

Aus der Klinik für Visceral-, Thorax- und Gefäßchirurgie

Geschäftsführender Direktor:
Prof. Dr. med. Detlef K. Bartsch

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Die Expression tumorkorrelierter mikroRNAs und ihrer potenziellen
Ziel-Gene APAF1 und HMGA2 in Lungenkarzinomen und
Lymphknotenmetastasen**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Jannis Tieck aus Ahaus
Marburg, 2022

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am: 25.05.2022

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin

Dekanin: Prof. Dr. Denise Hilfiker-Kleiner

Referent: Prof. Dr. Andreas Kirschbaum

1. Korreferentin: Prof. Dr. Anja Lorch

Originaldokument gespeichert auf dem Publikationsserver der
Philipps-Universität Marburg
<http://archiv.ub.uni-marburg.de>



Dieses Werk bzw. Inhalt steht unter einer
Creative Commons
Namensnennung
Keine kommerzielle Nutzung
Weitergabe unter gleichen Bedingungen
3.0 Deutschland Lizenz.

Die vollständige Lizenz finden Sie unter:
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/de/>

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	1
2	Einleitung	2
2.1	Das Lungenkarzinom	2
2.1.1	Epidemiologie, Ätiologie und Unterteilung.....	2
2.1.2	Stadieneinteilung des Lungenkarzinoms	3
2.1.3	Karzinogenese	8
2.2	miRNA	10
2.2.1	Definition und Geschichte	10
2.2.2	Nomenklatur.....	11
2.2.3	Biogenese der miRNA	12
2.2.4	Funktion der miRNA durch Regulation der Target Gene	13
2.2.5	miRNA Expression in Karzinomen und LK Metastasen.....	14
2.3	Fragestellung und Zielsetzung	16
3	Material und Methoden	17
3.1	Material.....	17
3.1.1	Geräte.....	17
3.1.2	Verbrauchsmaterial	17
3.1.3	Vorgefertigte Reagenzsysteme (Kits).....	18
3.1.4	Primer	18
3.1.5	Software	18
3.2	Methoden.....	19
3.2.1	Patienten und Proben.....	19
3.2.2	Mikrodissektion	20
3.2.3	RNA Isolierung und Nano Drop Messung	20
3.2.4	Pool Erstellung und cDNA Herstellung.....	21
3.2.5	Datenbank Analyse.....	22
3.2.6	Real-time PCR	23

3.2.7	Referenzen für miRNA und mRNA Messungen.....	26
3.2.8	Statistische Analyse	26
4	Ergebnisse	27
4.1	Demographische Darstellung des Patientenkollektivs und Tumorstaging.....	27
4.2	Nano Drop Messungen.....	30
4.3	Real Time PCR der miRNA.....	31
4.3.1	Expression von hsa-miR-19a.....	31
4.3.2	Expression von hsa-miR-19b.....	32
4.3.3	Expression von hsa-miR-30a-5p.....	33
4.3.4	Expression von hsa-miR-21-1.....	34
4.3.5	Expression von hsa-let-7b-5p	35
4.3.6	Expression von hsa-let-7f-5p	36
4.3.7	Zusammenfassung der miRNA Real-time PCR Ergebnisse	37
4.4	Real-time PCR der Target Gene	38
4.4.1	Expression von <i>APAF1</i>	38
4.4.2	Expression von <i>HMGA2</i>	39
4.4.3	Zusammenfassung der Target Real-time PCR Messung.....	39
4.5	Korrelation von miRNAs und Targets.....	40
5	Diskussion.....	42
5.1	Untersuchung von miRNA aus FFPE-Gewebe	42
5.2	Expression von hsa-miR-19 in NSCLC Gewebe.....	43
5.3	Expression von hsa-miR-30a-5p in NSCLC Gewebe	44
5.4	Expression von hsa-miR-21-1 in NSCLC Gewebe	46
5.5	Expression von hsa-Let-7 in NSCLC Gewebe.....	48
5.6	Expression von <i>APAF1</i> und <i>HMGA2</i> in NSCLC Gewebe.....	49
5.7	Expression der miRNAs und Targets in LK Metastasen Gewebe.....	50
5.8	Korrelation zwischen miRNAs und Targets.....	53
5.9	MiRNAs als molekularpathologisches Co-Diagnostikum und -therapeutikum	55

5.10	Zusammenfassung der Diskussion.....	56
6	Zusammenfassung.....	59
7	Summary	61
8	Tabellenverzeichnis:.....	63
9	Abbildungsverzeichnis:.....	64
10	Literaturverzeichnis.....	65
11	Anhang	80
11.1	Lebenslauf	80
11.2	Verzeichnis der akademischen Lehrer/-innen	81
11.3	Danksagung	82
11.4	Ehrenwörtliche Erklärung	83

1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
APAF1	Apoptotic protease activating factor 1
AR	Absorptionsrate Ratio
Bzw.	Beziehungsweise
Ca	Carcinoma/ Karzinom
C. elegans	Caenorhabditis elegans
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FFPE-Gewebe	Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe
HE	Hamatoxylin-Eosin
HKG	Housekeeping Gene
HMGA2	High mobility group A2
IASLC	International Association for the study of lung cancer
LK	Lymphknoten
Met	Metastase
miRNA	microRNA
mRNA	Messenger-RNA
NSCLC	Non-small cell lung cancer/ nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom
Pre-miRNA	Precursor miRNA
Pri-miRNA	Primär miRNA
qPCR	Real-time Polymerase Kettenreaktion
RISC	RNA induced slicing complex
RNA	Ribonukleinsäure
RRN18S	Ribosomale RNA 18S
SCLC	Small cell lung cancer
snRNA	Small nuclear riconucleic acid/ kleine nukleäre Ribonukleinsäure
UICC	Union for international cancer control
Vs.	Versus/ gegen
Xpo5	Exportin-5

2 Einleitung

2.1 Das Lungenkarzinom

2.1.1 Epidemiologie, Ätiologie und Unterteilung

Weltweit ist Lungenkrebs die am häufigsten diagnostizierte Krebsart bei Männern und die zweithäufigste nach dem Brustkrebs bei Frauen (Bade und Dela Cruz 2020). Lungenkrebs macht somit insgesamt etwa 13% aller diagnostizierten Krebsdiagnosen aus. Zudem steht Lungenkrebs bei Männern an erster und bei Frauen an zweiter Stelle bei den am häufigsten zum Tode führenden Krebserkrankungen (Torre et al. 2015; Bade und Dela Cruz 2020).

Auch in Deutschland gehört das Bronchialkarzinom zu den häufigsten Krebserkrankungen. 2016 gab es in Deutschland etwa 57 000 Neuerkrankungen, wobei zu ungefähr 60% Männer betroffen waren. Die Inzidenz des Bronchialkarzinoms lag 2016 in Deutschland für Frauen bei 31,4 und für Männer bei 57,5. Die relative 5-Jahres Überlebensrate betrug 21% bei Frauen und 15% bei Männern, die Mortalität lag bei 22,6 für Frauen und 45,7 bei Männern. Somit verursachte das Lungenkarzinom in etwa 45 000 Sterbefälle pro Jahr allein in Deutschland (Zentrum für Krebsregisterdaten 2019).

Ätiologisch gilt das Rauchen von Nikotin als Hauptrisikofaktor für das Lungenkarzinom (Malhotra et al. 2016; Bade und Dela Cruz 2020). Seit Ende der 1990er Jahre entwickelten sich die oben genannten Erkrankungs- und Sterberaten bei beiden Geschlechtern gegenläufig, sodass die Anzahl der Frauen kontinuierlich anstieg und die Zahl der Männer zurückging. Es ist davon auszugehen, dass sich diese Entwicklung aufgrund der veränderten Rauchgewohnheiten der Geschlechter in Zukunft fortsetzen wird (Zentrum für Krebsregisterdaten 2019).

Es gibt jedoch noch weitere Risikofaktoren, die das Risiko eines Lungenkarzinoms erhöhen. Dazu gehören eine genetische Vorbelastung, schlechte Ernährung und das Einatmen von krebserregenden Schadstoffen wie beispielsweise Asbest, Arsen, Cadmium und Nickel. Zur Prävention des Lungenkarzinoms ist es daher unerlässlich, weniger Nikotin aktiv und passiv zu rauchen und weniger Luftunreinheiten, vor allem im Berufsleben, einzusatmen. Auch eine bessere Ernährung mit Obst und Gemüse und ausreichend viel Bewegung helfen, das generelle Krebsrisiko zu senken (Malhotra et al. 2016; Krebsforschungszentrum 05.06.2018; Bade und Dela Cruz 2020).

Lungenkrebs wird in mehrere Formen unterteilt. 10 bis 15% der diagnostizierten Lungenkarzinome sind kleinzellige Lungenkarzinome (SCLC) und 80 bis 85% sind nicht-kleinzellige Lungenkarzinome (NSCLC). Weitere Lungenkrebsarten sind Karzinoid Tumore (unter 5%) und andere seltene Formen. Zu dem NSCLC gehören das Plattenepithelkarzinom, Adenokarzinom, squamöse Karzinom und großzellige Karzinom sowie weitere Unterformen (American cancer society 2020).

2.1.2 Stadieneinteilung des Lungenkarzinoms

Das Lungenkarzinom kann anhand der TNM-Klassifikation und des Gradings in verschiedene Stadien und Differenzierungsgrade eingeteilt werden.

Die TNM-Klassifizierung ist die häufigste Methode zum Staging von Tumorerkrankungen weltweit. Mit ihrer Hilfe können Stadien nach UICC (Union for international cancer control) gebildet werden, welche Auskunft über die Prognose der Patienten geben und eine angepasste Therapie anhand dieses Stadiums ermöglichen. Meist wird zunächst ein vorläufiges klinisches Stadium gebildet, welches postoperativ mithilfe der Histologie präzisiert wird.

Die drei wichtigsten Punkte zur Einteilung sind: T für die Tumorgöße und Ausbreitung des Primärtumors, N für den Lymphknotenbefall und M für die Fernmetastasen (DKG 2020).

Die TNM-Klassifikation und Stadieneinteilung wird nach Vorgabe der UICC durchgeführt. Die erste Auflage wurde im Jahr 1968 veröffentlicht. Inzwischen liegt seit dem 01.01.2017 die 8. Auflage zur Klassifikation von Lungentumoren nach der UICC vor. Diese wurde nach den Empfehlungen des Lungenkarzinom Staging Projektes der IASLC (International Association for the study of lung cancer) geschrieben. Das IASLC Lungenkarzinom Staging Projekt beruht auf der Untersuchung von über 100 000 Fällen aus 46 Zentren aus über 19 Ländern weltweit (Goldstraw et al. 2016).

Nach der 8. Auflage der UICC kann ein Lungenkarzinom wie folgt eingestuft werden:

Mit dem Buchstaben T wird der Primärtumor eingestuft, und es wird nach dem größten Tumordurchmesser, der Infiltrationstiefe, dem Befall von benachbarten Organen wie der Pleura oder des Mediastinums und der Assoziation mit daraus folgender Atelektase oder obstruktiver Pneumonitis untersucht (Tabelle 1).

Tabelle 1: Einteilung des Primärtumors eines Lungenkarzinoms nach der 8. Auflage der TNM-Klassifikation der UICC (Goldstraw et al. 2016)

T	Beschreibung
Tx	Der Primärtumor kann nicht beurteilt werden oder es werden bösartige Zellen im Sputum oder der bronchoalveolären Lavage festgestellt, ohne dass ein Tumor visuell dargestellt werden kann.
T0	Kein Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor ≤ 3 cm an größter Stelle, umgeben von Lungengewebe oder Pleura viszerale ohne bronchoskopischen Nachweis einer Invasion proximal des Lappenbronchus (also nicht im Hauptbronchus)
T1a(mi)	minimalinvasives Adenokarzinom
T1a	Tumor ≤ 1 cm an größter Stelle
T1b	Tumor > 1 cm aber ≤ 2 cm an größter Stelle
T1c	Tumor > 2 cm aber ≤ 3 cm an größter Stelle
T2	Tumor > 3 cm aber ≤ 5 cm oder Tumor mit Hauptbronchusinfiltration (unabhängig der Entfernung zur Carina, aber er darf sie nicht infiltrieren) oder Tumor mit Infiltration der Pleura viszerale oder Tumor mit Atelektase oder obstruktiver Pneumonitis
T2a	Tumorgröße > 3 cm aber ≤ 4 cm an größter Stelle
T2b	Tumorgröße > 4 cm aber ≤ 5 cm an größter Stelle
T3	Tumorgröße > 5 cm aber ≤ 7 cm an größter Stelle oder mit separaten Tumorherden im selben Lungenlappen oder mit Infiltration einer der folgenden Strukturen: Thoraxwand (inklusive parietaler Pleura oder superiorer sulcus Tumore), Nervus phrenicus oder parietalem Perikard
T4	Tumor > 7 cm an größter Stelle oder mit separaten Tumorherden in einem anderen ipsilateralen Lungenlappen oder Infiltration einer der folgenden Strukturen: Zwerchfell, Mediastinum, Herz, große Gefäße, Trachea, Nervus laryngeus recurrens, Ösophagus, Wirbelkörper, Carina

Mit dem Buchstaben N wird der Lymphknotenstatus eingeteilt, welcher postoperativ histologisch anhand der entnommenen Lymphknoten bestimmt wird. Die Lymphknoten werden dazu von 1 bis 14 in Stationen unterteilt, wobei die Zahlen 1 bis 9 (also einstellige Zahlen) die extrapulmonalen mediastinalen Lymphknotenstationen widerspiegeln und dem Lymphknotenstatus N2 und N3 entsprechen. Die Zahlen 10 bis 14 (also zweistellige Zahlen) stellen bei Befall den N1-Status dar (Tabelle 2) (Rusch et al. 2007).

Tabelle 2: Einteilung des Lymphknotenstatus bei Lungenkarzinomen nach der 8. Auflage der TNM-Klassifikation der UICC (Goldstraw et al. 2016)

N	Beschreibung
Nx	Regionale Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionalen Lymphknotenmetastasen
N1	Metastasen im ipsilateralen peribronchialen und/oder ipsilateralen hilären und intrapulmonalen Lymphknoten, einschließlich der direkten Infiltration des Tumors in umliegende Lymphknoten
N2	Metastasen in ipsilateralen mediastinalen und/oder subcarinalen Lymphknoten
N3	Metastasen in kontralateralen mediastinalen und hilären Lymphknoten oder ipsi- oder kontralateralen skalenischen oder supraclaviculären Lymphknoten

Mit dem Buchstaben M werden Fernmetastasen beschrieben. Der Metastasierungsweg des Lungenkarzinoms ist entweder lymphogen oder hämatogen. Es metastasiert am häufigsten in Hirn, Knochen und die Nebennieren. Als Fernmetastasen gelten jegliche Absiedlungen, die nicht im direkten regionalen Zusammenhang mit dem Primärtumor stehen und sich nicht in den regionalen Lymphknoten befinden (Tabelle 3) (Popper 2016).

Tabelle 3: Einteilung der Fernmetastasierung bei Lungenkarzinomen nach der 8. Auflage der TNM-Klassifikation der UICC (Goldstraw et al. 2016)

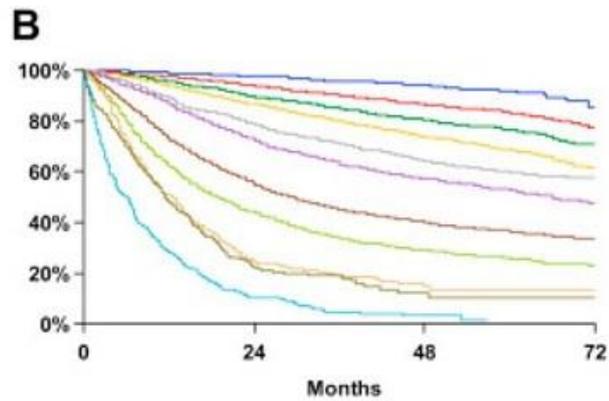
M	Beschreibung
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen vorhanden
M1a	Separate Tumorherde in der kontralateralen Lunge oder Tumorherde in der Pleura oder dem Perikard oder maligner Pleura- oder Perikarderguss
M1b	Einzelne extrathorakale Fernmetastase (auch nicht-regionale Lymphknoten)
M1c	Mehrere extrathorakale Metastasen in einem oder multiplen Organen

Aus der TNM-Klassifikation ergibt sich im Anschluss die folgende UICC Stadieneinteilung nach der 8. Auflage:

Tabelle 4: UICC Einteilung von Lungenkarzinomen nach der 8. Auflage der TNM-Klassifikation der UICC (Goldstraw et al. 2016)

Stadium	T	N	M
Okkultes Karzinom	Tx	N0	M0
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium IA1	T1a (mi), T1a	N0	M0
Stadium IA2	T1b	N0	M0
Stadium IA3	T1c	N0	M0
Stadium IB	T2a	N0	M0
Stadium IIA	T2b	N1	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	N3	M0
Stadium IVA	Jedes T	Jedes N	M1a, M1b
Stadium IVB	Jedes T	Jedes N	M1c

Anhand der Einteilung in Stadien nach UICC kann eine Prognose der Überlebensrate für die Patienten mit einem entsprechenden Stadium gegeben werden (Abbildung 1). Es ist zu erkennen, dass jedes Fortschreiten des Stadiums direkt mit einer schlechteren 2- und 5-Jahresüberlebensrate einhergeht. Die 2-Jahresüberlebensrate reicht von Stadium IA1 mit 97% bis Stadium IVB mit 10%, und die 5-Jahresüberlebensrate liegt bei 92% in Stadium IA1 und bei 0% in Stadium IVB.



Proposed	Events / N	MST	24 Month	60 Month
IA1	68 / 781	NR	97%	92%
IA2	505 / 3105	NR	94%	83%
IA3	546 / 2417	NR	90%	77%
IB	560 / 1928	NR	87%	68%
IIA	215 / 585	NR	79%	60%
IIB	605 / 1453	66.0	72%	53%
IIIA	2052 / 3200	29.3	55%	36%
IIIB	1551 / 2140	19.0	44%	26%
IIIC	831 / 986	12.6	24%	13%
IVA	336 / 484	11.5	23%	10%
IVB	328 / 398	6.0	10%	0%

Abbildung 1: Überlebensrate in Abhängigkeit vom klinischen Tumorstadium (Goldstraw et al. 2016)

Die weitere Charakterisierung eines Karzinoms erfolgt anhand des Tumorgradings. Dieses beurteilt die Beschaffenheit eines Karzinoms. Es wird histologisch untersucht, inwieweit sich das Tumorgewebe vom Normalgewebe unterscheidet. Dies wird als Differenzierungsgrad beschrieben.

G1 = gut differenziert („low grade“), ähnlich zum Ursprungsgewebe

G2 = mäßig differenziert

G3 = schlecht differenziert

G4 = undifferenziert bzw. anaplastisch („high grade“), der Tumor kann nicht mehr oder nur aufgrund immunhistochemischer Untersuchungen dem Ausgangsgewebe zugeordnet werden

Grad 9= Differenzierung nicht beurteilbar

Die Malignität eines Tumors nimmt mit sinkender Differenzierung zu, sodass ein hohes Grading Stadium mit schnellerem Wachstum und schlechterer Prognose einhergeht (DocCheck Medical Services GmbH 2020; DKG 2020).

2.1.3 Karzinogenese

Die Entstehung eines Karzinoms beruht auf dem Versagen physiologischer Abwehrmechanismen der unkontrollierten Zellproliferation und entsteht aus einer Kombination von genetischen und epigenetischen Veränderungen. Nach Hanahan und Weinberg (Hanahan und Weinberg 2011) gibt es sechs Veränderungen in der gesunden Zelle, die zu einem bösartigen Wachstum führen können. Dies betrifft das selbstständige Wachsen, ungehemmtes Potenzial sich zu teilen, Widerstand gegen wachstumshemmende Signale, dem Umgehen des Zelltodes, Angiogenese und die Fähigkeit, in andere Gewebe zu wachsen und Metastasen zu bilden.

Es gibt zahlreiche genetische Veränderungen, die eine Ursache für das Lungenkarzinom darstellen können. Dazu zählt beispielsweise eine *TP53* Mutation, welche in 12% aller Lungenkarzinome von Nicht-Rauchern gefunden werden kann und sogar in 30% aller Lungenkarzinome von Rauchern (Pfeifer et al. 2002).

TP53 dient physiologisch als Tumorsuppressorgen. Es reguliert die Transkription von zahlreichen untergeordneten Target Genen, welche in die Induktion von Zellzyklus Arrest, Apoptose, DNA-Reparatur und Zellseneszenz involviert sind. So kann es veränderte Zellen unterdrücken und die Entstehung von Tumoren vorbeugen (Lane und Levine 2010). Wenn *TP53* mutiert, wandelt es sich von einem Tumorsuppressorgen zu einem Onkogen. Es verliert, meist durch missense Mutationen, seine protektiven Fähigkeiten und fördert die Tumorprogression, die Fähigkeit des Tumors zu metastasieren und erhöht zudem Medikamentenresistenzen (Rivlin et al. 2015; Parrales und Iwakuma 2015).

Weitere genetische Veränderungen, die für das maligne Wachstum von Zellen verantwortlich sind und die Bildung von Lungenkarzinomen begünstigen, sind Mutationen von *EGFR* (Epidermal growth factor receptor), *ALK* (anaplastic lymphoma kinase), *ROS1* (receptor tyrosine kinase) oder auch *KRAS* (Kirsten rat sarcoma virus, proto-oncogene GTPase) (Travis et al. 2015; Ferrer et al. 2018).

Epigenetische Veränderungen können ebenfalls zur Entstehung eines Lungenkarzinoms beitragen. Es werden verschiedene Gene aktiviert oder inaktiviert, wodurch die Genexpression gesteuert werden kann. Zur Epigenetik werden folgende Mechanismen gezählt (Deans und Maggert 2015; Alzin 2019):

1. DNA-Methylierung: Es werden Methylgruppen (-CH₃) von DNA-Methyltransferasen an Nukleotide der Promotorregion von DNA angehängt. Diese Methylierung führt zur Inhibierung der Genexpression. Es konnten bereits zahlreiche Gene identifiziert werden, die in Lungenkarzinomen eine veränderte Methylierung aufweisen im Vergleich zu gesundem Lungengewebe, beispielsweise *MYF6*, *SIX6*, *SOX1*, *BCL2*, *PHOX2A*, *FOLX2* und *HPP1* (Zhao et al. 2013; Shen und Waterland 2007; Hanabata et al. 2004).
2. Histon-Modifizierung: Histone sind Proteine, die sich im Nukleus befinden. Um sie herum windet sich die DNA, um in einer kompakteren Form vorzuliegen. Sie regulieren die Gentranskription, DNA-Replikation und DNA-Reparatur, indem sie durch unterschiedliche Prozesse, wie Methylierung, Acetylierung oder Phosphorylierung verändert werden. So können nur verschiedene Teile der DNA abgelesen und die Genexpression verändert werden (Sawan und Herceg 2010).
3. mikroRNAs (miRNAs): mikroRNAs sind kleine nicht kodierende RNAs, welche die Genexpression ihrer sogenannten Target Gene posttranskriptionell regulieren, indem sie je nach Bedarf hoch- oder runterreguliert werden. Eine miRNA kann hunderte verschiedene mRNAs beeinflussen und somit die Expression vieler untereinander interagierender Gene verändern. MiRNAs sind an der Pathogenese zahlreicher Krankheiten wie Asthma, Ösophagitis, Ekzemen und auch Lungentumoren beteiligt und werden im Laufe dieser Arbeit weiter behandelt (Lu und Rothenberg 2018; Rebane 2015; Dissanayake und Inoue 2016; Lu und Rothenberg 2013).

2.2 miRNA

2.2.1 Definition und Geschichte

Zellen enthalten verschiedene Arten von RNA. Während beispielsweise mRNA als Messenger-RNA für die Überlieferung genetischer Informationen außerhalb des Zellkerns verantwortlich ist, gibt es auch nicht-codierende RNA Formen wie tRNA oder rRNA, welche für die Genexpression benötigt werden. Mikro-Ribonukleinsäuren (mikroRNAs oder auch miRNAs) gehören ebenfalls zu den nicht-codierenden RNA-Varianten. Sie beeinflussen die Expression anderer Gene und übernehmen so regulatorische Aufgaben in der Zelle (Ambros 2001). MiRNAs sind kurz-kettige, einsträngige und ca. 22 Nukleotide lange RNAs, welche komplementäre Ziel-mRNA binden können, die Translation dieser verhindern und dadurch die Expression des Ziel Protein Produktes beeinflussen können (Lee et al. 1993; Wightman et al. 1993; Reinhart et al. 2000). Es konnte nicht nur in zahlreichen Studien bewiesen werden, dass sie ein verändertes Expressionsverhalten in zahlreichen Krankheiten wie Karzinomen oder kardiovaskulären Erkrankungen aufweisen, sondern auch, dass ihre Expression aktiv, beispielsweise durch das Rauchen von Nikotin, verändert werden kann (Wojciechowska et al. 2017; Willinger et al. 2017).

Erstmals entdeckt wurden die miRNAs im Jahre 1993 von Lee et al. (Lee et al. 1993) in *Caenorhabditis elegans*. Dieser häufig in der Genetik und Entwicklungsbiologie erforschte Fadenwurm schien eine Runterregulation des lin-14 Proteins zu benötigen, um vom ersten in das zweite Larvenstadium übergehen zu können. Es wurde herausgefunden, dass diese Runterregulation von der Transkription eines zweiten Gens namens lin-4 abhängig war. lin-4 kodierte jedoch kein biologisch aktives Protein, sondern zwei kurz-kettige RNAs, welche 21 und 61 Nukleotide lang waren. Die längere der beiden RNAs formte sich zu einer Haarnadelstruktur und diente als Vorläufer der kürzeren RNA. Die kürzere RNA entsprach der miRNA. Zusammen mit einer zweiten Forschergruppe um Whightman et al. (Wightman et al. 1993) konnte später herausgefunden werden, dass die 21 Nukleotide lange RNA komplementär zum 3' UTR Ende der lin-14 mRNA war und die Translation der lin-14 mRNA verhinderte. So konnte die Expression des lin-14 Proteins herunterreguliert werden, ohne eine signifikante Veränderung der mRNA Konzentration zu verursachen (Bhaskaran und Mohan 2014; Almeida et al. 2011; Lee et al. 2004a).

Das Gen-Silencing durch miRNA schien zunächst spezifisch für *C. elegans* zu sein. Im Jahr 2000 wurde nach *lin-4* eine zweite miRNA namens *let-7* in *C. elegans* von zwei Forschungsgruppen entdeckt (Slack et al. 2000; Reinhart et al. 2000). *Let-7* konnte im Anschluss in zahlreichen weiteren Spezies wie Wirbeltieren, Ascidianern, Hemichordaten, Weichtieren, Ringelwürmern, Arthropoden und auch Menschen nachgewiesen werden und diente als Startschuss für die anschließende Forschung (Pasquinelli et al. 2000).

Es wurden mittlerweile viele weitere miRNAs in allen möglichen Arten von Pflanzen, Tieren und Menschen gefunden und in verschiedenen Databases gesammelt. Eine der größten miRNA Databases ist miRBase, welche Stand November 2020 in der 22. Version verfügbar ist und 38589 miRNA Einträge verzeichnet (miRBase 2020).

