

Aus dem Institut für Allgemeine und Spezielle Pathologie  
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. R. M. Bohle

**microRNA-Expression von primären Plattenepithelkarzinomen der Lunge in  
Abhängigkeit vom histologischen Grading**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanmedizin**

**der Medizinischen Fakultät**

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2023

vorgelegt von: Johannes Eduard Hohneck  
geb. am 05.04.1996 in Saarbrücken

Tag der Promotion: 15. November 2023  
Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Micheal D. Menger  
Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Rainer M. Bohle  
Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Robert Bals

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>V</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>VI</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>VII</b>
<b>1 Zusammenfassung</b> .....	<b>- 1 -</b>
1.1 Deutschsprachige Zusammenfassung .....	- 1 -
1.1.1 Hintergründe .....	- 1 -
1.1.2 Material und Methoden .....	- 1 -
1.1.3 Ergebnisse .....	- 2 -
1.1.4 Schlussfolgerung .....	- 2 -
1.2 Englischsprachige Zusammenfassung .....	- 3 -
1.2.1 Background .....	- 3 -
1.2.2 Material and methods .....	- 3 -
1.2.3 Results .....	- 3 -
1.2.4 Conclusion .....	- 4 -
<b>2 Einleitung</b> .....	<b>- 5 -</b>
2.1 Die RNA-Welt-Hypothese .....	- 5 -
2.2 RNA heute .....	- 5 -
2.3 <i>Small non-coding RNA</i> und RNA-Interferenz .....	- 5 -
2.4 MiRNAs .....	- 6 -
2.4.1 Biogenese der miRNAs .....	- 6 -
2.4.2 Mechanismen der mRNA-Regulation .....	- 8 -
2.4.3 MiRNAs im Kontext der Karzinogenese .....	- 9 -
2.5 Bronchialkarzinom .....	- 11 -
2.5.1 Epidemiologie .....	- 11 -
2.5.2 Pathologisch-anatomische Aspekte .....	- 11 -
2.6 Epitheliale mesenchymale Transition .....	- 16 -

2.7	MiRNAs beim Plattenepithelkarzinom der Lunge .....	- 17 -
2.8	Fragestellung der Arbeit .....	- 17 -
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>- 18 -</b>
3.1	Material .....	- 18 -
3.1.1	Verbrauchsmaterialien .....	- 18 -
3.1.2	Geräte .....	- 19 -
3.1.3	Reagenzien.....	- 21 -
3.1.4	Primer .....	- 22 -
3.1.5	Programme .....	- 23 -
3.2	Versuchsaufbau .....	- 24 -
3.3	Patientenkollektiv .....	- 24 -
3.4	Erhebung pathologischer Standardparameter .....	- 25 -
3.4.1	Konventionelles Grading.....	- 25 -
3.4.2	Grading nach Weichert et al. ....	- 27 -
3.5	Probengewinnung und Hämatoxylin-Eosin-Färbung .....	- 30 -
3.6	RNA-Isolation.....	- 30 -
3.7	RNA-Quantifizierung und Reinheitsanalyse .....	- 31 -
3.7.1	Spektralphotometrie.....	- 31 -
3.7.2	Gelelektrophorese .....	- 31 -
3.8	Microarray .....	- 32 -
3.9	Reverse Transkription und quantitative Polymerasekettenreaktion.....	- 34 -
3.9.1	Reverse Transkription.....	- 34 -
3.9.2	Quantitative Polymerasekettenreaktion .....	- 34 -
3.9.3	Verdünnungsreihe zur Bestimmung der Primereffizienz .....	- 36 -
3.10	Statistische Auswertung .....	- 38 -
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>- 39 -</b>
4.1	Patientenkollektiv .....	- 39 -
4.2	Grading .....	- 42 -
4.3	Gelelektrophorese .....	- 43 -

4.4	Microarray Analyse .....	- 43 -
4.5	Quantitative Polymerasekettenreaktion .....	- 45 -
4.5.1	Primereffizienzen .....	- 45 -
4.5.2	Expressionsänderung ausgewählter miRNAs .....	- 46 -
4.5.3	Subgruppenanalyse hinsichtlich der Grading-Stufen nach Weichert et al. ....	- 48 -
4.5.4	Subgruppenanalyse hinsichtlich der konventionellen Grading-Stufen.....	- 50 -
4.5.5	Korrelation mit dem Patientenalter .....	- 52 -
4.5.6	Subgruppenanalyse hinsichtlich des Geschlechts.....	- 53 -
4.5.7	Subgruppenanalyse hinsichtlich der histologischen Subtypen .....	- 54 -
4.5.8	Subgruppenanalyse hinsichtlich der T-Kategorie .....	- 55 -
4.5.9	Subgruppenanalyse hinsichtlich der N-Kategorien.....	- 56 -
4.5.10	Subgruppenanalyse hinsichtlich der UICC-Stadien.....	- 57 -
4.5.11	Subgruppenanalyse hinsichtlich einer Lymphangiosis carcinomatosa .....	- 58 -
4.5.12	Subgruppenanalyse hinsichtlich einer Hämangiosis carcinomatosa .....	- 59 -
4.5.13	Subgruppenanalyse hinsichtlich einer Perineuralscheideninfiltration .....	- 60 -
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>- 61 -</b>
5.1	Ergebnisdiskussion.....	- 61 -
5.1.1	Patientenkollektiv.....	- 61 -
5.1.2	MiRNA-Expressionsmuster.....	- 62 -
5.1.3	miR-126-3p.....	- 62 -
5.1.4	miR-144-3p.....	- 63 -
5.1.5	miR-200b-3p.....	- 64 -
5.1.6	miR-338-3p.....	- 64 -
5.1.7	miR-375-3p.....	- 65 -
5.1.8	miR-31-5p.....	- 65 -
5.1.9	miR-205-5p.....	- 65 -
5.1.10	miR-210-3p.....	- 66 -
5.1.11	miR-574-5p.....	- 66 -

5.2	Methodendiskussion .....	- 67 -
5.2.1	Ausgewählte Parameter .....	- 67 -
5.2.2	Grading und Tumorheterogenität.....	- 67 -
5.2.3	RNA-Gewinnung.....	- 68 -
5.2.4	Microarray .....	- 69 -
5.2.5	RT-qPCR .....	- 70 -
5.2.6	Statistik .....	- 71 -
5.3	Bedeutung der Expression selektierter miRNAs.....	- 72 -
5.3.1	im Kontext der Tumorphypoxie und Neoangiogenese.....	- 72 -
5.3.2	im Kontext der tumorfördernden Inflammation in der Tumormikroumgebung	- 74 -
5.3.3	im Kontext der epithelialen mesenchymalen Transition .....	- 76 -
5.4	Ausblick .....	- 78 -
	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>- 79 -</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>- 97 -</b>
	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>- 98 -</b>
	<b>Appendix .....</b>	<b>A</b>

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Verbrauchsmaterialien .....	- 18 -
Tabelle 2: Verwendete Laborgeräte .....	- 19 -
Tabelle 3: Verwendete Reagenzien .....	- 21 -
Tabelle 4: Verwendete Primer .....	- 22 -
Tabelle 5: Verwendete Programme.....	- 23 -
Tabelle 6: Konventionelles Grading der Plattenepithelkarzinome der Lunge.....	- 25 -
Tabelle 7: Grading nach Weichert et al. ....	- 29 -
Tabelle 8: RT-Ansatz einer Probe .....	- 34 -
Tabelle 9: PCR-Ansatz einer Probe .....	- 35 -
Tabelle 10: Übersicht über die klinisch-pathologischen Standardparameter des untersuchten Patientenkollektivs mit Plattenepithelkarzinomen.....	- 41 -
Tabelle 11: Kreuztabelle der angewandten Grading-Schemata.....	- 42 -
Tabelle 12: Effizienzen der verwendeten Primer.....	- 45 -
Tabelle 13: Expressionswerte für die 9 ausgewählten miRNAs.....	- 46 -
Tabelle 14: Korrelation mit dem Patientenalter .....	- 52 -
Tabelle 15: Subgruppenanalyse hinsichtlich des Geschlechts .....	- 53 -
Tabelle 16: Subgruppenanalyse hinsichtlich der histologischen Subtypen .....	- 54 -
Tabelle 17: Subgruppenanalyse hinsichtlich der T-Kategorien .....	- 55 -
Tabelle 18: Subgruppenanalyse hinsichtlich der N-Kategorien.....	- 56 -
Tabelle 19: Subgruppenanalyse hinsichtlich der UICC-Stadien.....	- 57 -
Tabelle 20: Subgruppenanalyse hinsichtlich einer Lymphangiosis carcinomatosa.....	- 58 -
Tabelle 21: Subgruppenanalyse hinsichtlich einer Hämangiosis carcinomatosa.....	- 59 -
Tabelle 22: Subgruppenanalyse hinsichtlich einer Perineuralscheideninfiltration .....	- 60 -
Tabelle 23: Definition der T-Kategorie.....	A
Tabelle 24: Definition der N-Kategorie .....	B
Tabelle 25: Definition der M-Kategorie.....	B
Tabelle 26: Definition der UICC-Stadien .....	C

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Kanonische Biogenese und Wirkungsmechanismus der microRNAs .....	- 7 -
Abbildung 2: <i>Hallmarks of Cancer</i> .....	- 10 -
Abbildung 3: Vorläuferläsionen des Plattenepithelkarzinoms der Lunge .....	- 13 -
Abbildung 4: Verhornendes und nicht verhornendes Plattenepithelkarzinom .....	- 14 -
Abbildung 5: Versuchsablauf .....	- 24 -
Abbildung 6: Konventionelles Grading G1 .....	- 26 -
Abbildung 7: Konventionelles Grading G2 .....	- 26 -
Abbildung 8: Konventionelles Grading G3 .....	- 27 -
Abbildung 9: <i>Tumor nesting</i> .....	- 28 -
Abbildung 10: <i>Tumor budding</i> .....	- 28 -
Abbildung 11: Funktionsweise cDNA-Microarray .....	- 33 -
Abbildung 12: Ablauf der Polymerasekettenreaktion .....	- 36 -
Abbildung 13: Verdünnungsreihe .....	- 37 -
Abbildung 14: Altersverteilung bei Erstdiagnose nach Geschlecht .....	- 39 -
Abbildung 15: Verteilung der UICC-Stadien nach Geschlecht .....	- 40 -
Abbildung 16: RIN-Werte der untersuchten Proben .....	- 43 -
Abbildung 17: Heatmap der Microarray-Analyse .....	- 44 -
Abbildung 18: Korrelationsmatrix der miRNA-Expression .....	- 47 -
Abbildung 19: Subgruppenanalyse hinsichtlich der Grading-Stufen nach Weichert et al. -	48 -
Abbildung 20: Subgruppenanalyse hinsichtlich der konventionellen Grading-Stufen .....	- 50 -
Abbildung 21: Heatmap der Microarray-Analyse mit alternativem Farbschema .....	D

## Abkürzungsverzeichnis

3' UTR	<i>3' untranslated Region</i> , untranslatierte Region einer mRNA am 3'-Ende
5' UTR	<i>5' untranslated Region</i> , untranslatierte Region einer mRNA am 5'-Ende
AC	Adenokarzinom
AGO	Protein der Argonaut-Familie
ASPP2	<i>apoptosis stimulating protein of p53 2</i> , Apoptose stimulierendes Protein für p53 2
CAF	<i>cancer associated fibroblast</i> , Krebs-assoziiertes Fibroblast
CCL	C-C-Motiv-Ligand
cDNA	<i>complementary DNA</i> , komplementäre DNA
CLL	chronische lymphatische Leukämie
DGCR8	<i>DiGeorge Syndrom critical region gene 8</i> , DiGeorge-Syndrom-kritische-Region-Gen 8
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxynukleinsäuren
EMT	epitheliale mesenchymale Transition
EMT-TF	EMT-aktivierende Transkriptionsfaktoren
FDR	<i>false discovery rate</i> , Falscherkennungsrate
FIH	<i>factor-inhibiting HIF</i> , HIF-inhibierender Faktor
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HIF	<i>hypoxia-inducable factor</i> , Hypoxie-induzierbarer Faktor
HPF	<i>high power field</i> , Hochvergrößerungsfeld
miRNA	microRNA
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	<i>messenger RNA</i> , Boten-RNA
ncRNA	<i>non coding RNA</i> , nicht codierende RNA
NSCLC	<i>non small cell lung cancer</i> , nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEC	Plattenepithelkarzinom

piRNA	<i>piwi interacting RNA</i> , PIWI-Proteine interagierende RNA
pre-miRNA	<i>precursor miRNA</i> , Vorläufer-miRNA
pri-miRNA	<i>primary miRNA</i> , primäre miRNA
qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion
RIN	<i>RNA Integrity Number</i> , RNA-Integritätszahl
RISC	<i>RNA-induced silencing Complex</i> , RNA-induzierter Inhibitionskomplex
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
rRNA	<i>ribosomal RNA</i> , ribosomale RNA
RT	Reverse Transkription
SCLC	<i>small cell lung cancer</i> , kleinzelliges Bronchialkarzinom
siRNA	<i>short interfering RNA</i> , kurze interferierende RNA
snRNA	<i>small nuclear RNA</i> , kleine nukleäre RNA
SOX4	<i>SRY-related HMG-box 4</i> , SRY-verbundene HMG-Box
TAM	<i>tumor-associated macrophage</i> , tumorassoziierter Makrophage
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i> , Krebsgenomatlas
TGF- $\beta$	<i>transforming growth factor <math>\beta</math></i> , transformierender Wachstumsfaktor $\beta$
TME	<i>tumor micro environment</i> , Tumormikroumgebung
TRBP	<i>HIV-1 transactivating response (TAR) RNA-binding protein</i> , HIV-1 transaktivierende Antwort-RNA bindendes Protein
tRNA	<i>transfer RNA</i> , Transfer-RNA
UICC	<i>Union internationale contre le cancer</i> , Internationale Vereinigung gegen Krebs
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i> , vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
WHO	<i>World Health Organization</i> , Weltgesundheitsorganisation
ZEB 1 und 2	<i>zinc-finger E-Box-binding homeobox 1 und 2</i> , Zink-finger-E-Box-bindende Homeobox 1 und 2

# 1 Zusammenfassung

## 1.1 Deutschsprachige Zusammenfassung

### 1.1.1 Hintergründe

MicroRNAs sind einsträngige, kurze, nicht (für ein Protein) kodierende Ribonukleinsäuren, welche die Proteintranslation regulieren. Sie sind dadurch in der Lage in eine Vielzahl von molekularbiologischen als auch -pathologischen Prozessen einzugreifen. Im Hinblick auf maligne Erkrankungen konnte für zahlreiche Karzinome eine aberrante microRNA-Expression im Vergleich zu tumorfreiem Gewebe nachgewiesen werden. In nicht kleinzelligen Bronchialkarzinomen sind sie durch Dysregulation ihrer Zielproteine an Entstehung, Progression und Metastasierung beteiligt. Für das pulmonale Adenokarzinom konnte zudem ein Zusammenhang zwischen einer aberranten microRNA-Expression und der Tumordifferenzierung nachgewiesen werden. Ziel dieser Arbeit war es, zu überprüfen, ob sich für das primäre Plattenepithelkarzinom der Lunge ein Zusammenhang zwischen der Dysregulation bestimmter microRNAs und der Tumordifferenzierung sowie weiteren klinisch-pathologischen Parametern ergibt.

### 1.1.2 Material und Methoden

Insgesamt wurden N = 45 Patienten, bei denen ein primäres Plattenepithelkarzinom der Lunge reseziert wurde, pseudonymisiert in diese Studie eingeschlossen. Die für die Diagnostik verwendeten und asservierten Schnittpräparate wurden erneut mikroskopiert. Die histopathologischen Befunde wurden, wenn nötig, entsprechend der zum Zeitpunkt dieser Arbeit gültigen TNM-Klassifikation (8. aktualisierte Auflage, 2020) aktualisiert. Zudem wurde der Differenzierungsgrad (sogenanntes „*Grading*“) der Plattenepithelkarzinome anhand zweier unterschiedlicher Schemata ermittelt: Neben dem bislang in der pathologischen Routinediagnostik angewandten Schema, das im Wesentlichen die Zell- und Zellkernmorphologie bewertet, wurde ein neueres Schema eingesetzt, welches anhand der Phänomene „*tumor budding*“ und „*tumor nesting*“ das Wachstumsmuster der Plattenepithelkarzinome an der Invasionsfront beurteilt. Nach RNA-Extraktion aus kryoasservierten, gepaarten Tumor- und Lungenproben wurden mittels Microarray-Analyse (N = 2550 microRNAs) an einer kleineren, zufällig ausgewählten Subgruppe (N = 18) die microRNA-Expressionsunterschiede zwischen Lungen- und Tumorgewebe untersucht. Für neun der dysregulierten microRNAs, welche nach Literaturrecherche in verschiedenen Karzinomen mit Tumorinvasion und -metastasierung assoziiert sind, wurde die Expression mittels quantitativer Polymerasekettenreaktion am Gesamtkollektiv analysiert.

### 1.1.3 Ergebnisse

In der Microarray-Analyse ließen sich insgesamt 79 differenziell exprimierte microRNAs nachweisen. In der nachfolgenden Polymerasekettenreaktion konnte für acht microRNAs eine Hoch- (miR-31-5p, miR-205-5p, und miR-210-3p) beziehungsweise Herabregulation (miR-126-3p, miR-144-3p, miR-338-3p und miR-375-3p) bestätigt werden. Für miR-574-5p ließ sich eine Dysregulation nicht bestätigen. Pulmonale Plattenepithelkarzinome mit histologischem Nachweis einer Hämangiosis carcinomatosa zeigten eine signifikant niedrige Expression von miR-126-3p. Zudem ergab sich für das neuere Grading-System mittels der Phänomene „*tumor budding*“ und „*tumor nesting*“ an der Invasionsfront ein signifikanter negativer Zusammenhang zwischen einer Expression von miR-338-3p und miR-126-3p und der Tumordifferenzierung. Für die weiteren klinisch-pathologischen Parameter konnte am untersuchten Kollektiv kein signifikanter Zusammenhang mit der microRNA-Expression nachgewiesen werden.

### 1.1.4 Schlussfolgerung

Die Phänomene „*tumor budding*“ und „*tumor nesting*“ gelten als morphologisch erfassbare Korrelate der sogenannten epithelialen-mesenchymalen Transition. Die damit bezeichnete Lösung von Karzinomzellen aus dem Zellverband und Akquirierung mesenchymaler Eigenschaften gilt als wesentlicher Bestandteil der Invasion und Metastasierung. Die Ergebnisse zeigen an einem Kollektiv resezierter Plattenepithelkarzinomen der Lunge, dass die Herabregulation von miR-338-3p und miR-126-3p unabhängig von Tumorstadium, Alter und Geschlecht der Patienten mit einer prognostisch ungünstigen Differenzierung der Plattenepithelkarzinome und für miR-126-3p zusätzlich mit einer Hämangiosis carcinomatosa assoziiert ist. So scheinen diese microRNAs, als Suppressoren der epithelialen mesenchymalen Transition, die Tumordinvasion und -metastasierung zu beeinflussen. Ihre Herabregulation im Vergleich zum Normalgewebe stellt somit einen weiteren, einfach messbaren prognostischen Faktor und gegebenenfalls einen potenziellen Therapieansatz dar.

## **1.2 Englischsprachige Zusammenfassung**

### **1.2.1 Background**

MicroRNAs are single-stranded, short, non-coding ribonucleic acids that regulate protein translation. Therefore, they are able to control a multitude of molecular biological and pathological processes. Regarding malignant diseases, aberrant microRNA expression is known for many carcinomas. For non-small cell lung cancer they are involved in cancer initiation, progression, and metastasis through dysregulation of their target proteins. In addition, a connection between dysregulated microRNA expression and tumor differentiation could be demonstrated for pulmonary adenocarcinomas. The aim of this work was to check whether there is a connection between the expression of certain microRNAs and tumor differentiation or other clinical-pathological parameters in primary squamous cell carcinomas of the lung.

### **1.2.2 Material and methods**

A total of N = 45 patients with a resected primary squamous cell carcinoma of the lung were included in this study. The preserved specimens, which were used for diagnostics, were again microscopically evaluated. The histopathological findings were updated in accordance with the latest TNM classification (8th updated edition, 2020) if necessary. In addition, the degree of differentiation (so-called grading) was recorded using two different grading schemes: in addition to the grading scheme used at the time of initial diagnosis, a newer scheme was also used. This grading scheme assesses the tumor growth pattern at the invasion front by quantifying the phenomena of *“tumor budding”* and *“tumor nesting”*. After RNA extraction from paired tumor and tumor free lung tissue, microRNA expression was investigated by microarray analysis (N = 2550 microRNAs) on a smaller, randomly selected subgroup (N = 18). Nine of the dysregulated microRNAs, which are associated with tumor invasion and metastasis according to literature research were analyzed by quantitative polymerase chain reaction in the overall collective.

### **1.2.3 Results**

In the microarray analysis, a total of 79 differentially expressed microRNAs could be detected. In the subsequent polymerase chain reaction, the downregulation (miR-31-5p, miR-205-5p, and miR-210-3p) or upregulation (miR-126-3p, miR-144-3p, miR-338-3p and miR-375-3p) was confirmed for eight microRNAs. For miR-574-5p, dysregulation was not proven. Primary squamous cell carcinomas of the lung with histological evidence of blood vessel invasion showed a significantly lower expression of miR-126-3p. In addition, a significant correlation between downregulation of miR-338-3p and miR-126-3p and lower tumor differentiation was

found for the new grading system using "*tumor budding*" and "*tumor nesting*". For the other clinico-pathological parameters, no significant connection with microRNA expression could be demonstrated.

#### **1.2.4 Conclusion**

The phenomena of "*tumor budding*" and "*tumor nesting*" are regarded as morphological correlates of the so-called epithelial-mesenchymal transition. This molecularpathological process, which describes detachment of an individual carcinoma cell out of the cell group and the acquisition of mesenchymal properties, is considered an essential part of invasion and metastasis. The results of the presented study show in a group of resected specimens that the downregulation of miR-338-3p and miR-126-3p is associated with a poorer prognostic tumor grade of squamous cell carcinomas regardless of tumor stage, age and sex of the patients. Downregulation of miR-126-3p is also associated with blood vessel invasion. Thus, these microRNAs, as suppressors of the epithelial mesenchymal transition, might be able to inhibit tumor invasion and metastasis. Therefore, their underexpression is an easily measurable prognostic factor and possibly a potential therapeutic approach.

## 2 Einleitung

### 2.1 Die RNA-Welt-Hypothese

Das Leben auf unserem Planeten ist vor circa 450 Milliarden Jahren entstanden [132]. Gemäß der RNA-Welt-Hypothese ging es von in der Ursuppe abiologisch synthetisierten Ribonukleinsäuren (*ribonucleic acid*, RNA) aus [57]. Hierbei entscheidend war die Fähigkeit der RNA-Moleküle sich selbst anhand ihres eigenen genetischen Codes zu duplizieren. Im Rahmen dieser Duplikation kam es zu Rekombination und Mutation als Treiber der Evolution. So entwickelte sich unter Einfluss von Cofaktoren ein immer breiter werdendes Spektrum an enzymatischen Funktionen. Der nächste große Fortschritt war die Entstehung von Aminosäure-bindenden RNA-Molekülen, welche die Synthese von Aminosäureketten anhand einer RNA-Vorlage ermöglichten. Die katalytische Fähigkeit dieser ersten (primitiven) Proteine übertraf die der RNA-Moleküle bei Weitem, weshalb sich letztlich die Protein-vermittelten Reaktionen durchsetzten [57].

### 2.2 RNA heute

Wie heutzutage bekannt ist, entwickelte sich dennoch ein breites Spektrum an verschiedenen RNA-Subtypen mit verschiedenen Aufgaben innerhalb der Zelle [4]. Lange Zeit waren nur drei dieser Subtypen bekannt. Diese waren die für ein Protein kodierende *messenger RNA* (mRNA), sowie die nicht kodierende *transfer RNA* (tRNA) und *ribosomale RNA* (rRNA). Daher ging man davon aus, dass RNA nach Evolution der Proteinenzyme und der Desoxynukleinsäure (*deoxyribonucleic acid*, DNA) nur noch als Bindeglied zwischen DNA und Proteinen benötigt wurde. Dies stellte sich allerdings spätestens mit der Entdeckung weiterer Vertreter der nicht-kodierenden RNA (*non coding RNA*, ncRNA) und der sogenannten RNA-Interferenz als fälschlich heraus [4].

### 2.3 *Small non-coding RNA* und RNA-Interferenz

Die RNA-Interferenz spielt dabei eine Rolle in der posttranskriptionellen Regulation der Proteinbiosynthese [4]. Sie funktioniert über sequenz-spezifische Basenpaarung der bereits transkribierten mRNA mit ncRNA. Hinsichtlich der ncRNA unterscheidet man heutzutage drei Unterklassen: *piwi-interacting RNA* (piRNA), *short interfering RNA* (siRNA) und *microRNA* (miRNA) [4].

## 2.4 MiRNAs

Bisher sind 2654 humane miRNAs bekannt [60–62,96–98]. Am Beispiel der humanen miRNA 30c werden im Folgenden die Regeln der Nomenklatur der miRNAs erläutert [6]:

hsa	-	miR	-	30	c	-	5p
Spezies		miRNA		Sequenznummer	Familie		Strang

Spezies: Verschiedene Spezies werden durch einen 3-Buchstaben-Präfix unterschieden. hsa (*homo sapiens*) steht dabei für humane miRNAs. In dieser Arbeit ist, sofern kein anderes Präfix genannt, die humane miRNA beschrieben.

miRNA: miR benennt die miRNA selbst, während miR den zugehörigen Genlokus beziehungsweise die Stammsequenz benennt.

Sequenznummer: Die Benennung der miRNAs erfolgt numerisch nach Zeitpunkt ihrer Sequenzierung. Dabei wird meist für eine Sequenz die gleiche Nummer in allen Spezies vergeben.

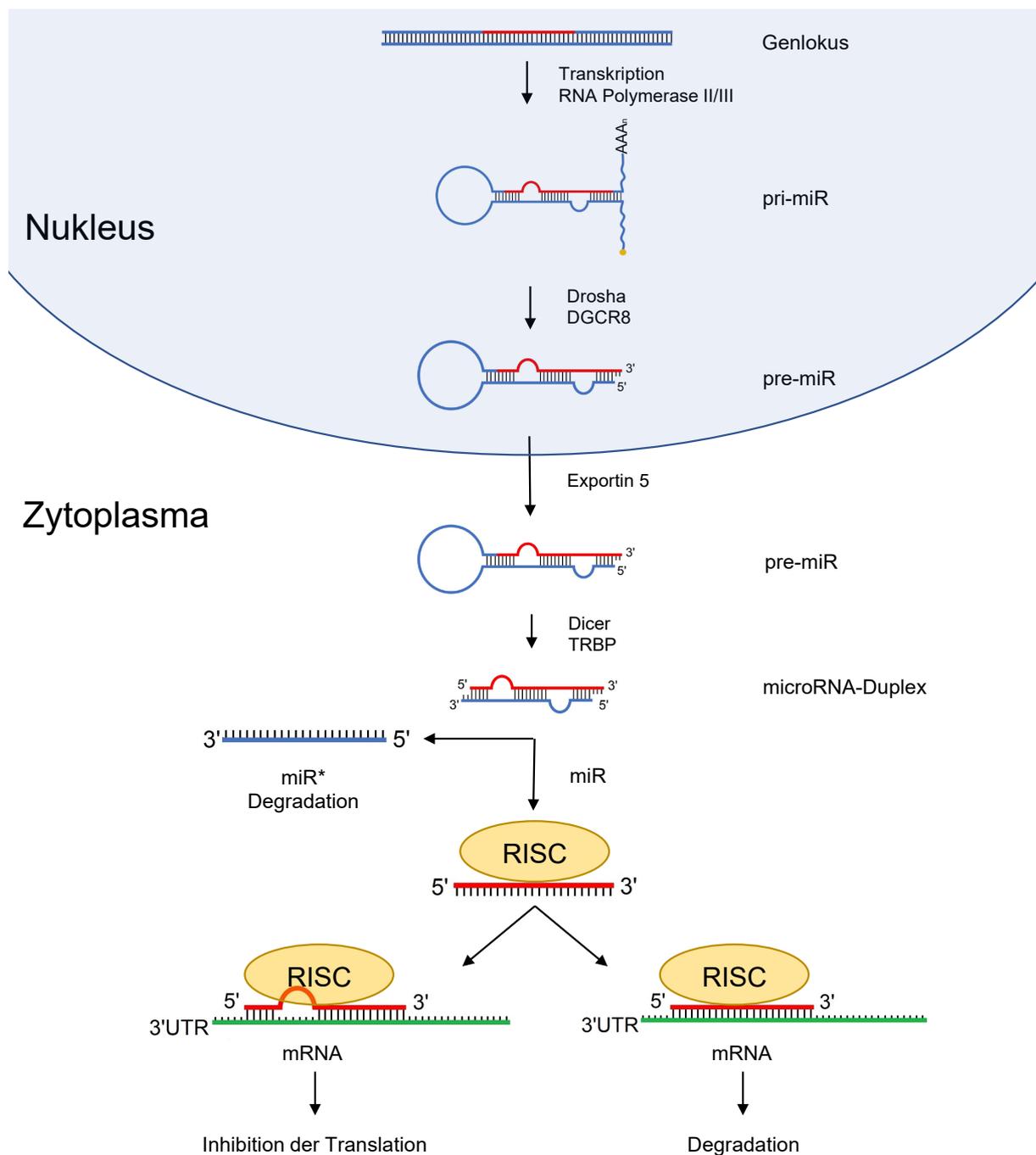
Familie: Manche miRNAs werden aufgrund ähnlicher Sequenzen zu Familien zusammengefasst. Diese werden jeweils mit Kleinbuchstaben in alphabetischer Reihenfolge ebenfalls nach Zeitpunkt ihrer Sequenzierung unterschieden.

Strang: Aus einer miRNA-Duplex können zwei miRNA entstehen (siehe Kapitel 2.4.1). Die 5p/3p-Nomenklatur gibt dabei an, aus welchem Arm der miRNA-Duplex (5- oder 3-Ende) die reife miRNA entstammt. In der früheren Nomenklatur wurde der prädominante Strang als miR bezeichnet, der andere komplementäre als miR\*. Die miR/miR\*-Nomenklatur wird zunehmend zugunsten der 5p/3p-Nomenklatur verlassen.

Ausnahmen bilden lin-4 und die let-7-Familie, deren Genlokus bereits vor Erstbeschreibung der miRNAs entdeckt wurde und deren Namensgebung aus historischen Gründen beibehalten wurde.

### 2.4.1 Biogenese der miRNAs

Die Biogenese der miRNAs beginnt im Nukleus mit der Transkription ihres Genlokus [137]. Dieser kann im Genom als eigenes Gen (monocistronisch) oder im Verband (Cluster) mit mehreren anderen miRNAs (polycistronisch) vorliegen [48]. Zudem sind auch miRNAs bekannt, welche innerhalb eines Introns eines proteinkodierenden Gens liegen, mit welchem sie gemeinsam transkribiert werden (intronisch, sogenannte „miRtrons“) [48,137]. Man unterscheidet den kanonischen sowie den nicht kanonischen Entstehungsweg [137]. Die kanonische Synthese ist in Abbildung 1 dargestellt.



**Abbildung 1: Kanonische Biogenese und Wirkungsmechanismus der microRNAs**

Im Nukleus beginnt die Biogenese der miRNAs mit der Transkription des Genlokus durch Polymerase II. Anschließend entfernt *Drosha* mit seinem Cofaktor *DiGeorge Syndrome critical region gene 8* (DGCR8) den 3' und 5' Überhang der entstandenen, circa 1000 nt langen *primary miRNA* (pri-miRNA). Die verbleibende Haarnadelstruktur aus 30-35 Basenpaaren wird als *precursor miRNA* (pre-miRNA) bezeichnet. Nach Transport über die Zellkernmembran durch Exportin-5 entfernt *Dicer* mit seinem Cofaktor HIV-1 transactivating response (TAR) RNA-binding protein (TRBP) die zentrale Schleife. Ein Strang der verbleibenden miRNA-Duplex wird als Leitstrang in den *RNA-induced silencing Complex* (RISC) eingebunden und bestimmt durch seine Sequenz dessen Wirkspektrum. Bei vollständiger, komplementärer Basenpaarung zwischen miRNA und mRNA wird die mRNA degradiert. Bei nur teilweiser, komplementärer Basenpaarung zwischen miRNA und mRNA wird die mRNA-Translation am Ribosom inhibiert. Erstellt nach [137].

Die meisten der miRNAs entstehen in der kanonischen Synthese [4,137,157]. Dabei beginnt die RNA Polymerase II mit der Transkription einer mehr als 1000 Nukleotiden langen *primary miRNA (pri-miRNA)* [107]. Diese besitzt eine zentrale Haarnadelstruktur aus 30-35 Basenpaaren, in der sich die Sequenz der reifen miRNA befindet [107]. Anschließend entfernt der sogenannte Mikroprozessorkomplex, bestehend aus der Ribonuklease III *Drosha*, ihrem Cofaktor *DiGeorge Syndrom critical region gene 8* (DGCR8) sowie weiteren Hilfsproteinen, die 3'- und 5'-Überstände [59,106]. Die verbleibende circa 70 Nukleotide lange Haarnadelstruktur wird als *precursor miRNA (pre-miRNA)* bezeichnet [137]. Nachfolgend wird diese durch Exportin-5 über die Kernmembran transportiert [122].

Im Zytoplasma entfernt die Ribonuklease III *Dicer* zusammen mit dem RNA-bindenden Cofaktor HIV-1 transactivating response (TAR) RNA-binding protein (TRBP) die zentrale Schleife [11,47]. Die entstandene miRNA-Duplex wird in den sogenannten *RNA-induced silencing Complex* (RISC) geladen [147]. Dieser beinhaltet als zentrale Einheit ein Protein aus der Argonaut-Familie (AGO 1-4) [147]. Einer der beiden miRNA-Stränge wird am Argonaut-Protein verankert [128]. Dieser wird auch als Leitstrang oder miR bezeichnet. Der komplementäre Strang, auch als miR\* bezeichnet, wird degradiert. Das genaue Verhältnis miR/miR\* variiert dabei je nach miRNA und zellulärer Umgebung [128].

Wenige miRNAs entstehen in nicht kanonischen Synthesewegen, welche Teile der bereits beschriebenen Enzymkaskade beinhalten [137]. Ein Beispiel hierfür sind die bereits zuvor erwähnten miRtrons, welche beim Splicen der mRNA entstehen und Drosha-prozessierten pre-miRNAs entsprechen [158].

#### **2.4.2 Mechanismen der mRNA-Regulation**

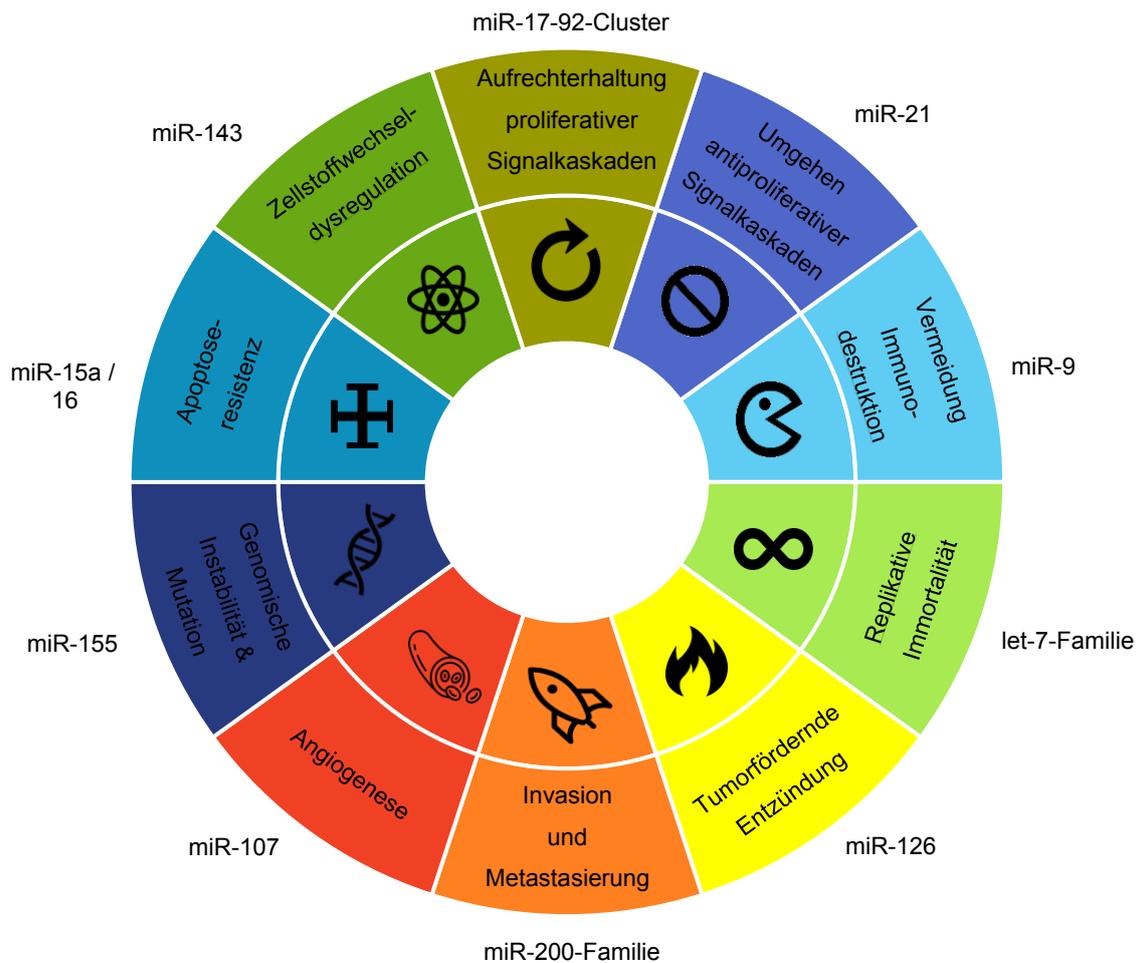
In der Regel binden miRNAs die Ziel-mRNA über komplementäre Basenpaarung zu einem am 3' untranslatierten Ende (*3' untranslated region, 3'UTR*) lokalisierten, wenige Basenpaare langen, nicht kodierenden Bereich (sogenannte *seed region*) der mRNA [9]. Allerdings wurden auch weitere Bindungsstellen zum Beispiel in der 5'UTR der mRNA beschrieben [123]. Bei vollständiger komplementärer Basenpaarung kann Argonaut 2 als Endonuklease den Polyp(A)-Schwanz der miRNA entfernen, was einen Abbau der mRNA durch Exonukleasen ermöglicht [4,80]. Die drei weiteren humanen Argonautproteine (1,3 und 4) hingegen besitzen keine Endonukleaseaktivität [4,137]. Zudem kommt in humanen Zellen eine vollständige Komplementarität nur selten vor, sodass die Blockade der mRNA-Translation als führender Mechanismus überwiegt [4,137]. Hierbei wurden unterschiedliche prä- und peritranslatorische Mechanismen postuliert [144]. Einer hiervon ist die Inhibierung der Translationsinitiation durch kompetitive Hemmung des eukaryotischen Initiationsfaktors 4E [92]. Zudem bindet AGO2 den mit der 60S-Untereinheit assoziierten eukaryotischen Initiationsfaktor 6 und verhindert damit

die Bindung der ribosomalen Untereinheiten [31]. Weitere Hypothesen beschreiben die Inhibition der Elongation durch Bindung bereits teilweise translatierter mRNA bis hin zur verfrühten Dissoziation von Ribosomen und mRNA (*ribosomal drop off*) [148] sowie die kotranslationale Proteindegradation, also den Abbau der gerade entstanden Aminosäurekette [136]. Zudem gibt es Hinweise, dass miRNAs unter bestimmten Bedingungen auch zur Aktivierung der Translation führen können [188].

