

Aus dem Institut für Allgemeine und Spezielle Pathologie

Aus dem Bereich Klinische Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg (Saar)

MicroRNA in-situ-Analytik bei Plattenepithelkarzinomen der Lunge

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2025

vorgelegt von: Victoria-Sigrid Bremm
geboren am: 19.04.2000 in Trier

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. med. M. D. Menger
Berichterstatter:	Univ.-Prof. Dr. med. R. M. Bohle Univ.-Prof. Dr. rer. physiol. C. Meier
Tag des Kolloquiums:	25.07.2025

0. Inhaltsverzeichnis

0. Inhaltsverzeichnis	1
I. Abkürzungsverzeichnis	3
II. Abbildungsverzeichnis	6
III. Tabellenverzeichnis	7
1. Zusammenfassung	8
1.1 Summary	10
2. Einleitung	12
2.1 Das Lungenkarzinom	12
2.1.1 Epidemiologie	12
2.1.2 Einteilung	13
2.1.3 Klassifikationskriterien	13
2.2 Subtyp Plattenepithelkarzinom	19
2.2.1 Ätiologie und Karzinogenese	19
2.2.2 Pathologie	19
2.3 MicroRNA	21
2.3.1 Biogenese	21
2.3.2 Funktion	23
2.4 Zielsetzung	24
3. Material und Methodik	26
3.1 Materialien	26
3.1.1 Apparaturen	26
3.1.2 Verbrauchsmaterialien	28
3.1.3 Substanzen	29
3.1.4 Kits	32
3.1.5 MicroRNA-Sonden	32
3.1.6 Gewebeproben	32
3.2 Methoden	34
3.2.1 Definition des Kollektivs	34
3.2.2 Aufarbeitung, Fixierung und Einbettung der Gewebeproben	34
3.2.3 Anfertigung des Empfängerblockes aus Paraffin	36
3.2.4 Herstellung des Array Blockes	36
3.2.5 Vorbereitung des Array Blockes für die Anfertigung der Paraffinschnitte	38
3.2.6 Anfertigung von Schnitten des Array Blockes	39
3.2.7 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	40
3.2.8 In-situ-Hybridisierung	42
4. Ergebnisse	55
4.1 Eigenschaften des Patientenkollektivs	55
4.2 snRNA-U6 in-situ-Analytik	55
4.3 Scrambled MicroRNA in-situ-Analytik	58
4.4 MicroRNA-205-5p in-situ-Analytik	59
4.5 MicroRNA-126-3p in-situ-Analytik	62
4.6 MicroRNA-200b-3p in-situ-Analytik	65
4.7 MicroRNA-31-3p in-situ-Analytik	67

5. Diskussion	68
5.1 Diskussion von Vor- und Nachteilen der miR-in-situ-Analytik	68
5.2 Diskussion möglicher Einflussfaktoren auf das Ergebnis der miRNA-in-situ-Hybridisierung	70
5.3 Diskussion der Ergebnisse und Funktion der miR-205-5p	71
5.4 Diskussion der Ergebnisse und Funktion der miR-126-3p	73
5.5 Diskussion der Ergebnisse und Funktion der miR-200b-3p	75
5.6 Diskussion der Ergebnisse und Funktion der miR-31-3p	79
6. Fazit	80
7. Literaturverzeichnis	83
8. Danksagung	90
9. Lebenslauf	91

I. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
Aqua dest.	destilliertes Wasser
AKT	Proteinkinase B
ASPP2	<i>engl. Apoptosis-Stimulating of P53 Protein 2</i> , Apoptose-stimulierendes p53-Protein 2
Aufl.	Auflage
BCIP	5-Brom-5-chlor-3-indoxylphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
circRNA	<i>engl. circular RNA</i> , zirkuläre RNA
CIS	Carcinoma in situ
CISH	Chromogene in-situ-Hybridisierung
CK	Cytokeratin
Ct	<i>engl. Cycle threshold</i> , Schwellenwertzyklus
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DGCR8	DiGeorge Syndrome Chromosomal Region 8
DNA	<i>engl. Deoxyribonucleic Acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFL7	<i>engl. Epidermal Growth Factor-Like domain-containing gene 7</i> , Epidermaler Wachstumsfaktor-ähnliche Domäne enthaltendes Gen 7
EMT	Epithelial-Mesenchymale Transition
ERK	<i>engl. Extracellular signal-Regulated Kinases</i> , Mitogen-aktivierte Kinasen
FFPE	<i>engl. Formalin-Fixed Paraffin-Embedded</i> , Formalin-fixiert und in Paraffin eingebettet

FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FOXO1	Forkhead-Box-Protein O1
g	Gramm
GABBR2	Gamma-Aminobuttersäure-B-Rezeptor 2
HE	Hämatoxylin-Eosin
HSA	Homo sapiens, Mensch
HCl	Hydrogenchlorid
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIF-1 α	Hypoxie-induzierter Faktor 1 α
ISH	In-situ-Hybridisierung
KCl	Kaliumchlorid
KTBT	Tris-HCl + NaCl + KCl
LNA™	<i>engl. Locked Nucleic Acid</i> , verbrückte Nukleinsäuren
lncRNA	<i>engl. long non-coding RNA</i> , lange nicht-kodierende RNA
M	Molar, mol/l
min	Minute
MIR	MicroRNA
miRNA	MicroRNA
mRNA	<i>engl. messenger RNA</i> , Boten-RNA
mTOR	<i>engl. mechanistic (mammalian) Target of Rapamycin</i> , mechanistisches Zielmolekül von Rapamycin
N.	Nervus
NaCl	Natriumchlorid
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NSCLC	<i>engl. Non-Small Cell Lung Cancer</i> , Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom
PBS	<i>engl. Phosphate Buffered Saline</i> , Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBS-T	<i>engl. Phosphate Buffered Saline with Tween®20</i> , Phosphat-gepufferte Salzlösung mit Tween®20

PCR	<i>engl. Polymerase Chain Reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PD-L1	<i>engl. Programmed Death-Ligand 1</i> , Programmierter Zelltod-Ligand 1
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
pre-miRNA	<i>engl. precursor miRNA</i> , Vorläufer-miRNA
pri-miRNA	<i>engl. primary miRNA</i> , Primär-miRNA
pT	histologisch beurteilter Primärtumor
PTEN	<i>engl. Phosphatase and Tensin homolog</i> , Phosphatase und Tensin Homolog
RISC	<i>engl. RNA-induced Silencing Complex</i> , RNA-induzierter Stilllegungs-Komplex
RNA	<i>engl. ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
SCLC	<i>engl. Small Cell Lung Cancer</i> , Kleinzelliges Lungenkarzinom
SSC	<i>engl. Saline Sodium Citrate</i> , Salzlösung Natriumcitrat
snRNA	<i>engl. small nuclear RNA</i> , kleine nukleäre Ribonukleinsäure
TMA	<i>engl. Tissue Micro Array</i> , Gewebe-Mikroarray
TME	<i>engl. Tumor Microenvironment</i> , Tumormikroumgebung
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UICC	<i>franz. Union Internationale Contre le Cancer</i> , Internationale Vereinigung gegen den Krebs
U6	U6 snRNA
3'-UTR	<i>engl. 3'-untranslated region</i> , 3'-untranslatierte Region
VEGF	<i>engl. Vascular Endothelial Growth Factor</i> , Endothelwachstumsfaktor
VPF	<i>engl. Vascular Permeability Factor</i> , Gefäßpermeabilitätsfaktor
ZEB	<i>engl. Zinc finger E-box-binding homeobox</i> , Zinkfinger E-Box-bindendes Homöobox

Als Vorsätze für Maßeinheiten wurden die gängigen SI-Präfixe verwendet.

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Biogenese der miRNA

Abbildung 2: Beispiel für die TMA-Planung

Abbildung 3: Prinzip der RNA-in-situ-Hybridisierung

Abbildung 4: Expressionsprofil der snRNA-U6

Abbildung 5: Beispiele für die Bewertungskategorien anhand der snRNA-U6

Abbildung 6: Korrekt negativ gefärbte Scrambled-MicroRNA

Abbildung 7: Expressionsprofil der miR-205-5p

Abbildung 8: Ausprägungen der Blaufärbung der miR-205-5p

Abbildung 9: Expressionsprofil der miR-126-3p

Abbildung 10: Unterschiedliche Expressionsniveaus der miR-126-3p

Abbildung 11: Unterschiedliche Expressionsniveaus der miR-200b-3p

Abbildung 12: Expressionsniveau der miR-31-3p

Abbildung 13: Doppelt-negative Feedback-Schleife zwischen der MicroRNA 200b und ZEB1/ ZEB2

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: TNM-Klassifikation des Lungenkarzinoms

Tabelle 2: Stadieneinteilung des Lungenkarzinoms

Tabelle 3: Subklassifikation des Stadiums IIIA nach Robinson

Tabelle 4: Auswahl der miR-Detektionssonden anhand der Ct-Mittelwerte ausgewählter MicroRNAs

Tabelle 5: Qualitativ-ordinale Bewertungskriterien

1. Zusammenfassung

Jährlich sterben viele Menschen weltweit an den Folgen einer Krebserkrankung. Die Liste der Krebstodesfälle wird dabei mit Abstand vom Lungenkarzinom angeführt, was es zu einer gefürchteten Erkrankung werden lässt. Trotz intensiver Forschung hinsichtlich neuer diagnostischer, wie auch therapeutischer Ansätze, besitzt das Lungenkarzinom eine schlechte Prognose. Eine unspezifische und häufig fehlende Symptomatik in den frühen Stadien sowie fehlende Screening-Programme führen zur meist erst späten Erstdiagnose der Erkrankung – eine folgenschwere Tatsache bei einer Erkrankung, deren Prognose stark vom Stadium der Erkrankung abhängig ist.

Als ein mittelhochmaligner Subtyp des Lungenkarzinoms gilt das Plattenepithelkarzinom, welches dem Typus des Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms zugeordnet wird. Mit circa 30% der Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinome ist das Plattenepithelkarzinom der zweithäufigste Subtyp dieser Gruppe. Es weist unter allen Typen des Lungenkarzinoms die stärkste Assoziation zur Exposition von Tabakrauch auf und zeigt insgesamt eine komplexe Molekularpathologie. Trotz multipler, zum Teil bekannter molekularer Veränderungen sind bisher nur wenige Medikamente speziell für das Plattenepithelkarzinom entwickelt worden.

Mit der Entdeckung der MicroRNA in den 90er-Jahren eröffnete sich ein neues Forschungsgebiet, das in seiner gesamten Komplexität noch nicht überblickt werden kann. Die kleinen, einzelsträngigen Ribonukleinsäure-Moleküle, welche den nicht-kodierenden Ribonukleinsäuren zugeordnet werden, scheinen vielfältig in multiplen Regulationsmechanismen des Organismus involviert zu sein. Das große Spektrum der beeinflussten Prozesse und die Vielgestaltigkeit der Beeinflussung erschweren das Verständnis für die MicroRNA, verdeutlichen jedoch gleichzeitig die enorme Komplexität dieses Forschungsgebietes und lassen auf große Durchbrüche für die Medizin mit zunehmendem Verständnis hoffen. In vielen Krebsentitäten, so auch beim Lungenkarzinom, konnten dysregulierte MicroRNA-Expressionen und zum Teil auch Einbindungen in bekannte molekulare Signalwege nachgewiesen werden. Das Interesse an der MicroRNA als molekulares Target wächst.

Das Ziel dieser Arbeit war es, eine neue Methode zur lichtmikroskopischen Visualisierung der MicroRNA beim Plattenepithelkarzinom der Lunge zu etablieren und optimieren. Mittels der chromogenen in-situ-Hybridisierung sollte dabei der Schritt von rein molekularen Nachweisverfahren hin zur Darstellung dieser Moleküle in ihrem Gewebeverband geschafft werden. Im Anschluss wurde anhand ausgewählter, spezifischer MicroRNA-Sonden der Versuch unternommen, in Grundzügen eine histo-morphologische Darstellung des MicroRNA-Expressionsprofils im Plattenepithelkarzinom der Lunge zu generieren und dies qualitativ zu kategorisieren.

Zusammenfassend konnte dabei festgestellt werden, dass die Methode der chromogenen in-situ-Hybridisierung zum Verständnis der MicroRNA einen sinnvollen Beitrag darstellt, indem das Vorhandensein und die Lokalisation der MicroRNA im Gewebe lichtmikroskopisch visualisiert werden

konnte. Ein routinemäßiger Einsatz genau dieser Methodik hinsichtlich diagnostischer Zwecke scheint jedoch zum jetzigen Zeitpunkt aufgrund des Aufwands der Methodik noch nicht praktikabel.

In Bezug auf den feingeweblichen Nachweis von insgesamt vier, für das Plattenepithelkarzinom der Lunge charakteristischen, MicroRNAs (MicroRNA 205-5p, 126-3p, 200b-3p, 31-3p), konnten für drei MicroRNAs zuverlässige Visualisierungen erzielt werden (MicroRNA 205-5p, 126-3p, 200b-3p). Anhand dieser Ergebnisse konnte die MicroRNA 126-3p als diejenige MicroRNA identifiziert werden, welche am stabilsten nachgewiesen werden konnte.

Eine direkte Kausalität zur Erklärung der unterschiedlichen Visualisierbarkeit der verschiedenen MicroRNAs im Rahmen der in-situ-Hybridisierung konnte nicht festgestellt werden. Ebenso waren keine Abhängigkeiten der Visualisierbarkeit vom Grading, Probenalter, Geschlecht und der Tumorgröße erkennbar. Es kann jedoch festgehalten werden, dass die deutlich differenzierte Visualisierbarkeit der unterschiedlichen MicroRNAs im Rahmen der Untersuchungsreihen darauf hinweist, dass diese doch sehr individuelle Anforderungen an die Untersuchungsbedingungen stellen und ein Nachweisverfahren im Sinne einer Panel-Analyse, zumindest zum jetzigen Zeitpunkt, nicht zielführend erscheint. Damit können bisherige Forschungsergebnisse, welche die Komplexität und Individualität unterschiedlicher MicroRNAs propagieren, nur bekräftigt werden.

Insgesamt tragen die Resultate dieser experimentellen und methodischen Arbeit somit dazu bei, das bisherige Wissen zur MicroRNA hinsichtlich ihrer Lokalisation und ihres Vorhandenseins in den Tumorzellen des Plattenepithelkarzinoms der Lunge zu erweitern. Zudem konnten zelltyp-spezifische Erkenntnisse für den Nachweis von MicroRNA gewonnen werden, die auch für diagnostisch limitiert vorliegendes Tumorgewebe geeignet sind.

1.1 Summary

MicroRNA in-situ-Analytic of Squamous Cell Carcinoma of the Lung

Worldwide many people die from the consequences of cancer. Lung cancer is the leading cause of cancer mortality, which makes this disease to be feared. Despite intense scientific research regarding medical diagnosis and therapy, lung cancer has a poor prognosis. Early stage lung cancer can be asymptomatic or present with non-specific symptoms. This, in addition to the lack of adequate screening programs can result in delayed diagnosis, an important factor, considering that prognosis is largely dependent on the stage of the disease.

Squamous Cell Carcinoma of the lung is a type of non-small cell lung cancer. It is the second most frequent type of non-small cell lung cancer, accounting for about 30% of this category. Of all the types of lung cancer, squamous cell carcinoma has the strongest association to tobacco smoke exposure and shows a complex molecular pathology. Despite advances in the molecular understanding of the disease, only a few drugs have been developed that specifically target squamous cell carcinoma.

The development of MicroRNA in the nineties opened a new area of scientific research which cannot be summarized here due to its complexity. The short, single-stranded ribonucleic acid molecules that belong to the non-coding ribonucleic acids seem to be involved in multiple aspects of molecular regulation in the human body. The wide range of processes regulated by MicroRNA and the multidimensionality of their effect makes an understanding of their function challenging. It explains the complexity of this area of research and raises expectations for future medical applications. Many cancer types, including lung cancer, show aberrant alterations MicroRNA-expression. As the proof of integration in known molecular pathways has become established, the interest in MicroRNA as a molecular target has increased.

The purpose of this research was to establish and optimize a new method for the visualization of MicroRNA in squamous cell carcinoma of the lung for optical microscopes. The use of chromogenic in-situ hybridization would allow the morphologic detection of this molecule in tissue. Furthermore, the present study aimed to generate and qualitatively evaluate this morphologic depiction of MicroRNA expression with specific selected MicroRNA-probes.

In summary, this paper established that chromogenic in-situ hybridization makes a meaningful contribution to the understanding of MicroRNA by showing the availability and localization of MicroRNA in cancer tissue for optical microscopes. The routine use of this method before this point, for example in medical diagnostics, was not practical due to costs and uncertain results.

Analyzing the test of four MicroRNAs, which are specific for squamous cell carcinoma of the lung (MicroRNA 205-5p, 126-3p, 200b-3p, 31-3p), there were three series of experiments that showed positive results, whereas the series with MicroRNA-31-3p showed no positive results. MicroRNA 126-

3p was identified as the MicroRNA showing the most stable behavior and best sensitivity and specificity. This suggests that MicroRNA 126-3p holds the most relevance for investigations of squamous cell carcinoma of the lung.

A clear explanation for the different results obtained for the various MicroRNA-probes could not be found. Furthermore, the results did not depend on grading, age of the samples, patient gender or tumor size. It was determined that the conditions affected the results. A panel-analytic seems not to be effective at this point. This work confirmed the complexity and individuality of different MicroRNAs.

In summary, the results of this research contribute to and expand the understanding of MicroRNA and their availability and localization in the tissue of squamous cell carcinomas of the lung and clarify the relevance of different MicroRNAs for this subtype of lung cancer. In addition, new insights for the practical use of MicroRNA could were identified.

2. Einleitung

2.1 Das Lungenkarzinom

2.1.1 Epidemiologie

Das Lungenkarzinom ist nach wie vor eine sehr häufig vorkommende Krebserkrankung. Pro Jahr erkranken in Deutschland ca. 57.000 Menschen an einem Lungenkarzinom, womit es bei Männern die zweithäufigste Krebsentität nach dem Prostatakarzinom und bei Frauen die dritthäufigste Krebsentität nach dem Mammakarzinom und Darmkrebs darstellt (DKFZ, 2023). Das Durchschnittsalter der Patientinnen und Patienten liegt zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bei 69 bzw. 70 Jahren (DKFZ, 2023). Epidemiologisch zeigt sich eine Dominanz für das männliche Geschlecht bei einer Verteilung von 3 zu 1, mit Ausnahme des histologischen Subtyps des Adenokarzinoms.

Doch nicht nur das gehäufte Auftreten dieser Erkrankung lässt sie zu einer gefürchteten Diagnose werden, sondern auch ihre ungünstige Prognose, trotz großer Therapieerfolge in den letzten Jahren.

Das Lungenkarzinom führt weltweit die Liste der Krebs-Todesursachen an (Global Cancer Observatory der World Health Organization, 2022). In Deutschland findet es sich auf dem 1. Platz der Krebs-Todesursachen bei den Männern mit ca. 28.000 Verstorbenen pro Jahr und auf dem 2. Platz bei Frauen mit ca. 16.500 Verstorbenen pro Jahr (DKFZ, 2023). Die schlechte Prognose spiegelt sich in niedrigen Überlebensraten wieder. So wird die relative 5-Jahres-Überlebensrate mit 22% und 17% für Frauen bzw. Männer beziffert, die relative 10-Jahres-Überlebensrate sogar nur noch mit 16% bzw. 12% (DKFZ, 2023). Dabei zeigt sich mittlerweile ein gegenläufiges Verhalten bzgl. der Erkrankungs- und Sterberaten bei beiden Geschlechtern, welches vermutlich auf die Tatsache des veränderten Rauchverhaltens zurückgeführt werden kann (Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut, 2022).

Die initiale Symptomarmut bei gleichzeitigem Fehlen von Screening-Methoden und -Programmen trägt ihren Teil zu einer häufig erst späten Erstdiagnosestellung bei, sodass sich ein Großteil der Patientinnen und Patienten zum Diagnosezeitpunkt schon in einem fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung befindet. So weisen ca. 70% der Patientinnen und Patienten vor Behandlungsbeginn ein inoperables Tumorstadium III oder IV auf, was mit reduzierten Therapiemöglichkeiten, in der Regel im Sinne einer palliativ-systemischen Therapie und demnach auch einem schlechteren Outcome einhergeht (Savic Prince, Bubendorf, 2019).

2.1.2 Einteilung

Anhand morphologischer und biologischer Parameter erfolgt seit Jahrzehnten eine Einteilung des Lungenkarzinoms in zwei große Gruppen: das Nicht-kleinzellige Lungenkarzinom, kurz NSCLC, und das Kleinzellige Lungenkarzinom, kurz SCLC.

Das SCLC wird der Gruppe der neuroendokrinen Karzinome der Lunge zugeordnet und weist mit einer Tumorverdopplungszeit von 10-15 Tagen eine im Vergleich zum NSCLC erheblich gesteigerte Proliferation auf (Institute of Pathology Heidelberg, 2017). Resultierend daraus ergibt sich eine frühere vor allem hämatogene Metastasierungstendenz und eine konsekutiv sehr ungünstige Prognose. 12-15% der Lungenkarzinome sind SCLC (Wolf et al., 2023).

Weitere Subtypen der neuroendokrinen Tumore der Lunge sind die Karzinoide (typisch/ atypisch) und das großzellige neuroendokrine Karzinom (Institute of Pathology Heidelberg, 2017).

Der mit 85-88% weitaus häufiger vorkommende Typ der Lungenkarzinome ist das NSCLC. Die häufigsten Subtypen sind: Adenokarzinome (54%), Plattenepithelkarzinome (28%) und großzellige Karzinome (6%) (Griesinger et al., 2022). Die NSCLC sind im Vergleich zum SCLC gekennzeichnet durch eine geringere Wachstumsgeschwindigkeit, selteneres Auftreten einer hämatogenen Metastasierung zum Diagnosezeitpunkt und eine durchschnittlich bessere Prognose.

2.1.3 Klassifikationskriterien

Das Lungenkarzinom kann, wie alle anderen malignen Tumoren auch, vor allem unter prognostischen Gesichtspunkten mittels verschiedener Kriterien und Systeme genauer typisiert werden. Diese dienen prätherapeutisch zum einen zur Orientierung und zum anderen als Entscheidungshilfe bzgl. des Therapieansatzes als auch im Verlauf zur Beurteilung des Ansprechens oder des weiteren Vorgehens.

Im Folgenden werden drei wichtige Klassifikationssysteme/-Parameter vorgestellt, welche in der alltäglichen Einordnung der Lungenkarzinome ihre Verwendung.

2.1.3.1 TNM- und R-Klassifikation

Das wohl bekannteste Klassifikationssystem maligner, solider Tumoren ist die TNM-Klassifikation. Sie wurde in den Jahren 1943 bis 1952 von dem französischen Chirurg Pierre Denoix entwickelt, mit der Intention, die Stadienbestimmung maligner Tumoren allgemein gültig festzulegen. Seit 1950 findet eine regelmäßige und stetige Weiterentwicklung durch die Union internationale contre le cancer, kurz UICC, statt (Weber, 2015). Die letzte Aktualisierung erfolgte im Jahre 2017 (8. Auflage der TNM-Klassifikation).

Der Name „TNM“ leitet sich von den drei Hauptgesichtspunkten dieses Klassifikationssystems ab: „T“ für die Größe und Ausdehnung des Primärtumors, „N“ – abgeleitet vom Lateinischen *nodus lymphoideus*, zu deutsch Lymphknoten – für das Vorhandensein bzw. Fehlen regionärer Lymphknotenmetastasen und „M“ für die Beschreibung einer potenziellen Fernmetastasierung. Durch eine Bezifferung hinter dem jeweiligen Buchstaben wird eine genauere Kategorisierung der Größe des Primarius, der Zahl oder Lage befallener Lymphknoten oder dem Fehlen bzw. Vorhandensein von Fernmetastasen erreicht.

Ziele dieser Klassifizierung sind zum einen die grobe Einschätzung des Tumors prätherapeutisch sowie die Präzisierung des Tumorstadiums nach histologischer Aufarbeitung und mikroskopischer Analyse zur weiteren Therapieplanung und zum anderen die Beurteilung einer eingeleiteten Therapie hinsichtlich ihres Ansprechens.

Neben der Bezifferung kann die TNM-Klassifikation auch durch Präfixe weiter präzisiert werden in Bezug darauf, anhand welcher Methoden oder vor welchem Hintergrund die Stadienbestimmung erfolgte. Ein „c“ – für Englisch *clinical* - ist dabei Hinweis dafür, dass die Ermittlung mittels klinischer Untersuchungen oder kleinerer Eingriffe erfolgte. Die cTNM-Angabe kann damit als prätherapeutische Bestimmung angesehen werden. Im Gegensatz dazu ist die pTNM-Angabe hinweisend dafür, dass die Ermittlung mittels eines chirurgischen Eingriffes und konsekutiver histopathologischer Untersuchung erfolgte und wird daher als „pathologische“ bzw. „postoperative histopathologische“ Bestimmung bezeichnet. Ein „u“ zeigt die Ermittlung des Tumorstadiums mittels Ultraschall-gestützter Methoden und ein „a“ die im Rahmen einer Autopsie vorgenommene Bestimmung an. Findet sich ein „y“ vor der TNM-Angabe, so zeigt dies eine bereits durchgeführte Therapie, z.B. neoadjuvant, wie beispielsweise eine Radiotherapie oder Chemotherapie, an und gibt somit Rückschlüsse auf ein Therapieansprechen. Ein „r“ signalisiert, dass es sich um ein Rezidiv handelt (Pistorius, 2022).

Die für das Lungenkarzinom gängige aktuelle TNM-Klassifikation wird im Folgenden in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: TNM-Klassifikation des Lungenkarzinoms

T – Primärtumor	
TX	Primarius nicht beurteilbar oder Nachweis maligner Zellen im Sputum / bei Bronchialspülungen, Tumor jedoch weder radiologisch noch bronchoskopisch sichtbar
T0	Kein Anhalt für Primarius
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor ≤ 3 cm in größter Ausdehnung, umgeben von Lungengewebe oder viszeraler Pleura, kein bronchoskopischer Nachweis einer Infiltration proximal eines Lappenbronchus (Hauptbronchus frei) <ul style="list-style-type: none"> • T1mi: minimal invasives Adenokarzinom • T1a: Tumor ≤ 1 cm in größter Ausdehnung • T1b: Tumor > 1 cm, aber ≤ 2 cm in größter Ausdehnung • T1c: Tumor > 2 cm, aber ≤ 3 cm in größter Ausdehnung
T2	Tumor > 3 cm, aber ≤ 5 cm in größter Ausdehnung oder Tumor mit wenigstens einem der folgenden Kennzeichen: <ul style="list-style-type: none"> - Befall des Hauptbronchus, 2cm oder weiter distal der Carina ohne Carina-Befall - Infiltration der viszeralen Pleura - assoziierte Atelektase oder obstruktive Entzündung bis zum Hilus, entweder Teile oder die ganze Lunge einnehmend <ul style="list-style-type: none"> • T2a: Tumor > 3 cm, aber ≤ 4 cm in größter Ausdehnung • T2b: Tumor > 4 cm, aber ≤ 5 cm in größter Ausdehnung
T3	Tumor > 5 cm, aber ≤ 7 cm in größter Ausdehnung oder Tumor mit direkter Infiltration folgender Strukturen: Pleura parietalis, Brustwand, N. phrenicus, parietales Perikard oder Tumorknoten im selben Lappen wie Primarius
T4	Tumor jeder Größe mit Infiltration wenigstens einer der folgenden Strukturen: Zwerchfell, Mediastinum, Herz, große Gefäße, Trachea, N. laryngeus recurrens, Ösophagus, Wirbelkörper, Carina vom Primarius getrennte(r) Tumorknoten in einem anderen Lappen derselben Seite
N – Regionäre Lymphknoten	
NX	regionäre Lymphknoten nicht beurteilbar
N0	kein Befall regionärer Lymphknoten
N1	Metastase(n) in ipsilateralen peribronchialen und/oder ipsilateralen Hilus- oder intrapulmonalen Lymphknoten (inklusive des Befalls durch Ausbreitung per continuitatem)

N2	Metastase(n) in kontralateralen mediastinalen, Hilus-, ipsi- oder kontralateralen Skalenus- oder supraklavikulären Lymphknoten
M – Fernmetastasen	
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen <ul style="list-style-type: none"> • M1a: vom Primarius getrennte Metastasen in einem kontralateralen Lungenlappen; Pleura-/ Perikardmetastasen oder maligner Pleura-/ Perikarderguss • M1b: 1 extrathorakale Metastase in einem Organ (inklusive eines nichtregionären Lymphknotens) • M1c: multiple extrathorakale Metastasen in einem/ multiplen Organen

Quelle: in Anlehnung an Wittekind C., TNM-Klassifikation maligner Tumoren, 8. Aufl.

Ergänzt wird die TNM-Klassifikation durch die sogenannte R-Klassifikation, welche auch, insbesondere beim Lungenkarzinom, einen wichtigen Prognosefaktor darstellt. Die R-Angabe beschreibt dabei, ob und inwiefern nach operativer Resektion des Tumors ein Residualtumor vorhanden ist. Unterschieden werden dabei insgesamt vier Möglichkeiten (Moch et al., 2019:

- R0: kein Residualtumor vorhanden, Entfernung im gesunden Gewebe
- RX: keine Beurteilung bzgl. des Vorhandenseins eines Residualtumors möglich
- R1: mikroskopischer Nachweis eines Residualtumors
- R2: makroskopischer Nachweis eines Residualtumors.

2.1.3.2 Grading

Das histopathologische Grading dient zur Angabe des Differenzierungsgrades des Tumorgewebes, beschreibt also die Abweichung des Tumorgewebes vom Normalgewebe. Basis dieser Beschreibung stellen histologische und zytologische Kriterien dar, wie beispielsweise die Mitosezahl pro Gesichtsfeld, Kernatypien oder die Differenzierung (Moch et al., 2019). Das Grading ist neben der TNM- und R-Klassifikation ein wichtiger Parameter für die Therapieplanung und steht häufig in enger Korrelation zur Prognose.