2.2.2 Nomenklatur

Die miRNA wurde nach ihrer Entdeckung 1993 erstmalig 2001 „mikroRNA“ von dem US-amerikanischen Genetiker Gary Ruvkun genannt (Ruvkun 2001). Die heute noch gültige Nomenklatur der miRNAs wurde im Jahr 2003 (Ambros et al. 2003) eingeführt. Die Namensgebung folgt dabei einheitlichen Regeln. Die ersten drei Buchstaben geben eine Information über den Organismus an (Beispiel *hsa-* für *homo sapiens* oder *rno* für *Rattus norvegicus*). Mit Ausnahme einiger miRNAs wie *lin-* und *let-* miRNAs folgen anschließend die Buchstaben „miR“ für mikroRNA (Beispiel *hsa-miR*). Die anschließende Identifikationsnummer ist für gleiche oder sehr ähnliche miRNAs identisch und wird chronologisch nach der Reihenfolge der Sequenzierung vergeben, dies geschieht unabhängig vom Organismus (Beispiel *hsa-miR-121*). Verschiedene Vorläufer Sequenzen und genomische Loci, welche eine identische reife Sequenz beschreiben, erhalten eine weitere Zahl am Ende (Beispiel *hsa-miR-121-1* oder *hsa-miR-121-2*). Buchstaben am Ende bedeuten eng miteinander verwandte reife Sequenzen, welche sich nur minimal unterscheiden (Beispiel *hsa-miR-121a* oder *hsa-miR-121b*). Wenn bei Klonierungsstudien zwei miRNA von derselben pre-miRNA unterschieden werden können, wird der Leitstrang normal benannt und der Begleitstrang mit einem * markiert (Beispiel *hsa-miR-56**). Wenn nicht klar ist, welcher der Leit- und Begleitstrang ist, wird ein -5p für den 5'-Arm der pre-miRNA angehängen (Beispiel *miR-142-5p*) und -3p für den 3'-Arm der pre-miRNA (Beispiel *miR-142-3p*) (miRBase 2020).

2.2.3 Biogenese der miRNA

Die Biogenese der miRNA beginnt im Zellkern (Abbildung 2). Die RNA-Polymerase II (Lee et al. 2004b) und seltener die RNA-Polymerase III (Borchert et al. 2006) transkribieren die Gene der miRNAs und es entsteht eine lange, primäre miRNA (pri-miRNA). Diese hat am 5' Ende ein Methylguanodin Cap und am 3' Ende einen Poly-A Schwanz (Kim 2005). Eine pri-miRNA kann eine einzelne miRNA enthalten oder eine Kombination aus mehreren miRNAs, welche aus dem einen primär Transkript prozessiert wird (Lin und Gregory 2015). Die pri-miRNA wird durch den Drosha-Komplex zu precursor miRNA (pre-miRNA) im Zellkern prozessiert und liegt nun in einer Haarnadelstruktur vor. Der Drosha Komplex besteht aus RNase III, Drosha, DGCR8 (DiGeorge syndrom critical region 8) und weiteren Partner Proteinen (Matsuyama und Suzuki 2019).

Der Transport der pre-miRNA aus dem Zellkern in das Zytosol geschieht anschließend aktiv durch Exportin-5 (XPO5). Dort wird sie durch die RNase III Dicer in etwa 22 Nukleotide lange doppelsträngige RNA gespalten. Die doppelsträngige RNA wird anschließend in Ago-Proteine geladen und der Leitstrang (in Abbildung 2 rot markiert) wird in das sogenannte RISC (RNA induced splicing complex) integriert. Der Begleitstrang wird in den meisten Fällen degradiert (Lin und Gregory 2015; Matsuyama und Suzuki 2019). Das Gen-Silencing geschieht nun über eine komplementäre Bindung des RISC an die 3' UTR Region seiner Ziel-mRNA (Target). So kann entweder die Translation der mRNA des Targets gehemmt werden oder zusammen mit Proteinen aus der GW182 Familie die mRNA des Targets degradiert werden (Treiber et al. 2012; Wu et al. 2018).

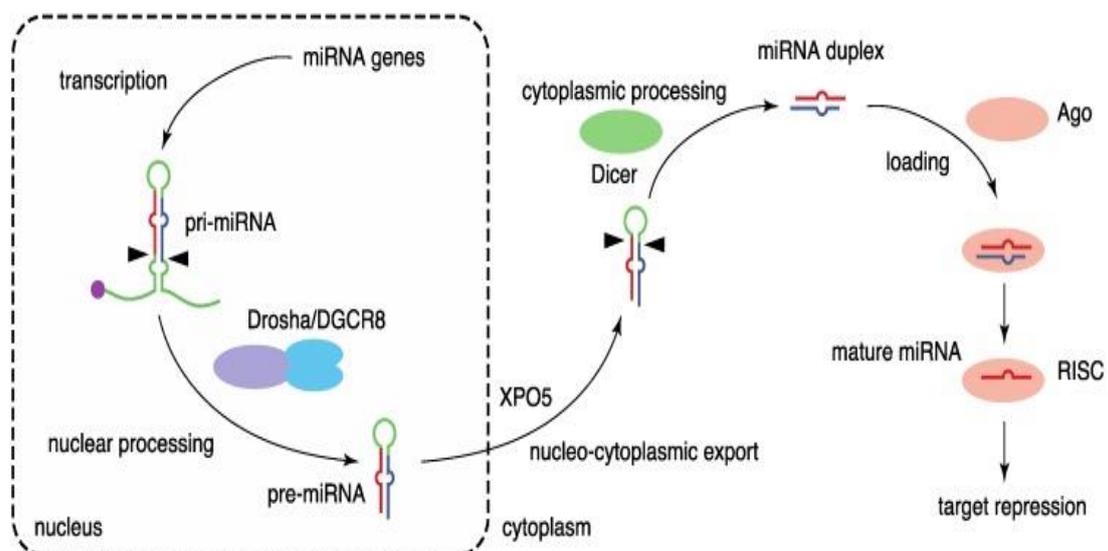


Abbildung 2: Schematische Darstellung der miRNA-Biogenese (Matsuyama und Suzuki 2019)

Pri-miRNA wird im Zellkern transkribiert und anschließend durch den Drosha-Komplex zu pre-miRNA prozessiert. Durch Exportin-5 wird sie in das Zytoplasma transportiert und durch Dicer in 22 Nukleotid lange doppelsträngige RNA gespalten. Der Leitstrang wird im Ago-Protein in das RISC integriert. Nun kann die Target mRNA runterreguliert werden.

2.2.4 Funktion der miRNA durch Regulation der Target Gene

Die Proteinbiosynthese einer Zelle kann durch miRNA modifiziert werden. Dazu modifiziert die miRNA mithilfe des oben genannten RISC die mRNA ihrer Ziel-Gene posttranskriptionell, um in den meisten Fällen eine Runterregulation des Ziel-Proteins zu erreichen (Lim et al. 2005). Eine miRNA bindet an die Target mRNA mit ihrer sogenannte Seed Sequenz. Diese ist essenziell für die Bindung und befindet sich am 2.-8. Nukleotid am 5' Ende der miRNA und bindet komplementär an die 3' UTR Region der untranslatierten Ziel-mRNA mittels Watson-Crick Basenpaarung (Lewis et al. 2003).

Wenn eine hohe Komplementarität der Bindung vorliegt, wird die mRNA meist durch die mRNA und den RISC degradiert (Baek et al. 2008). Eine partielle Komplementarität der Bindung zwischen miRNA und mRNA führt dagegen meist zur Translationshemmung der mRNA, wodurch die Menge der mRNA nicht messbar vermindert wird, allerdings eine geringere Menge des Ziel-Proteins vorliegt. Sowohl bei hoher als auch bei partieller Bindungskomplementarität wird die Expression des translatierten Proteins vermindert (Iorio und Croce 2012). Dies hat zur Folge, dass eine hohe miRNA Konzentration mit einer niedrigen Target Konzentration einhergeht und sie daher invers korrelieren (Steinkraus et al. 2016; Kuhn et al. 2008). Da keine vollständige Komplementarität der Bindung zwischen miRNA und mRNA erforderlich ist und diese auf nur 7 Nukleotiden beruht, kann eine miRNA viele verschiedene Targets regulieren und so zahlreiche zelluläre Prozesse modifizieren, zudem kann die Expression eines Targets von vielen verschiedenen miRNAs beeinflusst werden (Lim et al. 2005; Lewis et al. 2003).

Die sich hieraus ergebenden Funktionen der miRNA sind vielfältig. Sie sind sowohl an den physiologischen Prozessen der Zelle wie Zellwachstum, Differenzierung, Proliferation, Überleben und als auch an der Entstehung von Krankheiten wie Tumoren durch die Beeinflussung von Proteinkinasen, dem Zellzyklus und der Apoptose von Zellen beteiligt (Markopoulos et al. 2017; Hwang und Mendell 2006; Ambros 2004). Somit stellen sie einen essenziellen Schritt in der Regulation der Genexpression dar.

Durch die enge Beziehung einer miRNA und der durch sie unterdrückten Ziel-mRNA ergibt sich die genaue Funktion einer miRNA durch die Funktion ihres Target-Proteins. Potenzielle Targets von miRNAs können mithilfe von Computer Algorithmen prognostiziert und anschließend mittels experimenteller Forschung bestätigt oder falsifiziert werden (Kuhn et al. 2008).

2.2.5 miRNA Expression in Karzinomen und LK Metastasen

Seit der Entdeckung der miRNAs im Jahr 1993 (Lee et al. 1993) wurde vermehrt deutlich, dass sie eine veränderte Expression in verschiedenen Krankheiten, beispielsweise kardiovaskulären, allergischen oder respiratorischen Ursprungs, aufweisen (Wojciechowska et al. 2017; Dissanayake und Inoue 2016). Auch in zahlreichen Formen von Karzinomen konnte inzwischen eine veränderte miRNA Expression bewiesen werden. Der erste Nachweis darüber wurde im Jahr 2002 (Calin et al. 2002) erbracht, als die Runterregulation von miR-15 und miR-16 Genen in chronisch lymphatischer Leukämie nachgewiesen werden konnte. Das veränderte miRNA Expressionsprofil in Karzinomen wird auf epigenetisches silencing, die Dysregulation von Transkriptionsfaktoren spezifischer miRNAs und auf Deletionen, Amplifikationen und andere Mutationen der miRNA zurückgeführt, welche in fragilen Abschnitten der miRNA Gene geschehen (Croce 2009). Im Falle der CLL zeigte sich, dass miR-15 und miR-16 auf dem Chromosom 13q14 lokalisiert sind und dieses Chromosom bei ca. 68% aller CLL Fälle deletiert oder runterreguliert vorliegt (Calin et al. 2004).

MiRNAs können sowohl karzinominduzierend als auch -protektiv wirken. MiRNAs wie miR-15 und miR-16 haben eine Funktion als Tumorsuppressoren und liegen in Teilen von Chromosomen, welche in Karzinomen deletiert oder runterreguliert werden. Andere miRNAs wie das miR-17-92 Cluster wirken dagegen als Onkogene und liegen in Teilen des Genoms, welche in Karzinomen amplifiziert werden. Die dysregulierte miRNA Expression in menschlichen Karzinomen zielt auf die Transkripte der Gene wichtiger Proteine der Tumorgenese ab. Dies sind beispielsweise das *RAS* Onkogen durch let-7 miRNAs, das *BCL2* anti-apoptotische Gen durch das miR-15a und miR-16-1 Cluster, den *E2F1* Transkriptionsfaktor durch das miR-17-92 Cluster oder das *BCL6* anti-apoptotische Gen durch miR-127. Die veränderte Expression von miRNAs konnte inzwischen sowohl bei hämatopoetischen als auch bei soliden Tumoren nachgewiesen werden (Calin und Croce 2006).

Metastasiert ein Karzinom in ein anderes Organ, weist auch die Metastase ein eigenes miRNA Expressionsprofil auf (Feiersinger et al. 2016). Es konnte bereits gezeigt werden, dass die miR-21, miR-31 und miR-373 Expression in Kolorektalen Karzinomen erhöht vorliegt, aber die miR-21 Expression in den Lebermetastasen wieder erniedrigt gemessen werden kann. Auch Metastasen, welche von derselben Art von Primärtumor ausgehen, können sich je nach Lokalisation in ihrer miRNA Expression unterscheiden.

So unterscheiden sich bei einem Kolorektalen Karzinom sowohl die Expressionsprofile zwischen Primärtumor und Metastasen als auch die Lungen- und Lebermetastasen untereinander. Sie alle haben ein einzigartiges miRNA Expressionsprofil (Pecqueux et al. 2016).

Mit der Untersuchung der miRNA Expression in Lymphknotenmetastasen haben sich bisher wenige Studien beschäftigt. Aber auch bei ihnen konnte bereits bestätigt werden, dass sich das Expressionsprofil zwischen gesundem Lymphknoten und Lymphknotenmetastase in mindestens 50 miRNAs unterscheidet (Wu et al. 2017). Die in dieser Arbeit untersuchten miRNAs sind alle für eine veränderte Expression in Karzinomen unterschiedlicher Entitäten bekannt. MiR-19a und miR-19b sind Mitglieder des miR-17-92 Clusters. Dieses ist wichtig für zentrale Aufgaben der Zelle, wie den Zellzyklus, Proliferation und Apoptose und ist bekannt für sein onkogenes Potenzial (Mogilyansky und Rigoutsos 2013).

MiR-19a konnte bereits erhöht im Serum von Patientin mit einem NSCLC nachgewiesen werden. Diese Überexpression korreliert mit dem TNM-Stadium und dem Lymphknotenstatus der Patienten, sodass eine höhere miR-19a Serum Konzentration mit einem schlechteren Überleben einhergeht (Lin et al. 2013). MiR-19b zeigt ebenfalls onkogene Funktion in NSCLC Patienten und ist über den EGFR-Signalweg für die Zellzyklus Progression, Migration und klonales Wachstum der Tumorzelle zuständig und erhöht zudem die Resistenz für die Apoptose (Baumgartner et al. 2018).

Ebenso wie miR-19a geht auch die erhöhte Expression von miR-21 mit einem schlechteren NSCLC Stadium einher und spricht für eine schlechtere Prognose des Patienten (Wang et al. 2011). Im Gegensatz dazu hat miR-30a zwar ebenfalls eine wichtige Rolle in der Entstehung von Lungenkarzinomen, allerdings in der Form des Tumorsuppressors. Diese Funktion erfüllt miR-30a unter anderem über seine Targets *CD73* und *SIRT1*. Eine erhöhte miR-30a Expression vermindert durch sie die Zell Proliferation, Invasion und fördert die Apoptose von Lungenkrebszellen (Zhu et al. 2017a; Guan et al. 2018). Auch die let-7 miRNA Familie weist eine tumorsuppressive Funktion unter anderem über sein Target *EGFR* auf (Stahlhut und Slack 2015). In Lungenkarzinomen liegt daher häufig eine niedrigere Expression von let-7 vor. Diese korreliert mit einem schlechteren Überleben nach Operationen an der Lunge. Es konnte zudem gezeigt werden, dass let-7 in Adenokarzinomen der Lunge das Zellwachstum inhibieren kann (Takamizawa et al. 2004).

2.3 Fragestellung und Zielsetzung

MiRNAs sind an der Regulation zahlreicher essenzieller Funktionen der Zelle wie Wachstum, Differenzierung und Zelltod durch Hoch- oder Runterregulation beteiligt. Die seit 20 Jahre zunehmende Erforschung der miRNAs offenbart ihr großes Potential in der Diagnostik und Therapie verschiedenster Tumorentitäten. Auch in dem weltweit am häufigsten zum Tode führenden Krebs, dem Lungenkarzinom, zeigt sich ein verändertes miRNA Expressionsprofil.

In dieser Arbeit sollen die sechs miRNAs miR-19a, miR-19b, miR-21-1, miR-30-5p, let-7b-5p und let-7f-5p quantitativ untersucht. Sie sind bereits in verschiedenen Arten von Tumoren als dysreguliert identifiziert worden, allerdings gibt es bisher nur wenige Studien zu ihrer Expression in Metastasen von Tumoren. Insbesondere das Expressionsverhalten in Lymphknotenmetastasen, speziell bei Lungenkarzinomen, ist bisher nur wenig untersucht worden. Es bietet daher großes wissenschaftliches Potenzial, um ein besseres Verständnis für die Funktion von miRNAs in der Karzinogenese und lymphogenen Metastasierung von Lungenkarzinomen zu gewinnen.

Auf dieser Grundlage aufbauend, wurden in der vorliegenden Dissertation die folgenden Fragestellungen untersucht:

1. Was sind potenzielle Targets der miRNAs miR-19a, miR-19b, miR-21-1, miR-30-5p, let-7b-5p und let-7f-5p?
2. Wie ist die Expression der miRNAs miR-19a, miR-19b, miR-21-1, miR-30-5p, let-7b-5p und let-7f-5p und ihrer potenziellen Targets in Lungenkarzinomgewebe im Vergleich zu gesundem Lungengewebe verändert?
3. Weisen die miRNAs miR-19a, miR-19b, miR-21-1, miR-30-5p, let-7b-5p und let-7f-5p und ihre potenziellen Targets ein verändertes miRNA Expressionsprofil in Lymphknotenmetastase im Vergleich zu gesundem Lymphknotengewebe auf?

3 Material und Methoden

3.1 Material

Die folgenden Materialien wurden in dieser Studie verwendet.

3.1.1 Geräte

Tabelle 5: verwendete Geräte

Gerät	Firma und Ort
Analytik Jena FlexCycler	Analytik Jena AG, Jena, Deutschland
C1000 Thermal-Cycler	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Centrifuge 5430 R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
CFX96 Real-time PCR System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Leica SM2000 R Schlittenmikrotom	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland
Liebherr Gefrierschrank	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riß, Deutschland
Mikroliter Zentrifuge Biofuge pico	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Minishaker MS1 Vortex Mixer	Ika-Werke GmbH, Staufen, Deutschland
NanoDrop Lite Spektralphotometer	ThermoFisher Scientific Waltham, Massachusetts, USA
Pipetten 0,1-10µl, 10-100µl, 20-200µl, 100-1000µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Sanyo MDF-U73V Gefrierschrank	Ewald Innovationstechnik GmbH, Rodenberg, Deutschland
Sprout mini Centrifuge	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland

3.1.2 Verbrauchsmaterial

Tabelle 6: verwendetes Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Firma und Ort
Biosphere Filter Tip 2,5µl, 10µl, 100µl, 1250µl	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Ethanol 99,5%	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Feather Disposable Scalpel No. 10	Feather Safety Razor Co., Osaka, Japan
Mikro-Schraubrohre 2ml, PP	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Nuclease-freies Wasser	Promega, Mannheim, Deutschland
Objektträger	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland
PCR Plate 96 Well, Non Skirted, Low Profile	Starlab International GmbH, Hamburg, Deutschland
Reagiergefäß 1,5ml SafeSeal	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Sempercare Nitril Skin 2 Handschuhe	Semperit, Wien, Österreich
StarSeal Advanced Polyolefin Film	Starlab International GmbH, Hamburg, Deutschland

3.1.3 Vorgefertigte Reagenzsysteme (Kits)

Tabelle 7: verwendete Vorgefertigte Reagenzsysteme

Kit	Firma und Ort
GoTaq qPCR Master Mix	Promega, Mannheim, Deutschland
iScript cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Isolate II FFPE RNA/DNA Kit (Phenol free)	Bioline GmbH, Luckenwalde, Deutschland
miScript II RT Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
miScript SYBR® Green PCR Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland

3.1.4 Primer

Tabelle 8: verwendete Primer

Primer	Firma und Ort
Hsa_APAF1_1_SG	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Hsa_HMGA2	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Hsa_let-7b_1	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Hsa_let-7f_1	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Hsa_miR-19a_1	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Hsa_miR-19b_1	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Hsa_miR-21_1	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Hsa_miR-30a-5p_1	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Hsa_RNU6B_3	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Hsa_RRN18S_1_SG	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland

3.1.5 Software

Tabelle 9: verwendete Software

Hard- und Software	Hersteller
Bio-Rad CFX-Manager 2.0	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Citavi V. 6.7	Swiss Academic Software GmbH, Wädenswil, Schweiz
Microsoft Excel	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Rest 2009 V.2.0.13	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland

3.2 Methoden

3.2.1 Patienten und Proben

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten humanen Gewebeproben stammen aus dem pathologischen Archiv der Universitätsklinik Marburg von Patientinnen und Patienten, die im Zeitraum 2000 bis 2004 am UKGM Marburg eine Lungenresektion oder Lungenteilresektion aufgrund eines vorhandenen Lungenkarzinoms erhalten haben. Sämtliche Proben wurden postoperativ von Pathologen des UKGM klassifiziert und anschließend einer der folgenden vier Gruppen zugeteilt:

Lymphknoten gesund (LK gesund) = Gruppe 1

Lymphknoten Metastase (LK Met) = Gruppe 2

Lungen Karzinom (Lunge Ca) = Gruppe 3

Lunge gesund = Gruppe 4

Sämtliche Proben lagen als FFPE-Gewebe (Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes-Gewebe) vor. Von diesen wurden jeweils HE-Schnitte angefertigt, auf denen ein Pathologe anschließend den Bereich markierte, der der gesunden Lunge, dem Tumor, dem LK oder der LK Metastase entsprach (Abbildung 3).



Abbildung 3: Beispielbilder der markierten HE-Schnitte

Der markierte Bereich der HE-gefärbten Proben wurde als Vorlage verwendet, um die mit dem Mikrotom geschnittenen FFPE-Gewebe Schnitte an den richtigen Stellen auskratzen zu können. Nur dieses Material wurde für die weiteren Untersuchungen verwendet (Quelle: eigene Bilder).

Von einigen Patienten gab es Proben für mehrere dieser Gruppen, von einigen Patienten gab es nur Proben für eine dieser Gruppen. Zu Beginn der Laborversuche wurden 31 Patienten mit 90 Proben anhand der oben genannten Kriterien in die Studie eingeschlossen. In der LK Metastase Gruppe sind vier Proben vorhanden von Probanden, die bereits in dieser Gruppe vertreten sind. Es sind also von vier Probanden jeweils zwei Proben in dieser Gruppe vorhanden. Im Verlauf der Studie wurden Proben aus allen Gruppen wegen Verunreinigung und ungenügender RNA Menge aus der Studie ausgeschlossen. Sämtliche Proben, die nicht genau einer der vier oben genannten Gruppen zugeordnet werden konnten, wurden ebenfalls ausgeschlossen.

Im Folgenden wird daher nur über die Proben berichtet, die in den späteren PCR Versuchen der Studie verwendet wurden. Dies sind 70 Proben von 31 Probanden. Von den Patienten wurden die Daten des Geschlechts, der Tumorentität und des Alters zum Zeitpunkt der Operation abgefragt.

3.2.2 Mikrodissektion

Von den FFPE-Gewebeproben wurden mithilfe eines Schlittenmikrotoms 10 µm dicke Schnitte abgetragen und auf einen Objektträger gelegt. Jeweils 10 Schnitte wurden pro Probe angefertigt. Im Anschluss wurde der auf den HE-Schnitten markierte Bereich mithilfe eines Skalpell abgekratzt und das gewonnene Material in 1,5ml RNase-freien Gefäßen gesammelt.

3.2.3 RNA Isolierung und Nano Drop Messung

Die RNA Isolierung erfolgte mithilfe des „Isolate II FFPE RNA/DNA Kit (Phenol free)“ von der Firma Bioline. Die Isolierung erfolgte nach Anleitung des Herstellers. Die Proben wurden wieder in 1,5ml RNase-freien Gefäßen gesammelt. Es blieben von jeder Probe 20µl übrig, bestehend aus RNA und RNA Elution Buffer. Die Quantität und Qualität der Proben wurden per Nano Drop Lite gemessen. Hierbei wurde 1µl der Probe verwendet. Durch Messung der optischen Dichte bei 260nm und dem Umrechnungsfaktor von 40µg/ml spezifisch für RNA konnte die Quantität der Proben in ng/µl angegeben werden. So konnte für die cDNA Herstellung bestimmt werden, wie viel µl jeder Probe benutzt werden müssen, um 300ng RNA (inklusive miRNA) zu verwenden. Die Qualität wurde mithilfe der 260nm/280nm Absorptionsrate Ratio photometrisch bestimmt. Nukleinsäuren haben ihr maximales Absorptionsspektrum bei 260nm. Verunreinigungen wie Proteine, Kohlenhydrate, Salze, Phenole und andere Verunreinigungen haben eine stärkere Absorption bei 280nm. Aus den Verhältnissen der Absorption bei 260nm und 280nm konnte somit die Reinheit der Proben bestimmt werden (Armbrecht 2013). Anschließend wurden die Proben bei -80 °C gelagert.

3.2.4 Pool Erstellung und cDNA Herstellung

Um die in 3.2.1 genannten Gruppen in Poole zusammenzufassen, wurde für jede Probe berechnet, wie viel μl verwendet werden müssen, um 300ng RNA der Probe zu erhalten. Die berechneten Mengen wurden in 1,5 ml RNase-freien Tubes gesammelt und vermischt.

Im Anschluss wurden zwei verschiedene reverse Transkriptase Kits benutzt, um cDNA aus der gesammelten RNA zu erstellen. Das erste Kit ist das „miScript II RT Kit“ von Qiagen, mit welchem die cDNA für die qPCR der miRNA hergestellt wurde. Dabei wurde die Anleitung des Herstellers befolgt und alle Reagenzien zu jederzeit auf Eis gelagert. Pro 20 μl cDNA wurden folgende Komponenten verwendet:

Tabelle 10: „miScript II RT Kit“ Reagenzien

Reagenzien	Menge pro Reaktion
5x miScript HiSpec Buffer	4 μl
10x Nucleics Mix	2 μl
miScript Reverse Transcriptase Mix	2 μl
Template RNA	12 μl
Insgesamt	20 μl

Das zweite Kit ist das „iScript cDNA Synthesis Kit“ von Bio-Rad. Mithilfe dieses Kits wurde die cDNA für die qPCR der Targets erzeugt (Abbildung 4). Es wurde die Anleitung des Herstellers befolgt und alle Reagenzien zu jeder Zeit auf Eis gelagert. Es wurden folgende Komponenten verwendet:

Tabelle 11: „iScript cDNA Synthesis Kit“ Reagenzien

Reagenzien	Menge pro Reaktion
5x iScript Reaction Mix	4 μl
iScript Reverse Transcriptase	1 μl
Template RNA	15 μl
Insgesamt	20 μl

Die Reverse Transkriptase Reaktion erfolgte bei beiden Kits im Thermocycler nach folgendem Schema:

Tabelle 12: Thermocycler cDNA Schema

Zeit	Temperatur
60 min	37 °C
5 min	95 °C

Die Proben wurden anschließend bei -20 °C gelagert.