Gerade aufgrund der meist nicht vollständigen Komplementarität der *seed region* sowie weiteren möglichen Bindungsstellen kann eine miRNA eine Vielzahl von mRNAs regulieren [4,9]. Im Umkehrschluss kann aber auch eine mRNA durch verschiedene miRNAs kontrolliert werden [4,9]. Hierdurch entstehen komplexe Netzwerke, welche an der Regulation vielfältiger physiologischer Prozesse wie dem Zellzyklus, der Zelldifferenzierung, der Apoptose und auch pathologischer Prozesse wie der Neurodegeneration sowie der Karzinogenese beteiligt sind [114].

### **2.4.3 MiRNAs im Kontext der Karzinogenese**

Die Karzinogenese ist ein vielschrittiger und komplexer Prozess, welcher bislang noch nicht vollständig verstanden ist [69,70]. Basierend auf histomorphologischen Beobachtungen sind für gewisse Karzinome Vorläuferläsionen beschrieben worden: Als häufiges Beispiel hierfür wird die Entstehung des Kolonkarzinoms aus Adenomen im Sinne einer sogenannten Adenom-Karzinom-Sequenz angeführt [156]. Im Rahmen solcher Prozesse entstehen zunehmend maligne Zellen [69]. Die zugrundeliegenden Veränderungen der Zellbiologie wurden in den sogenannten „*Hallmarks of Cancer*“ [69,70] zusammengefasst (siehe Abbildung 2). Diese umfassen acht wesentliche Eigenschaften einer Tumorzelle: Zusätzlich wurden zwei notwendige Aktivierungsmerkmale (sogenannte „*enabling characteristics*“) benannt: Die genomische Instabilität und die tumorfördernde Entzündung [69,70].



**Abbildung 2: Hallmarks of Cancer**

Aufgeführt sind die acht postulierten *Hallmarks of Cancer* sowie die beiden Aktivierungsmerkmale (tumorfördernde Entzündung und Genomische Instabilität & Mutation). Zu jedem Punkt ist exemplarisch eine in Zusammenhang stehende miRNA aufgeführt. Erstellt nach [70].

Bei Studien über die chronische lymphatische Leukämie (CLL) konnte erstmals ein Zusammenhang zwischen dysregulierten miRNAs und den *Hallmarks of Cancer* bewiesen werden: Die bei CLL häufig deletierte Chromosomenregion 13q14 beherbergt den Genlokalus zweier miRNAs (miR-15a und miR-16) [21]. Diese miRNAs regulieren u.a. die Apoptose durch Repression von *B-Cell-Lymphoma-2 (bcl2)*, einem antiapoptotischem Onkogen der CLL [33,189]. Eine gezielte Deletion dieser beiden miRNAs führt im Mausmodell durch Verlust des Kontrollmechanismus von *bcl2* zu gesteigerter Proliferation, Apoptoseresistenz und dem phänotypischen Bild einer CLL [93].

Nachfolgend konnte für zahlreiche Karzinome wie beispielsweise dem Bronchialkarzinom ein Zusammenhang zwischen dysregulierten miRNAs und der Tumorgenese gezeigt werden [108,114,208].

## **2.5 Bronchialkarzinom**

### **2.5.1 Epidemiologie**

Nach Daten der deutschen Krebsgesellschaft [223] sind in Deutschland im Jahr 2016 rund 57.500 Menschen, davon 21.500 Frauen, am Bronchialkarzinom erkrankt. Das mittlere Erkrankungsalter lag bei 69 Jahren in der weiblichen sowie bei 70 Jahren in der männlichen Population. Die Prognose des Bronchialkarzinoms ist trotz einiger neuer Therapieansätze weiterhin ungünstig. Die Sterbefälle betragen im Jahr 2016 rund 45.800, davon 16.500 Frauen. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate über alle Tumorstadien und alle Subtypen belief sich auf rund 21 % (Frauen) beziehungsweise 15 % (Männer). Das mittlere Sterbealter betrug 71 Jahre in der weiblichen und 72 Jahre in der männlichen Population. Damit sind Neoplasien der Lunge hierzulande bei Männern die häufigste und bei Frauen nach dem Mammakarzinom die zweithäufigste malignombedingte Todesursache [223].

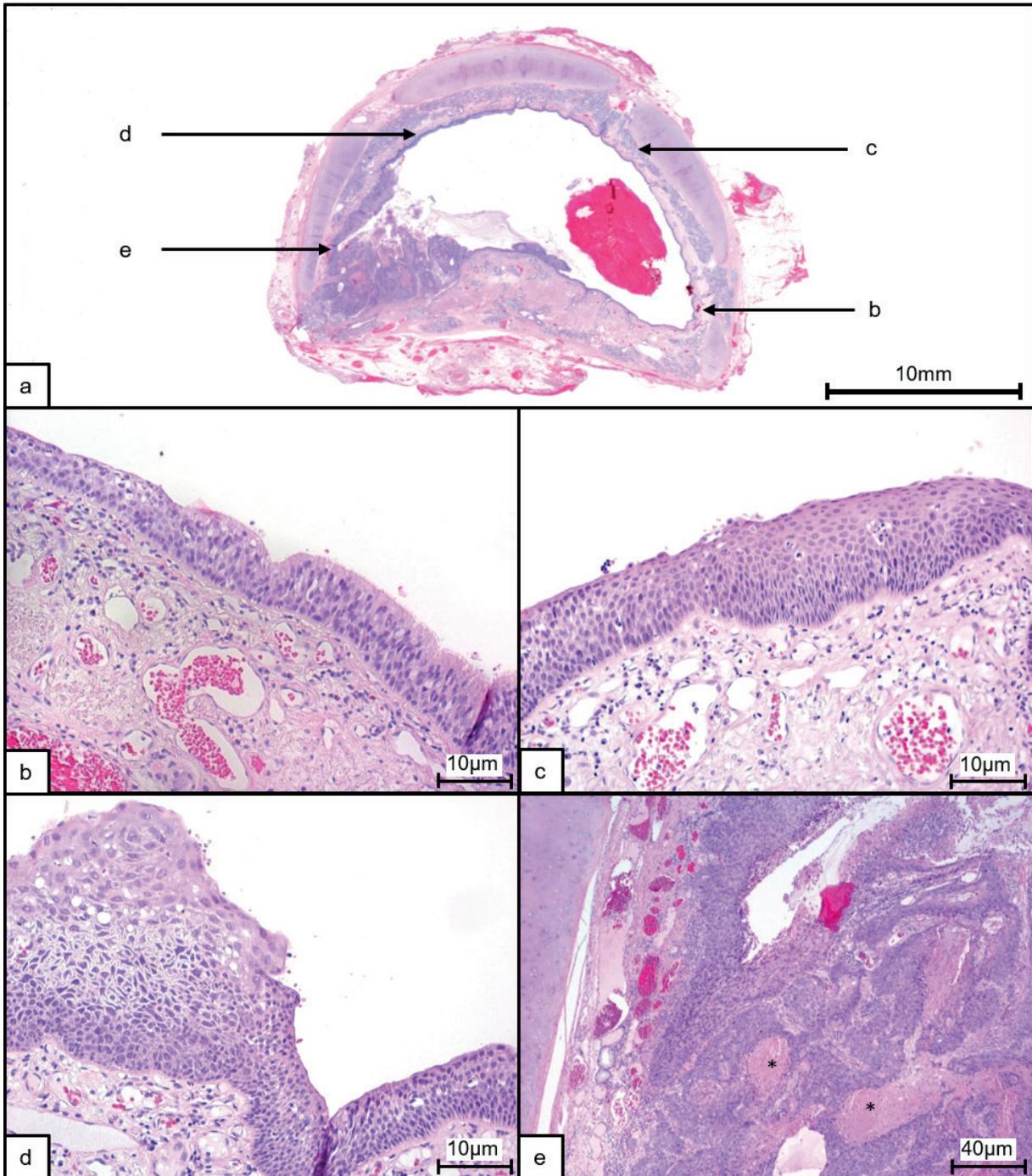
### **2.5.2 Pathologisch-anatomische Aspekte**

Die meisten Neoplasien der Lunge sind Bronchialkarzinome. Die häufigsten Subtypen sind Adenokarzinome (AC), Plattenepithelkarzinome (PEC), großzellige Karzinome und kleinzellige Lungenkarzinome (*small cell lung cancer*, SCLC) [228]. Die frühere Unterscheidung zwischen SCLC und nicht kleinzelligen Bronchialkarzinomen (*non-small cell lung cancer*, NSCLC) ist historisch aufgrund der schlechten Prognose des SCLC bedingt [109,228]. Diese Unterscheidung ist heutzutage für die Klassifikation von Lungenresektaten obsolet, da zum einen das SCLC heute als ein Subtyp der neuroendokrinen Neoplasien der Lunge gilt [228]. Zum anderen muss die heterogene Gruppe der NSCLCs aufgrund teils unterschiedlicher Therapieansätze, wenn immer möglich, genau typisiert werden [109,185]. Der Begriff des NSCLC soll nach WHO-Klassifikation heutzutage nur noch in der Zytologie- und Biopsie-Diagnostik verwendet werden, wenn sich histologisch und immunhistologisch ein klar definierter Subtyp nicht sichern lässt [185,228].

### **Plattenepithelkarzinom der Lunge**

Der Hauptrisikofaktor für die Entstehung von PECs ist das Rauchen [104,109,163]. Weitere Risikofaktoren sind Exposition gegenüber Asbest, Radon, Dieselmotorenemissionen und Industrieschadstoffen [109]. Diese kanzerogenen Schadstoffe führen bei dauerhafter Einwirkung zur Ausbildung von zunächst benignen Vorläuferläsionen und letztendlich zur malignen Transformation (siehe Abbildung 3) [104,163]. Im ersten Schritt degeneriert das respiratorische Flimmerepithel mit kompensatorischer Hyperplasie der Basalzellen. Bei weiterbestehender Einwirkung der Noxen reifen die Basalzellen jedoch nicht mehr zu Flimmerepithel, sondern zu widerstandsfähigerem Plattenepithel aus. Dieses als Plattenepithelmetaplasie bezeichnete Phänomen gilt noch nicht als neoplastisch und ist bei

Karenz der auslösenden Noxe reversibel. Treten im weiteren Verlauf u.a. durch mutationsbedingten Verlust oder Hypermethylierung von Tumorsuppressoren atypische Zellformen in der Basalzone auf, spricht man von einer leichtgradigen Plattenepitheldysplasie. Im Stadium der leichtgradigen Dysplasie ist eine regelrechte Ausreifung des Plattenepithels nach luminal noch gegeben. Ist diese nicht mehr erkennbar, also lassen sich atypische Zellformen auch in den obersten Zellschichten finden, spricht man bereits von einer schwergradigen Dysplasie. Ein *Carcinoma in situ* liegt vor, wenn keine Ausreifungstendenz von basal nach luminal mehr erkennbar ist. Dabei bezeichnet *Carcinoma in situ* ein Karzinom, welches sich noch am „ursprünglichen Ort“ innerhalb des Epithels befindet. Der Durchbruch der Basalmembran kennzeichnet den Übergang zum invasiven Karzinom [104,163].



**Abbildung 3: Vorläuferläsionen des Plattenepithelkarzinoms der Lunge**

(a) zeigt die Übersichtsvergrößerung eines Bronchusquerschnitts. Bereits in schwacher Vergrößerung ist der schrittweise Übergang in ein invasives PEC zu erkennen. HE-Färbung 2-fache Vergrößerung.

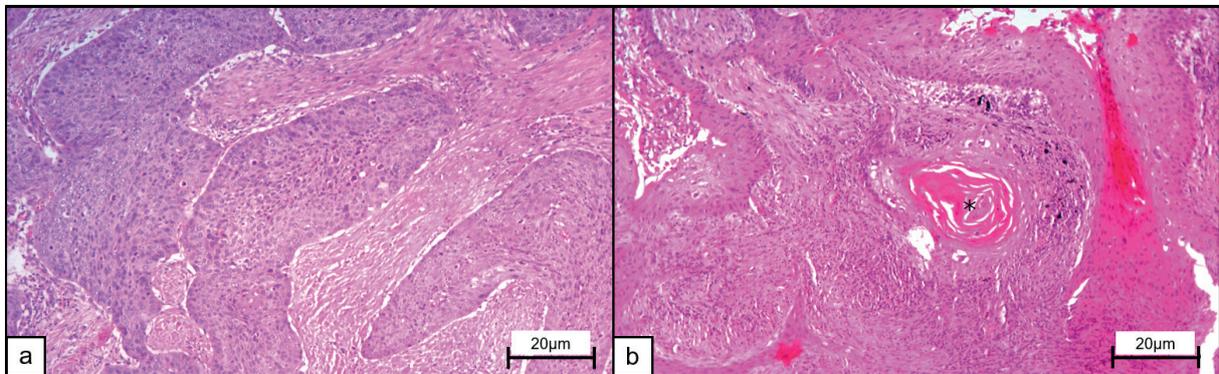
(b) Das Kinozilien besetzte Flimmerepithel (rechts unten) zeigt eine Basalzellhyperplasie und wird von dysplasiefrei ausreifendem Plattenepithel (links oben) abgelöst. HE-Färbung, 400-fache Vergrößerung.

(c) Die basale Zelllage des Plattenepithels ist links im Bild deutlich verbreitert mit einzelnen irregulär geformten Zellkernen. Eine Ausreifung nach luminal ist noch gegeben (leichtgradige Dysplasie). HE-Färbung, 400-fache Vergrößerung.

(d) In der linken Bildhälfte finden sich atypische Plattenepithelzellen mit vergrößerten, vesikulären Zellkernen auf der gesamten Breite des Epithels. Eine Unterscheidung zwischen basal und luminal ist morphologisch allerdings noch möglich (schwergradige Dysplasie). HE-Färbung, 400-fache Vergrößerung.

(e) Mit Durchbruch der Basalmembran ist hier bereits der Übergang vom Carcinoma in situ zum invasiven PEC gegeben. Zu erkennen sind strang- und nestförmige Tumorzellformationen mit zentralen, eosinophilen Nekrosen (\*). HE-Färbung, 100-fache Vergrößerung.

Die Tumorklassifikation der Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organization, WHO*) unterscheidet zwischen verhornenden und nicht verhornenden PECs [202]. Verhornungen und Ausbildung von Hornperlen sind die pathognomischen Kennzeichen der verhornenden PECs (siehe Abbildung 4). Diese zeigen meist auch Interzellularbrücken und eine gewisse Schichtungstendenz der Tumorzellen auf, welche noch an Plattenepithel erinnert. Nicht verhornende PECs hingegen zeigen keine Keratinisationsphänomene und wachsen meist strangförmig oder in soliden Formationen, sodass eine sichere Unterscheidung von anderen Entitäten oft nur durch immunhistochemische Untersuchungen möglich ist. Als wichtigster immunhistochemischer Marker für das PEC gilt hierbei das Protein p40, eine Isoform des Proteins p63. In Abgrenzung zum pulmonalen AC exprimieren PECs kein TTF-1 (thyroidaler Transkriptionsfaktor 1) [202].



**Abbildung 4: Verhornendes und nicht verhornendes Plattenepithelkarzinom**

Dargestellt sind die beiden Subtypen des PECs. (a) nicht verhornendes PEC (HE-Färbung, 100-fache Vergrößerung) (b) verhornendes PEC mit stark eosinophiler Hornperle(\*) (HE-Färbung, 100-fache Vergrößerung).

Das basaloide PEC wird als weitere Subentität angesehen, welche durch kleine Zellen mit basophilem Zytoplasma, lobulärer Architektur und peripherer Pallisadenbildung gekennzeichnet ist [202]. Ein basaloide PEC wird diagnostiziert, wenn mindestens 50 % des Tumors den zuvor aufgeführten Kriterien entsprechen [202].

## **TNM-Klassifikation**

Die pathologische Diagnostik umfasst die Beurteilung eines Resektates hinsichtlich Tumorentität sowie Tumorgröße, Tumorausdehnung in regionäre Lymphknoten und der Vollständigkeit der Resektion [7]. Diese Befunde werden kurz in der TNM-Klassifikation (**tumor nodes metastases**) zusammengefasst. Sie wird ergänzt durch weitere Klassifikatoren wie das Vorliegen einer Lymph- oder Hämangiosis carcinomatosa (L und V), einer Perineuralscheideninfiltration (Pn) oder den Resektionsstatus (R). Anhand der TNM-Formel erfolgt die Einteilung gemäß Vorgaben der Internationalen Vereinigung gegen Krebs (*Union internationale contre le cancer*, UICC) in die Stadien I bis IV, anhand denen sich die leitliniengerechte Therapie orientiert. Die zum Zeitpunkt dieser Arbeit gültige TNM-Klassifikation (8. aktualisierte Auflage, 2020) und die Einteilung der UICC-Stadien der Bronchialkarzinome [7] sind im Anhang angefügt.

## **Grading**

Für die meisten Karzinome stellt zudem der Grad der Differenzierung bzw. Entdifferenzierung einen wesentlichen prognostischen Faktor dar [206]. Man unterscheidet hierbei zwischen gut differenzierten (G1) bis undifferenzierten (G4) Neoplasien [18]. Während bei pulmonalen ACs anhand des histologischen Wachstumsmusters ein prognostisch aussagekräftiges Grading-System eingeführt werden konnte, ist derzeit bei PEC noch kein einheitliches, prognoseorientiertes Grading etabliert [13,186,202]. Für das bislang am häufigsten durchgeführte Grading anhand zellulärer morphologischer Merkmale (wie z.B. Kernpleomorphie, Vorhandensein oder Fehlen von Interzellularbrücken, Verhornung oder Nekrosen) [154] konnte keine sichere prognostische Aussagekraft nachgewiesen werden [186]. Weichert et al. [203] und Kadota et al. [86] konnten unabhängig voneinander zeigen, dass die Befunde an der Invasionsfront primärer Plattenepithelkarzinome der Lunge, die Phänomene *tumor nesting* beziehungsweise *tumor budding* eine prognoseorientierte Einteilung der PECs ermöglichen. Als *tumor nesting* bezeichnet man dabei die Ausbildung von Verbänden aus invasiven Tumorzellen, welche vollständig von Tumorstroma umgeben sind. Als *tumor budding* werden kleine Tumorzellverbände (weniger als 5 Zellen) bezeichnet, welche von größeren Zellnestern „abzweigen“ und ins angrenzende Stroma „ausknospen“ [203]. Insbesondere das *tumor budding* wird dabei als morphologisches Korrelat der sogenannten epithelialen mesenchymalen Transition angesehen [63].

## 2.6 Epitheliale mesenchymale Transition

Epithelien bilden die Auskleidung äußerer und innerer Körperoberflächen [204]. Sie besitzen eine polare Ausrichtung und liegen basalseitig auf einer Basalmembran auf [204]. Die einzelnen Epithelzellen sind mit der Basalmembran und als Zellverband untereinander fest durch Adhäsionskontakte verbunden [204]. Mesenchymzellen des Binde- und Stützgewebes hingegen liegen in einer lockeren Extrazellulärmatrix [204].

Ein wesentlicher Bestandteil der Adhäsionskontakte zwischen Epithelzellen ist die Proteingruppe der Cadherine, insbesondere E-Cadherin [204]. Innerhalb der sogenannten *Zonula adhaerens* binden transmembranär gelegene E-Cadherin-Moleküle einander im Extrazellulärraum und bilden hierdurch eine feste, mechanische Verbindung zwischen den Zellen [4,204]. E-Cadherin selbst ist durch sogenannte Plaqueproteine (u.a.  $\alpha$ -,  $\beta$ -Catenin und p120) mit den Aktin- und Intermediärfilamenten im Zytosol verankert [4,204].

Epitheliale mesenchymale Transition (EMT) bezeichnet Akquirierung eines mesenchymalen (fibroblastoiden) Phänotyps mit Lösung der Epithelzelle aus dem Zellverband und Verlust der Zellpolarität [87]. Dieser Prozess wurde zunächst in der Embryonalentwicklung beschrieben (EMT Typ 1), trägt aber zu einigen physiologischen Prozessen wie zum Beispiel der Wundheilung bei (EMT Typ 2). Ferner wird die EMT auch als essenzieller Bestandteil der Karzinomprogression und -metastasierung angesehen (EMT Typ 3) [87].

Ein Zusammenhang zwischen dem Verlust der Expression von E-Cadherin und der Tumorprogression und -metastasierung konnte mehrfach nachgewiesen werden [87]. Die EMT im Rahmen der Karzinogenese ist allerdings nicht als eigenständiger Prozess anzusehen, sondern wird durch die Tumorumgebung wesentlich beeinflusst [172]. Insbesondere die tumorfördernde Inflammation – als einer der beiden zugrundeliegenden Mechanismen der Tumorprogression (siehe 2.4.3) – hat einen wesentlichen Einfluss [172]. Tumorassoziierte Makrophagen (TAMs) gelten als potente Induktoren der EMT durch Sekretion multipler Wachstumsfaktoren und inflammatorischen Zytokinen [15]. Unter Einfluss dieser Botenstoffe produzieren die Tumorzellen vermehrt Matrix-Metalloproteinasen, welche E-Cadherin und Moleküle der extrazellulären Matrix spalten [124]. Hierdurch wird unter anderem die Migration der Tumorzellen ermöglicht [124]. In benignen als auch malignen Erkrankungen ist zudem auch bekannt, dass sich proinflammatorische und angiogenetische Kaskaden durch gemeinsame Schlüssel-moleküle gegenseitig aktivieren: Verschiedene proinflammatorische Zytokine setzen durch die vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren (*vascular growth factor*, VEGF) gesteuerte Signalkaskaden in Gang, wenngleich die VEGF-Familie selbst als starker Treiber der Inflammation gilt [3,22].

Zusammenfassend ist die EMT somit mit einer *Hallmark of Cancer* und einer *enabling characteristic* fest assoziiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass bestimmte miRNAs

proinflammatorische als auch proangiogenentische Prozesse regulieren können (siehe Abbildung 2). Somit kann auch für das PEC eine Relevanz der miRNAs angenommen werden.

## **2.7 MiRNAs beim Plattenepithelkarzinom der Lunge**

Weltweit wurden gewebespezifische und tumorspezifische miRNA-Expressionsprofile erstellt [65,193,198]. Die Ergebnisse der einzelnen Studien sind aufgrund unterschiedlicher Verfahren und Patientenkollektive teils sehr heterogen. In Metanalysen [65,193,198] konnten jedoch bereits einige miRNAs bestimmt werden, welche häufig bei Bronchialkarzinomen dysreguliert sind. Ein Großteil der Studien berücksichtigt allerdings das PEC der Lunge nicht als eigenständige Entität, sondern fassten dieses unter den NSCLC mit dem AC und anderen Subtypen zusammen [65,193,198]. Es konnte jedoch bereits gezeigt werden, dass sich die Expression der miRNAs zwischen einzelnen Subtypen deutlich unterscheiden [56]. Ferner konnte sogar eine differenzielle miRNA-Expression zwischen Wachstumsmustern des pulmonalen AC und somit indirekt in Abhängigkeit des Grading gezeigt werden [130]. In Abhängigkeit vom Grading liegen derartige Daten für das PEC derzeit noch nicht vor.

## **2.8 Fragestellung der Arbeit**

1. Wie ist die Verteilung der klinisch-pathologischen Parameter in der untersuchten Stichprobe?
2. Welche miRNA sind in der Microarray-Analyse in den primären PECs im Vergleich zum tumorfreien Lungengewebe dysreguliert?
3. Lassen sich die Ergebnisse der Microarray-Analyse mittels qPCR bestätigen?
4. Korrelieren die dysregulierten miRNAs mit den TNM- und Grading-Parametern der PECs?
5. Zeigen sich Unterschiede der dysregulierten miRNAs im Vergleich zu den weiteren klinisch-pathologischen Parametern?

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 1: Verwendete Verbrauchsmaterialien**

Produkt	Produktbezeichnung	Hersteller
96-Well-PCR Folie	MicroAmp Optical Adhesive Film	ThermoFisher Scientific Corp. 02451 Waltham Massachusetts, USA
96-Well-PCR-Platten	MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate	ThermoFisher Scientific Corp. 02451 Waltham Massachusetts, USA
Deckgläser	Deckgläser 24x32mm	R. Langenbrick GmbH 79312 Emmendingen
Dekontaminationsspray	MBP Molecular BioProducts Rnase Away	ThermoFisher Scientific Corp. 02451 Waltham Massachusetts, USA
Einbettmedium Kryostat	Tissue-Tek O.C.T Compound	Sakura Finetek Germany GmbH 79219 Staufen
Eindeckmedium	Entellan Neu	Merck KGAA 64293 Darmstadt
Eppendorfer Reaktionsgefäß	Biosphere Safe Seal Tube	Sarstedt AG & Co. KG 51588 Nümbrecht
Färbeküvetten / Färbegestell	Färbekasten Standard Sodaglas	witeg Labortechnik GmbH 97877 Wertheim
Kryo-Röhrchen	CryoPure 2 ml Röhrchen mit Innengewinde	Sarstedt AG & Co. KG 51588 Nümbrecht
Mikrotomklingen	C35 type microtome blades	pfm medical Institute gGmbH 50996 Köln
Silica-Membran-Säulen	miRNeasy Mini Spin Column	QIAGEN GmbH 40724 Hilden
Objektträger	SuperFrost Ultra plus Objektträger	R. Langenbrick GmbH 79312 Emmendingen
Pipettenspitzen, verschiedene Größen	epT.I.P.S Motion	Eppendorf AG 22339 Hamburg

### 3.1.2 Geräte

**Tabelle 2: Verwendete Laborgeräte**

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Beheiztes Wasserbad	VWB12	VWR International GmbH 64295 Darmstadt
Chipelektrophoresesystem	2100 BioAnalyzer Instrument	Agilent Technologies Inc. 95051 Santa Clara, Kalifornien, USA
Kryoasservateschrank	V. I.P. Series Freezer MDF-U32V	Sanyo Denki Germany GmbH 65760 Eschborn
Inkubationsschüttler	peqlab thriller	VWR International GmbH 64295 Darmstadt
Kryostatmikrotom	CM 1850 UV	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH 35578 Wetzlar
Mikroskop	Olympus BH2	Olympus Europa SE & Co. KG 20097 Hamburg
Kameramikroskop	Axioskop 40 mit Axiocam MRc	Carl Zeiss AG 73447 Oberkochen
Mikrozentrifuge	PerfectSpin Mini	Peqlab Biotechnologie GmbH, 91052 Erlangen
Pipetten, versch. Größen	Research plus	Eppendorf AG 22339 Hamburg
Spektralphotometer (mit zugehöriger Software)	NanoDrop 1000 Spectrophotometer	ThermoFisher Scientific Corp. 02451 Waltham Massachusetts, USA
Thermocycler (mit zugehöriger Software)	QuantStudio3	ThermoFisher Scientific Corp. 02451 Waltham Massachusetts, USA
Tischkühlzentrifuge	Sigma 1k15	SIGMA Laborzentrifugen GmbH 37507 Osterode
Universalzentrifuge	Z 326 K	HERMLE Labortechnik GmbH 78564 Wehingen

**Fortsetzung Tabelle 2: Verwendete Laborgeräte**

---

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Objekträger- /Filmscanner	Nikon LS-5000 ED	Nikon GmbH 40472 Düsseldorf
Vibrationsmischer	peqTWIST	Peqlab Biotechnologie GmbH, 91052 Erlangen
Fluoreszenzscanner	SureScan Microarray Scanner	Agilent Technologies Inc. 95051 Santa Clara, Kalifornien, USA

---

### 3.1.3 Reagenzien

**Tabelle 3: Verwendete Reagenzien**

Produkt	Produktbezeichnung	Hersteller
Chloroform	Chloroform (stabilisiert mit 0,6 % Ethanol)	VWR International GmbH 64295 Darmstadt
Essigsäure	Essigsäure 100 %	Carl Roth GmbH 76185 Karlsruhe
Eosin	Eosin G-Lösung 0,5 %, wässrig	Merck KGaA 64271 Darmstadt
Ethanol	Ethanol absolute	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 89555 Stenheim am Albuch
Formalin	Formalaldehyd-Lösung 4,0 % gepuffert	Otto Fischar GmbH & Co. KG 66133 Saarbrücken
(Alaun-) Hämtotoxylin	Haemalaun-Lösung nach Mayer, sauer	Waldeck GmbH und Co. KG 48161 Münster
Reagenzien Reverse Transkription	miScript II RT Kit 5x miScript HiSpec Buffer 10x miScript Nucleics Mix miScript Reverse Transcriptase Mix	QIAGEN GmbH 40724 Hilden
RNase-freies Wasser	RNase-freies Wasser (DECP- frei)	QIAGEN GmbH 40724 Hilden
Reagenzien Polymerase- kettenreaktion	miScript SYBR Green PCR Kit 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix 10x miScript Universal Primer	QIAGEN GmbH 40724 Hilden
Reagenzien RNA-Isolation	miRNeasy Mini Kit QIAzol Lysis Reagent Buffer RWT Buffer RPE	QIAGEN GmbH 40724 Hilden
Reagenzien Microarray	Human miRNA Microarray, Release 21.0, 8 x 60K	Agilent Technologies Inc. 95051 Santa Clara, Kalifornien, USA
Xylol	Xylol (Isomerenmischung)	Aug. Heidinger GmbH & Co. KG 70327 Stuttgart

### 3.1.4 Primer

**Tabelle 4: Verwendete Primer**

miScript Primer Assay	Verwendung	miRNA-Sequenz
Hs_miR-31_1	Nachweis von hsa-miR-31-5p	5'AGGCAAGAUGCUGGCAUAGCU3'
Hs_miR-126_1	Nachweis von hsa-miR-126-3p	5'UCGUACCGUGAGUAAUAAUGCG3'
Hs_miR-144_4	Nachweis von hsa-miR-144-3p	5'UACAGUAUAGAUGAUGUACU3'
Hs_miR-200b_3	Nachweis von hsa-miR-200b-3p	5'UAAUACUGCCUGGUAUGAUGA3'
Hs_miR-205_1	Nachweis von hsa-miR-205-5p	5'UCCUUCAUCCACCGGAGUCUG3'
Hs_miR-210_1	Nachweis von hsa-miR-210-3p	5'CUGUGCGUGUGACAGCGGCUGA3'
Hs_miR-338_1	Nachweis von hsa-miR-338-3p	5'UCCAGCAUCAGUGAUUUUGUUG3'
Hs_miR-375_2	Nachweis von hsa-miR-375-3p	5'UUUGUUCGUUCGGCUCGCGUGA3'
Hs_miR-574-5p_2	Nachweis von hsa-miR-574-5p	5'UGAGUGUGUGUGUGAGUGUGU3'
Hs_RNU6-2_11	Nachweis von RNU6B Endogene Referenz	
Ctrl_miRTC_1	Überprüfung Reverse Transkription	

Hersteller: QIAGEN GmbH, 40724 Hilden

### 3.1.5 Programme

**Tabelle 5: Verwendete Programme**

Programm	Verwendung	Entwickler
Microsoft Office	Verfassen der Arbeit	Microsoft Corporation Redmond, Washington USA
RStudio	Statistische Auswertung	Posit Software, Public-benefit corporation Boston, Massachusetts USA
Mendeley	Literaturverwaltung	Elsevier GmbH 80335 München
Zen – Digital Imaging für Lichtmikroskopie	Fotodokumentation	Carl Zeiss Microscopy Deutschland GmbH 73446 Oberkochen

### 3.2 Versuchsaufbau

Aus im Rahmen einer chirurgischen Tumorresektion entnommenen und sekundär kryoasservierten Gewebeproben von N = 45 PECs wurde miRNA isoliert und die Expressionsmuster mittels Microarray untersucht. Die Ergebnisse des Microarrays wurden nachfolgend mittels quantitativer Polymerasekettenreaktion validiert. Abbildung 1 zeigt einen schematischen Überblick des Versuchsablaufs.

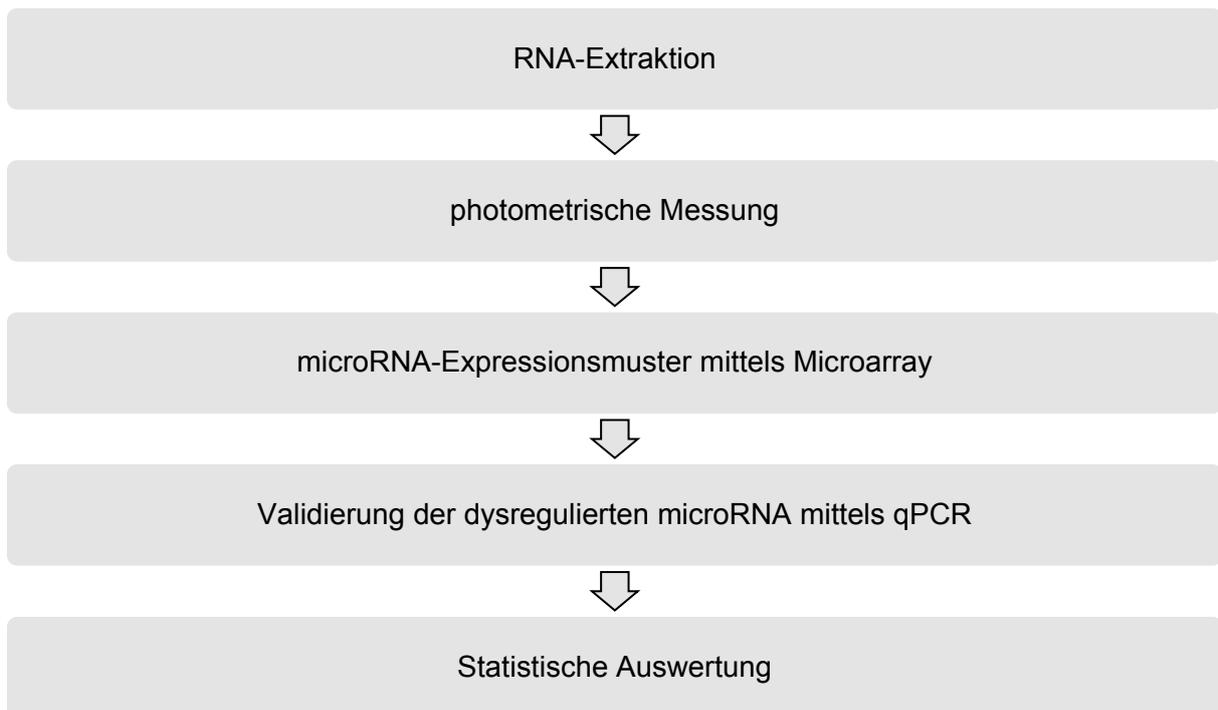


Abbildung 5: Versuchsablauf

### 3.3 Patientenkollektiv

Nach leitliniengerechter Diagnostik können PECs primär chirurgisch reseziert werden [109]. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Gewebeproben entstammen von Patienten, welche in der Herz-Thorax-Chirurgie des Universitätsklinikums des Saarlandes im Zeitraum 2010 bis 2015 operiert wurden. Die Lungenteilresektate wurden schnellstmöglich nativ an das Institut für Allgemeine und Spezielle Pathologie übersendet und durch ärztliche Mitarbeiter makroskopisch begutachtet. Zeitnah wurde sowohl natives Tumorgewebe als auch makroskopisch tumorfreies Lungengewebe entnommen und bei -80 °C asserviert.

Nach Formalinfixierung erfolgte im Rahmen der Routinediagnostik die weitere makroskopische Aufarbeitung des Resektates, die Herstellung der Paraffinblöcke und Schnitte zur histologischen Beurteilung.

### 3.4 Erhebung pathologischer Standardparameter

Die im Institut für Pathologie archivierten HE-Schnitte wurden nachmikroskopiert und die damals vergebene TNM-Klassifikation (inklusive L-, V- und Pn-Status) entsprechend der Änderung der zum Zeitpunkt dieser Arbeit gültigen 8. aktualisierten Auflage [7] neu ermittelt. Zudem wurden unter Anleitung und Supervision eines Facharztes für Pathologie folgende beiden Grading-Systeme angewandt.

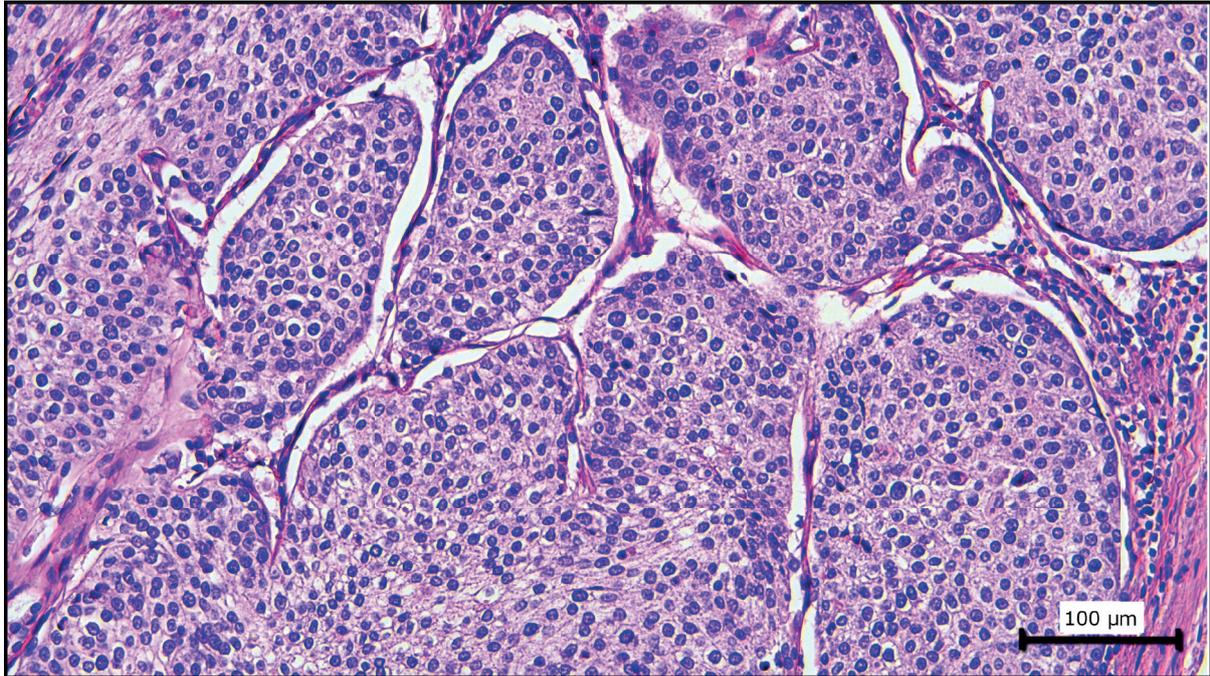
#### 3.4.1 Konventionelles Grading

Das bislang häufig in der Routinediagnostik angewendete Grading der PECs basiert auf morphologischen Kriterien [154], welche in Tabelle 6 aufgeführt und in Abbildung 6 bis 8 exemplarisch dargestellt sind.