Insgesamt können nach der UICC 5 Grading-Stufen unterschieden werden, wobei die Grade 1-3 die regulären Stufen darstellen und die Grade 4 und 9 eine Erweiterung darstellen. G1 steht dabei für eine gute Differenzierung des Tumors und signalisiert somit eine geringe Malignität. G2 weist auf eine mäßige Differenzierung und G3 auf eine schlechte Differenzierung hin. Der Grad G4 beschreibt einen anaplastischen Tumor ohne Differenzierung bzw. dessen Zuordnung zum Ursprungsgewebe nur mittels

Immunhistochemie möglich war. Mit G9 oder GX wird ausgedrückt, dass eine Beurteilung nicht möglich war (Pelaj, 2022)

Für das Lungenkarzinom und den Subtyp des Plattenepithelkarzinoms ist, gemäß S3-Leitlinie des Leitlinienprogramms Onkologie, eine Einordnung in das reguläre dreistufige G1-G3 – System vorgesehen, wobei zwischen gut differenzierten Plattenepithelkarzinomen mit deutlichen Verhornungszeichen, mittelgradig differenzierten mit geringfügigen Verhornungszeichen wie auch zentralen Nekrosen und schlecht differenzierten Plattenepithelkarzinomen differenziert wird (Bohle, Schnabel, 2016).

2.1.3.3 Stadieneinteilung

Auf Basis der TNM-Klassifikation wird zudem von der UICC eine Einteilung der Lungenkarzinome in Tumorstadien vorgenommen. Diese Einteilung ist maßgeblich richtungweisend für die Therapieplanung und wird in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Stadieneinteilung des Lungenkarzinoms

	T	N	M
Okkultes Karzinom	TX	N0	M0
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium IA	T1	N0	M0
• Stadium IA1	• T1mi; T1a	• N0	• M0
• Stadium IA2	• T1b	• N0	• M0
• Stadium IA3	• T1c	• N0	• M0
Stadium IB	T2a	N0	M0
Stadium IIA	T2b	N0	M0
Stadium IIB	T1a-c, T2a-b	N1	M0
	T3	N0	M0
Stadium IIIA	T1a-c, T2a-b	N2	M0
	T3	N1	M0
	T4	N0, N1	M0
Stadium IIIB	T1a-c, T2a-b	N3	M0
	T3, T4	N2	M0
Stadium IIIC	T3, T4	N0	M0
Stadium IV	jedes T	jedes N	M1
Stadium IVA	jedes T	jedes N	M1a-b

Stadium IVB	jedes T	jedes N	M1c
-------------	---------	---------	-----

Quelle: Wittekind C., *TNM-Klassifikation maligner Tumoren*, 8. Aufl.

Aufgrund der äußerst großen Heterogenität des Patientenkollektivs im Stadium IIIA, wird dieses durch eine weitere Subklassifikation näher unterteilt. Die Subklassifikation nach Robinson besitzt dabei therapeutische Relevanz und wird in der folgenden Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Subklassifikation des Stadiums IIIA nach Robinson

Stadium	Befund
IIIA ₁	inzidentelle Lymphknotenmetastasen in einer/ mehreren Lymphknotenstationen im Präparat nach postoperativer Aufarbeitung
IIIA ₂	intraoperativer Nachweis von Lymphknotenmetastasen in einer mediastinalen Lymphknotenstation (Schnellschnitt) und ggf. Abbruch des Eingriffs ohne Resektion
IIIA ₃	präoperativer Nachweis von Lymphknotenmetastasen in einer/ mehreren Lymphknotenstationen (PET, Mediastinoskopie, Biopsie); potenziell resektabel
IIIA ₄	ausgedehnte („bulky“) oder fixierte N2-Metastasen oder Metastasen in mehreren Lymphknotenstationen (mediastinale Lymphknoten > 2-3 cm) mit extrakapsulärer Infiltration; nicht resektabel

Quelle: in Anlehnung an Griesinger et al., *Onkopedia Leitlinien*, 2022

Grob zu unterscheiden ist dabei hinsichtlich der Therapie, dass bei den Stadien I-III_{A3} ein kurativer Therapieansatz und ab dem Stadium III_{A4} ein palliativer Ansatz verfolgt wird. Ein kurativer Ansatz besteht dabei in der Regel in einer radikalen Operation inklusive Lymphknoten-Dissektion, gegebenenfalls mit adjuvanter Radiatio der Thoraxwand und adjuvanter Chemotherapie. Der palliative Ansatz hingegen besteht meist in einer kombinierten Radiochemotherapie, alternativ mit angeschlossener Operation oder eine Induktionstherapie mit folgender Operation und Radiatio. Ab dem Stadium IV wird regelhaft eine palliative Systemtherapie eingeleitet (Herold, 2023).

2.2 Subtyp Plattenepithelkarzinom

Das Plattenepithelkarzinom ist als mittelhochmaligner Subtyp des NSCLC anzusehen (Riede et al., 2017). Seine Tumorverdopplungszeit beträgt ungefähr 300 Tage (Institute of Pathology Heidelberg, 2017), die Metastasierungstendenz ist später als beim Subtyp des Adenokarzinoms.

2.2.1 Ätiologie und Karzinogenese

Unter allen Typen des Lungenkarzinoms weist es die stärkste Assoziation zur Exposition von Zigarettenrauch auf (Riede et al., 2017). Als weitere Risikofaktoren für die Entstehung können neben dem Konsum bzw. der Exposition gegenüber Tabakrauch, auch die Exposition gegenüber verschiedenen Noxen wie Asbest, Arsen, Chrom, Beryllium, Nickel oder Radon sowie ionisierende Strahlung genannt werden. Ebenso ist eine genetische Disposition bekannt (Pelaj, 2022). So besteht ein zwei- bis dreifach erhöhtes Risiko für die Entstehung eines Karzinoms bei erkranktem Elternteil (Institute of Pathology Heidelberg, 2017).

Bei der Rauch-bedingten Karzinogenese ist häufig ein kaskadenartiger Ablauf mit prämaligen Vorläuferläsionen vorzufinden. Dabei entsteht das invasive Karzinom über die Stufen einer initialen Hyperplasie des respiratorischen Epithels, gefolgt von einer Meta- und später Dysplasien sowie schließlich dem plattenepithelialen Carcinoma in situ.

Das Plattenepithelkarzinom entwickelt sich daher vorwiegend in der Bronchialschleimhaut zentraler Haupt- und Segmentbronchien (Pelaj, 2022). Dabei findet sich häufig ein exophytisch, endobronchiales Wachstum mit konsekutiven Stenosierungen und dem klinischen Bild einer Bronchialobstruktion, sodass das Plattenepithelkarzinom eine Frühsymptomatik hervorrufen kann (Riede et al., 2017).

2.2.2 Pathologie

Makroskopisch zeigt sich das Bild eines grauweiß-markigen Tumors, welcher oftmals durch zentrale Nekrosen, Blutungen oder Kavernenbildungen gekennzeichnet ist (Riede et al., 2017).

Das endobronchiale Wachstum führt zudem zu sekundären Veränderungen, wie beispielsweise Sekretretentionen, Bronchiektasen, Atelektasen sowie Lipid-, Broncho- oder Retentionspneumonien (Institute of Pathology Heidelberg, 2017).

Histologisch präsentiert sich das Plattenepithelkarzinom als ein maligner epithelialer Tumor mit fakultativer Verhornung (z.B. im Sinne von Hornperlen) und Interzellularbrücken. Immunhistochemisch sind die „plattenepithelialen“ Marker p40, CK5, CK6 nachweisbar. In Abhängigkeit von der Tumorzelldifferenzierung finden sich wechselnd pleomorphe, hyperchromatische Nuklei mit irregulärem Chromatin (Savic Prince, Bubendorf, 2019). Zudem können unterschiedliche

Wachstumsmuster auftreten, wobei papilläre, klarzellige, kleinzellige und basaloide Varianten zu nennen wären (Institute of Pathology Heidelberg, 2017).

2.3 MicroRNA

MicroRNA, kurz miRNA, sind kleine einzelsträngige RNA-Moleküle, welche aus 19 bis 25 Nukleotiden bestehen (Lu et al., 2018). Sie werden der nicht-kodierenden RNA, genauer der regulatorischen RNA zugeordnet, zu der weiter noch die lange nicht-kodierende RNA (lncRNA) und die zirkuläre RNA (circRNA) zählen. Da sich innerhalb der einzelsträngigen miRNA komplementäre Abschnitte finden, besitzt sie die Tendenz zur intramolekularen Doppelstrangbildung, insbesondere im Sinne von Haarnadelstrukturen (Horn, 2020).

Die erste miRNA, lin-4, wurde 1993 von der Arbeitsgruppe um Ambros et al im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* als endogener Regulator für Gene zur Regulation der Entwicklungsstadien identifiziert (Lee et al., 1993). Mittlerweile sind insgesamt 1872 Vorläufer- und 2578 reife humane miRNA-Sequenzen bekannt. Zudem hat sich im Rahmen bisheriger Forschung als Eigenschaft der miRNA eine hohe Organ-, sowie Abstammungs- und Speziespezifität herausgestellt (Ranganathan, Sivasankar, 2014).

Der Hauptteil der miRNA befindet sich intrazellulär, jedoch kann sie auch extrazellulär im Rahmen von Exosomen in Serum, Plasma und Speichel vorkommen (Ranganathan, Sivasankar, 2014).

Da es sich bei der miRNA, wie bereits erwähnt, um eine nicht-kodierende RNA handelt, welche somit Steuerungsfunktionen einnimmt, ist ihre Produktion auch nicht konstitutiv, sondern abhängig von Entwicklungs- und Differenzierungsphasen sowie externen und internen Stimuli.

2.3.1 Biogenese

Die Biogenese verläuft kaskadenartig über mehrere Vorläufermoleküle und beinhaltet zwei Prozessierungsvorgänge mit der Beteiligung von Endonukleasen des RNAase-III-Typs (Horn, 2020). Insgesamt wurden mittlerweile 1000 Gene gefunden, welche für miRNA kodieren, was circa 3% des humanen Genoms entspricht. Die Genloci können dabei in verschiedenen Abschnitten der DNA vorkommen. So sind miRNA-Gene in Exons nicht-kodierender Gene, Introns kodierender und nicht-kodierender Gene sowie alleinstehend intragenisch lokalisiert (Ranganathan, Sivasankar, 2014).

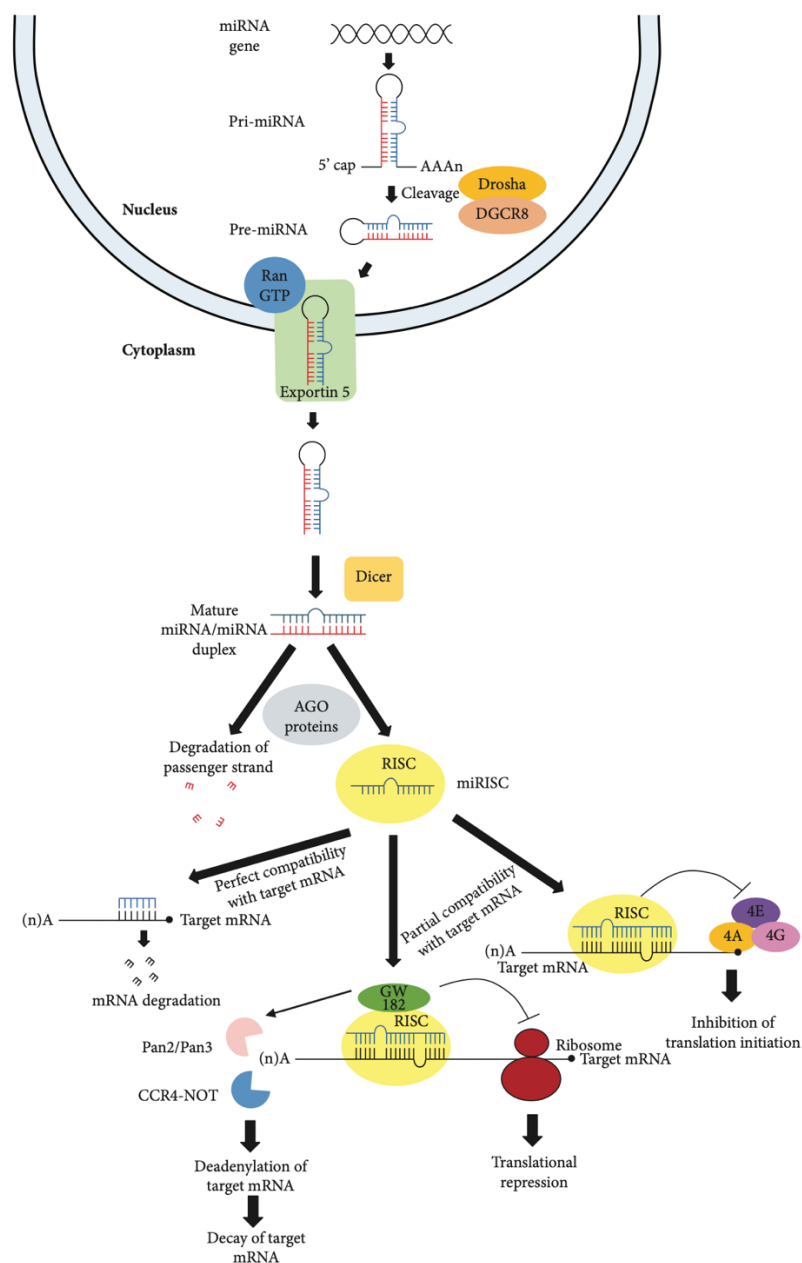
Die miRNA-Synthese beginnt im Nukleus mit der Transkription eines Primärtranskriptes, pri (primary)-miRNA genannt, welches noch über 1000 Nukleotide umfasst. Es folgt die erste Prozessierung mittels eines Mikroprozessor-Komplexes, bestehend aus der Drosha Ribonuklease III und der Protein DiGeorge Syndrome Chromosomal Region 8, kurz DGCR8, zur precursor-miRNA (pre-miRNA) mit circa 70 Nukleotiden und Haarnadelstruktur. Im Anschluss wird die pre-miRNA über eine Kernpore mittels Exportin-5 und Ran-GTP vom Nukleus ins Zytoplasma überführt, wo die zweite Prozessierung stattfindet. Bei dieser Prozessierung, welche über die Endonuklease Dicer abläuft, entsteht kurzfristig eine doppelsträngige miRNA aus ungefähr 22 Nukleotiden (Horn, 2020). Von dieser doppelsträngigen

miRNA wird ein Strang in den Multiproteinkomplex RISC – RNA-induced silencing complex – integriert und fungiert dort als Template für komplementäre mRNA. Übrig bleibt schließlich noch eine einzelsträngige miRNA mit oben genannter Länge von 19 bis 25 Nukleotiden (Wu et al., 2019).

Der besseren Veranschaulichung dienend sind die einzelnen Schritte der Biogenese in Abbildung 1 im Detail aufgeführt.

Neben dem hier aufgeführten Hauptsyntheseweg existieren weitere, alternative Pathways.

Für die Bindung an die Ziel-mRNA ist letztlich nur eine kurze, circa 7 Nukleotide umfassende, Sequenz verantwortlich, welche an ein miRNA response element – MRE – auf der Ziel-mRNA bindet (Horn, 2020). Die Bindung erfolgt dabei im Bereich der 3'-untranslatierten Region (3'-UTR) (Zhao et al., 2022).



Quelle: Lee et al., 2019

Abbildung 1: Biogenese der miRNA

Die Biogenese der MicroRNA ist ein kaskadenartiger, vielschrittiger Prozess. Über mehrere Vorläufermoleküle entsteht schließlich die mature, einzelsträngige MicroRNA mit der typischen Länge von 19 bis 25 Nukleotiden. Der Grad der Beeinflussung zur Regulation der mRNA ist schließlich von der Kompatibilität zwischen MicroRNA-Sequenz und mRNA-Sequenz abhängig.

2.3.2 Funktion

Physiologisch ist die miRNA in viele verschiedene biologische Prozessen involviert, u.a. in die Genregulation, Apoptose oder hämatopoetischen Entwicklung (Wu et al., 2019). Daher ist es nicht verwunderlich, dass eine dysregulierte miRNA-Expression in vielen Krebsentitäten, beispielsweise dem Lungen-, Mamma- oder Kolonkarzinom, nachgewiesen werden konnte und ihren Teil zur Karzinogenese beiträgt (Wang et al., 2015). So wurde beispielsweise eine Beteiligung der miRNA in der Steuerung des Tumor Microenvironment, kurz TME, erkannt, wobei die miRNA verschiedene stromale Zellen reguliert und auch eine regulatorische Rolle auf die Interaktion von Tumor- und Stromazellen ausübt (Wu et al., 2019). Es findet sich jedoch auch außerhalb der Karzinogenese eine Beteiligung in pathologischen Prozessen, beispielsweise wären hier Autoimmunerkrankungen und Virusinfektionen zu nennen (Ranganathan, Sivasankar, 2014).

Die molekulare Funktion der miRNA besteht dabei grundsätzlich in der post-transkriptionalen Regulation der Gen-Expression, insbesondere im Gen-Silencing, wobei eine miRNA mehrere hundert Ziel-mRNAs beeinflussen kann (Lu et al., 2018) und zum Teil auch mehrere miRNAs auf die Expression einer mRNA einwirken. Dabei steht vor allem die Inhibition der mRNA-Translation sowie die Förderung der mRNA-Degradation im Vordergrund (Wu et al., 2019). Für diese negative Regulation stehen zwei mögliche Varianten zur Verfügung, welche vom Maß der Komplementarität zur Ziel-mRNA abhängen. Besteht eine mäßige Komplementarität, so führt dies zur Verlangsamung der Translation, wohingegen bei hoher Komplementarität die Ziel-mRNA abgebaut wird und somit die Translation gänzlich verhindert wird (Horn, 2020).

2.4 Zielsetzung

Der ursprüngliche Gedanke, die MicroRNA sei ein evolutionärer Zelldebris ohne Funktion ist seit längerer Zeit überholt. Mittlerweile steht die Erforschung der MicroRNA hinsichtlich ihrer multiplen Funktionen und Beteiligungen in physiologische, wie auch pathologische Prozesse im Vordergrund. Von großem Interesse ist dabei insbesondere die Funktion der MicroRNA im Rahmen der Karzinogenese und deren Beitrag zum Progress bzw. der Metastasierung.

Das Lungenkarzinom repräsentiert nach wie vor eine Krebsentität mit äußerst schlechter Prognose, wobei ein gleichzeitiges Fehlen von konsequenten Vorsorge- und Screening-Programmen zu vermerken ist. Neben einer frühen Entdeckung des Karzinoms, welche die Prognose verbessert, haben sich in den letzten Jahren deutliche Fortschritte bezüglich der Therapieoptionen im Sinne der zielgerichteten Krebstherapie – targeted therapy – aufgetan. Diese Ansätze kommen jedoch meist erst in späterer Instanz zu tragen.

Im Rahmen der Forschung an der MicroRNA konnten vielseitige Beteiligungen derer in Bezug auf das Lungenkarzinom nachgewiesen werden, wobei die Einwirkung der MicroRNA von der Tumorsuppression bis hin zur Förderung der Metastasierung reicht. In diesem Zusammenhang sind Forschungsansätze mit zirkulierender MicroRNA in humanen Sekreten, wie beispielsweise Blutplasma oder -serum, von Ansätzen, welche sich mit der MicroRNA im Gewebe- bzw. Zellverband beschäftigen, zu unterscheiden. Die Untersuchung zirkulierender MicroRNA kann dabei beispielsweise für die Differentialdiagnostik zwischen Infektionserkrankungen und Lungenkarzinomen hilfreich sein (Ashirbekov et al., 2024) oder auch als nicht-invasives Tool Biomarker zur Verfügung stellen (Abdipourbozorgbaghi et al., 2024). Daher stellt die MicroRNA ein interessantes und vielseitiges Forschungsobjekt dar, deren genaue Bedeutung für die Zukunft allerdings noch ungewiss scheint und Gedanken in vielerlei Richtungen, von einer Früherkennung über Diagnostik bis hin zur Therapie, zulässt.

Hinsichtlich der oben genannten Aspekte soll diese Arbeit nun genau an der Schnittstelle von der (Molekular-) Pathologie zur angewandten Klinik ansetzen. Das übergeordnete Ziel dieses experimentellen Projektes ist dabei die zelltyp-spezifische Visualisierung durch Etablierung der chromogenen in-situ-Hybridisierung, kurz CISH, von MicroRNA in komplexen Gewebeproben von Plattenepithelkarzinomen der Lunge. Hierbei soll der Schritt vom Nachweis der MicroRNA im Gewebehomogenat mittels Polymerase-Kettenreaktion auf molekularer Ebene, hin zur visuellen Darstellung des Vorhandenseins und der Lokalisation der MicroRNA im Tumorgewebe geschafft werden, um damit das Verständnis für die MicroRNA auf eine bildgebende, morphomolekulare, mitunter leichter begreifliche, Ebene zu bringen.

Des Weiteren soll versucht werden, in Grundzügen eine histo-morphologische Darstellung des molekularen MicroRNA-Expressionsprofils im Plattenepithelkarzinom der Lunge, auf Ebene der Lichtmikroskopie, anhand verschiedener, ausgewählter MicroRNAs zu generieren

Mit der Etablierung dieses Nachweisverfahrens soll ein weiterer Grundstein auf dem Weg vom Pathologen zum Kliniker gelegt werden, so dass neue Erkenntnisse bezüglich des praktischen Umgangs mit MicroRNA und deren Eignung für die Diagnostik wie auch Therapie erwartet werden.

3. Material und Methodik

3.1 Materialien

3.1.1 Apparaturen

Analysenwaage	BP 110S, Sartorius, Göttingen, Deutschland
Durchlichtmikroskope	Axioskop 40, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland Olympus, BH-2, Olympus Lifescience, Tokyo, Japan
Färbeautomat	Linear Stainer COT 20, MEDITE Medical GmbH, Burgdorf, Deutschland
Gefrierschrank	Liebherr Premium, frost-free, Liebherr-International S.A., Bulle, Schweiz
Gewebeeinbettungsautomat	Tissue-Tek®, VIP®, Sakura Finetek Germany GmbH, Heppenheim, Deutschland
Glaseindeckautomat (vollautomatisch)	Leica CV5030, Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland
Hybridisierer	Hybridizer, DakoCytomation A/S, Glostrup, Dänemark
Thermo-Inkubationsschüttler	Thriller®, PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Kühlplatte	Para Cooler Blue, Weinkauf Medizintechnik und Umwelttechnik, Hallerndorf, Deutschland
Kühlschrank	Liebherr Premium, frost-free,

	Liebherr-International S.A., Bulle, Schweiz
Manual Tissue Arrayer	MTA-1, Estigen OÜ, Tartu, Estland
Mikroskopkamera	AxioCam MRc5, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland Software: ZEN3.2. blue edition
Mikrozentrifuge	Mini Star, VWR ®, Radnor, USA
Paraffinausgießkonsole	Tissue-Tek®, TEC™ 6, Sakura Finetek Germany GmbH, Heppenheim, Deutschland
Pipetten	Eppendorf Research ® Plus, Hamburg, Deutschland
Rotationsmikrotom	Rotary 3003, pfm medical, Köln, Deutschland
Vortex-Schüttler	peqTWIST, PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Wärmeschränk	Memmert. Typ UNB 200, Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Wasserbad	VWB2 12, VWR ®, Radnor, USA
Wasserbad für Paraffinschnitte	Leica HI 1210, Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Deckgläser	24 x 32mm, Glasdicke: 0,13 – 0,16mm, R. Langenbrink GmbH Labor- und Medizintechnik, Emmendingen, Deutschland
Einbettkassetten	Einbettkassetten Standard gelb, Engelbrecht Medizin- & Labortechnik, Edermünde, Deutschland
Einweghandschuhe	Vasco ® Nitril blue, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Klebstoff	Fixogum, Marabu GmbH & Co. KG, Tamm, Deutschland
Mikroreaktionsgefäße	Safe Seal 2ml, LOT 2081021, REF 72.695.500, Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland Safe Seal 1,5ml, LOT 1083921, REF 72.706, Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Objektträger	Super Frost Plus, LOT 0113229, REF J1800ARLX, R. Langenbrinck GmbH Labor- und Medizintechnik, Emmendingen, Deutschland
Pipettenspitzen (0,1-10; 100; 200; 50-1250 µl)	Sorenson Bioscience, Salt Lake City, Utah, USA Axon Labortechnik, Kaiserslautern, Deutschland Biosphere®, Nümbrecht, Deutschland
Präzisionstücher	Light-Duty Tissue Wipes, 11,4 x 21,0 cm, VWR®, Radnor, USA Kimtech-Science Präzisionstücher, 11 x 21 cm Kimberly-Clark Professional, Dallas, USA
Reagenzröhren	Schraubröhre 30ml, LOT 3042601, REF 62.543.001,

Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland

3.1.3 Substanzen

Alkohole	Ethanol (Ethylalkohol), vergällt mit MEK/ IPA/ Bitrex, mind. 99% Vol., EG-Nr. 200-578-6, UN-Nr. 1170, SAV Liquid Production GmbH, Flintsbach a. Inn, Deutschland; bei 90%-, 80%, 70% und 50%- Alkoholen Verdünnung mit entsprechenden Mengen Aqua dest.
Anti-Digoxigenin-Antikörper	Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments, vom Schaf, LOT 54732420, REF 11093274910, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
BSA	Albumin, Fraction V, fatty acid free, LOT 70185920, REF 10 775 835 001, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Eindeckmedium	Entellan®, LOT HX01729061, E. Merck, Darmstadt, Deutschland
Eosin	Eosin G-Lösung, 0,5%, wässrig, LOT HX17224144, REF 1.09844.1000, Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure	Eisessig, p.a., 100%, LOT K53269363113, Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
EDTA	0,5M, sterile solution, LOT 22B0456653, VWR Chemicals LLC, Solon, USA

Formaldehyd-Lösung	4%, neutral gepuffert, mit Methanol stabilisiert, LOT 6333012, Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken, Deutschland
Hämatoxylin	Haemalaun-Lsg., sauer, nach Mayer, LOT 22996, REF 2E-038, Waldeck GmbH & Co. KG, Münster, Deutschland
Kaliumchlorid	≥ 99,5%, p.a., E. Merck, Darmstadt, Deutschland
Levamisol-Hydrochlorid	Vetranal™, analytical standard, LOT SZBA109XV, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumchlorid	≥ 99,5%, p.a., ACS, ISO, LOT 099103906, Carl Roth GmbH & CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
NBT/BCIP Stock Solution	LOT 60011320, REF 11681451001, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Oberflächenreiniger	RNase AWAY™ Surface Decontaminant, LOT 15021875, Molecular Bio Products Inc., San Diego, USA
Paraffin	56/58°C, Engelbrecht, Edermünde, Deutschland
PBS	1x, PBS Ultra Pure, powdered, Cat. -Nr. 0780-2PK, VWR®, Radnor, USA
Polysorbat 20	Tween®20, LOT S8232384222, Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

RNase-freies Wasser	Wasser DEPC-behandelt, steril, Nuklease-frei, autoklaviert, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure Alkohol	1%/ 70%, LOT 40430-17, REF 10372.00500, UN-Nr. 2924, Morphisto GmbH, Offenbach, Deutschland
Schaf-Serum	Normal Sheep Serum, Cat. -Nr. 013-000-121, Jackson ImmunoResearch Europe Ltd, Cambridge, UK
SSC-Puffer	20x, RNase-frei, LOT P311505, Thermo Fisher Scientific, Ward Hill, USA; bei 5-facher, 1-facher und 0,2-facher Verdünnung wurde mit entsprechenden Mengen RNase-freien Wassers verdünnt
Tris	≥ 99,9%, LOT 2K011763, PanReac AppliChem ITW Reagents, Darmstadt, Deutschland
Tris-HCl	0,5M, pH 7,4, LOT N26H518, Thermo Fisher (Kandel) GmbH, Kandel, Deutschland
Xylol	p.a., UN-Nr. 1307, Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken, Deutschland

3.1.4 Kits

miRNA ISH Buffer Set (FFPE)	miRCURY® LNA® miRNA ISH Buffer Set (FFPE), Qiagen, Hilden, Deutschland
miRNA ISH Optimization Kit (FFPE)	miRCURY® LNA® miRNA ISH Optimization Kit (FFPE) 8, Qiagen, Hilden, Deutschland

3.1.5 MicroRNA-Sonden

HSA-MIR-31-3p	miRCURY LNA™ miRNA Detection Probe, LOT 500854448, Qiagen, Hilden, Deutschland
HSA-MIR-126-3p	miRCURY LNA™ miRNA Detection Probe, LOT 509237758, Qiagen, Hilden, Deutschland
HSA-MIR-200b-3p	miRCURY LNA™ miRNA Detection Probe, LOT 520267174, Qiagen, Hilden, Deutschland

3.1.6 Gewebeproben

Bei dem Material der ausgewählten Lungenkarzinome handelt es sich um Formalin-fixiertes und Paraffin-eingebettetes Überschussgewebe, kurz FFPE. Die dazugehörigen HE- und zum Teil immunhistochemisch gefärbten Gewebeschnitte wurden unter Verwendung der herkömmlichen Lichtmikroskopie von Herrn Prof. Dr. med. R. M. Bohle und mir erneut beurteilt, mit dem Ziel, für die Anfertigung der manuellen Tissue Micro Arrays (TMA) geeignete Tumorareale auszuwählen und zu markieren. Dabei wurden jeweils drei geeignete Stanzareale angezeichnet, welche möglichst viel intaktes Tumorgewebe enthalten sollten. Diese drei Areale konnten dabei entweder auf einen oder mehrere Gewebeschnitte des jeweiligen Falles verteilt sein. Hintergrund der Entscheidung für die Anfertigung von Tripletts war, unerwünschte Ereignisse, zum Beispiel im Sinne von mechanischen Schäden oder dem Abschwimmen der Proben abzufangen, sowie die Auswirkungen möglicher Zellschäden durch den vorangegangenen Fixierungsprozess auf die Auswertung der in-situ-Hybridisierung zu kompensieren, indem genug Material aus möglichst verschiedenen Tumorarealen vorhanden ist. Zudem sollte durch die Verwendung der Tripletts ein möglichst authentisches Bild des jeweiligen Tumors wiedergegeben werden.