1. Convert miRNA to cDNA in a one-step, single-tube reverse transcription reaction.

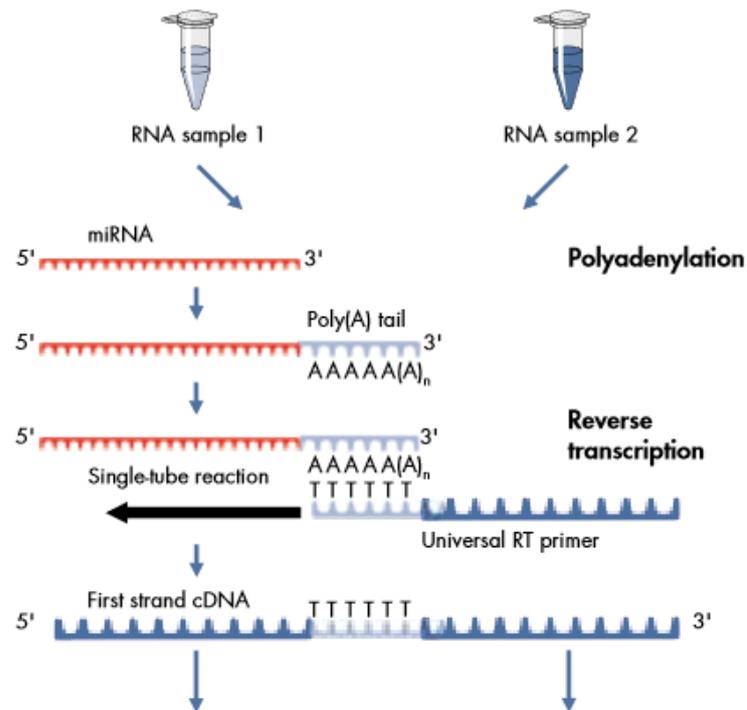


Abbildung 4: Konzept der cDNA Herstellung (Qiagen 2012)

Bei der cDNA Herstellung bindet der Universal Primer komplementär an den RNA Strang. Mithilfe des Enzyms Reverse Transkriptase wird dann ein RNA-DNA-Hybridstrang erzeugt. Der RNA-Strang wird mithilfe des Enzyms RNase H abgebaut. Anschließend können mithilfe einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase neue DNA-Stränge, komplementär zum vorherigen, erzeugt werden.

3.2.5 Datenbank Analyse

Um potenzielle Target Gene für die zu untersuchenden miRNAs zu finden, wurden drei verschiedene, voneinander unabhängige Databases benutzt. Dies waren miRanda (<http://www.microrna.org/>), miRDB (<http://mirdb.org/miRDB/>) und TargetScanHuman (http://www.targetscan.org/vert_72/). Jeder der drei Databases hat bei der Recherche eine unterschiedliche Anzahl an Targets für jede der miRNAs vorgeschlagen, da sie unterschiedliche Algorithmen verwenden. Bei der Suche wurde herausgefunden, dass APAF1 ein potenzielles Target von hsa-miR-19a, hsa-miR-19b (miRanda, TargetScan) und hsa-miR-21-1 (miRanda, miRDB) ist. Für hsa-let-7b-5p und hsa-let-7f-5p wurde HMGA2 (miRanda, miRDB, TargetScan) für die folgenden Untersuchungen als Target verwendet.

3.2.6 Real-time PCR

Im Gegensatz zu einer normalen PCR erlaubt eine Real-time PCR die Quantifizierung der genutzten Proben. Dazu wird ein fluoreszierender Farbstoff, in diesem Fall SYBR® Green, verwendet. Dieser Farbstoff lagert sich nicht an einzelsträngige DNA, lediglich an doppelsträngige DNA an. Somit steigt die Fluoreszenz bei zunehmend doppelsträngig vorliegender DNA. Durch die Erstellung einer Schmelzkurve anhand der Absorption kann daher eine Quantifizierung der DNA vorgenommen werden. Dabei wird der sogenannte C_t -Wert (englisch für Cycle Threshold) gemessen. Dieser gibt die Anzahl der Zyklen an, bei der die Fluoreszenz der doppelsträngig vorliegenden DNA erstmalig die Hintergrund Fluoreszenz signifikant übersteigt. Es wurden zwei verschiedene Messungen mit der Real-time PCR (qPCR) durchgeführt.

Die erste qPCR wurde für die Quantifizierung der cDNA aus dem „miScript II RT Kit“ von Qiagen durchgeführt. Für diese qPCR wurde das „miScript SYBR® Green PCR Kit“ von Qiagen benutzt. Jeder Probenpool (1-4) eines Primers wurde doppelt getestet und es wurde eine Kontrolle ohne Proben durchgeführt, um eine Kontamination des Wassers auszuschließen. Bei der Durchführung wurde sich an die Anleitung des Herstellers gehalten und alle Reagenzien wurden zu jederzeit auf Eis gelagert (Abbildung 5). Für die qPCR wurden folgende fertige Primer Mischungen (Forward und Reverse) genutzt:

Tabelle 13: Primer für qPCR mit „miScript SYBR® Green PCR Kit“

Primer	Hersteller, Ort
Hsa_let-7b_1	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Hsa_let-7f_1	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Hsa_miR-19a_1	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Hsa_miR-19b_1	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Hsa_miR-21_1	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Hsa_miR-30a-5p_1	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Hsa_RNU6B_3	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland

Folgende Mengen an Reagenzien wurden pro Reaktion verwendet:

Tabelle 14: „miScript SYBR® Green PCR Kit“ Reagenzien

Reagenzien	Menge
2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix	10µl
10x miScript Universal Primer	2µl
10 miScript Primer Assay	2µl
RNase-freies Wasser	4µl
Template cDNA	2µl
Insgesamt	20µl

Die qPCR des „miScript SYBR® Green PCR Kit“ erfolgte im Thermocycler nach folgendem Schema:

Tabelle 15: Thermocycler Schema qPCR des „miScript SYBR® Green PCR Kit“

Zeit	Temperatur	Zyklen
15 min	95 °C	1
15 sek	94 °C	40
30 sek	55 °C	
30 sek	70 °C	

Die zweite Messung der qPCR wurde für die Targets der miRNA durchgeführt. Dabei wurde der „GoTaq® qPCR Master Mix“ von Promega genutzt und die cDNA vom „iScript cDNA Synthesis Kit“ verwendet. Es wurden wieder alle Probenpools eines jeden Primer doppelt getestet und jeweils eine Kontrolle mit Wasser erstellt. Alle Reagenzien wurden zu jederzeit auf Eis gelagert. Folgende fertige Primer Mischungen (Forward und Reverse) wurden verwendet:

Tabelle 16: Primer für qPCR mit „GoTaq® qPCR Master Mix“

Primer	Hersteller, Ort
HMGA2, Hsa	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Hsa_APAF1_1_SG	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Hsa_RRN18S_1_SG	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland

Folgende Reagenzien wurden pro Reaktion verwendet:

Tabelle 17: „GoTaq® qPCR Master Mix“ Reagenzien

Reagenzien	Menge
GoTaq® qPCR Master Mix, 2X	10µl
Primer Assay	2µl
Nuclease-freies Wasser	7µl
Template cDNA	1µl
Insgesamt	20µl

Die qPCR des „GoTaq® qPCR Master Mix“ erfolgte im Thermocycler nach folgendem Schema:

Tabelle 18: Thermocycler Schema qPCR des „GoTaq® qPCR Master Mix“

Zeit	Temperatur	Zyklen
2 min	95 °C	1
15 sek	95 °C	40
60 sek	60 °C	

- Combine cDNA with QuantiTect SYBR Green PCR Mastermix, miScript Universal Primer, and water.
Aliquot mixture across miScript miRNA PCR Array.

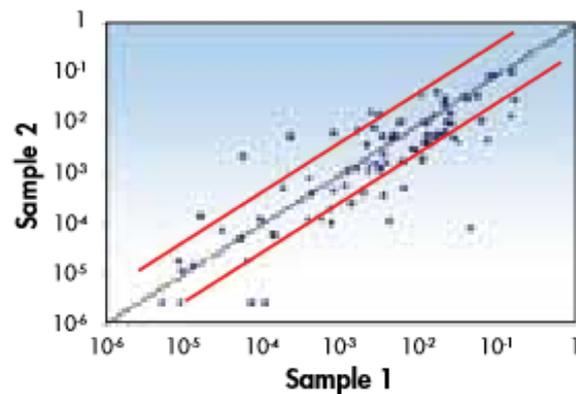
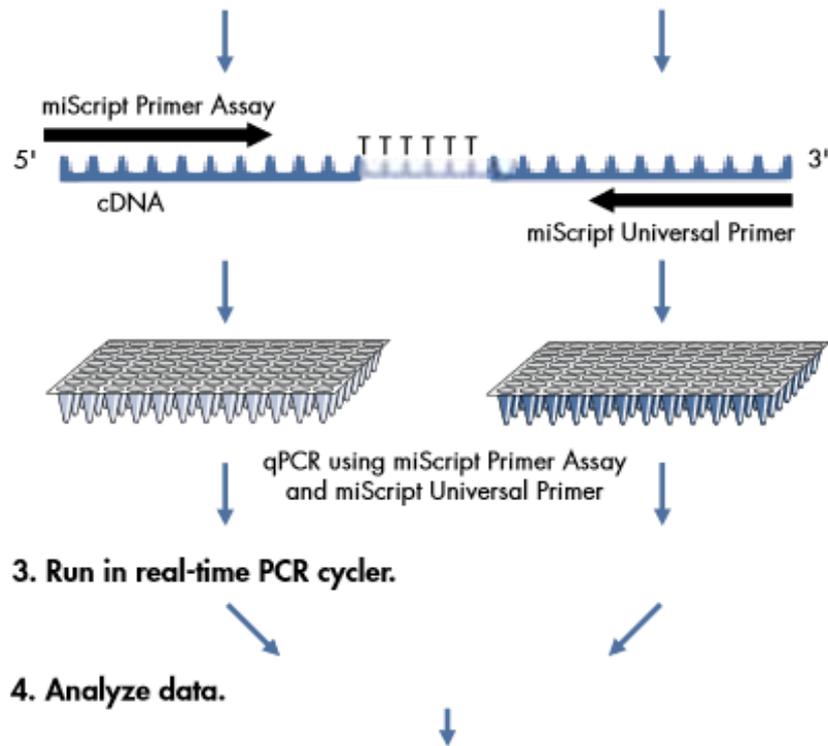


Abbildung 5: Konzept der qPCR mit cDNA (Qiagen 2012)

An die zuvor hergestellte cDNA wird ein Primer komplementär angehängt und anschließend wird eine komplementäre DNA mithilfe einer DNA-Polymerase erzeugt. Durch die wachsende Anzahl an DNA-Kopien kann eine Schmelzkurve erzeugt werden und mithilfe des fluoreszierenden Farbstoffes SYBR Green kann der C_t -Wert bestimmt werden.

3.2.7 Referenzgen für miRNA und mRNA Messungen

Die Quantifizierung der Ergebnisse der Real-Time PCR soll relativ angegeben werden. Dazu wird ein sogenanntes „Housekeeping Gen“ (HKG oder Referenzgen) benutzt. Das HKG ist ein zweites, ubiquitär und homogen exprimiertes Gen, anhand dessen die Expressionsergebnisse der miRNA oder mRNA normalisiert werden können. Somit kann die Veränderung der Expressionsergebnisse verringert werden, da Gewebe- und Matrixeffekte, verschiedene RNA Extraktionseffizienzen und Fehler innerhalb einer Probe gleichermaßen das Zielgen und das HKG betreffen (Pfaffl 2004). In dieser Studie wurde die snRNA (small nuclear ribonucleic acid) RNU6B als Referenzgen für die miRNA Ergebnisse verwendet. Zur Normalisierung der potenziellen Targets wurde ribosomale RNA 18s (RRN18S) verwendet. Im Anschluss an die relative Quantifizierung der Proben wurden jeweils zwei Gruppen miteinander verglichen, um die relative Expression eines Gewebes ermitteln zu können.

3.2.8 Statistische Analyse

Die statistische Analyse der Real-time PCR Ergebnisse erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurde für jede Probe mithilfe der Software CFX Manager der sogenannte C_t -Wert berechnet (siehe Abschnitt 3.2.6). Anschließend konnte mithilfe der Software REST (Relative Expression Software Tool) und der delta-delta CT Methode die relative Expression der Proben bestimmt werden. Dazu wurde zunächst der C_t -Wert des Referenzgens (RNU6B oder RRN18S) vom C_t -Wert der miRNA oder des potenziellen Targets subtrahiert. Das Ergebnis ist ΔC_t , also ein gegen ein Referenzgen normalisierter C_t -Wert. Vom ΔC_t des zu untersuchenden Gewebes wurde anschließend das ΔC_t eines anderen Gewebes abgezogen, um den relativen Expressionsunterschied zwischen zwei Proben normalisiert zum Referenzgen zu erhalten (Pfaffl 2004). Dies ist der sogenannte Fold Change Wert. Die Formel lautet daher:

Relative Expression normalisiert gegen ein Referenzgen = $2^{-\Delta\Delta C_t}$

4 Ergebnisse

4.1 Demographische Darstellung des Patientenkollektivs und Tumorstaging

Das durchschnittliche Alter der Probanden lag bei 60,2 Jahren zum Operationszeitpunkt. Von den 31 Probanden waren 30 männlich und eine weiblich. 69 Proben stammen von Männern und eine Probe von Frauen. 50 der 70 Proben stammen von Plattenepithelkarzinomen, 13 von Adenokarzinomen, 5 von Adeno-squamösen Karzinomen und 2 von vernarbtem Karzinomgewebe (Tabelle 19).

Tabelle 19: Patientenkollektiv und Tumorentität

Gruppe	LK gesund	LK Met	Lunge Ca	Lunge gesund	Gesamte Proben
Anzahl an Proben	12	16	28	14	70
Ø Alter aller Probanden bei OP in Jahre	64,3	52,6	60,3	58,9	60,2
Männlich	12	16	28	13	69
Ø Alter der Männer bei OP in Jahre	64,3	52,6	60,3	58,9	60,2
Weiblich	0	0	0	1	1
Ø Alter der Frauen bei OP in Jahre	X	X	X	62	62
Plattenepithelkarzinome	9	10	20	11	50
Adenokarzinome	2	2	6	3	13
Adeno-squamöse Karzinome	0	4	1	0	5
Vernarbtes Karzinom	1	0	1	0	2

Aus 70 Proben von FFPE-Gewebe wurde RNA isoliert und anschließend eine qPCR mit verschiedenen miRNA und Target Primern durchgeführt. Dabei gab es eine Unterscheidung von vier Gruppen, um einen anschließenden Vergleich zu ermöglichen. Die Tumorentität wurde von Pathologen des UKGM diagnostiziert.

Eine Einteilung der Probandenpools wurde auch anhand der TNM Klassifikation und des Tumorgradings vorgenommen. Die TNM Klassifikation dient dabei der Abschätzung der Tumorgröße und des Metastasierungsgrades, wohingegen die Einteilung des Tumorgradings eine Einschätzung über den Differenzierungsgrad des Tumors gibt (siehe Abschnitt 2.1.2).

Tabelle 20: TNM Klassifikation der Probanden, deren Proben in die Studie eingeschlossen wurden

Gruppe	LK gesund	LK Met	Lunge Ca	Lunge gesund	Gesamte Proben
pT1	3	0	7	5	15
pT2	5	7	14	6	32
pT3	3	7	5	2	17
pT4	1	2	2	1	6
pN0	6	0	9	6	21
pN1	5	8	10	7	30
pN2	0	7	3	0	10
pN3	0	0	1	0	1
pNX	1	1	5	1	8
Gesamt	12	16	28	14	70

Die Proben aus FFPE-Gewebe wurden von Pathologen des UGKM anhand der TNM Klassifikation unterteilt. pNX steht dabei für einen nicht klar definierbaren Lymphknotenstatus.

Tabelle 21: Tumorgrading der Proben

G1	0	0	0	0	0
G2	6	8	19	9	42
G3	6	8	9	5	28
Gesamt	12	16	28	14	70

Die Proben aus FFPE Gewebe wurden von Pathologen des UGKM anhand ihres Tumorgradings unterteilt. Es kamen ausschließlich Proben im G2 und G3 Stadium vor.

Die LK gesunde Gruppe bestand aus 3 pT1, 5 pT2, 3 pT3 und einer pT4 Probe, wobei der Lymphknotenbefall mit 6-mal pN0, 5-mal pN1 und einmal pNX, also unbekannt, angegeben ist. Die Grading Einteilung bestand aus 6 G2 und 6 G3 Proben.

Die Proben der Probanden in dem LK Metastasen Pool wurden 7-mal pT2, 7-mal pT3 und 2 pT4 diagnostiziert, aus denen 8 Proben pN1, 7 Proben pN2 und eine Probe pNX diagnostiziert wurde. Das Grading bestand aus jeweils 8 Proben mit G2 und G3 Einteilung.

Der Lungen Karzinom Pool bestand aus 7 pT1, 14 pT2, 5 pT3 und 2 pT4 Tumoren. Der Lymphknotenstatus war mit 9-mal pN0, 10-mal pN1, 3-mal pN2, einmal pN3 und 5-mal pNX angegeben. Der Differenzierungsgrad bestand aus 9 G2 und 5 G3 Proben.

Die Probanden mit Lungen gesunden Proben hatten 5 pT1, 6 pT2, 2 pT3 Tumore und einen pT4 Tumor, welche 6-mal pN0, 7-mal pN1 und einmal pNX diagnostiziert waren. Diese Gruppe bestand aus 9 G2 und 5 G3 Proben.

Alle Proben zusammen enthielten 15 pT1, 32 pT2, 17 pT3 und 6 pT4 Tumore. Davon waren 21 Proben pN0, 30 Proben pN1, 10 Proben pN2, eine Proben pN3 und 8 Proben pNX. Es kamen nur G2 und G3 Tumore vor, wobei 42 Proben als G2 und 28 Proben als G3 diagnostiziert worden waren (Tabelle 20 und Tabelle 21).

4.2 Nano Drop Messungen

Die Messungen mithilfe des Nano Drop Lite geben Auskunft über die Quantität und Qualität der untersuchten miRNA. Die durchschnittliche Menge der miRNA liegt bei 192,64 ng/µl. Proben mit einer Konzentration von weniger als 50 ng/µl wurden aus der Studie ausgeschlossen. Die durchschnittliche 260nm/280nm AR (Absorptionsrate Ratio) liegt bei 1,727. Proben mit einer AR <1,2 oder >2,1 wurden ebenfalls aus der Studie ausgeschlossen.

Tabelle 22: Quantitative und Qualitative Nano Drop Lite Messergebnisse

Probe	Konz ng/µl	260/280 AR	Probe	Konz ng/µl	260/280 AR	Probe	Konz ng/µl	260/280 AR
1	192,8	1,72	25	104,1	1,72	49	177,1	1,8
2	110,6	1,64	26	108	1,85	50	406,9	1,85
3	130,2	1,82	27	228,4	1,58	51	80,1	1,76
4	86,6	1,74	28	660,1	1,88	52	98	1,74
5	56,6	1,31	29	272,7	1,81	53	313,7	1,84
6	60,4	1,29	30	215,5	1,81	54	105,9	1,83
7	86,6	1,74	31	446,4	1,85	55	484,5	1,86
8	82,7	1,6	32	166	1,86	56	248,5	1,8
9	214,9	1,78	33	243,7	1,86	57	83,2	1,72
10	491	1,74	34	195,5	1,81	58	87,9	1,75
11	396	1,79	35	248,3	1,78	59	365,6	1,85
12	109,1	1,79	36	78,6	1,62	60	82,5	1,78
13	299,9	1,83	37	250,4	1,79	61	382,3	1,85
14	263	1,8	38	126,8	1,82	62	204,7	1,87
15	268,2	1,85	39	155,7	1,52	63	50	1,76
16	276,2	1,66	40	107,9	1,52	64	81,9	1,22
17	177,1	1,81	41	76,4	1,27	65	86,5	1,77
18	191,6	1,86	42	71,9	1,39	66	67	1,71
19	124,1	1,69	43	70,1	1,74	67	191,2	1,72
20	305,6	1,85	44	135,7	1,77	68	144,1	1,62
21	351	1,46	45	352,4	1,75	69	72,1	1,74
22	195,9	1,74	46	428,7	1,79	70	103,4	1,79
23	116,1	1,86	47	72,7	1,85			
24	77,8	1,67	48	87,5	1,59			

Proben mit einer Konzentration von unter 50 ng/µl wurden aus der Studie ausgeschlossen. Ebenso wurden sämtliche Proben mit einem 260nm/280nm AR von <1,2 und >2,1 ausgeschlossen.

4.3 Real Time PCR der miRNA

Im Folgenden sind die Ergebnisse der RT-qPCR dargestellt. Die Runterregulation einer miRNA ist signifikant verändert, wenn der Fold Change $<0,5$ liegt. Die Hochregulation einer miRNA ist signifikant verändert, wenn der Fold Change >2 ist.

4.3.1 Expression von hsa-miR-19a

Lungenkarzinom Proben und gesundes LK Gewebe zeigten, normalisiert gegen gesundes Lungengewebe, keine signifikante Erhöhung der Expression von hsa-miR-19a (Fold Change 1,86 bei Lungen Ca Proben und 1,73 bei gesundem LK) (Abbildung 6, Spalte 1 und 2) Die Expression von LK Metastasen Gewebe war sowohl normalisiert gegen gesundes Lungengewebe (Fold Change 0,138), als auch normalisiert gegen gesundes LK Gewebe (Fold Change 0,08), runterreguliert (Abbildung 6, Spalte 3 und 4).

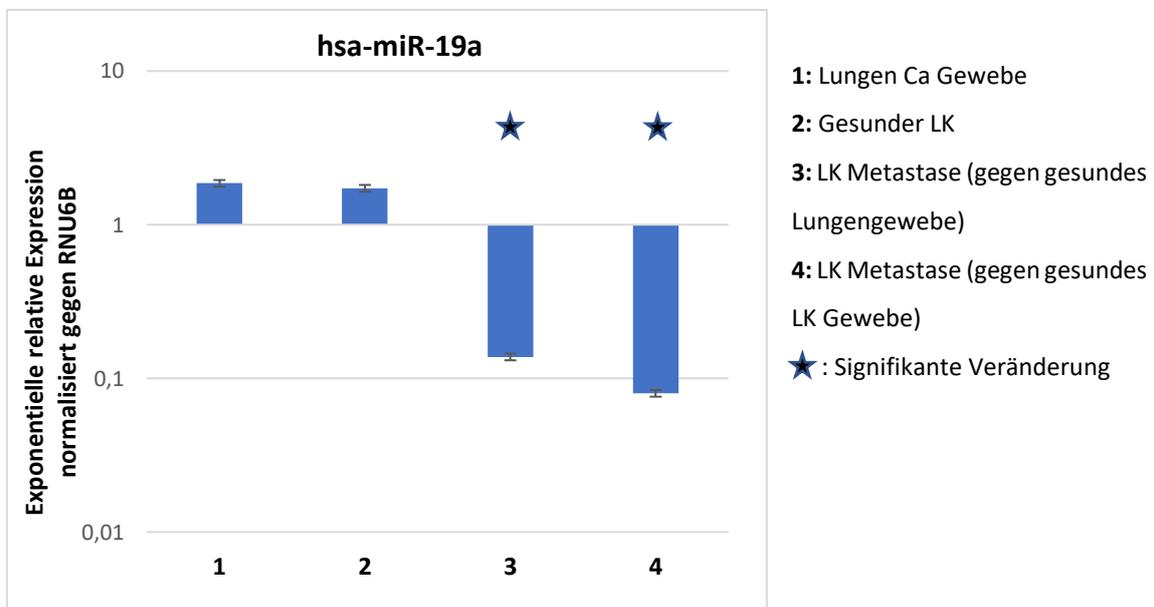


Abbildung 6: Expression von hsa-miR-19a

Die abgebildeten Fold Change Werte wurden aus den Daten von RT-qPCR Messungen berechnet. Dargestellt sind die 10-logarithmisch skalierten Mittelwerte der Fold-Change Werte, normalisiert gegen RNU6B als Kontroll-miRNA. Es ist der Durchschnitt aus zwei Messungen \pm Standardfehler dargestellt.

4.3.2 Expression von hsa-miR-19b

Die Expression von hsa-miR-19b stellte sich ähnlich wie die Expression von hsa-miR-19a dar. Sowohl das Lungenkarzinom Gewebe als auch das gesunde Lymphknoten Gewebe, beide normalisiert gegen gesundes Lungengewebe, wiesen keine signifikante Erhöhung der Expression von hsa-miR-19b auf (Fold Change 1,53 bei Lungen Ca Proben und 1,49 bei gesundem LK) (Abbildung 7, Spalte 1 und 2). Die LK Metastasen Proben zeigten, normalisiert gegen gesundes Lungengewebe, eine signifikante Runterregulation (Fold Change 0,48) (Abbildung 7, Spalte 3). Zudem wiesen die LK Metastasen Proben auch normalisiert gegen gesundes LK Gewebe eine signifikante Runterregulation auf (Fold Change 0,322) (Abbildung 7, Spalte 4).

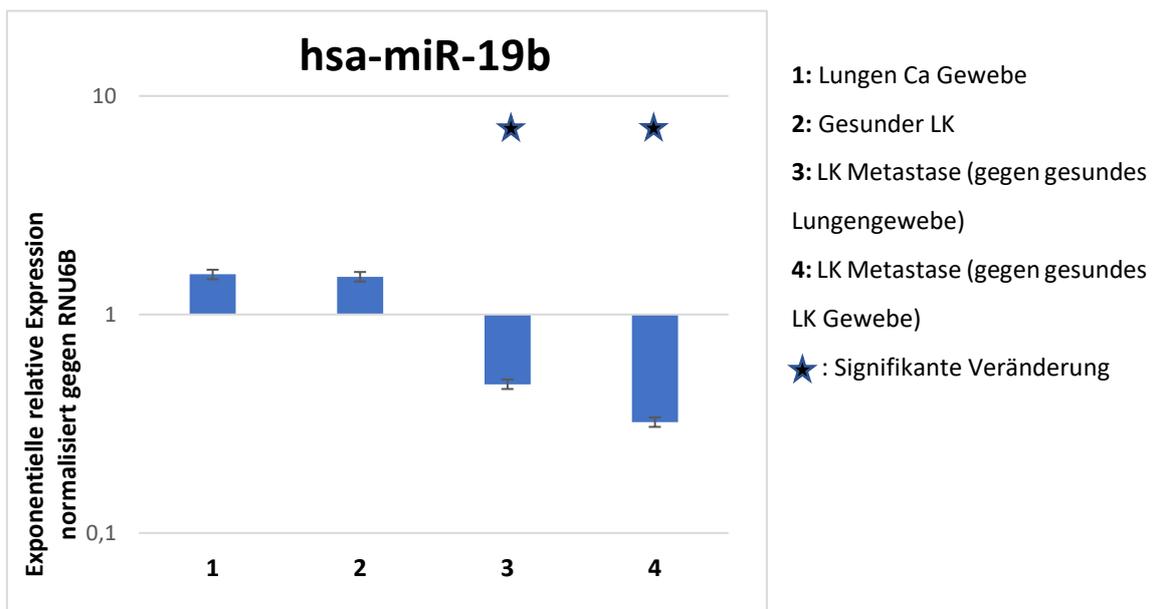


Abbildung 7: Expression von hsa-miR-19b

Die abgebildeten Fold Change Werte wurden aus den Daten von RT-qPCR Messungen berechnet. Dargestellt sind die 10-logarithmisch skalierten Mittelwerte der Fold-Change Werte, normalisiert gegen RNU6B als Kontroll-miRNA. Es ist der Durchschnitt aus zwei Messungen \pm Standardfehler dargestellt.

