

Aus dem Zentrum für Pathologie der Universität zu Köln
Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie
Direktor: Universitätsprofessor Dr. Reinhard Büttner

**Untersuchungen zu veränderten
Expressionsprofilen
der serin-/argininreichen Spleißfaktoren 1 und 3 in
murinen Lungenadenokarzinomen
nach LSD1-Inhibierung:
Eine Studie mithilfe der Laser-Mikrodissektion und
nCounter-Technologie**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Miriam Weiß
aus Bonn

promoviert am 20. Juni 2022

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln

Druckjahr 2022

Dekanin/Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink
1. Gutachterin: Professorin Dr. rer. nat. M. Odenthal
2. Gutachterin: Privatdozentin Dr. med. L. Nogová

Erklärung:

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Frau Prof. Dr. Margarete Odenthal, Frau Dr. Sonja Meemboor, Frau Dr. Iris Macheleidt und Frau Dr. Priya Dalvi.

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch Frau Prof. Dr. Margarete Odenthal von mir selbst ausgeführt worden mit zeitweiser technischer Unterstützung von Frau Hannah Eischeid-Scholz, Ulrike Koitzsch, Frau Dr. Priya Dalvi, Herrn Dr. Tim Nestler, Marion Müller und Svenja Wagener-Ryczek.

Die Ermittlung der Versuchssonden für die nCounter-Analyse erfolgte nach eigener Zusammenstellung der Transkriptsequenzen im Rahmen der Reagenzienbestellung zum Expressionsnachweis durch die Firma NanoString. Die chemische Synthese wurde nach den Zielsequenzangaben der Firma NanoString von der Firma Integrated DNA Technologies, Inc. (Coralville, Iowa, Vereinigte Staaten) durchgeführt.

Die Daten der nCounter-Analyse wurden von der Firma NanoString entschlüsselt und von mir weitergehend analysiert, interpretiert und in den Kontext dieser Arbeit gestellt. Zur Auswertung der Daten habe ich selbst das Programm nSolver der Firma NanoString genutzt, sowie Excel von Microsoft und das Statistikprogramm SPSS der Firma IBM.

Die Operationen an den Versuchstieren wurden durch Frau Dr. Iris Macheleidt im Rahmen ihrer eigenen Dissertation durchgeführt. Für die Versuche meiner Arbeit wurde mir konservierte Lungengewebe der Tiere zur Verfügung gestellt sowie die Ergebnisse der Dissertation von Frau Dr. Iris Macheleidt als Grundlage dieser Arbeit.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 21.08.2021

Unterschrift:

Danksagung

Hier an dieser Stelle möchte ich jedem Menschen meinen großen Dank aussprechen, der mich auf dem Weg der Durchführung meiner Doktorarbeit begleitet und unterstützt hat.

Ganz besonders gilt mein herzlicher Dank meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Margarete Odenthal, für ihre jahrelange angenehme und sympathische Betreuung und Unterstützung bei der Realisierung dieser Arbeit. Ich freue mich sehr die Möglichkeit bekommen zu haben, in ihrem Arbeitskreis an diesem anspruchsvollen und interessanten Promotionsthema zu arbeiten und so wertvolle Einblicke in das wissenschaftliche Arbeiten zu gewinnen.

Außerdem möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe Odenthal bedanken, im Besonderen bei Dr. Sonja Meemboor, Dr. Iris Macheleidt, Hannah Eischeid-Scholz, Ulrike Koitzsch, Dr. Priya Dalvi und Dr. Maria Anokhina. Gerade die kameradschaftliche und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre in dieser Gruppe habe ich sehr geschätzt. Herrn Dr. Tim Nestler danke ich für viele fruchtbare Gespräche und Anregungen und Marion Müller und Svenja Wagener-Ryczek für ihre technische Unterstützung.

Auch möchte ich den Herren Dr. Christoph König für die Hilfe bei der NanoString-Technologie und Dr. Ulrich Sauer für die Einweisung in die Laser-Mikrodissektion der Firma ZEISS meinen Dank aussprechen, und natürlich Herrn Prof. Dr. Reinhard Büttner für die Möglichkeit meine Versuche am Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der Universität zu Köln durchführen zu können.

Für die Durchsicht und unerschöpfliche Unterstützung möchte ich Leonie und Viola Brockhaus meinen tiefen Dank ausdrücken, außerdem Jonathan Hagemeister.

Meiner Mutter, meinem Vater und meiner Großmutter gilt ein ganz besonders inniges Dankeschön, da sie mich in jeder Lebenslage mit Rat, Anregungen, Ermutigungen, bedingungs- und endloser Liebe begleiten und so auch auf diesem Weg einen großen Anteil genommen und ihn erst möglich gemacht haben. Auch meinem Bruder bin ich für Rat und Tat bei jeglichen Formatierungsfragen sehr dankbar.

Nicht zuletzt möchte ich meinen engsten Freunden und Kommilitonen danken für ihre Zusprüche und Geduld während der Erstellung dieser Arbeit und meines gesamten Studiums.

Für die größten Anker in meinem Leben:
meine Mutter, Großmutter und meinen Vater

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	8
1. ZUSAMMENFASSUNG	12
2. EINLEITUNG	14
2.1 Definition und Epidemiologie von Lungenkrebs	14
2.2 Ätiologie, Einteilung	15
2.3 Klinik	17
2.4 Stadien	17
2.5 Diagnostik	18
2.6 Pathophysiologie	19
2.7 Therapie	20
2.8 Prognose	21
2.9 Einfluss epigenetischer Veränderungen in der Karzinogenese	22
2.9.1 Die lysinspezifische Histondemethylase LSD1	23
2.9.2 Die serin-/argininreichen Spleißfaktoren 1 und 3	24
2.10 Fragestellung und Ziel der Arbeit	25
3. MATERIAL UND METHODEN	27
3.1 Verwendete Mausmodelle und Auswahl der Proben	27
3.1.1 Lungenadenokarzinomproben der Maus mit einer EGFR L858R Mutation	28
3.1.2 Lungenadenokarzinomproben der Maus mit einer KRAS G12V Mutation	29
3.1.3 Lungenadenokarzinomproben der Maus mit shLSD1-Expression	31
3.1.4 Auswahl der Proben	32
3.2 Mikroskopische Kontrolle der LuAD-Knotenanzahl und -größe	32
3.3 Vorbereitung, inkl. Färbung der Proben	32
3.4 Laser-Mikrodissektion	34
3.5 Makrodissektion	34
3.6 Lyse des gewonnenen Materials	35

3.7	RNA-Isolierung	35
3.8	Konzentrationsbestimmung	36
3.9	NanoString - nCounter Analyse	37
3.9.1	Auswahl der SONDENSEQUENZEN	37
3.9.2	Design und Synthese der Sonden	39
3.9.3	Vorbereitung der Proben	40
3.9.4	Titrationläufe	41
3.9.5	Vorbereitung des Verfahrens und Qualitätsabsicherung	42
3.9.6	Erstellung einer Kalibrierungsprobe	43
3.9.7	PlexSet-Versuch	43
4.	ERGEBNISSE	44
4.1	Entwicklung von Lungenadenokarzinomen nach transgener KRAS Mutation oder EGFR Mutation in Abhängigkeit der LSD1-Inhibierung	44
4.1.1	Auftreten von Lungenadenokarzinomen nach transgener KRAS G12V - oder EGFR L858R Mutation in Abhängigkeit pharmakologischer oder transgener LSD1-Inhibierung	44
4.1.2	Charakterisierung der Lungenadenokarzinomknoten mit KRAS G12V - oder EGFR L858R Mutation nach pharmakologischer oder transgener LSD1- Inhibierung	47
4.2	Materialvorbereitung der Laser-Mikrodissektion	50
4.3	Sondensynthese	54
4.3.1	Sequenzauswahl der Sonden zur Darstellung der Expression von Spleißvarianten des serin-/argininreichen Spleißfaktors 1	55
4.3.2	Sequenzauswahl der Sonden zur Darstellung der Expression von Spleißvarianten des serin-/argininreichen Spleißfaktors 3	57
4.4	Expressionsprofile ausgewählter Schlüsselmediatoren in murinen Lungenadenokarzinomen durch die PlexSet-nCounter-Technologie	58
4.4.1	Expressionsmuster der Transkriptvarianten des SRSF1 in murinen Lungenadenokarzinomen in Abhängigkeit der LSD1-Inhibierung	61
4.4.2	Expressionsmuster der Transkriptvarianten des SRSF3 in murinen Lungenadenokarzinomen in Abhängigkeit der LSD1-Inhibierung	67
5.	DISKUSSION	72
5.1	Expressionsanalyse nach Laser-Mikrodissektion von Tumorknoten aus formalinfixiertem und paraffineingebettetem Gewebe	72

5.2	Expressionsprofile der serin-/argininreichen Spleißfaktoren 1 und 3	75
6.	LITERATURVERZEICHNIS	83
7.	ANHANG	90
7.1	Abbildungsverzeichnis	90
7.2	Tabellenverzeichnis	92
7.3	Ergänzende Tabellen	93
8.	VORABVERÖFFENTLICHUNGEN VON ERGEBNISSEN	103

Abkürzungsverzeichnis

AdCre	Cre-exprimierendes Adenovirus
ALK	Anaplastische-Lymphom-Kinase
ASCO	American Society of Clinical Oncology
BIN1	Bridging Integrator-1 = Myc-Box-abhängiges interagierendes Protein 1 = Amphiphysin-2
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaar/-e
BRAF-V600	Mutation des Gens BRAF (= v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1) im Codon 600
cDNA	complementary DNA = komplementäre DNS
CEA	Carcinoembryonales Antigen
cm	Zentimeter
Ct	cycle threshold = „Zyklus-Schwelle“
CT	Computertomographie
Ctrl	Kontrolle
ddH ₂ O	doppelt destilliertem Wasser
DNA	desoxyribonucleic acid = Desoxyribonukleinsäure
E-BUS	endobronchialer Ultraschall
EGFR	epidermal growth factor receptor = EGF-Rezeptor
EML4-Gen	Echinoderm microtubule-associated protein-like 4 = Echinoderm-Mikro tubuli-assoziiertes Protein-ähnliches 4
ESE	Exon-Spleiß-Enhancer = exonischer Spleißverstärker
EU	Europäische Union
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FFPE-Gewebe	formalinfixiertes, paraffineingebettetes Gewebe
g	Gramm
G12V	Punktmutation Codon 12: Glycin -> Valin

HAT	Histon-Acetyltransferasen
hbs1-like	HBS1-ähnliche translationale GTPase
HCl-2509	N'-(1-phenylethylidene)-benzohydrazide compound
HDAC	Histon-Deacetylasen
hnRNP A1, A2/B1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein = heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
H&E	Hämalaun- und Eosinfärbung
ID	Identifizierungsindex
kg	Kilogramm
KRAS	Kirsten Rat Sarcoma Virus
l	Liter
LSD1	lysinspezifische Histondemethylase 1
LuAD	Lungenadenokarzinom
L858R	Punktmutation Codon 858: Leucin -> Arginin
MAO	Monoaminoxidase
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mLSD1	mouseLSD1 = LSD1 der Maus
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
mRNA	messenger ribonucleic acid = Boten-RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
m-Tor	mechanistic Target of Rapamycin = Ziel des Rapamycins im Säugetier
MYC	Myelocytomatose-Onkogen
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NDUFS 6, 7, 8	NADH:Ubiquinone Oxidoreductase Core Subunit S6, 7, 8
ng	Nanogramm

nM	Nanomolar
NSCLC	non-small-cell lung cancer = nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom
NSE	neuronenspezifische Enolase
PCR	polymerase chain reaction = Polymerase-Kettenreaktion
PD1	Programmed cell death protein 1
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PINK 1	PTEN-induced kinase 1
qPCR	real-time quantitative PCR
RNA	ribonucleic acid = Ribonukleinsäure = RNS
RON	recepteur d'origine nantais = Makrophagen-stimulierender Proteinrezeptor
ROS	reactive oxygen species = reaktive Sauerstoffspezies
Sam68	Src-assoziiertes Substrat in der Mitose von 68 kDa
SCLC	small-cell lung cancer = kleinzelliges Lungenkarzinom
shLSD1	small hairpin Erkennungssequenz für LSD1
shRNA	small hairpin RNA = RNA-Molekül mit Haarnadelstruktur
SR Proteine	serin- und argininreiche Proteine
SRSF 1, 3	serin-/argininreicher Spleißfaktor 1, 3
TERT	Telomerase reverse transcriptase = reverse Transkriptase der Telomerase
TKI	Tyrosinkinase-Inhibitoren
TNM	Klassifikationssystem zur Einteilung maligner Tumorerkrankungen
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
VATS	Videoassistierte Thorakoskopie
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor = vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktoren
WHO	World Health Organization = Weltgesundheitsorganisation
μCT	Mikro-Computertomographie

μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μm^2	Quadratmikrometer
μM	Mikromolar

1. Zusammenfassung

Lungenkrebs ist weltweit eine der häufigsten und tödlichsten bösartigen Tumorerkrankungen. Die nicht-kleinzelligen Lungenkarzinome (NSCLC) machen die größte Gruppe der Lungenkarzinome aus, welche in weitere Unterformen, wie unter anderem dem Lungenadenokarzinom (LuAD) unterteilt werden können. Trotz jahrelanger intensiver Forschung und neuer Tumortreiber-spezifischen Therapiemöglichkeiten ist die Diagnose auch heutzutage noch mit einer schlechten Prognose verbunden. Daher wird stets nach neuen Behandlungsoptionen geforscht, wobei in den letzten Jahren vermehrt epigenetische Faktoren miteinbezogen wurden.

In verschiedenen Krebsarten, wie auch dem LuAD, wird eine stark erhöhte Expression der lysinspezifischen Demethylase LSD1 beobachtet. LSD1 ist ein epigenetischer Mediator, der Lysine an Histonen demethyliert und so maßgeblich die Transkription einer Vielfalt von Genen reguliert, die grundlegende zelluläre Prozesse wie die Zellproliferation und den -metabolismus beeinflussen. Zudem konnte in Vorarbeiten gezeigt werden, dass der LSD1 Inhibitor HCI-2509 die Expression transaktivierender Spleißfaktoren reprimiert. Daher wurden in der vorgelegten Doktorarbeit die zentralen Spleißfaktoren SRSF1 und SRSF3 in LuAD-repräsentativen, transgenen Mausmodellen nach KRAS G12V- oder EGFR L858R-induzierter Lungenadenokarzinogenese auf den Einfluss einer LSD1-Inhibierung untersucht.

Für die Expressionsanalyse standen formalinfixierte, paraffineingebettete (FFPE) Gewebepräparate einer Studie von Macheleidt et al. zur Verfügung ¹. Nach pharmakologischer LSD1-Inhibierung hatten sich nur bei wenigen Mäusen Tumore entwickelt, so dass hier nur von wenigen Mäusen Tumormaterial für die Studie vorhanden war. Ebenfalls war das Untersuchungsgut von Lungengewebe nach transgener LSD1-Inhibierung mittels shLSD1 limitiert. Aufgrund der Fragmentierung der RNA nach Formalinfixierung sollte die Genexpressionsanalyse mit der nCounter-Technologie durchgeführt werden. Die nCounter-Technologie hängt nicht von einer enzymatischen Umschreibung der mRNA in DNA und folgender Amplifikation der Zielsequenzen ab, stattdessen werden Transkripte direkt durch die Hybridisierung fluoreszierender Sonden erfasst und quantifiziert. Die Zielsequenzen von 24 Transkripten, die für Mediatoren der Zellzyklusregulation, des Metabolismus und der RNA-Reifung kodierten, wurden nach Datenbankrecherche des National Center of Biological Information definiert. In diesem Set an ausgewählten Genen wurden nicht nur die SRSF1 und SRSF3 Transkripte berücksichtigt, sondern auch deren konservierte Spleißvarianten.

Nach histologischer Erfassung des Tumorauftritts und der Evaluierung des für die Genexpressionsanalyse notwendigen Einsatzmaterials der murinen FFPE-Gewebeschnitte wurden eine Makro- und Laser-Mikrodissektion durchgeführt, um gezielt RNA aus Lungengewebe mit und ohne Tumorgewebe zu gewinnen. Die nCounter Expressionsprofile der ausgewählten

Gene zeigten in den murinen LuAD mit KRAS G12V oder EGFR L858R Mutation versus den korrespondierenden Nicht-Tumorgewebe meist nur geringe Veränderungen. Allerdings konnte für die untersuchten Spleißfaktoren abhängig von der Mutation und der Transkriptvariante in den LuAD ein unterschiedliches Expressionsmuster festgestellt werden. So wurde der SRSF1 in den LuAD mit einer KRAS G12V Mutation unabhängig von der LSD1-Inhibierung signifikant herunterreguliert, während der SRSF1-Expressionsspiegel insgesamt in EGFR L858R-basierten LuAD unverändert war. Allerdings lag im Einklang mit den KRAS mutierten Tumoren der Anteil der SRSF1 Transkriptvariante mit einer zusätzlichen Exon 3-Sequenz (Variante 2SRSF1_3a) vermindert vor. Weder die pharmakologische noch die transgene LSD1-Inhibierung zeigte hier einen eindeutigen Effekt. Im Gegensatz zu KRAS G12V mutierten LuAD unterlag die SRSF3-Gesamtexpression in den LuAD, die auf dem Boden der EGFR-Treiber-mutation L858R entstanden waren, einer Hochregulation. Die erhöhte SRSF3-Expression in EGFR L858R-LuAD spricht für den onkogenen Charakter des Faktors und bestätigt frühere Studien einer vermehrten Expression in zahlreichen Karzinomen. Unter dem Einfluss der LSD1-Inhibierung kommt es zu einem verminderten Anstieg der SRSF3-Expression in den EGFR L858R-LuAD. Während die Expression der Transkriptvariante, die aufgrund eines frühen Stop-Codons zu einer trunkierten inaktiven Peptidform führt, nicht unter dem Einfluss einer LSD1-Inhibierung stand, sprechen übereinstimmend mit in vitro-Daten der Arbeitsgruppe diese Daten dafür, dass eine LSD1-Inhibierung die Gesamtexpression von SRSF3 reguliert.

Insgesamt wurden am Beispiel der Faktoren SRSF1 und SRSF3 in der vorgelegten Arbeit die nCounter Technologie zur Expressionsanalyse von lasermikrodissezierten Tumorknoten aus FFPE-Material erfolgreich eingesetzt, wodurch die grundlegenden Voraussetzungen geschaffen wurden, die Technik in Zukunft an klinischem FFPE-Routine-material einzusetzen.

2. Einleitung

2.1 Definition und Epidemiologie von Lungenkrebs

Lungenkrebs ist mit einem Anteil von 11% eine der häufigsten bösartigen Tumorerkrankungen in Deutschland und weltweit (Abbildung 1 und Abbildung 2A). Im Jahr 2018 gab es allein in Deutschland fast 70.000 Neuerkrankungen – davon ca. 40.000 bei Männern und 27.000 bei Frauen. Somit handelt es sich bei Männern nach Prostatakrebs um die zweithäufigste und bei Frauen nach Brust- und Darmkrebs um die dritthäufigste Krebserkrankung ².

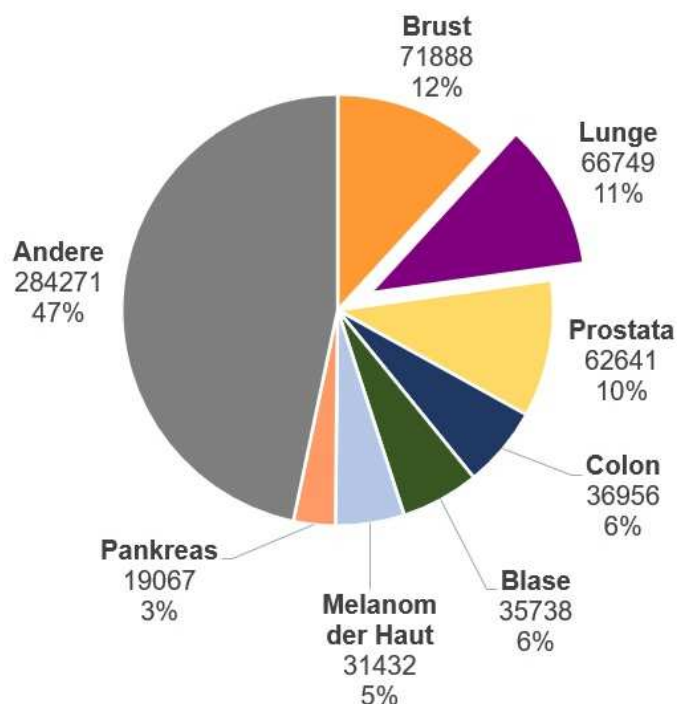


Abbildung 1: **Inzidenz von Krebserkrankungen in Deutschland 2018:**

Beide Geschlechter und alle Krebsarten sind eingeschlossen. Grafikdaten bezogen von und Grafik abgewandelt nach der World Health Organization (WHO). ³

Außerdem ist Lungenkrebs die häufigste tödliche Krebserkrankung insgesamt in Deutschland und auch weltweit, bei Frauen die zweittödlichste Krebserkrankung nach Brustkrebs, bei Männern insgesamt (Abbildung 2). Grund hierfür ist, dass Lungenkrebs oft erst spät diagnostiziert wird und prognostisch sehr ungünstig ist, was in Kapitel 2.8 genauer erläutert werden wird ⁴⁻⁶.

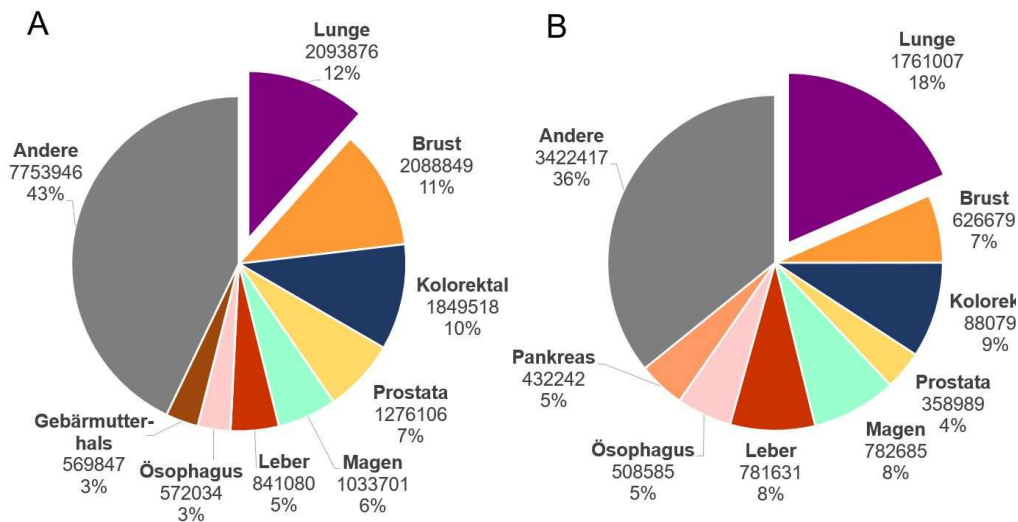


Abbildung 2: **Darstellung der weltweiten Inzidenz (A) und Mortalität (B) von Lungenkrebs in Kreisdiagrammen.**
 Grafikdaten bezogen von und Grafik abgewandelt nach der WHO. ⁷

Bezüglich der Geschlechterverteilung erkranken Männer generell häufiger an Lungenkrebs. Eine Ausnahme bilden die Adenokarzinome aus der Gruppe der nicht-kleinzelligen Lungenkarzinome, an denen Frauen häufiger erkranken.

In den letzten 20 Jahren nimmt die Rate an Lungenkrebs neu erkrankter Frauen zu, die der Männer jedoch ab ⁸. Dieser Beobachtung liegt möglicherweise zugrunde, dass sich das Rauchverhalten verändert – Frauen rauchen mehr, Männer dahingegen tendenziell weniger. Außerdem unterliegt die Gesellschaft aktuell dem demographischen Wandel, wobei die Inzidenz der Erkrankung mit dem Alter zunimmt und einen Gipfel im achten Lebensjahrzehnt erreicht⁹.

2.2 Ätiologie, Einteilung

Eine Ursache beziehungsweise ein Risikofaktor für die Entstehung von Lungenkrebs ist das Rauchen von Zigaretten. 85% der Lungenkrebsfälle sind auf den Zigarettenkonsum zurückzuführen, sowohl aktiven als auch passive ^{10,11}. Das Risiko eine Krebserkrankung der Lunge durch das Rauchen von Zigaretten zu entwickeln ist abhängig von Ausmaß und Dauer des Konsums, wobei sich das Risiko unter den Geschlechtern gleich verteilt ¹². Es sind auch berufliche (zum Beispiel Asbest ¹³) und umweltbedingte Kanzerogene (zum Beispiel Dieselabgase ¹⁴, Radon-222 ¹⁵) beschrieben, die ausschlaggebend für die Entwicklung dieser Erkrankung sind, sowie strukturelle Pathologien, wie Lungennarben. Außerdem können endogene Ursachen angeführt werden, wie Vorerkrankungen der Lunge oder eine genetische Disposition ¹⁶. Auf die Entstehung eines Lungenkarzinoms wird in Kapitel 2.6 noch genauer eingegangen werden.

Präventiv wird empfohlen Tabakrauch passiv und aktiv, sowie berufliche und umweltbedingte Kanzerogene zu vermeiden und physischer Aktivität und gesunder Ernährung nachzugehen ¹⁷.

Lungenkrebs, beziehungsweise -karzinome werden primär histologisch in zwei Hauptgruppen unterteilt: die kleinzelligen und nicht-kleinzelligen Lungenkarzinome.

Kleinzellige Lungenkarzinome, im Englischen „small cell lung cancer“ und im Folgenden als SCLC bezeichnet, machen 15% aller Lungenkarzinome aus ¹⁸. Sie gehören zu der Gruppe neuroendokriner Tumore und liegen anatomisch meist an den zentralen Atemwegen. Die Zellen haben eine hohe Teilungsrate, was das charakteristisch schnelle Wachstum und die frühere Metastasierung dieser Karzinome ausmacht. Aufgrund dieser Eigenschaften ist die Prognose des SCLC in der Regel schlechter als bei nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen und es gibt selten kurative Therapieansätze ^{19,20}.

Mit 85% bilden die nicht-kleinzelligen Lungenkarzinome, im Englischen „non small cell lung cancer“, im Folgenden als NSCLC bezeichnet, die Hauptgruppe der Lungenkarzinome. Im Vergleich zu SCLC ist hier meist eine periphere Lage des Tumorwachstums mit niedrigeren Zellteilungsraten beschrieben, weshalb die Prognose meist besser ist und öfter kurative Therapieansätze verfolgt werden können ²¹⁻²³. Die NSCLC können in weitere Subtypen unterteilt werden (Abbildung 3).

In dieser Arbeit wird der Fokus auf die Adenokarzinome (LuAD) gelegt, welche knapp die Hälfte der NSCLC ausmachen ²⁴. Das Adenokarzinom ist der häufigste Subtyp des Lungenkarzinoms, welcher bei Nichtrauchern, besonders bei nichtrauchenden Frauen diagnostiziert wird. Entsprechend der Charakteristika der NSCLC sind Adenokarzinome in der Regel anatomisch peripher gelegen und zeichnen sich durch Schleimbildung oder azinäres Wachstum aus. Alternativ ist auch eine papilläre Differenzierung möglich sowie eine flächenhafte Ausbreitung entlang der Bronchiolen und Alveolen beim bronchioalveolären Karzinom ²¹.

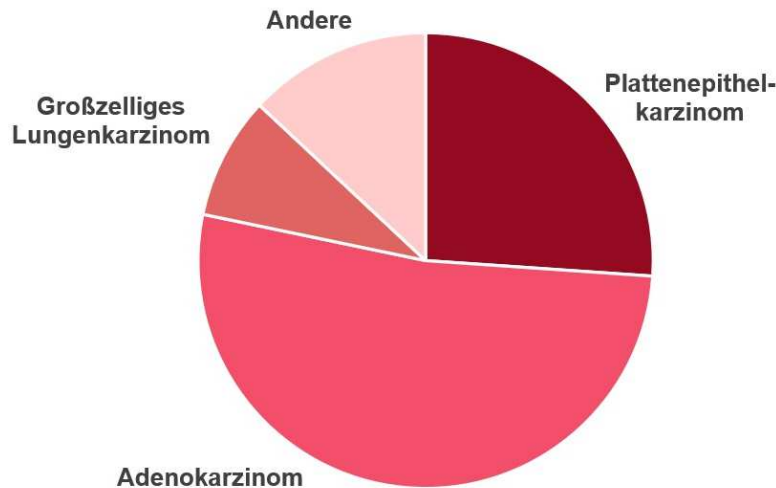


Abbildung 3: **Darstellung der Subtypen der Gruppe der nicht-kleinzelligen Lungenkarzinome, kurz NSCLC.** Die Gruppe der „anderen“ schließt zum Beispiel das Adenosquamöse und Sarkomatoide Karzinom mit ein. Grafik abgewandelt nach Pikor, L.A., et al. ²⁴.

2.3 Klinik

Initial haben 90% der Patienten mit Lungenkarzinomen Beschwerden wie Husten, Dyspnoe, Gewichtsverlust, Brustschmerzen oder Hämoptysen. Diese Symptome führen dennoch oft, aufgrund ihrer mangelnden Spezifität, dazu, dass die Erkrankung erst spät diagnostiziert wird ^{17,25}.

Rezidivierenden Atemwegsinfekten und neu auftretendem Asthma sollte besondere Beachtung geschenkt werden. Eher im späteren Verlauf können Nervenparesen, zum Beispiel des Nervus recurrens oder phrenicus, Pleuraexsudate, oder eine Einflusstauung als intrathorakale Beschwerden auftreten. Extrathorakale Symptome können Schmerzen durch Knochenbefall sein. Auch möglich ist das Auftreten eines Pancoast- oder Paraneoplastischen Syndroms ²¹.

2.4 Stadien

Lungenkarzinome werden nach der TNM-Klassifikation ²⁶ der Union Internationale Contre le Cancer, kurz UICC (Genf, Schweiz) eingeteilt. Das ‚T‘ steht hierbei für die Größe und Ausdehnung des Primärtumors, das ‚N‘ für einen möglichen Befall der regionären Lymphknoten und das ‚M‘ für die Frage, ob es bereits zu einer Metastasierung gekommen ist, oder nicht. Anhand dieser verschiedenen Merkmale können Tumore somit einheitlich klassifiziert werden. Beispielsweise bedeutet ‚Tx‘, dass keine Beurteilung oder ein Nachweis maligner Zellen nur im Sputum oder nach Spülungen der Bronchien möglich ist. ‚Tis‘ steht für ein Carcinoma in situ, ‚T1a‘ für eine Tumorgöße ≤ 2 cm. Je nach Lage und Größe geht die Einteilung bis hin zu ‚T4‘, bei dem weitere Strukturen des Mediastinums oder die kontralaterale Lungenseite bereits vom Tumorwachstum betroffen sind. Die ‚N‘-

Einteilung geht von ‚N0‘ mit nicht befallenen regionären Lymphknoten bis ‚N3‘ mit kontralateral mediastinal, tief zervikal, hiliär und/oder ipsilateral tief zervikal und/oder supra-klavikulär befallenen Lymphknoten. Eine nicht vorhandene Metastasierung wird mit ‚M0‘ verzeichnet, eine Metastasierung mit ‚M1‘. Zur weiteren Differenzierung steht ‚M1c‘ zum Beispiel für mehr als eine Fernmetastase in einem oder mehreren Organen ^{21,27}.

Je nach TNM-Klassifikation findet eine weitere Stadieneinteilung statt vom Stadium des okkulten Karzinoms und dem Stadium 0 (Tis, N0, M0) bis hin zu dem Stadium IV (jedes T, jedes N, M1).

Diese international durchgängige Klassifizierung ermöglicht eine klare Definition einer Erkrankung über Ländergrenzen und Behandlungsgruppen hinweg. Außerdem werden mithilfe dieser Stadien Leitlinien zur Therapie und Prognose erstellt.

2.5 Diagnostik

Bei der Diagnostik eines Lungenkarzinoms stehen, wie bei jeder Erkrankung die Anamnese und die körperliche Untersuchung des Patienten an erster Stelle. Trotz der schlechten Prognose der Erkrankung gibt es zum Lungenkarzinom derzeit keine empfohlenen, flächendeckenden Screenings, wie zum Beispiel beim Brust- oder Darmkrebs, da die Überlebensraten von erkrankten Patienten bislang nicht verbessert werden konnten ¹⁷.

Bei Verdacht einer pulmonalen Raumforderung gilt es diese zu lokalisieren und deren Wachstumsausmaße genauer zu beschreiben. Dazu stehen verschiedenste bildgebende Verfahren wie das Röntgen des Thoraxes in zwei Ebenen, die Computertomographie (CT), die virtuelle Bronchoskopie und der endobronchialer Ultraschall (EBUS) zur Verfügung ^{17,25}.

Zur Entnahme und histologischen Untersuchung von Gewebeproben können dem Patienten eine Bronchoskopie, Feinnadelbiopsie, Videoassistierte Thorakoskopie (VATS) oder diagnostische Probethorakotomie angeboten werden. Weitere Untersuchungen des Abdomens und des Schädels durch eine Magnetresonanztomographie (MRT) oder eine CT-Untersuchung, die Knochenszintigrafie, die Positronen-Emissions-Tomographie (PET-CT) oder auch Knochenmarkspunktionen stehen außerdem zum Ausschluss von Fernmetastasen zur Verfügung, sowie eine Lungenfunktionsdiagnostik und eine Spiroergometrie vor Operationen zur Einschätzung der Belastbarkeit der Lunge ²⁸. Risikogruppen, zum Beispiel Mitgliedern einer Berufsgruppe mit beruflicher Kanzerogenexposition sollten Vorsorgeuntersuchungen, wie eine Sputumzytologie mit DNA-Zytometrie angeboten werden ^{17,21,29}.

Die Bestimmung von Tumormarkern, wie der neuronenspezifischen Enolase (NSE) oder dem Carcinoembryonalen Antigen (CEA), wird aufgrund geringer Sensitivität und Spezifität nicht regulär empfohlen ¹⁷.

2.6 Pathophysiologie

Die Entstehung eines Tumors kann grundsätzlich in wenigen Schritten beschrieben werden: Gewebe wird gegenüber eines Karzinogens exponiert, was zu genetischen Schäden und einer Epitheldysplasie führen kann. Diese Dysplasie kann sich schließlich zu einem „Carcinoma in situ“ entwickeln ²¹.

Diese Schritte können auf vielfältige Weise stattfinden, was erklärt, weswegen es multiple Subtypen des Lungenkarzinoms gibt, welche anhand typischer Mutationen definiert werden können. Für diese typischen Mutationen gibt es heute teilweise zielgerichtete neue Therapieoptionen, welche eine sogenannte „Targeted Therapy“, also eine individuell an den Patienten und seinen Tumor angepasste Therapie ermöglichen.

Die mit 25% häufigste genetische Veränderung im Lungenkarzinom ist die KRAS-Mutation, welche in der Regel bei Patienten mit Adenokarzinom und Nikotinabusus in der Anamnese gefunden wird. Zur Behandlung KRAS-G12C-mutierter NSCLC gibt es seit wenigen Monaten den hierfür spezifischen Inhibitor Sotorasib ³⁰⁻³².

Die zweithäufigste Treibermutation in Adenokarzinomen der Lunge ist die des Epidermal Growth Factor Rezeptors, kurz EGFR mit 10-15%. Die genaue Ätiologie der Mutation ist unbekannt, jedoch kommt sie gehäuft bei Nicht- oder Gelegenheitsrauchern vor. Die EGFR-Mutation allein kann als starke Treibermutation zur Krebsentstehung führen. Am meisten – zu 80% - werden Mutationen in Exons 19 und 21 beschrieben, seltener auch in Exons 18 und 20 ^{16,33}.

Die American Society of Clinical Oncology, kurz ASCO (Alexandria, Virginia, Vereinigte Staaten) empfiehlt seit 2011 eine EGFR-Mutationstestung bei der Diagnose eines NSCLC, da seit einigen Jahren zielgerichtete Therapien auf dem Markt verfügbar sind, wie die Tyrosinkinase-Inhibitoren Gefitinib und Erlotinib. Das Ansprechen auf diese Therapien ist bei dieser Mutation besser als das auf Chemotherapeutika ³⁴. Die Tyrosinkinase-Inhibitoren wirken jedoch nicht universell bei jeder EGFR-Mutation und aufgrund von Resistenzentwicklungen nur für begrenzte Zeit. Diese Resistenzen können durch neu entstandene Mutationen auftreten und sind Thema aktueller Forschung. Teilweise kann die Bildung von Resistenzmechanismen schon durch eine Kombination verschiedener Medikamente in Studien durchbrochen oder verlangsamt werden (zusammengefasst in ¹⁶ und ³⁵).