Im Rahmen dieses Auswahlprozesses kam es durch verschiedene Gegebenheiten zu Drop-Outs. Hierbei sei unter anderem das Fehlen der entsprechenden FFPE-Blöcke genannt, welches beispielsweise durch den Einschluss des Materials in andere Studien zustande kam. Des Weiteren mussten auch einige Fälle aufgrund einer zu geringen bzw. zu disseminierten Tumorlast in den vorliegenden Proben ausgeschlossen werden. Ein weiterer Grund für das Ausscheiden der Proben war eine zu starke Durchsetzung des Tumorgewebes durch beispielsweise nekrotische Areale oder lymphozytäre Infiltrationen, welche die Anfertigung der manuellen Tissue Micro Arrays bzw. die weitere Verwendung einzelner Gewebeschnitte davon erschwerten. Zudem musste eine Mindestdicke des Patientenblockes von über 1mm vorhanden sein, um eine entsprechende Stanze anfertigen zu können.

3.2 Methoden

3.2.1 Definition des Kollektivs

Als Basis zur Rekrutierung des hier vorliegenden Patientenkollektivs dienten Lungenkarzinome der Jahre 2015 bis 2021, welche in der Herz-Thorax-Chirurgie des Universitätsklinikums des Saarlandes operiert und dem Institut für Allgemeine und Spezielle Pathologie des Universitätsklinikums des Saarlandes übersendet wurden sowie das Kollektiv der vorangegangenen Dissertation von Herrn Dr. med. Johannes Hohneck (Institut für Allgemeine und Spezielle Pathologie des Universitätsklinikums des Saarlandes), welches die Jahre 2010 bis 2015 umfasst. Dabei wurde ein Stichprobenumfang von mindestens 100 Teilnehmern angestrebt, welcher mit letztlich 114 Teilnehmern auch erreicht wurde. Die Auswahl der Probanden wurde anhand der nun im Folgenden erläuterten Ein- und Ausschlusskriterien getroffen.

Eingeschlossen wurden Patienten mit einem histologisch gesicherten Plattenepithelkarzinom der Lunge, deren Resektate dem Institut für Allgemeine und Spezielle Pathologie des Universitätsklinikums des Saarlandes (UKS) vorlagen. Berücksichtigt wurden dabei Diagnosestellungen im Zeitraum von 2010 bis 2021, welche sich auf die zwei o.g. Ausgangspunkte aufteilen. Ein weiteres Einschlusskriterium war, dass jeweils pulmonale Primärtumoren vorlagen.

Ausgeschlossen wurden Patienten, die neoadjuvant therapiert wurden. Des Weiteren führte das Vorliegen eines extrapulmonalen und/ oder nodalen Primarius zum Ausschluss. Patienten, deren Tumormaterial ausschließlich als (stanz-) bioptisch gesichertes Material vorlag, wurden von der Untersuchung ausgeschlossen.

Aufgrund der Aktualisierung der TNM-Klassifikation im Jahre 2017 wurden alle TNM-Stadien der älteren Proben an die neue Klassifikation, 8. Auflage, angepasst.

Zum Schutz der Patientendaten wurden alle Fallnummern pseudoanonymisiert und mit neuen Nummern versehen.

3.2.2 Aufarbeitung, Fixierung und Einbettung der Gewebeproben

Nach operativer Entnahme der Tumor-Resektate werden diese zunächst in 4%-iger, neutral gepufferter Formaldehyd-Lösung bei Raumtemperatur fixiert. Abhängig von der Größe und Struktur der Gewebeproben wird die Dauer der Formalin-Fixierung angepasst werden. Anschließend findet eine Vermessung dieser statt, zudem wird eine Beschreibung in Bezug auf die Beschaffenheit sowie Lokalisation des Tumors angefertigt. Es folgt der Zuschnitt der Gewebeproben mit anschließender Verteilung in Einbettkassetten für die spätere Paraffineinbettung und Spülung mit Aqua dest..

Die Fixierung erfolgt zum Erhalt der Gewebe- und Zellmorphologie sowie zur Unterbindung von Autolyse-Prozessen, wie auch zur Hemmung des Wachstums von Mikroorganismen, im Sinne von Schimmelpilzen oder Fäulnisbakterien. Zudem wird durch die Formaldehyd-Lösung eine zusätzliche Festigung und Härtung der Proben erzielt, indem es zur Reaktion mit basischen Aminosäuren des Gewebes, unter Ausbildung quervernetzender Hydroxymethylenbrücken, kommt. Dadurch können die Gewebeproben für die weitere Verarbeitung und Färbung vor mechanischen Schäden geschützt werden und das Aufschneiden der Blöcke kann gewährleistet werden.

Nach erfolgter Fixierung des Probenmaterials in Formalin schließt sich nun die Einbettung in Paraffin an. Dazu müssen die fixierten Gewebeproben entwässert werden, indem sukzessiv eine Alkoholreihe mit ansteigender Konzentration durchlaufen wird. Hierdurch wird, abgesehen von der Härtung des Gewebes infolge der Entwässerung, auch ein Freisetzen von Lipiden bewirkt. Im Anschluss erfolgt nun die Überführung der Proben über einen Zwischenschritt im Xylol in heißes Paraffin (circa 55-58°C), wobei das Xylol benötigt wird, um den Alkohol aus dem Gewebe herauszuwaschen.

Das bis hier beschriebene Procedere der Fixierung und Entwässerung wird dabei von einem programmierbaren Gewebereinbettungsautomat vollautomatisch übernommen. Das dabei durchlaufene Protokoll wird im Folgenden kurz skizziert.

Protokoll zur Formalin-Nachfixierung bzw. Entwässerung/ Paraffin-Einbettung mittels Einbettungsautomat:

	Substanz	Dauer
(1)	Formalin, 4% neutral gepuffert	1,3 Stunden
(2)	Ethanol, 50%	1,05 Stunden
(3)	Ethanol, 70%	1,05 Stunden
(4)	Ethanol, 80%	1,05 Stunden
(5)	Ethanol, 100%	1,05 Stunden
(6)	Ethanol, 100%	1,05 Stunden
(7)	Ethanol, 100%	1,05 Stunden
(8)	Xylol	55 Minuten
(9)	Xylol	55 Minuten
(10)	Xylol	2 Stunden
(11)	Paraffin	1 Stunde
(12)	Paraffin	1,2 Stunden
(13)	Paraffin	1,2 Stunden

Nach Beendigung des mehrstündigen Programmes zur Paraffin-Einbettung, kann nun die Ausblockung der Proben an einer Paraffinausgießkonsole erfolgen. Dazu müssen zunächst die Gewebeproben aus der Einbettkassette in eine Gießschale gebracht werden, was auf der zur Ausgießstation zugehörigen Wärmeplatte stattfindet. Zunächst wird ein wenig Paraffin in die Gießschale gegeben, anschließend die Gießform von der Wärmeplatte entfernt und die Gewebeprobe vorsichtig an den Boden der Schale angedrückt. Infolge des Wärmeentzugs erhärtet das Paraffin und die Probe haftet. Im Anschluss wird die Gießschale vollständig mit heißem Paraffin befüllt, die eingangs entfernte Einbettkassette erneut aufgesetzt und sanft angedrückt, sodass die Einbettkassette nun als Blockträger des Paraffinblockes fungiert. Zur endgültigen Aushärtung werden die Blöcke mit der Gießform auf eine Kühlplatte gelegt, welche nach dem fertigen Erkalten abgelöst werden kann. Nun sind die Paraffinblöcke fertig zur weiteren Verarbeitung und zum Schneiden der histologischen Präparate.

3.2.3 Anfertigung des Empfängerblockes aus Paraffin

Bevor mittels des Tissue Micro Arrayer die Gewebeareale, entsprechend der markierten HE-Schnitten als Matrize aus den Originalblöcken ausgestanzt und in einen neuen Paraffinblock eingesetzt werden können, muss zunächst ein Leerblock aus Paraffin, der sogenannte Empfänger- oder „recipient“-Block, hergestellt werden.

Die Herstellung findet an der oben aufgeführten Paraffinausgießkonsole statt. Als Grundlage für die Herstellung des Leerblockes dient eine Gießform mit einer Tiefe von 5-10mm, welche je nach Wunsch und Probenanzahl ausgewählt wird. Als Blockträger des neuen Empfängerblockes dient eine Kunststoff-Einbettkassette. Diese kann entweder vor oder nach dem Eingießen des, bei circa 55-58°C geschmolzenen, Paraffins auf die Gießform gelegt werden. Nach Befüllen der Gießform und Aufbringen der Einbettkassette muss der Leerblock für mindestens 24 Stunden bei Raumtemperatur aushärten. Sollten sichtbare Luftblasen erkennbar sein, so ist der Empfängerblock zu verwerfen. Mögliche kleinere Unreinheiten können durch das Anschneiden des Blockes am Rotationsmikrotom entfernt werden.

3.2.4 Herstellung des Array Blockes

Zu Beginn der Herstellung des Array Blockes steht das Design des Arrays. Dabei sind zum einen die Probenzahl-Planung und zum anderen die Anordnung der Proben zu beachten.

Insgesamt können maximal 100 Proben pro Array Block für ein optimales Ergebnis aufgebracht werden, um genügend Abstand zwischen den einzelnen Proben zu gewährleisten. In dieser Arbeit wurden pro Array Block maximal 69 Stanzen mit einem Durchmesser von jeweils 0,6 mm eingesetzt. Eine höhere Probenanzahl erschwert aufgrund der Verdichtung der Stanzen zudem die Herstellung eines möglichst homogenen Array Blockes und die Orientierung im Rahmen der Auswertung.

Bezüglich der Anordnung der Proben sollte im Vorhinein eine Tabelle erstellt werden, welche die Lokalisation der jeweiligen Patientenprobe angibt. Dabei ist eine wechselnde Probenanzahl pro Reihe des Array Blockes zur Kontrolle und zu Orientierungszwecken im Rahmen der mikroskopischen Auswertung zu empfehlen. Auf der x-Achse wurden daher 6-8 Stanzeinheiten genutzt, auf der y-Achse 6-9 Einheiten. Die Einheiten der x-Achse wurden dabei alphabetisch mit Buchstaben von A bis I und die der y-Achse mit arabischen Ziffern von 1-9 versehen. Somit kann jeder Stanzeinheit eine Koordinate zugeordnet werden, hinter welcher sich wiederum eine genaue Kodierung mit Fallnummer und verwendetem Gewebematerial verbirgt. Bezugnehmend auf die Verwendung der Proben-Triplets, ist zu sagen, dass pro Zeile des Array Blockes nur eine Probe jedes Patienten eingesetzt und nicht das gesamte Triplet hintereinander angeordnet wurde, um sich dahingehend abzusichern, dass im Falle des Verlustes, z.B. durch „Abschwimmen“ einer ganzen Reihe, die weiteren Stanzen des Falles trotzdem in die Auswertung der Arbeit einbezogen werden können und ein kompletter Drop-Out vermieden werden kann (siehe Abbildung 2).

Die einzelnen Array Blöcke wurden entsprechend der pT-Stadien bestückt, sodass sich folgende Aufteilung der Blöcke ergab:

- pT1: 1 TMA-Block
- pT2: 2 TMA-Blöcke
- pT3: 2 TMA-Blöcke
- pT4: 1 TMA-Block

TISSUE MICROARRAY

Block-Nr.: pT1- TMA

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1	A1 Patient 1 – Probe 1	B1 Patient 2 – Probe 1	...						
2									
3									
4	A4 Patient 1 – Probe 2	B4 Patient 2 – Probe 2	...						
5									
6									
7	A7 Patient 1 – Probe 3	B7 Patient 2 – Probe 3	...						
8									
9									

Abbildung 2: Beispiel für die TMA-Planung

Für die Planung der TMA-Blöcke wird zunächst für jeden geplanten Array Block eine Tabelle angelegt, in welcher die genaue Anordnung und Anzahl der Proben pro Block festgehalten ist. Anhand

dieser Tabelle wird später der Array Block in identischer Anordnung mit Stanzkernen bestückt, sodass die Tabelle im Rahmen der anschließenden mikroskopischen Auswertung zur Orientierung und Zuordnung der einzelnen Stanzen verwendet werden kann.

Zum Rand des Leerblockes sollten jeweils 3-4mm Abstand eingehalten werden, um Rissbildungen während des Stanzvorganges zu vermeiden.

Die Entnahmepositionen der einzelnen Stanzen aus dem Originalblock wurden zuvor, wie bereits oben erwähnt, mithilfe eines, möglichst aktuellen, HE-Schnittes markiert.

Ist die Planung der Probenanzahl und deren Anordnung abgeschlossen, so kann die eigentliche Herstellung des manuellen Tissue Micro Arrays erfolgen. Dazu wird der frisch hergestellte Empfängerblock in die dafür vorgesehene Halterung am Tissue Micro Arrayer eingeschraubt, wobei darauf zu achten ist, dass die Blockoberfläche parallel zur Arbeitsplatte ausgerichtet und der Empfängerblock an die vertikale sowie horizontale Führungsschiene angeschoben ist. Zum Einbringen der Stanzen auf die gewünschte Position sollte eine Einstichtiefe bis circa 0,5-1mm oberhalb der Einbettkassette gewählt werden.

Für das Ausstanzen des Gewebes aus dem Originalblock des Patienten und das Einbringen in den neuen Leerblock werden nun zwei Stanzköpfe mit unterschiedlichen Durchmessern benötigt. Dabei dient der Stanzkopf mit dem kleineren Durchmesser dazu, ein leeres Loch im Empfängerblock anzulegen. Ist dieses Loch angelegt, so kann eine Arbeitsbrücke über dem Blockhalter positioniert werden und mittels des Schwingkopfes der Stanzkopf zum größeren Durchmesser hin gewechselt werden. Dieser größere Stanzkopf wird dazu verwendet, die eigentliche Gewebestanze aus dem Originalblock zu entnehmen. Dazu wird der Spenderblock mittels der angezeichneten HE-Matrize in Position gebracht. Ist die gewünschte Position gefunden, kann der HE-Schnitt wieder entfernt und die Stanze entnommen werden. Im Anschluss wird die Arbeitsbrücke über dem Empfängerblock wieder entfernt und der Stanzkopf, welcher nun den Stanzkern aus der Gewebeprobe enthält, 0,5-1mm über dem zuvor angelegten Loch ausgerichtet. Mit der Betätigung des Ausdruckstempels wird der Stanzkern nun in das Loch überführt. Zur erneuten Kontrolle der richtigen Entnahmeposition nach der Stanzentnahme kann nochmals der HE-Schnitt zur Hand genommen werden.

Im Folgenden kann die nächste Stanz-Position im Empfängerblock mittels des Mikrometers eingestellt und das beschriebene Procedere wiederholt werden, bis alle geplanten Stanzkerne eingefügt wurden.

3.2.5 Vorbereitung des Array Blockes für die Anfertigung der Paraffinschnitte

Nachdem die Tissue Micro Array-Blöcke hergestellt wurden, müssen sie vor Anfertigung der ersten Paraffinschnitte einmalig eine Vorbereitung durchlaufen, um zu gewährleisten, dass sich die eingesetzten Gewebeproben, in Form von 1x1 mm runden Stanzen, mit dem Paraffin verbinden und

somit auch beim Schneidevorgang möglichst keine Gewebebrüche entstehen oder gar ganze Stenzen ausbrechen.

Dazu wird eingangs der Wärmeschrank auf eine Temperatur von 45-48°C eingestellt. Der zuvor angefertigte Array Block wird aus dem Halter des Tissue Micro Arrayer entnommen und für circa 10 Minuten in den vorgeheizten Wärmeschrank gelegt. Anschließend wird der Block auf einen Objektträger umgedreht und nun erneut für 20 Minuten angewärmt. Die genaue Dauer muss dabei individuell, abhängig von der Dicke und Beschaffenheit des Array Blockes, abgestimmt werden.

Im Anschluss an die zweite Erwärmung wird der Block mitsamt dem Objektträger dem Wärmeschrank entnommen. Um die Gewebestenzen alle auf die gleiche Höhe zu bringen, muss dann vorsichtig ein gleichmäßiger Druck auf den Objektträger ausgeübt werden.

Zwischenzeitlich wird ein weiterer Objektträger im Wärmeschrank bei 60-70°C angewärmt und anschließend auf den am Block befindlichen Objektträger gelegt, sodass das Paraffin unter dem befestigten Objektträger anschmelzen kann und mit den Stenzen eine möglichst glatte Oberfläche bildet. Ist dies geschehen, kann der zweite Objektträger entfernt werden und der Array Block mit dem befestigten Objektträger auf eine Kühlplatte bei -10 bis -15°C gelegt werden, bis sich der Block schließlich selbstständig vom Objektträger löst.

Im Anschluss daran ist der Array Block für die weitere Verarbeitung und Schneidevorgänge bereit, der fertige Array Block wird bei Raumtemperatur gelagert.

3.2.6 Anfertigung von Schnitten des Array Blockes

Die Anfertigung der Paraffinschnitte für die In-situ-Hybridisierung erfolgt am oben aufgeführten Rotationsmikrotom. Um der Zersetzung der miRNA, im Sinne der hydrolytischen Spaltung durch Ribonukleasen, vorzubeugen, sollte eine Kontamination des Arbeitsplatzes rund um das Rotationsmikrotom mit Ribonukleasen verhindert werden. Dazu wird der gesamte Arbeitsplatz, inklusive des Rotationsmikrotoms, vor jedem Schneidevorgang mit dem Oberflächenreiniger RNase Away® gereinigt. Des Weiteren wird darauf geachtet, dass es sich auch bei dem im Wasserbad befindlichen Wasser um RNase-freies Wasser handelt.

Um die Schnittfähigkeit des Array Blockes zu verbessern, wird dieser initial auf einer Kühlplatte bei -10 bis -15°C für circa 10-15 Minuten heruntergekühlt. Im Anschluss kann der eigentliche Schneidevorgang am Rotationsmikrotom erfolgen. Die Schnittdicke wird dabei auf 4 µm eingestellt, um möglichst gute Bedingungen bzgl. der Zell- und Gewebemorphologie für die weitere Verarbeitung und Auswertung zu gewährleisten. Die frischen Schnitte werden dann vorsichtig in ein Wasserbad für Paraffinschnitte gegeben. Dieses ist auf 50°C vorgewärmt und sorgt dafür, dass sich die Paraffinschnitte strecken und potenzielle Falten, Knicke oder gar kleine Risse vom Schneidevorgang geglättet werden. Sobald sich die Schnitte im Wasserbad geglättet haben, können sie auf die Super Frost Objektträger

aufgezogen werden. Dabei muss darauf geachtet werden, dass die verwendeten Objektträger stets staub- und fettfrei sind. Die verwendeten Super Frost Adhäsionsobjektträger sind mit einer langanhaltenden, positiven Ladung beschichtet, sodass die Gewebeschnitte durch elektrostatische Anziehungskräfte besser am Objektträger haften. Dadurch soll ein mechanisch-bedingtes Abschwimmen des Gewebes im Rahmen der folgenden in-situ-Hybridisierung möglichst verhindert werden.

Die fertig aufgezogenen Schnitte werden dann zunächst für eine Stunde bei Raumtemperatur und zum Schluss über Nacht bei 37°C im Wärmeschrank getrocknet. Dieser sollte dafür auch dekontaminiert werden, um die eingangs erwähnte Hydrolyse durch RNasen zu vermeiden.

Die Paraffinschnitte wurden stets einen Tag vor der geplanten in-situ-Hybridisierung frisch angefertigt.

3.2.7 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung ist nach wie vor eine Standardfärbung der Histologie zur Darstellung von Zellkernen und Zytoplasma. Sie fungiert als Übersichtsfärbung, um einen ersten Einblick in die Zell- und Gewebestrukturen zu gewinnen sowie zur Darstellung einer Vielzahl pathologischer Veränderungen.

Zu Beginn des Färbeprotokolls findet eine Entparaffinierung der Objektträger statt, indem die Paraffinschnitte eine Xylol-Reihe durchlaufen. Dies ist nötig, da verbleibendes Paraffin die Bindung der Farbstoffe an die Gewebekomponenten behindert und somit eine unregelmäßige Färbung resultieren würde. An die Xylol-Reihe schließt sich eine Alkohol-Reihe an, welche der Dehydratisierung des Gewebes dient.

Der eigentliche Färbeprozess beginnt dann mit dem Naturfarbstoff Hämatoxylin, welcher aus dem Blauholzbaum, *Haematoxylum campechianum*, gewonnen wird. Die färbende Wirkung ist dabei auf das Oxidationsprodukt des Hämatoxylins, das Hämatein, zurückzuführen. Dieses liegt als Komplexverbindung mit Metallionen vor, welche als sogenannte Alaunen in der Färbelösung vorhanden sind. Die hier verwendete Färbelösung enthält Aluminium-Alaune, woraus der Name Hämalaun-Lösung resultiert. Hintergrund, für den Zusatz der Metallionen, ist die Erhöhung der positiven Ladung und somit Stärkung der späteren Farbstoffbindung an anionische Strukturen. Als saure bzw. basophile Strukturen dienen im Gewebe beispielsweise die Zellkerne mit DNA und RNA sowie Ribosomen (Lüllmann-Rauch, Asan, 2019). Die Farbstoffbindung erfolgt im sauren Milieu und stellt sich initial bräunlich dar. Erst durch das sich anschließende intensive Spülen mit Wasser kommt es zum Farbumschlag ins Blaue, weshalb dieser Schritt als „Bläuen“ bezeichnet wird. Neben dem Farbumschlag sorgt das Bläuen auch für eine längere Haltbarkeit der Färbung, da sich der Farbstoff im alkalischen Milieu schlechter löst.

Im Anschluss erfolgt die Gegenfärbung mittels des synthetischen Farbstoffes Eosin. Dieser ist schwach sauer, weshalb zum Zwecke der Ansäuerung 2 Tropfen Essigsäure hinzugegeben werden. Dadurch wird

zum einen das alkalische Bläuen abgebrochen und die Kontrastfärbung erleichtert und zum anderen auch die Detailschärfe erhöht. Durch das Eosin werden basische bzw. acidophile Zellstrukturen rotgefärbt, so zum Beispiel Proteine im Zytoplasma, Mitochondrien, Kollagenfasern oder Hämoglobin. Gegen Ende des Färbeprotokolls schließt sich erneut eine Alkoholreihe zum Entwässern und letztlich eine Xylolreihe zum Entfernen der Alkoholreste und Klären an. Das Xylol dient dabei zusätzlich als Basis für das Eindeckmedium.

Das oben beschriebene Procedere, inklusive des anschließenden Eindeckens der Objektträger, wird dabei von einem programmierbaren Färbeautomat sowie einem Eindeckautomaten übernommen. Das Kurzprotokoll für die HE-Färbung wird im Folgenden skizziert.

Protokoll zur HE-Färbung:

	Substanz	Dauer
(1)	Xylol	3 Minuten
(2)	Xylol	3 Minuten
(3)	Xylol	3 Minuten
(4)	Ethanol, 100%	3 Minuten
(5)	Ethanol, 100%	3 Minuten
(6)	Ethanol, 100%	3 Minuten
(7)	H ₂ O	3 Minuten
(8)	Hämatoxylin	3 Minuten
(9)	Hämatoxylin	3 Minuten
(10)	Hämatoxylin	3 Minuten
(11)	H ₂ O	3 Minuten
(12)	H ₂ O	3 Minuten
(13)	Eosin	3 Minuten
(14)	Eosin	3 Minuten
(15)	Aqua dest.	3 Minuten
(16)	Ethanol, 100%	3 Minuten
(17)	Ethanol, 100%	3 Minuten
(18)	Ethanol, 100%	3 Minuten
(19)	Xylol	3 Minuten
(20)	Xylol	3 Minuten
(21)	Xylol	3 Minuten

Die Anfertigung der HE-gefärbten Gewebeschnitte dient der Übersicht der angefertigten Array Blöcke sowie dem Vergleich mit den Gewebeschnitten, welche mittels der chromogenen in-situ-Hybridisierung untersucht wurden.

3.2.8 In-situ-Hybridisierung

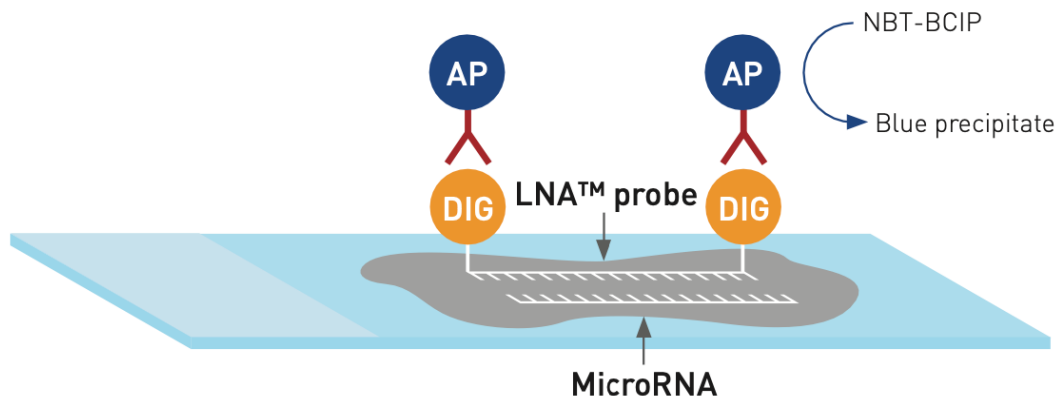
Die in-situ-Hybridisierung, von dem Lateinischen *in situ* - am (Ursprungs-) Ort - abgeleitet, stellt eine medizinisch-diagnostische Methode der Molekularpathologie dar. Sie wurde in den 60er Jahren des 20. Jahrhunderts von den US-amerikanischen Biologen Mary Lou Pardue und Joe Gall entwickelt, die ursprünglich radioaktiv markierte Sonden zur Hybridisierung verwendeten, welche anschließend mittels eines Röntgenfilms nachgewiesen wurden. Einen Vorteil der in-situ-Hybridisierung, der dieses Verfahren beispielsweise gegenüber Blotting-Techniken oder der Polymerase-Kettenreaktion abgrenzt, stellt der Erhalt der Gewebemorphologie dar, wodurch die Möglichkeit besteht, insbesondere zelltyp-spezifische Befunde in komplexen Geweben zu visualisieren. Gleichwohl ist es ein komplexes und zeitaufwändiges Verfahren, das z.B. in Abhängigkeit von der Sondenqualität nicht selten längere Etablierungs- bzw. Optimierungsphasen benötigt, nach robuster Etablierung aber auch kommerzialisiert und in Färbeautomaten eingesetzt werden kann.

3.2.8.1 Prinzip

Die Grundlage der in-situ-Hybridisierung stellt die komplementäre Basenpaarung und Zusammenlagerung komplementärer Nukleinsäurestränge dar. Ein Einzelstrang entstammt dabei direkt dem Originalgewebe, der andere einer zuvor synthetisierten Sonde. Bei diesen Sonden handelt es sich meist um modifizierte DNA- oder RNA-Stränge mit Komplementarität zur entsprechenden Ziel-Sequenz, wobei DNA-Stränge aufgrund der höheren Stabilität und infolgedessen leichteren Handhabung präferiert werden. Durch unterschiedliche Möglichkeiten der Sonden-Markierung, können verschiedene Varianten der in-situ-Hybridisierung unterschieden werden. So kann beispielsweise eine direkte Markierung mittels Fluoreszenz-Farbstoffen (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung, kurz FISH), eine indirekte Markierung mit Haptenen, wie Biotin- oder Digoxigenin-Gruppen, (Chromogene in-situ-Hybridisierung, kurz CISH) erfolgen oder aber durch Einbau radioaktiver Nukleotide. Mit dieser Basis ist der direkte und spezifische Nachweis von Nukleinsäuren in Geweben, einzelnen Zellen oder Chromosomen möglich.

In dieser Arbeit soll die in-situ-Hybridisierung zum Nachweis spezifischer MicroRNAs in Gewebeproben von Plattenepithelkarzinomen der Lunge verwendet werden. Dazu werden Digoxigenin-markierte RNA-Sonden eingesetzt. Entsprechend der indirekten Immunhistochemie auf Grundlage der Antigen-Antikörper-Reaktion stellt die mit dem Hapten markierte Sonde den „Primärantikörper“ dar,

welcher selektiv an die MicroRNA bindet und anschließend mittels eines Sekundärantikörpers detektiert wird, der wiederum mit einem Enzym konjugiert ist. Dieses Enzym katalysiert im Anschluss die Reaktion eines Substrates hin zu dessen unlöslichen Präzipitantes, was sich als Farbreaktion widerspiegelt (siehe Abbildung 3). Der Einsatz des Sekundärantikörpers führt zudem zu einer Erhöhung der Empfindlichkeit und Signalverstärkung, da sich multiple Enzym-gekoppelte Antikörper an den Primärantikörper anlagern können.



Quelle: Exiqon, 2011

Abbildung 3: Prinzip der RNA-in-situ-Hybridisierung

Die, doppelt mit dem Hapten Digoxigenin-gelabelte, LNA™-Hybridisierungssonde bindet an den komplementären Einzelstrang der MicroRNA im Gewebe. Der Anti-Digoxigenin-Antikörper, welcher mit dem Enzym Alkalische Phosphatase konjugiert ist, geht wiederum eine spezifische Bindung mit dem Primärantikörper ein und katalysiert eine Farbreaktion.

