, -resektate und -daten wurden, entsprechend einer bei der Ethikkommission der Universität zu Lübeck vorgelegten Ethikanzeige (AZ 14-242A), einer sofortigen Anonymisierung unterzogen.

### **2.2. Histologische Begutachtung und Studiengruppierung**

Alle in Frage kommenden Biopsate und Resektate wurden zuvor in der klinischen Routine der Jahre 1997 bis 2013 histologisch fachärztlich beurteilt und bei Selektion für diese Studie nochmals mikroskopisch (Axioskop, Zeiss, Jena, Deutschland) durch zwei wissenschaftliche Mitarbeiter (J. Knief und C. Just) untersucht. Zunächst wurde eine histologische Klassifizierung der Biopsate nach WHO-Vorgaben in tubulär, muzinös, gering kohäsiv und undifferenziert vorgenommen [144]. Des Weiteren wurden Informationen über die Tumorausdehnung, den Nodalstatus, eine eventuelle Fernmetastasierung sowie Lymphangio- und Perineuralinvasion aus der klinischen

Dokumentation des UKSH entnommen. Der histopathologische Regressionsgrad nach neoadjuvanter Chemotherapie wurde entsprechend des Tumorregressions-Score für Adenokarzinome nach Becker et al. erfasst (vgl. Tabelle 2) [14].

Regressionsgrad	Definition
1a	komplette Regression: keine vitalen Tumorzellen nachweisbar
1b	subtotale Regression: vitale Tumorzellen in <10% des Gewebes
2	partielle Regression: vitale Tumorzellen in 10-50% des Gewebes
3	geringe/keine Regression: vitale Tumorzellen in >50% oder keine regressiven Veränderungen

**Tabelle 2: Übersicht Regressionsgrade nach Becker et al.**

Zur Beurteilung wurden die angefertigten HE (Hämatoxylin-Eosin)-gefärbten Schnitte der Biopsate mit denen der Resektate verglichen. Da keine frischen bzw. Formalin-fixierten, unzugewandten Resektate für die makroskopische Begutachtung zur Verfügung standen, musste sich diesbezüglich auf die ursprüngliche ärztliche Zuschnittsdokumentation und erste Regressionsbeurteilung bezogen werden. Mikroskopisch wurden morphologisch regressive Veränderungen wie Vakuolisierung, Zellatrophie, Kernpyknosen und -fragmentierung, Nukleolenprominenz, muzinöse Degeneration und Desorganisation von Tumordrüsen sowie stromale Fibrose in ihrer Ausdehnung erfasst. In dieser Studie wurden die Regressionsgrade 1a und 1b der Responder-Gruppe und Grad 3 der Non-Responder-Gruppe zugeordnet. Der Regressionsgrad 2 wurde wegen unklarer Zuordbarkeit aus dieser Studie ausgeschlossen.

### **2.3. Korrelation mit klinischen Merkmalen**

Um Unterschiede hinsichtlich klinischer Merkmale wie Alter, Geschlecht, Lymphknotenstatus, Infiltrationstiefe, perineurale Invasion, lymphovaskuläre Invasion und Vorhandensein von Fernmetastasen zwischen beiden Gruppen abzuschätzen, wurde der  $\chi^2$ -Test angewendet und ein  $p$ -Wert <0.05 als statistisch signifikant angesehen.

## **2.4. Extraktion von Tumorgewebe**

Um RNA ausschließlich aus dem Tumorgewebe der AEG-Biopsate zu isolieren, mussten diese Areale zunächst anhand vorhandener HE-Schnitte unter dem Mikroskop markiert werden. Diese Markierungen wurden dann mit den entsprechenden FFPE-Blöcken verglichen und auf diese übertragen. Anschließend wurde aus jedem relevanten Biopsieblock jeweils ein 2mm durchmessender Stanzzylinder aus dem markierten Areal mittels eines Stanzstiftes aus dem Tissue-Tek® Microarray-System (Sakura Finetek, USA) entnommen, vorsichtig an einer Ausgießstation aufgeschmolzen und einzeln neu in Paraffin eingebettet.

## **2.5. RNA-Isolation und Konzentrationsbestimmung**

Aus jedem neuen FFPE-Block wurden zunächst 10 jeweils 10 µm dicke Röllchen mittels eines Rotationsmikrotoms (Leica, Deutschland) geschnitten, um aus diesen anschließend RNA-Isolationen mit Hilfe des RecoverAll™ Total Nucleid Acid Isolation Kit (Applied Biosystems, USA) entsprechend der Herstellerangaben durchzuführen.

Die Arbeitsschritte werden im Folgenden aufgeführt und beziehen sich auf jeweils eine Probe:

### **Entparaffinierung:**

1. Zugabe von 1 ml Xylol zu den Paraffinröllchen in einem 2 ml Tube, vortexen, 3 min bei 50°C inkubieren, danach den Überstand absaugen
2. Zugabe von 1 ml 100%igem Ethanol, vortexen, 2 min bei max. Geschwindigkeit zentrifugieren, Überstand absaugen
3. Schritt 2 wiederholen
4. nochmals 15 sec zentrifugieren und flüssigen Überstand vorsichtig abpipettieren
5. Gewebepellet am Tubeboden ca. 15 min lufttrocknen

### **Proteaseverdau:**

1. Zugabe von 400 µl Digestion-Buffer
2. Zugabe von 4 µl Protease, Tube leicht schütteln
3. drei Stunden bei 50°C inkubieren

### **Isolation der Nukleinsäuren:**

1. Zugabe von 480 µl Isolation Additive, vortexen bis Probe milchig aussieht
2. Zugabe von 1,1 ml 100%igem Ethanol, durch vorsichtiges auf- und abpipettieren mischen, bis Lösung klar wird
3. die entstandenen ca. 1,98 ml Probengemisch in drei Schritten (z.B. 700µl-700µl-600µl) auf eine Glasfiltersäule, die in einem 2 ml Tube steckt, laden und pro Schritt bei 8000 rpm zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
4. Zugabe von 700 µl Wasch-Lösung 1 auf die Säule, 30 sec bei 8000 rpm zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
5. Zugabe von 500 µl Wasch-Lösung 2/3 auf die Säule, 30 sec bei 8000 rpm zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
6. nochmals bei 8000 rpm 30 sec zentrifugieren

### **RNA-Isolation:**

1. Anfertigung eines DNase-Mix, bestehend aus: 6 µl 10x DNase-Puffer, 4 µl DNase, 50 µl Ambion-Wasser pro Probe
2. Zugabe von 60 µl DNase-Mix in das Zentrum der Glasfiltersäule, Inkubation bei Raumtemperatur für 30 min
3. Zugabe von 700 µl Wasch-Lösung 1 auf die Säule, 30 sec bei 8000 rpm zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
4. Zugabe von 500 µl Wasch-Lösung 2/3 auf die Säule, 30 sec bei 8000 rpm zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
5. Schritt 4 wiederholen
6. nochmals bei 8000 rpm für 30 sec zentrifugieren
7. Säule in ein neues Tube stecken (1,5 ml mit spitz zulaufendem Boden)
8. 60 µl nukleasefreies Ambion-Wasser (Raumtemperatur) in die Mitte der Säule geben, 1 min bei Raumtemperatur inkubieren, bei max. Geschwindigkeit für 1 min zentrifugieren

### Messung der RNA-Konzentration:

1. am PC das Nanodrop-Programm „Nucleid Acid Measurement“ wählen
2. Kalibrierung mit 2 µl AE-Puffer, Messvorgang starten, Messstation mit Tuch reinigen
3. Aufbringen von 2 µl der RNA-Lösung, Messvorgang starten, Messstation mit Tuch reinigen

Anschließend werden die RNA-Proben bei -80°C eingelagert bis eine weitere Verarbeitung erfolgt.

### 2.6. Synthese komplementärer DNA (cDNA)

Der Schritt der cDNA-Synthese beinhaltet eine reverse Transkription, ausgehend von der zuvor isolierten Gesamt-RNA pro Probe. Hierfür wurde das miRCURY LNA™ Universal cDNA Synthesis Kit II (Exiqon, Dänemark) genutzt. Jede zuvor isolierte und auf ihre Konzentration quantifizierte RNA-Probe wurde für diesen Schritt zunächst mit nukleasefreiem Wasser auf eine RNA-Konzentration von 5 ng/µl verdünnt.

Die Reagenzien wurden entsprechend der Herstellerangaben wie folgt zusammengesetzt, gevortext und kurz an zentrifugiert (pro Probe):

Reagenz	µl pro Probentube
5xReaktions-Puffer	2
nukleasefreies Wasser	4,5
Enzymmix	1
synthetische RNA-Spike-Ins (UniSp6, cel-miR-39-3p)	0,5
RNA der Proben (5 ng/µl)	2

**Tabelle 3: Ansatz für cDNA-Synthese**

Der Reaktionspuffer beinhaltet die für die reverse Transkription erforderlichen Primer, Mg<sup>2+</sup> und dNTPs (Desoxyribonukleotidtriphosphate: dATP, dTTP, dCTP, dGTP). Der Enzymmix enthält reverse Transkriptase und Poly-A-Polymerase. Durch die Zugabe definierter Mengen synthetischer RNA-Vorlagen (UniSp6 und cel-miR-39-3p), kann der Schritt der cDNA-Synthese, durch Schaffung einer Vergleichsmöglichkeit, überwacht

werden. So kann bei der späteren Auswertung z.B. eine Verunreinigung der Probe mit Nukleasen aufgedeckt werden.

Schließlich wurden die 10 µl-Reaktionsgemische pro Probe nach folgendem Schema für die reverse Transkription in einem Thermocycler (Biometra) inkubiert:

1. Inkubation für 60 min bei 42°C
2. erhitzen bis auf 95°C für 5 min
3. herunterkühlen bis auf 4°C

Das Reaktionsprodukt wurde innerhalb der vom Hersteller empfohlenen Lagerungszeit von 5 Wochen bei -20°C gelagert und weiter verarbeitet.

## 2.7. Beladen der PCR-Platten und Durchführung einer real-time-PCR

Um die 384-well-PCR-Platten (miRCURY LNA™ Universal RT miR Ready-to-use PCR, Cancer focus panel, V4.R) der Firma Exiqon zu beladen, wurde zunächst ein Reaktionsgemisch mit folgender Zusammensetzung pro Probe gefertigt:

Reagenz	Volumen in µl
ExiLENT SYBR® Green Master-Mix	500
nukleasefreies Wasser	495
cDNA	5

**Tabelle 4: Zusammensetzung des Reaktionsgemisches für Real-time-PCR**

Der Master-Mix aus dem ExiLENT SYBR® Green Master mix Kit (Exiqon, Dänemark) beinhaltet DNA Polymerase, miRCURY SYBR® Green PCR Puffer und SYBR® Green I. Die DNA-Polymerase (isoliert aus *Thermus aquaticus*) wird erst durch initiale Erhitzung auf 95°C, durch Entkopplung eines sie bis dahin inaktivierenden Antikörpers, aktiviert. Der miRCURY SYBR® Green PCR Puffer enthält die für die Amplifikation notwendigen dNTP sowie ein Gemisch aus Tris-HCl, KCl, NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>, MgCl<sub>2</sub> zur Schaffung eines optimalen Reaktionsmilieus. SYBR Green® I bindet bei der PCR-Amplifikation entstehende doppelständige DNA und emittiert ein durch Schmelzkurvenanalyse messbares Fluoreszenzsignal.

Jede 384-well-Platte besteht aus 4x96 Probenlöchern (engl. 'well') und enthält:

- 4x84 miRNA-Primer-Sets, die für ein häufiges Vorkommen bei Krebserkrankungen, als Onkogene oder als Tumorsuppressoren, bekannt sind; inkl. 4x3 Referenz-Gen-Primer (hsa-miR-103, hsa-miR-191, hsa-miR423-5p)
- 4x3 endogene Kontrollen (U6, SNORD38B, SNORD49A)
- 4x5 Kontroll-Primer (UniSp3, UniSp4, UniSp5, UniSp6, cel-miR-39,3p)
- 4x3 Interplate-Kalibratoren (UniSp3 IPC)
- 4x1 Leerkontrolle

**Folgende 84-miRNA-Primer sind in dem Cancer Focus microRNA Panel, V4.R von Exiqon enthalten:**

cel-miR-39-3p, hsa-let-7a-5p, hsa-let-7b-5p, hsa-let-7c-5p, hsa-let-7d-5p, hsa-let-7e-5p, hsa-let-7f-5p, hsa-let-7g-5p, hsa-let-7i-5p, hsa-miR-1-3p, hsa-miR-100-5p, hsa-miR-101-3p, hsa-miR-103a-3p, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-106b-5p, hsa-miR-107, hsa-miR-10a-5p, hsa-miR-10b-5p, hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-126-3p, hsa-miR-130a-3p, hsa-miR-132-3p, hsa-miR-133a-3p, hsa-miR-141-3p, hsa-miR-143-3p, hsa-miR-145-5p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-148a-3p, hsa-miR-149-3p, hsa-miR-150-5p, hsa-miR-155-5p, hsa-miR-15a-5p, hsa-miR-15b-5p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-181b-5p, hsa-miR-182-5p, hsa-miR-186-5p, hsa-miR-18a-5p, hsa-miR-191-5p, hsa-miR-192-5p, hsa-miR-194-5p, hsa-miR-195-5p, hsa-miR-196a-5p, hsa-miR-19a-3p, hsa-miR-19b-3p, hsa-miR-200a-3p, hsa-miR-200b-3p, hsa-miR-200c-3p, hsa-miR-202-3p, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-206, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-20b-5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-210-3p, hsa-miR-214-3p, hsa-miR-215-5p, hsa-miR-22-3p, hsa-miR-221-3p, hsa-miR-222-3p, hsa-miR-223-3p, hsa-miR-23a-3p, hsa-miR-23b-3p, hsa-miR-24-3p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-26a-5p, hsa-miR-26b-5p, hsa-miR-27a-3p, hsa-miR-27b-3p, hsa-miR-29a-3p, hsa-miR-29b-3p, hsa-miR-29c-3p, hsa-miR-30b-5p, hsa-miR-30c-5p, hsa-miR-30d-5p, hsa-miR-31-5p, hsa-miR-34a-5p, hsa-miR-423-5p, hsa-miR-7-5p, hsa-miR-9-5p, hsa-miR-92b-3p, hsa-miR-93-5p, hsa-miR-99a-5p

Eine 384-Loch-Platte besteht aus 24 Spalten (1-24) und 26 Zeilen (A-P) und kann mit Proben von insgesamt 4 Patienten bzw. Gewebeproben bestückt werden. Dabei sind in jeder zweiten Zeile und jeder zweiten Spalte die Primer für eine Patientenprobe enthalten. Im Folgenden ist das Lochschema exemplarisch anhand der ersten 4 Zeilen und Spalten



dargestellt (gleiche Farbe entspricht gleichem Patienten; ein 2x2-Feld beinhaltet immer den gleichen miRNA-Primer):

	1	2	3	4
A	hsa-let-7a-5p	hsa-let-7a-5p	hsa-let-7b-5p	hsa-let-7b-5p
B	hsa-let-7a-5p	hsa-let-7a-5p	hsa-let-7b-5p	hsa-let-7b-5p
C	hsa-miR-103a-3p	hsa-miR-103a-3p	hsa-miR-106a-5p	hsa-miR-106a-5p
D	hsa-miR-103a-3p	hsa-miR-103a-3p	hsa-miR-106a-5p	hsa-miR-106a-5p

**Abbildung 2: exemplarische Darstellung eines 4x4-Ausschnittes einer 384-well-Platte (Cancer Focus microRNA Panel, V4.R, Exiqon)**

Jedes Probenloch wurde mit 10 µl des oben erläuterten Probengemisches bestückt. Dieser Schritt erfolgte mittels einer elektronischen 12-Kanal-Pipette und unter visueller Kontrolle einer zweiten Person.

Anschließend wurde die befüllte Platte mit optisch klarer Klebefolie versiegelt und für 1 min bei 3000 rpm zentrifugiert.

Für die 33 Patientenproben wurden insgesamt neun Platten benötigt.

Die qPCR (quantitative real-time PCR) erfolgte mit einem LightCycler® 480 (Roche molecular systems Inc., Deutschland) entsprechend des vom Hersteller vorgegebenen Ablaufs:

Polymeraseaktivierung/Denaturation	10 min 95°C
Amplifikation	<u>45 Zyklen:</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ 10 sec 95°C</li> <li>➤ Abkühlung um 1,6°C/sec bis 60°C</li> <li>➤ 1 min 60°C</li> </ul>

**Tabelle 5: Ablauf der qPCR**

Während der real-time-PCR erfolgte eine Registrierung der Ct-Werte der PCR-Produkte mittels der LightCycler® 480 Software (Roche molecular systems Ing., Deutschland).

Für die weitere Analyse wurden nur miRNAs mit Ct-Werten kleiner als 40 verwendet, da der Ct-Wert mit der miRNA-Menge invers korreliert. Des Weiteren wurde jede einzelne Ct-Kurve, auch bei durch die Software ermittelbarem Wert, nochmals visuell bzgl. ihres Verlaufs kontrolliert, um falsch-positive Signale zu eliminieren. Nur exponentiell verlaufende Kurven geben einen wahren Ct-Wert wieder.

## **2.8. Normalisierung**

Während der einzelnen Schritte der RNA-Isolation, der cDNA-Synthese und der Amplifikation durch PCR kann es zu qualitativen Variationen zwischen den Proben kommen. Um Verzerrungen der Expressionsdaten durch Messfehler, physikalische oder technische Variabilität, sowohl zwischen den Einzelproben als auch zwischen den verwendeten Platten, zu berücksichtigen, wurde eine korrigierende Normalisierung der erfassten Daten mittels der vom Hersteller empfohlenen GenEx Software 6.1 (Trial Version; MultiD Analyses AB, München, Deutschland) durchgeführt. Hierfür wurden unter anderem synthetische Spike-Ins, die dem Ausgangsmaterial in definierter Menge zugesetzt und parallel zu den Zielanalyten quantifiziert wurden, verwendet.

Insgesamt wurden drei verschiedene Normalisierungsmethoden angewendet und die Ergebnisse anhand der anschließend durchgeführten *p*-Wert Ermittlung mittels SPSS miteinander verglichen. Bei dem ersten Normalisierungsverfahren "Normfinder" wurden durch die GenEx Software insgesamt 39 miRNAs, inklusive der zumeist stabil exprimierten hsa-miR-103-3p, als Referenz ermittelt und angewendet [151]. Als zweites Verfahren erfolgte eine Normalisierung mittels der bei der Probenverarbeitung zugegebenen synthetischen Spike-Ins (UniSp6, cel-miR-39-3p) [53]. Die letzte Normalisierungsmethode war der "Global mean Algorithmus", der zunächst unspezifisches Hintergrundrauschen reduziert, dann das arithmetische Mittel aller Werte berechnet und dieses anschließend von jedem einzelnen Wert subtrahiert [135]. Die Global mean Methode, als eine den anderen Normalisierungsmethoden überlegene Methode, soll vor allem angewendet werden, wenn viele miRNAs getestet werden [45].

## 2.9. Subgruppenanalyse

Um signifikante Unterschiede hinsichtlich der miRNA-Expression zwischen Responder- und Non-Responder-Gruppe zu ermitteln, wurde der Mann-Whitney-U-Test für ungepaarte, nicht normalverteilte Stichproben angewandt. Hierfür wurde SPSS Statistics Version 22 (IBM, Deutschland) verwendet. Da es sich hier um ein exploratives Studiendesign handelt, war eine Korrektur bzgl. multiplen Testens nicht erforderlich.

