

Aus dem Institut für Diagnostische und Interventionelle Radiologie
(Prof. Dr. med. J. Lotz)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Etablierung einer spezifischen Färbung
in der röntgenbasierten virtuellen
Histologie von Lungenkarzinomen
durch den Einsatz goldmarkierter
Antikörper**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Justus Caspar Alves

aus

Hamburg

Göttingen 2023

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuer/in Priv.-Doz. Dr. sc. hum. C. Dullin

Ko-Betreuer/in: Priv.-Doz. Dr. med. F. Bremmer

Prüfungskommission

Referent/in Priv.-Doz. Dr. sc. hum. C. Dullin

Ko-Referent/in: Priv.-Doz. Dr. med. F. Bremmer

Drittreferent/in:

Datum der mündlichen Prüfung: 28.11.2023

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel " Etablierung einer spezifischen Färbung in der röntgenbasierten virtuellen Histologie von Lungenkarzinomen durch den Einsatz goldmarkierter Antikörper" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den
.....
(Unterschrift)

Die Daten, auf denen die vorliegende Arbeit basiert, wurden teilweise publiziert:

Albers J, Svetlove A, Alves J, Kraupner A, di Lillo F, Markus MA, Tromba G, Alves F, Dullin C (2021): Elastic transformation of histological slices allows precise co-registration with microCT data sets for a refined virtual histology approach. *Sci Rep* 11, 10846

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	V
1 Einleitung	1
1.1 Lungenkarzinom.....	1
1.2 Histologische und immunhistochemische Diagnostik	1
1.3 Antikörper /-fragmente.....	3
1.4 Röntgen-basierte Verfahren.....	5
1.4.1 Micro-CT	5
1.4.2 Phasenkontrast- μ CT	7
1.4.3 Spezifische Färbung.....	8
1.5 Tierexperimentelles Modellsystem für Lungenkarzinome.....	9
1.6 Fragestellung	10
2 Material und Methoden	12
2.1 Materialien	12
2.1.1 Geräte.....	12
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	14
2.1.3 Chemikalien.....	15
2.1.4 Immunologische Sonden.....	18
2.1.5 Versuchstiere.....	19
2.1.6 Zelllinien	19
2.1.7 Software	20
2.2 Methoden.....	20
2.2.1 Zellkultur	20
2.2.2 Tiermodell.....	21
2.2.3 Implantation der Tumorzellen	21
2.2.4 Sektion.....	21
2.2.5 Humanes Material	22
2.2.6 Gewinnung von Biopsien.....	22
2.2.7 Whole mount staining – Free-Floating.....	22
2.2.8 In-vivo μ CT.....	25
2.2.9 Propagation-based imaging (PBI)	26
2.2.10 Histologie an Gewebe-Dünnschnitten	27
2.2.11 Fluoreszenzmikroskopie	30
2.2.12 Elektronenmikroskopie.....	31
2.2.13 Korrelation PBI – Histologie	32

3	Ergebnisse.....	33
3.1	Etablierung des Workflows zur Gewinnung von Lungen-Stanzbiopsien.....	33
3.1.1	In-vivo Monitoring der Lungentumor-Mausmodelle.....	33
3.1.2	Ex-vivo Gewinnung der murinen und humanen Lungenbiopsien.....	36
3.1.3	Einbettung und Visualisierung am Synchrotron.....	36
3.1.4	Kombination von PBI mit Histologie.....	41
3.1.5	Anwendung des Workflows auf humane Lungenbiopsien.....	42
3.2	Immunhistochemische Färbungen von ganzen Lungenbiopsien.....	45
3.2.1	Zweistufiger Ansatz mit konventionellen Antikörpern.....	45
3.2.2	Direkter Ansatz mit anti-EGFR goldmarkierten Nanobodies.....	53
3.3	Fusion von PBI und Histologie durch elastische Transformation.....	58
3.3.1	Workflow der Fusion (PBI - Histologie).....	61
4	Diskussion.....	62
4.1	Morphologische Darstellung mittels PBI und Histologie.....	62
4.2	Limitationen der spezifischen Färbungen.....	63
4.3	Klinische Anwendung und Ausblick.....	67
5	Zusammenfassung.....	69
6	Literaturverzeichnis.....	71

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung immunologischer Sonden.	4
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Einflusses verschieden großer Brennflecke auf die Bildschärfe.....	6
Abbildung 3: Aufbau der SYRMEP-Beamline am Synchrotron „Elettra“.....	26
Abbildung 4: Arbeitsablauf.....	32
Abbildung 5: In-vivo μ CT-Schnittbilder eines Mausthorax zwei Monate nach intravenöser Gabe von A549-Tumorzellen.....	34
Abbildung 6: In-vivo μ CT-Schnittbilder eines Mausthorax zwei Monate nach transthorakaler Implantation von A549-Tumorzellen.....	35
Abbildung 7: Gewinnung von Stanzbiopsien aus Lungentumor-Mausmodell.....	36
Abbildung 8: Virtuelle Schnitte durch PBI-Daten von ungefärbtem murinem Lungengewebe.....	37
Abbildung 9: Artefakte durch Riss- und Luftblasenbildung in einem rekonstruierten Schnitt aus PBI-Daten einer Lungenbiopsie in Agarose.....	38
Abbildung 10: Repräsentative PBI-Schnitte einer Stanzbiopsie aus gesundem murinem Lungengewebe in Paraffin.....	39
Abbildung 11: 3D-Rendering einer Stanzbiopsie aus murinem Lungengewebe.....	40
Abbildung 12: PBI- und lichtmikroskopischer Querschnitt einer murinen Lungentumor-Stanzbiopsie in Paraffin.....	41
Abbildung 13: Darstellung derselben Schnittebene einer murinen Lungentumor-Stanzbiopsie mittels histologischen Serienschnitten und einem davon abgeleiteten virtuellen PBI-Schnitt.....	42
Abbildung 14: Darstellung derselben Schnittebene einer humanen Lungentumor-Stanzbiopsie mittels histologischen Serienschnitten und einem davon abgeleiteten virtuellen PBI-Schnitt.....	44
Abbildung 15: Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von CD31-exprimierenden Endothelzellen in Stanzbiopsien aus gesunden murinen Lungen.....	46
Abbildung 16: Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von CD31-exprimierenden Endothelzellen in Stanzbiopsien aus gesunden murinen Lungen mit dual-markierten FluoroNanogold-Sekundäntikörpern.....	48
Abbildung 17: PBI-, Immunfluoreszenz- und lichtmikroskopische Querschnitte einer repräsentativen, gegen CD31 gefärbten 1 mm Biopsie aus gesundem murinem Lungengewebe.....	50
Abbildung 18: PBI-, lichtmikroskopische und Immunfluoreszenz-Querschnitte einer repräsentativen, gegen EGFR gefärbten murinen Lungentumor-Stanzbiopsie.....	52
Abbildung 19: Kontrolle der Bindungsaffinität der goldmarkierten anti-EGFR-Nanobodies an A549- und HTB182-Zellen.....	54
Abbildung 20: Korrespondierende Schnitte einer mit Gold-Nanobodies inkubierten murinen Lungentumorbiopsie.....	56

Abbildung 21: Korrespondierende Schnitte einer mit anti-EGFR-Gold-Nanobodies gefärbten humanen 1 mm Lungenbiopsiestanze.	57
Abbildung 22: Korrespondierende Schnitte einer mit Gold-Nanobodies gefärbten humanen 1 mm Lungenbiopsiestanze.	58
Abbildung 23: Korrelation von virtuellen PBI-Schnitten mit histologischen Schnitten. 59	
Abbildung 24: Überlagerung verschiedener histologischer Färbungen mit virtuellen PBI-Schnitten und 3D-Rendering	60
Abbildung 25: Workflow der Fusion von PBI und Histologie.	61

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte	12
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien	14
Tabelle 3: Chemikalien	15
Tabelle 4: Antikörper	18
Tabelle 5: Nanobodies	19
Tabelle 6: Versuchstiere	19
Tabelle 7: Zelllinien	19
Tabelle 8: Software	20

Abkürzungsverzeichnis

μCT	Micro-Computertomografie
ABI	<i>analyser-based imaging</i>
AEC	3-Amino-9-ethylcarbazol
ALK	<i>anaplastic lymphoma kinase</i> , Anaplastische Lymphomkinase
CCV	<i>clathrin coated vesicle</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CK	<i>cytokeratin</i> , Zytokeratin
CT	Computertomografie
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-essigsäure
EE	<i>early endosome</i> , frühes Endosomen
EGFR	<i>endothelial growth factor receptor</i>
Fab	<i>fragment antigen binding</i> , Antigenbindendes Fragment
Fc	<i>fragment crystallisable</i> , Kristallisierbares Fragment
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fötales Kälberserum
FOV	<i>field of view</i>
FOXN1	Forkhead-Box-Protein N1
HCAb	<i>heavy-chain-only antibody</i> , Schwere-Ketten-Antikörper
HE	Hämatoxylin-Eosin
IHC	Immunhistochemie
LE	<i>late endosome</i> , spätes Endosomen
MTS	<i>Masson-Trichrom-Staining</i>
NSCLC	<i>non-small-cell lung carcinoma</i>
PAP	Peroxidase-Anti-Peroxidase
PAS	<i>periodic acid-Schiff</i>
PBI	<i>propagation based imaging</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> , Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PBSTx	Triton-X100 (0,5%) in phosphatgepuffertter Kochsalzlösung
PFA	Paraformaldehyd (Formalin)
PM	Plasmamembran
PTA	<i>phosphotungstic acid</i> , Wolframatophosphorsäure
ROI	<i>region of interest</i>

sdAb	<i>single domain antibody</i>
SDD	<i>sample-to-detector-distance</i>
SNR	<i>signal-to-noise ratio</i>
SYRMEP	<i>Synchrotron Radiation for Medical Physics</i>
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TTF1	Thyroidaler Transkriptionsfaktor 1
VH	<i>variable domain of the heavy chain</i> , variable Domäne der schweren Kette.
VHH	<i>variable domain of the heavy-chain-only antibody</i> , variable Domäne eines Schwere-Ketten-Antikörpers
WMS	<i>whole mount staining</i>
WSI	<i>whole slide imaging</i>

1 Einleitung

1.1 Lungenkarzinom

Lungenkarzinome stellen mit 18% weltweit den größten Anteil der Todesfälle durch Tumorerkrankungen dar (Sung et al. 2021). Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt trotz Fortschritten in Diagnostik und Therapie weltweit nur 10 – 20% (Allemani et al. 2018). Das Lungenkarzinom wird in verschiedene histologische Subtypen eingeteilt. Etwa 80% der Lungenkarzinome in Deutschland werden den nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen (*non-small-cell lung carcinoma*, NSCLC) zugeordnet, darunter stellen Adenokarzinome mit etwa 36 – 46% den größten Anteil dar, gefolgt von Plattenepithelkarzinomen mit 15 – 29% (Kraywinkel und Schönfeld 2018). Zum Diagnosezeitpunkt zeigen sich etwa zwei Drittel aller NSCLC lokal fortgeschritten oder metastasiert (Morgensztern et al. 2010). Die Subtypen der Lungenkarzinome bilden eine heterogene Gruppe, die sich in Prognose und Therapieansprechen zum Teil deutlich unterscheiden (Nicholson et al. 2022). Die Therapie stützt sich auf die operative Resektion, Strahlentherapie und systemische Chemotherapie, beziehungsweise eine Kombination daraus (Hirsch et al. 2017). Durch das Aufkommen gezielter Therapieansätze rückt die molekulargenetische Diagnostik vermehrt in den Fokus. Aktivierende Mutationen im EGF-Rezeptor-Gen (*endothelial growth factor receptor*, EGFR) und Translokationen der Gene der Anaplastischen-Lymphomkinase- (ALK-) und ROS1-Kinase spielen dabei als pharmakologische Ziele von Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) eine zentrale Rolle (Lindeman et al. 2018). So hängt der Behandlungserfolg des TKI Erlotinib davon ab, ob bei Patienten eine aktivierende EGFR-Mutation vorliegt (Lindeman et al. 2013). Neben der molekulargenetischen Untersuchung sind für die Diagnostik aber weiterhin die morphologische Analyse und die immunhistochemische Bestimmung des Expressionsmusters tumorassoziierter Proteine essenziell (Osmani et al. 2018).

Die umfassende histopathologische und molekulargenetische Diagnostik dient der präzisen Klassifikation der Lungentumore, um die passende Therapie für Patienten auszuwählen und so ihre Überlebenschancen zu erhöhen.

1.2 Histologische und immunhistochemische Diagnostik

Für die morphologische Charakterisierung karzinomverdächtiger Lungenbiopsien ist die Histologie das Standardverfahren. Sie bietet eine hohe örtliche Auflösung und die Möglichkeit der Unterscheidung verschiedener Gewebetypen durch chemische

Färbeprotokolle wie die routinemäßig durchgeführte Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) und die *Periodic Acid Schiff Reaction* (PAS). Gerade die Entwicklung hin zu einer „digitalen Pathologie“, beispielsweise durch Aufnahme und Speicherung gesamter Schnitte in hoher Auflösung (whole slide imaging, WSI), erweitert die diagnostischen Möglichkeiten und ebnet den Weg zum Einsatz künstlicher Intelligenz in der histopathologischen Diagnostik (Niazi et al. 2019).

Der wesentliche Nachteil der histologischen Verfahren ist, dass von der Probe dünne Schnitte angefertigt werden müssen und somit primär zweidimensionale (2D) Daten generiert werden können. Das komplexe dreidimensionale Gewebe kann so nur unzureichend dargestellt werden. Die quantitative Bestimmung von Volumina zum Beispiel ist nur bedingt durch Anfertigung von aufwendigen Serienschnitten möglich. Außerdem muss die Probe chemisch entwässert und in Paraffin eingebettet werden. Jeder dieser Bearbeitungsschritte kann zu Artefakten wie Schrumpfungen oder Zerreißen und Faltungen führen (Dempster 1942; Rastogi et al. 2013). Die Probe wird zudem durch die Anfertigung der Schnitte zerstört und steht anschließend nicht mehr zu weiteren Analysen zur Verfügung.

Es ist möglich, histologische Serienschnitte mithilfe von 3D-Registrierung und elastischer Transformation zu Schichtstapeln zusammenzufügen und so näherungsweise 3D-Informationen zu erhalten (Ourselin et al. 2001; Handschuh et al. 2010). Ein neuerer Ansatz dafür ist das sogenannte „block-face imaging“ (Ishii et al. 2021). Diese Verfahren sind jedoch zeit- und personalintensiv, wodurch sie weder in der präklinischen Forschung noch in der klinischen Praxis regelhaft eingesetzt werden.

Durch die Hinzunahme von antikörperbasierten Färbungen an Gewebedünnschnitten, wie der Immunhistochemie (IHC), kann die Expression von tumorassoziierten Biomarkern spezifisch sichtbar gemacht werden. Bei Verdacht auf NSCLC gehören p40 und der thyroideale Transkriptionsfaktor 1 (TTF1) zu den zu untersuchenden Markern bei der Differenzierung zwischen Adeno- und Plattenepithelkarzinomen (Yatabe et al. 2019). NSCLC zeigen zudem in 43 – 89% der Fälle eine Überexpression von EGFR, bei der Untergruppe der Adenokarzinome liegt der Anteil bei 65% (Hirsch et al. 2003).

Die Immunhistochemie ist eine lange etablierte und optimierte Technik. Coons konnte 1941 erstmals spezifische Antigene mittels Fluoreszein-markierter Antikörper in der Fluoreszenzmikroskopie darstellen (Coons et al. 1941). Immunoenzym-Techniken wie die Peroxidase-Anti-Peroxidase(PAP)-Reaktion ermöglichten die Immunhistochemie auch in der Lichtmikroskopie, sodass die Gewebemorphologie und vorhandene Antigene

gleichzeitig beurteilt werden können (Sternberger et al. 1970). Die Entwicklung spezifischer monoklonaler Antikörper konnte die Anwendungsbreite zusätzlich erweitern (Köhler und Milstein 1975). Heute sind zweistufige, indirekte Antikörper-Modelle üblich, von denen der primäre gegen das Ziel-Epitop und der sekundäre gegen den primären Antikörper gerichtet ist. Dies erhöht die Sensitivität, da mehrere sekundäre an einen primären Antikörper binden können und so eine niedrigere Konzentration des primären Antikörpers an der Zielstruktur benötigt wird (Coons et al. 1955; Gosselin et al. 1986).

1.3 Antikörper /-fragmente

In den oben genannten immunhistochemischen Färbungen an Gewebedünnschnitten werden in der pathologischen Diagnostik als immunologische Sonden herkömmliche Antikörper eingesetzt. Diese bestehen im Falle der regelhaft verwendeten IgG-Antikörper aus aneinandergelagerten leichten (L) und schweren (H) Ketten (Abbildung 1). Ein Antikörper besteht dabei aus zwei verbundenen schweren Ketten, an die jeweils zwei leichte Ketten gebunden sind. Es resultiert ein Y-förmiges Molekül, dessen zwei Arme die variablen, antigenbindenden Domänen (*fragment antigen binding*, Fab) darstellen. Der Stamm wird als konstante Region (*fragment crystallisable*, Fc) bezeichnet. IgG-Antikörper haben ein molekulares Gewicht von 150 ca. kDa (Murphy und Weaver 2016). Ihre Fähigkeit zur Gewebedurchdringung ist also durch ihre Größe begrenzt. Dies stellt bei der Färbung wenige Mikrometer dünner histologischer Schnitte kein Problem dar, wird jedoch bei größeren Proben, beispielsweise ganzen Biopsien, zur Herausforderung. Kleinere immunologische Sonden wie Nanobodies sind daher von großem Interesse.

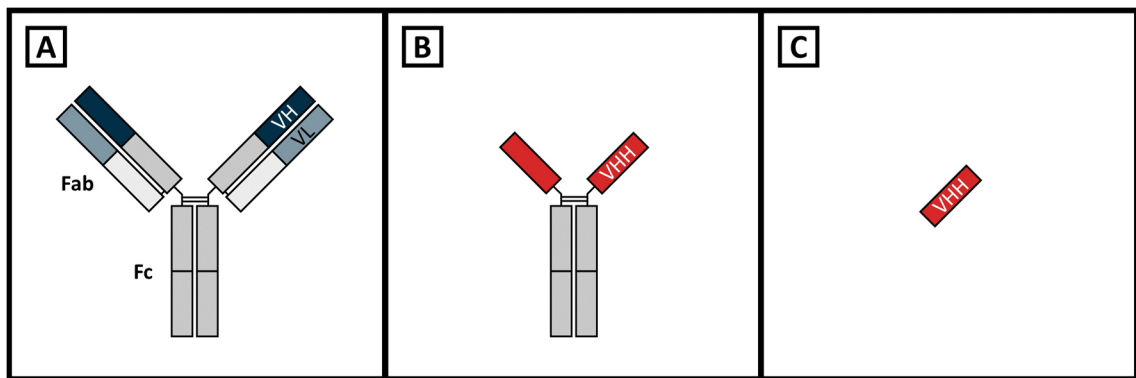


Abbildung 1: **Schematische Darstellung immunologischer Sonden.** A) Konventioneller IgG-Antikörper. Molekulargewicht ca. 150 kDa. VH: Variable Domäne der schweren Kette. VL: Variable Domäne der leichten Kette. Fab: Antigenbindendes Fragment. Fc: Kristallisierbares Fragment. B) *Heavy-chain-only-antibody* (HcAb) aus Kameliden. VHH: Variable Domäne eines HcAb. C) Nanobody (*single-domain-antibody*, sdAb). Molekulargewicht ca. 15 kDa.

In Kameliden wurden kleinere Immunglobuline gefunden, die wie in Abbildung 1B gezeigt ausschließlich aus schweren Ketten bestehen (*heavy chain only antibodies*, HcAb) (Hamers-Casterman et al. 1993). Deren hochvariable antigenbindende Domäne (VH der HcAb = VHH) kann rekombinant hergestellt werden und wird *single domain antibody* (sdAb) oder Nanobody genannt (Schoonooghe et al. 2012). Dadurch entstehen kleine, hochspezifische Antikörper mit sogar größerer Antigenbindungsvielfalt als vergleichbare IgG-Antikörper (Mitchell und Colwell 2018). Nanobodies sind mit einer molekularen Masse von ca. 15 kDa zehnmal kleiner als herkömmliche IgG-Antikörper (Stijlemans et al. 2004). Nanobodies wurden bereits in der Immunhistochemie eingesetzt und zeigen dort bei der Färbung von Astrozyten zum einen eine bessere Gewebedurchdringung als herkömmliche Antikörper und mindestens gleichwertige Färbemuster mit vermehrter Anfärbung peripherer Zellanteile (Perruchini et al. 2009). Durch die Kopplung mit entsprechenden Konjugaten eignen sie sich für verschiedene Modalitäten. In der Immunfluoreszenz konnte mit anti-HER2-Nanobodies bei der Detektion disseminierter Mammakarzinom-Mikrometastasen ex-vivo eine Überlegenheit zu herkömmlichen Antikörpern gezeigt werden (Ramos-Gomes et al. 2018). In SPECT-Analysen (Single-Photon-Emissionscomputertomografie) konnten mittels anti-EGFR-Nanobodies auch in-vivo Tumoreareale bereits 45 min nach Applikation detektiert werden (Krüwel et al. 2016).

1.4 Röntgen-basierte Verfahren

1.4.1 Micro-CT

Die komplexe dreidimensionale (3D) Gewebearchitektur kann durch die in der histopathologischen Routinediagnostik eingesetzte 2D-Histologie nur unvollständig beurteilt werden. So können immer nur eingeschränkt Aussagen über Tumorausdehnung und mögliches invasives Wachstum oder Gefäßeinbrüche gemacht werden. Daher ist davon auszugehen, dass eine detaillierte 3D-Bildgebungsmodalität zu einer genaueren Charakterisierung der Lungenkarzinome beitragen würde, insbesondere durch die 3D-Darstellung tumorassoziierter Proteine. Dafür eignen sich hochauflösende röntgenbasierte Verfahren, wie die Micro-Computertomografie (μ CT). Diese bezeichnet die CT-Bildgebung mit einer Auflösung im Bereich unterhalb eines Millimeters und wird in der präklinischen Forschung breit eingesetzt. Das μ CT basiert wie das klinische CT auf der Gewinnung von Projektionen aus verschiedenen Durchstrahlungswinkeln über mindestens 180° . Es folgt die Rekonstruktion, also das Errechnen der durchstrahlten Querschnitte und die Darstellung der lokalen Absorptionskoeffizienten. Ein Unterschied besteht darin, dass beim μ CT meist die Probe im Strahlengang rotiert wird, während Strahlenquelle und Detektor fixiert sind. Die Rotation der Probe kann aufgrund ihrer geringen Masse präziser durchgeführt werden, als die Röntgenquelle und den Detektor zu rotieren (Metscher 2009).

Die räumliche Auflösung bzw. die Bildschärfe ist maßgeblich durch die Größe des Brennflecks der Röntgenröhre, also der Größe der Strahlenquelle, limitiert (Abbildung 2). Daher werden in μ CT-Systemen Micro- oder Nanofokus-Röhren verwendet, die den Elektronenstrahl auf eine kleine Fläche an der Anode bündeln. Ein kleinerer Brennfleck erlaubt Aufnahmen mit größerer Bildschärfe, sorgt jedoch für vermehrte Hitzeentwicklung an der Anode (Paulus et al. 2000). In klinischen Systemen werden zur besseren Hitzeverteilung Drehanodenröhren verwendet, während es in der Forschung Konzepte mit Flüssigmetallstrahl-Anoden gibt (Hemberg et al. 2003). Die Hitzeentwicklung bleibt dennoch limitierend für die zu betreibende Spannung und folglich den erreichbaren Fluss, also Photonen pro Sekunde (Flynn et al. 1994).

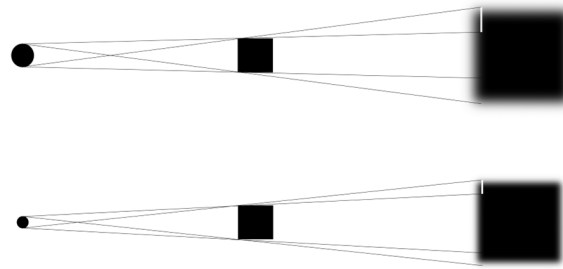


Abbildung 2: **Schematische Darstellung des Einflusses verschieden großer Brennflecke auf die Bildschärfe.** Beim Einsatz eines kleineren Brennflecks (untere Grafik) werden die hier gezeigten Kanten des Objekts auf einem kleineren Bereich am Detektor repräsentiert und stellen sich so schärfer dar.

Ein Ziel der Röntgenbildgebung ist das Erreichen eines möglichst hohen Signal-Rausch-Verhältnis (*signal-to-noise-ratio*, SNR). Dies beschreibt das Verhältnis von erwünschtem Photonen-Signal zu unerwünschtem Hintergrundrauschen. Um dieses Verhältnis zu verbessern, werden bei klinischen CT-Systemen oft mehrere Detektorelemente digital zu funktionellen Detektoreinheiten zusammengefasst. In diesem als „*binning*“ bezeichneten Prozess können so pro funktioneller Detektoreinheit mehr Photonen registriert und daher eine höhere SNR erreicht werden, während die Auflösung sinkt (Irie et al. 2022).

Um eine höhere Auflösung zu erlangen, werden hingegen kleine funktionelle Detektoreinheiten benötigt. Damit an den kleineren Detektoreinheiten eine weiterhin ausreichende SNR erreicht wird, muss also das Angebot an Photonen erhöht werden. Da der Fluss (Photonen/s) wie oben beschrieben nur begrenzt erhöht werden kann, muss dies also über eine längere Messzeit geschehen.

Ein großes Einsatzgebiet der μ CT ist die Bildgebung von knöchernen Strukturen. Aufgrund der hohen Unterschiede der Abschwächung zwischen Knochen- und Weichgewebe bzw. Luft eignen diese sich besonders gut für die röntgenbasierte Bildgebung. So ist es beispielsweise mittels hochauflösender μ CT möglich, durch eine 3D-Analyse des lakunokanalikulären Systems Knochenumbauprozesse besser zu verstehen (Schneider et al. 2010).

Die μ CT-Bildgebung von Weichgewebe ist allerdings durch dessen geringe Abschwächung insgesamt, sowie durch die geringen Abschwächungsunterschiede zwischen benachbarten Bereichen limitiert. Durch Färbeprotokolle mit Schwerionen kann der Kontrast von Weichgewebe in der röntgenbasierten Bildgebung unspezifisch erhöht werden. Ein Beispiel dafür ist die PTA-Färbung (*phosphotungstic acid*, Wolframatophosphorsäure) mit Wolfram-Ionen (Metscher 2009). Dieser Ansatz wurde in den vergangenen Jahren vielfach bei der μ CT-Bildgebung verschiedener Organe eingesetzt. Dadurch können beispielsweise murine

Nieren und pathologische Veränderungen wie Fibrose ex-vivo 3D dargestellt und funktionelle Regionen sowie Volumina quantifiziert werden (Missbach-Guentner et al. 2018).

1.4.2 Phasenkontrast- μ CT

1.4.2.1 Grundlagen

Durch den geringen Weichgewebekontrast und die oben erläuterte Notwendigkeit langer Messzeiten eignen sich herkömmliche μ CT-Systeme nur eingeschränkt für die Sub-Mikrometer-Bildgebung von Weichgewebe. Der Einsatz von Teilchenbeschleunigern wie Synchrotrons als Strahlenquelle erlaubt es hingegen, Weichgewebeproben in hoher Auflösung in kürzerer Zeit aufzunehmen. Die physikalischen Eigenschaften der Strahlung aus Synchrotron-Quellen ermöglichen zudem den Einsatz von Phasenkontrast-Bildgebung.

In Synchrotrons werden Elektronen auf nahezu Lichtgeschwindigkeit beschleunigt, in einen Speicherring eingespeist und dort durch eine besondere Anordnung von Magneten in einer polygonalen Kreisbahn gehalten. Bei der Ablenkung der Elektronen aus ihrer Bahn entsteht tangential dazu elektromagnetische Strahlung, die in einzelnen sogenannten *beamlines* ausgeleitet wird (Winick 1987; Falta und Möller 2010). Elektromagnetische Strahlung aus Synchrotron-Quellen hat mehrere vorteilhafte Eigenschaften: Bei Ablenkung der Elektronen entsteht ein **breites Spektrum** an Wellenlängen - von Radiowellen bis hin zu Röntgenstrahlung - von denen die für das jeweilige Experiment interessanten Wellenlängen isoliert verwendet werden können. Die elektromagnetische Strahlung wird bei der Ablenkung durch den Magneten in einem sehr schmalen Kegel ($0,006^\circ$) abgegeben, sodass sie praktisch **parallel** ist. Die Strahlung weist einen **hohen Fluss** auf. So kann sie im Vergleich zu normalen Röntgenstrahlenquellen mindestens die 1000-fache Anzahl an Photonen pro Sekunde zur Verfügung stellen. Röntgenstrahlung aus Synchrotronquellen ist etwas eine Million Mal heller als herkömmliche Quellen von Röntgenstrahlen. Durch den hohen Fluss und den kleinen Öffnungswinkel sowie die geringe Querschnittsfläche, weist die Strahlung aus Synchrotronquellen eine außerordentlich hohe **Brillanz** auf (Winick 1987).

Die zeitliche und räumliche Kohärenz erlaubt so den Einsatz von Phasenkontrast-Bildgebung (Snigirev et al. 1995). Beim Durchgang der Strahlung durch die Probe entstehen an Grenzflächen verschiedener Medien durch Refraktion kleine Phasenverschiebungen. Eine Modalität zu deren Messung ist das „propagation-based imaging“ (PBI), bei dem die geringen Phasenverschiebungen durch einen ausreichenden Abstand der Probe zum Detektor in Form von Intensitätsvariationen gemessen werden können. Der Vorteil gegenüber anderen

Modalitäten, wie dem „analyser-based imaging“ (ABI), besteht im simplen Aufbau, der keine weiteren Bauelemente wie einen Analysatorkristall benötigt (Kitchen et al. 2005).

