

Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

**Prospektive Untersuchung tumorassoziierter und immunonkologisch relevanter miRNA im
Verlauf der Strahlentherapie von Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom
(NSCLC)**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Frauke Kadler

Betreuer:

Prof. Dr. med. Dirk Vordermark

Gutachter:

Prof. Dr. med. Wolfgang Schütte, Halle (Saale)

Prof. Dr. rer. nat. Franz Rödel, Frankfurt am Main

Datum der Verteidigung: 11.10.2023

Referat

Das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom (NSCLC) stellt eine der bedeutendsten Krebserkrankungen weltweit dar. Die Prognose ist aufgrund der späten Diagnosestellung jedoch oft sehr schlecht. Ein wichtiger Therapiepfeiler insbesondere in fortgeschrittenen Stadien ist die Radiotherapie. Als potenzielle diagnostische und prognostische Biomarker wurden in der vorliegenden Arbeit mikro-RNA (miRNA) im Plasma von NSCLC-Patienten unter Radiotherapie bestimmt. MiRNA sind kurze, nicht-kodierende RNA, welche sowohl in Zellen als auch in vielen Körperflüssigkeiten wie Blutplasma zu finden sind, und vielfältige Funktionen ausüben.

Für diese Arbeit wurden sechs miRNA (miR-16-5p, -21-5p, -29a-3p, -144-3p, -150-5p und -155-5p) ausgewählt, die in der Literatur einen Zusammenhang zu NSCLC bzw. einer Radiatio gezeigt hatten. Von diesen konnten vier miRNA erfolgreich in einem Kollektiv aus 178 NSCLC-Patienten vor Beginn einer Radiotherapie, nach Bestrahlung mit 20 Gy und nach Ende der Radiotherapie sowie in 30 gesunden Blutspendern quantifiziert werden. Für die Detektion der miRNA erfolgte die Etablierung der droplet digital PCR (ddPCR), welche im Vgl. zur RT-qPCR eine Quantifizierung ohne Referenz-miRNA ermöglicht.

Der Vergleich der PCR-Methoden RT-qPCR und ddPCR erbrachte einen starken Zusammenhang beider Detektionsmethoden. Der Vergleich von Patientenproben mit Plasmaproben gesunder Blutspender zur Analyse der diagnostischen Wertigkeit der miRNA konnte aufgrund unterschiedlicher präanalytischer Voraussetzungen nicht bewertet werden.

Während die Analyse im Patientenkollektiv deutlich unterschiedliche Expressionslevel der vier miRNA zeigte, ergab sich eine starke Korrelation der miRNA untereinander. Die miR-16-5p war in diesem Kollektiv aufgrund starker Schwankungen der Expressionslevel nicht als Referenz-miRNA für die RT-qPCR geeignet. Für zwei miRNA (miR-29a-3p und -150-5p) zeigte sich insbesondere bei Patienten mit fortgeschrittenem UICC-Stadium ein Abfall im Verlauf der Radiotherapie. Zusammenhänge der Expressionslevel der miRNA zum UICC-Stadium und zum Gesamtüberleben der Patienten ergaben sich insbesondere nach Strahlentherapie. Patienten mit höheren Expressionsleveln der miR-29a-3p bzw. -144-3p wiesen ein besseres Gesamtüberleben auf. Hervorzuheben ist, dass sich die Kombination von vier miRNA nach Strahlentherapie als vom UICC-Stadium unabhängiger Prognosemarker erwies.

Insgesamt zeigte die vorliegende Arbeit eine klinische Bedeutung der untersuchten miRNA und einen Zusammenhang mit dem Gesamtüberleben nach einer Radiotherapie. Weitere Untersuchungen auf diesem Feld scheinen vielversprechend.

Kadler, Frauke: Prospektive Untersuchung tumorassoziierter und immunonkologisch relevanter miRNA im Verlauf der Strahlentherapie von Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom (NSCLC), Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 76 Seiten, 2023

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom	1
1.1.1	Epidemiologie.....	1
1.1.2	Histologie	1
1.1.3	Diagnostik und Staging.....	2
1.1.4	Generelle Therapieempfehlungen und Radiotherapie des NSCLC	3
1.1.5	Prävention und Risikofaktoren.....	4
1.1.6	Prognose	5
1.2	Mikro-RNA.....	6
1.2.1	Entdeckung, Funktion und Bedeutung.....	6
1.2.2	Zirkulierende miRNA als Tumormarker.....	7
1.2.3	Rolle zirkulierender miRNA bei NSCLC-Patienten	8
1.2.4	Ausgewählte miRNA: miR-16-5p, -144-3p, -150-5p, -29a-3p, -21-5p, -155-5p	9
1.2.5	Detektionsmethoden zirkulierender miRNA.....	11
2	Zielstellung	14
3	Material und Methoden.....	15
3.1	Material.....	15
3.1.1	Geräte.....	15
3.1.2	Chemikalien und Reagenzien	15
3.1.3	Synthetische Oligonukleotide	16
3.1.4	Kits.....	16
3.1.5	Verbrauchsmaterial.....	16
3.1.6	Software und Datenbanken	16
3.1.7	Patientenkohorte	17
3.2	Methoden.....	18
3.2.1	Blutentnahmen und Plasmaisolation.....	18
3.2.2	miRNA-Isolation und cDNA-Synthese	19
3.2.3	RT-qPCR.....	20
3.2.4	droplet digital PCR.....	20
3.2.5	Statistische Auswertung.....	22
4	Ergebnisse	23
4.1	Etablierung der ddPCR	23
4.2	Einflussfaktoren – Hb-Wert, miRNA-Gesamtkonzentration und Lagerungsdauer	27
4.3	Bewertung der miR-16-5p als potenzielle Referenz-miRNA für die RT-qPCR.....	29

4.4	Vergleich von Patientenproben und Blutspendern	30
4.5	Korrelationen der miRNA-Expressionslevel zu klinischen Parametern.....	31
4.6	Gesamtüberleben	33
4.7	Analyse der miRNA-Expressionslevel in Abhängigkeit vom Therapiezeitpunkt	39
5	Diskussion.....	44
5.1	Zusammensetzung des Studienkollektivs	44
5.2	Quantifizierung zirkulierender miRNA und Etablierung der ddPCR.....	44
5.3	Eignung der miR-16-5p als Referenzgen	46
5.4	Einflussfaktoren	47
5.4.1	Effekte des Hb-Werts der Plasmaproben.....	48
5.4.2	Effekte der miRNA-Gesamtkonzentration	48
5.4.3	Lagerung, Einfrieren und Auftauen der Proben.....	49
5.5	Vergleich der miRNA-Expressionslevel von NSCLC-Patienten und Blutspendern	50
5.6	Analyse der miRNA-Expressionslevel in Abhängigkeit vom Therapiezeitpunkt	51
5.7	Korrelationen der miRNA-Expressionslevel mit klinischen Parametern.....	53
5.8	Zusammenhang der miRNA-Expressionslevel mit dem Gesamtüberleben	55
5.9	Fazit und Ausblick.....	58
6	Zusammenfassung	61
7	Literatur.....	63
8	Thesen.....	76

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Häufigkeit verschiedener Tumore nach Geschlecht	1
Abbildung 2. Bösartige Neubildungen der Lunge nach hist. Typ	2
Abbildung 3. TNM-Klassifikation des NSCLC	2
Abbildung 4. Überleben von NSCLC-Patienten nach Stadium	5
Abbildung 5. Zelluläre Freisetzung und extrazelluläre Transport der miRNA	7
Abbildung 6. miR-150-5p, Verdünnung 1:25, exemplarisch für Spender 1	23
Abbildung 7. miR-155-5p, Verdünnung 1:25, exemplarisch für Spender 2	23
Abbildung 8. miR-21-5p, Verdünnung 1:1000, exemplarisch für Spender 3	24
Abbildung 9. Zusammenhang zwischen Verdünnungsgrad und per ddPCR ermittelter Konzentration.....	24
Abbildung 10. mediane Expressionslevel der gemessenen miRNA in Kopien/ng RNA	25
Abbildung 11. Korrelation ddPCR und RT-qPCR am Bsp. der miR-150-5p.....	26
Abbildung 12. Streudiagramm der Expressionslevel von miR-29a-3p und -150-5p	27
Abbildung 13. Level der miR-144-3p in Abh. des Hb-Werts [g/l].....	28
Abbildung 14. Level der miR-144-3p in Abh. der miRNA-Gesamtkonzentration [ng/μl].....	29
Abbildung 15. Level der miR-144-3p in Abh. der Lagerungsdauer [d].....	29
Abbildung 16. Histogramm der Verteilung der miR-16-5p	30
Abbildung 17. Vgl. der Expressionslevel zw. Blutspendern, NSCLC-1 und NSCLC-2	31
Abbildung 18. Verteilung der miR-29a-3p und -150-5p über die UICC-Stadien nach Ende der Bestrahlung	32
Abbildung 19. Überleben nach Kaplan-Meier nach der miR-29a-3p zum Zeitpunkt T1	33
Abbildung 20. Überleben nach Kaplan-Meier nach der miR-16-5p zum Zeitpunkt T2	34
Abbildung 21. Überleben nach Kaplan-Meier nach der miR-29a-3p zum Zeitpunkt T2	35
Abbildung 22. Überleben nach Kaplan-Meier nach der miR-144-3p zum Zeitpunkt T2	36
Abbildung 23. Überleben nach Kaplan-Meier nach KmiR zum Zeitpunkt T2	38
Abbildung 24. Spaghetti-Plot der Verteilung der miR-150-5p über die Messzeitpunkte T0, T1 und T2	40
Abbildung 25. mediane Expressionslevel miR-16-5p im Therapieverlauf	40
Abbildung 26. mediane Expressionslevel miR-29a-3p im Therapieverlauf	41
Abbildung 27. mediane Expressionslevel miR-144-3p im Therapieverlauf	41
Abbildung 28. mediane Expressionslevel miR-150-5p im Therapieverlauf	41
Abbildung 29. miR-29a-3p zu den drei Messzeitpunkten für Patienten mit UICC-Stadium IV ...	42

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Patientencharakteristik	18
Tabelle 2. Zusammenhang zw. RT-qPCR und ddPCR.....	25
Tabelle 3. Korrelation der miRNA nach Spearman-Rho.....	26
Tabelle 4. Korrelation zw. miRNA-Expressionsleveln und Einflussfaktoren	28
Tabelle 5. Lagemaße der miR-16-5p	29
Tabelle 6. Häufigkeitsverteilung der einzelnen UICC-Stadien über die drei Messzeitpunkte	32
Tabelle 7. Zahl der Patienten nach miR-29a-3p-Expressionslevel zum Zeitpunkt T1	34
Tabelle 8. Zahl der Patienten nach miR-16-5p-Expressionslevel zum Zeitpunkt T2	34
Tabelle 9. Zahl der Patienten nach miR-29a-3p-Expressionslevel zum Zeitpunkt T2	35
Tabelle 10. Zahl der Patienten nach miR-144-3p-Expressionslevel zum Zeitpunkt T2	36
Tabelle 11. univariable Cox-Regressionsanalyse der dichotomisierten miRNA-Level	37
Tabelle 12. Multivariable Cox-Regression ausgewählter miRNA.....	37
Tabelle 13. Patienten in den Gruppen (1) und (2) der KmiR zum Zeitpunkt T2.....	38
Tabelle 14. Multivariable Cox-Regression der KmiR adjustiert für Alter, Geschlecht und UICC- Stadium	39
Tabelle 15. Änderung der Level der miR-150-5p zu den Messzeitpunkten in Abh. vom UICC- Stadium	42

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
Abh.	Abhängigkeit
AUC	<i>Area under the Curve</i>
BCL-2	<i>B-Cell Lymphoma 2</i>
BMI	<i>Body Mass Index</i>
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
ca.	circa
ccm	Kubikzentimeter
cDNA	<i>Complementary Desoxyribonucleic Acid</i>
CEA	karzinoembryonales Antigen
CT	Computertomografie
Ct	Schwellenwertzyklus, englisch <i>Cycle Threshold</i>
CYFRA 21-1	<i>Cytokeratin-Fragment 19</i>
ddPCR	<i>Droplet Digital Polymerase Chain Reaction</i>
DEPC	Diethylpyrokarbonat
ECOG	<i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
et al.	und andere, latein <i>et alii</i>
EU	europäische Union
FC	Fold change
FDG-PET	Positronenemissionstomographie mit Fluorodesoxyglukose
GTV	makroskopisches Tumolvolumen, englisch <i>Gross Tumor Volume</i>
Gy	Gray
h	Stunde
Hb	Hämoglobin
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>
Her-2	<i>Human Epidermal Growth Factor Receptor 2</i>
hist.	histologisch
HR	<i>Hazard Ratio</i>
i. d. R.	in der Regel
Im	Patienten-Nummer

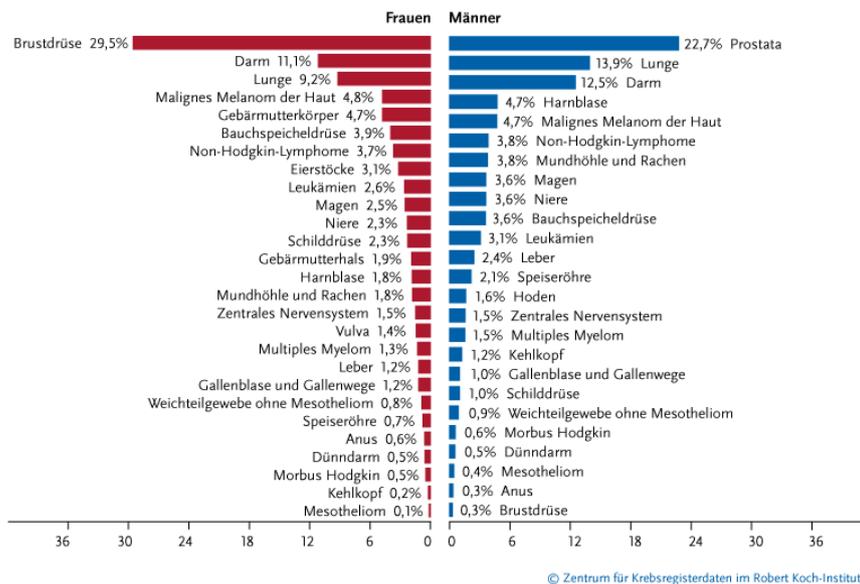
KmiR	kombinierte Variable aus miR-16-5p, -29a-3p, -144-3p und -150-5p
Kopien/ng RNA	Kopien je Nanogramm RNA
kum.	kumulativ
min	Minute
miRNA/ miR	Mikro-RNA
ml	Milliliter
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MRT	Magnetresonanztomografie
n	Anzahl
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NSCLC	nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom, englisch <i>Non-Small-Cell Lung Cancer</i>
OP	Operation
RISC	<i>RNA-induced Silencing Complex</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse, DNase	Ribonuklease, Desoxyribonuklease
RPM	Rotationen pro Minute
RT-qPCR	<i>Real-Time Quantitative PCR</i>
sec.	Sekunde
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
u. a.	unter anderem
UICC	<i>Union Internationale Contre Le Cancer</i>
Vgl.	Vergleich
vs.	versus
WHO	<i>World Health Organization</i>
x g	relative Zentrifugalkraft
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil
zw.	zwischen

1 Einleitung

1.1 Das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Das Bronchialkarzinom zählt zu den bedeutendsten Krebserkrankungen unserer Zeit. Weltweit stellte es im Jahr 2020 die häufigste Krebstodesursache dar (World Health Organization 2021). Bösartige Neubildungen der Lunge und Bronchien waren in Deutschland im Jahr 2020 für 4,5 % aller Todesfälle verantwortlich, sprich etwa einem von 22 Todesfällen (Statistisches Bundesamt Deutschland 2020). Folgende Abbildung zeigt den Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2016 (ohne nicht-melanotischen Hautkrebs), unter denen das Lungenkarzinom den zweiten bzw. dritten Platz bei Frauen bzw. Männern belegt.



© Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut

Abbildung 1. Häufigkeit verschiedener Tumore nach Geschlecht (Zentrum für Krebsregisterdaten 2019)

Die Inzidenz der Erkrankung steigt bei beiden Geschlechtern ab dem 60. Lebensjahr stark an und das mediane Erkrankungsalter liegt für beide Geschlechter um das 70. Lebensjahr (Robert Koch-Institut 2016).

1.1.2 Histologie

Nach histologischem Subtyp werden kleinzellige (SCLC) von nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen (NSCLC) unterschieden. Die nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinome umfassen Plattenepithel- und Adenokarzinome, großzellige Karzinome und andere seltene Subtypen sowie Mischformen und stellen den Hauptteil aller Bronchialkarzinome dar. Den größten Teil unter den NSCLC bilden die Adenokarzinome mit insgesamt 42 % (Zentrum für Krebsregisterdaten 2020).