Bei 3-5% der Adenokarzinomfälle - oft bei jungen und nie rauchenden Patienten kann eine Mutation des Gens der Anaplastische-Lymphom-Kinase (ALK) meist im Sinne einer EML4-ALK-Translokation gefunden werden³⁶. Diese Mutation kann eine dauerhafte Aktivierung des Gens und Tumorwachstums zur Folge haben. Der ALK-Inhibitor Crizotinib findet bereits klinische Anwendung mit Ansprechraten von 70%. Sowohl in diesen Fällen wie auch bei den EGFR-Inhibitoren kann es bereits nach wenigen Jahren zu der Entwicklung von Resistenzen kommen. Aufgrund dessen ist auch hier die Entwicklung neuer Medikamente Bestandteil aktueller Forschung.

Als letztes Beispiel einer typischen Mutation sei hier ROS 1 erwähnt, welche 1% der Mutationen im Lungenkarzinom ausmacht, fast ausschließlich in Adenokarzinomen von Nierauchern^{16,37}.

Die erwähnten Mutationen schließen sich in der Regel gegenseitig aus und kommen nicht gleichzeitig in einem Tumor vor. Gene ohne solche Mutationen werden als Wildtyp (wt) bezeichnet. Durch den Mangel einer spezifischen Mutation fehlt hier die Möglichkeit einer speziellen zielgerichteten Therapie.

2.7 Therapie

Die Therapie von Krebserkrankungen lässt sich grundsätzlich in zwei Ansätze einteilen: den kurativen und den palliativen Therapieansatz.

Der kurative Ansatz zielt darauf ab eine Heilung von der Erkrankung zu erreichen und ist nur in frühen und teilweise lokal fortgeschrittenen Stadien möglich. Im Gegensatz dazu ist eine Heilung im palliativen Therapieansatz nicht mehr zu erwarten oder zu erreichen. Im Fokus dieses Ansatzes steht die Symptomlinderung und der Erhalt der Lebensqualität der Patienten¹⁷.

Neben dem Stadium (vergleiche Kapitel 2.4) der Erkrankung sind weitere prognostische Marker (vergleiche Kapitel 2.8) für die Auswahl der Therapie von Interesse. In diesem Kapitel werden grundsätzliche Therapieoptionen aufgezählt, welche unabhängig von Tumorstadien oft miteinander kombiniert werden.

Die Therapie der Wahl ist stets die Operation mit möglichst vollständiger Resektion des Tumorgewebes durch eine Pneu-, Lob- oder Keilektomie, inklusive Entnahme befallener Lymphknoten^{17,38,39}. Diese Resektionen erfolgen in der Regel durch eine offene, laterale Thorakotomie oder VATS.

Neben der Operation ist die Chemotherapie ein wichtiger Pfeiler der Tumorthherapie. Diese kann adjuvant, neoadjuvant (/Induktionstherapie), definitiv oder palliativ

durchgeführt werden, abhängig vom Zustand des Tumors und des Patienten. Sogenannte reguläre Chemotherapeutika sind zum Beispiel platinhaltige Alkylantien, wie Cisplatin oder Carboplatin und Etoposid, ein Topoisomerase-II-Hemmstoff ⁴⁰.

Im Rahmen sogenannter „Targeted Therapies“ werden alternative Wirkstoffe genutzt und kombiniert, wenn Treibermutationen beziehungsweise genetische Marker detektiert werden konnten. Zum Beispiel werden beim NSCLC ALK1-Inhibitoren wie Crizotinib oder Ceritinib bei ROS1-Translokation oder EML4-ALK-Translokation eingesetzt, bei EGF-Rezeptormutationen die Gruppe der Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) ³³, wie Erlotinib, Afatinib, Osimertinib und Gefitinib, PD-1-Inhibitoren, wie Pembrolizumab ¹⁷, Nivolumab ⁴¹ bei Expression von PD-1, beziehungsweise hoher Mutationslast und Kombinationen aus Dabrafentib und Trametinib ⁴² bei BRAF-V600-Mutationen. Daneben gibt es weitere Wirkstoffe, welche in den VEGF-Signalweg eingreifen, oder bei fehlender Treibermutation Anwendung finden, wie Nintedanib ⁴³, Bevacizumab ⁴⁴, Ramucirumab ⁴⁵.

Die Radiatio beziehungsweise Strahlentherapie, welche oft in Kombination mit einer Chemotherapie durchgeführt wird ⁴⁶, kann ebenfalls adjuvant oder neoadjuvant angewendet werden, das bedeutet vor oder nach einer Operation. Oft werden auch im speziellen prophylaktische Schädelbestrahlungen oder die Bestrahlung von Metastasen durchgeführt ¹⁷.

Es besteht stets Bedarf nach mehr und neuen Therapien. In jüngster Zeit werden auch epigenetische Inhibitoren entwickelt und als Therapieansätze diskutiert.

2.8 Prognose

Die Prognose des Lungenkarzinoms ist schlecht mit einer 5-Jahresüberlebensrate von 15% bei Männern und 20% bei Frauen ⁸. Mehr als zwei Drittel der Patienten werden bereits bei der Klinikaufnahme oder intraoperativ als inoperabel eingestuft aufgrund einer Metastasierung oder eingeschränkten Lungenfunktion. Eine frühe Diagnose kann die Prognose verbessern ²¹.

Speziell bezüglich des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms ist die 5-Jahresüberlebensrate abhängig vom Stadium 75-80% (Stadium IA = T1 N0) bis 5-10% (Stadium IIIB = T1-T2 N3 oder T3-T4 N2) und somit besser als beim kleinzelligen Lungenkarzinom, bei dem die 5-Jahresüberlebensrate bei sehr limitiertem Befall mit N0 bei 50-70% liegt und bei ausgedehntem Befund nur vereinzelte Fälle 5 Jahre überleben ¹⁷. Wichtige prognostische Parameter sind das Tumorstadium, der Allgemeinzustand und Komorbiditäten des Patienten, inklusive Alter und Geschlecht, sowie das immunologische Verhalten und die Histologie des Lungenkarzinoms ^{17,21}.

In den letzten Jahren hat die 5-Jahresüberlebensrate des Lungenkarzinoms kaum zugenommen⁸. Dieser Fakt und die enorme Häufigkeit dieser Erkrankung betonen, wie wichtig es ist neue Therapieoptionen zu entwickeln und die Diagnostik zu spezifizieren, um auch spät diagnostizierten Patienten eine Verlängerung des Überlebens zu ermöglichen.

Die Erforschung neuer Therapieoptionen, besonders bezüglich epigenetischer Faktoren ist die Zielsetzung dieser Arbeit.

2.9 Einfluss epigenetischer Veränderungen in der Karzinogenese

Neben genetischen Veränderungen (siehe Kapitel 2.6) kommt es bei der Krebsentwicklung zu einer Dysregulation der Genexpression und dadurch zu einer Stimulierung onkogener Signalwege aufgrund epigenetischer Veränderungen. Der Begriff Epigenetik beschreibt die reversible Veränderung der DNA beziehungsweise der aus ihr heraus lesbaren Informationen, ohne, dass die Nukleotidsequenz selbst verändert wird. Diese Veränderungen sind möglich über Modifikationen der DNA durch DNA-Methylierung, der Histone oder über Einflüsse nicht-kodierender RNA. Sie haben regulatorische Auswirkungen bezüglich der Zugänglichkeit des Erbguts.

Histone sind Proteine, welche sich zu Oktameren zusammenlagern und um welche die DNA gewickelt ist. Ist diese Bindung stark und Wicklung sehr eng, so ist das Erbgut stark kondensiert und wird als Heterochromatin bezeichnet. Soll die DNA transkribiert, also genutzt werden, so lockert sich die Bindung der Histone zu der DNA. Diese entpackte Variante des Chromatins wird als Euchromatin bezeichnet. Die Transkription der DNA ist demnach abhängig von der Verpackung durch Histone.

Durch sekundäre Modifikationen der Histone wie eine Methylierung, Ubiquitinierung, Acetylierung oder Phosphorylierung kommt es zu strukturellen Veränderungen der Histone, was zu Chromatinveränderungen und damit auch zur Beeinflussung der Transkription führt. Die histonmodifizierenden Enzyme werden in verschiedene Gruppen unterteilt. Es gibt Enzyme, welche Aminosäuren zum Beispiel acetylieren, die Histonacetyltransferasen (HATs) und solche, welche diese Acetylierung wieder entfernen, die Histon-deacetylasen (HDACs). Methyltransferasen übertragen Methylgruppen auf Lysin- und Argininreste, Histondemethylasen entfernen diese Methylgruppen wieder. Aufgrund der Vielzahl der Histone und deren Reste ergeben sich eine Unmenge an Kombinationsmöglichkeiten zur Modifikation dieser und somit ein sehr komplexer Histoncode (zusammengefasst in⁴⁷ und⁴⁸).

2.9.1 Die lysinspezifische Histondemethylase LSD1

Die lysinspezifische Histondemethylase (LSD1) ist eine flavinabhängige Monoaminoxidase und kann mono- oder dimethylierte Bindungen der Lysinreste 4 und 9 am Histon 3 (H3K4, H3K9) wieder aufheben ^{48,49}. LSD1 wurde als erste der Histondemethylasen beschrieben, die die Reaktion mittels Aminoxidation mithilfe des Cofaktors FAD durchführen. Eine weitere Gruppe der Demethylasen bilden die Jumonji Proteine, welche über oxidative Mechanismen und Reaktionen mit Radikalen auch trimethylierte Bindungen lösen können ^{48,50}.

LSD1 wird ubiquitär exprimiert und ist essenziell für die Embryogenese ⁵¹. Die Polypeptidkette besteht aus 852 Aminosäuren und bildet über Faltungen verschiedenen funktionelle Regionen ⁵². Dem unstrukturierten N-Terminus schließt sich die SWIRM-Domäne an, welche einen Teil der Bindungsstelle der Histone bildet. Eine Oxidase-Domäne macht den Hauptteil des Proteins aus und demethyliert FAD-abhängig spezifische Histonlysine ⁴⁹. Innerhalb der Oxidase-Domäne liegt als Einschub eine Tower-Domäne vor, welche die Katalyse-Reaktion beeinflusst ⁵².

Die Aktivität von LSD1 wird durch Interaktionen mit weiteren epigenetischen Faktoren und Cofaktoren sowie Transkriptionsfaktoren reguliert. Somit kann die Lysinmodifikation unterschiedliche Wirkungen auf die Transkription ausüben, abhängig von Interaktionspartnern und davon, welcher Rest verändert wird. Kommt es zum Beispiel zu einer Interaktion mit dem „corepressor CoRest“ und Lysin 4 wird demethyliert, so resultiert eine Transkriptionsrepression ⁵³. Wird stattdessen mit einem Androgenrezeptor als nukleären Rezeptor interagiert und Lysin 9 modifiziert, wird die Transkription des Chromatins aktiviert ⁵⁴.

Die Expression von LSD1 ist von verschiedenen Autoren beschrieben in einem weiten Spektrum von Karzinomen, unter anderem dem Colon-, Prostata-, Ovarialkarzinom und dem Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle stark erhöht ⁵⁵⁻⁵⁸. Es konnte gezeigt werden, dass LSD1 ebenfalls in Lungenadenokarzinomen vermehrt exprimiert wird und die erhöhte Expression ein Hinweis auf ein progredientes Stadium und eine Metastasierung ist ^{1,59,60}.

In den vergangenen Jahren ist die LSD1-Inhibierung ein wichtiger Bestandteil der Krebsforschung geworden, da man sich durch die gezielte Inhibierung neue Therapiemöglichkeiten erhofft. So wird die Inhibierung von LSD1 inzwischen bei der Behandlung der Akuten Myeloischen Leukämie eingesetzt und weitere Inhibitoranwendungen auch für solide Tumore werden derzeit erforscht ⁶¹.

Sorna et al. identifizierten den reversiblen Inhibitor HCl-2509, welcher in der Nähe der Interaktionstasche der Histone bindet, die Interaktion mit dem „corepressor CoRest“ und somit die Enzymaktivität von LSD1 verhindert ⁶². So wird die Demethylierung der Histone am Lysin 4 und 9 unterbunden. Dieser Inhibitor soll in dieser Arbeit genauer untersucht werden. Neben Interaktionen mit Proteinen, die an der Chromatinumstrukturierung und der transkriptionellen Kontrolle beteiligt sind, haben Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Odenthal (Institut für Pathologie, Uniklinik Köln) gezeigt, dass LSD1 beziehungsweise die Inhibierung dessen zusätzlich auch einen Einfluss auf transaktivierende Faktoren des Spleißens haben (mündliche Mitteilung Prof. Dr. M. Odenthal, Institut für Pathologie, Uniklinik Köln) ⁶³.

LSD1-interagierende Spleißfaktoren sind in vielen Tumoren nachweislich hochreguliert ⁶⁴ und binden an ESEs, sogenannte Exon-Spleiß-Enhancer. Diese sind Erkennungssequenzen in Exons, welche die Spleißmaschinerie erkennen, binden und an denen sich das Spleißosom bildet ⁴⁷. Es konnte festgestellt werden, dass die Expression der Spleißmaschinerie selbst ein regelmäßiges Ziel des Alternativen Spleißens ist und während der Tumormutation hoch- und unter LSD1-Inhibierung runterreguliert wird ⁶³. Nach Behandlung mit HCl-2509 werden besonders bezüglich des Exonskippings im Rahmen des Spleißens große Veränderungen sichtbar. Viele Gene sind von diesen Veränderungen betroffen, zum Beispiel die Spleißregulatoren serin-/argininreicher Spleißfaktor 1 und serin-/argininreicher Spleißfaktor 3 ⁶³.

2.9.2 Die serin-/argininreichen Spleißfaktoren 1 und 3

Die serin-/argininreichen Spleißfaktoren 1 und 3 (SRSF1, SRSF3) gehören zu der SR Protein Familie, welche wichtige Rollen beim konstitutiven pre-mRNA- und alternativen Spleißen einnehmen, sowie beim RNA-Transport aus dem Nukleus, der Translation von mRNA und dem geregelten Zerfall von nonsense-RNA mitwirken ⁶⁵. Sie sind somit Schlüsselregulatoren der Genexpression. Verschiedenste Autoren stellten fest, dass SR Proteine in Tumorgewebe divergent reguliert werden und mit einer erhöhten Malignität assoziiert sind ⁶⁶⁻⁶⁹. Beispiele sind die Wirkungen am alternativen Spleißen von Tumorsuppressorgenen, wie BIN1 durch SRSF1, welche zur Entstehung funktionsloser Isoforme von BIN1 führt ⁶⁹ oder dem Spleißen von Protoonkogen RON, was die Epithelial-mesenchymale Transition begünstigt ⁷⁰.

Während SRSFs also selbst als Protoonkogene Auswirkungen auf andere Faktoren der Tumorbildung haben, unterliegen auch sie einer strengen Regulierung, um die normale Zellphysiologie möglichst zu erhalten. Für SR Proteine scheint grundsätzlich zu gelten, dass ihre Aktivität über eine Änderung der Lokalisation innerhalb der Zelle und des Phosphorylierungsstatus der Serinreste reguliert wird ⁷¹. Die phosphorylierenden Kinasen sind in NSCLC zum Beispiel vermeintlich ebenfalls hochreguliert. Gout et al. konnten außerdem feststellen, dass es keine Korrelation zwischen den SRSF1 mRNA- und Proteinleveln gibt. Aus diesem Grund scheint eine posttranskriptionelle Regulation für eine intranukleäre Akkumulation verantwortlich zu sein. Diese ist besonders in Tumorgewebe, zum Beispiel in NSCLC zu beobachten, im Sinne einer Reduktion des sonst stetigen Wechsels der Proteinlokalisierung zwischen Nukleus und Zytoplasma ⁷².

Als Teil dieser zusätzlichen posttranskriptionellen Regulation ist inzwischen bekannt, dass die Transkription von SR-Proteinen, wie SRSF1 und SRSF3 selbst Spleißmechanismen unterliegen ⁷³.

So wird die Transkription von SRSF3 durch den Faktor selbst reguliert, indem das Exon 4, das ein Stop-Codon beinhaltet, alternativ gespleißt wird. Im Tumorgewebe wird die Insertion von Exon 4 häufig verhindert und so die Expression von trunkierten, inaktiven SRSF3-Varianten vermindert ⁷⁴.

Bei der Transkription von SRSF1 soll es einen ähnlichen Mechanismus geben. Guo et al. beschreiben autoregulatorische Prozesse mithilfe alternativen Spleißens von Intron 3 und Exon 4, wobei insgesamt sechs Isoformen gebildet werden, welche jedoch nicht alle funktionstüchtig sind ⁷⁴. Es wird eine Runterregulation bewirkt durch die verminderte Produktion proteinkodierender Isoformen und die vermehrte Produktion von Isoformen, welche im Nukleus verbleiben oder abgebaut werden ⁷⁵. Eine Überexpression von SRSF1 führt zur Inklusion von Intron 3 und Teildeletion von Exon 4, wodurch die funktionelle Isoform für SRSF1 weniger oft gebildet wird ⁷⁴.

Die Expression der serin-/argininreichen Spleißfaktoren, ihrer Transkriptvarianten und der Einfluss einer LSD1-Inhibierung in LuAD-Geweben soll genauer untersucht werden.

2.10 Fragestellung und Ziel der Arbeit

LuAD machen die größte Gruppe der NSCLC aus und sind trotz neuer zielgerichteter Therapieformen meist mit einer schlechten Prognose verbunden. In LuAD findet

man eine erhöhte Expression von LSD1, die wiederum mit einer erhöhten Malignität verbunden ist. Basierend auf Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Odenthal an LuAD-repräsentativen humanen Zellkultursystemen, die darauf hinweisen, dass durch LSD1 die Expression der transaktivierenden Spleißfaktoren reguliert wird, soll das Expressionsprofil von SRSF1 und SRSF3 im Maus-LuAD-Modell unter dem Einfluss einer LSD1-Inhibierung untersucht werden.

Die Studie soll an archivierten Mausegewebeproben durchgeführt werden. Infolge einer induzierten, transgenen KRAS G12V oder EGFR L858R Treibermutation hatten Mäuse LuAD entwickelt, die entweder unbehandelt waren oder unter dem Einfluss einer pharmakologischen oder transgenen LSD1-Inhibierung standen. Zur Materialgewinnung soll zunächst die für die Genexpressionsanalyse notwendige Zahl und Größe der Lungenkarzinomknoten abgeschätzt werden. Nach Evaluierung des Arbeitsganges und der histologischen Kontrolle der Präparate soll eine Laser-Mikrodissektion zur Separation der LuAD-Tumorknoten aus den Schnittpräparaten durchgeführt und die RNA isoliert werden. Die Expression der transaktivierenden Spleißfaktoren SRSF1 und SRSF3 in LuAD auf dem Boden einer KRAS G12V oder EGFR L858R Treibermutation sowie unter dem Einfluss der LSD1-Inhibierung sollen letztendlich mithilfe der nCounter-Technologie der Firma NanoString untersucht werden. Diese soll zur Expressionsanalyse herangezogen werden, aufgrund der Formalinfixierung des Untersuchungsmaterials und der damit beeinträchtigten RNA-Qualität. Da in einem nCounter-PlexSet Ansatz bis zu 24 Gene untersucht werden können, sollen 24 Zielsequenzen der zu untersuchenden Gene durch einen Datenbankabgleich definiert werden. Die Zielsequenzen für die Faktoren SRSF1 und SRSF3 sollen die zum humanen konservierten Spleißformen der Maus darstellen.

3. Material und Methoden

Falls nicht anders vermerkt, wurden alle Chemikalien und Reagenzien von den Firmen Promega (Madison, Wisconsin, Vereinigte Staaten), Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten) oder Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten) genutzt. Vor Gebrauch wurde deionisiertes Wasser autoklaviert.

Reaktions- und Zentrifugationsgefäße wurden als Einwegplastikwaren von den Firmen Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland), Sarstedt AG & Co.KG (Nümbrecht, Deutschland) und Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf, Deutschland) bezogen. Glaswaren wurden bei 180 °C für fünf Stunden sterilisiert.

3.1 Verwendete Mausmodelle und Auswahl der Proben

Die in dieser Arbeit verwendeten Lungengewebeproben stammen aus transgenen Lungenadenokarzinom-Mausmodellen, die in der Arbeitsgruppe Odenthal im Rahmen der Promotionsarbeit von Dr. Iris Macheleidt (Arbeitsgruppe Odenthal, Institut für Pathologie, Uniklinik Köln) ¹ etabliert wurden. In den Mausmodellen wurden konditionell die für Lungenadenokarzinome typische EGFR L858R Mutation (3.1.1) oder die KRAS G12V Mutation (3.1.2) induziert und die Tumore dann mit einem LSD1 Inhibitor (3.1.1-3.1.2) pharmakologisch oder durch eine transgen induzierte RNA-Interferenz basierte LSD1-Inhibierung behandelt (3.1.3). In Abbildung 4 ist eine Übersicht des Probenkollektivs dargestellt.

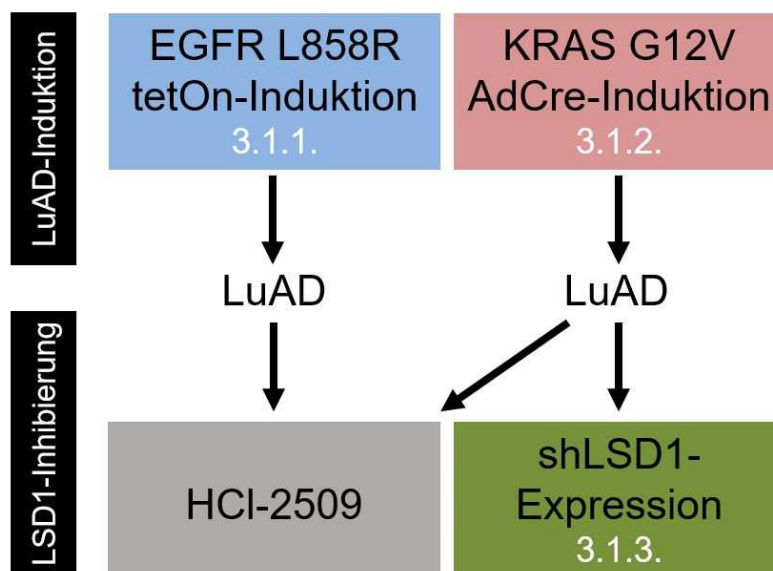


Abbildung 4: **Übersichtdarstellung des Probenkollektivs für die Versuche dieser Arbeit mit Verweis auf die dazugehörigen Kapitel.**

3.1.1 Lungenadenokarzinomproben der Maus mit einer EGFR L858R Mutation

Die für diese Versuche genutzten EGFR-Mäuse wurden aus rtTA- und tetOn EGFR L858R Mäusen gekreuzt.

Die rtTA-Mäuse, beziehungsweise C57BL/6N(TG(CCSP-rtTA)) -Mäuse wurden von Tichelaar et al. ⁷⁶ konstruiert und von dem Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, Vereinigte Staaten) bezogen. Dabei kontrolliert ein clarazelltypspezifischer Promotor (CCSP) die Expression des Tetracyclin-abhängigen Transaktivators. Dieser Transaktivator bindet an einen tetOn-Promotor des EGFR L858R Konstruktes, wenn Tetracyclin oder eines seiner Derivate, wie Doxycyclin anwesend ist. Durch dieses Prinzip wurde die clarazelltyp-spezifische Expression der EGFR Mutante für diesen Versuch ermöglicht ^{1,59,77}.

Die von I. Macheleidt zur Verfügung gestellten Proben stammten von heterozygoten C57BL/6N(TG(EGFR L858R) TG(CCSP-rtTA) (+-/+-)) -Mäusen, die im Alter von acht Wochen Doxycyclin (1g/kg Futter oder im Trinkwasser gelöst mit 2 g/l in 5%-iger Saccharoselösung; Ssniff Spezialdiäten GmbH Soest, Deutschland) verabreicht bekamen und so die konstitutiv aktive EGFR L858R Mutante exprimierten. Somit wurden Lungenadenokarzinome induziert.

Nach weiteren acht Wochen wurden die Mäuse in zwei Gruppen aufgeteilt. Die erste Gruppe bildete die Kontrollgruppe, welche für die darauffolgenden vier Wochen weiterhin Doxycyclin erhielt. Die zweite Gruppe hingegen bekam für diese vier Wochen neben Doxycyclin zusätzlich den LSD1 Inhibitor HCI-2509 in ihr Futter gemischt (180 mg/kg Futter; Ssniff Spezialdiäten GmbH Soest, Deutschland) ^{1,59}.

Nach diesen vier Wochen mit oder ohne LSD1-Inhibierung durch den Inhibitor HCI-2509 wurden alle Mäuse getötet. In Abbildung 5 ist der Versuchsaufbau dieses Modells grafisch dargestellt.

Die Diät der Kontrollgruppen bestand im gesamten Verlauf aus der Standarddiät der Firma Ssniff (Ssniff Spezialdiäten GmbH Soest, Deutschland) ¹.

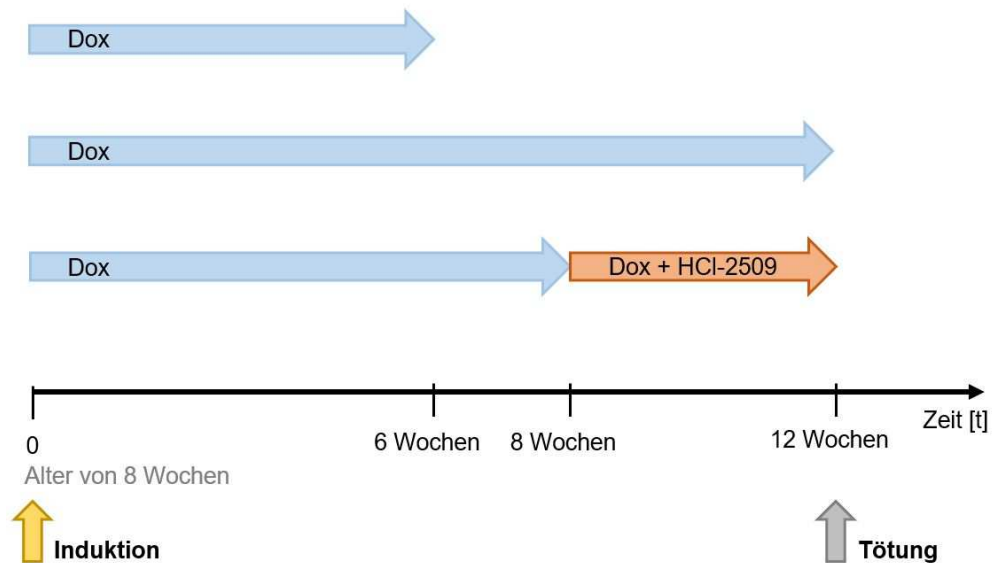


Abbildung 5: **Darstellung der EGFR L858R mutierten Mäuse mit unterschiedlichen Therapien im Zeitverlauf.**

Die x-Achse beschreibt den zeitlichen Verlauf in Wochen mit Markierungen wichtiger Ereignisse, wie der Induktion und der Tötung der Mäuse. Auf der y-Achse sind die unterschiedlichen Versuchsgruppen dargestellt. Unterschiedlich farbige Pfeile repräsentieren den Zeitverlauf der Behandlung der Mäuse: Orangefarbene Pfeile stehen für die Behandlung mit dem LSD1-Inhibitor HCl-2509 über das Futter und einer zusätzlichen Doxycyclingabe (Dox). Blaue Pfeile verbildlichen eine Standarddiät ohne HCl-2509-, nur mit Doxycyclingabe (Dox).

3.1.2 Lungenadenokarzinomproben der Maus mit einer KRAS G12V Mutation

Die konditionell KRAS G12V mutierten Mäuse für diesen Versuchsteil wurden von König et al. konstruiert ⁷⁸. Es handelte sich um C57BL/6N(TG(KRAS-mut2))-Mäuse mit einer G12V Mutation hinter einem β -Aktin Promotor. Die Transkription des Gens wird im inaktiven Zustand durch ein Stop-Codon an der KRAS-Kassette blockiert. Durch Induktion mit der Cre-Rekombinase per Inhalation eines Cre-exprimierenden Adenovirus (AdCre; Hölzel Diagnostika Handels GmbH, Köln, Deutschland), wird das Stop-Codon entfernt und die Mutation exprimiert (Abbildung 6).



Abbildung 6: **Vereinfachte Darstellung der Induktion der KRAS G12V Mutation durch Entfernung des Stop-Codons durch Inhalation eines Cre-exprimierenden Adenovirus (AdCre).**

Die schwarzen schmalen waagerechten Linien stehen für Introns, die schwarzen dicken waagerechte Blöcke für Exons. Die gelbe Linie markiert den β -Aktin-Promotor und die rote Linie die KRAS Mutationskassette. Grafik abgewandelt nach König et al. ⁷⁸.

Das Gewebe von KRAS G12V mutierten Mäusen (+/-) beiderlei Geschlechts, welche im Alter von acht bis zwölf Wochen mit AdCre induziert und im Anschluss in drei unterschiedlich behandelte Gruppen aufgeteilt wurden, wurde im Rahmen ihrer Doktorarbeit von I. Macheleidt generiert und mir freundlicherweise für die vorliegenden Studien zur Verfügung gestellt. In einer Kontrollgruppe (Ctrl) erhielten die Mäuse zu keinem Zeitpunkt den Inhibitor HCI-2509. Andere Mäuse erhielten für die ersten vier Wochen nach der Induktion Kontrollfutter und in den darauffolgenden zwei Wochen den LSD1-Inhibitor HCI-2509 im Futter (180mg/kg Futter) (Abbildung 7). Dadurch sollte der Einfluss von LSD1 während der Tumorprogression ermittelt werden. Eine dritte und letzte Gruppe bekam für die gesamten sechs Wochen ab 24 Stunden nach der Induktion HCI-2509-Futter, um den Einfluss von LSD1 während der Tumorformation zu ermitteln. Wie in Abbildung 7 dargestellt, wurden nach sechs Wochen mit und ohne pharmazeutische LSD1-Inhibierung alle Mäuse aus der Versuchsreihe durch einen Genickbruch getötet ^{1,59}.

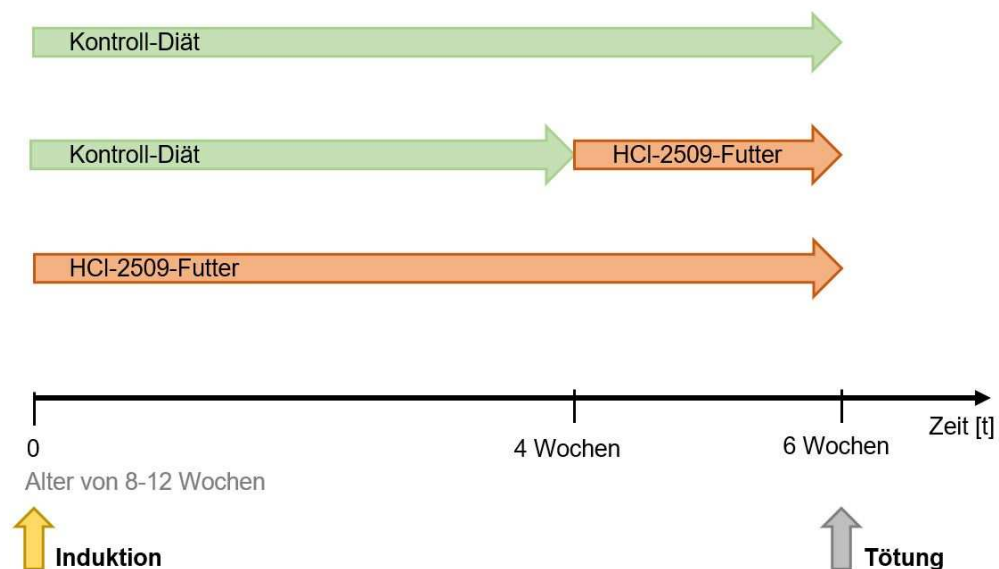


Abbildung 7: **Darstellung der KRAS-mutierten Mäuse mit unterschiedlichen Therapieansätzen im Zeitverlauf.**

Die x-Achse beschreibt den zeitlichen Verlauf in Wochen mit Markierungen wichtiger Ereignisse, wie der Induktion und der Tötung der Mäuse. Auf der y-Achse sind die unterschiedlichen Versuchsgruppen dargestellt. Unterschiedlich farbige Pfeile stellen den Behandlungsverlauf dar. Orangefarbene Pfeile stehen für die Behandlung mit dem LSD1-Inhibitor HCI-2509 über das Futter, grüne Pfeile für eine Standarddiät ohne HCI-2509-Gabe.

3.1.3 Lungenadenokarzinomproben der Maus mit shLSD1-Expression

Um eine genetische Inhibierung von LSD1 zu testen, wurden die oben erläuterten KRAS-Mäuse (3.1.2) mit Doxycyclin induzierbaren shLSD1-Mäusen (C57BL/6N(TG(shLSD1))) gekreuzt. Die entstandenen Mäuse waren alle heterozygot für die KRAS Mutation, sowie für die shLSD1 Expressionskassette. Die C57BL/6N(TG(shLSD1))-Mäuse wurden von Professor Dr. Johannes Schulte (Universitätsklinik Essen, jetzt Charité. Universität Berlin, Berlin, D) und von Sprüssel et al. konstruiert⁷⁹ und der Arbeitsgruppe Odenthal zur Verfügung gestellt.

Reguliert wurde die Expression der shLSD1-RNA in den C57BL/6N(TG(shLSD1))-Mäusen und in den C57BL/6N(TG(shLSD1)) x C57BL/6N(TG(KRASmut)) gekreuzten Mäusen durch ein tet-On-System. Die Expression von shLSD1 hängt von dem Vorhandensein von Tetracyclin oder einem seiner Derivate wie Doxycyclin ab indem über einen tetracyclin-aktivierenden Promotor und Tetracyclin-Regulator das Transgen reguliert wird. Als Kontrollgruppe wurden Wildtyp-Mäuse (shLSD1 (-/-)) mit Doxycyclin behandelt (Ctrl+Dox).

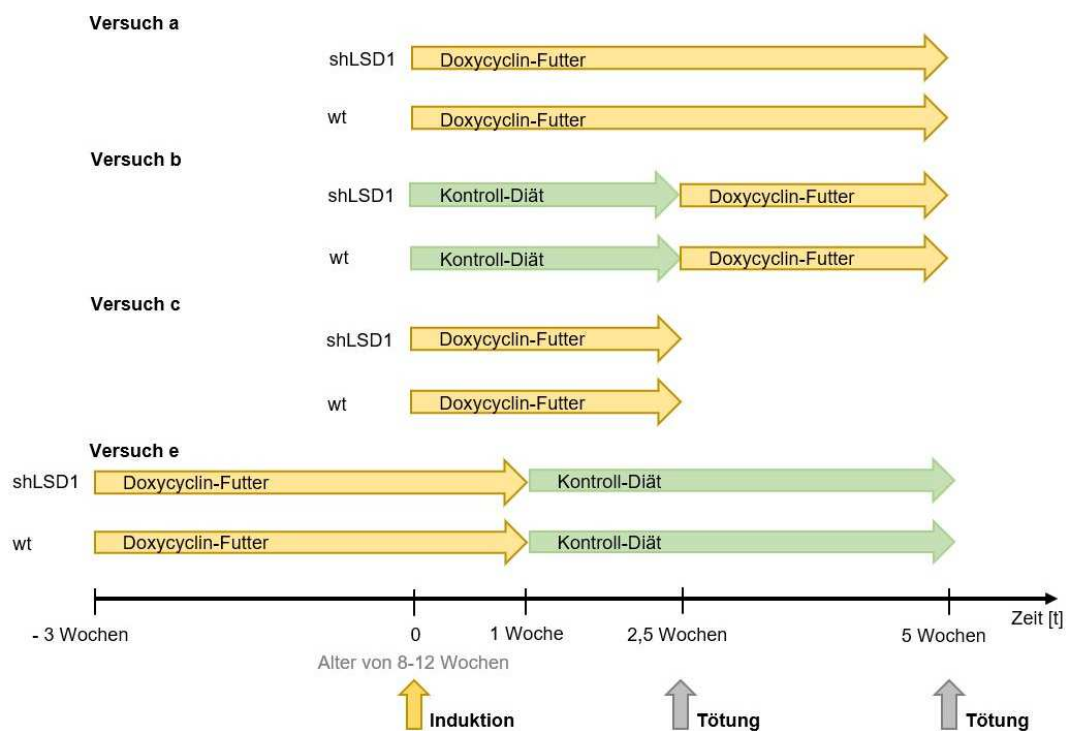


Abbildung 8: Darstellung der Versuchsschemata der unterschiedlichen Versuchsgruppen der Lungenadenokarzinomproben mit shLSD1-Expression unter genetischer LSD1-Inhibierung im Zeitverlauf.