Das PBI kann in Kombination mit PTA-Färbungen eingesetzt werden, wie bei der detaillierten Darstellung ganzer muriner Herzen oder der Quantifizierung von murinen Lungentumoren (Dullin et al. 2017; Bidola et al. 2019). Da das PBI aber auch ohne Färbungen mit Schwerionen in Weichgewebe einen guten Kontrast liefert, kann auf diese verzichtet werden (Saccomano et al. 2018). Dies konnte an der Bildgebung ungefärbten humanem Mammagewebe gezeigt werden (Baran et al. 2018; Pacilè et al. 2019). Gerade Lungengewebe kann durch die ausgeprägten Kanten zwischen Alveolen und Gewebe besonders gut im PBI dargestellt werden (Kitchen et al. 2004; Dullin et al. 2015; Albers et al. 2018b). Das PBI stellt also eine native, nicht-destruktive, 3D Bildgebungsmodalität für Weichgewebe dar (Betz et al. 2007). Die hochauflösende Schichtbildgebung ermöglicht unter anderem die Anfertigung von 3D-Darstellungen, sogenannten Renderings, und damit das Anzeigen beliebiger virtueller Schnittebenen durch die Probe. Diese „virtuelle Histologie“ ermöglicht ein besseres Verständnis komplexer räumlicher Gewebearchitektur. Durch einen hierarchischen Ansatz können menschliche Organe ex-vivo zunächst in Gänze und dann in Zielbereichen detailliert dargestellt werden (Walsh et al. 2021).

1.4.3 Spezifische Färbung

Da die röntgenbasierte Bildgebung von Weichgewebe aus oben genannten Gründen herausfordernd ist, können unspezifische Färbeprotokolle wie die PTA-Färbung zur Kontrasterhöhung eingesetzt werden. Diese Verfahren basieren auf der Diffusion von schweren Ionen ins Gewebe, nehmen dadurch viel Zeit in Anspruch und können durch ungleichmäßiges Eindringen zu uneinheitlicher Färbung führen. Zudem kann es zur Verringerung der Kantenschärfe kommen (Saccomano et al. 2018).

Einer der größten Nachteile der röntgenbasierten Bildgebung gegenüber der klassischen Histologie bzw. Immunhistochemie ist die fehlende Möglichkeit der spezifischen Darstellung von Gewebe oder molekularen Zielstrukturen. Die Entwicklung spezifischer Färbemethoden ist daher in der röntgenbasierten virtuellen Histologie von großem Interesse.

Da ein zentraler Vorteil der μ CT in der nicht-destruktiven Bildgebung der Probe im Ganzen besteht, muss die Probe auch als Ganze gefärbt werden. Dies wird auch *whole-mount-staining* (WMS) genannt. Während bei einer herkömmlichen Immunhistochemie in der Regel mit 2 μ m dünnen Paraffinschnitten gearbeitet wird, stellt beim WMS die Durchdringung der Probe mit Antikörpern daher eine besondere Herausforderung dar. Eine Methode dafür ist das

Free-Floating-Verfahren. Dabei werden die Proben freischwimmend in eine Antikörperlösung gegeben mit dem Vorteil, dass Antikörper von allen Seiten in die Probe gelangen können. Durch einfache Diffusion durchdringen die Antikörper die Probe langsam und binden ihre Epitope. Bei unvollständiger Durchdringung kommt es zu einem randbetonten Färbefeld unter Aussparung des Probenzentrums (Potts et al. 2020). Um dies zu verhindern können unterstützende Maßnahmen angewendet werden. Häufig wird das Gewebe durch Zugabe von Tensiden wie Triton X-100 permeabilisiert (Cheng et al. 2019). Hinzu kommt die Möglichkeit, die Probe leicht mechanisch zu bewegen. Nachteile bei der Anwendung dieser Methoden sind mögliche Veränderungen des Gewebes durch die chemische bzw. mechanische Manipulation (Koley und Bard 2010).

Zudem muss ein geeignetes Konjugat am Antikörper eingesetzt werden, welches mit der gewählten Modalität detektiert werden kann. In der μ CT eignen sich schwere Ionen, also neben dem genannten Wolfram (Ordnungszahl 74) auch Gold (Ordnungszahl 76). Gold hat sich bereits als geeignetes Kontrastmittel in der röntgenbasierten Bildgebung bewährt (Hainfeld et al. 2006). Da Gold als Marker auch in der Elektronenmikroskopie etabliert ist (Horisberger und Rosset 1977), sind bereits konjugierte Gold-Antikörper, sowie Konjugations-Kits kommerziell verfügbar. Lungengewebe scheint aufgrund der organspezifisch kurzen Diffusionsstrecken zwischen Alveolen und Blutgefäßen besonders für die Durchdringung von Antikörpern geeignet (Weibel und Knight 1964).

In der Literatur finden sich bisher vereinzelte Ansätze spezifischer Färbetechniken. Metscher und Müller konnten 2011 acetyliertes α -Tubulin und Kollagen II in Hühnerembryos mittels enzymvermittelter Silber-Ionen-Ablagerung anfärben (Metscher und Müller 2011). Die Spezifität dieser Methode ist durch eine fehlende Negativkontrolle nicht ausreichend abgesichert.

1.5 Tierexperimentelles Modellsystem für Lungenkarzinome

Um ein besseres Verständnis über die Pathogenese der Tumorerkrankungen zu erlangen und neue Verfahren in Diagnostik und Therapie zu entwickeln, werden Tumor-Tiermodelle benötigt. Da spontane Lungentumore in Mäusen im Wachstumsmuster den humanen Lungenkarzinomen ähneln, eignen sie sich als Wirtstiere für verschiedene Lungentumormodelle (Meuwissen und Berns 2005; Gazdar et al. 2016).

Immundefiziente Nacktmäuse sind in der Forschung als Wirtstiere für die Transplantation von Tumorzellen weit verbreitet (Flanagan 1966; Pantelouris 1968). Sie sind homozygote Träger einer Deletion im FOXP1-Gen (Forkhead-Box-Protein N1). Sowohl beim

Menschen als auch bei der Maus sorgt die fehlende Expression des Transkriptionsfaktors FOXP1 neben dem Ausbleiben der Haarentwicklung zu einer rudimentären Thymusbildung und so zum Verlust der Fähigkeit, T-Zellen zu entwickeln. Es kommt zu einer primären T-Zell-abhängigen Immundefizienz (Romano et al. 2013). Dadurch ist es möglich, Nacktmäusen xenogen Tumorzellen zu implantieren, welche weiterhin proliferieren können ohne abgestoßen zu werden (Croy et al. 2001).

Ein für das Adenokarzinom der Lunge etabliertes Mausmodell ist ein Xenograft humaner A549-Zellen in Nacktmäusen. Bei der A549-Zelllinie handelt sich um Zellen eines humanen Adenokarzinoms der Lunge, die aus einem Resektat eines soliden Lungentumors isoliert und anschließend kultiviert werden konnten (Giard et al. 1973). Die Zellen entsprechen Pneumozyten Typ II (Foster et al. 1998). Neben einer Überexpression von EGFR exprimieren sie vermehrt diverse Muzine, sowie die Zytokeratine (CK) 7, 8, 18 und 19 (Blobel et al. 1984; Zhang et al. 2009).

Die Zellen können sowohl intratracheal, transthorakal als auch intravenös verabreicht werden. Die intravenöse Implantation humaner A549-Tumorzellen in immunodefiziente Mäuse führt zur hämatogenen Metastasierung in die Lungen und stellt so ein etabliertes präklinisches Tumormodell für Adenokarzinome der Lunge dar (Leite Nascimento et al. 2016). In Verbindung mit bildgebenden Verfahren wie dem in-vivo μ CT kann die Entwicklung der Lungentumore in der Maus nicht-invasiv über die Zeit verfolgt werden (Haines et al. 2009).

1.6 Fragestellung

Das Ziel dieser Doktorarbeit war die Entwicklung einer Methode zur 3D-Immunhistochemie in der röntgenbasierten Bildgebung. Es sollte ein Verfahren etabliert werden, welches mit Hilfe der röntgenbasierten Bildgebungsmodalität PBI nicht nur die komplexe Architektur von Gewebe in 3D besser zugänglich macht, sondern zusätzlich mittels immunologischer Färbung das Expressionsmuster tumorassoziierter Biomarker in 3D zeigt. So soll eine genauere Differenzierung der verschiedenen Lungentumore ermöglicht werden.

Als Proben wurden in dieser Studie kleine zylindrische Stanzbiopsien von 1 mm Durchmesser aus murinem sowie humanem Lungengewebe verwendet. Davon war sowohl eine gute Darstellung im PBI als auch durch die Größe und die lockere Gewebearchitektur eine erhöhte Gewebedurchdringung durch immunologische Sonden zu erwarten. Im ersten Schritt sollte zunächst das gewählte Lungentumor-Mausmodell validiert und ein Workflow

etabliert werden, um die Stanzbiopsien zu gewinnen, am Synchrotron zu visualisieren und anschließend histologisch aufzuarbeiten. Dies sollte beantworten, ob sich die Gewebemorphologie mittels PBI vergleichbar darstellen lässt wie in der konventionellen Histologie. Weiterführend sollte zur Kombination beider Bildgebungsmodalitäten ein Verfahren entwickelt werden, welches eine genaue Überlagerung nach Identifizierung der korrelierenden Schnittebenen im PBI und der Histologie ermöglicht.

Als immunologische Zielproteine sollten zum einen das an Endothelzellen exprimierte CD31 (*Cluster of Differentiation 31*) in gesunden und tumortragenden Mäuselungen sowie der an Lungentumorzellen überexprimierte EGF-Rezeptor detektiert werden.

Zur Detektion im PBI sollten goldmarkierte immunologische Sonden eingesetzt werden. Abgeleitet von der konventionellen Immunhistochemie sollte mit einem indirekten, zweistufigen Antikörperansatz gearbeitet werden. Das Färben der ganzen Probe, das WMS, sollte im Free-Floating-Verfahren, also durch freie Suspension in Antikörperlösung, geschehen. Da die Messzeiten an Synchrotronquellen begrenzt sind, sollte das WMS zunächst mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern und anschließender Analyse durch die im Labor verfügbare Fluoreszenzmikroskopie validiert werden. Im folgenden Schritt sollte als sekundärer Antikörper ein doppelt konjugierter Fluoro-Gold-Antikörper verwendet werden, um unabhängig vom Ergebnis im PBI die Färbung kontrollieren zu können.

Zusätzlich sollten in einem direkten Ansatz goldmarkierte Nanobodies eingesetzt werden, die aufgrund ihrer deutlich geringeren Größe im Vergleich zu konventionellen Antikörpern eine bessere Gewebegängigkeit erwartet lassen.

Durch die Anwendung der Verfahren auf humanes Lungentumormaterial sollte die Möglichkeit eines klinischen Einsatzes der genannten Verfahren geprüft werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Tabelle 1: **Geräte**

Gerät	Hersteller
μ CT „Quantum FX“	PerkinElmer, Waltham, MA, USA
2k CCD Kamera	TRS, Moorenweis, Deutschland
ÄKTA FLPC-System	Amersham Biosciences Corp., Amersham, UK
Beheizbare Pinzette Leica EG F	Leica Biosystems GmbH, Nussloch, Deutschland
CO ₂ Inkubator BB 6220	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Dampfgarer (Immunhistochemie)	Braun GmbH, Kronberg im Taunus, Deutschland
Diamantmesser Diatome 35°	Science Services GmbH, München, Deutschland
Entwässerungssystem	Süsse Labortechnik, Gudensberg, Deutschland
Formalin Dispenser	Brand GmbH + Co KG, Wertheim, Deutschland
Größenausschlusschromatografie-Säule Superdex Increase 200 10/300 GL	Cytiva, Marlborough, MA, USA
Histologie Färbesystem	Bio-Optica Milano Spa, Mailand, Italien
Kamera C11440-22C ORCA-Flash 4.0 v2 (SYRMEP)	Hamamatsu Photonics K.K., Hamamatsu, Japan
Kleintierwaage CP4235	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Magnetrührer RET basic	IKA, Staufen im Breisgau, Deutschland
Mikroskop Axioskop 2	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Mikroskop Axiovert 200 M	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Mikroskop LSM880 mit Airyscan	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland

Mikrotom Microm HM340E	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Narkoseeinrichtung Vevo Compact	FUJIFILM Visualsonics, Toronto, Kanada
Neubauer-Zählkammer	Schuett-biotec GmbH, Göttingen, Deutschland
Paraffinausgießstation Leica EG1160	Leica Biosystems GmbH, Nussloch, Deutschland
Paraffinstreckbad 1052	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
Pipetten (0,5-10; 10-100; 100-1000 µl)	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
Pipettierhelfer Pipetboy acu	Integra Biosciences, Zizers, Schweiz
PTI QuantaMaster 30 Fluorometer	HORIBA Europe GmbH, Oberursel, Deutschland
Reinstwassersystem arium pro	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Schüttler vibrax VXR	IKA, Staufen im Breisgau, Deutschland
Sicherheitswerkbank HB 2448	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Strecktisch für Paraffinschnitte	Medax GmbH & Co. KG, Neumünster, Deutschland
Transmissionselektronenmikroskop LEO912	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Überkopf-Taumelschüttler CMV-ROM	Labortechnik Fröbel GmbH, Lindau, Deutschland
Ultramikrotom UC7	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Vortex-Genie 2	Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, USA
Wärmeplatte OTS 40	Medite, Burgdorf, Deutschland
Zentrifuge Centrifuge 5424	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Mini Microcentrifuge	Cole-Parmer Instrument Company Ltd., St. Neots, UK

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Amicon Ultra-0,5 Zentrifugen- Filtereinheit	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Deckgläschen	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Disposable biopsy punch, 1 mm	pfm medical ag, Köln, Deutschland
Disposable biopsy punch, 2 mm	pfm medical ag, Köln, Deutschland
Disposable biopsy punch, 4 mm	pfm medical ag, Köln, Deutschland
Einbettkassetten ROTILABO	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kanülen „Sterican“ (26G x ½; 0,45 x 12 mm)	Braun. Kronberg im Taunus, Deutschland
Knopfkanüle	CLS Medizintechnik und Vertrieb, Krebeck-Renshausen, Deutschland
Konische Zentrifugenröhrchen (Falcon-Tubes; 15, 50 ml)	BD (Becton, Dickinson and Company), Franklin Lakes, NJ, USA
Kryoröhrchen (1,8 ml)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Objektträger: Menzel-Gläser Superfrost Plus	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Parafilm M	Bemis Company Inc., Neenah, WI, USA

Peel-A-Way Einbettformen für Agarose	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße (250, 600, 1500 µl)	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
Safe-Lock-Tubes	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
Schraubbecher (100 ml)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipettenspitzen CELLSTAR 10 ml	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Zellkulturflaschen	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturplatte 12- Well	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland

2.1.3 Chemikalien

Tabelle 3: **Chemikalien**

Produkt	Hersteller
10 nm InnovaCoat GOLD Maleimide (20 OD) Konjugationskit	Expedeon AG, Heidelberg, Deutschland
AEC Substrat	BD (Becton, Dickinson and Company), Franklin Lakes, NJ, USA
Agarose Ultra Pure	NeoFroxx GmbH, Einhausen, Deutschland
Anilinblau	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Aqua-Poly/Mount	Polysciences, Inc., Warrington, PA, USA
Aquatex Eindecklösung	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland

Biebricher Scharlach-Säurefuchsin-Lösung	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Blockierpuffer Sea Block	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Bouin-Lösung	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Dako Antikörper-Verdünnungsmittel	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA
Dako Target Retrieval Solution	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA
DAPI	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
DePeX-Eindecklösung	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Eosin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Epon 812 (Glycidether 100)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Essigsäure	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Fetal calf serum (FCS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
H ₂ O ₂	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Isofluran	Abbvie, Ludwigshafen, Deutschland
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ketamin 10%	Medistar Arzneimittelvertrieb GmbH, Ascheberg, Deutschland
Mayers Hämalaunlösung	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Paraffin	Süsse Labortechnik Gudensberg, Deutschland
Paraformaldehyd 4%	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Phosphormolybdänsäure-Lösung	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Phosphorwolframsäure-Lösung	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
TRIS-Puffer	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Triton X-100	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Trypsin-EDTA (0,05 %/0,02 %)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Uranylacetat	Science Services GmbH, München, Deutschland
Weigert Eisenhämatoxylin	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Wolframatophosphorsäurehydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Xylazin 20 mg/ml	Riemser Pharma GmbH, Greifswald
Xylol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

2.1.4 Immunologische Sonden

Tabelle 4: Antikörper

Primärantikörper	Gegen Spezies	Ursprung	Hersteller
Rabbit Anti-CD31 ab28364 Verdünnungen: IHC 1:50 WMS 1:50	Mensch, Maus	Kaninchen	Abcam plc, Cambridge, UK
Rabbit Anti-EGFR, SP9-Klon MA5-16359 IHC 1:100 WMS 1:100	Mensch	Kaninchen	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Sekundärantikörper	Gegen Spezies	Ursprung	Hersteller
FluoroNanogold (Alexa Fluor 647; 1,4 nm Nanogold) Goat anti-Rabbit #7503 WMS 1:100	Kaninchen	Ziege	Nanoprobes Inc., Yaphank, NY, USA
Goat anti-Rabbit Alexa Fluor 594 A-11012 WMS 1:50	Kaninchen	Ziege	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Histofine Simple Stain goat-anti-rabbit HRP IHC: unverdünnt	Kaninchen	Ziege	Nichirei Biosciences Inc., Tokio, Japan

Tabelle 5: **Nanobodies**

Nanobodies	Zur Verfügung gestellt von:
Anti-EGFR-sdAb, Klone D10	Patrick Chames Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille (CRCM), Marseille, Frankreich Siehe (Nevoltris et al. 2015)

2.1.5 Versuchstiere

Tabelle 6: **Versuchstiere**

Stamm	Lieferant
NMRI Foxn1 Nu/Nu	Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, Frankreich

2.1.6 Zelllinien

Tabelle 7: **Zelllinien**

Zelllinie	Quelle
A549	American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA
A549 mCherry	Zur Verfügung gestellt von: PD Dr. Michael Winkler, Deutsches Primatenzentrum, Göttingen
NCI-H520 (HTB182)	American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA

2.1.7 Software

Tabelle 8: **Software**

Software	Hersteller
VGStudioMAX 3.2	Volume Graphics GmbH, Heidelberg, Deutschland
FIJI	NIH, Bethesda, MD, USA (Schindelin et al. 2012)
SYRMEP Tomo Project (STP 1.3.2)	Brun et al. (2017)
Elastix	Klein et al. (2010)
Fuxlastix	Albers et al. (2021) https://github.com/xPITcoding/Fuxlastix
Office 365	Microsoft, Redmond, WA, USA
Photoshop CS2	Adobe Inc., San Jose, CA, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

A549- und HTB182-Zellen wurden unter standardisierten Bedingungen bei 37°C, 5% CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% in einem Brutschrank kultiviert. Die Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen in einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Die Zellen wurden als Monolayer-Kultur in unbeschichteten Zellkulturflaschen in DMEM-Kulturmedium (*Dulbecco's modified Eagle's Medium*) mit hohem Glucosegehalt und 10% fötalem Kälberserum (*fetal calf serum*, FCS) gehalten. Abhängig von der Teilungsrate wurden die Zellen bei einer Konfluenz von 70 – 80% zwei- bis dreimal pro Woche im Verhältnis 1:10 passagiert. Dafür wurden sie zunächst in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (*phosphate buffered saline*, PBS) gewaschen und anschließend durch Inkubation mit 0,05% Trypsin und 0,02% EDTA (Ethylenediamin-tetraessigsäure) für 3 min aus der Flasche gelöst. Nach Zentrifugieren für 2 min bei 1200 rpm wurde das Pellet resuspendiert, in frisches Kulturmedium überführt und die Zellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

2.2.2 Tiermodell

Als Versuchstiere dienten athymische Nacktmäuse vom Stamm NMRI Foxn1 Nu/Nu. Die durchgeführten Tierversuche sind unter dem Tierversuchsantrag 33.9 42502 04/17 2630 genehmigt. Insgesamt wurden 12 männliche Mäuse im Alter von 3 Monaten verwendet

2.2.3 Implantation der Tumorzellen

Den Mäusen wurden jeweils ca. 1×10^6 in PBS suspendierte A549-Tumorzellen verabreicht. Dies wurde aufgrund der vorgeschriebenen Qualifikation durch Dr. Andrea Markus durchgeführt. Die Gabe der Zellen erfolgte bei sechs Mäusen durch intravenöse und bei drei Mäusen durch transthorakale Injektion. Drei Mäuse erhielten keine Tumorzellen. Für die Implantation wurden die Mäuse durch intraperitoneale Injektion einer 0,9% Kochsalzlösung mit 75 mg Ketamin und 15 mg Xylazin pro Kilogramm Körpergewicht narkotisiert. Die intravenöse Injektion erfolgte in Bauchlage unter Sicht in die Schwanzvene. Dazu wurde der Schwanz der Maus zuvor in warmes Wasser gehalten. Die transthorakale Gabe erfolgte in Bauchlage als interkostale Injektion von dorsal in die rechte Lunge. Nach erfolgreicher Injektion wurden die Mäuse auf eine Wärmeplatte transferiert und verblieben dort bis zum Ende der Narkose.

Die Sektion der meisten Tiere erfolgte nach 85 Tagen. Die drei Mäuse aus der Gruppe der transthorakalen Implantation der Tumorzellen mussten aufgrund eines ausgeprägten Gewichtsverlusts und Verschlechterung des Allgemeinzustands bereits früher seziiert werden. Dies war bei einer Maus nach einem Tag und bei den beiden anderen nach 55 beziehungsweise 66 Tagen nach Gabe erforderlich. In der Gruppe der intravenösen Applikation musste eine Maus aus demselben Grund bereits nach 80 Tagen seziiert werden.

2.2.4 Sektion

Die Tötung der Tiere erfolgte mittels CO₂ Überdosierung und zervikaler Dislokation. Aufgrund der vorgeschriebenen Qualifikation erfolgte dies durch PD Dr. Christian Dullin. Herz und Lungen wurden in Rückenlage nach medianem Hautschnitt und Durchtrennung des Sternums mittels Schere explantiert. Mit einer Knopfkanüle wurden die Lungen durch die Trachea mit Luft unter einem Druck von maximal 30 cm Wassersäule expandiert. Die Trachea wurde mit einem Bindfaden verschlossen, sodass die Luft nicht wieder entweichen konnte. Unmittelbar danach wurden die Lungen in einen Kunststoffbecher überführt und dieser in einen Behälter mit flüssigem Stickstoff gegeben.

2.2.5 Humanes Material

Es wurde zusätzlich humanes Lungen- und Lungentumorgewebe untersucht, um die klinische Translation zu demonstrieren. Dafür wurde Restmaterial aus Schnellschnitt-Operationspräparaten verwendet, an dem die klinische Diagnostik bereits abgeschlossen war. Die nativen Proben wurden unmittelbar nach Abschluss der Diagnostik mit einem Skalpell in kleiner Gewebestücke zerteilt und jeweils in Plastikbehältern in flüssigen Stickstoff gegeben. Die Genehmigung dieses Versuchs liegt unter der Antragsnummer 23/8/19 vor.

2.2.6 Gewinnung von Biopsien

Die gefrorenen Lungen wurden bei Raumtemperatur für 2 min und 30 s angetaut, bevor mit Einmalbiopsiestanzen multiple zylindrische Proben mit 1 mm Durchmesser entnommen wurden. Das Vorgehen war für murines und humanes Material gleich. Die Stanzen wurden direkt in 1,5 ml Eppendorf-Cups mit 4% Paraformaldehyd (PFA) ausgeworfen. Im Folgenden wurden sie entweder einem Färbeprotokoll zugeführt oder, wie unten beschrieben, direkt in Agarose oder Paraffin eingebettet.

2.2.7 Whole mount staining – Free-Floating

Die murinen und humanen zylindrischen Lungenbiopsiestanzen von 1 mm Durchmesser wurden in Gänze nach Formalinfixierung im Free-Floating Verfahren gefärbt.

Die Stanzen wurden dafür zunächst für 24 h bei Raumtemperatur in Eppendorf-Cups mit 4% PFA fixiert. Danach wurden die Biopsien in 12er Well Platten mit Siebeinsätzen überführt und 3 mal 20 min in PBS mit 0,5% Triton-X-100 (PBSTx) gewaschen und permeabilisiert. Die gewaschenen Biopsien wurden bei Raumtemperatur in 500 µl Eppendorf-Cups eine Stunde mit PBSTx und 10% SeaBlock unter leichter Bewegung behandelt, um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden.

Anschließend erfolgte die immunologische Färbung entweder als indirektes, zweistufiges Antikörpermodell, oder als direktes Modell mit markierten Nanobodies.

2.2.7.1 Indirektes Verfahren – Zweistufiges Antikörpermodell

Als indirektes Verfahren kam ein zweistufiges Antikörpermodell zum Einsatz. Dafür wurden im Verlauf primäre IgG-Antikörper aus dem Kaninchen gegen CD31 oder EGFR verwendet. Als sekundäre Antikörper kamen jeweils passende fluoreszenz-, bzw. goldmarkierte Antikörper zur Anwendung.

Im ersten Schritt wurden die Biopsien in 250 µl Eppendorf-Cups mit primärem Antikörper in PBSTx mit 2% SeaBlock oder für die Negativkontrolle nur in die entsprechende Lösung ohne Antikörper überführt. Als primäre Antikörper wurden entweder ein *rabbit*-anti-CD31 Antikörper in einer 1:50 Verdünnung oder ein *rabbit*-anti-EGFR Antikörper in einer Verdünnung von 1:100 verwendet. Die Inkubation mit primärem Antikörper erfolgte bei +4°C unter leichter Bewegung durch einen Überkopf-Rotationsschüttler für 4 Tage. Nach dreimaligem Waschen für je 20 min wurden alle Biopsien erneut in 250 µl Eppendorf-Cups mit nun sekundärem Antikörper überführt und wie zuvor 4 Tage inkubiert. Als Sekundärantikörper kamen ein 1:100 verdünnter *goat-anti-rabbit* Alexa Fluor 594 Antikörper oder ein 1:50 verdünnter dual markierter *goat-anti-rabbit* FluoroNanogold Antikörper mit Alexa Fluor 647 und 1,4 nm Goldpartikeln zum Einsatz.

Abschließend wurden die Biopsien erneut dreimal für 30 min in PBS gewaschen.

2.2.7.2 Direktes Verfahren – Nanobodies

Als direktes Verfahren kamen wegen ihrer geringen Größe mit 1,4 nm Goldpartikeln markierte anti-EGFR-Nanobodies zum Einsatz. Es handelte sich um D10 anti-EGFR-Nanobodies mit freien Cysteinresten zur Kopplung der Konjugate (Nevoltris et al. 2015).

2.2.7.2.1 Gold-Labeling

Die anti-EGFR-sdAbs (Nanobodies) besitzen zur Konjugation Thiolgruppen an freien Cysteinresten. Um eine Dimerisierung aufzuheben, mussten die Thiolgruppen der Nanobodies vor der Konjugation zunächst reduziert werden. Im Anschluss konnte mit Hilfe eines Labeling-Kis über die Maleimidgruppen an den kolloidalen Goldpartikeln (10 nm) eine Konjugation stattfinden.

Als Ausgangslösung standen 20 µl einer Nanobody-Lösung mit 3 µg/µl zur Verfügung. Zunächst wurde ein Teil der Nanobody-Lösung mit Hilfe eines Säulenchromatografie-Systems in Kombination mit einem in Reihe geschalteten Spektrofluorometer analysiert. Dafür wurden 0,5 µl Nanobody-Lösung in 50 µl PBS-Lösung gegeben und 25 µl der resultierenden Lösung in die zuführende Kunststoffkapillare (loop) injiziert. Bei einer Flussrate von 0,5 ml/min wurde das System durchlaufen und die UV-Absorption bei 280 nm gemessen sowie die Emission angeregter Tryptophanreste gemessen (Anregung: 295 nm; Emission: 350 nm).

Parallel wurden die verbleibenden 19,5 µl Nanobody-Lösung im Verhältnis 1:1 mit einer 200 mM Dithiothreitol-Lösung (DTT) als reduzierendes Agens gemischt und bei

Raumtemperatur 30 min inkubiert. Anschließend erfolgte mit 0,5 µl der Lösung eine Erfolgskontrolle der Reduktion nach oben genannter Methode. Danach wurde die gesamte restliche Nanobody-DTT-Lösung in das System gegeben und die reduzierten Nanobodies mittels Hinzunahme eines Fraktionssammlers gesammelt und das DTT verworfen. Die verdünnte Lösung aus reduzierten Nanobodies in PBS wurde durch einen Filtereinsatz in der Zentrifuge von 800 auf etwa 310 µl konzentriert.

Nach dem Auftauen des Gold-Konjugationskits wurden 90 µl der im Kit enthaltenen Verdünnungslösung hinzugegeben, um eine Ausgangslösung von 400 µl mit 57,8 µg Nanobody zu erhalten (Nanobody-Konzentration von bis zu 0,14 µg/µl). Dies entsprach einer Verdünnung von etwa 1:21. Nach Hinzugabe von 50 µl Reaktionspuffer wurde die Lösung in das Reaktionsgefäß mit dem 10 nm Gold gegeben und bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert. Abschließend wurden zum Abstoppen der Reaktion 50 µl „Quencher“, also ein Agens zum Entfernen eines Reaktionspartners, hinzugegeben und die fertige Lösung bei 4° gelagert.

Neben dem Einsatz im WMS wurde ein kleiner Teil der Gold-Nanobodies zunächst zur Validierung der spezifischen Bindung an Zellen für die Elektronenmikroskopie (EM) verwendet (siehe 2.2.12 Elektronenmikroskopie).

2.2.7.2.2 Färbung

Die fixierten, permeabilisierten und geblockten Stanzbiopsien aus Lungentumorgewebe wurden entsprechend dem indirekten Verfahren in der oben genannten Nanobody-Lösung in 1:6 Verdünnung (Nanobody-Konzentration bis zu 0,02 µg/µl) über 4 Tage bei 4°C inkubiert. Ein zweiter Färbeschritt entfiel hier.