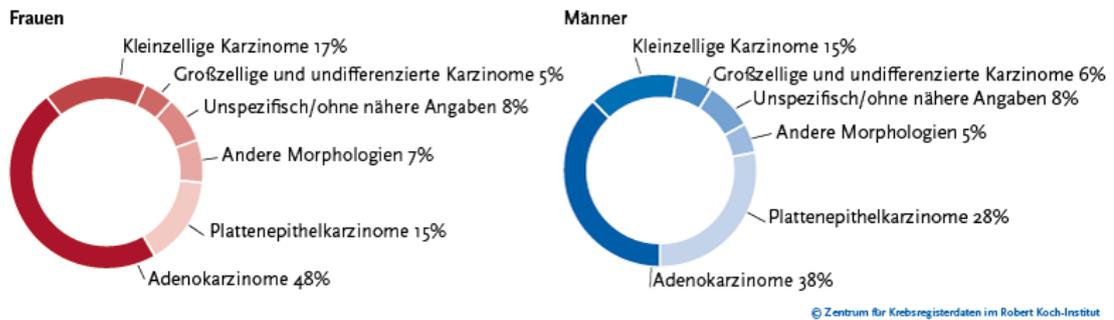


Abbildung 2. Bösartige Neubildungen der Lunge nach hist. Typ (Zentrum für Krebsregisterdaten 2020)

1.1.3 Diagnostik und Staging

Die Basisdiagnostik umfasst neben klinischer Untersuchung, Anamnese und Labor eine Röntgen-Thorax-Aufnahme, eine Spiral-CT inklusive Nebennieren und Oberbauch, eine Bronchoskopie sowie eine Ultraschalluntersuchung des Abdomens. U. a. zur Diagnostik von Hirnmetastasen kann sich eine MRT anschließen. V. a. zum N-Staging des NSCLC und zur Entdeckung von Fernmetastasen ist die FDG-PET geeignet. Die Diagnosesicherung per Biopsie ist obligat (S3-Leitlinie 2018). Bei auffälligen Lungenherden sollte ebenfalls die Möglichkeit eines extrapulmonalen Primärtumors mit pulmonalen Metastasen bedacht werden.

Das Staging des NSCLC erfolgt mithilfe der TNM-Klassifikation nach den Kriterien der *Union internationale contre le cancer* (UICC). Abhängig von Tumorgröße (T), Nodalstatus (N) und Metastasierung (M) wird das Tumorstadium festgelegt. Dies bereitet die Grundlage für das weitere Therapievorgehen und dient der Prognoseabschätzung. Folgende Abbildung zeigt die seit Januar 2017 geltende Einteilung.

	N0	N1	N2	N3	M1a jedes N	M1b jedes N	M1c jedes N
T1a	IA1	IIB	IIIA	IIIB	IVA	IVA	IVB
T1b	IA2	IIB	IIIA	IIIB	IVA	IVA	IVB
T1c	IA3	IIB	IIIA	IIIB	IVA	IVA	IVB
T2a	IB	IIB	IIIA	IIIB	IVA	IVA	IVB
T2b	IIA	IIB	IIIA	IIIB	IVA	IVA	IVB
T3	IIB	IIIA	IIIB	IIIC	IVA	IVA	IVB
T4	IIIA	IIIA	IIIB	IIIC	IVA	IVA	IVB

Abbildung 3. TNM-Klassifikation des NSCLC (Greiner und Schaudt 2016)

Etwa die Hälfte der Patienten befindet sich bei Diagnosestellung bereits in Stadium IV (Kraywinkel und Schönfeld 2018), (Robert Koch-Institut 2016). Die Metastasierung des NSCLC erfolgt hämatogen v. a. in Gehirn, Knochen, Leber, Nebennieren und lymphogen in intraabdominelle, axilläre, supraklavikuläre und zervikale Lymphknoten (S3-Leitlinie 2018).

Die Früherkennung des Bronchialkarzinoms gestaltet sich aufgrund der unspezifischen Symptomatik schwierig. Ein Screening mittels Low-Dose-CT für Risikopersonen wird in

Deutschland aufgrund der Strahlenbelastung und der hohen Rate an falsch-positiven Befunden nicht empfohlen (S3-Leitlinie 2018), (Swensen et al. 2005). Untersuchungen zur Aussagekraft von Tumormarkern, wie bspw. CEA, ergaben, dass diese in Betrachtung der geringen Prävalenz einer Lungenkrebserkrankung nur einen geringen positiven prädiktiven Wert mit vielen falsch-positiven Befunden aufzeigten (S3-Leitlinie 2018).

Es existiert noch keine geeignete Methode zur Diagnostik des Bronchialkarzinoms im asymptomatischen Frühstadium und zum Screening asymptomatischer Patienten. Es scheint daher sinnvoll, an weiteren minimalinvasiv zugänglichen diagnostischen Biomarkern zu forschen, da von der früheren Diagnosestellung ein deutlicher Überlebensvorteil zu erwarten ist.

1.1.4 Generelle Therapieempfehlungen und Radiotherapie des NSCLC

In den Stadien I, II und IIIA ist die operative Resektion in Form einer Lobektomie mit vollständiger Dissektion ipsilateraler Lymphknoten in kurativer Intention die Therapie der ersten Wahl (S3-Leitlinie 2018). Neben der Operation erfolgt stadienabhängig eine adjuvante oder neoadjuvante, platinbasierte Chemotherapie. Eine Bestrahlung wird als adjuvante Radiatio bei R1/R2-Situation oder als definitive Radiotherapie bei Inoperabilität des Primärtumors sowie bei mediastinalem Lymphknotenbefall eingesetzt (DGHO 2019). Ab dem Stadium IIIA4 mit einem mediastinalen Lymphknotenbefall liegt keine Operabilität mehr vor (Leyn et al. 2014). Hier wird eine definitive Radiochemotherapie empfohlen, je nach Ausdehnung des Primärtumors und Allgemeinzustand des Patienten in kurativer oder palliativer Intention (S3-Leitlinie 2018). Das Stadium IV wird durch das Vorliegen von Fernmetastasen definiert und i. d. R. palliativ therapiert. Es stehen abhängig vom ECOG-Status eine Kombinationschemotherapie, eine systemische Immuntherapie oder der *Best Supportive Care* zur Verfügung. Einen Sonderfall stellt die oligometastasierte Erkrankung dar, welche auch im Stadium IV kurativ therapiert werden kann (S3-Leitlinie 2018). Bei nicht kurativ therapierbaren nicht-plattenepithelialen Tumoren bzw. Plattenepithelkarzinomen von Nichtrauchern erfolgt eine molekulare Diagnostik zur Identifizierung möglicher Treibermutationen für eine gerichtete Therapie. Durch den Einsatz gezielter molekularer Therapien kann das mediane Überleben von 8–18 Monaten in Stadium IVB auf bis zu vier Jahre im Median verlängert werden (S3-Leitlinie 2018).

Die Strahlentherapie ist ein zentraler Baustein der Therapie des NSCLC und stellt eine Therapiemöglichkeit maligner Tumore mittels ionisierender Strahlen dar. Über die Bildung freier Radikale im Gewebe werden Zellen und ihr Erbgut geschädigt. Dies betrifft sowohl kanzeröses als auch gesundes Gewebe, wobei Tumorzellen i. d. R. anfälliger für die Bestrahlung sind, da ihre Teilungsrate erhöht und DNA-Reparaturmechanismen gestört sind.

Die Strahlentherapie erfolgt bei NSCLC zumeist als Bestrahlung des Primärtumors. Es werden inoperable Tumore oder das Tumorbett nach inkompletter Resektion bestrahlt bzw. erfolgt ab N2-Situation meist eine adjuvante Radiatio des Mediastinums. Ab Stadium III wird die simultane Radiochemotherapie eingesetzt. Weiterhin ist im palliativen Setting eine neoadjuvante Bestrahlung des Tumors ebenso möglich wie die Bestrahlung von Metastasen.

Im kurativen Ansatz kommen v. a. die konventionelle Fraktionierung oder die hyperfraktionierte akzelerierte Radiatio zum Einsatz. Es werden i. d. R. 1,8–2,0 Gy pro Tag 5 x/ Woche bis zu einer Gesamtdosis von 60–66 Gy verabreicht. Eine Steigerung der Gesamtdosis von 60 Gy auf 74 Gy führte nicht zu einem höheren Gesamtüberleben (Bradley et al. 2015). Im palliativen Ansatz erfolgt meist eine hypofraktionierte Applikation.

Nebenwirkungen einer Strahlentherapie umfassen die akute Ösophagitis, Müdigkeit, Abgeschlagenheit und Übelkeit, Myelopathien und Pneumonitiden. Eine symptomatische Strahlenpneumonitis tritt in 5–15 % der Fälle auf und kann in eine pulmonale Fibrose übergehen (DGHO 2019). Die Häufigkeit und Schwere der Nebenwirkungen korreliert mit Dosis, Fraktionierung und Bezug des Strahlengangs zum betroffenen Organ (S3-Leitlinie 2018).

Eine weitere Herausforderung ist das Auftreten von Radioresistenzen. Louis Harold Gray, Namensgeber der Einheit Gray, erkannte erstmals 1953 den Effekt einer Oxygenierung auf das Tumorsprechen auf Röntgenstrahlen im Mausmodell (Gray et al. 1953). Das Prinzip der hypoxischen Radioresistenz wird v. a. für solide Tumore beschrieben, in deren hypoxischen Anteilen die Wirksamkeit ionisierender Strahlung aufgrund des Sauerstoffmangels herabgesetzt ist. Es sind auch Mutationen bekannt, die zu einer höheren Radioresistenz in NSCLC beitragen, bspw. im EGF-Rezeptor oder durch Aktivierung der Akt/Proteinkinase B (Brognard et al. 2001), (Dutta und Maity 2007). Ebenso spielen Zellzyklusphase und das Funktionieren verschiedener DNA-Reparaturmechanismen eine Rolle für die Strahlenempfindlichkeit von humanen Zellen (Löbrich und Jeggo 2007). Gleichzeitig ergibt sich bei NSCLC-Patienten durch die biologische Vielfalt der Tumore ein sehr unterschiedliches Ansprechen auf die Radiotherapie (Florczuk et al. 2017).

Es scheint also sinnvoll, Marker zu finden, welche mit dem Ansprechen auf eine Radiotherapie korrelieren. Dies kann den Therapieerfolg verbessern und unerwünschte Nebenwirkungen reduzieren.

1.1.5 Prävention und Risikofaktoren

Einen verbreiteten und gut untersuchten Risikofaktor für die Entwicklung eines Bronchialkarzinoms stellt das Tabakrauchen dar. 1957 veröffentlichte der *Medical Research Council* im *British Medical Journal* einen Bericht, in dem erstmals ein Zusammenhang zwischen

der gestiegenen Lungenkrebsrate und der Zunahme des Tabakrauchens in der Bevölkerung aufgezeigt wird (The Medical Research Council 1957). 85 % der Lungenkrebstodesfälle in der EU ließen sich im Jahr 2004 auf Tabakrauchen zurückführen (S3-Leitlinie 2018). Dem Rauchverzicht bzw. -stopp kommt demnach eine große präventive Bedeutung zu (IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans 2004). Besonders bei Adenokarzinomen stellen Umwelteinflüsse und Gefahrstoffe wie Radon- oder Feinstaubbelastung mögliche Karzinogene dar. Andere bekannte Risikofaktoren sind eine familiäre Vorbelastung, ionisierende Strahlen, Dieselmotorenemissionen und eine berufliche Gefahrstoffexposition (S3-Leitlinie 2018).

1.1.6 Prognose

Die relative 5-Jahres-Überlebensrate beträgt für das Bronchialkarzinom insgesamt bei Frauen etwa 22 % und bei Männern 17 %, Stand 2019 (Zentrum für Krebsregisterdaten 2020). Diese schlechten Zahlen liegen z. T. darin begründet, dass das Bronchialkarzinom aufgrund seiner unspezifischen Symptome häufig erst in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert wird. Bei Erstdiagnose befinden sich ca. 23 % der Patienten in Stadium III und 53 % der Patienten im nicht kurativ therapierbaren Stadium IV (Robert Koch-Institut 2016).

Prognosebestimmend sind beim NSCLC u. a. das Tumorstadium inkl. Metastasierung, Differenzierungsgrad und Tumorgröße, der Genotyp des Tumors, der histologische Subtyp, das Geschlecht, der Allgemeinzustand und die Komorbiditäten des Patienten (DGHO 2019). In den letzten Jahren nahm hierbei die prognostische Bedeutung molekulargenetischer Marker und die damit einhergehende individualisierte Therapie deutlich zu (Redaktion Deutsches Ärzteblatt 2019). Das mediane Überleben ist hierbei besonders vom UICC-Stadium abhängig. Während nach zwei Jahren noch 97 % der Patienten in Stadium IA am Leben sind, sind es in Stadium IVB nur noch 10 %. Zu sehen sind die 2- und 5-Jahres-Überlebensraten nach der 8. Auflage der TNM-Klassifikation.

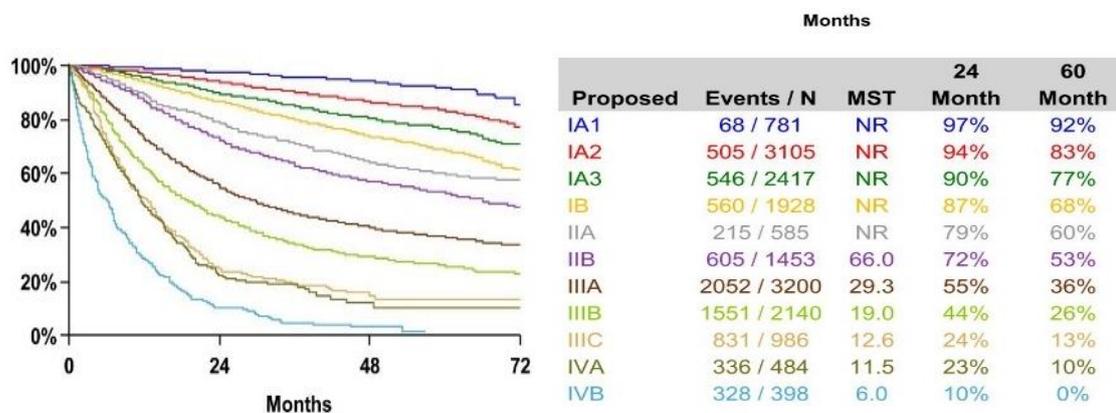


Abbildung 4. Überleben von NSCLC-Patienten nach Stadium (Goldstraw et al. 2016)

Zur prognostischen Stratifizierung mittels Biomarkern existieren zahlreiche Untersuchungen. Schon lange untersuchte Marker für die Prognose des NSCLC sind u. a. EGFR, Her-2, Ki-67, p53 und BCL-2, welche jedoch nur inkonsistente Ergebnisse lieferten und einen schwachen prognostischen Wert aufwiesen (Zhu et al. 2006). Auch für die CEA- und CYFRA 21-1-Level im Plasma wurde in mehreren Untersuchungen ein prognostischer Wert beschrieben (Grunnet und Sorensen 2012), (Pujol et al. 2004). Auch Hypoxiemarker wurden als prognostische Marker für NSCLC-Patienten unter Radiotherapie untersucht. Bspw. ergab sich das Protein Osteopontin im Plasma als leicht zugänglicher Marker mit prognostischer Wertigkeit in einem Kollektiv aus 69 inoperablen NSCLC-Patienten unter Radiotherapie (Ostheimer et al. 2014). Erfolgversprechend scheint besonders die Zusammenfassung mehrerer prognostischer Biomarker (Lai et al. 2020). Eine weitere aussichtsreiche Perspektive stellen die leicht zugänglichen zirkulierenden mikro-RNA (miRNA) im Plasma dar.