Die x-Achse beschreibt den zeitlichen Verlauf in Wochen mit Markierungen wichtiger Ereignisse, wie der Induktion und der Tötung der Mäuse. Auf der y-Achse sind die unterschiedlichen Versuchsaufbauten dargestellt, jeweils unterschieden in transgen inhibierte Mäuse (shLSD1) und Wildtypmäuse (wt). Unterschiedlich farbige Pfeile stellen den Behandlungsverlauf der Mäuse dar. Gelbe Pfeile stehen für eine Gabe von Doxycyclin im Futter, grüne Pfeile für eine Standarddiät ohne Doxycyclin.

Alle Mäuse waren bei der adenoviralen Cre vermittelten KRAS Mutationsinduktion acht bis zwölf Wochen alt. Sie wurden im Anschluss an die Induktion in mehrere Versuchsgruppen unterteilt und in unterschiedlichen Zeitintervallen mit Doxycyclin behandelt^{1,59}. Die Versuchsschemata a, b, c und e sind in Abbildung 8 zusammengefasst. Versuchsschemata d wurde in dieser Arbeit aufgrund mangelnder Relevanz nicht eingeschlossen, da es sich hier um shLSD1-induzierte Mäuse handelte, die aber kein KRAS-Transgen trugen und keine LuAD entwickelten.

3.1.4 Auswahl der Proben

Um die Tumorgewebeproben nicht nur untereinander, sondern auch mit physiologischem Gewebe vergleichen zu können, wurden zusätzlich Mauslungenproben ohne Tumore ausgewählt.

Die Paraffinblöcke mit den Lungenhälften wurden für die folgenden Experimente freundlicherweise von I. Macheleidt zur Verfügung gestellt.

Es war nicht von allen Mäusen dieser Modelle ausreichend Gewebematerial vorhanden, sodass nur ein Anteil in die Versuche eingeschlossen werden konnte (siehe auch 4.1.2). Die final genutzten Proben-IDs sind in Tabelle A 1 im Anhang aufgeführt.

3.2 Mikroskopische Kontrolle der LuAD-Knotenanzahl und -größe

Zur Abschätzung der Materialeinsatzmenge für die Laser-Mikrodissektion und RNA-Extraktion wurden histologisch die LuAD-Knotenanzahl und -größe am Mikroskop AH-2 von Olympus (Shinjuku, Präfektur Tokio, Japan) ermittelt.

Mit dem Programm Cell[^]P Imaging System von Olympus (Shinjuku, Präfektur Tokio, Japan) wurden bei den KRAS-mutierten Mäuselungen die Knoten, zu welchen sich die Tumore formierten, gezählt, deren Fläche bemessen, fotografiert und in Tabellen dokumentiert (Tabelle 2 in Kapitel 4.1.2). Mit Proben, von denen genügend Material zur Verfügung stand (Proben-IDs 91, 75, 34, 35), wurden anschließend Vortests durchgeführt, um zu ermitteln, wie die RNA Ausbeute von unterschiedlich großen Tumorarealen ist.

3.3 Vorbereitung, inkl. Färbung der Proben

Aufgrund der Unterschiede in der Tumorbildung (vergleiche Kapitel 4.1.2) wurden im Folgenden jeweils unterschiedliche Vorgehensweisen für KRAS- und EGFR-mutierte Proben und Normalgewebe bevorzugt.

Für die Schnitte des physiologischen und des EGFR-mutierten Gewebes mit nicht knotenformendem sondern diffusem Tumorwachstum wurden Glasobjektträger (Engelbrecht GmbH, Edermünde, Deutschland) genutzt. Es wurde keine histologische Färbung durchgeführt. Bei diesen Proben erfolgte eine Makrodissektion des gesamten Gewebes (siehe unten). Die Paraffinblöcke wurden freundlicherweise vom technischen Personal der Routinediagnostik des Johanniter-Krankenhauses in Bonn geschnitten.

Die Schnitte der KRAS-mutierten Proben mit Tumorknoten, welche mittels Laser-Mikrodissektion bearbeitet werden sollten, wurden freundlicher Weise durch die Mitarbeiterin Marion Müller (Institut für Pathologie, Uniklinik Köln) angefertigt. Hierzu wurden die Paraffinblöcke zunächst 30 Minuten auf einer Eisplatte („Tissue Cool Plate COP“, Leica, Wetzlar, Deutschland) bei -10 °C gekühlt und daraufhin 10 µm dick auf spezielle Membranobjektträger der Firma Zeiss (Oberkochen, Deutschland) mit einem Microm HM 355S von Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten) geschnitten. Um die Schnitte zu glätten und so eine plane Auflage der Schnitte auf der Membran zu gewährleisten, wurden diese daraufhin in einem 55 °C warmen Wasserbad („Paraffinstreckbad 1052“, GFL, Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland) gestreckt und in einem 30 °C warmen Brutschrank (Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland) über Nacht getrocknet. Es wurden immer nur so viele Proben geschnitten und vorbereitet, wie am nächsten Tag bearbeitet werden konnten. So konnte eine optimale Anlagerung an die Membran der Objektträger gewährleistet werden, was im Anschluss zu besseren Ergebnissen führen sollte.

Am Tage der Bearbeitung wurden die getrockneten Schnitte aus dem Brutschrank entnommen und für 30 Minuten in einen weiteren Brutschrank mit einer Temperatur von 60 °C gestellt. Unter dieser Temperatur konnten große Anteile des Paraffins schmelzen und ablaufen. Zur weiteren Entparaffinierung wurden die Schnitte im direkten Anschluss an die Wärmebehandlung für sechs Minuten in Xylol getaucht und zur Überführung in ein wässriges Milieu einer absteigenden Alkoholreihe unterzogen:

- 60 Sekunden Isopropanol
- 60 Sekunden 96% Ethanol
- 60 Sekunden 75% Ethanol
- 30 Sekunden DEPC behandeltes Leitungswasser.

Im Anschluss wurden die Schnitte für 60 Sekunden in RNase-freies Hämalaun getaucht, wodurch die basophilen Bestandteile der Zellen im Gewebe blau angefärbt wurden. Für zwei Minuten wurden die Schnitte in DEPC-H₂O gestellt, zum Dehydrieren einer aufsteigenden Alkoholreihe unterzogen und schließlich an der Luft getrocknet. Wenn die Schnitte sich besonders trocken zeigten und nicht plan auf der Membran der Objektträger

auflagen, wurden sie mit einem Fixierungsspray („Liquid-Cover Glass“, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) besprüht, um eine sichere Haftung zu gewährleisten.

3.4 Laser-Mikrodissektion

Die Laser-Mikrodissektion bietet den großen Vorteil, dass man auch bei kleinen Geweben, wie der Lunge einer Maus kleine Strukturen, wie Lungentumorknoten vom Restgewebe trennen und so gezielt nur die Tumormasse und die entsprechende RNA für weitere Versuche isolieren kann. Das Laser-Mikrodissektion-Mikroskop Observer.Z1 der Firma Zeiss (Oberkochen, Deutschland) steht im Institut für Pathologie in der Uniklinik Köln. Genutzt wurden spezielle Reaktionsgefäße von der Firma Zeiss mit Silikon in den Deckeln („Adhesive Caps opaque – 500 µl“, Zeiss), welches die Haftung des katapultierten Gewebes gewährleistete. Außerdem konnte die Membran auf den speziellen Zeiss-Membranobjektträgern („MembraneSlide 1.0 PEN“, Zeiss) mitgeschnitten werden und das durch den Laser geschnittene Gewebe beim Katapultieren zusammenhalten.

Folgende Einstellungen bewährten sich bei der Dissektion:

- | | | | |
|-----------------|----|-----------------|----|
| - Cut Energy: | 46 | - Focus Energy: | 89 |
| - Energy Delta: | 12 | - Focus Delta: | 2 |

Vor der Bearbeitung jeder neuen Probe wurde die Arbeitsfläche und der Objektträger des Mikroskops mit RNaseZap (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten) gereinigt. Sobald der Objektträger eingelegt und das Reaktionsgefäß in der Halterung fixiert worden war, wurden die Tumorknoten mit dem Objektiv mit einer 10- oder 20-fachen Vergrößerung aufgesucht. Die Tumorknoten wurden dabei mit dem PALM RoboSoftware-Programm (Zeiss) per Hand markiert und mithilfe der oben genannten Einstellungen vom Laser mit dem Energiefokus auf Schnittebene geschnitten. Die Größe der markierten Flächen wurden von dem Programm ermittelt. So konnte kontrolliert werden, ob die benötigte Mindestfläche von etwa 4-6 mm² erreicht worden war. Im Anschluss katapultierte das Gerät mithilfe der Energie des Lasers mit dem Fokus knapp unterhalb des Schnittes die Gewebestücke in die Deckel der Reaktionsgefäße. Im Anschluss an die Laser-Mikrodissektion wurde eine Proteinase-K-Behandlung durchgeführt (siehe unten).

3.5 Makrodissektion

Die Schnitte des Gewebes ohne Tumore und mit Tumoren mit der EGFR-Mutation wurden vor der Makrodissektion nicht entparaffiniert oder histologisch gefärbt, da hier der gesamte Gewebsschnitt für die RNA-Extraktion genutzt wurde. Das Gewebeareal wurde mit einem Skalpell (Feather, Osaka, Japan) vom Objektträger geschabt. Dabei wurde

darauf geachtet, möglichst viel von dem gewebefreien Paraffinanteil auszulassen. Die so gesammelten Gewebeproben wurden jeweils in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und für fünf Minuten in einem Thermoblock („Thermomixer compact“, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) bei 65 °C erhitzt und entparaffiniert. Dazu wurden jeweils 500 µl Xylol hinzugegeben, die Reaktionsgefäße zunächst manuell stark geschüttelt, für fünf Minuten in einen Schüttler („Vortexgenie 2“, Scientific Industries, Inc., Bohemia, New York, Vereinigte Staaten) mit einer Temperatur von 65 °C gestellt und schließlich für zwei Minuten bei 13.000 upm zentrifugiert (Biofuge Pico Mikroliterzentrifuge, Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland). Dieser Ablauf wurde dreimal durchgeführt und der Überstand jeweils abpipettiert.

Im Anschluss daran wurden jeweils 500 µl 100%iges Ethanol hinzugefügt, die Reaktionsgefäße erneut geschüttelt und zwei Minuten bei 13.000 upm zentrifugiert. Auch diese Schritte wurden jeweils dreimal vollzogen und die Überstände abgenommen. Nachfolgend wurden die Proben für eine Stunde in einem Brutschrank bei einer Temperatur von 37 °C getrocknet, bevor die Proteinase-K-Behandlung durchgeführt wurde (siehe unten).

3.6 Lyse des gewonnenen Materials

Für die Proteinase-K-Behandlung zur Lyse des Gewebematerials wurden jedem Reaktionsgefäß 200 µl Proteinase-K-Lösung (TRIS 20 mM pH 7,8, EDTA 5 mM, 500 µg Proteinase K/ml) hinzugegeben. Die Proben wurden geschüttelt, kurz anzentrifugiert und über Nacht bei 60 °C zur Gewebelyse in einen Schüttler gestellt. Am nächsten Tag wurden die Proben jeweils in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, wiederum anzentrifugiert und bei 95 °C für fünf Minuten erhitzt, um das Enzym zu denaturieren und somit zu stoppen. Bis alle Proben vollständig gesammelt waren, wurden die Reaktionsgefäße zu diesem Zeitpunkt bei -80 °C („Ultra low temperature freezer, MDF-U7-4V“, VIP Series, Sanyo, Moriguchi, Präfektur Osaka, Japan) eingefroren.

3.7 RNA-Isolierung

Nachdem alle Proben per Laser-Mikro- und Makrodissektion vorbereitet und gesammelt worden waren, folgte die RNA-Aufreinigung. Alle Zentrifugationsschritte wurden in einer Eppendorf-Zentrifuge 5424 R mit Kühlung durchgeführt.

Zunächst wurde zu den durch Makrodissektion oder durch Laser-Mikrodissektion gesammelten Gewebeproben 200 µl fertige Phenol-Chloroform-Isoamylalkohollösung und 20 µl 3M Na-acetatlösung (pH 5,2) hinzugefügt, diese Mischung vorsichtig geschüttelt und für 20 Minuten bei 13.000 upm zentrifugiert.

Daraufhin zeigten sich drei Phasen. Es wurde jeweils die obere wässrige Phase, in der die RNA vorhanden war, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 200 µl eiskaltem Isopropanol und 10 µg blau gefärbtem, RNase-freiem Glykogen als Präzipitationshilfe versetzt. Diese Mischung wurde dann bei -20 °C über Nacht gekühlt. Am darauffolgenden Tag wurden die Proben für 20 Minuten bei 13.000 upm zentrifugiert, woraufhin sich ein blaues Pellet aus Glykogen und RNA am Boden des Reaktionsgefäßes bildete. Der wässrige Überstand wurde abgenommen. Das Pellet verblieb im Reaktionsgefäß und wurde anschließend dreimal mit je 500 µl eiskaltem 70% Ethanol gewaschen. Dazu wurden die Reaktionsgefäße geschüttelt und für fünf Minuten bei 13.000 upm bei 4 °C zentrifugiert. Zwischen den Durchgängen wurden immer wieder die Überstände abgenommen.

Nach dem dritten Durchgang wurden die Reaktionsgefäße schließlich mit geöffnetem Deckel bei 37 °C getrocknet, so dass alleinig die Pellets zurückblieben. Diese wurden dann in 30 µl nukleasefreiem Wasser gelöst und 1 µl RNase-Inhibitor wurde pro Probe hinzugegeben.

Zur DNase Behandlung wurden außerdem jeweils 3 µl DNase (10U/µl) und 1 µl Magnesiumchlorid hinzugegeben, die Reaktionsgefäße geschüttelt, kurz anzentrifugiert und bei dem Temperaturoptimum des Enzyms von 37 °C erwärmt. Nach 30 Minuten wurde die DNase wiederum bei 95 °C für drei Minuten gestoppt. Schließlich ist jeder Probe noch 1 µl RNase-Inhibitor hinzugegeben worden, um den unerwünschten Abbau der RNA vorzubeugen.

3.8 Konzentrationsbestimmung

Mithilfe des QuantiFluor RNA Systems der Firma Promega (Madison, Wisconsin, Vereinigte Staaten) wurden die Konzentrationen der gewonnenen RNA bestimmt (vergleiche Tabelle A 2 im Anhang). Dazu wurde das Protokoll des Herstellers aus dem Jahre 2017 befolgt. Zunächst wurde TE-Puffer (20mM TRIS, 1mM EDTA, pH 8.0) vorbereitet, indem 1 ml TE zu 19 ml nukleasefreiem Wasser hinzugegeben wurde. Zum Erlangen der Arbeitslösung wurde dann die QuantiFluor-RNA-Farbe im Verhältnis von 1 zu 400 mit einfachem TE-Puffer gemischt. Es wurde vermieden die Proben Licht auszusetzen, da der Fluoreszenzfarbstoff lichtempfindlich ist. Entsprechend der Anzahl der Proben wurden Reaktionsgefäße speziell für die Messung am QuantiFluor-Fluorometer (Promega, Madison, Wisconsin, Vereinigte Staaten) vorbereitet und jeweils mit 200 µl der Fluoreszenzfarbstofflösung (QuantiFluor-Kit, Promega) und 1 µl der jeweiligen Probe versetzt. Als Vergleich dienten 200 µl Arbeitslösung ohne RNA-Probe (0-Wert) und eine Standardlösung gemäß den Angaben des Herstellers (Promega). Die Proben wurden daraufhin

geschüttelt und an dem Gerät QuantiFluor ST gemessen. Im Rahmen eines Vorversuchs führte Hannah Eischeid-Scholz (Institut für Pathologie, Uniklinik Köln) freundlicherweise eine Polymerase Kettenreaktion nach institutsinternen Standards zur Quantifizierung⁸⁰ durch.

3.9 NanoString - nCounter Analyse

Die nCounter PlexSet Technologie der Firma NanoString (Seattle, Washington, Vereinigte Staaten) ermöglicht die Analyse von Expressionsspiegeln von bis zu 24 Genen in bis zu 96 Proben in nur einem einzigen Versuchsdurchlauf. Dazu werden spezielle, per fluoreszierenden Barcodes markierte Sondenpaare genutzt, welche genspezifisch an die RNA der Proben binden. Werden Proben und Sonden in einer 96-Platte vermengt und hybridisieren, so werden daraufhin die zwölf Säulen der Platte in zwölf Reaktionsgefäße gesammelt und mittels eines NanoString-Roboters weiterverarbeitet. Die gewonnenen Daten können im Anschluss durch fluoreszierende Barcodes und mithilfe des nSolver-Systems von NanoString wieder zugeordnet und in verschiedenen Grafiken dargestellt werden.

3.9.1 Auswahl der Sondensequenzen

Für die Durchführung der NanoString nCounter wurde zunächst eine Liste an Genen zusammengestellt, deren Expression gemäß Ergebnissen der Arbeitsgruppe Odenthal durch die LSD1-Inhibierung im Lungengewebe mit beziehungsweise ohne Tumor beeinflusst werden könnte (Tabelle 1).

Tabelle 1: Zur Expressionsanalyse mit NanoString nCounter ausgewählte Gene.

Aldolase A	Enzym in der Glykolyse; Instandhaltung des Zytoskeletts
Fumarase	Enzym im Citratzyklus; inhibierende Effekte in der Histon- und DNA-Demethylierung; Einfluss auf Genexpression
hbs1-like	„housekeeping“-Gen
hnRNP A1 hnRNP A2/B1	RNA-bindende Proteine; beeinflussen pre-mRNA-Reifungsprozess und weitere Aspekte des mRNA-Stoffwechsels; Transkriptionsregulation u.a.
lin 28 A, B	RNA-bindendes Protein; RNA-Reifungsprozess und MikroRNA-Homöostase
mLSD1	Epigenetischer Faktor, Histondemethylase der Maus
MYC	Onkogen; Transkriptionsfaktor, der besonders den Zellzyklus erhöht
NDUFS 6-8	Mitochondriales kernkodiertes Protein; Komplex I der Atmungskette
PINK 1	Mitochondriales kernkodiertes Protein; Sensor für Mitophagie

SRSF1 SRSF3	Nukleäre RNA-bindende Proteine; Spleißfaktoren; Regulatoren des generellen und alternativen Spleißens
TERT	Subkomplex des Telomeraseenzyms; Unterdrückung des Alterungsprozesses von Zellen
HPRT	Enzym im Purinstoffwechsel, „housekeeping“-Gen

Die Sequenzen der Gene wurden jeweils in Datenbanken recherchiert. Diese wurden dann mithilfe der Nukleotid-Blastfunktion des National Center for Biotechnology Information (Bethesda, Maryland, Vereinigte Staaten; im Folgenden als „NCBI“ bezeichnet) hinsichtlich Übereinstimmungen mit dem Mausgenom getestet. Wenn dort zusätzlich zu dem gewünschten Gen noch weitere Übereinstimmungen an anderer Stelle des Genoms ermittelt wurden, so wurde die Sequenz um eben diese unspezifische Basenabfolge gekürzt, um zu verhindern, dass die entsprechenden Sonden auch dieses andere Gen markieren und somit die Auswertung verzerrt werden. Nach einer genauen Untersuchung möglicher Transkriptvarianten wurden solche, welche nicht kodierender mRNA entsprachen, ausgeschlossen. Alle anderen Transkriptvarianten hingegen wurden eingeschlossen, um die vollständige Expression zu ermitteln (Abbildung 9).

Zusätzlich zu der Recherche der NCBI Datenbank über den BLAST Modus wurde hier das „Alignment“-Test-Programm CLC Sequence Viewer 6 von Qiagen (Hilden, Deutschland) zu Hilfe genommen.

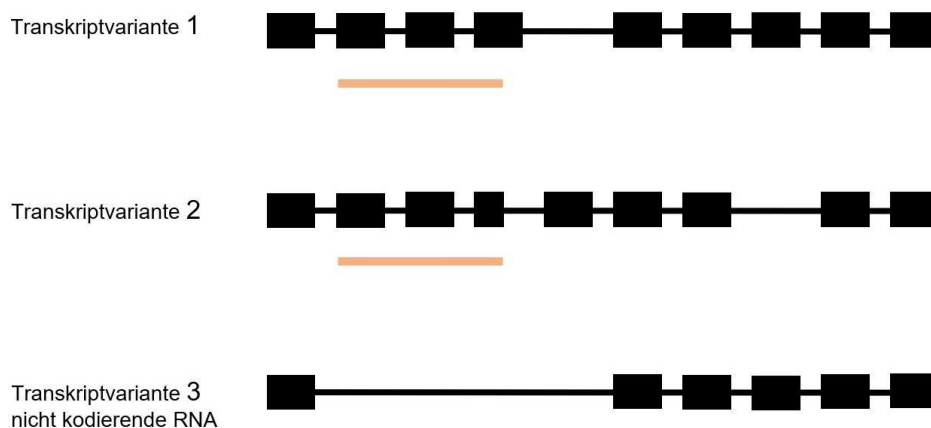


Abbildung 9: **Darstellung eines fiktiven Gens mit drei Transkriptvarianten.**

Die schwarzen, schmalen, waagerechten Linien stehen für Introns, die schwarzen, dicken, waagerechte Blöcke für Exons. Transkriptvariante 3 ist nicht kodierende RNA und soll in der NanoString Analyse nicht miteingeschlossen werden. Es wird eine Sequenz des Gens zur Sondensynthese ausgesucht, die bei Transkriptvarianten 1 und 2 identisch ist (siehe Markierung), aber nicht in der nicht-kodierenden RNA vorkommt.

Für Gene, bei denen alternative Spleißvarianten bekannt waren, wurden Sequenzen herausgesucht, bei denen genau diese Varianten enthalten waren. Außerdem wurden Sequenzen ausgewählt, welche beim Splicing nicht beeinflusst werden und somit als Kontrolle für die gesamte Expression gelten konnten (Abbildung 10).

Informationen über die herkömmliche Genbezeichnung, die Definition, die Accession-Number, die Sequenz selbst und bei mehrfachen Übereinstimmungen eine genauere Auswahl der Sequenz zum Erstellen der Sondenpaare wurden in einer Tabelle gesammelt (vergleiche Tabelle A 3 im Anhang).

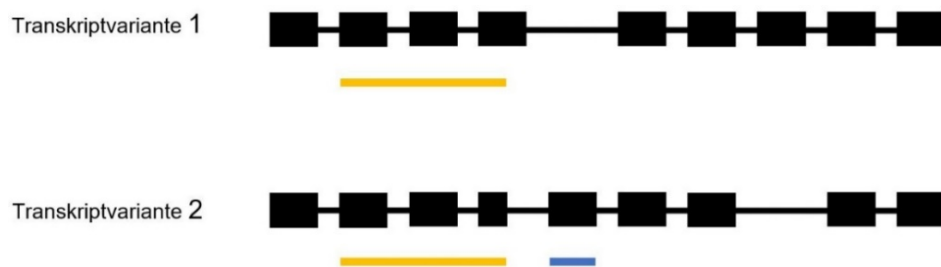


Abbildung 10: **Organisation eines fiktiven Gens und Exonverteilung zweier Transkriptpleißvarianten.**

Die schwarzen, schmalen, waagerechten Linien stehen für Introns, die schwarzen, dicken, waagerechte Blöcke für Exons. Für den hier angestrebten Expressionsnachweis wurde zur Sondensynthese zum einen eine Transkriptzielsequenz ausgesucht, die bei Transkriptvarianten 1 und 2 identisch ist, und zum andern eine Sequenz, welche nur bei Transkriptvariante 2 zu finden ist. Somit können bei der NanoString Analyse beide Expressionsspiegel bestimmt werden.

3.9.2 Design und Synthese der Sonden

Sequenzen für geeignete Sonden wurden für die oben beschriebenen Transkripte (vergleiche Tabelle 1 und Tabelle A 3 im Anhang) im Rahmen der Reagenzienbestellung zum Expressionsnachweis durch die Firma NanoString ermittelt. Die chemische Synthese wurde nach den Zielsequenzangaben der Firma NanoString von der Firma Integrated DNA Technologies, Inc. (Coralville, Iowa, Vereinigte Staaten) durchgeführt.

Für jede ausgewählte Sequenz wurden zwei Sonden – Sonde A und Sonde B – entworfen und synthetisiert.

An Sonde A, welche sich dem 5'-Ende der Zielsequenz anlagern soll, bindet an ein Ende ein sogenannter Reporteranhänger. An diesem Anhänger befinden sich sechs individuell gefärbte fluoreszierende Marker, die in ihrer Kombination eine spätere individuelle Unterscheidung der erkannten Zielsequenzen ermöglichen. Sonde B, welche an den 3'-Bereich der erkannten Zielsequenz hybridisiert, bindet zudem ein biotinkonjugiertes Anhängeroligonukleotid. Nach Hybridisierung

und Bindung des Biotinoligonukleotids wird die Zielsequenz so an einer Streptavidin-Matrix immobilisiert (Abbildung 11), vergleiche Protokoll des Herstellers NanoString ⁸¹).

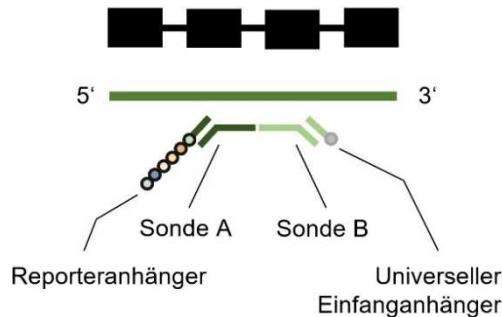


Abbildung 11: **Darstellung der Detektion und Immobilisierung von Zieltranskripten zur NanoString-Quantifizierung.**

Der ausgewählte Bereich eines Zieltranskripts (grün), das von den Exons eines fiktiven Gens (dicke, schwarze Blöcke) kodiert wurde, hybridisiert in dem NanoString Assay mit Sonde A am 5'- und mit Sonde B am 3'-Ende. Die 5'-zielsequenzspezifischen Sondenüberhänge der Sonde A werden von ebenfalls zielsequenzspezifischen Fluoreszenzreporter-konjugierten Sonden erkannt, während die 3'-Überhänge der Sonde B von biotinkonjugierten Sekundärsonden zur Immobilisierung an eine Streptavidin-Matrix interagieren (vergleiche Protokoll des Herstellers NanoString ⁸¹). Die schwarzen schmalen waagerechten Linien stehen für Introns.

3.9.3 Vorbereitung der Proben

Die Firma NanoString gab für den geplanten PlexSet-Versuch eine benötigte RNA Menge von mindestens 150 ng in 7 μ l vor, also 21,5 ng RNA pro μ l. Die Konzentration der Proben mussten entsprechend vor der Durchführung des Versuchs angepasst werden. Dazu sollte zunächst mit etwas Puffer ein Zielwert von 450 ng in 14 μ l, beziehungsweise 32,1 ng RNA pro μ l erreicht werden. Anhand der vorhergehenden Quantifizierung der Proben wurden diese in zwei Gruppen eingeteilt, je nachdem, ob mehr oder weniger als 14 μ l des vorhandenen Volumens benötigt werden würde, um die gewünschte Konzentration zu erlangen.

Die Proben, bei denen mehr Volumen von Nöten war, wurden komplett eingengt und mit 14 μ l nukleasefreiem Wasser aufgefüllt. Den Proben mit einem benötigten Volumen kleiner als 14 μ l wurde das errechnete Volumen entnommen und gegebenenfalls mit nukleasefreiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 14 μ l aufgefüllt.

Drei Proben wurden gesondert ausgewählt, da diese zusätzlich in einem Titrationslauf als Testproben genutzt werden sollten (Kapitel 3.9.4). Die Proben sollten möglichst aus unterschiedlichen Versuchsgruppen stammen und es sollte viel RNA vorhanden sein, um verschiedene Titrationspunkte zu gewähren und zu testen (50 μ l/ 125 μ l/ 250 μ l in jeweils 7 μ l Wasser).

Im Anschluss an die Konzentrationsanpassung wurden die Proben mit der bereits erläuterten QuantiFluor-Methode und einer Verdünnungsreihe erneut quantifiziert.

Mithilfe dieser neu ermittelten Konzentrationen wurden dann die ursprünglich ermittelten Konzentrationen korrigiert und die RNA-Menge ermittelt, die nun insgesamt in jeder Probe vorhanden war. Für den Versuch sollte so viel RNA eingesetzt werden, wie maximal möglich und gleichzeitig sollten alle Proben eine konstante Menge an RNA beinhalten.

3.9.4 Titrationsläufe

Die Durchführung sogenannter Titrationsläufe wird von dem Hersteller NanoString empfohlen, um die optimale RNA-Einsatzmenge zu ermitteln, eine Signalsättigung zu verhindern und überraschende Signale abzuschwächen (vergleiche Protokoll des Herstellers NanoString ⁸¹). Hierzu wurden zunächst unterschiedliche RNA-Einsatzmengen gegeneinander getestet. Es wurden drei Proben aus verschiedenen Versuchsgruppen, von denen genügend RNA vorlag ((03_ID36, 32_ID235 doppelt genutzt, 43_ID242), ausgewählt und mit jeweils drei unterschiedlichen RNA-Mengen (50 ng, 125 ng, 250 ng) eingesetzt (persönliche Mitteilung Dr. C. König, NanoString). Anschließend wurde mit zwölf Proben aus unterschiedlichen Gruppen (04_ID37, 15_ID124, 16_ID125, 35_ID241, 36_ID243, 38_ID229, 40_ID231, 46_ID103, 47_ID105, 56_ID109, 57_ID223, 70_ID251) mit der gleichen RNA-Menge von 300 ng eine weitere Überprüfung der Güte und Quantität der Proben durchgeführt. Leider war es bei zwei Proben (56_ID109, 57_ID223) aufgrund zu wenig vorhandener RNA-Menge nicht möglich 300 ng RNA einzusetzen, wie vom Protokoll des Herstellers ⁸¹ empfohlen, weshalb 200 ng verwendet wurden (siehe Tabelle A 4 im Anhang).

Statt 24 Zieltranskripten wurden hier nur 23 getestet, da eine Zielsequenz sich als für eine NanoString-PlexSet-Analyse ungeeignet darstellte (mündliche Mitteilung M. Odenthal). Es wurden 400 µl Sondengemisch (MasterStock) nach Anleitung der Firma NanoString angesetzt. Es wurden Einzeloligos mit einer Konzentration von 1 µM (Sonden A), beziehungsweise 5 µM (Sonden B) in jeweils 150 µl in einem Verhältnis von 1 zu 200 verdünnt. Hierdurch konnte die Zielkonzentration für das Sondengemisch von 5 nM (A), beziehungsweise 25 nM (B) erreicht werden. Für die Sonden A und B wurden jeweils 400 µl des Sondengemisches (Master-Pool) angesetzt. Dafür wurden getrennt für Sonde A und B das Volumen von 2 µl

der 23 einzelnen Sonden entnommen und entsprechend mit 354 µl doppelt destilliertem Wasser (ddH₂O) aufgefüllt und gemischt. Im Anschluss daran wurde das Protokoll des Herstellers weiter befolgt ⁸¹.

3.9.5 Vorbereitung des Verfahrens und Qualitätsabsicherung

Vor der Durchführung des PlexSet-Versuchs wurden einzelne Arbeitsschritte kontrolliert und getestet.

3.9.5.1 Testung der Versiegelungsmöglichkeiten der Platte

Der PlexSet Versuch sollte in einer 96-well-Platte (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Kalifornien, Vereinigte Staaten) durchgeführt werden, welche luftdicht verschlossen werden musste, um jegliche Verdunstung oder Probenverunreinigung zu verhindern. Das Protokoll des Herstellers NanoString ⁸¹ rät hierbei von selbstklebenden Plastikfolien ab und weist auf einen für den Versuch schädlichen Verlust von einem Volumen von mehr als drei Mikrolitern hin. Um eine geeignete Versiegelungsmethode zu finden, wurden zwei Tests durchgeführt. Mehrere willkürliche Positionen von zwei 96-well-Platten wurden mit 15 µl nukleasefreiem Wasser befüllt. Eine Platte wurde mit einer selbstklebenden Aluminiumfolie (VWR, Radnor, Pennsylvania, Vereinigte Staaten) abgedichtet, die andere Platte mit einer Folie (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Kalifornien, Vereinigte Staaten), welche durch Anwendung eines Schweißgeräts („PX1; PCR Plate Sealer“, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Kalifornien, Vereinigte Staaten) die Platte versiegelte. Beide Platten wurden entsprechend der späteren PlexSet-Versuchsvorgaben für 22 Stunden in einem Thermozykler („CFX Real-Time System, C1000 Thermal Cycler“, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Kalifornien, Vereinigte Staaten) erhitzt und auf einer konstanten Temperatur von 67 °C gehalten. Anschließend wurde gemessen, wie viel Mikroliter Wasser in den Plattenposition-en verblieben waren. Beide Testungen der Versiegelungsmöglichkeiten ergaben keinen relevanten Volumenverlust (maximal 3 µl). Das PlexSet-Kit wurde später im Versuch mit einem Schweißgerät versiegelt, um mögliche Lösungsmittelbeimischungen aus den selbstklebenden Aluminiumfolien zu vermeiden.

3.9.5.2 Testung der Vakuumzentrifuge zur Einengung von Proben

Um einen möglichst reibungslosen Ablauf des Versuchs sicherzustellen, wurde die Vakuumzentrifuge („Savant DNA 120 SpeedVac Concentrator“, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten) zur Einengung der Proben vor dem Versuch selbst getestet. Dazu wurden zwei Reaktionsgefäße (Bioszym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland) mit 13 µl, zwei mit 10 µl

und zwei mit 8 µl Wasser befüllt und in die Vakuumzentrifuge gestellt. Nach fünf Minuten und jeder weiteren zweiten Minute wurde die Zentrifuge gestoppt und es wurde kontrolliert, ob sich noch Wasser in den Gefäßen befand. Pro Minute zeigte sich eine Volumenreduktion um etwa 1 µl. Mit dieser Testung sollte verhindert werden, dass die Proben zu trocken werden und eine Lösung in Wasser wieder möglich ist.

3.9.5.3 Randomisierung der Plattenbelegung

Mithilfe des Programms Excel (Microsoft, Redmond, Washington, Vereinigte Staaten) und der Funktion der Zufallszahlen und der Sortierung der Daten anhand dieser, wurden alle Proben zufällig den Positionen der 96-Platte zugeordnet. Dabei musste pro Zeile die erste Position für die Kalibrierungsprobe freigehalten werden (entsprach A01-G01).

3.9.6 Erstellung einer Kalibrierungsprobe

Es wird empfohlen in der Platte des PlexSet-Versuchs jeweils die erste Position pro Zeile mit einer Kalibrierungsprobe zu befüllen⁸¹. Diese soll einen groben Querschnitt aller anderen Proben, beziehungsweise der zu erwarteten Ergebnisse darstellen und im Verlauf des Versuchs, wie die anderen Proben behandelt werden. Dazu wurde aus 17 der 19 Gruppen jeweils eine Probe ausgewählt und deren RNA unter Beachtung der benötigten Menge und Konzentration zu einem Pool vermischt.

3.9.7 PlexSet-Versuch

Zur Durchführung des NanoString-PlexSet-Versuchs wurde das Protokoll des Herstellers aus dem Jahre 2017 befolgt, sowie dessen Geräte genutzt (,nCounter Digital Analyzer 5s‘ und ,Prep Station 5s‘, NanoString, Seattle, Washington, Vereinigte Staaten)⁸¹.

Zur Auswertung der Daten wurde das Programm nSolver der Firma NanoString genutzt, sowie Excel von Microsoft (Redmond, Washington, Vereinigte Staaten) und das Statistikprogramm SPSS der Firma IBM (Armonk, New York, Vereinigte Staaten). Aufgrund der kleinen Gruppengrößen konnte nicht von einer Normalverteilung der Daten ausgegangen werden. Es wurden nicht-parametrische Tests zur Signifikanzermittlung durchgeführt und die Effektstärke nach Cohen ermittelt.

4. Ergebnisse

4.1 Entwicklung von Lungenadenokarzinomen nach transgener KRAS Mutation oder EGFR Mutation in Abhängigkeit der LSD1-Inhibierung

Für die Untersuchungen des Einflusses von LSD1 auf die Karzinogenese von LuAD standen Gewebeproben transgener Mausmodelle zur Verfügung. Es handelte sich um formalinfixiertes und paraffineingebettetes Lungengewebe, das aus drei Mausadenokarzinommodellen, wie in Material und Methoden (Kapitel 3.) beschrieben, stammte.