Abschließend wurden die Biopsien erneut dreimal für 30 min in PBS gewaschen.

2.2.7.3 Einbettung der Biopsien und Vorbereitung für Synchrotron-Scans

Die gefärbten oder nur gewaschenen murinen und humanen 1 mm Stanzbiopsien wurden entweder in Paraffin oder Agarose eingebettet. Für die Paraffineinbettung wurden die Biopsien nach unten genanntem Schema chemisch entwässert und anschließend mit einer beheizbaren Pinzette vertikal stehend in Paraffinblöcke eingebettet. Um den Vorteil des Scannens zylindrischer Proben auszunutzen, wurden aus den Paraffinblöcken Zylinder mit 4 mm Durchmesser gewonnen mit sich darin zentral befindender Lungenbiopsie.

Für die Agaroseeinbettung wurde Agarose in PBS gegeben, in der Mikrowelle erhitzt und unter Rühren vermischt, um einen 2% Agaroseansatz zu erhalten. Die noch heiße Lösung

wurde in eine Würfelform gegossen, die Biopsien darin vertikal stehend platziert und dann zum Auskühlen bei Raumtemperatur belassen.

Da das Ausstanzen von Zylindern aus den Agarosewürfeln zu Rissbildung führte, wurden längliche Quader mit darin befindlicher Biopsie mit einem Skalpell aus den Würfeln herausgetrennt und diese dann vertikal auf einer Kanüle platziert.

2.2.7.4 Whole-mount-staining(WMS)-Protokoll

Zusammengefasst wurde mit jeweils leicht abgewandelten Ausführungen des folgenden Protokolls gearbeitet:

1. Formalinfixierung 24 h mit 4% PFA
2. 3 x Waschen je 20 min in PBSTx
3. 1 x Blocken in PBSTx / 10% SeaBlock
4. Immunologische Färbung
 - a. Indirektes Verfahren mit Antikörpern (CD31 oder EGFR)
 - i. Inkubation in ~250 µl Lösung aus PBS / 2% SeaBlock + primärem CD31-/EGFR-Antikörper für 4 Tage
 - ii. 3 x Waschen je 30 min
 - iii. Inkubation in ~250 µl Lösung aus PBS / 2% SeaBlock + sekundärem Antikörper für 4 Tage

ODER
 - b. Direktes Verfahren mit Gold-Nanobodies
 - i. Inkubation in ~250 µl Lösung aus PBS / 2% SeaBlock + Nanobodies für 4 Tage
5. 3 x Waschen je 30 min in PBS
6. Entwässerung und Einbettung in Paraffin; Gewinnung von 4 mm Paraffinzylindern

2.2.8 In-vivo µCT

Zum Monitoring des Lungentumor-Mausmodells und Planung des Sektionszeitpunkts wurden in einmonatigen Abständen mit einem laborbasierten µCT-System (QuantumFX) in-vivo Thorax-Aufnahmen bei den Mäusen durchgeführt. Dies erfolgte mit einer Röhrenspannung von 90 kV und einem Röhrenstromfluss von 200 µA. Das Blickfeld (*field of view*, FOV) betrug 20 mm, was eine Pixelgröße von 39 µm ergab. Die Scans dauerten 4,5 min. Für die Aufnahme wurden bei den Mäusen mit einer speziell gebauten Vorrichtung eine Inhalationsnarkose mit Isofluran durchgeführt (2 – 3% Isofluran mit einer FiO₂ von 0,5 bei einem Fluss von 1 L/min)

2.2.9 Propagation-based imaging (PBI)

2.2.9.1 Aufnahmen

Die Proben wurden am italienischen Synchrotron “Elettra” in Triest an der SYRMEP-Beamline (SYnchrotron Radiation for Medical Physics) aufgenommen.

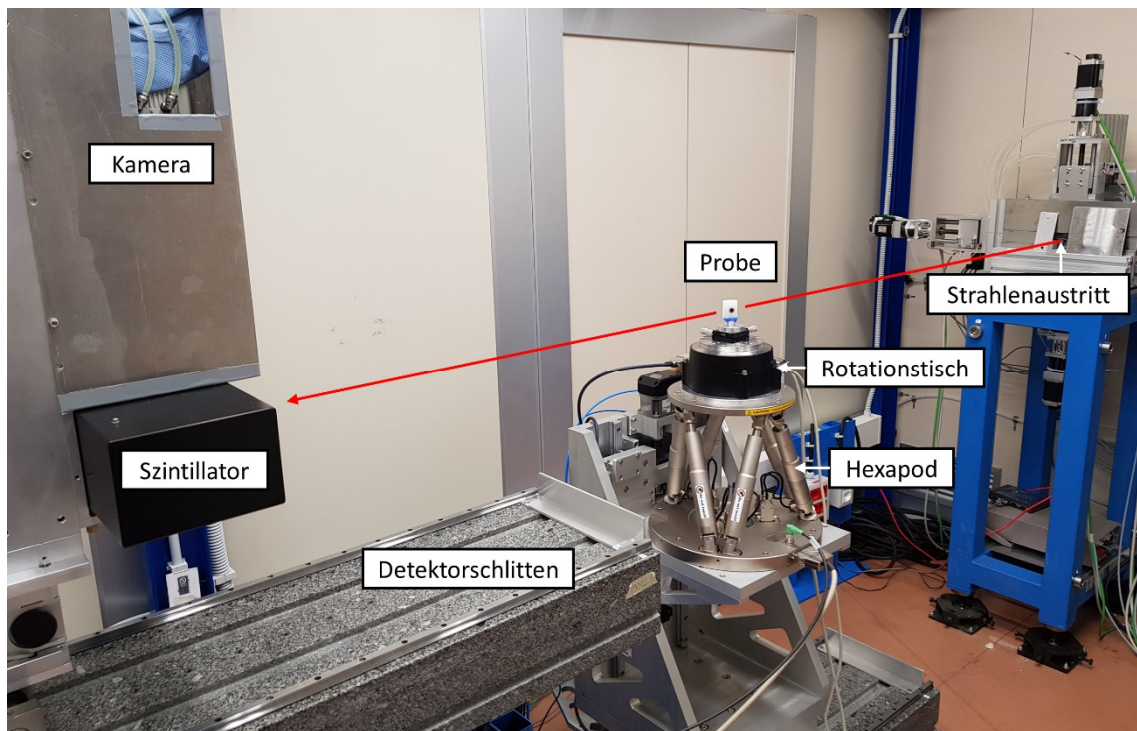


Abbildung 3: **Aufbau der SYRMEP-Beamline am Synchrotron „Elettra“.** Der Weg der elektromagnetischen Strahlung aus dem Ablenkmagneten (*bending magnet*) ist schematisch als roter Pfeil gezeigt. Die Probe ist auf einem Hexapod (Vorrichtung mit sechs Bewegungselementen) mit einem Rotationstisch platziert, sodass durch Bewegungen in alle Freiheitsgrade eine genaue Positionierung möglich ist. Der Detektor ist auf einem Schlitten montiert, der es erlaubt, die Distanz zwischen Probe und Detektor frei zu wählen (*sample-to-detector-distance*, SDD). Der Detektor besteht aus einem Szintillator, der die Röntgenstrahlung in sichtbares Licht umwandelt und einer nachgeschalteten 16-bit CCD-Kamera (Hamamatsu C11440-22C ORCA-Flash 4.0 v2). Die Abbildung zeigt die Aufnahme eines gesamten Paraffinblocks. Modifiziert nach Albers (2021) mit freundlicher Genehmigung von Dr. Jonas Albers, EMBL, Hamburg, Deutschland.

Die Aufnahmen erfolgten mit dem in Abbildung 3 gezeigten Aufbau. Die Stanzbiopsien in Agarosequadern wurden für die Aufnahmen auf einer 26G Kanüle auf dem Hexapod platziert. Die Stanzbiopsien in Paraffinzylindern wurden in eine zylindrische

Probenhalterung aus Kunststoff gegeben. Die ganzen Paraffinblöcke wurden mit Modellierpaste aufrecht auf dem Hexapod stehend fixiert.

Die Scans wurden mit folgenden Parametern durchgeführt:

1 mm Biopsien in Agarose:

180° Scans, 1800 Projektionen; Belichtungszeit: 50ms; Gesamtscanzeit: 1 min 30 s;
Pixelgröße: 0,9 µm; SDD=250mm; Filter: 0,5 mm Silizium (Si); Energie: 16,7 keV.

1 mm Biopsien in Paraffin:

180° Scans; 2400 Projektionen; Belichtungszeit: 50ms; Gesamtscanzeit: 2 min;
Pixelgröße: 0,9 µm, SDD: 120 mm; Filter 0,5 mm Silizium (Si); Energie: 16,7 keV.

Lungen in Paraffinblöcken:

360° Offset-Scans; 3600 Projektionen; Belichtungszeit 100 ms; Gesamtscanzeit 6 min;
Pixelgröße: 2,4 µm; SDD: 500 mm; Filter 0.5 Silizium (Si); Energie: 16,7 keV.

2.2.9.2 Rekonstruktion

Die Datensätze wurden mit der Software „Syrmp Tomo Project“ (STP) Version 1.3.2. mittels einer „filtered-backprojection“ rekonstruiert (Feldkamp et al. 1984; Brun et al. 2015). Die Analyse der Phaseneffekte, das sogenannte „phase-retrieval“, erfolgte durch den Algorithmus TIE-Hom mit einem delta-zu-beta-Verhältnis von 50 (Paganin et al. 2002).

2.2.10 Histologie an Gewebe-Dünnschnitten

2.2.10.1 Entwässerung und Einbettung

Die Formalin-fixierten murinen und humanen 1 mm Lungenbiopsien bzw. das verbliebene Restlungengewebe wurden in Kunststoffkassetten überführt, gewässert und über Nacht maschinell nach dem folgenden Schema entwässert:

- 3x 60 min 75% Ethanol
- 2x 90 min 96% Ethanol
- 3x 75 min 100% Ethanol
- 2x 120 min Xylol

Bei mit FluoroNanogold-Antikörpern behandelten Proben wurde auf die zweite Phase in Xylol (120 min) verzichtet, um die Zeit bei hohen Temperaturen so gering wie möglich zu halten.

Die Biopsien wurden mithilfe einer beheizbaren Pinzette vertikal stehend mit Hilfe von Einbettformen in Paraffin eingebettet.

2.2.10.2 Wiedereinbettung

Nach erfolgten Scans der zuvor ausgestanzten 4 mm Paraffinzyylinder wurden diese erneut in Paraffinblöcke zur anschließenden histologischen Aufarbeitung eingebettet. Dafür wurde der Boden der Einbettform etwas gefüllt, der Paraffinzyylinder vertikal darin platziert, dann kurz auf die Kälteplatte überführt, bevor die Form vollständig gefüllt wurde. Zur besseren Verbindung des „alten“ mit dem „neuen“ Paraffin wurde die gefüllte Einbettform für weitere 20 Sekunden auf der Wärmeplatte belassen, ehe sie abschließend zum Auskühlen auf die Kälteplatte überführt wurde.

2.2.10.3 Anfertigung histologischer Dünnschnitte

Zunächst wurden die Paraffinblöcke auf einer Kühlplatte gekühlt. Mit einem Rotationsmikrotom wurden Schnitte von 2 µm Dicke gewonnen, erst in ein Wärmebad und dann auf Glas-Objektträger überführt. Die Schnitte wurden über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

2.2.10.4 Entparaffinierung

Vor der Anfertigung von Färbungen wurden die Schnitte entparaffiniert. Dafür wurden sie zunächst 30 min bei 60° Celsius im Brutschrank erhitzt, um das Paraffin zu verflüssigen und das Gewebe am Objektträger zu fixieren. Anschließend wurden sie nach der folgenden absteigenden Alkoholreihe behandelt:

- 7 min: Xylol
- 7 min: Xylol
- 5 min: Isopropanol
- 5 min: 98% Ethanol
- 5 min: 75% Ethanol
- 5 min: 60% Ethanol
- 5 min: demineralisiertes Wasser

2.2.10.5 Färbeprotokolle

2.2.10.5.1 HE-Färbung

Die entparaffinierten Schnitte wurden für 5 min in Hämatoxylinlösung nach Mayer platziert. Anschließend wurden die Schnitte zunächst kurz mit demineralisiertem Wasser abgespült

und dann 5 min unter laufendem Leitungswasser gebläut. Danach folgte eine Färbung in Eosinlösung für 5 min, ehe die Schnitte erneut mit demineralisiertem Wasser gespült wurden. Abschließend wurden die gefärbten Schnitte nach dem unten genannten Protokoll entwässert und mithilfe einer Wasserfreien, permanenten Decklösung eingedeckt.

Kurz: destilliertes Wasser

Kurz: 60% Ethanol

Kurz: 70% Ethanol

5 min: 99% Ethanol

5 min: Isopropanol

5 min: Xylol

5 min: Xylol

2.2.10.5.2 Masson-Trichrom-Färbung (*Masson-trichrome-staining*, MTS)

Die nach oben genanntem Protokoll entparaffinierten Schnitte wurden zunächst bei Raumtemperatur über Nacht in Bouins-Lösung gebeizt und danach mit Leitungswasser gespült. Dann wurden sie für 5 min in Weigert'scher Eisenhämatoxylinlösung gefärbt und 5 min unter laufendem Leitungswasser gebläut, ehe sie kurz mit demineralisiertem Wasser gespült wurden. Es folgte die Färbung in Biebrich'scher Scharlachrot-Säurefuchsin-Lösung für 5 min mit anschließender Spülung mit entmineralisiertem Wasser und die Differenzierung in einer Lösung mit Phosphorwolframsäure und Phosphormolybdänsäure über 5 min. Die Schnitte wurden ohne weitere Spülung für 5 min in Anilinblau gefärbt. Unmittelbar danach wurden die Schnitte in 1% Essigsäure überführt und für 2 min belassen. Abschließend wurden die gefärbten Schnitte nach dem unten genannten Protokoll entwässert und mithilfe einer wasserfreien, permanenten Decklösung eingedeckt.

2.2.10.5.3 Immunhistochemie

Für die immunhistochemischen Färbungen wurden die nach oben genanntem Protokoll entparaffinierten Schnitte zu Beginn für 20 min in einem Dampfgerät mit Citratpuffer pH 6 (target retrieval solution) behandelt, um Antigene zu demaskieren. Dann wurden die Schnitte in kaltem destilliertem Wasser abgekühlt und zweimal mit TRIS-Puffer (Tris(hydroxymethyl)aminomethan) gewaschen. Um endogene Peroxidasen zu blockieren, wurden die Schnitte bei Raumtemperatur für 10 min mit 3% Wasserstoffperoxid behandelt und erneut zweimal in TRIS-Puffer gewaschen. Es folgte ein Blockierungsschritt mit SeaBlock bei Raumtemperatur über 20 min. Der Primärantikörper wurde in Antikörper-Verdünnungslösung auf die gewünschte Konzentration verdünnt, auf die Schnitte gegeben

und dort über Nacht bei 4°C belassen. Als Primärantikörper kamen ein *rabbit*-anti-CD31-Antikörper in 1:50 und ein *rabbit*-anti-EGFR-Antikörper in 1:100 Verdünnung zum Einsatz. Nach zweimaligem Waschen mit TRIS-Puffer wurden die Schnitte für eine Stunde mit dem sekundären *goat*-*anti*-*rabbit*-Antikörper unverdünnt inkubiert und erneut zweimal gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte für 30 min mit AEC-Substrat (3-Amino-9-ethylcarbazol) behandelt und schließlich mit destilliertem Wasser gespült. Es folgte eine Gegenfärbung mit Mayer'scher Hämatoxylinlösung für 20 Sekunden, erneut kurzes Spülen mit destilliertem Wasser, ehe die Schnitte unter laufendem Leitungswasser für 5 min gebläut wurden. Abschließend wurden die gefärbten Schnitte nach dem unten genannten Protokoll entwässert und mithilfe einer wässrigen Decklösung eingedeckt.

2.2.10.6 Aufnahmen

Alle histologischen Schnitte wurden mit einem Zeiss Axiovert 200M unter 20-facher Vergrößerung aufgenommen. Die Pixelgröße betrug dabei 0,5 µm. Einzelaufnahmen wurden mit dem mitgelieferten Zeiss MosaiX-Modul zu Gesamtbildern zusammengefügt.

2.2.11 Fluoreszenzmikroskopie

2.2.11.1 Vorbereitung der Schnitte

Die bereits im WMS-Verfahren gefärbten Lungenbiopsien wurden nach dem oben beschriebenen Arbeitsablauf wieder in Paraffin eingebettet, sodass 2 µm Schnitte angefertigt werden konnten. Diese wurden für den gesamten Prozess dunkel gehalten, um die bereits vorhandenen Fluorophore der sekundären Antikörper nicht auszubleichen. Die Schnitte wurden nach oben genanntem Schema entparaffiniert und zweimal für je 5 min in TRIS-Puffer gewaschen. Es folgte eine DAPI-Kernfärbung (4',6-Diamidino-2-phenylindol) über 5 min mit einer Verdünnung von 1:5000, ehe die Schnitte erneut zweimal für je 5 min gewaschen wurden. Abschließend wurden die Proben entwässert und mit einer wässrigen, nicht-fluoreszierenden Eindecklösung eingedeckt.

2.2.11.2 Aufnahmen

Für die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurde ein Zeiss LSM880 konfokales Laser-Scanning-Mikroskop mit einer Airyscan-Einheit, GaAsP-PMT-Spektraldetektor, einem einstellbaren Laser (470 – 670 nm) und einem 40x-Objektiv (Plan-APOCHROMAT 40x/1,4 Oil DIC M27) verwendet. Die Pixelgröße betrug 0,2 µm. Alexa Fluor 647, Alexa Fluor 594 und DAPI wurden bei 633, 594 beziehungsweise 405 nm angeregt.

2.2.12 Elektronenmikroskopie

Die Zellen wurden für die Transmissionselektronenmikroskopie nach einem etablierten Protokoll vorbereitet (Weil et al. 2019). Zusammenfassend wurden kultivierte A549- und HTB182-Zellen in 2x Fixierungslösung mit 2% Formaldehyd und 2,5% Glutaraldehyd fixiert. Nach 5 min wurde der Überstand entfernt und durch 1x Fixierungslösung in 100 mM Phosphatpuffer (pH 7.3) ersetzt. Anschließend wurden die Zellmonolayer zunächst in 1% OsO₄ in 100 mM Phosphatpuffer bei 4°C für eine Stunde fixiert und dann in Epon-Harz eingebettet. Die Entwässerung erfolgte mit einer aufsteigenden alkoholischen Reihe einschließlich einer Färbung mit 1,5% Uranylacetat und 1,5% Wolframatophosphorsäurehydrat in 70% Ethanol über 90 min. Nach der Inkubation in aufsteigenden Epon-Konzentrationen wurden die eingebetteten Zellmonoschichten für 24 h bei 60°C polymerisiert. Zur einfacheren Handhabung wurden vor der Polymerisation mit Epon gefüllte Beem-Kapseln auf der Zellmonoschicht platziert. Nach der Polymerisation wurden mit Hilfe eines UC7-Mikrotoms (Leica) und 35° Diamantenmesser ultradünne Schnitte parallel zum Kulturmedium angefertigt. Die Aufnahmen erfolgten mit einem LEO912-Transmissionselektronenmikroskop und einer 2k CCD-Kamera.

2.2.13 Korrelation PBI – Histologie

Die Biopsien wurden wie oben erläutert nach erfolgtem PBI-Scan am Synchrotron wieder in Paraffinblöcke eingebettet und anschließend histologisch geschnitten. Es wurden 5-fache Serienschritte angefertigt, von denen jeweils der erste HE-gefärbt wurde. Dann wurden die rekonstruierten PBI-Daten in VGSTUDIO MAX 3.1.2 3D Volumen-gerendert. Es wurde eine virtuelle Schnittebene ("clipping plane") eingefügt und deren Position und Winkel so adjustiert, dass der histologische Schnitt und besonders die Anschnittebene möglichst genau reproduziert werden konnte. Anschließend wurde der gesamte Datensatz anhand der virtuellen Schnittebene ausgerichtet („align objects to clipping plane“). Dies ermöglichte, die Entfernung von im PBI-Datensatz identifizierten „regions of interest“ (ROI) zur aktuellen Mikrotom-Schnittposition zu bestimmen, und so gezielt tiefer in den Paraffinblock zu schneiden. Bei geeigneter Überlagerung wurden die folgenden histologischen Serienschritte chemisch bzw. immunhistochemisch gefärbt und in Licht- bzw. Fluoreszenzmikroskopie aufgearbeitet. Eine Zusammenfassung des Arbeitsablaufes findet sich in Abbildung 4.

2.2.13.1 Elastische Transformation

Mit PBI-Schnittbildern korrelierende histologische Schnitte wurden in Größe, Auflösung und Rotation angepasst. Durch elastische Transformation mittels elastix wurden Dehnungs- und Schrumpfungartefakte ausgeglichen (Klein et al. 2010). Dies erfolgte über die grafische Benutzeroberfläche Fuxlastix (Albers et al. 2021).

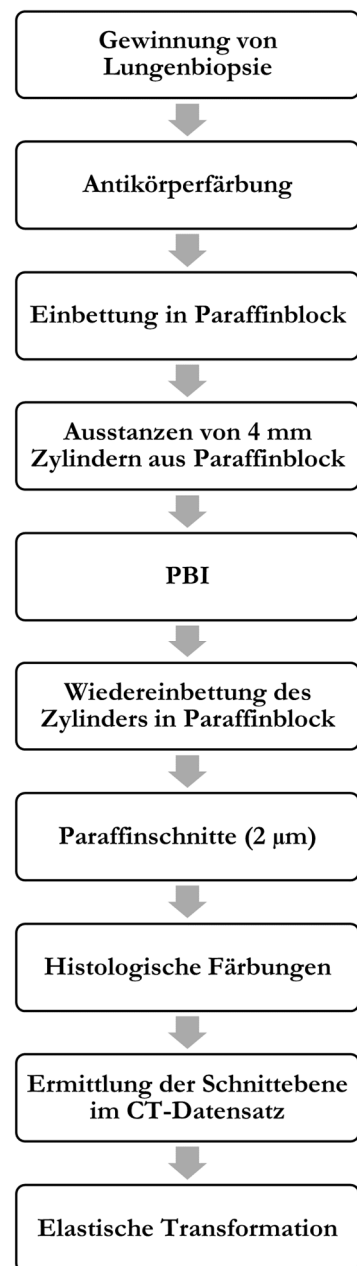


Abbildung 4: **Arbeitsablauf**

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung des Workflows zur Gewinnung von Lungen-Stanzbiopsien

3.1.1 In-vivo Monitoring der Lungentumor-Mausmodelle

Um bei der Etablierung des Workflows mit Lungentumorgewebe arbeiten zu können, wurde ein Mausmodell für Adenokarzinome der Lunge verwendet. Zur Kontrolle des Wachstums der Lungentumore in den mit Tumorzellen implantierten Mäusen, wurden 51 Tage nach Implantation in-vivo laborbasierte μ CT-Aufnahmen angefertigt. Dies ermöglichte neben der Beurteilung der jeweiligen Tumorausmaße den Vergleich der Wachstumsmuster bei den verschiedenen Applikationswegen. Da die Zellen auf zwei verschiedenen Wegen gegeben wurden, sind hier repräsentative Aufnahmen der Tumorbildung sowohl nach intravenöser als auch nach transthorakaler orthotoper Implantation der Lungentumorzellen in Nacktmäusen gezeigt.

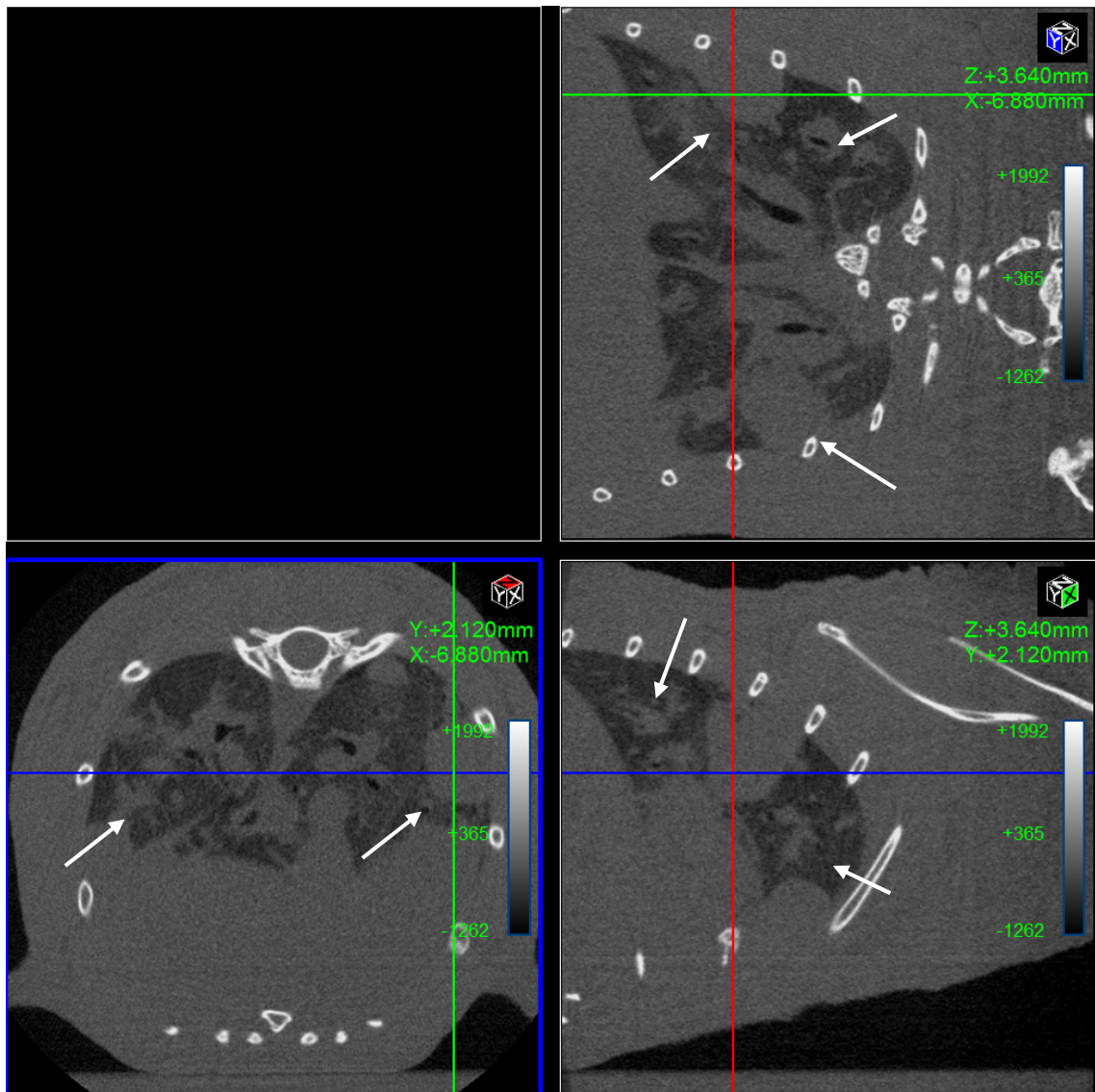


Abbildung 5: **In-vivo μ CT-Schnittbilder eines Mausthorax zwei Monate nach intravenöser Gabe von A549-Tumorzellen.** Maus in Bauchlage. Y-, Z-, X-Achse. Quantum-FX- μ CT (Scanparameter: FOV 20 mm; Röhrenspannung 90 kV; Röhrenstrom 200 μ A; Scanzeit 4,5 min; “cardiac gating”; Pixelgröße 39 μ m). Es stellen sich multiple pulmonale, peribronchiale Raumforderungen in allen Lungenlappen dar (markiert mit weißen Pfeilen).

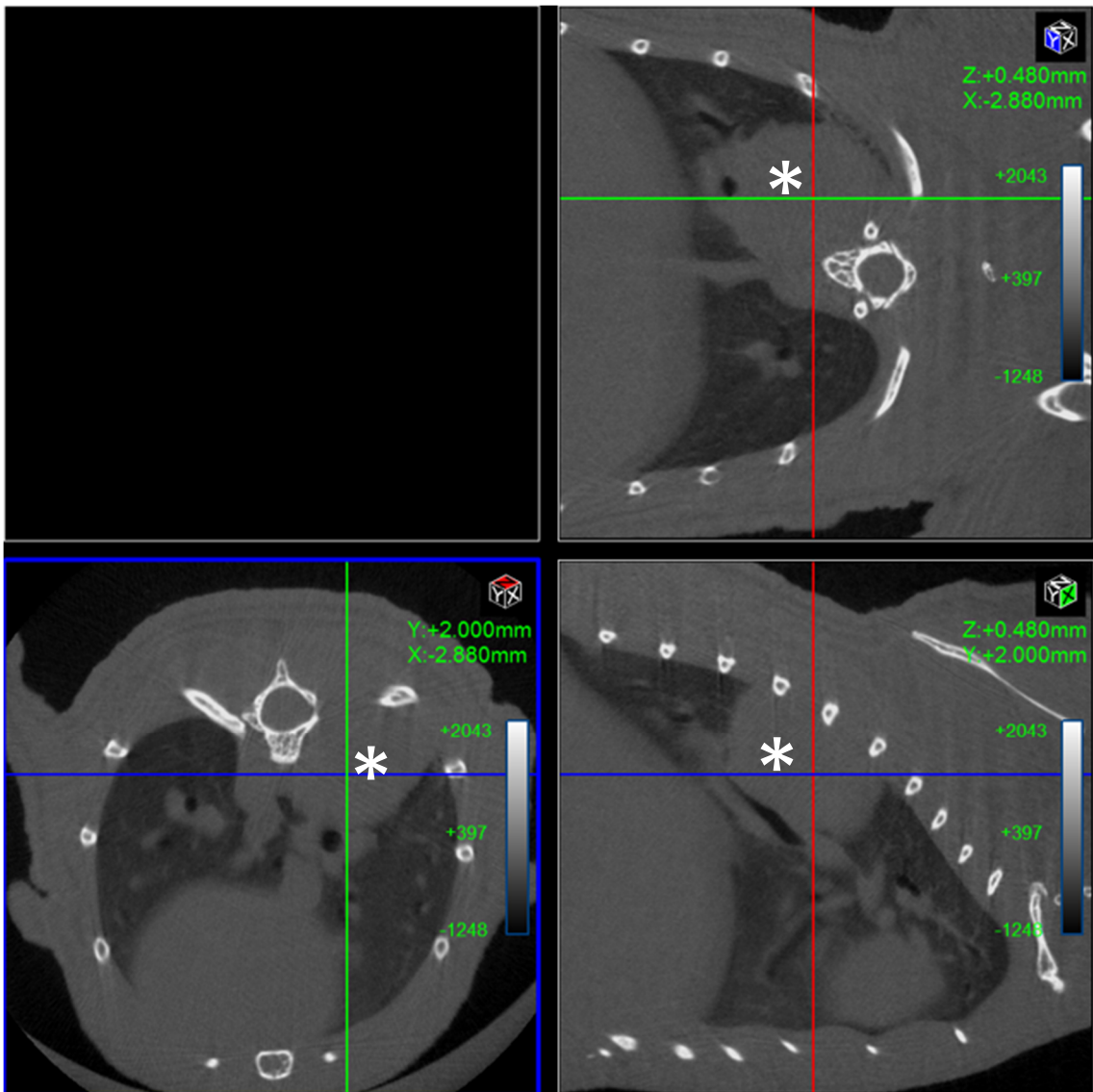


Abbildung 6: **In-vivo μ CT-Schnittbilder eines Mausthorax zwei Monate nach transthorakaler Implantation von A549-Tumorzellen.** Maus in Bauchlage. Y-, Z-, X-Achse. Quantum-FX- μ CT (Scanparameter: FOV 20 mm; 90 kV; 200 μ A; 4,5 min Scan; “cardiac gating”; Pixelgröße 39 μ m). Es stellt sich ein solider Tumor dorsal in der rechten Lunge dar (markiert mit weißen Sternen).