1.2 Mikro-RNA

1.2.1 Entdeckung, Funktion und Bedeutung

Die erste Beschreibung der mikro-RNA (miRNA) erfolgte 1993 in dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*). Hier wurde die mRNA-antagonistische Nukleotidsequenz *lin-4* entdeckt (Lee et al. 1993). Sieben Jahre später wurde die Nukleotidsequenz *let-7* neben *C. elegans* auch in verschiedenen Tierspezies und in menschlichem Gewebe nachgewiesen (Pasquinelli et al. 2000). Auch in Viren wurden miRNA entdeckt, was ihre konservierte Rolle in der Entwicklungsgeschichte aller Lebewesen unterstreicht (Pfeffer et al. 2004). MiRNA gehören zu den sogenannten nicht-codierenden RNA, welche an der Regulation der Transkription und Translation anderer Gene beteiligt sind. Sie bestehen aus etwa 19–25 Ribonukleotiden und kommen sowohl intra- als auch extrazellulär vor. I. d. R. wirken sie durch eine spezifische Bindung an die mRNA bzw. an die 3' untranslatierte Region und der damit einhergehenden posttranskriptionellen Inhibition der Translation (Bartel 2004), (Bartel 2009). Es stellte sich heraus, dass ein großer Teil der kodierenden mRNA durch miRNA reguliert wird (Friedman et al. 2009). Im Jahr 2006 wurde der Nobelpreis für Physiologie oder Medizin für die Entdeckung der RNA-Interferenz verliehen, bei der miRNA eine maßgebliche Rolle spielen (Fire et al. 1998). Hierbei erfolgt in eukaryotischen Zellen eine Suppression der Translation der Zielgene durch gezielte Degeneration der entsprechenden mRNA, u.a. durch antagonistische miRNA-Sequenzen (Cerutti und Casas-Mollano 2006).

Seit ihrer Entdeckung waren miRNA in den letzten Jahren Objekt intensiver Forschung und bieten vielfältige Möglichkeiten auf diagnostischer, prognostischer und sogar therapeutischer Ebene. Da sie Assoziationen zu malignen Veränderungen zeigen, im peripheren Blut zu finden

sind und eine hohe Stabilität besitzen, besteht ein großes Potenzial für zirkulierende miRNA in der Krebsfrüherkennung und zur prädiktiven und prognostischen Diagnostik des NSCLC.

1.2.2 Zirkulierende miRNA als Tumormarker

Im Jahr 2008 wurden miRNA nicht nur im Gewebe sondern auch in Serum und Plasma entdeckt und es wurde bereits ein breites diagnostisches und prognostisches Potential der zirkulierenden miRNA ausgemacht (Chen et al. 2008), (Gilad et al. 2008), (Mitchell et al. 2008). Neben Plasma und Serum konnten miRNA auch in verschiedenen Körperflüssigkeiten wie Speichel, Urin, Liquor oder Muttermilch nachgewiesen werden (Weber et al. 2010).

Die miRNA werden im Zellkern als pre-miRNA in Haarnadel-Formation transkribiert. Im Zytosol werden sie Teil des RNA-induced Silencing-Komplexes (RISC) zur Translationsregulation (1) oder es erfolgt der Export nach extrazellulär. Dies geschieht einerseits über *Multivesicular Bodies* (MVB), welche Exosomen freisetzen (2), über Mikrovesikel, welche sich aus der Zellmembran bilden (3) oder es wird freie reife oder pre-miRNA freigesetzt (4). Diese liegt im Plasma an RNA-Transportproteine oder an HDL gebunden vor (Creemers et al. 2012). In Abbildung 5 ist die Transkription und Freisetzung der miRNA dargestellt.

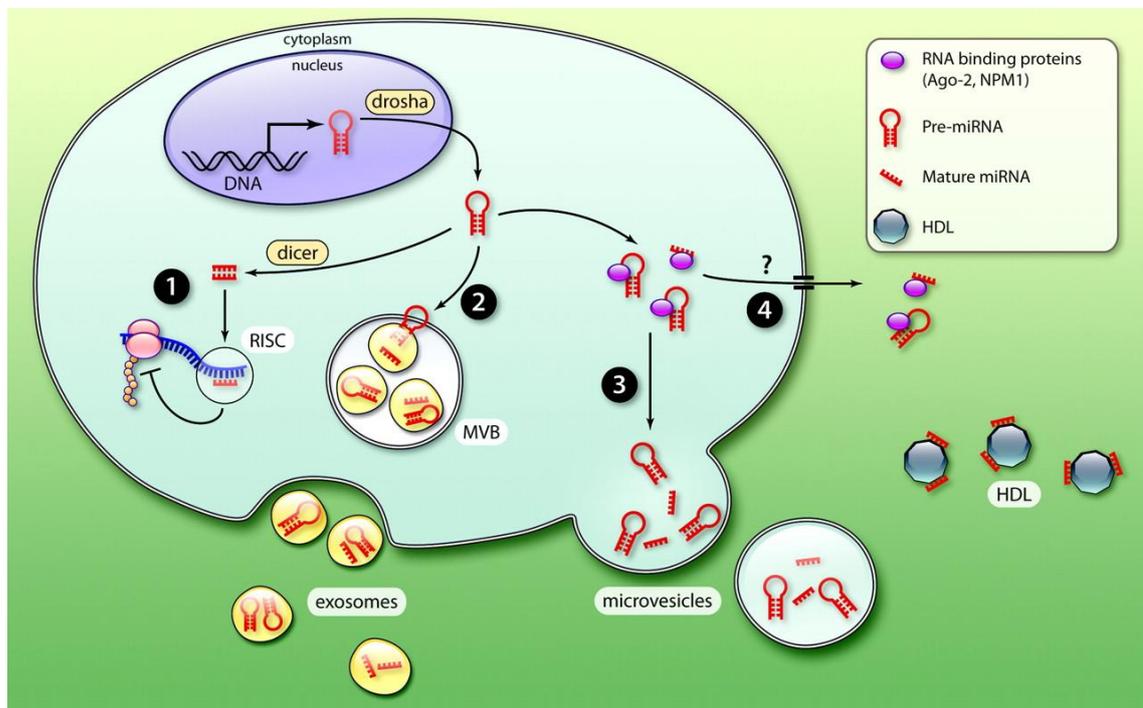


Abbildung 5. Zelluläre Freisetzung und extrazelluläre Transport der miRNA (Creemers et al. 2012)

Die zirkulierenden miRNA zeigten eine hohe Stabilität bei mehrmaligem Einfrieren, Schwankungen des pH-Wertes und eine Resistenz gegen plasmatische RNAsen (Arroyo et al. 2011), (Valadi et al. 2007). Vermutet wurde, dass besonders Blut- und Endothelzellen und gut durchblutete Organe wie Leber, Lunge und Niere größere Mengen miRNA zur Zell-Zell-

Kommunikation an das Blut abgeben. Ebenso werden bei einer Zellyse intrazelluläre miRNA freigesetzt (Chen et al. 2012), (Pritchard et al. 2012), (Schwarzenbach et al. 2014).

Es wurde für verschiedene Gewebe nachgewiesen, dass sich die miRNA-Expressionsprofile zwischen gesundem und Tumorgewebe z. T. deutlich unterscheiden (Calin und Croce 2006), (Lu et al. 2005). Auch im Plasmaprofil von miRNA zwischen Gesunden und Tumorpatienten wurden für zahlreiche Krebsarten Unterschiede gefunden. Einige miRNA scheinen gezielt von Tumorzellen sekretiert bzw. im Zytosol retiniert zu werden (Aushev et al. 2013), (Chen et al. 2008), (Mitchell et al. 2008), (Palma et al. 2012). Hieraus ergibt sich ein großes Potenzial der zirkulierenden miRNA zur Diagnostik von Tumorerkrankungen aus leicht zugänglichem Material wie Blutplasma oder Serum.

1.2.3 Rolle zirkulierender miRNA bei NSCLC-Patienten

Bereits ein Jahr nach der Entdeckung zirkulierender miRNA konnte ein diagnostisches Potenzial für Patienten mit NSCLC ausgemacht werden. Es fand sich ein erhöhter Gehalt an Plasma-miRNA innerhalb der Krebspatienten und diese wurden in tumorstämmigen Exosomen nachgewiesen (Rabinowits et al. 2009). Von verschiedenen Autoren wurden diagnostische miRNA-Signaturen aus Plasma zur Früherkennung eines NSCLC und zur Entdeckung von Hochrisiko-Patientengruppen entwickelt (Bianchi et al. 2011), (Boeri et al. 2011), (Sozzi et al. 2014), (Ulivi et al. 2013), (Wozniak et al. 2015). Häufig untersuchte Marker für das Bronchialkarzinom stellen bspw. die onkogenen miR-19a, -19b und -20 dar, welche im Serum erhöhte Level im Vergleich zu gesunden Kontrollen aufwiesen (Lampignano et al. 2020). Dabei wurden teilweise gegensätzliche Beziehungen zwischen den Expressionsleveln zellulärer und zirkulierender miRNA festgestellt (Boeri et al. 2011), (Niu et al. 2019).

Auch eine prognostische und prädiktive Assoziation verschiedener Plasma-miRNA zum Gesamtüberleben wurde bei NSCLC-Patienten festgestellt. Hierbei gibt es eine große Zahl an verschiedenen miRNA mit Bedeutung für das NSCLC, bspw. die miR-30d, miR-21, miR-125b oder miR-29a (Boeri et al. 2011), (Cui et al. 2013), (Hu et al. 2010), (Joerger et al. 2014).

Auch für die zelluläre Reaktion auf eine Bestrahlung scheinen miRNA eine Rolle zu spielen. In Lungengewebe und NSCLC-Zelllinien konnten nach Bestrahlung veränderte Expressionslevel zellulärer miRNA festgestellt werden sowie ein Zusammenhang einiger miRNA zum Therapieansprechen (Tang et al. 2016), (Wang et al. 2011), (Weidhaas et al. 2007).

1.2.4 Ausgewählte miRNA: miR-16-5p, -144-3p, -150-5p, -29a-3p, -21-5p, -155-5p

Aufgrund von Literaturdaten wurden in der vorliegenden Studie sechs miRNA mit diagnostischer oder prognostischer Bedeutung für das NSCLC oder einem Bezug zur Radiotherapie ausgewählt. Die miR-21 gehört zu den am häufigsten vorkommenden und hochkonservierten miRNA. Sie wird im Wesentlichen in allen Zellen exprimiert und spielt eine wichtige Rolle bei Gesundheit und Krankheit. In zahlreichen Tumoren einschließlich dem Bronchialkarzinom zeigt sie sich überexprimiert und nimmt eine prognostisch relevante Rolle ein (Bautista-Sánchez et al. 2020), (Jenike und Halushka 2021). Die onkogene miR-21 zeigte sich in mehreren unabhängigen Studien in Tumorgewebe aus NSCLC im Vgl. zu gesundem Lungengewebe hochreguliert und es scheint ein Zusammenhang zum Tumorstadium zu bestehen (Wei et al. 2011), (Yanaihara et al. 2006), (Zhang et al. 2010). Sie zeigte sich auch im Serum von NSCLC-Patienten als unabhängiger prognostischer Marker und hohe Level der miR-21 steigerten auf zellulärer Ebene die Resistenz der Tumorzellen gegen eine Bestrahlung (Liu et al. 2013).

Xinying et al. zeigten eine negative prognostische Bedeutung hoher Expressionslevel sowohl der miR-21 als auch der miR-155 für NSCLC-Patienten auf (Xinying Xue et al. 2016). Auch die miR-155 zeigte im Tumorgewebe von 55 NSCLC-Patienten eine negative prognostische Bedeutung hoher Expressionslevel (Yanaihara et al. 2006). Höhere Expressionslevel der miR-155 waren auch in 80 gepaarten Gewebeproben mit einem schlechteren Gesamtüberleben assoziiert. In NSCLC-Patienten zeigte die miR-155 erhöhte Level in sekretierten tumorstämmigen Exosomen und kam daher als potenzieller diagnostischer Marker für das Adenokarzinom der Lunge infrage (Rabinowits et al. 2009). Im Zellexperiment zeigte die miR-155 auf zellulärer Ebene einen radioprotektiven Effekt (Babar et al. 2011).

Für die miR-16-5p wurde gezeigt, dass sie *in vitro* Wachstum und Migration von NSCLC-Zellen hemmt (Ke et al. 2013), (Liu et al. 2019), (Wang et al. 2018a). Im Plasma zeigte sich tendenziell eine Herunterregulation der miR-16-5p bei Krebspatienten, so z.B. bei Magenkarzinom-Patienten (Zhang et al. 2015). Als Effekt einer Bestrahlung entdeckten Wang et al. in Prostatakarzinom-Zellen erhöhte Level der miR-16-5p, welche die Radiosensitivität des Gewebes steigerte (Wang et al. 2019). Auch in NSCLC steigerte die miR-16-5p die Radiosensitivität der Zellen im Zellexperiment (Du et al. 2021), (Wang et al. 2020). Andererseits wird diese miRNA auch regelmäßig als Referenz-miRNA in der RT-qPCR eingesetzt (s. u.) (Chim et al. 2008).

Die miR-144-3p wird in vielen Tumoren, bspw. Magen-, Nieren- oder hepatozellulären Karzinomen, herunterreguliert. Sie scheint im Gewebe eine tumorsuppressive und proapoptische Wirkung auszuüben (Liang et al. 2017), (Liu et al. 2015), (Liu et al. 2016). Dies konnte auch für das NSCLC gezeigt werden (Boeri et al. 2011), (Pan et al. 2015), (Zha et al. 2013).

Andererseits fanden Pu et al. in Patienten mit Plattenepithel-Ca. der Lunge erhöhte Level der miR-144-3p sowohl im Plasma als auch im Gewebe (Pu et al. 2016). In der Literatur fand sich auch eine prognostische Bedeutung der miR-144. Für die miR-144 in Tumorgewebe waren nach Analyse der TCGA-Datenbank niedrigere Level mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Yin et al. 2018).

Die zirkulierende miR-144-3p wurde bei NSCLC-Patienten unter Radiatio bisher nicht untersucht. Es zeigte sich jedoch ein Zusammenhang der Expressionslevel der miR-144 zu einer Bestrahlung. Für Ratten wurde ein Anstieg der rno-miR-144-3p im Plasma zwei Wochen nach Thoraxbestrahlung gemessen und die miR-144-3p schien in die Prozesse von Entzündung, Immunantwort und Zellwachstum involviert zu sein, welche durch eine Bestrahlung aktiviert werden (Gao et al. 2017). Für den Nebenstrang der miR-144, die miR-144-5p, wurde gezeigt, dass er in humanem NSCLC-Gewebe unter Bestrahlung herunterreguliert wird. Eine erhöhte miR-144-5p-Expression steigerte *in vitro* die Sensitivität von NSCLC-Zellen gegenüber Bestrahlung (Song et al. 2018).

Für die Gewebespiegel der miR-150-5p in Bronchialkarzinomen wurden teils unterschiedliche Entdeckungen gemacht. Einerseits wurden erniedrigte Level und eine tumorsuppressive Wirkung nachgewiesen (Dai et al. 2019), (Misono et al. 2019), (Suetsugu et al. 2018). Andererseits fanden sich erhöhte Gewebelevel in Lungenkrebspatienten und *in vitro* zeigte sich ein prometastatischer und onkogener Effekt der miR-150 (Li et al. 2016), (Li et al. 2019), (Zhang et al. 2018). Andere Autoren fanden für hohe Gewebelevel der miR-150 in klinischen Tumorproben von NSCLC-Patienten eine negative prognostische Bedeutung (Yin et al. 2015). Für NSCLC-typische Zelllinien wurde *in vitro* nachgewiesen, dass diese die miR-150-5p unter normalen Umständen aktiv in die Umgebung exportieren, sodass dort die ca. 8-fache Konzentration im Vgl. zum Zytoplasma vorliegt (Aushev et al. 2013). Die miR-150-5p zeigte demnach in verschiedenen Studien veränderte Expressionslevel in NSCLC und scheint vermehrt durch Tumorzellen ins Plasma sekretiert zu werden.

Untersuchungen von Dinh et al. fanden einen Zusammenhang der Level der miR-150-5p und -29a-3p im Plasma von NSCLC-Patienten mit der eingesetzten Strahlendosis während einer thorakalen Radiotherapie (Dinh et al. 2016).

Die miR-29a ist Mitglied der miR-29-Familie, wobei der miR-29a-3p-Strang den Leitstrang darstellt (miRBase 21.11.2020). Die miR-29a-3p ist in vielen Tumoren, bspw. in Prostata-, Magen-, Pankreaskarzinomen und auch in NSCLC, herunterreguliert und übt dort eine tumorsuppressive Wirkung aus (Cui et al. 2011), (Li et al. 2017), (Muniyappa et al. 2009), (Wang et al. 2018b), (Zhao et al. 2015). Im Gegensatz zu Bronchialkarzinomgewebe scheint die zirkulierende miR-29a-3p bei NSCLC-Patienten eine proinvasive Funktion ausüben. Fabbri et al.

entdeckten, dass Lungenkrebszellen exosomale miR-29a sekretierten, welche an der Tumor-Gewebe-Grenze die Metastasierung des Tumors begünstigte (Fabbri et al. 2012). Zu ihrer molekularen Funktion ist auch bekannt, dass sie bspw. im Herzen einen antifibrotischen Effekt vermittelt (van Rooij et al. 2008). In Mäuselungen zeigte sich ebenfalls ein antifibrotischer Effekt bei Bleomycin-induzierter Lungenfibrose (Cushing et al. 2011), (Xiao et al. 2012). Den gleichen Effekt entdeckten Dinh et al. auch in der menschlichen Lunge. Es zeigte sich auch ein Zusammenhang des miRNA-Levels der miR-29a-3p mit klinischen und dosimetrischen Parametern (Dinh et al. 2016).