**Tabelle 6: Konventionelles Grading der Plattenepithelkarzinome der Lunge**

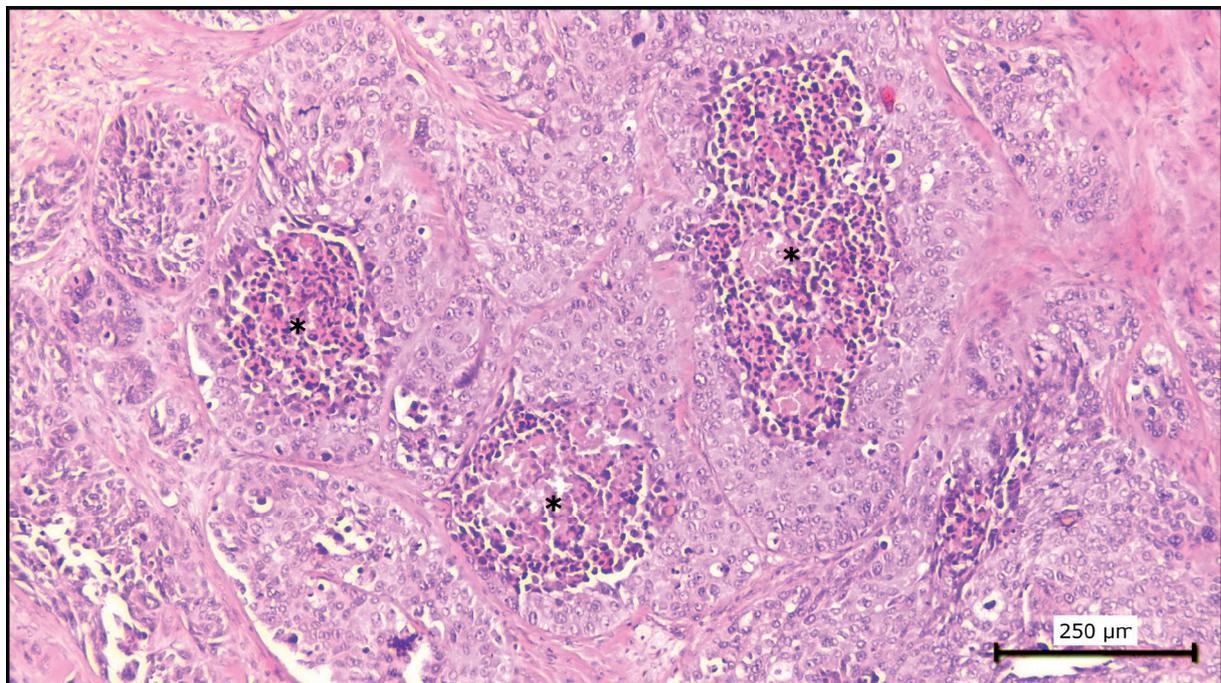
Grad	Eigenschaften
G1	<ul style="list-style-type: none"><li>• polygonale Tumorzellen mit deutlich erkennbaren Zellmembranen und hellem, glykogenreichem Zytoplasma</li><li>• deutlich erkennbare Interzellularbrücken</li><li>• Ausbildung von Hornperlen</li></ul>
G2	<ul style="list-style-type: none"><li>• Pflasterartiges Bild der Tumorzellen mit erkennbaren Zellmembranen</li><li>• wenige, teils nur fokal erkennbare Interzellularbrücken</li><li>• wenige Hornperlen</li><li>• zentrale Nekrosen</li></ul>
G3	<ul style="list-style-type: none"><li>• Strang- und nestförmige Anordnung der Tumorzellen</li><li>• Einzelzellverhornungen mit pyknotischen Zellkernen</li><li>• Bizarre nukleäre Formen und Polymorphismen</li><li>• Fehlen der Interzellularbrücken</li><li>• Nekrosen</li></ul>

Zusammengefasst sind die morphologischen Kriterien, welche die einzelnen Gradierungsstufen bestimmen. Bei intratumoraler Heterogenität ist jeweils der niedrigere (ziffernmäßig höhere) Gradierungsgrad zu wählen [154].



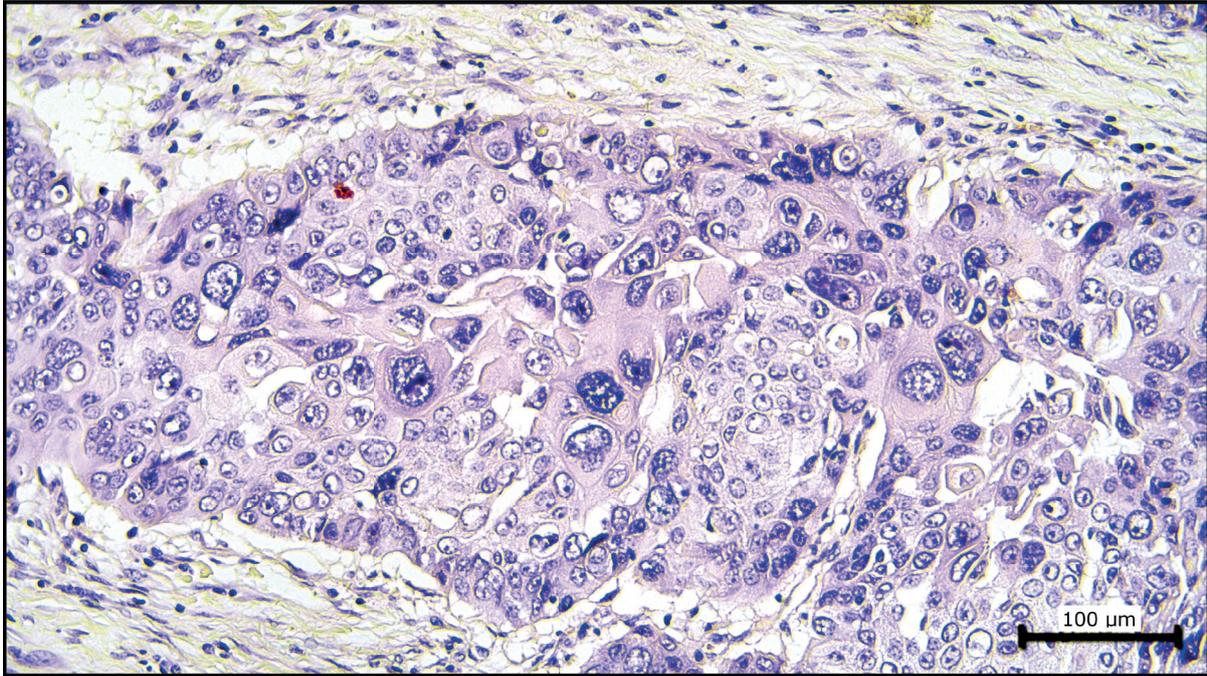
**Abbildung 6: Konventionelles Grading G1**

Gut differenziertes, nicht verhornendes Plattenepithelkarzinom mit polygonalen Tumorzellen mit erkennbaren Zellmembranen, hellem Zytoplasma und nur geringer Kernpleomorphie. Die Interzellularbrücken sind in dieser Vergrößerung nicht erkennbar. HE-Färbung, 200-fache Vergrößerung.



**Abbildung 7: Konventionelles Grading G2**

Mäßiggradig differenziertes, verhornendes Plattenepithelkarzinom. Auffällig sind vor allem die zentralen Nekrosen (\*). Die Zellmembranen sind meist noch gut abgrenzbar. Die Zellkerne zeigen nur eine geringe Pleomorphie, bizarre Kernformen sind nicht vorhanden. HE-Färbung, 100-fache Vergrößerung.

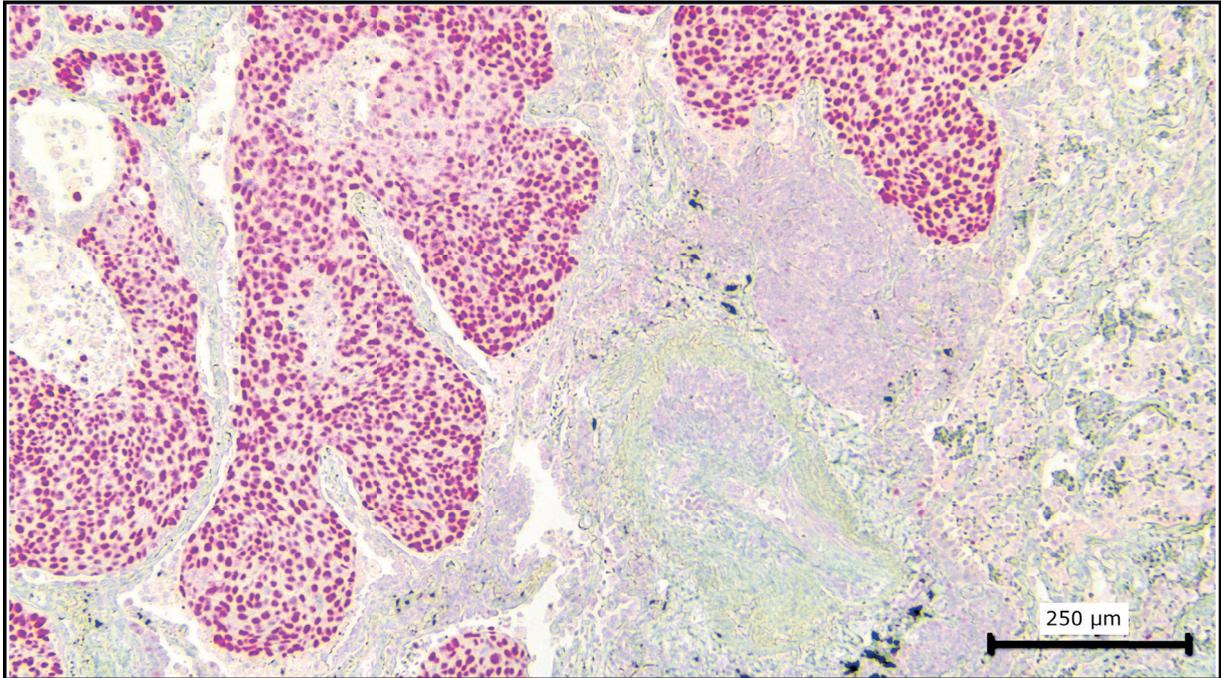


**Abbildung 8: Konventionelles Grading G3**

Schlecht differenziertes, nicht verhornendes Plattenepithelkarzinom mit strangförmigem Wachstum, nicht klar abgrenzbaren Zellmembranen und deutlichen Kernpolymorphismen mit bizarren, vergrößerten Kernen. HE-Färbung, 200-fache Vergrößerung.

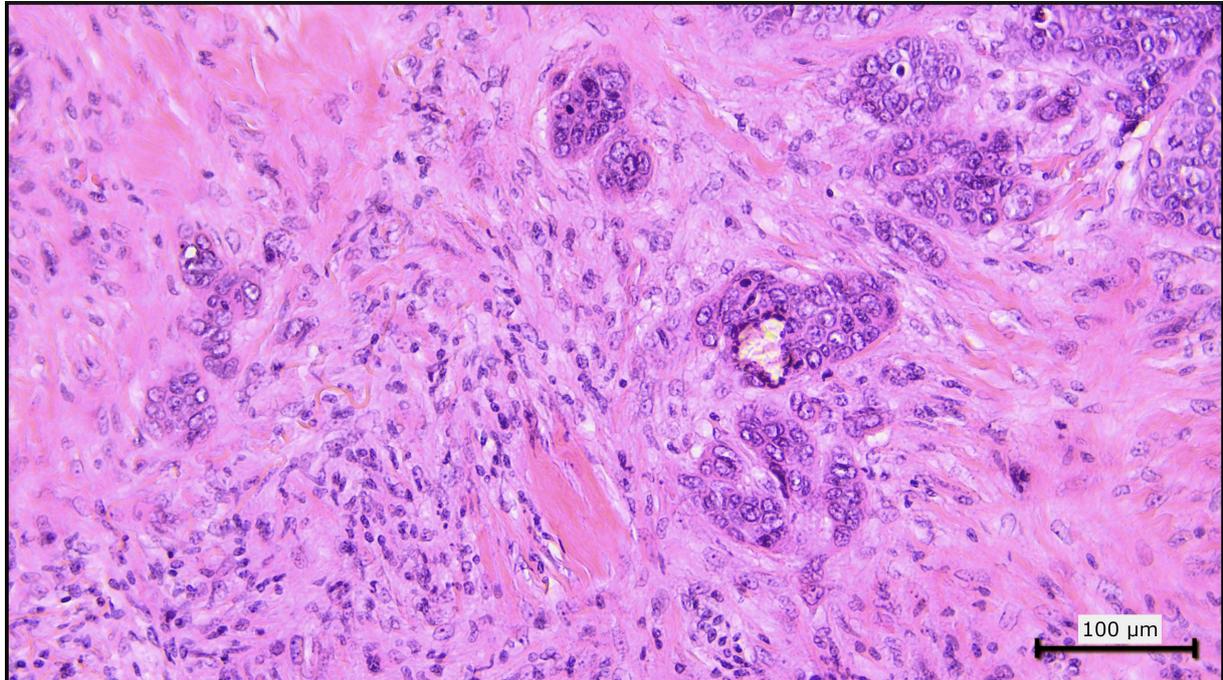
**3.4.2 Grading nach Weichert et al.**

Dieses Grading-System basiert auf den beiden Phänomenen *tumor budding* und *tumor nesting* [203]. Als *tumor budding* bezeichnet man dabei die Eigenschaft des Tumors kleine „Tumorknospen“ aus weniger als 5 Zellen zu bilden, welche sich von größeren Tumorverbänden abzweigen und ins angrenzende Stroma infiltrieren. Als *tumor nesting* wird die Ausbildung von invasiven Tumorzellenverbänden bezeichnet, welche vollständig von Tumorstroma umgeben sind [203]. Beide Phänomene sind in Abbildung 10 und Abbildung 9 dargestellt.



**Abbildung 9: Tumor nesting**

Gut differenziertes Plattenepithelkarzinom mit großen Tumorzellnestern ohne *tumor budding* oder Einzelzellinvasionen. Die Tumorzellen zeigen eine deutliche nukleäre Immunreaktivität. Immunhistochemische Färbung (p40, ΔNp63), 100-fache Vergrößerung.



**Abbildung 10: Tumor budding**

Schlecht differenziertes Plattenepithelkarzinom mit ausgeprägten *tumor budding* und sehr kleinen Tumorzellnestern. HE-Färbung, 200-fache Vergrößerung.

Wie in der Erstpublikation [203] angegeben wurden diese beiden Phänomene unabhängig voneinander ermittelt (siehe Tabelle 7). Die Graduierung ergibt sich anschließend aus der erreichten Punktzahl. Zur Bestimmung der Anzahl der *Budding* Foci wurde an allen archivierten Schnitten die Invasionsfront in mittlerer Vergrößerung nach dem Areal mit den meisten *Budding* Foci durchsucht. In diesem Areal wurde nachfolgend die genaue Anzahl pro 12 Hochvergrößerungsfeldern (*high power fields*, HPF) ausgezählt. Am verwendeten Mikroskop entsprach ein HPF 0,196 mm<sup>2</sup>. Intratumorales *Budding* wurde nach Angaben der Erstpublikation [203] nicht berücksichtigt. Für die Nestgröße wurden ebenfalls die gesamten Schnittpräparate in mittlerer (100-facher) Vergrößerung mikroskopiert und die Anzahl der Zellen im kleinsten Tumornest in hoher (400-facher) Vergrößerung ausgezählt.

**Tabelle 7: Grading nach Weichert et al.**

Budding Foci	
kein Budding	1
weniger als 15 Foci pro 12 HPF	2
mehr als 15 Foci pro 12 HPF	3
Tumornester	
größer als 15 Zellen	1
15 – 5 Zellen	2
2 – 5 Zellen	3
Einzelzellinvasionen	4
Grading	
2 bis 3 Punkte	G1
4 bis 6 Punkte	G2
7 Punkte	G3

Nach Bestimmung der maximalen Anzahl der Budding Foci sowie des kleinsten Tumornestes ergibt sich der Grad anhand der summierten Punktzahl. Erstellt nach [184].

### 3.5 Probengewinnung und Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Von den kryoasservierten Proben (N = 50) wurde zunächst ein Gefrierschnitt angefertigt und dieser in der nachfolgend beschriebenen Färbereihe mit Hämatoxylin und Eosin (HE) gefärbt. Dieser wurde von einem ärztlichen Mitarbeiter histologisch begutachtet. Probenpaare mit atypischen Zellen oder überwiegend (mehr als 50%) Entzündungszellen in der Lungenfraktion wurden ausgeschlossen. Zudem wurden Probenpaare ausgeschlossen, welche weniger als 60% vitale Tumorzellen aufwiesen. Insgesamt wurden N = 5 Probenpaare ausgeschlossen. Von den Proben, die die genannten Vorgaben erfüllten, wurden am Kryostatmikrotom 10 Schnitte à 10 µm abgetragen, in einem 2-ml-Eppendorfgefäß gesammelt und bis zur RNA-Extraktion weiterhin bei -80 °C gelagert. Abschließend wurde ein weiterer Gefrierschnitt angefertigt und HE gefärbt. Dies erlaubte einen relativ sicheren Überblick über das zur RNA-Extraktion verwendete Gewebe.

Die HE-Färbereihe wurde in analoger Weise zu der in der alltäglichen Routine verwendeten Schnellschnittfärbereihe des hiesigen Instituts aufgebaut [103]. Nach Formalinfixierung und Spülen in vollentsalztem Wasser wurden die Schnitte für 2 min in Hämatoxylin gefärbt und anschließend in heißem, fließendem Wasser für 30 s gebläut. Danach folgte für 10 s die Gegenfärbung in mit Eisessig angesäuertem Eosin. Nach erneutem Spülen in vollentsalztem Wasser und der Entwässerung durch 100%igen Ethanol und Xylol, wurde der Schnitt mit Eindeckmedium eingedeckt.

### 3.6 RNA-Isolation

Für die Gewinnung der miRNA aus den N = 45 eingeschlossenen Probenpaaren wurde das *miRNeasy Kit* (Qiagen) verwendet. Die RNA-Extraktion erfolgt hierbei durch eine Kombination *Single-Step-Methode* mittels Guanidiniumthiocyanat, Phenol und Chloroform [32] und der Aufreinigung der Probe durch Zentrifugation über eine Silica-basierte Membran [152].

Nach Herstellerangaben wurde zunächst durch die im *QIAzol Lyseagenz* enthaltenen, chaotropen Substanzen (u.a. Guanidinthiocyanat und Phenol) die Zellmembran aufgebrochen, DNA sowie Proteine denaturiert und anschließend das Gemisch durch Zugabe von Chloroform in drei Phasen aufgetrennt [152], sodass die in der oberen aquatischen Phase gelöste RNA abpipettiert werden konnte. Die untere organische, proteinhaltige und die DNA-haltige Zwischenphase wurden verworfen.

Die Probe wurde anschließend mit der 1,5-fachen Menge reinem Alkohol und über eine Silica-basierte Membran zentrifugiert. Im alkoholischen Milieu bleibt die RNA an der Silica-basierten Membran haften [152] und wurde mehrmals mit Hilfe der mitgelieferten, ebenfalls alkoholbasierten Waschlösung aufgereinigt. Letztlich wurde die gewonnene RNA in 30 µl RNase-freiem Wasser eluiert und bei -80 °C gelagert.

## **3.7 RNA-Quantifizierung und Reinheitsanalyse**

### **3.7.1 Spektralphotometrie**

Die Konzentration der gelösten RNA wurde anschließend mittels Spektralphotometrie RNA bestimmt. Da Nukleinsäuren (260 nm), Proteine (280 nm) und Phenol / Guanidinsalz (230 nm) unterschiedliche Absorptionsmaxima aufweisen, kann durch das Verhältnis der Lichtabsorption bei den angegebenen Wellenlängen Rückschlüsse auf die "Reinheit" der Probe gezogen werden [178]. Die RNA-Probe wurde als „rein“ angesehen bei einem 260/230-Quotient größer 2,0. Die Zielwerte für den 260/230-Quotient lagen zwischen 1,8 und 2,2 [178]. Unreine Proben wurden erneut in Alkohol eluiert, über die Silica-Membran zentrifugiert und wieder mit den oben genannten Puffern gewaschen.

### **3.7.2 Gelelektrophorese**

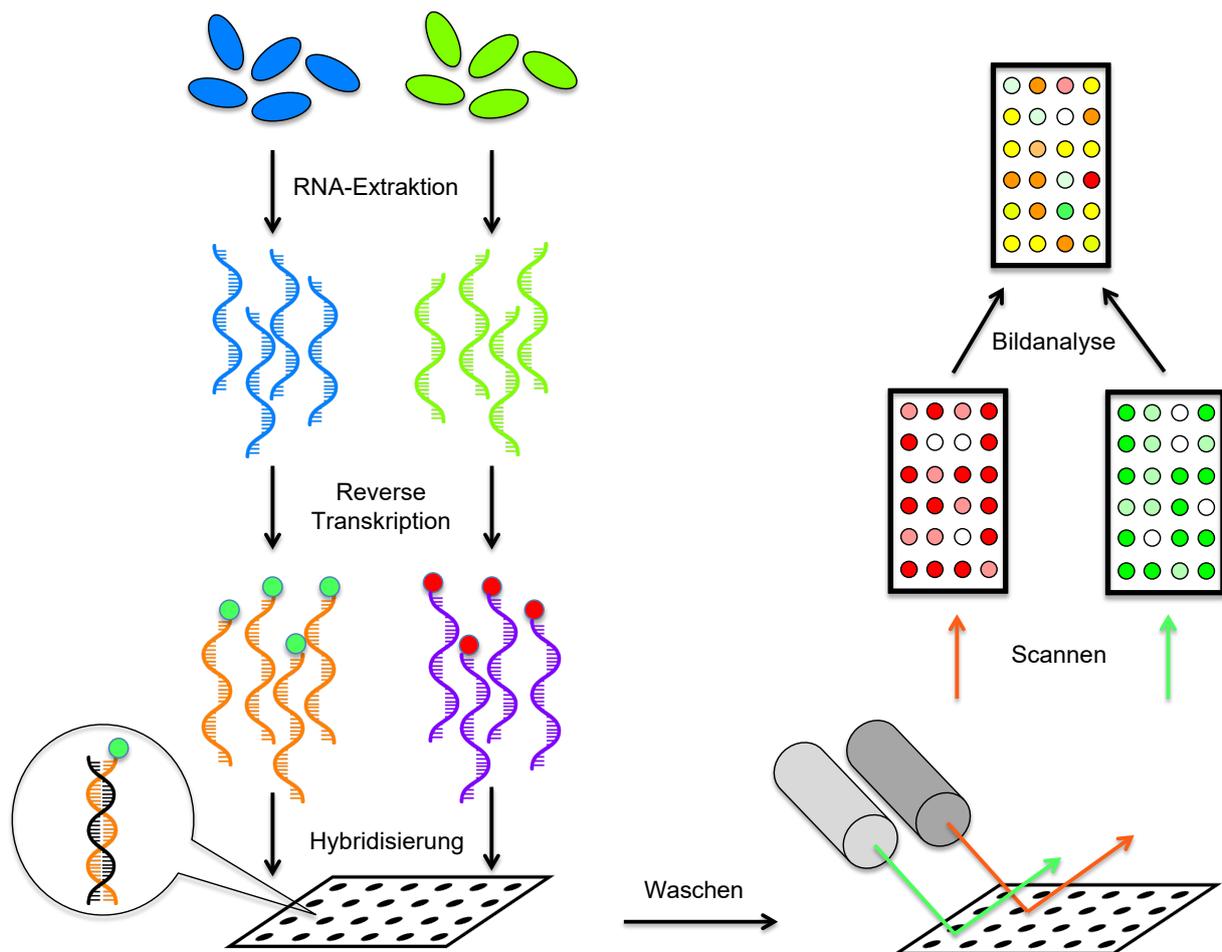
Der *BioAnalyzer*® ermöglicht die Durchführung einer Gelelektrophorese im Chipformat [2]. In die feinen Kanälchen des Chips wird zuvor eine mit Fluoreszenzfarbstoff versetzte Polymermatrix eingebracht. Entsprechend der herkömmlichen Gelelektrophorese mit Agarosegel wandern geladene Teilchen entlang eines angelegten elektrischen Feldes. Die Bewegungsgeschwindigkeit der Teilchen durch die Polymermatrix hängt dabei von der Ladung und der Masse der Teilchen ab. Der Fluoreszenzfarbstoff lagert sich an RNA und Proteine an und erlaubt somit die Detektion der Teilchen an einem festen Messpunkt. Anhand der ausgegebenen Zeit-Fluoreszenz-Diagrammen können Kontaminationen der Probe erkannt werden. Zudem wird von der mitgelieferten Software die sogenannte *RNA Integrity Number (RIN)* berechnet. Diese gibt auf einer Skala von 1 bis 10 als grobes Maß einen Anhalt für die Unversehrtheit beziehungsweise Degradation der untersuchten RNA [2].

### 3.8 Microarray

Die Durchführung der Microarray-Analyse erfolgte durch eine erfahrene Analytistin aus dem hiesigen Institut für Humangenetik (siehe Danksagung). Die Microarray-Technik basiert auf komplementären Basenpaarungen zwischen Nukleinsäuren aufgrund der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Purin- und Pyrimidinbasen (Watson-Crick-Bindung) [43]. Auf einem mittlerweile meist industriell hergestellten Chip werden Nukleinsäuren bekannter Sequenz an einer bestimmten, bekannten Stelle aufgetragen. Bei der eigentlichen Versuchsdurchführung werden nun die zuvor mittels Fluoreszenzfarbstoff markierten Proben aus dem zu untersuchenden Gewebe hinzugegeben. Nach der Inkubationszeit bleiben hybridisierte Proben haften, während überschüssige Nukleinsäuresequenzen abgewaschen werden können (siehe Abbildung 11) [43].

In diesem Versuch wurden mit Hilfe des *SurePrint Human miRNA Microarray V21* der Firma Agilent die Expression von  $N = 2550$  miRNAs untersucht [1]. Entsprechend der Herstellerangaben wurde nach Dephosphorylierung und Markierung der zuvor extrahierten RNA das Microarray bei  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 20 h inkubiert. Nach Waschen und Trocknen der Microarrays wurde die Expression mittels Fluoreszenzscanner und mitgelieferter Software ebenfalls der Firma *Agilent* gemessen [1]. Die Verarbeitung der Rohdaten erfolgte mittels Quantilnormalisierung und log-Transformation.

Zur Bestimmung der Expressionsunterschiede zwischen tumorfreiem Lungen- und Tumorgewebe wurde der Vergleich zentraler Tendenzen zweier abhängiger Stichproben mittels *Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test* angewandt. Die Signifikanzwerte wurden mit Hilfe des Benjamini-Hochberg-Verfahrens korrigiert. Als differenziell reguliert wurden diejenigen miRNAs angesehen, welche in der Tumorprobe gegenüber dem tumorfreien Lungengewebe mindestens zweifach höher bzw. zweifach niedriger exprimiert wurden und deren korrigierter Signifikanzwert  $p$  unter 0,05 lag.



**Abbildung 11: Funktionsweise cDNA-Microarray**

Nach Extraktion der gesamten RNA aus der zu testenden Probe sowie einer Referenzprobe wird die RNA mittels Reverser Transkription in komplementäre DNA (*complementary DNA*, cDNA) umgeschrieben. Durch Verwendung mittels Cyaninfarbstoffe markierter Nukleotide erfolgt somit gleichzeitig die Fluoreszenzmarkierung der Probe. Hierbei werden für die zu testende Probe und die Referenzprobe zwei verschiedene Farbstoffe eingesetzt. Anschließend werden beide Proben auf dem Microarray hybridisiert. Auf diesem sind an jeweils einer bekannten Stelle (Spot) die Basensequenzen einer zu untersuchenden (micro)RNA aufgetragen, welche die cDNA durch komplementäre Basenpaarung bindet. Nach mehreren Stunden Inkubation kann die überschüssige cDNA abgewaschen werden.

Die beiden verwendeten Farbstoffe besitzen unterschiedlich Anregungs- und Emissionsfrequenzen (grüne bzw. rote Wellenlänge), sodass die zu testende Probe sowie die Referenzprobe einzeln angeregt und gemessen werden können. Das gemessene Fluoreszenzsignal ist dabei proportional zur Menge der gebundenen cDNA an jedem Spot. Die zwei Einzelbilder werden anschließend computergraphisch übereinandergelegt. Bei dieser sogenannten *two channel*-Auswertung lässt das Verhältnis zwischen grünem und rotem Fluoreszenzsignal eine Aussage über die Expressionsunterschiede zwischen den beiden Proben zu. Bei der *single channel*-Auswertung wird nur eine einzelne Probe mit einem Farbstoff vermessen. Eine Normalisierung kann hierbei über einzelne Referenzgene erfolgen. Erstellt nach [43].

### 3.9 Reverse Transkription und quantitative Polymerasekettenreaktion

#### 3.9.1 Reverse Transkription

Die Polymerasekettenreaktion dient der Replikation von DNA mittels hitzebeständiger DNA-Polymerase [135]. Die isolierte RNA (siehe Punkt 3.6) musste hierfür zuerst mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase (RT) in cDNA (*complementary DNA*, komplementäre DNA) umgeschrieben werden. Hierzu wurde das miScript II RT Kit von Qiagen verwendet. Ein Teil der RNA-Probe wurde mit RNase-freiem Wasser verdünnt, sodass 50 ng RNA 12 µl Lösung entsprachen. Um Ungenauigkeiten durch mehrfaches Pipettieren möglichst gering zu halten, wurden Puffer, Reverse Transkriptase und Nukleotide auf Eis für mehrere Proben nach in Tabelle 8 aufgeführtem Verhältnis vermischt. Anschließend wurden 8 µl abpipettiert und zügig den in Eppendorfgefäßen vorbereiteten und ebenfalls auf Eis gelagerten Proben zugegeben. Nach Inkubation für 60 min bei 37 °C im Wasserbad wurde die Reverse Transkriptase 5 min lang im vorgeheizten Wärmeblock bei 95 °C denaturiert.

**Tabelle 8: RT-Ansatz einer Probe**

Reagenz	Volumen
miScript Reverse Transcriptase Mix	2 µl
miScript HiSpec Buffer	4 µl
miScript Nucleics Mix	2 µl
50 ng RNA gelöst in RNase-freiem Wasser	12 µl
	<b>20 µl</b>

#### 3.9.2 Quantitative Polymerasekettenreaktion

Die quantitative PCR (qPCR) unterscheidet sich von der „einfachen“ PCR dadurch, dass die DNA-Konzentration bereits während der Versuchsdurchführung bestimmt werden kann. Der hier verwendete Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I emittiert nach Einlagerung in die kleine Furche der cDNA ein 1000-fach höheres Fluoreszenzsignal [207]. Das messbare Farbsignal steigt somit proportional mit der DNA-Menge an. Als Ct-Wert (*Threshold-Cycle*) wird derjenige Zyklus bezeichnet, in dem erstmals ein vom Hintergrundrauschen unterscheidbares Fluoreszenzsignal gemessen werden kann [150].

Für die Durchführung der qPCR wurde das miScript SYBR Green PCR Kit und die entsprechenden miScript Primer Assays von QIAGEN verwendet. Die *small nuclear RNA* (snRNA) RNU6B diente dabei als endogene Kontrolle. Zudem wurde die erfolgreiche Durchführung der Reversen Transkription mittels miRTC-Primer kontrolliert.

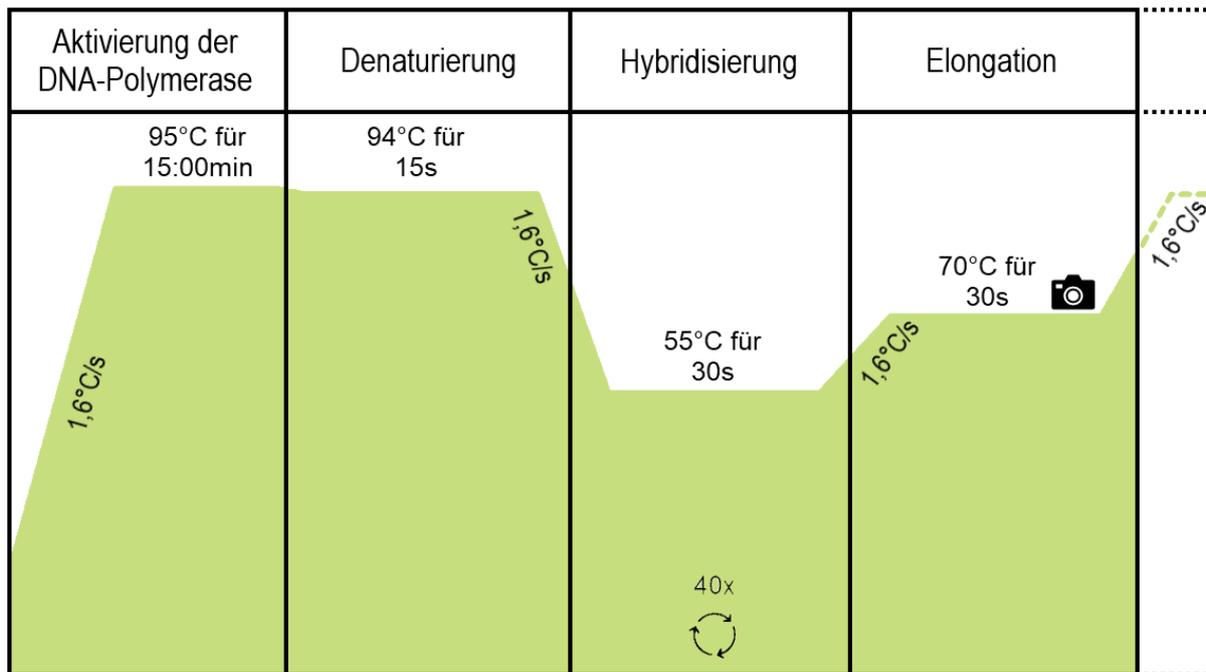
Für jeden Primer wurde zunächst auf Eis ein Ansatz für mehrere Proben hergestellt und anschließend mit je 2 µl der Probe (entsprechend 0,5ng cDNA) in die einzelnen *Wells* pipettiert. Tabelle 9 zeigt den PCR-Ansatz pro *Well*.

**Tabelle 9: PCR-Ansatz einer Probe**

Reagenz	Volumen
QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix	10 µl
miScript Universal Primer	2 µl
miScript Primer Assay	2 µl
RNase freies Wasser	2 µl
cDNA Probe (0,5ng)	2 µl
	<b>20 µl</b>

Die verwendete Hot-Start-Taq-Polymerase benötigt zur Aktivierung vor der eigentlichen Versuchsdurchführung eine 15-minütige Inkubation bei 95 °C [151]. Das verwendete qPCR-Programm ist in Abbildung 12 dargestellt.

Nach 40 Zyklen wurde die entstandene cDNA aufgeschmolzen und die Schmelzkurven visuell beurteilt. Mehrgipflige Schmelzkurven zeigen dabei unspezifische Syntheseprodukte auf [151]. Messungen, bei denen kein eindeutiger, einzelner Gipfel erkennbar war, wurden nicht in die Auswertung mit einbezogen und wiederholt.



**Abbildung 12: Ablauf der Polymerasekettenreaktion**

Nach Aktivierung der Hot-Start-Taq-DNA (95 °C für 15 min) wurden die drei Zyklen der PCR (Denaturierung, Hybridisierung und Elongation) 40-mal wiederholt. Im ersten Schritt, der Denaturierung (94 °C für 15 s), werden die DNA-Doppelstränge aufgespalten. Anschließend erfolgen die Anlagerung (Hybridisierung, 55 °C für 30 s) des Primers an den Einzelstrang und die Synthese eines komplementären Doppelstranges durch die Polymerase ausgehend vom Primer (Elongation, 70 °C für 30 s). Pro Zyklus erfolgte jeweils am Ende der Elongation die Fluoreszenzmessung. Erstellt nach [179].

### 3.9.3 Verdünnungsreihe zur Bestimmung der Primereffizienz

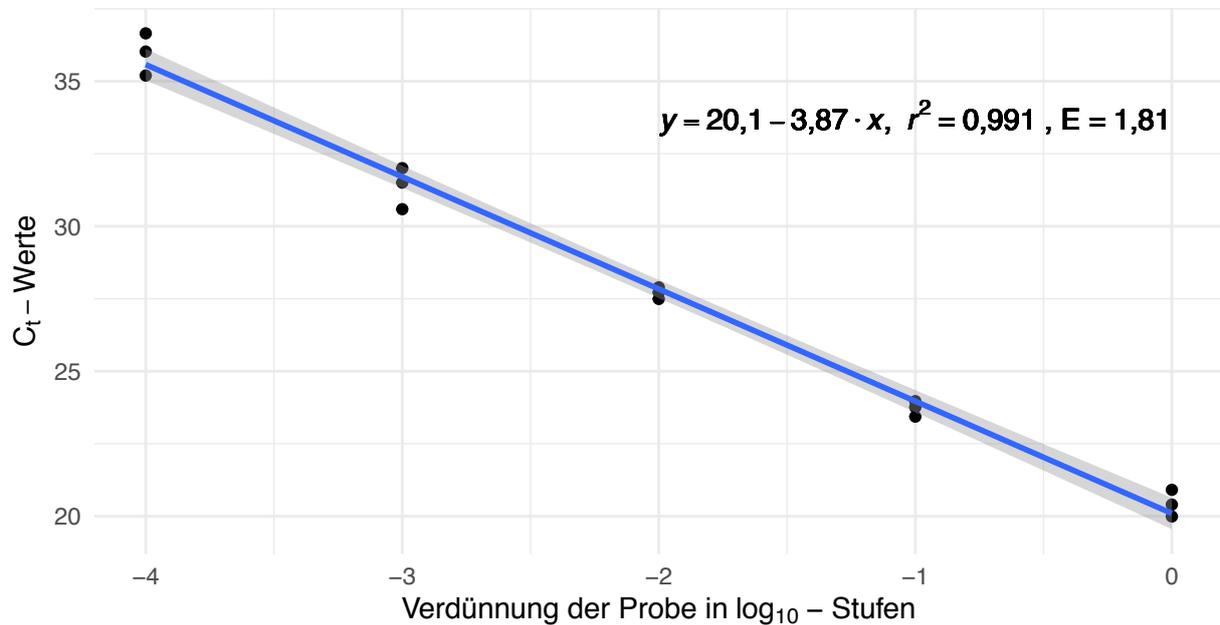
Im Idealfall, einer Effizienz des Primers von 100 %, verdoppelt sich die Anzahl der DNA-Stränge pro PCR-Zyklus [150]. Die relative Expression, meist auch als *Fold Change* bezeichnet, der miRNA zwischen Tumor- und Lungengewebe kann mit Hilfe des endogenen Referenzgenes RNU6B wie folgt berechnet werden [120]:

$$\begin{aligned}
 FC_{miRNA} &= 2^{\Delta\Delta Ct} = 2^{(\Delta Ct_{Tumor} - \Delta Ct_{Lunge})} \\
 &= 2^{(Ct_{Tumor,miRNA} - Ct_{Tumor,U6} - (Ct_{Lunge,miRNA} - Ct_{Lunge,U6}))} \\
 &= 2^{\frac{Ct_{Lunge,miRNA} - Ct_{Tumor,miRNA}}{Ct_{Lunge,U6} - Ct_{Tumor,U6}}}
 \end{aligned}$$

Bei dieser sogenannten *ΔΔCt-Methode* hat eine Abweichung von der optimalen Primereffizienz aufgrund des exponentiellen Wachstums eine starke Abweichung zur Folge [150]. Daher wurde die Primereffizienz für jeden Primer mittels 3 Proben in 5 log<sub>10</sub>-Stufen jeweils dreifach bestimmt. Die gemessenen Ct-Werte wurden dabei gegen Konzentration logarithmisch aufgetragen. Abbildung 13 zeigt diese Verdünnungskurve

exemplarisch anhand der endogenen Kontrolle RNU6B. Die Primereffizienz E kann mit Hilfe folgender Formel aus der Steigung m der Regressionsgerade berechnet werden [99]:

$$E = 10^{\left(-\frac{1}{m}\right)}$$



**Abbildung 13: Verdünnungsreihe**

Abszisse: Verdünnungsstufen der Proben (in log<sub>10</sub>-Schritten). Ordinate: Ct-Werte der durchgeführten qPCR. Aufgetragen sind für drei gemessene Proben jeweils die Mittelwerte der drei Einzelmessungen pro Verdünnungsstufe. Die Effizienz E ergibt sich aus der Steigung m der linearen Regressionsgleichung  $y = n - mx$ . Abkürzungen:  $r^2$ : Determinationskoeffizient der Regressionsgeraden, E: Effizienz der qPCR.