4.3.3 Expression von hsa-miR-30a-5p

Hsa-miR-30a-5p zeigte keine signifikant veränderte Expression in Lungenkarzinom Gewebe, welches gegen gesundes Lungengewebe normalisiert wurde (Fold Change 1,74) (Abbildung 8, Spalte 1). Gesundes LK Gewebe (Fold Change 0,12) wies normalisiert gegen gesundes Lungengewebe eine signifikante Runterregulation auf (Abbildung 8, Spalte 2). Als einzige miRNA wies hsa-miR-30a-5p in LK Metastasen Gewebe eine gegensätzliche Expression zwischen der Normalisierung zu gesundem Lungengewebe und gesundem LK Gewebe auf. Normalisiert gegen gesundes Lungengewebe war die Expression runterreguliert (Fold Change 0,46) und gegen gesundes LK Gewebe war sie hochreguliert (Fold Change 3,986) (Abbildung 8, Spalte 3 und 4).

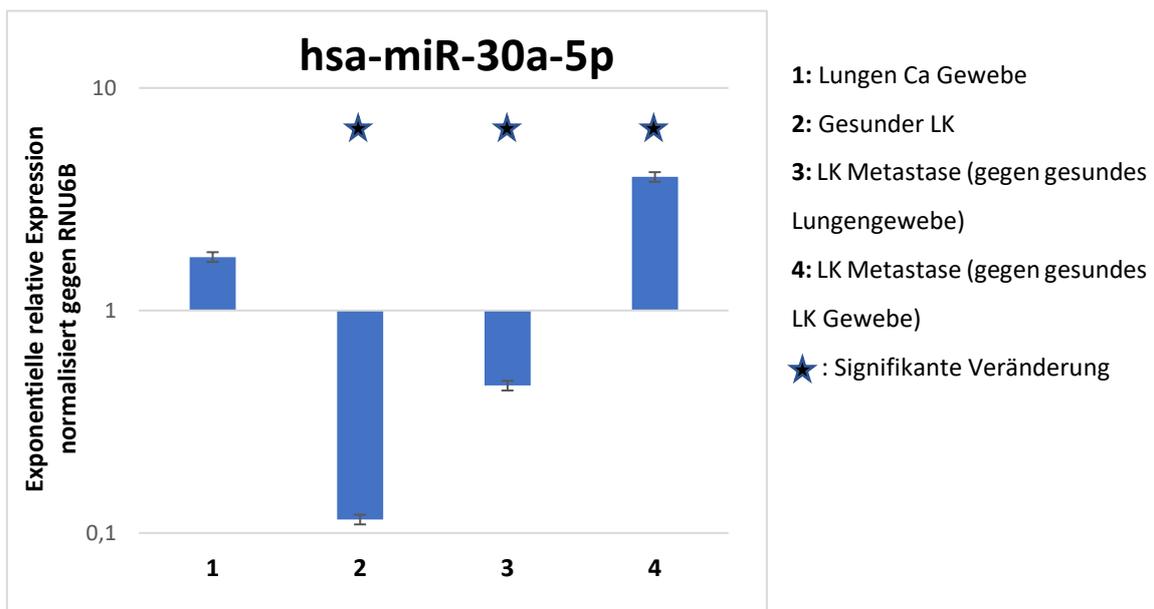


Abbildung 8: Expression von hsa-miR-30a-5p

Die abgebildeten Fold Change Werte wurden aus den Daten von RT-qPCR Messungen berechnet. Dargestellt sind die 10-logarithmisch skalierten Mittelwerte der Fold-Change Werte, normalisiert gegen RNU6B als Kontroll-miRNA. Es ist der Durchschnitt aus zwei Messungen \pm Standardfehler dargestellt.

4.3.4 Expression von hsa-miR-21-1

Das Lungenkarzinom Gewebe, welches gegen gesundes Lungengewebe normalisiert wurde, zeigte eine signifikant verringerte Expression von hsa-miR-21-1 auf (Fold Change 0,105) (Abbildung 9, Spalte 1). Gesundes LK Gewebe, welches ebenfalls gegen gesundes Lungengewebe normalisiert wurde, wies ebenfalls eine signifikant runterregulierte Expression von hsa-miR-21-1 auf (Fold Change 0,339) (Abbildung 9, Spalte 2). In LK Metastasen Gewebe, welches gegen normales Lungengewebe normalisiert wurde, konnte keine signifikant veränderte Expression von hsa-miR-21-1 festgestellt werden (Fold Change 1,83), allerdings konnte eine signifikante Hochregulation von LK Metastasen Gewebe festgestellt werden, welche gegen gesundes LK Gewebe normalisiert wurde (Fold Change 5,39) (Abbildung 9, Spalte 3 und 4).

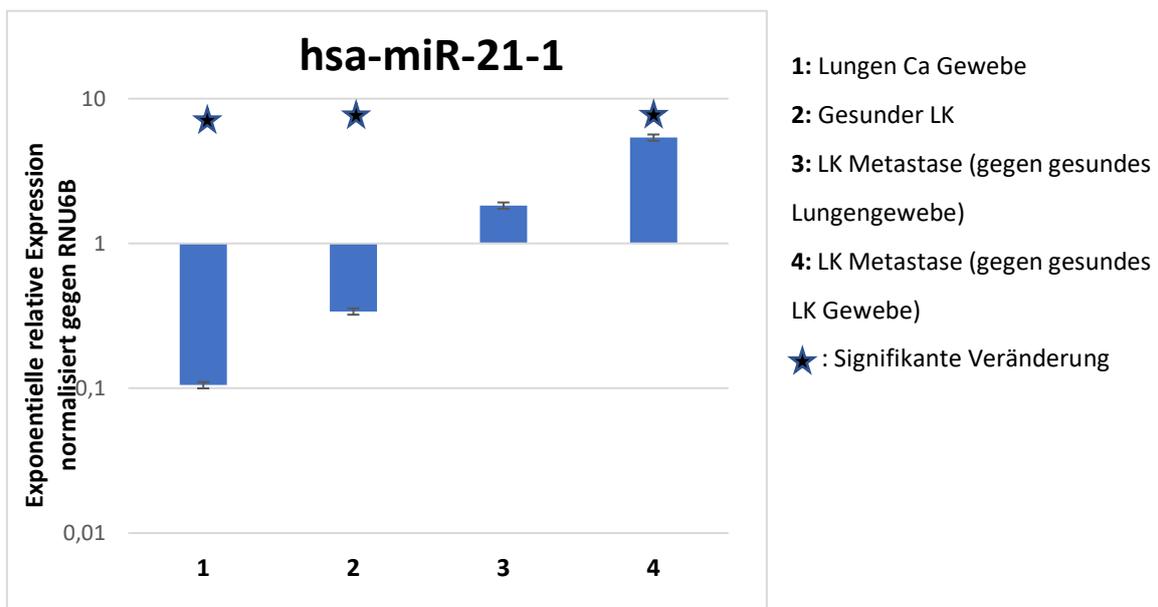


Abbildung 9: Expression von hsa-miR-21-1

Die abgebildeten Fold Change Werte wurden aus den Daten von RT-qPCR Messungen berechnet. Dargestellt sind die 10-logarithmisch skalierten Mittelwerte der Fold-Change Werte, normalisiert gegen RNU6B als Kontroll-miRNA. Es ist der Durchschnitt aus zwei Messungen \pm Standardfehler dargestellt.

4.3.5 Expression von hsa-let-7b-5p

Hsa-let-7b-5p zeigte sowohl in Lungenkarzinom Gewebe (Fold Change 0,45) als auch in gesundem LK Gewebe (Fold Change 0,31), beide verglichen mit gesundem Lungengewebe, eine signifikant runterregulierte Expression (Abbildung 10, Spalte 1 und 2). Signifikant hochreguliert dagegen war das LK Metastasen Gewebe, sowohl im Vergleich gegen gesundem Lungengewebe (Fold Change 3,13) als auch im Vergleich gegen gesundem LK Gewebe (Fold Change 10,02) (Abbildung 10, Spalte 3 und 4).

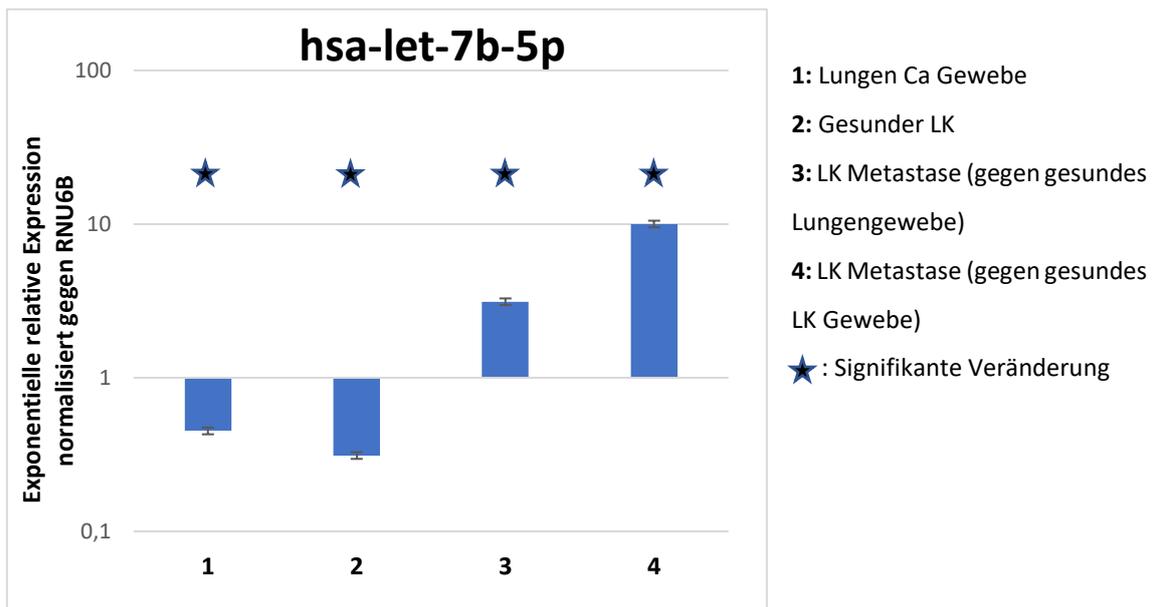


Abbildung 10: Expression von hsa-let-7b-5p

Die abgebildeten Fold Change Werte wurden aus den Daten von RT-qPCR Messungen berechnet. Dargestellt sind die 10-logarithmisch skalierten Mittelwerte der Fold-Change Werte, normalisiert gegen RNU6B als Kontroll-miRNA. Es ist der Durchschnitt aus zwei Messungen \pm Standardfehler dargestellt.

4.3.6 Expression von hsa-let-7f-5p

Die Messungen der Expression von hsa-let-7f-5p zeigten keine signifikante Veränderung in Lungenkarzinom Gewebe, normalisiert gegen gesundes Lungengewebe (Fold Change 1,36) (Abbildung 11, Spalte 1). Hsa-let-7f-5p wies jedoch eine signifikante Runterregulation in gesundem LK Gewebe, normalisiert gegen gesundes Lungengewebe, auf (Fold Change 0,019) und zudem zeigte sich eine signifikante Hochregulation in LK Metastasen Gewebe, normalisiert gegen gesundes Lungengewebe (Fold Change 3,39) und auch normalisiert gegen gesundes LK Gewebe (Fold Change 182,91) (Abbildung 11, Spalte 2,3 und 4).

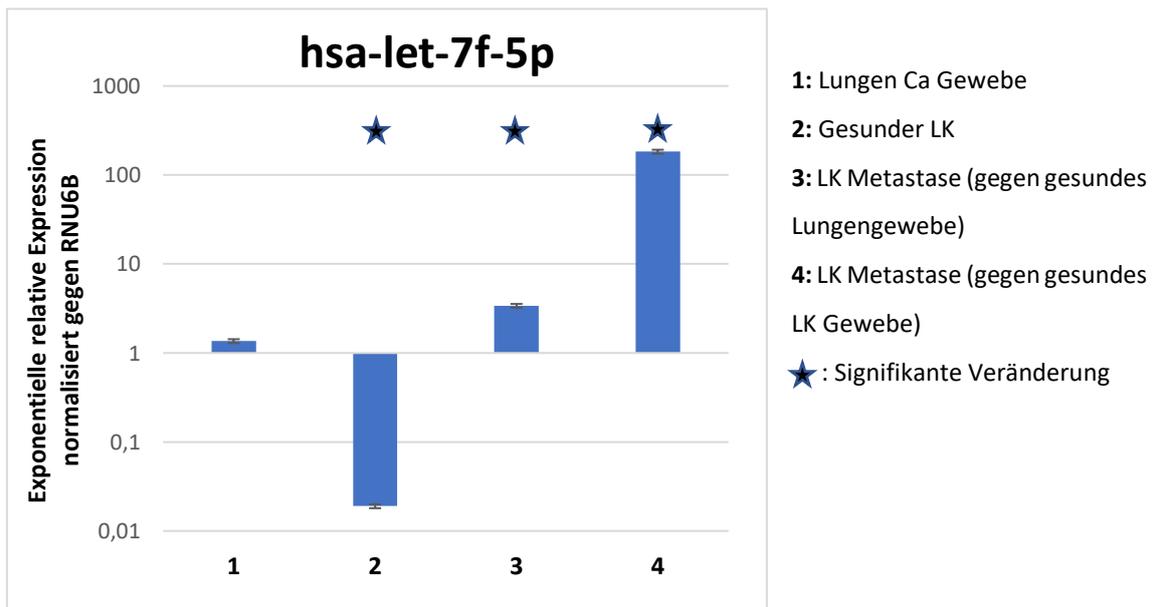


Abbildung 11: Expression von hsa-let-7f-5p

Die abgebildeten Fold Change Werte wurden aus den Daten von RT-qPCR Messungen berechnet. Dargestellt sind die 10-logarithmisch skalierten Mittelwerte der Fold-Change Werte, normalisiert gegen RNU6B als Kontroll-miRNA. Es ist der Durchschnitt aus zwei Messungen \pm Standardfehler dargestellt.

4.3.7 Zusammenfassung der miRNA Real-time PCR Ergebnisse

Zusammenfassend ist zu erkennen, dass die sechs untersuchten miRNAs oftmals eine signifikant veränderte Expression in NSCLC und LK Metastasen Gewebe aufweisen. Hsa-miR-19a und hsa-miR-19b zeigten eine signifikant verringerte Expression in LK Metastasen Gewebe, sowohl normalisiert gegen gesundes Lungengewebe als auch normalisiert gegen gesundes LK Gewebe. Hsa-miR-30a-5p wies eine signifikant verringerte Expression in gesundem LK Gewebe und LK Metastasen Gewebe, beide normalisiert gegen gesundes Lungengewebe, auf. Zudem ließ sich eine signifikante Erhöhung der Expression in LK Metastasen Gewebe, normalisiert gegen gesundes LK Gewebe, nachweisen.

Hsa-miR-21-1 ließ eine signifikant verringerte Expression in Lungenkarzinom und gesundem LK Gewebe, beide normalisiert gegen gesundes Lungengewebe, erkennen. Zudem zeigte sich eine signifikant erhöhte Expression in LK Metastasen Gewebe, normalisiert gegen gesundes LK Gewebe (Tabelle 23).

Die Expression von hsa-let-7b-5p ließ eine signifikant verringerte Expression in Lungenkarzinom Gewebe, normalisiert gegen gesundes Lungengewebe, nachweisen. Zudem zeigten sowohl hsa-let-7b-5p als auch hsa-let-7f-5p eine signifikant verringerte Expression in gesundem LK Gewebe, normalisiert gegen gesundes Lungengewebe, und eine signifikant erhöhte Expression in LK Metastasen Gewebe, sowohl gegen gesundes Lungengewebe als auch gegen gesundes LK Gewebe normalisiert (Tabelle 23).

Tabelle 23: Zusammenfassung der miRNA RT-PCR Ergebnisse

Gene	Lungen Ca Gewebe	Gesunder Lymphknoten	Lymphknoten-metastase gegen gesundes Lungengewebe	Lymphknoten-metastase gegen gesundes LK-Gewebe
hsa-miR-19a	→	→	↓	↓↓
hsa-miR-19b	→	→	↓	↓
hsa-miR-30a-5p	→	↓	↓	↑
hsa-miR-21-1	↓	↓	→	↑
hsa-let-7b-5p	↓	↓	↑	↑↑
hsa-let-7f-5p	→	↓↓	↑	↑↑↑

Dargestellt sind die logarithmischen Mittelwerte der Fold-Change Werte aus zwei RT-qPCR Versuchen normalisiert gegen RNU6 als Kontroll-miRNA. Legende: Fold-Change Werte: → nicht signifikant verändert $\uparrow > 2$, $\uparrow\uparrow > 10$, $\uparrow\uparrow\uparrow > 100$ und $\downarrow < 0,5$, $\downarrow\downarrow < 0,1$

4.4 Real-time PCR der Target Gene

4.4.1 Expression von *APAF1*

Das Target *APAF1* zeigte in den Messungen der Real-time PCR eine signifikante Runterregulation in Lungenkarzinom (Fold Change 0,082) und gesundem LK Gewebe (Fold Change 0,025), beide normalisiert gegen gesundes Lungengewebe (Abbildung 12, Spalte 1 und 2). Zudem wurde eine signifikante Hochregulation in LK Metastasen Gewebe, normalisiert gegen gesundes Lungengewebe (Fold Change 2,65) und normalisiert gegen gesundes LK Gewebe (Fold Change 106,15), festgestellt (Abbildung 12, Spalte 3 und 4).

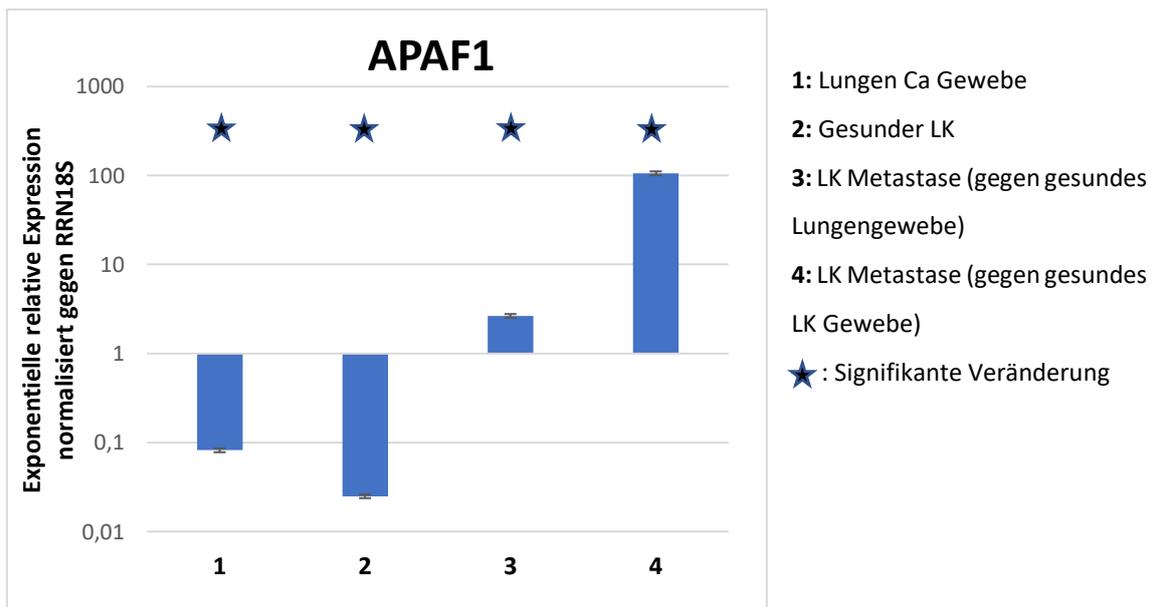


Abbildung 12: Expression von *APAF1*

Die abgebildeten Fold Change Werte wurden aus den Daten von RT-qPCR Messungen berechnet. Dargestellt sind die 10-logarithmisch skalierten Mittelwerte der Fold-Change Werte, normalisiert gegen *RRN6B* als Kontroll-miRNA. Es ist der Durchschnitt aus zwei Messungen \pm Standardfehler dargestellt.

4.4.2 Expression von HMGA2

HMGA2 zeigte eine signifikante Hochregulation in Lungenkarzinom Gewebe (Fold Change 3,66), gesundem LK Gewebe (Fold Change 4,38) und LK Metastasen Gewebe (Fold Change 2,48), alle normalisiert gegen gesundes Lungengewebe (Abbildung 13, Spalte 1,2 und 3). Lymphknotenmetastasen Gewebe, welches gegen gesundes LK Gewebe normalisiert wurde, ließ keine signifikant veränderte Expression deutlich werden (Abbildung 13, Spalte 4).

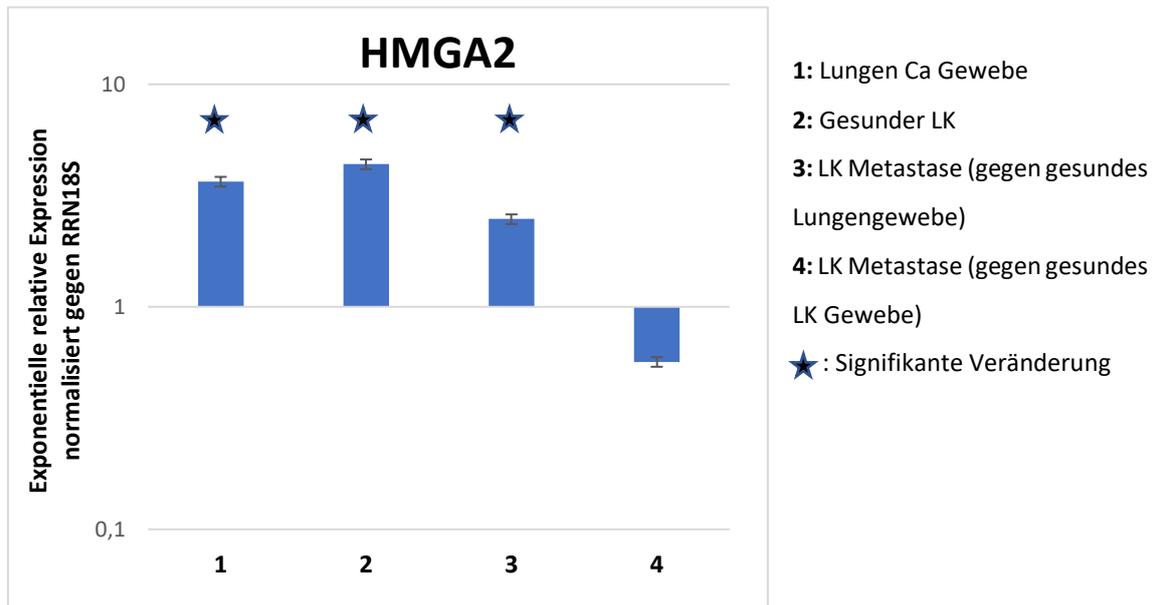


Abbildung 13: Expression von HMGA2

Die abgebildeten Fold Change Werte wurden aus den Daten von RT-qPCR Messungen berechnet. Dargestellt sind die 10-logarithmisch skalierten Mittelwerte der Fold-Change Werte, normalisiert gegen RNU6B als Kontroll-miRNA. Es ist der Durchschnitt aus zwei Messungen \pm Standardfehler dargestellt.

4.4.3 Zusammenfassung der Target Real-time PCR Messung

Zusammenfassend ist zu erkennen, dass *APAF1* eine signifikant erniedrigte Expression in Lungenkarzinom Gewebe und gesundem LK Gewebe und eine signifikant erhöhte Expression in LK Metastasen Gewebe aufwies. *HMGA2* zeigte eine signifikant erhöhte Expression in Lungenkarzinom Gewebe, gesundem LK Gewebe und LK Metastasen Gewebe (Tabelle 24).

Tabelle 24: Zusammenfassung der Target RT PCR Messungen

Gene	Lungen Ca Gewebe	Gesunder Lymphknoten	Lymphknoten-metastase gegen gesundes Lungengewebe	Lymphknoten-metastase gegen gesundes LK-Gewebe
APAF1	↓↓	↓↓	↑	↑↑↑
HMGA2	↑	↑	↑	→

Dargestellt sind die logarithmischen Mittelwerte der Fold-Change Werte aus zwei RT-qPCR Versuchen normalisiert gegen RRN18S als Kontroll-miRNA. Legende: Fold-Change Werte: →=nicht signifikant verändert $\uparrow > 2$, $\uparrow\uparrow > 10$, $\uparrow\uparrow\uparrow > 100$ und $\downarrow < 0,5$, $\downarrow\downarrow < 0,1$

4.5 Korrelation von miRNAs und Targets

Die Expression einer miRNA und ihrem Target muss invers bzw. negativ korrelieren, um eine eindeutige Beziehung zueinander nachweisen zu können.

APAF1 ist laut Recherche in den Datenbanken miRanda, miRDB und TargetScan das Target von hsa-miR-19a, hsa-miR-19b und hsa-miR-21-1. APAF1 zeigte eine signifikante Runterregulation in Lungentumor Gewebe und eine signifikante Hochregulation in LK Met Gewebe.

Hsa-miR-19a und hsa-miR-19b wiesen in Lungen Ca Gewebe keine veränderte Expression auf, in LK Met Gewebe dagegen wurde eine signifikante Runterregulation deutlich. Somit konnte in Lungenkarzinom Gewebe eine inverse Korrelation von hsa-miR-19a und hsa-miR-19b mit APAF1 beobachtet werden (vorhandene miRNA reguliert das Target runter), in LK Metastasen konnte hingegen eine negative Korrelation (gegensätzliche Expression von miRNA und Target) zu APAF1 bewiesen werden.

Hsa-miR-21-1 zeigt eine Runterregulation in Lungen Ca Gewebe und eine Hochregulation in LK Metastasen Gewebe (Tabelle 25). Somit korrelierte hsa-miR-21-1 sowohl in Lungen Ca Gewebe als auch LK Met Gewebe positiv (gleiche Expression von miRNA und Target) mit APAF1.

Tabelle 25: Expression von hsa-miR-19, hsa-miR-19b und hsa-miR-21-1 und ihrem Target APAF1

Gene	Lunge Ca vs gesunde Lunge	LK Met vs gesunder LK
APAF1	↓↓	↑↑↑
hsa-miR-19a	→	↓↓
hsa-miR-19b	→	↓
hsa-miR-21-1	↓	↑

Dargestellt sind die logarithmischen Mittelwerte der Fold-Change Werte aus zwei RT-qPCR Versuchen normalisiert gegen RNU6B bei den miRNAs und RRN18S bei APAF1 als Kontrolle. Im Vergleich stehen die angegebenen Gruppen. Fold-Change Werte: ↑>2, ↑↑>10, ↑↑↑>100 und ↓<0,5, ↓↓<0,1

HMGA2 wird bei miRanda, miRDB und TargetScan als das Target von hsa-let-7b-5p und hsa-let-7f-5p angegeben. In der durchgeführten RT-qPCR ließ sich in Lungen Ca Gewebe eine Hochregulation von HMGA2 feststellen und keine signifikante Veränderung in LK Metastasen Gewebe (Tabelle 26).