Da der Einsatz von RNA-Sonden, wie oben bereits kurz erwähnt, in der Handhabung schwieriger und anfälliger ist, wurden in dieser Arbeit spezielle LNA™-Hybridisierungssonden verwendet. LNA, aus dem Englischen *locked nucleic acid*, was übersetzt so viel wie „verbrückte Nukleinsäure“ bedeutet, ist ein modifiziertes RNA-Analogon, eine sogenannte Xenonukleinsäure, welche mit einer zusätzlichen Methylenbrücke versehen wurde. Diese Methylenbrücke führt zu einer Fixierung des Riboseringes in der 3'-endo-Konformation, welche ideal für die Watson-Crick-Basenpaarung ist. Die unabhängige Erstbeschreibung bzw. Synthese dieser Xenonukleinsäure erfolgte 1997 von den Arbeitsgruppen um Jesper Wengel (Koshkin et al., 1998) und Takeshi Imanishi (Obika et al., 1997). Durch die veränderte Konformation ergeben sich für LNA™-Hybridisierungssonden einige neue Eigenschaften. Zum einen wird die thermische Stabilität deutlich erhöht, sodass die Schmelztemperatur steigt, zum anderen auch die Resistenz gegenüber Endo- und Exonukleasen, sodass die Anwendung in vivo, wie auch in vitro verbessert wurde. Durch eine kleinere räumliche Konfiguration, als die konventionellen RNA- bzw.

DNA-Oligonukleotide, können kleinere Zielstrukturen, wie beispielsweise die MicroRNA, leichter detektiert werden. Weiter noch findet sich eine erhöhte Sensitivität und Target-Spezifität sowie deutlich höhere Affinität zu den entsprechenden komplementären Nukleinsäure-Sequenzen (Qiagen, o.J.).

3.2.8.2 Vorbereitung

Vor der Durchführung der in-situ-Hybridisierung sollten einige Dinge vorbereitet und beachtet werden. So sollte stets mit Handschuhen gearbeitet werden und sämtliche Arbeitsplätze, inklusive Apparaturen, sind vor Arbeitsbeginn möglichst gründlich mittels RNase Away™ von Ribonukleasen zu befreien. Verwendete Glaswaren sollten ebenso entweder durch Autoklavierung oder oben genannten Reiniger dekontaminiert werden. Zum Säubern oder Trocknen der Objektträger vor bzw. während den einzelnen Schritten des Hybridisierungsprozesses, sollten spezielle Präzisionstücher genutzt werden.

Des Weiteren sind vor Beginn der in-situ-Hybridisierung die benötigten Puffer und Reagenzien anzusetzen, deren Herstellung im Folgenden kurz erläutert wird.

So muss der erworbene 20-fach konzentrierte SSC-Puffer in eine 5-fache (1:4), 1-fache (1:20) und 0,2-fache (1:100) Konzentration verdünnt werden, indem die entsprechende Menge RNase-freies Wasser hinzugefügt und anschließend autoklaviert wird. Als Ansatzmenge sollten jeweils 1000 ml gewählt werden.

Für den Proteinase-K-Puffer müssen 5ml 1M Tris-HCl mit 2 ml 0,5M EDTA und 0,2 ml 5M NaCl vermischt und auf eine Menge von 1000 ml mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt werden. Anschließend sollte eine Autoklavierung erfolgen.

Der KTB-T-Puffer wird ebenso auf eine Menge von 1000 ml angesetzt. Dazu wird der Ansatz aus 7,9 g Tris-HCl (50 mM), 8,7 g NaCl (150 mM) und 0,75 g KCl (10 mM) mit der entsprechenden Menge RNase-freien aufgefüllt und autoklaviert.

Für die PBS-T-Lösung muss zunächst der 1-fache PBS-Puffer, durch das Auflösen des erworbenen PBS-Pulvers in 1000 ml RNase-freiem Wasser, hergestellt werden. Anschließend wird 1 ml des Detergens Tween®20 hinzugegeben und die Lösung autoklaviert.

Zur Herstellung des NBT-Puffers werden 20 ml 0,1M Tris-HCl mit 0,5 ml 1%-igem HCl und 0,11688 g NaCl vermischt.

Die 30%-ige BSA-Lösung wird hergestellt, indem 3 g BSA mit 10 ml PBS-T-Lösung unter ausgiebigem Schütteln vermischt werden.

Die oben genannten Puffer und Reagenzien können einige Zeit im Vorhinein und auf Vorrat für die in-situ-Hybridisierung angesetzt werden. Die Lagerung erfolgt bei Raumtemperatur. Im Unterschied dazu müssen die nun folgenden Reagenzien am Tag der in-situ-Hybridisierung frisch hergestellt bzw. frisch aufgetaut werden.

So muss die Proteinase-K-Reagenz angesetzt werden, indem die Stock Proteinase-K-Lösung auf 1-fache Proteinase-K-Konzentration verdünnt wird, beispielsweise mit 1,5 µl Proteinase-K-Lösung und Zugabe von 2 ml Proteinase-K-Puffer. Die Proteinase-K-Reagenz sollte bei jedem Lauf der in-situ-Hybridisierung frisch angesetzt werden.

Für den Hybridisierungsmix wird zunächst der 2-fach konzentrierte MicroRNA-Puffer mit RNase-freiem Wasser auf die 1-fache Konzentration verdünnt. Die Hybridisierungsproben werden in Mikroreaktionsgefäßen vorgelegt und 4 min bei 90°C im Inkubationsschüttler denaturiert, anschließend abzentrifugiert und gevortext. Zur Hybridisierungsprobe wird dann der MicroRNA-Puffer in entsprechender Menge für die etablierten Konzentrationen zugefügt. So konnte für die Positivkontrolle U6-LNA™ eine Konzentration von 8 nM (1:62,5) etabliert werden, dafür werden 32 µl Hybridisierungsprobe mit 2 ml MicroRNA-Puffer vermischt. Für den Ansatz der spezifischen miR-Sonden, inklusive der zweiten Positivkontrolle miR-205 und der Negativkontrolle Scrambled-miR wurde eine Konzentration von 160 nM (1:156) etabliert, wofür 12,8 µl Hybridisierungsprobe mit 2 ml MicroRNA-Puffer gemischt wird. Diese Hybridisierungsmixe wurden nach erfolgreicher Etablierung der Methode für die folgenden Durchläufe der in-situ-Hybridisierung in größerer Menge angesetzt, aliquotiert und bei einer Temperatur von -20°C eingefroren.

Die Blocking Solution und Dilutant Solution werden jeweils für 10 ml angesetzt. Dazu werden zu 15 ml PBS-T-Lösung 300 µl Schaf-Serum hinzugefügt. Aus diesem Ansatz werden 5 ml in ein neues Reaktionsgefäß gegeben und mit 5 ml PBS sowie 330 µl BSA gemischt, was die Dilutant Solution ergibt. Die Blocking Solution wird aus den übrigen circa 10 ml Ansatz hergestellt, indem lediglich 330 µl BSA hinzugefügt werden. Sowohl Blocking- als auch Dilutant-Solution können ebenso aliquotiert und eingefroren gelagert werden.

3.2.8.3 Durchführung

Das Protokoll der in-situ-Hybridisierung wurde anhand der von der Firma Qiagen mitgelieferten Anleitung etabliert und optimiert. Pro Durchlauf wurden jeweils vier Objektträger mitgeführt, darunter die Positivkontrollen U6-LNA und miR-205, die Negativkontrolle Scrambled-miR und die jeweilige spezifische miRNA-Detektionssonde.

Die Auswahl der miRNA-Detektionssonden erfolgte dabei auf Basis der, im Rahmen der Dissertation von Dr. med. Johannes Hohneck (Institut für Allgemeine und Spezielle Pathologie des Universitätsklinikums des Saarlandes) bestimmten, Ct-Werte. Dabei wurde jeweils das arithmetische Mittel der Ct-Werte aus den Mittelwerten der Mehrfachbestimmungen zu einer MicroRNA errechnet und anhand dessen eine Auswahl der zu untersuchenden MicroRNAs getroffen. Dabei wurden zwei MicroRNAs mit einem ähnlichen Ct-Mittelwert zur Positivkontrolle miR-205-5p ausgewählt, nämlich

miR-126-3p und miR-200b-3p und eine MicroRNA mit einem höheren Ct-Wert, miR-31-3p. Insgesamt den geringsten Ct-Mittelwert weist die Positivkontrolle U6 auf. Die genauen Werte sind der folgenden Tabelle 4 zu entnehmen.

Tabelle 4: Auswahl der miR-Detektionssonden anhand der Ct-Mittelwerte ausgewählter MicroRNAs

RNA	Funktion im Rahmen der CISH	Ct-Mittelwert
snRNA-U6	allgemeine Positivkontrolle	25,52
miR-205-5p	spezifische Positivkontrolle, spezifische MicroRNA	26,78
miR-126-3p	spezifische MicroRNA	26,69
miR-200b-3p	spezifische MicroRNA	26,67
miR-31-3p	spezifische MicroRNA	31,26

Der Prozess der Etablierung wurde damit begonnen, den Proteinverdau mittels der Proteinase K sowie die Hybridisierungstemperatur anhand der Positivkontrolle U6-LNA grob zu adjustieren. Im nächsten Schritt wurden die optimierten Parameter anhand der zweiten, spezifischeren Positivkontrolle miR-205, welche im Rahmen dieser Arbeit eine doppelte Rolle als Positivkontrolle und spezifische Detektionssonde einnimmt und der Negativkontrolle Scrambled-miR kontrolliert und weiter optimiert. Erst nach abgeschlossener Etablierung wurden die spezifischen miRNA-Detektionssonden eingesetzt.

Deparaffinieren und Rehydrieren:

Zu Beginn durchlaufen die Paraffinschnitte drei Xylolbäder von zweimal 5 Minuten und anschließend einmal 10 Minuten, um das Paraffin aus den Gewebeschnitten zu entfernen. Dies ist nötig, damit im Folgenden die MicroRNA-Sonden im Gewebe möglichst ungehindert anlagern können und eine Hybridisierung am Gewebe erfolgt. Zudem werden unspezifische Hintergrundfärbungen bzw. ein Maskieren spezifischer Färbungen vermieden. Danach schließt sich eine absteigende Alkoholreihe an, um einerseits das Xylol zu verdrängen und andererseits das Gewebe zu rehydrieren. Dazu werden Alkohole der Konzentrationen 100%, 90% und 70% eingesetzt, welche durch entsprechende Zugabe von Aqua dest. angesetzt wurden. Die Gewebeschnitte durchlaufen zunächst den 100%-igen Alkohol zweimal für 5 Minuten und einmal für 10 Minuten. Der 90- und 70%-ige Alkohol schließt sich jeweils zweimal für 5 Minuten an. Zum Schluss wird das Gewebe für 5 Minuten im PBS-Puffer, einem Waschpuffer mit definiertem pH bei circa 7,4 – entsprechend dem physiologischen pH des Gewebes in vivo – gereinigt.

Fixierung:

An die Deparaffinierung anschließend, findet eine kurze Fixierung mittels 4%-iger, neutral gepufferter Formaldehyd-Lösung für 15 Minuten bei Raumtemperatur statt, um die Gewebeschnitte für die folgenden Schritte der in-situ-Hybridisierung zu stabilisieren. Es folgt abschließend ein erneuter Waschschrift im PBS-Puffer, welchen die Proben zweimal für 2 Minuten durchlaufen.

Proteinase-K-Verdau:

Der Proteinase-K-Verdau dient der Demaskierung der miRNA im Gewebe, um einen Zugang für die LNA-Hybridisierungsproben zu schaffen. Darüber hinaus dient der Verdau der Befreiung der miRNA von umgebenden Proteinen, insbesondere von endogenen Nukleasen, welche die miRNA hydrolysieren und somit das finale Ergebnis verfälschen können.

Für den Proteinverdau mittels Proteinase-K werden 300 µl der Proteinase-K-Reagenz auf die Gewebeschnitte pipettiert. Der Verdau wird bei 37°C im Hybridisierer durchgeführt. Die Dauer unterscheidet sich dabei für die unterschiedlichen Präparationen der Objektträger geringfügig. So wird für die Positivkontrolle U6-LNA ein Verdau von 20 Minuten, für die weiteren Sonden und Kontrollen ein Verdau von 22 Minuten durchgeführt. Nach dem Verdau sollten die Gewebeschnitte unverzüglich im PBS-Puffer gewaschen werden, um den Verdauungsprozess zu stoppen.

Dehydrierung:

Im Anschluss an den Proteinverdau werden die Gewebeschnitte mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert. Es wurden hierzu Alkohole der Konzentrationen 70%, 90% und 100% verwendet, in welchen die Schnitte jeweils zweimal für 1 Minute inkubiert wurden.

Nach dem Durchlaufen der Alkoholreihe wurden die Proben für 10 Minuten bei Raumtemperatur an einem möglichst staubfreien Platz getrocknet.

Hybridisierung:

Die Hybridisierung erfolgt mittels doppelt-Digoxigenin-gelabelter LNA-Hybridisierungsproben. Dazu werden 30 µl des Hybridisierungsmixes auf die Objektträger gegeben. Wichtig ist dabei, dass der Gewebeschnitt nicht berührt wird. Anschließend wird ein steriles Deckglas aufgelegt, wobei darauf geachtet werden sollte, dass Luftblasen gänzlich vermieden werden, da diese eine heterogene Hybridisierung bedingen und somit das Ergebnis verfälschen. Das Deckglas wird zudem mittels Fixogum versiegelt, um zu verhindern, dass Hybridisierungsmix verloren geht oder eine Kontamination stattfindet. Die Hybridisierungstemperatur wurde im Rahmen der Etablierung auf 50°C und die Dauer auf 1,5 Stunden festgelegt.

Nach der Inkubationszeit wird der Fixogum manuell entfernt und die Objektträger werden inklusive der aufsitzenden Deckgläser in einen 5-fach konzentrierten SSC-Waschpuffer bei Raumtemperatur

überführt, worin sich die Deckgläser selbstständig ablösen. Falls die Ablösung der Deckgläser nicht direkt erfolgt, kann durch vorsichtiges Schwenken im Waschpuffer nachgeholfen werden. Eine manuelle Entfernung mit Zug des Deckglases über die Gewebeschnitte sollte vermieden werden.

Stringentes Waschen:

Um mögliche ungebundene oder unspezifisch gebundene Sondenanteile zu eliminieren, schließt sich der Hybridisierung ein Waschvorgang an mit in sinkender Konzentration angesetzter Salzlösung (SSC-Puffer). Dies dient dazu, eine exakte Detektion der hybridisierten Sonden in der Auswertung zu ermöglichen. Je geringer die Konzentration der Salzlösung, desto stringenter die Bindungen.

Die Salzlösungen wurden frühzeitig bei 55°C im Wasserbad angewärmt. Für den Waschvorgang werden die in der Salzlösung befindlichen Objektträger erneut ins Wasserbad zurückgestellt, um die Temperatur möglichst genau zu halten. Die Gewebeschnitte durchlaufen dabei einen 5-fach und jeweils zwei 1- bzw. 0,2-fach konzentrierte Bäder der Salzlösung für jeweils 5 Minuten in absteigender Reihenfolge. Es schließt sich ein drittes 0,2-fach konzentriertes Bad bei Raumtemperatur für 5 Minuten an.

Abschließend erfolgt eine Spülvorgang im PBS-Puffer.

Für die weiteren Inkubationen ist es unbedingt erforderlich, dass die Gewebeschnitte zu keinem Zeitpunkt austrocknen.

Blocken unspezifischer Bindungen:

Mit dem Ziel, unspezifische Hintergrundfärbungen von vornherein möglichst effizient zu vermeiden, werden unspezifische Proteinbindungen mittels der angesetzten Blocking Solution blockiert. Dazu werden 200 µl der Blocking Solution auf die Gewebeschnitte pipettiert und diese für 15 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert.

Antikörper-Inkubation:

Die Antikörper-Inkubation erfolgt mittels Anti-Digoxigenin-Antikörper, welche direkt mit dem Enzym Alkalische Phosphatase konjugiert sind. Verwendet wird eine Konzentration des Anti-Digoxigenin-Antikörpers von 1:800, wozu 1 µl des Anti-Digoxigenin-Antikörpers (Schaf) in 800 µl Dilutant Solution verdünnt werden. Dies sollte bei jedem Durchlauf des Protokolls frisch angesetzt werden. Pro Objektträger werden 50 µl Antikörper-Lösung auf den Gewebeschnitt pipettiert. Die Inkubation wird bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer durchgeführt und hat eine Dauer von 60 Minuten, wobei nach der Hälfte der Zeit ein Wechsel der Antikörper-Lösung erfolgt. Dazu wird die alte Lösung auf dem Objektträger vorsichtig abgeschüttet und der Objektträger grob mit Präzisionstüchern, insbesondere an den Rändern, abgetrocknet. Der Gewebeschnitt darf dabei weder berührt noch trocken werden. Anschließend werden erneut 50 µl der Antikörper-Lösung aufpipettiert und die Inkubation für die

restlichen 30 Minuten in der feuchten Kammer fortgeführt. Während der Inkubation wird die feuchte Kammer mit einem Tuch abgedeckt.

Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Objektträger aus der feuchten Kammer entnommen und dreimal für jeweils 5 Minuten in der PBS-T-Lösung gewaschen. Dabei dient das Detergens Tween®20 in diesem Waschgang dazu, unspezifische Protein-Protein-Bindungen zu vermeiden.

Detektion des Antikörpers:

Die Detektion des Anti-Digoxigenin-Antikörpers erfolgt durch Zugabe des NBT-BCIP-Substrates. Der Ansatz des Substrates erfolgt jeweils frisch und möglichst unmittelbar vor dessen Verwendung, indem 20 µl der NBT/ BCIP Stock Solution mit 1 ml des NBT-Puffers und 1 µl Levamisol-Hydrochlorid gemischt und anschließend kurz zentrifugiert und gevortext werden. Das Levamisol dient dabei der Blockade der Aktivität unspezifischer endogener alkalischer Phosphatasen, um zum einen die Spezifität der Antikörper-Detektion zu gewährleisten und zum anderen störende, unspezifische Hintergrundfärbungen zu vermeiden.

Zur Antikörper-Detektion im Dunkeln erfolgte das Aufpipettieren des Substrates bei ausgeschaltetem Raumlicht. Pro Objektträger wurden 200 µl des Substrates auf den Gewebeschnitt gegeben und die Gewebeschnitte dann im Hybridisierer für insgesamt 1 Stunde und 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Ein Wechsel des Substrates erfolgt nach der Hälfte der Zeit, indem, analog zur Antikörper-Inkubation, das alte Substrat abgeschüttet wird, die Objektträger kurz mittels Präzisionstüchern gesäubert und daraufhin erneut 200 µl des Substrates aufpipettiert werden.

Bei erfolgreicher Antikörper-Detektion findet eine Konversion des initial gelben Substrates hin zu einer blauen Färbung statt, indem das eingangs lösliche Substrat von der, am Anti-Digoxigenin-Antikörper-gebundenen, Alkalischen Phosphatase in seine sowohl Wasser- als auch Alkohol-unlöslichen blauen Präzipitate umgesetzt wird. Es erfolgt eine kovalente Farbstoffbindung im Gewebe, sodass die Präzipitate am Ort der Reaktion verbleiben.

Nach Ablauf der übrigen 45 Minuten Inkubationszeit mit dem gewechselten Substrat werden die Objektträger zweimal in KTBT-Puffer, auch „Alkalische Phosphatase Stop Solution“ genannt, vorsichtig geschwenkt, um die Reaktion zu beenden. Daraufhin findet ein Waschschriff in RNase-freiem Wasser statt, indem die Objektträger dort zweimal für 1 Minute verweilen.

Dehydrieren:

Die anschließende Dehydrierung der Gewebeschnitte erfolgt mittels einer Alkoholreihe aufsteigender Konzentrationen, wobei die Schnitte jeweils zweimal für 1 Minute Alkoholbäder der Konzentrationen 70%, 90% und 100% in angegebener Reihenfolge durchlaufen.

Zum Auswaschen des Alkohols werden die Proben abschließend in ein Xylolbad überführt.

Eindeckeln der Objektträger:

Nach der erfolgten in-situ-Hybridisierung werden die Array Schnitte zur Konservierung und besseren mikroskopischen Auswertung mittels Entellan, einem Eindeckmedium, eingedeckt. Dazu werden 1-2 Tropfen Entellan auf den Gewebeschnitt gegeben und der Objektträger mittels eines Deckglases eingedeckelt. Das Eindeckmedium härtet nun bei Raumtemperatur aus. Zum schnelleren Trocknen werden die Objektträger noch circa 10-20 Minuten unter einem Abzug bei Raumtemperatur und ausgeschaltetem Licht positioniert und bei 4°C über Nacht im Kühlschrank dunkel gelagert.

Mikroskopische Kontrolle:

Nachdem die Objektträger über Nacht im Kühlschrank trocknen gelassen wurden, kann lichtmikroskopisch kontrolliert werden, ob die in-situ-Hybridisierung erfolgreich war. Dabei wird neben der spezifischen Färbung auf unspezifische Hintergrundsignale, eine schlechte Entwässerung oder auch ein schlechtes Eindecken der Schnitte geachtet und gegebenenfalls neu eingedeckt oder der Lauf komplett wiederholt.

3.2.8.4 Prozess der Etablierung

Die Etablierung des Protokolls der in-situ-Hybridisierung erfolgte mithilfe des Optimization Kits, anhand dessen der grundlegende Ablauf festgelegt wurde. Dabei wurden zum Teil Einzelschritte ergänzt und wiederum andere geändert oder verworfen sowie die idealen Bedingungen für ein bestmögliches Ergebnis herausgearbeitet. Die Phasen der Etablierung hin zum oben geschilderten, endgültigen Protokoll sollen im Folgenden kurz, in der Reihenfolge des Protokollablaufs, erläutert werden.

Begonnen mit der Anpassung der Schnittdicke hat sich gezeigt, dass eine initial gewählte Schnittdicke von 6 µm sowohl hinsichtlich der Bearbeitung im Rahmen der in-situ-Hybridisierung und Immunhistochemie als auch der lichtmikroskopischen Auswertung nicht ideal war, da sich oftmals starke Überlagerungen zeigten und eine zu hohe Zelldichte vorlag. Umgekehrt war das Verhalten bei einer Schnittdicke von 4 µm zu fragil, sodass sich eine Schnittdicke von 5 µm als am besten herausstellte. Der initiale Schritt des Deparaffinierens wurde insofern optimiert, als dass eingangs sowohl die Xylol- als auch die Alkoholbäder jeweils dreimal für 5 Minuten durchlaufen wurden, was jedoch hinsichtlich des Grades der Entparaffinierung nicht zufriedenstellend war und infolgedessen zu unspezifischen Hintergrundfärbungen führte. Daher wurde dies dahingehend abgeändert, die Zeit im Xylol wie auch 100%-igen Alkohol zu verlängern auf je 20 Minuten, aufgeteilt auf zweimal 5 und einmal 10 Minuten und die Zeit in den beiden übrigen Alkoholkonzentrationen auf jeweils insgesamt 10 Minuten, zu je zweimal 5 Minuten, zu verkürzen.

Im Anschluss an das Deparaffinieren war zunächst direkt der Proteinase-K-Verdau vorgesehen. Es stellte sich allerdings heraus, dass die Paraffinschnitte unfixiert sehr instabil bzgl. weiterer

Bearbeitungsschritte waren und so größere Gewebeverluste entstanden, sodass die Entscheidung zu einer Fixierung im Formalin getroffen wurde.

Als Waschschrift nach der Formalin-Fixierung wurde zunächst zweimal Aqua dest. verwendet, das jedoch zügig gegen RNase-freies DEPC-Wasser getauscht wurde, um Kontaminationen mit Nukleasen zu vermeiden. Da das Gewebe allerdings auch nach der Verwendung mit RNase-freiem Wasser zum Teil noch recht strapaziert schien, wurde das RNase-freie Wasser gegen den isotonischen PBS-Puffer eingetauscht, welcher sich als schonender erwies.

Beim Proteinase-K-Verdau galt es, die richtige Inkubationszeit zu finden, wonach ein ausreichender Grad der Demaskierung der miRNA vorliegt, jedoch keine Verluste hinsichtlich der Zellmorphologie entstehen. Dabei wurde die Inkubationszeit bei einer Zeitspanne von 5-30 Minuten optimiert, wobei zunächst für die Positivkontrolle U6-snRNA eine Inkubationszeit festgelegt wurde. Hierbei fanden sich beste Ergebnisse bei einer Dauer von 20 Minuten. Anschließend wurde die Inkubationszeit an der zweiten, spezifischeren Positivkontrolle miR-205 getestet, wobei auffiel, dass die Färbung sehr schwach war und wohl kaum Hybridisierung stattgefunden hatte. Daher wurde die Zeit des Verdaus zunächst auf 25 Minuten verlängert, was jedoch starke Schäden in Bezug auf den Erhalt und die Qualität der Zellmorphologie hervorrief, sodass die Zeit in 1-minütigen Schritten wieder verkürzt wurde. Letztlich erzielte eine Dauer von 22 Minuten die besten Ergebnisse und wurde als Zeit für die spezifischen Sonden, die Positivkontrolle miR-205 und die Negativkontrolle Scrambled-RNA festgelegt.

Bezüglich der sich anschließenden Hybridisierung mussten zunächst die Konzentrationen für die Ansätze der Hybridisierungsmixe ausgearbeitet werden. Begonnen wurde dabei mit der Positivkontrolle U6-snRNA, da sich diese am robustesten verhält und einer Konzentration von 1 nM. Diese wurde zügig gesteigert über die Zwischenschritte von 2 nM und 5 nM, bis sich bei 8 nM eine intensive Färbung einstellte. Anschließend wurde die Konzentration der Positivkontrolle miR-205 optimiert, wobei durch den spezifischeren Ansatz an der miRNA und einem schwächer erwarteten Signal hier direkt mit einer höheren Konzentration von 20 nM gestartet wurde. Auch hier wurde die Konzentration sukzessive gesteigert, bis bei einer Konzentration von 160 nM stabile und ausreichend intensive Ergebnisse festgestellt werden konnten. Die Negativkontrolle und die spezifischen Sonden werden im Anschluss wie die Positivkontrolle miR-205 gehandhabt.

Während und nach der Etablierung der richtigen Konzentration mussten zudem die Hybridisierungsdauer und die Menge des Hybridisierungsmix eingestellt werden. Eingangs wurde mit einer Dauer von 1 Stunde gearbeitet, was zu kurz schien, weshalb probeweise – angelehnt an das Protokoll einer FISH – auch ein Durchlauf mit einer Hybridisierungszeit über Nacht ausgetestet wurde, was sich jedoch als absolut insuffizient äußerte, da das Gewebe im Anschluss äußerst strapaziert und angegriffen erschien. Nach mehreren kleineren zeitlichen Veränderungen stellten sich die besten Ergebnisse bei einer Dauer von 1,5 Stunden ein. Hinsichtlich der Menge des zugegebenen Hybridisierungsmix wurde die Startmenge von 25 µm auf 30 µm erhöht, damit alle Stenzen genügend

benetzt werden konnten und im Hybridisierer, trotz Versiegelung mittels Fixogum, keine trockenen Stellen entstanden.

Die Hybridisierungstemperatur wurde ebenfalls schrittweise eingestellt, wobei für snRNA ein Spektrum von 54-57°C und für miRNA eine Temperatur von 55°-60°C angegeben wurden, was als Orientierungsmarke genutzt wurde. Wichtig zu beachten ist hierbei, dass bei niedrigeren Temperaturen die Signalstärke höher, jedoch mitunter durch Kreuzreaktionen unspezifischer und bei höheren Temperaturen die Signalstärke schwächer, jedoch unempfindlicher gegenüber Kreuzreaktionen wird. Eine gute Signalstärke stellte bei 50°C ein, woraufhin diese Temperatur festgelegt wurde. Die Befürchtung, dass bei dieser recht niedrigen Temperatur vermehrt unspezifische Hintergrundfärbungen oder Kreuz-Hybridisierungen zu ähnlichen Sequenzen auftreten und zu Lasten der Sensitivität gehen könnten, bestätigte sich nicht.

Die Temperatur der SSC-Puffer beim folgenden stringenten Waschen richtet sich grob nach der Hybridisierungstemperatur. Nach eingangs gewählten 57°C stellten sich die besten Ergebnisse bei einer Temperatur von 55°C ein, wodurch sowohl unspezifische Färbungen durch nicht- bzw. unspezifisch gebundene Sondenanteile als auch das Abschwimmen ganzer Stanzen reduziert werden konnten.

Da sich bei der Positivkontrolle miR-205 eingangs nur schwache Farbsignale einstellten, trotz starker Signale bei der U6-snRNA, wurde im Rahmen der Antikörper-Inkubation ein Wechsel der Antikörper-Lösung nach der Hälfte der Zeit zur Signalverstärkung eingeführt. Analog dazu und mit dem gleichen Ziel wurde auch ein Substratwechsel nach der Hälfte der Inkubationszeit etabliert. Die Zeit der Antikörper-Detektion wurde zudem von 1 Stunde auf 1,5 Stunden verlängert, ebenso mit dem Ziel der Signalverstärkung.

Der sich anschließende Waschschriff im KTBT-Puffer zum Stoppen der Reaktion der Alkalischen Phosphatase zeigte bei initial zweimal 5 Minuten eine sehr starke Wirkung, sodass sich das Farbsignal deutlich und sichtbar abschwächte. Daher wurde dies vorsichtig verkürzt, bis sich bei zweimaligem Schwenken im KTBT-Puffer kein Farbverlust mehr einstellte und trotzdem die Reaktion genügend stoppte. Ein folgendes Spülen der Schnitte in Aqua dest. wurde umgestellt auf RNase-freies Wasser, erneut vor dem Hintergrund, Kontaminationen mit Nukleasen zu vermeiden.

Gegen Ende des Protokolls findet sich üblicherweise eine Gegenfärbung der Nuclei mit Nuclear Fast Red. Da jedoch, trotz des optimierten Protokolls, die spezifische miRNA-Färbung lichtmikroskopisch häufig nur sehr schwach darzustellen ist, fiel die Entscheidung, auf die Gegenfärbung gänzlich zu verzichten, da diese trotz vieler Versuche und Varianten letztlich immer zu stark ausfiel und die miRNA-Signale maskierte.