Das sogenannte effizienz-korrigierte relative Quantifizierungsmodell [149] korrigiert die relative Expression um Unterschiede in der Primereffizienz. Die Formel lautet:

$$FC_{miRNA} = \frac{(E_{miRNA})^{Ct_{Lunge,miRNA} - Ct_{Tumor,miRNA}}}{(E_{U6})^{Ct_{Lunge,U6} - Ct_{Tumor,U6}}}$$

Die zuvor genannte  $\Delta\Delta Ct$ -Methode stellt damit den Sonderfall  $E_{miRNA} = E_{U6} = 2$  dar, entsprechend einer idealen Primereffizienz für die untersuchte miRNA und die endogene Kontrolle.

Der *Fold Change* gibt dabei als maßlose Zahl das Verhältnis zwischen Tumor- und Lungenprobe an. Ein Wert von  $R = 2$  entspricht einer doppelt so hohen Expression im Tumorgewebe im Vergleich zum tumorfreien Lungengewebe. Ein Wert von  $R = 0,5$  entspricht hingegen einer halb so hohen Expression im Tumorgewebe im Vergleich zum tumorfreien

Lungengewebe. Eine Herabregulation wird damit auf den Zahlenbereich zwischen 0 und 1, eine Hochregulation auf den Zahlenbereich größer 1 abgebildet. Hierdurch wird bei der graphischen Darstellung der Daten die Herabregulation „gestaucht“ dargestellt. In den im Ergebnisteil präsentierten Tabellen und Diagrammen wird daher immer der  $\log_2$ -skalierte *Fold Change* ( $\log_2FC$ ) angegeben, welcher eine Hoch- bzw. Herabregulation symmetrisch um den Nullpunkt auf den gesamten positiven bzw. negativen Zahlenbereich abbildet.

### 3.10 Statistische Auswertung

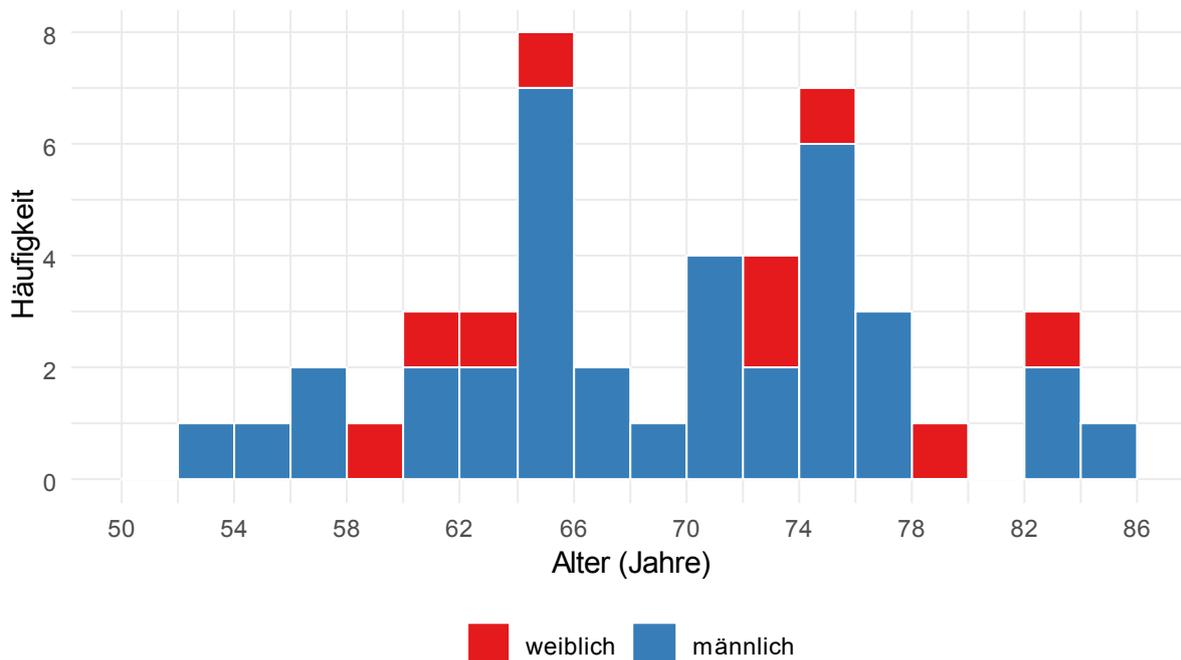
Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe der Programmiersprache R [153] durchgeführt. Bei Verletzung der Normverteilung wurden folgende nicht parametrische Tests verwendet:

- Einprobenstichtest mittels *Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test*
- Vergleich zentraler Tendenzen zweier abhängiger Stichproben mittels *Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test*
- Vergleich zentraler Tendenzen zweier unabhängiger Stichproben mittels *Mann-Whitney-U-Test*
- Unabhängigkeitstest zweier nominaler bzw. ordinaler Variablen mittels *exaktem Fisher-Test*
- Korrelation zweier metrischer Variablen mittels *Spearman'schen Rangkorrelationskoeffizient (Spearman's Rho)*
- Korrelation einer metrischen und einer ordinal skalierten Variable mittels *Kendall'schen Rangkorrelationskoeffizient (Kendall's tau<sub>b</sub>)*

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Patientenkollektiv

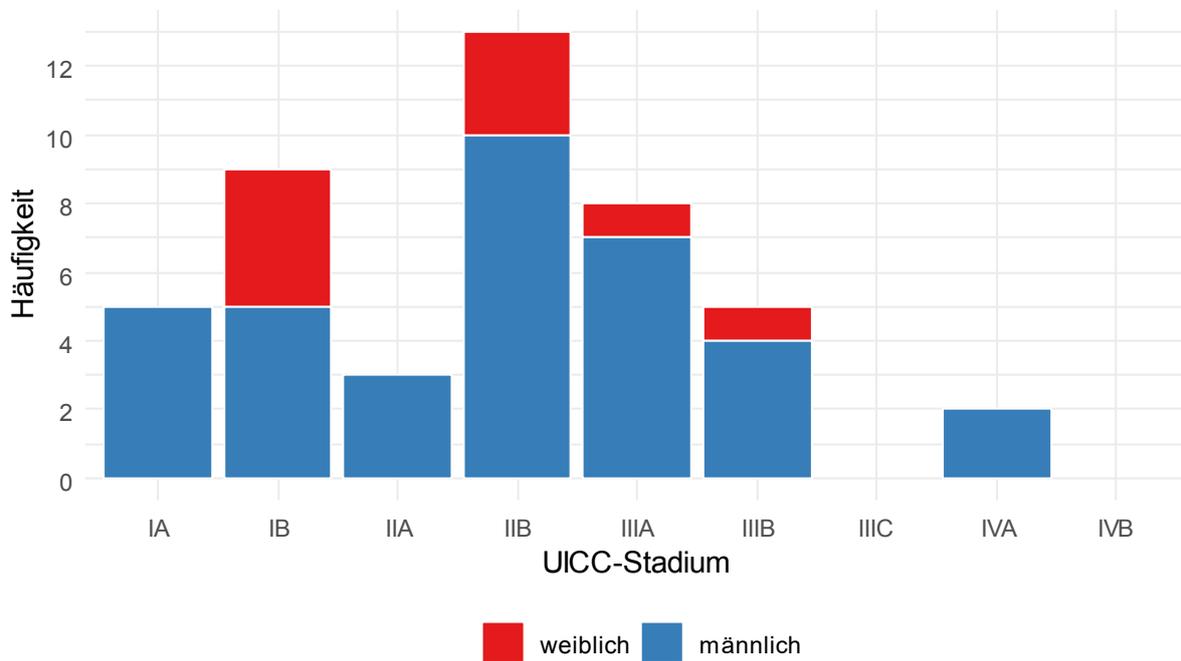
Das untersuchte Patientenkollektiv bestand insgesamt aus 45 Patienten, davon 36 Männer und 9 Frauen. Das mittlere Alter bei Diagnosestellung betrug im Gesamtkollektiv 69,2 Jahre (Standardabweichung 7,9 Jahre). Nach Geschlechtern getrennt betrug das mittlere Alter 69,1  $\pm$  7,9 Jahre für die Männer und 70,0  $\pm$  8,6 Jahre für die Frauen.



**Abbildung 14: Altersverteilung bei Erstdiagnose nach Geschlecht**

Abszisse: Alter in Jahren unterteilt in Altersgruppen (à zwei Jahre). Ordinate: Absolute Häufigkeiten der Patienten pro Altersgruppe. Das Geschlecht ist farblich kodiert (siehe Legende).

Die meisten der untersuchten Patienten wurden Stadium I und II operiert: Bei zwei Patienten lag perioperativ ein maligner Pleuraerguss vor (Stadium IVa).



**Abbildung 15: Verteilung der UICC-Stadien nach Geschlecht**

Abzisse: UICC-Stadien. Ordinate: Absolute Häufigkeiten der Patienten pro Stadium. Bei keinem der eingeschlossenen Patienten lag ein Stadium IIIC oder IVB vor. Das Geschlecht ist farblich kodiert (siehe Legende).

Die Verteilung der weiteren klinisch-pathologischen Standardparameter ist in Tabelle 10 dargestellt.

**Tabelle 10: Übersicht über die klinisch-pathologischen Standardparameter des untersuchten Patientenkollektivs mit Plattenepithelkarzinomen**

	<b>Microarray-Analyse (N = 18)</b>	<b>PCR-Analyse (N = 45)</b>
<b>Geschlecht</b>		
weiblich	5 (27,8 %)	9 (20,0 %)
männlich	13 (72,2 %)	36 (80,0 %)
<b>Wachstumsmuster</b>		
nicht verhornend	8 (44,4 %)	27 (60,0 %)
verhornend	10 (55,6 %)	18 (40,0 %)
<b>T-Kategorie</b>		
T1	1 (5,5 %)	6 (13,3 %)
T2	9 (50,0 %)	23 (51,1 %)
T3	5 (27,8 %)	9 (20,0 %)
T4	3 (16,7 %)	7 (15,6 %)
<b>N-Kategorie</b>		
N0	12 (66,7 %)	23 (51,1 %)
N1	2 (11,1 %)	14 (31,1 %)
N2	4 (22,2 %)	8 (17,8 %)
<b>M-Kategorie</b>		
M0	17 (94,4 %)	43 (95,6 %)
M1a	1 (5,6 %)	2 (4,4 %)
<b>Lymphangiosis carcinomatosa</b>		
L0	11 (61,1 %)	24 (53,3 %)
L1	7 (38,9 %)	21 (46,7 %)
<b>Hämangiosis carcinomatosa</b>		
V0	11 (61,1 %)	23 (51,1 %)
V1	7 (38,9 %)	22 (48,9 %)
<b>Perineuralscheideninfiltration</b>		
Pn0	16 (88,9 %)	39 (86,7 %)
Pn1	2 (11,1 %)	6 (13,3 %)
<b>Resektionsstatus</b>		
R0	17 (94,4 %)	42 (93,3 %)
R1	1 (5,6 %)	3 (6,7 %)

## 4.2 Grading

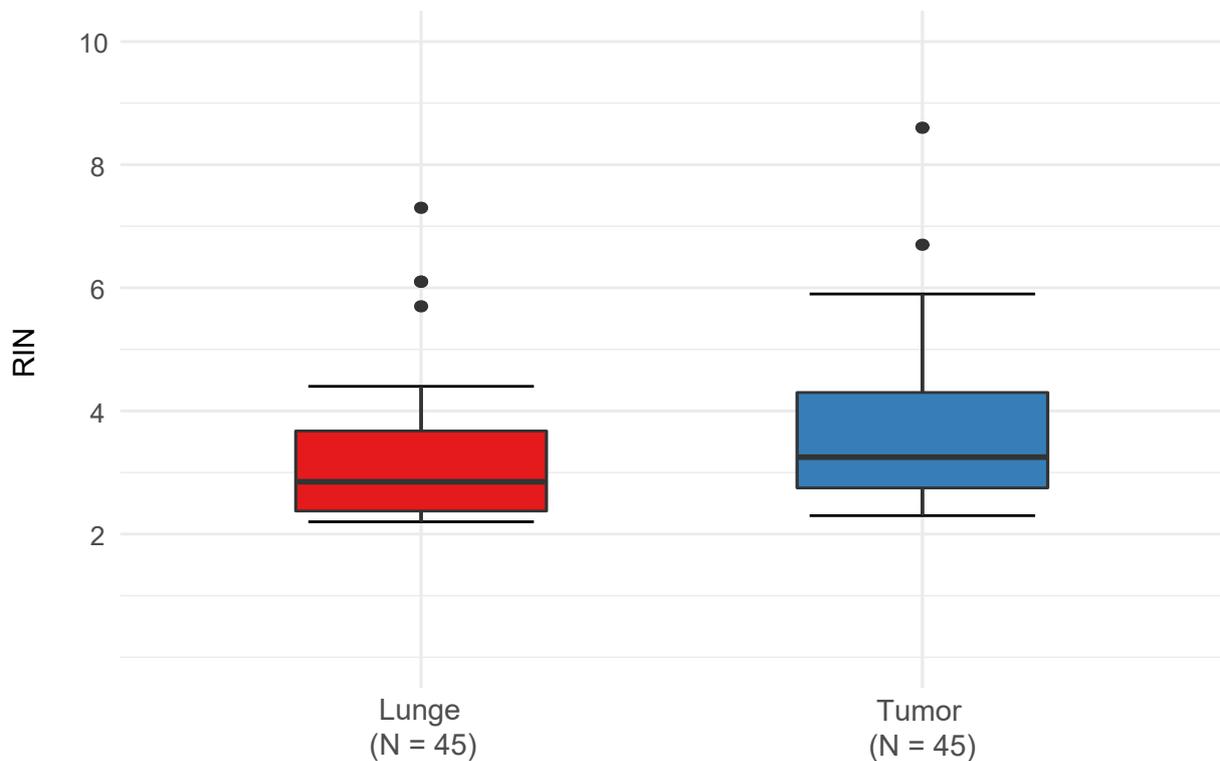
Zwischen den beiden Grading-Schemata bestand in der untersuchten Population kein signifikanter Zusammenhang (exakter Fisher-Test,  $p = 0,203$ ,  $N = 45$ ). Die Häufigkeiten der einzelnen Grading-Stufen sind in Tabelle 11 aufgeführt.

**Tabelle 11: Kreuztabelle der angewandten Grading-Schemata**

		Grading nach Weichert et al.			Summe
		G1	G2	G3	
konventionelles Grading	G1	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
	G2	10 (22,2 %)	7 (15,6 %)	4 (8,9 %)	21 (46,7 %)
	G3	6 (13,3 %)	14 (31,1 %)	4 (8,9 %)	24 (53,3 %)
	Summe	16 (35,6 %)	21 (46,7 %)	8 (17,8 %)	45 (100 %)

### 4.3 Gelelektrophorese

Zwischen den Lungenproben und den gepaarten Tumorproben ergab sich für die Integrität der RNA (RIN) kein signifikanter Unterschied (Wilcoxon Vorzeichen-Rang-Test für gepaarte Stichproben:  $V = 81$ ,  $p = 0,144$ ). Die Verteilung der RIN-Werte sind in Abbildung 16 getrennt für die Lungen- und Tumorproben dargestellt.

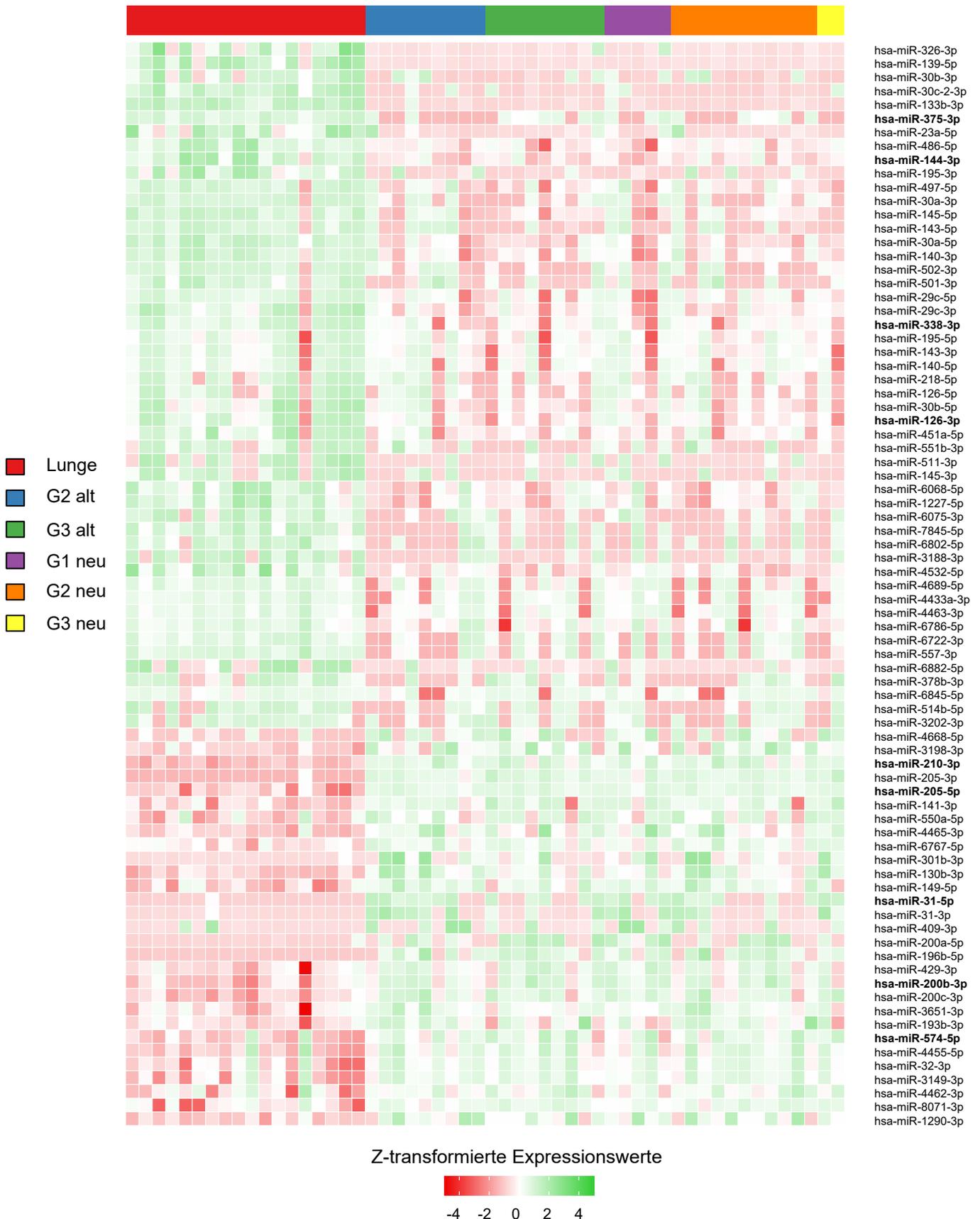


**Abbildung 16: RIN-Werte der untersuchten Proben**

Abszisse: Subgruppe Lungen- oder Tumorgewebe. Ordinate: RIN (maßlose Zahl) der untersuchten Proben.

### 4.4 Microarray Analyse

Von den 48 untersuchten gepaarten Lungen- und Tumorproben waren vier Tumor- und zwei Lungenproben nicht valide auswertbar und wurden paarweise von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Die verbliebenen 36 Proben (18 Probenpaare) wurden in die weitere statistische Analyse eingeschlossen. Für 79 miRNAs ergab sich ein signifikanter Unterschied (adjustierter Signifikanzwert  $p < 0,05$ , Fold Change  $> 2$ ) zwischen den 18 gepaarten Lungen- und Tumorproben mittels *Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test*. Diese sind in Abbildung 17 dargestellt.



- hsa-miR-326-3p
- hsa-miR-139-5p
- hsa-miR-30b-3p
- hsa-miR-30c-2-3p
- hsa-miR-133b-3p
- hsa-miR-375-3p**
- hsa-miR-23a-5p
- hsa-miR-486-5p
- hsa-miR-144-3p**
- hsa-miR-195-3p
- hsa-miR-497-5p
- hsa-miR-30a-3p
- hsa-miR-145-5p
- hsa-miR-143-5p
- hsa-miR-30a-5p
- hsa-miR-140-3p
- hsa-miR-502-3p
- hsa-miR-501-3p
- hsa-miR-29c-5p
- hsa-miR-29c-3p
- hsa-miR-338-3p**
- hsa-miR-195-5p
- hsa-miR-143-3p
- hsa-miR-140-5p
- hsa-miR-218-5p
- hsa-miR-126-5p
- hsa-miR-30b-5p
- hsa-miR-126-3p**
- hsa-miR-451a-5p
- hsa-miR-551b-3p
- hsa-miR-511-3p
- hsa-miR-145-3p
- hsa-miR-6068-5p
- hsa-miR-1227-5p
- hsa-miR-6075-3p
- hsa-miR-7845-5p
- hsa-miR-6802-5p
- hsa-miR-3188-3p
- hsa-miR-4532-5p
- hsa-miR-4689-5p
- hsa-miR-4433a-3p
- hsa-miR-4463-3p
- hsa-miR-6786-5p
- hsa-miR-6722-3p
- hsa-miR-557-3p
- hsa-miR-6882-5p
- hsa-miR-378b-3p
- hsa-miR-6845-5p
- hsa-miR-514b-5p
- hsa-miR-3202-3p
- hsa-miR-4668-5p
- hsa-miR-3198-3p
- hsa-miR-210-3p**
- hsa-miR-205-3p
- hsa-miR-205-5p**
- hsa-miR-141-3p
- hsa-miR-550a-5p
- hsa-miR-4465-3p
- hsa-miR-6767-5p
- hsa-miR-301b-3p
- hsa-miR-130b-3p
- hsa-miR-149-5p
- hsa-miR-31-5p**
- hsa-miR-31-3p
- hsa-miR-409-3p
- hsa-miR-200a-5p
- hsa-miR-196b-5p
- hsa-miR-429-3p
- hsa-miR-200b-3p**
- hsa-miR-200c-3p
- hsa-miR-3651-3p
- hsa-miR-193b-3p
- hsa-miR-574-5p**
- hsa-miR-4455-5p
- hsa-miR-32-3p
- hsa-miR-3149-3p
- hsa-miR-4462-3p
- hsa-miR-8071-3p
- hsa-miR-1290-3p

**Abbildung 17: Heatmap der Microarray-Analyse**

Dargestellt sind die jeweiligen quantilnormalisierten, logarithmierten und z-transformierten Expressionswerte der 79 differenziell regulierten microRNAs (Zeilen) für jede der untersuchten Proben (Spalten). Grüne Farbtöne entsprechen einer Hoch-, rote Farbtöne einer Herabregulation (siehe Farbskala unten). Farblich unterschieden sind zudem die Lungenproben sowie die Tumorproben nach Grading (siehe Legende links). Die Tumorproben sind für das ältere, konventionelle sowie das neuere Grading-System nach Weichert et al. je einmal dargestellt.

Im Anhang ist die gleiche Heatmap mit alternativem Farbschema (blau und orange) angefügt.

## 4.5 Quantitative Polymerasekettenreaktion

### 4.5.1 Primereffizienzen

Die Bestimmung der Primereffizienzen erfolgte mittels Verdünnungsreihe in 5  $\log_{10}$ -Stufen. Eine ideale Primereffizienz von 100 % entspricht einem dimensionslosen Faktor 2. In Tabelle 12 sind die Primereffizienzen, welche zur Berechnung des *Fold Change* dienen, aufgeführt.

**Tabelle 12: Effizienzen der verwendeten Primer**

Primer	Effizienz
hsa-miR-31-5p	2,01
hsa-miR-126-3p	1,86
hsa-miR-144-3p	1,62
hsa-miR-200b-3p	1,65
hsa-miR-205-5p	2,08
hsa-miR-210-3p	2,06
hsa-miR-338-3p	1,91
hsa-miR-375-3p	2,01
hsa-miR-574-5p	2,04
RNU6-2	1,81

#### 4.5.2 Expressionsänderung ausgewählter miRNAs

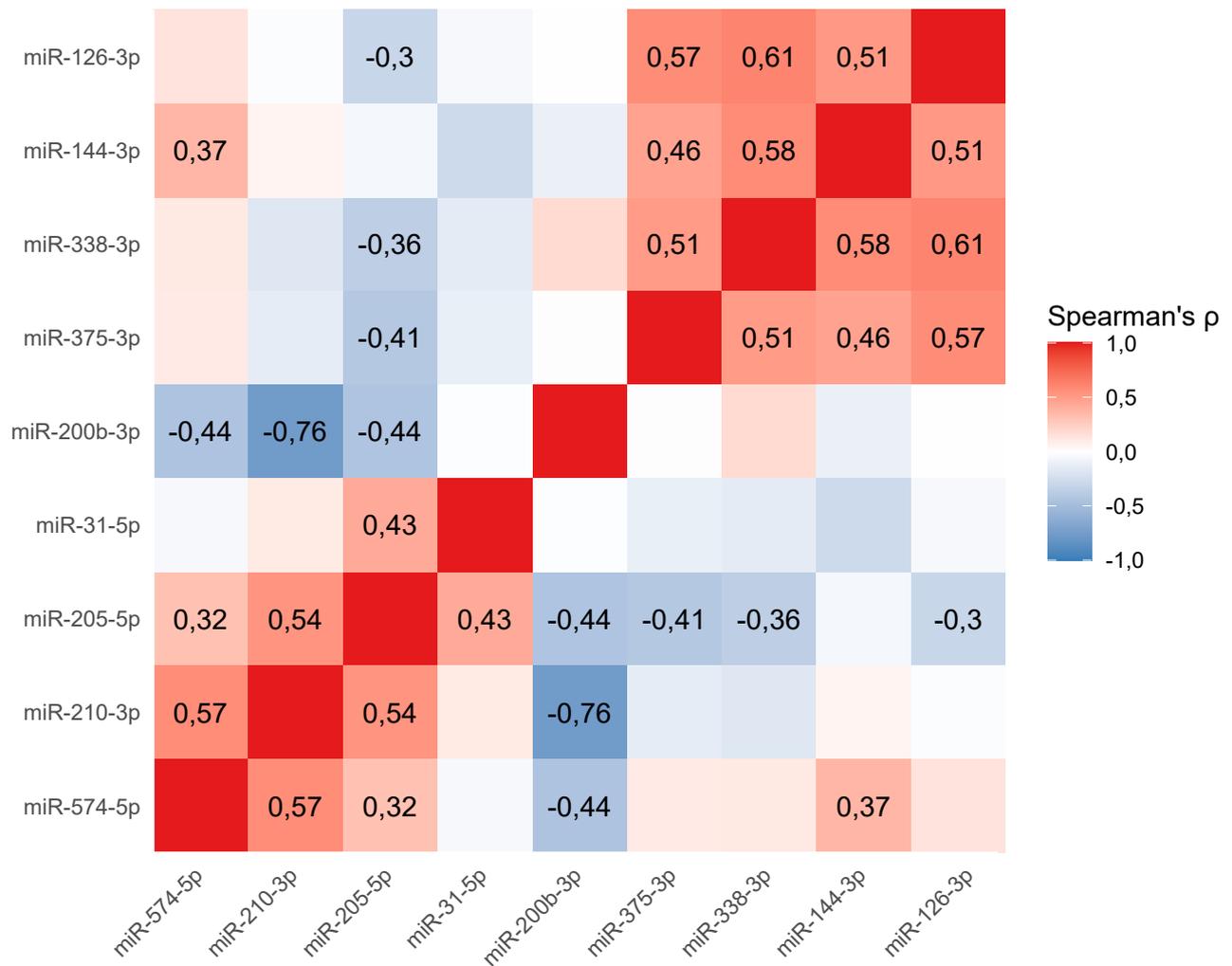
Mittels qPCR ergab sich mit Hilfe des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests für 8 der ausgewählten miRNAs eine signifikante Hoch- bzw. Herabregulation ( $p < 0,05$ ) im Tumorgewebe im Vergleich zum tumorfreien Lungengewebe. Für miR-31-5p, miR-126-3p, miR-144-3p, miR-205-5p, miR-210-3p, miR-338-3p und miR-375-3p ergab sich ein starker Effekt (Effektstärke  $r > 0,5$ ), für miR-200b-3p ergab sich ein mittlerer Effekt ( $0,3 < \text{Effektstärke } r = 0,44 < 0,5$ ) nach Cohen [34]. Die Ergebnisse sind in Tabelle 13 zusammengefasst.

**Tabelle 13: Expressionswerte für die 9 ausgewählten miRNAs**

	$\log_2(\text{Fold Change})$ N = 45	V	Z	r	p
<b>Hochregulierte MiRNAs</b>					
<b>miR-31-5p</b>		896	4,27	0,64	<b>&lt;0,001</b>
<b>Mdn (MAA)</b>	<b>3,2 (2,6)</b>				
[Min; Max]	[-5,1; 7,1]				
<b>miR-205-5p</b>		997	5,41	0,81	<b>&lt;0,001</b>
<b>Mdn (MAA)</b>	<b>7,3 (3,5)</b>				
[Min; Max]	[-6,1; 11]				
<b>miR-210-3p</b>		819	3,4	0,51	<b>&lt;0,001</b>
<b>Mdn (MAA)</b>	<b>1,9 (1,5)</b>				
[Min; Max]	[-7,2; 5,5]				
<b>Nicht dysregulierte miRNAs</b>					
<b>mir-574-5p</b>		525	0,08	0,01	0,938
<b>Mdn (MAA)</b>	<b>-0,22 (1,0)</b>				
[Min; Max]	[-5,1; 4,2]				
<b>Herabregulierte MiRNAs</b>					
<b>miR-126-3p</b>		80	-4,94	0,74	<b>&lt;0,001</b>
<b>Mdn (MAA)</b>	<b>-2,9 (1,3)</b>				
[Min; Max]	[-5,5; 9,0]				
<b>miR-144-3p</b>		87	-4,86	0,72	<b>&lt;0,001</b>
<b>Mdn (MAA)</b>	<b>-1,6 (1,7)</b>				
[Min; Max]	[-5,4; 4,9]				
<b>miR-200b-3p</b>		246	-3,06	0,46	<b>0,002</b>
<b>Mdn (MAA)</b>	<b>-1,2 (1,8)</b>				
[Min; Max]	[-6,6; 4,3]				
<b>miR-338-3p</b>		166	-3,97	0,59	<b>&lt;0,001</b>
<b>Mdn (MAA)</b>	<b>-2,5 (1,6)</b>				
[Min; Max]	[-5,8; 9,0]				
<b>miR-375-3p</b>		74	-5,01	0,76	<b>&lt;0,001</b>
<b>Mdn (MAA)</b>	<b>-2,6 (2,8)</b>				
[Min; Max]	[-9,4; 3,5]				

Abkürzungen: Mdn: Median, MAA: mittlere absolute Abweichung, Min: Minimum, Max: Maximum, V: Teststatistik des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test Z: standardisierte Teststatistik, r: Effektstärke, p: Signifikanzwert.

In den untersuchten Proben verhielt sich die Expression der herabregulierten miRNAs miR-126-3p, miR-144-3p, miR-338-3p und miR-375-3p sowie die Expression der hochregulierten miRNAs miR-205-5p, miR-210-3p und miR-574-5p gleichartig. miR-200b-3p verhielt sich gegenläufig zu den zuvor genannten hochregulierten miRNAs. Die Expression von miR-31-5p korrelierte nur mit der Expression von miR-205-5p signifikant. In Abbildung 18 sind die paarweisen Zusammenhangsmaße der Expression der neun untersuchten miRNAs dargestellt.

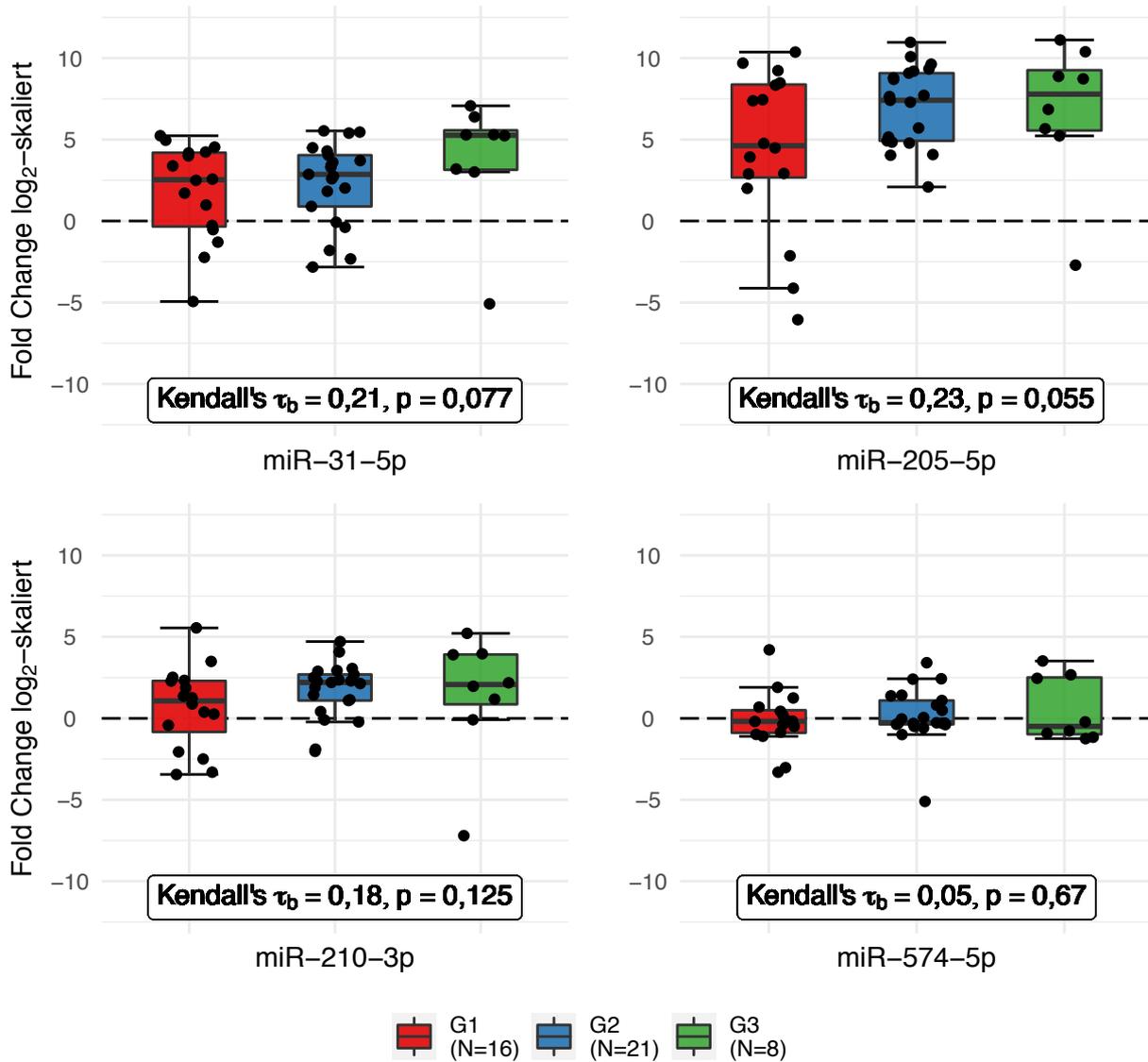


**Abbildung 18: Korrelationsmatrix der miRNA-Expression**

Die Abbildung zeigt die Korrelation der Expressionswerte der 9 ausgewählten miRNAs. Rote Felder geben positive, blaue Felder negative Korrelationen an (siehe Legende). Für signifikante Korrelationen ( $p < 0.05$ ) ist der *Spearman'sche Rangkorrelationskoeffizient* in die Felder eingetragen.

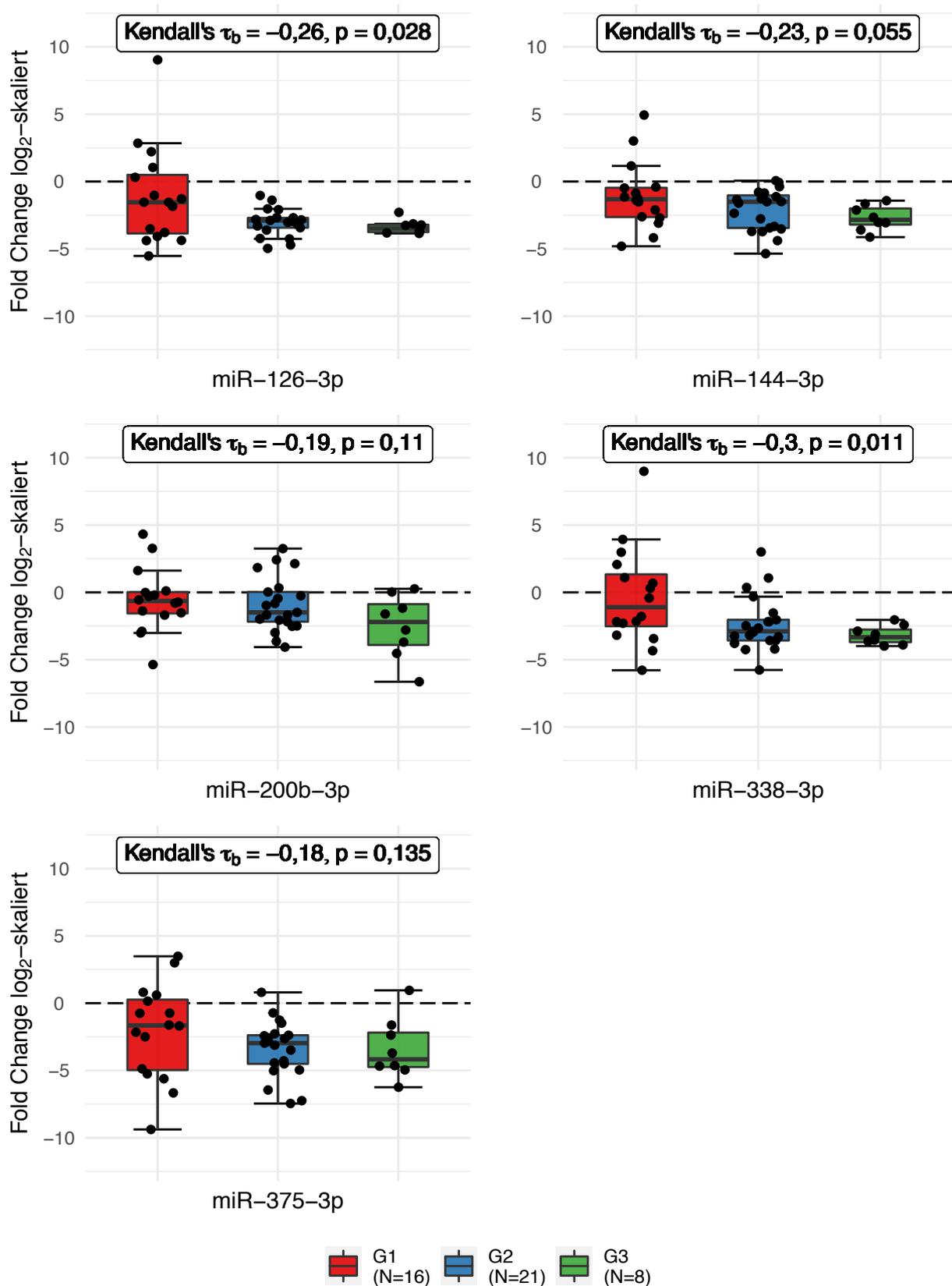
### 4.5.3 Subgruppenanalyse hinsichtlich der Grading-Stufen nach Weichert et al.