Schließlich wurden die signifikant differenziell exprimierten miRNAs sowie Überschneidungen zwischen den verwendeten Normalisierungsmethoden erfasst.

Das Signifikanzniveau wurde mit  $\alpha=5\%$  festgelegt, so dass  $p$ -Werte  $< 0.05$  als statistisch signifikant angesehen wurden.

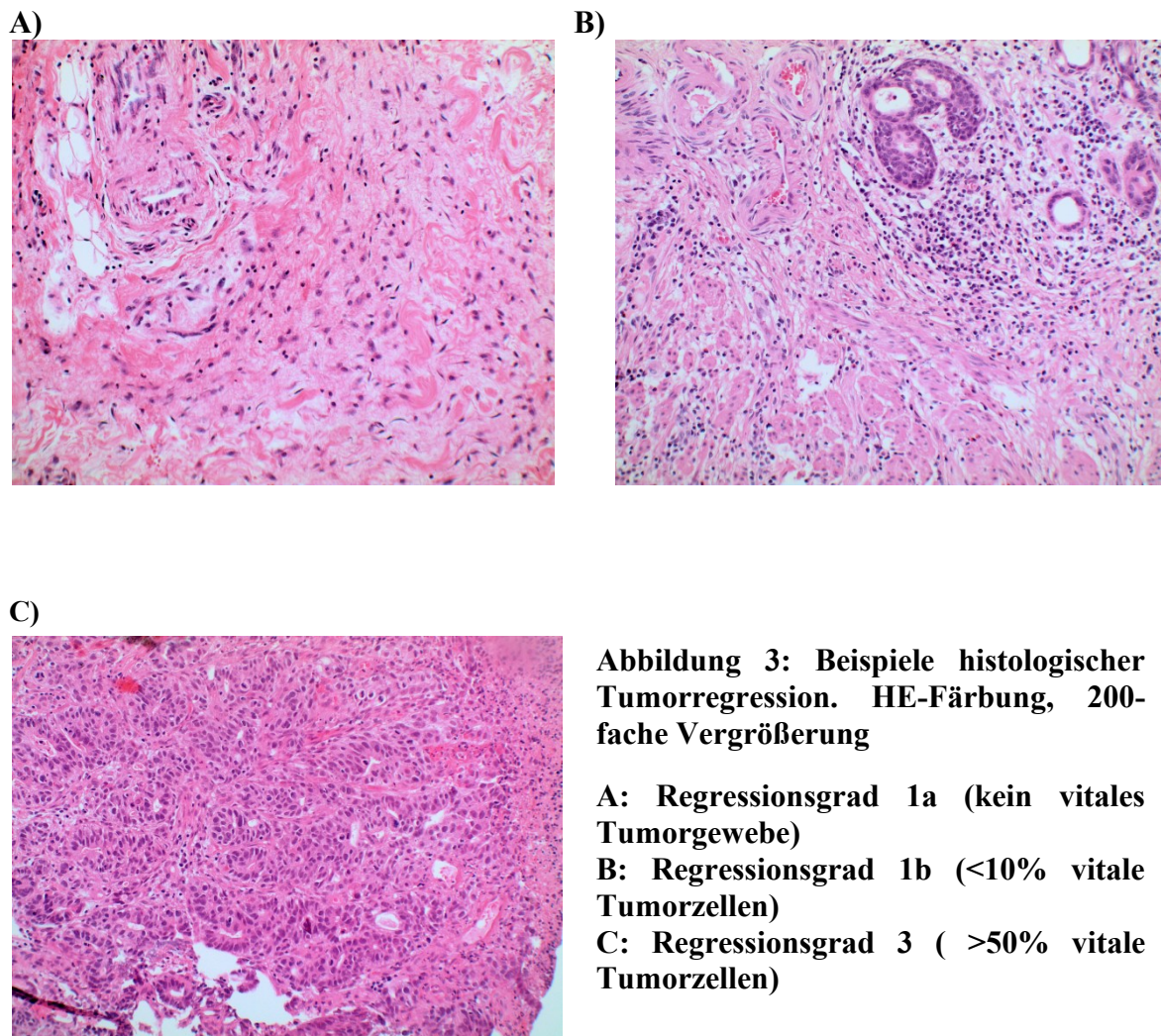
## 2.10. Patientenprognose

Um den prognostischen Wert der miR-Expression zu bestimmen, wurde der Median für jede analysierte miRNA berechnet. Die Fälle wurden dann dichotomisiert und zeigten entweder ein Expressionsniveau über oder unter dem Median. Die Gesamtüberlebenskurven wurden über Kaplan-Meier-Schätzungen mit SPSS Statistics Version 22 (IBM, Ehningen, Deutschland) visualisiert. Die Daten wurden für mehrere Tests unter Verwendung des Bonferroni-Verfahrens angepasst, wonach ein  $p$ -Wert  $< 0.00052$  für diesen Test als statistisch signifikant angesehen wurde.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Histologie

Nach histologischer Untersuchung der in Frage kommenden prä-therapeutisch entnommenen AEG-Biopsate und deren korrespondierender postoperativer Resektate, konnten insgesamt 33 Fälle für diese Studie herangezogen werden. Hiervon konnten gemäß der Klassifikation nach Becker et al. 12 Fälle als Non-Responder, entsprechend Regressionsgrad 3, und 21 Fälle als Responder, entsprechend Regressionsgrad 1a und 1b, identifiziert werden. Repräsentative Beispiele sind in Abbildung 3 dargestellt. Unter den 33 Fällen wurden 24 als tubuläres Adenokarzinom, 3 als gering kohäsives Karzinom, 2 als muzinöses Adenokarzinom und 4 Fälle als undifferenziert nach dem aktuellen WHO-Standard eingestuft.



**Abbildung 3: Beispiele histologischer Tumorregression. HE-Färbung, 200-fache Vergrößerung**

**A: Regressionsgrad 1a (kein vitales Tumorgewebe)**

**B: Regressionsgrad 1b (<10% vitale Tumorzellen)**

**C: Regressionsgrad 3 (>50% vitale Tumorzellen)**

### **3.2. Korrelation der Responder und Non-Responder zu klinischen Merkmalen**

Bezüglich der zwei verglichenen Gruppen, Responder vs. Non-Responder, zeigte sich, dass undifferenzierte Adenokarzinome eher in der Gruppe der Non-Responder zu finden waren, während unter den Fällen der Responder insbesondere der tubuläre Typ präsent war ( $p$ -Wert 0.034). Hinsichtlich der Verteilung von Geschlecht, Invasionstiefe, Nodalstatus, lymphovaskulärer und perineuraler Invasion sowie Fernmetastasierung konnte mit einer  $p$ -Wert-Verteilung zwischen 0.087 und 0.443 keine signifikante Korrelation zur Gruppe der Responder oder Non-Responder dargelegt werden, wie der Tabelle 6 zu entnehmen ist.

<b>Merkmal</b>	<b>Responder</b>	<b>Non-Responder</b>	<b><i>p</i>-Wert</b>
Total <i>n</i>	21	12	
Geschlecht			
männlich	18	8	<i>0.198</i>
weiblich	3	4	
WHO-Klassifikation			
tubulär	17	7	<b><i>0.034</i></b>
gering kohäsiv	2	1	
muzinös	2	0	
undifferenziert/ andere	0	4	
pT			
(low) pT0	2	0	<i>0.136</i>
pT1a	2	0	
pT1b	5	0	
pT2	3	1	
(high) pT3	8	10	
pT4a	1	1	
pT4b	0	0	
pN			
pN0	12	6	<i>0.203</i>
pN1	3	4	
pN2	6	1	
pN3	0	1	
LVI			
vorhanden	6	5	<i>0.443</i>
nicht vorhanden	15	7	
perineurale Invasion			
vorhanden	1	3	<i>0.087</i>
nicht vorhanden	20	9	
Fernmetastasierung			
vorhanden	4	1	<i>0.409</i>
nicht vorhanden	17	11	

**Tabelle 6: Merkmale der Adenokarzinome des ösophagogastralen Übergangs nach Responder- und Non-Responder-Status. Fettgedruckte Ziffern in den *p*-Werten zeigen einen statistisch signifikanten Unterschied an. LVI: lymphovaskuläre Invasion. pT/N: histopathologische Klassifikation von T=Tumor und N=Nodus**

### 3.3. Therapieregime

Alle Patienten erhielten eine neoadjuvante Chemotherapie. Zusätzlich wurde bei drei Patienten der Responder-Gruppe eine Radiotherapie mit Bestrahlungsdosen von 45 Gy, 59 Gy und 66 Gy durchgeführt. Hinsichtlich der Non-Responder-Gruppe bestand die neoadjuvante Chemotherapie in den meisten Fällen (8/12) aus einer Kombination von 5-

Fluorouracil, Leucovorin, Oxaliplatin und Docetaxel, welche auch als FLOT-Schema bekannt ist. Des Weiteren erhielten zwei Patienten eine Kombination von 5-Fluorouracil mit Cisplatin und weitere zwei eine Kombination von Epirubicin mit Oxaliplatin. Bezüglich der Responder-Gruppe wurde bei 12 von 21 Patienten eine Kombination aus Cisplatin und 5-Fluorouracil verabreicht. Lediglich vier Patienten erhielten eine Behandlung entsprechend des FLOT-Schemas. Des Weiteren erhielten zwei Patienten eine neoadjuvante Therapie mit 5-Fluorouracil in Kombination mit Leucovorin und Etoposid. Bei drei Patienten wurde eine Chemotherapie ohne 5-Fluorouracil appliziert, welche die Substanzen Oxaliplatin, Etoposid und Irinotecan enthielt.

### 3.4. miRNA-Analysen

Über Panel-Analysen, anschließende Normalisierung der ermittelten Ct-Werte und Zuordnung dieser zu Responder- und Non-Responder-Gruppen, konnten insgesamt 4 miRNAs identifiziert werden, die zwischen Respondern und Non-Respondern unterschiedlich exprimiert werden: hsa-let-7f-5p, hsa-miR-191-5p, hsa-miR-221-3p und hsa-miR-31-5p.

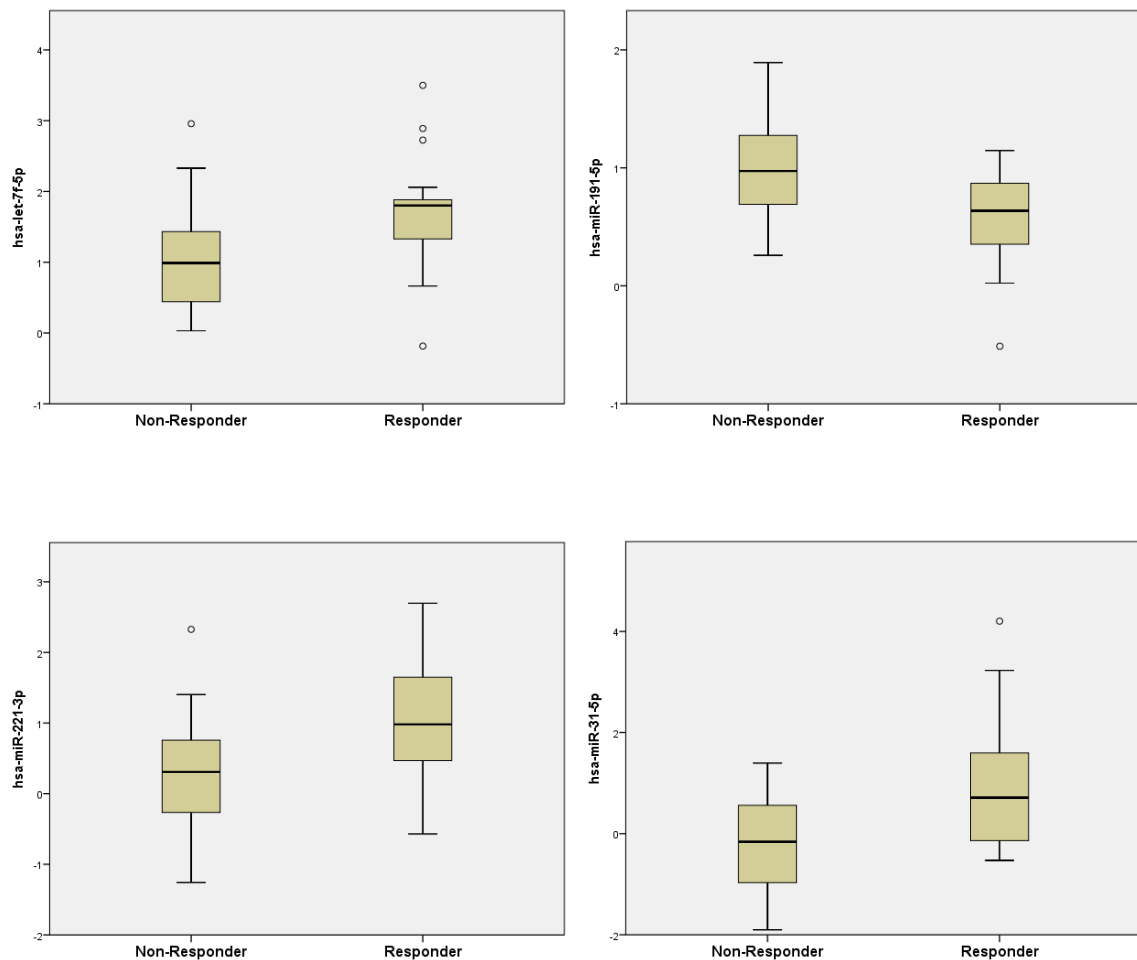
Bezüglich der Normalisierungsmethoden gab es nur geringfügige Unterschiede. Unter Anwendung des Normfinder-Algorithmus wurden hsa-let-7f-5p, hsa-miR-191-5p sowie hsa-miR-31-5p mit  $p$ -Werten von 0.03, 0.005 und 0.047 signifikant unterschiedlich exprimiert. Bei der Normalisierung mittels zugefügter bekannter Mengen Spike-Ins (UniSp6, cel-miR-39-3p) wurden mit  $p$ -Werten von 0.022 und 0.02 hsa-miR-221-5p und hsa-miR-31-5p signifikant differenziell exprimiert, während unter Verwendung von hsa-miR-103a-3p als Normalisierungsbezug, hsa-let-7f-5p und hsa-miR-31-5p mit  $p$ -Werten von 0.038 und 0.036 detektiert wurden. Als vierte Methode diente die Normalisierung über die Subtraktion des Ct-Mittelwerts von den einzeln ermittelten Ct-Werten ("Global mean"), welche schließlich alle bisher ermittelten miRNAs erneut als signifikant identifizierte: hsa-let-7f-5p ( $p=0.025$ ), hsa-miR-191-5p ( $p=0.014$ ), hsa-miR-221-3p ( $p=0.04$ ) und hsa-miR-31-5p ( $p=0.033$ ). Die Tabelle 7 fasst diese kurz zusammen.

Normalisierungsmethode	signifikante miRNAs	<i>p</i> -Wert
Normfinder	hsa-let-7f-5p	0.03
	hsa-miR-191-5p	0.005
	hsa-miR-31-5p	0.047
Spike-Ins	hsa-miR-221-5p	0.022
	hsa-miR-31-5p	0.02
hsa-miR-103a-3p	hsa-let-7f-5p	0.038
	hsa-miR-31-5p	0.036
Global mean	hsa-let-7f-5p	0.025
	hsa-miR-191-5p	0.014
	hsa-miR-221-3p	0.04
	hsa-miR-31-5p	0.033

**Tabelle 7: *p*-Werte angewandeter Normalisierungsmethoden**

Zusammengefasst zeigten hsa-let-7f-5p, hsa-miR-221-3p und hsa-miR-31-5p in der Gruppe der Non-Responder höhere Expressionslevel, während hsa-miR-191-5p in der Gruppe der Responder ein höheres Expressionslevel zeigte. Abbildung 4 stellt die ermittelten miRNAs in Bezug zur Gruppe der Responder und Non-Responder graphisch dar.





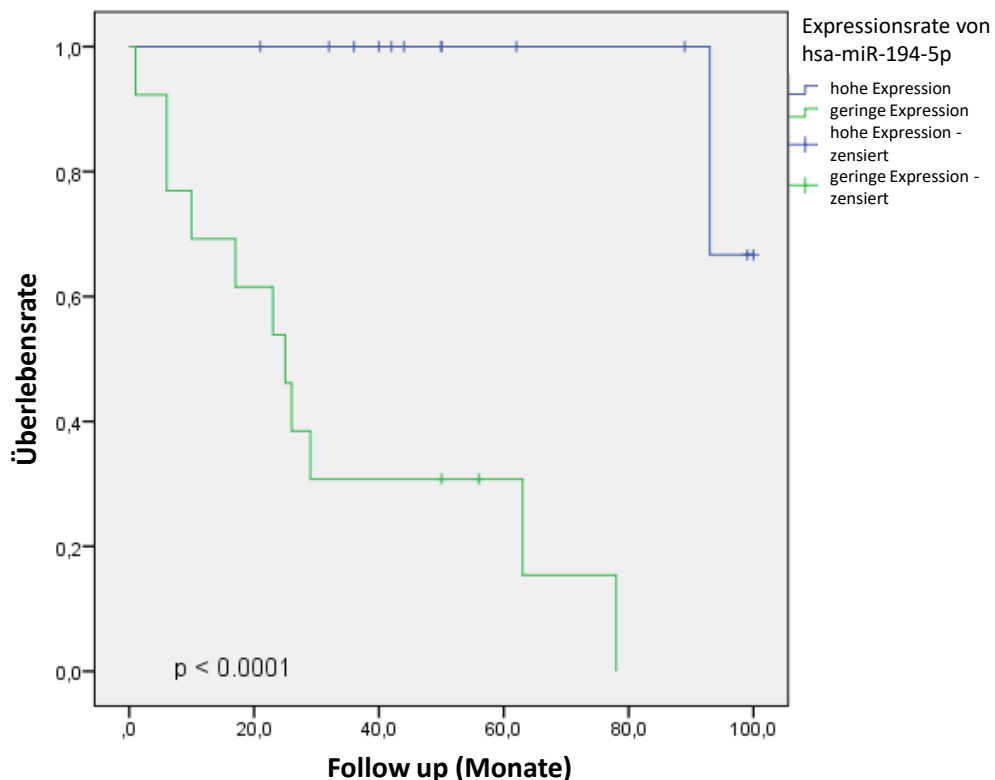
**Abbildung 4: Ct-Werte der differenziell exprimierten miRNAs in Responder- und Non-Responder-Gruppe. Oben links: Ct-Werte für hsa-let-7f-5p. Oben rechts: Ct-Werte für hsa-miR-191-5p. Unten links: Ct-Werte für hsa-miR-221-3p. Unten rechts: Ct-Werte für hsa-miR-31-5p. Die Ct-Werte korrelieren invers zur miR-Expressionsrate. Dargestellt werden Median, Quartile und Spannweite.**

### 3.5. miRNAs und Tumordifferenzierung

Hinsichtlich der Beziehung von miRNA-Expressionsprofilen und Tumordifferenzierung konnte festgestellt werden, dass eine schlechte Tumordifferenzierung (G3) signifikant mit erniedrigten Spiegeln von hsa-miR-200a-3p und erhöhten Spiegeln von hsa-miR-21-5p, hsa-miR-222-3p, hsa-miR-25-3p und hsa-let-7d-5p ( $p$ -Werte 0.03–0.031) korreliert war.