Bei den hier gezeigten Verlaufskontrollen handelt es sich um repräsentative Aufnahmen. Wie in der Abbildung 5 zu sehen ist, führt die intravenöse Implantation zu einer ausgeprägten diffusen pulmonalen Metastasierung, die von den Bronchialstrukturen auszugehen scheint. Im Gegensatz dazu hatte sich bei der transthorakalen Implantation (Abbildung 6) ein solider Tumor im Bereich der Injektionsstelle gebildet, der sich schlecht abgrenzbar von der Pleura zeigte. Zwei Mäuse nach transthorakaler Implantation mussten aufgrund einer Verschlechterung ihres Allgemeinzustandes bereits 55 bzw. 66 Tage nach Implantation seziiert werden. Eine Maus war bereits einen Tag nach transthorakaler Implantation

verstorben. Von den intravenös implantierten Mäusen musste eine nach 80 Tagen seziiert werden, die zwei verbliebenen konnten geplant nach 85 Tagen seziiert werden.

Für das Ziel, anschließend ex-vivo Lungenbiopsien mit Tumorgewebe zu gewinnen und diese in Gänze spezifisch auf Tumorareale anzufärben, erscheint das diffuse Metastasierungsmuster durch die häufigen Übergänge von Tumor- und Lungengewebe am geeignetsten. Daher wurde im Folgenden vermehrt mit Lungen aus Mäusen mit intravenös injizierten Tumorzellen gearbeitet

3.1.2 Ex-vivo Gewinnung der murinen und humanen Lungenbiopsien

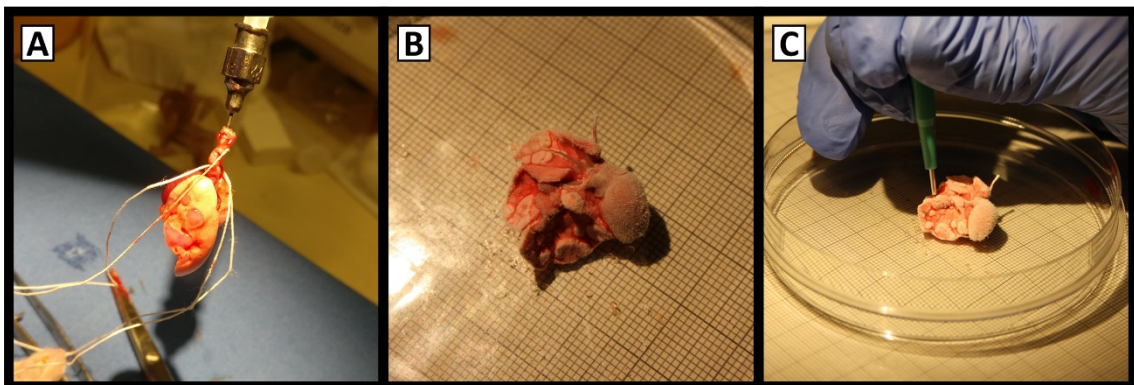


Abbildung 7: **Gewinnung von Stanzbiopsien aus Lungentumor-Mausmodell.** A) Expansion der murinen Lunge mit Luft bis maximal 30 cmH₂O mit einer Knopfkanüle. Abbinden der Trachea mit Bindfaden. Multiple makroskopisch sichtbare Metastasen. B) Gefrorenes Gewebe. Herz und Lunge mit multiplen makroskopisch sichtbaren Metastasen. C) Gewinnung von zylindrischen Stanzbiopsien von 1 mm Durchmesser mittels Einmalbiopsiestanze.

Die Abbildung 7 zeigt den Prozess der Gewinnung der Stanzbiopsien nach erfolgter Sektion der Mäuse und Explantation von Herz und Lungen. Durch das Einfrieren konnte eine bessere Stabilität für den Stanzvorgang erreicht werden. Um Brüche des Gewebes zu vermeiden, wurden die Lungen kurz für 2 min und 30 s aufgetaut. Danach ließen sich anhand des makroskopischen Befunds multiple Stanzbiopsien sicher entnehmen

3.1.3 Einbettung und Visualisierung am Synchrotron

Im ersten Ansatz wurden als Validierung des Workflows Stanzbiopsien aus gesunden Mäuselungen ohne Lungentumoren verwendet. Die Biopsien wurden nach der oben beschriebenen Methode gewonnen. Diese wurden nach Entnahme und Fixierung für die PBI-Aufnahmen in Agarose eingebettet, da sie so im Gegensatz zu einer Paraffineinbettung nicht chemisch entwässert werden mussten und daher so unbehandelt wie möglich blieben

(Abbildung 8A). Das nach Biopsieentnahme verbliebene Restlungengewebe wurde entwässert, in Paraffinblöcke eingebettet und auch mittels PBI dargestellt (Abbildung 8B).

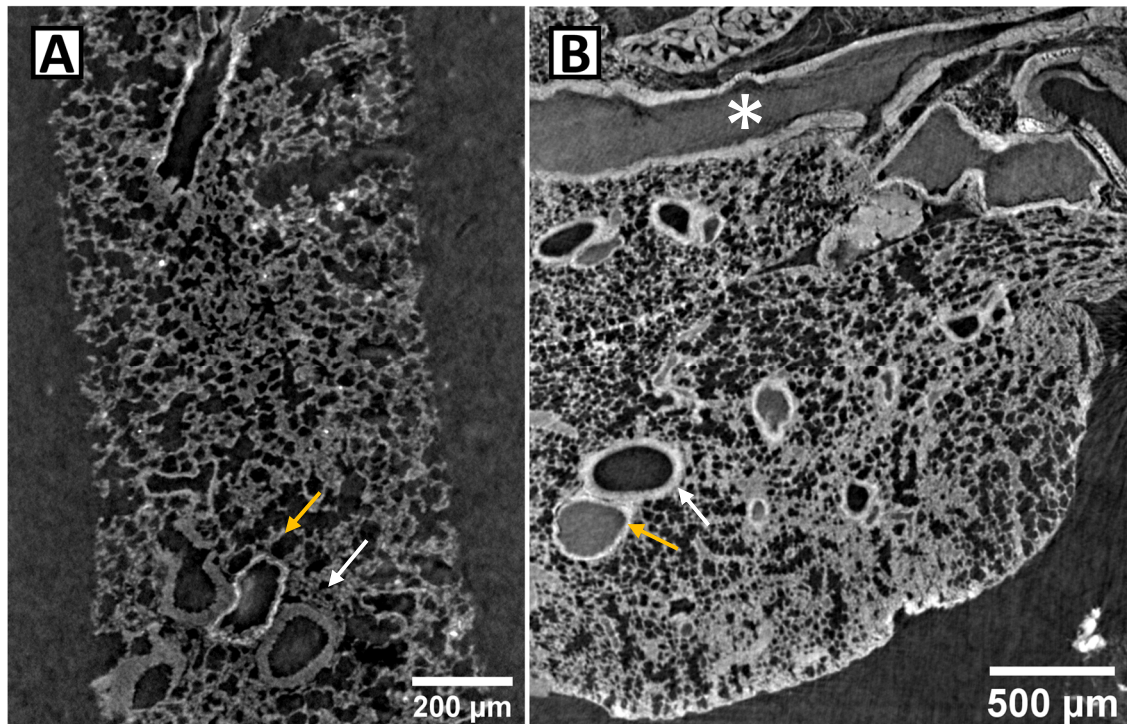


Abbildung 8: **Virtuelle Schnitte durch PBI-Daten von ungefärbtem murinem Lungengewebe.** Die Aufnahmen wurden an der SYRMEP-Beamline am Synchrotron „Elettra“ in Triest durchgeführt. A) Dargestellt ist die hochauflösende Aufnahme einer Lungenbiopsie von 1 mm Durchmesser in Agarose. Ein Gefäß- und Bronchiolus-Anschnitt (gelbe bzw. weiße Pfeile) ist in beiden Abbildungen markiert. Scanparameter: A) 180° Scans, 1800 Projektionen; Belichtungszeit: 50 ms; Gesamtscanzeit: 1,5 min; Pixelgröße: 0,9 μm ; SDD: 250 mm; Filter: 0,5 mm Silizium (Si); Energie: 16,7 keV. B) Gezeigt ist die Übersichtsaufnahme des übrig gebliebenen Restlungengewebes im Paraffinblock. Das Lungengewebe zeigt bis auf atelektatische Anteile durch nicht ausreichende Insufflation keine Auffälligkeiten. Der Anschnitt eines zentralen Blutgefäßes ist mit einem weißen Stern markiert. Scanparameter: B) 360° Offset-Scans; 3600 Projektionen; Belichtungszeit 100 ms; Gesamtscanzeit 6 min; Pixelgröße: 2,4 μm ; SDD: 500 mm; Filter 0,5 Silizium (Si); Energie: 16,7 keV.

Abbildung 8 zeigt die Detailaufnahme eines Längsschnitts einer Stanzbiopsie in Agarose (A) neben einer Übersichtsaufnahme von in Paraffin eingebettetem Restlungengewebe (B). Die hochauflösende Aufnahme der Lungenbiopsie in Agarose zeigt die detaillierte Gewebearchitektur. Es zeigen sich Queranschnitte von Blutgefäß-Bronchiolus-Paaren (weiße Pfeile). Die Blutgefäße zeigen sich hier im Vergleich zu den Bronchiolen kontrastangehoben, sodass beide klar voneinander zu unterscheiden sind. Die Struktur des Restlungengewebes im Paraffinblock ist deutlich dargestellt und bietet eine gute Übersicht. Neben mehreren Blutgefäß-Bronchiolus-Paaren (gelbe bzw. weiße Pfeile) zeigt sich ein längs

angeschnittenes, großes Blutgefäß (weißer Stern). Das Lungengewebe weist einige atelektatische Regionen auf, was auf unzureichende Insufflation der Lungen nach Sektion zurückzuführen sein könnte. Es finden sich keine Hinweise auf Gewebeschäden durch das Einfrieren und Auftauen bei der Stanzbiopsie-Gewinnung.

Da die Proben in Agarose aber Schwierigkeiten in der Handhabung boten und vermehrte Bewegungsartefakten durch Hitzeentwicklung während des Scanprozesses am Synchrotron auftraten (Abbildung 9), wurde in den folgenden Experimenten eine Einbettung in Paraffin geprüft.

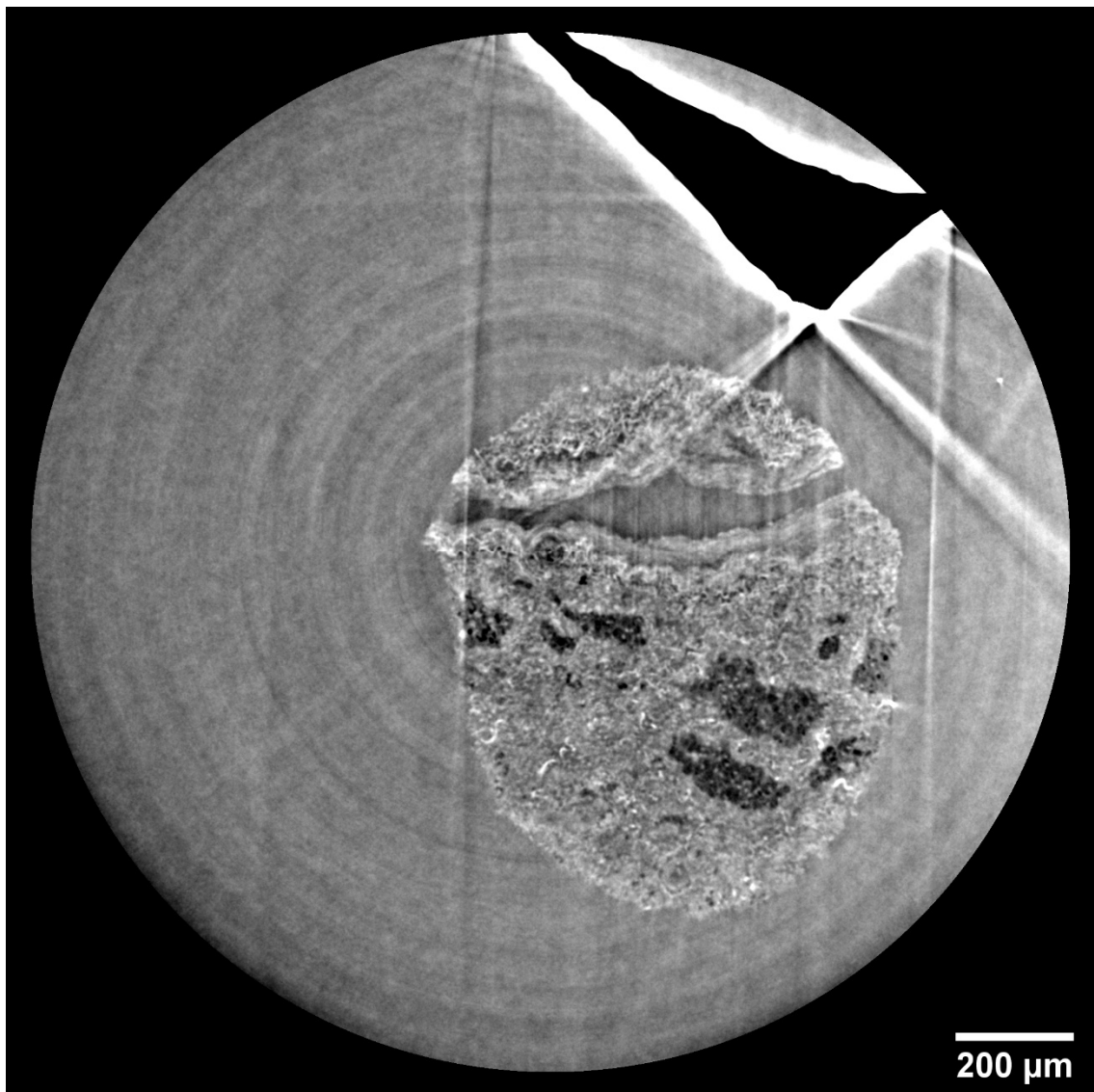


Abbildung 9: Artefakte durch Riss- und Luftblasenbildung in einem rekonstruierten Schnitt aus PBI-Daten einer Lungenbiopsie in Agarose.

Zur Einbettung der Stanzbiopsien in Paraffin mussten diese zunächst chemisch entwässert und vertikal stehend in Paraffinblöcke eingebettet werden. Um für bessere Aufnahmebedingungen eine zylindrische Probe zu erhalten, wurde aus den Paraffinblöcken jeweils ein Paraffinzylinder von 4 mm Durchmesser mit der zentral darin enthaltenen 1 mm Stanzbiopsie ausgestanzt. Die Stanzbiopsien in den 4 mm Paraffinzylindern konnten dann am Synchrotron mittels PBI dargestellt werden.

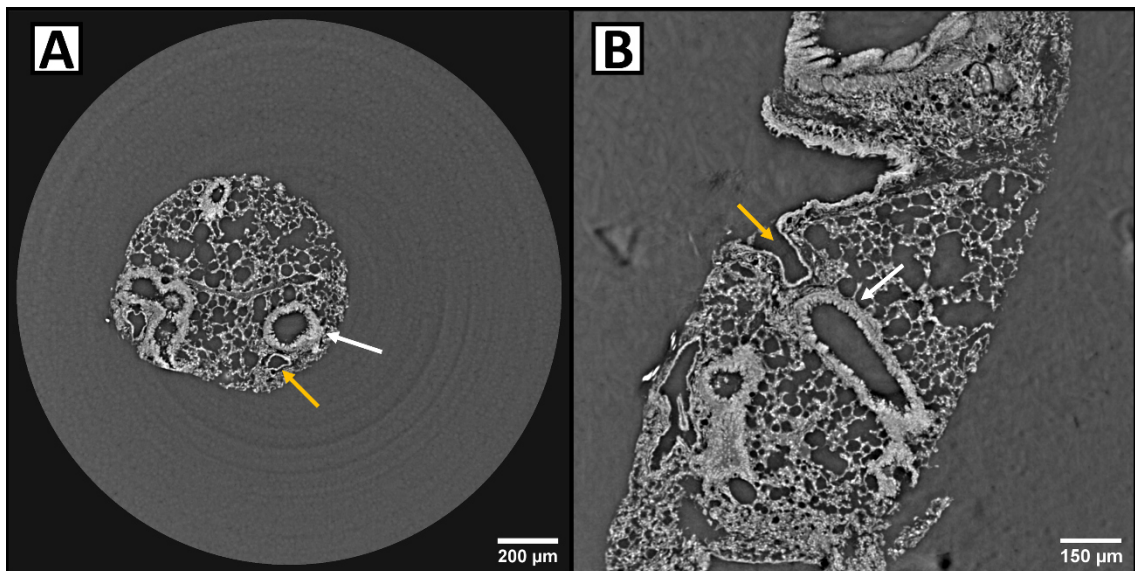


Abbildung 10: **Repräsentative PBI-Schnitte einer Stanzbiopsie aus gesundem murinen Lungengewebe in Paraffin.** Gezeigt ist ein virtueller Querschnitt (A) und Längsschnitt (B) einer 1 mm ungefärbten Lungen-Stanzbiopsie im 4 mm Paraffinzylinder. Das Lungengewebe zeigt sich unauffällig. Es sind mehrere Anschnitte größerer Gefäße (gelbe Pfeile) und Bronchiolen (weiße Pfeile) zu sehen. Die Aufnahmen wurden an der SYRMEP-Beamline am Synchrotron „Elettra“ in Triest durchgeführt. Scanparameter: 180° Scans; 2400 Projektionen; Belichtungszeit: 50 ms; Gesamtscanzeit: 2 min; Pixelgröße: 0,9 µm, SDD: 120 mm; Filter 0,5 mm Silizium (Si); Energie: 16,7 keV.

Abbildung 10 zeigt eine virtuellen Quer- sowie Längsschnitt durch eine in Paraffin eingebettete Biopsie aus einer nicht pathologisch veränderten murinen Lunge. Die Gewebemorphologie in der Paraffin-eingebetteten Probe konnte wie bei der oben gezeigten Agarose-Einbettung gut dargestellt werden. Insbesondere fällt auf, dass sich Zellkerne hier deutlich kontrastgehoben zeigen, was eine wertvolle Information darstellt und gerade die Vergleichbarkeit mit der HE-Färbung in der Histologie erleichtert. Aufgrund der leichteren Handhabung und der etwas besseren Darstellung ist in den folgenden Experimenten die Einbettung der Lungenbiopsien in Paraffin beibehalten worden.

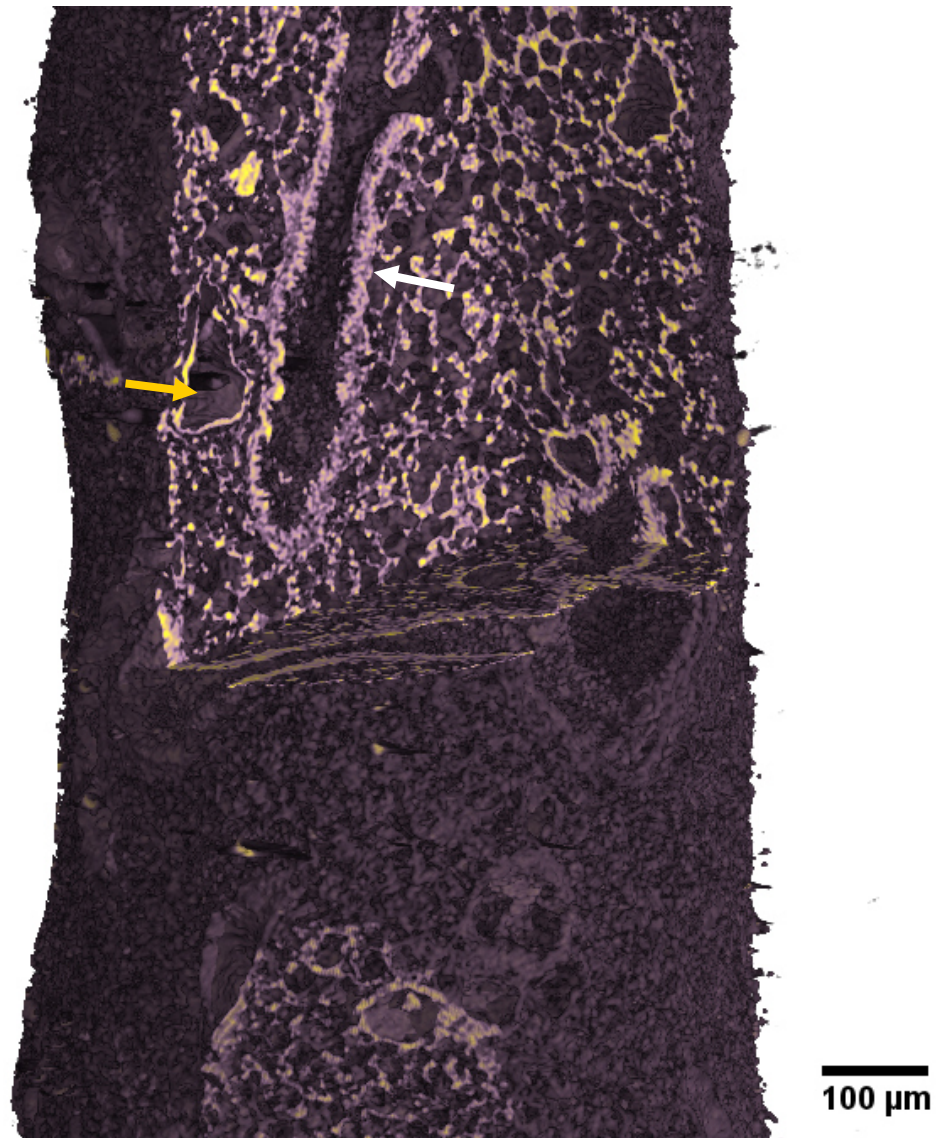


Abbildung 11: **3D-Rendering einer Stanzbiopsie aus murinem Lungengewebe.** Gezeigt ist ein Volumenrendering eines Bildstapels rekonstruierter PBI-Schnitte. Bei der Probe handelt es sich um eine ungefärbte, in Paraffin eingebettete 1 mm Stanzbiopsie aus einer gesunden Mäuselunge. Zur Darstellung der Gewebearchitektur ist virtuell ein Keil ausgeschnitten. An der frontalen Schnittebene zeigt sich ein Längs angeschnittener Bronchiolus (weißer Pfeil) mit einer Aufzweigung am oberen Bildrand. Daneben sieht man einen Querschnitt eines Blutgefäßes (gelber Pfeil). Das Rendering und die Segmentierung erfolgten in VG Studio MAX.

Die Abbildung 11 zeigt eine 3D-Darstellung der PBI-Daten und verdeutlicht den zusätzlichen Informationsgewinn echter 3D-Daten. So ist es hier möglich, den Verlauf von 3D-Strukturen wie einem Bronchiolus in 3D nachzuvollziehen. Außerdem wird eine Einschätzung der Gewebedichte ermöglicht, die Hinweise auf lokale oder diffuse Bindegewebsvermehrungen im Rahmen einer fibrotischen Veränderung geben könnten. Das hier gezeigte murine Lungengewebe stellt sich unauffällig dar.

3.1.4 Kombination von PBI mit Histologie

Nach erfolgten PBI-Aufnahmen am Synchrotron wurden die Proben erneut in Paraffinblöcke eingebettet und histologisch aufgearbeitet. Dies sollte zum einen den Vergleich der beiden bildgebenden Modalitäten zulassen und zum anderen die Möglichkeit bieten, immunologische Färbungen zu validieren.

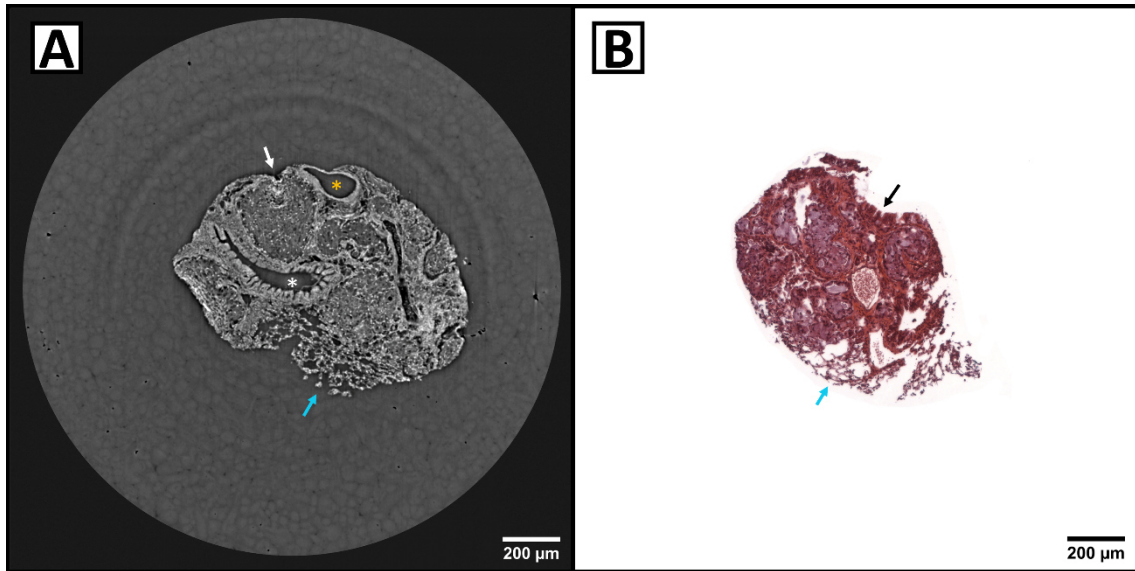


Abbildung 12: **PBI- und lichtmikroskopischer Querschnitt einer murinen Lungentumor-Stanzbiopsie in Paraffin.** Die 1 mm Stanzbiopsie wurde in Paraffinzylindern am Synchrotron aufgenommen und anschließend in Paraffinblöcke wieder eingebettet und histologisch aufgearbeitet. A) Der virtuelle PBI-Schnitt zeigt einen Querschnitt, auf dem Tumor- (weißer Pfeil) und ein kleiner Anteil normales Lungengewebe (blauer Pfeil) zu sehen ist. Der Übergang ist klar zu erkennen. Außerdem zeigen sich Anschnitte eines Bronchiolus (weißer Stern) sowie Blutgefäßen (gelber Stern). Die Scanparameter entsprachen denen aus Abbildung 10. Pixelgröße: 0,9 μm . B) In der HE-Färbung am anschließend entstandenen Gewebedünnschnitt ist ein anderer Bereich derselben Probe gezeigt. Auch hier finden sich Tumoreale (schwarzer Pfeil) und angrenzendes normales Lungengewebe (blauer Pfeil), sowie Bronchiolus- und Gefäßanschnitte. Pixelgröße: 0,5 μm .

Abbildung 12 zeigt einen virtuellen Schnitt durch eine mittels PBI aufgenommene Lungenbiopsie (A). Daneben ist eine anschließend durchgeführte HE-Färbung am Gewebedünnschnitt gezeigt (B). Es wird deutlich, dass die Gewearchitektur der Probe im PBI-Schnitt vergleichbar detailliert dargestellt werden kann wie in der konventionellen Histologie und somit einen ähnlichen Informationsgewinn bietet. Lungengewebe und Tumorgewebe sind voneinander abgrenzbar, wichtige Strukturen wie Gefäße und Bronchiolen können identifiziert werden.