Für zwei der untersuchten miRNAs (miR-126-3p und miR-338-3p) ergab sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen den Grading-Stufen nach Weichert et al. und ihrer Expression. Die Ergebnisse der Kendall'schen Rangkorrelation sind in Abbildung 19 dargestellt.



**Abbildung 19: Subgruppenanalyse hinsichtlich der Grading-Stufen nach Weichert et al.**

Abzisse: Subgruppen anhand der Grading-Stufen nach Weichert et al. (siehe Legende). Ordinate: *Fold Change* (maßlose Zahl, log<sub>2</sub>-skaliert) der jeweiligen miRNA. Abkürzungen:  $\tau_b$ : Rangkorrelationskoeffizient (Kendall's  $\tau_b$ ), p: Signifikanzwert.

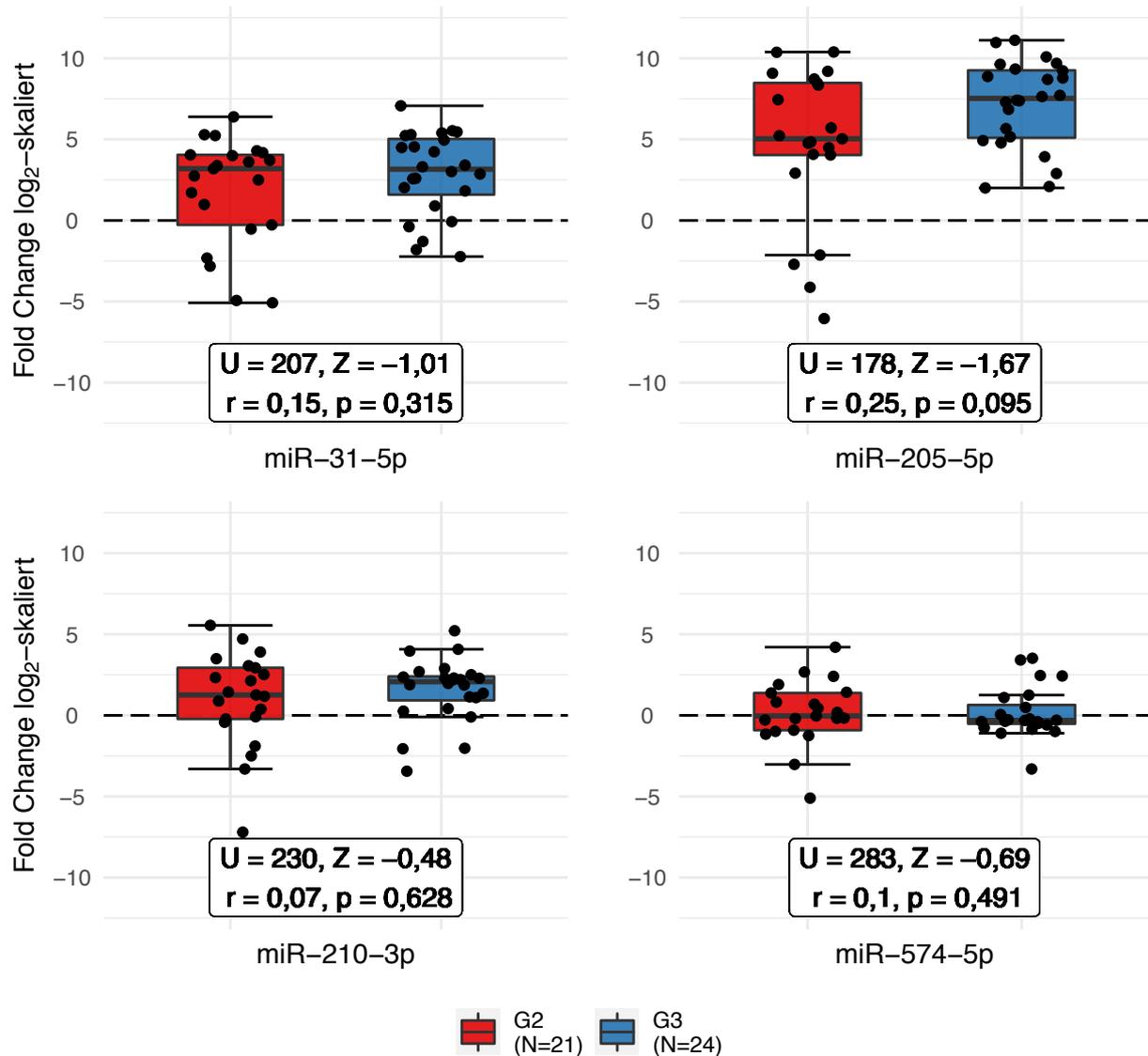


**Fortsetzung Abbildung 19: Subgruppenanalyse hinsichtlich der Grading-Stufen nach Weichert et al.**

Abszisse: Subgruppen anhand der Grading-Stufen nach Weichert et al. (siehe Legende). Ordinate: *Fold Change* (maßlose Zahl,  $\log_2$ -skaliert) der jeweiligen miRNA. Abkürzungen:  $\tau_b$ : Rangkorrelationskoeffizient (Kendall's  $\tau_b$ ),  $p$ : Signifikanzwert.

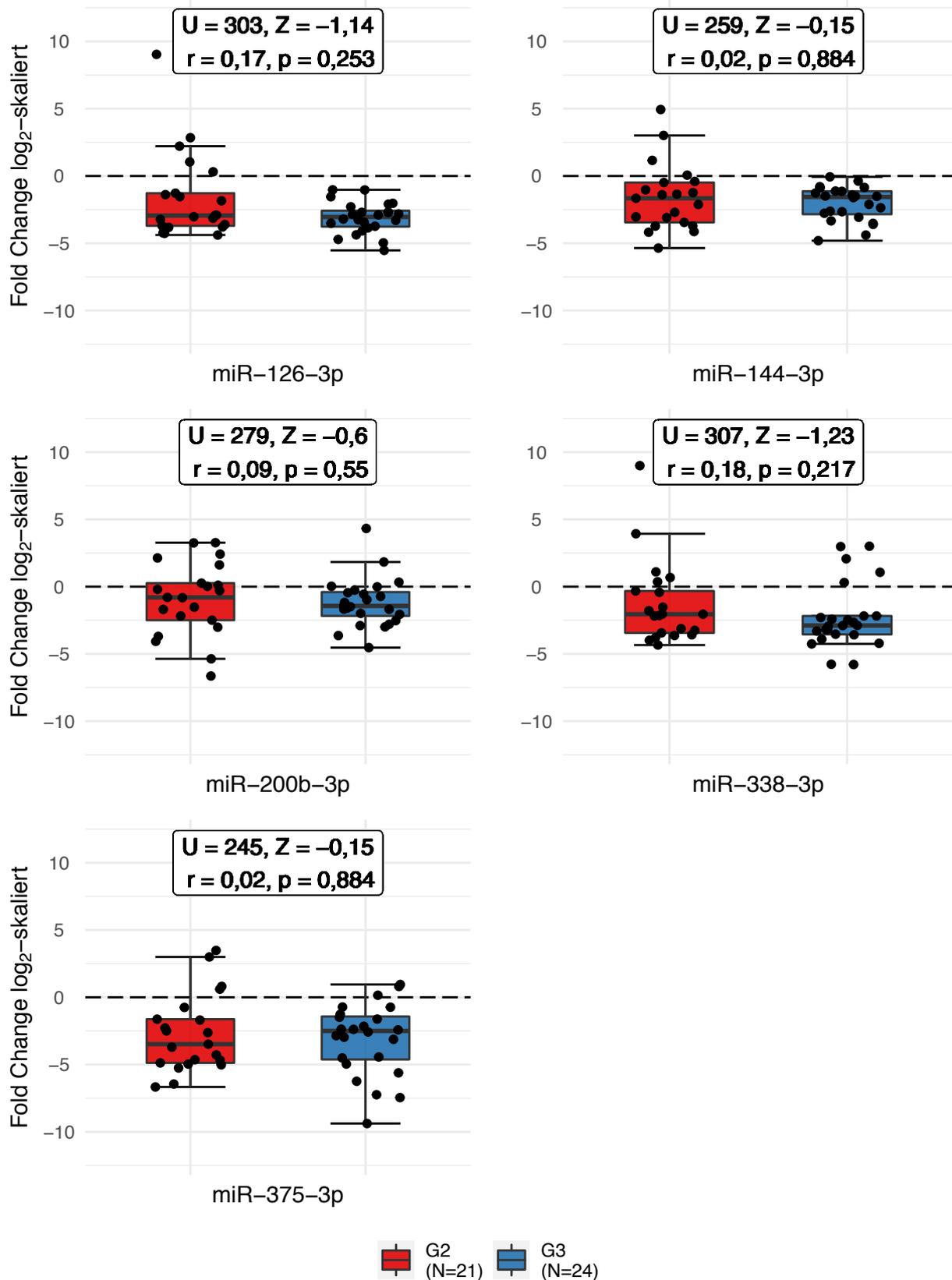
#### 4.5.4 Subgruppenanalyse hinsichtlich der konventionellen Grading-Stufen

Für das konventionelle Grading-Schema ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gradierungen G2 und G3. Die Ergebnisse des Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben sind in Abbildung 20 dargestellt.



**Abbildung 20: Subgruppenanalyse hinsichtlich der konventionellen Grading-Stufen**

Abzisse: Subgruppen anhand der konventionellen Grading-Stufen (siehe Legende). Ordinate: *Fold Change* (maßlose Zahl, log<sub>2</sub>-skaliert) der jeweiligen miRNA. Abkürzungen: U: Mann-Whitney-U-Statistik, Z: standardisierte Teststatistik, r: Effektstärke, p: Signifikanzwert



**Fortsetzung Abbildung 20: Subgruppenanalyse hinsichtlich der konventionellen Grading-Stufen**

Abszisse: Subgruppen anhand der konventionellen Grading-Stufen (siehe Legende). Ordinate: *Fold Change* (maßlose Zahl,  $\log_2$ -skaliert) der jeweiligen miRNA. Abkürzungen: U: Mann-Whitney-U-Statistik, Z: standardisierte Teststatistik, r: Effektstärke, p: Signifikanzwert.

#### 4.5.5 Korrelation mit dem Patientenalter

Im untersuchten Kollektiv ergab sich kein signifikanter Zusammenhang mit dem Patientenalter. Die Ergebnisse der Rangkorrelation nach Spearman sind in Tabelle 14 dargestellt.

**Tabelle 14: Korrelation mit dem Patientenalter**

	<i>Spearman's <math>\rho</math></i>	<i>p</i>
<b>Hochregulierte miRNAs</b>		
miR-31-5p	0,15	0,328
miR-205-5p	-0,03	0,859
miR-210-3p	0,36	0,138
<b>Nicht dysregulierte miRNAs</b>		
mir-574-5p	0,03	0,841
<b>Herabregulierte miRNAs</b>		
miR-126-3p	-0,20	0,18
miR-144-3p	-0,21	0,16
miR-200b-3p	-0,24	0,111
miR-338-3p	-0,05	0,733
miR-375-3p	0,04	0,815

Abkürzungen:  $\rho$ : Rangkorrelationskoeffizient nach *Spearman*, *p*: Signifikanzwert.

#### 4.5.6 Subgruppenanalyse hinsichtlich des Geschlechts

Ein signifikanter Unterschied der miRNA-Expression hinsichtlich des Geschlechtes konnte am vorliegenden Patientenkollektiv für keine der untersuchten miRNAs nachgewiesen werden. Die Ergebnisse des zweiseitigen Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben sind in Tabelle 15 dargestellt.

**Tabelle 15: Subgruppenanalyse hinsichtlich des Geschlechts**

	<i>Fold Change, log<sub>2</sub>-skaliert</i>		<b>U</b>	<b>Z</b>	<b>r</b>	<b>p</b>
	<b>weiblich (N = 9)</b>	<b>männlich (N = 36)</b>				
<b>Hochregulierte miRNAs</b>						
<b>miR-31-5p</b>			214	-1,45	0,22	0,146
<b>Mdn (MAA)</b>	<b>4,3 (1,4)</b>	<b>2,8 (2,7)</b>				
[Min; Max]	[-2,3; 7,1]	[-5,1; 6,4]				
<b>miR-205-5p</b>			155	-0,18	0,03	0,856
<b>Mdn (MAA)</b>	<b>5,7 (4)</b>	<b>7,3 (3,4)</b>				
[Min; Max]	[-4,1; 11]	[-6,1; 11]				
<b>miR-210-3p</b>			139	-0,63	0,09	0,53
<b>Mdn (MAA)</b>	<b>1,4 (2,3)</b>	<b>2,2 (1,7)</b>				
[Min; Max]	[-2,5; 4,0]	[-7,2; 5,5]				
<b>Nicht dysregulierte miRNAs</b>						
<b>miR-574-5p</b>			195	-0,91	0,14	0,363
<b>Mdn (MAA)</b>	<b>0,69 (1,3)</b>	<b>-0,29 (1)</b>				
[Min; Max]	[-5,1; 2,5]	[-3,3; 4,2]				
<b>Herabregulierte miRNAs</b>						
<b>miR-126-3p</b>			156	-0,15	0,02	0,878
<b>Mdn (MAA)</b>	<b>-3,3 (2,2)</b>	<b>-2,9 (1,2)</b>				
[Min; Max]	[-4,7; 1,0]	[-5,5; 9,0]				
<b>miR-144-3p</b>			154	-0,21	0,03	0,834
<b>Mdn (MAA)</b>	<b>-2,7 (1,6)</b>	<b>-1,6 (1,6)</b>				
[Min; Max]	[-3,7; 1,2]	[-5,4; 4,9]				
<b>miR-200b-3p</b>			230	-1,92	0,29	0,054
<b>Mdn (MAA)</b>	<b>-0,73 (3,1)</b>	<b>-1,6 (2)</b>				
[Min; Max]	[-2,8; 3,3]	[-6,6; 4,3]				
<b>miR-338-3p</b>			158	-0,1	0,02	0,922
<b>Mdn (MAA)</b>	<b>-2,3 (2,2)</b>	<b>-2,6 (1,4)</b>				
[Min; Max]	[-4,2; 3,9]	[-5,8; 9,0]				
<b>miR-375-3p</b>			135	-0,74	0,11	0,459
<b>Mdn (MAA)</b>	<b>-5,0 (2,2)</b>	<b>-2,5 (2,6)</b>				
[Min; Max]	[-6,4; 0,81]	[-9,4; 3,5]				

Abkürzungen: Mdn: Median, MAA: mittlere absolute Abweichung, Min: Minimum, Max: Maximum, U: Mann-Whitney-U-Statistik, Z: standardisierte Teststatistik, r: Effektstärke, p: Signifikanzwert

#### 4.5.7 Subgruppenanalyse hinsichtlich der histologischen Subtypen

Für die histologischen Subtypen konnte kein signifikanter Unterschied der miRNA-Expression zwischen den beiden Subgruppen festgestellt werden. Die Ergebnisse des zweiseitigen Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben sind in Tabelle 16 dargestellt.

**Tabelle 16: Subgruppenanalyse hinsichtlich der histologischen Subtypen**

	<i>Fold Change, log<sub>2</sub>-skaliert</i>		U	Z	r	p
	nicht verhornend (N = 27)	verhornend (N = 18)				
<b>Hochregulierte miRNAs</b>						
<b>miR-31-5p</b>			257	-0,31	0,05	0,757
<b>Mdn</b> (MAA)	<b>3,2</b> (3)	<b>3,1</b> (2,3)				
[Min; Max]	[-4,9; 7,1]	[-5,1; 6,4]				
<b>miR-205-5p</b>			319	-1,75	0,26	0,0802
<b>Mdn</b> (MAA)	<b>7,4</b> (3,3)	<b>4,9</b> (4,2)				
[Min; Max]	[-6,1; 11]	[-4,1; 9,2]				
<b>miR-210-3p</b>			267	-0,54	0,08	0,59
<b>Mdn</b> (MAA)	<b>2,0</b> (2,3)	<b>1,7</b> (1,7)				
[Min; Max]	[-3,4; 5,5]	[-7,2; 3,5]				
<b>Nicht dysregulierte miRNAs</b>						
<b>miR-574-5p</b>			256	-0,29	0,04	0,774
<b>Mdn</b> (MAA)	<b>-0,30</b> (1)	<b>-0,18</b> (1,3)				
[Min; Max]	[-3,3; 4,2]	[-5,1; 2,4]				
<b>Herabregulierte miRNAs</b>						
<b>miR-126-3p</b>			218	-0,56	0,08	0,574
<b>Mdn</b> (MAA)	<b>-3,2</b> (0,8)	<b>-2,8</b> (2)				
[Min; Max]	[-5,0; 9,0]	[-5,5; 2,2]				
<b>miR-144-3p</b>			280	-0,84	0,13	0,402
<b>Mdn</b> (MAA)	<b>-1,6</b> (1,6)	<b>-1,8</b> (2,1)				
[Min; Max]	[-4,4; 4,9]	[-5,4; 3,0]				
<b>miR-200b-3p</b>			239	-0,08	0,01	0,936
<b>Mdn</b> (MAA)	<b>-1,4</b> (2,1)	<b>-0,90</b> (1,8)				
[Min; Max]	[-5,4; 4,3]	[-6,6; 3,3]				
<b>miR-338-3p</b>			214	-0,65	0,10	0,513
<b>Mdn</b> (MAA)	<b>-2,9</b> (1)	<b>-2,2</b> (2,5)				
[Min; Max]	[-5,8; 9,0]	[-5,8; 3,9]				
<b>miR-375-3p</b>			224	-0,42	0,06	0,671
<b>Mdn</b> (MAA)	<b>-3,1</b> (2,7)	<b>-2,5</b> (2)				
[Min; Max]	[-7,5; 3,0]	[-9,4; 3,5]				

Abkürzungen: Mdn: Median, MAA: mittlere absolute Abweichung, Min: Minimum, Max: Maximum, U: Mann-Whitney-U-Statistik, Z: standardisierte Teststatistik, r: Effektstärke, p: Signifikanzwert.

#### 4.5.8 Subgruppenanalyse hinsichtlich der T-Kategorie

Für die ausgewählten miRNAs ergab sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen den Expressionswerten und den T-Kategorien T1 bis T4. Die Ergebnisse der Kendall'schen Rangkorrelation sind in Tabelle 17 dargestellt.

**Tabelle 17: Subgruppenanalyse hinsichtlich der T-Kategorien**

	<i>Fold Change, log<sub>2</sub>-skaliert</i>				$\tau_b$	p
	<b>T1</b> (N = 6)	<b>T2</b> (N = 30)	<b>T3</b> (N = 5)	<b>T4</b> (N = 4)		
<b>Hochregulierte miRNAs</b>						
<b>miR-31-5p</b>					0,03	0,774
<b>Mdn (MAA)</b>	<b>1,1</b> (2,7)	<b>3,4</b> (2,5)	<b>2,5</b> (3,0)	<b>3,6</b> (1,0)		
[Min; Max]	[-2,2; 5,5]	[-2,3; 6,4]	[-4,1; 7,1]	[-4,9; 5,3]		
<b>miR-205-5p</b>					0,08	0,503
<b>Mdn (MAA)</b>	<b>4,0</b> (2,4)	<b>7,4</b> (3,3)	<b>7,4</b> (4,0)	<b>7,3</b> (2,3)		
[Min; Max]	[-2,1; 11]	[-4,1; 10]	[-2,7; 11]	[-6,1; 9,2]		
<b>miR-210-3p</b>					0,13	0,274
<b>Mdn (MAA)</b>	<b>0,15</b> (2,4)	<b>2,0</b> (1,1)	<b>2,3</b> (1,4)	<b>2,1</b> (3,8)		
[Min; Max]	[-3,4; 4,1]	[-2,5; 5,2]	[-7,2; 4,0]	[-3,3; 2,1]		
<b>Nicht dysregulierte miRNAs</b>						
<b>mir-574-5p</b>					0,18	0,118
<b>Mdn (MAA)</b>	<b>-0,70</b> (0,5)	<b>-0,19</b> (0,9)	<b>-0,17</b> (1,4)	<b>1,4</b> (2,5)		
[Min; Max]	[-3,3; 1,9]	[-5,1; 3,5]	[-1,2; 3,4]	[-3,0; 4,2]		
<b>Herabregulierte miRNAs</b>						
<b>miR-126-3p</b>					-0,07	0,559
<b>Mdn (MAA)</b>	<b>-3,0</b> (1,1)	<b>-2,8</b> (1,4)	<b>-3,3</b> (1,8)	<b>-2,9</b> (1,2)		
[Min; Max]	[-4,1; 2,2]	[-5,5; 1,0]	[-4,4; 2,8]	[-5,0; 9,0]		
<b>miR-144-3p</b>					0,14	0,23
<b>Mdn (MAA)</b>	<b>-1,8</b> (3,0)	<b>-2,1</b> (1,4)	<b>-2,7</b> (1,9)	<b>-1,0</b> (0,8)		
[Min; Max]	[-4,4; 3,0]	[-5,4; 1,2]	[-4,8; -0,85]	[-3,1; 4,9]		
<b>miR-200b-3p</b>					-0,21	0,072
<b>Mdn (MAA)</b>	<b>0,045</b> (0,4)	<b>-1,2</b> (1,3)	<b>-2,5</b> (1,4)	<b>-1,6</b> (3,6)		
[Min; Max]	[-3,6; 4,3]	[-4,5; 3,3]	[-6,6; 0,03]	[-5,4; 3,3]		
<b>miR-338-3p</b>					-0,03	0,807
<b>Mdn (MAA)</b>	<b>-1,3</b> (3,4)	<b>-2,4</b> (1,3)	<b>-3,3</b> (1,4)	<b>-2,0</b> (2,3)		
[Min; Max]	[-3,6; 3,0]	[-4,3; 3,9]	[-5,8; 2,1]	[-3,6; 9,0]		
<b>miR-375-3p</b>					-0,07	0,545
<b>Mdn (MAA)</b>	<b>-3,4</b> (2,6)	<b>-2,6</b> (2,8)	<b>-2,3</b> (3,6)	<b>-3,0</b> (0,9)		
[Min; Max]	[-5,6; 3,5]	[-6,7; 0,95]	[-9,4; -0,15]	[-5,0; 3,0]		

Abkürzungen: Mdn: Median, MAA: mittlere absolute Abweichung, Min: Minimum, Max: Maximum,  $\tau_b$ : Rangkorrelationskoeffizient (Kendall's  $\tau_b$ ), p: Signifikanzwert.

#### 4.5.9 Subgruppenanalyse hinsichtlich der N-Kategorien

Für die ausgewählten miRNAs ergab sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen den Expressionswerten und den N-Kategorien N1 bis N3. Die Ergebnisse der Kendall'schen Rangkorrelation sind in Tabelle 18 dargestellt.

**Tabelle 18: Subgruppenanalyse hinsichtlich der N-Kategorien**

	<i>Fold Change, log<sub>2</sub>-skaliert</i>			$\tau_b$	p
	<b>N0 (N = 23)</b>	<b>N1 (N = 14)</b>	<b>N2 (N = 8)</b>		
<b>Hochregulierte miRNAs</b>					
<b>miR-31-5p</b>				0,02	0,897
<b>Mdn (MAA)</b>	<b>3,4 (2,7)</b>	<b>2,6 (3,2)</b>	<b>3,8 (1,1)</b>		
[Min; Max]	[-5,1; 7,1]	[-4,9; 5,5]	[0,89; 5,3]		
<b>miR-205-5p</b>				0,15	0,219
<b>Mdn (MAA)</b>	<b>5,2 (3,3)</b>	<b>7,3 (4,2)</b>	<b>8,6 (1,2)</b>		
[Min; Max]	[-2,7; 11]	[-6,1; 10]	[4,8; 9,7]		
<b>miR-210-3p</b>				0,04	0,714
<b>Mdn (MAA)</b>	<b>1,4 (1,6)</b>	<b>1,7 (3)</b>	<b>2,0 (0,6)</b>		
[Min; Max]	[-7,2; 4,1]	[-3,3; 5,2]	[-1,9; 5,5]		
<b>Nicht dysregulierte miRNAs</b>					
<b>mir-574-5p</b>				0,16	0,175
<b>Mdn (MAA)</b>	<b>-0,27 (1)</b>	<b>-0,25 (1,2)</b>	<b>0,46 (1,6)</b>		
[Min; Max]	[-5,1; 2,5]	[-3,0; 3,5]	[-0,85; 4,2]		
<b>Herabregulierte miRNAs</b>					
<b>miR-126-3p</b>				-0,03	0,829
<b>Mdn (MAA)</b>	<b>-2,9 (1,1)</b>	<b>-2,6 (2)</b>	<b>-3,6 (1,5)</b>		
[Min; Max]	[-5,5; 2,2]	[-4,4; 9,0]	[-5,0; 2,8]		
<b>miR-144-3p</b>				0,23	0,058
<b>Mdn (MAA)</b>	<b>-2,7 (1,9)</b>	<b>-1,3 (0,6)</b>	<b>-2,0 (2,1)</b>		
[Min; Max]	[-5,4; 3,0]	[-3,1; 1,2]	[-3,5; 4,9]		
<b>miR-200b-3p</b>				-0,03	0,779
<b>Mdn (MAA)</b>	<b>-0,82 (1,6)</b>	<b>-1,1 (2,8)</b>	<b>-1,5 (0,5)</b>		
[Min; Max]	[-6,6; 4,3]	[-4,5; 3,3]	[-5,4; 2,4]		
<b>miR-338-3p</b>				0,2	0,085
<b>Mdn (MAA)</b>	<b>-3,1 (1,2)</b>	<b>-2,1 (1,8)</b>	<b>-1,7 (3,2)</b>		
[Min; Max]	[-5,8; 1,1]	[-4,3; 9,0]	[-5,8; 1,1]		
<b>miR-375-3p</b>				0,1	0,413
<b>Mdn (MAA)</b>	<b>-3,5 (2,6)</b>	<b>-2,7 (2,9)</b>	<b>-2,4 (1,2)</b>		
[Min; Max]	[-9,4; 3,5]	[-7,2; 3,0]	[-7,5; 0,80]		

Abkürzungen: Mdn: Median, MAA: mittlere absolute Abweichung, Min: Minimum, Max: Maximum,  $\tau_b$ : Rangkorrelationskoeffizient (Kendall's  $\tau_b$ ), p: Signifikanzwert.

#### 4.5.10 Subgruppenanalyse hinsichtlich der UICC-Stadien

Für die untersuchten miRNAs ergab sich kein signifikanter Zusammenhang der miRNA-Expression mit den UICC-Stadien. Die Ergebnisse der Kendall'schen Rangkorrelation sind in Tabelle 19 dargestellt.

**Tabelle 19: Subgruppenanalyse hinsichtlich der UICC-Stadien**

	<i>Fold Change, log<sub>2</sub>-skaliert</i>				$\tau_b$	p
	<b>I (N = 15)</b>	<b>II (N = 15)</b>	<b>IIIA (N = 8)</b>	<b>IIIB+IV (N = 7)</b>		
<b>Hochregulierte miRNAs</b>						
<b>miR-31-5p</b>					0,06	0,573
<b>Mdn (MAA)</b>	<b>3,0 (3,3)</b>	<b>4,0 (2,1)</b>	<b>2,4 (2)</b>	<b>4,2 (1,7)</b>		
[Min; Max]	[-2,3; 5,5]	[-5,1; 7,1]	[-4,9; 4,2]	[0,89; 5,5]		
<b>miR-205-5p</b>					0,13	0,273
<b>Mdn (MAA)</b>	<b>5,2 (3,3)</b>	<b>4,8 (5,9)</b>	<b>8,0 (1,8)</b>	<b>7,7 (1,3)</b>		
[Min; Max]	[-2,1; 11]	[-4,1; 11]	[-6,1; 10]	[4,8; 9,2]		
<b>miR-210-3p</b>					0,07	0,545
<b>Mdn (MAA)</b>	<b>1,4 (2,2)</b>	<b>1,2 (2,0)</b>	<b>2,1 (0,8)</b>	<b>2,2 (0,8)</b>		
[Min; Max]	[-3,4; 5,2]	[-7,2; 4,0]	[-3,3; 4,7]	[-1,9; 5,5]		
<b>Nicht dysregulierte miRNAs</b>						
<b>mir-574-5p</b>					0,13	0,273
<b>Mdn (MAA)</b>	<b>-0,22 (1,0)</b>	<b>-0,31 (1,0)</b>	<b>1,2 (2,0)</b>	<b>-0,17 (0,9)</b>		
[Min; Max]	[-5,1; 3,5]	[-1,2; 2,7]	[-3,0; 3,4]	[-0,77; 4,2]		
<b>Herabregulierte miRNAs</b>						
<b>miR-126-3p</b>					-0,07	0,519
<b>Mdn (MAA)</b>	<b>-2,8 (1,5)</b>	<b>-3,1 (0,9)</b>	<b>-3,2 (1,7)</b>	<b>-2,9 (1,3)</b>		
[Min; Max]	[-4,2; 2,2]	[-5,5; 1,0]	[-4,7; 9,0]	[-5,0; 2,8]		
<b>miR-144-3p</b>					0,25	0,051
<b>Mdn (MAA)</b>	<b>-2,8 (2)</b>	<b>-2,1 (0,9)</b>	<b>-0,95 (0,6)</b>	<b>-1,3 (2,1)</b>		
[Min; Max]	[-5,4; 3,0]	[-4,8; 1,2]	[-3,5; -0,38]	[-3,3; 4,9]		
<b>miR-200b-3p</b>					-0,14	0,208
<b>Mdn (MAA)</b>	<b>-0,80 (1,3)</b>	<b>-0,73 (1,9)</b>	<b>-1,5 (1,8)</b>	<b>-1,6 (1,4)</b>		
[Min; Max]	[-4,5; 4,3]	[-6,6; 1,8]	[-4,1; 3,3]	[-5,4; 2,4]		
<b>miR-338-3p</b>					0,03	0,766
<b>Mdn (MAA)</b>	<b>-2,4 (1,3)</b>	<b>-3,1 (1,4)</b>	<b>-2,3 (2)</b>	<b>-2,2 (2,6)</b>		
[Min; Max]	[-3,8; 1,1]	[-5,8; 3,9]	[-4,2; 9,0]	[-5,8; 0,68]		
<b>miR-375-3p</b>					-0,01	0,959
<b>Mdn (MAA)</b>	<b>-2,6 (3,5)</b>	<b>-3,1 (2,6)</b>	<b>-2,5 (2)</b>	<b>-2,5 (1,2)</b>		
[Min; Max]	[-6,4; 3,5]	[-9,4; 0,81]	[-7,2; 3,0]	[-7,5; -1,7]		

Abkürzungen: Mdn: Median, MAA: mittlere absolute Abweichung, Min: Minimum, Max: Maximum,  $\tau_b$ : Rangkorrelationskoeffizient (Kendall's  $\tau_b$ ), p: Signifikanzwert.

#### 4.5.11 Subgruppenanalyse hinsichtlich einer Lymphangiosis carcinomatosa

Für die ausgewählten miRNAs ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den gebildeten Subgruppen hinsichtlich einer Lymphangiosis carcinomatosa. Die Ergebnisse des Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben sind in Tabelle 20 dargestellt.

**Tabelle 20: Subgruppenanalyse hinsichtlich einer Lymphangiosis carcinomatosa**

	<i>Fold Change, log<sub>2</sub>-skaliert</i>		U	Z	r	p
	L0 (N = 24)	L1 (N = 21)				
<b>Hochregulierte miRNAs</b>						
<b>miR-31-5p</b>			196	-1,26	0,19	0,209
<b>Mdn</b> (MAA)	<b>2,5</b> (3,7)	<b>3,4</b> (1,7)				
[Min; Max]	[-5,1; 7,1]	[-4,9; 5,5]				
<b>miR-205-5p</b>			228	-1,91	0,29	0,054
<b>Mdn</b> (MAA)	<b>4,9</b> (3,4)	<b>8,3</b> (1,6)				
[Min; Max]	[-4,1; 11]	[-6,1; 10]				
<b>miR-210-3p</b>			224	-0,62	0,09	0,535
<b>Mdn</b> (MAA)	<b>1,7</b> (1,9)	<b>1,9</b> (1,5)				
[Min; Max]	[-7,2; 4,1]	[-3,3; 5,5]				
<b>Nicht dysregulierte miRNAs</b>						
<b>miR-574-5p</b>			206	-1,03	0,15	0,304
<b>Mdn</b> (MAA)	<b>-0,20</b> (1,1)	<b>-0,30</b> (0,9)				
[Min; Max]	[-5,1; 2,5]	[-3,0; 4,2]				
<b>Herabregulierte miRNAs</b>						
<b>miR-126-3p</b>			240	-0,26	0,039	0,796
<b>Mdn</b> (MAA)	<b>-3,0</b> (1,3)	<b>-2,9</b> (1,3)				
[Min; Max]	[-5,5; 2,2]	[-5,0; 9,0]				
<b>miR-144-3p</b>			175	-1,74	0,26	0,082
<b>Mdn</b> (MAA)	<b>-2,4</b> (1,7)	<b>-1,3</b> (1,2)				
[Min; Max]	[-5,4; 3,0]	[-4,1; 4,9]				
<b>miR-200b-3p</b>			276	-0,53	0,08	0,596
<b>Mdn</b> (MAA)	<b>-1,0</b> (1,5)	<b>-1,4</b> (2,2)				
[Min; Max]	[-6,6; 4,3]	[-5,4; 3,3]				
<b>miR-338-3p</b>			185	-1,51	0,22	0,131
<b>Mdn</b> (MAA)	<b>-3,2</b> (1,3)	<b>-2,2</b> (1,5)				
[Min; Max]	[-5,8; 3,9]	[-5,8; 9,0]				
<b>miR-375-3p</b>			192	-1,35	0,2	0,178
<b>Mdn</b> (MAA)	<b>-4,0</b> (2,5)	<b>-2,4</b> (2,5)				
[Min; Max]	[-9,4; 3,5]	[-7,5; 3,0]				

Abkürzungen: Mdn: Median, MAA: mittlere absolute Abweichung, Min: Minimum, Max: Maximum, U: Mann-Whitney-U-Statistik, Z: standardisierte Teststatistik, r: Effektstärke, p: Signifikanzwert.

#### 4.5.12 Subgruppenanalyse hinsichtlich einer Hämangiosis carcinomatosa

Hinsichtlich einer Hämangiosis carcinomatosa zeigten PECs mit Nachweis einer Blutgefäßinvasion (V1) eine signifikant stärkere Herabregulation von miR-126-3p im Vergleich PECs ohne Nachweis einer Blutgefäßinvasion (V0). Für die weiteren untersuchten miRNA ergab sich kein signifikanter Unterschied. Die Ergebnisse des Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben sind in Tabelle 21 dargestellt.

**Tabelle 21: Subgruppenanalyse hinsichtlich einer Hämangiosis carcinomatosa**

	<i>Fold Change, log<sub>2</sub>-skaliert</i>		U	Z	r	p
	V0 (N = 23)	V1 (N = 22)				
<b>Hochregulierte miRNAs</b>						
<b>miR-31-5p</b>			273	-0,44	0,07	0,661
<b>Mdn</b> (MAA)	<b>3,4</b> (2,3)	<b>2,9</b> (3,2)				
[Min; Max]	[-5,1; 7,1]	[-4,9; 5,5]				
<b>miR-205-5p</b>			214	-0,87	0,13	0,386
<b>Mdn</b> (MAA)	<b>5,2</b> (4,8)	<b>7,3</b> (2,9)				
[Min; Max]	[-4,1; 11]	[-6,1; 10]				
<b>miR-210-3p</b>			233	-0,44	0,07	0,661
<b>Mdn</b> (MAA)	<b>1,3</b> (2,2)	<b>2,1</b> (1,1)				
[Min; Max]	[-7,2; 5,5]	[-3,4; 5,2]				
<b>Nicht dysregulierte miRNAs</b>						
<b>mir-574-5p</b>			236	-0,37	0,06	0,711
<b>Mdn</b> (MAA)	<b>-0,18</b> (1,2)	<b>-0,28</b> (0,8)				
[Min; Max]	[-5,1; 4,2]	[-3,3; 3,5]				
<b>Herabregulierte miRNAs</b>						
<b>miR-126-3p</b>			350	-2,21	0,33	<b>0,027</b>
<b>Mdn</b> (MAA)	<b>-2,8</b> (1,9)	<b>-3,4</b> (1,0)				
[Min; Max]	[-5,5; 2,8]	[-5,0; 9,0]				
<b>miR-144-3p</b>			253	0	<0,01	1
<b>Mdn</b> (MAA)	<b>-1,6</b> (1,8)	<b>-1,8</b> (1,5)				
[Min; Max]	[-4,8; 4,9]	[-5,4; 0,062]				
<b>miR-200b-3p</b>			234	-0,42	0,06	0,677
<b>Mdn</b> (MAA)	<b>-0,80</b> (1,9)	<b>-1,3</b> (1,7)				
[Min; Max]	[-6,6; 2,1]	[-4,5; 4,3]				
<b>miR-338-3p</b>			247	-0,12	0,02	0,902
<b>Mdn</b> (MAA)	<b>-2,3</b> (2)	<b>-2,6</b> (1,3)				
[Min; Max]	[-5,8; 3,9]	[-5,8; 9,0]				
<b>miR-375-3p</b>			254	-0,01	<0,01	0,991
<b>Mdn</b> (MAA)	<b>-3,5</b> (2,7)	<b>-2,6</b> (1,8)				
[Min; Max]	[-9,4; 3,5]	[-7,5; 3,0]				

Abkürzungen: Mdn: Median, MAA: mittlere absolute Abweichung, Min: Minimum, Max: Maximum, U: Mann-Whitney-U-Statistik, Z: standardisierte Teststatistik, r: Effektstärke, p: Signifikanzwert.

#### 4.5.13 Subgruppenanalyse hinsichtlich einer Perineuralscheideninfiltration

Hinsichtlich einer perineuralen Tumorausbreitung ergab sich für die ausgewählten miRNAs kein signifikanter Unterschied zwischen den gebildeten Subgruppen. Die Ergebnisse des Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben sind in Tabelle 22 dargestellt.