### 3.6. miRNAs und dessen prognostische Aussage

Für insgesamt 29 Patienten lagen, mit einer durchschnittlichen Nachbeobachtungszeit von 44,52 Monaten (Bereich 1 - 100 Monate) Überlebensdaten vor. Während dieser Zeit starben 12 Patienten (41,38%). Nach Anpassung für multiples Testen wurden signifikante Unterschiede im Überleben, gemäß hoher oder niedriger Expression ausgewählter miRNAs, nur für hsa-miR-194-5p mit einem  $p$ -Wert von  $<0.0001$  festgestellt. Die Überlebenszeiten bei Patienten mit höherer Expression dieser miRNA waren fast dreimal länger als bei Patienten mit niedriger Expression (97,67 vs. 32,69 Monate). Entsprechende Überlebenskurven sowie mittlere Überlebenszeiten, einschließlich 95%-Konfidenzintervall, sind in Abbildung 5 und Tabelle 8 dargestellt.



**Abbildung 5: Kaplan-Meier-Kurve zur Darstellung von Überlebensraten in Abhängigkeit von hohen und geringen Expressionsniveaus von hsa-miR-194-5p**

	$\bar{x}$ Überleben	SD	95% CI	<i>p</i> -Wert
Hsa-miR-194-5p				
hoch	97.67	1.91	93.93 – 101.4	<i>&lt; 0.0001</i>
niedrig	32.69	7.89	17.22 – 48.16	

**Tabelle 8: Durchschnittliche Überlebenszeiten gemäß hoher oder niedriger Expression von hsa-miR-194-5p. Die Überlebenszeiten sind in Monaten mit Standardabweichung (SD), 95% Konfidenzintervall (95% CI) und entsprechendem *p*-Wert angegeben**

## 4. Diskussion

Diverse wissenschaftliche Arbeiten haben sich mit Ursachen und Auswirkungen von Arzneimittel- bzw. Chemoresistenz sowie -sensitivität befasst. So wurden unter anderem membrangebundene Transporter, intrazelluläre Signaltransduktoren, Wachstumsfaktoren, Zytokine, Enzyme und Chaperone identifiziert, die einerseits in der Lage sind Tumorwachstum zu beeinflussen und andererseits als mögliches Target in der Krebstherapie fungieren [15, 24]. Auch unter miRNAs, die seit Jahren intensiver weltweiter Forschungsschwerpunkt sind, konnten vielfältige zelluläre Beeinflussungswege gefunden werden, die in Zusammenhang mit der Entstehung von Krebserkrankungen stehen. So spielen sie beispielsweise eine Rolle bei der Regulation von Apoptose, DNA-Reparation, arzneimittelmetabolisierenden Enzymen, MDR-Transportern oder als potentielle Zielstrukturen von Medikamenten [43, 238]. Chemotherapeutische Resistenz ist ein großes klinisches Problem bei der Behandlung von AEG-Tumoren. Daher ist es von großer Bedeutung, neuartige Biomarker zu untersuchen, die eine Chemoresistenz vorhersagen und die Entwicklung einer individualisierten Behandlung für Patienten mit Adenokarzinomen des ösophagogastralen Übergangs erleichtern können.

In dieser Studie untersuchten wir archivierte Gewebeproben von Patienten mit Adenokarzinomen des ösophagogastralen Übergangs und identifizierten vier miRNAs, die unterschiedlich hohe Expressionen bei Patienten zeigten, die auf eine Chemotherapie ansprachen (Responder) bzw. nicht ansprachen (Non-Responder). In der Gruppe der Non-Responder zeigten hsa-let-7f-5p, hsa-miR-221-3p und hsa-miR-31-5p signifikant höhere Expressionen als in der Gruppe der Responder, während hsa-miR-191-5p in der Gruppe der Responder höhere Expressionsraten aufwies. Diese Ergebnisse überschneiden sich nicht streng mit Ergebnissen anderer Studien oder sind vielmehr nicht eins zu eins vergleichbar. Dies liegt, wie einleitend erläutert, beispielsweise an einer uneinheitlichen Definition der Lokalisation von distalen Ösophagus- und Magenkarzinomen bzw. AEG-Tumoren. Auch macht ein unterschiedliches Studiendesign die entsprechenden Ergebnisse nur teilweise vergleichbar. So wurden in vorangehenden Studien etwa plasmatisch zirkulierende miRNA oder miRNA aus spezifischen Zelllinien analysiert, deren Ergebnisse nicht in Gänze auf primär-pathologisches Gewebe projizierbar sind [143]. Sehr viele dieser Studien, die sich mit der miRNA-Signatur von chemoresistenten bzw. -sensiblen Karzinomen des oberen Gastrointestinaltraktes auseinandergesetzt haben, bezogen sich auf Plattenepithelkarzinome der Speiseröhre. Diese zeigten, dass unter anderem eine

Überexpression von miR-27a und miR-200c aus repräsentativem Tumorgewebe, eine überexprimierte plasmatische miR-23a oder auch eine verminderte Expression von let-7 mit einer erhöhten Rate von Non-Respondern auf übliche Chemotherapien (5-FU, Oxaliplatin/Cisplatin) einhergingen [195, 64, 194, 93]. Des Weiteren bezogen sich einige Studien auf die Untersuchung von Plattenepithelkarzinom-Zelllinien, in denen zum einen ein erhöhtes Level von miR-141, zum anderen eine verminderte Expression von miR-218 oder auch miR-338 mit 5-Fluorouracil- und Oxali- bzw. Cisplatinresistenz assoziiert werden konnte [82, 83, 115]. Hummel et al. zeigten, dass eine Dysregulation von miR-27b, miR-193b, miR-192, miR-378 a, miR-125a und miR-18a eine 5-FU/Cisplatin-Resistenz sowohl in Zelllinien von Plattenepithel- als auch Adenokarzinomen der Speiseröhre vermittelten [78]. Zudem konnte auch demonstriert werden, dass durch äußere Beeinflussung des Expressionsniveaus bestimmter miRNAs (z.B. miR-148a) eine erhöhte Sensibilisierung gegenüber Chemotherapeutika in Zelllinien induziert werden kann [79]. Bezogen auf Adenokarzinome des Magens konnten ebenfalls miRNA-Dysregulationen mit veränderter Reaktion auf chemotherapeutische Intervention in Verbindung gebracht werden. So weist beispielsweise eine verminderte Expression von miR-181b in Zelllinien auf eine Vincristinresistenz hin, während ein erhöhtes Vorkommen von miR-20a eine Cisplatinresistenz zu vermitteln vermag [241, 242]. Auch konnten weitere Forschungen eine induzierte Chemosensibilität durch künstlich veränderte miRNA-Expressionsniveaus herbeiführen. So konnte eine Minderung der miR-27a-Level bei Magenkarzinomen eine erhöhte Sensibilität gegenüber Chemotherapeutika induzieren und eine vermehrte Akkumulation von Adriamycin im Tumorgewebe erreicht werden [237]. Des Weiteren zeigt eine vermehrte Expression von miR-375 ein signifikant besseres Ansprechen auf eine Chemotherapie mit Cisplatin [240].

#### **4.1. Hsa-let-7f-5p**

Hsa-let-7f-5p gehört zur Familie der Let-7-microRNAs, dessen insgesamt 9 Mitglieder (let-7a, let-7b, let-7c, let-7d, let-7e, let-7f, let-7g, let-7i, miR-98) in der Lage sind, die Expression bestimmter Ziel-mRNAs auf posttranskriptioneller Ebene über eine unvollständige Basenpaarung an die 3'-UTR der Ziel-mRNAs negativ zu regulieren [18]. Auf diese Weise nehmen sie vorwiegend inhibitorischen, aber selten auch aktivierenden Einfluss auf u.a. Komponenten der DNA-Replikationsmaschinerie, Transkriptionsfaktoren,

Onkogene und Checkpoints [84, 141]. Alle Let-7-Mitglieder besitzen eine identische "seed-Sequenz" in Nukleotidposition 2 bis 8, über die die Erkennung der Ziel-mRNA erfolgt [114, 248]. Dies wiederum bedingt, dass sie teilweise identische Ziele und Funktionen besitzen, weshalb in Studien vielfach nicht explizit zwischen einzelnen Let-7-miRNAs bezüglich ihrer Ziele differenziert wird [207]. Auch die übrigen Nukleotidsequenzen der let-7-miRNAs unterscheiden sich lediglich in einzelnen Positionen [114, 249]. Hsa-let7f-5p liegt auf dem langen Arm von Chromosom 9 (9q22.3) und ist beispielsweise involviert in der Differenzierung von Immunzellen, Angiogenese, Regulation von Zellwachstum, Migration und Invasion [96, 113, 224, 227].

Vorangehende Studien zeigten, dass eine verringerte Expression von let-7f mit dem Vorkommen von z.B. Lungen-, Ovarial-, Schilddrüsen- und Magenkarzinomen assoziiert ist [41, 97, 113, 153]. Aber andererseits wurde auch gezeigt, dass die Entstehung von oralen Plattenepithelkarzinomen und die des Mammakarzinoms mit einem hochregulierten let-7f korreliert [72, 223]. Diese Ergebnisse weisen möglicherweise auf eine gewebespezifische Funktion hin. Ähnlich verhält sich dieser Umstand hinsichtlich der Betrachtung des Ansprechens auf Chemotherapien. Ergebnisse einer Studie zu miRNA-Profilen bei cisplatinresistenten Medulloblastomen, zeigten eine verminderte Expression von hsa-let-7f-5p bei Non-Respondern [146]. Auf der anderen Seite fanden Yateng Tie et al., korrelierend zu unseren Ergebnissen, auch in einem der am häufigsten vorkommenden Malignome, dem kolorektalen Karzinom, eine erhöhte Expression von hsa-let-7f in chemoresistenten gegenüber chemosensitiven Tumoren. Sie konnten zudem eine korrelierende Hochregulation der anti-apoptotisch wirkenden hsa-let-7f-Zielproteine Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) und Bcl-xL (B-cell lymphoma-extra large) sowie eine verminderte Aktivität von Caspase-3 und Caspase-9, die in den komplexen Vorgängen des kontrollierten Zelltodes eine Rolle spielen, erfassen [198]. Bcl-2, Bcl-xL, Caspase 3 und 9 sowie weitere zellzyklusregulierende Proteine, die über hsa-let-7f-5p reguliert werden, könnten sowohl bezüglich der Entstehung als auch dem Ansprechen auf Chemotherapie des Adenokarzinoms des ösophagogastralen Übergangs eine Rolle spielen, wurden jedoch hinsichtlich ihrer Expressionsprofile in unserer Studie nicht erfasst und bieten hier einen Ansatz für weitere Forschung.

Unsere und die Ergebnisse erwähnter Studien deuten auf eine prädiktive Relevanz von hsa-let-7f-5p bzgl. des Ansprechens auf neoadjuvante Therapie hin. Möglicherweise kann eine Inhibition von let-7f-5p die chemotherapeutische Response verbessern und so zu einer wirksamen therapeutischen Strategie gegen AEG-Tumoren werden.

## 4.2. Hsa-miR-221-3p

Hsa-miR-221 ist in der menschlichen DNA auf dem X-Chromosom in Position Xp11.3 in einem Gencluster, zusammen mit hsa-miR-222, lokalisiert und war bereits Schwerpunkt vielfacher Studien. Sie konnte in ihrer Rolle als zumeist Onco-miR, aber selten auch als Tumorsuppressor-miR mit der Entstehung maligner Erkrankungen in Verbindung gebracht werden und ist u.a. beteiligt an der Regulation von Angiogenese, Zellwachstum, Proliferation, Apoptose und Metastasierung [249]. Eine Überexpression konnte bereits in zahlreichen Malignomen, wie beispielsweise Brust-, Leber-, Magen-, Bauchspeicheldrüsen- und Darmkrebs oder auch dem Glioblastom detektiert werden [56, 102, 117, 162, 225]. Hingegen wurde bezüglich des Prostatakarzinoms auch eine verminderte hsa-miR-221-Expression mit dessen Pathogenese in Verbindung gebracht [222]. Weitere Studien weisen darauf hin, dass miR-221 ein geeignetes Ziel für Krebsbehandlungen darstellen könnte. So konnte unter anderem gezeigt werden, dass eine erhöhte miR-221 und miR-222-Expression für die Resistenz gegenüber dem selektiven Östrogenrezeptormodulator Tamoxifen bei Brustkrebs verantwortlich ist und dass das Stummschalten von miR-221 die apoptotische Wirkung von Cisplatin bei der Behandlung von Brustkrebs, über eine erhöhte Expression von BIM (Bcl-2 interacting mediator for cell death), einem pro-apoptotischen Protein der Bcl-2-Familie, fördert [211, 228]. Auch hinsichtlich des Pankreaskarzinoms ergaben sich bereits Hinweise auf eine Chemoresistenz gegenüber 5-Fluorouracil, bedingt durch eine miR-221-Überexpression und inverser Suppression seines Ziel-Proteins RB1 (Retinoblastom-Protein-1), welches seinerseits als Tumorsuppressor fungiert [236]. In Zelllinien von Lungenkrebszellen konnte ein Zusammenhang zwischen vermehrter Cisplatinresistenz, erhöhter miR-221-Level und dadurch bedingter PTEN-Suppression (Phosphatase and Tensin homolog), welches ebenfalls ein Enzym mit tumorsuppressorischer Eigenschaft ist, gesehen werden [206]. Bezüglich des humanen Osteosarkoms konnten Untersuchungen an Zelllinien zeigen, dass in Osteosarkomzellen gegenüber normalen Osteoblasten die miR-221-Expression erhöht ist und zudem mit Cisplatin- sowie Doxorubicinresistenz und verringerten Apoptoseraten einhergeht. Als Zielstruktur von miR-221 wurde auch hier unter anderem PTEN beschrieben, welches durch miR-221 invers reguliert wird [119, 235]. Ähnliches konnte beim Glioblastom, Cervix- und Colonkarzinom beobachtet werden. In diesen Malignomen

führte ebenfalls eine miR-221-vermittelte PTEN-Hemmung und anschließende Aktivierung des Akt- und STAT3-Signalweges zu erhöhten Raten an Radio- und Chemoresistenz [48, 169, 221]. Studien hinsichtlich des chemotherapeutischen Ansprechens von Zelllinien oraler Plattenepithelkarzinome auf das Anthracyclin Doxorubicin weisen auf eine erhöhte Responderrate im Zusammenhang mit einer verminderten miR-221-Expression hin, welche durch die Verwendung von Anti-miR-221-Oligonukleotiden herbeigeführt wurde. Hierbei zeigte sich gleichzeitig eine vermehrte Expression von TIMP3, einem Metalloproteinase-Inhibitor, der mit der Homöostase extrazellulärer Matrix und insbesondere mit der Suppression von Angiogenese in Verbindung gebracht wird und als ein direktes Ziel von miR-221 identifiziert wurde [30, 250, 49]. Wang et al. zeigten 2016 durch Zelllinien- sowie Tumorgewebeanalysen, dass eine erhöhte Expression von miR-221 in humanen ösophagealen Adenokarzinomen mit einer Resistenz gegenüber 5-Fluorouracil assoziiert ist. Sie konnten zudem verbesserte 5-Fluorouracil-Response, verminderte Proliferations- und erhöhte Apoptoseraten durch Hemmung bzw. Herabregulation der miR-221-Expression induzieren und identifizierten den DKK2-Wnt/ $\beta$ -Catenin-Weg mit DKK2 als direktes miR-221-Ziel. Überdies entdeckten Sie eine miR-221-assoziierte Dysregulation weiterer Wnt/ $\beta$ -Catenin-Zielgene (CDH1, CD44, MYC und ABCG2) [209].

Auch in der hier präsentierten Studie zu Adenokarzinomen des ösophagogastralen Übergangs konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen einer erhöhten miR-221-Expression und Chemoresistenz gesehen werden, so dass auch für diese Art von Karzinom das Potential einer zielgerichteten Therapie mit verbessertem chemotherapeutischem Ansprechen, korrelierend zu den oben beschriebenen Ergebnissen vorangehender Studienergebnisse, über die Hemmung von miR-221 besteht.

### **4.3. Hsa-miR-31-5p**

Bezüglich hsa-miR-31-5p, welche im menschlichen Genom auf Chromosom 9 in Position 9p21.3 lokalisiert ist, gibt es heterogene Studienergebnisse hinsichtlich ihrer physiologischen und pathologischen Expressionsprofile in Geweben sowie dessen Funktion als sogenannte Onco-miR oder Tumorsuppressor-miR. Dieser Aspekt verhält sich gleichermaßen hinsichtlich der Betrachtung von Chemosensitivität und –resistenz und soll



im Folgenden anhand vorhandener Beispiele von Forschungsergebnissen dargestellt werden.

Studien an Gebärmutterhalskrebszelllinien sowie klinisch entnommenen Geweben von Gebärmutterhalskrebspatientinnen konnten zeigen, dass in diesen die Expression von miR-31 hochreguliert ist und dieser Umstand mit einer häufigeren lymphatischen Metastasierung, verstärkter Proliferation und insgesamt verringertem Gesamtüberleben korreliert [205]. Auf der anderen Seite konnten Untersuchungen des microRNA-Profiles von Osteosarkomen zeigen, dass erhöhte miR-31-Level mit verminderter Proliferation, Invasion und Migration einhergehen [28].

Li et al. zeigten 2016 anhand von Zelllinien, dass miR-31 in cisplatinresistenten Gallenblasenkarzinomzellen deutlich geringer exprimiert ist als in cisplatinempfindlichen Zellen. Des Weiteren konnten Sie eine verbesserte Chemosensitivität dieser Zellen durch hochregulierte miR-31-Expression induzieren [109]. Ähnliches Verhalten konnte auch in Zelllinien von Ovarialkarzinomzelllinien gegenüber Paclitaxel beobachtet werden. So zeigte sich in diesen bei herabregulierter miR-31-Expression und hierdurch erhöhter MET-Level, einer Rezeptortyrosinkinase, eine signifikant erhöhte Resistenz gegenüber dem Spindelgift Paclitaxel [138]. Weitere Forschungen konnten ergänzend zeigen, dass durch künstlich herbeigeführte, erhöhte miR-31-Expression in taxanresistenten Ovarialkarzinomzelllinien das Ansprechen auf Taxane über eine Hemmung von Stathmin1, einem Mikrotubuli-destabilisierenden Molekül, wiederhergestellt werden kann [67]. Auf der anderen Seite beobachteten Samuel et al. einen Zusammenhang zwischen erhöhter miR-31-Expression und Cisplatinresistenz beim Ovarialkarzinom, welcher mit einer Hemmung Calcium-aktivierter Kaliumkanäle einhergeht [172]. Auch Chen et al. konnten 2016 an Pleuramesotheliomzelllinien zeigen, dass durch künstlich herbeigeführte hohe miR-31-Level eine Resistenz gegenüber Cis- und Carboplatin induziert werden kann [139].

Welche Expressionsmuster zeigen sich nun in Karzinomen des Ösophagus und des Magens? Gao et al. konnten 2017 die Funktion von miR-31 als Onko-miR in Plattenepithelkarzinomzelllinien und -geweben des Ösophagus darstellen und zeigten zudem, dass eine miR-31-Hemmung das proliferative und invasive Verhalten dieser Tumoren unterdrücken kann [59]. In Magenkarzinomen hingegen weisen miR-31 tumorsuppressorische Eigenschaften auf. So gingen in verschiedenen Studien an Magenkarzinomgeweben und -zelllinien geringe miR-31-Expressionsraten mit schlechter Tumordifferenzierung, fortgeschrittenen Tumorstadien, vermehrtem Vorkommen von Lymphknotenmetastasen und geringerem Gesamtüberleben einher. Gleichzeitig konnten an

entsprechenden Zelllinien durch Hochregulation von miR-31 deutlich erhöhte Apoptoseraten beobachtet werden [233, 203, 33]. Hinsichtlich des chemotherapeutischen Ansprechens von Adenokarzinomen des Ösophagus konnten Hummel et al. 2014 ein heterogenes Verhalten von miR-31 feststellen. Während miR-31 in 5-Fluorouracil-resistenten Zelllinien hochreguliert war, zeigte sich bezüglich der Resistenz gegenüber Cisplatin eine verminderte miR-31-Expression in entsprechenden Zelllinien [78].

