

Michael Wühl

Dr. med.

lncRNAs – a novel superfamily of prognostic markers in metastatic colorectal cancer

Fach/Einrichtung: Chirurgie

Doktorvater: Prof. Dr. med. Martin Schneider

lncRNAs (long non-coding RNAs) gehören zur Familie der nicht-kodierenden RNAs und besitzen vielfältige Funktionen innerhalb des Zellorganismus. Sie dienen als Mediatoren der Genexpression, indem sie Transkription und Translation beeinflussen. lncRNAs zeigen ein hohes Maß an Gewebespezifität und ihre Dysregulation ist oftmals an der Pathogenese von Tumorerkrankungen beteiligt. Dies macht sie zu vielversprechenden potentiellen Biomarkern. CCAT1 und CCAT2 sind zwei lncRNAs, die erstmals im kolorektalen Karzinom beschrieben wurden. Ihre Expression im Primärtumor ist mit einer negativen Prognose assoziiert. Ihre primäre Funktion besteht in der Überexpression ihrer Zielstruktur, dem Protoonkogen MYC. Die Rolle von CCAT1 und CCAT2 in kolorektalen Metastasen ist derzeit noch ungeklärt. Lebermetastasen betreffen bis zu ein Drittel aller am kolorektalen Karzinom erkrankten Patienten. Die chirurgische Resektion ist das Kernelement einer potentiell kurativen Therapie. Dennoch ist ein Tumorrezidiv nach Operation häufig. Der Großteil aller Patienten erleidet ein Rezidiv, wobei bis zu 50 % von einem Rezidiv innerhalb der Leber betroffen sind.

Ziel dieser Promotionsarbeit war die Untersuchung von lncRNAs in kolorektalen Lebermetastasen, um neue prognostische Marker zu entdecken und molekulare Mechanismen der Pathogenese zu ergründen. Die Expression von CCAT1, CCAT2 und MYC wurde in kolorektalen Lebermetastasen und gepaartem gesunden Lebergewebe von 97 Patienten gemessen, die sich einer Lebermetastasenresektion in der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie des Universitätsklinikums Heidelberg zwischen 2009 bis 2014 unterzogen hatten. Die Expressionslevel wurden mit dem Patientenoutcome korreliert. Die Proteinexpression im Gewebe wurde in einer Untergruppe von Patienten mittels Multiplex-ELISA durchgeführt. Zudem erfolgte die Analyse zellulärer Migration und Invasion nach Knockdown von CCAT1, CCAT2 und MYC in den drei metastatischen kolorektalen Karzinomzelllinien Colo205, LIM2099 und HROC277Met2, ebenso wie die Analyse von Protein und Genexpression.

Es zeigte sich, dass eine erhöhte Expression von CCAT1, CCAT2 und MYC in kolorektalen Lebermetastasen mit einem signifikant längeren progressionsfreien Überleben nach Lebermetastasenresektion assoziiert war. Ein gleichgerichteter Trend zeigte sich bei erhöhter MYC Proteinexpression in der Subgruppe von Patienten die für Proteinextraktion ausgewählt wurden. Ebenso zeigt sich ein Zusammenhang zwischen erhöhter Expression von CCAT1 und einer statistisch signifikant verlängerten Gesamtüberlebenszeit. Der Knockdown von CCAT1 und MYC

führt zu signifikant erhöhter Migration und Invasion der Tumorzelllinien Colo205 und HROC277Met2. Der Knockdown von CCAT2 hingegen erhöhte die Migration und Invasion in HROC277Met2 und erniedrigte diese in Colo205. In LIM2099 kam es nach Knockdown der drei RNAs zu keiner Erhöhung der Migration und Invasion. Die Analyse der mRNA und Proteinexpression von MYC zeigte signifikante Unterschiede in den drei Zelllinien, was als mögliche Erklärung für die beobachteten Unterschiede zu werten ist. Die qPCR Analyse der RNA-Expression nach Knockdown zeigte eine nicht einheitliche Veränderung der Genexpression, woraus sich schließen lässt, dass CCAT1 und CCAT2 über weitere noch unbekannte Funktionsmechanismen verfügen, die unabhängig ihrer Interaktion mit MYC sind. Es zeigte sich in allen drei Knockdowns eine erhöhte Expression von PPRAD. Die PPRAD Signalkaskade wurde in der Vergangenheit bereits mit prometastatischer Funktion in Karzinomen in Verbindung gebracht, so dass es Nahe liegt, dass dies auch in kolorektalen Lebermetastasen der Fall ist.

Diese Arbeit ist die erste ihrer Art, die einen protektiven Effekt von CCAT1, CCAT2 und MYC in kolorektalen Lebermetastasen aufzeigt. Die Zellkulturexperimente konnten eine Beteiligung dieser drei Gene an der zellulären Migration und Invasion zeigen. Die Genexpressionsanalyse konnte neue Hinweise auf Mechanismen von CCAT1 und CCAT2 unabhängig ihrer Interaktion mit MYC aufzeigen. Zusammenfassend bringt diese Arbeit neue Erkenntnisse zur Rolle von CCAT1 und CCAT2 in der Repression der Tumorzellaussaat aus kolorektalen Lebermetastasen.