**Tabelle 22: Subgruppenanalyse hinsichtlich einer Perineuralscheideninfiltration**

	<i>Fold Change, log<sub>2</sub>-skaliert</i>		U	Z	r	p
	Pn0 (N = 39)	Pn1 (N = 6)				
<b>Hochregulierte miRNAs</b>						
<b>miR-31-5p</b>			103	-0,44	0,07	0,66
<b>Mdn (MAA)</b>	<b>3,2 (2,2)</b>	<b>3,5 (2,7)</b>				
[Min; Max]	[-5,1; 7,1]	[-1,3; 5,4]				
<b>miR-205-5p</b>			100	-0,54	0,08	0,591
<b>Mdn (MAA)</b>	<b>5,7 (4,2)</b>	<b>7,5 (1,5)</b>				
[Min; Max]	[-6,1; 11]	[4,0; 9,3]				
<b>miR-210-3p</b>			94	-0,74	0,11	0,462
<b>Mdn (MAA)</b>	<b>1,9 (1,5)</b>	<b>2,2 (2)</b>				
[Min; Max]	[-7,2; 5,5]	[-0,099; 5,2]				
<b>Nicht dysregulierte miRNAs</b>						
<b>mir-574-5p</b>			103	-0,44	0,07	0,66
<b>Mdn (MAA)</b>	<b>-0,22 (1,1)</b>	<b>-0,17 (0,6)</b>				
[Min; Max]	[-5,1; 4,2]	[-0,77; 3,5]				
<b>Herabregulierte miRNAs</b>						
<b>miR-126-3p</b>			161	-1,44	0,21	0,15
<b>Mdn (MAA)</b>	<b>-2,9 (1,4)</b>	<b>-3,5 (1,1)</b>				
[Min; Max]	[-5,5; 9,0]	[-5,0; -2,3]				
<b>miR-144-3p</b>			144	-0,87	0,13	0,386
<b>Mdn (MAA)</b>	<b>-1,5 (1,7)</b>	<b>-2,7 (1,2)</b>				
[Min; Max]	[-5,4; 4,9]	[-3,7; -0,87]				
<b>miR-200b-3p</b>			140	-0,74	0,11	0,462
<b>Mdn (MAA)</b>	<b>-0,97 (1,6)</b>	<b>-2,1 (2,2)</b>				
[Min; Max]	[-6,6; 4,3]	[-4,5; 0,33]				
<b>miR-338-3p</b>			126	-0,28	0,04	0,782
<b>Mdn (MAA)</b>	<b>-2,5 (1,6)</b>	<b>-2,6 (0,8)</b>				
[Min; Max]	[-5,8; 9,0]	[-5,8; 2,1]				
<b>miR-375-3p</b>			103	-0,44	0,07	0,66
<b>Mdn (MAA)</b>	<b>-2,9 (3)</b>	<b>-2,3 (0,7)</b>				
[Min; Max]	[-9,4; 3,5]	[-7,5; 0,95]				

Abkürzungen: Mdn: Median, MAA: mittlere absolute Abweichung, Min: Minimum, Max: Maximum, U: Mann-Whitney-U-Statistik, Z: standardisierte Teststatistik, r: Effektstärke, p: Signifikanzwert.

## 5 Diskussion

### 5.1 Ergebnisdiskussion

#### 5.1.1 Patientenkollektiv

In der von uns durchgeführten Studie wurden Proben von insgesamt 36 Männern und 9 Frauen im Alter von 53 bis 85 Jahren untersucht. Die deutliche Mehrheit der Männer spiegelt auch die aktuelle Geschlechterverteilung bei PECs wieder [223]. Auch die Altersstruktur entspricht derer von Deutschland [223], sodass das untersuchte Kollektiv dahingehend als repräsentativ angesehen werden kann. Gegeben durch das Einzugsgebiet des Universitätsklinikums des Saarlandes setzt sich das Patientenkollektiv vornehmlich aus Einwohnern des Saarlandes und der Südpfalz zusammen. Allerdings variiert das genetische Erbgut nicht nur zwischen einzelnen Individuen, sondern auch zwischen verschiedenen Ethnien [54,160]. So ist es denkbar, dass Unterschiede zu anderen Studien auch durch Untersuchung verschiedener Patientenkollektive begründet sein können.

Bezüglich der beiden betrachteten Subtypen des PEC war eine annähernd ähnliche Verteilung im Vergleich zu anderen Studien gegeben. In unserer Studie ergab sich ein etwas höherer Anteil der verhornenden PECs von 40%. In der Studie von Kadota et al. betrug der Anteil 25 %, in der Studie von Weichert et al. 33 % [86,203].

Aufgrund der Art der Probengewinnung aus Lungenresektaten wurden hauptsächlich frühe Tumorstadien betrachtet. Patienten mit ausgedehntem Tumorleiden u.a. mit Fernmetastasen (mit Ausnahme der solitären Organmetastasen) werden leitliniengerecht nach bioptischer Sicherung der Diagnose mittels definitiver Radiochemotherapie behandelt [109]. Eine Resektion des Bronchialkarzinoms erfolgt nicht [109], sodass diese Patientengruppe nicht eingeschlossen werden konnte. Jedoch überwiegen bei Diagnosestellung aufgrund des anfangs meist asymptomatischen Verlaufs des NSCLC fortgeschrittene Tumorstadien [163], wodurch eine Verzerrung der Ergebnisse entstehen kann. Da sich ein Karzinom im Verlauf der Krankheit genetisch verändert [138], kann nicht zweifelsfrei von frühen auf fortgeschrittene Tumorstadien rückgeschlossen werden.

In vielen Studien erfolgte bezüglich der Tumorgraduierung keine Auswertung oder es wurde nicht angegeben, welches Grading-System verwendet wurde [30,44,90,115,173–175,222,227]. Auch wurde bei Angabe des Gradings nicht zwischen den Subgruppen des NSCLC unterschieden [44,90,173]. Die Verteilung des Grading-Systems nach Weichert et al. war vergleichbar. Auch in der Erstpublikation wurden die PECs überwiegend als G1 (47%)

oder G2 (45%) klassifiziert. Eine niedrige Differenzierung (G3) war mit 8 % als selten anzusehen [203].

### **5.1.2 MiRNA-Expressionsmuster**

In der durchgeführten Microarray-Analyse konnte ein Expressionsprofil des untersuchten Patientenkollektives erstellt werden. Aufgrund der in der Methodendiskussion (siehe Kapitel 5.2.4) beschriebenen Limitation der Methodik decken sich auch in der Literatur nicht alle Ergebnisse verschiedener Studien [193]. In einer Metaanalyse mit 20 eingeschlossenen Studien, welche ACs und PECs der Lunge untersucht haben, konnte eine Meta-Signatur von sieben hochregulierten (miR-21-5p, miR-31-5p, miR-182-5p, miR-183-5p, miR-200b-3p, miR-205-5p und miR-210-3p) und acht herabregulierten miRNAs (miR-30a-5p, miR-30d-5p, miR-126-3p, miR-126-5p, miR-143-3p, miR-145-5p, miR-451a-5p, miR-486-5p) festgestellt werden [193]. Die zuvor aufgeführten und unterstrichenen miRNAs konnten auch in unserer Studie verifiziert werden. Die Unterschiede können neben den nachfolgend erläuterten Problemen der Methodik (siehe Kapitel 5.2.4) und der verschiedenen Patientenkollektive (siehe Kapitel 5.1.1) auch darin begründet sein, dass in dieser Metanalyse neben PECs auch ACs betrachtet wurden. Eine weitere Metanalyse konnte drei für das PEC der Lunge angeblich spezifische miRNAs nachweisen (miR-196b-5p, miR-205-5p, miR-375-3p) [68], welche auch in unserem Patientenkollektiv gleichsinnig reguliert waren. Entsprechend scheint das in unserer Studie miRNA-Expressionsmuster mit bereits veröffentlichten Ergebnissen im Wesentlichen vergleichbar zu sein.

### **5.1.3 miR-126-3p**

Die miR-126-3p wirkt über Hemmung der Neoangiogenese im Zellexperiment tumorsuppressiv [42] (siehe Kapitel 4.4.1). Zudem konnte für die auch in dieser Studie festgestellte Herabregulation von miR-126-3p im NSCLC eine prognostische Bedeutung nachgewiesen werden [226]. Die vier in dieser Metaanalyse eingeschlossenen Studien [27,90,113,216] untersuchten mittels qPCR die Expression von miR-126-3p in asiatischen Kohorten. Eingeschlossen wurden NSCLC-Patienten in allen Stadien. Die Expression von miR-126-3p zeigte keine wesentlichen Unterschiede zwischen PECs und ACs der Lunge. Die Auswertung bezüglich der weiteren Parameter erfolgte damit über alle eingeschlossenen Fälle ohne Stratifizierung nach Histologie. In je einer der Studien zeigte die Expression von miR-126-3p über alle eingeschlossenen NSCLC-Fälle eine unterschiedliche Expression hinsichtlich einer lymphogenen Metastasierung [27] beziehungsweise hinsichtlich der Tumorgroße (kleiner beziehungsweise größer 3 cm entsprechend mindestens pT2) [90]. Eine Erklärung hierfür könnte die mit der Tumorgroße zunehmende Hypoxie und damit Stimulation der Neoangiogenese bieten [50]. In den anderen Studien [27,113,216] sowie in dieser Arbeit

ließ sich dieser Zusammenhang jedoch nicht zeigen. Eine vaskuläre Invasion wurde nur in einer der Studien [90] untersucht. Dabei konnte die in unserer Studie gefundene Assoziation mit einer Blutgefäßinvasion nicht bestätigt werden. Allerdings wurde in dieser Studie nicht zwischen einer Lymph- oder Hämangiosis beziehungsweise zwischen PECs und ACs unterschieden [90]. Bezüglich des Patientenalters und dem Geschlecht ergab sich übereinstimmend mit unseren Ergebnissen in allen vier Studien kein signifikanter Zusammenhang [27,90,113,216]. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen konnte in diesen Studien kein signifikanter Zusammenhang mit dem Grading nachgewiesen werden [27,90,113,216]. Hierbei ist allerdings anzumerken, dass in diesen Studien keine Methode der Graduierung genannt wurde. Zudem ist die in diesen Studien durchgeführte gepoolte Auswertung bei Adeno- und PECs der Lungen aufgrund der unterschiedlichen Grading-Systeme wahrscheinlich weniger aussagekräftig.

#### **5.1.4 miR-144-3p**

Der miR-144-3p wird u.a. im Magen, Kolon oder Mammakarzinom eine tumorsuppressive Wirkung zugeschrieben [110,141,169]. Andererseits wurde in nasopharyngealen PECs eine tumorfördernde Wirkung beschrieben [180]. Im PEC der Lunge wurde eine tumorsuppressive Wirkung beider miRNA Stränge miR-144-5p und miR-144-3p festgestellt [187]. Übereinstimmend zeigte sich in unserer Arbeit eine Herabregulation beider Stränge in der Microarray-Analyse. Die qPCR beschränkte sich allerdings auf den stärker reprimierten Strang miR-144-3p. Die in unserer Studie beobachtete, tendenziell mit höherer Grading-Stufe nach Weichert et al. sinkende Expression von miR-144-3p (Kendall's  $\tau_b = -0,23$ ,  $p = 0,055$ ) wäre durchaus vereinbar mit einer tumorsuppressiven Wirkung im PEC der Lunge. Auch konnte für beide Stränge gezeigt werden, dass eine Herabregulation des jeweiligen Strangs im Tumorgewebe der PECs der Lunge ein negativer prognostischer Faktor ist [187], was die These eines Tumorsuppressors weiter stützt. In einer Analyse von Daten des *The Cancer Genome Atlas (TCGA)* [133] konnte ebenfalls die Herabregulation von miR-144-3p in pulmonalen PECs nachgewiesen werden [30]. Auch ergab sich in dieser Studie ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden frühen und den beiden fortgeschrittenen T-Kategorien bzw. UICC-Stadien. Dies ließ sich jedoch in der ebenfalls in dieser Studie durchgeführten RT-PCR nicht bestätigen [30]. Auch in unserer Studie ließ sich ein solcher Zusammenhang nicht eindeutig verifizieren, wobei eine nicht signifikante, inverse Korrelation der Expression von miR-144-3p und der N-Kategorie, dem UICC-Stadium sowie dem Grading nach Weichert et al. zu beobachten war. Eine Erklärung hierfür könnte die im Vergleich zum TCGA-Datensatz geringere Gruppengröße der in der genannten Studie [30] durchgeführten als auch unserer PCR-Analyse bieten. Aufgrund der somit höheren Teststärke könnte im TCGA-Datensatz auch ein nur schwacher Effekt signifikant nachgewiesen worden sein.

### **5.1.5 miR-200b-3p**

Für die miR-200b-3p zeigten sich in unserer Studie gegenläufige Ergebnisse. In der Microarray-Analyse ergab sich übereinstimmend mit der in Kapitel 5.1.2 genannten Metaanalyse [193] eine signifikante Hochregulation. In der PCR-Analyse hingegen ergab sich eine geringe signifikante Herabregulation (*Fold Change* 0,47). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die Berechnung der Primereffizienz aus einer Verdünnungsreihe bieten. Diese Methode überschätzt häufig die Primereffizienz [150] und unterschätzt damit den *Fold Change* (vergleiche Kapitel 3.10.2 und 5.2.5). Interessanterweise verhält sich die Expression von miR-200b-3p gegenläufig zu den zwei hochregulierten miRNAs (miR-205-5p und miR-210-3p). Ferner scheint mit höherer T-Kategorie sowie fortgeschrittenem UICC-Stadium die Expression von miR-200b-3p tendenziell weiter abzunehmen. Eine signifikante Korrelation ließ sich allerdings am vorliegenden Kollektiv nicht nachweisen. Eine weitere Studie, welche miR-200b-3p im PEC der Lunge stratifiziert nach den klinisch-pathologischen Standardparametern untersucht, lag unseres Wissens zum Zeitpunkt des Verfassens dieser Arbeit in der deutsch- und englischsprachigen Literatur nicht vor. In Zellkulturmodellen wurde eine tumorsuppressive Wirkung von miR-200b-3p beschrieben [82,175,210]. Sie soll wie weitere Vertreter der miR-200-Familie der Aufrechterhaltung eines epithelialen Phänotyps (siehe Kapitel 5.3.3) dienen und die Invasion und Migration von Zellen inhibieren [58,95,165]. Eine zunehmende Herabregulation von miR-200b-3p im Verlauf der PECs wäre daher durchaus plausibel.

### **5.1.6 miR-338-3p**

Die miR-338-3p gilt in multiplen Karzinomen als Tumorsuppressor [83,112,116,173,183]. Dabei verhindert miR-338-3p in diesen Zellkulturmodellen die Zellmigration und -invasion. Als Erklärung hierfür wird meist eine direkte Inhibition der epithelialen mesenchymalen Transition angeführt (siehe Kapitel 5.3.3) [83,112,116,173,183]. Vereinbar mit diesem Modell war in unserer Studie die miR-338-3p sowohl in der Microarray- als auch qPCR-Analyse signifikant herabreguliert. Zudem zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen dem Expressionsniveau und dem Grading nach Weichert et al. In zwei Studien [116,173] mit 32 beziehungsweise 45 eingeschlossenen NSCLC-Patienten konnte eine Korrelation von miR-338-3p mit der T- und N-Kategorie gezeigt werden. Allerdings sind in beiden Studien keine Angaben über die histologischen Subtypen angegeben [116,173]. Für die PECs allein betrachtet konnten wir diesen Zusammenhang nicht bestätigen. Weiterhin ergab sich in einer der beiden Studien [173] eine signifikante Herabregulation von miR-338-3p in schlecht differenzierten Tumoren im Vergleich zu gut differenzierten Karzinomen. Allerdings ist auch hier keine Unterscheidung zwischen den histologischen Subtypen oder eine Angabe über das verwendete Grading-Schema gegeben.

### **5.1.7 miR-375-3p**

Die miR-375-3p wird in verschiedenen Karzinomen herabreguliert und gilt meist als Tumorsuppressor [214]. Interessanterweise unterscheidet sich die Expression von miR-375-3p jedoch zwischen verschiedenen Subentitäten des Bronchialkarzinoms [84]. Im SCLC und AC wird miR-375-3p hochreguliert und fördert im Zellexperiment das Wachstum der SCLC-Reihe [84]. In der genannten Studie wurde übereinstimmend mit unseren Ergebnissen zudem eine Herabregulation von miR-375-3p im PEC der Lunge festgestellt [84]. Die unterschiedliche Expression von miR-375-3p (zusammen mit miR-205-5p) zwischen PECs und ACs der Lunge kann zudem in gewissem Maße zur Subtypisierung dieser beiden Entitäten verwendet werden [68,145]. In einer weiteren Studie ging eine erniedrigte Expression von miR-375-3p im NSCLC (nicht stratifiziert nach Histologie) mit einer schlechteren Prognose und fortgeschrittener T- und N-Kategorie einher [115]. Dies ließ sich allerdings bei der Analyse eines TCGA-Datensatzes [145] sowie in unserer Studie für das PEC der Lunge nicht bestätigen.

### **5.1.8 miR-31-5p**

Die genaue Rolle von miR-31-5p in NSCLC oder PECs ist bislang nicht eindeutig geklärt, jedoch wird eher eine onkogene Wirkung und Hochregulation von miR-31-5p in PECs angenommen [220]. Allerdings liegen für das pulmonale AC auch Hinweise auf eine tumorsuppressive Wirkung vor [211]. In anderen Tumorentitäten ist bekannt, dass miR-31-5p tumorsuppressive und onkogene Wirkung haben kann. Aufgrund der hohen Mutationslast in Lungentumoren [23] wäre durchaus eine bivalente Wirkung von miR-31-5p denkbar. Humane Epithelzellen, welche kondensiertem Zigarettenrauch ausgesetzt wurden, zeigten eine erhöhte Expression von miR-31-5p [209]. Auch konnte in unserer Stichprobe eine signifikante Hochregulation von miR-31-5p in PECs der Lunge gegenüber tumorfreiem Lungengewebe nachgewiesen werden. Basierend darauf könnte die These formuliert werden, dass eine Hochregulation von miR-31-5p in vorwiegend Tabak-assoziierten PECs von Relevanz ist. Für ACs der Lunge konnte gezeigt werden, dass miR-31-5p bei Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen signifikant höher reguliert ist [129]. Für PECs konnten wir einen derartigen Zusammenhang nicht nachweisen. Auch liegen unseres Kenntnisstandes nach in der deutsch- und englischsprachigen Literatur solche Daten für das PEC der Lunge derzeit nicht vor.

### **5.1.9 miR-205-5p**

Die miR-205-5p gilt als eine spezifisch in PECs hochregulierte microRNA [73,91,105]. Lebanony et al. konnten sogar für das Bronchialkarzinom zeigen, dass die Expression von

miR-205-5p relativ zur Expression miR-21-5p und snRNA RNU6B (sogenannter *Lebanony-Score*) häufig in der Lage ist zwischen PECs und weiteren Entitäten des Bronchialkarzinoms zu unterscheiden [105]. Unter zu Hilfenahme von miR-375-3p kann die Spezifität und Sensitivität dieser Methode noch etwas gesteigert werden [145]. Dennoch stellt der *Lebanony-Score* keinen ausreichenden Ersatz einer konventionellen morphologischen und immunhistochemischen Klassifizierung dar [191]. Übereinstimmend zeigten auch in unserer Studie miR-205-5p sowie der Nebenstrang miR-205-3p den deutlichsten Unterschied zwischen tumorfreiem Lungen- und Tumorgewebe. Dabei war die Expression in unserer sowie einer weiteren Studie [222] unabhängig von Patientenalter, Geschlecht und Stadium der Erkrankung. Interessanterweise induzieren die im Zigarettenrauch enthaltenen Karzinogene eine Suppression von miR-205-5p im Bronchialepithel [177]. So bleiben auch die Fragen offen ob, wie und wann die Herabregulation im Bronchialepithel in eine Hochregulation im vorwiegend Tabak-assoziierten PEC umschlägt.

#### **5.1.10 miR-210-3p**

Die miR-210-3p gilt als eine der am häufigsten Hypoxie-induzierten miRNAs [79,100] und reguliert in nicht neoplastischen Zellen verschiedene Anpassungsreaktionen an die zelluläre Hypoxie [78,79]. Übereinstimmend mit unseren Ergebnissen ist miR-210-3p im NSCLC und zahlreichen weiteren Karzinomen hochreguliert [36]. Dabei ist zum jetzigen Stand nicht eindeutig geklärt, ob miR-210-3p nur einen Surrogatparameter der Tumorphypoxie darstellt oder selbst kausal an der Tumorprogression beteiligt ist. Einerseits inhibiert miR-210-3p einige DNA-Reparaturproteine, fördert die Zellzyklusprogression und trägt damit zur genetischen Instabilität bei. Zudem bedingt miR-210-3p die Hemmung der mitochondrialen, aeroben Glykolyse zugunsten der aeroben Energiegewinnung (sog „*angiogenic switch*“) und bietet so den Tumorzellen im hypoxischen Tumormikromilieu einen Überlebensvorteil [36]. Andererseits verhindert eine ektope, Hypoxie unabhängige Expression die Tumorinitiation- und das Tumorwachstum [78]. Passend zum Modell eines Tumorsuppressors stellt die erhöhte Expression von miR-210-3p im NSCLC einen positiven prognostischen Faktor dar [44].

#### **5.1.11 miR-574-5p**

Für miR-574-5p konnte die im Microarray festgestellte Hochregulation mittels qPCR nicht validiert werden. Auch zwischen den gebildeten Subgruppen ergab sich an unserem Kollektiv keine signifikante Expressionsänderung. In einer Studie aus 75 Serumproben, davon 68 gepaart mit Tumorgewebeproben von NSCLC Patienten konnte eine Hochregulation der miR-574-5p in Patienten mit metastasiertem NSCLC nachgewiesen werden [227]. In nicht metastasierten Tumorstadien ließ sich übereinstimmend mit unseren Ergebnissen keine Hochregulation feststellen. Allerdings wird in einer anderen Studie miR-574-5p als Serum-

Marker in frühen Tumorstadien beschrieben [52]. Als mögliche Erklärung der Diskrepanz wären die unterschiedlichen Probenarten zu nennen, wobei in der zuvor genannten Studie von Zhou et al. [227] die Expression von miR-574-5p im Serum und Blut stark miteinander korrelierte. Eine andere Erklärung bietet das Patientenkollektiv: Die genannten Studien vergleichen nur NSCLC gegen Normalgewebe, sodass die PECs gegebenenfalls gegen das häufigere AC statistisch „untergehen“. Während in der erst genannten Studie [227] keine Subtypisierung angegeben ist, kommen in der Studie von Foss et al. [52] von 22 Proben nur insgesamt 7 PECs vor. Eine explizite statistische Analyse der PECs erfolgt nicht und wäre aufgrund der geringen Fallzahl wahrscheinlich nur gering aussagekräftig. So bleibt also offen, ob die getroffene Aussage auf die Subgruppe der PECs übertragbar ist.

## **5.2 Methodendiskussion**

Die in dieser Arbeit verwendeten Methoden unterliegen folgenden Einschränkungen, welche bei Ergebnisdiskussion und -interpretation mitberücksichtigt, werden müssen:

### **5.2.1 Ausgewählte Parameter**

Die hier durchgeführte Arbeit galt der Fragestellung, ob eine Korrelation zwischen dem Grading und dysregulierten miRNAs zu finden war. Weiterhin wurde explorativ geprüft, ob weitere klinisch-pathologische Standardparameter, welche im Rahmen der Routinediagnostik bestimmt werden [18], ebenfalls eine Korrelation mit der miRNA-Expression aufweisen und damit als mögliche *Confounder* in Betracht kommen. Bezüglich des Resektionsstatus wurde keine Auswertung vorgenommen, da zum einen im ausgesuchten Patientenkollektiv nur eine R1-Situation vorlag. Zum anderen beschreibt der R-Klassifikator im engeren Sinne keine Eigenschaft des Tumors selbst, auch wenn er einen wesentlichen Prognosefaktor darstellt [40]. Neben diesen Parametern konnten jedoch über 150 weitere tumor- und patientenbezogene prognostisch relevante Parameter (z.B. Multimorbidität, Karnofsky-Index, molekularpathologische Befunde) festgestellt werden [19,140]. Diese konnten in dieser Arbeit nicht alle berücksichtigt oder gar kontrolliert werden.

### **5.2.2 Grading und Tumorheterogenität**

Die (morphologische) Beurteilung eines histologischen Schnittes wird maßgeblich durch die Färbung und den Untersucher selbst mitbeeinflusst [20,139]. Daher sind in der pathologisch-anatomischen Diagnostik objektive Kriterien von Nöten. Als Färbung wurde eine HE-Färbung als etablierte Übersichtsfärbung der pathologischen Diagnostik verwendet [103]. Zudem wurden auch die verwendeten Grading-Schemata am HE-Schnitt entwickelt [86,203]. Nur in Einzelfällen wurden morphologisch nicht eindeutige Befunde mittels Immunhistochemie

verifiziert oder falsifiziert (z.B. Nachweis oder Ausschluss einer Lymphangiosis carcinomatosa).

Zur Kontrolle der Inter- und Intraobserver-Variabilität innerhalb dieser Studie wurden alle zuvor im Rahmen der Diagnostik erhobenen Befunde validiert. Zudem erfolgte die Durchführung des Gradings unter fortlaufender Supervision eines Facharztes. Allerdings unterliegen Grading-Systeme für PECs anhand nukleärer Morphologien, Fehlen oder Vorhandensein von Interzellulärbrücken und Keratinisationsphänomenen einer erheblichen Interobserver-Variabilität [134]. Dies kann zu Verfälschungen der Ergebnisse geführt haben. Das Grading nach Weichert et al. hingegen beruht auf wohl definierten, numerischen Grenzen [86,184,203]. Zwar liegen keine Daten zur Interobserver-Variabilität dieses Gradings vor, allerdings, zeigt ein gleichartiges Grading-Schema für orale PECs eine gute Reproduzierbarkeit [16].

Ebenfalls können die Ergebnisse durch die Art der Probenentnahme beeinflusst werden. Zwar wurde die Graduierung am gesamten Tumor anhand des gering differenziertesten Tumoranteils bestimmt, jedoch erfolgte die miRNA-Expressionsbestimmung an zuvor gewonnenen, peripheren Tumorproben. So ist aufgrund der Tumorerheterogenität nicht zwangsweise eine Repräsentativität der analysierten Probe für die Gesamttumormasse gegeben [126]. Vor diesem Hintergrund war die Entscheidung periphere Proben zu verwenden dadurch zu begründen, dass für die Gradierung nach Weichert et al. insbesondere die Tumoranteile entlang der Tumorfront relevant sind [203]. Hinsichtlich der Tumorerheterogenität ist zudem anzumerken, dass diese in frühen, in dieser Arbeit hauptsächlich betrachteten Stadien, weniger ausgeprägt ist, als in fortgeschrittenen Tumorstadien [111].

Auch wurde aufgrund der Probengewinnung nur die Tumormasse als Gesamtheit betrachtet. Dabei ist allerdings bereits bekannt, dass maligne Neubildungen komplexe Gebilde aus mehreren Zellkompartimenten sind [12]. Auch ist denkbar, dass die miRNA-Expression zwischen den einzelnen Kompartimenten variiert [159,164]. Eine Aussage zur miRNA-Expression innerhalb der einzelnen Kompartimente ist aufgrund des Studiendesigns nicht möglich. Auch sind die Ergebnisse daher nicht zwangsläufig vergleichbar mit Zellstudien [z.B. 116,210,219] in denen ausschließlich Karzinomzellen betrachtet werden.

### **5.2.3 RNA-Gewinnung**

Von den bei kryoasservierten Proben wurden am Kryostatmikrotom abgetragene Gefrierschnitte gesammelt. Eine Kontamination der verschiedenen Proben untereinander wurde durch regelmäßiges Wechseln der Mikrotomklinge und Reinigen der verwendeten Pinzetten bestmöglich vermieden. Auch wurde durch die Anfertigung je eines HE-Schnittes vor und nach der Probenentnahme eine Kontamination der Lungenproben mit Tumorgewebe

(z.B. durch eine Lymphangiosis carcinomatosa) soweit möglich ausgeschlossen. Auch konnte sichergestellt werden, dass möglichst wenig Nekroseareale miterfasst und damit weitestgehend vitale Tumoranteile untersucht wurden.

Bei der RNA-Extraktion war vor allem eine Kontamination der Proben zu vermeiden, welche die nachfolgenden Experimente verfälschen würde [152]. Hierzu erfolgte die Extraktion an einem stets vor Arbeitsbeginn dekontaminierten Arbeitsplatz mit Luftabzug. Mögliche Verunreinigungen oder eine unvollständige Trennung von RNA und DNA wurden dennoch für jede Probe photospektrometrisch überprüft. Verunreinigte Proben wurden, wenn möglich erneut gereinigt. War eine Aufreinigung nicht möglich, wurde die Probe verworfen.

In der Bestimmung der RNA-Integrität ergab sich für einen Teil der Proben eine deutlich erniedrigte RIN. Diese gilt als grobes Maß für die Unversehrtheit der gesamten extrahierten RNA [2]. Allerdings soll die RIN im Gegensatz zur mRNA-Quantifizierung bei Analyse der stabileren miRNAs einen vernachlässigbar kleinen Effekt haben [67,85]. Ein signifikanter Unterschied der RIN-Werte zwischen Tumor- und tumorfreiem Lungengewebe, welcher zu einem systemischen Fehler führen könnte, lag nicht vor.

#### **5.2.4 Microarray**

Die Microarraytechnik erlaubt die gleichzeitige Untersuchung mehrerer hundert bis mehrerer tausend DNA- beziehungsweise in cDNA umgeschriebener RNA-Moleküle [192]. Dabei wurde diese Methode in der vorliegenden Arbeit dazu genutzt, Unterschiede zwischen verschiedenen Gruppen zu detektieren. Andere Einsatzgebiete des Microarrays (zum Beispiel Clusteranalysen im sogenannten „*unsupervised learning*“) kamen in dieser Arbeit aufgrund der formulierten Fragestellung nicht zum Einsatz [192].

Im Allgemeinen ist die Microarray-Analytik durch die geringe Größe der Microarrays anfällig für systematische Fehler, beispielsweise durch Mikrostaub oder Scanfehler [192]. Um diese bestmöglich zu minimieren, wurde die Analyse von einer erfahrenen Analytistin aus dem Institut für Humangenetik durchgeführt.

Auch die Analyse der Rohdaten stellt eine statistische Herausforderung dar. Aufgrund der unvermeidbaren Fehler / Ungenauigkeiten müssen die Rohdaten vor der eigentlichen Auswertung um eben diese „korrigiert“ werden [14]. Hierzu sind in der Literatur zahlreiche verschiedene analytische Ansätze beschrieben [192]. Ein einheitliches Vorgehen existiert allerdings nicht, sodass unterschiedliche Ergebnisse zwischen Microarrays auch auf unterschiedliche Prozessierung der Rohdaten und Analysemethoden beruhen können [192].

Die hier verwendete Prozessierung der Rohdaten mittels medianer Quantilnormalisierung stellt eine mögliche, etablierte Methode zur Vereinheitlichung des Fluoreszenzsignals dar [14]. Da hierbei das Fluoreszenzsignal über alle Proben gemittelt wird, ist keine endogene Kontrolle notwendig [8]. Um dies anwenden zu können, sollte die deutliche Mehrzahl der Proben nicht differenziell exprimiert sein, da so ihr Fluoreszenzsignal im Mittel dem Hintergrundrauschen entspricht [8]. Diese Bedingung zur Anwendung war in der vorliegenden Studie erfüllt. Aufgrund der verschiedenen Analyse-Methoden sind Ergebnisse einer Microarray-Analyse durch einen weiteres Testverfahren zu validieren. Dazu diente in der vorliegenden Studie die RT-qPCR.

### 5.2.5 RT-qPCR

Vor der Durchführung der PCR wurde die RNA mittels Reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Die erfolgreiche Durchführung wurde mittels miRTC-Primer überprüft, sodass falsch-negative Ergebnisse durch eine fehlerhafte reverse Transkription als sehr unwahrscheinlich anzusehen sind.

Die PCR gilt bei richtiger Einstellung der Temperatur und Dauer (insbesondere der *Annealing*-Phase) als sehr spezifische Reaktion, da die Sequenz des Primers vorgibt, welches Produkt gebunden und synthetisiert wird [135]. Um die Ergebnisse mit anderen Studien vergleichbar zu halten, wurden für die jeweiligen miRNAs etablierte, vorgefertigte Primer verwendet [51]. Jedoch sind Unterschiede mit anderen Studien aufgrund von möglichen Unterschieden in der Primersequenz anderer Herstellung nicht ausgeschlossen. Bei zu langer *Annealing*-Phase kann ein Primer auch an nicht vollständig komplementäre Nukleotidsequenzen binden [151]. Dies wurde durch die nach jedem Versuch durchgeführte Schmelzkurvenanalyse ausgeschlossen. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurde der PCR-Ansatz an einem getrennten, eigenen Arbeitsplatz durchgeführt, um eine strikte Trennung zwischen sauberen und kontaminierten Arbeitsplätzen zu gewährleisten [39]. Auch wurde für jeden PCR-Ansatz (Primer, Nukleotide und Reverse Transkriptase) pro PCR-Lauf jeweils eine Negativkontrolle mit RNase-freiem Wasser mitgeführt, um falsch-positive Ergebnisse durch Kontamination auszuschließen.

Weiterhin ist die Bindungsaffinität des Primers an die komplementäre Zielsequenz und damit die Primereffizienz abhängig von der Temperatur und Dauer der *Annealing*-Phase [135]. Der Idealfall einer Primereffizienz von 100 %, entsprechend einer Verdopplung der cDNA-Menge pro Zyklus, wurde in der Versuchsreihe nicht für alle Primer erreicht. Aufgrund des exponentiellen Verlaufes führen selbst geringe Abweichungen jedoch zu einer starken Verzerrung der Ergebnisse [149]. Um dies auszugleichen, wurde anstatt der sogenannten

$\Delta\Delta C_t$ -Methode [120] das sogenannte effizienz-korrigierte relative Quantifizierungsmodell verwendet [149]. Eine Verdünnungsreihe bietet ein einfaches, wenn auch relativ arbeitsaufwändiges Mittel, um die Primereffizienz abzuschätzen [99]. Nachteile dieser Methode sind, dass sie einerseits häufig die wahre Primereffizienz überschätzt und andererseits auf interindividuelle Schwankungen der Primereffizienz zwischen den Proben nicht ausgleichen kann [150]. Eine alternative Methode wäre daher die mathematische Abschätzung der Primereffizienz für jede Probe aus der Fluoreszenzkurve der qPCR [150].

Für die Bestimmung der relativen Expressionsänderung zwischen Tumor- und Normalgewebe ist auch die Wahl einer entsprechenden endogenen Kontrolle ein wesentlicher Einflussfaktor, da bei der hier angewendeten relativen Quantifizierung die gemessenen miRNA-Expressionswerte anhand der endogenen Kontrolle normalisiert werden [150]. Änderungen der Expression der endogenen Kontrolle zwischen Tumor- und Lungengewebe könnten daher die Ergebnisse der Studie verfälschen. Die als endogene Kontrolle verwendete *snRNA* U6B gilt auch in PECs der Lunge als nicht differenziell exprimiert [224] und wird in vielen der in der folgenden Diskussion aufgeführten Studien als endogene Referenz verwendet (z.B. [52,90,105,116]). Allerdings wird die *snRNA* U6B schneller degradiert als die stabileren miRNAs [224]. Manche Autoren schlagen deshalb nicht differenziell exprimierte miRNAs als endogene Referenz vor [146].

Ein möglicher Einflussfaktor ist auch das exakte Mischungsverhältnis des PCR-Ansatzes selbst [151]. In der durchgeführten Studie wurde kein Pipettierautomat für die PCR verwendet. Um Verfälschung durch Pipettierungenauigkeiten weitestgehend zu vermeiden, wurden alle Proben dreifach bestimmt. Bei starker Divergenz (Standardabweichung  $< 0,5$ ) wurde der Lauf mit drei neuen Ansätzen einmalig wiederholt.

### **5.2.6 Statistik**

Die Aussagekraft eines statistischen Tests wird von mehreren Faktoren bestimmt [74]. Ein wichtiger Einflussfaktor dabei ist die Gruppengröße. Obwohl die vorliegende Studie mit  $N = 45$  im Vergleich zu anderen Studien eine ähnlich große Kohorte untersucht [26,90,116,187,227], ist die Gruppengröße aus statistischer Sicht nur limitiert aussagekräftig. Insbesondere sind hierdurch auch gebildete Subgruppen klein, was die Stärke der gewählten statistischen Tests einschränkt. Dies birgt die Gefahr eines Fehlers zweiter Art [74].

Ein weiterer limitierender Faktor der statistischen Aussagekraft ist das sogenannte multiple Testproblem [74], das insbesondere in der Microarray-Analytik zum Tragen kommt. Aufgrund der Vielzahl der untersuchten miRNAs wurde zwangsläufig eine Vielzahl unterschiedlicher

Hypothesen geprüft. Verfahren zur Adjustierung des globalen alpha-Niveaus (z.B. Bonferroni-Korrektur) zielen darauf ab, eine zuvor für das Gesamtexperiment festgelegte Irrtumswahrscheinlichkeit (meist von 5 %) nicht zu überschreiten [181]. Sie sind daher für Hochdurchsatzverfahren zu konservativ und führen unweigerlich zu falsch-negativen Ergebnissen [192]. Um diesen Effekt auszugleichen wurde für die Auswertung der Microarray-Analyse die Benjamini-Hochberg-Methode verwendet, welche die *False Discovery Rate (FDR)* kontrolliert [10]. Hierdurch können im Sinne einer explorativen Statistik möglichst viele richtig-positive Ergebnisse beibehalten werden, während eine minimale Anzahl von FDR = 5 % falsch-positiver Ergebnisse in Kauf genommen wird. Vor diesem Hintergrund bedürfen positive Ergebnisse einer nachträglichen Validierung [10]. Zusammenfassend besitzen die in dieser Studie präsentierten Ergebnisse einen explorativen Charakter und bedürfen der Validierung an unabhängigen Kollektiven.

### **5.3 Bedeutung der Expression selektierter miRNAs**

#### **5.3.1 im Kontext der Tumorhypoxie und Neoangiogenese**

Eine der stärksten Limitationen des Tumorwachstums ist die Versorgung des Tumors selbst mit Sauerstoff [50]. Bedingt durch das Tumorwachstum vergrößert sich unweigerlich die Diffusionstrecke zwischen Tumor und vorhanden Gefäßen [50]. Die daraus resultierende Hypoxie in weiten Anteilen des Tumors führt zu Aktivierung angiogenetisch wirksamer Signalkaskaden [45].

Als „Sauerstoffsensoren“ und Hauptregulator dieser Kaskaden dient der Hypoxie-induzierbare Faktor 1 (HIF-1, *hypoxia-inducible factor 1*) [45,217]. Dieser besteht aus zwei Untereinheiten: HIF-1 $\alpha$  und HIF-1 $\beta$ . Während HIF-1 $\beta$  ständig exprimiert wird, wird die Expression von HIF-1 $\alpha$  durch sauerstoffabhängige Degradation streng kontrolliert. Das HIF-1-Dimer steuert als Transkriptionsfaktor die Expression zahlreicher angiogenetischer und proinflammatorischer Gene [45,217]. Dabei stimuliert HIF-1 u.a. die vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren (*vascular endothelial growth factor*, VEGF) [217], welche als wichtige Faktoren der angiogenetischen Signalkaskade gelten [75]. Zur humanen VEGF-Familie gehören dabei VEGF-A bis VEGF-D sowie der plazentare Wachstumsfaktor (*placental growth factor*, PLGF) [75]. Vor allem VEGF-A induziert die Angiogenese durch direkte Stimulation der Endothelzellen tumornaher Kapillaren über die VEGF-Rezeptoren [127]. Die gebildeten Kapillaren sind abnormal geformt, enden teils blind und ermöglichen so keine effiziente Sauerstoffversorgung des Tumors [127]. Zusammen mit dem stetig steigenden Sauerstoff- und Energiebedarf des Tumors führt dies zu einer sich selbsterhaltenden angiogenetischen Kaskade. Darüber hinaus zählt VEGF-A auch als potenter Mediator der EMT [25,46].