Unsere Studie ergänzt das derzeitige Verständnis von Chemoresistenz bei Adenokarzinomen des ösophagogastralen Übergangs, indem wir nachweisen konnten, dass Non-Responder höhere hsa-miR-31-5p-Expressionslevel aufweisen als Responder.

Die hier erwähnten Studienergebnisse weisen auf die Relevanz und die potentielle Aussagekraft von miR-31 hin, präsentieren jedoch weiterhin, dass sich deutliche Unterschiede bezüglich dessen Funktion in verschiedenen menschlichen Geweben und Tumorentitäten zeigen. Des Weiteren beruhen die meisten der aufgefundenen Studien auf Untersuchungen an Zelllinien und es bleibt teilweise offen, ob die Ergebnisse auf entsprechende Gewebeproben übertragen werden können.

#### **4.4. miR-191-5p**

Ähnlich der oben beschriebenen Charakteristik von miR-31 zeigt sich auch hinsichtlich miR-191-5p ein heterogenes Expressionsverhalten in menschlichen Geweben, Neoplasien sowie in Abhängigkeit des erfassten Kontextes. Mehrere Studien, die sich mit microRNA-Profilen verschiedener Malignome, wie dem Kolon-, Mamma- oder Ovarialkarzinom befassten, verweisen auf eine DNA-Hypomethylierung im miR-191-Genlocus, welche eine erhöhte miR-191-Expression bedingt [69, 120, 159]. Eine Überexpression von miR-191 konnte auch in Zelllinien des Prostata- und des Cholangiokarzinoms (CCA), sowie in Gewebeproben und Zelllinien des hepatozellulären Karzinoms (HCC) gesehen werden, wobei durch artifizielle Expressionshemmung in CCA- und HCC-Zelllinien eine verminderte Proliferation, Migration, Invasion und zugleich verstärkte Apoptose generiert werden konnte [52, 76, 87, 208]. Hinsichtlich der Expressionsprofile beim Mammakarzinom fanden sich divergente Studienergebnisse. Einerseits verwiesen Nagpal et al. und auch Mar-Aguilar et al. 2013 auf hohe miR-191-Expressionsniveaus beim Mammakarzinom sowie auf eine durch Mar-Aguilar beschriebene durch Östrogen induzierbare Expression [126, 140]. Andererseits berichteten Di Leva G et al. im gleichen

Jahr von einer tumorsuppressorischen Eigenschaft des miR-191/425-Clusters, dessen Aktivierung die Tumorentstehung beim Mammakarzinom zu inhibieren vermag [46]. Solch tumorsuppressorische Eigenschaft von miR-191 wurde ebenfalls beim follikulären Schilddrüsenkarzinom beschrieben, wobei eine herunterregulierte miR-191-Expression mit einer inversen CDK6 (cyclin-dependent-kinase-6)-Überexpression und damit einhergehend ausbleibendem Zellzyklusarrest korreliert [38]. Vielfache Studien befassten sich auch mit microRNA-Profilen des kolorektalen Karzinoms und beschrieben einheitlich eine miR-191-Überexpression sowohl in Tumorgewebeproben als auch in Zelllinien [40, 220]. Zugleich konnten im Rahmen von Experimenten an entsprechenden Zelllinien durch eine miR-191-Inhibierung ein verringertes Zellwachstum und eine reduzierte Proliferation verzeichnet werden. Überdies wurde in verschiedenen Studien festgestellt, dass 5-Fluorouracil, Oxaliplatin und Etoposid die Expression von miR-191 hemmten und eine persistierende Hochregulation von miR-191 die Zellanfälligkeit für 5-Fluorouracil reduzierte [63, 232, 239].

Bezüglich der Karzinogenese im oberen Gastrointestinaltrakt wurde bereits in vorausgehenden Untersuchungen eine onkogene Rolle von miR-191-5p im Plattenepithelkarzinom des Ösophagus sowie in Tumorgewebe und Zelllinien des Magenkarzinoms beschrieben und dessen signifikanter Zusammenhang mit Differenzierung, Apoptoserate, Invasionstiefe und Metastasierungstendenz erläutert [58, 179, 152].

Während der Recherche bisher veröffentlichter Studien, konnte keine Arbeit gefunden werden, die eine veränderte miR-191-5p-Expression beim Ösophaguskarzinom, Magenkarzinom oder dem hier thematisierten Adenokarzinom des ösophagogastralen Übergangs in Zusammenhang mit einem Ansprechen auf übliche Chemotherapeutika beschreibt, so dass die vorliegende Arbeit erstmalig einen derartigen Zusammenhang im Bereich Ösophagus/Magen darstellt. Unsere Ergebnisse zeigen, dass eine erhöhte miR-191-5p-Expression in Adenokarzinomen des ösophagogastralen Überganges mit einer chemotherapeutischen Response auf übliche neoadjuvante Therapeutika einhergeht. Es bleibt abzuwarten, ob diese Ergebnisse in weiteren Studien reproduziert werden können oder ob ein ähnlicher Effekt noch bei anderen Krebsarten nachgewiesen werden kann. Es ist denkbar, dass unsere Ergebnisse - wie dies möglicherweise sowohl für hsa-let-7f-5p als auch für hsa-miR-31-5p der Fall ist - einen Effekt widerspiegeln, der nur in einer definierten Untergruppe von Tumoren oder bestimmten Tumorentitäten erkennbar ist.

#### **4.5. Assoziation von hsa-miR-194-5p mit dem Gesamtüberleben**

Nach Anwendung der Bonferroni-Korrektur für multiples Testen korrelierte das Gesamtüberleben der Patienten signifikant mit den Expressionswerten von hsa-miR-194-5p ( $p$ -Wert  $<0.0001$ ). In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen, in denen höhere Raten von hsa-miR-194-5p einem verlängerten Überleben (97,67 vs. 32,69 Monate) entsprachen, wurde berichtet, dass eine Überexpression die Zellproliferation hemmt und miR-194-5p als Tumorsuppressor-miR beim Plattenepithelkarzinom des Larynx sowie bei Prostatakrebs, beim malignen Melanom, Blasenkrebs, NSCLC und dem klarzelligen Nierenkarzinom wirkt [62, 94, 110, 142, 243]. Darüber hinaus wurde in mehreren Studien festgestellt, dass Überexpression das Wachstum und die Proliferation sowohl in Magenkrebszelllinien als auch beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus hemmt [12, 39]. Überdies stellten auch Chen et al. 2015 fest, dass eine erhöhte miR-194-Expression mit einem verlängerten Gesamtüberleben korreliert [32]. Andere microRNAs, die häufig mit einem verlängerten oder verkürzten Gesamtüberleben bei Magen- oder Speiseröhrenkarzinomen zusammenhängen - zum Beispiel miR-16, miR-21, miR-29, miR-125b, miR-130a, miR-141 und miR-222 - konnten in unserer Studie nicht detektiert werden [111, 118, 168, 202]. Dies könnte durchaus auf eine geringere Anzahl von Patienten in unserer Studie zurückzuführen sein, die die statistische Zuverlässigkeit einschränkt, sowie auf die Tatsache, dass nach Anpassung für multiples Testen nur ein  $p$ -Wert  $<0.00052$  als statistisch signifikant eingestuft wurde, was eine Reihe von statistisch ansonsten signifikanten miRNAs ausschloss.

#### **4.6. Gesamteinordnung der Ergebnisse**

Im Rahmen der hier präsentierten Studie konnten die miRNAs hsa-let-7f-5p, hsa-miR-221-3p, hsa-miR-31-5p sowie hsa-miR-191-5p als signifikant unterschiedlich exprimierte microRNAs zwischen Responder- und Non-Responder-Gruppe auf neoadjuvante Therapie bei Adenokarzinomen des ösophagogastralen Übergangs identifiziert werden. Mit einer Gesamtanzahl von nur 33 Fallproben aus den Archiven des Instituts für Pathologie des

Universitätsklinikum Lübeck, ist die hier analysierte Kohorte bedauerlicherweise nur sehr klein. Ursache dieses Umstandes ist nicht das geringe Vorkommen dieser Art von gastrointestinalem Karzinom (siehe Einleitung). Vielmehr mussten eine große Anzahl von Fällen wegen unvollständiger oder ungenauer Daten aus der Betrachtung ausgeschlossen werden, da häufig entweder die Proben aus der initialdiagnostischen durchgeführten Gastroskopie oder das operativ entfernte Resektat nach neoadjuvanter Therapie fehlte oder Angaben zur Durchführung einer neoadjuvanten Therapie nicht auffindbar waren. Dieser Sachverhalt macht die Notwendigkeit weiterer, möglicherweise prospektiv geplanter Studien mit größeren Kohorten deutlich, um zu verifizieren, ob sich die hier präsentierten miRNA-Signaturen zum einen bestätigen und zum anderen womöglich präzisieren lassen, um sie in Zukunft gegebenenfalls klinisch-prognostisch anwendbar zu machen.

Die angewandten chemotherapeutischen Regime zur Durchführung der neoadjuvanten Therapie unterschieden sich teilweise sowohl innerhalb einer Gruppe, als auch zwischen Responder- und Non-Responder-Gruppe. Allerdings erhielten die meisten Patienten eine 5-Fluorouracil- (28/33) und/oder platinbasierte (31/33) Therapie. Aufgrund dieser Heterogenität verwendeter Chemotherapeutika und zudem geringer Fallzahlen einzelner Schemata, wurde hier von einem microRNA-Profilung in Bezug auf einzelne Therapieregime verzichtet. Es bleibt offen, wie sich dieser Umstand auf die Ergebnisse ermittelter miRNAs auswirkt.

Bei der microRNA-Profil-Untersuchung verwendeten wir ein spezielles Panel (Cancer Focus microRNA PCR panel, V4, Exiqon, Vedbaek, Dänemark), welches sich auf die Analyse 84 ausgewählter, in Karzinomen häufig vorkommender microRNAs beschränkt. Somit bleiben in der hiesigen Betrachtung andere, evtl. aussagekräftige microRNAs außen vor. Möglicherweise auch jene, welche bereits durch andere Autoren im Zusammenhang mit Chemoresistenz bzw. –sensitivität von Tumoren des Ösophagus oder Magens beschrieben wurden.

Des Weiteren beschränkt sich diese Arbeit auf den Vergleich der microRNA-Profile ausschließlich erkrankter Patientengruppen in ihrem Ansprechen auf neoadjuvante Therapien. Es wurde in diesem Studiendesign, aufgrund von Mangel an nicht-erkranktem PE-Gewebe der untersuchten Patientenproben, nicht die Grundsignatur nicht-pathologischer Mukosa des ösophagogastralen Überganges ermittelt, so dass kein Vergleich zwischen basal-physiologischen und pathologischen miRNA-Signaturen der einzelnen Patienten erstellt werden konnte. Somit kann zu diesem Zeitpunkt keine Aussage

darüber getätigt werden, auf welchem Niveau die von uns ermittelten und auch andere microRNAs unter physiologischen Bedingungen exprimiert werden.

Unsere Daten weisen zwar auf einen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Expression von hsa-let-7f-5p, hsa-miR-221-3p, hsa-miR-31-5p und hsa-miR-191-5p hin, zeigen jedoch, wie Abbildung 4 (siehe Abschnitt 3.4) darstellt, Überschneidungen hinsichtlich der Betrachtung einzelner Ct-Werte, so dass zu diesem Zeitpunkt die Betrachtung eines einzelnen Ct-Wertes für die Vorhersage, ob es sich bei einem Patienten um einen künftigen Responder oder Non-Responder handeln wird, nicht ausreicht.

Bei der Verwendung von Formalin-fixiertem Paraffin-gebettetem Gewebe (FFPE) darf nicht außer Acht gelassen werden, dass möglicherweise RNA chemisch und mechanisch beschädigt oder gebunden wurde, was wiederum dessen Analyse beeinträchtigt haben könnte. Die Hersteller der verwendeten Kits (RecoverAll® total nucleid isolation kit, Applied Biosystems, USA) evaluierten dieses potentielle Problem und zeigten in einer eigens durchgeführten Studie, dass insbesondere sehr kurze RNA, beispielsweise microRNA, seltener in veränderter oder gebundener Form vorläge und somit sehr gut detektierbar sei. Sie zeigten aber auch, dass aus frischen Gewebeproben, inklusive der Verwendung spezieller RNA-Isolationskits für Frischpräparate, größere RNA-Mengen aus Geweben gewonnen werden können [251]. In der hier präsentierten Studie wurden jedoch ausschließlich FFPEs sowie spezielle RNA-Isolations-Kits für die Verarbeitung von FFPEs verwendet, was einen direkten Vergleich mit miRNA-Expressionsniveaus aus Frischgewebe nicht zulässt.

Während der Literaturrecherche stellte sich heraus, dass es bisher nur wenige Studien gibt, die sich mit der microRNA-Signatur von Adenokarzinomen des ösophagogastralen Übergangs befassen. Dieser Umstand erschwerte die Einordnung der hier präsentierten Ergebnisse, so dass insbesondere auf entsprechende Literatur zu rein ösophagealen und rein gastralen Karzinomen zurückgegriffen wurde, was wiederum die direkte Vergleichbarkeit limitiert.

Ungeachtet der oben genannten Einschränkungen tragen unsere Ergebnisse zu anderen Studien bei, in denen postuliert wird, dass microRNAs ein prätherapeutisches Mittel sein könnten, um das Ansprechen auf eine neoadjuvante Therapie vorherzusagen und besser einzuordnen, ob Patienten von einer neoadjuvanten Therapie profitieren oder ob Sie möglicherweise überhaupt nicht profitieren und daher von Nebenwirkungen einer für Sie unwirksamen Behandlungsstrategie verschont werden könnten. Es bleibt abzuwarten, ob

die von uns ermittelte miRNA-Signatur für Adenokarzinome des ösophagogastralen Übergangs in zukünftigen Studien oder für verschiedene Tumorentitäten reproduziert werden kann.

## 5. Zusammenfassung

Die Inzidenz von Adenokarzinomen des ösophagogastralen Übergangs (AEG) ist in den vergangenen 30 Jahren merklich angestiegen und erfährt somit eine aktuelle Zunahme diagnostischer, therapeutischer und prognostischer Relevanz. Verschiedene, in Leitlinien erfasste, chemotherapeutische Therapieregime werden aktuell neoadjuvant, adjuvant oder auch palliativ angewandt, wobei das individuelle Ansprechen des Tumors von Patient zu Patient differiert. Somit erfährt die Analyse chemoresistenz- bzw. chemosensitivitätsvermittelnder Faktoren zunehmendes Forschungsinteresse. MicroRNAs (miRNA), als Teil molekularer Signalwege bei Krebserkrankungen, konnten in der Vergangenheit in ihrer Funktion sowohl als Onkogen, sog. OncomiR, als auch als Tumorsuppressor bei diversen Neoplasien identifiziert werden.

Ziel der vorliegenden explorativen Arbeit war die Identifizierung von miRNAs, die eine Vorhersage über das Ansprechen (engl. response) auf heute üblicherweise angewandte neoadjuvante Therapien bei AEG tätigen können. Hierfür wurden insgesamt 33 Biopsate und Resektate von Patienten mit Adenokarzinom des ösophagogastralen Überganges, die der Routinediagnostik des Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck entstammen, retrospektiv histologisch und auf molekularer Ebene untersucht. Alle Patienten erhielten nach Diagnosestellung eine neoadjuvante Therapie und anschließende onkochirurgische Resektion. Unter mikroskopischer Begutachtung und Anwendung der von Becker et al. entwickelten Regressionssystematik konnten 12 Fälle als Non-Responder (Regressionsgrad 3) und 21 als Responder (Regressionsgrad 1a und 1b) identifiziert werden. Von den erfassten 33 prä-Neoadjuvanz entnommenen, formalinfixierten und in Paraffin-eingebetteten Biopsaten wurde anschließend RNA isoliert, in cDNA transkribiert und diese anschließend auf ihr miRNA-Expressionsprofil untersucht. Zur Anwendung kam hier das miRCURY LNA<sup>TM</sup> Universal RT miR Ready-to-use PCR, Cancer Focus Panel, V4 der Firma Exiqon unter real-time-PCR durch den LightCycler 480® (Roche, Germany). Das Cancer Focus Panel von Exiqon erfasst 84 der am häufigsten in Zusammenhang mit Neoplasien beschriebenen miRNAs.

In dieser Studie wurden insgesamt vier miRNAs identifiziert, die sich hinsichtlich ihres Expressionsniveaus zwischen Responder- und Non-Responder-Gruppe unterscheiden. Es konnte eine erhöhte Expression von hsa-let-7f-5p, hsa-miR-221-3p und hsa-miR-31-5p in der Gruppe der Non-Responder gefunden werden, während sich in der Responder-Gruppe signifikant höhere hsa-miR-191-5p Level nachweisen ließen. Zudem konnte festgestellt



werden, dass eine erhöhte Expression von hsa-miR-194-5p mit einem verlängerten Überleben korreliert. Die exakten Funktionen und Einbindungen dieser miRNAs in komplexe molekulare Signalwege sind bisher noch nicht abschließend geklärt.

Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass miRNAs eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Chemoresistenz und/oder Chemosensitivität von Adenokarzinomen des ösophagogastralen Überganges spielen könnten. Hinsichtlich der Assoziation hier identifizierter miRNAs zum chemotherapeutischen Ansprechen verschiedener Tumoren, unter anderem Tumoren des oberen Gastrointestinaltraktes, wurden in der Literaturrecherche uneinheitliche Daten gefunden. Möglicherweise zeigt sich hier ein gewebe- und/oder therapieabhängiger Effekt, der weiterer Forschung und Evaluation bedarf. Zudem war die Anzahl verfügbarer AEG-Biopsate und -Resektate für diese Arbeit begrenzt, weshalb die statistischen Ergebnisse zunächst mit Vorsicht interpretiert und in möglicherweise prospektiven Studien mit einer höheren Fallzahl auf ihre Reproduzierbarkeit überprüft werden sollten.