Hsa-let-7b-5p zeigte sowohl Runterregulation in Lungen Ca Gewebe und eine Hochregulation in LK Metastasen Gewebe. Somit ließ sich zwischen hsa-let7b-5p und HMGA2 in Lungen Ca Gewebe eine inverse Korrelation feststellen und in LK Met keine Korrelation erkennen. Hsa-Let-7f-5p zeigte keine signifikant veränderte Expression in Lungentumoren und eine starke Hochregulation in LK Metastasen (Tabelle 26). Somit konnte zwischen hsa-Let-7f-5p und HMGA2 in beiden Geweben keine Korrelation festgestellt werden.

Tabelle 26: Expression von hsa-let-7b-5p und hsa-let-7f-5p und ihrem Target HMGA2

Gene	Lunge Ca vs gesunde Lunge	LK Met vs gesunder LK
HMGA2	↑	→
hsa-let-7b-5p	↓	↑↑
hsa-let-7f-5p	→	↑↑↑

Dargestellt sind die logarithmischen Mittelwerte der Fold-Change Werte aus zwei RT-qPCR Versuchen normalisiert gegen RNU6B bei den miRNAs und RRN18S bei HMGA2 als Kontrolle. Im Vergleich stehen die angegebenen Gruppen. Fold-Change Werte: ↑>2, ↑↑>10, ↑↑↑>100 und ↓<0,5, ↓↓<0,1

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression der miRNAs hsa-miR-19a, hsa-miR-19b, hsa-miR-30a-5p, hsa-miR-21-1, hsa-let-7b-5p und hsa-let-7f-5p und der Target Gene HMGA2 und APAF1 von NSCLC Gewebe und erstmalig dessen LK Metastasen untersucht. Dies wurde mit der Expression in gesundem Lungen- und LK Gewebe verglichen. Dazu wurden 70 FFPE-Gewebeproben von 31 Probanden mithilfe einer Real-time RT-PCR quantitativ untersucht.

5.1 Untersuchung von miRNA aus FFPE-Gewebe

In der hier beschriebenen Studie wurden Patientenproben untersucht, die als FFPE-Gewebe vorlagen und mikrodisssektiert wurden. Es ist gelungen, aus diesen Gewebeproben miRNA zu extrahieren und mithilfe einer Real-time PCR quantitativ zu erfassen. Der Vorteil von FFPE-Gewebe ist, dass es meist in größeren Mengen gelagert wird im Gegensatz zu frischem und gefrorenem Gewebe. Zudem wird es im Archiv meist lange aufbewahrt und ist somit über lange Zeiträume hinweg verfügbar. FFPE-Gewebe für die Untersuchung von miRNA zu nutzen, birgt jedoch die Gefahr, dass die RNA und auch die miRNA durch das Formalin und Paraffin degradiert wird und es somit zu verfälschten Ergebnissen kommen kann. Insbesondere lange RNA-Stücke sind von der Degradierung betroffen (Kakimoto et al. 2016).

Der Vergleich von FFPE-Gewebe mit frischen gefrorenen Proben aus Tonsillentumor Gewebe von Vojtechova et al. (Vojtechova et al. 2017) zeigt, dass die miRNA in FFPE-Gewebe zwar teilweise degradiert ist, allerdings sind immer noch Fragmente mit einer Länge von über 200 Basenpaaren vorhanden. Somit ist eine miRNA Extraktionsanalyse möglich. Zudem zeigt Liu et al. (Liu und Xu 2011) mithilfe von Mikroarray Experimenten, dass FFPE-Gewebe in der Tat gut für die Isolation von miRNA geeignet ist und das Expressionsprofil dem von frischen gefrorenen Proben sehr ähnlich ist.

Insgesamt betrachtet lässt sich sagen, dass FFPE-Gewebe für die Extraktion von miRNA gut geeignet ist, da es häufig in großen Mengen verfügbar ist und zudem verlässliche Ergebnisse in der miRNA Expressionsanalyse vorweisen kann (Liu und Xu 2011). Dabei ist zu beachten, dass ein Vergleich am besten mit anderen miRNA Expressionsanalysen durchgeführt werden sollte, welche auch FFPE-Gewebe als klinisches Material verwendet haben (Vojtechova et al. 2017).

5.2 Expression von hsa-miR-19 in NSCLC Gewebe

Die Ergebnisse zeigten einen erhöhten Fold-Change Wert der miRNAs hsa-miR-19a (Abbildung 6) und hsa-miR-19b (Abbildung 7) in NSCLC Gewebe im Vergleich zu gesundem Lungengewebe, allerdings keine ausreichende Erhöhung, um als signifikante Hochregulation zu gelten. Eine Überexpression von hsa-miR-19 wird in einigen Studien berichtet und zeigte dort eine deutlichere, signifikante Ausprägung. In der Studie von Hayashita et al. (Hayashita et al. 2005) konnte mithilfe von Southern Blot Untersuchungen bewiesen werden, dass das miR-17-92 Cluster in Lungenkarzinomen überexprimiert wird und in der Studie von Olive et al. (Olive et al. 2009) ist miR-19 als ein Schlüsselonkogen vom miR-17-92 Cluster mithilfe des E μ -myc Maus Modells bei B-Zell Lymphomen identifiziert worden.

Auch in weiteren Studien wird die Überexpression von hsa-miR-19a und hsa-miR-19b in Lungenkarzinomen weiter unterstützt. Sie wird mit einer stärkeren Differenzierung von Krebs Stammzellen in Lungengewebe in Verbindung gebracht (Zhu et al. 2017b) und führt zu stärkerer Migration von Lungenkrebszellen (Li et al. 2015), sodass das Überleben der Patienten abhängig von der Expression von miR-19 ist. (Mairinger et al. 2014) Bei der Transfektion von miR-19a Mimics in NSCLC Zellen konnte sogar eine Verstärkung des Zellwachstums, der Zellvariabilität, der Zellinvasion und Zellmigration von NSCLC Zellen beobachtet werden (Wang und Chen 2015). Auch in Magenkarzinomen Proben zeigte sich in vergangenen Studien eine Überexpression von miR-19a und miR-19b, welche signifikant mit der Metastasierung, Lymphknoten Metastasierung und dem TNM Stadium der Patienten in Verbindung gebracht werden konnte (Wu et al. 2014). Auch Lin et al. (Lin et al. 2013) konnte eine Überexpression von miR-19a in Proben von Lungentumor Gewebe und Serum von Patienten beweisen, wobei es ebenfalls möglich war, eine Korrelation zwischen TNM Stadium und Lymphknotenmetastasierung und der Expression von hsa-miR-19a herzustellen.

Auch die in dieser Studie beschriebenen erhöhten Fold-Change Werte weisen auf eine erhöhte Expression der beiden miRNAs in Lungenkarzinomen hin. Allerdings ist die Hochregulation in den hier untersuchten Proben wesentlich weniger stark ausgeprägt. Dafür kann es mehrere Gründe geben. Zunächst ist zu beachten, dass in allen hier aufgeführten Studien mit Ausnahme von Mairinger und Kollegen (Mairinger et al. 2014) kein FFPE-Gewebe als klinisches Material benutzt wurde, was die Vergleichbarkeit der Ergebnisse durch die Veränderung der RNA in FFPE-Gewebe erschwert. Es ist möglich, dass eine stärkere Degradierung der miRNAs hsa-miR-19a und hsa-miR-19b vorliegt und somit ihre Expression niedrig falsch gemessen wird.

Auch das Poolen der Proben kann ein Grund für die stabil gemessene Expression sein, da somit lediglich die durchschnittliche Expression der miRNAs gemessen werden konnte. Dadurch werden Proben mit hoher Expression durch stabil oder sogar niedrig exprimierte Proben ausgeglichen und „verdünnt“. Somit wird anhand dieser Studie deutlich, dass die durchschnittliche Expression in Lungenkarzinomproben nicht signifikant erhöht ist, aber einzeln gemessene Proben durchaus eine erhöhte Expression aufweisen können, da hsa-miR-19a und hsa-miR-19b eine onkogene Wirkung in anderen Studien aufweisen.

5.3 Expression von hsa-miR-30a-5p in NSCLC Gewebe

In den Ergebnissen zeigte sich eine unveränderte Expression von hsa-miR-30a-5p in NSCLC Gewebe im Vergleich mit gesundem Lungengewebe (Abbildung 8). Allerdings konnten zahlreiche Studien bisher verdeutlichen, dass miR-30a als Tumorsuppressor in verschiedenen Tumorerkrankungen dient und somit eine reduzierte Expression aufweist. In Brustkrebs Proben konnte in der Studie von Zhang, Wang et al. (Zhang et al. 2014) verdeutlicht werden, dass die miR-30a Expression negativ mit der Entstehung von Lymphknoten und Lungen Metastasierungen korrelierte. Auch anhand von Kolorektalenkarzinomen konnte die tumorsuppressive Wirkung von miR-30 bewiesen werden, da eine Überexprimierung von miR-30a eine reduzierte Zellmigration und reduzierte Leber Metastasierung zufolge hatte, wohingegen eine Deletion von miR-30a zu stärkerer Zellmigration und -invasion führte (Zhong et al. 2013).

In dem Review von Langevin, Kratzke et al. (Langevin et al. 2015) und zahlreichen weiteren Studien wird deutlich, dass miR-30a auch in Lungenkarzinomen dafür bekannt ist, runterreguliert zu werden und tumorsuppressiv zu wirken (Zhu et al. 2015; Langevin et al. 2015; Ma et al. 2018; Fan et al. 2017; Wang et al. 2015; Jiang et al. 2013). Insbesondere Patienten mit einer niedrigeren miR-30a/c Expression zeigten in einer Studie kürzere progressionsfreie Überlebenszeiten und ein kürzeres Gesamtüberleben (Ma et al. 2018), was darauf schließen lässt, dass die miR-30a Expression in einem direkten Verhältnis zum Überleben der Patienten steht.

Es konnten bereits verschiedene Wege entdeckt werden, durch welche miR-30a das Überleben der Patienten verlängert bzw. bei einer Runterregulation das Überleben verkürzt. Durch Transfektion von miR-30a „Mimics“ in Lungenkarzinomzellen wurde demonstriert, dass das Wachstum und die Verbreitung von Lungenkarzinomzellen reduziert werden konnte (Luan et al. 2018).

Dies geschah durch die Unterdrückung von MEF2D (Myocyte enhancer factor 2D) einem Target von miR-30a. Durch den Apoptose Weg, bei welchem Caspase3 involviert ist, konnte miR-30a zudem die Apoptose von Lungenkarzinomzellen induzieren und somit auf einem weiteren Weg tumorsuppressiv wirken (Luan et al. 2018). Dass miR-30a die Zell Apoptose steigern und malignes Wachstum in Lungenkarzinomen Zellen schwächen kann, wurde ebenfalls belegt (Fan et al. 2017). Ein weiteres Target von miR-30a ist BCL11A, welches in Proben von NSCLC Patienten in höher exprimiert wurde. Besonders erhöht ist die Expression von BCL11A bei Rauchern, Patienten ohne Lymphknoten Beteiligung und Patienten mit frühen Stadien der Erkrankung (Jiang et al. 2013).

Die verfügbaren Studien zeigen, dass miR-30a als Tumorsuppressor dient und somit eine meist herunterregulierte Expression in Lungenkarzinom Gewebe vorweist. In dieser Arbeit wird von einer unveränderten Expression von hsa-miR-30a-5p berichtet. Durch das Poolen der Patientenproben wird in dieser Studie lediglich ein Durchschnittswert aller Lungenkarzinomproben angegeben. Es ist daher sehr gut möglich, dass einige Proben eine erhöhte oder erniedrigte Expression von hsa-miR-30a-5p aufgewiesen haben. Durch die Größe des Patientenkollektivs wird dies allerdings ausgeglichen und die durchschnittliche Expression in Lungenkarzinomen ist als stabil bzw. unverändert zu erkennen. Es ist zudem denkbar, dass die Runterregulation von hsa-miR-30a-5p keine zwingende Voraussetzung für die Entstehung eines Lungenkarzinoms ist, sondern nur einen weiteren von zahlreichen kanzerogenen Faktoren darstellt. Dies sollte in zukünftigen Studien validiert werden, da somit die Variabilität der Expression von miRNAs in Krebserkrankungen verdeutlicht werden kann.

Zudem ist ein Vergleich zwischen verschiedenem Ausgangsmaterial mit FFPE-Gewebe aufgrund der Degradierung der RNA schwierig. Lediglich die Studien von Luan et al (Luan et al. 2018) und Jiang et al (Jiang et al. 2013) haben teilweise FFPE-Gewebe als Material verwendet, ansonsten wurden meist frische Proben oder Zelllinien für die Untersuchungen benutzt. Dies erschwert den Vergleich der Ergebnisse mit den bisherigen Studien zur Expression von hsa-miR-30a-5p.

5.4 Expression von hsa-miR-21-1 in NSCLC Gewebe

Hsa-miR-21-1 war in FFPE-Gewebeproben von NSCLC Patienten im Vergleich mit gesundem Lungengewebe signifikant runterreguliert. In verschiedenen Studien und einer großangelegten Metaanalyse über 19 Studien von 2013 zeigte sich dagegen, dass in NSCLC Proben eine erhöhte miR-21 Expression vorliegt (Wang et al. 2013; Saito et al. 2011; Yang et al. 2013; Zhou et al. 2017; Wang et al. 2011; Liu et al. 2013; Xue et al. 2016). Dabei korrelierte die erhöhte miR-21 Expression mit einem erhöhten Risiko einer Lymphinfiltration, einem niedrigeren rezidiv-freien Überleben und einem niedrigeren Gesamtüberleben (Wang et al. 2013; Saito et al. 2011; Yang et al. 2013). Bei Patienten mit NSCLC, welche eine hohe miR-21 Expression aufwiesen, lag das 3-Jahres Überleben bei 39,8% im Gegensatz zu 58,2% bei Patienten mit niedriger miR-21 Expression (Wang et al. 2011). Es wird zudem vermutet, dass miR-21 insbesondere bei der Entstehung von NSCLC als Onkogen mitwirkt, da die erhöhte miR-21 Expression bereits Stadium I des NSCLC betrifft (Saito et al. 2011) und dort ein hohes Expressionsniveau erreicht (Zhou et al. 2017).

In weiteren Studien zeigte sich, dass auch im Blutplasma von NSCLC Patienten eine erhöhte Expression von miR-21 gemessen werden konnte. Das TNM Stadium korrelierte dabei positiv mit der miR-21 Expression, jedoch gab es keine Verbindung zu Alter, Geschlecht, Raucherstatus, histologischer Klassifikation oder Metastasierung (Wei et al. 2011). Dass die Metastasierung und auch im speziellen die Lymphknoten Metastasierung bei NSCLC Patienten mit der miR-21 Expression positiv korreliert, konnte in weiteren Studien in Blutserum, NSCLC Zelllinien und gefrorenen NSCLC Proben nachgewiesen werden (Zhou et al. 2017; Wang et al. 2011; Liu et al. 2013).

Das onkogene Potenzial von miR-21 wird durch die Inhibition der Tumorsuppressoren *PTEN*, *SNX1*, *SGPP1*, *SOCS1* und *SOCS6* und die Steigerung der Akt-Phosphorylierung ausgelöst (Liu et al. 2013; Zhang et al. 2015; Xue et al. 2016). In einem Xenograft Tiermodell konnte zudem gezeigt werden, dass das Antagonisieren von miR-21 die Tumorprogression inhibieren konnte (Xue et al. 2016).

Bei all den Studien ist zu beachten, dass lediglich zwei der zahlreichen Studien FFPE-Gewebe für ihre Messungen verwendet haben. Eine der zwei Studien mit FFPE-Gewebe als Ausgangsmaterial stammte von Saito, Voortmann und seinen Kollegen (Saito et al. 2011; Voortman et al. 2010). In ihrer ersten von zwei Studien wurden wie in der vorliegenden Arbeit FFPE-Gewebeproben mit quantitativer RT-PCR untersucht, wobei eine schlechtere Prognose bei niedrigerer miR-21 Expression vermutet werden konnte (Voortman et al. 2010) und somit die Ergebnisse dieser Studie unterstützt werden.

In der nachfolgenden Studie (Saito et al. 2011) aus dem Jahr 2011 wurden dagegen gefrorene NSCLC Proben mit quantitativer RT-PCR untersucht. Im Gegensatz zur vorherigen Studie wurde nun eine höhere Expression von miR-21 mit einem schlechteren tumorspezifischen Überleben, unabhängig von anderen klinischen Faktoren, in Verbindung gebracht. Somit scheint die miR-21 Expression im direkten Vergleich unterschiedliche Ergebnisse bei unterschiedlichem Ausgangsmaterial aufzuweisen. Wie oben beschrieben, konnte in Blutplasma beispielsweise zwar eine erhöhte miR-21 Expression festgestellt werden, allerdings bestand im Gegensatz zu anderen Studien (Zhou et al. 2017; Wang et al. 2011; Liu et al. 2013) keine Korrelation mit der Metastasierung des NSCLC (Wei et al. 2011).

Insgesamt ist daher unklar, welches Probenmaterial die beste Quelle für die Expressionsmessung von miR-21 bei NSCLC erkrankten Patienten darstellt (Wang et al. 2013) und es wird deutlich, dass miR-21 große Schwankungen bei der direkten Messung in Lungenkarzinomproben präsentiert. Da eine einzelne miRNA auf zahlreiche Targets wirken kann, könnte sich die Expression von miR-21 zwischen verschiedenen Lungenkarzinomproben unterscheiden. Durch die Ergebnisse der vorliegenden Studie und die Ergebnisse von Voortman et al. (Voortman et al. 2010) wird die hohe miR-21 Variabilität deutlich und es kann vermutet werden, dass Lungenkarzinome die Möglichkeit haben, die Expression von miR-21 zu beeinflussen, eine hochregulierte Expression aber nicht zwangsweise für ein Lungenkarzinom vorliegen muss. Auch eine erhöhte Degradierung von miR-21 in FFPE-Gewebe im Gegensatz zu anderen miRNAs kann vermutet werden. So kann eine falsch niedrige Expression durch die Einbettung in Paraffin gemessen worden sein, wenn die Degradierung von miR-21 in den Lungenkarzinomproben weitaus stärker ausgeprägt war als in den lungengesunden Vergleichsproben. Dieses Phänomen muss in weiteren Studien anhand von Vergleichen zwischen frischen Proben und FFPE-Gewebe untersucht werden.

5.5 Expression von hsa-Let-7 in NSCLC Gewebe

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass hsa-let-7b-5p eine signifikante Runterregulation in NSCLC Gewebe aufwies, wohingegen hsa-let-7f-5p stabil exprimiert war. Ein ähnliches Ergebnis wurde auch im Jahr 2017 berichtet (Di Fazio et al. 2017), welche die Expression derselben miRNAs in typischen und atypischen neuroendokrinen Karzinoiden der Lunge untersuchten. Sie konnten ebenfalls eine signifikante Runterregulation von hsa-let-7b-5p und eine stabile- oder Überexpression von hsa-let-7f-5p in FFPE-Gewebe nachweisen. In Untersuchungen mit Zellreihen von Lungenkarzinomen wurde bisher eine reduzierte Expression von let-7a, let-7b und let-7f nachgewiesen (Takamizawa et al. 2004; Stahlhut und Slack 2015), wobei Patienten mit einer niedrigeren let-7 Expression ein signifikant kürzeres Überleben nach einer potenziell kurativen Lungen- oder Lungenteilresektion aufwiesen (Takamizawa et al. 2004).

Die tumorsuppressive Wirkung der let-7 Familie wurde in einer Zellreihe mit Lungen Adenokarzinomen demonstriert, sodass eine Überexpression von let-7 das Tumorwachstum in den Lungenkrebszellen in vitro inhibieren konnte (Takamizawa et al. 2004). Es war zudem durch eine erhöhte Expression von let-7g in K-Ras exprimierenden Murin Lungenkrebszellen möglich, ein Zellzyklus Arrest und Zelltod herbeizuführen und in einem Tumor Xenograft Modell konnte durch künstliche Überexprimierung von let-7g mithilfe von lentiviralen Vektoren eine signifikante Wachstumsreduktion in menschlichen NSCLC Zellen erreicht werden (Kumar et al. 2008).

Die in dieser Studie gemessene Runterregulation von hsa-let-7b-5p in Verbindung mit zahlreichen weiteren Studien können daher die vermutete tumorsuppressive Wirkung der let-7 Familie bestätigen (Stahlhut und Slack 2015; Esquela-Kerscher et al. 2008). Eine Runterregulation von let-7f in NSCLC Gewebe wurde in dieser Arbeit nicht festgestellt und wurde bisher nur in Zellreihen und nicht in FFPE-Gewebe beschrieben. Eine unterschiedliche Funktion von let-7b und let-7f in Lungenkarzinomen wurde aufgrund der unterschiedlichen Expression bereits von Di Fazio et al. (Di Fazio et al. 2017) vermutet und wird durch diese Studie weiter bestärkt. Es muss daher in Zukunft eine differenziertere Expressionsanalyse der let-7 Familie vorgenommen werden, da auch weitere Vertreter der Familie eine unterschiedliche Expression aufweisen könnten und somit nicht die komplette let-7 Familie eine tumorsuppressive Wirkung aufweisen würde.

5.6 Expression von APAF1 und HMGA2 in NSCLC Gewebe

In der vorliegenden Arbeit wurde eine signifikant runterregulierte Expression von *APAF1* in NSCLC Gewebe im Vergleich zu gesundem Lungengewebe gemessen. Diese Ergebnisse werden durch weitere Studien aus den Jahren 2012 und 2017 unterstützt und bestätigen eine Runterregulation von *APAF1* in NSCLC Proben, NSCLC Zelllinien und unspezifischen Lungenkarzinom Proben (Li et al. 2017; Zang et al. 2012). Die Ergebnisse deuten auf eine tumorsuppressive Wirkung von *APAF1* hin, indem es über Cytochrom C die Expression von Caspasen aktiviert, welche an der Zell Apoptose beteiligt sind (Zermati et al. 2007). Eine Runterregulation von *APAF1* kann somit die Apoptose durch eine verminderte Expression von Caspase-3 inhibieren und so die Fortschreitung des NSCLC begünstigen (Li et al. 2017). Lediglich eine frühere Studie von 2004 konnte im Gegensatz zu dieser Studie eine hochregulierte Expression von *APAF1* und Procaspase-3 (Procaspase-3 wird im Verlauf zu Caspase-3 umgewandelt (Moravcikova et al. 2014)) in NSCLC feststellen. Dies lässt vermuten, dass NSCLC eine Möglichkeit haben, die Apoptose getriebene Caspase Aktivierung im Zytosol zu unterdrücken (Krepela et al. 2004).

Die verminderte *APAF1* Expression konnte in dieser Studie in FFPE-Gewebe und in anderen Studien in verschiedenstem Ausgangsmaterial bewiesen werden und bestätigt daher den Verdacht einer tumorsuppressiven Wirkung von *APAF1*. Da Targets von vielen verschiedenen miRNAs beeinflusst werden, ist eine klare Ursache der Runterregulation von *APAF1* bisher noch nicht gefunden worden. Studien mit einem breiten Spektrum an miRNA Expressionsprofilen und der gleichzeitigen Messung von *APAF1* könnten diese klären.

Die Expression von *HMGA2* in NSCLC Gewebe im Vergleich zu gesundem Lungengewebe stellte sich in der vorliegenden Arbeit als signifikant erhöht dar. Diese signifikant erhöhte Expression von *HMGA2* in primären menschlichen Lungenkarzinomen und speziell dem NSCLC wird auch aus weiteren Studien berichtet (Meyer et al. 2007; Sun et al. 2017; Jiang et al. 2018; Di Cello et al. 2008; Sarhadi et al. 2006; Di Fazio et al. 2017). Es konnte zudem eine unterschiedliche Expression zwischen typischen und atypischen Karzinoiden festgestellt werden, was langfristig eine Differenzierung zwischen verschiedenen Tumorentitäten erlauben könnte (Di Fazio et al. 2017).

Die erhöhte Expression von *HMGA2* beim NSCLC führte zu einer gesteigerter Zellproliferation, -migration und -invasion (Sun et al. 2017; Gao et al. 2017; Sarhadi et al. 2006) und nimmt auch Einfluss auf die Metastasierung (Di Cello et al. 2008). Die Expression von *HMGA2* korrelierte zudem mit dem Tumorgrading (Di Cello et al. 2008) und korrelierte invers mit dem Gesamtüberleben der Patienten (Gao et al. 2017).

HMGA2 hat eine duale Funktion bei der Förderung des Lungenkarzinoms. (Kumar et al. 2014) Die erste Funktion für die Tumorgenese hat *HMGA2* als proteinkodierendes Gen, indem es die Zellapoptose durch Caspase 3, 9 und Bcl-2 beeinflusst (Gao et al. 2017). Die andere Funktion von *HMGA2* ist als nicht-kodierende RNA, indem es kompetitiv gegen die tumorsuppressiv wirkende let-7 miRNA Familie wirkt (Kumar et al. 2014; Takamizawa et al. 2004; Stahlhut und Slack 2015; Esquela-Kerscher et al. 2008). Diese beiden Wirkungsweisen machen die onkogene Funktion von *HMGA2* deutlich (Sun et al. 2017; Jiang et al. 2018; Gao et al. 2017; Di Cello et al. 2008) und unterstützen die Ergebnisse dieser Studie, dass *HMGA2* in Lungenkarzinomen mit erhöhter Expression vorliegt. Aufgrund der erhöht gemessenen Expression von *HMGA2* ist eine Degradierung dieser mRNA durch die Verwendung von FFPE-Lungenkarzinomgewebe zudem äußerst unwahrscheinlich und präzisiert daher die Ergebnisse dieser Studie.

Zusammenfassend lassen sich die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit durch die Literatur umfassend bestätigen. Die unterschiedlichen Gewebeformen, die in den verschiedenen Studien untersucht worden sind, scheinen dabei keinen Einfluss auf die Expression dieser mRNAs zu haben. Durch die Analyse der Expression in dieser Arbeit lässt sich daher bestätigen, dass *APAF1* runterreguliert beim menschlichen NSCLC vorliegt und somit eine tumorsuppressive Funktion einnimmt. Die Hochregulation von *HMGA2* im menschlichen NSCLC lässt sich ebenso bestätigen, was deutlich macht, dass *HMGA2* eine onkogene Funktion einnimmt.