1.2.5 Detektionsmethoden zirkulierender miRNA

Die Quantifizierung zirkulierender miRNA gestaltet sich aufgrund verschiedener Faktoren schwierig. So ist ihr Gehalt im Plasma sehr gering und es handelt sich um kurze Nukleotidsequenzen mit einer hohen Variabilität (Blondal et al. 2013), (Kroh et al. 2010).

Übliche Messmethoden für miRNA stellen neben PCR-basierten Methoden die Messung per Sequenzierung und per Hybridisierung, bspw. mittels Microarray, dar. Die *microRNA Quality Control-Studie* durch Mestagh et al. von 2014 bietet einen Vergleich verschiedener kommerzieller Detektionsmethoden. Bei niedrigen miRNA-Konzentrationen, welche bei miRNA im Plasma vorliegen, zeigte die RT-qPCR die beste Sensitivität. Die Messung per Sequenzierung zeigte nur bei ausreichenden Ausgangsmengen eine gute Sensitivität. Ein Vorteil der Sequenzierung ist die Möglichkeit, unbekannte miRNA zu identifizieren, sie ist jedoch kostenintensiv. Kostengünstiger ist die Messung per Microarray, bei der fluoreszenzmarkierte Sonden auf einem Träger die gesuchte Sequenz binden. Hier ist ein hoher Durchsatz möglich, jedoch können nur miRNA mit bekannten Sequenzen erfasst werden (Mestdagh et al. 2014). Eine weitere auf einer Hybridisierung beruhende Messmethode ist die digitale Nanostring-Counter-Technologie, welche über Hybridisierungssonden ohne Amplifikation und cDNA-Synthese auskommt (Fortina und Surrey 2008). Die hybridisierungsbasierten Methoden zeigten im Vergleich die niedrigste Sensitivität (Di Leva und Croce 2013), (Fortina und Surrey 2008). Zwischen den verschiedenen Messmethoden wurde nur eine Konkordanz von ca. 55 % gefunden, sodass empfohlen wird, Expressionsunterschiede von miRNA idealerweise in zwei Messmethoden zu bestätigen (Mestdagh et al. 2014). Sequenzierung und Hybridisierung eignen sich besonders zum Screening, da eine große Zahl an miRNA gemessen werden kann. Für Analysen zirkulierender miRNA mit bekannten Sequenzen sind PCR-basierte Methoden aufgrund ihrer hohen Sensitivität bei geringen Ausgangsmengen vorteilhaft.

Die am meisten verbreitete Methode der Messung von zirkulierenden miRNA ist die *Real-Time quantitative PCR* (RT-qPCR). Hierbei wird die Fluoreszenz des amplifizierten Produktes während des Synthesevorgangs detektiert. Somit steigt mit jedem Zyklus die Intensität des Signals in Abhängigkeit von der Menge der Amplifikate. Als Ergebnis kann der sogenannte Ct-Wert (*Cycle Threshold*, Schwellenwertzyklus) angesehen werden. Er gibt den PCR-Zyklus an, ab dem eine Probe in exponentielle Amplifikation übergeht. Diese Methode kann genutzt werden, um eine bestimmte Menge Nukleinsäure zu quantifizieren, indem der Ct-Wert gegen ein Referenzgen normalisiert wird. Dies ist notwendig, um eine Vergleichbarkeit und Unabhängigkeit von Einflussfaktoren wie bspw. ungleicher RNA-Extraktion oder der Ko-Isolation von PCR-Inhibitoren zu erreichen.

Die RT-qPCR benötigt daher für die Quantifizierung von miRNA stabil exprimierte Referenzgene bzw. -miRNA. In zahlreichen Studien mit zirkulierenden miRNA ergibt sich das Problem, eine geeignete Referenz in Plasma und Serum zu finden. Häufig eingesetzt wird bspw. die ubiquitär vorhandene miR-16, welche auch in Zellmaterial als endogene Referenz zum Einsatz kommt. Andere genutzte Referenzgene sind snoRNA (*small nucleolar RNA*) wie U6, die mittlere Gesamt-miRNA (*Mean miRNA-Expression*) oder einzelne, durch Normfinder-Analysen als stabil identifizierte miRNA. Auch die Kombination mehrerer miRNA kann als Referenz verwendet werden. Mitunter kommt auch eine exogene, bei der Isolation zugesetzte Spike-In-Kontrolle zur Anwendung (Chim et al. 2008), (Lagos-Quintana et al. 2003), (Lawrie et al. 2008), (McDonald et al. 2011), (Mestdagh et al. 2009), (Ulivi et al. 2013).

Die Ansprüche an ein Referenzgen beinhalten u. a. eine stabile Expression im untersuchten Material und eine Resistenz gegen pathologische Einflüsse wie Entzündungszustände oder maligne Prozesse. Gleichzeitig sollte es zur Vermeidung methodischer Fehler derselben RNA-Klasse wie die untersuchte Sequenz (sprich miRNA) angehören. Besonders für zirkulierende miRNA ist jedoch die Etablierung allgemeingültiger Referenzgene schwierig, da die miRNA-Expressionslevel von zahlreichen Kofaktoren und Komorbiditäten beeinflusst werden und u. a. zirkadianen Schwankungen unterliegen (Marabita et al. 2016).

So gibt es für die Analyse zirkulierender miRNA per RT-qPCR bis heute keine einheitliche Bezugsgröße. Die Inkonsistenz der Studienergebnisse zu zirkulierenden miRNA scheint z. T. durch die mangelnde Vergleichbarkeit der eingesetzten Methodik begründet zu sein. Zusätzlich erschweren mehrere analytische Schritte wie bspw. Blutentnahme, miRNA-Isolation, cDNA-Synthese und RT-qPCR, welche zwischen den Studien nicht einheitlich durchgeführt wurden, die Vergleichbarkeit von Ergebnissen (D'Antona et al. 2019). Auch ungleiche Lagerungsbedingungen, eine unterschiedliche Ausbeute der RNA-Isolation oder die Ko-Isolation von PCR-Inhibitoren sowie hämolytische oder zellhaltige Proben können die Ergebnisse

verfälschen und die Vergleichbarkeit weiter einschränken (Blondal et al. 2013), (McDonald et al. 2011).

Eine alternative PCR-Methode, die in den letzten Jahren an Bedeutung gewann und welche eine Quantifizierung ohne Referenzgen ermöglicht, ist die droplet digital PCR (ddPCR). Hier erfolgt die Auftrennung einer Probe mit definiertem RNA-Gehalt in ca. 20.000 Tröpfchen. In jedem Tröpfchen läuft eine gesonderte PCR-Reaktion ab. Diese fällt positiv oder negativ aus, abhängig davon, ob die gesuchten Fragmente in einem Tröpfchen enthalten sind. Aus der Zahl der positiven und negativen Tröpfchen kann mittels Poisson-Regressionsanalyse die in einem Nanogramm RNA enthaltene Zahl an Kopien des Ausgangsprodukts berechnet werden (Bio-Rad Laboratories), (Pinheiro et al. 2012).

Die ddPCR hat das Potenzial, den Problemen der heterogenen Normierung von Plasma-miRNA in der RT-qPCR zu begegnen und eine Quantifizierung ohne Referenzgen zu ermöglichen.

Die ddPCR zeigte im Vgl. zur RT-qPCR eine niedrigere Variabilität bei vergleichbarer Sensitivität (Campomenosi et al. 2016), (Hindson et al. 2013). Andere Autoren fanden eine höhere Sensitivität und bessere Reproduzierbarkeit der Messergebnisse der ddPCR. Die ddPCR zeigte sich weniger anfällig für Störeinflüsse wie PCR-Inhibitoren, da sie im Vgl. zur RT-qPCR eine Endpunkt-PCR darstellt und die Menge des amplifizierten Produktes erst nach Abschluss der Amplifikation gemessen wird (Hindson et al. 2013). Da die ddPCR noch weniger verbreitet ist als die RT-qPCR, ist ihr Einsatz durch die neu notwendige Etablierung der Methode, Schulung des Personals und Beschaffung der notwendigen Geräte zu Beginn mit einem höheren Aufwand verbunden (Precazzini et al. 2021). Ist sie als Verfahren einmal etabliert, ist ein höherer Durchsatz bei vergleichbaren Kosten möglich (Campomenosi et al. 2016). Kritisch zu sehen ist der hohe Umsatz an Verbrauchsmaterial durch die ddPCR und der im Vgl. zur RT-qPCR höhere Zeitaufwand. Dennoch scheint sie geeignet, den Problemen, welche sich bei der Quantifizierung zirkulierender miRNA mittels RT-qPCR ergeben, zu begegnen und somit einen neuen Standard zur Detektion dieser vielversprechenden Biomarker zu etablieren.

2 Zielstellung

Das Lungenkarzinom weist als häufigstes bzw. zweithäufigstes Malignom bei Männern bzw. Frauen eine sehr hohe Mortalität auf. Um diese zu verbessern, gibt es Ansätze u. a. zu geeigneten Früherkennungsmethoden, verbessertem Therapiemonitoring oder neuen prognostischen Biomarkern. Ein möglicher Weg führt zu den minimalinvasiv erreichbaren miRNA im Plasma. Hier besteht das Problem der exakten und vergleichbaren Messbarkeit. Die bisher übliche Quantifizierung per RT-qPCR weist eine ungenügende Vergleichbarkeit auf. Vor diesem Hintergrund soll in der vorliegenden Arbeit die ddPCR für ausgewählte zirkulierende miRNA etabliert und deren Bedeutung in einem Kollektiv aus NSCLC-Patienten unter Strahlentherapie untersucht werden.

Folgende Fragestellungen sollen beantwortet werden:

1. Ist die ddPCR eine überlegene Messmethode im Vergleich zur RT-qPCR und wie geeignet ist die ddPCR im klinischen Alltag?
2. Ist die zirkulierende miR-16-5p als potenzielles Referenzgen für die RT-qPCR im Patientenkollektiv einsetzbar?
3. Wie sind die Plasma-Expressionslevel der miR-16-5p, -21-5p, -29a-3p, -144-3p, -150-5p und 155-5p in diesem Studienkollektiv und gibt es einen Zusammenhang der miRNA-Level untereinander?
4. Gibt es Veränderungen der Expressionslevel der miRNA im Plasma im Verlauf der Strahlentherapie?
5. Unterscheiden sich die Expressionslevel der miRNA zwischen Patienten mit NSCLC und gesunden Blutspendern?
6. Gibt es einen Zusammenhang zwischen den miRNA-Leveln im Plasma und klinischen Parametern der Patientenkohorte?
7. Gibt es einen prognostischen Zusammenhang der miRNA-Level im Patientenkollektiv mit dem Gesamtüberleben?
8. Besitzt die Kombination mehrerer miRNA eine prognostische Bedeutung in diesem Studienkollektiv?

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Acura 855 Mehrkanalpipette 5-50µl	Socorex (Ecublens, Schweiz)
Biofuge fresco	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Centrifuge 5415 D	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Centrifuge 5415 R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Eismaschine AF103	Scotsman (Mailand, Italien)
FastGene High Speed Minizentrifuge	Nippon Genetics Europe (Düren, Deutschland)
Kühlschrank -80 °C Ultra Low	Sanyo (Moriguchi, Japan)
Mikrofuge	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Mikrozentrifuge Mini Star silverline	VWR (Radnor, USA)
Multipipette Plus	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Nanodrop 2000c	ThermoFischer Scientific (Waltham, USA)
Pipet-Lite Multi Pipette L8-50XLS+, 5-50µl	Rainin (Gießen, Deutschland)
Pipetten 10;20;100;200;1000µl	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Pipetten 2,5: 20; 100; 200; 1000 µl	Gilson (Limburg, Deutschland)
Plate Holder	Bio-Rad (München, Deutschland)
PX1™ Plate Sealer	Bio-Rad (München, Deutschland)
QX200™ Droplet Generator	Bio-Rad (München, Deutschland)
QX200™ Droplet Reader	Bio-Rad (München, Deutschland)
Rotor-Gene 6000	Corbett Research (Sydney, Australien)
T1 Thermocycler	Biometra (Göttingen, Deutschland)
T100™ Thermocycler	Bio-Rad (München, Deutschland)
TG8™ Cartridge Holder	Bio-Rad (München, Deutschland)
Vortex-Genie 2	Scientific Industries (New York, USA)

3.1.2 Chemikalien und Reagenzien

DEPC-Wasser	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Ethanol	Fisher Chemical (Waltham, USA)
Isopropanol	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
QX200™ ddPCR™ EvaGreen Supermix	Bio-Rad (München, Deutschland)
QX200™ Droplet Generation Oil for EvaGreen	Bio-Rad (München, Deutschland)
Trockeneis	Linde AG (München)

3.1.3 Synthetische Oligonukleotide

Best.nr.	Bezeichnung	Hersteller	Sequenz
YP00205702	hsa-miR-16-5p	Qiagen (Hilden)	5'-UAGCAGCACGUAAAAUUGGCG-3'
YP00204230	hsa-miR-21-5p	Qiagen (Hilden)	5'-UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA-3'
YP00204698	hsa-miR-29a-3p	Qiagen (Hilden)	5'-UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA-3'
YP00204754	hsa-miR-144-3p	Qiagen (Hilden)	5-'UACAGUAUAGAUGAUGUACU-3'
YP00204660	hsa-miR-150-5p	Qiagen (Hilden)	5'-UCUCCCAACCCUUGUACCAGUG-3'
YP00204308	hsa-miR-155-5p	Qiagen (Hilden)	5'-UUAAUGCUAAUCGUGAUAGGGGU-3'
YP02119305	hsa-miR-451a	Qiagen (Hilden)	5'-AAACCGUUACCAUUACUGAGUU-3'
YP00203954	UniSp6	Qiagen (Hilden)	

3.1.4 Kits

miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
miRCURY LNA™ RT Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
miRCURY LNA™ SYBR Green PCR Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)

3.1.5 Verbrauchsmaterial

ddPCR™ 96-Well Plates	Bio-Rad (München, Deutschland)
Biosphere® Filter Tips 2-200µl	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Gefrierbehälter	Fisher Scientific (Waltham, USA)
Einmalhandschuhe Micro Touch Nitra Tex	Ansell (Richmond, Australien)
PCR Heat Seal Foil	Bio-Rad (München, Deutschland)
PCR-Reaktionsbehälter 0,5 ml, 1,5 ml	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
permanent Marker	Faber-Castell (Stein, Deutschland)
Pipettenspitzen „Safe Seal Tips“	Biozym (Hessisch Oldendorf)
Pipettenspitzen „Filter Tip“	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)
Pipette Tips in Green-Pak®200/250µl	Mettler-Toledo (Greifensee, Schweiz)
PCR 0,1 ml 4-Tube & 4-Cap Strips	Biozym (Hessisch Oldendorf)
Reaktionsbehälter 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
TG8™ Cartridges	Bio-Rad (München, Deutschland)
TG8™ Gaskets	Bio-Rad (München, Deutschland)

3.1.6 Software und Datenbanken

Microsoft Office	Microsoft (Redmond, USA)
QuantaSoft™ Software	Bio-Rad (München, Deutschland)
SPSS, Version 25	IBM (Armonk, USA)

3.1.7 Patientenkohorte

Die Rekrutierung der Patienten erfolgte von April 2017 bis September 2020 in der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie im Universitätsklinikum Halle. Patienten, die mit der Diagnose Nicht-Kleinzelliges Bronchialkarzinom zur Strahlentherapie kamen, wurden unter folgenden Einschlusskriterien aufgenommen:

1. Histologisch gesichertes NSCLC (Adeno- oder Plattenepithelkarzinom)
2. UICC-Stadium I, II, III oder IV
3. Alter \geq 18 Jahre
4. Indikation zur kurativen oder palliativen Radiotherapie oder Radiochemotherapie (3D-konformal oder stereotaktisch) des Primärtumors (mit/ohne Radiotherapie der Metastasen)
5. Vom Patienten unterschriebene Einwilligungserklärung

Ausschlusskriterien waren:

1. Vorherige Operation oder Entfernung des Primärtumors
2. Teilnahme an sich gegenseitig ausschließenden Studien
3. Malignom < 5 Jahre vor Diagnose des NSCLC
4. Nur palliativ intendierte Radiotherapie von Metastasen im Stadium UICC IV

Es wurden primär 200 Patienten rekrutiert, es erfolgte ein nachträglicher Ausschluss von 22 Patienten aufgrund im Nachhinein festgestellter Ausschlusskriterien, Abbruch der Radiotherapie bzw. auf Wunsch des Patienten.