- a) KRAS G12V Mutation getriebene Mausmodelle, pharmakologische LSD1-Inhibierung mit HCI-2509 (Kapitel 3.1.2)
- b) EGFR L858R Mutation getriebene Mausmodelle, pharmakologische LSD1-Inhibierung mit HCI-2509 (Kapitel 3.1.1)
- c) KRAS G12V Mutation getriebene Mausmodelle, transgene LSD1-Inhibierung mit shLSD1 (Kapitel 3.1.3)

In diesen Mausmodellen wurde die tumortreibende KRAS G12V Mutation oder EGFR L858R Mutation konditionell induziert. LSD1 wurde entweder durch eine Diät mit dem LSD1 Inhibitor HCI-2509 oder durch Einkreuzung einer transgenen shLSD1 Mauslinie, die nach Doxycyclingabe shRNA gegen LSD1 exprimierte, inhibiert (Kapitel 3.1).

Zunächst wurde das zur Verfügung stehende Gewebe der drei methodischen Ansätze zur Lungenkarzinogenese begutachtet und auf Zahl und Ausbreitung der entstandenen Lungenadenokarzinome untersucht.

4.1.1 Auftreten von Lungenadenokarzinomen nach transgener KRAS G12V oder EGFR L858R Mutation in Abhängigkeit pharmakologischer oder transgener LSD1-Inhibierung

Nach Induktion einer transgenen KRAS G12V Mutation wurden bei sieben von insgesamt 15 Mäusen Adenokarzinome in der Lunge gefunden. Dagegen wurden in nur zwei von insgesamt 14 Mäusen, die in der zweiten Hälfte des Versuchszeitraums mit dem LSD1 Inhibitor HCI-2509 behandelt wurden, Lungenadenokarzinome beobachtet. Von 16 Mäusen, die über den gesamten Versuchszeitraum mit dem LSD1-Inhibitor behandelt wurden, zeigten sich Lungenadenokarzinome ebenfalls in nur zwei Mäusen (Abbildung 12) ⁵⁹. Demnach entwickelten nach pharmakologischer LSD1-Inhibierung weniger Mäuse Tumore.

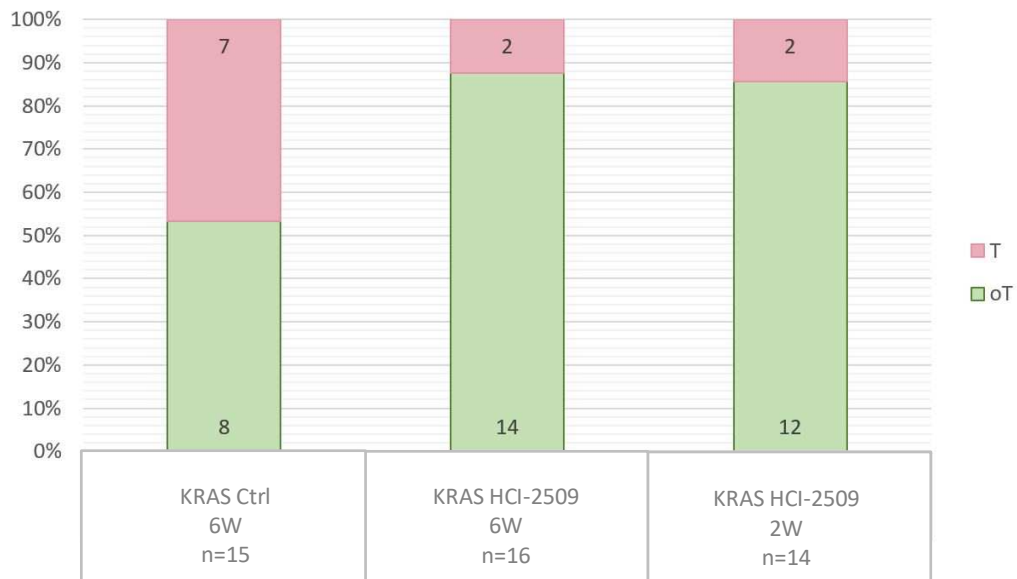


Abbildung 12: **Darstellung des Tumoraufretens in der Gruppe der Mäuse mit KRAS G12V Mutation und pharmakologischer LSD1-Inhibierung durch HCI-2509.**

(T: Mäuse mit Tumoraufreten, oT: Mäuse ohne Tumorentwicklung, n: Anzahl der Mäuse mit oder ohne Tumorentwicklung, KRAS: KRAS G12V Mutation: C57BL/6N^{TG(KRAS^{mut2})}, Ctrl: Kontrollgruppe, welche nicht mit dem LSD1-Inhibitor behandelt wurden, HCI-2509: LSD1-Inhibitor, W: Wochen)

Um die Wirkung von LSD1 auf die Expressionsprofile zentraler onkogenetischer Mediatoren zu studieren, wurden ebenfalls Lungengewebeproben herangezogen, in denen nicht nur die Karzinogenese durch KRAS G12V Mutation induziert wurde, sondern in denen zusätzlich LSD1 durch transgene Expression von shRNA inhibiert worden war. Die Expression von shRNA gegen LSD1 (shLSD1) wurde durch Doxycyclingabe in verschiedenen Zeitfenstern aktiviert (vergleiche Abbildung 8).

Genau 50% aller Mäuse, die nicht mit Doxycyclin behandelt wurden, entwickelten Lungenadenokarzinome. Von den acht Wildtyp-Mäusen ohne transgene shLSD1 Expression, die für fünf Wochen mit Doxycyclin behandelt wurden, entwickelte lediglich eine Maus Tumorknoten, während unter den shLSD1 transgenen Mäusen nach fünfwöchiger Doxycyclingabe sechs von den insgesamt neun Mäusen Tumore bildeten (vergleiche Versuch a in Kapitel 3.1.3, Abbildung 8). Bei shLSD1 transgenen Mäusen, die nur in einem zweieinhalb- bis vierwöchigen Zeitfenster mit Doxycyclin behandelt wurden (vergleiche Versuche b, c und e in Kapitel 3.1.3, Abbildung 8) kam es bei zwei von acht Mäusen zur Bildung von Tumoren (Abbildung 13).

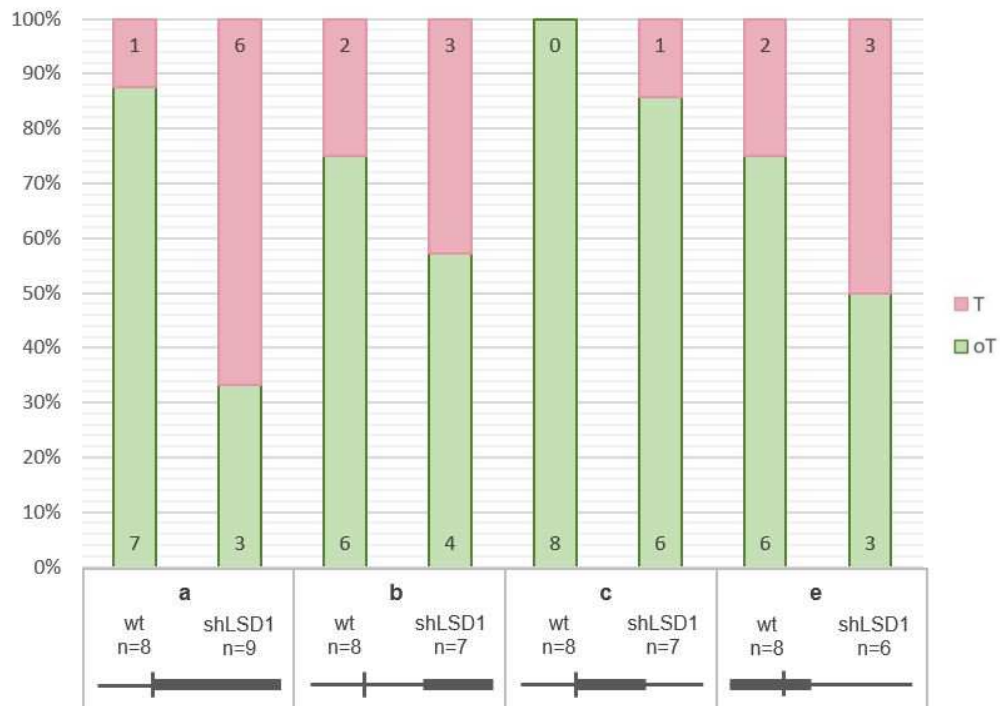


Abbildung 13: **Darstellung des Tumorauftritts in der Gruppe der Mäuse mit KRAS G12V Mutation und transgener LSD1-Inhibierung.**

Die dünnen Linien zeigen den Versuchszeitraum der Mausmodelle von 5 Wochen an. Dickmarkiert sind die Behandlungszeiträume zur transgenen Expression in den unterschiedlichen Modellen a, b, c und e (vergleiche Kapitel 3.1.3).

(T: Mäuse mit Tumorauftritt, oT: Mäuse ohne Tumorentwicklung, n: Anzahl der Mäuse mit oder ohne Tumorentwicklung; wt: Wildtyp, shLSD1: Expression von shRNA gegen LSD1; transgene LSD1-Inhibierung: C57BL/6N^{TG(shLSD1)}, a/b/c/e: Versuchsaufbau a/b/c/e (vergleiche Kapitel 3.1.3))

In den Mäusen, die die konditionell induzierbare EGFR L858R Mutation trugen, wurde nach Doxycyclingabe die Mutation in Clarazellen der Lunge induziert (vergleiche Kapitel 3.1.1). Dementsprechend wurden in allen Mäusen Lungendendokarzinome gefunden⁵⁹. I. Macheleidt konnte im Laufe der vier Wochen mit und ohne pharmakologische LSD1-Inhibierung mit μ CT-Untersuchungen einen signifikanten Unterschied im relativen Tumorstadium zeigen. Unter Gabe des Inhibitors nahm die Tumormasse signifikant weniger zu im Vergleich zu den Mäusen, welche nicht mit dem Inhibitor behandelt wurden. Es kam demnach nicht zu einem Rückgang der Tumore, sondern zu einem verminderten Tumorstadium¹. In den in dieser Arbeit durchgeführten Analysen wurden nur Proben von Mäusen mit EGFR L858R Mutation herangezogen, deren Tumorstadium pharmakologisch gehemmt wurden, nicht jedoch transgen.

4.1.2 Charakterisierung der Lungenadenokarzinomknoten mit KRAS G12V oder EGFR L858R Mutation nach pharmakologischer oder transgener LSD1-Inhibierung

Damit eingeschätzt werden konnte, wie viel Tumormaterial in den vorhandenen Proben (vergleiche Tabelle A 1 im Anhang) zur Verfügung stand, wurden die Flächen der Lungenadenokarzinomknoten in den Lungenpräparaten der Mäuse mit KRAS G12V induzierten Lungenadenokarzinomen vermessen. Dazu wurden Hämatoxylin-Eosin gefärbte Schnitte fotografiert und anschließend morphometrisch die Flächen aller Knoten im Präparat bestimmt (Abbildung 14). Mithilfe dieser Daten konnte ein Eindruck darüber gewonnen werden, wie viele Tumorknoten mit welcher Fläche für die Laser-Mikrodissektion eingesetzt werden konnten und sollten (vergleiche Tabelle 2).

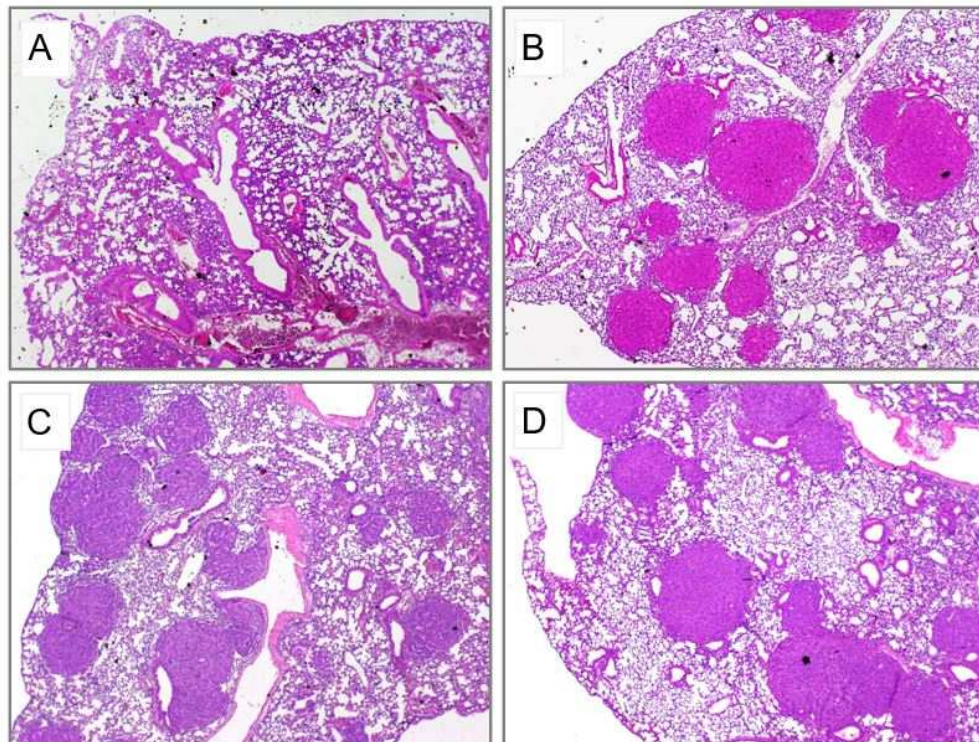


Abbildung 14: **Histologische Darstellung von Gewebeschnitten unterschiedlicher Mauslungen mit KRAS G12V Mutation.**

Bild A repräsentiert Lungengewebe ohne Tumorknoten einer Maus, die nicht mit dem LSD1-Inhibitor HCl-2509 behandelt wurde (Proben-ID 217), Bild B zeigt die Tumorknoten einer Maus, welche ebenso keiner Inhibierung unterzogen wurde (Proben-ID 35), Bild C zeigt Tumorknoten einer Maus nach zweiwöchiger Behandlung mit dem LSD1-Inhibitor HCl-2509 (Proben-ID 80) und Bild D Tumorknoten einer anderen Maus nach sechswöchiger Behandlung mit selbigem Inhibitor (Proben-ID 23) (H&E Färbung, 4x Objektivvergrößerung).

Bei den EGFR L858R mutierten Mäuseproben wurde neben der Fotodokumentation diese Flächenberechnung nicht durchgeführt, da sich hier die Lungenadenokarzinome nicht als Knoten ausbildeten, sondern ein diffuses

Wachstum zeigten. Dieses Wachstum begründet sich darin, dass in diesem Modell nicht vereinzelte Zellen mit der Mutation zur Tumorbildung induziert wurden, sondern aufgrund eines clonalen Promotors in allen Clonalzellen das Tumorstadium einsetzte (vergleiche Kapitel 3.1.1 und Abbildung 15) ^{1,59}.

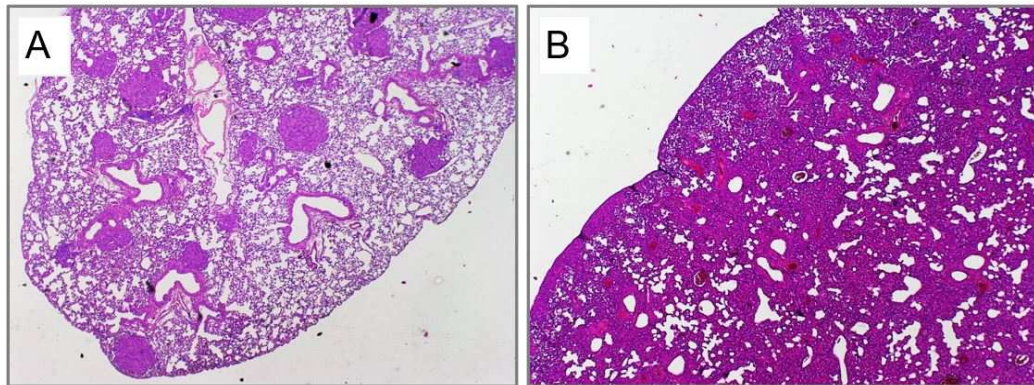


Abbildung 15: **Tumorwachstumsmuster von Lungenadenokarzinomen des konditionellen KRAS G12V- und des EGFR L858R Mutationsmodells.**

A: Sporadische Knotenbildung in Lungengewebe von KRAS G12V induzierten Lungenadenokarzinomen (exemplarische mikroskopische Aufnahme, Proben-ID 38). Vom Normalgewebe durch die hohe Dichte unterscheidbar sind multiple Tumorknoten zu erkennen. B: Diffuse Wachstumsmuster der Lungenadenokarzinome nach clonaler Induktion der EGFR L858R Mutation (repräsentative mikroskopische Aufnahme, Proben-ID 228). Hier können keine abgegrenzten Knoten erkannt werden (H&E Färbung, 4x Objektivvergrößerung).

Tabelle 2: Anzahl und Größe der LuAD-Knoten in Mausproben mit KRAS G12V Mutation unter pharmakologischer oder transgener LSD1-Inhibierung.

Versuchsgruppe	Mutation	Behandlungsart	Behandlungszeit	Versuchsaufbau****	Tumor ja/nein***	Proben-ID**	Geschlecht	Anzahl der Tumorknoten	Tumorknotenfläche insgesamt [mm ²]*
HCl-2509 Versuchsgruppe	KRAS G12V	C	6W		T	34	w	3	0,89
						35	w	13	3,89
						38	m	21	4,63
						39	m	6	1,44
						51	m	33	8,07
		52	m			27	6,10		
		77	w			11	2,33		
		80	m			48	9,10		
		91	w			29	21,72		
		20	w			10	1,75		
transgene LSD1 Inhibitor Versuchsgruppe	KRAS G12V	wt	5W	a	23	w	35	9,70	
					76	m	32	9,92	
		shLSD1	5W	a	70	w	54	12,36	
					75	m	95	37,94	
		wt	2,5W	c	109	m	45	14,81	
					223	m	69	22,27	
		shLSD1	3W+1W	e	202	w	36	5,57	
					195		1	0,16	
		wt	2,5W	b	156		3	0,38	
					162	m	31	4,80	
shLSD1	2,5W	b	163	m	35	5,38			
			217		0	-			
wt	2,5W	b	255		0	-			
			208		0	-			
shLSD1	2,5W	b	211	m	33	11,10			
			219	w	113	37,01			

* Zur Abschätzung der Tumorknotengröße wurden die Tumorknotenflächen mit archivierten histologischen Schnittpräparaten bestimmt.

** Die rot markierten Proben wurden von den weiteren Versuchen ausgeschlossen, da nur noch unzureichend Material für die hier beschriebenen Versuche zur Verfügung stand.

*** Es wurden nur Proben von Mäusen berücksichtigt, die Tumore entwickelt hatten (vergleiche Tabelle A 1 im Anhang).

**** Versuchsaufbauten gemäß Kapitel 3.1.3 und Abbildung 8

(KRAS G12V: C57BL/6N^{TG(KRASmut2)}), shLSD1: C57BL/6N^{TG(shLSD1)}), wt: Wildtyp, W: Woche/Wochen, T: Tumoraufkommen, a/b/c/e: Versuchsaufbau a/b/c/e (vergleiche Kapitel 3.1.3), m: männliches Geschlecht, w: weibliches Geschlecht, C: Kontrollbehandlung ohne LSD1-Inhibitor HCl-2509, I: Behandlung mit dem LSD1-Inhibitor HCl-2509)

In der Gruppe der KRAS G12V mutierten Mäuse, welche keiner LSD1-Inhibierung unterzogen wurden, bildeten die Mäuse zwischen 3 und 33 Tumorknoten mit einer jeweiligen Gesamtfläche von 1-8 mm². In den Mäusen, bei denen LSD1 für zwei oder sechs Wochen mit HCl-2509 inhibiert wurde, wurden insgesamt zwischen 10 und 48 Tumorknoten mit einer Gesamtgröße von 2-22 mm² gesichtet, also einer insgesamt größeren Fläche (vergleiche Tabelle 2 und Abbildung 16).

Da in den Behandlungsgruppen mit zwei- oder sechswöchiger HCl-2509 Behandlung nur jeweils zwei Mäuse Lungenadenokarzinome entwickelten, können keine signifikanten Aussagen gemacht werden. Allerdings scheinen – obwohl die Tumorentwicklung stark durch die LSD1-Inhibierung unterdrückt werden konnte und es nur in wenigen Mäusen zur Entwicklung von LuAD-Knoten kommt - in diesen wenigen Mäusen unter der LSD1-Inhibierung vermehrt und insgesamt mehr Tumorstadium aufzutreten, als in der Kontrollgruppe (vergleiche Abbildung 16 B).

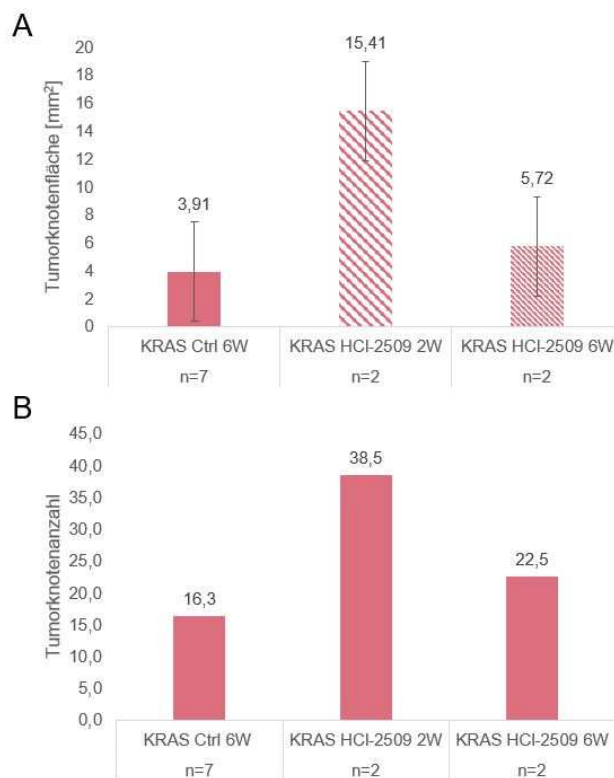


Abbildung 16: LuAD-Knotengröße und -anzahl nach KRAS-Mutation und LSD1-Inhibierung
Mittlere Tumorknotenflächen (A) und -anzahl (B) nach 6 Wochen Induktion der KRAS Mutation ohne zusätzliche Behandlung (Ctrl) oder mit einer zusätzlichen pharmakologischen LSD1-Inhibierung durch HCl-2509 für die gesamten sechs Wochen (6W) oder für die letzten 2 Wochen (2W) des sechswöchigen Behandlungszeitraums des Versuchs.
(n: Anzahl der Proben, KRAS: KRAS G12V Mutation: C57BL/6N^{TG(KRASmut2)}, Ctrl: Kontrollbehandlung ohne LSD1-Inhibitor HCl-2509, HCl-2509: Behandlung mit dem LSD1-Inhibitor HCl-2509, W: Wochen)

Nachdem die Tumorknotengröße und -anzahl nach pharmakologischer LSD1-Inhibierung analysiert worden waren, wurde die LuAD-Entwicklung im KRAS G12V Mausmodell nach fünfwöchiger transgener shLSD1 vermittelter LSD1-Inhibierung begutachtet. Hier wurden 45-95 Tumorknoten pro Lungenschnittpräparat mit Flächengrößen von jeweils 12-48 mm² beobachtet. Nach kurzer transgener LSD1-Inhibierung durch shRNA traten die LuAD Knoten in geringerer Zahl und Größe auf. Hier lag die maximale Anzahl an Knoten bei 36 mit einer maximalen Tumorfläche von 5,6 mm² (Versuchsaufbau c und e). Eine Maus mit KRAS G12V Mutation ohne shLSD1-Einkreuzung, aber fünfwöchiger Doxycyclinbehandlung (Versuchsaufbau a), hatte 32 Tumorknoten mit einer Fläche von insgesamt fast 10 mm². Mit kürzerer Doxycyclinbehandlungsdauer (Versuchsaufbau e und c) stand nur eine Maus ohne shLSD1-Einkreuzung mit einem Tumorknoten mit einer Fläche von circa 0,16 mm² für die Untersuchungen zur Verfügung (Versuchsaufbau e).

In der Gruppe der Mäuse mit zweieinhalbwöchiger Doxycyclin-Therapie nach zweieinhalb Wochen reiner Standarddiät hatten die shLSD1-Mäuse 33-113 Tumorknoten mit einer Gesamtfläche von 11-37 mm², wobei bei einer der drei shLSD1-Mäusen, sowie bei beiden Wildtyp-Mäusen keine Knoten unter dem Mikroskop zu erkennen waren (Versuchsaufbau b).

Nach der histologischen Begutachtung mussten mehrere Proben-IDs aus dem Mausmodell der transgenen LSD1-Inhibierung ausgeschlossen werden, da nicht ausreichend Gewebe auf den Paraffingewebsblöcken für die spätere Anfertigung von Schnittpräparaten und anschließende Laser-Mikrodissektion zur Verfügung stand (vergleiche Tabelle 2: rot markierte Proben-IDs). Aus diesen Gründen wurden die Gruppen b, c und e mit kurzen Therapieintervallen des Mausmodells mit transgener LSD1-Inhibierung (vergleiche Kapitel 3.1.3 Aufbauten b, c, e) von den weiteren Versuchen ausgeschlossen und lediglich Proben aus dem Versuchsaufbau a in die weiteren Versuche mitaufgenommen.

Auch innerhalb der anderen Mausmodelle konnten aufgrund unzureichend vorhandenen Materials nur eine Auswahl an Proben eingeschlossen werden (vergleiche Tabelle 2 und Tabelle A 1 im Anhang).

4.2 Materialvorbereitung der Laser-Mikrodissektion

Nachdem das für die Laser-Mikrodissektion zur Verfügung stehende Material geprüft worden war, wurden Vortests durchgeführt, um die notwendige Flächengröße der Tumorknoten zu ermitteln, die eine ausreichende RNA-Ausbeute in der RNA-Isolierung

des makrodissezierten Materials ergeben würde. Diese vorbereitenden Tests wurden aufgrund mangelnden Schnittmaterials nicht systematisch durchgeführt. Teilweise flossen neben den eigenen Eindrücken zu den Arbeitsabläufen und der Durchführbarkeit auch die Erfahrung der Arbeitsgruppenkollegen, insbesondere von Dr. Tim Nestler (Institut für Pathologie, Klinik für Urologie, Uniklinik Köln) mit ein.

Mit einer Fläche von circa 22 mm² (vergleiche Tabelle 2) hatte die Proben-ID 91 eine der größten Tumorflächen. Durch Verwendung dieser Probe stand genügend Material zur Verfügung, um einen ersten Vorversuch durchzuführen. Die Probe stammte aus einer Maus, in der Lungenkarzinome aufgrund einer KRAS G12V Mutation entstanden waren (vergleiche Tabelle A 1 im Anhang).

Zunächst wurden mithilfe der Laser-Mikrodissektion drei unterschiedlich große Areale ausgeschnitten und in drei verschiedene Reaktionsgefäße katapultiert.

Tabelle 3: Ergebnisse der quantitativen Real Time PCR für beta-Aktin mRNA der Proben-ID 91 mit Material aus drei unterschiedlich großen Gewebeflächen.

	Reaktionsgefäß 1	Reaktionsgefäß 2	Reaktionsgefäß 3
Fläche [mm²]	0,67	2,21	4,22
Ct (beta-Aktin) (Ct-Mittelwert aus qPCR Triplicaten)	38,45	35,64	35,49

Die Schnittpräparate, die für diesen Vorversuch herangezogen wurden, waren 3 µm dick und auf Glasobjektträgern aufgezogen. Das herausgelaserte Gewebe wurde in diesem Ansatz nicht am Stück herauskatapultiert und aufgefangen, sondern aufgrund der Glasobjektträger ohne Membranaufgabe in mehreren kleineren Fraktionen katapultiert.

Im Anschluss wurde die RNA isoliert und die RNA-Menge durch eine quantitative Real Time PCR (qPCR) für beta-Aktin mRNA abgeschätzt. Eine hohe Zyklenzahl, die notwendig ist, um die logarithmische Phase der PCR zu erreichen - das heißt hohe Ct-Werte - zeigt an, dass wenig Matrizenausgangs-cDNA für die Amplifikation zur Verfügung stand. Tabelle 3 zeigt, dass aus den Präparaten mit einer Gewebefläche von 4,2 mm² nur unwesentlich mehr RNA isoliert werden konnte als aus einem Gewebeareal mit einer Fläche von 2,21 mm². Wurden nur 0,7 mm² für die RNA-Isolierung eingesetzt, dann waren die qPCR Ct-Werte nahe der Nachweisgrenze.

Da man mit der PCR einen Ct-Wert unterhalb von 35 anstrebt, zeigen die Ergebnisse, dass RNA-Extrakte aus einem Tumorgewebeareal mit einer Fläche von mindestens 2 mm² notwendig sind, um ausreichend RNA für weitere Analysen zu gewinnen (mündliche Mitteilung M. Odenthal).

Bei der Verwendung von Glasobjektträgern können für die Laser-Mikrodissektion nur Gewebsschnitte mit einer Dicke von 3 µm aufgezogen werden (Abbildung 17 A), da dickere Schnitte nicht durch den Laser hochkatapultiert werden können. Im Gegensatz dazu können bei sogenannten Membranobjektträgern 10 µm dicke Schnitte eingesetzt werden, da die Membranen als Träger für das lasermikrodissezierte Material dienen und das Katapultieren in die Auffanggefäße erleichtern (Abbildung 17 B und C).

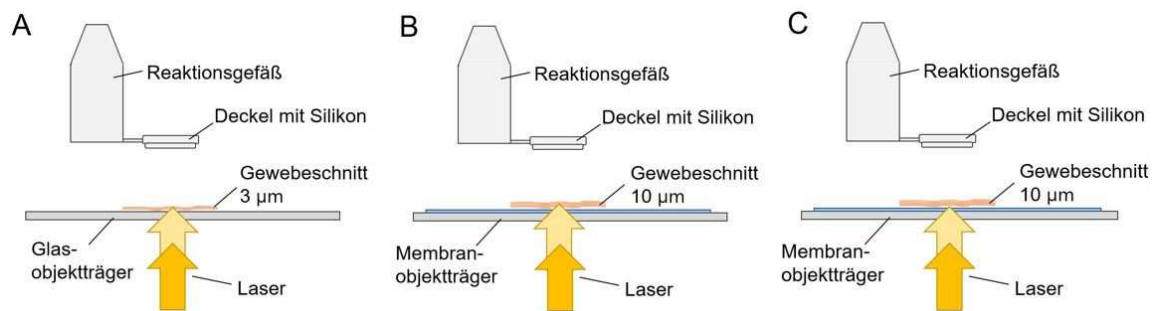


Abbildung 17: **Laser-Mikrodissektion von Gewebsschnittarealen unter Verwendung von Glasobjektträgern (A) oder Membranobjektträgern (B, C)** (Erklärung siehe bitte im Text). Während für das Schneiden mithilfe des Lasers der Laserfokus auf der Schnittebene liegt, wird für das Katapultieren der Fokus unterhalb des Schnittes justiert und die Energie erhöht (vergleiche Kapitel 3.4).

Um die Membranobjektträger zu testen, wurden in einem weiteren Vorversuch Gewebearaele ausgewählten Proben (Proben-IDs 34, 35 und 75) mit einer Fläche von 4-6 mm² mithilfe der Laser-Mikrodissektion isoliert und die RNA-Ausbeute bestimmt. Dieser Test ergab, dass eine Ausbeute von 13-18 ng/µl in 36 µl bei einer gelaserten Fläche von knapp 4 mm² und eine Ausbeute von 24-26 ng/µl in 36 µl bei etwa 6 mm² erreicht werden konnte. Da für die NanoString-Expressionsanalyse 150 ng isolierte RNA notwendig ist, wurde das Ziel formuliert bei jeder Probe eine Fläche von mindestens 4-6 mm² per Laser-Mikrodissektion zu gewinnen. Sollte mehr Tumorgewebe auf einem Schnitt zur Verfügung stehen, sollte auch der Rest gewonnen werden, sofern der Silikondeckel des Reaktionsgefäßes das Gewebe halten kann.

Eine Gegenfärbung des Gewebes vor der Mikrodissektion barg den Vorteil, dass eine - wenn auch häufig schwer zu interpretierende - histologische Bildgebung bei der Mikrodissektion zur Verfügung stand, aber auch die Ablösung des Gewebeschnitts vom Objektträger aufgrund eines veränderten Feuchtegrads des Präparats erleichtert wurde (Rücksprache mit T. Nestler). Aufgrund dessen wurden die Schnitte mit Hämalaun gefärbt und in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und luftgetrocknet. Zeigten sich die Schnitte besonders trocken und lagen nicht eben auf der Membran der Objektträger auf, wurden sie mit einem Fixierungsspray eingesprüht, um eine sichere Haftung zu gewährleisten. Dieser Ablauf zeigte sich als die effektivste Herangehensweise (Tabelle 4).

Tabelle 4: Einfluss der histologischen Färbung und der Behandlung mit einem Fixierungsspray auf die Katapultierfähigkeit und die RNA-Ausbeute im Rahmen der Laser-Mikrodissektion.

		Histologische Auflösung	Katapultierfähigkeit	RNA-Ausbeute
Färbung	+	++	+	+
	-	+	-	n.mgl.
Fixierungsspray	+	+	+	+
	-	-	-	n.mgl.

(„+“: verbessert, vereinfacht, gut; „-“: erschwert, schlecht; „n.mgl.“: aufgrund von mangelnder Katapultierfähigkeit nicht möglich)

Anhand der Erkenntnisse der Vorversuche wurde schließlich mit Proben, die lasermikrodisseziert werden sollten, wie folgt verfahren:

- 1) Es wurden Membranobjektträger verwendet und Schnitte mit einer Dicke von 10 µm aufgezogen.
- 2) Die Schnittpräparate wurden histologisch mit RNase-freiem Hämalaun gefärbt und zur besseren Haftung auf der Membran und besseren histologischen Auflösung mit Fixierungsspray behandelt.
- 3) Von allen Proben wurden Tumoreareale mit einer Gesamtfläche von mindestens 4-6 mm² gewonnen und für die RNA-Isolierung eingesetzt. Falls nicht genügend Tumorknoten auf einem Schnittpräparat vorhanden waren, wurden mehrere Schnitte verwendet, um die genannte Ziel-Gesamtfläche zu erreichen.

Nach der Laser-Mikrodissektion wurde aus dem gewonnenen Gewebe die RNA isoliert und die Konzentration ermittelt (Tabelle 5). Wie in den Vorversuchen bereits beobachtet, konnte mehr RNA isoliert werden, wenn mehr oder größere Arealflächen zur Laser-Mikrodissektion eingesetzt wurden. Dennoch war trotz sorgfältiger Vermessung und Berechnung der benötigten Flächen der Areale die RNA-Ausbeute nicht streng proportional zur isolierten Tumorknotenfläche (vergleiche Tabelle 5 und Abbildung 18).

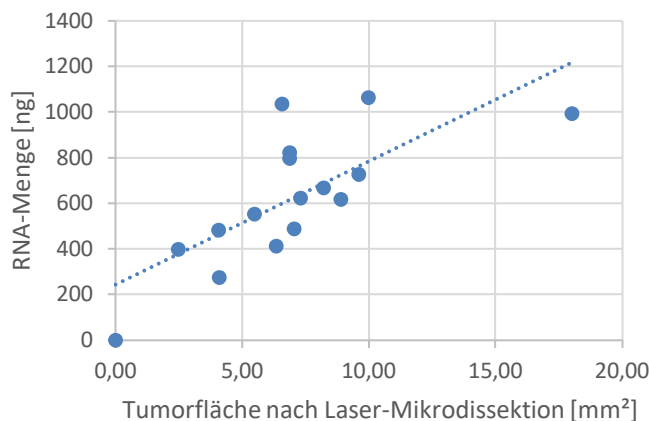


Abbildung 18: **RNA-Ausbeute in Abhängigkeit von den Flächen der Tumor-areale**, die durch die Laser-Mikrodissektion gewonnen wurden.

Tabelle 5: Ergebnis der RNA-Isolierung: Konzentration und gewonnene Gesamtmenge von RNA aus der gelaserten Tumorroäche aus LuAD-Knoten in Mausproben mit KRAS G12V Mutation unter pharmakologischer oder transgener LSD1-Inhibierung.