5.7 Expression der miRNAs und Targets in LK Metastasen Gewebe

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten das folgende miRNA Expressionsprofil in Lymphknoten Metastasen:

1. LK Metastasen im Vergleich zu gesundem LK:
 - ➔ Hochregulation von hsa-miR-30a-5p, hsa-miR-21-1, hsa-let-7b-5p, hsa-let-7f-5p, *APAF1*
 - ➔ Unveränderte Expression von *HMGA2*
 - ➔ Runterregulation von hsa-miR-19a, hsa-miR-19b
2. LK Metastasen im Vergleich zu Lungentumor Gewebe (jeweils im Vergleich zu gesundem Lungengewebe):
 - ➔ Hochregulation von hsa-miR-21-1, hsa-let-7b-5p, hsa-let-7f-5p, *APAF1*
 - ➔ Unveränderte Expression von *HMGA2*
 - ➔ Runterregulation von hsa-miR-19a, hsa-miR-19b, hsa-miR-30a-5p

Wie zu erkennen ist, unterscheidet sich die Expression der miRNAs und Targets zwischen Primärtumor und Lymphknotenmetastase. Einzig *HMGA2* zeigte die gleiche Expression in allen drei Geweben.

Im Vergleich von LK Metastasen mit Lungentumorgewebe zeigten *hsa-miR-21-1*, *APAF1*, *hsa-let-7b-5p* und *hsa-let-7f-5p* eine hochregulierte Expression und *hsa-miR-19a*, *hsa-miR-19b* und *hsa-miR-30a-5p* eine runterregulierte Expression. Interessanterweise ist nur bei *HMGA2* eine unveränderte Expression zwischen Primärtumor und LK Metastase messbar. Alle anderen miRNAs und *APAF1* weisen eine unterschiedliche Expression zwischen Lungentumor und der LK Metastase auf. Es lässt sich daher vermuten, dass die in Lymphknotenmetastasen im Gegensatz zu Lungenkarzinomen hochregulierten miRNAs *hsa-miR-21-1*, *hsa-let-7b-5p*, *hsa-let-7f-5p* und die mRNA *APAF1* eine wichtigere Rolle in der Metastasierung des Lungenkarzinoms spielen als in der Entstehung des Primärtumors oder sie im Primärtumor aufgrund tumorsuppressiver Wirkung vermindert exprimiert werden. Die runterregulierten miRNAs *hsa-miR-19a*, *hsa-miR-19b* und *hsa-miR-30a-5p* scheinen dagegen eine wichtigere Rolle in der Entstehung des Primärtumors zu spielen als in der Metastasierung oder sie müssen in Lymphknotenmetastasen runterreguliert werden aufgrund metastasensuppressiver Wirkung.

Die aktuelle Studienlage lässt keinen Vergleich der Ergebnisse zu, da es keine Studien zur Messung der hier untersuchten miRNAs und Targets in LK Metastasen von NSCLC Patienten gibt. Viele der aktuellen Studien untersuchen lediglich das miRNA Expressionsprofil im Primärtumor und versuchen so auf das TNM Stadium und die Metastasierung zu schließen (Lin et al. 2013; Wu et al. 2014; Wang et al. 2013; Zhang et al. 2014). Im Gegensatz dazu versucht die vorliegende Arbeit anhand der miRNA Expression in LK Metastasen ausgehend vom NSCLC, einen Einblick in die Entstehung und Entwicklung von Metastasen zu erlangen. Wu und Kollegen haben im Jahr 2017 bereits eine Studie zur Messung von miRNA in LK Metastasen von Patienten mit Lungenkarzinomen veröffentlicht (Wu et al. 2017). Anhand einer Mikroarray Analyse der LK Metastasen von fünf Patienten konnte eine veränderte Expression von miR-21 und 49 weiteren miRNAs im Vergleich zu gesundem LK Gewebe gefunden werden. Die Expression von miR-21 zeigte einen erhöhten Fold-Change Wert, wurde jedoch nicht weiter untersucht (Wu et al. 2017).

Die vorliegende Studie zeigte, dass es einen Unterschied in der Expression von miRNA und Target zwischen Primärtumor und Metastase gibt. Diese unterschiedliche Expression bestätigen zwei Studien, welche die miRNA Expression in Kolorektalen Karzinomen und ihren Metastasen untersucht haben. Feiersinger und Kollegen haben herausgefunden, dass miR-21 und miR-31 in Lebermetastasen von Kolorektalen Karzinomen im Vergleich zu gesundem Lebergewebe erhöht sind (Feiersinger et al. 2016). Jedoch zeigte miR-21 eine signifikant reduzierte Expression in Lebermetastasen im Vergleich zum Primärtumor. Die erhöhte Expression von miR-21 in Metastasen im Vergleich zum gesunden Gewebe konnten in der vorliegenden Studie bestätigt werden. Im Gegensatz zu Feiersinger et al. zeigte miR-21 in dieser Studie allerdings eine höhere Expression in LK Metastasen als im Primärtumor. MiR-21 scheint eine andere Aufgabe in Lymphknotenmetastasen von Lungenkarzinomen als in Lebermetastasen von Kolorektalkarzinomen zu übernehmen und stellt daher keinen konstanten Marker für die Metastasierung von Karzinomen dar.

Dass ein Vergleich zwischen unterschiedlichem Gewebe, in welches Metastasen eingewandert sind, erschwert ist, zeigte auch die Studie von Pecqueux (Pecqueux et al. 2016). Sie haben die Leber- und Lungenmetastasen von vier zufällig ausgewählten Patienten mit Kolorektalkarzinomen untersucht und ein unterschiedliches miRNA Expressionsprofil zwischen den Lungen- und Lebermetastasen gefunden.

Die Studien machen die vielfältige Expression der miRNAs deutlich und zeigen, dass die miRNA Expression nicht nur zwischen Primärtumor und Metastasen Unterschiede aufweist, sondern auch zwischen verschiedenen Lokalisationen der Metastasen. Die in dieser Studie vorlegten Ergebnisse sind daher nur für das NSCLC und die davon ausgehenden LK Metastasen gültig. In weiteren Studien sollte daher nicht nur die Expression der miRNAs des Primärtumors, sondern auch die miRNA Expression der Metastasen auf ihre Korrelation mit dem TNM Stadium untersucht werden, um ein ganzheitliches Bild der Primärtumor- und Metastasenentstehung zu erstellen.

5.8 Korrelation zwischen miRNAs und Targets

In der vorliegenden Arbeit wurde die Beziehung zwischen miRNA und Target sowohl in Lungenkarzinomen als auch in Lymphknotenmetastasen von Lungenkarzinomen untersucht.

In Lungenkarzinomgewebe und in Lymphknotenmetastasengewebe wurde eine inverse Korrelation zwischen hsa-miR-19a, hsa-miR-19b und dem potenziellen Target *APAF1* festgestellt. Somit konnte in dieser Studie eine wahrscheinliche Beeinflussung von *APAF1* durch hsa-miR-19a und hsa-miR-19b in Lungenkarzinomgewebe und Lymphknotenmetastasen bestätigt werden.

Die Korrelation von hsa-miR-19a und hsa-miR-19b mit *APAF1* wurde in anderen Studien noch nicht untersucht, wodurch ein Vergleich der in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse erschwert wird. Da zahlreiche Studien jedoch von einer signifikanten Hochregulation von miR-19a und miR-19b (Lin et al. 2013; Li et al. 2015; Zhu et al. 2017b) und andere von einer signifikanten Runterregulation von *APAF1* berichten (Li et al. 2017; Zang et al. 2012), stützt dies die Ergebnisse dieser Studie, dass eine inverse Korrelation zwischen miR-19a/b und *APAF1* in Lungenkarzinom- und Lymphknotenmetastasengewebe besteht.

In dieser Studie wurde zudem eine positive Korrelation zwischen hsa-miR-21-1 und *APAF1* sowohl in Lungenkarzinomgewebe als auch in Lymphknotenmetastasengewebe deutlich. Diese Korrelation zeigt nicht die typische inverse Korrelation zwischen miRNA und Target und kann daher nicht die Hypothese stützen, dass *APAF1* als Target von hsa-miR-21-1 dient. Auch die Expression von hsa-miR-21-1 in Relation zu seinem potenziellen Target *APAF1* ist in der bestehenden Literatur bisher wenig untersucht worden. Auf der einen Seite kann die positive Korrelation zwischen hsa-miR-21-1 und *APAF1* in der vorliegenden Studie durch die Studie von Flores et al. (Flores et al. 2017) bestätigt werden, allerdings wurden ihre Untersuchungen in Speicheldrüsenkrebs durchgeführt.

Auf der anderen Seite konnte Au Yeung et al. (Au Yeung et al. 2016) in Ovarialtumoren beweisen, dass *APAF1* ein direktes Target von miR-21 darstellt. Da die in Abschnitt 5.4 und 5.6 erwähnten Studien allerdings von einer signifikanten Hochregulation von miR-21 (Wang et al. 2013; Saito et al. 2011; Yang et al. 2013; Wei et al. 2011) und einer signifikanten Runterregulation von *APAF1* in NSCLC Gewebe und Zelllinien (Li et al. 2017; Zang et al. 2012) berichten, erhärtet sich die Hypothese, dass *APAF1* in Lungenkarzinomen ein Target von miR-21 in NSCLC darstellt. Es ist jedoch zu beachten, dass ein miRNA mehrere Targets beeinflusst und ein Target von zahlreichen miRNAs beeinflusst wird (Lim et al. 2005; Lewis et al. 2003).

Daher ist ihre Expression nicht immer grundsätzlich invers korreliert und kann durch weitere anders exprimierte Faktoren beeinflusst werden.

In der vorliegenden Studie wurde eine inverse Korrelation zwischen *HMGA2* und *hsa-let-7b-5p* in Lungenkarzinomen bestätigt, wodurch eine miRNA Target Beziehung verdeutlicht wurde. Jedoch konnte keine Korrelation zwischen *hsa-let-7f-5p* und *HMGA2* in Lungenkarzinomen festgestellt werden, da *hsa-let-7f-5p* eine stabile Expression zeigte. Da *HMGA2* in Lymphknotenmetastasen eine stabile Expression präsentierte, konnte in diesem Gewebe keine Korrelation zu einer miRNA bestätigt werden. Im Gegensatz zu dieser Studie, wurde von Di Fazio et al. (Di Fazio et al. 2017) eine inverse Korrelation von *let-7f* mit *HMGA2* in Lungenkarzinoiden bewiesen, allerdings konnten sie keine Korrelation zwischen *let-7b* und *HMGA2* feststellen. Eine Bestätigung der vorliegenden Studie, dass *HMGA2* das direkte Target von *let-7b* ist, war jedoch bereits durch (McDaniel et al. 2017) in der Leber bewiesen worden. Weitere Studien untersuchten nicht speziell *let-7b*, sondern generell die *let-7* Familie und konnten auch hier feststellen, dass *HMGA2* ein Target dieser ist (Liu et al. 2014; Paz et al. 2014). Kumar und Kollegen berichteten sogar von einer kompetitiven Wirkung, die *HMGA2* gegen die *let-7* Familie ausübt und so den Fortschritt von Lungenkarzinomen fördert (Kumar et al. 2014).

Zusammenfassend lässt sich erkennen, dass die Ergebnisse der inversen Korrelation von *hsa-let-7b-5p* mit *HMGA2* in Lungenkarzinomen durch die Literatur gestützt werden können. Es ist laut Literatur jedoch auch von einer inversen Korrelation von *hsa-let-7f-5p* und *HMGA2* auszugehen, die in dieser Arbeit nicht festgestellt werden konnte. Vergleichsliteratur zur Expression der Beziehung in Lymphknotenmetastasen liegt nicht vor, allerdings wurde in dieser Arbeit auch keine miRNA-Target Korrelation festgestellt.

5.9 MiRNAs als molekularpathologisches Co-Diagnostikum und -therapeutikum

Die zukünftigen Einsatzfelder in der Quantifizierung von miRNAs in Tumoren sind vielfältig. Mithilfe des Wissens um die unterschiedliche Expression von miRNAs in Neoplasien im Vergleich zu gesundem Gewebe lässt sich langfristig sowohl die Diagnostik als auch die Therapie von Tumoren weiterentwickeln. MiRNAs könnten sich in der Zukunft der Diagnostik sowohl zur Vorsorge als auch zum Staging von verschiedenen Tumorerkrankungen und besonders dem NSCLC eignen. Die meisten der in dieser Arbeit untersuchten miRNAs korrelieren mit dem Überleben, der Metastasierung und auch mit dem TNM Stadium bei Tumorerkrankungen und im speziellen auch dem NSCLC. Dies konnte bereits bei miR-19a, miR-19b, miR-21, miR-30a und let-7f nachgewiesen werden (Lin et al. 2013; Mairinger et al. 2014; Wu et al. 2014; Wang et al. 2013; Saito et al. 2011; Ma et al. 2018; Zhang et al. 2014; Takamizawa et al. 2004). Diese Erkenntnisse lassen darauf schließen, dass die Untersuchung der Expressionsmuster von miRNAs in Zukunft eine supportive Maßnahme des Stagings des NSCLCs darstellen könnte. Dazu wird lediglich eine Biopsie des Tumors benötigt, um anschließend durch die Quantifizierung entsprechender miRNAs das Tumorwachstum und die Wahrscheinlichkeit einer Metastasierung abschätzen zu können.

Auch Vorsorgeuntersuchungen könnten durch ein miRNA Screening auf der Suche nach verschiedenen miRNAs ergänzt werden. Wie Chen und Kollegen beweisen konnten, ist im Plasma von Patienten mit Lungenkrebs, Kolorektalkarzinomen und Brustkrebs sowie in gutartigen Veränderungen der Lunge und der Brust eine erhöhte Expression von miR-21 und miR-152 nachweisbar (Chen et al. 2016). Daraus lässt sich schließen, dass in Zukunft gewisse miRNAs als nichtspezifische und nichtinvasive Biomarker für das Screening von Tumorerkrankungen dienen.

Auch in der Therapie von Tumorerkrankungen könnten sich miRNAs in der Zukunft als hilfreich erweisen. Eine Therapiemöglichkeit ist die Gabe sogenannter miRNA „Mimics“, also synthetisch hergestellte und chemisch modifizierte siRNA (small interfering RNA), welche die natürliche miRNA imitieren (Alipoor et al. 2016).

In ersten Studien konnte das Tumorwachstum vom NSCLC in vitro und in Tumor Xenografts durch die Gabe von Let-7 und Let-7g inhibiert werden (Takamizawa et al. 2004; Kumar et al. 2008). In NSCLC Zelllinien war ebenfalls eine Inhibition des Zellwachstums sowie eine Inhibition der Zell-invasion und -migration durch die Gabe von anti-miR-21 beobachtet worden (Liu et al. 2013). MiR-19a- und miR-21 Mimics hingegen konnten das Zellwachstum, -migration und -invasion in NSCLC Zellen verstärken (Liu et al. 2013; Wang und Chen 2015).

MiRNA Mimics könnten zudem in Zukunft additiv zu Chemotherapeutika angewendet werden. Stahlhut und Slack haben bereits gezeigt, dass der antiproliferative Effekt von Erlotinib auf Lungenkarzinom Zelllinien durch die Gabe von let-7b und miR-34a Mimics verstärkt werden konnte, wobei der beste Effekt bei einer Kombination aus beiden miRNAs mit dem Chemotherapeutikum auftrat (Stahlhut und Slack 2015).

Eine mögliche Darreichungsform der miRNA Mimics stellen Plasmide dar, welche durch Transfektion die miRNAs exprimieren und in liposomalen Vesikeln mithilfe von Antikörpern zum Zielgebiet transportiert werden können (Rai et al. 2011; Chen et al. 2010).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass miRNAs das Potenzial besitzen, in Zukunft in der Diagnostik und Therapie des NSCLC eingesetzt zu werden. Die Über- oder Unterexpression von miRNAs im Plasma kann in der Vorsorge einen ersten Hinweis auf ein tumoröses Geschehen im Körper geben. Zudem kann das Gesamtüberleben des Patienten anhand der Expressionshöhe von miRNAs abgeschätzt werden. In der Therapie bieten miRNA Mimics die Möglichkeit, direkt das Tumorwachstum inhibieren zu können oder den Tumor für Chemotherapeutika zu sensibilisieren.

5.10 Zusammenfassung der Diskussion

FFPE Material ist durch die lange Haltbarkeit und die meist großen verfügbaren Mengen gut für die Untersuchung in Studien geeignet. Studien zeigen, dass die miRNAs in FFPE Gewebe zwar von einer gewissen Degradierung im Gegensatz zu frischen gefrorenen Proben betroffen sind, allerdings sind sie immer noch in ausreichend guter Qualität vorhanden, um eine qualitativ gute miRNA Expressionsanalyse zu gewährleisten. Ein optimaler Vergleich der Ergebnisse kann trotzdem nur zwischen gleichem Ausgangsgewebe erfolgen. Die meisten verwendeten Studien dieser Diskussion sind nicht mit FFPE Gewebe durchgeführt worden, sondern mit Plasma oder frischen/gefrorenen Proben, und nur wenige Studien haben FFPE Gewebe als Ausgangsmaterial verwendet. Die Studien mit FFPE Gewebe erzielten jedoch meist ähnliche Ergebnisse wie die Studien mit frischen Proben. Somit kann geschlossen werden, dass die Ergebnisse dieser Studie gut vergleichbar mit anderen Studien sind, welche kein FFPE Material benutzt haben.

Das miRNA Expressionsprofil des NSCLC Gewebes in der vorliegenden Arbeit stimmte größtenteils mit der aktuellen Studienlage überein. Hsa-miR-19a und hsa-miR-19b zeigten in dieser Arbeit eine nicht-signifikante Hochregulation, die aktuellen Studien sprechen bei diesen miRNAs sogar von einer signifikanten Hochregulation, was bedeutet, dass sie höchstwahrscheinlich eine onkogene Wirkungsweise aufweisen.

Hsa-miR-30a zeigte in dieser Arbeit keine veränderte Expression, wohingegen die aktuelle Studienlage von einer Runterregulation berichtet und somit nicht mit den Ergebnissen dieser Studie übereinstimmte. Somit hat hsa-miR-30a laut Studienlage eine eher tumorsuppressive Wirkung, wohingegen die Ergebnisse dieser Studie keine klare Eingliederung in onkogen oder tumorsuppressiv zulassen. Die Expressionshöhe korrelierte in der Studie von Ma et al sogar mit dem Überleben der Patienten (Ma et al. 2018).

Die Expression von hsa-miR-21-1 stellte sich in der vorliegenden Arbeit als signifikante Runterregulation dar, wohingegen die meisten Studien von einer Hochregulation berichteten. Einzig eine Studie, welche auch FFPE Gewebe verwendete, konnte die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen. Viele Studien berichteten von einer onkogenen Wirkung von miR-21, wobei die Expressionshöhe mit dem Überleben, der Metastasierung und dem TNM Stadium korrelierte. Hsa-let-7b-5p war in dieser Studie signifikant runterreguliert und hsa-let-7f-5p stabil exprimiert. Diese Ergebnisse werden von Di Fazio und Kollegen unterstützt (Di Fazio et al. 2017), wobei die weiteren Studien von einer Runterregulation beider miRNAs und der gesamten let-7 Familie berichten. Hsa-let-7b-5p hat aufgrund der Ergebnisse dieser Studie und weiterer Studien eine eher tumorsuppressive Funktion. Hsa-let-7f-5p sollte weiter untersucht werden, wobei sich auch hier eine tumorsuppressive Funktion andeutet, die von dieser Arbeit nicht unterstützt werden kann. Die Let-7 Expression korrelierte in Studien zudem mit dem Überleben der Patienten.

APAF1 und *HMGGA2* zeigten sowohl in der vorliegenden Arbeit wie auch in der aktuellen Studienlage eine signifikante Runterregulation in Lungenkarzinomen. *HMGGA2* korrelierte zudem mit der Metastasierung, der Zellproliferation, dem Tumorgrading und dem Überleben der Patienten.

In der vorliegenden Arbeit zeigten sämtliche untersuchten miRNAs und Targets, mit Ausnahme von *HMGGA2*, eine veränderte Expression zwischen Primärtumor und LK Metastasen. Zudem war auch eine veränderte Expression zwischen gesundem LK und den LK Metastasen feststellbar. Zum aktuellen Zeitpunkt gibt es keine Studien, die die hier untersuchten miRNAs in LK Metastasen vom NSCLC untersuchen, um einen Vergleich zu ermöglichen und die neuen wissenschaftlichen Ergebnisse dieser Studie zu bestätigen. Es wurde in der Literatur anhand von Kolorektalkarzinomen bereits festgestellt, dass Metastasen in verschiedenem Gewebe, welche vom selben Primärtumor ausgehen, eine unterschiedliche miRNA Ausprägung zeigen. Somit ist ein Vergleich des miRNA Expressionsprofils zwischen LK Metastasen und Metastasen in anderem Gewebe nicht sinnvoll.

Eine inverse Korrelation zwischen miRNA und Target konnte zwischen *APAF1* und hsa-miR-19a und hsa-miR-19b in Lymphknotenmetastasen bestätigt werden. Zwischen *APAF1* und hsa-miR-21-1 zeigte sich sowohl in Lungenkarzinomen als auch in Lymphknotenmetastasen eine positive Korrelation. In der aktuellen Literatur deutet sich anhand der Expressionsmuster eine inverse Korrelation zwischen miR-19a, miR-19b und miR-21 zu *APAF1* an.

Eine für miRNA und Target typische inverse Korrelation zeigte sich auch zwischen *HMGA2* und hsa-let-7b-5p in Lungenkarzinomgewebe. Aufgrund der stabilen Expression von *HMGA2* in Lymphknotenmetastasengewebe konnte in diesem Gewebe keine Korrelation zu miRNAs festgestellt werden. Auch andere Studien berichten von einer inversen Korrelation zwischen let-7b und *HMGA2* und häufig auch von let-7f zu *HMGA2*, was allerdings in dieser Studie nicht bestätigt werden konnte.

In Zukunft könnten miRNAs sowohl für die Diagnostik als auch die Therapie von Tumoren verwendet werden. Beim Screening auf Tumore kann die Messung im Plasma erste Hinweise auf eine gut- oder bösartige Veränderung im Körper geben. Beim Staging könnte ihre Expressionshöhe im Primärtumor quantifiziert werden, um auf das Tumorwachstum wie auch auf die Metastasierung und das Überleben der Patienten zu schließen.

Auch in der Tumorthherapie könnten miRNAs in Zukunft eingesetzt werden. Onkogen wirkende miRNAs könnten durch Anti-miRNAs im Körper bekämpft werden und mithilfe von miRNA Mimics könnten tumorsuppressiv wirkende miRNAs in den Körper gegeben werden, um somit das Tumorwachstum zu inhibieren. Zudem könnten miRNA Mimics die Wirkung von Chemotherapeutika verstärken, wie es beispielsweise schon bei dem Chemotherapeutikum Erlotinib demonstriert werden konnte.

6 Zusammenfassung

MiRNAs sind einsträngige, nicht kodierende und ungefähr 22 Nukleotide lange RNAs, die durch Translationshemmung oder Abbau ihrer Ziel-mRNA beinahe sämtliche Prozesse einer Zelle, wie Wachstum, Differenzierung und Apoptose, beeinflussen können. Sie sind in den letzten 20 Jahren vermehrt erforscht worden, da sie sich in der Literatur zunehmend als valide Biomarker verschiedenster Erkrankungen und insbesondere Tumoren bewiesen haben. Lungenkarzinome zählen zu den am häufigsten diagnostizierten malignen Neoplasien und sorgen zudem für die meisten Tode aufgrund eines Tumorleidens weltweit. Trotz modernsten Therapien ist die Prognose des Lungenkarzinoms häufig schlecht und bedarf daher neuer Konzepte zur Früherkennung, Diagnostik und Therapie. MiRNAs bieten hierbei großes Potenzial, da bereits in vielen Studien gezeigt werden konnte, dass zahlreiche miRNAs in Lungenkarzinomen eine veränderte Expression aufweisen, an der Karzinogenese und Metastasierung beteiligt sind und mit dem TNM-Stadium und der Prognose der Patienten korrelieren können.

In der vorliegenden Dissertation wurde die Expression der miRNAs miR-19a, miR-19b, miR-21-1, miR-30-5p, let-7b-5p und let-7f-5p und ihrer potenziellen Targets *HMGA2* und *APAF1* in Lungenkarzinomen und Lymphknotenmetastase im Vergleich zum gesunden Gewebe untersucht. Dazu wurden Formalin-fixierte und in Paraffin eingebettete (FFPE) Proben von 31 Patienten, die zwischen 2000 und 2004 an der Universitätsklinik Marburg operiert wurden, verwendet. Es wurden 28 Lungenkarzinomproben, 16 Lymphknotenmetastasenproben, 14 gesunde Lungenproben und 12 gesunde Lymphknotenproben in die Studie eingeschlossen. Nach der RNA-Isolierung wurden vier Pools aus den Proben erstellt, die sämtliche Proben der Gruppe in gleicher Menge enthielten. Die Expression der miRNAs und mRNAs wurde anschließend durch quantitative Real-Time reverse-Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion gemessen.

Im Ergebnisteil wurden die Expression von Lungenkarzinomen mit der Expression von gesunder Lunge, die Expression zwischen gesundem Lymphknoten und gesunder Lunge und die Expression zwischen Lymphknotenmetastasen und gesundem Lungen- und Lymphknotengewebe ausgewertet. Hsa-miR-19a und hsa-miR-19b zeigten in Lungenkarzinomgewebe keine signifikant veränderte Expression, jedoch eine starke Runterregulation in Lymphknotenmetastasengewebe im Vergleich mit gesundem Lungen- und Lymphknotengewebe. Die Expression von hsa-miR-30a-5p war in Lungenkarzinomgewebe unverändert, aber die Expression in Lymphknotenmetastasengewebe war im Vergleich zu gesundem Lungengewebe runterreguliert und im Vergleich zu gesundem Lymphknotengewebe hochreguliert. Hsa-miR-21-1 zeigte eine starke Runterregulation in Lungenkarzinomproben und

eine starke Hochregulation in Lymphknotenmetastasen im Vergleich zu gesundem Lymphknotengewebe. Hsa-let-7b-5p wies eine signifikante Runterregulation in Lungenkarzinomgewebe auf, wohingegen von hsa-let-7f-5p keine veränderte Expression nachgewiesen werden konnte. Sowohl hsa-let-7b-5p als auch hsa-let-7f-5p zeigten jedoch eine signifikante Hochregulation in Lymphknotenmetastasengewebe im Vergleich zu gesundem Lungen- und Lymphknotengewebe.

Das potenzielle Target (der miRNAs hsa-miR-19a, hsa-miR-19b und hsa-miR-21-1) APAF1 wies eine signifikante Runterregulation in Lungenkarzinomgewebe und eine signifikante Hochregulation in Lymphknotengewebe auf. APAF1 korrelierte mit keiner der vorhergesagten miRNAs in Lungenkarzinomgewebe, jedoch bestand eine inverse Korrelation zwischen hsa-miR-19a und hsa-miR-19b in Lymphknotenmetastasengewebe im Vergleich zu gesundem Lymphknotengewebe. Das potenzielle Target (der miRNAs hsa-let-7b-5p und hsa-let-7f-5p) HMGA2 war in Lungenkarzinomgewebe und in Lymphknotenmetastasengewebe im Vergleich zu gesunder Lunge hochreguliert, im Vergleich zu gesundem Lymphknotengewebe jedoch unverändert exprimiert. Somit korrelierte es umgekehrt mit der Expression von hsa-let-7b-5p in Lungenkarzinomgewebe, mit hsa-let-7f-5p jedoch nicht. Da HMGA2 in Lymphknotenmetastasen im Vergleich zu gesundem Lymphknoten keine veränderte Expression aufwies, korrelierte es mit keinem der beiden miRNAs.