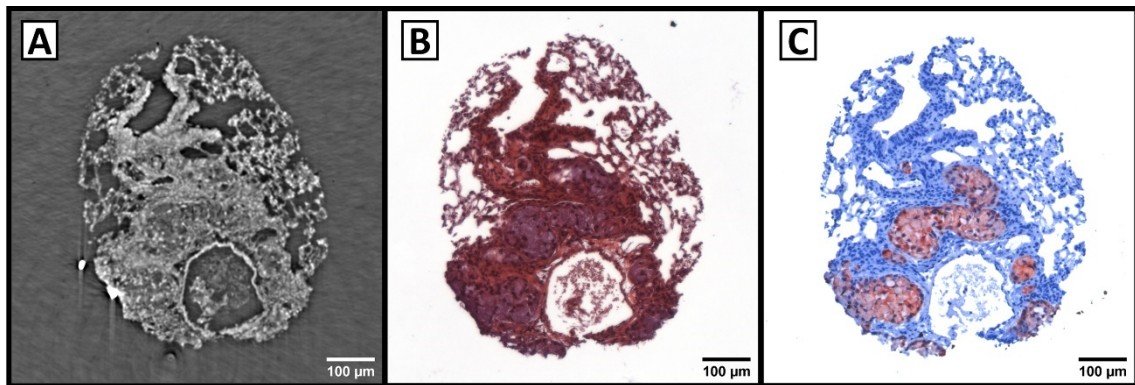


Abbildung 13: **Darstellung derselben Schnittebene einer murinen Lungentumor-Stanzbiopsie mittels histologischen Serienschritten und einem davon abgeleiteten virtuellen PBI-Schnitt.** Ausgehend von den histologischen Schnitten wurde im 3D-Rending der zuerst entstandenen PBI-Daten die exakte Ausrichtung der Schnittebene des Mikrotoms ermittelt, sodass der korrespondierende virtuelle PBI-Schnitt den histologischen Schnitten gegenübergestellt werden konnte. A) Der virtuelle PBI-Schnitt zeigt den Übergang zwischen Lungen- und Tumorgewebe mit großem Blutgefäßanschnitt. Darin lässt sich ein kontrastgehobener Bereich erkennen. B) In der HE-Färbung zeigt sich eine ähnlich detailreiche morphologische Darstellung. Der in A) genannte Bereich innerhalb des Blutgefäßes entspricht am ehesten einem Konglomerat von Erythrozyten. C) Eine Anti-EGFR-Immunhistochemie zeigt rot gefärbt hoch EGFR-exprimierende Tumoreale. Pixelgröße: 0,5 µm.

Zum genaueren Vergleich der im Anschluss durchgeführten histologischen Schnitte wurde die Schnittebene des Mikrotoms im 3D-genderten PBI-Datensatz ermittelt und die genau korrespondierenden virtuellen PBI-Schnitte aufgefunden. So war es möglich, Informationen über denselben Bereich der Probe in verschiedenen Bildgebungsmodalitäten darzustellen. Über histologische Serienschritte konnten verschiedene Färbungen kombiniert gezeigt werden, wie die Abbildung 13 zeigt. So ist hier zusätzlich eine anti-EGFR-Immunhistochemie dargestellt. Hier zeigt sich eine kräftige Anfärbung der Zielstruktur EGFR, was erneut demonstriert, dass eine konventionelle Immunhistochemie nach abgeschlossener PBI-Analyse der Probe am Synchrotron problemlos möglich ist.

3.1.5 Anwendung des Workflows auf humane Lungenbiopsien

Zur Demonstration der klinischen Translation wurden auch humane Lungenbiopsien nach demselben Vorgehen analysiert. Diese wurden aus Restmaterial humaner Lungentumorresektate für Schnellschnittuntersuchungen entnommen, an denen die Diagnostik bereits abgeschlossen war. Dafür wurde das Gewebe nativ bei -80°C eingefroren

damit anschließend nach oben genannter Methodik nach kurzem antauen 1 mm Stanzbiopsien entnommen werden konnten.

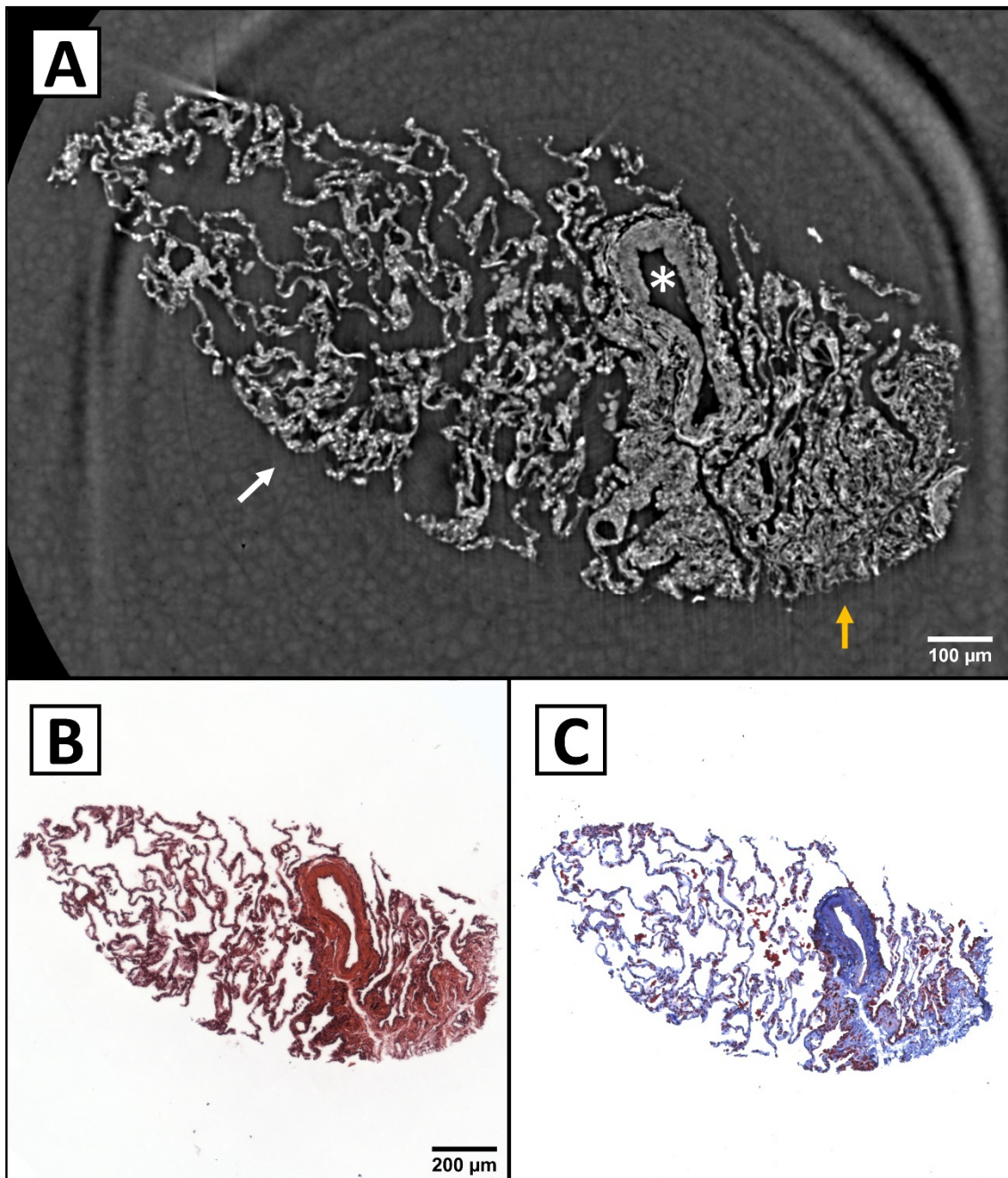


Abbildung 14: **Darstellung derselben Schnittebene einer humanen Lungentumor-Stanzbiopsie mittels histologischer Serienschichten und einem davon abgeleiteten virtuellen PBI-Schnitt.** Es ist eine ungefärbte Stanzbiopsie aus einem humanem Lungentumorresektat gezeigt. Auch hier erfolgte nach der PBI-Analyse eine Wiedereinbettung in Paraffinblöcke mit anschließender histologischer Aufarbeitung. A) Virtueller PBI-Schnitt. Lungengewebe (weißer Pfeil) mit angrenzendem verdichtetem Gewebe (gelber Pfeil) um Bronchiolus (Stern). B) Anschließende entstandene HE-Färbung am Gewebedünnschnitt. C) Anti-EGFR-Immunhistochemie am Serien-Dünnschnitt. Vermehrt EGFR-exprimierende Zellen im Randbereich des dichteren Gewebeareals sind rot angefärbt.

Die Abbildung 14 zeigt humanes Lungengewebe aus einem Operationsresektat. Hier lässt sich im PBI-Schnitt das feine Lungengewebe sehr detailliert und kontrastreich darstellen. Insbesondere die kontrastangehobenen Zellkerne in den Interalveolarepten lassen eine sehr genaue Einschätzung der Gewebearchitektur zu, wie sie auch in der HE-Färbung der Histologie möglich ist. Der PBI-Schnitt ermöglicht die Identifizierung von regelrechtem Lungengewebe angrenzend an ein Areal mit dichterem Gewebe um einen benachbarten Bronchiolus.

3.2 Immunhistochemische Färbungen von ganzen Lungenbiopsien

3.2.1 Zweistufiger Ansatz mit konventionellen Antikörpern

3.2.1.1 Validierung des Whole-Mount-Stainings (WMS) durch Immunfluoreszenz

Um das WMS-Verfahren zur Färbung ganzer Lungenbiopsien zu testen, wurden zunächst ganze murine Lungenbiopsien von 1 mm Durchmesser mit einem primären Antikörper gegen CD31 (Endothelien) und dem entsprechenden sekundären Fluorophor-gekoppelten Antikörper für jeweils vier Tage inkubiert. Um die Durchdringung und die spezifische Färbung von CD31 zu kontrollieren, wurden die Biopsien anschließend in Paraffin eingebettet, histologische Dünnschnitte davon angefertigt und diese mit dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Zur besseren Orientierung innerhalb des Gewebes wurden die Zellkerne mit DAPI gegengefärbt.

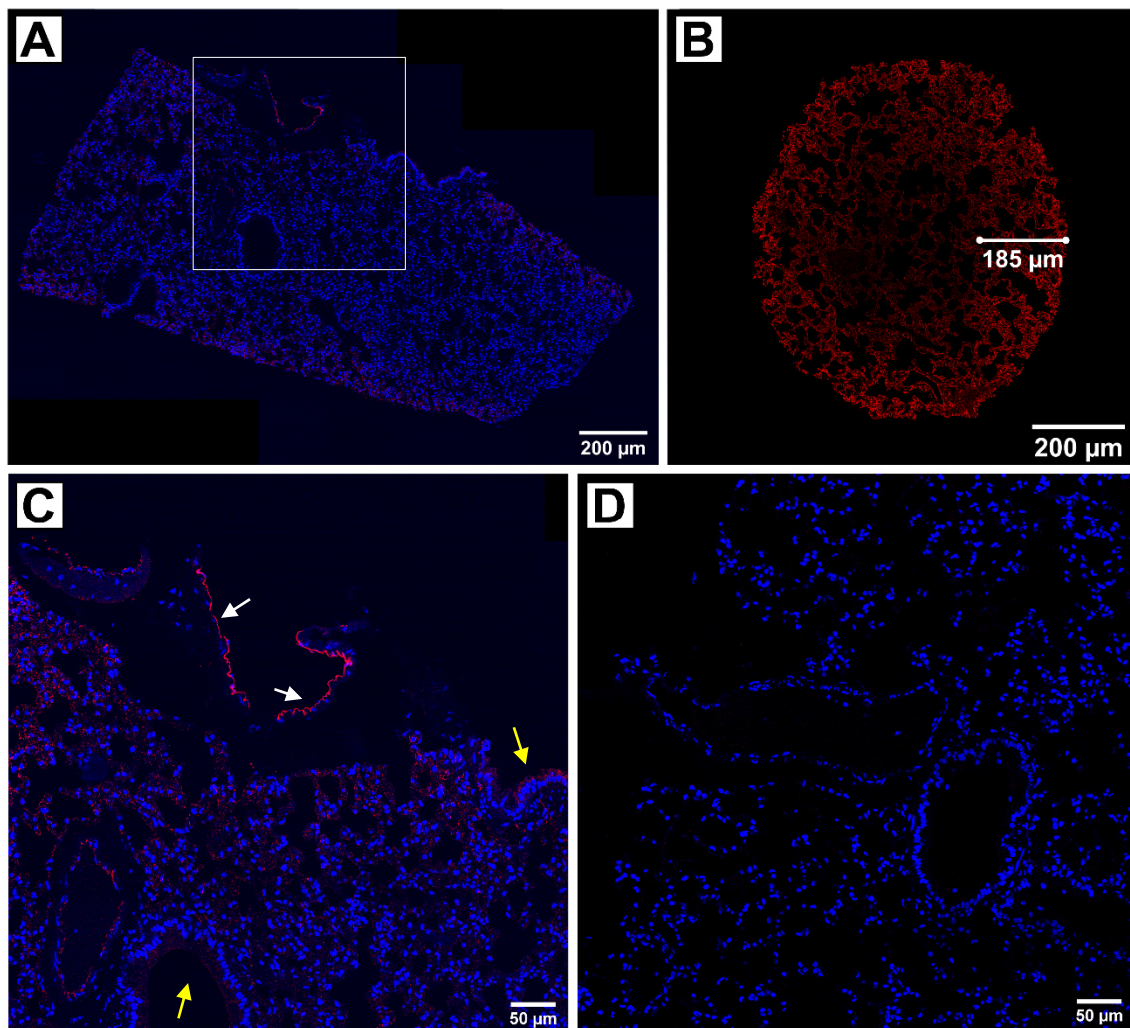


Abbildung 15: **Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von CD31-exprimierenden Endothelzellen in Stanzbiopsien aus gesunden murinen Lungen.** CD31 wurde in den Lungenstanzbiopsien im zweistufigen Free-Floating Verfahren angefärbt. Es erfolgte eine Inkubation mit primären *rabbit*-anti-CD31 Antikörper und dann mit sekundärem Alexa Fluor 594 *anti-rabbit* Antikörper (rot) für jeweils 4 Tage. Gezeigt sind die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Paraffindünnschnitte mit einer DAPI-Kernfärbung (blau). A) Längsschnitt einer 1 mm Stanzbiopsie. Es zeigt sich ein großes Blutgefäß im Randbereich spezifisch rot angefärbt. Zudem findet sich eine diffuse Färbung der Alveolarkapillaren. B) Dargestellt ist im Querschnitt einer Stanzbiopsie nur der rote Farbkanal, in dem erneut die diffuse rote Färbung der Alveolarkapillaren zeigt. Dies demonstriert die unvollständige Durchdringung der Färbung von unter 200 µm. Es finden sich keine großen Blutgefäßanschnitte. C) Detailaufnahme von A). Das Endothel eines großen Blutgefäßes ist stark angefärbt (weiße Pfeile). Benachbarte große Bronchiolen sind nicht angefärbt (gelbe Pfeile). D) Gezeigt ist eine Negativkontrolle ohne unspezifische Färbung, bei der die Inkubation nur mit sekundärem Antikörper stattfand.

Die Abbildung 15 zeigt eine spezifische Färbung größerer Blutgefäße, wie besonders in der Detailaufnahme in (C) zu sehen ist. Diese Färbung betrifft vor allem die Randbereiche. Das

Lungengewebe ist diffus schwach angefärbt. Vermutlich kommt dies durch die in den Interalveolarsepten befindlichen Kapillaren zustande. Eine quer geschnittene Biopsie (A) von nominell 1 mm Durchmesser verdeutlicht die unvollständige Durchdringung der Antikörper mit einer Eindringtiefe von unter 200 μm . Aus diesem Grund wurde in den folgenden Experimenten kein größerer Durchmesser der Biopsien als 1 mm gewählt. Dieses Experiment zeigt, dass das hier dargestellte WMS-Protokoll eine spezifische Färbung von CD31 in ganzen 1 mm Lungenbiopsien mit nur leichter diffuser Färbung der Alveolarkapillaren ermöglicht und wurde daher in den folgenden Ansätzen weiterverfolgt.

3.2.1.2 Dual markierte FluoroNanogold-Antikörper

Der Einsatz von doppelt markierten, sowohl fluorophor- als auch 1,4-nm-goldgekoppelten, sekundären Antikörpern sollte ermöglichen, vor der PBI-Analyse die Eindringtiefe der Antikörper und die spezifische Bindung an Endothelzellen in der im Labor verfügbaren Fluoreszenzmikroskopie zu validieren.

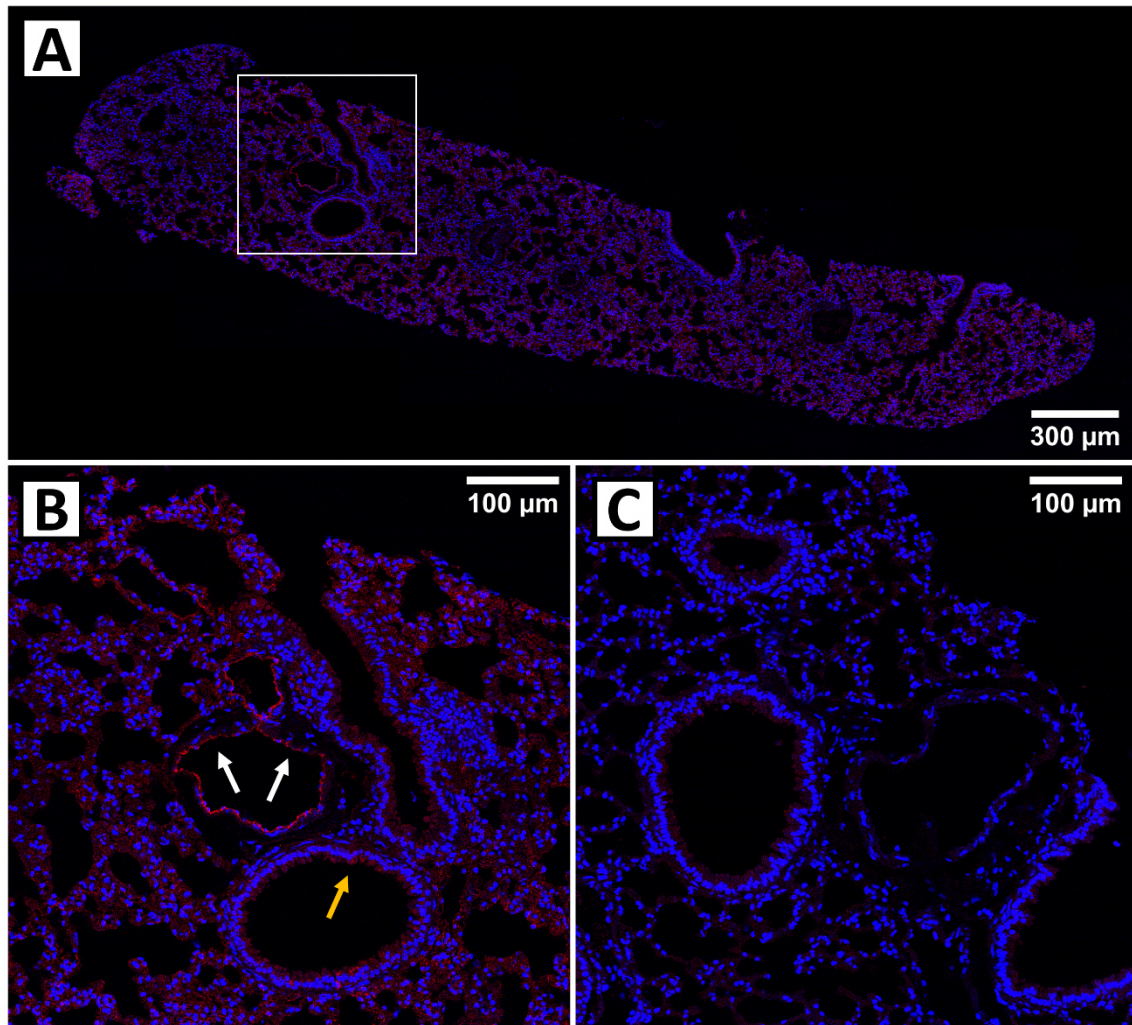


Abbildung 16: **Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von CD31-exprimierenden Endothelzellen in Stanzbiopsien aus gesunden murinen Lungen mit dual-markierten FluoroNanogold-Sekundärantikörpern.** CD31 wurde in den Lungenstanzbiopsien im zweistufigen Free-Floating Verfahren angefärbt. Es erfolgte eine Inkubation mit primären anti-CD31 Antikörper gefolgt von einem dual-konjugierten *anti-rabbit* Antikörper mit Alexa Fluor 647 (rot) und 1,4 nm Goldpartikeln für jeweils 4 Tage. An den nach Paraffineinbettung entstandenen Dünnschnitten erfolgte eine DAPI-Kernfärbung (blau). A) Gezeigt ist ein Längsschnitt einer 1 mm Biopsiestanze mit spezifischer Anfärbung großer Blutgefäße und diffuser Färbung der Alveolarkapillaren. B) In der Detailaufnahme von A) zeigt sich das Endothel auch mit dem veränderten Sekundärantikörper kräftig angefärbt (weiße Pfeile). Große Bronchien sind auch hier nicht angefärbt (gelber Pfeil). C) In der Negativkontrolle. (nur sekundärer Antikörper) findet sich keine Färbung.

Die Abbildung zeigt mit dem geänderten Sekundärantikörper in der Fluoreszenzmikroskopie erneut eine spezifische Anfärbung von größeren Gefäßen, gerade im Vergleich zu den nicht angefärbten benachbarten Bronchiolen (A, B). Auch hier ist die diffuse Anfärbung der Alveolarkapillaren zu erkennen, die zur Mitte der Probe leicht nachlässt und sich in der

Negativkontrolle (C) nicht wiederfindet. Wie zu erwarten, zeigt das Färbemuster auch hier eine unvollständige Durchdringung der Probe mit den Antikörpern.

Der Nachweis des am sekundären Antikörper gekoppelten Fluorophors bestätigt trotz unvollständiger Durchdringung die spezifische Bindung der Antikörper an der Zielstruktur in einer in Gänze gefärbten Lungenbiopsie. Da die hier verwendeten Antikörper sowohl fluoreszenz-, als auch Gold-gekoppelt sind, müssten sich also auch die 1,4 nm Goldpartikel spezifisch an den Zielstrukturen befinden.

3.2.1.3 Propagation Based Imaging (PBI)

3.2.1.3.1 Nachweis von CD31-exprimierenden Endothelzellen mittels PBI

Nach erfolgreicher Validierung der WMS-Methode wurden zum Nachweis der 1,4 nm Goldpartikel an der spezifischen Zielstruktur CD31 identisch behandelte 1 mm Biopsien aus gesunden Mauslungen am Synchrotron mittels PBI dargestellt. Hier erfolgte die Anfertigung histologischer Dünnschnitte erst nach abgeschlossenem PBI.

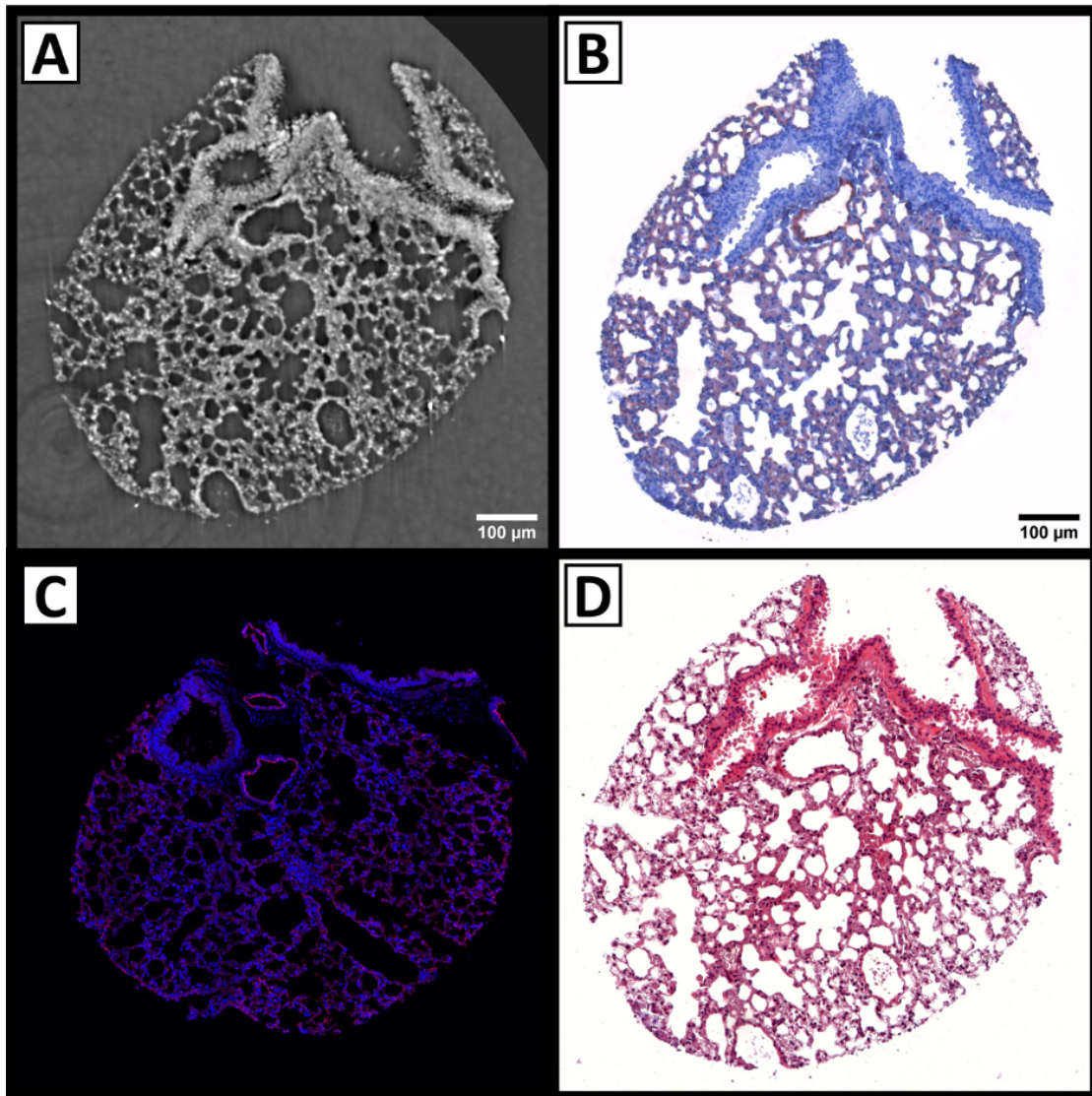


Abbildung 17: **PBI-, Immunfluoreszenz- und lichtmikroskopische Querschnitte einer repräsentativen, gegen CD31 gefärbten 1 mm Biopsie aus gesundem murinen Lungengewebe.** Die Biopsie wurde identisch zur Abbildung 16 im Free-Floating Verfahren für jeweils 4 Tage mit primärem anti-CD31 und dual markiertem Alexa Fluor 647 und 1,4 nm Gold *anti-rabbit* Sekundärantikörper gefärbt. Es erfolgten zunächst die PBI-Aufnahmen, ehe histologische Dünnschnitte gewonnenen wurden. Es wurde eine HE- und eine immunhistochemische Färbung mit demselben Primärantikörper durchgeführt und dieselbe Schnittebene wie oben identifiziert. A) Im virtuellen PBI-Schnitt zeigt sich unauffälliges Lungengewebe mit mehreren Gefäß- sowie einem großen Bronchiolouschnitt. Die Blutgefäße zeigen sich nicht vermehrt kontrastgehoben. Vergleich: Negativkontrolle aus Abbildung 13. B) In der Anti-EGFR-Immunhistochemie zeigt sich eine diffuse Anfärbung der Alveolarsepten und eine leichte Anfärbung des Endothels eines Blutgefäßanschnitts. C) Immunfluoreszenz. Darstellung von Alexa Fluor 647 (rot) aus dem WMS und DAPI (blau) aus der Dünnschnittfärbung. Endothelien der Gefäßanschnitte zeigen sich rot angefärbt. Hinweis: Aufgrund starker Artefaktbildung ist hier stellvertretend eine andere Schnittebene derselben Probe dargestellt. D) Gezeigt ist die korrespondierende HE-Färbung.

Das Färbemuster in der Fluoreszenzmikroskopie (C) entspricht wie erwartet dem der methodisch nahezu identisch behandelten Probe aus Abbildung 16. Da die Fluoreszenzmikroskopie erst nach den PBI-Aufnahmen und anschließender Paraffin-Wiedereinbettung entstanden ist, wird deutlich, dass Färbungen mit Fluorophoren (hier Alexa Fluor 647) durch das PBI nicht beeinträchtigt werden. In der CD31-Immunhistochemie lässt sich eine diffuse schwache Färbung der Alveolarkapillaren nachvollziehen. Die Färbung größerer Blutgefäße ist weniger deutlich als in der Fluoreszenzmikroskopie, aber dennoch vorhanden. Im PBI lässt sich das Färbemuster aus der Fluoreszenzmikroskopie nicht überzeugend wiederfinden. Das zentrale Blutgefäß zeigt sich zwar neben dem benachbarten Bronchiolus kontrastangehoben, jedoch fällt im Vergleich zur Negativkontrolle (Abbildung 10) auf, dass sich größere Blutgefäße im PBI generell kontrastangehoben darstellen und hier kein Hinweis auf eine spezifische Färbung durch Goldpartikel vorliegt.

3.2.1.3.2 Nachweis von EGFR-exprimierenden Lungentumorzellen in murinen Stanzbiopsien

Dieselbe Methodik wurde im nächsten Schritt an Biopsien aus den oben genannten Mauslungen mit Lungentumoren durchgeführt, um die Detektion von Tumorearealen zu ermöglichen.