Von 30 gesunden Blutspendern lag ebenfalls Material vor. Ein positives Ethikvotum durch das Ethikkomitee der medizinischen Fakultät mit der Bearbeitungsnummer 2017-15 lag zum Studienzeitraum für die durchgeführten Untersuchungen vor. Alle Teilnehmer wurden ausführlich über den Zweck und Ablauf der Untersuchung aufgeklärt und die Plasmaproben mit schriftlicher Einwilligung der Patienten gewonnen.

Die Kohorte bestand aus 178 Patienten, welche mit der Diagnose NSCLC eine Bestrahlung in der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie am Universitätsklinikum Halle erhielten. Die Zusammensetzung ist in der folgenden Tabelle dargestellt. Aufgrund von Rundungen weicht die Summe der Prozentwerte geringfügig von 100 % ab.

Tabelle 1. Patientencharakteristik

		Studienkollektiv (n = 178)
Geschlecht	w / m	53 (30 %) / 125 (70 %)
Alter [Jahre]	Median (Min.–Max.)	69 (45–91)
Histologie	Adeno-Ca.	75 (42 %)
	Plattenepithel-Ca.	68 (38 %)
	Andere	35 (20 %)
Grading	G1–G2	40 (22 %)
	G3–G4	51 (29 %)
	unbekannt	87 (49 %)
T-Stadium	T1–2	63 (35 %)
	T3–4	99 (56 %)
	unbekannt	16 (9 %)
N-Stadium	N0	48 (27 %)
	N1–3	113 (63 %)
	Nx	17 (10 %)
M-Stadium	M0	93 (52 %)
	M1	72 (40 %)
	Mx	13 (7 %)
UICC-Stadium	I	20 (11 %)
	II	14 (8 %)
	III	61 (34 %)
	IV	73 (41 %)
	unbekannt	10 (6 %)
GTV [ccm]	Median (Min.–Max.)	27,9 (1,5–1597,0)
Therapie-Ansatz	kurativ/ palliativ	104 (58 %) / 74 (42 %)
Konzept	STX/ normofraktioniert	52 (29 %) / 126 (71 %)
Karnofsky-Index	Median (Min.–Max.)	80 (50–100)
Immuntherapie	nein/ ja/ unbekannt	122/ 55/ 1
Chemotherapie	nein/ ja/ unbekannt	86/ 84/ 8

3.2 Methoden

3.2.1 Blutentnahmen und Plasmaisolation

Es erfolgten Blutentnahmen zu drei Zeitpunkten: vor der ersten Bestrahlung (T0), nach Bestrahlung mit 20 Gy (T1) und nach Abschluss der Radiotherapie (T2). Bei stereotaktisch bestrahlten Patienten erfolgten diese vor (T0) und nach der Radiatio (T2). Alle Blutproben wurden in der Ambulanz der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie oder auf der zugehörigen Station abgenommen und im Labor der Arbeitsgruppe Molekulare Strahlenbiologie (Laborleiter: Dr. M. Bache) im Universitätsklinikum Halle verarbeitet. Die gewonnenen Plasma- und Serumröhrchen wurden 30–60 min bei Raumtemperatur gelagert, bevor sie 10 min bei 4500 RPM

zentrifugiert wurden. Plasma und Serum wurden in Kryoröhrchen überführt bzw. aliquotiert und bei -80 °C kryokonserviert.

3.2.2 MiRNA-Isolation und cDNA-Synthese

Die Gesamt-miRNA wurde aus dem Plasma per miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit (Qiagen) laut Herstellerprotokoll aus 250 µl Plasma isoliert. Die Konzentration der gewonnenen miRNA wurde per Nanodrop 2000c an 2 µl über die Messung der Absorptionen bei 230 nm, 260 nm und 280 nm (A230, A260, A280) bestimmt. Als Indikator für die Qualität der gewonnenen miRNA wurde der Quotient der Absorptionen bei A260/A230 nm und A260/A280 nm genutzt (ThermoFisher Scientific 2010). Die miRNA wurde bei -80 °C kryokonserviert. Zur Bestimmung des Hb-Wertes wurden am Nanodrop 2000c an 2 µl Plasma die Absorptionen bei 415 nm, 380 nm, 450 nm und 260 nm gemessen (A415, A380, A450, A260). Bestimmt wurde das freie Hämoglobin nach der 3-Wellenlängen-Methode nach Harboe nach folgender Formel: $Hb [g/L] = (167,2 \cdot A_{415} - 83,6 \cdot A_{380} - 83,6 \cdot A_{450}) \cdot 0,01017$.

Mittels reverser Transkription erfolgte das Umschreiben der miRNA in cDNA mit dem miRCURY LNA RT Kit (Qiagen) mit folgendem Reaktionsansatz:

miRNA	10 ng (Volumen X)
DEPC-Wasser	6,5 µl - X
Reaktionspuffer	2 µl
Enzym-Mix	1 µl
Spike-In	0,5 µl
Gesamtvolumen	10 µl

Das Volumen X wurde nach folgender Formel berechnet: $X [\mu l] = 10 [ng] / miRNA\text{-Konzentration} [ng / \mu l]$. Bis auf den Enzym-Mix wurden alle Bestandteile gevortext. Alle Komponenten wurden auf Eis gelagert und vor Verwendung herunterzentrifugiert. Für etwa die Hälfte der Proben lag schon cDNA vor. Hier erfolgte im Nachhinein die Verdünnung der cDNA entsprechend der gemessenen miRNA-Konzentration auf 1 ng/ µl. Diese war mit folgendem Ansatz umgeschrieben worden:

miRNA	6,5 µl
Reaktionspuffer	2 µl
Enzym-Mix	1 µl
Spike-In	0,5 µl
Gesamtvolumen	10 µl

Alle Proben wurden in 0,5 ml PCR-Tubes für 60 min bei 42 °C im T1 Thermocycler (Biometra) inkubiert und anschließend bei -80 °C gelagert. Die Effektivität der cDNA-Synthese jeder Probe

wurde über die Messung des RNA-Spike-Ins, welcher beim Umschreiben zugesetzt wurde, mittels RT-qPCR überprüft.

3.2.3 RT-qPCR

Zur Vorbereitung der RT-qPCR erfolgte das Lösen der UniSp6-Primer bzw. der miRNA-Primer in 80 µl bzw. 220 µl Nuklease-freiem Wasser. Die gewonnene Lösung wurde gevortext, herunterzentrifugiert, 30 min auf Eis inkubiert und anschließend aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Es wurde eine Verdünnung der cDNA im Verhältnis von 1:30 mit DEPC-Wasser hergestellt. Folgender Ansatz wurde verwendet:

SYBR-Green™	5 µl
PCR-Primer	1 µl
cDNA, 1:30 verdünnt	4 µl
Reaktionsansatz	10 µl

In einer 72-Well-PCR-Platte wurden die Komponenten zueinander gegeben. Die Amplifizierung und Fluoreszenzmessung erfolgten im Rotor-Gene 6000 (Corbett Research) nach folgendem Protokoll:

Schritt	Temperatur	Dauer
Hold	95 °C	10 min
Cycling 40 x	95 °C	10 sec
	60 °C	60 sec
Pre-Melt	55 °C	90 sec
Melt	55–99 °C	5 sec/ 1 °C

3.2.4 Droplet digital PCR

In den aktuellen Versuchen wurde die cDNA so verdünnt, dass zwischen 10–1.000 positive Tröpfchen je Well gemessen wurden, da bei ca. 100 positiven Tröpfchen die genaueste Messung in der ddPCR möglich ist. Die optimale Verdünnung wurde für jede miRNA mithilfe einer Verdünnungsreihe ermittelt. Für die Optimierung der Annealingtemperatur und der Verdünnung jeder miRNA wurden Testversuche durchgeführt. Eine Erhöhung der Annealingtemperatur steigert die Spezifität der Primer, jedoch sinkt die Ausbeute am gewünschten PCR-Produkt, indessen werden bei niedrigen Temperaturen zunehmend unspezifische Zwischenprodukte vervielfältigt. Die besten Ergebnisse wurden bei einer Annealingtemperatur von 58 °C und einer Verdünnung von 1:25 für die miR-29a-3p und die miR 150-5p, 1:100 für die miR-144-3p und 1:250 für die miR-16-5p ermittelt. Da die gemessene Konzentration der miRNA in Kopien/ng RNA angegeben wird, ist es von Bedeutung, dass die Konzentration der eingesetzten cDNA bei 1 ng/µl liegt. Über die Kenntnis der vorliegenden

Verdünnung kann hierdurch die Konzentration je Nanogramm RNA ermittelt werden. Die zu messenden Proben wurden am Vortag verdünnt und dann über Nacht bei -80 °C gelagert. Am Folgetag fand die Messung per ddPCR im PCR-Labor des Julius-Bernstein-Instituts für Physiologie der medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg statt (Ansprechpartner: Prof. Dr. O. Thews, Frau S. Reime).

Zur Vorbereitung wurden alle Komponenten auf Raumtemperatur erwärmt, > 10 sec gevortext und anschließend herunterzentrifugiert. Ein Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

QX200™ ddPCR EvaGreen	11 µl
Primer	1,1 µl
verdünnte cDNA	9,9 µl
Reaktionsansatz	22 µl

Die Komponenten wurden in PCR-Streifen pipettiert, herunterzentrifugiert und für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. 20 µl wurden in den Sample-Streifen eines Cartridges überführt und je 70 µl Droplet Generation Oil in die dafür vorgesehenen Streifen. Die Cartridges wurden mit einem Gasket abgedeckt und im Droplet Generator (Bio-Rad) wurden daraufhin Tröpfchen erzeugt, die als Volumen von 40 µl per 8-Kanal-Pipette in eine 96-Well-PCR-Platte überführt wurden. Nach jeder überführten Reihe wurde diese zunächst mit einem Klebestreifen überklebt, da das verwendete Öl flüchtig ist. Nach Transfektion aller Proben in die PCR-Platte wurden die Wells mit einer BioRad Piercable Foil Heat Seal im PX1 PCR Plate Sealer (Bio-Rad) verschlossen. Im T100 Thermal Cycler (BioRad) lief die PCR-Reaktion nach folgendem Protokoll ab:

Schritt	Dauer	Temperatur	Funktion
1. Schritt (1 x)	5 min	95 °C	Polymerase-Aktivierung, Denaturierung der cDNA
2. Schritt (40 x)	30 sec	95 °C	Denaturierung der cDNA
	1 min	58 °C	Annealing der Primer, Amplifikation
3. Schritt (1 x)	5 min	4 °C	Stabilisierung des Färbemittels
4. Schritt (1 x)	5 min	90 °C	Stabilisierung des Färbemittels
5. Schritt	∞	4 °C	Infinite Hold

Die Veränderungsrate der Temperatur war auf 1,6 °C/sec eingestellt. Nach Abschluss der PCR-Reaktion erfolgte die Messung der positiven und negativen Tröpfchen im QX200™ Droplet Reader (Bio-Rad). Hierfür wurde die verschlossene Platte in den Plate Holder eingesetzt und in das Zählgerät überführt. Die Zählung wurde durch das Programm QuantaSoft™ gesteuert. Das Ergebnis der Messung konnte der Software entnommen werden. Der Grenzwert zwischen negativen und positiven Tröpfchen wurde durch die Software für jeweils alle Wells einer miRNA festgelegt. Die in QuantaSoft™ gemessenen Werte wurden in das Programm Excel (Microsoft Office) überführt und analysiert. Als Grundlage galt der aus der in QuantaSoft™ als

Concentration bezeichneten Menge positiver Tröpfchen berechnete Wert der Kopien je Nanogramm RNA. Hierbei wurde folgende Formel verwendet:

$$\frac{\text{Kopien}}{\text{ng RNA}} = \text{Konzentration} \left[\frac{\text{Kopien}}{\mu\text{l}} \right] * 2,222 * \text{Verdünnungsfaktor} * 1 \left[\frac{\mu\text{l}}{\text{ng RNA}} \right]$$

Durch die mitgeführten Kontrollproben wurde eine vergleichbare Effektivität der ddPCR gewährleistet bzw. durch unauffällige Negativkontrollen konnte eine Verunreinigung des Mastermixes ausgeschlossen werden. Spike-In-Kontrollen sicherten die erfolgreiche cDNA-Synthese und den Ausschluss der Ko-Isolation von PCR-Inhibitoren.

3.2.5 Statistische Auswertung

Nach experimenteller Ermittlung aller Messwerte wurden Verteilungs- und Korrelationsanalysen mit dem Programm SPSS, Version 25 (IBM) und in Excel (Microsoft Office) durchgeführt. Im Kolmogorov-Smirnov- und im Shapiro-Wilk-Test wurde keine Normalverteilung der gemessenen miRNA-, Konzentrations- und Hb-Werte festgestellt. Daher kamen nicht parametrische statistische Tests zum Einsatz. Für Mittelwertvergleiche zwischen zwei unabhängigen Stichproben fand der Mann-Whitney-U-Test Verwendung, für > 2 Stichproben der Kruskal-Wallis-Test. Bivariate Korrelationsanalysen wurden nach Spearman-Rho durchgeführt. Für Analysen verbundener Stichproben kam der Wilcoxon-Test zum Einsatz. Für Überlebensanalysen kamen Kaplan-Meier-Kurven und Log-Rank-Test sowie die uni- und multivariable Cox-Regression zum Einsatz. Für die Überlebensanalysen wurden die am Median dichotomisierten miRNA-Level eingesetzt.

Vor Studienbeginn war eine Fallzahlschätzung gemäß dem Verfahren von Hsieh und Lavori erfolgt (Hsieh und Lavori 2000). Hierbei angenommen wurden eine Power von 80 %, ein Signifikanzniveau von 5 %, eine Varianz der Exposition von 0,25 nach logarithmischer Transformation, ein klinisch relevanter Effekt von HR = 2,3 bezogen auf Änderung (Abnahme) des Ct um eine Einheit, Überleben von 20 % der Studienpopulation und Korrelation von $r = 0,7$ zwischen zwei Parametern. Diese ergab eine Mindestzahl von 127 Patienten für eine nicht-stratifizierte Auswertung (siehe Studienprotokoll). Der primäre Endpunkt war hierbei das Gesamtüberleben der Patienten ab Beginn der Bestrahlung bis zum Versterben bzw. letzten Kontakt in der Nachverfolgung. Diese Patientenzahl wurde innerhalb der Studie erreicht, daher können für nicht-stratifizierte Berechnungen über den primären Endpunkt Aussagen über die statistische Signifikanz getroffen werden. Ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet. Für andere Auswertungen nicht den primären Endpunkt betreffend erfolgte anhand des p-Wertes eine Einschätzung ob ein relevanter bzw. bedeutender Effekt vorliegt.

4 Ergebnisse

4.1 Etablierung der ddPCR

Zu Beginn wurde die Auftrennung der Banden positiver und negativer Tröpfchen sowie die optimale Verdünnung für die zu untersuchenden miRNA ermittelt. Während sich die Banden positiver und negativer Tröpfchen der miR-16-5p, miR-29a-3p, miR-144-3p und -150-5p sehr gut auftrennen ließen, war eine Messung der miR-21-5p aufgrund einer unzureichenden Auftrennung der Banden positiver und negativer Tröpfchen auch nach Testung verschiedener Verdünnungen und Annealing-Temperaturen nicht möglich. Die Analyse der miR-155-5p war aufgrund niedriger Expressionslevel nicht durchführbar. Zu sehen sind repräsentative Messungen der miR-150-5p, -155-5p und -21-5p mittels ddPCR (Abbildungen 6–8) verschiedener Patientenproben. Es zeigt sich die deutliche Auftrennung positiver und negativer Tröpfchen in der Messung der miR-150-5p im Vgl. zu den niedrigen Leveln der miR-155-5p und der schlechten Auftrennung der Tröpfchen in der miR-21-5p.