## 6. Anhang

### 6.1. Ergänzende Tabellen und Auflistungen

#### **Auflistung 1: mit Cancer Focus Panel V4 (Exiqon, Denmark) erfasste microRNAs**

cel-miR-39-3p, hsa-let-7a-5p, hsa-let-7b-5p, hsa-let-7c-5p, hsa-let-7d-5p, hsa-let-7e-5p, hsa-let-7f-5p, hsa-let-7g-5p, hsa-let-7i-5p, hsa-miR-1-3p, hsa-miR-100-5p, hsa-miR-101-3p, hsa-miR-103a-3p, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-106b-5p, hsa-miR-107, hsa-miR-10a-5p, hsa-miR-10b-5p, hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-126-3p, hsa-miR-130a-3p, hsa-miR-132-3p, hsa-miR-133a-3p, hsa-miR-141-3p, hsa-miR-143-3p, hsa-miR-145-5p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-148a-3p, hsa-miR-149-3p, hsa-miR-150-5p, hsa-miR-155-5p, hsa-miR-15a-5p, hsa-miR-15b-5p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-181b-5p, hsa-miR-182-5p, hsa-miR-186-5p, hsa-miR-18a-5p, hsa-miR-191-5p, hsa-miR-192-5p, hsa-miR-194-5p, hsa-miR-195-5p, hsa-miR-196a-5p, hsa-miR-19a-3p, hsa-miR-19b-3p, hsa-miR-200a-3p, hsa-miR-200b-3p, hsa-miR-200c-3p, hsa-miR-202-3p, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-206, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-20b-5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-210-3p, hsa-miR-214-3p, hsa-miR-215-5p, hsa-miR-22-3p, hsa-miR-221-3p, hsa-miR-222-3p, hsa-miR-223-3p, hsa-miR-23a-3p, hsa-miR-23b-3p, hsa-miR-24-3p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-26a-5p, hsa-miR-26b-5p, hsa-miR-27a-3p, hsa-miR-27b-3p, hsa-miR-29a-3p, hsa-miR-29b-3p, hsa-miR-29c-3p, hsa-miR-30b-5p, hsa-miR-30c-5p, hsa-miR-30d-5p, hsa-miR-31-5p, hsa-miR-34a-5p, hsa-miR-423-5p, hsa-miR-7-5p, hsa-miR-9-5p, hsa-miR-92b-3p, hsa-miR-93-5p, hsa-miR-99a-5p

**Tabelle 9: normalisierte Ct-Werte (Global mean) aberrant exprimierter miRNAs in der Non-Responder-Gruppe**

Fallnummer	hsa-let-7f-5p	hsa-miR-191-5p	hsa-miR-221-3p	hsa-miR-31-5p
Fall 1	0,347777778	1,457777778	-0,962222222	-1,902222222
Fall 2	0,032222222	1,892222222	0,772222222	-0,957777778
Fall 3	0,766507937	1,246507937	2,326507937	1,396507937
Fall 4	1,433174603	1,013174603	-1,256825397	-0,976825397
Fall 5	0,536507937	1,146507937	0,146507937	-0,173492063
Fall 6	0,164603175	0,464603175	0,554603175	-0,105396825
Fall 7	0,763809524	1,303809524	0,743809524	-1,706190476
Fall 8	2,958095238	0,638095238	-0,491904762	0,428095238
Fall 9	2,328730159	0,258730159	0,468730159	0,928730159
Fall 10	1,213650794	0,743650794	1,403650794	0,693650794
Fall 11	1,432857143	0,932857143	0,022857143	-0,147142857
Fall 12	1,317936508	0,767936508	-0,042063492	-0,322063492

**Tabelle 10: normalisierte Ct-Werte (Global mean) aberrant exprimierter miRNAs in der Responder-Gruppe**

Fallnummer	hsa-let-7f-5p	hsa-miR-191-5p	hsa-miR-221-3p	hsa-miR-31-5p
Fall 13	3,499206349	0,409206349	-0,570793651	-0,120793651
Fall 14	1,87984127	0,31984127	0,97984127	3,22984127
Fall 15	0,663492063	0,383492063	0,293492063	-0,136507937
Fall 16	1,716666667	0,636666667	2,696666667	-0,453333333
Fall 17	1,957460317	1,147460317	-0,222539683	0,167460317
Fall 18	1,22984127	0,72984127	1,64984127	0,81984127
Fall 19	-0,184761905	0,895238095	2,585238095	-0,444761905
Fall 20	1,627936508	-0,512063492	1,207936508	2,247936508
Fall 21	1,757936508	0,047936508	0,817936508	2,027936508
Fall 22	1,328571429	0,708571429	0,708571429	0,898571429
Fall 23	1,072063492	1,032063492	0,982063492	0,022063492
Fall 24	1,869047619	0,869047619	0,469047619	0,669047619
Fall 25	1,843015873	0,023015873	0,853015873	2,023015873
Fall 26	2,058412698	0,408412698	1,668412698	0,878412698
Fall 27	1,223333333	0,353333333	1,853333333	4,203333333
Fall 28	1,802222222	0,892222222	1,612222222	1,362222222
Fall 29	1,442222222	0,552222222	1,242222222	-0,527777778
Fall 30	2,725555556	0,835555556	2,155555556	1,595555556
Fall 31	2,89015873	0,29015873	-0,40984127	-0,45984127
Fall 32	1,882698413	0,942698413	-0,217301587	0,712698413
Fall 33	1,823650794	0,703650794	1,043650794	-0,226349206

## 6.2. Materialien

**Tabelle 11: Kits**

Name	Hersteller
miRCURY LNA™ Universal cDNA Synthesis Kit II	Exiqon
miRCURY LNA™ ExiLENT SYBR® Green master mix	Exiqon
miRCURY LNA™ Universal RT miR Ready-to-use PCR, Cancer Focus Panel V4	Exiqon
miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR, RNA Spike-in kit	Exiqon
Recover All™ Total Nucleid Acid Isolation Kit für FFPE	Ambion, Thermo Fisher Scientific

**Tabelle 12: nicht in Kits enthaltene Reagenzien**

Reagenz	Hersteller
Aqua dest.	Merck
Eosin	Waldeck
Ethanol	Merck
Hämatoxylin	Waldeck
nukleasefreies Wasser	Ambion, Thermo Fisher Scientific
Paraffin	Medite
RNase Oberflächendekontaminationsmittel	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific
Xylol 100%	J.T. Baker, Büfa Chemikalien

**Tabelle 13: Geräte**

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Abzüge	Captair
Brutschrank	Memmert
Computer	HP, ASUS
Gefrierschränke	Bosch, Liebherr
Einkanalpipetten	Eppendorf
FFPE-Stanzer von Tissue-Tek®	Sakura Finetek
Kühl-/Heiz-Blockthermostat für Reaktionsgefäße	Eppendorf
Kühlschränke	Bosch, Liebherr
Mehrkanalpipette	Eppendorf
Mikroskop- Axioskop	Zeiss
Multifärber	Leica
Objektträger	Leica
Paraffin-Ausgießstation	Medite
qPCR-System LightCycler®	Roche Life Science
Rotationsmikrotom	Leica DSC1
Spektralphotometer	Nanodrop Technologies by Thermo Fisher Scientific
Thermocycler	Biometra
Vortexer	Heidolph
Wasserbäder (verschiedene)	Biosystems Switzerland AG, GFL
Zentrifugen	Heraeus, Eppendorf

**Tabelle 14: Verbrauchsmaterialien**

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
Deckgläschen	Leica
Einbettkassetten	CarlRoth
Klebefolie	Roche Diagnostics
Latexhandschuhe	Hartmann
PCR-Tubes	Sarstedt
Safe-Lock Tubes (verschiedene Größen)	Eppendorf
Pipettenspitzen (verschiedene Größen, mit und ohne Filter)	Sarstedt

**Tabelle 15: Software**

<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>
Excel	Microsoft Office, Version 2007
GenEx Version 6.1 (Trial Version)	MultiD Analyses AB
LightCycler Software release 1.5.0	Roche
Nanodrop ND-1000	Thermo Fisher Scientific
SPSS Statistics Version 22	IBM
Word	Microsoft Office, Version 2007

**Tabelle 16: In silico Ressourcen**

<b>Programm</b>	<b>URL</b>
Exiqon	<a href="http://www.exiqon.com/">http://www.exiqon.com/</a>
miRbase	<a href="http://www.mirbase.org/">http://www.mirbase.org/</a>
PubMed	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/</a>

## 7. Literaturverzeichnis

1. Adams BD, Claffey KP, White BA (2009) Argonaute-2 expression is regulated by epidermal growth factor receptor and mitogen-activated protein kinase signaling and correlates with a transformed phenotype in breast cancer cells. *Endocrinology* 150:14–23. doi: 10.1210/en.2008-0984
2. Agirre X, Vilas-Zornoza A, Jiménez-Velasco A, Martín-Subero JI, Cordeu L, Gárate L, San José-Eneriz E, Abizanda G, Rodríguez-Otero P, Fortes P, Rifón J, Bandrés E, Calasanz MJ, Martín V, Heiniger A, Torres A, Siebert R, Román-Gomez J, Prósper F (2009) Epigenetic silencing of the tumor suppressor microRNA Hsa-miR-124a regulates CDK6 expression and confers a poor prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res* 69:4443–4453. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-4025
3. Ajani JA, Winter K, Okawara GS, Donohue JH, Pisters PWT, Crane CH, Greskovich JF, Anne PR, Bradley JD, Willett C, Rich TA (2006) Phase II trial of preoperative chemoradiation in patients with localized gastric adenocarcinoma (RTOG 9904): quality of combined modality therapy and pathologic response. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 24:3953–3958. doi: 10.1200/JCO.2006.06.4840
4. Alevizos I, Illei GG (2010) MicroRNAs as biomarkers in rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol* 6:391–398. doi: 10.1038/nrrheum.2010.81
5. Allgayer H, Babic R, Gruetzner KU, Tarabichi A, Schildberg FW, Heiss MM (2000) c-erbB-2 is of independent prognostic relevance in gastric cancer and is associated with the expression of tumor-associated protease systems. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 18:2201–2209. doi: 10.1200/JCO.2000.18.11.2201
6. Almeida MI, Nicoloso MS, Zeng L, Ivan C, Spizzo R, Gafà R, Xiao L, Zhang X, Vannini I, Fanini F, Fabbri M, Lanza G, Reis RM, Zweidler-McKay PA, Calin GA (2012) Strand-specific miR-28-5p and miR-28-3p have distinct effects in colorectal cancer cells. *Gastroenterology* 142:886-896.e9. doi: 10.1053/j.gastro.2011.12.047
7. Altuvia Y, Landgraf P, Lithwick G, Elefant N, Pfeffer S, Aravin A, Brownstein MJ, Tuschl T, Margalit H (2005) Clustering and conservation patterns of human microRNAs. *Nucleic Acids Res* 33:2697–2706. doi: 10.1093/nar/gki567
8. Ambros V, Bartel B, Bartel DP, Burge CB, Carrington JC, Chen X, Dreyfuss G, Eddy SR, Griffiths-Jones S, Marshall M, Matzke M, Ruvkun G, Tuschl T (2003) A uniform system for microRNA annotation. *RNA* 9:277–279. doi: 10.1261/rna.2183803
9. Avidan B, Sonnenberg A, Schnell TG, Chejfec G, Metz A, Sontag SJ (2002) Hiatal hernia size, Barrett’s length, and severity of acid reflux are all risk factors for esophageal adenocarcinoma. *Am J Gastroenterol* 97:1930–1936. doi: 10.1111/j.1572-0241.2002.05902.x
10. Bahmanyar S, Ye W (2006) Dietary patterns and risk of squamous-cell carcinoma and adenocarcinoma of the esophagus and adenocarcinoma of the gastric cardia: a population-based case-control study in Sweden. *Nutr Cancer* 54:171–178. doi: 10.1207/s15327914nc5402\_3
11. Bang Y-J, Van Cutsem E, Feyereislova A, Chung HC, Shen L, Sawaki A, Lordick F, Ohtsu A, Omuro Y, Satoh T, Aprile G, Kulikov E, Hill J, Lehle M, Rüschoff J, Kang Y-K, ToGA Trial Investigators (2010) Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet Lond Engl* 376:687–697. doi: 10.1016/S0140-6736(10)61121-X

12. Bao J, Zou J-H, Li C-Y, Zheng G-Q (2016) miR-194 inhibits gastric cancer cell proliferation and tumorigenesis by targeting KDM5B. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 20:4487–4493
13. Baskerville S, Bartel DP (2005) Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. *RNA N Y N* 11:241–247. doi: 10.1261/rna.7240905
14. Becker K, Mueller JD, Schulmacher C, Ott K, Fink U, Busch R, Böttcher K, Siewert JR, Höfler H (2003) Histomorphology and grading of regression in gastric carcinoma treated with neoadjuvant chemotherapy. *Cancer* 98:1521–1530. doi: 10.1002/cncr.11660
15. Begicevic R-R, Falasca M (2017) ABC Transporters in Cancer Stem Cells: Beyond Chemoresistance. *Int J Mol Sci* 18. doi: 10.3390/ijms18112362
16. Beilharz TH, Humphreys DT, Clancy JL, Thermann R, Martin DIK, Hentze MW, Preiss T (2009) microRNA-mediated messenger RNA deadenylation contributes to translational repression in mammalian cells. *PLoS One* 4:e6783. doi: 10.1371/journal.pone.0006783
17. Berezikov E, Chung W-J, Willis J, Cuppen E, Lai EC (2007) Mammalian mirtron genes. *Mol Cell* 28:328–336. doi: 10.1016/j.molcel.2007.09.028
18. Berindan-Neagoe I, Calin GA (2014) Molecular pathways: microRNAs, cancer cells, and microenvironment. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 20:6247–6253. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-2500
19. van Blankenstein M, Looman CWN, Siersema PD, Kuipers EJ, Coebergh JWW (2007) Trends in the incidence of adenocarcinoma of the oesophagus and cardia in the Netherlands 1989–2003. *Br J Cancer* 96:1767–1771. doi: 10.1038/sj.bjc.6603798
20. Bollschweiler E, Wolfgarten E, Gutschow C, Hölscher AH (2001) Demographic variations in the rising incidence of esophageal adenocarcinoma in white males. *Cancer* 92:549–555
21. Borchert GM, Lanier W, Davidson BL (2006) RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol* 13:1097–1101. doi: 10.1038/nsmb1167
22. Bousquet M, Quelen C, Rosati R, Mansat-De Mas V, La Starza R, Bastard C, Lippert E, Talmant P, Lafage-Pochitaloff M, Leroux D, Gervais C, Viguié F, Lai J-L, Terre C, Beverlo B, Sambani C, Hagemeijer A, Marynen P, Delsol G, Dastugue N, Mecucci C, Brousset P (2008) Myeloid cell differentiation arrest by miR-125b-1 in myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia with the t(2;11)(p21;q23) translocation. *J Exp Med* 205:2499–2506. doi: 10.1084/jem.20080285
23. Bozzetti F, Marubini E, Bonfanti G, Miceli R, Piano C, Crose N, Gennari L (1997) Total versus subtotal gastrectomy: surgical morbidity and mortality rates in a multicenter Italian randomized trial. The Italian Gastrointestinal Tumor Study Group. *Ann Surg* 226:613–620
24. Butera G, Pacchiana R, Donadelli M (2018) Autocrine mechanisms of cancer chemoresistance. *Semin Cell Dev Biol* 78:3–12. doi: 10.1016/j.semcdb.2017.07.019
25. Butz H, Rácz K, Hunyady L, Patócs A (2012) Crosstalk between TGF- $\beta$  signaling and the microRNA machinery. *Trends Pharmacol Sci* 33:382–393. doi: 10.1016/j.tips.2012.04.003
26. Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR (2004) Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA N Y N* 10:1957–1966. doi: 10.1261/rna.7135204



27. Chan DSY, Campbell F, Edwards P, Jasani B, Williams GT, Lewis WG (2012) Relative Prognostic Value of Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) Expression in Operable Oesophagogastric Cancer. *ISRN Surg* 2012:804891. doi: 10.5402/2012/804891
28. Chao L-M, Sun W, Chen H, Liu B-Y, Li P-F, Zhao D-W (2018) MicroRNA-31 inhibits osteosarcoma cell proliferation, migration and invasion by targeting PIK3C2A. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 22:7205–7213. doi: 10.26355/eurrev\_201811\_16254
29. Chen C-Z, Li L, Lodish HF, Bartel DP (2004) MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* 303:83–86. doi: 10.1126/science.1091903
30. Chen D, Yan W, Liu Z, Zhang Z, Zhu L, Liu W, Ding X, Wang A, Chen Y (2016) Downregulation of miR-221 enhances the sensitivity of human oral squamous cell carcinoma cells to Adriamycin through upregulation of TIMP3 expression. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother* 77:72–78. doi: 10.1016/j.biopha.2015.12.002
31. Chen W-S, Leung C-M, Pan H-W, Hu L-Y, Li S-C, Ho M-R, Tsai K-W (2012) Silencing of miR-1-1 and miR-133a-2 cluster expression by DNA hypermethylation in colorectal cancer. *Oncol Rep* 28:1069–1076. doi: 10.3892/or.2012.1899
32. Chen X, Wang Y, Zang W, Du Y, Li M, Zhao G (2015) miR-194 targets RBX1 gene to modulate proliferation and migration of gastric cancer cells. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med* 36:2393–2401. doi: 10.1007/s13277-014-2849-1
33. Chen Z, Liu S, Xia Y, Wu K (2016) MiR-31 Regulates Rho-Associated Kinase-Myosin Light Chain (ROCK-MLC) Pathway and Inhibits Gastric Cancer Invasion: Roles of RhoA. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res* 22:4679–4691
34. Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, Nishikura K, Shiekhattar R (2005) TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* 436:740–744. doi: 10.1038/nature03868
35. Chow WH, Blaser MJ, Blot WJ, Gammon MD, Vaughan TL, Risch HA, Perez-Perez GI, Schoenberg JB, Stanford JL, Rotterdam H, West AB, Fraumeni JF (1998) An inverse relation between cagA+ strains of *Helicobacter pylori* infection and risk of esophageal and gastric cardia adenocarcinoma. *Cancer Res* 58:588–590
36. Chow WH, Blot WJ, Vaughan TL, Risch HA, Gammon MD, Stanford JL, Dubrow R, Schoenberg JB, Mayne ST, Farrow DC, Ahsan H, West AB, Rotterdam H, Niwa S, Fraumeni JF (1998) Body mass index and risk of adenocarcinomas of the esophagus and gastric cardia. *J Natl Cancer Inst* 90:150–155
37. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, Wojcik SE, Aqeilan RI, Zupo S, Dono M, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu C-G, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM (2005) miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:13944–13949. doi: 10.1073/pnas.0506654102
38. Colamaio M, Borbone E, Russo L, Bianco M, Federico A, Califano D, Chiappetta G, Pallante P, Troncione G, Battista S, Fusco A (2011) miR-191 down-regulation plays a role in thyroid follicular tumors through CDK6 targeting. *J Clin Endocrinol Metab* 96:E1915-1924. doi: 10.1210/jc.2011-0408
39. Cui G, Liu D, Li W, Li Y, Liang Y, Shi W, Zhao S (2017) Original Research: miR-194 inhibits proliferation and invasion and promotes apoptosis by targeting KDM5B in esophageal squamous cell carcinoma cells. *Exp Biol Med Maywood NJ* 242:45–52. doi: 10.1177/1535370216662712