Die durchgeführte Studie liefert einen Überblick über die Expression von miRNAs in Lungenkarzinomen und insbesondere der Expression in Lymphknotenmetastasen. Die Erforschung dieser Expressionsprofile trägt dazu bei, die Entstehung der Lungentumore und Metastasenbildung besser zu verstehen und in Zukunft eine bessere Diagnostik und Therapie zu ermöglichen. Nachfolgende Studien können dazu genutzt werden, die hier vorgelegten Ergebnisse zu validieren und das miRNA Expressionsprofil in Lymphknotenmetastasen weiter zu untersuchen, da dies bisher kaum erfolgt ist und so ein besserer Einblick in die Pathogenese der Metastasierung von Lungenkarzinomen erlangt werden kann.

7 Summary

MiRNAs are single-stranded, non-coding and approximately 22 nucleotide-long RNAs being able to affect almost all cellular processes such as growth, differentiation and apoptosis, by translational inhibition or degradation of their target mRNA. They have been increasingly studied over the last 20 years, as they have been shown in the literature to be valid biomarkers of a wide variety of diseases including cancer. Lung carcinomas are among the most commonly diagnosed malignant neoplasms and account for the most cancer-related deaths worldwide. Despite state-of-the-art therapies, the prognosis of lung cancer is often poor and therefore requires new concepts for early detection, diagnosis and therapy. MiRNAs offer great potential in this regard, as many studies have already shown that numerous miRNAs exhibit an altered expression in lung carcinomas, are involved in carcinogenesis and metastasis, and may correlate with TNM stage and patient prognosis.

In the present dissertation, the expression of miRNAs miR-19a, miR-19b, miR-21-1, miR-30-5p, let-7b-5p, and let-7f-5p and their potential targets HMGA2 and APAF1 was investigated in lung carcinoma and lymph node metastasis compared to healthy tissue. Formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) samples from 31 patients operated at the University Hospital of Marburg between 2000 and 2004 were collected. Twenty-eight lung carcinoma samples, 16 lymph node metastasis samples, 14 healthy lung samples, and 12 healthy lymph node samples were included in the study. After RNA isolation, four pools were created from the samples, which contained all samples in the group in equal amounts. The expression of miRNAs and mRNAs was measured by quantitative real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction.

The expression of miRNAs in lung carcinoma was compared with their expression in healthy lung tissues. The expression of miRNAs in lymph node metastasis was compared to healthy lung and lymph node tissue. Hsa-miR-19a and hsa-miR-19b did not show significantly altered expression in lung cancer tissues. Instead, they showed a strong downregulation in lymph node metastasis tissues compared to healthy lung and lymph node tissues. The expression of hsa-miR-30a-5p was unchanged in lung carcinoma tissues. Its expression was down regulated in lymph node metastasis tissues compared to healthy lung tissues and up regulated compared to healthy lymph node tissues. Hsa-miR-21-1 showed a strong downregulation in lung carcinoma samples and a strong upregulation in lymph node metastases compared with healthy lymph node tissue. Hsa-let-7b-5p exhibited significant downregulation in lung carcinoma tissues, whereas no altered expression of hsa-let-7f-5p was detected.

However, both hsa-let-7b-5p and hsa-let-7f-5p showed a significant upregulation in lymph node metastasis tissues compared to healthy lung and lymph node tissues.

The potential target (of miRNAs hsa-miR-19a, hsa-miR-19b, and hsa-miR-21-1) *APAF1* exhibited a significant downregulation in lung cancer tissues and a significant upregulation in lymph node tissues. *APAF1* did not correlate with any of the predicted miRNAs in lung cancer tissues. An inverse correlation between *APAF1* and hsa-miR-19a and hsa-miR-19b was found in lymph node metastasis tissues compared to healthy lymph node tissues. The potential target (of miRNAs hsa-let-7b-5p and hsa-let-7f-5p) *HMGA2* was found upregulated in lung cancer tissues and in lymph node metastasis tissues compared to healthy lung, but its expression was stable in comparison to healthy lymph node tissues. Thus, it inversely correlated with the expression of hsa-let-7b-5p in lung carcinoma tissue but not with hsa-let-7f-5p. Because *HMGA2* did not show altered expression in lymph node metastases compared with healthy lymph node, it did not correlate with either miRNA.

The study performed provides an overview of the expression of miRNAs in lung carcinomas and in lymph node metastases. The exploration of the expression profiles in primary tumor and metastasis could provide a better understanding of lung tumorigenesis and metastasis and enable a better diagnosis and therapy in the future. Further studies will enable to validate the results presented here and to highlight the miRNA expression profile in lymph node metastases. Thus providing better insight into the pathogenesis of lung cancer metastasis.

8 Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1: Einteilung des Primärtumors eines Lungenkarzinoms nach der 8. Auflage der TNM-Klassifikation der UICC (Goldstraw et al. 2016)	4
Tabelle 2: Einteilung des Lymphknotenstatus bei Lungenkarzinomen nach der 8. Auflage der TNM-Klassifikation der UICC (Goldstraw et al. 2016)	5
Tabelle 3: Einteilung der Fernmetastasierung bei Lungenkarzinomen nach der 8. Auflage der TNM-Klassifikation der UICC (Goldstraw et al. 2016)	5
Tabelle 4: UICC Einteilung von Lungenkarzinomen nach der 8. Auflage der TNM-Klassifikation der UICC (Goldstraw et al. 2016)	6
Tabelle 5: verwendete Geräte	17
Tabelle 6: verwendetes Verbrauchsmaterial	17
Tabelle 7: verwendete Vorgefertigte Reagenzsysteme	18
Tabelle 8: verwendete Primer	18
Tabelle 9: verwendete Software	18
Tabelle 10: „miScript II RT Kit“ Reagenzien	21
Tabelle 11: „iScript cDNA Synthesis Kit“ Reagenzien.....	21
Tabelle 12: Thermocycler cDNA Schema	21
Tabelle 13: Primer für qPCR mit „miScript SYBR® Green PCR Kit“	23
Tabelle 14: „miScript SYBR® Green PCR Kit“ Reagenzien	23
Tabelle 15: Thermocycler Schema qPCR des „miScript SYBR® Green PCR Kit“	24
Tabelle 16: Primer für qPCR mit „GoTaq® qPCR Master Mix“	24
Tabelle 17: „GoTaq® qPCR Master Mix“ Reagenzien.....	24
Tabelle 18: Thermocycler Schema qPCR des „GoTaq® qPCR Master Mix“	24
Tabelle 19: Patientenkollektiv und Tumorentität	27
Tabelle 20: TNM Klassifikation der Probanden, deren Proben in die Studie eingeschlossen wurden	28
Tabelle 21: Tumorgrading der Proben.....	28
Tabelle 22: Quantitative und Qualitative Nano Drop Lite Messergebnisse	30
Tabelle 23: Zusammenfassung der miRNA RT-PCR Ergebnisse	37
Tabelle 24: Zusammenfassung der Target RT PCR Messungen	39
Tabelle 25: Expression von hsa-miR-19, hsa-miR-19b und hsa-miR-21-1 und ihrem Target APAF1.....	40
Tabelle 26: Expression von hsa-let-7b-5p und hsa-let-7f-5p und ihrem Target HMGA2	41

9 Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1: Überlebensrate in Abhängigkeit vom klinischen Tumorstadium (Goldstraw et al. 2016)	7
Abbildung 2: Schematische Darstellung der miRNA-Biogenese (Matsuyama und Suzuki 2019)	12
<i>Abbildung 3: Beispielbilder der markierten HE-Schnitte</i>	<i>19</i>
Abbildung 4: Konzept der cDNA Herstellung (Qiagen 2012)	22
Abbildung 5: Konzept der qPCR mit cDNA (Qiagen 2012)	25
Abbildung 6: Expression von hsa-miR-19a	31
Abbildung 7: Expression von hsa-miR-19b	32
Abbildung 8: Expression von hsa-miR-30a-5p	33
Abbildung 9: Expression von hsa-miR-21-1	34
Abbildung 10: Expression von hsa-let-7b-5p	35
Abbildung 11: Expression von hsa-let-7f-5p	36
Abbildung 12: Expression von APAF1	38
Abbildung 13: Expression von HMGA2	39

10 Literaturverzeichnis

- Alipoor, Shamila D./Adcock, Ian M./Garssen, Johan/Mortaz, Esmaeil/Varahram, Mohammad/Mirsaeidi, Mehdi/Velayati, Aliakbar (2016). The roles of miRNAs as potential biomarkers in lung diseases. *European journal of pharmacology* 791, 395–404. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.09.015>.
- Almeida, Maria I./Reis, Rui M./Calin, George A. (2011). MicroRNA history: discovery, recent applications, and next frontiers. *Mutation research* 717 (1-2), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2011.03.009>.
- Alzin, Mohamad Shadi (2019). Prognostische Wertigkeit der TNM-Klassifizierung nicht-kleinzelliger Lungenkarzinome und der miRNA-Expression im Plasma von Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom. <https://doi.org/10.22028/D291-31036>.
- Ambros, Victor (2001). microRNAs. *Cell* 107 (7), 823–826. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00616-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00616-X).
- Ambros, Victor (2004). The functions of animal microRNAs. *Nature* 431 (7006), 350–355. <https://doi.org/10.1038/nature02871>.
- Ambros, Victor/Bartel, Bonnie/Bartel, David P./Burge, Christopher B./Carrington, James C./Chen, Xuemei/Dreyfuss, Gideon/Eddy, Sean R./Griffiths-Jones, Sam/Marshall, Mhairi/Matzke, Marjori/Ruvkun, Gary/Tuschl, Thomas (2003). A uniform system for microRNA annotation. *RNA (New York, N.Y.)* 9 (3), 277–279. <https://doi.org/10.1261/rna.2183803>.
- American cancer society (2020). Types of Lung Cancer. Online verfügbar unter <https://www.cancer.org/cancer/lung-cancer/about/what-is.html> (abgerufen am 12.11.2020).
- Ambrecht, Martin. Eppendorf Anleitung: Detektion von Kontaminationen in DNA und Protein-Proben durch photometrische Messungen. Eppendorf Application note No.279 03/2013.
- Au Yeung, Chi Lam/Co, Ngai-Na/Tsuruga, Tetsushi/Yeung, Tsz-Lun/Kwan, Suet-Ying/Leung, Cecilia S./Li, Yong/Lu, Edward S./Kwan, Kenny/Wong, Kwong-Kwok/Schmandt, Rosemarie/Lu, Karen H./Mok, Samuel C. (2016). Exosomal transfer of stroma-derived miR21 confers paclitaxel resistance in ovarian cancer cells through targeting APAF1. *Nature communications* 7, 11150. <https://doi.org/10.1038/ncomms11150>.
- Bade, Brett C./Dela Cruz, Charles S. (2020). Lung Cancer 2020: Epidemiology, Etiology, and Prevention. *Clinics in chest medicine* 41 (1), 1–24. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2019.10.001>.

- Baek, Daehyun/Villén, Judit/Shin, Chanseok/Camargo, Fernando D./Gygi, Steven P./Bartel, David P. (2008). The impact of microRNAs on protein output. *Nature* 455 (7209), 64–71. <https://doi.org/10.1038/nature07242>.
- Baumgartner, Ulrich/Berger, Fabienne/Hashemi Gheinani, Ali/Burgener, Sabrina Sofia/Monastyrskaya, Katia/Vassella, Erik (2018). miR-19b enhances proliferation and apoptosis resistance via the EGFR signaling pathway by targeting PP2A and BIM in non-small cell lung cancer. *Molecular cancer* 17 (1), 44. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0781-5>.
- Bhaskaran, M./Mohan, M. (2014). MicroRNAs: history, biogenesis, and their evolving role in animal development and disease. *Veterinary pathology* 51 (4), 759–774. <https://doi.org/10.1177/0300985813502820>.
- Borchert, Glen M./Lanier, William/Davidson, Beverly L. (2006). RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nature structural & molecular biology* 13 (12), 1097–1101. <https://doi.org/10.1038/nsmb1167>.
- Calin, George A./Croce, Carlo M. (2006). MicroRNA signatures in human cancers. *Nature reviews. Cancer* 6 (11), 857–866. <https://doi.org/10.1038/nrc1997>.
- Calin, George Adrian/Dumitru, Calin Dan/Shimizu, Masayoshi/Bichi, Roberta/Zupo, Simona/Noch, Evan/Aldler, Hansjuerg/Rattan, Sashi/Keating, Michael/Rai, Kanti/Rassenti, Laura/Kipps, Thomas/Negrini, Massimo/Bullrich, Florencia/Croce, Carlo M. (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (24), 15524–15529. <https://doi.org/10.1073/pnas.242606799>.
- Calin, George Adrian/Sevignani, Cinzia/Dumitru, Calin Dan/Hyslop, Terry/Noch, Evan/Yendamuri, Sai/Shimizu, Masayoshi/Rattan, Sashi/Bullrich, Florencia/Negrini, Massimo/Croce, Carlo M. (2004). Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (9), 2999–3004. <https://doi.org/10.1073/pnas.0307323101>.
- Chen, Hankui/Liu, Helu/Zou, Hanqing/Chen, Rui/Dou, Yuhong/Sheng, Shile/Dai, Shengming/Ai, Junmei/Melson, Joshua/Kittles, Rick A./Pirooznia, Mehdi/Liptay, Michael J./Borgia, Jeffrey A./Deng, Youping (2016). Evaluation of Plasma miR-21 and miR-152 as Diagnostic Biomarkers for Common Types of Human Cancers. *Journal of Cancer* 7 (5), 490–499. <https://doi.org/10.7150/jca.12351>.

- Chen, Yunching/Zhu, Xiaodong/Zhang, Xiaojun/Liu, Bin/Huang, Leaf (2010). Nanoparticles modified with tumor-targeting scFv deliver siRNA and miRNA for cancer therapy. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 18 (9), 1650–1656. <https://doi.org/10.1038/mt.2010.136>.
- Croce, Carlo M. (2009). Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nature reviews. Genetics* 10 (10), 704–714. <https://doi.org/10.1038/nrg2634>.
- Deans, Carrie/Maggert, Keith A. (2015). What do you mean, "epigenetic"? *Genetics* 199 (4), 887–896. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.173492>.
- Dela Cruz, Charles S./Tanoue, Lynn T./Matthay, Richard A. (2011). Lung cancer: epidemiology, etiology, and prevention. *Clinics in chest medicine* 32 (4), 605–644. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2011.09.001>.
- Di Cello, Francescopaolo/Hillion, Joelle/Hristov, Alexandra/Wood, Lisa J./Mukherjee, Mita/Schuldenfrei, Andrew/Kowalski, Jeanne/Bhattacharya, Raka/Ashfaq, Raheela/Resar, Linda M. S. (2008). HMGA2 participates in transformation in human lung cancer. *Molecular cancer research : MCR* 6 (5), 743–750. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-07-0095>.
- Di Fazio, Pietro/Maass, Moritz/Roth, Silvia/Meyer, Christian/Grups, Joana/Rexin, Peter/Bartsch, Detlef K./Kirschbaum, Andreas (2017). Expression of hsa-let-7b-5p, hsa-let-7f-5p, and hsa-miR-222-3p and their putative targets HMGA2 and CDKN1B in typical and atypical carcinoid tumors of the lung. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 39 (10), 1010428317728417. <https://doi.org/10.1177/1010428317728417>.
- Dissanayake, Eshika/Inoue, Yuzaburo (2016). MicroRNAs in Allergic Disease. *Current allergy and asthma reports* 16 (9), 67. <https://doi.org/10.1007/s11882-016-0648-z>.
- DKG (2020). Klassifikation von Tumoren. Online verfügbar unter <https://www.krebsgesellschaft.de/onko-internetportal/basis-informationen-krebs/basis-informationen-krebs-allgemeine-informationen/klassifikation-von-tumoren-tnm-.html> (abgerufen am 14.11.2020).
- DocCheck Medical Services GmbH (2020). Grading - DocCheck Flexikon. Online verfügbar unter <https://flexikon.doccheck.com/de/Grading> (abgerufen am 14.11.2020).
- Esquela-Kerscher, Aurora/Trang, Phong/Wiggins, Jason F./Patrawala, Lubna/Cheng, Angie/Ford, Lance/Weidhaas, Joanne B./Brown, David/Bader, Andreas G./Slack, Frank J. (2008). The let-7 microRNA reduces tumor growth in mouse models of lung cancer. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 7 (6), 759–764. <https://doi.org/10.4161/cc.7.6.5834>.

- Fan, M-J/Zhong, Y-H/Shen, W./Yuan, K-F/Zhao, G-H/Zhang, Y./Wang, S-K (2017). MiR-30 suppresses lung cancer cell 95D epithelial mesenchymal transition and invasion through targeted regulating Snail. *European review for medical and pharmacological sciences* 21 (11), 2642–2649.
- Feiersinger, Fabian/Nolte, Elke/Wach, Sven/Rau, Tilman T./Vassos, Nikolaos/Geppert, Carol/Konrad, Andreas/Merkel, Susanne/Taubert, Helge/Stürzl, Michael/Croner, Roland S. (2016). MiRNA-21 Expression Decreases from Primary Tumors to Liver Metastases in Colorectal Carcinoma. *PloS one* 11 (2), e0148580.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148580>.
- Ferrer, Irene/Zugazagoitia, Jon/Herbertz, Stephan/John, William/Paz-Ares, Luis/Schmid-Bindert, Gerald (2018). KRAS-Mutant non-small cell lung cancer: From biology to therapy. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* 124, 53–64.
<https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2018.07.013>.
- Flores, Bianca de Cássia Troncarelli de Campos Parra/Lourenço, Silvia Vanessa/Damascena, Aline Santos/Kowalski, Luiz Paulo/Soares, Fernando Augusto/Coutinho-Camillo, Cláudia Malheiros (2017). Altered expression of apoptosis-regulating miRNAs in salivary gland tumors suggests their involvement in salivary gland tumorigenesis. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 470 (3), 291–299. <https://doi.org/10.1007/s00428-016-2049-z>.
- Gao, Xiaotian/Dai, Ming/Li, Qinglan/Wang, Zhigang/Lu, Yonglin/Song, Zeqing (2017). HMGA2 regulates lung cancer proliferation and metastasis. *Thoracic cancer* 8 (5), 501–510.
<https://doi.org/10.1111/1759-7714.12476>.
- Goldstraw, Peter/Chansky, Kari/Crowley, John/Rami-Porta, Ramon/Asamura, Hisao/Eberhardt, Wilfried E. E./Nicholson, Andrew G./Groome, Patti/Mitchell, Alan/Bolejack, Vanessa (2016). The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 11 (1), 39–51. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2015.09.009>.
- Guan, Yaowu/Rao, Zhongming/Chen, Cheng (2018). miR-30a suppresses lung cancer progression by targeting SIRT1. *Oncotarget* 9 (4), 4924–4934.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.23529>.
- Hanabata, Tetsuro/Tsukuda, Kazunori/Toyooka, Shinichi/Yano, Masaaki/Aoe, Motoi/Nagahiro, Itaru/Sano, Yoshifumi/Date, Hiroshi/Shimizu, Nobuyoshi (2004). DNA methylation of

- multiple genes and clinicopathological relationship of non-small cell lung cancers. *Oncology Reports*. <https://doi.org/10.3892/or.12.1.177>.
- Hanahan, Douglas/Weinberg, Robert A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144 (5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- Hayashita, Yoji/Osada, Hirotsuka/Tatematsu, Yoshio/Yamada, Hideki/Yanagisawa, Kiyoshi/Tomida, Shuta/Yatabe, Yasushi/Kawahara, Katsunobu/Sekido, Yoshitaka/Takahashi, Takashi (2005). A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer research* 65 (21), 9628–9632. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2352>.
- Hwang, H-W/Mendell, J. T. (2006). MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis. *British journal of cancer* 94 (6), 776–780. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603023>.
- Iorio, Marilena V./Croce, Carlo M. (2012). Causes and consequences of microRNA dysregulation. *Cancer journal (Sudbury, Mass.)* 18 (3), 215–222. <https://doi.org/10.1097/PPO.0b013e318250c001>.
- Jiang, Ben-yuan/Zhang, Xu-chao/Su, Jian/Meng, Wei/Yang, Xue-ning/Yang, Jin-ji/Zhou, Qing/Chen, Zhi-yong/Chen, Zhi-hong/Xie, Zhi/Chen, Shi-liang/Wu, Yi-long (2013). BCL11A overexpression predicts survival and relapse in non-small cell lung cancer and is modulated by microRNA-30a and gene amplification. *Molecular cancer* 12, 61. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-12-61>.
- Jiang, Chuanfu/Cao, Yang/Lei, Ting/Wang, Yu/Fu, Junfeng/Wang, Ze/Lv, Zhenyang (2018). microRNA-363-3p inhibits cell growth and invasion of non-small cell lung cancer by targeting HMGA2. *Molecular medicine reports* 17 (2), 2712–2718. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.8131>.
- Kakimoto, Yu/Tanaka, Masayuki/Kamiguchi, Hiroshi/Ochiai, Eriko/Osawa, Motoki (2016). MicroRNA Stability in FFPE Tissue Samples: Dependence on GC Content. *PloS one* 11 (9), e0163125. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163125>.
- Kim, V. Narry (2005). MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nature reviews. Molecular cell biology* 6 (5), 376–385. <https://doi.org/10.1038/nrm1644>.
- Krebsforschungszentrum, Deutsches (2018). Lungenkrebs vorbeugen, Risiken vermeiden. Krebsinformationsdienst vom 05.06.2018. Online verfügbar unter <https://www.krebsinformationsdienst.de/tumorarten/lungenkrebs/risikofaktoren.php> (abgerufen am 12.11.2020).

- Krepela, Evzen/Procházka, Jan/Liul, Xiaoyi/Fiala, Pavel/Kinkor, Zdeněk (2004). Increased expression of Apaf-1 and procaspase-3 and the functionality of intrinsic apoptosis apparatus in non-small cell lung carcinoma. *Biological chemistry* 385 (2), 153–168. <https://doi.org/10.1515/BC.2004.034>.
- Kuhn, Donald E./Martin, Mickey M./Feldman, David S./Terry, Alvin V./Nuovo, Gerard J./Elton, Terry S. (2008). Experimental validation of miRNA targets. *Methods (San Diego, Calif.)* 44 (1), 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2007.09.005>.
- Kumar, Madhu S./Armenteros-Monterroso, Elena/East, Philip/Chakravorty, Probir/Matthews, Nik/Winslow, Monte M./Downward, Julian (2014). HMGA2 functions as a competing endogenous RNA to promote lung cancer progression. *Nature* 505 (7482), 212–217. <https://doi.org/10.1038/nature12785>.
- Kumar, Madhu S./Erkeland, Stefan J./Pester, Ryan E./Chen, Cindy Y./Ebert, Margaret S./Sharp, Phillip A./Jacks, Tyler (2008). Suppression of non-small cell lung tumor development by the let-7 microRNA family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (10), 3903–3908. <https://doi.org/10.1073/pnas.0712321105>.
- Lane, David/Levine, Arnold (2010). p53 Research: the past thirty years and the next thirty years. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2 (12), a000893. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000893>.
- Langevin, Scott M./Kratzke, Robert A./Kelsey, Karl T. (2015). Epigenetics of lung cancer. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine* 165 (1), 74–90. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2014.03.001>.
- Lee, Rosalind C./Feinbaum, Rhonda L./Ambros, Victor (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75 (5), 843–854. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90529-Y](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90529-Y).
- Lee, Rosalind/Feinbaum, Rhonda/Ambros, Victor (2004a). A short history of a short RNA. *Cell* 116, S89-S92. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00035-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00035-2).
- Lee, Yoontae/Kim, Minju/Han, Jinju/Yeom, Kyu-Hyun/Lee, Sanghyuk/Baek, Sung Hee/Kim, V. Narry (2004b). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO journal* 23 (20), 4051–4060. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600385>.
- Lewis, Benjamin P./Shih, I-hung/Jones-Rhoades, Matthew W./Bartel, David P./Burge, Christopher B. (2003). Prediction of Mammalian MicroRNA Targets. *Cell* 115 (7), 787–798. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)01018-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)01018-3).

- Li, Jing/Yang, Sheng/Yan, Wen/Yang, Jie/Qin, Yu-Juan/Lin, Xiao-Lin/Xie, Rao-Ying/Wang, Sheng-Chun/Jin, Wen/Gao, Fei/Shi, Jun-Wen/Zhao, Wen-Tao/Jia, Jun-Shuang/Shen, Hong-Fen/Ke, Jie-Rong/Liu, Bin/Zhao, Yi-Qiao/Huang, Wen-Hua/Yao, Kai-Tai/Li, Dan-Juan/Xiao, Dong (2015). MicroRNA-19 triggers epithelial-mesenchymal transition of lung cancer cells accompanied by growth inhibition. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 95 (9), 1056–1070. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2015.76>.
- Li, Tao/Ding, Zong-Li/Zheng, Yu-Long/Wang, Wei (2017). MiR-484 promotes non-small-cell lung cancer (NSCLC) progression through inhibiting Apaf-1 associated with the suppression of apoptosis. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 96, 153–164. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.09.102>.
- Lim, Lee P./Lau, Nelson C./Garrett-Engele, Philip/Grimson, Andrew/Schelter, Janell M./Castle, John/Bartel, David P./Linsley, Peter S./Johnson, Jason M. (2005). Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 433 (7027), 769–773. <https://doi.org/10.1038/nature03315>.
- Lin, Qunying/Chen, Tingjian/Lin, Qingyu/Lin, Guosheng/Lin, Juan/Chen, Guohuan/Guo, Lijing (2013). Serum miR-19a expression correlates with worse prognosis of patients with non-small cell lung cancer. *Journal of surgical oncology* 107 (7), 767–771. <https://doi.org/10.1002/jso.23312>.
- Lin, Shuibin/Gregory, Richard I. (2015). MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nature reviews. Cancer* 15 (6), 321–333. <https://doi.org/10.1038/nrc3932>.
- Liu, Aihua/Xu, Xiaowei (2011). MicroRNA isolation from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 724, 259–267. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-055-3_16.
- Liu, Qing/Liu, Tao/Zheng, Shutao/Gao, Xiangpeng/Lu, Mang/Sheyhidin, Ilyar/Lu, Xiaomei (2014). HMGA2 is down-regulated by microRNA let-7 and associated with epithelial-mesenchymal transition in oesophageal squamous cell carcinomas of Kazakhs. *Histopathology* 65 (3), 408–417. <https://doi.org/10.1111/his.12401>.
- Liu, Zhi-Li/Wang, He/Liu, Jing/Wang, Zhao-Xia (2013). MicroRNA-21 (miR-21) expression promotes growth, metastasis, and chemo- or radioresistance in non-small cell lung cancer cells by targeting PTEN. *Molecular and cellular biochemistry* 372 (1-2), 35–45. <https://doi.org/10.1007/s11010-012-1443-3>.
- Lu, Thomas X./Rothenberg, Marc E. (2013). Diagnostic, functional, and therapeutic roles of microRNA in allergic diseases. *The Journal of allergy and clinical immunology* 132 (1), 3-13; quiz 14. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.04.039>.