Versuchsgruppe	Mutation	Behandlungsart	Behandlungszeit	Versuchsaufbau ****	Tumorja/nein ***	Proben-ID **	Anzahl der Tumorknoten	Tumorknotenfläche insgesamt [mm ²] [*]	gelaserte Fläche [mm ²] ^{*****}	Konzentration [ng/μl]	RNA-Menge [ng] in insgesamt 36 μl
HCl-2509 Versuchsgruppe	KRAS G12V	C	6W		T	34	3	0,89	6,34	11,47	412,92
						35	13	3,89	4,08	7,67	276,12
						38	21	4,63	8,21	18,59	669,24
						39	6	1,44	8,89	17,18	618,48
						51	33	8,07	5,48	15,4	554,4
		52	27			6,10	6,85	22,84	822,24		
		77	11			2,33	4,07	13,39	482,04		
		80	48			9,10	6,88	22,13	796,68		
		91	29			21,72	9,59	20,2	727,2		
		20	10			1,75	2,46	11,1	399,6		
transgene LSD1-Inhibitor Versuchsgruppe	KRAS G12V	wt	5W	a		23	35	9,70	7,03	13,55	487,8
						76	32	9,92	0,00	0	0
		shLSD1	70			54	12,36	7,29	17,32	623,52	
			75			95	37,94	18,00	27,62	994,32	
			109			45	14,81	6,57	28,78	1036,08	
			223			69	22,27	9,98	29,58	1064,88	

* Zur Abschätzung der Tumorknotengröße wurden die Tumorknotenflächen mit archivierten histologischen Schnittpräparaten bestimmt.

** Die rot markierten Proben wurden von den weiteren Versuchen ausgeschlossen, da nur noch unzureichend Material für die hier beschriebenen Versuche zur Verfügung stand.

*** Es wurden nur Proben von Mäusen berücksichtigt, die Tumore entwickelt hatten (vergleiche Tabelle A 1 im Anhang).

**** Versuchsaufbauten gemäß Kapitel 3.1.3 und Abbildung 8

***** Die Ebene des gelaserten Gewebematerials ist pro Probe nicht übereinstimmend mit der Schnittebene des archivierten Schnittmaterials zur histologischen Untersuchung.

(KRAS G12V: C57BL/6N^{TG(KRASmut2)}, shLSD1: C57BL/6N^{TG(shLSD1)}, wt: Wildtyp, W: Woche/Wochen, T: Tumoraufkommen, a: Versuchsaufbau a (vergleiche Kapitel 3.1.3), C: Kontrollbehandlung ohne LSD1-Inhibitor HCl-2509, I: Behandlung mit dem LSD1-Inhibitor HCl-2509)

4.3 Sondensynthese

Um den Einfluss der pharmakologischen oder der transgenen LSD1-Inhibierung in LuAD der Maus zu analysieren, sind Zielgene ausgewählt worden, deren veränderte Expressionen nach LSD1-Inhibierung bereits in Zellkulturexperimenten in der Arbeitsgruppe Odenthal gezeigt worden waren. Es wurde sich auf Schlüsselmediatoren des RNA-Reifungsprozesses, der Zellproliferation sowie des mitochondrialen Metabolismus beschränkt (siehe Tabelle 1 in Kapitel 3.9.1). Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurden die Transkriptzielsequenzen aller ausgewählten Gene definiert (vergleiche Kapitel 3.9.2). Eine Liste dieser definierten Zielsequenzen und der für die NanoString-Technologie entworfenen Sondenpaare ist im Anhang zu finden (Tabelle A 3). Als „house-keeping“-Gen wurde für die folgenden Analysen HPRT herangezogen.

In der vorliegenden Doktorarbeit sollte die Expression der Spleißvarianten des serin-/argininreichen Spleißfaktors 1 (SRSF1) und des serin-/argininreichen Spleißfaktors 3 (SRSF3) in LuAD unter dem Einfluss der LSD1-Inhibierung beschrieben werden. Daher werden die Ergebnisse der Sequenzrecherche und der Definition der Zielsequenzen, die für NanoString Expressionsanalysen eingesetzt werden sollten, nur für die Transkriptvarianten des SRSF1 und SRSF3 vertiefend erläutert (Kapitel 4.3.1 und 4.3.2).

4.3.1 Sequenzwahl der Sonden zur Darstellung der Expression von Spleißvarianten des serin-/argininreichen Spleißfaktors 1

Nach NCBI-Datenbankrecherche konnten für den murinen Organismus drei SRSF1 Spleißvarianten (1, 2 und X1) identifiziert werden (Abbildung 19). Die Spleißvarianten unterschieden sich im Exon 3 und 4. Bei der zweiten Transkriptvariante waren das dritte und vierte Exon der ersten Transkriptvariante zu einem längeren Exon fusioniert. Dieser Sequenzbereich fehlte in den Varianten 1 und X1. Daher wurde zur Unterscheidung der SRSF1-Variante 2 diese Sequenzregion zur Hybridisierung des Sondenpaars ausgewählt. Sie wird nachstehend als SRSF1_3a bezeichnet. Transkriptvariante X1 hatte im Vergleich zur ersten Transkriptvariante fünf Exons. Zur Differenzierung der Variante X1 gegenüber den Varianten 1 und 2 wurde die divergente Region SRSF1_3b als Zieldomäne für das Sondenpaar bestimmt.

Um alle drei Varianten zu erkennen und so die SRSF1-Gesamtexpression bestimmen zu können, wurde schließlich für ein drittes Sondenpaar namens SRSF1_Ctrl ein Sequenzbereich rausgesucht, welcher in allen Varianten gleich vorhanden war (Abbildung 19). Im Text werden nachfolgend zur Vereinfachung Bezeichnungen entsprechend der durch die einzelnen Sonden erkannten Variantenkombinationen gewählt (Tabelle 6).

Tabelle 6: Ermittelte SRSF1-Zielsequenzen für die NanoString-Expressionsanalyse

Sonden-ID (Bezeichnung der Varianten)	Zielsequenzen	Sonde A*	Sonde B**
SRSF1_3a (Variante 2 _{SRSF1_3a})	1020-1215 in Variante 2 („Accession Number“: NM_001078167.2)	1071-1120	1121-1170
SRSF1_3b (Varianten 1, 2 _{SRSF1_3b})	1705-2585 in Variante 1 („Accession Number“: NM_173374.4)	1981-2033 (V1) 2177-2229 (V2)	2234-2083 (V1) 2230-2279 (V2)
SRSF1_Ctrl (Varianten 1, 2, X1 _{SRSF1_Ctrl})	2954-5364 in Variante 1 („Accession Number“: NM_173374.4)	4111-4160 (V1) 4307-4356 (V2)	4161-4212 (V1) 4357-4408 (V2)

* Sonde A: Basenregion des SRSF1-Gens zur Andockung der Reporteranhänger

** Sonde B: Basenregion des SRSF1-Gens zur Andockung der Immobilisierungsanhänger

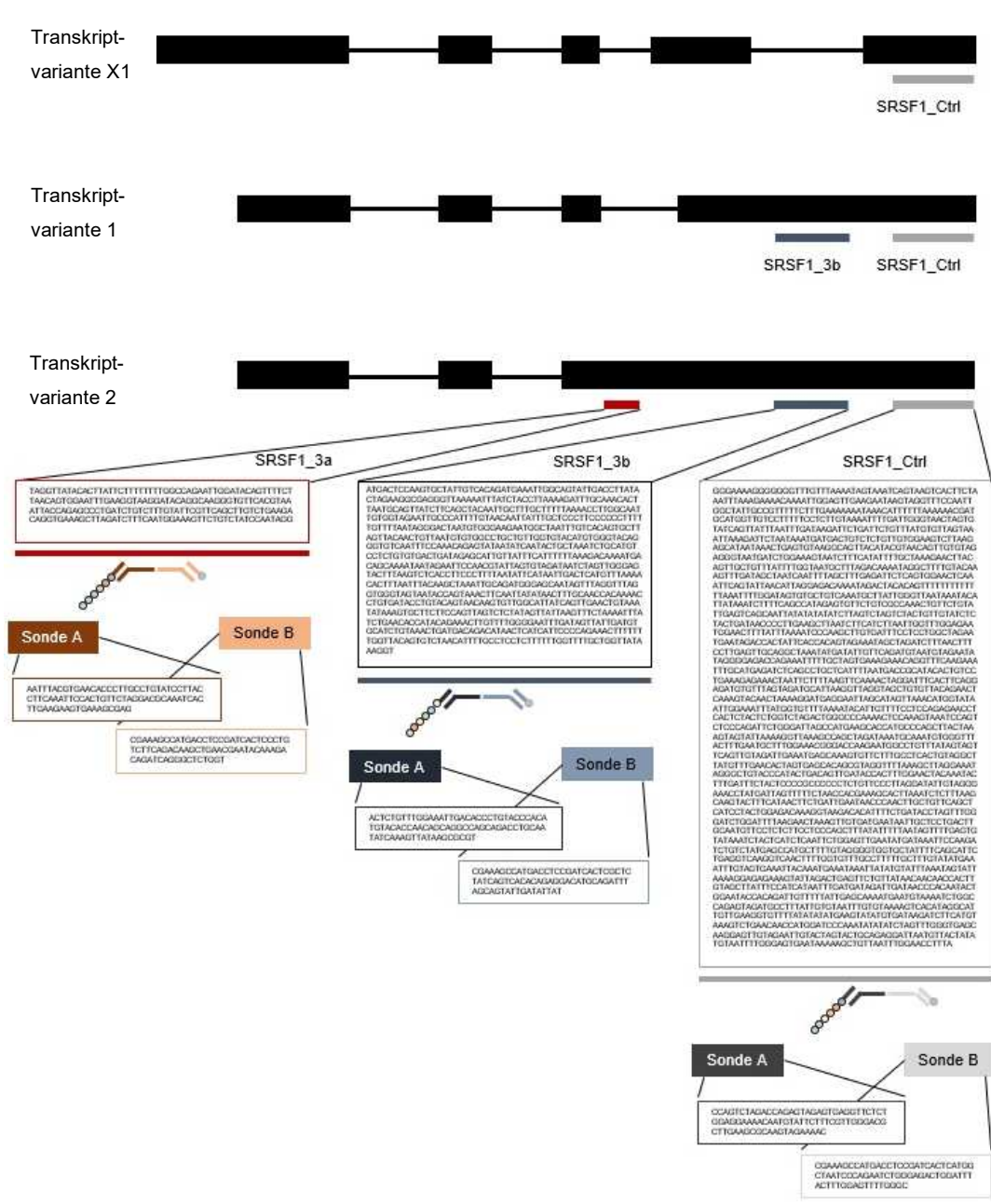


Abbildung 19: Schematische Darstellung der SRSF1 Transkriptvarianten und der Auswahl der Regionen zur Transkriptdifferenzierung mittels nCounter Sondenhybridisierung. Die Sequenzen der Transkriptvarianten im murinen System wurden mithilfe des ‚CLC Sequence Viewers‘ verglichen. Die schwarzen, schmalen, waagerechten Linien stehen für Introns, die schwarzen, dicken, waagerechten Blöcke für Exons. Die rote Linie steht für die Sequenzregion des Sondenpaars SRSF1_3a, die dunkelblauen Linien stehen für die Region des Sondenpaars SRSF1_3b und die grauen Linien für die Sequenzregion des Sondenpaars SRSF1_Ctrl. In den jeweiligen Kä-sten unter der Sondenbezeichnung ist die Sequenz des entsprechenden Bereichs aufgeführt. Unter diesen Kästen sind schematisch die Sondenpaare dargestellt mit den jeweiligen tatsächlich verwendeten Sondensequenzen.

4.3.2 Sequenzwahl der Sonden zur Darstellung der Expression von Spleißvarianten des serin-/argininreichen Spleißfaktors 3

Ausgehend vom SRSF3-Gen werden zwei Transkriptvarianten exprimiert, die sich im Einbau des Exons 4 unterscheiden ^{74,82} (Abbildung 20 und Tabelle 7).

Für die Sequenz dieses vierten Exons wurde ein Sondenpaar zur Differenzierung der Transkriptvariante 2 entwickelt (Abbildung 20). Dieses wird nachstehend als SRSF3_E4 bezeichnet. Um auch die SRSF3-Gesamtexpression bestimmen zu können, wurde ein weiteres Sondenpaar entworfen, welches beide Transkriptvarianten erkennen soll und als SRSF3_E1-3 bezeichnet wird.

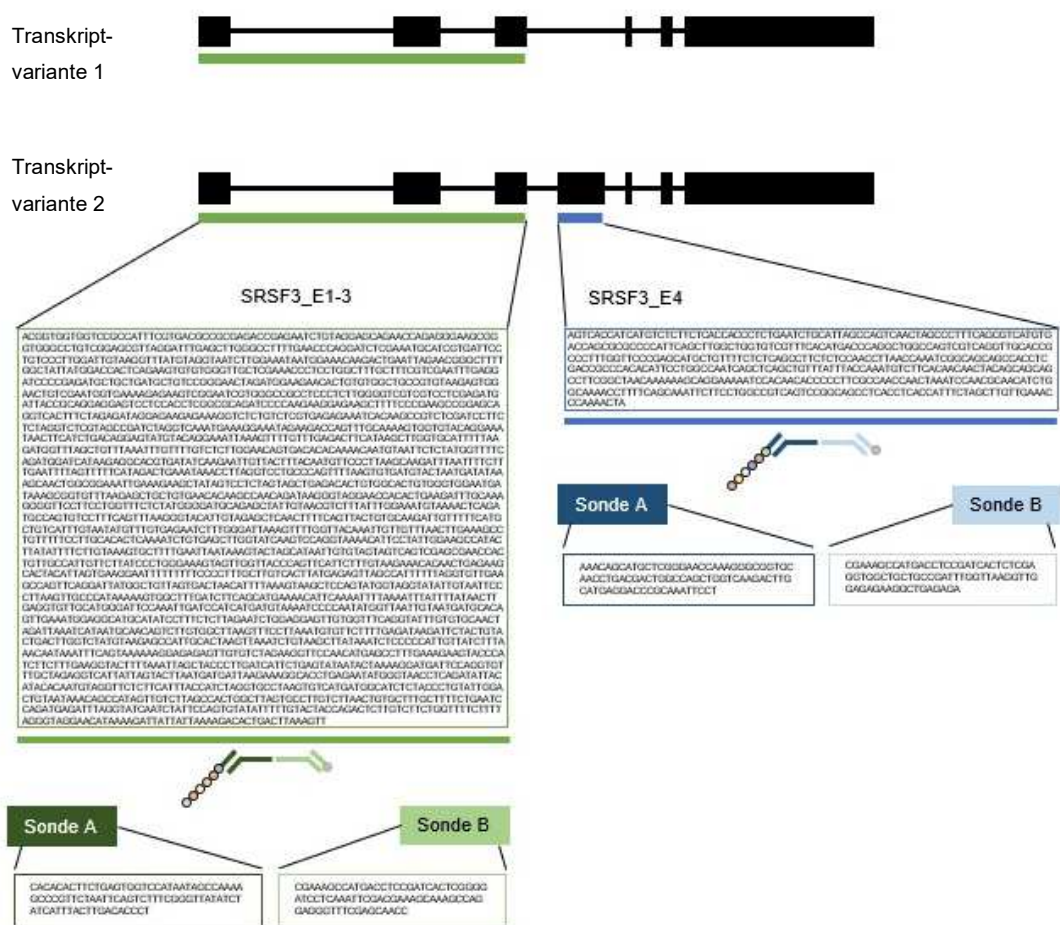


Abbildung 20: Schematische Darstellung der SRSF3 Transkriptvarianten und der Auswahl der Regionen zur Transkriptdifferenzierung mittels nCounter Sondenhybridisierung.

Die Sequenzen der Transkriptvarianten im murinen System wurden mithilfe des ‚CLC Sequence Viewers‘ verglichen. Die schwarzen, schmalen, waagerechten Linien stehen für Introns, die schwarzen, dicken, waagerechten Blöcke für Exons. Die grünen Linien stehen für die Sequenzregion des Sondenpaares SRSF3_E1-3 und die blaue Linie steht für die Region des Sondenpaares SRSF3_E4. In den jeweiligen Kästen unter der Sondenbezeichnung ist die Sequenz des entsprechenden Bereichs aufgeführt. Unter diesen Kästen sind schematisch die Sondenpaare dargestellt mit den jeweiligen tatsächliche verwendeten Sondensequenzen.

Tabelle 7: Ermittelte SRSF3-Zielsequenzen für die NanoString-Expressionsanalyse.

Sonden-ID	Angegebene Sequenzen	Sonde A*	Sonde B**
SRSF3_E1-3	1-470 (= Exons 1-3) von Variante 1 („Accession Number“: NM_013663 XM_991475)	196-248	249-301
SRSF3_E4	471-925 (= Exon 4) von Variante 2 („Accession Number“: NR_036613)	586-644	645-694

* Sonde A: Basenregion des SRSF3-Gens zur Andockung der Reporteranhänger

** Sonde B: Basenregion des SRSF3-Gens zur Andockung der Immobilisierungsanhänger

4.4 Expressionsprofile ausgewählter Schlüsselmediatoren in murinen Lungenadenokarzinomen durch die PlexSet-nCounter-Technologie

Für die Ermittlung der Expression ausgewählter Zielgenen in den charakterisierten Mausegewebeproben im Vergleich zu Lungengewebe ohne Tumoren wurde das PlexSet-Kit der nCounter Technologie der Firma NanoString verwendet.

Vor dem eigentlichen Versuchsdurchlauf wurden in Titrationsassays (vergleiche Kapitel 3.9.4) die RNA-Einsatzmenge und die konzentrationsabhängige Detektion der Transkripte durch die entworfenen Sonden kontrolliert und getestet. Die Titrationsläufe, in denen verschiedene Mengen an RNA in Verdünnungsreihen eingesetzt wurden, zeigten, dass eine konzentrationsabhängige Analyse im Bereich einer RNA-Einsatzmenge von 50-250 ng möglich war. Eine RNA-Einsatzmenge von 200 ng ergab stabile Ergebnisse bei der Detektion der Expression der ausgewählten Transkripte und Transkriptvarianten und wurde fortan angestrebt (vergleiche Tabelle A 4 im Anhang).

Zur Normalisierung der Signale des Versuchs wurde das „housekeeping“-Gen HPRT herangezogen. Die Analyse deckte ausgewählte Gene ab, die unterschiedliche Zellfunktionen innehaben. Neben der Expression zweier LSD1-Transkriptvarianten wurde die Expression von Genen untersucht, die im Metabolismus (Aldolase, Fumarase), in dem posttranskriptionellen RNA-Reifungsprozess (hnRNP A1, hnRNP A2/B1, SRSF1, SRSF3), in der mitochondrialen Aktivität (PINK1, NDUFS 6, NDUFS 7, NDUFS 8), sowie in der Zellentwicklung und Seneszenz (TERT, lin 28 A und B, Myc) eine Rolle spielen (vergleiche Tabelle 1).

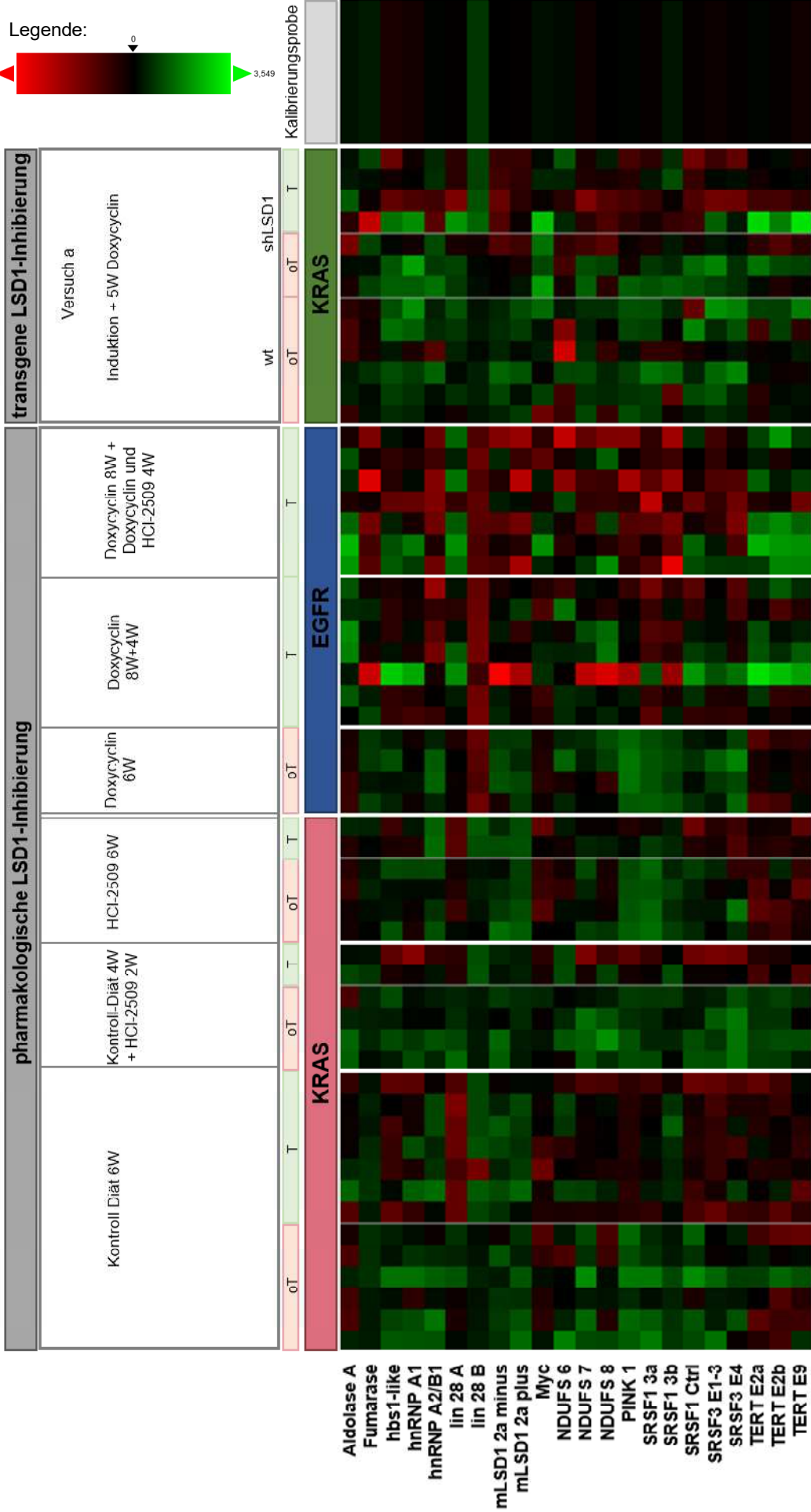
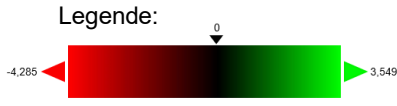
Die in Abbildung 21 gezeigte „Heatmap“ gibt einen ersten Überblick über die Expressionsunterschiede der Transkriptvarianten der genannten Gene in den Mutations- und Behandlungsgruppen der Mausproben.

In Lungengewebe mit und ohne Tumor oder bezüglich LSD1-Inhibierung versus der Kontrollbehandlung zeigte sich bei den meisten Transkripten kein eindeutig divergentes Expressionsmuster. Die Expression von PINK1 war jedoch auffällig. Es zeigte im

Tumorgewebe im Vergleich zum Lungengewebe ohne Tumor eine verminderte Expression.

Lin 28 A wurde hingegen zwar in den KRAS basierten LuAD vermindert exprimiert, eine abgeschwächte Expression fand man jedoch nicht in den LuAD der Mäuse, die Tumore auf dem Boden einer EGFR Mutation entwickelt hatten (Abbildung 21).

Die verschiedenen Transkriptvarianten des SRSF1-Gens, die durch die Sonde SRSF1_Ctrl erfasst wurden, waren in den Lungengeweben mit Tumoren der pharmakologisch behandelten LuAD mit KRAS G12V Mutation geringer exprimiert. Die Expressionsdaten der SRSF1- und SRSF3-Transkriptionsvarianten wurden in weiteren Untersuchungen genauer betrachtet.



- Aldolase A
- Fumarase
- hbs1-like
- hnRNP A1
- hnRNP A2/B1
- lin 28 A
- lin 28 B
- mLSD1 2a minus
- mLSD1 2a plus
- Myc
- NDUFS 6
- NDUFS 7
- NDUFS 8
- PINK 1
- SRSF1 3a
- SRSF1 3b
- SRSF1 Ctrl
- SRSF3 E1-3
- SRSF3 E4
- TERT E2a
- TERT E2b
- TERT E9

Abbildung 21: „Heatmap“ der Genexpressionen in LuAD versus Lungenproben ohne Tumor in Abhängigkeit der Treibermutation KRAS G12V (KRAS) oder EGFR L858R (EGFR) und der pharmakologischen und transgenen LSD1-Inhibierung.

Die Ergebnisse (Zielsequenz/HPRT) sind nach Behandlungs- und Mutationsgruppenzugehörigkeit der Proben sortiert. Unten sind die alphabetisch geordneten Zieltranskripte vermerkt. Seitlich links sind die Informationen zu den Versuchsgruppen zusammengefasst.

(Tumor- (T) oder Lungengewebe ohne Tumor (oT), KRAS: RNA stammt aus Lungengewebe der C57BL/6N^{(TG(KRAS^{mut2}))}-Mäuse, EGFR: RNA stammt aus Lungengewebe der C57BL/6N^{(TG(CCSP-rTA))} mit C57BL/6N^{(TG(EGFR L858R))} gekreuzten Mäuse, shLSD1: RNA stammt aus Lungengewebe der C57BL/6N^{(TG(shLSD1))}-Mäuse, wt: Wildtyp, Dox: Doxycyclin, W: Woche/Wochen, Farblegende: 0: keine divergente Expression im Vergleich mit dem Kalibrierungsgemisch; Abweichungen davon rot gefüllt, bei niedrigerer Expression und grün bei höherer Expression)

4.4.1 Expressionsmuster der Transkriptvarianten des SRSF1 in murinen Lungenadenokarzinomen in Abhängigkeit der LSD1-Inhibierung

Die Expression des SRSF1 sowie dessen Spleißvarianten wurden in murinen Lungenadenokarzinomen untersucht, die sich entweder aufgrund der Treibermutation KRAS G12V (Kapitel 4.4.1.1 und 4.4.1.2) oder aufgrund einer EGFR L858R Mutation (Kapitel 4.4.1.3) entwickelt hatten. Um den Einfluss von LSD1 auf die Expression von SRSF1 und der SRSF1-Spleißmuster zu erfassen, wurden die RNA-Proben der transgenen LuAD-Mausmodelle nach pharmakologischer LSD1-Inhibierung (Kapitel 4.4.1.1 und 4.4.1.3) beziehungsweise nach Inhibierung durch in-vivo shRNA-Interferenz (4.4.1.2) in die Studie einbezogen. Zur Betrachtung der Gesamtexpression des SRSF1-Gens wurde die Sonde SRSF1_Ctrl eingesetzt und zur Normalisierung der NanoString-Signale mit den Signalen der „housekeeping“-mRNA des HPRT-Gens ins Verhältnis gesetzt. Die SRSF1-mRNA umfasst drei Spleißvarianten, die sich in Exon 3 und Exon 4 unterscheiden (vergleiche Abbildung 19). Die Expression der Spleißvarianten wurde mit den Sonden SRSF_3a und SRSF_3b bestimmt. Zudem wurde untersucht, in welchem Verhältnis die Spleißvarianten in den LuAD unter dem Einfluss der LSD1-Inhibierung auftraten.

4.4.1.1 Expression des SRSF1 in murinen Lungenadenokarzinomen mit einer KRAS G12V Mutation in Abhängigkeit der pharmakologischen LSD1-Inhibierung

Die Gesamtexpression von SRSF1 war unter KRAS G12V Mutation in LuAD Tumorknoten gegenüber Lungengewebe ohne Tumorknoten signifikant erniedrigt. Da die SRSF1-Expression in den LuAD-Tumorearealen und in den Lungengeweben ohne Tumorknoten unter der Behandlung mit dem LSD1-Inhibitor HCI-2509 keinen Unterschied zu den Geweben aus Mäusen ohne Behandlung zeigte, sprechen die Ergebnisse dafür, dass die in vivo Expression des SRSF1 nicht unter dem Einfluss von LSD1 steht (Abbildung 22).

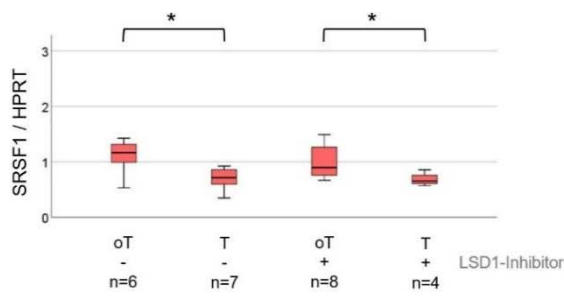


Abbildung 22: **SRSF1-Expression nach pharmakologischer LSD1-Inhibierung in KRAS G12V induzierten LuAD versus tumorfreien Lungengeweben.**

Sechs Wochen nach KRAS G12V Mutationsinduktion hatten sich in Mäusen, die mit dem LSD1-Inhibitor HCI-2509 behandelt wurden (+) oder nicht (-), LuAD gebildet. Die RNA wurde aus lasermikrodissezierten LuAD-Tumorknoten (T) oder aus tumorfreiem Lungengewebe (oT) isoliert und einer

NanoString-SRSF1-Expressionsanalyse mithilfe der SRSF1_Ctrl-Sonde unterzogen. Es erfolgte eine Normalisierung mit dem „housekeeping“-Gen HPRT (SRSF1/HPRT). n: Anzahl der Versuchstiere, *: Signifikanz: p-Wert <0,05 (große Effektstärke nach Cohen $r > 0,5$)

Die Expression der Variante 2SRSF1_3a war vergleichbar mit der Gesamtexpression von SRSF1 (Abbildung 23 A). Dagegen zeigten Varianten 1, 2SRSF1_3b in ihrer Expression keine Unterschiede in Tumorknoten gegenüber tumorfreiem Gewebe sowohl mit als auch ohne LSD1-Inhibierung (Abbildung 23 B).

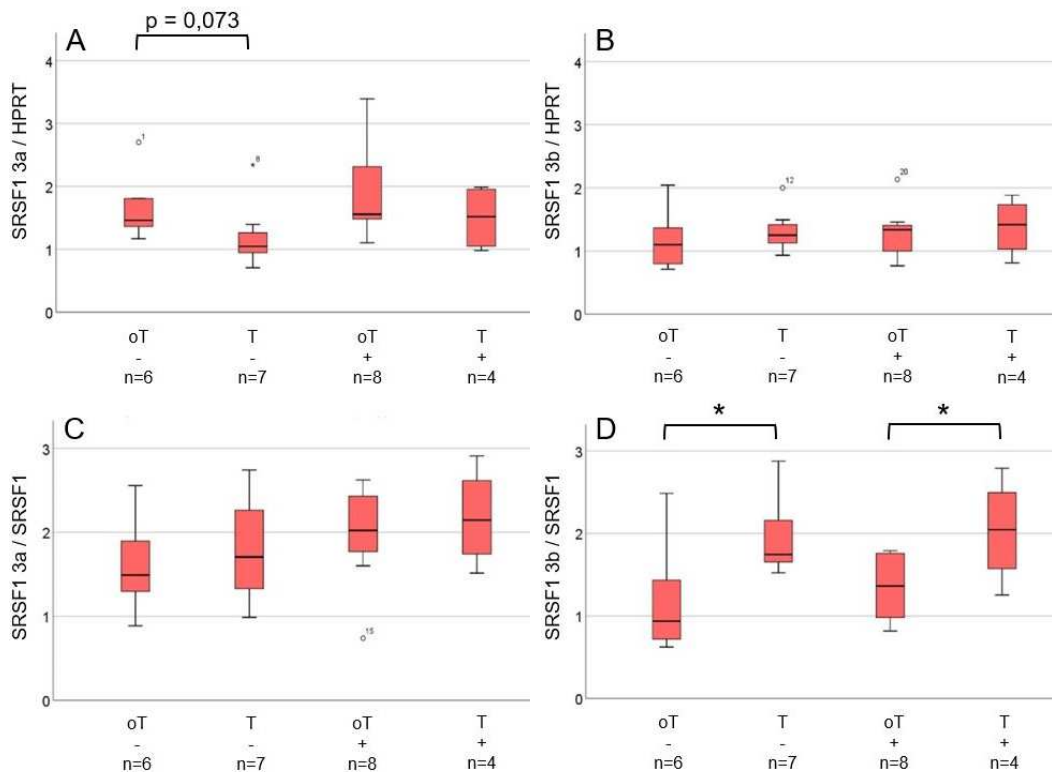


Abbildung 23: **Expression der SRSF1 Transkriptvarianten nach pharmakologischer LSD1-Inhibierung in KRAS G12V induzierten LuAD versus tumorfreien Lungengeweben.**

Sechs Wochen nach KRAS G12V Mutationsinduktion hatten sich in Mäusen, die mit dem LSD1-Inhibitor HCI-2509 behandelt wurden (+) oder nicht (-), LuAD gebildet. Die RNA wurde aus lasermikrodissezierten LuAD-Tumorknoten (T) oder aus tumorfreiem Lungengewebe (oT) isoliert und einer NanoString-SRSF1-Expressionsanalyse mithilfe der SRSF1_Ctrl- und spleißvariantenspezifischen Sonden (SRSF1_3a, SRSF1_3b) unterzogen. Die Expression der SRSF1-Spleißvariante 2SRSF1_3a und -varianten 1, 2SRSF1_3b wurde mithilfe des „housekeeping“-Gens HPRT normalisiert (A, B) oder ins Verhältnis zur Gesamtexpression (ermittelt mit der Sonde SRSF1_Ctrl) gesetzt (C, D). n: Anzahl der Versuchstiere, *: Signifikanz: p-Wert <0,05 (große Effektstärke nach Cohen $r > 0,5$), p: p-Wert bei knapp nicht signifikanten Werten

Um die Variabilität der Expression der Varianten gegen die der gesamten SRSF1 mRNA abgrenzen zu können, wurde die Expression der Variante 2SRSF1_3a und der Varianten 1, 2SRSF1_3b in das Verhältnis zur SRSF1-Gesamtexpression gesetzt. Diese Darstellung bestätigte, dass die Variante 2SRSF1_3a sich ähnlich wie die Gesamtexpression verhielt (Abbildung 23 C). Daneben verdeutlichte diese Darstellung der Daten, dass die SRSF1 Varianten 1, 2SRSF1_3b im Tumor im Vergleich zum Gewebe ohne Tumorknoten signifikant hochreguliert wurden und sich beinahe in LuAD-Tumorknoten verdoppelten, unabhängig von der LSD1-Inhibierung (Abbildung 23 D).

4.4.1.2 Expression des SRSF1 in murinen Lungenadenokarzinomen mit einer KRAS G12V Mutation in Abhängigkeit der LSD1-Inhibierung durch Doxycyclin induzierbare, transgene shLSD1 Expression

Nachdem zwar ein Unterschied der SRSF1-Gesamtexpression und der Expression der Variante 2SRSF1_3a in LuAD gegenüber Tumorknoten-freiem Lungengewebe nachgewiesen werden konnte, diese jedoch von der Behandlung mit dem pharmakologischen LSD1-Inhibitor unbeeinflusst war, sollte in einem nächsten Schritt untersucht werden, ob die SRSF1-Expression und das Auftreten der Spleißvarianten ebenfalls von einer Expressionsblockade mittels shRNA unbeeinflusst ist.

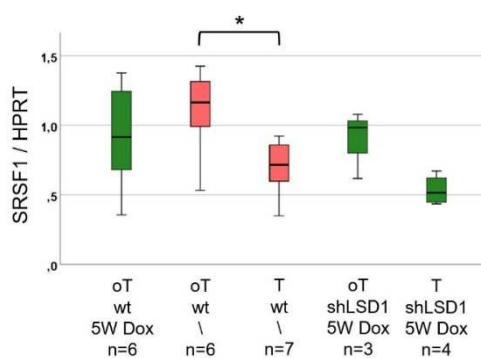


Abbildung 24: SRSF1-Expression in KRAS G12V induzierten LuAD versus tumorfreien Lungengewebe in Abhängigkeit einer shLSD1-abhängigen LSD1-Hemmung.