40. Cummins JM, He Y, Leary RJ, Pagliarini R, Diaz LA, Sjoblom T, Barad O, Bentwich Z, Szafranska AE, Labourier E, Raymond CK, Roberts BS, Juhl H, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE (2006) The colorectal microRNAome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:3687–3692. doi: 10.1073/pnas.0511155103
41. Dahiya N, Sherman-Baust CA, Wang T-L, Davidson B, Shih I-M, Zhang Y, Wood W, Becker KG, Morin PJ (2008) MicroRNA expression and identification of putative miRNA targets in ovarian cancer. *PLoS One* 3:e2436. doi: 10.1371/journal.pone.0002436
42. Davis BN, Hata A (2009) Regulation of MicroRNA Biogenesis: A miRiad of mechanisms. *Cell Commun Signal CCS* 7:18. doi: 10.1186/1478-811X-7-18
43. Deng H, Zhang J, Shi J, Guo Z, He C, Ding L, Tang JH, Hou Y (2016) Role of long non-coding RNA in tumor drug resistance. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med* 37:11623–11631. doi: 10.1007/s13277-016-5125-8
44. Devesa SS, Blot WJ, Fraumeni JF (1998) Changing patterns in the incidence of esophageal and gastric carcinoma in the United States. *Cancer* 83:2049–2053
45. D’haene B, Mestdagh P, Hellemans J, Vandesompele J (2012) miRNA expression profiling: from reference genes to global mean normalization. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 822:261–272. doi: 10.1007/978-1-61779-427-8\_18
46. Di Leva G, Piovan C, Gasparini P, Ngankeu A, Taccioli C, Briskin D, Cheung DG, Bolon B, Anderlucci L, Alder H, Nuovo G, Li M, Iorio MV, Galasso M, Santhanam R, Ramasamy S, Marcucci G, Perrotti D, Powell KA, Bratasz A, Garofalo M, Nephew KP, Croce CM (2013) Estrogen mediated-activation of miR-191/425 cluster modulates tumorigenicity of breast cancer cells depending on estrogen receptor status. *PLoS Genet* 9:e1003311. doi: 10.1371/journal.pgen.1003311
47. Diederichs S, Haber DA (2007) Dual role for argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression. *Cell* 131:1097–1108. doi: 10.1016/j.cell.2007.10.032
48. Du J, Wang L, Li C, Yang H, Li Y, Hu H, Li H, Zhang Z (2016) MicroRNA-221 targets PTEN to reduce the sensitivity of cervical cancer cells to gefitinib through the PI3K/Akt signaling pathway. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med* 37:3939–3947. doi: 10.1007/s13277-015-4247-8
49. Du L, Ma S, Wen X, Chai J, Zhou D (2017) Oral squamous cell carcinoma cells are resistant to doxorubicin through upregulation of miR-221. *Mol Med Rep* 16:2659–2667. doi: 10.3892/mmr.2017.6915
50. Edgren G, Adami H-O, Weiderpass E, Nyrén O (2013) A global assessment of the oesophageal adenocarcinoma epidemic. *Gut* 62:1406–1414. doi: 10.1136/gutjnl-2012-302412
51. Eiring AM, Harb JG, Neviani P, Garton C, Oaks JJ, Spizzo R, Liu S, Schwind S, Santhanam R, Hickey CJ, Becker H, Chandler JC, Andino R, Cortes J, Hokland P, Huettner CS, Bhatia R, Roy DC, Liebhaber SA, Caligiuri MA, Marcucci G, Garzon R, Croce CM, Calin GA, Perrotti D (2010) miR-328 functions as an RNA decoy to modulate hnRNP E2 regulation of mRNA translation in leukemic blasts. *Cell* 140:652–665. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.007
52. Elyakim E, Sitbon E, Faerman A, Tabak S, Montia E, Belanis L, Dov A, Marcusson EG, Bennett CF, Chajut A, Cohen D, Yerushalmi N (2010) hsa-miR-191 is a candidate oncogene

- target for hepatocellular carcinoma therapy. *Cancer Res* 70:8077–8087. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1313
53. Fardin P, Moretti S, Biasotti B, Ricciardi A, Bonassi S, Varesio L (2007) Normalization of low-density microarray using external spike-in controls: analysis of macrophage cell lines expression profile. *BMC Genomics* 8:17. doi: 10.1186/1471-2164-8-17
  54. Feith M, Stein HJ, Siewert JR (2003) Pattern of lymphatic spread of Barrett's cancer. *World J Surg* 27:1052–1057. doi: 10.1007/s00268-003-7060-2
  55. Feng Y, Zhang X, Graves P, Zeng Y (2012) A comprehensive analysis of precursor microRNA cleavage by human Dicer. *RNA N Y N* 18:2083–2092. doi: 10.1261/rna.033688.112
  56. Fornari F, Gramantieri L, Ferracin M, Veronese A, Sabbioni S, Calin GA, Grazi GL, Giovannini C, Croce CM, Bolondi L, Negrini M (2008) MiR-221 controls CDKN1C/p57 and CDKN1B/p27 expression in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 27:5651–5661. doi: 10.1038/onc.2008.178
  57. Freedman ND, Murray LJ, Kamangar F, Abnet CC, Cook MB, Nyrén O, Ye W, Wu AH, Bernstein L, Brown LM, Ward MH, Pandeya N, Green AC, Casson AG, Giffen C, Risch HA, Gammon MD, Chow W-H, Vaughan TL, Corley DA, Whitman DC (2011) Alcohol intake and risk of oesophageal adenocarcinoma: a pooled analysis from the BEACON Consortium. *Gut* 60:1029–1037. doi: 10.1136/gut.2010.233866
  58. Gao X, Xie Z, Wang Z, Cheng K, Liang K, Song Z (2017) Overexpression of miR-191 Predicts Poor Prognosis and Promotes Proliferation and Invasion in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Yonsei Med J* 58:1101–1110. doi: 10.3349/ymj.2017.58.6.1101
  59. Gao Y, Yi J, Zhang K, Bai F, Feng B, Wang R, Chu X, Chen L, Song H (2017) Downregulation of MiR-31 stimulates expression of LATS2 via the hippo pathway and promotes epithelial-mesenchymal transition in esophageal squamous cell carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res CR* 36:161. doi: 10.1186/s13046-017-0622-1
  60. Ghorai A, Ghosh U (2014) miRNA gene counts in chromosomes vary widely in a species and biogenesis of miRNA largely depends on transcription or post-transcriptional processing of coding genes. *Front Genet* 5. doi: 10.3389/fgene.2014.00100
  61. Goldblum JR, Richter JE, Vaezi M, Falk GW, Rice TW, Peek RM (2002) Helicobacter pylori infection, not gastroesophageal reflux, is the major cause of inflammation and intestinal metaplasia of gastric cardiac mucosa. *Am J Gastroenterol* 97:302–311. doi: 10.1111/j.1572-0241.2002.05462.x
  62. Guo B, Hui Q, Zhang Y, Chang P, Tao K (2016) miR-194 is a negative regulator of GEF-H1 pathway in melanoma. *Oncol Rep* 36:2412–2420. doi: 10.3892/or.2016.5020
  63. Guo Z, Liu Z, Yue H, Wang J (2018) Beta-elemene increases chemosensitivity to 5-fluorouracil through down-regulating microRNA-191 expression in colorectal carcinoma cells. *J Cell Biochem* 119:7032–7039. doi: 10.1002/jcb.26914
  64. Hamano R, Miyata H, Yamasaki M, Kurokawa Y, Hara J, Moon J ho, Nakajima K, Takiguchi S, Fujiwara Y, Mori M, Doki Y (2011) Overexpression of miR-200c Induces Chemoresistance in Esophageal Cancers Mediated Through Activation of the Akt Signaling Pathway. *Clin Cancer Res* 17:3029–3038. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2532

65. Han J, Lee Y, Yeom K-H, Kim Y-K, Jin H, Kim VN (2004) The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev* 18:3016–3027. doi: 10.1101/gad.1262504
66. Hasegawa S, Yoshikawa T, Cho H, Tsuburaya A, Kobayashi O (2009) Is adenocarcinoma of the esophagogastric junction different between Japan and western countries? The incidence and clinicopathological features at a Japanese high-volume cancer center. *World J Surg* 33:95–103. doi: 10.1007/s00268-008-9740-4
67. Hassan MK, Watari H, Mitamura T, Mohamed Z, El-Khamisy SF, Ohba Y, Sakuragi N (2015) P18/Stathmin1 is regulated by miR-31 in ovarian cancer in response to taxane. *Oncoscience* 2:294–308. doi: 10.18632/oncoscience.143
68. He L, He X, Lim LP, de Stanchina E, Xuan Z, Liang Y, Xue W, Zender L, Magnus J, Ridzon D, Jackson AL, Linsley PS, Chen C, Lowe SW, Cleary MA, Hannon GJ (2007) A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature* 447:1130–1134. doi: 10.1038/nature05939
69. He Y, Cui Y, Wang W, Gu J, Guo S, Ma K, Luo X (2011) Hypomethylation of the hsa-miR-191 locus causes high expression of hsa-mir-191 and promotes the epithelial-to-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Neoplasia N Y N* 13:841–853
70. Hechtman JF, Polydorides AD (2012) HER2/neu gene amplification and protein overexpression in gastric and gastroesophageal junction adenocarcinoma: a review of histopathology, diagnostic testing, and clinical implications. *Arch Pathol Lab Med* 136:691–697. doi: 10.5858/arpa.2011-0168-RS
71. Hermanek P (1995) pTNM and residual tumor classifications: problems of assessment and prognostic significance. *World J Surg* 19:184–190
72. Hilly O, Pillar N, Stern S, Strenov Y, Bachar G, Shomron N, Shpitzer T (2016) Distinctive pattern of let-7 family microRNAs in aggressive carcinoma of the oral tongue in young patients. *Oncol Lett* 12:1729–1736. doi: 10.3892/ol.2016.4892
73. Hölscher AH, Bollschweiler E, Siewert JR (1995) Carcinoma of the gastric cardia. *Ann Chir Gynaecol* 84:185–192
74. Hölscher AH, Schröder W, Bollschweiler E, Beckurts KTE, Schneider PM (2003) [How safe is high intrathoracic esophagogastronomy?]. *Chir Z Alle Geb Oper Medizen* 74:726–733. doi: 10.1007/s00104-003-0649-z
75. Houbaviy HB, Murray MF, Sharp PA (2003) Embryonic stem cell-specific MicroRNAs. *Dev Cell* 5:351–358
76. Huang D, Bi C, Zhao Q, Ding X, Bian C, Wang H, Wang T, Liu H (2018) Knockdown long non-coding RNA ANRIL inhibits proliferation, migration and invasion of HepG2 cells by down-regulation of miR-191. *BMC Cancer* 18:919. doi: 10.1186/s12885-018-4831-6
77. Huang L, Xu A-M, Peng Q (2015) CD147 and MMP-9 expressions in type II/III adenocarcinoma of esophagogastric junction and their clinicopathological significances. *Int J Clin Exp Pathol* 8:1929–1937
78. Hummel R, Sie C, Watson DI, Wang T, Ansar A, Michael MZ, Van der Hoek M, Haier J, Hussey DJ (2014) MicroRNA signatures in chemotherapy resistant esophageal cancer cell lines. *World J Gastroenterol WJG* 20:14904–14912. doi: 10.3748/wjg.v20.i40.14904

79. Hummel R, Watson DI, Smith C, Kist J, Michael MZ, Haier J, Hussey DJ (2011) Mir-148a Improves Response to Chemotherapy in Sensitive and Resistant Oesophageal Adenocarcinoma and Squamous Cell Carcinoma Cells. *J Gastrointest Surg* 15:429–438. doi: 10.1007/s11605-011-1418-9
80. Hutvágner G, Zamore PD (2002) A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* 297:2056–2060. doi: 10.1126/science.1073827
81. Ishikawa S, Togashi A, Inoue M, Honda S, Nozawa F, Toyama E, Miyanari N, Tabira Y, Baba H (2007) Indications for EMR/ESD in cases of early gastric cancer: relationship between histological type, depth of wall invasion, and lymph node metastasis. *Gastric Cancer Off J Int Gastric Cancer Assoc Jpn Gastric Cancer Assoc* 10:35–38. doi: 10.1007/s10120-006-0407-2
82. Jin Y-Y, Chen Q-J, Xu K, Ren H-T, Bao X, Ma Y-N, Wei Y, Ma HB (2016) Involvement of microRNA-141-3p in 5-fluorouracil and oxaliplatin chemo-resistance in esophageal cancer cells via regulation of PTEN. *Mol Cell Biochem* 422:161–170. doi: 10.1007/s11010-016-2816-9
83. Jingjing L, Wangyue W, Qiaoqiao X, Jietong Y (2016) MiR-218 increases sensitivity to cisplatin in esophageal cancer cells via targeting survivin expression. *Open Med* 11:31–35. doi: 10.1515/med-2016-0007
84. Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, Labourier E, Reinert KL, Brown D, Slack FJ (2005) RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* 120:635–647. doi: 10.1016/j.cell.2005.01.014
85. Junginger T, Hermanek P, Klimpfinger M (2013) Klassifikation maligner Tumoren des Gastrointestinaltrakts I. Springer-Verlag
86. Kabat GC, Ng SK, Wynder EL (1993) Tobacco, alcohol intake, and diet in relation to adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia. *Cancer Causes Control CCC* 4:123–132
87. Kang P-C, Leng K-M, Liu Y-P, Liu Y, Xu Y, Qin W, Gao J-J, Wang Z-D, Tai S, Zhong X-Y, Cui Y-F (2018) miR-191 Inhibition Induces Apoptosis Through Reactivating Secreted Frizzled-Related Protein-1 in Cholangiocarcinoma. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol* 49:1933–1942. doi: 10.1159/000493654
88. Katai H, Ishida M, Yamashita H, Ohashi M, Morita S, Katayama H, Fukagawa T, Kushima R (2014) HER2 expression in carcinomas of the true cardia (Siewert type II esophagogastric junction carcinoma). *World J Surg* 38:426–430. doi: 10.1007/s00268-013-2256-6
89. Kawahara Y, Zinshteyn B, Chendrimada TP, Shiekhattar R, Nishikura K (2007) RNA editing of the microRNA-151 precursor blocks cleavage by the Dicer-TRBP complex. *EMBO Rep* 8:763–769. doi: 10.1038/sj.embor.7401011
90. Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD (2003) Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 115:209–216
91. Kim J, Inoue K, Ishii J, Vanti WB, Voronov SV, Murchison E, Hannon G, Abieliovich A (2007) A MicroRNA feedback circuit in midbrain dopamine neurons. *Science* 317:1220–1224. doi: 10.1126/science.1140481
92. Koch-Institut R (2017) Krebs in Deutschland für 2013/2014. 154

93. Komatsu S, Ichikawa D, Kawaguchi T, Takeshita H, Miyamae M, Ohashi T, Okajima W, Imamura T, Kiuchi J, Arita T, Konishi H, Shiozaki A, Fujiwara H, Okamoto K, Otsuji E (2016) Plasma microRNA profiles: identification of miR-23a as a novel biomarker for chemoresistance in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 7:62034–62048. doi: 10.18632/oncotarget.11500
94. Kong Q, Chen X-S, Tian T, Xia X-Y, Xu P (2017) MicroRNA-194 suppresses prostate cancer migration and invasion by downregulating human nuclear distribution protein. *Oncol Rep* 37:803–812. doi: 10.3892/or.2016.5305
95. Krützfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M, Stoffel M (2005) Silencing of microRNAs in vivo with “antagomirs.” *Nature* 438:685–689. doi: 10.1038/nature04303
96. Kuehbach A, Urbich C, Zeiher AM, Dimmeler S (2007) Role of Dicer and Drosha for endothelial microRNA expression and angiogenesis. *Circ Res* 101:59–68. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.107.153916
97. Kumar MS, Erkeland SJ, Pester RE, Chen CY, Ebert MS, Sharp PA, Jacks T (2008) Suppression of non-small cell lung tumor development by the let-7 microRNA family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:3903–3908. doi: 10.1073/pnas.0712321105
98. Laerum OD, Ovrebo K, Skarstein A, Christensen IJ, Alpizar-Alpizar W, Helgeland L, Danø K, Nielsen BS, Illemann M (2012) Prognosis in adenocarcinomas of lower oesophagus, gastro-oesophageal junction and cardia evaluated by uPAR-immunohistochemistry. *Int J Cancer* 131:558–569. doi: 10.1002/ijc.26382
99. Lagergren J, Bergström R, Lindgren A, Nyrén O (2000) The role of tobacco, snuff and alcohol use in the aetiology of cancer of the oesophagus and gastric cardia. *Int J Cancer* 85:340–346
100. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T (2001) Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 294:853–858. doi: 10.1126/science.1064921
101. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T (2002) Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol CB* 12:735–739
102. Lee EJ, Gusev Y, Jiang J, Nuovo GJ, Lerner MR, Frankel WL, Morgan DL, Postier RG, Brackett DJ, Schmittgen TD (2007) Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer. *Int J Cancer* 120:1046–1054. doi: 10.1002/ijc.22394
103. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75:843–854
104. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Rådmark O, Kim S, Kim VN (2003) The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425:415–419. doi: 10.1038/nature01957
105. Lee Y, Hur I, Park S-Y, Kim Y-K, Suh MR, Kim VN (2006) The role of PACT in the RNA silencing pathway. *EMBO J* 25:522–532. doi: 10.1038/sj.emboj.7600942
106. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom K-H, Lee S, Baek SH, Kim VN (2004) MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 23:4051–4060. doi: 10.1038/sj.emboj.7600385

107. Levine MS, Chu P, Furth EE, Rubesin SE, Laufer I, Herlinger H (1997) Carcinoma of the esophagus and esophagogastric junction: sensitivity of radiographic diagnosis. *AJR Am J Roentgenol* 168:1423–1426. doi: 10.2214/ajr.168.6.9168701
108. Li J, Wan Y, Guo Q, Zou L, Zhang J, Fang Y, Zhang J, Zhang J, Fu X, Liu H, Lu L, Wu Y (2010) Altered microRNA expression profile with miR-146a upregulation in CD4+ T cells from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 12:R81. doi: 10.1186/ar3006
109. Li M, Chen W, Zhang H, Zhang Y, Ke F, Wu X, Zhang Y, Weng M, Liu Y, Gong W (2016) MiR-31 regulates the cisplatin resistance by targeting Src in gallbladder cancer. *Oncotarget* 7:83060–83070. doi: 10.18632/oncotarget.13067
110. Li P, Yang Y, Liu H, Yang A-K, Di J-M, Tan G-M, Wang H-F, Qiu J-G, Zhang W-J, Jiang Q-W, Zheng D-W, Chen Y, Wei M-N, Huang J-R, Wang K, Shi Z, Ye J (2017) MiR-194 functions as a tumor suppressor in laryngeal squamous cell carcinoma by targeting Wee1. *J Hematol Oncol J Hematol Oncol* 10:32. doi: 10.1186/s13045-017-0402-6
111. Li X, Zhang Y, Zhang Y, Ding J, Wu K, Fan D (2010) Survival prediction of gastric cancer by a seven-microRNA signature. *Gut* 59:579–585. doi: 10.1136/gut.2008.175497
112. Li Z, Zou X, Xie L, Dong H, Chen Y, Liu Q, Wu X, Zhou D, Tan D, Zhang H (2013) Prognostic importance and therapeutic implications of PAK1, a drugable protein kinase, in gastroesophageal junction adenocarcinoma. *PloS One* 8:e80665. doi: 10.1371/journal.pone.0080665
113. Liang S, He L, Zhao X, Miao Y, Gu Y, Guo C, Xue Z, Dou W, Hu F, Wu K, Nie Y, Fan D (2011) MicroRNA let-7f inhibits tumor invasion and metastasis by targeting MYH9 in human gastric cancer. *PloS One* 6:e18409. doi: 10.1371/journal.pone.0018409
114. Lim LP, Lau NC, Weinstein EG, Abdelhakim A, Yekta S, Rhoades MW, Burge CB, Bartel DP (2003) The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev* 17:991–1008. doi: 10.1101/gad.1074403
115. Lin W-C, Chen L-H, Hsieh Y-C, Yang P-W, Lai L-C, Chuang EY, Lee J-M, Tsai M-H miR-338-5p inhibits cell proliferation, colony formation, migration, and cisplatin resistance in esophageal squamous cancer cells by targeting FERMT2. *Carcinogenesis*. doi: 10.1093/carcin/bgy189
116. Liu J, Valencia-Sanchez MA, Hannon GJ, Parker R (2005) MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat Cell Biol* 7:719–723. doi: 10.1038/ncb1274
117. Liu K, Li G, Fan C, Diao Y, Wu B, Li J (2012) Increased Expression of MicroRNA-221 in gastric cancer and its clinical significance. *J Int Med Res* 40:467–474. doi: 10.1177/147323001204000208
118. Liu W, Dong Z, Liang J, Guo X, Guo Y, Shen S, Kuang G, Guo W (2016) Downregulation of Potential Tumor Suppressor miR-203a by Promoter Methylation Contributes to the Invasiveness of Gastric Cardia Adenocarcinoma. *Cancer Invest* 34:506–516. doi: 10.1080/07357907.2016.1242010
119. Liu Y, Liu X, Yang S (2021) MicroRNA-221 Upregulates the Expression of P-gp and Bcl-2 by Activating the Stat3 Pathway to Promote Doxorubicin Resistance in Osteosarcoma Cells. *Biol Pharm Bull* 44:861–868. doi: 10.1248/bpb.b21-00163