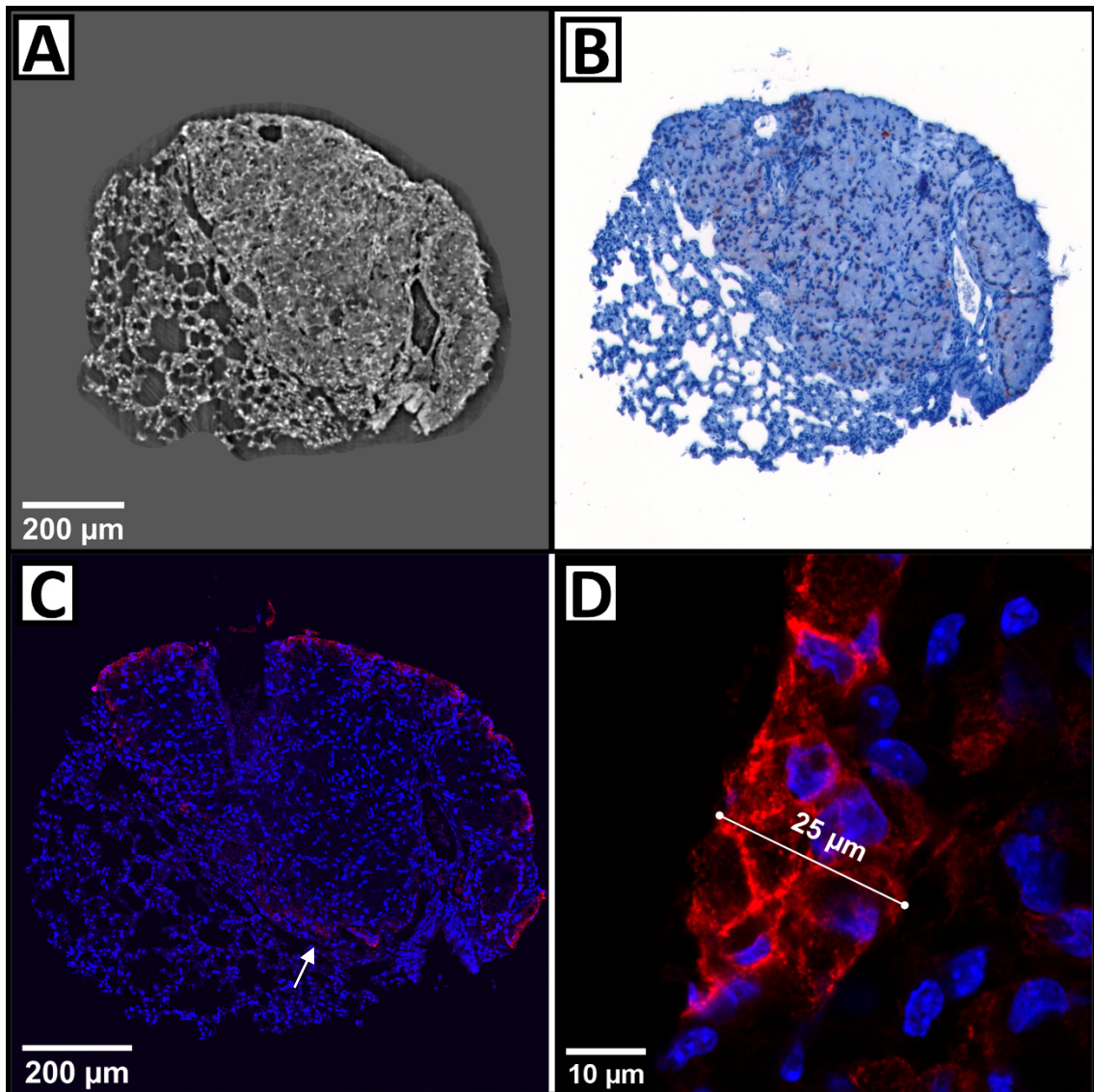


Abbildung 18: **PBI-, lichtmikroskopische und Immunfluoreszenz-Querschnitte einer repräsentativen, gegen EGFR gefärbten murinen Lungentumor-Stanzbiopsie.** Die Biopsie wurde im Free-Floating Verfahren als zweistufiges Antikörpermodell für jeweils 4 Tage mit primärem anti-EGFR Antikörper und dual markiertem Alexa Fluor 647 und 1,4 nm Gold *anti-rabbit* Sekundärantikörper inkubiert. Gezeigt sind die zunächst entstandenen PBI-Aufnahmen am Synchrotron und die am Paraffindünnschnitt durchgeführte Immunhistochemie bzw. Fluoreszenzmikroskopie. A) Der virtuelle PBI-Schnitt zeigt im Querschnitt angrenzendes Tumor- sowie unauffälliges Lungengewebe. B) In der Anti-EGFR-Immunhistochemie ist eine schwache rötliche Färbung im kompakten Tumorgewebe zu sehen. C) In der Immunfluoreszenz findet sich eine klare rote Färbung des Randbereichs des Tumorgewebes. Die Färbung konnte durch das lockere Lungengewebe eindringen und die zum Inneren der Biopsie gelegene Grenze des Tumors anfärben (Pfeil). Zur Verdeutlichung wurde am Paraffinschnitt eine DAPI-Kernfärbung (blau) durchgeführt. D) Die Detailaufnahme zeigt die geringe Durchdringung der Färbung von nur wenigen Zellschichten.

Die Abbildung 18 zeigt Schnitte durch murines Tumor-, sowie Lungengewebe. Methodisch entsprechen sie Abbildung 17 (CD31), nur dass hier der EGF-Rezeptor angefärbt wurde. In der Fluoreszenzmikroskopie zeigt sich eine spezifische Färbung am Rande des Tumorgewebes ohne Anfärbung des Lungengewebes. Die Färbung reicht etwa zwei bis drei Zellschichten, also 25 μm in die Probenmitte hinein, konnte die tieferen Schichten jedoch nicht erreichen (siehe Abbildung 18, D). Auffällig ist die Anfärbung des in der Mitte der Biopsie gelegenen linken Randes des Tumorgewebes (Pfeil), die auf eine erleichterte Durchdringung der Antikörper durch das lockere Lungengewebe hinweist.

Im PBI (Abbildung 18A) findet sich dahingegen im Vergleich zur Negativkontrolle (Abbildung 13A) keine überzeugende Kontrasterhöhung, obwohl neben dem Alexa Fluor 647 auch Goldpartikel am EGF-Rezeptor vorliegen müssten.

3.2.2 Direkter Ansatz mit anti-EGFR goldmarkierten Nanobodies

3.2.2.1 Bestätigung der Bindungsaffinität mittels Elektronenmikroskopie

Da der oben gezeigte zweistufige Ansatz mit konventionellen Antikörpern in der Fluoreszenzmikroskopie nur eine unvollständige Durchdringung der Probe zeigen konnte und die Goldpartikel im PBI nicht sichtbar waren, sollte überprüft werden, ob durch den Einsatz kleinerer immunologischer Sonden mit größeren Goldpartikeln bessere Ergebnisse erzielt werden können. Daher wurde in mit einem direkten, einstufigen Modell mit deutlich kleineren Nanobodies gegen EGFR konjugiert mit 10 nm Goldpartikeln gearbeitet. Am Synchrotron sollte anschließend eine spezifische Färbung mit besserer Durchdringung gezeigt werden. Für die Konjugation wurde das kolloidale Gold (10 nm) mit einer Maleimidgruppe an freie Cysteinreste der Nanobodies gebunden. Im Anschluss wurde die EGFR-Bindungsaffinität der goldmarkierten Nanobodies an hoch EGFR-exprimierenden A549-Adenokarzinomzellen im Vergleich zu niedrig EGFR-exprimierenden NCI-H520-Plattenepithelkarzinomzellen (HTB182) (Weiss et al. 2008) mittels Elektronenmikroskopie bestätigt (Abbildung 19).

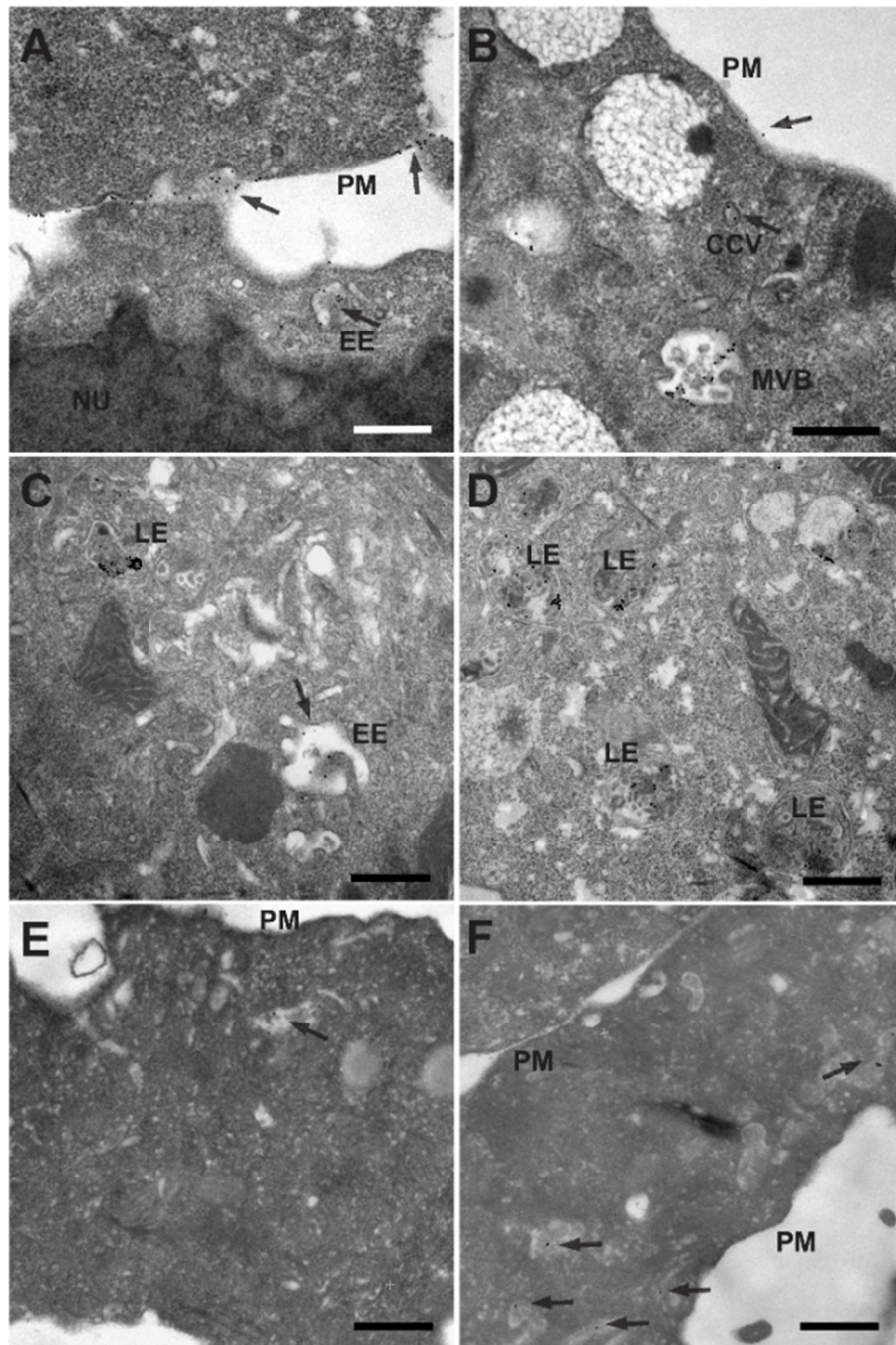


Abbildung 19: **Kontrolle der Bindungsaffinität der goldmarkierten anti-EGFR-Nanobodies an A549- und HTB182-Zellen.** A)-C) 1 h Inkubation von A549-Zellen bei 37°C. (A) Die anti-EGFR Gold-Nanobodies (Pfeile) binden an die Plasmamembran (PM) und zeigen sich in frühen Endosomen (EE). (B) Goldpartikel sind in einem *clathrin coated vesicle* (CCV) sichtbar, hinweisend auf rezeptorvermittelte Endozytose. Ein multivesikulärer Körper zeigt sich mit Goldpartikeln an der Membran sowie an internen Vesikeln. (C) Goldpartikel innerhalb eines frühen Endosoms (EE) und in höherer Dichte in einem späten Endosom (LE). (D) 3 h Inkubation von A549-Zellen bei 37°C. Nach 3 h Inkubation beinhalten mehrere späte Endosomen Goldpartikel. E)-F) 3 h Inkubation von HTB182-Zellen bei 37°C als Negativkontrolle. Die niedrig EGFR-exprimierenden HTB182-Zellen enthalten fast keine Goldpartikel nach 3 h Inkubation bei 37°C. Maßstabsbalken: 500 nm.

3.2.2.2 Visualisierung mittels Propagation Based Imaging

Der Versuchsansatz der Färbung von Lungentumorgewebe in murinen Lungenbiopsien wurde auch im direkten immunologischen Färbeverfahren mit Gold-Nanobodies durchgeführt.

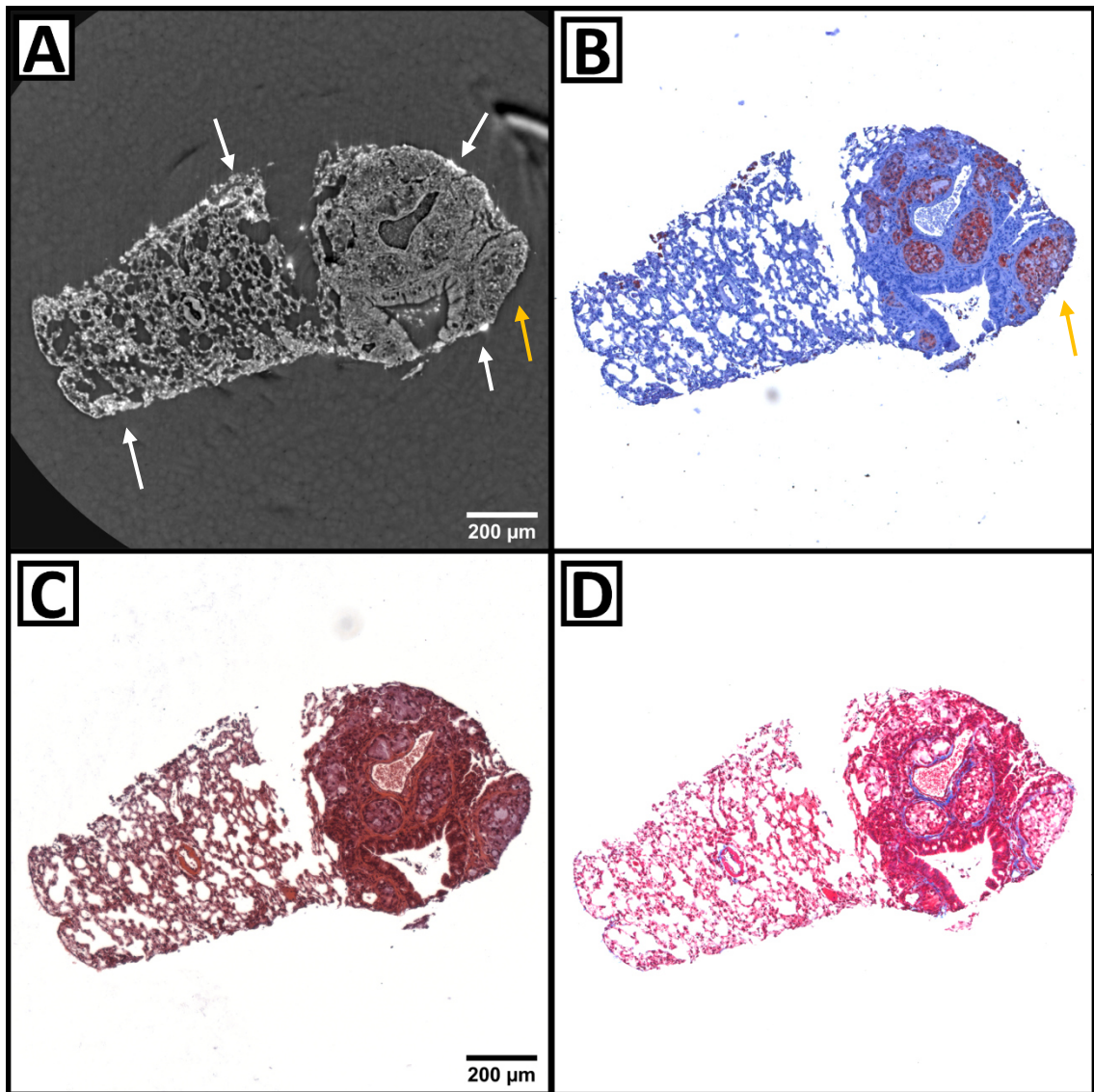


Abbildung 20: **Korrespondierende Schnitte einer mit Gold-Nanobodies inkubierten murinen Lungentumorbiopsie.** Gezeigt sind ein virtueller PBI-Schnitt sowie anschließend entstandene korrespondierende histologische Färbungen einer murinen Stanzbiopsie in Paraffin. Die Stanzbiopsie wurde für 4 Tage bei 4°C in einem 1:6 verdünnten Ansatz der oben genannten Gold-Nanobody-Lösung inkubiert. A) Die PBI-Aufnahme zeigt den Übergang von Lungen- zu Tumorgewebe mit leichter Rissbildung dazwischen. Es findet sich eine deutliche Kontrastanhebung im Randbereich der Probe, welche auch Bereiche mit unauffälligem Lungengewebe betrifft (weiße Pfeile). Einige Bereiche zeigen keinen kontrastangehobenen Rand (gelber Pfeil). B) EGFR-exprimierende Tumorzellen sind rot angefärbt. Die gelben Pfeile markieren einen in der anti-EGFR-Immunhistochemie angefärbten, aber im PBI nicht kontrastangehobenen Randbereich. D) Gezeigt ist zusätzlich eine Masson-Trichrom-Färbung (MTS).

Die Abbildung zeigt in verschiedenen Bildgebungsmodalitäten einen korrespondierenden Schnitt durch eine Biopsie, die sowohl reguläres lockeres Lungengewebe als auch kompaktes Tumorgewebe beinhaltet. In der anti-EGFR-Immunhistochemie (Abbildung 20B) zeigen

sich mehrere EGFR-positive Tumorzellen rot angefärbt mit umgebendem zellreichem Gewebe. Im PBI zeigt sich eine am ehesten unspezifische Kontrasterhöhung in verschiedenen Abschnitten des Rands der Probe (weiße Pfeile). Dies betrifft sowohl Tumoral als auch Lungengewebe. Eine am Rand gelegene, freie Fläche EGFR-positiven Tumorgewebes (gelber Pfeil) zeigt sich im PBI nicht kontrastgehoben. Die in der MTS-Histologie blau angefärbten Bindegewebsareale sind in der PBI nicht klar zu differenzieren.

Im Vergleich zum zweistufigen Ansatz sind hier zwar die größeren Goldpartikel (10 vs 1,4 nm) in den PBI-Aufnahmen sichtbar, die Eindringtiefe ist jedoch trotz des Einsatzes 10-fach kleinerer immunologischer Sonden auf die Randbereiche begrenzt.

3.2.2.3 Anwendung des direkten Färbansatzes auf humane Lungentumorbiopsien

Um auch hier die Anwendung der direkten immunologischen Färbemethode mit Gold-Nanobodies auf humane Proben zu zeigen, wurde diese an Stanzbiopsien aus oben genannten humanen Lungentumorresektaten angewendet.

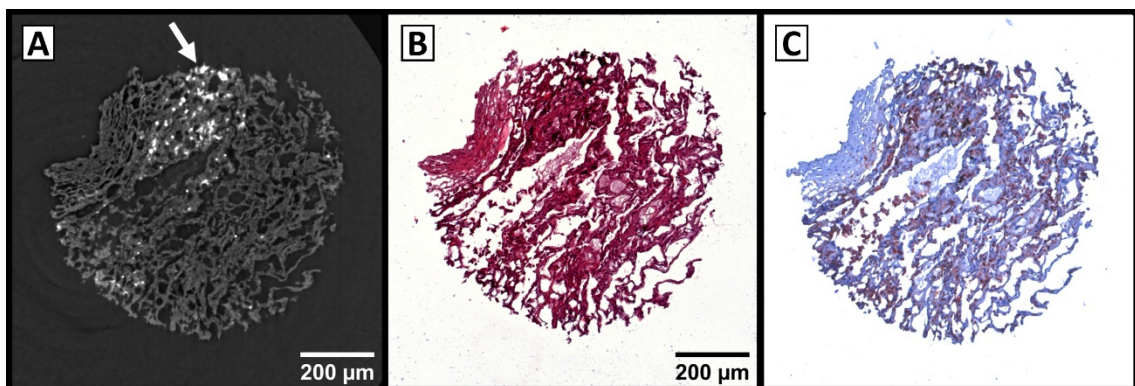


Abbildung 21: **Korrespondierende Schnitte einer mit anti-EGFR-Gold-Nanobodies gefärbten humanen 1 mm Lungenbiopsiestanze.** Gezeigt sind ein virtueller PBI-Schnitt sowie anschließend entstandene, korrespondierende histologische Färbungen einer murinen Stanzbiopsie in Paraffin. Die Stanzbiopsie wurde für 4 Tage bei 4°C in einem 1:6 verdünnten Ansatz der oben genannten Gold-Nanobody-Lösung inkubiert. A) Im virtuellen PBI-Schnitt sieht man lockeres Gewebe mit einem größeren Blutgefäßanschnitt am linken oberen Rand. Es finden sich einige kontrastgehobene Punkte, die in einem Bereich besonders gehäuft sind (weißer Pfeil). B) In der HE-Färbung am Dünnschnitt korrespondiert der in A) markierte Bereich mit einem dichteren Gewebeareal. C) Dieses Areal zeigt in der Anti-EGFR-Immunhistochemie eine dezente rote Anfärbung, jedoch nicht wesentlich mehr als die ohnehin vorhandene, diffuse Färbung des Gewebes (unter Aussparung des Gefäßanschnitts).

Abbildung 21 zeigt die mit anti-EGFR-Gold-Nanobodies inkubierte Lungenbiopsie im PBI sowie anschließend entstandene Paraffinschnitte mit histologischen Färbungen. Im

Vergleich zur entsprechenden Immunhistochemie am später entstandenen 2 μm Gewebedünnschnitt deckt sich das Färbemuster teilweise. So korrelieren alle kontrastangehobenen Areale mit ebenfalls angefärbten Arealen in der anti-EGFR-Immunhistochemie, jedoch nicht andersherum. Gleichzeitig handelt es sich bei diesen Bereichen um besonders dichtes Gewebe, in dem ungebundene Antikörper möglicherweise nicht ausreichend ausgewaschen werden konnten.

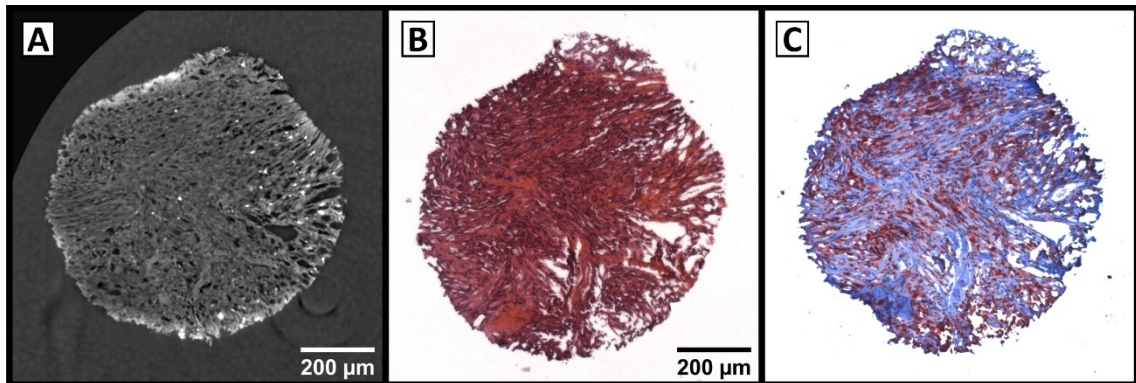


Abbildung 22: **Korrespondierende Schnitte einer mit Gold-Nanobodies gefärbten humanen 1 mm Lungenbiopsiestanze.** Virtueller PBI-Schnitt sowie anschließende histologische Färbungen. A) Im virtuellen PBI-Schnitt zeigt sich kompaktes Gewebe. Auch hier findet sich ein in Teilen sich mit der Immunhistochemie deckendes Färbemuster, das aber vermutlich durch eine unspezifisch erscheinende Färbung der dichteren Randbereiche zurückzuführen ist. B) HE-Färbung am Dünnschnitt. C) Anti-EGFR-Immunhistochemie am Dünnschnitt.

Die Abbildung entspricht methodisch der direkt zuvor beschriebenen Abbildung 21. Auffällig ist wieder das Auftreten kontrastangehobener Flecken, hier allerdings besonders im Bereich der lockersten Gewebearchitektur.

Das Färbemuster bei den hier gezeigten Proben muss also am ehesten als unspezifisch gewertet werden; eine überzeugende spezifische Färbung kann nicht nachvollzogen werden. Dennoch demonstriert dies eine detaillierte morphologische Darstellung und durch die anschließende histologische Aufarbeitung eine Kombination von PBI und Immunhistochemie bei Stanzbiopsien aus humanem Lungentumorgewebe.

3.3 Fusion von PBI und Histologie durch elastische Transformation

Zur genauen Überlagerung der beiden Bildgebungsmodalitäten war es nötig, die durch die histologische Aufarbeitung entstandenen Dehnungs- und Schrumpfungartefakte

auszugleichen. Dabei wurde zunächst im PBI-Datensatz die virtuelle Schnittebene ermittelt, die der realen Schnittebene des Mikrotoms durch den Paraffinblock entsprach. Der virtuelle PBI-Schnitt wurde in diesem Prozess als Referenz definiert, während der histologische Schnitt als verzerrte Näherung betrachtet wurde.

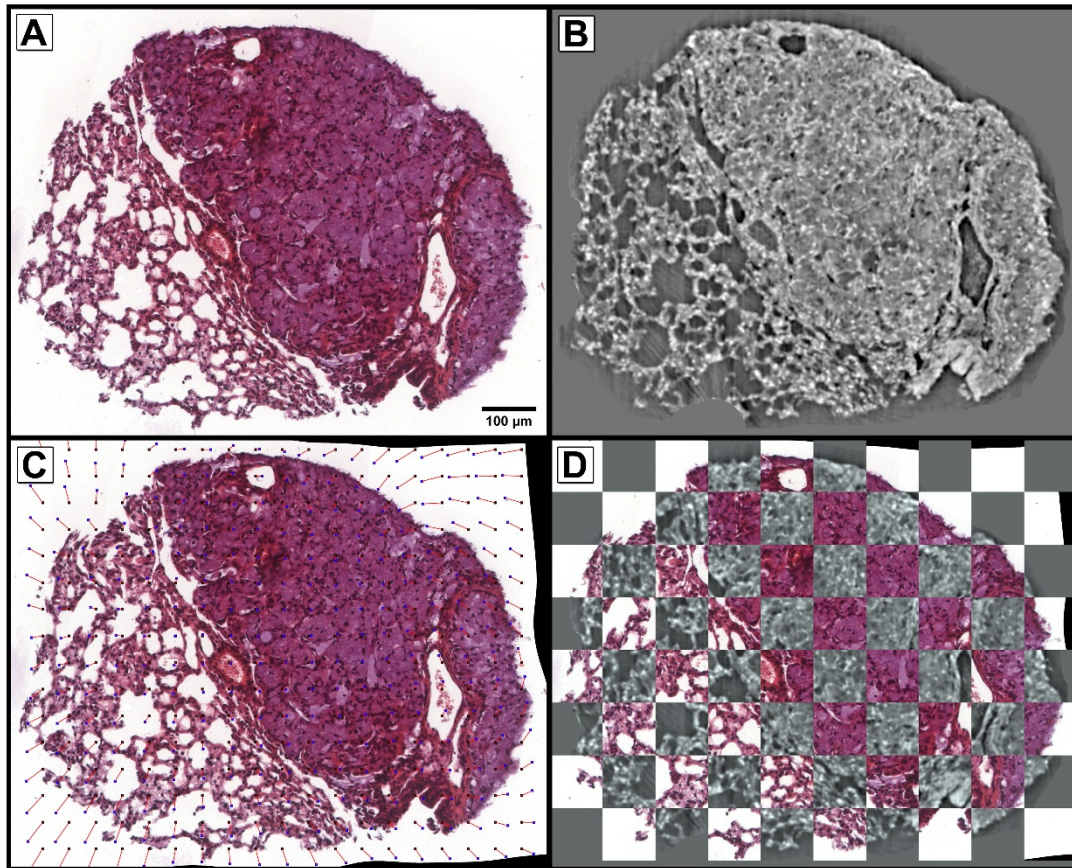


Abbildung 23: **Korrelation von virtuellen PBI-Schnitten mit histologischen Schnitten.** Nach Wiedereinbettung und Anfertigung histologischer Schnitte erfolgte die Ermittlung der passenden virtuellen Schnittebene im PBI und Überlagerung mittels elastischer Transformation. A) Lichtmikroskopie (HE). B) Korrespondierender virtueller Schnitt im PBI C) Transformierter histologischer Schnitt mit überlagelter Transformationsmatrix. D) Schachbrettartige genaue Überlagerung der transformierten Histologie mit dem PBI-Schnitt.

Die Abbildung 23 zeigt, wie nach Anfertigung der histologischen Schnitte im 3D-Rendering des PBI-Datensatzes die exakte Schnittposition aufgesucht und die Ausrichtung der Schnittebene ermittelt werden konnte. So ist es möglich, die beiden Modalitäten genau zu vergleichen. Deformationen durch den Schnittprozess wurden mittels elastischer Transformation ausgeglichen, sodass eine beinahe deckungsgleiche Überlagerung entsteht (Abbildung 23D). Die entsprechende Transformationsmatrix ist in (Abbildung 23C) gezeigt.

Als Ergebnis lassen sich nun spezifische Informationen der Histologie den räumlichen Informationen des PBI zuordnen.