Die miR-126-3p gilt als Regulator der Angiogenese in benignen [155] als auch malignen Erkrankungen [5,24,162]. Durch Bindung der VEGF-A-mRNA inhibiert miR-126-3p die Angiogenese in Mamma- und Magenkarzinomen sowie oralen PECs [5,24,162]. Die fehlende Regulation durch miR-126-3p unter Hypoxie könnte insbesondere in G3-Karzinomen eine Erklärung bieten für die in PECs der Lunge schon länger bekannte Hochregulation von VEGF [81]. Diese geht mit einer schlechteren Prognose einher [81]. In den Endothelzellen hingegen unterstützt miR-126-3p die angiogenetische Signalkaskade durch Degradation der mRNA zweier intraendothelialen Down-Stream-Inhibitoren der angiogenetischen Signalkaskade und dient damit der regelrechten Ausbildung von Kapillaren und Aufrechterhaltung der vaskulären Integrität [49,199]. Ferner hemmt miR-126-3p die Metalloproteinnase 9 (MMP-9), welche Bestandteile der extrazellulären Matrix und der vaskulären Lamina spaltet und damit die Migration (von Angioblasten) innerhalb der Extrazellulärmatrix erlaubt [218]. Die vorliegende Studie erlaubt aufgrund des geringen Verhältnisses von Endothelzellen zur Gesamttumormasse jedoch keine Aussage über die miRNA-Expression in den Endothelien.

Die miRNAs miR-31-5p, miR-338-3p und miR-375-3p kontrollieren die Expression von HIF-1 $\alpha$ . Während HIF-1 $\alpha$  ein direktes Ziel von miR-338-3p im PEC des Nasopharynx [167] und von miR-375-3p im hepatozellulären Karzinom darstellt [196], induziert miR-31-5p die HIF-1 $\alpha$ -Expression über die Inhibition des HIF-inhibierenden Faktors (*factor-inhibiting HIF*, FIH) in Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches [117]. Die hier festgestellte Hochregulation miR-31-5p und Herabregulation von miR-338-3p sowie miR-375-3p in PECs könnte also gleichsam zu einer Aktivierung von HIF-1 $\alpha$  beitragen.

HIF-1 $\alpha$  wird allerdings nicht nur von miRNAs kontrolliert, sondern induziert die Transkription mehrerer miRNA-Genloci [166]. Eine der am häufigsten beschriebenen, durch HIF-1 $\alpha$  induzierten miRNAs ist miR-210-3p [78,79,100]. Die miR-210-3p wiederum inhibiert einen Up-Stream-Inhibitor von HIF und erzeugt somit eine Hypoxie-induzierte, positive Rückkopplungsschleife [89]. In Bezug auf die Angiogenese fördert miR-210-3p den VEGF-Signalweg durch Inhibition zweier negativer Regulatoren des VEGF-Rezeptors 2.

Die Rolle von miR-144-3p in Bezug auf die Neoangiogenese ist nicht abschließend geklärt. In extrazellulären Vesikeln des nasopharyngealen Karzinoms ist miR-144-3p stark angereichert [180]. Endothelzellen humaner Nabelschnurvenen, welche mit diesen Vesikeln kultiviert wurden, bildeten gefäßähnliche Gebilde. Die miR-144-3p soll hierbei die Angiogenese durch indirekte Promotion des HIF-1 $\alpha$ /VEGF-A-Signalweges induzieren [180]. Im Zellmodell

des Cervixkarzinoms hingegen verhindert miR-144-3p die Invasion und Migration durch direkte Inhibition von VEGF A und VEGF C [176].

### **5.3.2 im Kontext der tumorfördernden Inflammation in der Tumormikroumgebung**

Ein Karzinom besteht nicht nur aus einem losen Verband aus Karzinomzellen, sondern die Karzinomzellen liegen innerhalb eines Tumorstromas und werden von einer Vielzahl von nicht neoplastischen Zellen umgeben [12]. Innerhalb dieser sogenannten Tumormikroumgebung (*tumor micro environment*, TME) verändert der Tumor durch verschiedene Signalkaskaden die umgebenden, primär nicht neoplastischen Zellen, sodass diese das Tumorstromawachstum unterstützen. Zu diesen zählen auch Entzündungszellen und krebsassoziierte Fibroblasten (*cancer associated fibroblast*, CAF) [12].

Die CAFs bilden dabei eine Gruppe verschiedener Zellen unterschiedlichen Ursprungs [12]. Zum einen gibt es ortständige veränderte Fibroblasten und zum anderen aus dem Knochenmark eingewanderte Stammzellen [12]. Mittlerweile ist bekannt, dass Karzinomzellen mit den umgebenden Zellen interagieren und diese beeinflussen [41]. Eine Möglichkeit der interzellulären Kommunikation ist die Übertragung von miRNAs mittels sogenannter Exosomen [215]. Wenngleich daher mittlerweile bekannt ist, dass Karzinomzellen das miRNA-Profil der CAFs verändern, sind noch viele Fragen über die miRNA-Expression in CAFs offen [164]. Für miR-31-5p konnte eine Hochregulation in den CAFs festgestellt werden, während miR-1-3p und miR-206-3p im Vergleich zu gesunden Fibroblasten herabreguliert waren [168]. Die Inhibition von miR-1-3p und miR-206-3p sowie die gleichzeitige forcierte Expression von miR-31-5p führte im Zellmodell zur Konversion von gesunden Fibroblasten zu CAFs [168]. Im Mausmodell konnte zudem durch die intravenöse Gabe eines miR-31-Inhibitors, sowie pre-miR-1 und pre-miR-206 über Beeinflussung des VEGF-Signalweges die Tumorangiogenese, das Tumorstromawachstum und die Lungenmetastasierung verlangsamt werden [168].

Unter vielen Entzündungszellen kommt vor allem den tumorassoziierten Makrophagen (TAM), welche bis zu 50% der Zellen innerhalb eines Tumors ausmachen können [88], eine besondere Rolle zu. Wenngleich die Makrophagen eigentlich der Tumorabwehr als Immunantwort des Körpers dienen, werden diese im TME „umprogrammiert“ und fördern durch Sekretion verschiedener Zytokine die Tumorprogression und Invasion [125]. Ein möglicher Mechanismus dieser Umprogrammierung ist die Sekretion von miRNAs, welche von den umgebenden nicht neoplastischen Zellen aufgenommen werden [53]. Im Mammakarzinom konnte eine starke Anreicherung von miR-375-3p in Apoptosekörperchen des Karzinoms festgestellt werden. Die Aufnahme dieser Apoptosekörperchen und damit von miR-375-3p verstärkte die Migration der

TAMs [53]. Eine Depletion von miR-375-3p in den Tumorzellen führte zudem zur Herabregulation des C-C-Motiv-Liganden 2 (CCL2) [53], einem chemotaktischen Zytokin der Chemokin-Familie [64]. Auch für miR-126-3p und miR-126-5p wurde eine inhibitorische Wirkung auf die CCL2-Expression in Stromazellen von Mammakarzinomen [225] beschrieben. Hierdurch hemmt miR-126-3p und miR-126-5p die Infiltration des Tumorstromas durch mesenchymale Stammzellen und Monozyten *in vivo* [225]. Eine erhöhte Makrophagendichte im Stroma ist mit der EMT assoziiert [15]. Zudem induziert CCL2 die EMT über den Transkriptionsfaktor TWIST [28] (siehe Kapitel 5.3.3). Beides könnte eine indirekte Erklärung für die schwache, nicht signifikante Korrelation der miRNA-375-3p-Expression sowie die Korrelation der miR-126-3p-Expression und dem Grading nach Weichert et al. bieten.

Die Entzündungszellen und CAFs sezernieren eine Vielzahl von Zytokinen, welche ein immunsuppressives Mikromilieu schaffen und damit die Immunevasion des Tumors begünstigen [101]. Ein potenter Regulator im TME ist der transformierende Wachstumsfaktor  $\beta$  (*Transforming Growth factor  $\beta$* , TGF- $\beta$ ) [142,221]. Nach der „Aktivierung“ aus seinem Vorläufermolekül durch Metalloproteasen, bindet TGF- $\beta$  den TGF- $\beta$ -Rezeptor I und führt dadurch zur Phosphorylierung der Proteine SMAD2 und SMAD3 [131,142,221]. Das Trimer bestehend aus phosphorylierten SMAD2 und SMAD3 sowie SMAD4 reguliert im Nukleus die Genexpression durch Bindung von DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren [131,142,221]. Während TGF- $\beta$  im Rahmen der Karzinogenese als Tumorsuppressor gilt, wandelt sich die Wirkung von TGF- $\beta$  im Verlauf der Tumorprogression [142]. Durch Polarisation von Makrophagen zu TAMs und Konversion von (Myo-)fibroblasten zu CAFs, trägt TGF- $\beta$  durch Erschaffung eines immunsuppressiven Mikromilieus zur Immunevasion und Progression des Tumors bei. Zudem induziert TGF- $\beta$  das EMT-Programm durch Induktion der EMT-Transkriptionsfaktoren (siehe Kapitel 4.4.3) [142]. So konnte immunhistochemisch in Mammakarzinomen gezeigt werden, dass TGF- $\beta$  im Tumorstroma nahe der Tumorfront im Vergleich zu zentralen Tumoranteilen deutlich erhöht ist [35].

Die miR-144-3p gilt als Regulator des TGF- $\beta$ -Signalweges bei Leberfibrose und posttransplantärer Bronchiolitis obliterans durch Inhibition von *TGF- $\beta$ -induced homeobox 1* (TGIF1), einem Korepressor der SMAD-Proteinfamilie [66,119,213]. Transfektion von miR-144-3p führte im Zellmodell in Fibroblasten zur Herabregulation von TGIF1 und Hochregulation von SMAD2, SMAD4, TGF- $\beta$  und VEGF [213]. In malignen Erkrankungen hingegen ließ sich für miR-144-3p eine tumorsuppressive Wirkung über direkte Inhibition von SMAD4 feststellen [169]. Auch für miR-200b-3p konnte im Zellexperiment eine negative Regulation des TGF- $\beta$ -Signalweges durch Inhibition der SMAD 2 nachgewiesen

werden [29,170]. Ein Wegfall der Hemmung der SMAD-Familie im Tumormikromilieu des PECs könnte zur bekannten Hochregulation von TGF- $\beta$  [72] beitragen.

### 5.3.3 im Kontext der epithelialen mesenchymalen Transition

Die epitheliale mesenchymale Transition wird durch mehrere, aktivierende Transkriptionsfaktoren (EMT-TFs) gesteuert [38,171]. Diese umfassen *Snail* (SNAI1), *Slug* (SNAI2), *Twist-related protein 1* (TWIST) sowie die *Zink-finger-E-Box-bindende Homeobox 1 und 2* (ZEB1 und ZEB2). Diese können Signalkaskaden in Gang setzen, welche zum Verlust der E-Cadherin-Expression, Auflösung der Zellulärbrücken und Akquirierung eines mesenchymalen Phänotyps führen [38,171]. Dabei sind die einzelnen Transkriptionsfaktoren jedoch nicht unabhängig in der Lage den Prozess der EMT in Gang zu setzen, sondern sind funktionell voneinander abhängig [38]. Die EMT-TFs werden in gesunden Epithelien reprimiert und z.B. im Rahmen der Wundheilung durch weitere Signalwege aktiviert [87]. Wichtige Induktoren sind dabei TGF- $\beta$  [71] und VEGF-A [46,194].

In gesunden Epithelien dient die miR-205-5p sowie die miR-200-Familie der Aufrechterhaltung eines epithelialen Phänotyps [58]. Aus dem kolorektalen Karzinom ist jedoch bekannt, dass miR-200c-3p und miR-200b-3p bereits in tumornahen Epithel- und Stromazellen durch Hypermethylierung ihres Promotors inaktiviert werden [37]. Gleichartige Veränderungen konnten auch in bronchialen Epithelzellen festgestellt werden, nachdem diese mit Zigarettenrauch behandelt wurden [177]. Neben diesen epigenetischen Modifikationen wird die Expression der miR-200-Familie auch direkt durch die EMT-TFs kontrolliert: TWIST, SNAI1, SNAI2, ZEB1 und ZEB2 hemmen die Expression der miR-200-Familie jeweils durch direkte Bindung an ihre Promotoren [17,38,118,205]. In Versuchen mit mesenchymalen Zellen konnte durch Einbringen von miR-200a-, miR-200b- und miR-205-Mimics ein epithelialer Phänotyp erzeugt werden [58]. Ebenfalls konnte in dieser Studie in Mammakarzinomzelllinien für miR-200a-3p und miR-200b-3p die direkte Regulation von ZEB1 und ZEB2 durch Bindung der 3'UTR nachgewiesen werden. Zudem inhibierte miR-200b-3p SNAI1 und SNAI2 ebenfalls durch RNA-Interferenz. Forcierte Suppression von miR-200a-3p und miR-200b-3p führte zur Herabregulation von E-Cadherin der Mammakarzinomzellen. Dieser Effekt konnte durch den simultanen *Knock-out* von ZEB1 und ZEB2 verhindert werden [58]. Obwohl in der vorliegenden Arbeit miR-200b-3p signifikant herabreguliert war, korrelierte die Expression nicht eindeutig mit dem Grading. Zudem war in der zuvor beschriebenen Studie der synergistische Effekt der drei miRNA stärker als von miR-200b-3p allein [58]. So könnte die These aufgestellt werden, dass im Gegensatz zum Zellexperiment im komplexen Tumormikromilieu die Suppression von miR-200b-3p nötig, aber nicht suffizient für den Prozess der EMT ist.

Für miR-205-5p waren die Ergebnisse der Studie nicht so eindeutig: Die Expression von miR-205-5p schwankte jedoch zwischen verschiedenen Mammakarzinomzelllinien und korrelierte nicht eindeutig mit der Expression von E-Cadherin [58]. In Zelllinien des laryngealen PECs konnte für miR-205-5p und miR-375-3p ein synergistischer Effekt auf die E-Cadherin und SNAI1 nachgewiesen werden: Inhibition von miR-375-3p und forcierte Expression von miR-205-5p führten zur Herabregulation beider Proteine [195]. In Zervix- und Lungenkarzinomzelllinien konnte zudem für miR-205-5p ein gleichartiger Effekt festgestellt werden [200]. Die Expression von miR-205-5p konnte durch Hypoxie induziert werden und ging mit einer verminderten Expression von E-Cadherin einher. Dieser Effekt war durch Einbringen von miR-205-Inhibitoren reversibel. Als Ziel wurde in dieser Studie die mRNA des Apoptose-stimulierenden Proteins für p53 2 (*apoptosis stimulating protein of p53 2*, ASPP2) angegeben [200]. ASPP2 selbst stimuliert die Apoptose über den p53 Signalweg [161], inhibiert aber auch die EMT durch Regulation von ZEB1 [201] und indirekt durch Hemmung des TGF- $\beta$ -Signalweges [55]. Zusammengefasst ist für das PEC der Lunge wohl eher von einer onkogenen Wirkung von miR-205-5p auszugehen. Ein Einfluss auf die E-Cadherin Expression bietet zudem eine mögliche Erklärung für die in dieser Studie festgestellte, schwache, nicht signifikante Korrelation zwischen miR-205-5p und dem Grading nach Weichert et al.

Neben diesen fünf Kernfaktoren wurden weitere Transkriptionsfaktoren beschrieben, welche in Zusammenspiel mit den Kernfaktoren ebenfalls die EMT auslösen können [102]. Darunter ist insbesondere der Transkriptionsfaktor *Sry-related high mobility group box 4* (SOX4) hervorzuheben, welcher von manchen Autoren sogar als ein den EMT-TFs übergeordneter Regulator der EMT beschrieben wird [121,143]. SOX4 wird u.a. durch TGF- $\beta$ /SMAD-Signalweg aktiviert [190] und kontrolliert die anderen EMT-TFs [182]. Eine im Zellexperiment forcierte Expression von SOX4 ist in der Lage den Prozess der EMT auszulösen [182]. Eine Ablation von SOX4 hingegen verhindert die Induktion der EMT und Zellmigration durch TGF- $\beta$  [182]. In Mamma-, Nierenzell- und Lungenkarzinomen wird SOX4 durch miR-338-3p inhibiert [83,116,183]. Auch kontrolliert miR-338-3p den SOX4 nachgeschalteten EMT-TF ZEB2 [76,77]. Zudem inhibieren miR-338-3p und miR-126-3p die Metallomatrixproteasen 2 und 9 [112,212,218], welche einerseits zur Spaltung der Extrazellulärmatrix und Zellmigration [124] aber auch zur Aktivierung von TGF- $\beta$  [94] benötigt werden. Ein Wegfall der Kontrollen durch miR-338-3p und miR-126-3p kann zur Aktivierung des TGF- $\beta$ -Signalweges und zur bereits bekannten Hochregulation von SOX4 im NSCLC [197] beitragen. Dies könnte eine mögliche Erklärung für die Korrelation zwischen miR-338-3p, miR-126-3p und dem Grading nach Weichert et al. bieten.

## 5.4 Ausblick

Für zwei der untersuchten miRNAs, miR-126-3p und miR-338-3p, konnten wir eine Korrelation mit dem histologischen Grading nachweisen. Jedoch sollte bei dem explorativen Charakter der vorliegenden Studie eine Validierung der Ergebnisse an einem unabhängigen Patientenkollektiv erfolgen. Auch wenn eine Korrelation noch lange keine Kausalität bedeutet, ist jedoch ein kausaler Zusammenhang vor dem Hintergrund der aus der Literatur dargelegten Wirkmechanismen durchaus denkbar. Diese aus anderen Karzinomtypen bekannten Wirkmechanismen müssten zukünftig auch am PEC der Lunge überprüft werden.

Aufgrund der Probengewinnung konnte zudem nur die miRNA-Expression des PEC als Gesamttumormasse betrachtet werden. Gezielte Expressionsanalysen (z.B. durch Lasermikrodissektion) oder morphologische Studien (z.B. mittels Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung) könnten zukünftig überprüfen, ob eine unterschiedliche Expression der untersuchten miRNAs in den verschiedenen Zellgruppen (Karzinomzellen, Fibroblasten oder Entzündungszellen) vorliegt. Interessant wäre zudem vor dem Hintergrund der EMT auch die Frage, ob sich an der Invasionsfront eine stärkere Dysregulation von miR-126-3p und miR-338-3p nachweisen ließe, was eine funktionelle Bedeutung der beiden miRNAs im Rahmen der EMT untermauern würde.

Zusammenfassend bietet diese Arbeit einen Einblick in komplexe biochemische Mechanismen der EMT und Tumorprogression aus dem Blickwinkel der neun aus mehreren hundert ausgewählten miRNAs. Aufgrund der Komplexität der zahlreichen, ineinander verwobenen Signalkaskaden umfasst die vorliegende Arbeit diese nicht vollumfänglich, sondern beleuchtet nur die neun untersuchten miRNAs in diesem Kontext. Es ist daher anzumerken, dass aufgrund der Vielzahl von möglichen Zielmolekülen wahrscheinlich weitere Wirkmechanismen existieren, welche bislang nicht entdeckt und beschrieben wurden.

## Literaturverzeichnis

1. Agilent Technologies Inc. (2015) One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis Protocol. URL: <https://www.agilent.com/en/product/gene-expression-Microarray-platform/gene-expression-exon-Microarrays/human-Microarrays/human-gene-expression-Microarrays-228462> (Zugriff am 20.09.2021)
2. Agilent Technologies Inc. (2020) Agilent 2100 Bioanalyzer System User's Guide. URL: <https://www.agilent.com/en/product/automated-electrophoresis/bioanalyzer-systems/bioanalyzer-instrument/2100-bioanalyzer-instrument-228250> (Zugriff am 20.09.2021)
3. Aguilar-Cazares D, Chavez-Dominguez R, Carlos-Reyes A, Lopez-Camarillo C, Hernandez de la Cruz ON, Lopez-Gonzalez JS (2019) Contribution of Angiogenesis to Inflammation and Cancer. *Front Oncol* 9:1399
4. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P (2015) *Molecular biology of the cell*. 6th edition. Garland Science, New York
5. Alhasan L (2019) MiR-126 modulates angiogenesis in breast cancer by targeting VEGF-A-mRNA. *Asian Pacific J Cancer Prev* 20:193–197
6. 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
7. Asamura H (2020) Lunge, Pleura und Thymus. In: Wittekind C (ed) *TNM - Klassifikation maligner Tumoren : korrigierter Nachdruck 2020 mit allen Ergänzungen der UICC aus den Jahren 2017 bis 2019*. 8. Auflage. WILEY-VCH, Weinheim, pp 141-156
8. Ball CA, Chen Y, Panavally S, Sherlock G, Speed T, Spellmann PT, Yang YH (2003) An Introduction to Microarray Bioinformatics. In: Bowtell D, Sambrook J (eds) *DNA Microarrays: A molecular cloning manual*. Cold Spring Harbor, New York, pp 509-594
9. Bartel DP (2004) MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell* 116:281–297
10. Benjamini Y, Hochberg Y (1995) Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J R Stat Soc Ser B* 57:289–300
11. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409:363–366
12. Binnewies M, Roberts EW, Kersten K, Chan V, Fearon DF, Merad M, Coussens LM, Gabilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Hedrick CC, Vonderheide RH, Pittet MJ, Jain RK, Zou W, Howcroft TK, Woodhouse EC, Weinberg RA, Krummel MF (2018) Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nat Med* 24:541–550

13. Bohle RM, Schnabel PA (2016) Grading von Lungenkarzinomen. *Pathologe* 37:314–319
14. Bolstad BM, Irizarry RA, Åstrand M, Speed TP (2003) A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics* 19:185–193
15. Bonde AK, Tischler V, Kumar S, Soltermann A, Schwendener RA (2012) Intratumoral macrophages contribute to epithelial-mesenchymal transition in solid tumors. *BMC Cancer* 12:35
16. Boxberg M, Bollwein C, Jöhrens K, Kuhn PH, Haller B, Steiger K, Wolff KD, Kolk A, Jesinghaus M, Weichert W (2019) Novel prognostic histopathological grading system in oral squamous cell carcinoma based on tumour budding and cell nest size shows high interobserver and intraobserver concordance. *J Clin Pathol* 72:285–294
17. Bracken CP, Gregory PA, Kolesnikoff N, Bert AG, Wang J, Shannon MF, Goodall GJ (2008) A double-negative feedback loop between ZEB1-SIP1 and the microRNA-200 family regulates epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res* 68:7846–7854
18. Brierley JD, Gospodarowicz MK, O’Sullivan B, Wittekind C (2020) Allgemeine Regeln. In: Wittekind C (ed) *TNM-Klassifikation maligner Tumoren: korrigierter Nachdruck 2020 mit allen Ergänzungen der UICC aus den Jahren 2017 bis 2019*. 8. Auflage. WILEY-VCH, Weinheim, pp 1-25
19. Brundage MD, Davies D, Mackillop WJ (2002) Prognostic Factors in Non-small Cell Lung Cancer: A Decade of Progress. *Chest* 122:1037–1057
20. Bueno-de-Mesquita JM, Nuyten DSA, Wesseling J, van Tinteren H, Linn SC, van de Vijver MJ (2009) The impact of inter-observer variation in pathological assessment of node-negative breast cancer on clinical risk assessment and patient selection for adjuvant systemic treatment. *Ann Oncol* 21:40–47
21. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM, Adrian Calin G, Dan Dumitru C, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM (2002) Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:15524–15529
22. Capitão M, Soares R (2016) Angiogenesis and Inflammation Crosstalk in Diabetic Retinopathy. *J Cell Biochem* 2443–2453
23. Chalmers ZR, Connelly CF, Fabrizio D, Gay L, Ali SM, Ennis R, Schrock A, Campbell B, Shlien A, Chmielecki J, Huang F, He Y, Sun J, Tabori U, Kennedy M, Lieber DS, Roels S, White J, Otto GA, Ross JS, Garraway L, Miller VA, Stephens PJ, Frampton GM (2017) Analysis of 100,000 human cancer genomes reveals the landscape of tumor

- mutational burden. *Genome Med* 9:34
24. Chen H, Li L, Wang S, Lei Y, Ge Q, Lv N, Zhou X, Chen C (2014) Reduced miR-126 expression facilitates angiogenesis of gastric cancer through its regulation on VEGF-A. *Oncotarget* 5:11873–11885
  25. Chen L, Lin G, Chen K, Liang R, Wan F, Zhang C, Tian G, Zhu X (2020) VEGF promotes migration and invasion by regulating EMT and MMPs in nasopharyngeal carcinoma. *J Cancer* 11:7291–7301
  26. Chen L juan, Li X ya, Zhao Y qiu, Liu W jing, Wu H juan, Liu J, Mu X qian, Wu H bo (2017) Down-regulated microRNA-375 expression as a predictive biomarker in non-small cell lung cancer brain metastasis and its prognostic significance. *Pathol Res Pract* 213:882–888
  27. Chen SW, Wang TB, Tian YH, Zheng YG (2015) Down-regulation of microRNA-126 and microRNA-133b acts as novel predictor biomarkers in progression and metastasis of non small cell lung cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 8:14983–14988
  28. Chen W, Gao Q, Han S, Pan F, Fan W (2015) The CCL2/CCR2 axis enhances IL-6-induced epithelial-mesenchymal transition by cooperatively activating STAT3-Twist signaling. *Tumor Biol* 36:973–981
  29. Chen Y, Xiao Y, Ge W, Zhou K, Wen J, Yan W, Wang.Y, Wang B, Qu C, Wu J, Xu L, Cai W (2013) MiR-200b inhibits TGF- $\beta$ 1-induced epithelial-mesenchymal transition and promotes growth of intestinal epithelial cells. *Cell Death Dis* 4:e541–e541
  30. Chen YJ, Guo YN, Shi K, Huang HM, Huang SP, Xu WQ, Li ZY, Wei KL, Gan TQ, Chen G (2019) Down-regulation of microRNA-144-3p and its clinical value in non-small cell lung cancer: A comprehensive analysis based on Microarray, miRNA-sequencing, and quantitative real-time PCR data. *Respir Res* 20:48
  31. Chendrimada TP, Finn KJ, Ji X, Baillat D, Gregory RI, Liebhaber SA, Pasquinelli AE, Shiekhattar R (2007) MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. *Nature* 447:823–828
  32. Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156–159
  33. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio M V., Ferracin M, Shimizu M, Wojcik SE, Aqeilan RI, Zupo S, Dono M, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM (2005) miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:13944–13949
  34. Cohen J (1988) *Statistical power analysis for the behavioral sciences*. L. Erlbaum Associates, Hillsdale NJ
  35. Dalal BI, Keown PA, Greenberg AH (1993) Immunocytochemical localization of secreted transforming growth factor-  $\beta$ 1 to the advancing edges of primary tumors and to lymph

- node metastases of human mammary carcinoma. *Am J Pathol* 143:381–389
36. Dang K, Myers KA (2015) The role of hypoxia-induced miR-210 in cancer progression. *Int J Mol Sci* 16:6353–6372
  37. Davalos V, Moutinho C, Villanueva A, Boque R, Silva P, Carneiro F, Esteller M (2012) Dynamic epigenetic regulation of the microRNA-200 family mediates epithelial and mesenchymal transitions in human tumorigenesis. *Oncogene* 31:2062–2074
  38. Dave N, Guaita-Esteruelas S, Gutarra S, Frias À, Beltran M, Peiró S, García De Herreros A (2011) Functional cooperation between snail1 and twist in the regulation of ZEB1 expression during epithelial to mesenchymal transition. *J Biol Chem* 286:12024–12032
  39. Dieffenbach CW, Dveksler GS (1993) Setting Up a PCR laboratory. *Genome Res* 3:52–57
  40. Dienemann H, Trainer C, Hoffmann H, Bülzebruck H, Muley T, Kayser K, Vogt-Moykopf I (1997) Incomplete resection of lung cancer: Morbidity and prognosis. *Chirurg* 68:1014–1019
  41. Dominiak A, Chelstowska B, Olejarz W, Nowicka G (2020) Communication in the Cancer Microenvironment as a Target for Therapeutic Interventions. *Cancers (Basel)* 12:1232
  42. Ebrahimi F, Gopalan V, Smith RA, Lam AKY (2014) MiR-126 in human cancers: Clinical roles and current perspectives. *Exp Mol Pathol* 96:98–107
  43. Ehrenreich A (2006) DNA Microarray technology for the microbiologist: An overview. *Appl Microbiol Biotechnol* 73:255–273
  44. Eilertsen M, Andersen S, Al-Saad S, Richardsen E, Stenvold H, Hald SM, Al-Shibli K, Donnem T, Busund LT, Bremnes RM (2014) Positive prognostic impact of miR-210 in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 83:272–278
  45. Elzakra N, Kim Y (2021) HIF-1 $\alpha$  Metabolic Pathways in Human Cancer. In: Hu S (ed) *Cancer Metabolomics. Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer, Cham, pp 243-260
  46. Fantozzi A, Gruber DC, Pisarsky L, Heck C, Kunita A, Yilmaz M, Meyer-Schaller N, Cornille K, Hopfer U, Bentires-Alj M, Christofori G (2014) VEGF-mediated angiogenesis links EMT-induced cancer stemness to tumor initiation. *Cancer Res* 74:1566–1575
  47. Fareh M, Yeom KH, Haagsma AC, Chauhan S, Heo I, Joo C (2016) TRBP ensures efficient Dicer processing of precursor microRNA in RNA-crowded environments. *Nat Commun* 7:1–11
  48. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N (2008) Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* 9:102–114

49. Fish JE, Santoro MM, Morton SU, Yu S, Yeh RF, Wythe JD, Ivey KN, Bruneau BG, Stainier DYR, Srivastava D (2008) miR-126 Regulates Angiogenic Signaling and Vascular Integrity. *Dev Cell* 15:272–284
50. Folkman J (1990) What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 82:4–7
51. Forero DA, González-Giraldo Y, Castro-Vega LJ, Barreto GE (2019) qPCR-based methods for expression analysis of miRNAs. *Biotechniques* 67:192–199
52. Foss KM, Sima C, Ugolini D, Neri M, Allen KE, Weiss GJ (2011) MiR-1254 and miR-574-5p: Serum-based microRNA biomarkers for early-stage non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 6:482–488
53. Frank AC, Ebersberger S, Fink AF, Lampe S, Weigert A, Schmid T, Ebersberger I, Syed SN, Brüne B (2019) Apoptotic tumor cell-derived microRNA-375 uses CD36 to alter the tumor-associated macrophage phenotype. *Nat Commun* 10:1–18
54. Frazer KA, Murray SS, Schork NJ, Topol EJ (2009) Human genetic variation and its contribution to complex traits. *Nat Rev Genet* 10:241–251
55. Gen Y, Yasui K, Kitaichi T, Iwai N, Terasaki K, Dohi O, Hashimoto H, Fukui H, Inada Y, Fukui A, Jo M, Moriguchi M, Nishikawa T, Umemura A, Yamaguchi K, Konishi H, Naito Y, Itoh Y (2017) ASPP2 suppresses invasion and TGF- $\beta$ 1-induced epithelial–mesenchymal transition by inhibiting Smad7 degradation mediated by E3 ubiquitin ligase ITCH in gastric cancer. *Cancer Lett* 398:52–61
56. Gilad S, Lithwick-Yanai G, Barshack I, Benjamin S, Krivitsky I, Edmonston TB, Bibbo M, Thurm C, Horowitz L, Huang Y, Feinmesser M, Steve Hou J, St. Cyr B, Burnstein I, Gibori H, Dromi N, Sanden M, Kushnir M, Aharonov R (2012) Classification of the four main types of lung cancer using a microRNA-based diagnostic assay. *J Mol Diagnostics* 14:510–517
57. Gilbert W (1986) Origin of life: The RNA world. *Nature* 319:618–618
58. Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, Barry SC, Tsykin A, Farshid G, Vadas MA, Khew-Goodall Y, Goodall GJ (2008) The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat Cell Biol* 10:593–601
59. Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, Shiekhattar R (2004) The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* 432:235–240
60. Griffiths-Jones S (2004) The microRNA registry. *Nucleic Acids Res* 32:D109–D111
61. Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ (2006) miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res* 34:D140–D144
62. Griffiths-Jones S, Saini HK, Van Dongen S, Enright AJ (2008) miRBase: Tools for

- microRNA genomics. *Nucleic Acids Res* 36:D154–D158
63. Grigore A, Jolly M, Jia D, Farach-Carson M, Levine H (2016) Tumor Budding: The Name is EMT. Partial EMT. *J Clin Med* 5:51
  64. Gschwandtner M, Derler R, Midwood KS (2019) More Than Just Attractive: How CCL2 Influences Myeloid Cell Behavior Beyond Chemotaxis. *Front Immunol* 10:2759
  65. Guan P, Yin Z, Li X, Wu W, Zhou B (2012) Meta-analysis of human lung cancer microRNA expression profiling studies comparing cancer tissues with normal tissues. *J Exp Clin Cancer Res* 31:54
  66. Guca E, Suñol D, Suñol S, Ruiz L, Konkol A, Cordero J, Torner C, Aragon E, Martin-Malpartida P, Riera A, Macias MJ (2018) TGIF1 homeodomain interacts with Smad MH1 domain and represses TGF-signaling. *Nucleic Acids Res* 46:9220–9235
  67. Hall JS, Taylor J, Valentine HR, Irlam JJ, Eustace A, Hoskin PJ, Miller CJ, West CML (2012) Enhanced stability of microRNA expression facilitates classification of FFPE tumour samples exhibiting near total mRNA degradation. *Br J Cancer* 107:684–694
  68. Hamamoto J, Soejima K, Yoda S, Naoki K, Nakayama S, Satomi R, Terai H, Ikemura S, Sato T, Yasuda H, Hayashi Y, Sakamoto M, Takebayashi T, Betsuyaku T (2013) Identification of microRNAs differentially expressed between lung squamous cell carcinoma and lung adenocarcinoma. *Mol Med Rep* 8:456–462
  69. Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57–70
  70. Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 144:646–674
  71. Hao Y, Baker D, Dijke P ten (2019) TGF- $\beta$ -mediated epithelial-mesenchymal transition and cancer metastasis. *Int J Mol Sci* 20:2767
  72. Hasegawa Y, Takanashi S, Kanehira Y, Tsushima T, Imai T, Okumura K (2001) Transforming growth factor- $\beta$ 1 level correlates with angiogenesis, tumor progression, and prognosis in patients with nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 91:964–971
  73. Hezova R, Kovarikova A, Srovnal J, Zemanova M, Harustiak T, Ehrmann J, Hajduch M, Sachlova M, Svoboda M, Slaby O (2016) MiR-205 functions as a tumor suppressor in adenocarcinoma and an oncogene in squamous cell carcinoma of esophagus. *Tumor Biol* 37:8007–8018
  74. Hilgers R-D, Bauer P, Schreiber V (2007) Einführung in die Medizinische Statistik. 2. verbesserte und überarbeitete Auflage. Springer, Berlin
  75. Holmes DI, Zachary I (2005) The vascular endothelial growth factor (VEGF) family: Angiogenic factors in health and disease. *Genome Biol* 6:209
  76. Hong-Yuan W, Xiao-Ping C (2015) MIR-338-3p suppresses epithelial-mesenchymal transition and metastasis in human nonsmall cell lung cancer. *Indian J Cancer* 52:e168–e171

77. Huang N, Wu Z, Lin L, Zhou M, Wang L, Ma H, Xia J, Bin J, Liao Y, Liao W (2015) MiR-338-3p inhibits epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer cells by targeting ZEB2 and MACC1/Met/Akt signaling. *Oncotarget* 6:15222–15234
78. Huang X, Ding L, Bennewith KL, Tong RT, Welford SM, Ang KK, Story M, Le QT, Giaccia AJ (2009) Hypoxia-Inducible mir-210 Regulates Normoxic Gene Expression Involved in Tumor Initiation. *Mol Cell* 35:856–867
79. Huang X, Le QT, Giaccia AJ (2010) MiR-210 - micromanager of the hypoxia pathway. *Trends Mol Med* 16:230–237
80. Hutvagner G, Zamore PD (2002) A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* 297:2056–2060
81. Imoto H, Osaki T, Taga S, Ohgami A, Ichiyoshi Y, Yasumoto K (1998) Vascular endothelial growth factor expression in non-small-cell lung cancer: Prognostic significance in squamous cell carcinoma. *J Thorac Cardiovasc Surg* 115:1007–1014
82. Jin HF, Wang JF, Song TT, Zhang J, Wang L (2020) MiR-200b Inhibits Tumor Growth and Chemoresistance via Targeting p70S6K1 in Lung Cancer. *Front Oncol* 10:643
83. Jin Y, Zhao M, Xie Q, Zhang H, Wang Q, Ma Q (2015) MicroRNA-338-3p functions as tumor suppressor in breast cancer by targeting SOX4. *Int J Oncol* 47:1594–1602
84. Jin Y, Liu Y, Zhang J, Huang W, Jiang H, Hou Y, Xu C, Zhai C, Gao X, Wang S, Wu Y, Zhu H, Lu S (2015) The expression of MIR-375 is associated with carcinogenesis in three subtypes of lung cancer. *PLoS One* 10:e0144187
85. Jung M, Schaefer A, Steiner I, Kempkensteffen C, Stephan C, Erbersdobler A, Jung K (2010) Robust MicroRNA stability in degraded RNA preparations from human tissue and cell samples. *Clin Chem* 56:998–1006
86. Kadota K, Nitadori JI, Woo KM, Sima CS, Finley DJ, Rusch VW, Adusumilli PS, Travis WD (2014) Comprehensive pathological analyses in lung squamous cell carcinoma: Single cell invasion, nuclear diameter, and tumor budding are independent prognostic factors for worse outcomes. *J Thorac Oncol* 9:1126–1139
87. Kalluri R, Weinberg RA (2009) The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 119:1420–1428
88. Kelly PMA, Davison RS, Bliss E, McGee JOD (1988) Macrophages in human breast disease: A quantitative immunohistochemical study. *Br J Cancer* 57:174–177
89. Kelly TJ, Souza AL, Clish CB, Puigserver P (2011) A Hypoxia-Induced Positive Feedback Loop Promotes Hypoxia-Inducible Factor 1 $\alpha$  Stability through miR-210 Suppression of Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase 1-Like. *Mol Cell Biol* 31:2696–2706
90. Kim MK, Jung SB, Kim JS, Roh MS, Lee JH, Lee EH, Lee HW (2014) Expression of microRNA miR-126 and miR-200c is associated with prognosis in patients with non-

- small cell lung cancer. *Virchows Arch* 465:463–471
91. Kimura S, Naganuma S, Susuki D, Hirono Y, Yamaguchi A, Fujieda S, Sano K, Itoh H (2010) Expression of microRNAs in squamous cell carcinoma of human head and neck and the esophagus: miR-205 and miR-21 are specific markers for HNSCC and ESCC. *Oncol Rep* 23:1625–1633
  92. Kiriakidou M, Tan GS, Lamprinaki S, De Planell-Saguer M, Nelson PT, Mourelatos Z (2007) An mRNA m7G Cap Binding-like Motif within Human Ago2 Represses Translation. *Cell* 129:1141–1151
  93. Klein U, Lia M, Crespo M, Siegel R, Shen Q, Mo T, Ambesi-Impiombato A, Califano A, Migliazza A, Bhagat G, Dalla-Favera R (2010) The DLEU2/miR-15a/16-1 Cluster Controls B Cell Proliferation and Its Deletion Leads to Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer Cell* 17:28–40
  94. Kobayashi T, Kim HJ, Liu X, Sugiura H, Kohyama T, Fang Q, Wen FQ, Abe S, Wang X, Atkinson JJ, Shipley JM, Senior RM, Rennard SI (2014) Matrix metalloproteinase-9 activates TGF- $\beta$  and stimulates fibroblast contraction of collagen gels. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol* 306:L1006–L1015
  95. Korpala M, Lee ES, Hu G, Kang Y (2008) The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2. *J Biol Chem* 283:14910–14914
  96. Kozomara A, Griffiths-Jones S (2011) MiRBase: Integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res* 39:D152–D157
  97. Kozomara A, Griffiths-Jones S (2014) MiRBase: Annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res* 42:D68–D73
  98. Kozomara A, Birgaoanu M, Griffiths-Jones S (2019) MiRBase: From microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res* 47:D155–D162
  99. Kralik P, Ricchi M (2017) A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything. *Front Microbiol* 8:108
  100. Kulshreshtha R, Ferracin M, Wojcik SE, Garzon R, Alder H, Agosto-Perez FJ, Davuluri R, Liu C-G, Croce CM, Negrini M, Calin GA, Ivan M (2007) A MicroRNA Signature of Hypoxia. *Mol Cell Biol* 27:1859–1867
  101. Labani-Motlagh A, Ashja-Mahdavi M, Loskog A (2020) The Tumor Microenvironment: A Milieu Hindering and Obstructing Antitumor Immune Responses. *Front Immunol* 11:940
  102. Lamouille S, Xu J, Derynck R (2014) Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15:178–196
  103. Lang G (2013) *Histotechnik Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik*. 2. überarbeitete und aktualisierte Auflage. Springer, Wien
  104. Lantuejoul S, Hwang D, Mascaux C, Remon J, Van Schil P, Warth A (eds) (2021)