120. Loginov VI, Pronina IV, Burdenny AM, Filippova EA, Kazubskaya TP, Kushlinsky DN, Utkin DO, Khodyrev DS, Kushlinskii NE, Dmitriev AA, Braga EA (2018) Novel miRNA genes deregulated by aberrant methylation in ovarian carcinoma are involved in metastasis. *Gene* 662:28–36. doi: 10.1016/j.gene.2018.04.005
121. Lordick F, Stein HJ, Peschel C, Siewert JR (2004) Neoadjuvant therapy for oesophagogastric cancer. *Br J Surg* 91:540–551. doi: 10.1002/bjs.4575
122. Lowery AJ, Miller N, McNeill RE, Kerin MJ (2008) MicroRNAs as prognostic indicators and therapeutic targets: potential effect on breast cancer management. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 14:360–365. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-0992
123. Lujambio A, Ropero S, Ballestar E, Fraga MF, Cerrato C, Setién F, Casado S, Suarez-Gauthier A, Sanchez-Cespedes M, Git A, Gitt A, Spiteri I, Das PP, Caldas C, Miska E, Esteller M (2007) Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. *Cancer Res* 67:1424–1429. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-4218
124. Lytle JR, Yario TA, Steitz JA (2007) Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:9667–9672. doi: 10.1073/pnas.0703820104
125. Maniataki E, Mourelatos Z (2005) A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA. *Genes Dev* 19:2979–2990. doi: 10.1101/gad.1384005
126. Mar-Aguilar F, Luna-Aguirre CM, Moreno-Rocha JC, Araiza-Chávez J, Trevino V, Rodríguez-Padilla C, Reséndez-Pérez D (2013) Differential expression of miR-21, miR-125b and miR-191 in breast cancer tissue. *Asia Pac J Clin Oncol* 9:53–59. doi: 10.1111/j.1743-7563.2012.01548.x
127. Marco A, Macpherson JI, Ronshaugen M, Griffiths-Jones S (2012) MicroRNAs from the same precursor have different targeting properties. *Silence* 3:8. doi: 10.1186/1758-907X-3-8
128. Marín RM, Voellmy F, von Erlach T, Vaníček J (2012) Analysis of the accessibility of CLIP bound sites reveals that nucleation of the miRNA:mRNA pairing occurs preferentially at the 3'-end of the seed match. *RNA N Y N* 18:1760–1770. doi: 10.1261/rna.033282.112
129. May A, Günter E, Roth F, Gossner L, Stolte M, Vieth M, Ell C (2004) Accuracy of staging in early oesophageal cancer using high resolution endoscopy and high resolution endosonography: a comparative, prospective, and blinded trial. *Gut* 53:634–640
130. Mayne ST, Risch HA, Dubrow R, Chow WH, Gammon MD, Vaughan TL, Farrow DC, Schoenberg JB, Stanford JL, Ahsan H, West AB, Rotterdam H, Blot WJ, Fraumeni JF (2001) Nutrient intake and risk of subtypes of esophageal and gastric cancer. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol* 10:1055–1062
131. Meister G (2013) Argonaute proteins: functional insights and emerging roles. *Nat Rev Genet* 14:447–459. doi: 10.1038/nrg3462
132. Meister G, Landthaler M, Dorsett Y, Tuschl T (2004) Sequence-specific inhibition of microRNA- and siRNA-induced RNA silencing. *RNA N Y N* 10:544–550
133. Melo SA, Esteller M (2011) A precursor microRNA in a cancer cell nucleus. *Cell Cycle* 10:922–925. doi: 10.4161/cc.10.6.15119



134. Melo SA, Moutinho C, Ropero S, Calin GA, Rossi S, Spizzo R, Fernandez AF, Davalos V, Villanueva A, Montoya G, Yamamoto H, Schwartz S, Esteller M (2010) A Genetic Defect in Exportin-5 Traps Precursor MicroRNAs in the Nucleus of Cancer Cells. *Cancer Cell* 18:303–315. doi: 10.1016/j.ccr.2010.09.007
135. Mestdagh P, Van Vlierberghe P, De Weer A, Muth D, Westermann F, Speleman F, Vandesompele J (2009) A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. *Genome Biol* 10:R64. doi: 10.1186/gb-2009-10-6-r64
136. Meyer H-J, Buhr HJ, Wilke H (2004) Management des Magen- und Ösophaguskarzinoms. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg
137. Mirza A, Foster L, Valentine H, Welch I, West CM, Pritchard S (2014) Investigation of the epithelial to mesenchymal transition markers S100A4, vimentin and Snail1 in gastroesophageal junction tumors. *Dis Esophagus Off J Int Soc Dis Esophagus* 27:485–492. doi: 10.1111/j.1442-2050.2012.01435.x
138. Mitamura T, Watari H, Wang L, Kanno H, Hassan MK, Miyazaki M, Katoh Y, Kimura T, Tanino M, Nishihara H, Tanaka S, Sakuragi N (2013) Downregulation of miRNA-31 induces taxane resistance in ovarian cancer cells through increase of receptor tyrosine kinase MET. *Oncogenesis* 2:e40. doi: 10.1038/oncsis.2013.3
139. Moody HL, Lind MJ, Maher SG (2017) MicroRNA-31 Regulates Chemosensitivity in Malignant Pleural Mesothelioma. *Mol Ther Nucleic Acids* 8:317–329. doi: 10.1016/j.omtn.2017.07.001
140. Nagpal N, Ahmad HM, Molparia B, Kulshreshtha R (2013) MicroRNA-191, an estrogen-responsive microRNA, functions as an oncogenic regulator in human breast cancer. *Carcinogenesis* 34:1889–1899. doi: 10.1093/carcin/bgt107
141. Nicoloso MS, Spizzo R, Shimizu M, Rossi S, Calin GA (2009) MicroRNAs--the micro steering wheel of tumour metastases. *Nat Rev Cancer* 9:293–302. doi: 10.1038/nrc2619
142. Nofech-Mozes R, Khella HWZ, Scorilas A, Youssef L, Krylov SN, Lianidou E, Sidiropoulos KG, Gabril M, Evans A, Yousef GM (2016) MicroRNA-194 is a Marker for Good Prognosis in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Cancer Med* 5:656–664. doi: 10.1002/cam4.631
143. Odenthal M, Hee J, Gockel I, Sisic L, Schmitz J, Stoecklein NH, Driemel C, Möhlendick B, Schmidt T, Knoefel WT, Lang H, Büttner R, Ott K, Vallböhmer D (2015) Serum microRNA profiles as prognostic/predictive markers in the multimodality therapy of locally advanced adenocarcinomas of the gastroesophageal junction. *Int J Cancer* 137:230–237. doi: 10.1002/ijc.29363
144. Organization WH, Cancer IA for R on (2010) WHO Classification of Tumours of the Digestive System. International Agency for Research on Cancer
145. Palanichamy JK, Rao DS (2014) miRNA dysregulation in cancer: towards a mechanistic understanding. *Front Genet* 5:54. doi: 10.3389/fgene.2014.00054
146. Pannuru P, Dontula R, Khan AA, Herbert E, Ozer H, Chetty C, Lakka SS (2014) miR-let-7f-1 regulates SPARC mediated cisplatin resistance in medulloblastoma cells. *Cell Signal* 26:2193–2201. doi: 10.1016/j.cellsig.2014.06.014
147. Park DJ, Yoon C, Thomas N, Ku GY, Janjigian YY, Kelsen DP, Ilson DH, Goodman KA, Tang LH, Strong VE, Coit DG, Yoon SS (2014) Prognostic significance of targetable

- angiogenic and growth factors in patients undergoing resection for gastric and gastroesophageal junction cancers. *Ann Surg Oncol* 21:1130–1137. doi: 10.1245/s10434-013-3429-0
148. Park JH, Shin C (2015) Slicer-independent mechanism drives small-RNA strand separation during human RISC assembly. *Nucleic Acids Res* 43:9418–9433. doi: 10.1093/nar/gkv937
  149. Parker JS, Roe SM, Barford D (2005) Structural insights into mRNA recognition from a PIWI domain-siRNA guide complex. *Nature* 434:663–666. doi: 10.1038/nature03462
  150. Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, Hayward DC, Ball EE, Degnan B, Müller P, Spring J, Srinivasan A, Fishman M, Finnerty J, Corbo J, Levine M, Leahy P, Davidson E, Ruvkun G (2000) Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature* 408:86–89. doi: 10.1038/35040556
  151. Peltier HJ, Latham GJ (2008) Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues. *RNA N Y N* 14:844–852. doi: 10.1261/rna.939908
  152. Peng W-Z, Ma R, Wang F, Yu J, Liu Z-B (2014) Role of miR-191/425 cluster in tumorigenesis and diagnosis of gastric cancer. *Int J Mol Sci* 15:4031–4048. doi: 10.3390/ijms15034031
  153. Perdas E, Stawski R, Nowak D, Zubrzycka M (2016) The Role of miRNA in Papillary Thyroid Cancer in the Context of miRNA Let-7 Family. *Int J Mol Sci* 17. doi: 10.3390/ijms17060909
  154. Phillips BE, Tubbs RR, Rice TW, Rybicki LA, Plesec T, Rodriguez CP, Videtic GM, Saxton JP, Ives DI, Adelstein DJ (2013) Clinicopathologic features and treatment outcomes of patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive adenocarcinoma of the esophagus and gastroesophageal junction. *Dis Esophagus Off J Int Soc Dis Esophagus* 26:299–304. doi: 10.1111/j.1442-2050.2012.01369.x
  155. Pohl H, Sirovich B, Welch HG (2010) Esophageal adenocarcinoma incidence: are we reaching the peak? *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol* 19:1468–1470. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-10-0012
  156. Pohl H, Welch HG (2005) The Role of Overdiagnosis and Reclassification in the Marked Increase of Esophageal Adenocarcinoma Incidence. *JNCI J Natl Cancer Inst* 97:142–146. doi: 10.1093/jnci/dji024
  157. Preston SR, Clark GWB, Martin IG, Ling HMS, Harris KM (2003) Effect of endoscopic ultrasonography on the management of 100 consecutive patients with oesophageal and junctional carcinoma. *Br J Surg* 90:1220–1224. doi: 10.1002/bjs.4268
  158. Pronina IV, Loginov VI, Burdenny AM, Fridman MV, Kazubskaya TP, Dmitriev AA, Braga EA (2016) Expression and DNA methylation alterations of seven cancer-associated 3p genes and their predicted regulator miRNAs (miR-129-2, miR-9-1) in breast and ovarian cancers. *Gene* 576:483–491. doi: 10.1016/j.gene.2015.10.059
  159. Pronina IV, Loginov VI, Burdenny AM, Fridman MV, Senchenko VN, Kazubskaya TP, Kushlinskii NE, Dmitriev AA, Braga EA (2017) DNA methylation contributes to deregulation of 12 cancer-associated microRNAs and breast cancer progression. *Gene* 604:1–8. doi: 10.1016/j.gene.2016.12.018

160. Pschyrembel W (2011) Pschyrembel® Klinisches Wörterbuch, 261. neu bearb. A. de Gruyter, Berlin
161. Pühringer-Oppermann F, Stahl M, Keller G, Sarbia M (2006) Lack of prognostic impact of p53 gene mutation and p53 phosphorylation at serine 15 in multimodally treated adenocarcinomas of the gastroesophageal junction. *J Cancer Res Clin Oncol* 132:433–438. doi: 10.1007/s00432-006-0085-9
162. Qin J, Luo M (2014) MicroRNA-221 promotes colorectal cancer cell invasion and metastasis by targeting RECK. *FEBS Lett* 588:99–104. doi: 10.1016/j.febslet.2013.11.014
163. Qu H, Zheng L, Song H, Jiao W, Li D, Fang E, Wang X, Mei H, Pu J, Huang K, Tong Q (2016) microRNA-558 facilitates the expression of hypoxia-inducible factor 2 alpha through binding to 5'-untranslated region in neuroblastoma. *Oncotarget* 7:40657–40673. doi: 10.18632/oncotarget.9813
164. von Rahden BHA, Stein HJ, Siewert JR (2003) Barrett's esophagus and Barrett's carcinoma. *Curr Oncol Rep* 5:203–209
165. von Rahden BHA, Stein HJ, Siewert JR (2006) Surgical management of esophagogastric junction tumors. *World J Gastroenterol* 12:6608–6613
166. Räsänen JV, Sihvo EIT, Knuuti MJ, Minn HRI, Luostarinen MES, Laippala P, Viljanen T, Salo JA (2003) Prospective analysis of accuracy of positron emission tomography, computed tomography, and endoscopic ultrasonography in staging of adenocarcinoma of the esophagus and the esophagogastric junction. *Ann Surg Oncol* 10:954–960
167. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G (2000) The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403:901–906. doi: 10.1038/35002607
168. Ren C, Chen H, Han C, Fu D, Wang D, Shen M (2016) High expression of miR-16 and miR-451 predicating better prognosis in patients with gastric cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 142:2489–2496. doi: 10.1007/s00432-016-2243-z
169. Ren Y, Yang M, Ma R, Gong Y, Zou Y, Wang T, Wu J (2019) Microcystin-LR promotes migration via the cooperation between microRNA-221/PTEN and STAT3 signal pathway in colon cancer cell line DLD-1. *Ecotoxicol Environ Saf* 167:107–113. doi: 10.1016/j.ecoenv.2018.09.065
170. van Rooij E, Sutherland LB, Liu N, Williams AH, McAnally J, Gerard RD, Richardson JA, Olson EN (2006) A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:18255–18260. doi: 10.1073/pnas.0608791103
171. Rüdiger Siewert J, Feith M, Werner M, Stein HJ (2000) Adenocarcinoma of the Esophagogastric Junction. *Ann Surg* 232:353–361
172. Samuel P, Pink RC, Caley DP, Currie JMS, Brooks SA, Carter DRF (2016) Over-expression of miR-31 or loss of KCNMA1 leads to increased cisplatin resistance in ovarian cancer cells. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med* 37:2565–2573. doi: 10.1007/s13277-015-4081-z
173. Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD (2003) Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115:199–208

174. Sen GL, Blau HM (2005) Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. *Nat Cell Biol* 7:633–636. doi: 10.1038/ncb1265
175. Sengpiel C, König IR, Rades D, Noack F, Duchrow M, Schild SE, Ludwig D, Homann N (2009) p53 Mutations in carcinoma of the esophagus and gastroesophageal junction. *Cancer Invest* 27:96–104. doi: 10.1080/07357900802161047
176. Shao M, Rossi S, Chelladurai B, Shimizu M, Ntukogu O, Ivan M, Calin GA, Matei D (2011) PDGF induced microRNA alterations in cancer cells. *Nucleic Acids Res* 39:4035–4047. doi: 10.1093/nar/gkq1305
177. Shapiro J, van Lanschot JJB, Hulshof MCCM, van Hagen P, van Berge Henegouwen MI, Wijnhoven BPL, van Laarhoven HWM, Nieuwenhuijzen GAP, Hospers GAP, Bonenkamp JJ, Cuesta MA, Blaisse RJB, Busch ORC, Ten Kate FJW, Creemers G-JM, Punt CJA, Plukker JTM, Verheul HMW, Bilgen EJS, van Dekken H, van der Slangen MJC, Rozema T, Biermann K, Beukema JC, Piet AHM, van Rij CM, Reinders JG, Tilanus HW, Steyerberg EW, van der Gaast A, CROSS study group (2015) Neoadjuvant chemoradiotherapy plus surgery versus surgery alone for oesophageal or junctional cancer (CROSS): long-term results of a randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 16:1090–1098. doi: 10.1016/S1470-2045(15)00040-6
178. Sharma R, Samantaray S, Shukla NK, Ralhan R (2003) Transcriptional gene expression profile of human esophageal squamous cell carcinoma. *Genomics* 81:481–488
179. Shi X, Su S, Long J, Mei B, Chen Y (2011) MicroRNA-191 targets N-deacetylase/N-sulfotransferase 1 and promotes cell growth in human gastric carcinoma cell line MGC803. *Acta Biochim Biophys Sin* 43:849–856. doi: 10.1093/abbs/gmr084
180. Siewert JR, Feith M, Stein HJ (2005) Biologic and clinical variations of adenocarcinoma at the esophago-gastric junction: relevance of a topographic-anatomic subclassification. *J Surg Oncol* 90:139–146; discussion 146. doi: 10.1002/jso.20218
181. Siewert JR, Hölscher AH, Becker K, Gössner W (1987) [Cardia cancer: attempt at a therapeutically relevant classification]. *Chir Z Alle Geb Oper Medizen* 58:25–32
182. Siewert JR, Stein HJ (1997) Barrett's cancer: indications, extent, and results of surgical resection. *Semin Surg Oncol* 13:245–252
183. Siewert JR, Stein HJ (1998) Classification of adenocarcinoma of the oesophagogastric junction. *Br J Surg* 85:1457–1459. doi: 10.1046/j.1365-2168.1998.00940.x
184. Siewert JR, Stein HJ, Feith M (2006) Adenocarcinoma of the esophago-gastric junction. *Scand J Surg SJS Off Organ Finn Surg Soc Scand Surg Soc* 95:260–269. doi: 10.1177/145749690609500409
185. Siewert JR, Stein HJ, von Rahden BHA (2005) Multimodal treatment of gastrointestinal tract tumors: consequences for surgery. *World J Surg* 29:940–948. doi: 10.1007/s00268-005-0010-4
186. Siomi H, Siomi MC (2010) Posttranscriptional regulation of microRNA biogenesis in animals. *Mol Cell* 38:323–332. doi: 10.1016/j.molcel.2010.03.013
187. Spechler SJ (2002) Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma: pathogenesis, diagnosis, and therapy. *Med Clin North Am* 86:1423–1445, vii