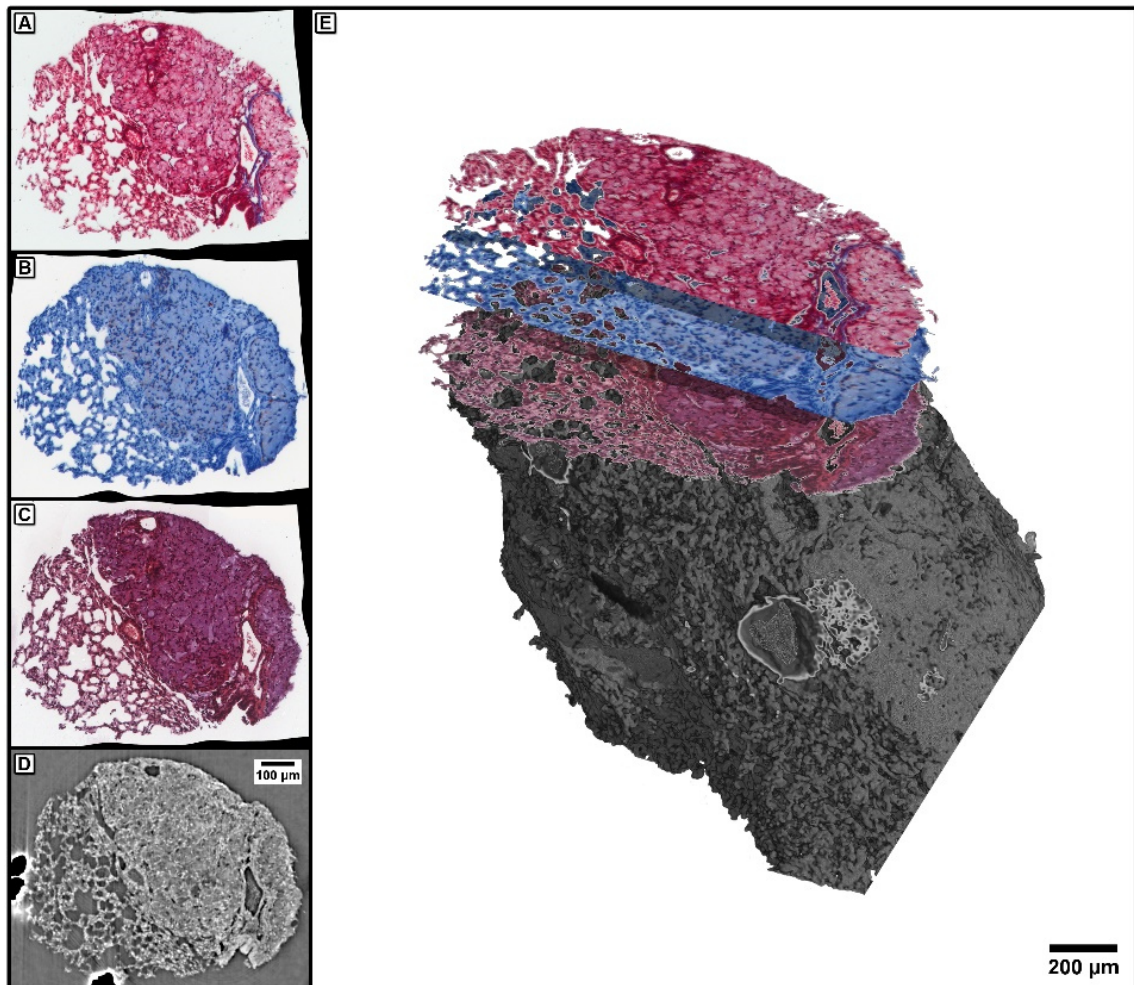


Abbildung 24: **Überlagerung verschiedener histologischer Färbungen mit virtuellen PBI-Schnitten und 3D-Rendering.** A) Lichtmikroskopie (MTS). B) Lichtmikroskopie (EGFR-Immunhistochemie). C) Lichtmikroskopie (HE) D) Virtueller PBI-Schnitt. E) Die Überlagerung der histologischen Schnitte im 3D-Rendering des PBI-Datensatzes. Zur Verdeutlichung sind die Schnitte mit vergrößertem Abstand schwebend über der PBI-Schnittebene gezeigt. Das Rendering und die Segmentierung erfolgten in VG Studio MAX.

Diese Korrelation lässt sich nun auf die räumlichen Informationen der PBI übertragen. Abbildung 24 zeigt Serienschnitte mit verschiedenen histologischen Färbungen (A-C), die in ein 3D-Rendering der zuvor entstandenen PBI-Daten passgenau eingefügt sind. Die Schnittebene konnte darin frei gewählt werden, sodass die hier interessante Region gezeigt werden konnte. Diese 2D-zu-3D-Registrierung demonstriert die Kombination aus 3D-PBI-Daten mit den gewebsspezifischen Informationen der Histologie. Der gesamte Arbeitsablauf ist in Abbildung 25 gezeigt.

3.3.1 Workflow der Fusion (PBI - Histologie)

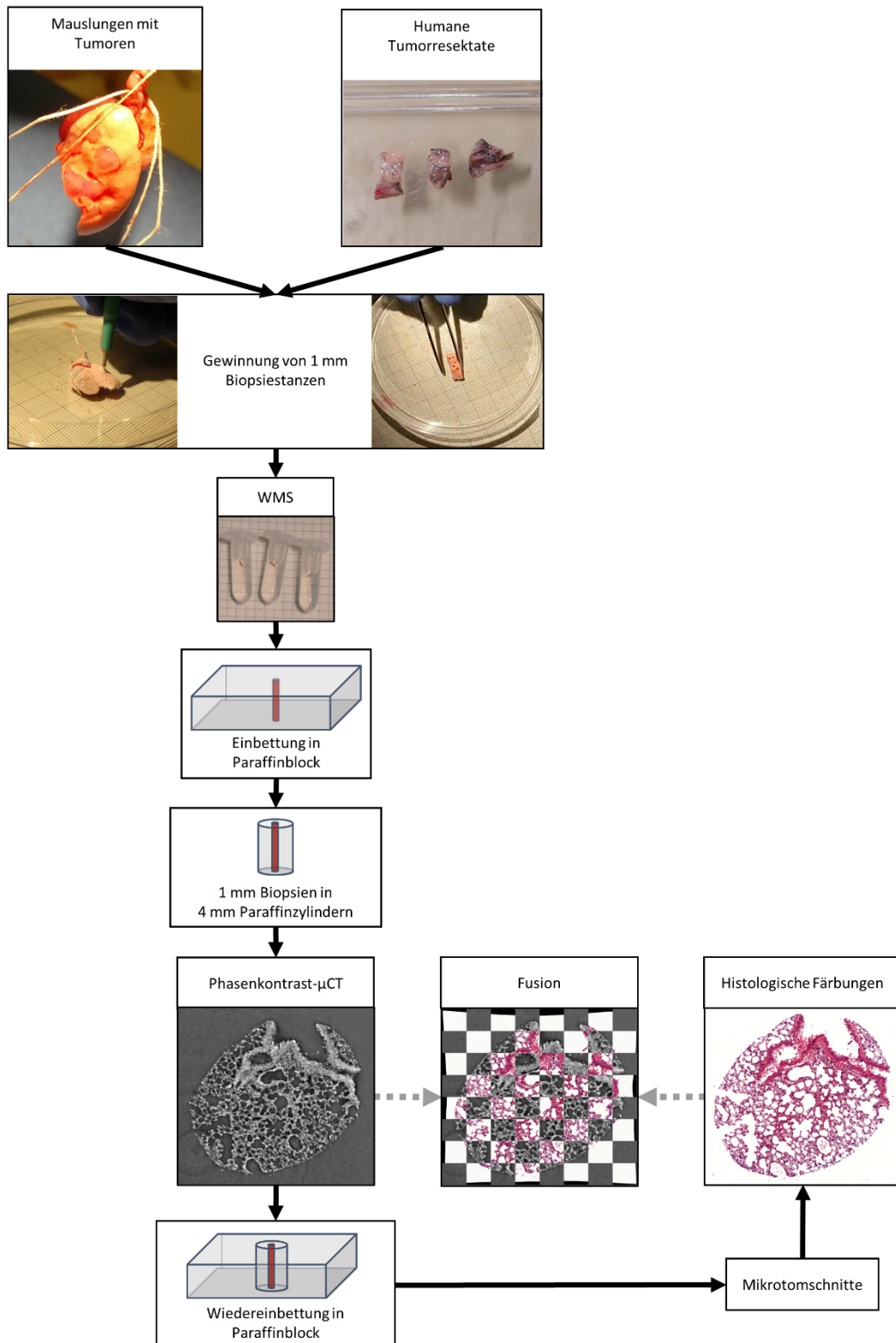


Abbildung 25: **Workflow der Fusion von PBI und Histologie.**

4 Diskussion

4.1 Morphologische Darstellung mittels PBI und Histologie

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich murine Lungenbiopsien in der röntgenbasierten virtuellen Histologie ähnlich detailreich wie in der konventionellen Histologie darstellen lassen. Zum Einsatz kam eine Modalität der hochauflösenden Phasenkontrast-Computertomografie - das Propagation-based imaging (PBI). Es konnte ein Arbeitsablauf etabliert werden, der es ermöglicht, durch anschließende histologische Aufarbeitung die Informationen des PBI mit denen der konventionellen Histologie zu vergleichen. Weiterhin wurde das Verfahren an Patientenproben angewendet, um das Potenzial der klinischen Translation zu demonstrieren.

Die virtuelle Histologie mittels PBI hat den großen Vorteil der 3D-Bildgebung und ermöglicht so den Zugang zu Informationen über räumliche Verläufe von Leitungsbahnen oder Bronchien, Faserorientierungen und die Lokalisation und Volumetrie von Zielstrukturen. Da bislang keine spezifische Färbung in der röntgenbasierten Bildgebung existiert, müssen spezifische Gewebeinformationen aus histologischen Färbungen gewonnen und anschließend auf die PBI-Daten übertragen werden. Dies gelang in dieser Studie, indem nach Anfertigung der histologischen Schnitte die korrespondierende Schnittebene im PBI-Datensatz ermittelt wurde. Beim histologischen Schneiden werden mit dem Mikrotom in einer Ebene dünne Scheiben von der Probe abgenommen. Diese Dünnschnitte können als 2D-Ebene beschrieben werden (Albers et al. 2021). Es wurde also ein histologischer Schnitt (2D) mit einem virtuellen PBI-Schnitt (2D) verglichen. Durch eine elastische Transformation mit Hilfe des Algorithmus „elastix“ wurden zudem histologische Schnittartefakte im Sinne einer 2D-2D-Registrierung korrigiert. Eine 3D-Korrektur war aufgrund der nur planaren Deformationen beim histologischen Schneiden nicht notwendig. So war es möglich, virtuelle PBI-Schnitte mit nahezu identischen histologischen Schnitten zu überlagern. Die Lokalisation und Ausrichtung der Schnittebene musste manuell im 3D-Rendering der PBI-Daten bestimmt werden, was zeitaufwendig und fehleranfällig ist. Daher rücken automatisierte 2D-zu-3D-Registrierungsalgorithmen in Zukunft mehr in den Fokus (Chicherova et al. 2018). Diese sind allerdings für das Aufsuchen von dünnen histologischen Schnittebenen in CT-Datensätzen noch zu ungenau (Rodgers et al. 2022). Semiautomatisierte Prozesse mit manueller Auswahl charakteristischer Landmarken scheinen verlässlichere Ergebnisse zu liefern (Khimchenko et al. 2016).

Ein korrelatives Verfahren wurde auch von Yi et al. (2017) an Biopsien aus humanen Lungen-Operationsresektaten mit Adenokarzinomen gezeigt. Dafür wurden formalinfixierte Biopsien (5 x 5 x 1 mm) in einer Ethanol-Lösung an der Synchrotronquelle „PLS-II“ in Pohang (Korea) gescannt. Es wurden Übersichtsaufnahmen mit einem FOV von 13 x 8 mm (Pixelgröße 4,5 μm) und Zoom-Aufnahmen mit 7 x 4,5 mm (Pixelgröße 1,8 μm) gemacht. Die detaillierte PBI-Darstellung ließ eine klare Identifizierung von Tumorgrenzen zu. Die Biopsien wurden nach abgeschlossenem Scan in Paraffin eingebettet. Auch hier wurde eine Überlagerung von PBI und anschließender Histologie durchgeführt, indem die korrespondierende Schnittebene manuell ermittelt wurde. Eine Korrektur von histologischen Schnittartefakten fand nicht statt. Im Vergleich dazu wurden in der hier vorliegenden Arbeit zylindrische Stanzbiopsien bereits vor den Synchrotron-Aufnahmen in Paraffin eingebettet und als Paraffinzylinder gescannt. Dies hatte den Vorteil, dass das Gewebe nach abgeschlossenem Scan keine zusätzlichen Arbeitsschritte durchlaufen musste, die zu strukturellen Veränderungen hätten führen können. Es erfolgte lediglich eine Einbettung der intakten Paraffinzylinder in ganze Paraffinblöcke, um das Schneiden mit dem Mikrotom zu ermöglichen. So konnten die Stanzbiopsien in unveränderter Form im PBI und in der Histologie beurteilt werden. Zudem wurden die Stanzbiopsien in dieser Arbeit in doppelt so hoher maximaler Auflösung gescannt (1,8 vs. 0,9 μm Pixelgröße). Dadurch konnte die Gewebestruktur auf zellulärer Ebene, insbesondere durch die Darstellung der Zellkerne, noch besser gezeigt werden.

Die Kombination von PBI und Histologie ermöglicht zudem, den histologischen Schnittprozess auf bestimmte Zielstrukturen auszurichten. Beim gezielten Schneiden wird die Distanz von der aktuellen Schnittfläche des Paraffinblocks bis zur Zielregion im CT-Datensatz ausgemessen und anschließend entsprechend tief in den Paraffinblock hineingeschnitten. So könnte die pathologische Aufarbeitung von größeren Gewebeproben schneller und vollständiger erfolgen (Albers et al. 2018a).

4.2 Limitationen der spezifischen Färbungen

Gewebespezifische Informationen lassen sich in der röntgenbasierten virtuellen Histologie wie oben erläutert aktuell nur aus einer anschließenden histologischen Analyse und Überlagerung beider Bildgebungsmodalitäten übertragen. Ein Ziel dieser Arbeit war es, den Zwischenschritt der Überlagerung überflüssig zu machen. Daher sollte eine spezifische immunologische Färbemethode für Lungenstanzbiopsien entwickelt werden, die direkt

mittels PBI dargestellt werden kann. Dazu kamen in dieser Arbeit zwei methodisch verschiedene Ansätze zu Anwendung.

Im indirekten Ansatz mit zweistufigem Antikörpermodell war es möglich, eine spezifische Färbung von Zielstrukturen innerhalb von in Gänze gefärbten 1 mm Lungenstanzbiopsien in der Fluoreszenzmikroskopie nachzuweisen. Die Durchdringung der Antikörper betrug in lockerem Lungengewebe einige Hundert Mikrometer, in dichtem Tumorgewebe allerdings nur wenige Zellschichten (25 μm). Bei der Übertragung der Methode auf das PBI durch den Einsatz dual-gekoppelter FluoroNanogold-Antikörper konnte allerdings trotz in der Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesener spezifischer Färbung und damit Bindung der Antikörper an die Zielstrukturen im PBI keine entsprechende Kontrasterhöhung beobachtet werden.

Im direkten Ansatz wurden 10-fach kleinere, mit 10 nm Goldpartikeln gekoppelte Nanobodies verwendet. Im PBI konnte bei den murinen Proben eine Kontrasterhöhung am äußersten Rand der Probe dargestellt werden, die sowohl in Bereichen mit Tumor- als auch Lungengewebe vorhanden war. Bei den humanen Proben zeigten sich in lockerem Gewebe interessante Ansätze, mit teilweise korrespondierenden Färbemustern in beiden Modalitäten, jedoch insgesamt ein randbetontes, unspezifisches Bild.

Ein Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse in den beiden Ansätzen könnte die unterschiedliche Größe der konjugierten Goldpartikel sein. Die 1,4 nm Goldpartikel der FluoroNanogold-Sekundärantikörper aus dem zweistufigen Ansatz waren im PBI nicht nachweisbar. Diese sind vor allem für die höher auflösende EM entwickelt, in der sie bereits zur korrelativen Bildgebung an Gewebedünnschnitten erfolgreich eingesetzt wurden (Takizawa und Robinson 2012). Solche kleinen Nanogold-Partikel weisen eine hohe Konjugationseffizienz auf und erlauben so eine erhöhte Sensitivität, es wird jedoch auch schwieriger, sie in der Routine EM zu detektieren (Robinson et al. 2000). Daher werden selbst in dieser Bildgebungsmodalität mit Auflösungen im Bereich weniger Nanometer häufig Gold- oder Silberverstärkungsprotokolle eingesetzt, um die Detektion zu erleichtern (He et al. 2007). Dabei durchdringen hinzugegebene Gold- oder Silberionen die Probe und lagern sich an die an Antikörper gebundenen Gold-Nanopartikel ab. Es bilden sich so größere Silber- oder Goldpartikel (10 – 20 nm), die besser nachweisbar sind (Danscher und Stoltenberg 2006). Einen ähnlichen Ansatz verfolgten auch Metscher und Müller (2011) bei der spezifischen immunologischen Färbung zur Darstellung im Phasenkontrast-CT. Dabei wurden ganze Hühnerembryonen zuerst in primärem Antikörper gegen α -Tubulin bzw. Kollagen II inkubiert. Es folgte eine Inkubation mit sekundärem Antikörper mit Peroxidase-

Konjugat. Als Substrat wurde ein enzymvermitteltes Silberablagerungs-Kit eingesetzt. So war es möglich, im Phasenkontrast-CT ZNS-Strukturen bzw. Knorpel der Hühnerembryonen darzustellen. Eine Integration der Verstärkungsprotokolle in das hier gezeigte WMS-Protokoll könnte also zukünftig einen vielversprechenden Versuchsansatz darstellen.

Im direkten Ansatz wurden mit den Nanobodies deutlich kleinere immunologische Sonden, gleichzeitig aber größere Goldpartikel (10 nm) verwendet. Diese zeigten ebenfalls eine schlechte Gewebedurchdringung, waren jedoch im Gegensatz zu den 1,4 nm FluoroNanogold-Sekundärantikörpern im PBI nachweisbar. Eine Erklärung dafür könnten die schlechten Durchdringungseigenschaften größerer Goldpartikel sein. So konnten in einer Studie IgG-Antikörper mit 1,4 nm Goldpartikeln Gewebedünnschnitte von 2 μm Dicke vollständig durchdringen, während Antikörper mit 10 nm Goldpartikeln nur an der Schnittoberfläche nachzuweisen waren (Takizawa und Robinson 1994).

Die unvollständige Durchdringung der Antikörper ins Gewebe ist eine zentrale Limitation des WMS (Kakimoto 2018). Wie oben beschrieben konnte in dieser Arbeit in dichtem Tumorgewebe für das WMS fluoreszenzmikroskopisch nur eine Eindringtiefe von wenigen Zellschichten gezeigt werden. Um die Diffusion der Antikörper zu verbessern, könnten zum einen deutlich längere Inkubationszeiten gewählt werden. Darüber hinaus gibt es gerade im Bereich der Immunfluoreszenz weitere vielversprechende Ansätze zur Verbesserung der Durchdringung von immunologischen Sonden. Optische Clearing-Protokolle wie CLARITY erlauben durch Erhöhung der Permeabilität eine schnellere Durchdringung von Gewebe, verändern die Probe aber möglicherweise strukturell und sind zeitaufwendig (Chung et al. 2013). Weiterführend gibt es elektrophoretische Ansätze, die durch die Anlage eines elektrischen Felds die Diffusionsgeschwindigkeit der Antikörper erhöhen können (Li et al. 2015). Außerdem können Gewebeproben in Antikörperlösung zentrifugiert werden oder durch das Anlegen einer Flüssigkeitsströmung effektiver durchspült werden (Lee et al. 2016). Eine Übertragung dieser Techniken könnte also auch die Durchdringung der hier gezeigten Lungenstanzbiopsien verbessern. Dennoch hätte auch eine Färbung mit unvollständiger Durchdringung diagnostische Relevanz, indem zumindest die Randbereiche einzelner solider Tumorareale in einer Lungenbiopsie detektiert werden könnten.

Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, goldmarkierte immunologische Sonden in-vivo zu verabreichen und so eine bessere Verteilung im Gewebe zu erzielen. Dies wurde von Quarta et al. (2022) in einem Preprint zur spezifischen Färbung im Phasenkontrast-CT beschrieben. In dieser Studie wurden Mäusen in-vivo goldgekoppelte anti-GFAP-Nanobodies intravenös oder intranasal verabreicht. Anschließend sollten in explantierten Gehirnen astrozytenreiche

Regionen mittels Phasenkontrast-CT dargestellt werden. Die Autoren konnten zeigen, dass in-vivo verabreichte Gold-Nanobodies die Blut-Hirn-Schranke überwinden. In Blutgefäßen im Hippocampus konnten Goldpartikel als kontrastangehobene Areale gezeigt werden. Eine Validierung der Spezifität beschränkte sich auf fluoreszenzmikroskopische Darstellung dieser Areale. Dies wurde mit Proben verglichen, bei denen lediglich Gold-Nanopartikel unkonjugiert verabreicht wurden. Hier zeigte sich bei den Gold-Nanobodies ein etwas randständigeres Färbemuster als bei den Gold-Nanopartikeln. Es bleibt zu diskutieren, ob dies als Hinweis auf eine spezifische Bindung an GFAP zu werten ist, oder die Färbung durch eine Akkumulation entlang der Blutgefäße erklärt ist. Es handelt sich um einen vielversprechenden Ansatz, der sich aber zum aktuellen Zeitpunkt bei fehlender Beschreibung der Methoden nicht bestätigen oder vergleichen lässt.

Ein weiterer möglicher Grund für die fehlende Detektion der 1,4 nm Goldpartikel und die nur randständige Färbung mit 10 nm Gold-Nanobodies im PBI sind die erhöhten Temperaturen, denen die Proben nach der Färbung bei der Paraffineinbettung ausgesetzt waren. Obwohl in dieser Arbeit die Hitzeexposition bei der Paraffineinbettung verkürzt wurde, reichen möglicherweise kurze Perioden erhöhter Temperatur, um die Bindung der Goldpartikel von den Antikörpern bzw. Nanobodies zu lösen. Dies könnte die ausbleibende bzw. unspezifische Färbung erklären. Dagegen spricht allerdings der Nachweis in der Elektronenmikroskopie, der auch unter erhöhten Temperaturen erfolgreich war.

Ein Problem des direkten Ansatzes war die fehlende Möglichkeit, die Nanobodies unabhängig vom PBI im Gewebe nachzuweisen. Hier konnte eine Kontrolle durch eine andere Bildgebungsmodalität wie oben nicht durchgeführt werden, da keine duale Konjugation möglich war. Das erschwert die Ermittlung der Gründe der unspezifischen Färbung, sodass hier nur spekuliert werden kann. Hier wäre wie im zweistufigen Ansatz eine doppelte Konjugation der Nanobodies mit Goldpartikeln und einem Fluorophor sinnvoll. Dies ist bereits mit verschiedenen Fluorophoren durchgeführt wurden (Schneider et al. 2021).

In dieser Studie wurde EGFR als Zielstruktur der Färbung gewählt, da humane NSCLC eine hohe EGFR-Expression zeigen und so eine gute Übertragbarkeit gerade auf das Gewebe der humanen Lungentumorresekte zu erwarten war. Die dennoch variable EGFR-Expression erklärt die unterschiedliche Qualität der immunhistochemischen EGFR-Kontrollfärbungen. Außerdem konnte zwar im Tumormodell mit A549-Zellen im μ CT-Thorax zur Verlaufskontrolle ein ausreichendes Tumorwachstum nachgewiesen werden, jedoch war es bei der Biopsiegewinnung makroskopisch nicht immer sicher einzuschätzen, ob in jeder

einzelnen Biopsie Tumormaterial vorhanden war. Dies machte eine erhöhte Anzahl an Proben notwendig, um die Wahrscheinlichkeit von Tumorarealen in den gefärbten Biopsien zu erhöhen. Der Ansatz mit CD31-Antikörpern wurde gewählt, weil Endothelien in jeder Lungenbiopsie zu erwarten sind. Die CD31-Färbungen waren jedoch vor allem bei großen Gefäßen überzeugend sichtbar. Durch die beinahe ubiquitäre Anfärbung der Alveolarkapillaren waren große Teile des Lungengewebes leicht angefärbt und somit der Kontrast zwischen gefärbten und nicht-gefärbten Arealen begrenzt.

4.3 Klinische Anwendung und Ausblick

Die hier überprüften spezifischen Färbemethoden können die Immunhistochemie aktuell noch nicht ersetzen. Auch in der Literatur finden sich mit Metscher und Müller (2011) und Quarta et al. (2022) nur wenige Arbeiten zu spezifischen Färbungen in der röntgenbasierten Bildgebung. Dies verdeutlicht die Herausforderung bei der Etablierung einer geeigneten Methode. Trotzdem bietet die virtuelle Histologie durch PBI eine wertvolle Addition bei der feingeweblichen Analyse von Lungenbiopsien. Durch die Dreidimensionalität der Daten können wichtige morphologische Zusatzinformationen gewonnen werden, die durch die 2D-Histologie nur unzureichend beurteilt werden können. In der Lungentumordiagnostik sind spezifische immunhistochemische Färbungen zur histopathologischen Diagnostik unabdingbar, sodass hier die virtuelle Histologie nur ergänzend zum Einsatz kommen kann. Die hier gezeigte Methode erlaubt es allerdings, die PBI-Analyse in den histopathologischen Workflow zu integrieren. Nach Abgeschlossenen PBI-Aufnahmen kann eine immunhistologische Aufarbeitung problemlos erfolgen - durch das oben erläuterte gezielte Schneiden kann dies auf kritische Bereiche fokussiert werden. Die Kombination aus der besseren 3D-Darstellung der Morphologie und der Spezifität der histologischen Färbungen ermöglicht eine präzisere pathologische Diagnostik. So ist davon auszugehen, dass die Beurteilung der Tumoreindringtiefe, Gefäßinfiltration oder Resektionsstatus in der gesamten Gewebeprobe umfassender möglich wird. Gerade unter Hinzunahme neuer zyklischer Immunfluoreszenzverfahren zur Durchführung mehrerer immunologischer Färbungen an einem einzelnen Schnitt im Sinne einer Multiplex-Immunhistochemie stellt dies eine Kombination verschiedener Modalitäten mit erheblichem Informationsgewinn dar (Kinkhabwala et al. 2022). Ausgehend von den gewebespezifischen Informationen der histologischen Färbungen, könnte eine automatisierte Segmentierung von Zielstrukturen im PBI-Datensatz vorgenommen werden. Da die hier gezeigte Methode unter anderem mit paraffineingebetteten Gewebeproben arbeitet, ist es denkbar, archivierte Paraffinblöcke aus

der histopathologischen Diagnostik mittels PBI hochauflösend in 3D darzustellen und so durch eine hohe Anzahl an Datensätzen eine Basis für eine automatische Segmentierung von Gewebetypen mittels *machine learning* zu schaffen. Für Pathologien, bei denen sich die histopathologische Diagnostik in erste Linie auf die Beurteilung der Gewebemorphologie stützt, wäre die virtuelle Histologie durch PBI auch als alleinige Bildgebungsmodalität geeignet. Bei interstitiellen Lungenparenchymerkrankungen wie der idiopathischen Lungenfibrose kann eine virtuelle 3D Histologie hier einen deutlichen Vorteil gegenüber der konventionellen Histologie bieten, da gerade die räumliche Ausdehnung der Gewebeveränderungen besser beurteilt werden kann (Raghu et al. 2011).

Limitierend für die klinische Anwendung des PBI ist die Notwendigkeit einer Synchrotron-Strahlenquelle. Aktuell ist nur so eine Phasenkontrast-Bildgebung mit kurzen Scanzeiten möglich. Aufgrund der begrenzten Anzahl und Kapazität von Synchrotronquellen erscheint die Anwendung bisher nur im Rahmen von Studien an ausgewählten Zentren sinnvoll. Es gibt allerdings Ansätze, laborbasierte Röntgen-Phasenkontrast-Systeme zu entwickeln. Bidola et al. (2017) konnten mit dem Zeiss Xradia Versa 500 an biologischen Proben einen überlegenen Kontrast zu abschwächungsbasierter CT-Bildgebung zeigen.

Ein weiterer Ausblick der hier beschriebenen ex-vivo Methodik wäre das Gewinnen „virtueller Biopsien“ in-vivo. Dafür müssen jedoch klinisch akzeptable Strahlendosen erreicht werden können (Liu et al. 2006). An der SYRMEP-Beamline am Synchrotron Trieste konnte in ex-vivo Studien an Schweinelungen-Phantomen eine in-vivo Lungenbildgebung simuliert werden (Wagner et al. 2018). In einer anderen Studie konnte an humanem Mammagewebe gezeigt werden, dass die Bildqualität des PBI besser ist, als mit konventionellen klinischen CT-Systemen und zusätzlich eine geringere Strahlendosis erfordert (Tavakoli Taba et al. 2020). Mittels Dunkelfeld-Thorax-Radiografie wird Phasenkontrast-Bildgebung bereits im Rahmen von Studien bei Patienten durchgeführt (Gassert et al. 2021). Mit etwa 0,035 mSv ist die Strahlenbelastung mit konventionellen Röntgen-Thorax-Aufnahmen (etwa 0,02 mSv) vergleichbar (Willer et al. 2021). Dadurch können Pathologien wie die Lungenfibrose mit Lungenemphysem besser detektiert werden (Gassert et al. 2022).

5 Zusammenfassung

Das Lungenkarzinom ist weltweit für die meisten Todesfälle durch Tumorerkrankungen verantwortlich. Da sich die verschiedenen Subtypen der Erkrankung zum Teil in ihrer Prognose und den Therapiemöglichkeiten erheblich voneinander unterscheiden, ist eine genaue pathologische Diagnostik von zentraler Bedeutung. Neben molekulargenetischen Untersuchungen zur Identifizierung behandlungsrelevanter Mutationen spielen die morphologische Analyse sowie die Detektion tumorassoziierter Biomarker eine entscheidende Rolle. Die Standardverfahren dafür sind die Histologie bzw. die Immunhistochemie, die auf der Anfertigung von Gewebedünnschnitten basieren. Es entstehen zweidimensionale Daten, die das dreidimensionale Gewebe zum Teil nur eingeschränkt darstellen können. Zudem wird die Probe zerstört und es kommt zu Artefakten durch die Bearbeitungsschritte.