Bei der abschließenden Dehydrierung vor dem Eindeckeln der Schnitte wurde an die Alkoholreihe ein zusätzliches Xylolbad angeschlossen, um überschüssigen Alkohol zu entfernen und eine bessere Basis für das Eindeckmedium zu schaffen.

3.2.8.5 Lichtmikroskopische Auswertung und Dokumentation

Zur Auswertung der, mittels chromogener in-situ-Hybridisierung und Immunhistochemie dargestellten, MicroRNA-Expression wurde die konventionelle Lichtmikroskopie gewählt. Die Stenzen wurden dabei einzeln mikroskopiert, wobei der Fokus insbesondere auf das Fehlen bzw. Vorhandensein einer Blaufärbung, als Zeichen der vorhandenen spezifischen MicroRNA sowie auf deren Lokalisation innerhalb des Gewebes lag.

Um eine Auswertung nach qualitativen Gesichtspunkten vornehmen zu können, wurden die Gewebeproben hinsichtlich der Intensität und quantitativen Verteilung der MicroRNA-Anfärbung bewertet und ordinal kategorisiert. Dazu wurde eine Einteilung von „keine Beurteilung möglich“ (X), über „fehlende“ (-), „schwache“ (+), „mäßige“ (++) bis „starke“ (+++) Färbung vorgenommen (siehe Tabelle 5). Diese Einteilung wurde für die spezifischen Sonden, wie auch die verschiedenen Kontrollen vorgenommen. Bild-Beispiele zu den einzelnen Bewertungskategorien finden sich im Abschnitt Ergebnisse.

Die Dokumentation der einzelnen Stenzen erfolgte dabei photographisch, indem von jeder Stanze in 10-facher Vergrößerung mittels einer Mikroskopkamera eine Aufnahme angefertigt wurde. Aufgrund der Größe der Stenzen konnte dabei jeweils das gesamte Gewebe dargestellt werden. Bei der verwendeten Software handelt es sich um die zugehörige Mikroskopie-Software der Firma Zeiss, Zen 3.2 blue edition. In Bezug auf eine mögliche spätere digitale Bildanalyse mittels der genannten Software, wurde lediglich die Kontrastierung optimiert. Die Einstellungen bezüglich der Kontrastierung wurden nach einmaliger Einstellung während der Foto-Dokumentation möglichst nicht verändert, um eine Vergleichbarkeit der Photographien zum Zwecke der qualitativen Auswertung zu gewährleisten.

Tabelle 5: Qualitativ-ordinale Bewertungskriterien

Bewertungspunkt	Bewertungskategorie	Beschreibung
X	keine Beurteilung möglich	Gewebe abgeschwommen; nur Randbezirke/ einzelne kleine Stücke der Stanze vorhanden; starke Artefaktierung (z.B. Faltung der gesamten Stanze)
-	keine Blaufärbung	keinerlei Blaufärbung erkennbar
+	schwache Blaufärbung	Intensität der Färbung schwach (hellblaue bis graublaue Färbung); kleine Areale bis „schleierhafte“ Färbung

++	mäßige Blaufärbung	Intensität mäßig stark (blaue Färbung deutlich erkennbar); mittelgroße bis große Areale
+++	starke Blaufärbung	Intensität sehr stark (überwiegend tiefblaue Färbung); mittelgroße bis große Areale

4. Ergebnisse

4.1 Eigenschaften des Patientenkollektivs

Das Probenkollektiv umfasst insgesamt, nach Abzug verschiedener Drop-Outs, 114 Lungenkarzinome, von denen jeweils drei Stanzproben verwendet wurden. Der Anteil weiblicher Patientinnen betrug 26,3%, der Anteil männlicher Patienten 73,7%. Der Altersmedian betrug bei den weiblichen Patienten 73 Jahre, bei den männlichen Patienten 74,5 Jahre.

In Bezug auf die eingeschlossenen Tumorstadien ergab sich folgende Einteilung: 23 Patienten mit einem pT1-Tumorstadium, 42 Patienten mit einem pT2-Stadium, 30 Patienten mit einem pT3-Stadium und 19 Patienten mit einem pT4-Stadium.

Hinsichtlich des Gradings fanden sich ausschließlich Befunde der Kategorien G2 und G3. Insgesamt wurden 86 Tumoren mit G3, 26 Tumoren mit G2 und 2 Tumoren mit G2-3 befundet.

4.2 snRNA-U6 in-situ-Analytik

Als eine Positivkontrolle im Rahmen der in-situ-Hybridisierung wurde die small nuclear RNA U6 verwendet.

Insgesamt war bei der snRNA-U6 in der Mehrzahl der Fälle ein positives Ergebnis zu vermerken und nur sehr selten zeigte sich keinerlei nukleäre Anfärbung. Ein gänzlich Fehlen nukleärer Färbung kann dabei beispielsweise dadurch zustande kommen, dass die Stanze in den Bereich einer größeren Nekrose fällt, einem Charakteristikum des Plattenepithelkarzinoms. In einigen Fällen war eine genauere Beurteilung des Färbeverhaltens aufgrund starker Artefakte nicht möglich, wenn es beispielsweise zum großflächigeren Abschwimmen des Gewebematerials der Stanze kam oder eine Faltung des Gewebes die genaue Betrachtung verhindert. Im Falle fehlender Beurteilbarkeit oder der Negativität sollte für diese einzelne Gewebeprobe keine Aussage in Bezug die Anfärbung spezifischer MicroRNAs getroffen werden.

Hinsichtlich der qualitativ-ordinalen Bewertung konnte die Färbung überwiegend in die Kategorie der starken Blaufärbung, gefolgt von einer mäßigen Blaufärbung eingeordnet werden. Eine genaue prozentuale Auswertung der Bewertungspunkte ist in Abbildung 4 dargestellt.

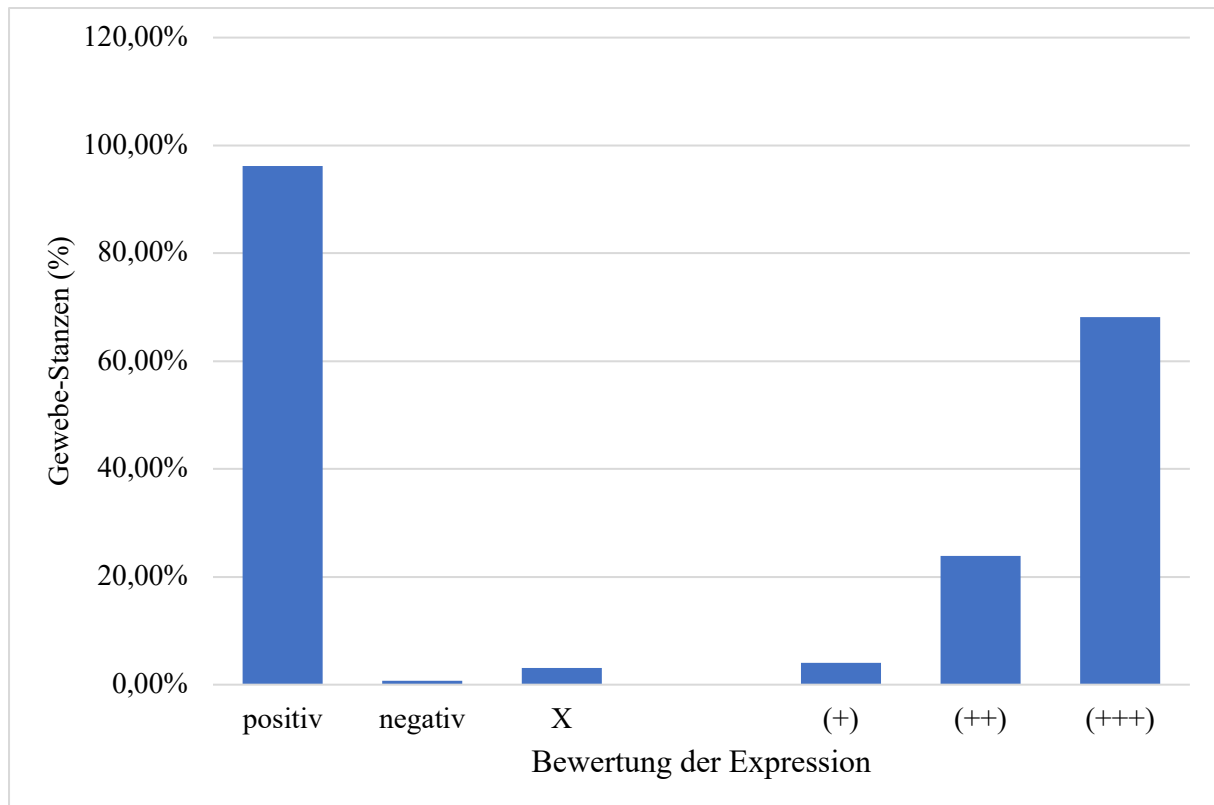


Abbildung 4: Expressionsprofil der snRNA-U6

Das Färbeverhalten der Positivkontrolle snRNA-U6 präsentiert sich überwiegend als sehr stark. Daher konnte im Rahmen der in-situ-Hybridisierung eine Optimierung der Parameter anhand des Verhaltens der snRNA-U6 vorgenommen werden.

Zur besseren Veranschaulichung und Nachvollziehbarkeit der Bewertungspunkte, welche in Tabelle 5 im Abschnitt „Material und Methodik“ erläutert wurden, sollen in der folgenden Abbildung 5 die Bewertungskategorien anhand ausgewählter Beispiele der snRNA-U6 dargestellt werden.

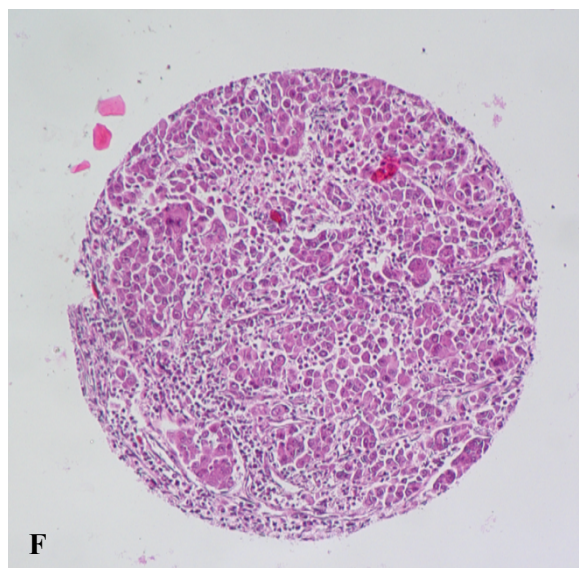
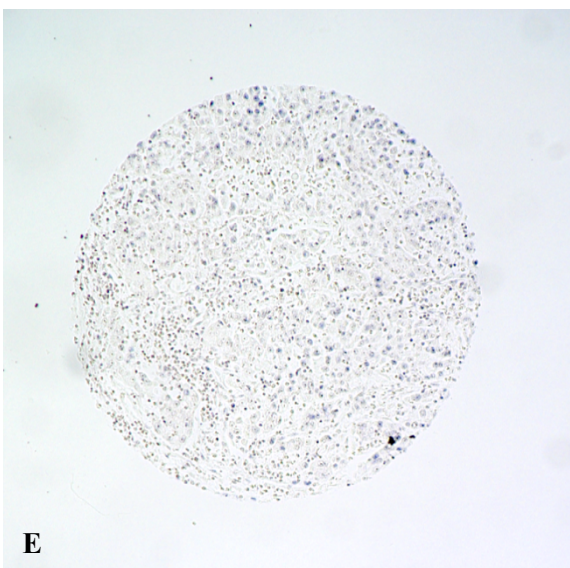
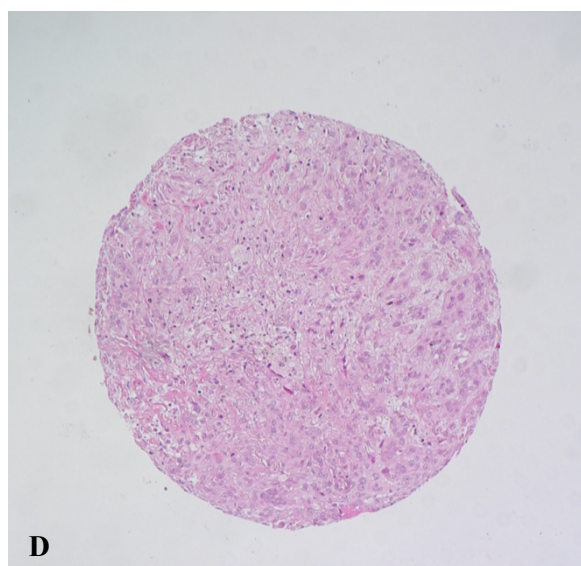
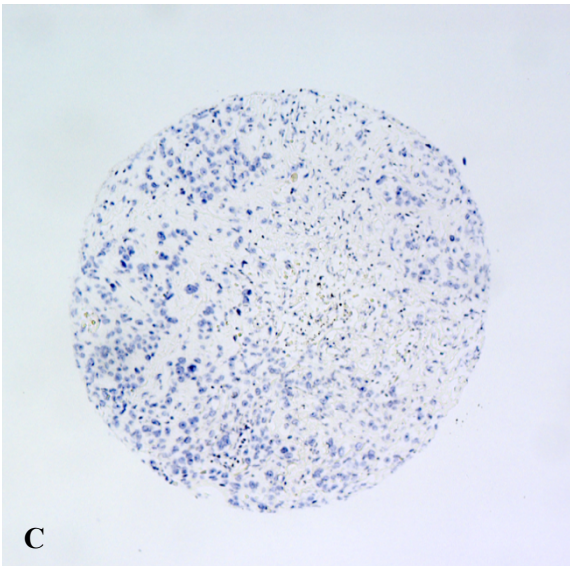
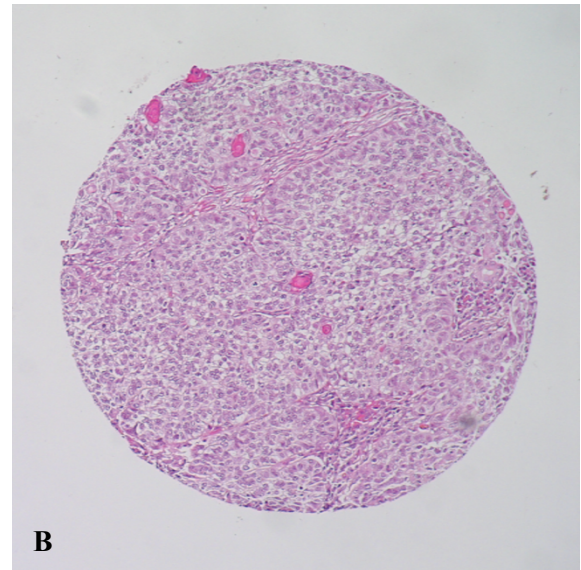
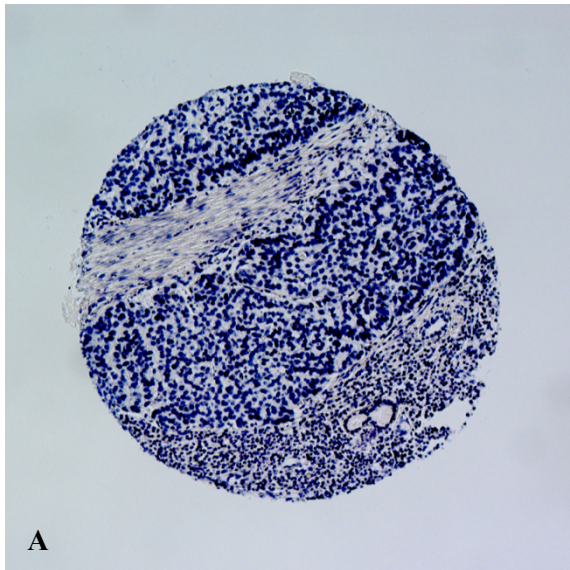


Abbildung 5: Beispiele für die Bewertungskategorien anhand der snRNA-U6

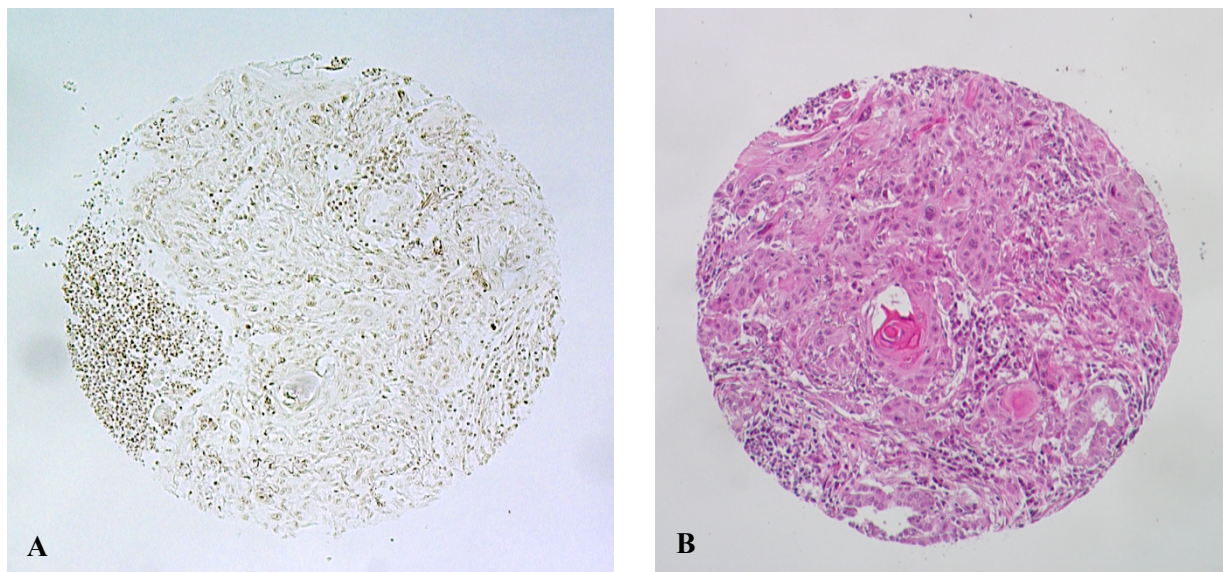
(A) Bewertungskategorie „starke Blaufärbung“. (B) zu A entsprechender, HE-gefärbter Gewebeausschnitt. (C) Bewertungskategorie „mäßige Blaufärbung“. (D) zu C entsprechender, HE-gefärbter Gewebeausschnitt. (E) Bewertungskategorie „schwache Blaufärbung“. (F) zu E entsprechender, HE-gefärbter Gewebeausschnitt.

4.3 Scrambled-MicroRNA in-situ-Analytik

Die Scrambled-MicroRNA wurde als Negativkontrolle der in-situ-Hybridisierung bei jedem Durchlauf mitgeführt.

Insgesamt konnten keine Färbungen der Scrambled-MicroRNA festgestellt werden, sodass alle Durchläufe als gültig gewertet werden konnten. Im Falle der fehlenden Beurteilbarkeit der Scrambled-miR, beispielsweise aufgrund des Fehlens dieser einzelnen Stanze, sollte für diese einzelne Gewebeprobe keine Aussage in Bezug auf die Anfärbung spezifischer MicroRNAs getroffen werden.

In der folgenden Abbildung 6 ist eine Gewebestanze mit korrekt negativ gefärbter Scrambled-MicroRNA nach durchlaufenem Protokoll zu sehen.

**Abbildung 6: Korrekt negativ gefärbte Scrambled-MicroRNA**

(A) Die als Negativkontrolle verwendete Scrambled-MicroRNA zeigt keinerlei Blaufärbung, somit findet sich kein Anhalt für eine unspezifische Färbung. (B) zu A entsprechender HE-gefärbter Gewebeausschnitt.

4.4 MicroRNA-205-5p in-situ-Analytik

Die MicroRNA-205-5p nimmt in dieser Arbeit eine doppelte Rolle ein. Zum einen wurde sie neben der snRNA-U6 als spezifische Positivkontrolle des verwendeten Kits eingesetzt und zum anderen stellt sie eine für das Plattenepithelkarzinom der Lunge spezifische MicroRNA dar. Ihre Expression wird daher auch äquivalent zu den anderen spezifischen MicroRNAs betrachtet.

Im Vergleich zur snRNA-U6 zeigt die miR-205-5p eine deutlich schwächere Expression und damit auch Blaufärbung. Insgesamt finden sich unter den gültigen Gewebeproben mehr negative Färberegebnisse als positive. Bei den positiven Färbungen dominiert die Kategorie der schwachen Blaufärbung, gefolgt von einer mäßigen Blaufärbung. Eine genaue prozentuale Auswertung der Bewertungspunkte findet sich in Abbildung 7.

Da die miR-205-5p als spezifische Positivkontrolle primär der genaueren Einstellung des Protokolls dient, bedingt eine Negativität oder fehlende Beurteilbarkeit dieser Stanze keine mangelnde Aussagekraft über das Verhalten der weiteren spezifischen MicroRNAs dieser Gewebestanze.

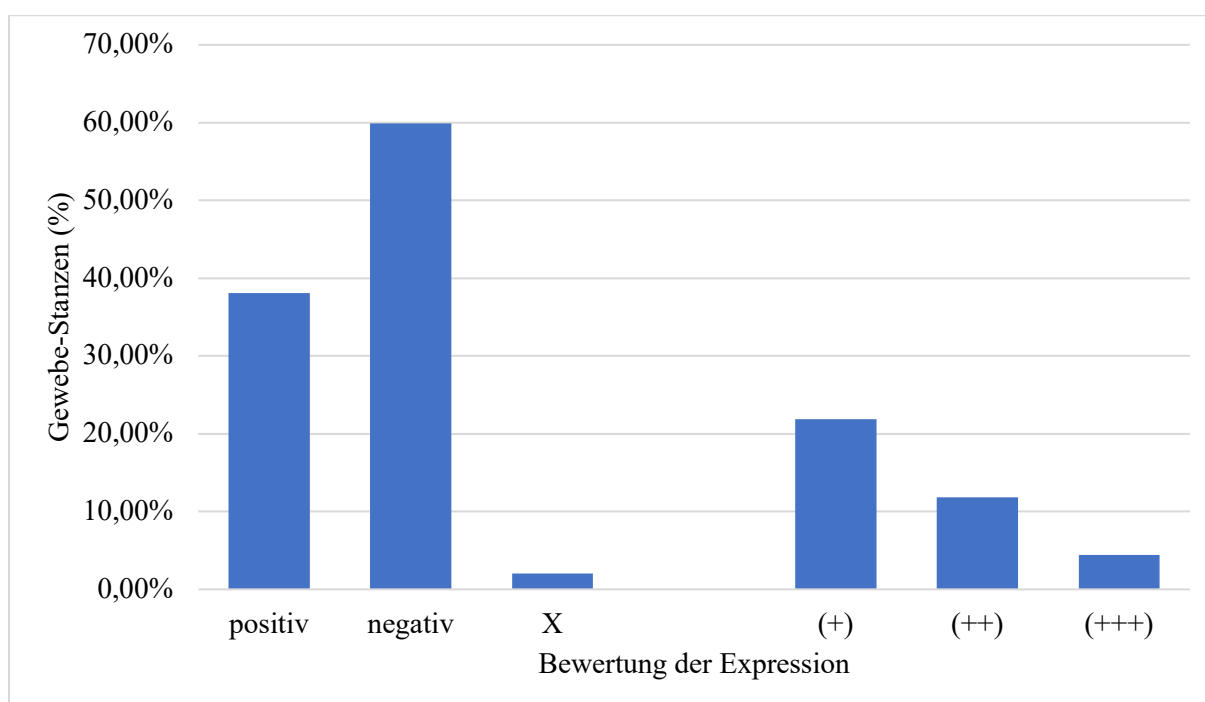


Abbildung 7: Expressionsprofil der miR-205-5p

Die miR-205-5p zeigt in ihrer Rolle als spezifische MicroRNA für das Plattenepithelkarzinom der Lunge insgesamt mehr negative als positive Ergebnisse. Hinsichtlich der positiven Ergebnisse überwiegen diese der Kategorien mit schwacher bis mäßiger Blaufärbung.

Die unterschiedlichen Ausprägungen der Blaufärbung der miR-205-5p sollen im Folgenden (siehe Abbildung 8) beispielhaft dargestellt werden. Gut zu erkennen ist dabei zum einen die insgesamt schwächere Färbung in allen drei Bewertungskategorien, sowie die zytoplasmatische Anfärbung der Tumorzellen im Vergleich zur vorwiegend nukleären Färbung der snRNA-U6.

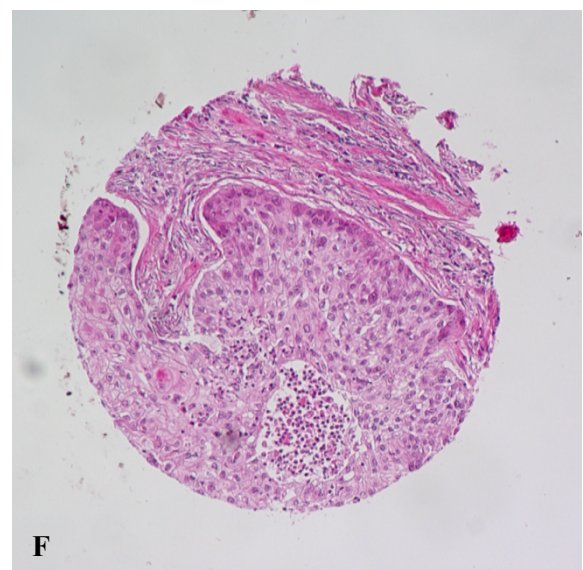
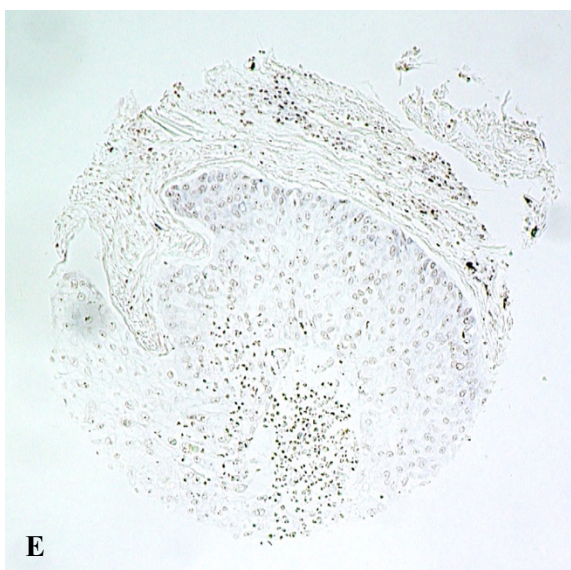
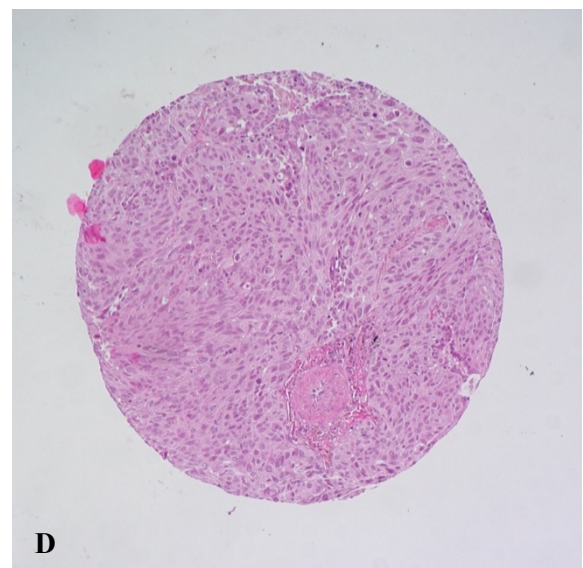
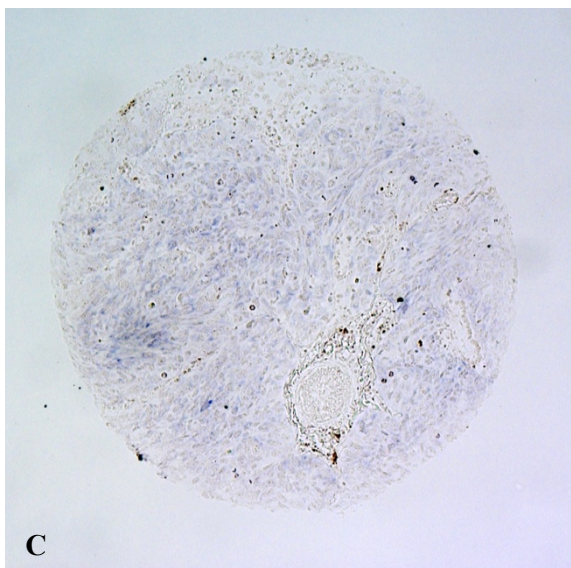
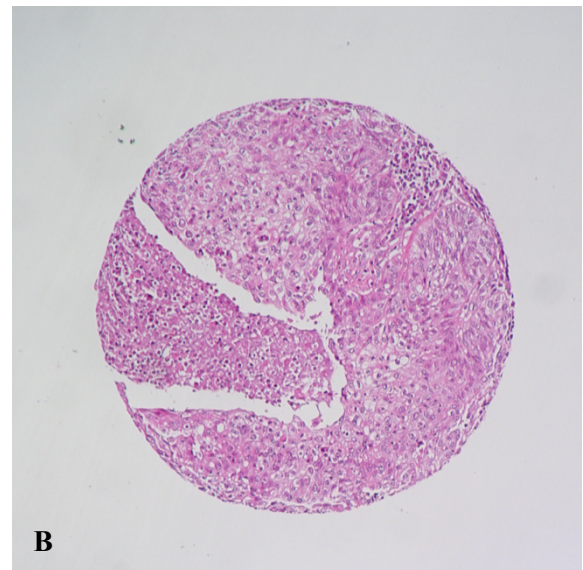
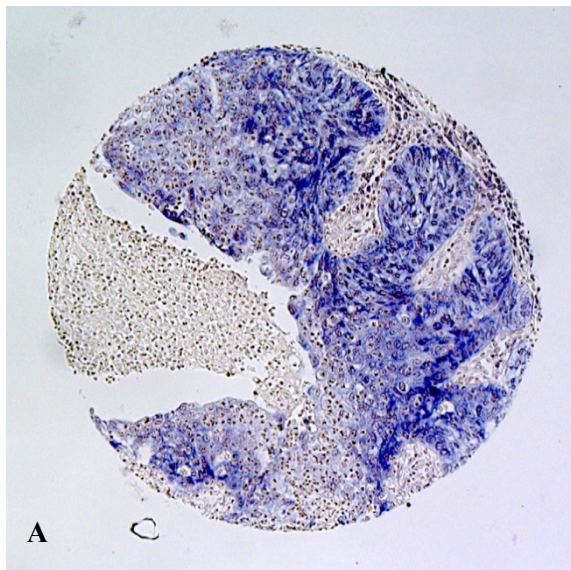


Abbildung 8: Ausprägungen der Blaufärbung der miR-205-5p

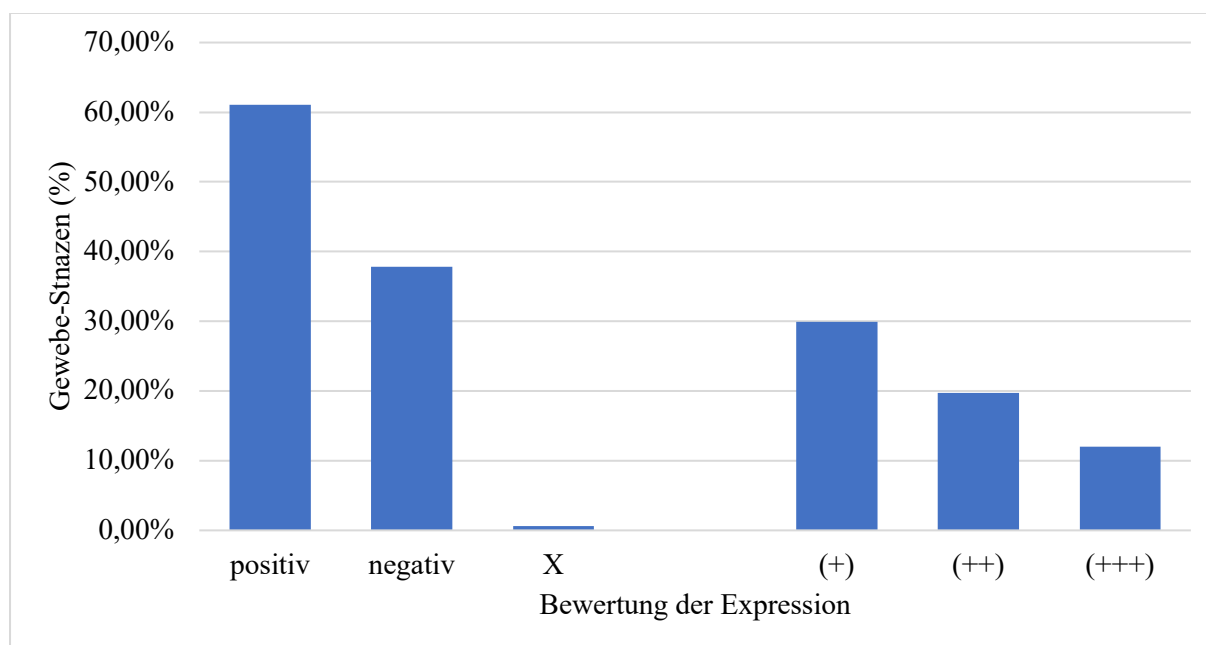
(A) Bewertungskategorie „starke Blaufärbung“. (B) zu A entsprechender, HE-gefärbter Gewebeausschnitt. (C) Bewertungskategorie „mäßige Blaufärbung“. (D) zu C entsprechender, HE-gefärbter Gewebeausschnitt. (E) Bewertungskategorie „schwache Blaufärbung“. (F) zu E entsprechender, HE-gefärbter Gewebeausschnitt.