- Lu, Thomas X./Rothenberg, Marc E. (2018). MicroRNA. *The Journal of allergy and clinical immunology* 141 (4), 1202–1207. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.08.034>.
- Luan, Nianxu/Wang, Yi/Liu, Xuedong (2018). Absent expression of miR-30a promotes the growth of lung cancer cells by targeting MEF2D. *Oncology letters* 16 (1), 1173–1179. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8719>.
- Ma, Yu-Shui/Yu, Fei/Zhong, Xiao-Ming/Lu, Gai-Xia/Cong, Xian-Ling/Xue, Shao-Bo/Xie, Wen-Ting/Hou, Li-Kun/Pang, Li-Juan/Wu, Wei/Zhang, Wei/Cong, Le-Le/Liu, Tie/Long, Hui-Deng/Sun, Ran/Sun, Hong-Yan/Lv, Zhong-Wei/Wu, Chun-Yan/Fu, Da (2018). miR-30 Family Reduction Maintains Self-Renewal and Promotes Tumorigenesis in NSCLC-Initiating Cells by Targeting Oncogene TM4SF1. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 26 (12), 2751–2765. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.09.006>.
- Mairinger, Fabian Dominik/Ting, Saskia/Werner, Robert/Walter, Robert Fred Henry/Hager, Thomas/Vollbrecht, Claudia/Christoph, Daniel/Worm, Karl/Mairinger, Thomas/Sheu-Grabellus, Sien-Yi/Theegarten, Dirk/Schmid, Kurt Werner/Wohlschlaeger, Jeremias (2014). Different micro-RNA expression profiles distinguish subtypes of neuroendocrine tumors of the lung: results of a profiling study. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 27 (12), 1632–1640. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2014.74>.
- Malhotra, Jyoti/Malvezzi, Matteo/Negri, Eva/La Vecchia, Carlo/Boffetta, Paolo (2016). Risk factors for lung cancer worldwide. *The European respiratory journal* 48 (3), 889–902. <https://doi.org/10.1183/13993003.00359-2016>.
- Markopoulos, Georgios S./Roupakia, Eugenia/Tokamani, Maria/Chavdoula, Evangelia/Hatziapostolou, Maria/Polytarchou, Christos/Marcu, Kenneth B./Papavassiliou, Athanasios G./Sandaltzopoulos, Raphael/Kolettas, Evangelos (2017). A step-by-step microRNA guide to cancer development and metastasis. *Cellular oncology (Dordrecht)* 40 (4), 303–339. <https://doi.org/10.1007/s13402-017-0341-9>.
- Matsuyama, Hironori/Suzuki, Hiroshi I. (2019). Systems and Synthetic microRNA Biology: From Biogenesis to Disease Pathogenesis. *International journal of molecular sciences* 21 (1). <https://doi.org/10.3390/ijms21010132>.
- McDaniel, Kelly/Huang, Li/Sato, Keisaku/Wu, Nan/Annable, Tami/Zhou, Tianhao/Ramos-Lorenzo, Sugeily/Wan, Ying/Huang, Qiaobing/Francis, Heather/Glaser, Shannon/Tsukamoto, Hidekazu/Alpini, Gianfranco/Meng, Fanyin (2017). The let-7/Lin28

- axis regulates activation of hepatic stellate cells in alcoholic liver injury. *The Journal of biological chemistry* 292 (27), 11336–11347. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.773291>.
- Meyer, Britta/Loeschke, Siegfried/Schultze, Anke/Weigel, Thomas/Sandkamp, Martin/Goldmann, Torsten/Vollmer, Ekkehard/Bullerdiek, Jörn (2007). HMGA2 overexpression in non-small cell lung cancer. *Molecular carcinogenesis* 46 (7), 503–511. <https://doi.org/10.1002/mc.20235>.
- miRBase (2020). Online verfügbar unter <http://www.mirbase.org/> (abgerufen am 15.11.2020).
- miRBase (2020). Online verfügbar unter <http://www.mirbase.org/help/nomenclature.shtml> (abgerufen am 15.11.2020).
- Mogilyansky, E./Rigoutsos, I. (2013). The miR-17/92 cluster: a comprehensive update on its genomics, genetics, functions and increasingly important and numerous roles in health and disease. *Cell death and differentiation* 20 (12), 1603–1614. <https://doi.org/10.1038/cdd.2013.125>.
- Moravcikova, Erika/Krepela, Evzen/Prochazka, Jan/Benkova, Kamila/Pauk, Norbert (2014). Differential sensitivity to apoptosome apparatus activation in non-small cell lung carcinoma and the lung. *International journal of oncology* 44 (5), 1443–1454. <https://doi.org/10.3892/ijo.2014.2333>.
- Olive, Virginie/Bennett, Margaux J./Walker, James C./Ma, Cong/Jiang, Iris/Cordon-Cardo, Carlos/Li, Qi-Jing/Lowe, Scott W./Hannon, Gregory J./He, Lin (2009). miR-19 is a key oncogenic component of mir-17-92. *Genes & development* 23 (24), 2839–2849. <https://doi.org/10.1101/gad.1861409>.
- Parrales, Alejandro/Iwakuma, Tomoo (2015). Targeting Oncogenic Mutant p53 for Cancer Therapy. *Frontiers in oncology* 5, 288. <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00288>.
- Pasquinelli, A. E./Reinhart, B. J./Slack, F./Martindale, M. Q./Kuroda, M. I./Maller, B./Hayward, D. C./Ball, E. E./Degnan, B./Müller, P./Spring, J./Srinivasan, A./Fishman, M./Finnerty, J./Corbo, J./Levine, M./Leahy, P./Davidson, E./Ruvkun, G. (2000). Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature* 408 (6808), 86–89. <https://doi.org/10.1038/35040556>.
- Paz, Edwin A./LaFleur, Bonnie/Gerner, Eugene W. (2014). Polyamines are oncometabolites that regulate the LIN28/let-7 pathway in colorectal cancer cells. *Molecular carcinogenesis* 53 Suppl 1, E96-106. <https://doi.org/10.1002/mc.22051>.
- Pecqueux, Mathieu/Liebetrau, Isabell/Werft, Wiebke/Dienemann, Hendrik/Muley, Thomas/Pfannschmidt, Joachim/Müssle, Benjamin/Rahbari, Nuh/Schölch, Sebastian/Büchler, Markus W./Weitz, Jürgen/Reissfelder, Christoph/Kahlert, Christoph

(2016). A Comprehensive MicroRNA Expression Profile of Liver and Lung Metastases of Colorectal Cancer with Their Corresponding Host Tissue and Its Prognostic Impact on Survival. *International journal of molecular sciences* 17 (10).

<https://doi.org/10.3390/ijms17101755>.

Pfaffl, Michael Walter (2004). Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *Biospektrum*.

Pfeifer, Gerd P./Denissenko, Mikhail F./Olivier, Magali/Tretyakova, Natalia/Hecht, Stephen S./Hainaut, Pierre (2002). Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers. *Oncogene* 21 (48), 7435–7451.

<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205803>.

Popper, Helmut H. (2016). Progression and metastasis of lung cancer. *Cancer and Metastasis Reviews* 35 (1), 75–91. <https://doi.org/10.1007/s10555-016-9618-0>.

Qiagen (2012). microRNA Sample and Assay Technologies. miRNA purification, quantification, and functional analysis. miRNA Brochure. Online verfügbar unter

<https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=b2adf4f8-b344-46cb-958c-e88848c7d3dc&lang=en> (abgerufen am 24.11.2020).

Rai, Kammei/Takigawa, Nagio/Ito, Sachio/Kashihara, Hiromi/Ichihara, Eiki/Yasuda, Tatsuji/Shimizu, Kenji/Tanimoto, Mitsune/Kiura, Katsuyuki (2011). Liposomal delivery of MicroRNA-7-expressing plasmid overcomes epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor-resistance in lung cancer cells. *Molecular cancer therapeutics* 10 (9), 1720–1727. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-11-0220>.

Rebane, Ana (2015). microRNA and Allergy. *Advances in experimental medicine and biology* 888, 331–352. https://doi.org/10.1007/978-3-319-22671-2_17.

Reinhart, B. J./Slack, F. J./Basson, M./Pasquinelli, A. E./Bettinger, J. C./Rougvie, A. E./Horvitz, H. R./Ruvkun, G. (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403 (6772), 901–906.

<https://doi.org/10.1038/35002607>.

Rivlin, Noa/Koifman, Gabriela/Rotter, Varda (2015). p53 orchestrates between normal differentiation and cancer. *Seminars in cancer biology* 32, 10–17.

<https://doi.org/10.1016/j.semcan.2013.12.006>.

Rusch, Valerie W./Crowley, John/Giroux, Dorothy J./Goldstraw, Peter/Im, Jung-Gi/Tsuboi, Masahiro/Tsuchiya, Ryosuke/Vansteenkiste, Johan (2007). The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the N descriptors in the forthcoming seventh edition of the TNM classification for lung cancer. *Journal of thoracic oncology* :

- official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer 2 (7), 603–612. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e31807ec803>.
- Ruvkun, G. (2001). Molecular biology. Glimpses of a tiny RNA world. *Science (New York, N.Y.)* 294 (5543), 797–799. <https://doi.org/10.1126/science.1066315>.
- Saito, Motonobu/Schetter, Aaron J./Mollerup, Steen/Kohno, Takashi/Skaug, Vidar/Bowman, Elise D./Mathé, Ewy A./Takenoshita, Seiichi/Yokota, Jun/Haugen, Aage/Harris, Curtis C. (2011). The association of microRNA expression with prognosis and progression in early-stage, non-small cell lung adenocarcinoma: a retrospective analysis of three cohorts. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 17 (7), 1875–1882. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2961>.
- Sarhadi, V. K./Wikman, H./Salmenkivi, K./Kuosma, E./Sioris, T./Salo, J./Karjalainen, A./Knuutila, S./Anttila, S. (2006). Increased expression of high mobility group A proteins in lung cancer. *The Journal of pathology* 209 (2), 206–212. <https://doi.org/10.1002/path.1960>.
- Sawan, Carla/Herceg, Zdenko (2010). Histone modifications and cancer. *Advances in genetics* 70, 57–85. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-380866-0.60003-4>.
- Shen, Lanlan/Waterland, Robert A. (2007). Methods of DNA methylation analysis. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 10 (5), 576–581. <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e3282bf6f43>.
- Slack, Frank J./Basson, Michael/Liu, Zhongchi/Ambros, Victor/Horvitz, H.Robert/Ruvkun, Gary (2000). The lin-41 RBCC Gene Acts in the C. elegans Heterochronic Pathway between the let-7 Regulatory RNA and the LIN-29 Transcription Factor. *Molecular cell* 5 (4), 659–669. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80245-2](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80245-2).
- Stahlhut, Carlos/Slack, Frank J. (2015). Combinatorial Action of MicroRNAs let-7 and miR-34 Effectively Synergizes with Erlotinib to Suppress Non-small Cell Lung Cancer Cell Proliferation. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 14 (13), 2171–2180. <https://doi.org/10.1080/15384101.2014.1003008>.
- Steinkraus, Bruno R./Toegel, Markus/Fulga, Tudor A. (2016). Tiny giants of gene regulation: experimental strategies for microRNA functional studies. *Wiley interdisciplinary reviews. Developmental biology* 5 (3), 311–362. <https://doi.org/10.1002/wdev.223>.
- Sun, Xiaoping/Xu, Min/Liu, Haiyan/Ming, Kunxiu (2017). MicroRNA-219 is downregulated in non-small cell lung cancer and inhibits cell growth and metastasis by targeting HMGA2. *Molecular medicine reports* 16 (3), 3557–3564. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7000>.

- Takamizawa, Junichi/Konishi, Hiroyuki/Yanagisawa, Kiyoshi/Tomida, Shuta/Osada, Hirota/Endoh, Hideki/Harano, Tomoko/Yatabe, Yasushi/Nagino, Masato/Nimura, Yuji/Mitsudomi, Tetsuya/Takahashi, Takashi (2004). Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer research* 64 (11), 3753–3756. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0637>.
- Torre, Lindsey A./Bray, Freddie/Siegel, Rebecca L./Ferlay, Jacques/Lortet-Tieulent, Joannie/Jemal, Ahmedin (2015). *Global cancer statistics, 2012*. CA: a cancer journal for clinicians 65 (2), 87–108. <https://doi.org/10.3322/caac.21262>.
- Travis, William D./Brambilla, Elisabeth/Nicholson, Andrew G./Yatabe, Yasushi/Austin, John H. M./Beasley, Mary Beth/Chirieac, Lucian R./Dacic, Sanja/Duhig, Edwina/Flieder, Douglas B./Geisinger, Kim/Hirsch, Fred R./Ishikawa, Yuichi/Kerr, Keith M./Noguchi, Masayuki/Pelosi, Giuseppe/Powell, Charles A./Tsao, Ming Sound/Wistuba, Ignacio (2015). The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 10 (9), 1243–1260. <https://doi.org/10.1097/JTO.0000000000000630>.
- Treiber, T./Treiber, N./Meister, G. (2012). Regulation of microRNA biogenesis and function. *Thrombosis and haemostasis* 107 (4), 605–610. <https://doi.org/10.1160/TH11-12-0836>.
- Vojtechova, Zuzana/Zavadil, Jiri/Klozar, Jan/Grega, Marek/Tachezy, Ruth (2017). Comparison of the miRNA expression profiles in fresh frozen and formalin-fixed paraffin-embedded tonsillar tumors. *PloS one* 12 (6), e0179645. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179645>.
- Voortman, Johannes/Goto, Akiteru/Mendiboure, Jean/Sohn, Jane J./Schetter, Aaron J./Saito, Motonobu/Dunant, Ariane/Pham, Trung C./Petrini, Iacopo/Lee, Alan/Khan, Mohammed A./Hainaut, Pierre/Pignon, Jean-Pierre/Brambilla, Elisabeth/Popper, Helmut H./Filipits, Martin/Harris, Curtis C./Giaccone, Giuseppe (2010). MicroRNA expression and clinical outcomes in patients treated with adjuvant chemotherapy after complete resection of non-small cell lung carcinoma. *Cancer research* 70 (21), 8288–8298. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1348>.
- Wang, Tairen/Li, Fei/Tang, Shengjian (2015). MiR-30a upregulates BCL2A1, IER3 and cyclin D2 expression by targeting FOXL2. *Oncology letters* 9 (2), 967–971. <https://doi.org/10.3892/ol.2014.2723>.
- Wang, Xuguang/Chen, Zhe (2015). MicroRNA-19a functions as an oncogenic microRNA in non-small cell lung cancer by targeting the suppressor of cytokine signaling 1 and mediating

- STAT3 activation. *International journal of molecular medicine* 35 (3), 839–846.
<https://doi.org/10.3892/ijmm.2015.2071>.
- Wang, Yan/Li, Jinyuan/Tong, Liping/Zhang, Jingwei/Zhai, Aixia/Xu, Kun/Wei, Lanlan/Chu, Ming (2013). The prognostic value of miR-21 and miR-155 in non-small-cell lung cancer: a meta-analysis. *Japanese journal of clinical oncology* 43 (8), 813–820.
<https://doi.org/10.1093/jjco/hyt084>.
- Wang, Zhao-Xia/Bian, Hai-Bo/Wang, Ji-Rong/Cheng, Zhi-Xiang/Wang, Ke-Ming/De, Wei (2011). Prognostic significance of serum miRNA-21 expression in human non-small cell lung cancer. *Journal of surgical oncology* 104 (7), 847–851.
<https://doi.org/10.1002/jso.22008>.
- Wei, Juan/Gao, Wen/Zhu, Cheng-Jun/Liu, Yi-Qian/Mei, Zhu/Cheng, Ting/Shu, Yong-Qian (2011). Identification of plasma microRNA-21 as a biomarker for early detection and chemosensitivity of non-small cell lung cancer. *Chinese Journal of Cancer* 30 (6), 407–414. <https://doi.org/10.5732/cjc.010.10522>.
- Wightman, Bruce/Ha, Ilho/Ruvkun, Gary (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75 (5), 855–862. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90530-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90530-4).
- Willinger, Christine M./Rong, Jian/Tanriverdi, Kahraman/Courchesne, Paul L./Huan, Tianxiao/Wasserman, Gregory A./Lin, Honghuang/Dupuis, Josée/Joehanes, Roby/Jones, Matthew R./Chen, George/Benjamin, Emelia J./O'Connor, George T./Mizgerd, Joseph P./Freedman, Jane E./Larson, Martin G./Levy, Daniel (2017). MicroRNA Signature of Cigarette Smoking and Evidence for a Putative Causal Role of MicroRNAs in Smoking-Related Inflammation and Target Organ Damage. *Circulation. Cardiovascular genetics* 10 (5). <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.116.001678>.
- Wojciechowska, Anna/Braniewska, Agata/Kozar-Kamińska, Katarzyna (2017). MicroRNA in cardiovascular biology and disease. *Advances in clinical and experimental medicine : official organ Wroclaw Medical University* 26 (5), 865–874.
<https://doi.org/10.17219/acem/62915>.
- Wu, Ke/He, Juan/Pu, Wenchen/Peng, Yong (2018). The Role of Exportin-5 in MicroRNA Biogenesis and Cancer. *Genomics, proteomics & bioinformatics* 16 (2), 120–126.
<https://doi.org/10.1016/j.gpb.2017.09.004>.
- Wu, Lina/Hu, Bo/Zhao, Bingtian/Liu, Yinan/Yang, Yue/Zhang, Lijian/Chen, Jinfeng (2017). Circulating microRNA-422a is associated with lymphatic metastasis in lung cancer. *Oncotarget* 8 (26), 42173–42188. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15025>.

- Wu, Q./Yang, Z./An, Y./Hu, H./Yin, J./Zhang, P./Nie, Y./Wu, K./Shi, Y./Fan, D. (2014). MiR-19a/b modulate the metastasis of gastric cancer cells by targeting the tumour suppressor MXD1. *Cell death & disease* 5, e1144. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.110>.
- Xue, Xinying/Liu, Yuxia/Wang, Yong/Meng, Mingming/Wang, Kaifei/Zang, Xuefeng/Zhao, Sheng/Sun, Xiaohua/Cui, Lei/Pan, Lei/Liu, Sanhong (2016). MiR-21 and MiR-155 promote non-small cell lung cancer progression by downregulating SOCS1, SOCS6, and PTEN. *Oncotarget* 7 (51), 84508–84519. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13022>.
- Yang, Miaomiao/Shen, Hongchang/Qiu, Chen/Ni, Yang/Wang, Liguang/Dong, Wei/Liao, Yida/Du, Jiajun (2013). High expression of miR-21 and miR-155 predicts recurrence and unfavourable survival in non-small cell lung cancer. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 49 (3), 604–615. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2012.09.031>.
- Zang, Y-S/Zhong, Y-F/Fang, Z./Li, B./An, J. (2012). MiR-155 inhibits the sensitivity of lung cancer cells to cisplatin via negative regulation of Apaf-1 expression. *Cancer gene therapy* 19 (11), 773–778. <https://doi.org/10.1038/cgt.2012.60>.
- Zentrum für Krebsregisterdaten (Hrsg.) (2019). Zentrum für Krebsregisterdaten. Online verfügbar unter https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Lungenkrebs/lungenkrebs_node.html (abgerufen am 12.11.2020).
- Zermati, Yael/Mouhamad, Shahul/Stergiou, Lilli/Besse, Benjamin/Galluzzi, Lorenzo/Boehrer, Simone/Pauleau, Anne-Laure/Rosselli, Filippo/D'Amelio, Marcello/Amendola, Roberto/Castedo, Maria/Hengartner, Michael/Soria, Jean-Charles/Cecconi, Francesco/Kroemer, Guido (2007). Nonapoptotic role for Apaf-1 in the DNA damage checkpoint. *Molecular cell* 28 (4), 624–637. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.09.030>.
- Zhang, Jinghui/Zhang, Chailan/Hu, Lin/He, Yin/Shi, Zeya/Tang, Siyuan/Chen, Yuxiang (2015). Abnormal Expression of miR-21 and miR-95 in Cancer Stem-Like Cells is Associated with Radioresistance of Lung Cancer. *Cancer investigation* 33 (5), 165–171. <https://doi.org/10.3109/07357907.2015.1019676>.
- Zhang, N./Wang, X./Huo, Q./Sun, M./Cai, C./Liu, Z./Hu, G./Yang, Q. (2014). MicroRNA-30a suppresses breast tumor growth and metastasis by targeting metadherin. *Oncogene* 33 (24), 3119–3128. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.286>.
- Zhao, Yangxing/Zhou, Huaifu/Ma, Kelong/Sun, Jinfeng/Feng, Xu/Geng, Junfeng/Gu, Jun/Wang, Wei/Zhang, Hongyu/He, Yinghua/Guo, Shicheng/Zhou, Xiaoyu/Yu, Jian/Lin, Qiang (2013). Abnormal methylation of seven genes and their associations with clinical

characteristics in early stage non-small cell lung cancer. *Oncology letters* 5 (4), 1211–1218. <https://doi.org/10.3892/ol.2013.1161>.

Zhong, Ming/Bian, Zhengqian/Wu, Zhiyong (2013). miR-30a suppresses cell migration and invasion through downregulation of PIK3CD in colorectal carcinoma. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 31 (2-3), 209–218. <https://doi.org/10.1159/000343362>.

Zhou, Y./Sheng, B./Xia, Q./Guan, X./Zhang, Y. (2017). Association of long non-coding RNA H19 and microRNA-21 expression with the biological features and prognosis of non-small cell lung cancer. *Cancer gene therapy* 24 (8), 317–324. <https://doi.org/10.1038/cgt.2017.20>.

Zhu, Jianjie/Zeng, Yuanyuan/Li, Wei/Qin, Hualong/Lei, Zhe/Shen, Dan/Gu, Dongmei/Huang, Jian-An/Liu, Zeyi (2017a). CD73/NT5E is a target of miR-30a-5p and plays an important role in the pathogenesis of non-small cell lung cancer. *Molecular cancer* 16 (1), 34. <https://doi.org/10.1186/s12943-017-0591-1>.

Zhu, Jianjie/Zeng, Yuanyuan/Xu, Chun/Qin, Hualong/Lei, Zhe/Shen, Dan/Liu, Zeyi/Huang, Jian-An (2015). Expression profile analysis of microRNAs and downregulated miR-486-5p and miR-30a-5p in non-small cell lung cancer. *Oncology reports* 34 (4), 1779–1786. <https://doi.org/10.3892/or.2015.4141>.

Zhu, Jianyun/Wang, Shijia/Chen, Yue/Li, Xiaoting/Jiang, Ye/Yang, Xue/Li, Yuan/Wang, Xiaoqian/Meng, Yu/Zhu, Mingming/Ma, Xiao/Huang, Cong/Wu, Rui/Xie, Chunfeng/Geng, Shanshan/Wu, Jieshu/Zhong, Caiyun/Han, Hongyu (2017b). miR-19 targeting of GSK3 β mediates sulforaphane suppression of lung cancer stem cells. *The Journal of nutritional biochemistry* 44, 80–91. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2017.02.020>.

11 Anhang

11.1 Lebenslauf

Der Lebenslauf enthält persönliche Daten. Er ist deshalb nicht Bestandteil der gedruckten Fassung dieser Arbeit.

11.2 Verzeichnis der akademischen Lehrer/-innen

Meine akademischen Lehrenden waren in Marburg:

Adamkiewicz, Aigner, Arndt, Bartsch, Basler, Baranovski, Bauer, Baum, Bäumlein, Becker, Best, Bette, Bertoune, Bodnar, Boettner, Bliemel, Brehm, Bonaterra, Cetin, Czubayko, Daut, Decher, del Rey, Dettmeyer, Divchev, Donner–Banzhoff, Eberhart, Engenhardt-Cabillic, Eschbach, Feldmann, Feuser, Frink, Fuchs-Winkelmann, Gebhardt, Geks, Geraedts, Görg, Gress, Greulich, Grgic, Günther, Haas, Hack, Hegele, Hertl, Heyse, Hildebrandt, Hoch, Hofmann, Holland, Hoyer, Jansen, Jerrentrup, Josephs, Kann, Kaufmann, Kill, Kinscherf, Kirschbaum, Klasan, Knauf Koczulla, Köhler, Kolb–Niemann, König, Kortus-Götze, Kruse, Kubo, Kühnert, Kwee, Leonhardt, Lill, Lohoff, Ludolph, Lüsebrink, Mahnken, Mey, Milani, Moll, Morin, Moosdorf, Mutters, Neubauer, Neumüller, Nimsky, Oberkircher, Oberwinkler, Oliver, Opitz, Pagenstecher, Peterlein, Plant, Pöttgen, Preisig–Müller, Rastan, Reese, Renke, Renz, Richter, Rost, Ruchholtz, Rüscher, Rust, Sattler, Schäfer, Schieffer, Schneider, Schu, Schulz, Schütz, Schwarz, Seifert, Seitz, Sekundo, Sevinc, Shevchenko, Sieveking, Sommer, Stahl, Steiniger, Stuck, Suske, Tackenberg, Thieme, Timmermann, Vahdad, Vogelmeier, Vogt, Vojnar, Wagner, Weihe, Wertenbruch, Westermann, Wiemers Wiesmann, Wilhelm, Wiśniowski, Worzfeld, Wrocklage, Wulf, Zavorotnyy, Zemlin, Zentgraf, Ziller, Zimmer, Ziring, Zwioerek

11.3 Danksagung

Die Fertigstellung dieser Arbeit wäre ohne die Hilfe vieler weiterer Personen so niemals möglich gewesen. Daher möchte ich mich an dieser Stelle bei einigen Personen ganz besonders bedanken.

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Andreas Kirschbaum für die tolle unterstützende Betreuung bei der Fertigstellung dieser Arbeit bedanken. Die schnelle Erreichbarkeit und die wertvollen Anmerkungen haben mir sehr geholfen.

Ganz besonders danken möchte ich natürlich Dr. rer. nat. Pietro Di Fazio für die wirklich spitzenmäßige Betreuung über all die Jahre. Sowohl die Einarbeitung und Ratschläge im Labor, als auch die Tipps zum Schreiben einer Doktorarbeit und die ständige Verfügbarkeit waren wirklich Gold wert.

Hiermit möchte ich auch allen Mitarbeitern im Labor der Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie für die tolle Zusammenarbeit im Labor danken. Insbesondere Silvia Roth möchte ich an dieser Stelle erwähnen, die mir bei den Versuchen im Labor immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Der letzte und wichtigste Dank gilt natürlich meinen Eltern, die mich während meines gesamten Studiums und der Doktorarbeit immer hervorragend unterstützt haben und mich stets weiter motiviert haben. Ohne euch wäre das alles nicht möglich gewesen.

11.4 Ehrenwörtliche Erklärung

Die Ehrenwörtliche Erklärung wurde in der Druckfassung der Arbeit entfernt.