Fünf Wochen nach KRAS G12V Mutationsinduktion hatten sich in Mäusen LuAD gebildet, deren LSD1-Expression durch Doxycyclin-induzierte shLSD1-Expression während der Tumorentwicklung über den gesamten Zeitraum der 5 Wochen gehemmt wurde (vergleiche Kapitel 3.1.3). Zum Vergleich wurden Gewebeprobe mit und ohne Tumorentwicklung von KRAS G12V mutierten Mäusen hinzugezogen, welche keine pharmakologische LSD1-Inhibitor- und Doxycyclinbehandlung erhielten (rot markierte Boxplots; vergleiche Kapitel 3.1.2 und Abbildung 22; Erklärung siehe Text). Die RNA wurde aus lasermikrodissezierten LuAD-Tumorknoten (T) oder aus tumorfreiem Lungengewebe (oT) isoliert und einer NanoString-SRSF1-Expressionsanalyse mithilfe der SRSF1_Ctrl-Sonde unterzogen. Es erfolgte eine Normalisierung mit dem „housekeeping“-Gen HPRT (SRSF1/HPRT). Dox: Doxycyclingabe, n: Anzahl der Versuchstiere, W: Wochen, wt: Wildtyp, *: Signifikanz p-Wert <0,05 (große Effektstärke nach Cohen $r > 0,5$)

Aufgrund des nur unzureichend vorhandenen Probenmaterials konnten in diese Analysen keine shLSD1-Wildtypmäuse, die mit Doxycyclin behandelt wurden und Tumore entwickelten, eingeschlossen werden. Zum Vergleich wurden aus diesem Grund Gewebeprobe mit und ohne Tumor aus der Gruppe der Mausproben mit KRAS Mutation hinzugezogen (vergleiche Kapitel 3.1.2 und

Tabelle A 1 im Anhang: Proben-IDs aus Gruppe mit KRAS G12V Mutation und Kontrolldiät), welche nicht mit dem pharmakologischen LSD1-Inhibitor und auch nicht mit Doxycyclin behandelt worden waren.

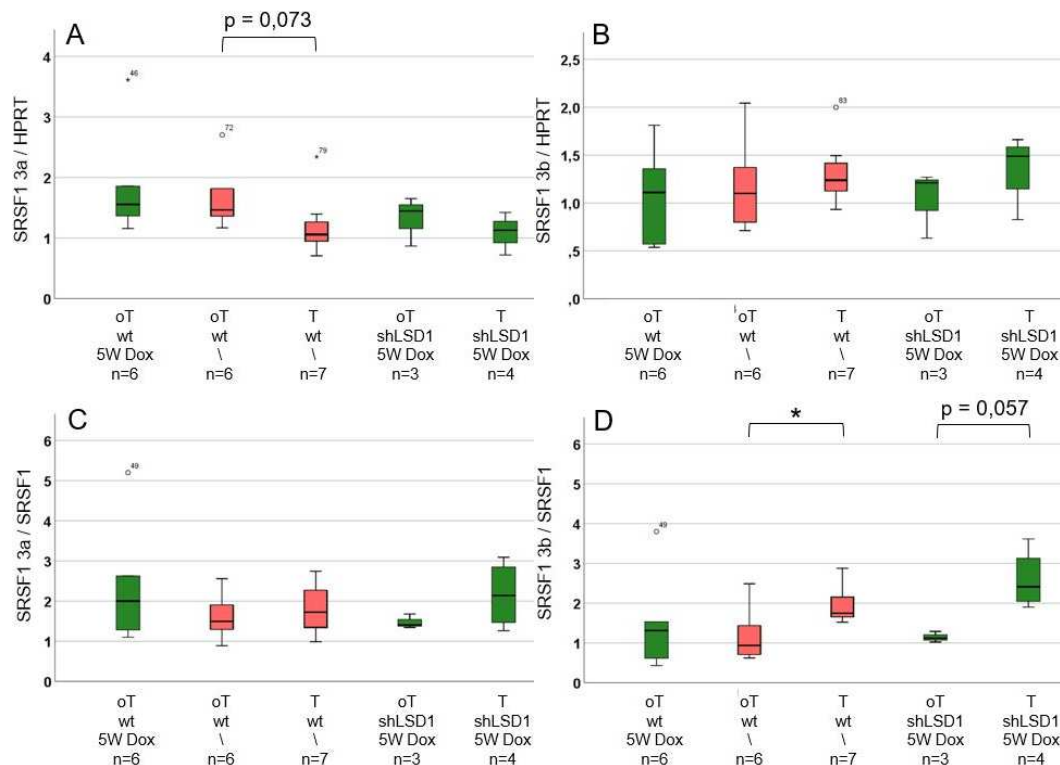


Abbildung 25: **Expression der SRSF1 Transkriptvarianten in KRAS G12V induzierten LuAD versus tumorfremem Lungengewebe in Abhängigkeit einer shLSD1-abhängigen LSD1-Hemmung.**

Fünf Wochen nach KRAS G12V Mutationsinduktion hatten sich in Mäusen LuAD gebildet, deren LSD1-Expression durch Doxycyclin-induzierte shLSD1-Expression während der Tumorentwicklung über den gesamten Zeitraum der 5 Wochen gehemmt wurde (vergleiche Kapitel 3.1.3). Zum Vergleich wurden Gewebeproben mit und ohne Tumorentwicklung von KRAS G12V mutierte Mäusen hinzugezogen, welche keine pharmakologische LSD1-Inhibitor- und Doxycyclinbehandlung erhielten (rot markierte Boxplots; vergleiche Kapitel 3.1.2; Erklärung siehe Text). Die RNA wurde aus laser-mikrodissezierten LuAD-Tumorknoten (T) oder aus tumorfremem Lungengewebe (oT) isoliert und einer NanoString-SRSF1-Expressionsanalyse mithilfe der SRSF1 Ctrl- und spleißvariantenspezifischen Sonden (SRSF1_3a, SRSF1_3b) unterzogen. Die Expression der SRSF1-Spleißvariante 2_{SRSF1_3a} und -varianten 1, 2_{SRSF1_3b} wurde mithilfe des „housekeeping“-Gens HPRT normalisiert (A, B) oder ins Verhältnis zur Gesamtexpression (ermittelt mit der Sonde SRSF1_Ctrl) gesetzt (C, D). Dox: Doxycyclingabe, n: Anzahl der Versuchstiere, W: Wochen, wt: Wildtyp, *: Signifikanz: p-Wert <0,05 (große Effektstärke nach Cohen $r > 0,5$), p: p-Wert bei knapp nicht signifikanten Werten

Die Expression der gesamten SRSF1-RNA-Population (SRSF1/HPRT) in Wildtypmäusen zeigte eine leichte Runterregulation in LuAD-Tumorknoten ohne Doxycyclinbehandlung im Vergleich zum Lungengewebe ohne Tumorknoten mit und ohne Doxycyclinbehandlung. Nach shLSD1 vermittelter LSD1-Inhibierung zeigten sich ähnliche Level der SRSF1-Gesamtexpression im Lungengewebe ohne Tumor wie in den Wildtypmäusen. Im Tumorgewebe zeigte sich eine verringerte Expression, vergleichbar mit den Leveln der Mausproben ohne Tumor ohne Doxycyclingabe. Diese Ergebnisse zeigten, dass die in Tumorealen

verminderte SRSF1-Expression nicht nur von der pharmakologischen LSD1-Inhibierung, wie in Kapitel 4.4.1.1 beschrieben, sondern auch von der transgenen shLSD1-Inhibierung unabhängig ist (Abbildung 24).

Bei Betrachtung der Expression der Variante 2SRSF1_3a konnte ebenfalls eine leichte Runterregulation im Tumorgewebe beobachtet werden. In den Varianten 1, 2SRSF1_3b war hingegen eine leichte Hochregulation in Tumorearealen versus Non-Tumorearealen zu beobachten. Auch hier zeigte sich keine Abhängigkeit von der shRNA vermittelten LSD1-Repression (Abbildung 25 A+B).

Anschließend wurde die Expression der Variante 2SRSF1_3a und Varianten 1, 2SRSF1_3b ins Verhältnis zur gesamten Expression von SRSF1 gesetzt. In diesem Ansatz konnte die Hochregulation der Varianten 1, 2SRSF1_3b in den Tumorknoten im Vergleich zum Lungengewebe ohne Tumor bestätigt werden, die bereits in den Versuchstieren beobachtet wurden, die zur pharmakologischen LSD1-Inhibierung eingesetzt worden waren (vergleiche Kapitel 4.4.1.1). Das Expressionsmuster im Tumor und Non-Tumor waren LSD1-inhibierungsunabhängig (Abbildung 25 C+D).

4.4.1.3 Expression des SRSF1 in murinen Lungenadenokarzinomen mit einer EGFR L858R Mutation in Abhängigkeit der pharmakologischen LSD1-Inhibierung

Neben den KRAS Treibermutationen sind die EGFR Mutationen vor allem im Exon 19 die häufigsten Mutationen im LuAD. Daher wurden für die Analyse der SRSF1-Expression auch Proben eines Mausmodells mit der aktivierenden EGFR L858R Mutation hinzugezogen. In dem Modell wurde die Mutation in den Clazellen der Lunge durch Doxycyclingabe induziert (vergleiche Abbildung 5). Die Lungenadenokarzinome waren im µCT nach 6-10 Wochen erkennbar ¹.

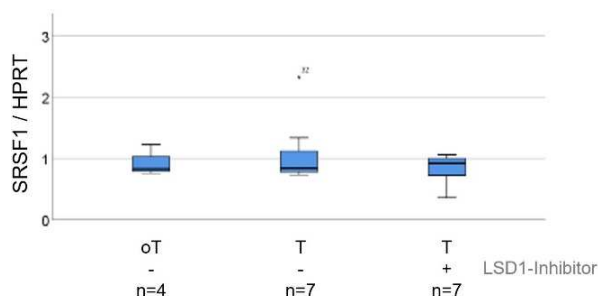


Abbildung 26: **SRSF1-Expression nach pharmakologischer LSD1-Inhibierung in EGFR L858R mutierten und mit Doxycyclingabe induzierten LuAD versus tumorfreien Lungengeweben.**

Sechs Wochen nach EGFR L858R Mutationsinduktion war noch kein Tumor in den Mäusen detektierbar (ohne Tumor, oT). Die Gewebeprobe mit LuAD wurden nach 12 Wochen Doxycyclinbehandlung zur Tumorinduktion analysiert (Tumor, T).

Sieben Mäuse waren in den letzten 4 Wochen mit dem LSD1-Inhibitor HCI-2509 behandelt worden (+), während weitere sieben Mäuse unbehandelt blieben (-). Die isolierte RNA wurde einer NanoString-SRSF1-Expressionsanalyse mithilfe der SRSF1_Ctrl-Sonde unterzogen. Es erfolgte eine Normalisierung mit dem „housekeeping“-Gen HPRT (SRSF1/HPRT). n: Anzahl der Versuchstiere

Für die Expressionsanalyse wurden Lungengewebebeobproben nach 6 Wochen Doxycyclingabe eingesetzt, in denen noch keine Tumore detektierbar waren. Zudem standen Gewebepbeobproben für die hier beschriebenen Studien zur Verfügung, die von Mäusen entnommen wurden, die 8 Wochen mit Doxycyclin behandelt worden waren und in denen daher das Tumorwachstum eingesetzt hatte (vergleiche Tabelle A 1 im Anhang) ¹. Diese Tiere waren zusätzlich entweder noch weitere 4 Wochen mit Doxycyclin oder mit Doxycyclin und dem LSD1-Inhibitor HCI-2509 behandelt worden (vergleiche Abbildung 5). Anschließend wurde in den Proben des EGFR L858R LuAD-Modells die SRSF1 Expression analysiert.

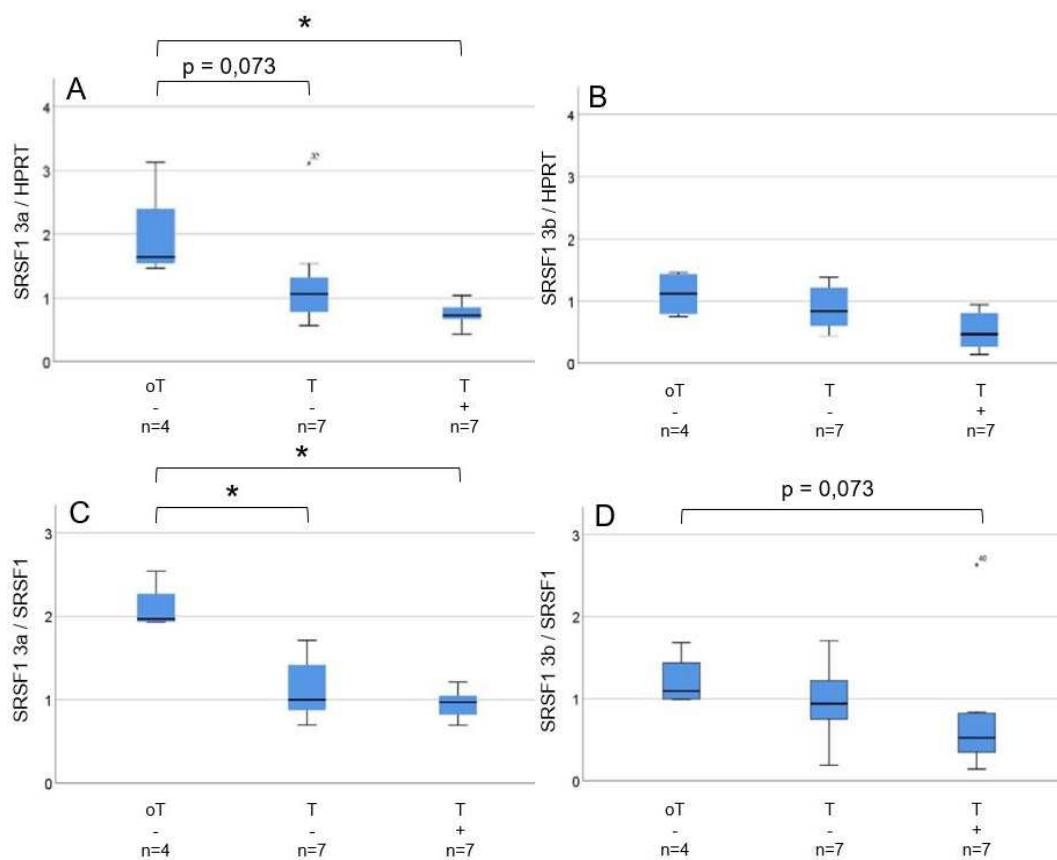


Abbildung 27: Expression der SRSF1 Transkriptvarianten nach pharmakologischer LSD1-Inhibition in EGFR L858R mutierten und mit Doxycyclingabe induzierten LuAD versus tumorfreien Lungengeweben.

Sechs Wochen nach EGFR L858R Mutationsinduktion war noch kein Tumor in den Mäusen detektierbar (ohne Tumor, oT). Die Gewebepbeobproben mit LuAD wurden nach 12 Wochen Doxycyclinbehandlung zur Tumorinduktion analysiert (Tumor, T). Sieben Mäuse waren in den letzten 4 Wochen mit dem LSD1-Inhibitor HCI-2509 behandelt worden (+), während weitere sieben Mäuse unbehandelt blieben (-). Die isolierte RNA wurde einer NanoString-SRSF1-Expressionsanalyse mithilfe der SRSF1_Ctrl- und spleißvariantenspezifischen Sonden (SRSF1_3a, SRSF1_3b) unterzogen. Die Expression der SRSF1-Spleißvariante 2_{SRSF1_3a} und -varianten 1, 2_{SRSF1_3b} wurde mithilfe des „housekeeping“-Gens HPRT normalisiert (A, B) oder ins Verhältnis zur Gesamtexpression (ermittelt mit der Sonde SRSF1_Ctrl) gesetzt (C, D). n: Anzahl der Versuchstiere, *: Signifikanz: p-Wert <0,05 (große Effektstärke nach Cohen r > 0,5), p: p-Wert bei knapp nicht signifikanten Werten

Die Gesamtexpression von SRSF1 (SRSF1/HPRT) in Lungengeweben, die noch keine Tumore entwickelt hatten, unterschied sich nicht zu der im Tumorgewebe. Ähnlich wie im KRAS LuAD-Mausmodell bereits beobachtet, war ebenfalls kein Unterschied in der Expression des SRSF1-Gens nach LSD1-Inhibierung erkennbar (Abbildung 26).

Bei Betrachtung der Expression der Variante 2SRSF1_3a fiel auf, dass die Variante im Tumorgewebe im Vergleich zum Nicht-Tumorgewebe runterreguliert war. Varianten 1, 2SRSF1_3b zeigten keine divergente Expression zwischen Nicht-Tumor- und Tumorgewebe.

Die Inhibierung von LSD1 führte zu einer weiteren Verminderung der Expression der Varianten, besonders aber der Varianten 1, 2SRSF1_3b im Tumorgewebe im Vergleich zum Tumorgewebe ohne Inhibierung (Abbildung 27 A und B).

Wurde die Expression der Variante 2SRSF1_3a beziehungsweise der Varianten 1, 2SRSF1_3b in Bezug zur gesamten Expression von SRSF1 gesetzt, so bestätigte sich das Bild (Abbildung 27 C und D).

4.4.2 Expressionsmuster der Transkriptvarianten des SRSF3 in murinen Lungenadenokarzinomen in Abhängigkeit der LSD1-Inhibierung

Als kleinstes Mitglied der SR-Proteine verändert auch SRSF3 konzentrationsabhängig das alternative Spleißen von mRNA vieler Gene und kann somit einen Einfluss auf Tumorgeneseprozesse nehmen^{65,74,83}. Dabei wird die Konzentration von SRSF3 selbst auch über autoregulatorische Prozesse im Rahmen des alternativen Spleißens gesteuert. Die zwei resultierenden SRSF3-Transkriptvarianten unterscheiden sich im Vorhandensein von Exon 4 (vergleiche Abbildung 20). Die Insertion von Exon 4 führt aufgrund der Generierung eines Stop-Codons zu einer nicht aktiven Form⁷⁴.

Analog zu dem Prozedere beim SRSF1 wurde auch beim SRSF3 vorgegangen, um die Expressionsmuster aller Transkriptvarianten (erfasst mittels der Sonde SRSF3_E1-3) und der Transkriptvariante speziell mit Exon 4 (erfasst mittels der Sonde SRSF3_E4) zu ermitteln und zu vergleichen.

4.4.2.1 Expression des SRSF3 in murinen Lungenadenokarzinomen mit einer KRAS G12V Mutation in Abhängigkeit der pharmakologischen LSD1-Inhibierung

Die Betrachtung der Gesamtexpression mit der Sonde SRSF3_E1-3 zeigte in KRAS G12V basierten Lungenadenokarzinomen eine Runterregulation im Tumorgewebe gegenüber Lungengewebe ohne Tumorknoten. Nach pharmakologischer Inhibierung von LSD1 war im Gegensatz dazu eine leichte Hochregulation des Faktors in Lungengewebe ohne Tumor und ebenso mit Tumor zu verzeichnen. Der Expressionsspiegel des Faktors SRSF3 glich demnach im Tumorgewebe nach Inhibierung dem des Gewebes ohne Tumor ohne Inhibierung (Abbildung 28 A).

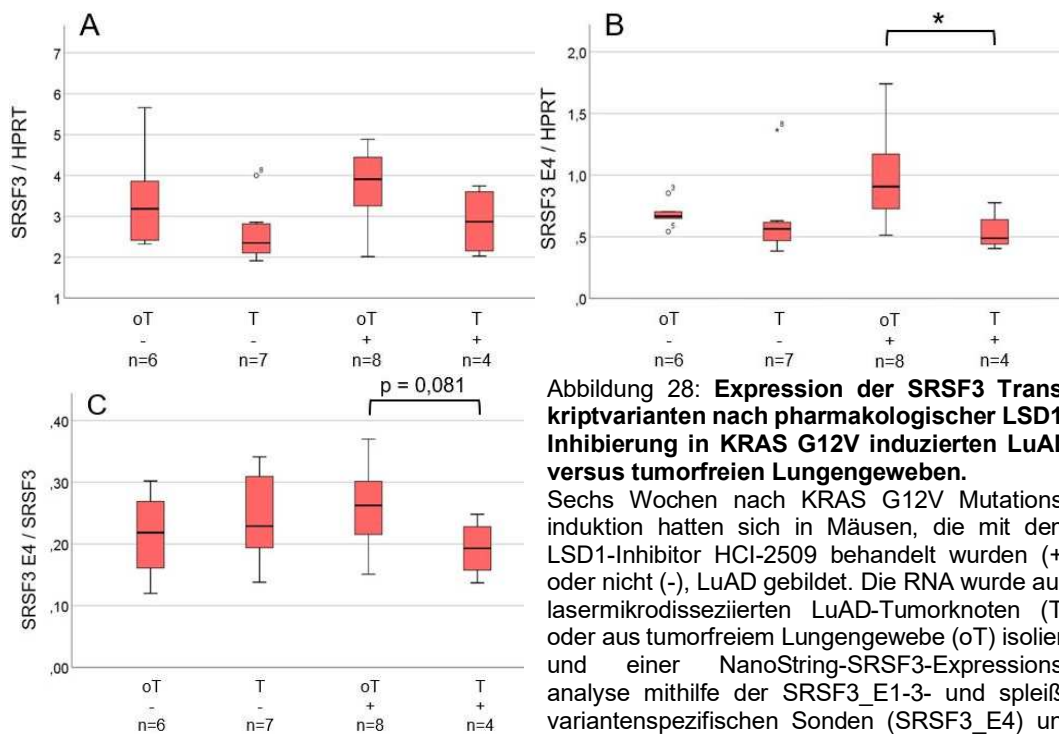


Abbildung 28: Expression der SRSF3 Transkriptvarianten nach pharmakologischer LSD1-Inhibierung in KRAS G12V induzierten LuAD versus tumorfreien Lungengewebe.

Sechs Wochen nach KRAS G12V Mutationsinduktion hatten sich in Mäusen, die mit dem LSD1-Inhibitor HCI-2509 behandelt wurden (+) oder nicht (-), LuAD gebildet. Die RNA wurde aus lasermikrodissezierten LuAD-Tumorknoten (T) oder aus tumorfreiem Lungengewebe (oT) isoliert und einer NanoString-SRSF3-Expressionsanalyse mithilfe der SRSF3_E1-3- und spleißvariantenspezifischen Sonden (SRSF3_E4) unterzogen. Die Gesamtexpression des SRSF3 (ermittelt mithilfe der Sonde SRSF3_E1-3), sowie die der Spleißvariante SRSF3 E4 (ermittelt mithilfe der Sonde SRSF3_E4) wurden mithilfe des „housekeeping“-Gens HPRT normalisiert (A, B) oder zueinander ins Verhältnis gesetzt (C). n: Anzahl der Versuchstiere, *: Signifikanz: p-Wert <0,05 (große Effektstärke nach Cohen $r > 0,5$), p: p-Wert bei knapp nicht signifikanten Werten

Die Expression des Exons 4 war vergleichbar mit der Gesamtexpression. Nach LSD1-Inhibierung zeigte sich allerdings im Lungengewebe ohne Tumor eine höhere Expression der Exon 4 positiven SRSF3 Variante, die zur inaktiven Proteinisoform führte. Im Tumorgewebe schien die Variante mit Exon 4 unabhängig von der LSD1-Inhibierung exprimiert zu werden (Abbildung 28 B).

In unbehandelten Proben zeigte sich für die Expressionen der SRSF3-Transkriptvarianten kein Unterschied im Lungengewebe mit und ohne Tumor. Nach

pharmakologischer LSD1-Inhibierung war im Verhältnis zur Gesamtexpression eine geringere Expression der Transkriptvariante mit Exon 4 im Tumorgewebe erkennbar (Abbildung 28 C).

4.4.2.2 Expression des SRSF3 in murinen Lungenadenokarzinomen mit einer KRAS G12V Mutation in Abhängigkeit der LSD1-Inhibierung durch Doxycyclin induzierbare, transgene shLSD1 Expression

Entsprechend den oben beschriebenen Beobachtungen der Expression von SRSF3 bei KRAS G12V mutierten Lungenadenokarzinomproben ohne pharmakologische LSD1-Inhibierung, war auch bei den Mäusen ohne transgene shLSD1-Inhibierung eine SRSF3-Runterregulation in Lungengewebe ohne Tumore im Vergleich zu den LuAD-Proben zu erkennen. Die transgene LSD1-Inhibierung durch das shLSD1-Konstrukt führte zu einer Verminderung der SRSF3-Expression sowohl in Lungengewebe ohne Tumor als auch mit Tumor (Abbildung 29).

Unabhängig von einer transgenen LSD1-Inhibierung durch shLSD1-Expression war im Lungengewebe ohne und mit Tumor kein deutlicher Unterschied der Expressionslevel von Exon 4 zu beobachten (Daten nicht gezeigt).

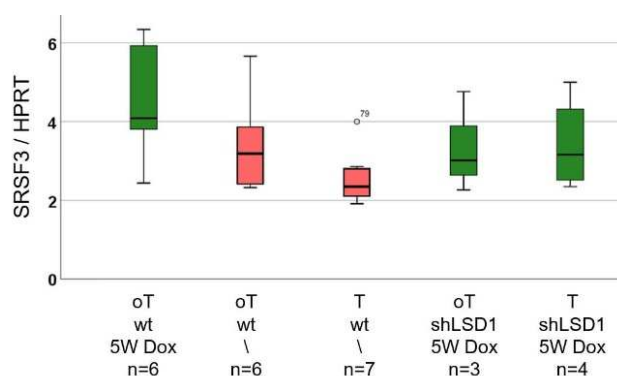


Abbildung 29: **Gesamtexpression von SRSF3 in KRAS G12V induzierten LuAD versus tumorfreien Lungengewebe in Abhängigkeit einer shLSD1-abhängigen LSD1-Hemmung.**

Fünf Wochen nach KRAS G12V Mutationsinduktion hatten sich in Mäusen LuAD gebildet, deren LSD1-Expression durch Doxycyclin-induzierte shLSD1-Expression während der Tumorentwicklung über den gesamten Zeitraum der 5 Wochen gehemmt wurde (vergleiche Kapitel 3.1.3). Zum Vergleich wurden

Gewebeproben mit und ohne Tumorentwicklung von KRAS G12V mutierten Mäusen hinzugezogen, welche keine pharmakologische LSD1-Inhibitor- und Doxycyclinbehandlung erhielten (rot markierte Boxplots; vergleiche Kapitel 3.1.2; Erklärung siehe Text). Die RNA wurde aus lasermikrodissezierten LuAD-Tumorknoten (T) oder aus tumorfreiem Lungengewebe (oT) isoliert und einer NanoString-SRSF3-Expressionsanalyse mithilfe der SRSF3_E1-3-Sonde unterzogen. Es erfolgte eine Normalisierung mit dem housekeeping-Gen HPRT (SRSF3/HPRT). Dox: Doxycyclingabe, n: Anzahl der Versuchstiere, W: Wochen, wt: Wildtyp

4.4.2.3 Expression des SRSF3 in murinen Lungenadenokarzinomen mit einer EGFR L858R Mutation in Abhängigkeit der pharmakologischen LSD1-Inhibierung

Im Gegensatz zu den Beobachtungen bei durch KRAS G12V induzierten Lungenadenokarzinomen war bei Lungenadenokarzinomen auf Basis einer EGFR L858R Mutation im Vergleich zum Normalgewebe eine Hochregulation von SRSF3 im Tumorgewebe zu erkennen. Nach Inhibierung von LSD1 wurde die SRSF3-Expression im Tumor runterreguliert (Abbildung 30 A).

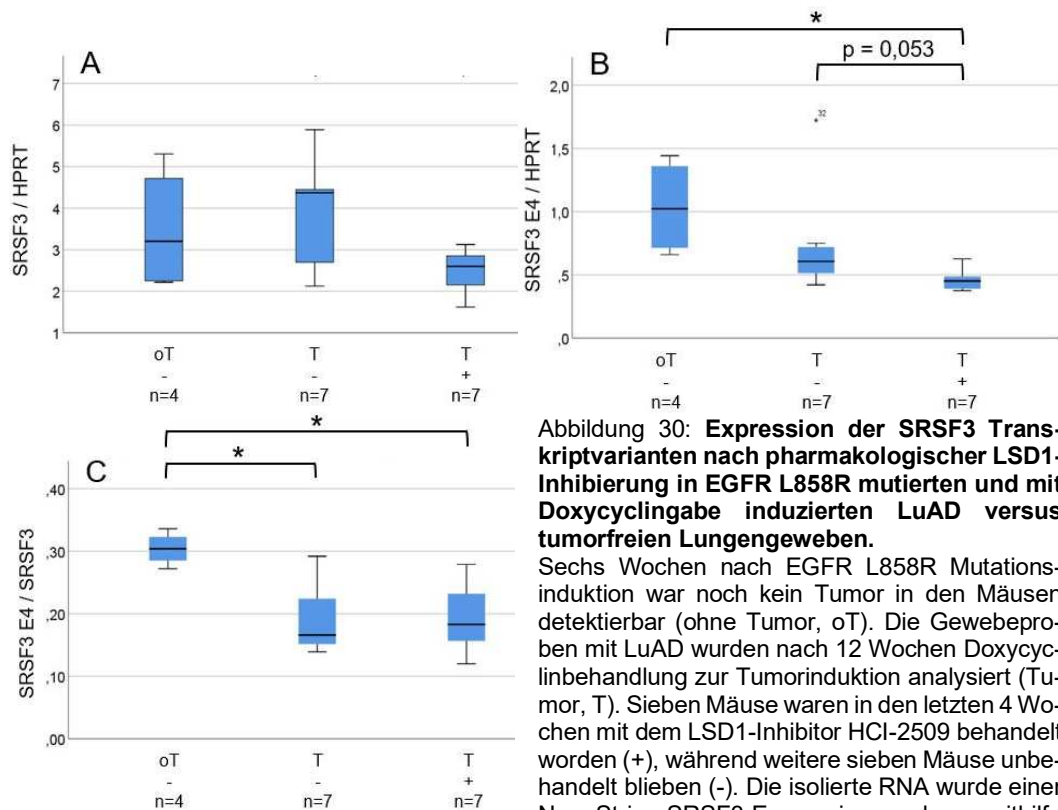


Abbildung 30: **Expression der SRSF3 Transkriptvarianten nach pharmakologischer LSD1-Inhibierung in EGFR L858R mutierten und mit Doxycyclingabe induzierten LuAD versus tumorfreien Lungengeweben.**

Sechs Wochen nach EGFR L858R Mutationsinduktion war noch kein Tumor in den Mäusen detektierbar (ohne Tumor, oT). Die Gewebeproben mit LuAD wurden nach 12 Wochen Doxycyclinbehandlung zur Tumorinduktion analysiert (Tumor, T). Sieben Mäuse waren in den letzten 4 Wochen mit dem LSD1-Inhibitor HCI-2509 behandelt worden (+), während weitere sieben Mäuse unbehandelt blieben (-). Die isolierte RNA wurde einer NanoString-SRSF3-Expressionsanalyse mithilfe

der SRSF3_E1-3- und spleißvariantenspezifischen Sonden (SRSF3_E4) unterzogen. Die Gesamtexpression des SRSF3 (ermittelt mithilfe der Sonde SRSF3_E1-3), sowie die der Spleißvariante SRSF3 E4 (ermittelt mithilfe der Sonde SRSF3_E4) wurden mithilfe des „housekeeping“-Gens HPRT normalisiert (A, B) oder zueinander ins Verhältnis gesetzt (C). n: Anzahl der Versuchstiere, *: Signifikanz: p-Wert <0,05 (große Effektstärke nach Cohen $r > 0,5$), p: p-Wert bei knapp nicht signifikanten Werten

Im Gegensatz zu der SRSF3-Gesamtexpression wurde die Exon 4 positive SRSF3 Transkriptvariante im Tumorgewebe im Vergleich zum Non-Tumor-Lungengewebe vermindert exprimiert (Abbildung 30 B).

Die reduzierte Expression der Exon 4 positiven SRSF3 Isoform im Tumorgewebe versus dem Non-Tumor-Lungengewebe zeigte sich besonders deutlich, wenn die Expression der SRSF3 Exon 4-positiven Variante ins Verhältnis zur SRSF3-Gesamtexpression gesetzt wurde, unabhängig von der LSD1-Inhibierung

(Abbildung 30 C). Die Variante mit Exon 4 wurde im Nicht-Tumorgewebe demnach mehr exprimiert als im Tumorgewebe.

5. Diskussion

In dieser Arbeit wurden Lungenadenokarzinome transgener Mausmodelle herangezogen, um den Einfluss von LSD1 auf die Expression der transaktivierenden Spleißfaktoren SRSF1 und SRSF3 zu untersuchen. Dafür wurde zunächst das zur Verfügung stehende Gewebematerial gesichtet, die notwendige Tumorgroße und -knotenanzahl für die Laser-Mikrodissektion und anschließende RNA-Aufreinigung abgeschätzt, sowie die Zielsequenzen für die Expressionsanalyse definiert. Nach Dissektion der Tumorfleichen wurden die Expressionsprofile mittels der nCounter-Technologie analysiert und damit die grundlegenden Voraussetzungen geschaffen, Spleißvariantenexpressionen in formalinfixiertem und paraffin-eingebettetem Gewebe zu untersuchen.

5.1 Expressionsanalyse nach Laser-Mikrodissektion von Tumorknoten aus formalinfixiertem und paraffineingebettetem Gewebe

In der vorgelegten Arbeit wurde RNA aus lasermikrodissezierten FFPE-Gewebearealen isoliert und anschließend mithilfe der nCounter-Technologie der Firma NanoString auf Expressionsprofile onkogener Schlüsselmediatoren untersucht.

Für den Expressionsnachweis können bestimmte mRNA-Spezies durch PCR-basierte oder durch Sondenhybridisierungs-basierte Methoden oder eine Kombination beider Techniken nachgewiesen werden. In der vorliegenden Studie wurde die Sondenhybridisierung in einem PlexSet-Ansatz der nCounter-Technologie genutzt. Bei dieser Technologie bedarf es keiner RNA-Amplifikation und keinem Einsatz von reverser Transkriptase, wie es zum Beispiel bei einer qPCR von Nöten ist ^{81,84}. Gegenüber der PCR-Amplifikation mit vorgeschalteter cDNA-Synthese birgt daher die nCounter-Hybridisierungstechnologie den Vorteil, dass eine Genexpressionsermittlung ohne Zwischenschritte und Amplifikation des Detektionssignals stattfindet und ein 1-zu-1-Nachweis von detektiertem Transkript und Fluoreszenzhybridisierungssignal gelingt (vergleiche Protokoll des Herstellers NanoString ⁸¹). Dadurch kommt es zu einem sehr weiten Detektionsbereich, der im Gegensatz zur quantitativen PCR im geringeren Maße von einem limitierten Vorhandensein des zu detektierenden Transkriptes oder von einer Detektionssättigung abhängt.

In dem PlexSet-Ansatz können 24 Zielgene parallel untersucht werden. Ein vorgefertigtes Assay-Set ermöglicht dabei die simultane Analyse von bis zu 96 Proben. Dabei wird die Sondenhybridisierung, die Nachbereitung der Proben, sowie die Signalauslese automatisiert durchgeführt ⁸⁴. Neben RNA aus lysierten Zellen und nativem Gewebe ist auch RNA aus FFPE-Gewebe für die nCounter-Technologie einsetzbar. Eine Formalin-

fixierung führt zu kovalenten Bindungen zwischen Proteinen und Nukleinsäuren. Aufgrund dieses Einflusses der Formalinfixierung kommt es bei der Isolierung der Nukleinsäuren aus FFPE-Material zur Fragmentierung dieser und die Qualität der isolierten RNA ist daher niedrig ^{85,86}. Jedoch speziell bezüglich aus FFPE-Gewebe gewonnener RNA verspricht die Firma NanoString mit ihrer nCounter-Technologie gute Ergebnisse, da es sich um eine enzymlose Technologie handelt und die beiden Sonden lediglich kurze, insgesamt etwa einhundert Basen lange Zielsequenzen erkennen und binden müssen. Somit beeinflusst eine RNA Fragmentierung nicht die Güte des Nachweises ⁸¹. Obwohl auch bei der PCR mit Fragmentgrößen kleiner 150 bp gearbeitet werden kann ⁸⁷ und sie daher auch für FFPE-Material einsetzbar ist, spricht für die NanoString-Methode, dass ohne Hochamplifikation des Präparats direkte Messungen zur Quantifizierung ablaufen. Im Gegensatz dazu werden bei einer quantitativen PCR nach Amplifikation indirekt Rückschlüsse auf die vorhandene RNA-Menge gemacht. Die Ergebnisse einer direkten Messung können als genauer und wahrheitsgetreuer erachtet werden mit weniger Verfälschungsmöglichkeiten der Daten. Des Weiteren sind Positiv- und Negativkontrollen in dem NanoString-Versuchsaufbau bereits enthalten. Geiss et al. und Malkov et al. haben festgestellt, dass das nCounter System ähnlich sensitiv ist wie die real-time PCR, aber sensitiver als ein Mikroarray Hybridisierungssassay ^{88,89}.