4.5 MicroRNA-126-3p in-situ-Analytik

Als eine weitere Versuchsreihe wurde die entsprechende Sonde zur Detektion der MicroRNA-126-3p eingesetzt

Insgesamt finden sich unter den Ergebnissen der Versuchsreihe zur MicroRNA-126-3p deutlich mehr positive als negative Ergebnisse, im Gegensatz zur MicroRNA-205-5p. Dabei werden die positiven Ergebnisse von der Bewertungskategorie „schwache Blaufärbung“, gefolgt von „mäßiger Blaufärbung“ angeführt. Mit diesem Expressionsprofil weist die MicroRNA-126-3p von allen, in dieser Arbeit getesteten, MicroRNAs die quantitativ höchste Expression auf und übertrifft auch die Positivkontrolle miR-205-5p mit Spezifität unter anderem für Plattenepithelkarzinomzellen.

Die genaue prozentuale Verteilung der Ergebnisse ist folgend in Abbildung 9 dargestellt.

**Abbildung 9: Expressionsprofil der miR-126-3p**

Die Versuchsreihe zur Expression der MicroRNA-126-3p bringt mehr positive als negative Ergebnisse zum Vorschein. Dabei ist unter den positiven Ergebnissen die Kategorie der „schwachen Blaufärbung“ dominierend, gefolgt von einer „mäßigen“ bzw. „starken Blaufärbung“.

Hinsichtlich der positiven Ergebnisse ist festzustellen, dass vor allem die Durchläufe der Tumorstadien pT4 und pT2 einen äußerst hohen Anteil mit jeweils über 70% positiven Ergebnissen aufweisen, gefolgt vom Stadium pT3 mit knapp 60%. Das Tumorstadium pT1 folgt mit knapp 37% positiven Ergebnissen.

Die oben beschriebenen Ergebnisse bezüglich des Expressionsprofils der miR-126-3p sollen in der folgenden Abbildung 10 beispielhaft visualisiert werden.

Auch bei der MicroRNA-126-3p zeigt sich eine vorwiegend zytoplasmatische Anfärbung der Tumorzellen.

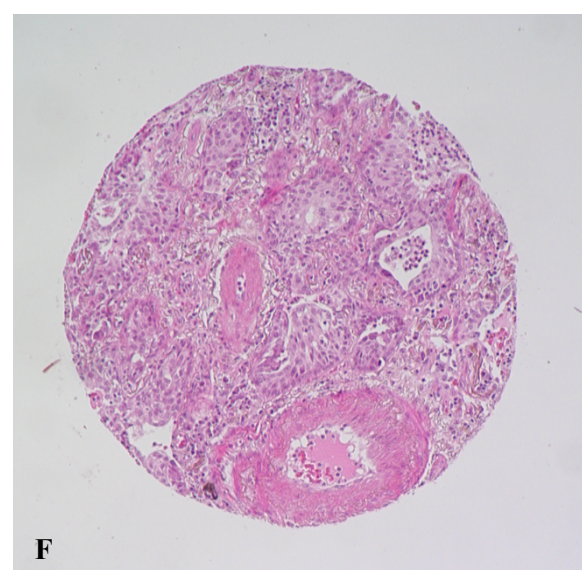
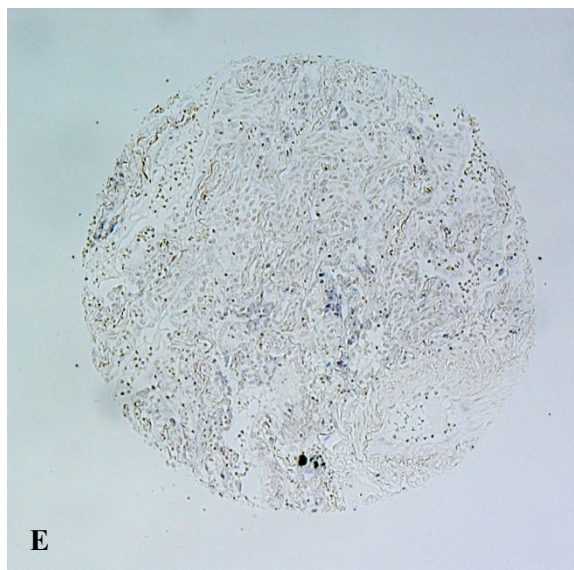
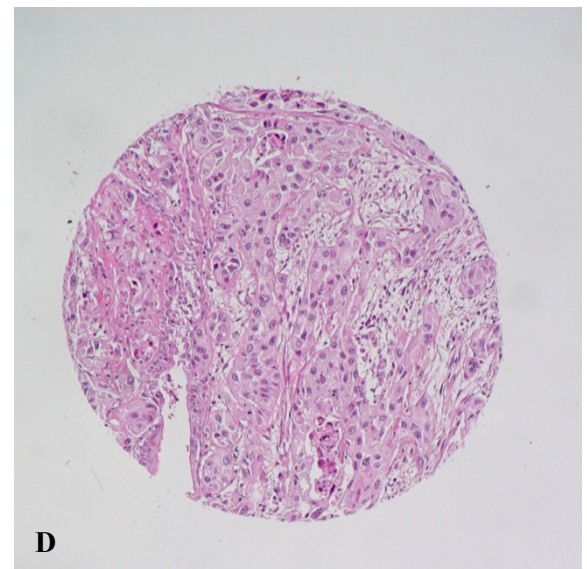
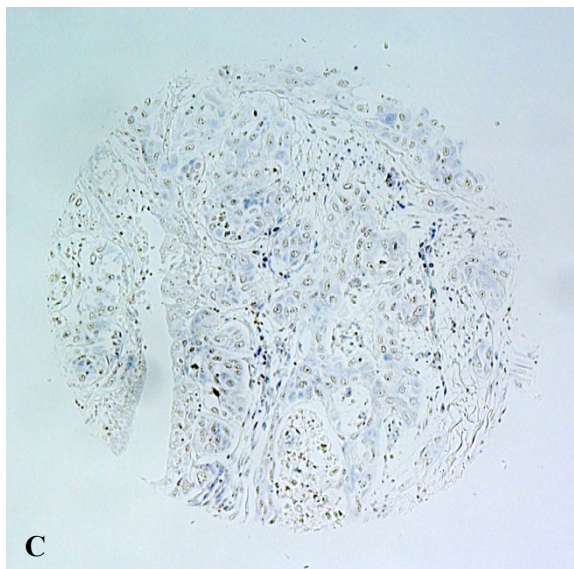
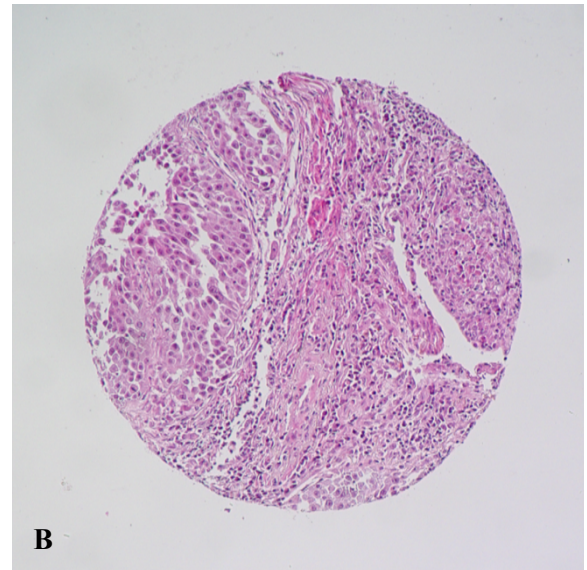
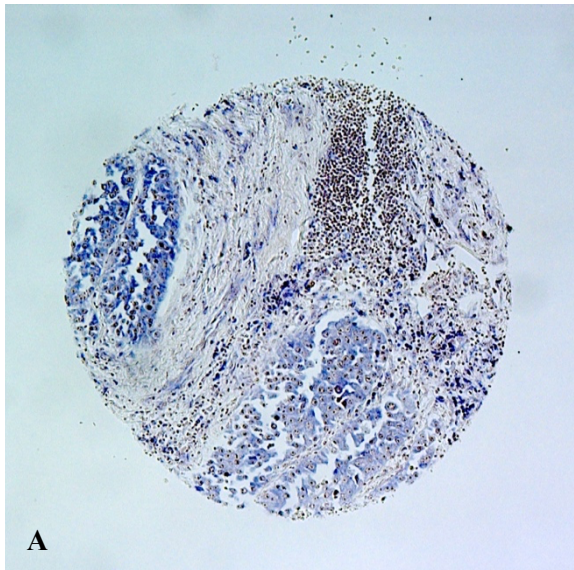


Abbildung 10: Unterschiedliche Expressionsniveaus der miR-126-3p

(A) Bewertungskategorie „starke Blaufärbung“. (B) zu A entsprechender, HE-gefärbter Gewebeausschnitt. (C) Bewertungskategorie „mäßige Blaufärbung“. (D) zu C entsprechender, HE-gefärbter Gewebeausschnitt. (E) Bewertungskategorie „schwache Blaufärbung“. (F) zu E entsprechender, HE-gefärbter Gewebeausschnitt.

4.6 MicroRNA-200b-3p in-situ-Analytik

Eine weitere Versuchsreihe wurde mit der MicroRNA-200b-3p aus der miR-200-Familie durchgeführt. Insgesamt betrachtet, weist die MicroRNA-200b-3p eine sehr gering ausgeprägte Expression auf. So lassen sich nur wenige positive Ergebnisse vermerken (2,5% der Gewebestanzen), wohingegen der Großteil der Stenzen keine Blaufärbung zeigt (95,5% der Gewebestanzen). Bei den wenigen positiven Ergebnissen ist die Bewertungskategorie der „schwachen Blaufärbung“ vorherrschend und insgesamt kann nur eine Gewebestanze mit „mäßiger Blaufärbung“ gefunden werden. Die übrigen 2% der Stenzen können aufgrund starker Artefakte, mechanischen Abschwimmens des Gewebes oder fehlender Beurteilbarkeit bzw. Negativität der Positiv- und/ oder Negativkontrolle nicht beurteilt werden. Zu den vorhandenen positiven Ergebnissen werden, in der sich anschließenden Abbildung 11 Beispiele aufgeführt.

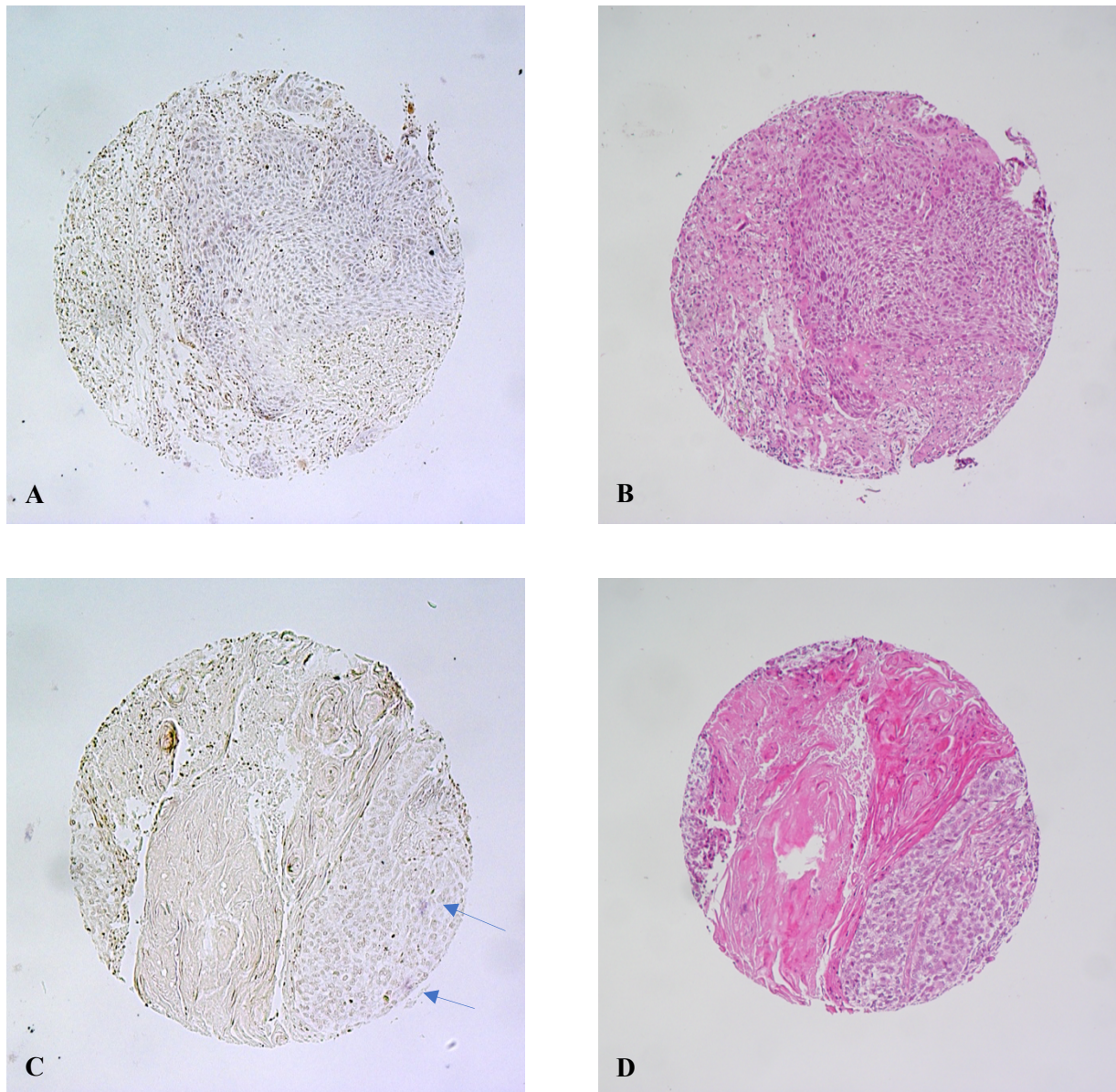


Abbildung 11: Unterschiedliche Expressionsniveaus der miR-200b-3p

(A) Bewertungskategorie „mäßige Blaufärbung“. (B) zu A entsprechender, HE-gefärbter Gewebeausschnitt. (C) Bewertungskategorie „leichte Blaufärbung“; Pfeilspitzen zeigen beispielhaft auf einzelne blau angefärbte Ausschläge. (D) zu C entsprechender, HE-gefärbter Gewebeausschnitt.

4.7 MicroRNA-31-3p in-situ-Analytik

Eine weitere, kürzere Versuchsreihe wurde zur MicroRNA-31-3p durchgeführt.

Bei dieser Versuchsreihe konnte kein positives Ergebnis vermerkt werden. Sowohl im Rahmen des Etablierungsprozesses als auch bei Verwendung des optimierten Protokolls konnte bei keiner Gewebestanze ein blauer Farbausschlag detektiert werden.

In der folgenden Abbildung 12 ist beispielhaft ein Ergebnis der Versuchsreihe zu sehen.

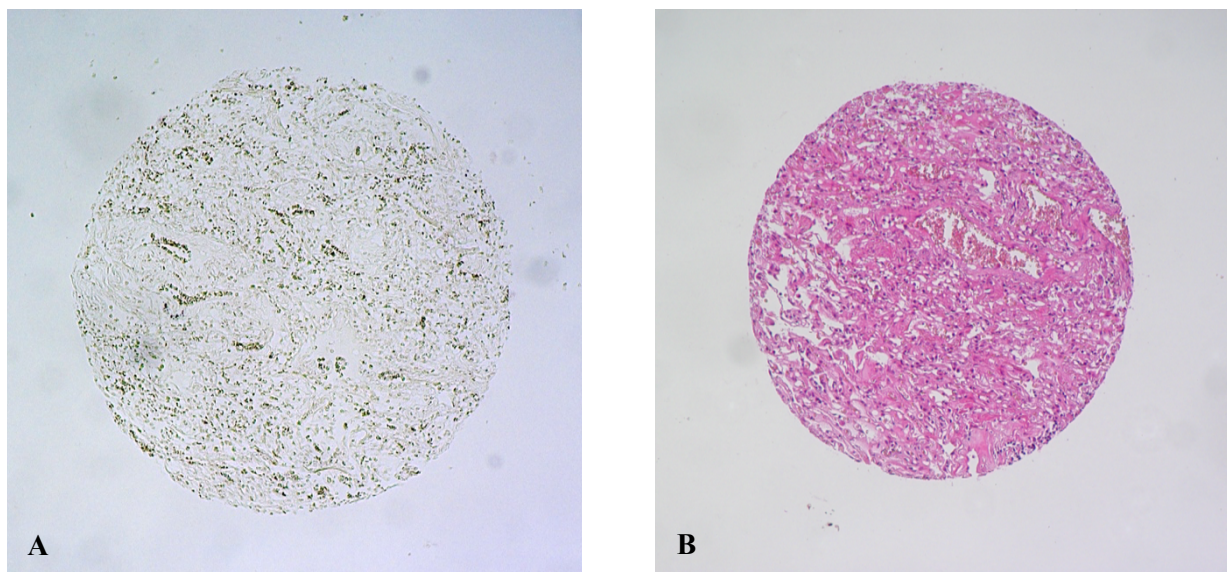


Abbildung 12: Expressionsniveau der miR-31-3p

(A) Bewertungskategorie „keine Blaufärbung“. (B) zu A entsprechender, HE-gefärbter Gewebeausschnitt.

5. Diskussion

Das Lungenkarzinom führt weltweit mit circa 1,82 Millionen Toten (Stand 2022) die Liste der Krebstodesfälle an (Radtke, 2024).

Neben der Symptomarmut der Erkrankung wird das Problem der späten Erstdiagnose durch fehlende konsequente Vorsorge- und Screening-Konzepte verstärkt. Ein Problem dabei stellen stark schwankende Werte hinsichtlich der Sensitivität und Spezifität dar, welche in Screening-Studien zu kontroversen Ergebnissen führen und bislang kein einheitliches Konzept ermöglichen (Reck et al., 2023).

Sowohl für therapeutische, aber auch für diagnostische und prognostische Zwecke wird nach wie vor nach neuen Möglichkeiten, insbesondere im Bereich der personalisierten Medizin, geforscht. Gegenstand aktueller Forschung ist dabei unter anderem die MicroRNA. Ein Großteil der Forschung beschäftigt sich dabei auf molekularer Ebene mit dem Nachweis der MicroRNA und deren Quantifizierung über Nachweisverfahren wie Polymerase-Kettenreaktionen oder Blotting-Verfahren und mit der Erforschung der beeinflussten Signalwege.

In dieser Arbeit sollte daher der nächste Schritt gegangen und ein Verfahren etabliert werden, um die MicroRNA auch auf zellulärer bzw. histologischer Ebene zu erfassen. Deshalb wurde im Rahmen eines experimentellen Projektes ein Protokoll zur chromogenen in-situ-Hybridisierung an MicroRNA etabliert und optimiert, mit dem die Expression von, für das Plattenepithelkarzinom der Lunge spezifischen, MicroRNAs im Tumorgewebe auf lichtmikroskopischer Ebene visualisiert wird. Nachfolgend wurden anhand unterschiedlicher MicroRNA-Sonden mehrere Versuchsreihen durchgeführt, um das MicroRNA-Expressionsprofil des Plattenepithelkarzinoms der Lunge zu untersuchen und Unterschiede zu vermerken sowie potenzielle Abhängigkeiten zu prüfen.

5.1. Diskussion von Vor- und Nachteilen der miR-in-situ-Analytik

Vielen Nachweisverfahren molekularer Strukturen ist es gemein, dass stets eine komplette Probe auf die Zielstruktur hin untersucht wird, jedoch keine Weitere Zuordnung innerhalb der Probe möglich ist.

Daher wurde in dieser Arbeit zur Untersuchung der unterschiedlichen MicroRNAs bewusst die in-situ-Analytik ausgewählt, bei der die in-vivo Lokalisation der MicroRNAs im Vordergrund steht. Der Ansatz dabei, die kleinen Nukleinsäuren im direkten Zell- bzw. Gewebeverband des Tumors zu untersuchen, sorgt einerseits für einen veränderten Blickwinkel, der sich in Richtung des klinischen Einsatzes orientiert und damit verbunden andere Fragestellungen, andererseits birgt er jedoch die Konfrontation mit neuen Problemen, beispielsweise hinsichtlich der technischen Handhabung oder auch der Auswertungsmöglichkeiten. Im Folgenden sollen daher einige Vor- und Nachteile der in-situ-Analytik diskutiert werden.

Zur besseren Handhabung und zur Erleichterung des akkuraten Einhaltens des Protokolls der in-situ-Hybridisierung wurde sich im Vorhinein für die Verwendung manueller Tissue Micro Arrays entschieden. Dies ermöglicht die Vereinigung unterschiedlicher Gewebeproben auf einem Paraffinblock, wodurch mit vergleichsweise geringerem Aufwand mehr Proben bearbeitet werden können. Damit einhergehend, kann der gesamte Zeitaufwand gesenkt werden und gleichzeitig auch, im Sinne des Qualitätsmanagements, ein Arbeiten mit weniger Objektträgern pro Versuchsreihe ermöglicht werden, woraus kürzere Übergangszeiten und ein exakterer Ablauf der einzelnen Arbeitsschritte resultiert. Zudem wird dadurch ein standardisiertes Vorgehen für eine gewisse Anzahl an Proben garantiert, mit der Folge einer geringeren Varianz und der Konsequenz, dass eine Streuung der Ergebnisse, infolge systematischer Fehler, reduziert wird. Des Weiteren bietet der manuelle Tissue Micro Array den Vorteil, dass das Originalgewebe weiterhin für Untersuchungen zur Verfügung steht, da nur einzelne, kleine Stanzungen entnommen werden und somit Gewebematerial gespart wird. Gleichzeitig stellt dies jedoch auch eine Schwachstelle der Methode dar, da durch die Verwendung kleiner Gewebestanzungen nur ein Teil des Tumors repräsentiert wird und so die Gefahr besteht, Areale zu verwenden, welche, beispielsweise im Rahmen der vorherigen Gewebeaufarbeitung mit Formalin-Fixierung und Paraffin-Einbettung, Schaden erlitten haben. Um, unter anderem, diesem Problem entgegenzuwirken, wurden daher jeweils drei Gewebestanzungen pro Tumor verwendet.

Die Verwendung des Originalgewebes im Rahmen der Tissue Micro Arrays, anstelle homogenisierten Materials der Plattenepithelkarzinome, bedingt auch, dass eine quantitative Auswertung der MicroRNA-Expression aufgrund variierender Tumorzellzahlen pro Gewebestanze stark erschwert ist, weshalb sich für eine qualitativ-ordinale Bewertung der Ergebnisse entschieden wurde. Zudem konnte durch die nötige Bearbeitung der Photographien, im Sinne der Kontrast-Optimierung, keine sichere semi-quantitative Auswertung des Blauanteils, mittels spezieller Software, anhand der Metadaten der Photographien vorgenommen werden. Diese Bearbeitung war jedoch notwendig, um die häufig nur schwachen Farbausschläge in der Foto-Dokumentation abzubilden, da im Allgemeinen durch die Photographie die Farbintensität und Sättigung der Gewebestanzungen reduziert wiedergegeben wird.

Betrachtet man die chromogene in-situ-Hybridisierung im Gesamten, so ist festzuhalten, dass damit sicherlich eine potente Methodik vorliegt, um im Rahmen der Forschung eine neue Ebene des Verständnisses zu eröffnen, jedoch durchaus Schwachstellen vorhanden sind, welche diese Methode zumindest aktuell für einen routinemäßigen, beispielsweise diagnostischen Einsatz im Bereich der MicroRNA, nicht geeignet erscheinen lassen.

5.2. Diskussion möglicher Einflussfaktoren auf das Ergebnis der miRNA-in-situ-Hybridisierung

Wie bei jeder neuen Etablierung einer Methodik stellt sich die Frage, ob bestimmte Parameter einen Einfluss auf das Ergebnis der miRNA-in-situ-Hybridisierung nehmen und möglicherweise für eine künftige Verwendung kritisch betrachtet bzw. einberechnet werden müssen.

So konnte, im Rahmen dieser Arbeit, mit einem Probenumfang, welcher die Jahre 2010 bis 2021 umfasst, hinsichtlich des Parameters des Probenalters kein zweifelsfrei negativer Zusammenhang festgestellt werden. Sowohl die Gewebeproben aus den frühen Jahren als auch die Proben aus den späteren Jahren zeigen positive wie auch negative Ergebnisse, ohne, dass ein klarer Trend erkennbar ist. Daher kann die Vermutung aufgestellt werden, dass auch eine retrospektive Analyse der miRNA prinzipiell auch an Langzeit-archiviertem FFPE-Gewebe möglich ist.

Als ein weiterer Parameter wurde eine Abhängigkeit zum Ct-Mittelwert der spezifischen MicroRNAs betrachtet. Dabei ist zu bedenken, dass die Ct-Mittelwerte aus einem Datensatz stammen, welcher zum einen anhand von Kryomaterial und zum anderen nach einer RNA-Isolation aus dem entsprechenden Gewebe und anschließenden PCR-Analyse berechnet wurde. Die Hypothese, bei geringerem Ct-Wert ein stärkeres Ansprechen in der in-situ-Hybridisierung zu beobachten, konnte dabei nicht klar bestätigt werden. Diejenigen spezifischen MicroRNAs, welche einen sehr ähnlichen Ct-Wert besitzen - miR-205-5p, miR-126-3p und miR-200b-3p – zeigten im Rahmen der CISH-Auswertung deutlich differenzierte Expressionsverhalten. Wo die miR-126-3p am ausgeprägtesten dargestellt werden konnte, wurden bei der miR-200b-3p, trotz eines sogar geringfügig geringeren Ct-Wertes, kaum positive Ergebnisse erzielt. Ein Versuch der Erklärung könnte darin bestehen, dass die in-situ-Hybridisierung an nicht-homogenisiertem Originalgewebe durchgeführt wurde und demnach der Ct-Mittelwert, welcher anhand von RNA-Isolaten bestimmt wurde, deutlich abweicht. Auch könnte ein Unterschied durch die unterschiedliche Aufarbeitung des Gewebes zustande kommen, welche sich bei Kryo- und FFPE-Gewebe deutlich unterscheidet und möglicherweise eine Auswirkung auf den Degradierungsgrad der MicroRNA besitzt. Betrachtet man einen größeren Ct-Wert-Unterschied, wie er bei der miR-31-3p vorliegt, so ist zu vermuten, dass eine grobe Orientierung des CISH-Erfolgs anhand des Ct-Mittelwertes möglich ist, da sich hier bestätigte, dass bei einem Ct-Wert > 30 keine visuelle Darstellung der MicroRNA mehr möglich war.