188. Stahl M, Walz MK, Riera-Knorrenschild J, Stuschke M, Sandermann A, Bitzer M, Wilke H, Budach W (2017) Preoperative chemotherapy versus chemoradiotherapy in locally advanced adenocarcinomas of the oesophagogastric junction (POET): Long-term results of a controlled randomised trial. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990 81:183–190. doi: 10.1016/j.ejca.2017.04.027
189. Stahl M, Walz MK, Stuschke M, Lehmann N, Meyer H-J, Riera-Knorrenschild J, Langer P, Engenhart-Cabillic R, Bitzer M, Königsrainer A, Budach W, Wilke H (2009) Phase III comparison of preoperative chemotherapy compared with chemoradiotherapy in patients with locally advanced adenocarcinoma of the esophagogastric junction. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 27:851–856. doi: 10.1200/JCO.2008.17.0506
190. Steevens J, Botterweck AAM, Dirx MJM, van den Brandt PA, Schouten LJ (2010) Trends in incidence of oesophageal and stomach cancer subtypes in Europe. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 22:669. doi: 10.1097/MEG.0b013e32832ca091
191. Stegmeier F, Hu G, Rickles RJ, Hannon GJ, Elledge SJ (2005) A lentiviral microRNA-based system for single-copy polymerase II-regulated RNA interference in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:13212–13217. doi: 10.1073/pnas.0506306102
192. Stein HJ, Feith M, von Rahden BHA, Siewert JR, Rahden BAH v (2003) Approach to early Barrett's cancer. *World J Surg* 27:1040–1046. doi: 10.1007/s00268-003-7059-8
193. Stein HJ, Feith M, Siewert JR (2000) Cancer of the esophagogastric junction. *Surg Oncol* 9:35–41. doi: 10.1016/S0960-7404(00)00021-9
194. Sugimura K, Miyata H, Tanaka K, Hamano R, Takahashi T, Kurokawa Y, Yamasaki M, Nakajima K, Takiguchi S, Mori M, Doki Y (2012) Let-7 expression is a significant determinant of response to chemotherapy through the regulation of IL-6/STAT3 pathway in esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 18:5144–5153. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-0701
195. Tanaka K, Miyata H, Sugimura K, Fukuda S, Kanemura T, Yamashita K, Miyazaki Y, Takahashi T, Kurokawa Y, Yamasaki M, Wada H, Nakajima K, Takiguchi S, Mori M, Doki Y (2015) miR-27 is associated with chemoresistance in esophageal cancer through transformation of normal fibroblasts to cancer-associated fibroblasts. *Carcinogenesis* 36:894–903. doi: 10.1093/carcin/bgv067
196. Theisen J, Stein HJ, Dittler HJ, Feith M, Moebius C, Kauer WKH, Werner M, Siewert JR (2002) Preoperative chemotherapy unmasks underlying Barrett's mucosa in patients with adenocarcinoma of the distal esophagus. *Surg Endosc* 16:671–673. doi: 10.1007/s00464-001-8307-3
197. Thrift AP, Shaheen NJ, Gammon MD, Bernstein L, Reid BJ, Onstad L, Risch HA, Liu G, Bird NC, Wu AH, Corley DA, Romero Y, Chanock SJ, Chow W-H, Casson AG, Levine DM, Zhang R, Ek WE, MacGregor S, Ye W, Hardie LJ, Vaughan TL, Whitman DC (2014) Obesity and risk of esophageal adenocarcinoma and Barrett's esophagus: a Mendelian randomization study. *J Natl Cancer Inst* 106. doi: 10.1093/jnci/dju252
198. Tie Y, Chen C, Yang Y, Qian Z, Yuan H, Wang H, Tang H, Peng Y, Du X, Liu B (2018) Upregulation of let-7f-5p promotes chemotherapeutic resistance in colorectal cancer by directly repressing several pro-apoptotic proteins. *Oncol Lett* 15:8695–8702. doi: 10.3892/ol.2018.8410
199. Tokunaga R, Imamura Y, Nakamura K, Uchihara T, Ishimoto T, Nakagawa S, Iwatsuki M, Baba Y, Sakamoto Y, Miyamoto Y, Yoshida N, Oyama S, Shono T, Naoe H, Saeki H, Oki

- E, Watanabe M, Sasaki Y, Maehara Y, Baba H (2015) Carbohydrate antigen 19-9 is a useful prognostic marker in esophagogastric junction adenocarcinoma. *Cancer Med* 4:1659–1666. doi: 10.1002/cam4.514
200. Ueda T, Volinia S, Okumura H, Shimizu M, Taccioli C, Rossi S, Alder H, Liu C, Oue N, Yasui W, Yoshida K, Sasaki H, Nomura S, Seto Y, Kaminishi M, Calin GA, Croce CM (2010) Relation between microRNA expression and progression and prognosis of gastric cancer: a microRNA expression analysis. *Lancet Oncol* 11:136–146. doi: 10.1016/S1470-2045(09)70343-2
  201. Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA (2007) Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* 318:1931–1934. doi: 10.1126/science.1149460
  202. Wang D, Fan Z, Liu F, Zuo J (2015) Hsa-miR-21 and Hsa-miR-29 in Tissue as Potential Diagnostic and Prognostic Biomarkers for Gastric Cancer. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol* 37:1454–1462. doi: 10.1159/000438514
  203. Wang H, Zhang X, Liu Y, Ni Z, Lin Y, Duan Z, Shi Y, Wang G, Li F (2016) Downregulated miR-31 level associates with poor prognosis of gastric cancer and its restoration suppresses tumor cell malignant phenotypes by inhibiting E2F2. *Oncotarget* 7:36577–36589. doi: 10.18632/oncotarget.9288
  204. Wang KL, Wu T-T, Choi IS, Wang H, Resetkova E, Resetkova E, Correa AM, Hofstetter WL, Swisher SG, Ajani JA, Rashid A, Albarracin CT (2007) Expression of epidermal growth factor receptor in esophageal and esophagogastric junction adenocarcinomas: association with poor outcome. *Cancer* 109:658–667. doi: 10.1002/cncr.22445
  205. Wang N, Li Y, Zhou J (2017) miR-31 Functions as an Oncomir Which Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition via Regulating BAP1 in Cervical Cancer. *BioMed Res Int* 2017:6361420. doi: 10.1155/2017/6361420
  206. Wang N, Zhu C, Xu Y, Qian W, Zheng M (2018) Negative Regulation of PTEN by MicroRNA-221 and Its Association with Drug Resistance and Cellular Senescence in Lung Cancer Cells. *BioMed Res Int* 2018:7908950. doi: 10.1155/2018/7908950
  207. WANG X, CAO L, WANG Y, WANG X, LIU N, YOU Y (2012) Regulation of let-7 and its target oncogenes (Review). *Oncol Lett* 3:955–960. doi: 10.3892/ol.2012.609
  208. Wang X, Shi Z, Liu X, Su Y, Li W, Dong H, Zhao L, Li M, Wang Y, Jin X, Huo Z (2018) Upregulation of miR-191 promotes cell growth and invasion via targeting TIMP3 in prostate cancer. *J BUON Off J Balk Union Oncol* 23:444–452
  209. Wang Y, Zhao Y, Herbst A, Kalinski T, Qin J, Wang X, Jiang Z, Benedix F, Franke S, Wartman T, Camaj P, Halangk W, Kolligs FT, Jauch KW, Nelson PJ, Bruns CJ (2016) miR-221 Mediates Chemoresistance of Esophageal Adenocarcinoma by Direct Targeting of DKK2 Expression. *Ann Surg* 264:804–814. doi: 10.1097/SLA.0000000000001928
  210. Washington K, Chiappori A, Hamilton K, Shyr Y, Blanke C, Johnson D, Sawyers J, Beauchamp D (1998) Expression of beta-catenin, alpha-catenin, and E-cadherin in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinomas. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc* 11:805–813
  211. Wei Y, Lai X, Yu S, Chen S, Ma Y, Zhang Y, Li H, Zhu X, Yao L, Zhang J (2014) Exosomal miR-221/222 enhances tamoxifen resistance in recipient ER-positive breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 147:423–431. doi: 10.1007/s10549-014-3037-0

212. Weston AP, Badr AS, Topalovski M, Cherian R, Dixon A, Hassanein RS (2000) Prospective evaluation of the prevalence of gastric *Helicobacter pylori* infection in patients with GERD, Barrett's esophagus, Barrett's dysplasia, and Barrett's adenocarcinoma. *Am J Gastroenterol* 95:387–394. doi: 10.1111/j.1572-0241.2000.01758.x
213. Wightman B, Ha I, Ruvkun G (1993) Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75:855–862
214. Wittekind C (2017) TNM Klassifikation maligner Tumoren, 8th ed. Wiley-VCH, Weinheim
215. Wlodarczyk J, Rudnicka-Sosin L, Kuźdżał J (2015) Expression of  $\beta$ -catenin and its correlation with metastatic progression of esophagogastric junction adenocarcinoma. *Pol J Pathol Off J Pol Soc Pathol* 66:414–419
216. Wu AH, Tseng C-C, Bernstein L (2003) Hiatal hernia, reflux symptoms, body size, and risk of esophageal and gastric adenocarcinoma. *Cancer* 98:940–948. doi: 10.1002/cncr.11568
217. Wu AH, Wan P, Bernstein L (2001) A multiethnic population-based study of smoking, alcohol and body size and risk of adenocarcinomas of the stomach and esophagus (United States). *Cancer Causes Control CCC* 12:721–732
218. Wu L, Fan J, Belasco JG (2006) MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:4034–4039. doi: 10.1073/pnas.0510928103
219. Wu W, Sun M, Zou G-M, Chen J (2007) MicroRNA and cancer: Current status and prospective. *Int J Cancer* 120:953–960. doi: 10.1002/ijc.22454
220. Xi Y, Formentini A, Chien M, Weir DB, Russo JJ, Ju J, Kornmann M, Ju J (2006) Prognostic Values of microRNAs in Colorectal Cancer. *Biomark Insights* 2:113–121
221. Xie Q, Yan Y, Huang Z, Zhong X, Huang L (2014) MicroRNA-221 targeting PI3-K/Akt signaling axis induces cell proliferation and BCNU resistance in human glioblastoma. *Neuropathol Off J Jpn Soc Neuropathol* 34:455–464. doi: 10.1111/neup.12129
222. Xuan H, Xue W, Pan J, Sha J, Dong B, Huang Y (2015) Downregulation of miR-221, -30d, and -15a contributes to pathogenesis of prostate cancer by targeting Bmi-1. *Biochem Biokhimiia* 80:276–283. doi: 10.1134/S0006297915030037
223. Yan L-X, Huang X-F, Shao Q, Huang M-Y, Deng L, Wu Q-L, Zeng Y-X, Shao J-Y (2008) MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis. *RNA N Y N* 14:2348–2360. doi: 10.1261/rna.1034808
224. Yan S, Han X, Xue H, Zhang P, Guo X, Li T, Guo X, Yuan G, Deng L, Li G (2015) Let-7f Inhibits Glioma Cell Proliferation, Migration, and Invasion by Targeting Periostin. *J Cell Biochem* 116:1680–1692. doi: 10.1002/jcb.25128
225. Yang F, Wang W, Zhou C, Xi W, Yuan L, Chen X, Li Y, Yang A, Zhang J, Wang T (2015) MiR-221/222 promote human glioma cell invasion and angiogenesis by targeting TIMP2. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med* 36:3763–3773. doi: 10.1007/s13277-014-3017-3
226. Yang LP, Fu LC, Guo H, Xie LX (2012) Expression of vascular endothelial growth factor C correlates with lymphatic vessel density and prognosis in human gastroesophageal junction carcinoma. *Onkologie* 35:88–93. doi: 10.1159/000336807

227. Yao Y, Wang W, Jing L, Wang Y, Li M, Hou X, Wang J, Peng T, Teng J, Jia Y (2017) Let-7f Regulates the Hypoxic Response in Cerebral Ischemia by Targeting NDRG3. *Neurochem Res* 42:446–454. doi: 10.1007/s11064-016-2091-x
228. Ye Z, Hao R, Cai Y, Wang X, Huang G (2016) Knockdown of miR-221 promotes the cisplatin-inducing apoptosis by targeting the BIM-Bax/Bak axis in breast cancer. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med* 37:4509–4515. doi: 10.1007/s13277-015-4267-4
229. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR (2003) Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 17:3011–3016. doi: 10.1101/gad.1158803
230. Yokoi C, Gotoda T, Hamanaka H, Oda I (2006) Endoscopic submucosal dissection allows curative resection of locally recurrent early gastric cancer after prior endoscopic mucosal resection. *Gastrointest Endosc* 64:212–218. doi: 10.1016/j.gie.2005.10.038
231. Zeng Y, Cullen BR (2004) Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5. *Nucleic Acids Res* 32:4776–4785. doi: 10.1093/nar/gkh824
232. Zhang X-F, Li K, Gao L, Li S-Z, Chen K, Zhang J-B, Wang D, Tu R-F, Zhang J-X, Tao K-X, Wang G, Zhang X-D (2014) miR-191 promotes tumorigenesis of human colorectal cancer through targeting C/EBP $\beta$ . *Oncotarget* 6:4144–4158
233. Zhang Y, Guo J, Li D, Xiao B, Miao Y, Jiang Z, Zhuo H (2010) Down-regulation of miR-31 expression in gastric cancer tissues and its clinical significance. *Med Oncol* 27:685–689. doi: 10.1007/s12032-009-9269-x
234. Zhang ZF, Kurtz RC, Yu GP, Sun M, Gargon N, Karpeh M, Fein JS, Harlap S (1997) Adenocarcinomas of the esophagus and gastric cardia: the role of diet. *Nutr Cancer* 27:298–309. doi: 10.1080/01635589709514541
235. Zhao G, Cai C, Yang T, Qiu X, Liao B, Li W, Ji Z, Zhao J, Zhao H, Guo M, Ma Q, Xiao C, Fan Q, Ma B (2013) MicroRNA-221 induces cell survival and cisplatin resistance through PI3K/Akt pathway in human osteosarcoma. *PloS One* 8:e53906. doi: 10.1371/journal.pone.0053906
236. Zhao L, Zou D, Wei X, Wang L, Zhang Y, Liu S, Si Y, Zhao H, Wang F, Yu J, Ma Y, Sun G (2016) MiRNA-221-3p desensitizes pancreatic cancer cells to 5-fluorouracil by targeting RB1. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med*. doi: 10.1007/s13277-016-5445-8
237. Zhao X, Yang L, Hu J (2011) Down-regulation of miR-27a might inhibit proliferation and drug resistance of gastric cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res* 30:55. doi: 10.1186/1756-9966-30-55
238. Zheng T, Wang J, Chen X, Liu L (2010) Role of microRNA in anticancer drug resistance. *Int J Cancer* 126:2–10. doi: 10.1002/ijc.24782
239. Zhou J, Zhou Y, Yin B, Hao W, Zhao L, Ju W, Bai C (2010) 5-Fluorouracil and oxaliplatin modify the expression profiles of microRNAs in human colon cancer cells in vitro. *Oncol Rep* 23:121–128
240. Zhou N, Qu Y, Xu C, Tang Y (2016) Upregulation of microRNA-375 increases the cisplatin-sensitivity of human gastric cancer cells by regulating ERBB2. *Exp Ther Med* 11:625–630. doi: 10.3892/etm.2015.2920



241. Zhu M, Zhu M, Zhou X, Zhou X, Du Y, Du Y, Huang Z, Huang Z, Zhu J, Zhu J, Xu J, Xu J, Cheng G, Cheng G, Shu Y, Shu Y, Liu P, Liu P, Zhu W, Zhu W, Wang T, Wang T (2016) miR-20a induces cisplatin resistance of a human gastric cancer cell line via targeting CYLD. *Mol Med Rep* 14:1742–1750. doi: 10.3892/mmr.2016.5413
242. Zhu W, Shan X, Wang T, Shu Y, Liu P (2010) miR-181b modulates multidrug resistance by targeting BCL2 in human cancer cell lines. *Int J Cancer* 127:2520–2529. doi: 10.1002/ijc.25260
243. Zhu X, Li D, Yu F, Jia C, Xie J, Ma Y, Fan S, Cai H, Luo Q, Lv Z, Fan L (2016) miR-194 inhibits the proliferation, invasion, migration, and enhances the chemosensitivity of non-small cell lung cancer cells by targeting forkhead box A1 protein. *Oncotarget* 7:13139–13152. doi: 10.18632/oncotarget.7545
244. (2019) S3-Leitlinie Magenkarzinom-Diagnostik und Therapie der Adenokarzinome des Magens und ösophagogastralen Übergangs. AWMF
245. (2021) S3-Leitlinie Diagnostik und Therapie des Ösophaguskarzinoms. AWMF
246. ICD-Scout: Volltextsuche im systematischen und alphabetischen Verzeichnis der ICD-10-GM. <https://www.icdscout.de/>. Accessed 21 Nov 2021
247. mirna - PubMed - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=mirna>. Accessed 18 Oct 2021
248. miRBase. <http://www.mirbase.org/>. Accessed 19 Nov 2021
249. miRNA Entry for MI0000298. [http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna\\_entry.pl?acc=MI0000298](http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0000298). Accessed 22 Sep 2019
250. TIMP3 - an overview | ScienceDirect Topics. <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/timp3>. Accessed 14 May 2019
251. Optimized Gene Expression Analysis from FFPE Samples - DE. <https://www.thermofisher.com/de/de/home/references/ambion-tech-support/rna-isolation/tech-notes/optimized-gene-expression-analysis-from-ffpe-samples.html>. Accessed 4 Jun 2019

## **8. Danksagung**

Ohne die großartige Unterstützung einiger besonderer Menschen wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Ich danke ALLEN von ganzem Herzen.

Dem ehemaligen Institutsleiter, Herrn Prof. Dr.med Sven Perner, danke ich für die Möglichkeit diese Arbeit am Institut für Pathologie der Universität zu Lübeck durchführen zu können.

Prof. Dr.med. Christoph Thorns für die Überlassung des Themas, seine tolle Betreuung, seine Ideen und seine rosarote Art zu sagen: "Jetzt mach´mal schneller!"

Mein besonderer Dank gilt meiner anfänglichen Betreuerin und schließlich Dokotormutter PD Dr.med. Juliana Knief, die mich vom ersten Tag an motivierte, bei Fragen und Problemen immer ein offenes Ohr und Lösungen parat hatte, sich viel Zeit für mich und diese Arbeit nahm und die Ergebnisse dieser Arbeit schließlich bei der Jahresversammlung der ASCP im September 2017 in Chicago, Illinois präsentierte, was ich als eine riesige Wertschätzung empfinde.

Die wissenschaftlichen Mitarbeiterinnen Annette Aufseß und Dr.rer.hum.biol. Pamela Lazar-Karsten, die mich bei meiner Arbeit im Labor unterstützten. Durch euch weiß ich, was gewissenhafte Laborarbeit bedeutet.

Schließlich meinem Ehemann Andreas und meiner besten Freundin Madlen, dass sie seit Jahren für mich da waren und sind. Ihr habt mir geholfen mich zu verwirklichen und meinen Traum zu leben!

## **9. Erklärung und Publikation**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel

### **MicroRNAs als potenzielle Biomarker für Chemoresistenz in Adenokarzinomen des ösophagogastralen Übergangs**

ohne fremde Hilfe im Institut für Pathologie unter Betreuung von Prof. Dr.med. Christoph Thorns und PD Dr.med. Juliana Knief angefertigt habe. Ich habe keine anderen als die in dieser Arbeit aufgeführten Hilfsmittel benutzt.

Ich habe diese Dissertation, oder Teile dieser, nie versucht an einer anderen Universität einzureichen oder einen Zulassungsantrag zu stellen.

Sämtliche Untersuchungen erfolgten nach Genehmigung durch die Ethikkommission der Universität zu Lübeck (AZ 14-242A, 20.10.2014).

Ich widerspreche einer Zulassung von Zuhörerinnen oder Zuhörern bei der mündlichen Prüfung.

Christina Block

## **Publikation**

Auszüge dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

**Just C, Knief J, Lazar-Karsten P, Petrova E, Hummel R, Röcken C, Wellner U, Thorns C. MicroRNAs as Potential Biomarkers for Chemoresistance in Adenocarcinomas of the Esophagogastric Junction. Journal of Oncology 2019: 1-11,**

sowie in Form eines wissenschaftlichen Posters präsentiert beim:

**Jahrestreffen 2017 der ASCP in Chicago, Illinois. – Winner of „Best International Poster“**