Daher wurde in dieser Arbeit der Einsatz der Phasenkontrast-Computertomografie als nicht-destruktive, dreidimensionale Bildgebungsmodalität zur Analyse von Lungentumorgewebe untersucht. Dafür wurden Stanzbiopsien von 1 mm Durchmesser am Synchrotron „Elettra“ in Triest (Italien) mittels der Phasenkontrast-CT-Modalität Propagation-based imaging (PBI) analysiert. Zusätzlich zur rein morphologischen Darstellung wurden Methoden zur spezifischen Färbung durch goldmarkierte immunologische Sonden evaluiert.

Es konnte gezeigt werden, dass sich die Morphologie ungefärbter Lungentumor-Stanzbiopsien im PBI ähnlich detailreich wie in der konventionellen Histologie darstellen lässt. In den dreidimensionalen Aufnahmen konnten Tumorgrenzen klar identifiziert und der Verlauf von Leitungsbahnen räumlich nachvollzogen werden. Durch anschließende histologische Einbettung und Ermittlung der korrespondierenden Schnittebenen konnten die histologischen Schnitte mit virtuellen PBI-Schnitten überlagert werden. Eine elastische Transformation ermöglichte die Korrektur histologischer Schnittartefakte.

Als spezifische Färbemethoden wurden zur Darstellung des EGF-Rezeptors (EGFR) und des Endothelmarkers CD31 in intakten Lungentumor-Stanzbiopsien zwei Ansätze untersucht.

Zunächst wurden im zweistufigen Antikörpermodell gefärbte Stanzbiopsien mittels Fluoreszenzmikroskopie und PBI analysiert. Dazu wurde ein gleichzeitig sowohl gold- als auch fluorophor-markierter Sekundärantikörper verwendet. Dabei konnte zwar fluoreszenzmikroskopisch eine spezifische Färbung von Tumorgewebe mit unvollständiger Durchdringung gezeigt, aber im PBI keine lokale Kontrasterhöhung durch die Goldpartikel nachgewiesen werden. Deshalb sollte zukünftig der Einsatz von Gold- oder Silberverstärkungsprotokollen verfolgt werden.

Parallel wurden mit dem Ziel einer verbesserten Gewebedurchdringung direkt goldmarkierte Nanobodies eingesetzt. Mit diesen zehnmal kleineren immunologischen Sonden konnten

Kontrasterhöhungen gezeigt werden, allerdings unspezifisch im gesamten Randbereich der Proben.

Diese Studie zeigt, dass sich das PBI als dreidimensionale Bildgebungsmodalität gut eignet, um kleine Weichgewebsbiopsien morphologisch darzustellen. Die in dieser Arbeit untersuchten spezifischen Färbemethoden können die Immunhistochemie aktuell noch nicht ersetzen. Eine Kombination von PBI und Immunhistochemie führt dagegen zu einem relevanten Informationsgewinn. Dies konnte an humanen Gewebeproben bestätigt werden.

Für die routinemäßige klinische Anwendung bleibt die Notwendigkeit einer Synchrotron-Strahlenquelle eine Limitation. Laborbasierte Phasenkontrast-CT-Systeme, die dies ermöglichen könnten, sind Gegenstand aktueller Forschung.

6 Literaturverzeichnis

- Albers J: Preclinical evaluation of nanoparticle enhanced breast cancer diagnosis and radiation therapy. Mol. Med. Diss. Göttingen 2021
- Albers J, Markus MA, Alves F, Dullin C (2018a): X-ray based virtual histology allows guided sectioning of heavy ion stained murine lungs for histological analysis. *Sci Rep* **8**, 7712
- Albers J, Pacilé S, Markus MA, Wiart M, Vande Velde G, Tromba G, Dullin C (2018b): X-ray-Based 3D Virtual Histology—Adding the Next Dimension to Histological Analysis. *Mol Imaging Biol* **20**, 732–741
- Albers J, Svetlove A, Alves J, Kraupner A, di Lillo F, Markus MA, Tromba G, Alves F, Dullin C (2021): Elastic transformation of histological slices allows precise co-registration with microCT data sets for a refined virtual histology approach. *Sci Rep* **11**, 10846
- Allemani C, Matsuda T, Di Carlo V, Harewood R, Matz M, Nikšić M, Bonaventure A, Valkov M, Johnson CJ, Estève J, et al. (2018): Global surveillance of trends in cancer survival 2000–14 (CONCORD-3): analysis of individual records for 37 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries. *Lancet* **391**, 1023–1075
- Baran P, Mayo S, McCormack M, Pacile S, Tromba G, Dullin C, Zanconati F, Arfelli F, Dreossi D, Fox J, et al. (2018): High-Resolution X-Ray Phase-Contrast 3-D Imaging of Breast Tissue Specimens as a Possible Adjunct to Histopathology. *IEEE Trans Med Imaging* **37**, 2642–2650
- Betz O, Wegst U, Weide D, Heethoff M, Helfen L, Lee WK, Cloetens P (2007): Imaging applications of synchrotron X-ray phase-contrast microtomography in biological morphology and biomaterials science. I. General aspects of the technique and its advantages in the analysis of millimetre-sized arthropod structure. *J Microsc* **227**, 51–71
- Bidola P, Morgan K, Willner M, Fehringer A, Allner S, Prade F, Pfeiffer F, Achterhold K (2017): Application of sensitive, high-resolution imaging at a commercial lab-based X-ray micro-CT system using propagation-based phase retrieval. *J Microsc* **266**, 211–220
- Bidola P, Martins de Souza e Silva J, Achterhold K, Munkhbaatar E, Jost PJ, Meinhardt AL, Taphorn K, Zdora M-C, Pfeiffer F, Herzen J (2019): A step towards valid detection and quantification of lung cancer volume in experimental mice with contrast agent-based X-ray microtomography. *Sci Rep* **9**, 1325
- Blobel GA, Moll R, Franke WW, Vogt-Moykopf I (1984): Cytokeratins in normal lung and lung carcinomas. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* **45**, 407–429
- Brun F, Pacilé S, Accardo A, Kourousias G, Dreossi D, Mancini L, Tromba G, Pugliese R (2015): Enhanced and Flexible Software Tools for X-ray Computed Tomography at the Italian Synchrotron Radiation Facility Elettra. *Fundam Inform* **141**, 233–243
- Brun F, Massimi L, Fratini M, Dreossi D, Billé F, Accardo A, Pugliese R, Cedola A (2017): SYRMEP Tomo Project: a graphical user interface for customizing CT reconstruction workflows. *Adv Struct Chem Imaging* **3**, 4
- Cheng R, Zhang F, Li M, Wo X, Su YW, Wang W (2019): Influence of Fixation and Permeabilization on the Mass Density of Single Cells: A Surface Plasmon Resonance Imaging Study. *Front Chem* **7**, 588
- Chicherova N, Hieber SE, Khimchenko A, Bikis C, Müller B, Cattin P (2018): Automatic deformable registration of histological slides to μ CT volume data. *J Microsc* **271**, 49–61

- Chung K, Wallace J, Kim S-Y, Kalyanasundaram S, Andalman AS, Davidson TJ, Mirzabekov JJ, Zalocusky KA, Mattis J, Denisin AK, et al. (2013): Structural and molecular interrogation of intact biological systems. *Nature* 497, 332–337
- Coons AH, Creech HJ, Jones RN (1941): Immunological Properties of an Antibody Containing a Fluorescent Group. *Exp Biol Med* 47, 200–202
- Coons AH, Leduc EH, Connolly JM (1955): Studies on Antibody Production: I. A Method for the Histochemical Demonstration of Specific Antibody and its Application to a Study of the Hyperimmune Rabbit. *J Exp Med* 102, 49–60
- Croy BA, Linder KE, Yager JA (2001): Primer for Non-immunologists on Immune-Deficient Mice and Their Applications in Research. *Comp Med* 51, 300–313
- Danscher G, Stoltenberg M (2006): Silver enhancement of quantum dots resulting from (1) metabolism of toxic metals in animals and humans, (2) in vivo, in vitro and immersion created zinc–sulphur/zinc–selenium nanocrystals, (3) metal ions liberated from metal implants and particles. *Prog Histochem Cytochem* 41, 57–139
- Dempster WT (1942): The mechanics of paraffin sectioning by the microtome. *Anat Rec* 84, 241–267
- Dullin C, Larsson E, Tromba G, Markus AM, Alves F (2015): Phase-contrast computed tomography for quantification of structural changes in lungs of asthma mouse models of different severity. *J Synchrotron Radiat* 22, 1106–1111
- Dullin C, Ufartes R, Larsson E, Martin S, Lazzarini M, Tromba G, Missbach-Guentner J, Pinkert-Leetsch D, Katschinski DM, Alves F (2017): μ CT of ex-vivo stained mouse hearts and embryos enables a precise match between 3D virtual histology, classical histology and immunochemistry. *PLoS One* 12, e0170597
- Falta J, Möller T (Hrsg.): *Forschung mit Synchrotronstrahlung: Eine Einführung in die Grundlagen und Anwendungen*. Vieweg+Teubner, Wiesbaden 2010
- Feldkamp LA, Davis LC, Kress JW (1984): Practical cone-beam algorithm. *J Opt Soc Am A* 1, 612
- Flanagan SP (1966): ‘Nude’, a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. *Genet Res* 8, 295–309
- Flynn MJ, Hames SM, Reimann DA, Wilderman SJ (1994): Microfocus X-ray sources for 3D microtomography. *Nucl Instrum Methods Phys Res A* 353, 312–315
- Foster KA, Oster CG, Mayer MM, Avery ML, Audus KL (1998): Characterization of the A549 Cell Line as a Type II Pulmonary Epithelial Cell Model for Drug Metabolism. *Exp Cell Res* 243, 359–366
- Gassert FT, Urban T, Frank M, Willer K, Noichl W, Buchberger P, Schick R, Koehler T, von Berg J, Fingerle AA, et al. (2021): X-ray Dark-Field Chest Imaging: Qualitative and Quantitative Results in Healthy Humans. *Radiology* 301, 389–395
- Gassert FT, Urban T, Pfeiffer D, Pfeiffer F (2022): Dark-Field Chest Radiography of Combined Pulmonary Fibrosis and Emphysema. *Radiol Cardiothorac Imaging* 4, e220085
- Gazdar AF, Hirsch FR, Minna JD (2016): From Mice to Men and Back: An Assessment of Preclinical Model Systems for the Study of Lung Cancers. *J Thorac Oncol* 11, 287–299

- Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP (1973): In Vitro Cultivation of Human Tumors: Establishment of Cell Lines Derived From a Series of Solid Tumors. *J Natl Cancer Inst* 51, 1417–1423
- Gosselin EJ, Cate CC, Pettengill OS, Sorenson GD (1986): Immunocytochemistry: Its evolution and criteria for its application in the study of epon-embedded cells and tissue. *Am J Anat* 175, 135–160
- Haines BB, Bettano KA, Chenard M, Sevilla RS, Ware C, Angagaw MH, Winkelmann CT, Tong C, Reilly JF, Sur C, Zhang W (2009): A Quantitative Volumetric Micro-Computed Tomography Method to Analyze Lung Tumors in Genetically Engineered Mouse Models. *Neoplasia* 11, 39–47
- Hainfeld JF, Slatkin DN, Focella TM, Smilowitz HM (2006): Gold nanoparticles: a new X-ray contrast agent. *Br J Radiol* 79, 248–253
- Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hammers C, Songa EB, Bendahman N, Hammers R (1993): Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* 363, 446–448
- Handschuh S, Schwaha T, Metscher BD (2010): Showing their true colors: a practical approach to volume rendering from serial sections. *BMC Dev Biol* 10, 41
- He W, Kivork C, Machinani S, Morpew MK, Gail AM, Tesar DB, Tiangco NE, McIntosh JR, Bjorkman PJ (2007): A freeze substitution fixation-based gold enlarging technique for EM studies of endocytosed Nanogold-labeled molecules. *J Struct Biol* 160, 103–113
- Hemberg O, Otendal M, Hertz HM (2003): Liquid-metal-jet anode electron-impact x-ray source. *Appl Phys Lett* 83, 1483–1485
- Hirsch FR, Scagliotti GV, Langer CJ, Varella-Garcia M, Franklin WA (2003): Epidermal growth factor family of receptors in preneoplasia and lung cancer: perspectives for targeted therapies. *Lung Cancer* 41, 29–42
- Hirsch FR, Scagliotti GV, Mulshine JL, Kwon R, Curran WJ, Wu YL, Paz-Ares L (2017): Lung cancer: current therapies and new targeted treatments. *The Lancet* 389, 299–311
- Horisberger M, Rosset J (1977): Colloidal gold, a useful marker for transmission and scanning electron microscopy. *J Histochem Cytochem* 25, 295–305
- Irie MS, Spin-Neto R, Borges JS, Wenzel A, Soares PBF (2022): Effect of data binning and frame averaging for micro-CT image acquisition on the morphometric outcome of bone repair assessment. *Sci Rep* 12, 1424
- Ishii N, Tajika Y, Murakami T, Galipon J, Shirahata H, Mukai R, Uehara D, Kaneko R, Yamazaki Y, Yoshimoto Y, Iwasaki H (2021): Correlative microscopy and block-face imaging (CoMBI) method for both paraffin-embedded and frozen specimens. *Sci Rep* 11, 13108
- Kakimoto T (2018): Validation of an easily applicable three-dimensional immunohistochemical imaging method for a mouse brain using conventional confocal microscopy. *Histochem Cell Biol* 149, 97–103
- Khimchenko A, Deyhle H, Schulz G, Schweighauser G, Hench J, Chicherova N, Bikis C, Hieber SE, Müller B (2016): Extending two-dimensional histology into the third dimension through conventional micro computed tomography. *Neuroimage* 139, 26–36
- Kinkhabwala A, Herbel C, Pankratz J, Yushchenko DA, Rüberg S, Praveen P, Reiß S, Rodriguez FC, Schäfer D, Kollet J, et al. (2022): MACSima imaging cyclic staining (MICS) technology

- reveals combinatorial target pairs for CAR T cell treatment of solid tumors. *Sci Rep* **12**, 1911
- Kitchen MJ, Paganin D, Lewis RA, Yagi N, Uesugi K, Mudie ST (2004): On the origin of speckle in x-ray phase contrast images of lung tissue. *Phys Med Biol* **49**, 4335–4348
- Kitchen MJ, Lewis RA, Yagi N, Uesugi K, Paganin D, Hooper SB, Adams G, Jureczek S, Singh J, Christensen CR, et al. (2005): Phase contrast X-ray imaging of mice and rabbit lungs: a comparative study. *Br J Radiol* **78**, 1018–1027
- Klein S, Staring M, Murphy K, Viergever MA, Pluim J (2010): elastix: A Toolbox for Intensity-Based Medical Image Registration. *IEEE Trans Med Imaging* **29**, 196–205
- Köhler G, Milstein C (1975): Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**, 495–497
- Koley D, Bard AJ (2010): Triton X-100 concentration effects on membrane permeability of a single HeLa cell by scanning electrochemical microscopy (SECM). *Proc Natl Acad Sci USA* **107**, 16783–16787
- Kraywinkel K, Schönfeld I (2018): Epidemiologie des nichtkleinzelligen Lungenkarzinoms in Deutschland. *Onkologe (Berl)* **24**, 946–951
- Krüwel T, Nevoltris D, Bode J, Dullin C, Baty D, Chames P, Alves F (2016): In vivo detection of small tumour lesions by multi-pinhole SPECT applying a ^{99m}Tc-labelled nanobody targeting the Epidermal Growth Factor Receptor. *Sci Rep* **6**, 21834
- Lee E, Choi J, Jo Y, Kim JY, Jang YJ, Lee HM, Kim SY, Lee H-J, Cho K, Jung N, et al. (2016): ACT-PRESTO: Rapid and consistent tissue clearing and labeling method for 3-dimensional (3D) imaging. *Sci Rep* **6**, 18631
- Leite Nascimento T, Hillaireau H, Vergnaud J, Rivano M, Deloménie C, Courilleau D, Arpicco S, Suk JS, Hanes J, Fattal E (2016): Hyaluronic acid-conjugated lipoplexes for targeted delivery of siRNA in a murine metastatic lung cancer model. *Int J Pharm* **514**, 103–111
- Li J, Czajkowsky DM, Li X, Shao Z (2015): Fast immuno-labeling by electrophoretically driven infiltration for intact tissue imaging. *Sci Rep* **5**, 10640
- Lindeman NI, Cagle PT, Beasley MB, Chitale DA, Dacic S, Giaccone G, Jenkins RB, Kwiatkowski DJ, Saldivar J-S, Squire J, et al. (2013): Molecular Testing Guideline for Selection of Lung Cancer Patients for EGFR and ALK Tyrosine Kinase Inhibitors: Guideline from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology. *J Thorac Oncol* **8**, 823–859
- Lindeman NI, Cagle PT, Aisner DL, Arcila ME, Beasley MB, Bernicker EH, Colasacco C, Dacic S, Hirsch FR, Kerr K, et al. (2018): Updated Molecular Testing Guideline for the Selection of Lung Cancer Patients for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors. *J Thorac Oncol* **13**, 323–358
- Liu P, Sun J, Guan Y, Zhang G, Xu LX: Detection of Lung Cancer with Phase-Contrast X-ray Imaging Using Synchrotron Radiation. In: 2006 International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE, New York 2006, 2001–2004
- Metscher BD (2009): MicroCT for comparative morphology: simple staining methods allow high-contrast 3D imaging of diverse non-mineralized animal tissues. *BMC Physiol* **9**, 11

- Metscher BD, Müller GB (2011): MicroCT for molecular imaging: Quantitative visualization of complete three-dimensional distributions of gene products in embryonic limbs. *Dev Dyn* 240, 2301–2308
- Meuwissen R, Berns A (2005): Mouse models for human lung cancer. *Genes Dev* 19, 643–664
- Missbach-Guentner J, Pinkert-Leetsch D, Dullin C, Ufartes R, Hornung D, Tampe B, Zeisberg M, Alves F (2018): 3D virtual histology of murine kidneys –high resolution visualization of pathological alterations by micro computed tomography. *Sci Rep* 8, 1407
- Mitchell LS, Colwell LJ (2018): Analysis of nanobody paratopes reveals greater diversity than classical antibodies. *Protein Eng Des Sel* 31, 267–275
- Morgensztern D, Ng SH, Gao F, Govindan R (2010): Trends in Stage Distribution for Patients with Non-small Cell Lung Cancer: A National Cancer Database Survey. *J Thorac Oncol* 5, 29–33
- Murphy K, Weaver C (Hrsg.): *Janeway's immunobiology*. 9. Auflage; Garland Science, New York 2016
- Nevoltris D, Lombard B, Dupuis E, Mathis G, Chames P, Baty D (2015): Conformational Nanobodies Reveal Tethered Epidermal Growth Factor Receptor Involved in EGFR/ErbB2 Predimers. *ACS Nano* 9, 1388–1399
- Niazi MKK, Parwani AV, Gurcan MN (2019): Digital pathology and artificial intelligence. *Lancet Oncol* 20, e253–e261
- Nicholson AG, Tsao MS, Beasley MB, Borczuk AC, Brambilla E, Cooper WA, Dacic S, Jain D, Kerr KM, Lantuejoul S, et al. (2022): The 2021 WHO Classification of Lung Tumors: Impact of Advances Since 2015. *J Thorac Oncol* 17, 362–387
- Osmani L, Askin F, Gabrielson E, Li QK (2018): Current WHO guidelines and the critical role of immunohistochemical markers in the subclassification of non-small cell lung carcinoma (NSCLC): Moving from targeted therapy to immunotherapy. *Semin Cancer Biol* 52, 103–109
- Ourselin S, Bardinet E, Dormont D, Malandain G, Roche A, Ayache N, Tandé D, Parain K, Yelnik J: Fusion of Histological Sections and MR Images: Towards the Construction of an Atlas of the Human Basal Ganglia. In: Niessen WJ, Viergever MA (Hrsg.): *Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention – MICCAI 2001*. Springer, Berlin, Heidelberg 2001, 743–751
- Pacilè S, Dullin C, Baran P, Tonutti M, Perske C, Fischer U, Albers J, Arfelli F, Dreossi D, Pavlov K, et al. (2019): Free propagation phase-contrast breast CT provides higher image quality than cone-beam breast-CT at low radiation doses: a feasibility study on human mastectomies. *Sci Rep* 9, 13762
- Paganin D, Mayo SC, Gureyev TE, Miller PR, Wilkins SW (2002): Simultaneous phase and amplitude extraction from a single defocused image of a homogeneous object. *J Microsc* 206, 33–40
- Pantelouris EM (1968): Absence of Thymus in a Mouse Mutant. *Nature* 217, 370–371
- Paulus MJ, Gleason SS, Kennel SJ, Hunsicker PR, Johnson DK (2000): High Resolution X-ray Computed Tomography: An Emerging Tool for Small Animal Cancer Research. *Neoplasia* 2, 62–70

- Perruchini C, Pecorari F, Bourgeois J-P, Duyckaerts C, Rougeon F, Lafaye P (2009): Llama VHH antibody fragments against GFAP: better diffusion in fixed tissues than classical monoclonal antibodies. *Acta Neuropathol* 118, 685
- Potts EM, Coppotelli G, Ross JM (2020): Histological-Based Stainings using Free-Floating Tissue Sections. *J Vis Exp* 162, e61622
- Quarta A, Sanna A, Pieroni N, Parodi B, Palermo F, Bukreeva I, Fratini M, Massimi L, Simeone D, Guével XL, et al. (2022): Immuno-Histo X-ray Phase Contrast Tomography: New 3D imaging technique for molecular tomography. *arXiv:2204.04894*
- Raghu G, Collard HR, Egan JJ, Martinez FJ, Behr J, Brown KK, Colby TV, Cordier J-F, Flaherty KR, Lasky JA, et al. (2011): An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Statement: Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Evidence-based Guidelines for Diagnosis and Management. *Am J Respir Crit Care Med* 183, 788–824
- Ramos-Gomes F, Bode J, Sukhanova A, Bozrova SV, Saccomano M, Mitkovski M, Krueger JE, Wege AK, Stuehmer W, Samokhvalov PS, et al. (2018): Single- and two-photon imaging of human micrometastases and disseminated tumour cells with conjugates of nanobodies and quantum dots. *Sci Rep* 8, 4595
- Rastogi V, Puri N, Arora S, Kaur G, Yadav L, Sharama R (2013): Artefacts: A Diagnostic Dilemma – A Review. *J Clin Diagn Res* 7, 2408–2413
- Robinson JM, Takizawa T, Vandre DD (2000): Applications of gold cluster compounds in immunocytochemistry and correlative microscopy: comparison with colloidal gold. *J Microsc* 199, 163–179
- Rodgers G, Sigron GR, Tanner C, Hieber SE, Beckmann F, Schulz G, Scherberich A, Jaquiéry C, Kunz C, Müller B (2022): Combining High-Resolution Hard X-ray Tomography and Histology for Stem Cell-Mediated Distraction Osteogenesis. *Appl Sci (Basel)* 12, 6286
- Romano R, Palamaro L, Fusco A, Giardino G, Gallo V, Del Vecchio L, Pignata C (2013): FOXP1: A Master Regulator Gene of Thymic Epithelial Development Program. *Front Immunol* 4
- Saccomano M, Albers J, Tromba G, Dobrivojević Radmilović M, Gajović S, Alves F, Dullin C (2018): Synchrotron inline phase contrast μ CT enables detailed virtual histology of embedded soft-tissue samples with and without staining. *J Synchrotron Radiat* 25, 1153–1161
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, et al. (2012): Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9, 676–682
- Schneider AFL, Benz LS, Lehmann M, Hackenberger CPR (2021): Cell-Permeable Nanobodies Allow Dual-Color Super-Resolution Microscopy in Untransfected Living Cells. *Angew Chem Int Ed* 60, 22075–22080
- Schneider P, Meier M, Wepf R, Müller R (2010): Towards quantitative 3D imaging of the osteocyte lacuno-canalicular network. *Bone* 47, 848–858
- Schoonoghe S, Laoui D, Van Ginderachter JA, Devoogdt N, Lahoutte T, De Baetselier P, Raes G (2012): Novel applications of nanobodies for in vivo bio-imaging of inflamed tissues in inflammatory diseases and cancer. *Immunobiology* 217, 1266–1272

- Snigirev A, Snigireva I, Kohn V, Kuznetsov S, Schelokov I (1995): On the possibilities of x-ray phase contrast microimaging by coherent high-energy synchrotron radiation. *Rev Sci Instrum* 66, 5486–5492
- Sternberger LA, Hardy PH, Cuculis JJ, Meyer HG (1970): The Unlabeled Antibody Enzyme Method of Immunohistochemistry Preparation and Properties of Soluble Antigen-Antibody Complex (Horseradish Peroxidase-Antihorseradish Peroxidase) and its Use in Identification of Spirochetes. *J Histochem Cytochem* 18, 315–333
- Stijlemans B, Conrath K, Cortez-Retamozo V, Van Xong H, Wyns L, Senter P, Revets H, De Baetselier P, Muyltermans S, Magez S (2004): Efficient Targeting of Conserved Cryptic Epitopes of Infectious Agents by Single Domain Antibodies: African Trypanosomes as Paradigm. *J Biol Chem* 279, 1256–1261
- Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F (2021): Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 71, 209–249
- Takizawa T, Robinson JM (1994): Use of 1.4-nm immunogold particles for immunocytochemistry on ultra-thin cryosections. *J Histochem Cytochem* 42, 1615–1623
- Takizawa T, Robinson JM: Correlative Fluorescence and Transmission Electron Microscopy in Tissues. In: Müller-Reichert T, Verkade P (Hrsg.): *Methods in Cell Biology*. Band 111; Elsevier 2012, 37–57
- Tavakoli Taba S, Baran P, Nesterets YI, Pacile S, Wienbeck S, Dullin C, Pavlov K, Maksimenko A, Lockie D, Mayo SC, et al. (2020): Comparison of propagation-based CT using synchrotron radiation and conventional cone-beam CT for breast imaging. *Eur Radiol* 30, 2740–2750
- Wagner WL, Wuennemann F, Pacilé S, Albers J, Arfelli F, Dreossi D, Biederer J, Konietzke P, Stiller W, Wielpütz MO, et al. (2018): Towards synchrotron phase-contrast lung imaging in patients – a proof-of-concept study on porcine lungs in a human-scale chest phantom. *J Synchrotron Radiat* 25, 1827–1832
- Walsh CL, Tafforeau P, Wagner WL, Jafree DJ, Bellier A, Werlein C, Kühnel MP, Boller E, Walker-Samuel S, Robertus JL, et al. (2021): Imaging intact human organs with local resolution of cellular structures using hierarchical phase-contrast tomography. *Nat Methods* 18, 1532–1541
- Weibel ER, Knight BW (1964): A morphometric study on the thickness of the pulmonary air-blood barrier. *J Cell Biol* 21, 367–384
- Weil M-T, Ruhwedel T, Meschkat M, Sadowski B, Möbius W: Transmission Electron Microscopy of Oligodendrocytes and Myelin. In: Lyons DA, Kegel L (Hrsg.): *Oligodendrocytes: Methods and Protocols*. Band 1936; Springer, New York 2019, 343–375
- Weiss GJ, Bemis LT, Nakajima E, Sugita M, Birks DK, Robinson WA, Varella-Garcia M, Bunn PA, Haney J, Helfrich BA, et al. (2008): EGFR regulation by microRNA in lung cancer: correlation with clinical response and survival to gefitinib and EGFR expression in cell lines. *Ann Oncol* 19, 1053–1059
- Willer K, Fingerle AA, Noichl W, De Marco F, Frank M, Urban T, Schick R, Gustschin A, Gleich B, Herzen J, et al. (2021): X-ray dark-field chest imaging for detection and quantification of emphysema in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a diagnostic accuracy study. *Lancet Digit Health* 3, e733–e744
- Winick H (1987): Synchrotron Radiation. *Sci Am* 257, 88–101

- Yatabe Y, Dacic S, Borczuk AC, Warth A, Russell PA, Lantuejoul S, Beasley MB, Thunnissen E, Pelosi G, Rekhtman N, et al. (2019): Best Practices Recommendations for Diagnostic Immunohistochemistry in Lung Cancer. *J Thorac Oncol* 14, 377–407
- Yi E, Han SM, Chang JE, Kim HT, Kim J-K, Seo SJ, Chung JH, Jheon S (2017): Synchrotron tomographic images from human lung adenocarcinoma: Three-dimensional reconstruction and histologic correlations. *Microsc Res Tech* 80, 1141–1148
- Zhang C, Lv F, Zhou L, Li X, Wu XX, Hoffman RM (2009): Effect of verapamil on the expression of EGFR and NM23 in A549 human lung cancer cells. *Anticancer Res* 29, 27–32

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater PD Dr. Christian Dullin für die Themenfindung und die engagierte Betreuung zu jeder Zeit. Außerdem möchte ich PD Dr. Felix Bremmer als zweites Mitglied meines Betreuungsausschusses für die konstruktiven Anregungen und insbesondere die Bereitstellung des humanen Probenmaterials danken.

Zusätzlich bedanke ich mich bei Dr. Jonas Albers für die Unterstützung bei den Versuchen und die Vermittlung wertvoller Expertise in der Daten- und Bildverarbeitung.

Aus dem Max-Planck-Institut für multidisziplinäre Naturwissenschaften in Göttingen danke ich Dr. Fernanda Ramos-Gomes für die Durchführung der Fluoreszenzmikroskopie und Dr. Andrea Markus für die Hilfe beim tierexperimentellen Tumormodell sowie beiden für die Beiträge zum Versuchsaufbau. Für die Durchführung der Elektronenmikroskopie danke ich Dr. Wiebke Möbius, für die Konjugation der Nanobodies Dr. David Ewers.

Zuletzt möchte ich mich bei allen bedanken, ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Insbesondere gilt dies Regine Kruse für die Anfertigung zahlreicher histologischer Schnitte, Bärbel Heidrich für die großartige Hilfe im Labor und bei der Zellkultur sowie Sabine Wolfgramm und Bettina Jeep für die Durchführung histologischer Färbungen.