Die Nutzung von RNA aus formaldehydfixiertem Material und von Gewebeflächen unterschiedlicher Größe mit der NanoString Technik, wie in der vorliegenden Arbeit, ist für die nachfolgende Analyse von Expressionsprofilen von besonderem Wert, da in der Klinik häufig nur FFPE-Material zur Verfügung steht. Wenn Gewebe jedoch sehr lang in Formalin liegt, nimmt die Fragmentierung weiter zu und bei hoher Fragmentierung ist dann selbst die Anlagerung kurzer Sonden nicht mehr möglich. In pathologischen Instituten wird heutzutage versucht eine maximale Einwirkungszeit von drei Tagen einzuhalten, was in der Regel zu Fragmentlängen von im Mittel 150-500 Basen führt (persönliche Mitteilung M. Odenthal).

Obwohl in der nCounter-Technologie im Gegensatz zur PCR keine cDNA-Synthese notwendig ist, ist diese Technologie nicht zeitsparender, insbesondere da die Vorbereitung der Assays sehr arbeits- und zeitintensiv ist. Zu der Vorbereitung des hier angesetzten PlexSet-Versuchs gehörte unter anderem das Sondendesign, die Austestung der Signalstärke und die Konzentrationsanpassung der Proben. Gerade die Titrationsansätze, um die ausreichende RNA-Einsatzmenge festzulegen, ist gegenüber PCR-Methoden wesentlich aufwändiger. Entgegen des erwarteten geringeren Arbeitsaufwands war die Probenvorbereitung sehr komplex, insbesondere die Konzentrationsanpassung mit

zum Teil wenig vorhandener Materialmenge aufgrund des Einsatzes der Laser-Mikrodissektion.

Um die Expressionsprofile in Tumorknoten gegenüber dem tumorfremden Material zu differenzieren, sollte die RNA aus lasermikrodissezierten Material isoliert werden. Für die Laser-Mikrodissektion wurden die Areale der Tumore bestimmt, die mindestens einzusetzen sind, um sicherzustellen, dass genügend RNA für die Expressionsanalyse zur Verfügung steht. Die Ergebnisse der RNA-Ausbeute zeigten keine lineare Abhängigkeit zur Tumorphäche der eingesetzten Tumoreareale. Insgesamt war aber dennoch eine grobe Abschätzung des benötigten Materials möglich und eine Fläche von 4 mm² wurde als minimale Einsatzfläche für eine Laser-Mikrodissektion festgelegt. Vergleichbare Areale wurden bereits in früheren Publikationen als angezielte Größe eingesetzt, allerdings war die gewonnene RNA-Menge hier geringer⁹⁰. Unterschiedliche Ausbeute an RNA könnten sich aber durchaus in den Unterschieden der Gewebearchitektur und der unterschiedlichen Syntheseleistung der Zellen begründen.

Die Verwendung der Methodik der Laser-Mikrodissektion ermöglichte letztlich die differenzierte Gewinnung des Tumorgewebes in Form der Knoten ohne Einschluss des umher liegenden Bindegewebes oder anderer Zellarten^{91,92}. In der vorliegenden Arbeit wurde das MicroBeam-System der Firma Zeiss genutzt⁹³. Die ausgewählten Gewebearale wurden mit einem UV-A Laserstrahl (355nm) in kurzen Pulsen geschnitten, wodurch es nicht zu einer Schädigung der Zellen, RNA und DNA durch Erhitzung kommen sollte⁹³. Durch einen stärkeren Laserstoß beziehungsweise durch Änderung des Laserfokusses wurde das ausgeschnittene Gewebe entgegen der Schwerkraft in die Deckel eines Reaktionsgefäßes katapultiert, welche zur besseren Haftung mit Silikon gefüllt waren⁹³. Durch die Technik des Katapultierens und den somit auf den Umgang mit den Reaktionsgefäßen reduzierten manuellen Kontakt sollte die Möglichkeit einer Verunreinigung der Proben minimiert werden. Trotz exakten Arbeitens konnte jedoch nicht grundsätzlich verhindert werden, dass Anteile des vermessenen Materials verloren gingen, da nicht immer das gesamte ausgeschnittene Gewebe im Deckel des Reaktionsgefäßes aufgefangen werden konnte. Des Weiteren schien die Haftkapazität des Deckels nach einer Fläche von etwa 5 mm² ausgeschöpft zu sein. Unter stetiger Sichtkontrolle wurde sich bemüht einen solchen Verlust an Material zu vermeiden.

Alternativ zu der Technik der Firma Zeiss gibt es weitere Verfahren, bei denen der potenziell verlustreiche Aspekt des Materialeinfangens umgangen werden könnte. Im Rahmen der Laser-Mikrodissektion der Firma Leica zum Beispiel werden die Proben mithilfe der Schwerkraft gesammelt. Die Objektträger werden im Vergleich zu der in dieser Arbeit verwendeten Methode andersherum eingesetzt und das Gewebe fällt nach

dem Ausschneiden mit einem Laser direkt in die Versuchsgefäße⁹⁴. Hier kann eine Streuung des ausgewählten Gewebes verhindert werden, jedoch kann auch Gewebe, das nicht spezifisch ausgewählt wurde, der Schwerkraft in das Gefäß folgen und als Kontamination wirken.

Bei der Laser-Mikrodissektionstechnik ArcturusXT von ThermoFisher Scientific wird hingegen ein Film im Deckel des Reaktionsgefäßes mit dem ausgeschnittenen Areal mit Infrarot-Laser verschmolzen, wodurch das ausgewählte Gewebeareal kontaminationsfrei vom Restgewebe abgehoben werden kann⁹⁵. In der MMI CellCut-Technik der Molecular Machines and Industries AG wird das ausgeschnittene Areal durch Herunterfahren des Deckels und direkten Kontakt des in dem Deckel befindlichen, haftenden Material aufgenommen^{96,97}. Durch diese Methoden kann die Streuung, die in der Laser-Mikrodissektion nach Zeiss durch die Funktion des Katapultierens auftrat, umgangen werden. Außerdem kann bei der alternativen Methode des ArcturusXT neben Ultraviolett-Laser auch Infrarot-Laser eingesetzt werden, als sanftere Methode um einzelne oder wenige Zellen zu sammeln⁹⁵. Dadurch können mögliche Schädigungen der Gewebemorphologie reduziert werden. Des Weiteren liegt bei dem MMI CellCut-System eine Membran auf dem Gewebe auf, welches auf einem Objektträger liegt⁹⁶. Diese Membran wird mitgeschnitten und ermöglicht möglicherweise eine bessere Bildgebung als bei dem System der Firma Zeiss, da hier das Präparat bedeckt ist und die histologische Bildgebung vergleichbar erscheint mit der Nutzung eines Deckglases. In dem hier beschriebenen Ansatz unter Verwendung der Zeiss-Apparatur konnte durch Fixierungsspray eine Eindeckung des Präparats simuliert werden und dadurch das histologische Bild, die Führung des Lasers und die Schneidegenauigkeit verbessert werden.

Unter Verwendung des Laser-Mikrodissektionverfahrens der Firma Zeiss wurden nur so viele Schnitte vorbereitet und gefärbt, wie auch tatsächlich an einem Tag bearbeitet werden konnten. Die Proben waren bei Verwendung trocken, die Arbeitsoberflächen wurden mit RNase Zap gereinigt und die Reaktionsgefäße wurden nach der Laser-Mikrodissektion vorsichtig aus der Halterung entnommen und geschlossen. Dieses Vorgehen steht im Einklang mit den Empfehlungen neuer Publikationen⁸⁵. Die Methode des Nano-String PlexSet-Versuchsaufbaus und die Laser-Mikrodissektion schienen insgesamt gut kombinierbar zu sein.

5.2 Expressionsprofile der serin-/argininreichen Spleißfaktoren 1 und 3

Nach Etablierung und Durchführung der Laser-Mikrodissektion wurde der nCounter-Ansatz eingesetzt, um das Expressionsmuster von Schlüsselfaktoren der Lungenkarzinogenese zu analysieren.

Divergente LSD1-Expressionsspiegel haben bekanntlich Einfluss auf grundlegende zelluläre Mechanismen, wie die mitochondriale Aktivität⁹⁸, die Differenzierung⁹⁹ und über die Mitose-Kontrolle auf den Zellzyklus¹⁰⁰⁻¹⁰². Die Expression von zentralen Mediatoren dieser Zellprozesse wurde untersucht, da sich auch in Zellkulturversuchen von Dalvi et al. (bislang unveröffentlichte Daten)⁶³ gezeigt hatte, dass sie durch LSD1 beeinflusst werden.

Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Odenthal an NSCLC-repräsentativen Zellkultursystemen hatten Hinweise ergeben, dass LSD1 auch den RNA-Reifungsprozess stark beeinflusst. Insbesondere konnte gezeigt werden, dass die pharmakologische LSD1-Inhibierung in humanen LuAD Zellen zu einer Repression von SRSF1 und SRSF3 führte (persönliche Mitteilung Dr. Priya Dalvi, Institut für Pathologie, Uniklinik Köln). Die Gene der SR Proteine sind zwischen Mensch und Maus konserviert^{73,75}. Um dem in-vivo Einfluss von LSD1 auf die Expression der SRSF1 und SRSF3 während der Karzinogenese von LuAD nachzugehen, wurden diese Spleißmediatoren in LuAD-Mausmodellen vertiefend untersucht und der Fokus auf diese beiden Faktoren gelegt.

Die Expression der Spleißfaktoren, sowie deren Transkriptisoformen wurden mittels der nCounter-Technologie lasermikrodissezierter Tumorknoten von KRAS G12V beziehungsweise EGFR L858R induzierten Lungenadenokarzinomen der Maus analysiert.

SRSF1 hat vielfältige zelluläre Funktionen. Er ist bei posttranskriptionellen Prozessen involviert wie unter anderem dem RNA-Transport aus dem Zellkern⁶⁵, der Genomstabilität¹⁰³, aber vor allem dem alternativen Spleißen⁶⁹ verschiedener Gene, wodurch er außerdem Einfluss auf den Zellzyklus, die Proliferation und Apoptose hat¹⁰⁴.

Es konnte festgestellt werden, dass nach KRAS G12V Mutation induzierter Lungenadenokarzinogenese die Transkription von SRSF 1 leicht, aber signifikant herunterreguliert wird (vergleiche Abbildung 22). Dies könnte einen möglichen Effekt auf die Tumorgenese bedeuten. Diese Daten stehen im Gegensatz zu den Beobachtungen anderer Autoren, welche eine Hochregulation von SRSF1 in Tumorerkrankungen, wie Mammakarzinomen^{68,105}, Gliomen⁶⁷, sowie bei Ovarialkarzinomen¹⁰⁶ beschreiben. Möglicherweise ist die Expression des Faktors SRSF1 jedoch im Lungenadenokarzinom anders als bei den bereits beschriebenen Krebserkrankungen. Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit widersprechen den Ergebnissen der Autoren Ezponda et al.¹⁰⁷ und Gout et al.⁷², die zeigen konnten, dass auch in nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen die Expression von SRSF1 hochreguliert wird. Sie zeigten eine erhöhte Expression von SRSF1, unterschieden jedoch nicht nach Subtypen, beziehungsweise nach Mutation. Eine Erklärung für die divergenten Ergebnisse wäre daher, dass SRSF1 KRAS mutationsabhängig

herunterreguliert wird und es unter anderen tumortreibenden Mutationen als der KRAS G12V Mutation zu einer Hochregulation der Expression des Faktors kommt.

Aufgrund der Annahme, dass die Expression von SRSF1 möglicherweise mutationsabhängig reguliert wird, wurde in dieser Arbeit ein weiteres Modell herangezogen und die Expression der serin-/argininreichen Spleißfaktoren in EGFR L858R mutierten Lungenkarzinomen betrachtet. Jedoch war auch hier keine Hochregulation des SRSF1 zu beobachten, sondern der Expressionsstatus verblieb unverändert (vergleiche Abbildung 26). Die EGFR-Aktivierung aktiviert aber auch den KRAS-Weg, weshalb es möglicherweise an der Aktivierung des EGFR/KRAS-Signalweges liegen könnte, dass keine Hochregulation festgestellt werden konnte. Ghigna et al. fanden heraus, dass in nicht familiären Colonadenokarzinomen das mRNA Level verschiedener serin-/argininreicher Spleißfaktoren, unter anderem auch von SRSF1 im Tumor, niedriger exprimiert ist als im benachbarten Normalgewebe ⁶⁶. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den hier gefundenen Daten an dem KRAS G12V LuAD Modell. Da Colonkarzinome mit einer Häufigkeit von circa 40 % KRAS-Mutationen beinhalten ¹⁰⁸⁻¹¹⁰, welche in dieser Arbeit bei Lungenadenokarzinomen untersucht wurden, ist die Runterregulation von SRSF1 möglicherweise doch auf die KRAS-Mutation zurückzuführen.

Des Weiteren wird vermutet, dass die Aktivität von SRSF1 und dessen Wirkungen durch ein Zusammenspiel mit anderen Mediatoren beeinflusst wird, welche antagonistische oder synergistische Wirkungen zeigen ⁷¹. Als Beispiel sei hier Sam68 genannt, Spleißregulator und Proto-Onkogen, welches über eine Regulation von SRSF1 die Epithelial-mesenchymale Transition epithelialer Tumore begünstigt ¹¹¹. Im Rahmen dieser Komplexität lässt sich also nicht ausschließen, dass in LuADs weitere Faktoren Einfluss nehmen, welche die hier ermittelte, generelle Runterregulation der SRSF1-Expression erklären könnten.

Entsprechend der Annahme, dass die meisten SR Proteine selbst posttranskriptionellen Modifikationen unterliegen, beschreiben Guo et al. und Sun et al. autoregulatorische Prozesse mithilfe alternativen Spleißens verschiedenster Introns und Exons und insgesamt sechs daraus resultierende Isoformen im menschlichen System ^{74,75}. Die Gene sind nahezu vollständig zwischen Mensch und Maus konserviert ^{73,75}. In dieser Arbeit wurden drei murine Varianten berücksichtigt, die in der NCBI-Datenbank abgelegt

waren (vergleiche Kapitel 4.3.1). Sowohl in der Maus als auch im Menschen ist das Exon 3 von einem alternativen Spleißvorgang betroffen. Interessanterweise unterscheiden sich die Spleißvarianten der Maus vom humanen System in dem Exon 3-Spleißmuster aber geringfügig. Dalvi et al. konnte in Zellkulturversuchen mit humanen Zellen feststellen, dass sich die Expression von SRSF1 gerade auch für diesen Bereich unter LSD1 Einfluss divergent verhält (Abbildung 31; unveröffentlichte Daten).

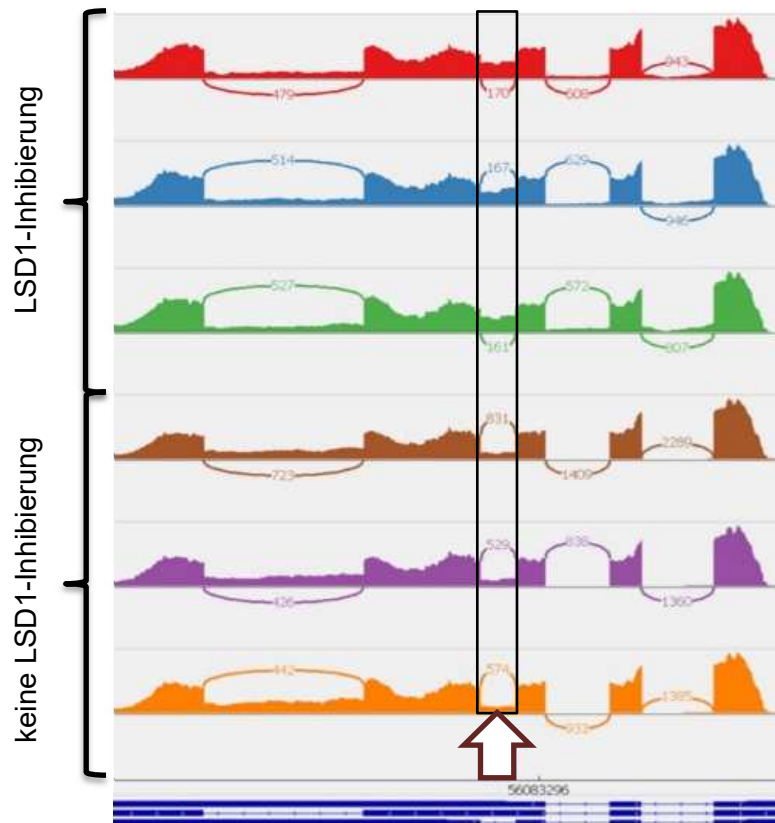


Abbildung 31: **Sashimi-Plot zur vergleichenden und quantitativen Darstellung von unterschiedlich gespleißten Exons und Isoformen des humanen SRSF1-Gens sechs verschiedener Proben der PC9 NSCLC Zelllinie unter dem Einfluss einer LSD1-Inhibierung (oben) oder ohne LSD1-Inhibierung (unten).**

Unten sind die mRNA Isoformen dargestellt mit feinen Linien für die Introns und dicken Blöcken für Exons. Die Abdeckung der Genregionen, die durch die Sequenzierung erfasst wurden, sind als „Peaks“ dargestellt. Die Bögen stellen Sequenzen dar, die Exons miteinander verbinden. Die Anzahl solcher exonverbindender Sequenzen ist gekennzeichnet. Die Umrahmung markiert den Bereich, der unter LSD1-Inhibierung vermehrt exprimiert wird (Abbildung von Dalvi et al.; bislang unveröffentlichte Daten ⁶³).

Die für diese Arbeit identifizierte Transkriptvariante 2 enthält ein besonders langes drittes Exon, welches in Transkriptvariante 1 in dieser Länge nicht vorhanden ist (vergleiche Abbildung 19). Dieses Exon und somit Transkriptvariante 2 soll über das Sondenpaar 3a erkannt werden (Variante 2SRSF1_3a). In den Transkriptvarianten 1 und 2 ist außerdem ein Teil eines Exons vorhanden, welches bei Transkriptvariante X1 nicht enthalten ist. Dieser Exonteil und somit die Expression der Transkriptvarianten 1 und 2 wurden durch das Sondenpaar 3b ermittelt (Varianten 1, 2SRSF1_3b). Im Vergleich dazu weist

im humanen System lediglich eine von drei Varianten eine vergleichbare Divergenz im Exon 3 vor (vergleiche Abbildung 31).

Im Rahmen der Literaturrecherchen für diese Arbeit konnten keine genaue Angaben zu Funktionen dieser beobachteten Varianten gefunden werden. Außerdem sind keine exakten Funktions- oder Aktivitätsunterschiede zwischen den Varianten bekannt und es wurde auch noch nicht festgestellt, ob es Veränderungen im Protein-Muster gibt, welche die Karzinogenese weiter ankurbeln könnten. In der vorliegenden Arbeit wurde getestet, wie sich die gesamte Expression von SRSF1 und die der beschriebenen Spleißvarianten in Tumor- und Nichttumorgewebe mit und ohne Inhibierung von LSD1 verhält.

Im Gegensatz zu der Runterregulation der SRSF1 Gesamtexpression und der Variante 2SRSF1_3a bei KRAS G12V mutierten LuAD zeigte sich bei Varianten 1, 2SRSF1_3b im Tumorgewebe im Verhältnis zur Expression aller Varianten eher eine Hochregulation (vergleiche Abbildung 22 und Abbildung 23) und zwischen Tumor- und Normalgewebe zeigen sich keine Expressionsunterschiede (vergleiche Abbildung 23 B und D). Da die Funktion der Varianten bisher noch nicht genau erforscht wurde⁷⁵, kann daher zum jetzigen Zeitpunkt die Bedeutung dieser divergenten Expressionsmuster der SRSF1 Gesamtexpression und der drei Varianten nicht geklärt werden.

Da LSD1-Inhibitoren bekanntlich die Karzinogenese inhibieren^{62,112,113} wäre zu erwarten, dass nach LSD1-Inhibierung die Reduktion der Expression im Tumorgewebe abschwächt und wieder auf den Level des Nicht-Tumorgewebes gelangt. Obwohl eine antitumoröse Wirkung durch den Inhibitor HCI-2509 bei den KRAS G12V induzierten Lungenadenokarzinomen beobachtet werden konnte¹, konnte jedoch kein Einfluss der pharmakologischen LSD1-Inhibierung auf die SRSF1 Expression nachgewiesen werden. Selbst nach transgener Hemmung war hier nicht der erwartete Effekt einer Angleichung der Expressionsspiegel im Tumorgewebe nach Inhibierung an die im Nicht-Tumorgewebe zu erkennen (vergleiche Abbildung 24 und Abbildung 25). Die transgene shLSD1 Expression könnte aber auch über den Behandlungszeitraum von sechs Wochen hinweg nicht stabil gewesen sein.

Bezüglich der KRAS G12V mutierten LuAD konnte demnach zum einen eine verminderte Gesamtexpression des SRSF1-Gens und der Variante 2SRSF1_3a im Tumorgewebe und zum anderen eine im Gegensatz stehende Hochregulation der Varianten 1, 2SRSF1_3b im Tumorgewebe beschrieben werden. Ein eindeutiger Einfluss einer pharmakologischen oder transgenen LSD1-Inhibierung auf die SRSF1-Expression in KRAS G12V mutierten LuAD war nicht zu verzeichnen.

Gegenüber der SRSF1 Gesamtexpression und der Expression der Varianten 1, 2SRSF1_3b, die nach EGFR aktivierender Tumorinduktion unverändert bleiben (vergleiche Abbildung 26 und Abbildung 27 B), liegt Variante 2SRSF1_3a in EGFR L858R mutierten Lungenadenokarzinomen vermindert vor (vergleiche Abbildung 27 A). Das Verhalten der Variante 2SRSF1_3a in EGFR L858R mutierten Lungenadenokarzinomen entspricht den Beobachtungen der Gesamtexpression von SRSF1 unter KRAS G12V Mutation, wo im Tumorgewebe ebenfalls eine Runterregulation erkennbar war. Auch bei den EGFR L858R induzierten Lungenadenokarzinomen war kein eindeutiger Einfluss von LSD1 auf die veränderte Exoninklusion in vivo zu sehen. Ein möglicher therapeutischer Effekt war demnach auch hier nicht erkennbar.

Aufgrund des hier dargelegten heterogenen Gesamtbildes der Expression des SRSF1 und der SRSF1-Spleißvarianten hinsichtlich der Abhängigkeit von der Treiber-mutation in den LuAD und dem Einfluss einer LSD1-Inhibierung, sind weitere Forschungsansätze zur Klärung der SRSF1 Regulation in zukünftigen Studien von Nöten. Im Gegensatz zu den humanen Zellkulturdaten in vitro ist kein eindeutig detektierbarer Effekt von LSD1 zu erkennen.

Ein weiteres Mitglied der SR-Proteinfamilie neben SRSF1 ist SRSF3. SRSF3 ist das kleinste Mitglied dieser Proteingruppe und hat ähnlich wie SRSF1 vielfältige Funktionen in der Zelle ⁷⁴. Es wurde bereits mehrfach beschrieben, dass SRSF3 in seiner Expression bei Tumorerkrankungen, unter anderem in Ovarial- und Mammakarzinomen ¹¹⁴⁻¹¹⁶ hochreguliert ist. Eine solche Hochregulation konnte auch in der vorliegenden Arbeit bei durch EGFR L858R induzierten Lungenadenokarzinomen beobachtet werden (vergleiche Abbildung 30 A). Im Gegensatz dazu war jedoch in durch KRAS G12V induzierten Lungenadenokarzinomen eher eine Runterregulation im Tumorgewebe zu verzeichnen (vergleiche Abbildung 28 A). Die Autoren Sen et al. und Guo et al. diskutierten eine mögliche tumorsuppressive Wirkung von SRSF3 und konnten feststellen, dass es nach einem Knock-Out von SRSF3 zu Tumorentwicklungen, wie zum Beispiel von hepatozellulären Karzinomen, kommen kann ^{74,117}. Somit ergibt sich, ähnlich wie beim SRSF1 die Möglichkeit, dass SRSF3 in manchen Tumorerkrankungen hoch- und in anderen Fällen runterreguliert wird. Dieser Prozess ist eventuell abhängig von der Mutation, die zu der Tumorgenese geführt hat.

SRSF3 kommt in zwei Spleißvarianten vor, die sich in der Insertion von Exon 4 unterscheiden und sowohl im humanen als auch murinen System vorkommen ^{74,82}. In der NanoString-Expressionsanalyse konnte ein unterschiedliches Expressionsmuster der

SRSF3-Isoform mit dem zusätzlichen Exon 4 nachgewiesen werden. Es konnte im Vergleich zum Nicht-Tumorgewebe im EGFR L868R induzierten Lungenadenokarzinomgewebe eine signifikante Verringerung der Expression der SRSF3-Transkriptvariante mit Exon 4 im Verhältnis zur Gesamtexpression gesehen werden (vergleiche Abbildung 30 C). Während SRSF3 insgesamt im Tumorgewebe von EGFR L858R induzierten Lungenadenokarzinomen vermehrt exprimiert wird, ist die Expression der SRSF3 Transkriptvariante, die auch das Exon 4 enthält, im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe demnach verringert (vergleiche Abbildung 30 A und B). Wird Exon 4, welches ein Stop-Codon enthält, bei einem alternativen Spleißvorgang nicht herausgeschnitten, so kommt es zu einem verkürzten und somit funktionslosen Protein, was im Normalgewebe eine übermäßige Expression verhindern soll. Mit einer verminderten Expression der SRSF3-Isoform mit dem vierten Exon kommt es daher seltener zum Einbau des Stop-Codons, welches das SRSF3-Protein im Folgenden funktionslos machen würde⁷⁴. Demnach können mit dieser Beobachtung im LuAD Erkenntnisse aus der Literatur bestätigt werden, dass im Tumorgewebe EGFR L868R induzierter LuADs die Expression von Exon 4 runterreguliert wird und es somit zu mehr funktionierendem SRSF3 kommt. Nicht jedoch ließ sich hier eine Erkenntnis von Dalvi et al. im humanen System bestätigen, die besagt, dass sich unter der Inhibierung von LSD1 durch HCI-2509 eine vermehrte Expression von Exon 4 von SRSF3 beobachten lässt⁶³. Die LSD1-Inhibierung zeigte im Mausmodell keinen Effekt.

In LuAD auf Basis einer KRAS Mutation war die SRSF3 Gesamtexpression leicht verringert gegenüber der Expression im Lungengewebe ohne Tumorknoten (vergleiche Abbildung 28 A). Analog dazu ist auch in der Expression der SRSF3-Transkriptvariante, die das zusätzliche Exon 4 beinhaltet, eine Runterregulation zu beobachten (vergleiche Abbildung 28 B). Die LSD1-Inhibierung scheint besonders im Lungengewebe ohne Tumor die Expression aller SRSF3 Transkriptvarianten, sowie speziell der Transkripte mit Exon 4 etwas hochzuregulieren. Im Tumorgewebe scheint die Inhibierung jedoch keinen Effekt zu haben (vergleiche Abbildung 28 A und B), im Gegensatz zu der durch Dalvi et al. beschriebenen Runterregulation der Gesamtexpression und der Hochregulation der Exon 4 positiven Varianten infolge der LSD1-Inhibierung.

Ein deutlicher Effekt der LSD1-Inhibierung ist demnach lediglich im Sinne einer Runterregulation der SRSF3 Gesamtexpression im Tumorgewebe bei durch EGFR L858R induzierten Lungenadenokarzinomen zu erkennen (vergleiche Abbildung 30 A). Da SRSF3 als Protoonkogen angesehen wird, kann die Reduktion der Expression dessen als potenzieller therapeutischer Effekt der LSD1-Inhibierung bei LuAD unter EGFR L858R Mutation gedeutet werden.

Anzumerken ist außerdem, dass die Faktoren SRSF1 und SRSF3 auch antagonistisch wirken können und dass sie ihre Spleißmuster gegenseitig regulieren. Aber der durch Jumaa et al. beschriebene Zusammenhang, der darlegt, dass SRSF1 die Inklusion von Exon 4 im SRSF3-Transkript behindert, konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden⁸².

Zusammenfassend zeigte diese Arbeit, dass abhängig von der Mutation und der Transkriptvariante SRSF1 und SRSF3 in LuAD der Maus divergent exprimiert werden. Es zeigte sich eine generelle Unabhängigkeit der Expression der Spleißfaktoren von LSD1. Lediglich in EGFR mutierten LuAD bewirkte eine LSD1-Inhibierung eine Runterregulation aller SRSF3 Transkriptvarianten nach ursprünglicher Überexpression des Faktors im Tumorgewebe.

Insgesamt ergaben sich vereinzelte Diskrepanzen zwischen den hier vorgestellten Daten und der Literatur. Die Methodik, die in dieser Arbeit genutzt wurde, war technisch sehr aufwendig. Der PlexSet-Versuch war komplex, hat technisch jedoch funktioniert. Bei weiteren Untersuchungen dieser Art wären weitere Optimierungsversuche bei anderen Schritten des Versuchsablaufs zu empfehlen, wie bei der RNA-Aufreinigung und der Laser-Mikrodissektion. Bezogen auf die Normalisierung der Daten wäre gegebenenfalls die Nutzung zusätzlicher „housekeeping“-Gene zu empfehlen. Möglicherweise haben sich Ungenauigkeiten und Fehlerquellen potenziert und dazu beigetragen, dass die Daten in sich nicht immer stimmig waren und von Ergebnissen, wie sie in der Literatur zu finden sind, abweichen. Dazu kommen mögliche Diskrepanzen zwischen Regulationsmechanismen in der Maus und im Menschen. Die meisten Daten in der Literatur, die zur Diskussion der Ergebnisse herangezogen wurden, stammen aus Untersuchungen humanen Gewebes. Es ist möglich, dass die Genexpression in Mäusen weiteren, zum Menschen divergenten Regulationsmechanismen unterliegen. Nichtsdestotrotz wäre es für weitere Untersuchungen auch am Mausmodell von Vorteil eine größere Probenanzahl in die jeweiligen Versuchsgruppen einzuschließen, um genauere Daten ermitteln zu können. Dies war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, da nicht ausreichend Material zur Verfügung stand. Grundsätzlich, nachdem die Technik nun für FFPE-Gewebe der Maus etabliert wurde, wäre aber in Zukunft auch ein Einsatz an humanen FFPE-Material möglich. Demnach wurden hiermit die Voraussetzungen geschaffen, Expressionsprofile verschiedenster tumorrelevanter Gene am klinischen Material auf Malignitätsprognosen vertiefend zu untersuchen.

6. Literaturverzeichnis

1. Macheleidt IF. Inhibition of LSD1 in Non-Small Cell Lung-Cancer - in vitro and in vivo; 2017.
2. WHO. Cancer today. Population Fact Sheets. Germany. 2018. <http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/276-germany-fact-sheets.pdf>, (Zuletzt abgerufen am 30.03.2019).
3. WHO. Cancer today. Population Fact Sheets. Germany. 2018 http://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2018&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=276&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=7&group_cancer=0&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&half_pie=0&donut=0&population_group_globocan_id=#collapse-group-0-4 (Zuletzt abgerufen am 30.03.2019).
4. Robert Koch Institut - Neue Daten zu Krebs in Deutschland. 2015. https://www.rki.de/DE/Content/Service/Presse/Pressemitteilungen/2015/11_2015.html, (Zuletzt abgerufen am 30.03.2019).
5. Deutsche Krebsgesellschaft. Onko Internetportal - Lungenkrebs B. 2018. <https://www.krebsgesellschaft.de/onko-internetportal/basis-informationen-krebs/krebsarten/definition/lunge-seite-1.html>, (Zuletzt abgerufen am 30.03.2019).
6. Koyi H, Hillerdal G, Branden E. Patient's and doctors' delays in the diagnosis of chest tumors. *Lung Cancer* 2002; **35**(1): 53-7.
7. WHO. Cancer today. Population Fact Sheets. Germany. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/15-Lung-fact-sheet.pdf> (Zuletzt abgerufen am 30.03.2019).
8. Zentrum für Krebsregisterdaten - Lungenkrebs (Bronchialkarzinom). 2017. https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Lungenkrebs/lungenkrebs_node.html, (Zuletzt abgerufen am 30.03.2019)
9. Krebs in Deutschland 2015/2016. 12. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2019.
10. Warren GW, Cummings KM. Tobacco and lung cancer: risks, trends, and outcomes in patients with cancer. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* 2013: 359-64.
11. Bialous SA, Sarna L. Lung Cancer and Tobacco: What Is New? *Nurs Clin North Am* 2017; **52**(1): 53-63.
12. WHO. International Agency for Research on Cancer, Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Volume 83. Tobacco Smoke and Involuntary Smoking; 2004.
13. Hauptverband der gewerblichen Berufsgenossenschaften (2007) BK-Report 1/2007: Faserjahre. Berufsgenossenschaftliche Hinweise zur Ermittlung der kumulativen Asbestfaserstaubdosis am Arbeitsplatz (Faserjahre) und Bearbeitungshinweise zur Berufskrankheit Nr. 4101 Lungenkrebs oder Kehlkopfkrebs. Hauptverband der gewerblichen Berufsgenossenschaften, St. Augustin.
14. Bhatia R, Lopipero P, Smith AH. Diesel exhaust exposure and lung cancer. *Epidemiology* 1998; **9**(1): 84-91.
15. Darby S, Hill D, Auvinen A, et al. Radon in homes and risk of lung cancer: collaborative analysis of individual data from 13 European case-control studies. *BMJ* 2005; **330**(7485): 223.

16. LungCancerGroup Cologne - Treibermutationen. 2018. <https://lungcancergroup.de/molekularpathologie/treibermutationen/>, (Zuletzt abgerufen am 30.03.2019).
17. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft DK, AWMF): Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms, Lang-version 1.0, 2018, AWMF-Registernummer: 020/007OL, <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Lungenkarzinom.98.0.html> (Zuletzt abgerufen am 30.03.2019).
18. Glatzer M, Schmid S, Radovic M, Fruh M, Putora PM. The role of radiation therapy in the management of small cell lung cancer. *Breathe (Sheff)* 2017; **13**(4): e87-e94.
19. Sher T, Dy GK, Adjei AA. Small cell lung cancer. *Mayo Clin Proc* 2008; **83**(3): 355-67.
20. Souhami RL, Law K. Longevity in small cell lung cancer. A report to the Lung Cancer Subcommittee of the United Kingdom Coordinating Committee for Cancer Research. *Br J Cancer* 1990; **61**(4): 584-9.
21. Herold G. Innere Medizin. 2017 ed: Eigenverlag.
22. Travis WD, Travis LB, Devesa SS. Lung cancer. *Cancer* 1995; **75**(1 Suppl): 191-202.
23. Couraud S, Zalcman G, Milleron B, Morin F, Souquet PJ. Lung cancer in never smokers-- a review. *Eur J Cancer* 2012; **48**(9): 1299-311.
24. Pikor LA, Ramnarine VR, Lam S, Lam WL. Genetic alterations defining NSCLC subtypes and their therapeutic implications. *Lung Cancer* 2013; **82**(2): 179-89.
25. Spiro SG, Gould MK, Colice GL, American College of Chest P. Initial evaluation of the patient with lung cancer: symptoms, signs, laboratory tests, and paraneoplastic syndromes: ACCP evidenced-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest* 2007; **132**(3 Suppl): 149S-60S.
26. Wittekind C. TNM Klassifikation maligner Tumoren. Weinheim: Wiley-VCH; Januar 2017.
27. Chansky K, Detterbeck FC, Nicholson AG, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: External Validation of the Revision of the TNM Stage Groupings in the Eighth Edition of the TNM Classification of Lung Cancer. *J Thorac Oncol* 2017; **12**(7): 1109-21.
28. Wyser C, Stulz P, Soler M, et al. Prospective evaluation of an algorithm for the functional assessment of lung resection candidates. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; **159**(5 Pt 1): 1450-6.
29. Raab SS, Hornberger J, Raffin T. The importance of sputum cytology in the diagnosis of lung cancer: a cost-effectiveness analysis. *Chest* 1997; **112**(4): 937-45.
30. Canon J, Rex K, Saiki AY, et al. The clinical KRAS(G12C) inhibitor AMG 510 drives anti-tumour immunity. *Nature* 2019; **575**(7781): 217-23.
31. Hong DS, Fakih MG, Strickler JH, et al. KRAS(G12C) Inhibition with Sotorasib in Advanced Solid Tumors. *N Engl J Med* 2020; **383**(13): 1207-17.
32. De SK. Sotorasib: First approved KRAS mutation inhibitor for the treatment of non-small cell lung cancer. *Curr Med Chem* 2022.
33. Moskalev EA, Stohr R, Rieker R, et al. Increased detection rates of EGFR and KRAS mutations in NSCLC specimens with low tumour cell content by 454 deep sequencing. *Virchows Arch* 2013; **462**(4): 409-19.
34. Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med* 2009; **361**(10): 947-57.
35. O'Kane GM, Barnes TA, Leighl NB. Resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors, T790M, and clinical trials. *Curr Oncol* 2018; **25**(Suppl 1): S28-S37.