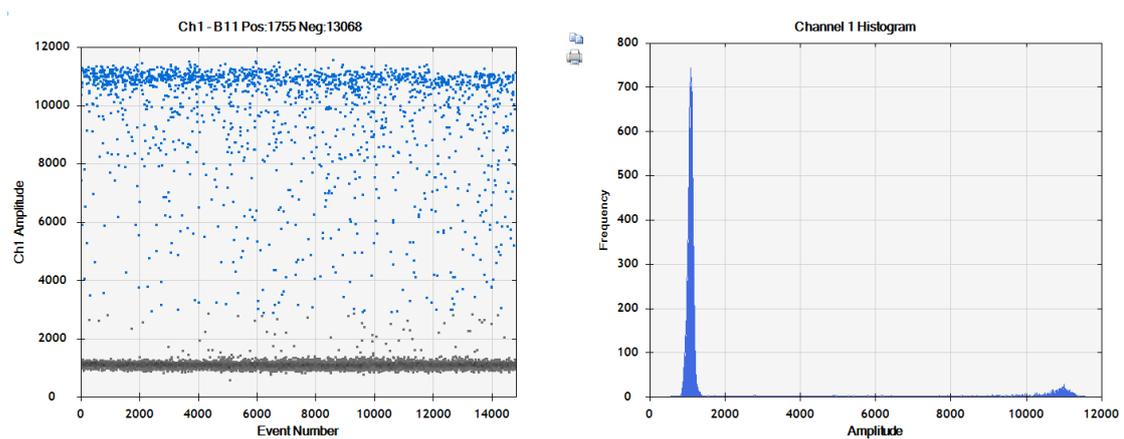


Abbildung 6. miR-150-5p, Verdünnung 1:25, exemplarisch für Spender 1

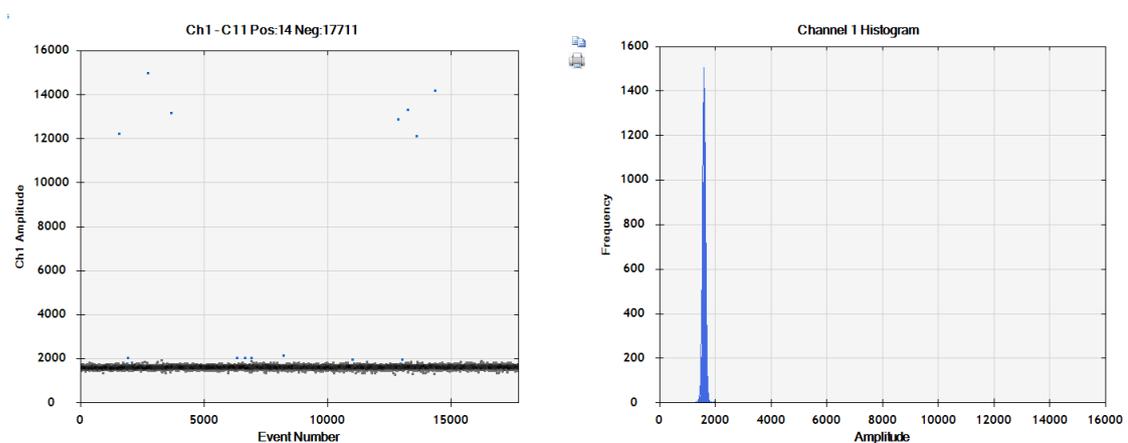


Abbildung 7. miR-155-5p, Verdünnung 1:25, exemplarisch für Spender 2

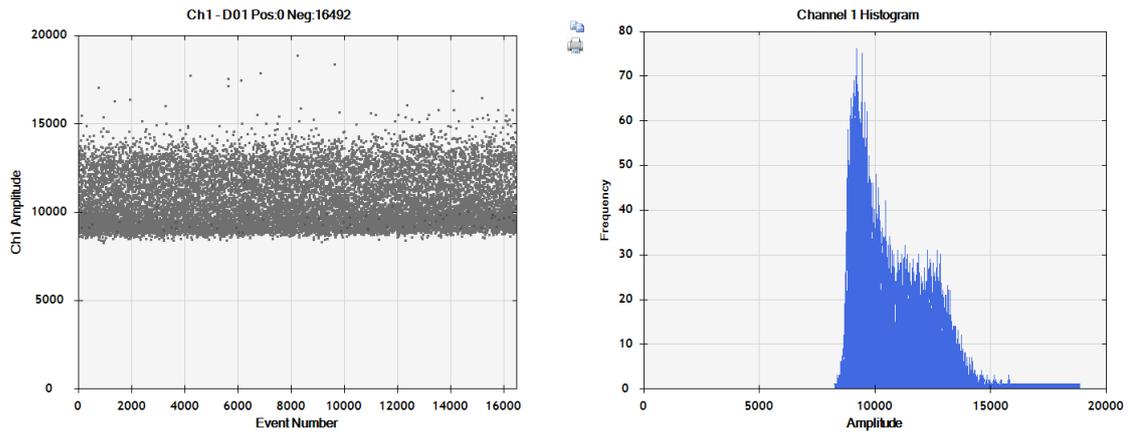


Abbildung 8. miR-21-5p, Verdünnung 1:1000, exemplarisch für Spender 3

Um die optimale Verdünnungsstufe zu ermitteln, wurde in sechs Verdünnungsschritten von 1:25 bis 1:5000 gemessen. Es zeigte sich ein linearer Zusammenhang zwischen der Höhe der Verdünnung und der mittels ddPCR bestimmten Konzentration mit R^2 -Werten von $> 0,99$ für die miR-16-5p in drei von vier untersuchten Proben. Dieser Zusammenhang unterstreicht die Validität der Messergebnisse der miR-16-5p im eingesetzten Konzentrationsbereich. Ab Verdünnungen von 1:1000 waren größere Abweichungen zu beobachten, daher wurde eine Verdünnung von 1:250 für die Messung der miR-16-5p eingesetzt. Analog wurde für die miR-29a-3p und -150-5p eine optimale Verdünnung mit 1:25 und für die miR-144-3p mit 1:100 ermittelt. In der folgenden Abbildung ist der Zusammenhang zwischen Verdünnungsgrad und per ddPCR ermittelter Konzentration exemplarisch für die miR-16-5p für Spender 4 dargestellt.

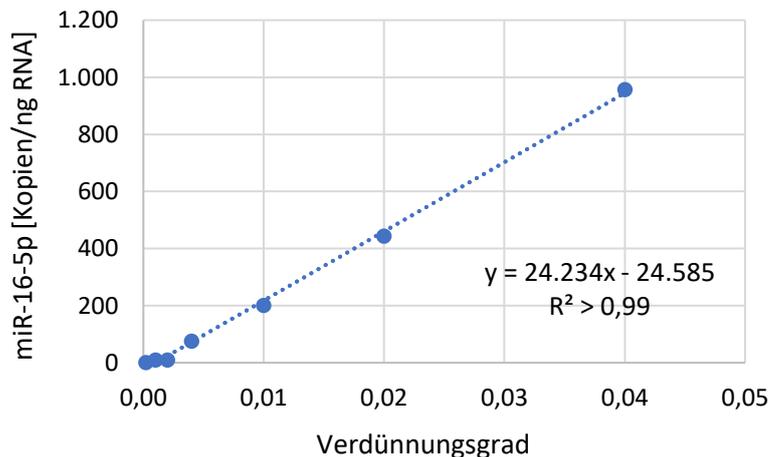


Abbildung 9. Zusammenhang zwischen Verdünnungsgrad und per ddPCR ermittelter Konzentration

Der Vergleich der Expressionslevel der vier untersuchten miRNA zeigte die höchsten Expressionslevel für die miR-16-5p mit dem ca. 18-fachen der miR-29a-3p, 3-fachen der miR-144-3p und 22-fachen der miR-150-5p. Die medianen Expressionslevel der vier miRNA sind in der folgenden Abbildung dargestellt.

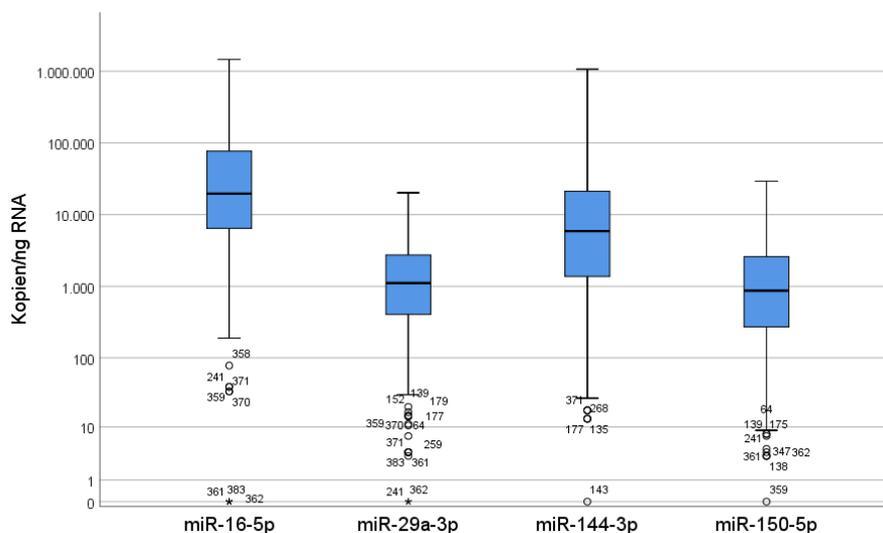


Abbildung 10. mediane Expressionslevel der gemessenen miRNA in Kopien/ng RNA (n = 455)

Die miR-16-5p wies hierbei im Patientenkollektiv ein medianes Expressionslevel von 19.609 Kopien/ng RNA auf, die miR-29a-3p von 1111 Kopien/ng RNA, die miR-144-3p von 5888 Kopien/ng RNA und die miR-150-5p von 872 Kopien/ng RNA.

Der Vergleich von RT-qPCR und ddPCR erfolgte an 30 Proben. Dabei zeigte sich ein exponentieller Zusammenhang zwischen den per ddPCR ermittelten Kopien/ng RNA und den in der RT-qPCR bestimmten Ct-Werten. Folgende Tabelle gibt die Exponentialfunktion zwischen beiden Werten sowie deren R^2 -Wert und die zugehörigen p-Werte an.

Tabelle 2. Zusammenhang zw. RT-qPCR und ddPCR

	miR-16-5p	miR-29a-3p	miR-144-3p	miR-150-5p
f(Kopien/ng RNA): Ct	$y = 3E+09e^{-0,549x}$	$y = 5E+10e^{-0,638x}$	$y = 2E+09e^{-0,491x}$	$y = 7E+10e^{-0,653x}$
R^2 -Wert	0,73	0,93	0,78	0,96
p-Wert	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001

Die miR-29a-3p und -150-5p wiesen hierbei R^2 -Werte $\geq 0,93$ auf ($p < 0,001$). Diese Korrelation spricht für eine hohe Reproduzierbarkeit der gemessenen Werte und unterstreicht die Validität beider Messmethoden. Für die miR-16-5p und -144-3p waren die R^2 -Werte mit 0,73 bzw. 0,78 ($p < 0,001$) deutlich niedriger. Dies weist auf die Notwendigkeit einer Normierung der Messwerte der RT-qPCR mittels Referenzgen hin. Beispielhaft ist in Abbildung 11 der Zusammenhang zwischen beiden PCR-Methoden für die miR-150-5p dargestellt.

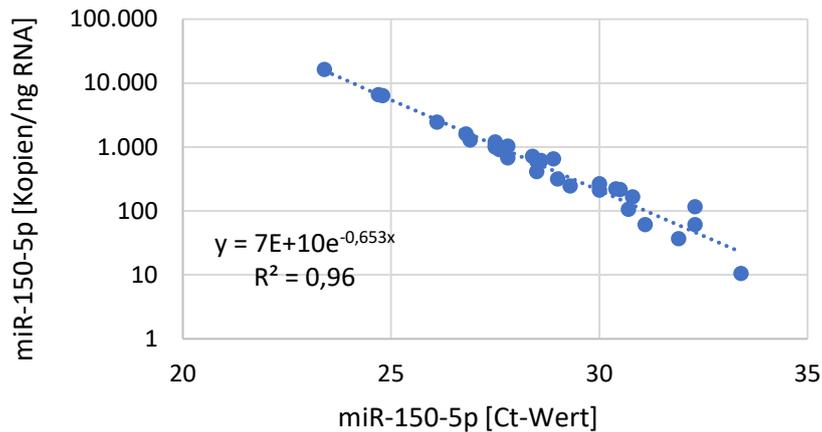


Abbildung 11. Korrelation ddPCR und RT-qPCR am Bsp. der miR-150-5p

In jedem Ansatz wurden zwei Vergleichskontrollen sowie eine Negativkontrolle mitgeführt. Die Schwankungen der Kontrollproben für die miR-29a-3p, -144-3p und -150-5p wiesen eine Standardabweichung von 11–23 % des Mittelwerts auf. Für die miR-16-5p ergab sich eine deutlich höhere Standardabweichung von 55 % bzw. 78 % des Mittelwerts.

Um Unspezifitäten auszuschließen, wurden die PCR-Produkte in ein Plasmid kloniert und anschließend sequenziert. Dabei wurden die Sequenzen der einzelnen miRNA spezifisch nachgewiesen.

Die Beziehung der miRNA-Level untereinander wurde nach Spearman-Rho untersucht. In dieser Arbeit wurden Korrelationskoeffizienten von $r_s \geq 0,9$ als sehr stark, von $r_s = 0,9–0,7$ als stark, von $r_s = 0,4–0,7$ als moderat, von $r_s = 0,1–0,4$ als schwach und von $r_s < 0,1$ als unwesentlich bewertet (Schober et al. 2018).

Mit einem Korrelationskoeffizienten von $r_s \geq 0,8$ wiesen die vier gemessenen miRNA untereinander eine starke bis sehr starke Korrelation auf. Der stärkste Zusammenhang innerhalb der untersuchten miRNA bestand zwischen den miR-29a-3p und -150-5p ($r_s = 0,900$) und der geringste Zusammenhang lag zwischen den miR-144-3p und -150-5p vor ($r_s = 0,794$). Folgende Tabelle gibt die Korrelationskoeffizienten innerhalb der untersuchten miRNA an.

Tabelle 3. Korrelation der miRNA nach Spearman-Rho (n = 455)

		miR-29a-3p	miR-144-3p	miR-150-5p
miR-16-5p	r_s	0,826	0,832	0,808
	p-Wert	< 0,001	< 0,001	< 0,001
miR-29a-3p	r_s		0,850	0,900
	p-Wert		< 0,001	< 0,001
miR-144-3p	r_s			0,794
	p-Wert			< 0,001

Der Zusammenhang zwischen miR-29a-3p und -150-5p ist in Abbildung 12 grafisch als Streudiagramm dargestellt und zeigt die Abhängigkeit beider Expressionslevel voneinander.

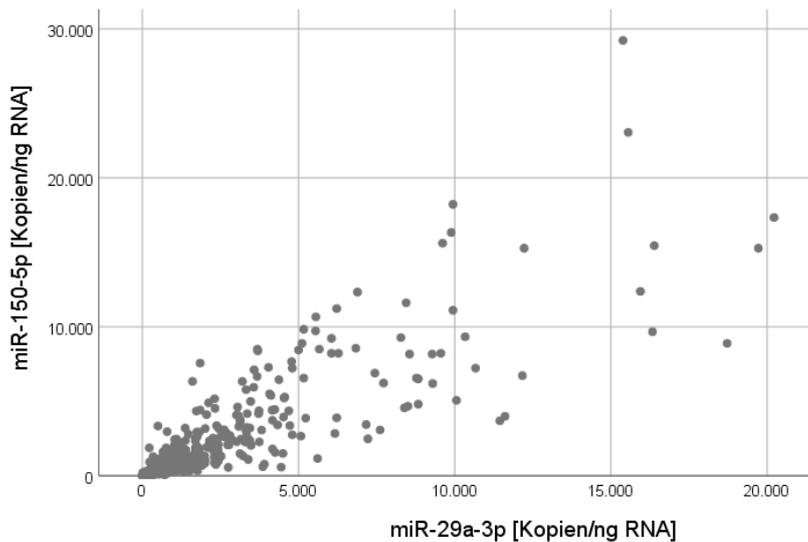


Abbildung 12. Streudiagramm der Expressionslevel von miR-29a-3p und -150-5p

Zusammenfassend wurden als erster Schritt der Etablierung der neuen PCR-Methode die optimalen Versuchsbedingungen für die ddPCR ermittelt. Es zeigte sich, dass die miR-21-5p und -155-5p nicht valide messbar waren. Für die anderen vier miRNA wurde die entsprechende Verdünnungsstufe ermittelt. Die miR-16-5p wies im Vergleich die höchsten Expressionslevel der vier untersuchten miRNA auf. Im Vgl. mit der RT-qPCR ergab sich ein starker Zusammenhang beider Messmethoden, insbesondere für die miR-29a-3p und -150-5p. Auch untereinander wiesen die vier untersuchten miRNA starke bis sehr starke Korrelationen auf.