Als Tumor-abhängige Einflussgröße sollte unter anderem das Grading, also der Differenzierungsgrad des Tumorgewebes und dessen Einfluss auf die CISH-Ergebnisse betrachtet werden. Insgesamt beinhaltet das Kollektiv jedoch nur G2- bzw. G3-Tumoren mit einer mäßig- bis schlechten Differenzierung malignen Gewebes, sodass die Untersuchung eines Einflusses innerhalb dessen wenig aussagekräftig ist und erwartungsgemäß zwischen G2 und G3 mittels qualitativ-ordinaler Auswertung auch keine Beeinflussung auffiel. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen auch Chen et al. im Jahr 2015,

welche ebenso für die miR-126-3p keine Korrelation zwischen Expressionslevel und Alter, Geschlecht, Tumorgröße, Histologie und Differenzierung feststellten. Gleiches wurde durch Yang et al. schon im Jahre 2012 postuliert.

5.3. Diskussion der Ergebnisse und Funktion der miR-205-5p

Wie bereits im Abschnitt „Ergebnisse“ erwähnt, nimmt die MicroRNA-205-5p in dieser Arbeit eine doppelte Rolle ein, einerseits als spezifische Positivkontrolle und andererseits als für das Plattenepithelkarzinom der Lunge spezifische MicroRNA. Die Spezifität ist dabei so hoch, dass die miR205-5p, hinsichtlich der Rolle der MicroRNA zur Identifikation histologischer Subtypen, als für das Plattenepithelkarzinom spezifische MicroRNA gewertet wird, wohingegen beispielsweise für das Adenokarzinom der Lunge die miR-124a als spezifisch gilt (Wu et al., 2019). Diese Spezifität für Plattenepithelien und speziell das bronchiale Plattenepithel sollte daher künftig im Rahmen diagnostischer Untersuchungen genutzt werden oder zumindest Beachtung finden. Neben der Expression im Lungenkarzinom, findet sich die miR-205-5p noch in anderen Krebsentitäten, beispielsweise dem Endometrium-, Harnblasen-, Prostata-, Magen-, Mamma und Colon-Karzinom (Zhao et al., 2022).

Hinsichtlich des Lungenkarzinoms konnte nachgewiesen werden, dass die miR-205-5p als onkogene MicroRNA fungiert und die Tumor-Progression, sowohl hinsichtlich des Gewichtes als auch des Volumens, fördert (Zhao et al., 2022). Diese Annahme wird dadurch verstärkt, dass das Expressionslevel im NSCLC deutlich erhöht ist und eine gesteigerte Expression als Indiz für eine onkogene Wirkungsweise gilt. Ebenfalls konnte diese Hochregulierung im Endometrium-Karzinom beobachtet werden (Wang et al., 2016). Gleichzeitig konnte im Gewebe anderer Tumor-Entitäten eine Herunterregulation der miR-205-5p beobachtet werden, sodass im Falle des Mamma-, Prostata-, Harnblasen-Karzinoms und Glioms von einer Tumor-suppressiven Wirkung dieser MicroRNA auszugehen ist und onkogene Faktoren, wie beispielsweise VEGF-A oder ZEB1/ZEB2, als Ziele identifiziert wurden (Wang et al., 2016). Diese Ergebnisse legen daher die Vermutung nahe, dass die miR-205-5p, hinsichtlich ihrer Funktionen im Rahmen der Tumorgenese, ein ambivalentes Verhalten aufweist, welches vermutlich durch den Tumortyp und die äußeren Begleitumstände, wie beispielsweise das Tumor-Mikroenvironment, geprägt wird.

Die Hypoxie spielt im Rahmen des Tumor-Mikroenvironments eine Schlüsselrolle zur Förderung der Metastasierung bei soliden Tumoren und führt zur Freisetzung verschiedener mediierender Faktoren, wie beispielsweise von HIF-1 α . Wang et al. konnten dabei zeigen, dass, vermutlich in Abhängigkeit von der Freisetzung solcher Faktoren, eine Steigerung der miR-205-Expression unter Hypoxie stattfindet und diese als Teil einer EMT-regulierenden Achse fungiert. Target der miR-205 ist in diesem

Fall das Apoptose-stimulierende p53-Protein 2, kurz ASPP2, welches im TP53BP2-Gen kodiert ist und physiologisch als p53-Aktivator sowie zum Erhalt der epithelialen Polarität dient, somit eine Tumorsuppressive Funktion einnimmt. Die Lokalisation, nahe des Zelladhäsionsproteins E-Cadherin, im Bereich der Zell-Zell-Kontakte vermittelt dabei die Bedeutung des Proteins für den Erhalt des epithelialen Zustandes, sodass im Falle einer Dysregulation, wie es in Tumoren der Fall ist, eine ASPP2-Suppression mit aggressiveren Phänotypen und einem reduzierten klinischen Outcome einhergeht. Die inverse Korrelation von miR-205 und ASPP2 hebt somit die EMT-hemmende Wirkung des ASPP2 auf und spielt eine Rolle in der Hypoxie-induzierten EMT mittels Beeinflussung der Marker E-Cadherin und Vimentin, welche in der Förderung des Tumorzellwachstums sowohl in vitro als auch in vivo resultiert. MiR-205 kann somit im Rahmen des NSCLC klar als EMT-Promotor gesehen werden und stellt damit gleichzeitig auch einen potenziellen Ansatzpunkt für neue Therapieansätze dar.

Neben der miR-Expression im Gewebe können auch die miR-Serumlevel untersucht werden. Dabei zeigen sich beim NSCLC deutlich höhere miR-205-Serumwerte, als im gesunden Zustand, wobei zudem Unterschiede hinsichtlich des Geschlechtes, Rauchstatus und Alkoholkonsums existieren. So fanden Zhao et al. heraus, dass das männliche Geschlecht, ein positiver Raucherstatus und Alkoholkonsum mit höheren miR-205-Serumwerten assoziiert sind, wohingegen keine signifikante Assoziation mit dem Patienten-Alter, dem pathologischen Typ und TNM-Stadium des Tumors vorhanden ist. Auch die Ergebnisse der, im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten, in-situ-Hybridisierung ergaben keinen klaren Zusammenhang zwischen dem TNM-Stadium des Tumors und der dargestellten miR-Expression.

Hinsichtlich eines therapeutischen Zweckes ist festzuhalten, dass neben dem oben genannten Ansatzpunkt der EMT auch die Antwort des Tumorgewebes auf Chemotherapie, Radiatio oder *targeted therapies* durch die MicroRNA-Expression beeinflusst wird. Der miR-205 konnte dabei als onkogene MicroRNA eine Förderung der Arzneimittelresistenz über verschiedene Proteine, wie beispielsweise PTEN (Tumorsuppressor) oder Survivin (Apoptoseinhibitor) nachgewiesen werden (Wu et al., 2019). Eine Hemmung der MicroRNA-205 wäre somit zum Beispiel eine Möglichkeit, einerseits die Tumorsensitivität in Bezug auf vorhandene Therapien zu erhöhen und andererseits eine Tumprogression und -Metastasierung zu hemmen.

Wie anhand der vorliegenden Untersuchungen gezeigt wurde, stellt die miR-205-5p sowohl ein Target für die Diagnostik als auch für die Therapie dar. Mit der etablierten chromogenen in-situ-Hybridisierung war eine Detektion der miR-205-5p möglich, sodass zum einen das Vorhandensein der MicroRNA im Tumorzellverband lichtmikroskopisch nachgewiesen werden konnte und zum anderen auch dahingehend Rückschlüsse auf die Methode der CISH gezogen werden können, als dass die Optimierung der Parameter für die miR-205-5p und deren Sonde erfolgreich war. Für künftige Untersuchungen wurden somit wesentliche experimentelle Rahmenbedingungen festgelegt. Ein bidirektionaler Einsatz der miR-205-5p, diagnostisch wie auch therapeutisch, im Rahmen der sogenannten „Theranostik“ sollte daher im Zeitalter der onkologischen zielgerichteten Therapien in Betracht gezogen werden.

5.4. Diskussion der Ergebnisse und Funktion der miR-126-3p

In Anbetracht der zuvor beschriebenen Ergebnisse und der Zielsetzung dieser Arbeit, sind gerade für die MicroRNA-126-3p maßgebliche Erfolge erkenntlich, welche im Folgenden mit weiteren Informationen zu deren Funktion zusammen in Kontext gebracht und diskutiert werden sollen.

Die MicroRNA-126-3p ist im Intron 7 des *Epidermal Growth Factor-like Domain-Containing Gene 7* – kurz EGFL7 – auf Chromosom 9q34.3 kodiert (Chen et al., 2021). Eine besonders hohe Expression findet sich im Lungen- und Herzgewebe, eine geringere Expression im Hirn-, Leber- und Nierengewebe (Yang et al., 2012). Auf zellulärer Ebene wird die miR-126-3p besonders in endothelialen Zellen der Blutgefäße exprimiert (Yang et al., 2012; Chen et al., 2014), wodurch die Vermutung naheliegt, dass diese MicroRNA vor allem eine Rolle im Rahmen der Vaskularisation und Angiogenese einnimmt. Die Angiogenese, als Prozess der Neovaskularisation, unter physiologischen wie auch pathologischen Bedingungen, nimmt im Organismus eine entscheidende Rolle ein. Insbesondere solide Tumoren können ohne diesen Vorgang der Gefäßneubildung eine bestimmte Größe nicht überschreiten, da keine adäquate Blut- und Nährstoffversorgung über Mechanismen, wie beispielsweise die Diffusion, aufrechterhalten werden kann. Eine Schlüsselrolle besitzt dabei der *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) (Chen et al., 2014), dessen Signalweg unter anderem durch die MicroRNA 126-3p inhibiert wird, wodurch diese eine regulative Funktion im Rahmen der Angiogenese und Gefäßintegrität einnimmt (Yang et al., 2012). VEGF, der auch als VPF – *vascular permeability factor* – bezeichnet wird, besitzt entscheidende Funktionen hinsichtlich der Vaskulo- und Angiogenese, wie auch der Chemotaxis und Regulation der Vasodilatation sowie Gefäßpermeabilität (Melincovici et al., 2018). So zeigten Yang et al. anhand von Experimenten am Beispiel des Zebrafisches, dass ein Knockdown der miR-126-3p zum Verlust der Gefäßintegrität und zu Blutungen während der embryonalen Entwicklung führt. Chen et al. konnten zudem den Nachweis zwischen der miR-126-Expression und Kapillardichte im Gewebe des Lungenkarzinoms erbringen, wonach die vermehrte miR-Expression mit einem verminderten VEGF-Level und einer geringeren Tumorgroße einhergeht.

Insgesamt konnte die Expression der miR-126-3p in mehreren Tumorentitäten nachgewiesen werden, wobei eine geringe Expression unter anderem mit der Metastasierung des Hepatozellulären Karzinoms, einer schlechten Prognose des Cervix-Karzinoms oder als prognostischem Marker des klarzelligen Nierenzellkarzinoms korreliert wurde (Chen et al., 2015).

Für das NSCLC wurde nachgewiesen, dass das Expressionsniveau signifikant herunterreguliert ist (Sun et al., 2020 und Chen et al., 2015), ebenso fanden sich geringe miR-126-3p-Level im Colon-, Mamma- und Magen-Karzinom (Yang et al., 2012). Eine MicroRNA deren Expression im Krebsgewebe herunterreguliert ist, wird im Allgemeinen in der Rolle eines Tumor-Suppressors gesehen, indem sie physiologisch eine schützende Funktion durch negative Regulation von Onkogenen sowie Kontrollgenen für die Proliferation, Differenzierung, Migration und Apoptose ausübt (Yang et al.,

2012). Bei der miR-126-3p wurden allerdings einerseits geringe Level in bestimmten Tumoren entdeckt und andererseits auch hohe Expressionslevel, unter anderem bei der Akuten Myeloischen Leukämie (Chen et al., 2014), sodass kontroverse Diskussion über die Funktion dieser MicroRNA im Raum stehen und die Vermutung besteht, dass die Funktion von der Krebsentität abhängig ist.

Die klare Herunterregulation im Falle des NSCLC deutet dabei auf eine Tumor-suppressive Funktion im Rahmen des Lungenkarzinoms hin und wird dadurch erhärtet, dass eine geringe miR-126-Expression stark mit einem verkürzten Overall Survival korreliert (Chen et al., 2015; Yang et al., 2012). Diese Tatsache könnte dabei als potenziell prognostischer Biomarker von Nutzen sein.

Prognostisch bedeutsam ist auch das Faktum, dass die miR-126-3p in den Prozess der Metastasierung involviert ist und dabei als einer der Hauptregulatoren für den EMT-Signalweg fungiert. Chen et al. zeigten im Jahr 2021, dass ein Target der miR-126 der PI3K/ AKT/ Snail-Signalweg ist, welcher unter anderem als initialer Schritt der Tumor-Metastasierung gilt. Snail gilt dabei als zuerst entdeckter und wichtigster transkriptionaler Repressor von E-Cadherin (Wu et al., 2010), dessen Verlust als epithelialer Marker entscheidend ist für die Metastasierung. Die MicroRNA führt dabei über die Zytokin-Ebene zu einer reduzierten Rekrutierung mesenchymaler Stammzellen und inflammatorischer Monozyten hin zum Primarius und übt somit einen anti-metastatischen Effekt aus. Die Regulation des TME scheint somit ein wichtiger Angriffspunkt der MicroRNA zur Beeinflussung der Tumorgenese.

Hinsichtlich der zuvor beschriebenen Ergebnisse der chromogenen in-situ-Hybridisierung zur Versuchsreihe der miR-126-3p ist dabei festzustellen, dass trotz einer Herunterregulation im NSCLC die Detektion der miR-126-3p am besten gelang und gerade auch in höheren pT-Stadien einen hohen positiv-Anteil zeigt. Somit scheint diese MicroRNA gerade für das Plattenepithelkarzinom der Lunge von größerer Bedeutung zu sein, da selbst im herabregulierten Expressions-Zustand eine noch äußerst gute Detektion möglich war. Hinsichtlich des Ct-Mittelwertes bei vorangegangenen Untersuchungen dieser MicroRNA im Tumorgewebe, ergab sich ein ähnlich hoher Wert, wie bei der spezifischen Positivkontrolle miR-205-5p, wobei die CISH-Ergebnisse deutliche Unterschiede zugunsten des Nachweises der miR-126-3p zeigen. Daraus abgeleitet scheint die miR-126-3p von den, im Rahmen dieser Arbeit, untersuchten MicroRNAs die höchste Eignung für sowohl diagnostische als auch, unter Einbezug ihrer oben und im Folgenden beschriebenen Funktionen, therapeutische Zwecke aufzuweisen. Die äußerst gute Detektionsrate der miR-126-3p im Rahmen der durchgeführten CISH sollte somit einerseits als Hinweis auf die besondere Relevanz dieser MicroRNA für das bronchiale Plattenepithelkarzinom und andererseits auch als eine Bestätigung der experimentell ermittelten CISH-Bedingungen gewertet werden. Die im Vergleich zur miR-205-5p bessere Visualisierbarkeit, trotz ähnlicher Ct-Mittelwerte der beiden MicroRNAs, sollte ohne weitere Studien diesbezüglich nicht zweifelslos als Hinweis auf eine größere Relevanz gewertet werden, sondern sollte auch dahingehend interpretiert werden, als dass die unterschiedliche Visualisierbarkeit auf individuelle Ansprüche der MicroRNAs sowie deren Sonden hinsichtlich deren Analytik hinweist. Demnach werden mittels des

hier entwickelten Protokolls die individuellen Ansprüche der miR-126-3p noch besser erfüllt als jene der miR-205-5p, sodass für weitere Untersuchungen in diesem Feld wichtige Informationen gewonnen wurden.

Vor dem Hintergrund einer potenziell therapeutischen Bedeutung ist zudem zu erwähnen, dass auch die miR-126-3p die NSCLC-Sensitivität für antikanzerogene Arzneimittel erhöht, indem sie Signalwege, wie den AKT- und ERK-Signalweg beeinflusst. Dadurch steigert sie die Sensitivität von Tyrosinkinase-Inhibitoren, welche als Ansatz beispielsweise den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor beeinflussen (Wu et al., 2019; Chen et al., 2021).

5.5. Diskussion der Ergebnisse und Funktion der miR-200b-3p

Die MicroRNA 200b-3p wird der miR-200-Familie zugeteilt, welche insgesamt aus fünf Mitgliedern besteht: miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141 und miR-429. Die fünf MicroRNAs werden dabei in zwei Cluster unterteilt, die auf chromosomaler Ebene unterschiedlich lokalisiert sind. MicroRNA-200b, -200a und -429 bilden dabei das erste Cluster, welches auf Chromosom 1 lokalisiert ist und miR-200c sowie miR-141 bilden das zweite Cluster auf Chromosom 12 (Klicka et al., 2022). Die genaue Lokalisation der miR-200b-3p ist auf Chromosom 1p36.33 in einer Genregion, welche viele bekannte genomische Amplifikationen in soliden Tumoren, inklusive des Lungenkarzinoms, beinhaltet (Leng et al., 2011). Wie die schon zuvor diskutierte MicroRNA-205, wird auch die MicroRNA-200-Familie als wichtige Größe des epithelialen Phänotyps angesehen (Leng et al., 2011), weshalb auch in dieser experimentellen Arbeit das Vorhandensein dieser MicroRNA im bronchialen Plattenepithelkarzinom weiter eruiert werden soll. Krebsentitäten mit bisher nachgewiesen abnormer miR-200b-3p-Expression sind unter anderem das Magen-, Mamma-, Harnblasen- und Lungenkarzinom (Jin et al., 2020), wobei im NSCLC eine herunterregulierte Expression beobachtet wird (Klicka et al., 2022; Jin et al., 2020). Auch hierbei wird die herunterregulierte Expression als Zeichen für eine Tumor-suppressive Funktion der MicroRNA gewertet.

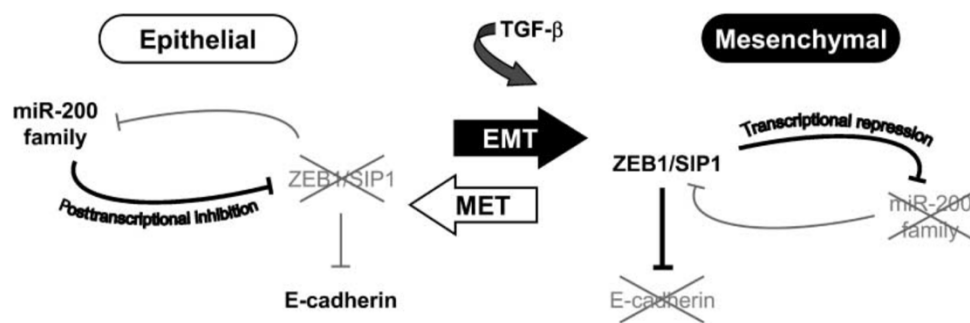
An dieser Stelle sollte erwähnt werden, dass zur Rolle der miR-200b zum Teil inkonsistente Ergebnisse in der Forschung kursieren, sodass es auch einige wenige Stimmen gibt, welche von einer erhöhten Expression im Lungenkarzinom und somit onkogenen Funktion sprechen (Chen et al., 2022).

Durch verschiedene, unabhängige Untersuchungen wurde eruiert, dass die miR-200b-Expression mit der E-Cadherin-Expression in epithelialen Zellen korreliert (Korpál et al., 2008). E-Cadherin spielt als Zelladhäsionsprotein eine zentrale Rolle im Rahmen der Epithelialen-Mesenchymalen Transition (EMT) und sorgt für den Erhalt epithelialer Strukturen. Reguliert wird es dabei unter anderem durch transkriptionale Repressorgene, wie beispielsweise ZEB1, ZEB2, Snail und Slug. Für die Repressorgene ZEB1 und ZEB2 ist dabei bekannt, dass sie direkte Ziele der miR-200-Familie darstellen (Davalos et

al., 2012), wobei bei den MicroRNAs-200b, -200c und -429 der größte Einfluss auf die E-Cadherin-Expression nachgewiesen wurde (Korpal et al., 2008).

Die Epithelial-Mesenchymale Transition ist physiologisch ein zentraler Prozess der embryonalen Entwicklung, welcher unter anderem als Grundlage der Ausbildung der Neuralleiste, des muskuloskelettalen Systems und des peripheren Nervensystems fungiert. Im adulten Organismus besitzen nur noch wenige Zellen die Fähigkeit zur Transition, beispielsweise Keratinozyten im Rahmen der Wundheilung (Korpal et al., 2008). Unter pathologischen Bedingungen spielt die EMT eine Schlüsselrolle für die Tumor-Invasion und -Metastasierung bei multiplen soliden Tumoren, inklusive des Lungenkarzinoms (Leng et al., 2011), wobei die epithelialen Zellen einen mesenchymalen Charakter mit einem motilen und invasiven Phänotyp erlangen. Der Verlust epithelialer und gleichzeitige Gewinn mesenchymaler Eigenschaften bedingt das zelluläre Loslösen vom Primarius, die Invasion in angrenzendes Stroma und schließlich den Eintritt in die systemische Zirkulation und Extravasation mit der Konsequenz einer Mikro- und Makrometastasierung (Davalos et al., 2012).

Die regulierende Einbindung der miR-200b-3p in diesen Prozess der EMT lässt sie zu einem bedeutungsvollen Mitspieler im Verständnis um die Tumor-Entwicklung und -Regulation werden. So konnten Bracken et al. schon 2008 einen reziproken Regulationsmechanismus zwischen der miR-200 und ZEB1/ ZEB2 nachweisen, wobei die negative Regulation der miR-200b durch Beeinflussung der Promotor-Aktivität infolge der ZEB1/ZEB2-Bindung an Enhancer-Boxen nahe der Transkriptions-Start Site erfolgt (siehe Abbildung 13). Ähnlich erfolgt auch die Regulation von E-Cadherin durch ZEB1/ZEB2.



Quelle: Bracken et al., 2008

Abbildung 13: Doppelt-negative Feedback-Schleife zwischen der MicroRNA 200b und ZEB1/ ZEB2

Zum Erhalt einer Gewebestruktur ist ein Gleichgewicht unterschiedlicher Faktoren nötig. In epithelialen Geweben herrschen hohe Level der miR-200, bei gleichzeitig geringen Leveln von ZEB1/ZEB2 mit konsekutiv gesteigerter E-Cadherin-Expression. Anders stellt sich die Situation im mesenchymalen

Setting dar, wo erhöhte ZEB1/ZEB2-Level sowohl die miR-200- als auch die E-Cadherin-Expression inhibieren. Der Wechsel von epithelialem zu mesenchymalem Setting kann unter anderem durch Zytokine, wie den transformierenden Wachstumsfaktor β hervorgerufen werden. Zum Erhalt eines stabilen Zustandes sind demnach die richtigen Level von ZEB1/ZEB2 und miR-200 nötig. Die reziproke Beeinflussung beider Komponenten führt zu einer doppelt-negativen Feedback-Schleife.

Trotz dieser vielversprechenden Nachweise im Rahmen der oben beschriebenen EMT-Regulation ist dabei zu beachten, dass ein daraus abgeleiteter therapeutischer Ansatz sicherlich einen Fortschritt im Kampf gegen die Tumorprogression erbringt, jedoch kein komplettes Blockieren oder gar dauerhaftes Rückgängigmachen einer bereits erfolgten Metastasierung ermöglicht. Dies konnte bereits durch entsprechende Experimente von Korpál et al. (2008) gezeigt werden, woraus sich die Vermutung ergibt, dass weitere, bisher noch unbekannte Faktoren einen Einfluss auf die Tumor-Progression ausüben.

Neben der Einbindung in die EMT-Regulation und den damit verbundenen Metastasierungsprozess wurde auch bei der MicroRNA-200b eine Assoziation zu Arzneimittelresistenzen festgestellt. Die Tatsache, dass das metastasierte NSCLC häufig nicht mehr kurativ zu therapieren ist, wird unter anderem auch durch intrinsische oder erworbene Chemoresistenzen bedingt, wobei insbesondere eine Cisplatin-Resistenz zu vermerken ist (Jin et al., 2020). Im Rahmen verschiedener Untersuchungen konnte dabei eine Verminderung der Chemoresistenz bei entsprechender miR-Expression und sogar eine Verbindung zwischen der Überexpression der MicroRNA-200b und der Steigerung der Cisplatin-Sensitivität nachgewiesen werden (Klicka et al, 2022; Jin et al., 2020). Als dafür verantwortliches Target gilt derzeit das Enzym P70S6K1, eine ribosomale Serin/Threonin-Kinase, welche in zelluläre Prozesse wie das Wachstums, die Proteinbiosynthese oder den Erhalt von Glucose-Leveln eingebunden ist. Die Genregulation dieses Enzyms erfolgt dabei vorwiegend über den mTOR-Signalweg. Untersuchungen von Jin et al. und Klicka et al. zeigten dabei, dass das P70S6K1-Leveln bei Krebspatienten deutlich höher ist, als bei gesunden Patienten und schlossen auf eine onkogene Funktion dieses Enzyms. In einem nächsten Schritt gelang der Nachweis einer direkt negativen Korrelation zwischen miR-200b und P70S6K1, sodass eine Überexpression der MicroRNA zu verringerten Enzym-Leveln führt und durch eine Inhibierung verschiedener nachgeschalteter Signalwege, unter anderem AKT- & ERK-Signalwege, die Tumorzell-Proliferation, Invasion und Metastasierung reduziert wird. Konkret konnte in einem Mausexperiment bestätigt werden, dass eine miR-200b-Überexpression mit verminderten P70S6K1-Leveln einhergeht und der Tumor sowohl in Größe als auch Gewicht der Kontrollgruppe deutlich unterlegen ist, was konsistent zu vorangegangenen in-vitro-Ergebnissen ist. Weiter noch konnten auch für verschiedene andere Wirkstoffe sensitivitätssteigernde Einwirkungen festgestellt werden, beispielsweise für Nintedanib, ein Tyrosinkinase-Inhibitor oder Docetaxel, ein Zytostatikum aus der Gruppe der Taxane.

Ein weiteres entscheidendes Target der miR-200b, welches auch heute schon als therapeutischer Ansatz genutzt wird und dessen Entdeckung 2018 zur Verleihung des Nobelpreises führte, ist PD-L1. Die

Expression dieses wichtigen Oberflächenproteins, welches immunmodulierend wirkt, wird durch die miR-200b supprimiert, was unter anderem zur verstärkten Aktivität zytotoxischer CD8-positiver T-Zellen führt und somit einen regulatorischen Einfluss auf das metastatische Potenzial ausübt (Klicka et al., 2022). Es zeigt sich damit ein weiterer, regulierender Zusammenhang zwischen der MicroRNA und dem TME, wie es auch schon bei den zuvor diskutierten MicroRNAs der Fall war.

Insgesamt betrachtet, sollte festgehalten werden, dass die miR-200b-3p im Rahmen der chromogenen in-situ-Hybridisierung zwar visuell darstellbar ist, sich jedoch deutlich schwieriger in der Detektion präsentiert als beispielsweise die miR-126-3p oder miR-205-5p. Eine genauere Begründung dafür kann an dieser Stelle nicht genannt werden, jedoch sollte ihre Relevanz für das Lungenkarzinom, unter Beachtung oben genannter, bisheriger Forschungsergebnisse, dadurch nicht geschmälert werden. Als eine potenzielle Konsequenz könnte allerdings abgeleitet werden, dass der diagnostische Wert einem potenziellen therapeutischen Wert möglicherweise unterlegen ist oder zumindest die in-situ-Hybridisierung als Diagnostikum weniger geeignet scheint. Wie bei der zuvor diskutierten miR-126-3p schon angesprochen, scheinen die unterschiedlichen MicroRNAs und die verwendeten Sonden individuelle experimentelle Bedingungen für einen optimalen Nachweis zu benötigen, sodass ein standardisiertes Vorgehen zum derzeitigen Forschungsstand schwierig scheint. Die geringere Detektionsrate kann somit als Hinweis dafür gewertet werden, dass weitere Modifikationen und Optimierungsschritte zum optimalen Nachweis der miR-200b-3p erforderlich sind, mit der hier vorliegenden Arbeit jedoch bereits eingrenzende und richtungsgebende Informationen für die Bedingungen festgelegt wurden.

5.6. Diskussion der Ergebnisse und Funktion der miR-31-3p

Im Vergleich zu den bisher beschriebenen und diskutierten MicroRNAs ist über die Rolle der miR-31-3p bisher nur wenig bekannt. Die Ergebnisse bisheriger Forschung, ob die miR-31-3p eine onkogene oder tumorsuppressive Funktion einnimmt, unterscheiden sich dabei in Abhängigkeit der Tumorentität. In Falle des Lungenkarzinoms wird die miR-31-3p derzeit als onkogene MicroRNA angesehen, was durch eine deutlich gesteigerte Expression untermauert wird. Dies konnte beispielsweise in einer Pilotstudie von Rai et al. gezeigt werden, bei der die MicroRNA-Expression im Kondensat der Expirationsluft von Lungenkarzinom-Patienten untersucht wurde. Da das Kollektiv dieser Pilotstudie ausschließlich fortgeschrittene Stadien des Lungenkarzinoms umfasst, wurde dies als Hinweis auf eine spezifische Rolle dieser MicroRNA im Rahmen der Tumorprogression gewertet (Rai et al., 2023).

Die Rolle als onkogene MicroRNA konnte auch im Fall des Plattenepithelkarzinoms des Kopfes und Halses bestätigt werden (Oshima et al., 2021).