36. Ren W, Zhang BO, Ma J, et al. EML4-ALK translocation is associated with early onset of disease and other clinicopathological features in Chinese female never-smokers with non-small-cell lung cancer. *Oncol Lett* 2015; **10**(6): 3385-92.
37. Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, et al. RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer. *Nat Med* 2012; **18**(3): 378-81.
38. Chang JY, Senan S, Paul MA, et al. Stereotactic ablative radiotherapy versus lobectomy for operable stage I non-small-cell lung cancer: a pooled analysis of two randomised trials. *Lancet Oncol* 2015; **16**(6): 630-7.
39. Postmus PE, Kerr KM, Oudkerk M, et al. Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2017; **28**(suppl_4): iv1-iv21.
40. Mineo TC, Ambrogi V, Corsaro V, Roselli M. Postoperative adjuvant therapy for stage IB non-small-cell lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg* 2001; **20**(2): 378-84.
41. Chen S, Hu B, Li H. A meta-analysis of nivolumab for the treatment of advanced non-small-cell lung cancer. *Onco Targets Ther* 2018; **11**: 7691-7.
42. Kelly RJ. Dabrafenib and trametinib for the treatment of non-small cell lung cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* 2018; **18**(11): 1063-8.
43. Capelletto E, Migliorino MR, Morabito A, et al. Final results of the SENECA (SEcond line NintEdanib in non-small cell lung CAncer) trial. *Lung Cancer* 2019; **134**: 210-7.
44. Sandomenico C, Costanzo R, Carillio G, et al. Bevacizumab in non small cell lung cancer: development, current status and issues. *Curr Med Chem* 2012; **19**(7): 961-71.
45. Arrieta O, Zatarain-Barron ZL, Cardona AF, Carmona A, Lopez-Mejia M. Ramucirumab in the treatment of non-small cell lung cancer. *Expert Opin Drug Saf* 2017; **16**(5): 637-44.
46. O'Rourke N, Roque IFM, Farre Bernado N, Macbeth F. Concurrent chemoradiotherapy in non-small cell lung cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2010; (6): CD002140.
47. Nordheim A, Knippers R. Molekulare Genetik: Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York; 2015.
48. Dawson MA, Kouzarides T. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell* 2012; **150**(1): 12-27.
49. Shi Y, Lan F, Matson C, et al. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* 2004; **119**(7): 941-53.
50. Mosammamaparast N, Shi Y. Reversal of histone methylation: biochemical and molecular mechanisms of histone demethylases. *Annu Rev Biochem* 2010; **79**: 155-79.
51. Wang J, Hevi S, Kurash JK, et al. The lysine demethylase LSD1 (KDM1) is required for maintenance of global DNA methylation. *Nat Genet* 2009; **41**(1): 125-9.
52. Stavropoulos P, Blobel G, Hoelz A. Crystal structure and mechanism of human lysine-specific demethylase-1. *Nat Struct Mol Biol* 2006; **13**(7): 626-32.
53. Lee MG, Wynder C, Norman J, Shiekhattar R. Isolation and characterization of histone H3 lysine 4 demethylase-containing complexes. *Methods* 2006; **40**(4): 327-30.
54. Metzger E, Wissmann M, Yin N, et al. LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription. *Nature* 2005; **437**(7057): 436-9.
55. Kahl P, Gullotti L, Heukamp LC, et al. Androgen receptor coactivators lysine-specific histone demethylase 1 and four and a half LIM domain protein 2 predict risk of prostate cancer recurrence. *Cancer Res* 2006; **66**(23): 11341-7.

56. Wang Y, Zhu Y, Wang Q, et al. The histone demethylase LSD1 is a novel oncogene and therapeutic target in oral cancer. *Cancer Lett* 2016; **374**(1): 12-21.
57. Li Y, Wan X, Wei Y, et al. LSD1-mediated epigenetic modification contributes to ovarian cancer cell migration and invasion. *Oncol Rep* 2016; **35**(6): 3586-92.
58. Ding J, Zhang ZM, Xia Y, et al. LSD1-mediated epigenetic modification contributes to proliferation and metastasis of colon cancer. *Br J Cancer* 2013; **109**(4): 994-1003.
59. Macheleidt IF, Dalvi PS, Lim SY, et al. Preclinical studies reveal that LSD1 inhibition results in tumor growth arrest in lung adenocarcinoma independently of driver mutations. *Mol Oncol* 2018; **12**(11): 1965-79.
60. Lim SY, Macheleidt I, Dalvi P, et al. LSD1 modulates the non-canonical integrin beta3 signaling pathway in non-small cell lung carcinoma cells. *Sci Rep* 2017; **7**(1): 10292.
61. Castelli G, Pelosi E, Testa U. Targeting histone methyltransferase and demethylase in acute myeloid leukemia therapy. *Onco Targets Ther* 2018; **11**: 131-55.
62. Sorna V, Theisen ER, Stephens B, et al. High-throughput virtual screening identifies novel N'-(1-phenylethylidene)-benzohydrazides as potent, specific, and reversible LSD1 inhibitors. *J Med Chem* 2013; **56**(23): 9496-508.
63. Dalvi P, et al. The histone lysine demethylase LSD1 controls the oncogenic splicing pattern by transcriptional regulation of transacting splicing factors and interaction with the splicing machinery. Manuscript in preparation.
64. Lee SC, Abdel-Wahab O. Therapeutic targeting of splicing in cancer. *Nat Med* 2016; **22**(9): 976-86.
65. Long JC, Caceres JF. The SR protein family of splicing factors: master regulators of gene expression. *Biochem J* 2009; **417**(1): 15-27.
66. Ghigna C, Moroni M, Porta C, Riva S, Biamonti G. Altered expression of heterogenous nuclear ribonucleoproteins and SR factors in human colon adenocarcinomas. *Cancer Res* 1998; **58**(24): 5818-24.
67. Zhou X, Wang R, Li X, et al. Splicing factor SRSF1 promotes gliomagenesis via oncogenic splice-switching of MYO1B. *J Clin Invest* 2019; **129**(2): 676-93.
68. Anczukow O, Rosenberg AZ, Akerman M, et al. The splicing factor SRSF1 regulates apoptosis and proliferation to promote mammary epithelial cell transformation. *Nat Struct Mol Biol* 2012; **19**(2): 220-8.
69. Das S, Krainer AR. Emerging functions of SRSF1, splicing factor and oncoprotein, in RNA metabolism and cancer. *Mol Cancer Res* 2014; **12**(9): 1195-204.
70. Ghigna C, Giordano S, Shen H, et al. Cell motility is controlled by SF2/ASF through alternative splicing of the Ron protooncogene. *Mol Cell* 2005; **20**(6): 881-90.
71. Goncalves V, Jordan P. Posttranscriptional Regulation of Splicing Factor SRSF1 and Its Role in Cancer Cell Biology. *Biomed Res Int* 2015; **2015**: 287048.
72. Gout S, Brambilla E, Boudria A, et al. Abnormal expression of the pre-mRNA splicing regulators SRSF1, SRSF2, SRPK1 and SRPK2 in non small cell lung carcinoma. *PLoS One* 2012; **7**(10): e46539.
73. Lareau LF, Inada M, Green RE, Wengrod JC, Brenner SE. Unproductive splicing of SR genes associated with highly conserved and ultraconserved DNA elements. *Nature* 2007; **446**(7138): 926-9.
74. Guo J, Jia J, Jia R. PTBP1 and PTBP2 impaired autoregulation of SRSF3 in cancer cells. *Sci Rep* 2015; **5**: 14548.

75. Sun S, Zhang Z, Sinha R, Karni R, Krainer AR. SF2/ASF autoregulation involves multiple layers of post-transcriptional and translational control. *Nat Struct Mol Biol* 2010; **17**(3): 306-12.
76. Tichelaar JW, Lu W, Whitsett JA. Conditional expression of fibroblast growth factor-7 in the developing and mature lung. *J Biol Chem* 2000; **275**(16): 11858-64.
77. Politi K, Zakowski MF, Fan PD, Schonfeld EA, Pao W, Varmus HE. Lung adenocarcinomas induced in mice by mutant EGF receptors found in human lung cancers respond to a tyrosine kinase inhibitor or to down-regulation of the receptors. *Genes Dev* 2006; **20**(11): 1496-510.
78. Konig K, Meder L, Kroger C, et al. Loss of the keratin cytoskeleton is not sufficient to induce epithelial mesenchymal transition in a novel KRAS driven sporadic lung cancer mouse model. *PLoS One* 2013; **8**(3): e57996.
79. Sprussel A, Schulte JH, Weber S, et al. Lysine-specific demethylase 1 restricts hematopoietic progenitor proliferation and is essential for terminal differentiation. *Leukemia* 2012; **26**(9): 2039-51.
80. Drebber U, Odenthal M, Aberle SW, et al. Hepatitis E in liver biopsies from patients with acute hepatitis of clinically unexplained origin. *Front Physiol* 2013; **4**: 351.
81. NanoString - PlexSet Reagents. 2019. <https://www.nanostring.com/products/custom-solutions/ncounter-plexset-reagents>, (Zuletzt abgerufen am 16.04.2019).
82. Jumaa H, Nielsen PJ. The splicing factor SRp20 modifies splicing of its own mRNA and ASF/SF2 antagonizes this regulation. *EMBO J* 1997; **16**(16): 5077-85.
83. Jia R, Li C, McCoy JP, Deng CX, Zheng ZM. SRp20 is a proto-oncogene critical for cell proliferation and tumor induction and maintenance. *Int J Biol Sci* 2010; **6**(7): 806-26.
84. Pescarmona R, Belot A, Villard M, et al. Comparison of RT-qPCR and Nanostring in the measurement of blood interferon response for the diagnosis of type I interferonopathies. *Cytokine* 2019; **113**: 446-52.
85. Aguilar-Bravo B, Sancho-Bru P. Laser capture microdissection: techniques and applications in liver diseases. *Hepatol Int* 2019; **13**(2): 138-47.
86. Lu X, van der Straaten T, Tiller M, Li X. Evidence for qualified quantitative mRNA analysis in formalin-fixed and paraffin-embedded colorectal carcinoma cells and tissue. *J Clin Lab Anal* 2011; **25**(3): 166-73.
87. ThermoFisher Scientific - Real Time PCR Handbook. 2014. <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/Forms/PDF/real-time-pcr-handbook.pdf> (Zuletzt abgerufen am 22.04.2019).
88. Geiss GK, Bumgarner RE, Birditt B, et al. Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs. *Nat Biotechnol* 2008; **26**(3): 317-25.
89. Malkov VA, Serikawa KA, Balantac N, et al. Multiplexed measurements of gene signatures in different analytes using the Nanostring nCounter Assay System. *BMC Res Notes* 2009; **2**: 80.
90. Bevilacqua C, Makhzami S, Helbling JC, Defrenaix P, Martin P. Maintaining RNA integrity in a homogeneous population of mammary epithelial cells isolated by Laser Capture Microdissection. *BMC Cell Biol* 2010; **11**: 95.
91. Emmert-Buck MR, Bonner RF, Smith PD, et al. Laser capture microdissection. *Science* 1996; **274**(5289): 998-1001.
92. Espina V, Heiby M, Pierobon M, Liotta LA. Laser capture microdissection technology. *Expert Rev Mol Diagn* 2007; **7**(5): 647-57.

93. Carl Zeiss AG - PALM MicroBeam. 2019. <https://www.zeiss.de/mikroskopie/produkte/laser-mikrodissektion/microbeam.html#einfuehrung>, (Zuletzt abgerufen am 22.04.2019).
94. Leica Microsystems - Lasermikrodissektionssysteme. 2019. <https://www.leica-microsystems.com/de/produkte/lichtmikroskope/p/leica-lmd7/>, (Zuletzt abgerufen am 22.04.2019).
95. ThermoFisher Scientific - Laser-Capture-Mikrodissektion. 2019. <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/gene-expression-analysis-genotyping/laser-capture-microdissection.html>, (Zuletzt abgerufen am 22.04.2019)..
96. Molecular Machines & Industries - MMI CellCut. 2019. http://www.molecular-machines.com/single_cell_sorting_products/mmi_cellcut_-_laser_microdissection/technology_27, (Zuletzt abgerufen am 22.04.2019)..
97. Frost AR, Eltoun IE, Siegal GP, Emmert-Buck MR, Tangrea MA. Laser Microdissection. *Curr Protoc Mol Biol* 2015; **112**: 25A 1 1-A 1 30.
98. Duteil D, Metzger E, Willmann D, et al. LSD1 promotes oxidative metabolism of white adipose tissue. *Nat Commun* 2014; **5**: 4093.
99. Adamo A, Sese B, Boue S, et al. LSD1 regulates the balance between self-renewal and differentiation in human embryonic stem cells. *Nat Cell Biol* 2011; **13**(6): 652-9.
100. Chau CM, Deng Z, Kang H, Lieberman PM. Cell cycle association of the retinoblastoma protein Rb and the histone demethylase LSD1 with the Epstein-Barr virus latency promoter Cp. *J Virol* 2008; **82**(7): 3428-37.
101. Scoumanne A, Chen X. The lysine-specific demethylase 1 is required for cell proliferation in both p53-dependent and -independent manners. *J Biol Chem* 2007; **282**(21): 15471-5.
102. Lv S, Bu W, Jiao H, et al. LSD1 is required for chromosome segregation during mitosis. *Eur J Cell Biol* 2010; **89**(7): 557-63.
103. de Miguel FJ, Sharma RD, Pajares MJ, Montuenga LM, Rubio A, Pio R. Identification of alternative splicing events regulated by the oncogenic factor SRSF1 in lung cancer. *Cancer Res* 2014; **74**(4): 1105-15.
104. Sokol E, Boguslawska J, Piekuelko-Witkowska A. The role of SRSF1 in cancer. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2017; **71**(0): 422-30.
105. Anczukow O, Akerman M, Clery A, et al. SRSF1-Regulated Alternative Splicing in Breast Cancer. *Mol Cell* 2015; **60**(1): 105-17.
106. Fischer DC, Noack K, Runnebaum IB, et al. Expression of splicing factors in human ovarian cancer. *Oncol Rep* 2004; **11**(5): 1085-90.
107. Ezponda T, Pajares MJ, Agorreta J, et al. The oncoprotein SF2/ASF promotes non-small cell lung cancer survival by enhancing survivin expression. *Clin Cancer Res* 2010; **16**(16): 4113-25.
108. Yoon HH, Tougeron D, Shi Q, et al. KRAS codon 12 and 13 mutations in relation to disease-free survival in BRAF-wild-type stage III colon cancers from an adjuvant chemotherapy trial (N0147 alliance). *Clin Cancer Res* 2014; **20**(11): 3033-43.
109. Siddiqui AD, Piperdi B. KRAS mutation in colon cancer: a marker of resistance to EGFR-I therapy. *Ann Surg Oncol* 2010; **17**(4): 1168-76.
110. Chang YS, Yeh KT, Chang TJ, et al. Fast simultaneous detection of K-RAS mutations in colorectal cancer. *BMC Cancer* 2009; **9**: 179.

111. Valacca C, Bonomi S, Buratti E, et al. Sam68 regulates EMT through alternative splicing-activated nonsense-mediated mRNA decay of the SF2/ASF proto-oncogene. *J Cell Biol* 2010; **191**(1): 87-99.
112. Ueda R, Suzuki T, Mino K, et al. Identification of cell-active lysine specific demethylase 1-selective inhibitors. *J Am Chem Soc* 2009; **131**(48): 17536-7.
113. Stazi G, Zwergel C, Valente S, Mai A. LSD1 inhibitors: a patent review (2010-2015). *Expert Opin Ther Pat* 2016; **26**(5): 565-80.
114. He X, Arslan AD, Pool MD, et al. Knockdown of splicing factor SRp20 causes apoptosis in ovarian cancer cells and its expression is associated with malignancy of epithelial ovarian cancer. *Oncogene* 2011; **30**(3): 356-65.
115. He X, Zhang P. Serine/arginine-rich splicing factor 3 (SRSF3) regulates homologous recombination-mediated DNA repair. *Mol Cancer* 2015; **14**: 158.
116. Stickeler E, Kittrell F, Medina D, Berget SM. Stage-specific changes in SR splicing factors and alternative splicing in mammary tumorigenesis. *Oncogene* 1999; **18**(24): 3574-82.
117. Sen S, Langiewicz M, Jumaa H, Webster NJ. Deletion of serine/arginine-rich splicing factor 3 in hepatocytes predisposes to hepatocellular carcinoma in mice. *Hepatology* 2015; **61**(1): 171-83.

7. Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Inzidenz von Krebserkrankungen in Deutschland 2018:.....	14
Abbildung 2: Darstellung der weltweiten Inzidenz (A) und Mortalität (B) von Lungenkrebs in Kreisdiagrammen. Grafikdaten bezogen von und Grafik abgewandelt nach der WHO. ⁷	15
Abbildung 3: Darstellung der Subtypen der Gruppe der nicht-kleinzelligen Lungenkarzinome, kurz NSCLC.....	17
Abbildung 4: Übersichtsdarstellung des Probenkollektivs für die Versuche dieser Arbeit mit Verweis auf die dazugehörigen Kapitel.	27
Abbildung 5: Darstellung der EGFR L858R mutierten Mäuse mit unterschiedlichen Therapien im Zeitverlauf.	29
Abbildung 6: Vereinfachte Darstellung der Induktion der KRAS G12V Mutation durch Entfernung des Stop-Codons durch Inhalation eines Cre-exprimierenden Adenovirus (AdCre).....	29
Abbildung 7: Darstellung der KRAS-mutierten Mäuse mit unterschiedlichen Therapieansätzen im Zeitverlauf.	30
Abbildung 8: Darstellung der Versuchsschemata der unterschiedlichen Versuchsgruppen der Lungenadenokarzinomproben mit shLSD1-Expression unter genetischer LSD1-Inhibierung im Zeitverlauf.....	31
Abbildung 9: Darstellung eines fiktiven Gens mit drei Transkriptvarianten.	38
Abbildung 10: Organisation eines fiktiven Gens und Exonverteilung zweier Transkriptspleißvarianten.	39
Abbildung 11: Darstellung der Detektion und Immobilisierung von Zieltranskripten zur NanoString-Quantifizierung.	40
Abbildung 12: Darstellung des Tumorauftritts in der Gruppe der Mäuse mit KRAS G12V Mutation und pharmakologischer LSD1-Inhibierung durch HCI-2509.	45
Abbildung 13: Darstellung des Tumorauftritts in der Gruppe der Mäuse mit KRAS G12V Mutation und transgener LSD1-Inhibierung.	46
Abbildung 14: Histologische Darstellung von Gewebeschnitten unterschiedlicher Mauslungen mit KRAS G12V Mutation.....	47
Abbildung 15: Tumorstadiumsmuster von Lungenadenokarzinomen des konditionellen KRAS G12V- und des EGFR L858R Mutationsmodells.	48
Abbildung 16: LuAD-Knotengröße und -anzahl nach KRAS-Mutation und LSD1-Inhibierung	49
Abbildung 17: Laser-Mikrodissektion von Gewebsschnittarealen unter Verwendung von Glasobjektträgern (A) oder Membranobjektträgern (B, C) (Erklärung siehe bitte im Text).....	52
Abbildung 18: RNA-Ausbeute in Abhängigkeit von den Flächen der Tumor-areale,	53
Abbildung 19: Schematische Darstellung der SRSF1 Transkriptvarianten und der Auswahl der Regionen zur Transkriptdifferenzierung mittels nCounter Sondenhybridisierung.	56
Abbildung 20: Schematische Darstellung der SRSF3 Transkriptvarianten und der Auswahl der Regionen zur Transkriptdifferenzierung mittels nCounter Sondenhybridisierung.	57

Abbildung 21: „Heatmap“ der Genexpressionen in LuAD versus Lungenproben ohne Tumor in Abhängigkeit der Treibermutation KRAS G12V (KRAS) oder EGFR L858R (EGFR) und der pharmakologischen und transgenen LSD1-Inhibierung.	61
Abbildung 22: SRSF1-Expression nach pharmakologischer LSD1-Inhibierung in KRAS G12V induzierten LuAD versus tumorfreien Lungengeweben.....	62
Abbildung 23: Expression der SRSF1 Transkriptvarianten nach pharmakologischer LSD1- Inhibierung in KRAS G12V induzierten LuAD versus tumorfreien Lungengeweben.	62
Abbildung 24: SRSF1-Expression in KRAS G12V induzierten LuAD versus tumorfreien Lungen- gewebe in Abhängigkeit einer shLSD1-abhän- gigen LSD1-Hemmung.	63
Abbildung 25: Expression der SRSF1 Transkriptvarianten in KRAS G12V induzierten LuAD versus tumorfreien Lungengeweben in Abhängigkeit einer shLSD1-abhängigen LSD1-Hemmung.	64
Abbildung 26: SRSF1-Expression nach pharmakologischer LSD1-Inhibierung in EGFR L858R mutierten und mit Doxycyclingabe induzierten LuAD versus tumorfreien Lungengeweben.....	65
Abbildung 27: Expression der SRSF1 Transkriptvarianten nach pharmakologischer LSD1-Inhibierung in EGFR L858R mutierten und mit Doxycyclingabe induzierten LuAD versus tumorfreien Lungengeweben.	66
Abbildung 28: Expression der SRSF3 Trans- kriptvarianten nach pharmakologischer LSD1-Inhibierung in KRAS G12V induzierten LuAD versus tumorfreien Lungengeweben.	68
Abbildung 29: Gesamtexpression von SRSF3 in KRAS G12V induzierten LuAD versus tumorfreien Lungengeweben in Abhängigkeit einer shLSD1- abhängigen LSD1-Hemmung.....	69
Abbildung 30: Expression der SRSF3 Trans- kriptvarianten nach pharmakologischer LSD1-Inhibierung in EGFR L858R mutierten und mit Doxycyclingabe induzierten LuAD versus tumorfreien Lungengeweben.	70
Abbildung 31: Sashimi-Plot zur vergleichenden und quantitativen Darstellung von unterschiedlich gespleißten Exons und Isoformen des humanen SRSF1- Gens sechs verschiedener Proben der PC9 NSCLC Zelllinie unter dem Einfluss einer LSD1-Inhibierung (oben) oder ohne LSD1-Inhibierung (unten)..	78

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zur Expressionsanalyse mit NanoString nCounter ausgewählte Gene.....	37
Tabelle 2: Anzahl und Größe der LuAD-Knoten in Mausproben mit KRAS G12V Mutation unter pharmakologischer oder transgener LSD1-Inhibierung.	48
Tabelle 3: Ergebnisse der quantitativen Real Time PCR für beta-Aktin mRNA der Proben-ID 91 mit Material aus drei unterschiedlich großen Gewebeflächen.....	51
Tabelle 4: Einfluss der histologischen Färbung und der Behandlung mit einem Fixierungsspray auf die Katapultierfähigkeit und die RNA-Ausbeute im Rahmen der Laser-Mikrodissektion.....	53
Tabelle 5: Ergebnis der RNA-Isolierung: Konzentration und gewonnene Gesamtmenge von RNA aus der gelaserten Tumorfläche aus LuAD-Knoten in Mausproben mit KRAS G12V Mutation unter pharmakologischer oder transgener LSD1-Inhibierung.	54
Tabelle 6: Ermittelte SRSF1-Zielsequenzen für die NanoString-Expressionsanalyse ..	55
Tabelle 7: Ermittelte SRSF3-Zielsequenzen für die NanoString-Expressionsanalyse. .	58
Tabelle A 1: Zusammenstellung der untersuchten Maus-Gewebeproben mit Angabe der Versuchsgruppe.....	93
Tabelle A 2: RNA-Konzentration und -Menge der eingeschlossenen Proben.	94
Tabelle A 3: Ausgewählte Transkriptzielregionen und Sequenzangaben der Sonden A und B zur Expressionsanalyse.....	95
Tabelle A 4: Ergebnisse des Titrationslaufs mit 12 Proben-IDs und einer RNA-Einsatzmenge von 200-300 ng. Die Proben-IDs sind in den Spalten vermerkt, in den Zeilen werden die Positiv-, sowie Negativkontrollen und die Gene beziehungsweise Transkriptvarianten, deren Expressionen ermittelt wurden, aufgelistet.....	102

7.3 Ergänzende Tabellen

Tabelle A 1: Zusammenstellung der untersuchten Maus-Gewebeproben mit Angabe der Versuchsgruppe.

	Proben-ID	Mausstamm	Behandlungsart	Behandlungszeit	Tumor ja/nein	Geschlecht	
HCI-2509 Versuchsgruppe	16	KRAS G12V	Kontroll-Diät	6W	oT	w	
	17		Kontroll-Diät	6W		w	
	36		Kontroll-Diät	6W		w	
	37		Kontroll-Diät	6W		m	
	84		Kontroll-Diät	6W		w	
	87		Kontroll-Diät	6W		m	
	34		Kontroll-Diät	6W	T	w	
	35		Kontroll-Diät	6W		w	
	38		Kontroll-Diät	6W		m	
	39		Kontroll-Diät	6W		m	
	51		Kontroll-Diät	6W		m	
	52		Kontroll-Diät	6W		m	
	77		Kontroll-Diät	6W	w		
	123		KRAS G12V	Kontroll-Diät + HCI-2509 Diät	4W + 2W	oT	m
	124	Kontroll-Diät + HCI-2509 Diät		4W + 2W	m		
	125	Kontroll-Diät + HCI-2509 Diät		4W + 2W	w		
	126	Kontroll-Diät + HCI-2509 Diät		4W + 2W	w		
	80	Kontroll-Diät + HCI-2509 Diät		4W + 2W	T	m	
	91	Kontroll-Diät + HCI-2509 Diät		4W + 2W		w	
	56	HCI-2509 Diät		6W	oT	m	
	57	HCI-2509 Diät		6W		m	
	58	HCI-2509 Diät		6W		w	
	59	HCI-2509 Diät		6W		w	
	20	HCI-2509 Diät		6W	T	w	
	23	HCI-2509 Diät		6W		w	
	47	EGFR L858R		Dox	6W	oT	m
	48			Dox	6W		m
	49		Dox	6W	w		
	50		Dox	6W	w		
	232		Dox + Dox	8W + 4W	T	m	
	233		Dox + Dox	8W + 4W		m	
	235		Dox + Dox	8W + 4W		m	
236	Dox + Dox		8W + 4W	m			
237	Dox + Dox		8W + 4W	m			
241	Dox + Dox		8W + 4W	w			
243	Dox + Dox		8W + 4W	w			
228	Dox + Dox mit HCI-2509		8W + 4W	T	m		
229	Dox + Dox mit HCI-2509		8W + 4W		w		
230	Dox + Dox mit HCI-2509		8W + 4W		w		
231	Dox + Dox mit HCI-2509	8W + 4W	w				
234	Dox + Dox mit HCI-2509	8W + 4W	w				
240	Dox + Dox mit HCI-2509	8W + 4W	w				
242	Dox + Dox mit HCI-2509	8W + 4W	w				
	Proben-ID	Mausstamm	shLSD1-Status	Doxycyclin-Behandlungsschema	Tumor ja/nein	Geschlecht	
transgene LSD1 Inhibitor Versuchsgruppe	71	KRAS G12V	wt	5W Dox	oT	w	
	72		wt	5W Dox		w	
	103		wt	5W Dox		w	
	105		wt	5W Dox		w	
	106		wt	5W Dox		w	
	108		wt	5W Dox		m	
	107		shLSD1	5W Dox	oT	m	
	110		shLSD1	5W Dox		m	
	222		shLSD1	5W Dox		m	
	70		shLSD1	5W Dox		T	w
	75		shLSD1	5W Dox			m
	109		shLSD1	5W Dox			m
223	shLSD1	5W Dox	m				

(KRAS G12V: C57BL/6N^{TG(KRASmut2)}), EGFR L858R: C57BL/6N^{TG(CCSP-rTA)}) gekreuzt mit C57BL/6N^{TG(EGFR L858R)}, shLSD1: C57BL/6N^{TG(shLSD1)}, wt: Wildtyp, Dox: Doxycyclin, a: Versuchsaufbau der Gruppe a (vergleiche Kapitel 3.1.3), W: Woche/Wochen, T: Lungengewebe mit Tumor; oT: Lungengewebe ohne Tumor, m: männliches Geschlecht, w: weibliches Geschlecht)

Tabelle A 2: RNA-Konzentration und -Menge der eingeschlossenen Proben.

Probeninformation		Behandlungsart	Behandlungszeit	Versuchsaufbau	Tumor ja/nein	Geschlecht	Proben-ID	RNA-Konzentration [ng/μl]	RNA-Menge (in insgesamt 36 μl) [ng]					
HCI-2509 Versuchsgruppe	KRAS G12V	C	6W		oT	w	16	143,18	5154,47					
						w	17	81,64	2939,08					
						w	36	84,24	3032,65					
						m	37	139,44	5019,96					
						w	84	85,49	3077,70					
					m	87	186,80	6724,84						
					T	w	34	11,47	412,82					
						w	35	7,67	275,98					
						m	38	18,59	669,19					
						m	39	17,18	618,63					
		m	51	15,40		554,55								
		HCI-2509		2W			oT	m	123	165,62	5962,28			
								m	124	172,80	6220,93			
								w	125	207,20	7459,07			
								w	126	166,13	5980,65			
								w	126	166,13	5980,65			
				6W					T	m	80	22,13	796,53	
										w	91	20,20	727,14	
										m	56	34,36	1236,82	
										m	57	29,25	1052,85	
	w									58	54,30	1954,73		
	EGFR L858R		Dox	6W		oT	m	47	34,11	1227,86				
							m	48	22,47	809,09				
							w	49	37,20	1339,24				
							w	50	45,01	1620,46				
							w	50	45,01	1620,46				
			8W + 4W					T	m	232	276,45	9952,07		
									m	233	383,46	13804,48		
									m	235	313,80	11296,97		
									m	236	350,41	12614,84		
									m	237	414,36	14916,95		
	Dox + HCI-2509		8W + 4W				T	w	241	503,24	18116,53			
								w	243	461,01	16596,36			
								m	228	453,42	16323,24			
								w	229	930,22	33488,08			
								w	230	462,71	16657,52			
								w	231	844,44	30399,84			
								w	234	812,51	29250,46			
								w	240	527,37	18985,23			
								w	242	701,43	25251,58			
transgene LSD1 Inhibitor Versuchsgruppe								KRAS G12V	wt	5W	a	oT	w	71
	w	72	311,24	11204,79										
	w	103	67,23	2420,29										
	w	105	194,81	7013,22										
	w	106	315,41	11354,89										
	shLSD1					T	m					108	413,40	14882,41
							m					107	93,43	3363,61
							m					110	152,24	5480,55
							m					222	543,74	19574,76
							w					70	17,32	623,60
							T		m	75	27,62	994,43		
									m	109	28,78	1036,11		
									m	223	29,58	1065,00		

(KRAS G12V: C57BL/6N^{TG(KRASmut2)}), EGFR L858R: C57BL/6N^{TG(CCSP-rTA)}) gekreuzt mit C57BL/6N^{TG(EGFR L858R)}, shLSD1: C57BL/6N^{TG(shLSD1)}, C: Kontrolldiät, wt: Wildtyp, Dox: Doxycyclin, a: Versuchsaufbau der Gruppe a (vergleiche Kapitel 3.1.3), W: Wochen, T: Lungengewebe mit Tumor; oT: Lungengewebe ohne Tumor, m: männliches Geschlecht, w: weibliches Geschlecht)

Tabelle A 4: Ergebnisse des Titrationslaufs mit 12 Proben-IDs und einer RNA-Einsatzmenge von 200-300 ng. Die Proben-IDs sind in den Spalten vermerkt, in den Zeilen werden die Positiv-, sowie Negativkontrollen und die Gene beziehungsweise Transkriptvarianten, deren Expressionen ermittelt wurden, aufgelistet.

Probenkennzeichnung	04-ID37	15-ID124	16-ID125	35-ID241	36-ID243	38-ID229	40-ID231	46-ID103	47-ID105	56-ID109	57-ID223	70-ID251
	pharmakologische Inhibierung						transgene Inhibierung					
Mutations- und Diätinformation	KRAS - Kontroll-Diät + HCl-2509 - 4W + 2W	KRAS - Kontroll-Diät + HCl-2509 - 4W + 2W	KRAS - Kontroll-Diät + HCl-2509 - 4W + 2W	EGFR - Dox + Dox - 8W + 4W	EGFR - Dox + Dox - 8W + 4W	EGFR - Dox + Dox mit HCl-2509 - 8W + 4W	EGFR - Dox + Dox mit HCl-2509 - 8W + 4W	KRAS - wt - Induktion + 5W Dox - Versuch a	KRAS - wt - Induktion + 5W Dox - Versuch a	KRAS - shLSD1 - Induktion + 5W Dox - Versuch a	KRAS - shLSD1 - Induktion + 5W Dox - Versuch a	KRAS - shLSD1 - Induktion + 2.5W kein Dox + 2.5W Dox - Versuch b
Tumor ja/nein	oT	oT	oT	T	T	T	T	oT	oT	T	T	oT
RNA-Einsatzmenge	300 ng	300 ng	300 ng	300 ng	300 ng	300 ng	300 ng	300 ng	300 ng	200 ng	200 ng	300 ng
Positive	48043	48213	51792	44778	41683	50228	51549	47808	51793	50532	47520	49521
POS A												
POS B	6536	6694	6946	6158	5472	6836	7223	6553	7102	6863	6440	6771
POS C	2903	2990	3242	2768	2416	2996	3129	2997	3073	2971	2797	3042
POS D	354	346	385	351	346	381	366	342	381	376	333	397
POS E	114	131	116	104	107	122	107	140	133	129	107	122
POS F	36	24	35	28	30	35	32	39	42	32	30	33
NEG A	1	2	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1
NEG B	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1
NEG C	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
NEG D	1	1	1	2	3	2	1	3	3	1	3	1
NEG E	1	1	1	3	1	2	1	1	4	6	1	1
NEG F	4	2	1	1	1	1	1	3	1	6	2	2
Endogenous	1	3	1	1	1	1	1	1	2	1	3	1
GSAT												
Housekeeping	462	545	579	437	308	247	358	758	292	762	1027	404
NDUFS 6	727	807	871	741	455	207	556	991	309	1261	2080	576
NDUFS 7	2255	2341	2165	1213	1054	529	963	2516	1181	2167	2480	1276
NDUFS 8	1013	1562	1368	850	798	356	709	1394	544	1628	2195	868
PINK1	1777	1684	1552	632	445	178	564	2167	768	1159	1103	567
SRSF1_3a	1125	1114	1075	418	282	152	336	1496	459	1266	1276	479
SRSF1_3b	764	761	723	527	278	143	387	1209	292	1319	1522	472
SRSF1_Ctrl	813	834	816	410	278	262	257	1088	368	835	786	414
SRSF3_E1_3	2355	2678	2803	1396	1072	709	1165	3355	1382	2873	3267	1836
SRSF3_E4	770	1063	1006	429	315	271	339	1163	397	1060	869	501
TERT_E2a	181	254	251	141	118	174	70	177	105	178	253	76
TERT_E2b	131	185	169	101	99	111	56	142	77	148	184	59
TERT_E9	210	249	232	143	121	164	75	231	102	174	223	90
aldolase_a	2543	3585	3225	2219	2005	1329	2176	2999	1515	4661	6307	1863
fumarase	289	270	323	278	120	19	212	463	119	503	739	188
hbs11	930	966	900	368	331	425	930	1210	528	888	930	497
hnRNP_A1	2350	2253	2064	1246	1031	850	890	2801	1391	2757	3064	1421
hnRNP_A2/B1	2326	2226	2148	1352	744	376	951	3489	1135	3573	4241	1380
lin_28_A	163	167	136	90	88	154	39	115	105	64	53	86
lin_28_B	642	507	485	3	8	3	7	654	259	3062	3917	133
mLSD1_2a_minus	329	419	420	228	129	40	203	588	161	266	267	116
mLSD1_2a_plus	488	422	418	211	96	28	182	656	188	278	325	90
myc	200	243	253	122	106	137	148	349	184	382	378	593

8. Vorabveröffentlichungen von Ergebnissen

Zum Zeitpunkt des Einreichens dieser Dissertation gibt es keine Vorabveröffentlichungen von Ergebnissen dieser Arbeit.