- Squamous dysplasia and carcinoma in situ of the lung. In: WHO Classification of Tumours Editorial Board. Thoracic tumours. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer; 2021. (WHO classification of tumours series, 5th ed.; vol. 5), pp 85-88
105. Lebanony D, Benjamin H, Gilad S, Ezagouri M, Dov A, Ashkenazi K, Gefen N, Izraeli S, Rechavi G, Pass H, Nonaka D, Li J, Spector Y, Rosenfeld N, Chajut A, Cohen D, Aharonov R, Mansukhani M (2009) Diagnostic assay based on hsa-miR-205 expression distinguishes squamous from nonsquamous non-small-cell lung carcinoma. *J Clin Oncol* 27:2030–2037
  106. 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
  107. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN (2004) MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 23:4051–4060
  108. Leidinger P, Keller A, Meese E (2012) Micronas - important molecules in lung cancer research. *Front Genet* 2:
  109. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms, Langversion 1.0, 2018, AWMF-Registernummer: 020/007OL, URL: <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Lungenkarzinom.98.0.html> (Zugriff am: 02.08.2021)
  110. Li B, Zhang S, Shen H, Li C (2017) MicroRNA-144-3p suppresses gastric cancer progression by inhibiting epithelial-to-mesenchymal transition through targeting PBX3. *Biochem Biophys Res Commun* 484:241–247
  111. Li M, Zhang Z, Li L, Wang X (2020) An algorithm to quantify intratumor heterogeneity based on alterations of gene expression profiles. *Commun Biol* 3:1–19
  112. Li X, Li Z, Yang G, Pan Z (2015) MicroRNA-338-3p suppresses tumor growth of esophageal squamous cell carcinoma in vitro and in vivo. *Mol Med Rep* 12:3951–3957
  113. Li XG, Wan GS, Liang YX (2014) Effect of miR-126 on cell cycle regulation and prognosis of lung cancer patients. *J Pract Oncol* 29:440–445
  114. Li Y, Kowdley K V. (2012) MicroRNAs in Common Human Diseases. *Genomics, Proteomics Bioinforma* 10:246–253
  115. Li Y, Jiang Q, Xia N, Yang H, Hu C (2012) Decreased expression of microRNA-375 in nonsmall cell lung cancer and its clinical significance. *J Int Med Res* 40:1662–1669
  116. Li Y, Chen P, Zu L, Liu B, Wang M, Zhou Q (2016) MicroRNA-338-3p suppresses metastasis of lung cancer cells by targeting the EMT regulator Sox4. *Am J Cancer Res* 6:127–140

117. Liu CJ, Tsai MM, Hung PS, Kao SY, Liu TY, Wu KJ, Chiou SH, Lin SC, Chang KW (2010) miR-31 ablates expression of the HIF regulatory factor FIH to activate the HIF pathway in head and neck carcinoma. *Cancer Res* 70:1635–1644
118. Liu YN, Yin JJ, Abou-Kheir W, Hynes PG, Casey OM, Fang L, Yi M, Stephens RM, Seng V, Sheppard-Tillman H, Martin P, Kelly K (2013) MiR-1 and miR-200 inhibit EMT via Slug-dependent and tumorigenesis via Slug-independent mechanisms. *Oncogene* 32:296–306
119. Liu Z, Yi J, Ye R, Liu J, Duan Q, Xiao J, Liu F (2015) miR-144 regulates transforming growth factor- $\beta$ 1 induced hepatic stellate cell activation in human fibrotic liver. *Int J Clin Exp Pathol* 8:3994–4000
120. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25:402–408
121. Lourenço AR, Coffey PJ (2017) SOX4: Joining the Master Regulators of Epithelial-to-Mesenchymal Transition? *Trends in Cancer* 3:571–582
122. Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U (2004) Nuclear Export of MicroRNA Precursors. *Science* 303:95–98
123. 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 USA* 104:9667–9672
124. MacDougall JR, Matrisian LM (1995) Contributions of tumor and stromal matrix metalloproteinases to tumor progression, invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 14:351–362
125. Mantovani A, Bottazzi B, Colotta F, Sozzani S, Ruco L (1992) The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunol Today* 13:265–270
126. Marusyk A, Polyak K (2010) Tumor heterogeneity: Causes and consequences. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer* 1805:105–117
127. McDonald DM (2008) Angiogenesis and Vascular Remodeling in Inflammation and Cancer: Biology and Architecture of the Vasculature. In: *Angiogenesis: An Integrative Approach From Science to Medicine*. Springer US, Boston, MA
128. Medley JC, Panzade G, Zinovyeva AY (2020) microRNA strand selection: Unwinding the rules. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 12:e1627
129. Meng W, Ye Z, Cui R, Perry J, Dedousi-Huebner V, Huebner A, Wang Y, Li B, Volinia S, Nakanishi H, Kim T, Suh SS, Ayers LW, Ross P, Croce CM, Chakravarti A, Jin VX, Lautenschlaeger T (2013) MicroRNA-31 predicts the presence of lymph node metastases and survival in patients with lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 19:5423–5433
130. Nadal E, Zhong J, Lin J, Reddy RM, Ramnath N, Orringer MB, Chang AC, Beer DG,

- Chen G (2014) A microRNA cluster at 14q32 drives aggressive lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 20:3107–3117
131. Nakao A, Imamura T, Souchelnytskyi S, Kawabata M, Ishisaki A, Oeda E, Tamaki K, Hanai JI, Heldin CH, Miyazono K, Ten Dijke P (1997) TGF- $\beta$  receptor-mediated signalling through Smad2, Smad3 and Smad4. *EMBO J* 16:5353–5362
132. National Academy of Sciences (1999) *The Origin of the Universe, Earth, and Life In: National Academies Press (1999) Science and Creationism: A View from the National Academy of Sciences, 2nd edition, Washington DC URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK230211/> (Zugriff am 13.10.2022)*
133. National Cancer Institute The Cancer Genome Atlas Program. URL: <https://www.cancer.gov/about-nci/organization/ccg/research/structural-genomics/tcga> (Zugriff am 20.08.2022)
134. Naumann CM, Alkatout I, Hamann MF, Al-Najar A, Hegele A, Korda JB, Bolenz C, Klöppel G, Jünemann KP, Van Der Horst C (2009) Interobserver variation in grading and staging of squamous cell carcinoma of the penis in relation to the clinical outcome. *BJU Int* 103:1660–1665
135. Netzker R (2016) Nachweis und Analyse von Nukleinsäuren. In: Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R (eds) *Duale Reihe Biochemie, 3. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, pp 482-484*
136. Nottrott S, Simard MJ, Richter JD (2006) Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. *Nat Struct Mol Biol* 13:1108–1114
137. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C (2018) Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Front Endocrinol (Lausanne)* 9:402
138. Osada H, Takahashi T (2002) Genetic alterations of multiple tumor suppressors and oncogenes in the carcinogenesis and progression of lung cancer. *Oncogene* 21:7421–7434
139. Paech DC, Weston AR, Pavlakis N, Gill A, Rajan N, Barraclough H, Fitzgerald B, Van Kooten M (2011) A systematic review of the interobserver variability for histology in the differentiation between squamous and nonsquamous non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 6:55–63
140. Paesmans M (2012) Prognostic and predictive factors for lung cancer. *Breathe* 9:113–122
141. Pan Y, Zhang J, Fu H, Shen L (2016) miR-144 functions as a tumor suppressor in breast cancer through inhibiting ZEB1/2-mediated epithelial mesenchymal transition process. *Onco Targets Ther* 9:6247–6255
142. Papageorgis P, Stylianopoulos T (2015) Role of TGF $\beta$  in regulation of the tumor microenvironment and drug delivery (review). *Int J Oncol* 46:933–943

143. Parvani JG, Schiemann WP (2013) Sox4, EMT programs, and the metastatic progression of breast cancers: Mastering the masters of EMT. *Breast Cancer Res* 15:R72
144. Pasquinelli AE (2012) MicroRNAs and their targets: Recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nat Rev Genet* 13:271–282
145. Patnaik S, Mallick R, Kannisto E, Sharma R, Bshara W, Yendamuri S, Dhillon SS (2015) MIR-205 and MIR-375 MicroRNA assays to distinguish squamous cell carcinoma from adenocarcinoma in lung cancer biopsies. *J Thorac Oncol* 10:446–453
146. 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* 14:844–852
147. Peters L, Meister G (2007) Argonaute Proteins: Mediators of RNA Silencing. *Mol Cell* 26:611–623
148. Petersen CP, Bordeleau ME, Pelletier J, Sharp PA (2006) Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol Cell* 21:533–542
149. Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:e45
150. Pfaffl MW (2004) Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *Biospektrum* 1:92–95
151. QIAGEN GmbH (2011) QuantiTect SYBR Green PCR Handbook. URL: <https://www.qiagen.com/dk/shop/pcr/quantitect-sybr-green-pcr-kits/#resources> (Zugriff am 07.07.2021)
152. QIAGEN GmbH (2020) miRNeasy Mini Handbook. URL: <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/rna-purification/mirna/mirneasy-kits/> (Zugriff am 07.07.2021)
153. R Core Team (2021) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Wien
154. Rao N, Moran C, Suster S (2007) Tumors of the Lungs and Pleura. In: Damjanov I, Fang F (eds) *Cancer Grading Manual*. Springer, New York, pp 31-41
155. Rawal S, Munasinghe PE, Shindikar A, Paulin J, Cameron V, Manning P, Williams MJA, Jones GT, Bunton R, Galvin I, Katare R (2017) Down-regulation of proangiogenic microRNA-126 and microRNA-132 are early modulators of diabetic cardiac microangiopathy. *Cardiovasc Res* 113:90–101
156. Riede U-N, Werner M (2017) Dickdarm. In: *Allgemeine und Spezielle Pathologie*. 2. überarbeitete Auflage. Springer, Berlin, pp 497-510
157. Roberts T (2015) The microRNA Machinery. In: Santulli G. (ed) *microRNA: Basic Science*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer, Cham, pp 15-30

158. Ruby JG, Jan CH, Bartel DP (2007) Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature* 448:83–86
159. Rupaimoole R, Calin GA, Lopez-Berestein G, Sood AK (2016) MiRNA deregulation in cancer cells and the tumor microenvironment. *Cancer Discov* 6:235–246
160. Ryan BM, Robles AI, Harris CC (2010) Genetic variation in microRNA networks: The implications for cancer research. *Nat Rev Cancer* 10:389–402
161. Samuels-Lev Y, O'Connor DJ, Bergamaschi D, Trigiante G, Hsieh JK, Zhong S, Campargue I, Naumovski L, Crook T, Lu X (2001) ASPP proteins specifically stimulate the apoptotic function of p53. *Mol Cell* 8:781–794
162. Sasahira T, Kurihara M, Bhawal UK, Ueda N, Shimomoto T, Yamamoto K, Kirita T, Kuniyasu H (2012) Downregulation of miR-126 induces angiogenesis and lymphangiogenesis by activation of VEGF-A in oral cancer. *Br J Cancer* 107:700–706
163. Savic Prince S, Bubendorf L (2019) Lunge. In: Höfler G, Kreipe H, Moch H (eds) *Pathologie: Das Lehrbuch*. Urban & Fischer, München, pp 484-522
164. Schoepp M, Ströse AJ, Haier J (2017) Dysregulation of miRNA Expression in Cancer Associated Fibroblasts (CAFs) and Its Consequences on the Tumor Microenvironment. *Cancers (Basel)* 9:54
165. Senfter D, Madlener S, Krupitza G, Mader RM (2016) The microRNA-200 family: Still much to discover. *Biomol Concepts* 7:311–319
166. Serocki M, Bartoszewska S, Janaszak-Jasiecka A, Ochocka RJ, Collawn JF, Bartoszewski R (2018) miRNAs regulate the HIF switch during hypoxia: a novel therapeutic target. *Angiogenesis* 21:183–202
167. Shan Y, Li X, You B, Shi S, Zhang Q, You Y (2015) MicroRNA-338 inhibits migration and proliferation by targeting hypoxia-induced factor 1 $\alpha$  in nasopharyngeal carcinoma. *Oncol Rep* 34:1943–1952
168. Shen H, Yu X, Yang F, Zhang Z, Shen J, Sun J, Choksi S, Jitkaew S, Shu Y (2016) Reprogramming of Normal Fibroblasts into Cancer-Associated Fibroblasts by miRNAs-Mediated CCL2/VEGFA Signaling. *PLoS Genet* 12:e1006244
169. Sheng S, Xie L, Wu Y, Ding M, Zhang T, Wang X (2019) MiR-144 inhibits growth and metastasis in colon cancer by down-regulating SMAD4. *Biosci Rep* 39:BSR20181895
170. Shin JO, Lee JM, Cho KW, Kwak S, Kwon HJ, Lee MJ, Cho SW, Kim KS, Jung HS (2012) MiR-200b is involved in Tgf- $\beta$  signaling to regulate mammalian palate development. *Histochem Cell Biol* 137:67–78
171. Stemmler MP, Eccles RL, Brabletz S, Brabletz T (2019) Non-redundant functions of EMT transcription factors. *Nat Cell Biol* 21:102–112
172. Suarez-Carmona M, Lesage J, Cataldo D, Gilles C (2017) EMT and inflammation: inseparable actors of cancer progression. *Mol Oncol* 11:805–823

173. Sun J, Feng X, Gao S, Xiao Z (2015) MicroRNA-338-3p functions as a tumor suppressor in human nonsmallcell lung carcinoma and targets Ras-related protein 14. *Mol Med Rep* 11:1400–1406
174. Tan X, Qin W, Zhang L, Hang J, Li B, Zhang C, Wan J, Zhou F, Shao K, Sun Y, Wu J, Zhang X, Qiu B, Li N, Shi S, Feng X, Zhao S, Wang Z, Zhao X, Chen Z, Mitchelson K, Cheng J, Guo Y, He J (2011) A 5-MicroRNA signature for lung squamous cell carcinoma diagnosis and hsa-miR-31 for prognosis. *Clin Cancer Res* 17:6802–6811
175. Tang Q, Li M, Chen L, Bi F, Xia H (2018) miR-200b/c targets the expression of RhoE and inhibits the proliferation and invasion of non-small cell lung cancer cells. *Int J Oncol* 53:1732–1742
176. Tao P, Wen H, Yang B, Zhang A, Wu X, Li Q (2018) miR-144 inhibits growth and metastasis of cervical cancer cells by targeting VEGFA and VEGFC. *Exp Ther Med* 15:562–568
177. Tellez CS, Juri DE, Do K, Bernauer AM, Thomas CL, Damiani LA, Tessema M, Leng S, Belinsky SA (2011) EMT and stem cell-like properties associated with miR-205 and miR-200 epigenetic silencing are early manifestations during carcinogen-induced transformation of human lung epithelial cells. *Cancer Res* 71:3087–3097
178. Thermo Fisher Scientific Inc. (2010) NanoDrop Nucleic Acid Handbook. URL: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/Thermo-Scientific-NanoDrop-Products-Nucleic-Acid-Technical-Guide-EN.pdf> (Zugriff am 25.11.2021)
179. Thermo Fisher Scientific Inc. (2021) QuantStudio™. URL: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/global/forms/life-science/quantstudio-3-5-software.html>
180. Tian X, Liu Y, Wang Z, Wu S (2021) miR-144 delivered by nasopharyngeal carcinoma-derived EVs stimulates angiogenesis through the FBXW7/HIF-1 $\alpha$ /VEGF-A axis. *Mol Ther - Nucleic Acids* 24:1000–1011
181. Timischl W (2013) *Angewandte Statistik: Eine Einführung für Biologen und Mediziner*. 3. Auflage. Springer, Wien
182. Tiwari N, Tiwari VK, Waldmeier L, Balwierz PJ, Arnold P, Pachkov M, Meyer-Schaller N, Schübeler D, VanNimwegen E, Christofori G (2013) Sox4 Is a Master Regulator of Epithelial-Mesenchymal Transition by Controlling Ezh2 Expression and Epigenetic Reprogramming. *Cancer Cell* 23:768–783
183. Tong Z, Meng X, Wang J, Wang L (2017) MicroRNA-338-3p targets SOX4 and inhibits cell proliferation and invasion of renal cell carcinoma. *Exp Ther Med* 14:5200–5206
184. Travis WD, Brambilla E, Geisinger KR (2016) Histological grading in lung cancer: one system for all or separate systems for each histological type? *Eur Respir J* 47:720–723
185. Travis WD, Scagliotti G V., Al-Dayel FH, Bubendorf L, Chung J-H, Rekhtman N (2021)

- Small diagnostic samples In: Travis W, Brambilla E, Burke A, Marx A, Nicholson A (eds) WHO Classification of Tumours of the the Lung, Pleura, Thymus and Heart. 4th edition. IARC, Lyon, pp 16-21
186. Tsoa M, Brambilla E, Nicholson A, Butnor K, Caporaso N, Chen G, Chou T, Devesa S, Hainaut P, Jen J, Jett J, Ladanyi M, Meyerson M, Naidich D, Noguchi M, Powell C, Rami-Porta R, Rekhtman N, Roggli V, Takano A, Thunnissen E, Travis W, Schil P van, Wistuba I (2015) Squamous cell carcinoma. In: Travis W, Brambilla E, Burke A, Marx A, Nicholson A (eds) WHO Classification of Tumours of the the Lung, Pleura, Thymus and Heart. 4th edition. IARC, Lyon, pp 51-55
  187. Uchida A, Seki N, Mizuno K, Misono S, Yamada Y, Kikkawa N, Sanada H, Kumamoto T, Suetsugu T, Inoue H (2019) Involvement of dual-strand of the miR-144 duplex and their targets in the pathogenesis of lung squamous cell carcinoma. *Cancer Sci* 110:420–432
  188. Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA (2007) Switching from repression to activation: MicroRNAs can up-regulate translation. *Science* 318:1931–1934
  189. Vaux DL, Cory S, Adams JM (1988) Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 335:440–442
  190. Vervoort SJ, Van Boxtel R, Coffey PJ (2013) The role of SRY-related HMG box transcription factor 4 (SOX4) in tumorigenesis and metastasis: Friend or foe? *Oncogene* 32:3397–3409
  191. Vescovo V Del, Cantaloni C, Cucino A, Girlando S, Silvestri M, Bragantini E, Fasanella S, Cuorvo LV, Palma PD, Rossi G, Papotti M, Pelosi G, Graziano P, Cavazza A, Denti MA, Barbareschi M (2011) MiR-205 expression levels in nonsmall cell lung cancer do not always distinguish adenocarcinomas from squamous cell carcinomas. *Am J Surg Pathol* 35:268–275
  192. Victor A, Klug SJ, Blettner M (2005) cDNA-Microarrays: Strategien zur Bewältigung der Datenflut. *Dtsch Arztebl* 102:A-355 / B-293 / C-276
  193. Vösa U, Vooder T, Kolde R, Vilo J, Metspalu A, Annilo T (2013) Meta-analysis of microRNA expression in lung cancer. *Int J Cancer* 132:2884–2893
  194. Wanami LS, Chen HY, Peiró S, García de Herreros A, Bachelder RE (2008) Vascular endothelial growth factor-A stimulates Snail expression in breast tumor cells: Implications for tumor progression. *Exp Cell Res* 314:2448–2453
  195. Wang B, Lv K, Chen W, Zhao J, Luo J, Wu J, Li Z, Qin H, Wong T-SS, Yang W, Fu Q-LL, Lei W (2016) miR-375 and miR-205 Regulate the Invasion and Migration of Laryngeal Squamous Cell Carcinoma Synergistically via AKT-Mediated EMT. *Biomed Res Int* 2016:9652789
  196. Wang C, Luo J, Chen Z, Ye M, Hong Y, Liu J, Nie J, Zhao Q, Chang Y (2021) MiR-375

- Impairs the Invasive Capabilities of Hepatoma Cells by Targeting HIF1 $\alpha$  Under Hypoxia. *Dig Dis Sci* 66:493–502
197. Wang D, Hao T, Pan Y, Qian X, Zhou D (2015) Increased expression of SOX4 is a biomarker for malignant status and poor prognosis in patients with non-small cell lung cancer. *Mol Cell Biochem* 402:75–82
  198. Wang K, Chen M, Wu W (2017) Analysis of microRNA (miRNA) expression profiles reveals 11 key biomarkers associated with non-small cell lung cancer. *World J Surg Oncol* 15:175
  199. Wang S, Aurora AB, Johnson BA, Qi X, McAnally J, Hill JA, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN (2008) The Endothelial-Specific MicroRNA miR-126 Governs Vascular Integrity and Angiogenesis. *Dev Cell* 15:261–271
  200. Wang X, Yu M, Zhao K, He M, Ge W, Sun Y, Wang Y, Sun H, Hu Y (2016) Upregulation of MiR-205 under hypoxia promotes epithelial–mesenchymal transition by targeting ASPP2. *Cell Death Dis* 7:e2517–e2517
  201. Wang Y, Bu F, Royer C, Serres S, Larkin JR, Soto MS, Sibson NR, Salter V, Fritzsche F, Turnquist C, Koch S, Zak J, Zhong S, Wu G, Liang A, Olofsen PA, Moch H, Hancock DC, Downward J, Goldin RD, Zhao J, Tong X, Guo Y, Lu X (2014) ASPP2 controls epithelial plasticity and inhibits metastasis through  $\beta$  2-catenin-dependent regulation of ZEB1. *Nat Cell Biol* 16:1092–1104
  202. Warth A, Bottling J, Chung J, Ishii G, Rossi G, Wistuba I (eds) (2021) Squamous cell carcinoma of the lung. In: WHO Classification of Tumours Editorial Board. Thoracic tumours. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer; 2021. (WHO classification of tumours series, 5th ed.; vol. 5), pp 89-93
  203. Weichert W, Kossakowski C, Harms A, Schirmacher P, Muley T, Dienemann H, Warth A (2016) Proposal of a prognostically relevant grading scheme for pulmonary squamous cell carcinoma. *Eur Respir J* 47:938–946
  204. Welsch U (2017) Zelle. In: Wennemuth G (ed) Taschenbuch Histologie. 2. Auflage. Urban & Fischer / Elsevier GmbH, München, pp 2-30
  205. Wiklund ED, Bramsen JB, Hulf T, Dyrskjøt L, Ramanathan R, Hansen TB, Villadsen SB, Gao S, Ostenfeld MS, Borre M, Peter ME, Ørntoft TF, Kjems J, Clark SJ (2011) Coordinated epigenetic repression of the miR-200 family and miR-205 in invasive bladder cancer. *Int J Cancer* 128:1327–1334
  206. Wittekind C, Brierley J, Lee AWM, Eycken E van (eds) (2019) TNM Supplement: A Commentary on Uniforme Use. 5th edition. Wiley Blackwell, Hoboken NJ, pp 26-28
  207. Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP (1997) Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 22:130–138
  208. Wu KL, Tsai YM, Lien CT, Kuo PL, Hung JY (2019) The roles of microRNA in lung

- cancer. *Int J Mol Sci* 20:1611
209. Xi S, Yang M, Tao Y, Xu H, Shan J, Inchauste S, Zhang M, Mercedes L, Hong JA, Rao M, Schrupp DS (2010) Cigarette smoke induces C/EBP- $\beta$ -mediated activation of miR-31 in normal human respiratory epithelia and lung cancer cells. *PLoS One* 5:e13764
  210. Xiao P, Liu W, Zhou H (2016) MiR-200b inhibits migration and invasion in non-small cell lung cancer cells via targeting FSCN1. *Mol Med Rep* 14:1835–1840
  211. Xu H, Ma J, Zheng J, Wu J, Qu C, Sun F, Xu S (2016) miR-31 functions as a tumor suppressor in lung adenocarcinoma mainly by targeting hur. *Clin Lab* 62:711–718
  212. Xu J, Wang H, Wang H, Chen Q, Zhang L, Song C, Zhou Q, Hong Y (2019) The inhibition of miR-126 in cell migration and invasion of cervical cancer through regulating ZEB1. *Hereditas* 156:11
  213. Xu Z, Ramachandran S, Gunasekaran M, Zhou F, Trulock E, Kreisel D, Hachem R, Mohanakumar T (2015) MicroRNA-144 dysregulates the transforming growth factor- $\beta$  signaling cascade and contributes to the development of bronchiolitis obliterans syndrome after human lung transplantation. *J Hear Lung Transplant* 34:1154–1162
  214. Yan JW, Lin JS, He XX (2014) The emerging role of miR-375 in cancer. *Int J Cancer* 135:1011–1018
  215. Yang F, Ning Z, Ma L, Liu W, Shao C, Shu Y, Shen H (2017) Exosomal miRNAs and miRNA dysregulation in cancer-associated fibroblasts. *Mol Cancer* 16:148
  216. Yang J, Lan H, Huang X, Liu B, Tong Y (2012) MicroRNA-126 inhibits tumor cell growth and its expression level correlates with poor survival in non-small cell lung cancer patients. *PLoS One* 7:e42978
  217. Yang Y, Sun M, Wang L, Jiao B (2013) HIFs, angiogenesis, and cancer. *J Cell Biochem* 114:967–974
  218. Ye P, Liu J, He F, Xu W, Yao K (2013) Hypoxia-induced deregulation of miR-126 and its regulative effect on VEGF and MMP-9 expression. *Int J Med Sci* 11:17–23
  219. Yu M, Liang H, Fu Z, Wang X, Liao Z, Zhou Y, Liu Y, Wang Y, Hong Y, Zhou X, Yan X, Yu M, Ma M, Zhang W, Guo B, Zhang J, Zen K, Zhang CY, Wang T, Zhang Q, Chen X (2016) BAP1 suppresses lung cancer progression and is inhibited by miR-31. *Oncotarget* 7:13742–13753
  220. Yu T, Ma P, Wu D, Shu Y, Gao W (2018) Functions and mechanisms of microRNA-31 in human cancers. *Biomed Pharmacother* 108:1162–1169
  221. Zavadil J, Böttinger EP (2005) TGF- $\beta$  and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* 24:5764–5774
  222. Zeng Y, Zhu J, Shen D, Qin H, Lei Z, Li W, Liu Z, Huang J an (2017) MicroRNA-205 targets SMAD4 in non-small cell lung cancer and promotes lung cancer cell growth in vitro and in vivo. *Oncotarget* 8:30817–30829

223. Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut (ed) (2016) Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. Berlin
224. Zhang H, Mao F, Shen T, Luo Q, Ding Z, Qian L, Huang J (2017) Plasma miR-145, miR-20a, miR-21 and miR-223 as novel biomarkers for screening early-stage non-small cell lung cancer. *Oncol Lett* 13:669–676
225. Zhang Y, Yang P, Sun T, Li D, Xu X, Rui Y, Li C, Chong M, Ibrahim T, Mercatali L, Amadori D, Lu X, Xie D, Li QJ, Wang XF (2013) MiR-126 and miR-126 \* repress recruitment of mesenchymal stem cells and inflammatory monocytes to inhibit breast cancer metastasis. *Nat Cell Biol* 15:284–294
226. Zheng W, Zhou Y, Lu J, Xu H, Lei L, Chen C, Zhao J, Xu L (2017) The prognostic value of miR-126 expression in non-small-cell lung cancer: A meta-analysis. *Cancer Cell Int* 17:71
227. Zhou R, Zhou X, Yin Z, Guo J, Hu T, Jiang S, Liu L, Dong X, Zhang S, Wu G (2016) MicroRNA-574-5p promotes metastasis of non-small cell lung cancer by targeting PTPRU. *Sci Rep* 6:35714
228. Znaor A, Travis WD, Yatabe Y, Borczuk AC, Kerr KM, Dacic S, Schil PEY Van, Scagliotti G V., Asamura H, Devesa SS, MacMahon H, Samet JM, Rusch VW (eds) (2021) Tumours of the lung: Introduction. In: WHO Classification of Tumours Editorial Board. Thoracic tumours. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer; 2021. (WHO classification of tumours series, 5th ed.; vol. 5), pp 20-28

## Danksagung

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. R. M. Bohle, Direktor des Instituts für Allgemeine und Spezielle Pathologie des Universitätsklinikums des Saarlandes, für die Bereitstellung dieses Dissertationsthemas und die allzeitige Unterstützung während des Verfassens dieser Arbeit – fachlich wie menschlich. Ihm verdanke ich zudem fortwährende Motivation für die fachärztliche Ausbildung zum Pathologen.

Frau Dr. rer. nat. Ludwig und Herrn Prof. Dr. rer. nat. E. Meese, Leiter des Instituts für Humangenetik sei herzlich gedankt für die wissenschaftliche Kooperation. Insbesondere Frau Dr. rer. Nat. Ludwig gilt Dank für die hervorragende Durchführung der Microarray-Analyse.

Herrn Dr. med. F. Flockerzi möchte ich herzlich für seine Hilfsbereitschaft und fortwährende Unterstützung danken – als Betreuer dieser Arbeit, Kollege und Freund.

Frau Dr. rer. nat. E. Ebert gilt Dank für ihre Hilfe bei der Etablierung und Durchführung der molekularbiologischen Laborarbeit. Frau J. Laubscher gilt Dank für die Unterstützung bei der Anfertigung der Schnittpräparate.

Frau Dipl.-Stat. G. Wagenpfeil, Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Medizinische Informatik des UKS, sei gedankt für die Hilfestellung im Rahmen der statistischen Auswertungen.

Ich bedanke mich auch bei Frau A. Seibold, MD, PhD für ihre Hilfestellung beim Verfassen der englischsprachigen Textpassagen.

Frau A. Klein und Herrn Dr. rer. nat. P. Wartenberg gebührt Dank für Ihre Hilfsbereitschaft bei der Fotodokumentation der Präparate und Unterstützung bei den Grafiken dieser Arbeit.

Frau E. Stenzhorn-Niemann möchte ich für die freundliche Unterstützung bei der Archivierungsarbeit danken.

Dank gilt auch meiner langjährigen Partnerin, meiner Familie und meinen Freunden, welche mich alle bis heute fortwährend unterstützen. Insbesondere Herr Dr. med. J. Federspiel hatte als guter Freund immer einen heißen Kaffee und ein offenes Ohr.

## **Lebenslauf**

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

## Appendix

Nachfolgend sind die Kriterien tabellarisch aufgeführt, welche für die Erhebung der T-, N- und M-Kategorien sowie der UICC-Stadien angewandt wurden. Diese entstammen der zum Zeitpunkt dieser Arbeit gültigen TNM-Klassifikation (8. aktualisierte Auflage, 2020) [7].

**Tabelle 23: Definition der T-Kategorie**

---

TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor 3 cm oder weniger in größter Ausdehnung, umgeben von Lungengewebe oder viszeraler Pleura, kein bronchoskopischer Nachweis einer Infiltration proximal eines Lappenbronchus (Hauptbronchus frei)
T1a	Tumor 1 cm oder weniger größter Ausdehnung
T1b	Tumor mehr als 1 cm, aber nicht mehr als 2 cm in größter Ausdehnung
T1c	Tumor mehr als 2 cm, aber nicht mehr als 3 cm in größter Ausdehnung
T2	Tumor mehr als 3 cm, aber nicht mehr als 5 cm in größter Ausdehnung <i>oder</i> Tumor mit wenigstens einem der folgenden Kennzeichen: Tumor befällt Hauptbronchus, unabhängig vom Abstand zur Carina aber ohne Befall der Carina Tumor infiltriert viszerale Pleura assoziierte Atelektase oder obstruktive Entzündung bis zum Hilus, entweder Teile der Lungen oder die ganze Lunge einnehmend
T2a	Tumor mehr als 3 cm, aber nicht mehr als 4 cm in größter Ausdehnung
T2b	Tumor mehr als 4 cm, aber nicht mehr als 5 cm in größter Ausdehnung
T3	Tumor mehr als 5 cm, aber nicht mehr als 7 cm in größter Ausdehnung <i>oder</i> Tumor mit direkter Infiltration einer der folgenden Strukturen: Pleura parietalis, Brustwand (eingeschlossen Sulcus superior-Tumoren), Nervus phrenicus, parietalis Perikard <i>oder</i> Separate(r) Tumorknoten im selben Lappen wie der Primärtumor
T4	Tumor größer als 7 cm <i>oder</i> Tumor jeder Größe mit Infiltration wenigstens einer der folgenden Strukturen: Zwerchfell, Mediastinum, Herz, große Gefäße, Trachea, N. laryngeales recurrens, Ösophagus, Wirbelkörper, Carina; <i>oder</i> Separate(r) Tumorknoten in einem anderen, ipsilateralen Lungenlappen

---

**Tabelle 24: Definition der N-Kategorie**

---

N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase(n) in ipsilateralen peribronchialen und/oder ipsilateralen Hilus- oder intrapulmonalen Lymphknoten (einschließlich eines Befalls durch direkte Ausbreitung des Primärtumors)
N2	Metastase(n) in ipsilateralen mediastinalen und/oder subkarinalen Lymphknoten
N3	Metastase(n) in kontralateralen mediastinalen, kontralateralen Hilus-, ipsi- oder kontralateralen Scalenus- oder supraclavikulären Lymphknoten

---

**Tabelle 25: Definition der M-Kategorie**

---

M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen
M1a	Vom Primärtumor getrennte Tumorherde in einem kontralateralen Lungenlappen, Tumor mit Pleura- oder Perikardmetastasen oder malignem Pleura- oder Perikarderguss
M1b	Eine extrathorakale Metastase in einem Organ
M1c	Multiple extrathorakale Metastasen in einem oder multiplen Organen

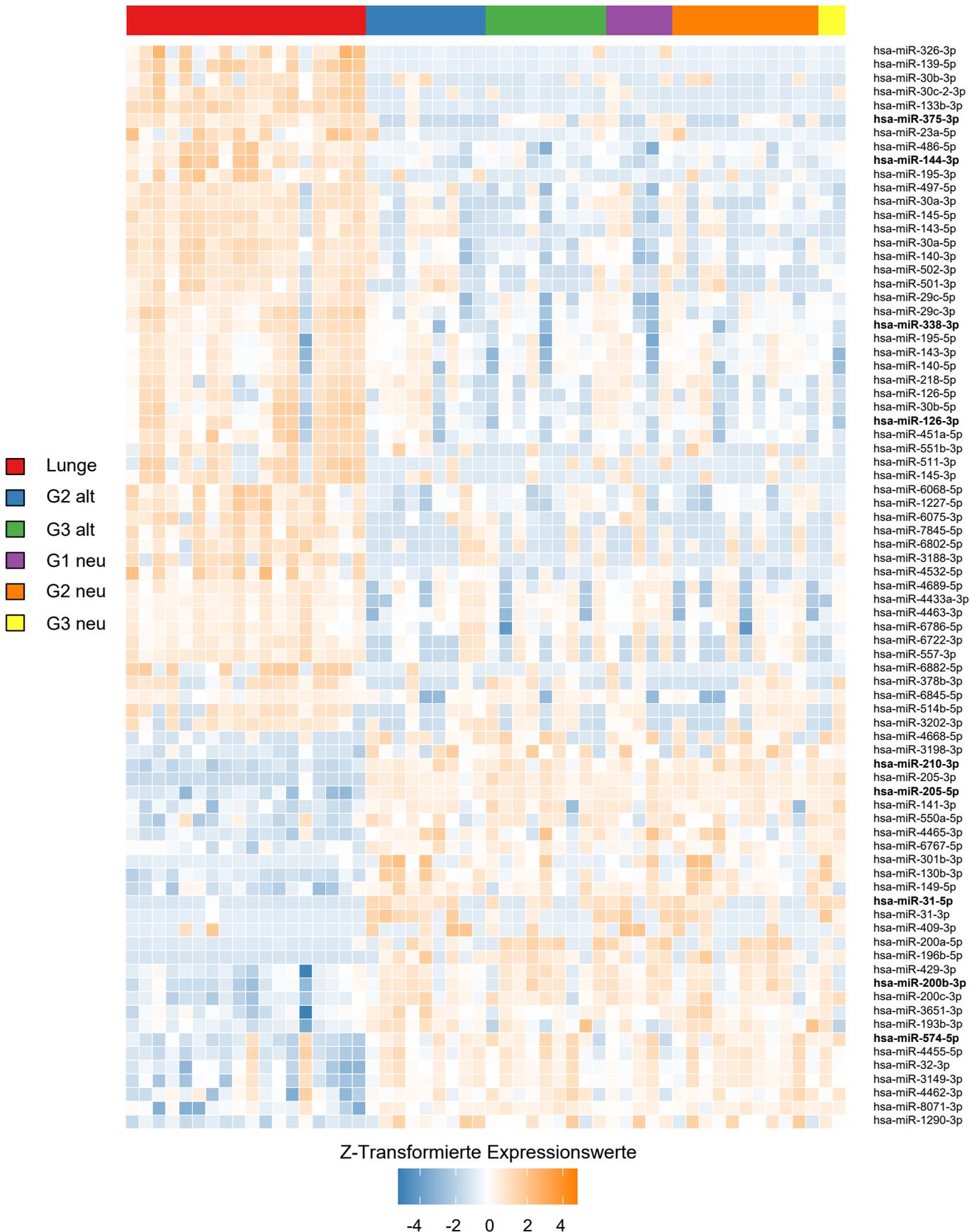
---

**Tabelle 26: Definition der UICC-Stadien**

---

Okkultes Karzinom	TX	N0	M0
0	Tis	N0	M0
IA	T1	N0	M0
IA1	T1a	N0	M0
IA2	T1b	N0	M0
IA3	T1c	N0	M0
IB	T2a	N0	M0
IIA	T2b	N0	M0
IIB	T1a-T2b	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T1a-T2b	N2	M0
	T3	N1	M0
	T4	N0, N1	M0
IIIB	T1a-T2b	N3	M0
	T3, T4	N2	M0
IIIC	T3, T4	N3	M0
IV	Jedes T	Jedes N	M1
IVA	Jedes T	Jedes N	M1a, M1b
IVB	Jedes T	Jedes N	M1c

---



**Abbildung 21: Heatmap der Microarray-Analyse mit alternativem Farbschema**

Dargestellt sind die jeweiligen quantilnormalisierten, logarithmierten und z-transformierten Expressionswerte der 79 differenziell regulierten microRNAs (Zeilen) für jede der untersuchten Proben (Spalten). Blaue Farbtöne entsprechen einer Hoch-, orangene Farbtöne einer Herabregulation (siehe Farbskala unten). Farblich unterschieden sind zudem die Lungenproben sowie die Tumorproben nach Grading (siehe Legende links). Die Tumorproben sind für das ältere, konventionelle sowie das neuere Grading-System nach Weichert et al. je einmal dargestellt.