Bisherige Untersuchungen an NSCLC-Gewebe, welche als Target-Gen der miR-31-3p das *Forkhead-Box-Gen O1* – kurz FOXO1 – identifizierten (Tumorsuppressor-Gen) und die Einbindung dieser MicroRNA insbesondere in den Prozess der Metastasierung postulierten, mussten widerrufen werden (Zeng et al., 2022).

Wie bereits erwähnt, scheint die Tumorentität für die Funktion der MicroRNA eine entscheidende Rolle zu spielen. So konnte beispielsweise im Falle des Prostatakarzinoms für die miR-31-3p eine Tumorsuppressive Funktion nachgewiesen und als direktes miRNA-Target der Gamma-Aminobuttersäure-B-Rezeptor 2 – kurz GABBR2 – identifiziert werden (Choi et al., 2022).

Hinsichtlich der CISH-Ergebnisse zur Versuchsreihe der miR-31-3p ist festzustellen, dass eine visuelle Darstellung dieser MicroRNA im Plattenepithelkarzinom der Lunge, trotz der Rolle als hochregulierte, onkogene MicroRNA nicht möglich war, was womöglich mit dem recht hohen Ct-Mittelwert > 30 in Verbindung gebracht werden kann. Ordnet man dieses Ergebnis in die Reihe der anderen getesteten, spezifischen MicroRNAs ein, so wäre die Ableitung möglich, dass die miR-31-3p eine doch leicht untergeordnete Relevanz für das Lungenkarzinom aufweist oder zumindest die gewählte Methodik der chromogenen in-situ-Hybridisierung an dieser Stelle bisher keine Eignung besitzt, um deren Funktion und Bedeutung weiter zu eruieren. Die hier durchgeführten Untersuchungen untermauern daher noch einmal deutlich die Abhängigkeit des Detektionsergebnisses von den individuellen Untersuchungsbedingungen der nachzuweisenden MicroRNA, sodass für künftige Experimente eine Anpassung der experimentellen Bedingungen durchgeführt werden sollte. Der fehlenden Darstellbarkeit dieser MicroRNA, im Rahmen der hier etablierten experimentellen Bedingungen, ist demnach zu entnehmen, dass sich die miR-31-3p in ihrem Nachweisverhalten deutlich von den anderen untersuchten MicroRNAs unterscheidet, was wiederum Rückschlüsse auf eine Sonderstellung dieser RNA im Stoffwechsel zuließe und weiterführende Untersuchungen erfordert.

6. Fazit

Circa 85% der menschlichen Tumoren sind von epithelialen Zellen ausgehend (Davalos et al., 2012). Als ein Vertreter, mit nach wie vor schlechter Prognose, gilt das Plattenepithelkarzinom der Lunge, welches daher als zentrales Forschungsobjekt in dieser experimentellen Arbeit ausgewählt wurde. Im Mittelpunkt stand dabei die nähere Erforschung der tumorösen MicroRNA-Ausstattung.

Die Entwicklung des Lungenkarzinoms ist dabei sowohl an verschiedene Umweltfaktoren als auch an die Genetik gebunden (Zhao et al., 2022), sodass beiderlei Beeinflussung theoretisch eine Prognoseverbesserung ermöglicht. Insgesamt sind mehr als 90% der Krebs-bedingten Mortalität der Metastasierung geschuldet (Wang et al., 2016), sodass diese einen entscheidenden Ansatzpunkt darstellt. Als ein neues Ziel der molekularen Grundlagenforschung gelten die MicroRNAs, nicht-kodierende RNAs, die insgesamt mehr als 90% der gesamten humanen RNA ausmachen (Chen et al., 2022) und somit vermutlich noch einen großen unbekannten Einfluss in der gesamten Homöostase des Organismus besitzen.

Mehr als 50% der miR-kodierenden Gene befinden sich dabei in Krebs-assoziierten Gen-Regionen oder Fragile Sites (Sun et al., 2020), sodass deren Rolle hinsichtlich der Karzinogenese augenscheinlich greifbar nah scheint. Die Einbindung in vielerlei physiologische Regulationsmechanismen lässt dabei ohne Weiteres den Schluss zu, dass eine Dysregulation wiederum pathologische Ereignisse, wie z.B. chronische Inflammationsgeschehen oder die Onkogenese, bedingt bzw. beschleunigt. So wurde bisher ein Einfluss der miR-Dysregulation auf die Krebsproliferation, Angiogenese, Metastasierung und Entwicklung von Arzneimittelresistenzen nachgewiesen, indem die Interaktion maligner Tumorzellen mit nicht-malignen stromalen Zellen und nichtzellulären Komponenten, im Rahmen des Tumor Microenvironments, beeinflusst wird (Lee et al., 2019). Die Tatsache, dass unterschiedliche Dysregulationen und Funktionen der MicroRNA innerhalb einer Tumorentität vermerkt wurden, scheint dabei darauf hinzudeuten, dass möglicherweise die Tumor-Stadien und -Subtypen mit unterschiedlichem Tumor Microenvironment und molekularen Hintergründen ausgestattet sind und die Interaktion zwischen MicroRNA und TME eine entscheidende Rolle spielt (Chen et al., 2022). Weiter noch besteht die Vermutung, dass auch eine direkte Interaktion der MicroRNA mit Proto-Onkogenen und Tumor-Suppressor-Faktoren besteht (Sun et al., 2020). Die miR-Expression selbst scheint spezifisch für verschiedene Gewebetypen und Zellen zu sein, sodass eine Abhängigkeit von der Zell- bzw. Gewebefunktion wahrscheinlich erscheint (Zhao et al., 2022).

In dieser Arbeit wurden daher unter anderem die miR-205-5p und miR-126-3p näher untersucht, welche aufgrund der Spezifität für das Plattenepithel bzw. die Endothelzellen im Rahmen des bronchialen Plattenepithelkarzinoms eine zentrale Rolle einnehmen. Die durchaus große Anzahl positiver Detektionsergebnisse demonstriert den Erfolg der durchgeführten Experimente, was die Etablierung und Optimierung des Nachweisprotokolls der chromogenen in-situ-Hybridisierung im Tumorgewebe angeht

und ermöglicht gleichzeitig den entscheidenden Schritt vom Labor in die angewandte Klinik, indem wichtige Rahmenbedingungen sowie auch Einschränkungen, beispielsweise für die Diagnostik, weiter festgesteckt werden konnten. Als entscheidender Fortschritt ist hier zu vermerken, dass eine Zelltyp-spezifische Analyse nun im Tumorgewebe etabliert und nicht an Gewebekomponenten oder einzelnen Zelllinien durchgeführt wurde. Bisherige Untersuchungen arbeiteten oftmals mit gereinigten miRNA-Isolaten aus NSCLC-Gewebe, wie beispielsweise Chen et al. (2015) oder Patienten-Serum, wie z.B. Zhao et al.. Dies beeinflusst die Untersuchungsergebnisse dahingehend, dass zwar deutlich weniger Störfaktoren im Ansatz vorhanden sind, jedoch auch die Abbildbarkeit und Übertragbarkeit reduziert ist. Des Weiteren wurden die meisten Studien zur MicroRNA bisher mit Varianten der Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt, welche den quantitativen Nachweis zum Vorhandensein bestimmter MicroRNAs liefert, jedoch weitergehende Fragestellungen hinsichtlich der Funktion der MicroRNA offenlässt. Um genau diesen Fragestellungen auf den Grund zu gehen ist es entscheidend, die in-vivo Lokalisation im Tumorgewebe darzustellen, wozu die in-situ-Hybridisierung bestens geeignet ist (Paulsen et al., 2021). Dieser Nachweis, mit dem nun die MicroRNA auf eine für jeden sichtbare Ebene gebracht wurde, konnte mit den vorliegenden Ergebnissen nun für mehrere spezifische MicroRNAs geliefert. Um dies mit den Worten eines berühmten Mannes zu erklären: „Sehen verändert unser Wissen. Wissen verändert unser Sehen.“ (Jean Piaget, Schweizer Biologe).

Die Tatsache, dass sich die Visualisierbarkeit dabei zwischen den einzelnen Versuchsreihen unterscheidet verdeutlicht dabei, dass es zumindest zum jetzigen Zeitpunkt kein standardisiertes Prozedere für die miR-Gewinnung gibt und einige Abhängigkeiten, unter anderem der Gewebetyp oder die Fixierungszeit, existieren. Die Optimierung der individuellen Bedingungen muss daher vermutlich für jede MicroRNA-Probe einzeln vorgenommen werden, was die heterogenen Ergebnisse der einzelnen in-situ-Analysen dieser Untersuchungen untermauern. Weiter noch wird die Detektion durch die Tatsache, dass oft nur geringe Mengen an MicroRNA vorhanden sind, erschwert, sodass optimale experimentelle Bedingungen und diesbezüglich jede neue Information wertvoll für weitergehende Forschungsprojekte ist (Kasai et al., 2016). Material- und Technik-bedingte Unterschiede, zum Beispiel verschiedene Chargen bei der verwendeten Protease, können dabei Unterschiede in Bezug auf die Detektionsraten deutlich verstärken und bedingen eine gewisse Varianz bei vergleichbaren Untersuchungsbedingungen (Paulsen et al., 2021). Des Weiteren sind Fixierungsbedingungen, Archivierungszeiten sowie die Vorbehandlung der Proben - Proteolyse versus Hitze-induzierter miR-Gewinnung – einige zu nennende Schrauben, an denen auch künftig noch im Rahmen weiterer Versuche gedreht werden kann, um beispielsweise die Detektion der miR-31-3p zu ermöglichen.

Mit der Entdeckung und Erforschung der MicroRNA wurde eine neue Tür aufgestoßen. Ob der Nutzen letztlich im Diagnostischen, Therapeutischen oder Prognostischen liegt, ist derzeit nicht zu sagen, was jedoch feststeht, ist, dass das Verständnis um die Komplexität des menschlichen Organismus mit der MicroRNA erneut unterstrichen wurde.

Als Ausblick für einen potenziellen therapeutischen Einsatz soll an dieser Stelle noch kurz die Beeinflussung von Arzneimittelresistenzen erwähnt werden. Heutzutage tauchen global gesehen immer häufiger Probleme bzw. Engpässe durch intrinsische oder erworbene Arzneimittelresistenzen auf. Die Erforschung und Herstellung neuer Wirkstoffe zum Umgehen dieser Resistenzmechanismen verbraucht dabei hohe Summen und ist oft wenig bis nicht rentabel, sodass nur ein geringfügiger Fortschritt stattfindet. Anstelle der Suche nach Umgehungsmöglichkeiten bestehender Resistenzen scheint dabei die Transition resistenter Zellen in sensitive Zellen ein attraktives Forschungsziel. Viele Arzneimittel finden bei unterschiedlichen Erkrankungen Einsatz, beispielsweise potente Zytostatika wie Cisplatin oder Docetaxel, welche beim Lungenkarzinom, aber auch beim Hoden-, Mamma- und Prostatakarzinom feste Therapiebestandteile darstellen. Zunehmende Engpässe durch Resistenzen schmälern die Prognose der Patienten. Eine Beeinflussung der zellulären Chemosensitivität, wie sie beispielsweise bei der MicroRNA 200b-3p oder 126-3p schon bemerkt wurde, könnte demnach für eine ganze Reihe von betroffenen Patienten in der Zukunft die Prognose entscheidend beeinflussen.

Schlussfolgernd ist festzuhalten, dass sowohl für die miR-205-5p als auch für die miR-126-3p sehr gute Bedingungen etabliert werden und die Auswertung sowie Diskussion der Ergebnisse sicherlich eine Eignung dieser MicroRNAs im Kontext der Theranostik aufzeigen konnten. Für die Detektion der miR-200b-3p konnten zudem entscheidende, richtungsgebende Rahmenbedingungen festgesetzt werden, die zukünftigen Unternehmungen diesbezüglich eine gute Basis darstellen. Darüber hinaus liefern die negativen Detektionsraten im Zuge der Versuchsreihe um die miR-31-3p ebenso eine wichtige Erkenntnis. Sie lassen Rückschlüsse darauf zu, dass sich die miR-31-3p deutlich von den anderen, hier untersuchten, MicroRNAs hinsichtlich der individuellen Bedingungen zur in-situ-Hybridisierung unterscheidet und damit einhergehend möglicherweise auch im Organismus eine andersartige Funktionsweise besitzt. Für weitere Studien können daher einige Bedingungen, die im hier vorliegenden etablierten Protokoll Anwendung finden, frühzeitig angepasst werden.

Resümierend ist demnach zu erwähnen, dass die eingangs genannte, übergeordnete Zielsetzung dieser Arbeit – die zelltyp-spezifische Visualisierung durch Etablierung der chromogenen in-situ-Hybridisierung von MicroRNA in komplexen Gewebeproben von Plattenepithelkarzinomen der Lunge – vollständig erfüllt und damit das Verständnis für die MicroRNA deutlich erweitert werden konnte. Zudem konnte dieses Ziel um die in-situ-Analyse verschiedener, für das bronchiale Plattenepithelkarzinom spezifischer, MicroRNAs erweitert werden.

7. Literaturverzeichnis

1. Abdipourbozorgbaghi M, Vancura A, Radpour R, Haeffliger S (2024) Circulating miRNA panels as a novel non-invasive diagnostic, prognostic, and potential predictive biomarkers in non-small cell lung cancer (NSCLC). *British Journal of Cancer* 131:1350-1362. doi: 10.1038/s41416-024-02831-3
2. 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. Aufl. WILEY-VCH, Weinheim, pp 141-156
3. Ashirbekov Y, Khamitova N, Satken K, Abaildayev A, Pinskiy I, Yeleussizov A, Yegenova L, Kairanbayeva A, Kadirshe D, Utegenova G, Jainakbayev N, Sharipov K (2024) Circulating MicroRNAs as Biomarkers for the Early Diagnosis of Lung Cancer and Its Differentiation from Tuberculosis. *Diagnostics (Basel)* 14:2684. doi: 10.3390/diagnostics14232684
4. Bassand K, Metzinger L, Naïm M, Mouhoubi N, Haddad O, Assoun V, Zaïdi N, Sainte-Catherine O, Butt A, Guyot E, Oudar O, Laguillier-Morizot C, Sutton A, Charnaux N, Metzinger-Le Meuth V, Hlawaty H (2021) miR-126-3p is essential for CXCL12-induced angiogenesis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 25:6032-6045. doi: 10.1111/jcmm.16460
5. Bohle RM, Schnabel PA (2016) Grading von Lungenkarzinomen. *Pathologe* 37:314-319. doi: 10.1007/s00292-016-0175-7
6. 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 Research* 68:7846-7854. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1942
7. 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. doi: 10.18632/oncotarget.2662
8. Chen Q, Chen S, Zhao J, Zhou Y, Xu L (2021) MicroRNA-126: A new and promising player in lung cancer (Review). *Oncology Letters* 21:35. doi: 10.3892/ol.2020.12296
9. Chen S, Tu Y, Yuan H, Shi Z, Guo Y, Gong W, Tu S (2022) Regulatory functions of miR-200b-3p in tumor development (Review). *Oncology Reports* 47:96. doi: 10.3892/or.2022.8307

10. 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. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 8:14983-14988. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26823832/> (Zugriff am: 17.04.2023)
11. Choi S, Lee S, Han YH, Choi J, Kim I, Lee J, An HJ (2022) miR-31-3p functions as a tumor suppressor by directly targeting GABBR2 in prostate cancer. *Frontiers in Oncology* 12:945057. doi: 10.3389/fonc.2022.945057
12. 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. doi: 10.1038/onc.2011.383
13. Deutsches Krebsforschungszentrum DKFZ (ed) (2023) Lungenkrebs (Bronchialkarzinom). URL: <https://www.krebsinformationsdienst.de/tumorarten/lungenkrebs/index.php> (Zugriff am: 15.04.2023)
14. Eberhardt WEE, Metzenmacher M (2014) Plattenepithelkarzinome der Lunge: Völlig neue Therapieprinzipien. *Dtsch Arztebl International* 111:8. URL: <https://www.aerzteblatt.de/archiv/163350/Plattenepithelkarzinome-der-Lunge-Voellig-neue-Therapieprinzipien#literatur> (Zugriff am: 20.07.2023)
15. Exiqon (ed) (2011) miRCURY LNA™ microRNA ISH Optimization Kit (FFPE). Instruction manual v2.0
16. Global Cancer Observatory der World Health Organization (ed) (2022) Fact Sheet Lung. URL: <https://gco.iarc.who.int/media/globocan/factsheets/cancers/15-trachea-bronchus-and-lung-fact-sheet.pdf> (Zugriff am: 16.04.2023)
17. Griesinger F, Absenger G, Bleckmann A, Eberhardt W, Eichhorn M, Früh M, Gautschi O, Hilbe W, Hoffmann H, Huber RM, Kraywinkel K, Loges S, Pöttgen C, Reck M, Reinmuth N, Sebastian M, Siehl JM, Waller C, Wolf J, Wörmann B in Kooperation mit der Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie (2022) Lungenkarzinom, nicht-kleinzellig (NSCLC). *Onkopedia Leitlinien*. URL: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/lungenkarzinom-nicht-kleinzellig-nsclc/@@guideline/html/index.html> (Zugriff am: 27.04.2023)

18. Herold G (2023) Innere Medizin. Lungenkarzinom. Köln
19. Horn F (2020) RNA. In: Horn F (ed) Biochemie des Menschen. 8., überarbeitete und erweiterte Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, pp 291-300. doi: 10.1055/b0000000082
20. Institute of Pathology Heidelberg (ed) (2017) Lungenkarzinom.
URL: https://eliph.klinikum.uni-heidelberg.de/texte_s/651/bronchialkarzinom (Zugriff am: 22.04.2023)
21. Jin HF, Wang JF, Song TT, Zhang J, Wang L (2020) MiR-200b Inhibits Tumor Growth and Chemoresistance via Targeting p70S6K1 in Lung Cancer. *Frontiers in Oncology* 10:643. doi: 10.3389/fonc.2020.00643
22. Kasai A, Kakihara S, Miura H, Okada R, Hayata-Takao A, Hazama K, Niu M, Shintani N, Nakazawa T, Hashimoto H (2016) Double In situ Hybridization for MicroRNAs and mRNAs in Brain Tissues. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 9:126. doi: 10.3389/fnmol.2016.00126
23. Klicka K, Grzywa TM, Mielniczuk A, Klinke A, Włodarski PK (2022) The role of miR-200 family in the regulation of hallmarks of cancer. *Frontiers in Oncology* 12:965231. doi: 10.3389/fonc.2022.965231
24. Korpál 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. *Journal of Biological Chemistry* 283:14910-14914. doi: 10.1074/jbc.C800074200
25. Koshkin AA, Singh SK, Nielsen P, Rajwanshi VK, Kumar R, Meldgaard M, Olsen CE, Wengel J (1998) LNA (Locked Nucleic Acids): Synthesis of the adenine, cytosine, guanine, 5-methylcytosine, thymine and uracil bicyclonucleoside monomers, oligomerisation, and unprecedented nucleic acid recognition. *Tetrahedron* 54:3607-3630. doi: 10.1016/S0040-4020(98)00094-5
26. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75:843-854. doi: 10.1016/0092-8674(93)90529-y

27. Lee SS, Cheah YK (2019) The Interplay between MicroRNAs and Cellular Components of Tumour Microenvironment (TME) on Non-Small-Cell Lung Cancer (NSCLC) Progression. *Journal of Immunology Research* 2019:3046379. doi: 10.1155/2019/3046379
28. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF) (2022) Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms. Langversion 2.1. AWMF-Registernummer: 020/007OL.
URL: <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/lungenkarzinom/> (Zugriff am: 24.05.2023)
29. Leng S, Bernauer AM, Zhai R, Tellez CS, Su L, Burki EA, Picchi MA, Stidley CA, Crowell RE, Christiani DC, Belinsky SA (2011) Discovery of common SNPs in the miR-205/200 family-regulated epithelial to mesenchymal transition pathway and their association with risk for non-small cell lung cancer. *International Journal of Molecular Epidemiology and Genetics* 2:145-155.
URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3110389/> (Zugriff am: 05.05.2023)
30. Lu TX, Rothenberg ME (2018) MicroRNA. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 141:1202-1207. doi: 10.1016/j.jaci.2017.08.034
31. Lüllmann-Rauch R, Asan E (2019) Taschenlehrbuch Histologie. 6. Aufl. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
32. Melincovici CS, Boşca AB, Şuşman S, Mărginean M, Mişu C, Istrate M, Moldovan IM, Roman AL, Mişu CM (2018) Vascular endothelial growth factor (VEGF) - key factor in normal and pathological angiogenesis. *Romanian Journal of Morphology and Embryology* 59:455-467.
URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30173249/> (Zugriff am: 18.04.2023)
33. Moch H, Höfler HK, Lax S, Moll R, Tannapfel A, Zimmermann DR (2019) Tumorerkrankungen. Pathologie und Tumordiagnostik. In: Höfler G, Kreibe H, Hoch M (eds) Pathologie. Das Lehrbuch. 6. Aufl. Elsevier & Urban und Fischer, München, pp 176-178
34. Obika S, Nanbu D, Hari Y, Morio KI, In Y, Ishida T, Imanishi T (1997) Synthesis of 2'-O,4'-C-methyleneuridine and -cytidine. Novel bicyclic nucleosides having a fixed C3'-endo sugar puckering. *Tetrahedron Letters* 38:8735-8738. doi: 10.1016/S0040-4039(97)10322-7
35. Oshima S, Asai S, Seki N, Minemura C, Kinoshita T, Goto Y, Kikkawa N, Moriya S, Kasamatsu A, Hanazawa T, Uzawa K (2021) Identification of Tumor Suppressive Genes Regulated by miR-

- 31-5p and miR-31-3p in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *International Journal of Molecular Sciences* 22:6199. doi: 10.3390/ijms22126199
36. Paulsen IW, Bzorek M, Olsen J, Grum-Schwensen B, Troelsen JT, Pedersen OB (2021) A novel approach for microRNA in situ hybridization using locked nucleic acid probes. *Scientific Reports* 11:4504. doi: 10.1038/s41598-021-83888-5
 37. Pelaj P (2022) Tumorklassifikation. *Journal Onkologie*.
URL: https://www.journalonko.de/thema/lesen/who_klassifikation (Zugriff am: 24.05.2023)
 38. Pelaj P (2022) NSCLC. Ein Überblick über das nicht-kleinzellige Lungenkarzinom. *Journal Onkologie*.
URL:
https://www.journalonko.de/thema/lesen/ueberblick_ueber_das_nicht_kleinzellige_lungenkarzinom_nscld (Zugriff am: 24.05.2023)
 39. Pistorius S (2022) Chirurgische Onkologie. In: Largiadèr F, Saeger H, Keel M, Bruns C (eds) *Checkliste Chirurgie*. 12., unveränderte Aufl. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, doi: 10.1055/b0000000803
 40. Qiagen (ed) (o.J.) The Power of LNA.
URL: <https://www.qiagen.com/de-de/knowledge-and-support/knowledge-hub/technology-and-research/lna-technology/power-of-lna/what-is-lna/lna-powerful-research-tool> (Zugriff am: 28.12.2024)
 41. Radtke R (2024) Zahl der Krebstodesfälle weltweit nach Krebsart im Jahr 2022. *Statista*.
URL: <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/286584/umfrage/zahl-der-krebstodesfaelle-nach-krebsart-weltweit/> (Zugriff am: 30.12.2024)
 42. Rai D, Pattnaik B, Bangaru S, Bhatraju NK, Tak J, Kashyap S, Verma U, Vadala R, Yadav G, Dhaliwal RS, Agrawal A, Guleria R, Mohan A (2023) MicroRNAs in exhaled breath condensate: A pilot study of biomarker detection for lung cancer. *Cancer Treatment and Research Communications* 35:100689. doi: 10.1016/j.ctarc.2023.100689
 43. Ranganathan K, Sivasankar V (2014) MicroRNAs – Biology and clinical applications. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology* 18:229-234. doi: 10.4103/0973-029X.140762

44. Reck M, Dettmer S, Kauczor HU, Kaaks R, Reinmuth N, Vogel-Claussen J (2023) Lungenkrebs-Screening mittels Niedrigdosis-Computertomografie. Aktueller Stand in Deutschland. Dtsch Arztebl International 120:387-92. doi: 10.3238/arztebl.m2023.0099
45. Riede UN, Kayser G, Freudenberg N, Matthys H (2017) Lunge. Plattenepithelkarzinom. In: Riede UN, Werner M (eds) Allgemeine und Spezielle Pathologie. 2. Aufl. Springer-Verlag GmbH Deutschland, p 431, doi: 10.1007/978-3-662-48725-9_34
46. Savic Prince S, Bubendorf L (2019) Lunge. Tumoren der Lunge. In: Höfler G, Kreipe H, Hoch M (eds) Pathologie. Das Lehrbuch. 6. Aufl. Elsevier & Urban und Fischer, München, pp 512-519
47. Sun L, Zhou H, Yang Y, Chen J, Wang Y, She M, Li C (2020) Meta-analysis of diagnostic and prognostic value of miR-126 in non-small cell lung cancer. Bioscience Reports 40:BSR20200349. doi: 10.1042/BSR20200349
48. 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 and Disease 7:e2517. doi: 10.1038/cddis.2016.412
49. Wang YX, Lang F, Liu YX, Yang CQ, Gao HJ (2015) In situ hybridization analysis of the expression of miR-106b in colonic cancer. International Journal of Clinical and Experimental Pathology 8:786-792.
URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25755775/> (Zugriff am: 21.06.2023)
50. Weber M (2015) Einführung in die TNM-Klassifikation. Universität Bern, Institut für Pathologie, Krebsregister des Kanton Bern.
URL: <https://www.patologi.com/TNM%20Klassifikation.pdf> (Zugriff am: 26.05.2023)
51. Wolf M, Bleckmann A, Eberhardt W, Eichhorn M, Früh M, Gautschi O, Griesinger F, Hilbe W, Hoffmann H, Kraywinkel K, Loges S, Pirker R, Pöttgen C, Reck M, Reinmuth N, Sebastian M, Waller C, Wolf J (2023) Lungenkarzinom, kleinzellig (SCLC). Onkopedia Leitlinien.
URL: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/lungenkarzinom-kleinzellig-sclc/@@guideline/html/index.html> (Zugriff am: 25.04.2023)
52. Wu KL, Tsai YM, Lien CT, Kuo PL, Hung AJ (2019) The Roles of MicroRNA in Lung Cancer. International Journal of Molecular Sciences 20:1611. doi: 10.3390/ijms20071611

53. Wu Y, Zhou BP (2010) Snail: More than EMT. *Cell Adhesion & Migration* 4:199-203. doi: 10.4161/cam.4.2.10943
54. 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. doi: 10.1371/journal.pone.0042978
55. Zeng X, Liu D, Peng G, Liu J, Yang H (2022) MicroRNA-31-3p Promotes the Invasion and Metastasis of Non-Small-Cell Lung Cancer Cells by Targeting Forkhead Box 1 (FOXO1). *Computational and Mathematical Methods in Medicine* 2022:4597087. doi: 10.1155/2022/4597087
56. Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut (ed) (2022) Lungenkrebs. URL: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Lungenkrebs/lungenkrebs_node.html (Zugriff am: 16.04.2023)
57. Zhao YL, Zhang JX, Yang JJ, Wei YB, Peng JF, Fu CJ, Huang MH, Wang R, Wang PY, Sun GB, Xie SY (2022) MiR-205-5p promotes lung cancer progression and is valuable for the diagnosis of lung cancer. *Thoracic Cancer* 13:832-843. doi: 10.1111/1759-7714.14331

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich den nachstehenden Personen meinen besonderen Dank aussprechen, ohne deren Mithilfe die Anfertigung dieser Promotionsschrift nicht zustande gekommen wäre:

Mein besonderer Dank gilt zunächst meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. R. M. Bohle, für die Betreuung dieser Arbeit und für die Möglichkeit zur Promotion an seinem Institut, trotz eines engen zeitlichen Rahmens. Die persönliche Betreuung mit zahlreichen Gesprächen, aber auch die Stunden des gemeinsamen Mikroskopierens, an einigen Abenden zu Beginn meiner Arbeit, werden mir immer als beispielhafte Betreuung in Erinnerung bleiben. Aus unseren Besprechungen bin ich stets ermutigt und motiviert herausgegangen.

Danken möchte ich außerdem meiner Betreuerin Frau Dr. rer. nat. Elke Ebert, dass Sie sich zur Betreuung der Dissertation bereit erklärt und mir die Formalia einer Dissertation an der Universitätsklinik des Saarlandes nähergebracht hat.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Meike Williams, mit der ich gemeinsam viele Stunden und Tage meiner Semesterferien im Labor verbracht habe und die mir jederzeit weitergeholfen hat, auch außerhalb ihrer regulären Arbeitszeiten. Der fachliche, wie auch persönliche Austausch hat uns einige Stunden der Wartezeit subjektiv verkürzt.

Ein weiterer Dank gilt Herrn Dr. med. Johannes Hohneck, der mir Daten seiner Promotionsschrift zur Verfügung gestellt hat.

Ein großer Dank gilt meinen Eltern, die mich in jeder Phase der Promotion moralisch unterstützt haben, sich zeitweise mit meiner Übellaunigkeit infolge anfänglicher Misserfolge, aber auch der Thematik selbst auseinandersetzen mussten.

Besonders möchte ich meinem Vater für das kritische Korrekturlesen dieser Arbeit danken, aber vor allem auch für die vielen fachlichen Gespräche und Diskussionen, in denen ich meine Gedanken sowie Ideen abends und am Telefon mit Ihm besprechen durfte und stets einen guten Rat erhielt.

Meiner Mutter möchte ich besonders für die emotionale Unterstützung danken, für Aufmunterung und Beistand in schwierigen Zeiten, aber auch für die geteilte große Freude bei Erfolgen. Nicht zu vergessen ist auch ihre gute Verpflegung, denn mit leerem Magen denkt es sich bekanntlich schlecht und Zeit war oftmals Mangelware.

Ohne Euch hätte ich das alles nicht so geschafft.

9. Lebenslauf

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