4.2 Einflussfaktoren – Hb-Wert, miRNA-Gesamtkonzentration und Lagerungsdauer

Der Einfluss des Hb-Werts im Plasma, der miRNA-Gesamtkonzentration der aus dem Patientenplasma isolierten Probe und der Lagerungsdauer wurde durch den Korrelationskoeffizienten nach Spearman-Rho quantifiziert. Der Hb-Wert der Studienproben lag zwischen 0,0001 und 1,08 g/l mit einem medianen Hb-Wert von 0,027 g/l. Stark hämolytische Proben mit einem Hb-Wert > 1 g/L waren in der vorliegenden Studie von den Untersuchungen ausgeschlossen worden und 98 % aller Proben wiesen einen Hb-Wert von Hb < 0,25 g/L auf. Auf die untersuchten miRNA war ein schwacher Effekt des Hb-Werts der Proben zu beobachten. Die miRNA-Gesamtkonzentration lag zwischen 0,6 und 101,3 ng/μl mit einem medianen Wert von 8,0 ng/μl. Für die miRNA-Gesamtkonzentration der Proben zeigte sich für alle vier miRNA ebenfalls ein schwacher Zusammenhang mit den gemessenen miRNA-Leveln. Die Lagerungsdauer der Proben betrug zwischen 32 und 1234 Tagen mit einer medianen Lagerungsdauer von 603 Tagen. Für die Lagerungsdauer ergab sich eine schwache Korrelation

mit den Expressionsleveln der miR-16-5p, -29a-3p und -150-5p und ein moderater Zusammenhang zu denen der miR-144-3p. Es zeigten sich besonders innerhalb der Proben mit einer Lagerungsdauer > 590 Tage geringere miRNA-Level. An diesen Proben waren bereits Analysen erfolgt, sodass sie bereits aufgetaut worden waren. Dies lässt schlussfolgern, dass durch Lagerung und Auftauen der Proben ein Abbau der miRNA erfolgte.

Um einen Einfluss von Hb-Wert, miRNA-Gesamtkonzentration und Lagerungsdauer auf die Überlebensanalysen ausschließen zu können, wurden die Faktoren als unabhängige Variablen in der multivariablen Regressionsanalyse berücksichtigt. Folgende Tabelle zeigt die Korrelation nach Spearman-Rho zwischen Hb-Wert, miRNA-Gesamtkonzentration und Lagerungsdauer mit den miRNA-Leveln.

Tabelle 4. Korrelation zw. miRNA-Expressionsleveln und Einflussfaktoren (n = 455)

		miR-16-5p	miR-29a-3p	miR-144-3p	miR-150-5p
Hb-Wert	r_s	0,247	0,102	0,257	0,107
	p-Wert	< 0,001	0,030	< 0,001	0,022
miRNA-Konzentration	r_s	-0,241	-0,233	-0,262	-0,252
	p-Wert	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Lagerungsdauer	r_s	-0,335	-0,322	-0,449	-0,284
	p-Wert	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001

Insgesamt zeigte sich ein schwacher Effekt der Einflussfaktoren auf die miRNA-Expressionslevel. Ausschließlich auf die miR-144-3p zeigte sich ein moderater Effekt der Lagerungsdauer der Proben.

Da die miR-144-3p den drei untersuchten Einflussfaktoren am stärksten unterworfen war, sind exemplarisch die Level dieser miRNA in Abhängigkeit des Hb-Werts, der miRNA-Gesamtkonzentration und der Lagerungsdauer dargestellt (Abbildung 13–15).

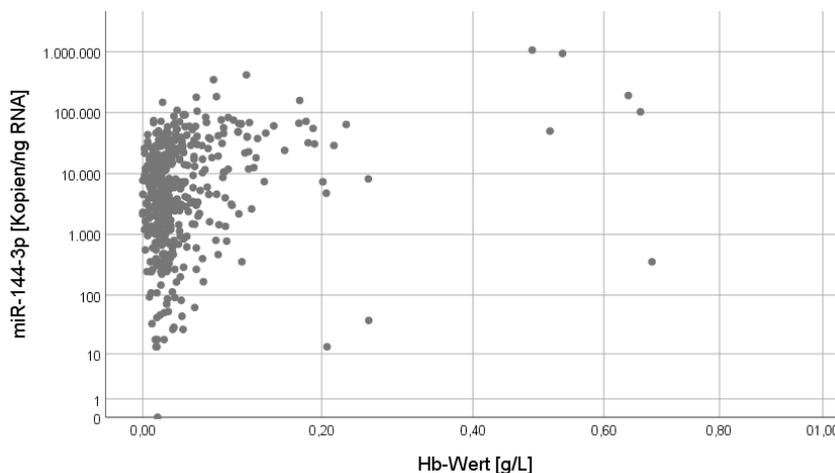


Abbildung 13. Level der miR-144-3p in Abh. des Hb-Werts [g/l]

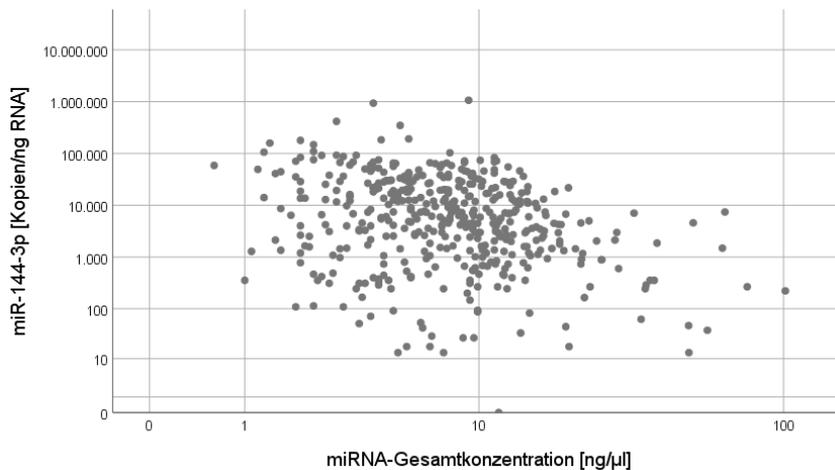


Abbildung 14. Level der miR-144-3p in Abh. der miRNA-Gesamtkonzentration [ng/μl]

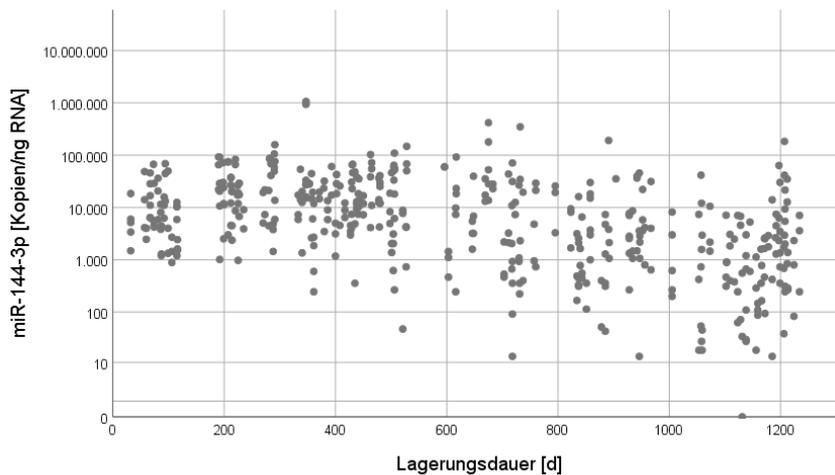


Abbildung 15. Level der miR-144-3p in Abh. der Lagerungsdauer [d]

4.3 Bewertung der miR-16-5p als potenzielle Referenz-miRNA für die RT-qPCR

Aufgrund der häufigen Verwendung der miR-16-5p als Referenzgen für zirkulierende miRNA in der RT-qPCR wurde die Werteverteilung der miR-16-5p genauer analysiert. Die Streuungsmaße der miR-16-5p in den untersuchten Patientenproben sind in der folgenden Tabelle dargestellt:

Tabelle 5. Lagemaße der miR-16-5p (n = 455)

	Kollektiv
Mittelwert [Kopien/ng RNA]	71.673
Median [Kopien/ng RNA]	19.609
Minimum [Kopien/ng RNA]	0
Maximum [Kopien/ng RNA]	1.460.965
Standardabweichung/Mittelwert [%]	211
Standardfehler des Mittelwerts/Mittelwert [%]	10

Es zeigte sich eine Standardabweichung von 211 % vom Mittelwert. Einzelne Patientenproben weisen besonders hohe Expressionslevel vom 20-fachen des Mittelwerts bzw. sehr geringe Level nahe der Nachweisgrenze auf. Die Schwankungen der miRNA-Expressionslevel der NSCLC-Patientenkohorte sind für die miR-16-5p insgesamt als hoch zu bewerten. Abbildung 16 zeigt die Werteverteilung der miR-16-5p im Studienkollektiv.

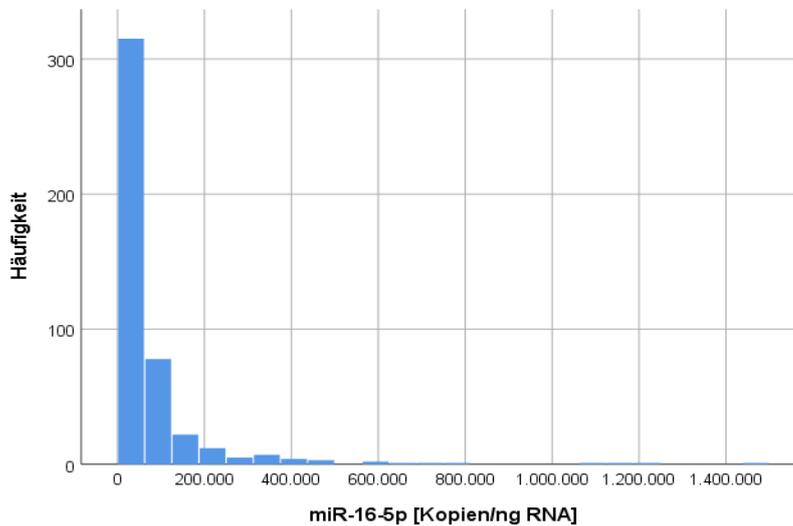


Abbildung 16. Histogramm der Verteilung der miR-16-5p

Aufgrund der starken Schwankungen der Werte der miR-16-5p sowie der starken Korrelationen der miRNA untereinander ($r_s \geq 0,8$) ist die miR-16-5p nicht als geeignetes Referenzgen für die RT-qPCR in diesem Kollektiv zu betrachten.

4.4 Vergleich von Patientenproben und Blutspendern

Es erfolgte ein Vergleich der Blutspender mit den NSCLC-Patientenproben vor Bestrahlung. Zwischen Blutspendern und Patienten zeigten sich Unterschiede im Mann-Whitney-U-Test. Im Gesamtvergleich aller Patienten vor Bestrahlung ($n = 178$) und der Blutspender ($n = 30$) zeigten sich relevante Unterschiede in den Expressionsleveln der miR-16-5p ($p = 0,001$), -144-3p ($p < 0,001$) und -150-5p ($p < 0,001$). Die Patientenproben wiesen hierbei höhere Expressionslevel auf. Für die miR-29a-3p zeigte sich kein bedeutender Unterschied ($p = 0,143$). Da eine inverse Korrelation der miRNA-Expressionslevel mit der Lagerungsdauer der Proben vorlag (s. Tabelle 4, Abbildung 15), wurde ein getrennter Vergleich der älteren (Lagerungsdauer > 590 Tage) und bereits für andere Untersuchungen aufgetauten Patientenproben (NSCLC-1) mit jüngeren (Lagerungsdauer < 590 Tage) bisher nicht untersuchten Patientenproben (NSCLC-2) und den Blutspendern durchgeführt. Die Proben der Blutspender waren langfristig gelagert und für andere Analysen aufgetaut worden. Zwischen der Gruppe NSCLC-1 ($n = 86$) und den Blutspendern ($n = 30$) ergab sich für keine der untersuchten

miRNA ein relevanter Unterschied. Die Gruppe NSCLC-2 (n = 92) wies jedoch im Vgl. mit Blutspendern aber auch mit NSCLC-1 bedeutend höhere Expressionslevel aller vier untersuchten miRNA ($p < 0,001$) auf. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass unterschiedliche Expressionslevel der untersuchten miRNA zwischen NSCLC-Patienten (gesamte Gruppe) und Blutspendern nicht durch tumorentitätsspezifische Merkmale begründet werden können, sondern möglicherweise auf präanalytische Einflussfaktoren zurückgeführt werden müssen. Diese Verteilung ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

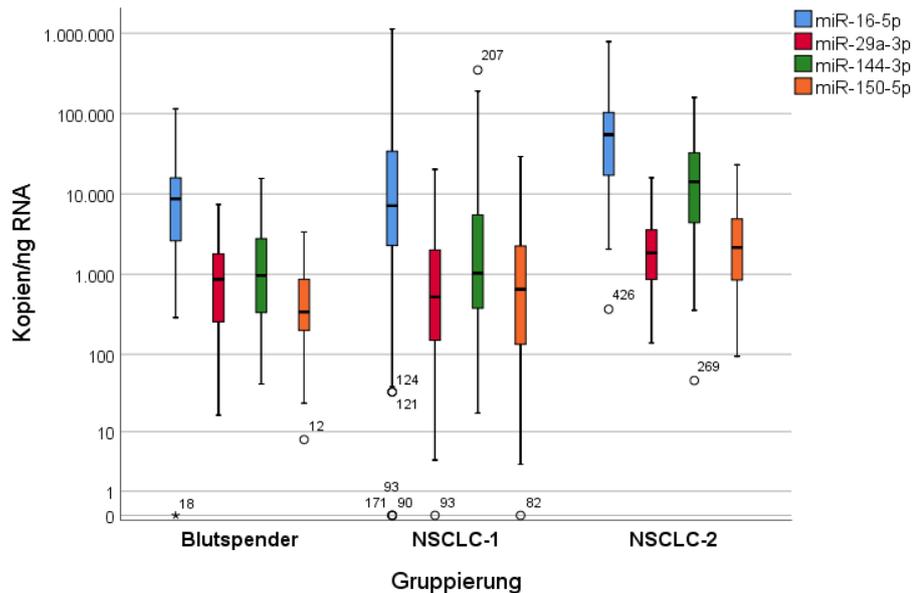


Abbildung 17. Vgl. der Expressionslevel zw. Blutspendern, NSCLC-1 und NSCLC-2

4.5 Korrelationen der miRNA-Expressionslevel zu klinischen Parametern

Der Zusammenhang zwischen klinischen Parametern und den miRNA-Expressionsleveln wurde mittels Mann-Whitney-U-Test, der Korrelation nach Spearman-Rho sowie mittels Kruskal-Wallis-Test untersucht. Es erfolgte eine Analyse des Zusammenhangs zwischen den miRNA-Expressionsleveln mit Alter, Geschlecht und UICC-Stadium der Patienten.

Prätherapeutisch (T0) ergaben sich keine Unterschiede der Expressionslevel zwischen Männern (n = 125) und Frauen (n = 53). Nach Bestrahlung mit 20 Gy (T1) wiesen männliche Patienten (n = 88) im Vgl. zu weiblichen Patienten (n = 42) höhere Expressionslevel der miR-29a-3p ($p = 0,032$) auf. Die miR-16-5p, -144-3p und 150-5p zeigten zu diesem Zeitpunkt keine Expressionsunterschiede. Nach Ende der Bestrahlung (T2) ergab sich ebenfalls kein Unterschied der vier untersuchten miRNA zwischen Männern und Frauen.

Zwischen dem Alter des Patienten und den miRNA-Expressionsleveln ergab sich zu keinem Messzeitpunkt eine relevante Korrelation nach Spearman-Rho.

Mittels Kruskal-Wallis-Test wurden die Expressionslevel zwischen den UICC-Stadien I–IV verglichen. Vor der Bestrahlung (T0) sowie nach Bestrahlung mit 20 Gy (T1) ergaben sich keine Unterschiede für alle vier miRNA. Nach Ende der Bestrahlung (T2) zeigten sich Unterschiede in den Expressionsleveln der miR-29a-3p ($p = 0,010$), miR-144-3p ($p = 0,030$) und der miR-150-5p ($p = 0,005$). Patienten mit fortgeschrittenem UICC-Stadium wiesen hierbei niedrigere Expressionslevel auf. Für die miR-16-5p ergaben sich keine Unterschiede nach Ende der Bestrahlung. In Abbildung 18 ist die Verteilung der miR-29a-3p, -144-3p und -150-5p über die UICC-Stadien I–IV nach Ende der Bestrahlung (T2) dargestellt.

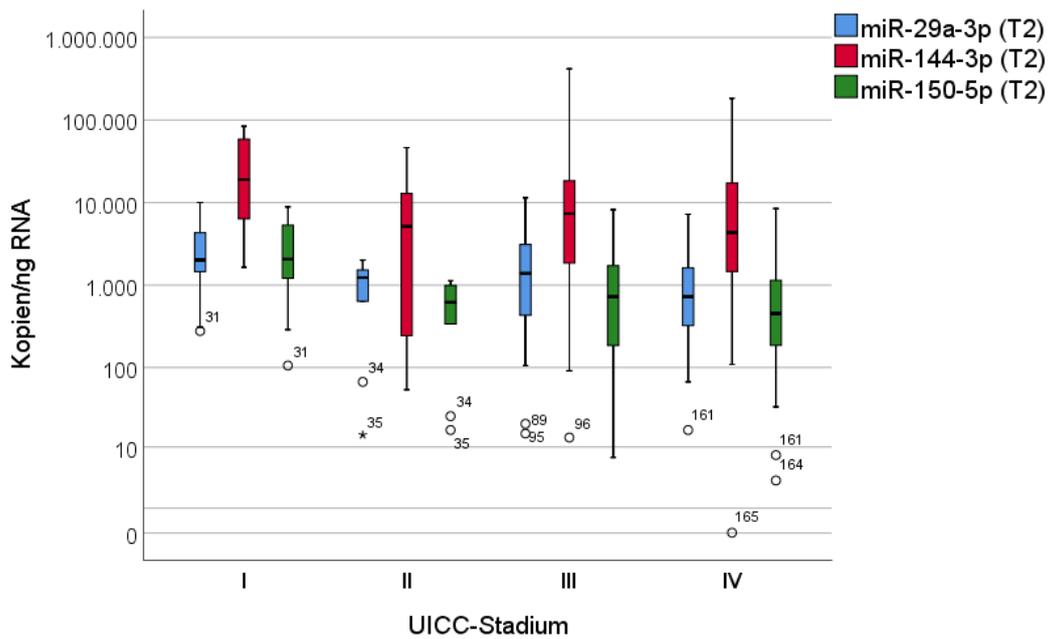


Abbildung 18. Verteilung der miR-29a-3p und -150-5p über die UICC-Stadien nach Ende der Bestrahlung

Die Häufigkeitsverteilung der UICC-Stadien zu den Messzeitpunkten ist in Tabelle 6 wiedergegeben:

Tabelle 6. Häufigkeitsverteilung der einzelnen UICC-Stadien über die drei Messzeitpunkte

	UICC I	UICC II	UICC III	UICC IV
T0	n = 20	n = 14	n = 61	n = 73
T1	n = 4	n = 9	n = 53	n = 57
T2	n = 16	n = 9	n = 52	n = 60

In der Analyse des Zusammenhangs der miRNA-Expressionslevel mit klinischen Parametern ergab sich kein wesentlicher Zusammenhang zu Alter und Geschlecht der Patienten. Insbesondere nach Bestrahlung zeigten sich Unterschiede in den Expressionsleveln der miRNA zwischen den UICC-Stadien. Dabei wiesen Patienten mit fortgeschrittenem UICC-Stadium geringere Expressionslevel im Vgl. zu den Patienten mit niedrigem UICC-Stadium auf.

4.6 Gesamtüberleben

Es wurden Überlebensanalysen mittels Kaplan-Meier-Analyse und Log-Rank-Test für die untersuchten miRNA zu den drei Messzeitpunkten durchgeführt. Das Gesamtüberleben im Patientenkollektiv war hierbei der primäre Endpunkt der Studie. In diesem Abschnitt werden Aussagen über die statistische Signifikanz gemacht (s. o.).

Für die Auswertung wurden die miRNA-Level am Median dichotomisiert. Vor der Bestrahlung zeigten sich keine Unterschiede im Überleben zwischen Patienten mit hohen (\geq Median) bzw. niedrigen ($<$ Median) Expressionsleveln für alle vier untersuchten miRNA. Nach einer Bestrahlung mit 20 Gy zeigte sich ein signifikanter Unterschied für die miR-29a-3p ($p = 0,034$). Nach Ende der Radiatio ergaben sich signifikante Unterschiede für die miR-144-3p ($p = 0,026$) bzw. ein Trend der miR-16-5p ($p = 0,061$) und miR-29a-3p ($p = 0,071$). Patienten mit miRNA-Leveln oberhalb des Medians wiesen längere Überlebenszeiten auf. In den Abbildungen 19–22 sind die Überlebenskurven nach Kaplan-Meier anhand der dichotomisierten miRNA-Level dargestellt. In den Tabellen 7–10 sind die Patientenzahlen in beiden Gruppen sowie die medianen Überlebenszeiten aufgetragen.

1) miR-29a-3p zum Zeitpunkt T1

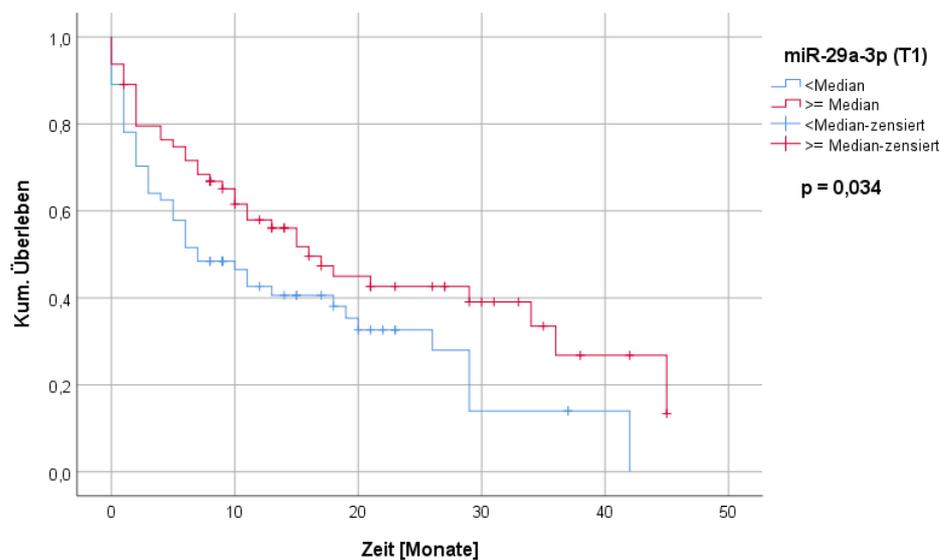


Abbildung 19. Überleben nach Kaplan-Meier nach der miR-29a-3p zum Zeitpunkt T1

Tabelle 7. Zahl der Patienten nach miR-29a-3p-Expressionslevel zum Zeitpunkt T1

Monat	miR-29a-3p < Median		miR-29a-3p ≥ Median	
	kumulative Ereignisse	verbliebene Fälle	kumulative Ereignisse	verbliebene Fälle
10	34	24	24	34
20	40	11	32	19
30	44	3	34	9
40	44	1	36	3
mediane Überlebenszeit [Mo]; (95 %-KI)	7; (2,2–11,8)		16; (10,1–21,9)	

2) miR-16-5p zum Zeitpunkt T2

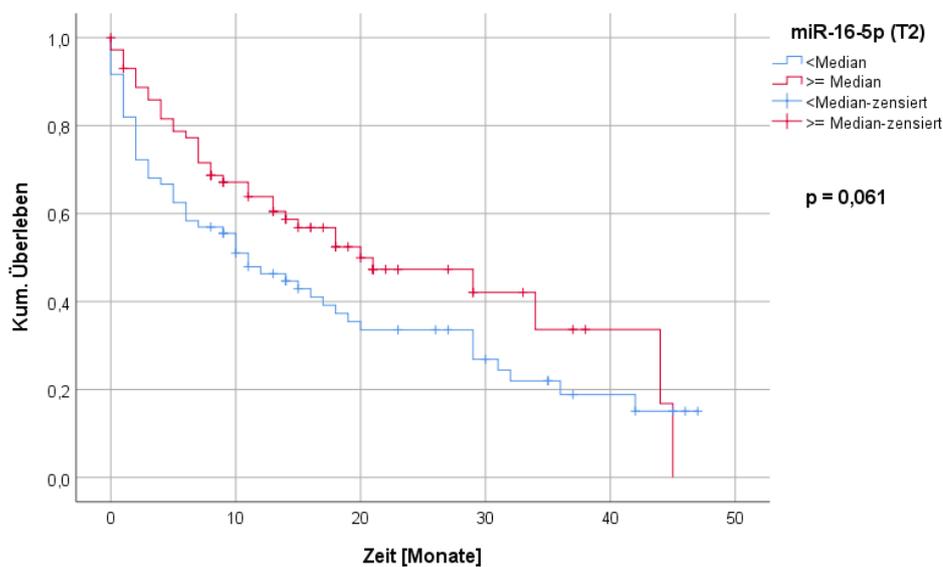


Abbildung 20. Überleben nach Kaplan-Meier nach der miR-16-5p zum Zeitpunkt T2

Tabelle 8. Zahl der Patienten nach miR-16-5p-Expressionslevel zum Zeitpunkt T2

Monat	miR-16-5p < Median		miR-16-5p ≥ Median	
	kumulative Ereignisse	verbliebene Fälle	kumulative Ereignisse	verbliebene Fälle
10	35	33	23	41
20	45	18	32	19
30	48	11	34	6
40	51	5	35	2
mediane Überlebenszeit [Mo]; (95 %-KI)	11; (5,6–16,4)		20; (7,8–32,2)	

3) miR-29a-3p zum Zeitpunkt T2

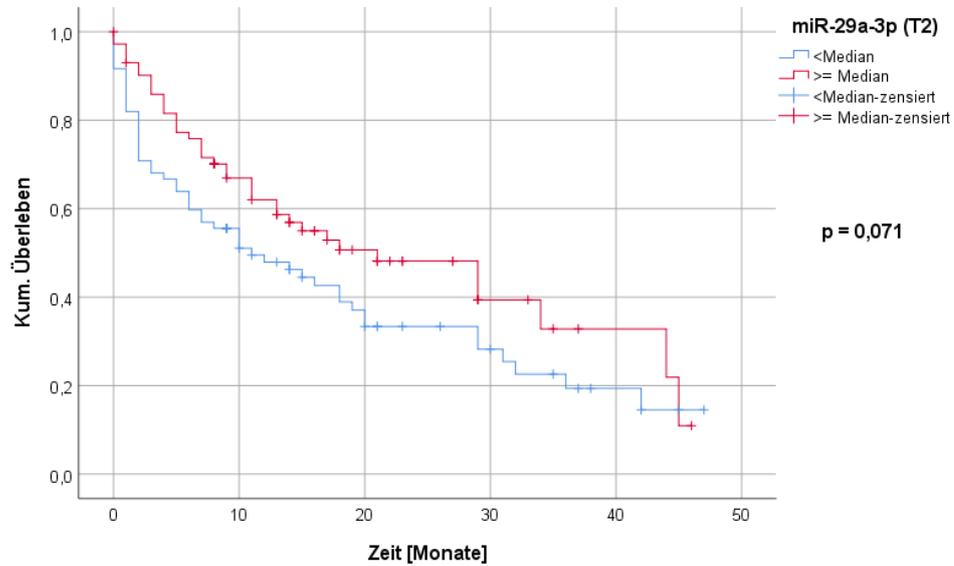


Abbildung 21. Überleben nach Kaplan-Meier nach der miR-29a-3p zum Zeitpunkt T2

Tabelle 9. Zahl der Patienten nach miR-29a-3p-Expressionslevel zum Zeitpunkt T2

Monat	miR-29a-3p < Median		miR-29a-3p ≥ Median	
	kumulative Ereignisse	verbliebene Fälle	kumulative Ereignisse	verbliebene Fälle
10	35	33	23	41
20	45	17	32	20
30	47	10	35	7
40	50	4	36	3
mediane Überlebenszeit [Mo]; (95 %-KI)	11; (3,6–18,4)		21; (9,9–32,1)	

4) miR-144-3p zum Zeitpunkt T2

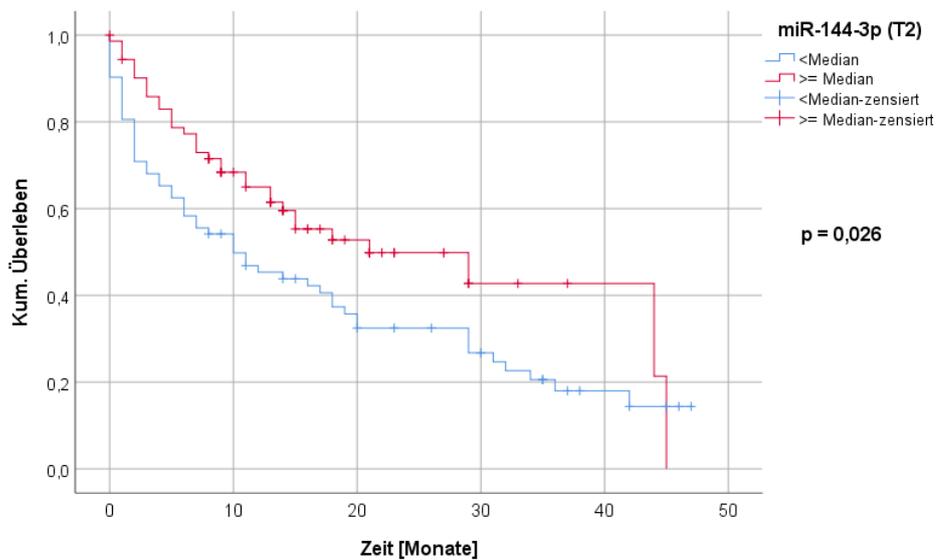


Abbildung 22. Überleben nach Kaplan-Meier nach der miR-144-3p zum Zeitpunkt T2

Tabelle 10. Zahl der Patienten nach miR-144-3p-Expressionslevel zum Zeitpunkt T2

Monat	miR-144-3p < Median		miR-144-3p ≥ Median	
	kumulative Ereignisse	verbliebene Fälle	kumulative Ereignisse	verbliebene Fälle
10	36	34	22	40
20	47	19	30	18
30	50	13	32	4
40	54	5	32	2
mediane Überlebenszeit [Mo]; (95 %-KI)	10; (3,1–16,9)		21; (6,1–35,9)	

Mittels univariabler Cox-Regressionsanalyse wurde das Risiko zu versterben in Abhängigkeit der Plasma-Expressionslevel der miRNA quantifiziert. Für die miR-29a-3p zum Zeitpunkt T1 ergab sich eine Hazard-Ratio von HR = 1,58 (p = 0,041) und für die miR-144-3p zum Zeitpunkt T2 ergab sich eine Hazard-Ratio von HR = 1,61 (p = 0,030).

Die miRNA-Gesamtkonzentration, der Hb-Wert und die Lagerungsdauer beeinflussten die prognostische Relevanz der miRNA nicht. Die Hazard-Ratio der univariablen Cox-Regression für die miRNA, welche eine Assoziation mit dem Gesamtüberleben bzw. einen Trend aufzeigten, ist in Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 11. univariable Cox-Regressionsanalyse der dichotomisierten miRNA-Level

miRNA	Zeitpunkt	Anzahl	Hazard-Ratio	95 %-KI	p (HR)	p (Modell)
29a-3p	T1	128	1,58	1,02–2,46	0,041	0,039
16-5p	T2	144	1,48	0,97–2,27	0,068	0,067
29a-3p	T2	144	1,46	0,96–2,22	0,078	0,077
144-3p	T2	144	1,61	1,05–2,49	0,030	0,029

Es erfolgte eine multivariable Cox-Regressionsanalyse unter Einbeziehung des Patientenalters, des Geschlechts und des UICC-Stadiums. In der univariablen Regressionsanalyse hatte sich das UICC-Stadium (HR = 1,49; $p < 0,001$) als signifikant mit dem Gesamtüberleben assoziiert gezeigt. Alter und Geschlecht zeigten sich in der univariablen Regressionsanalyse nicht mit dem Gesamtüberleben assoziiert.

Die multivariable Cox-Regressionsanalyse zeigte eine vom UICC-Stadium abhängige prognostische Bedeutung der Expressionslevel der miR-29a-3p nach Bestrahlung mit 20 Gy (T1) (HR = 1,32; $p = 0,228$) und der miR-144-3p nach Ende der Bestrahlung (T2) (HR = 1,52; $p = 0,059$). In der multivariablen Regression zeigten sich diese miRNA nicht als signifikant mit dem Gesamtüberleben assoziiert.

In Tabelle 12 sind jeweils die Ergebnisse der multivariablen Cox-Regression für die miRNA-Expressionslevel adjustiert nach Alter, Geschlecht und UICC-Stadium dargestellt.

Tabelle 12. Multivariable Cox-Regression ausgewählter miRNA

miRNA	Zeitpunkt	Anzahl	Hazard-Ratio	95 %-KI	p (HR)	p (Modell)
miR-29a-3p	T1	128	1,32	0,84–2,06	0,228	0,004
miR16-5p	T2	144	1,41	0,92–2,17	0,114	$< 0,001$
miR-29a-3p	T2	144	1,43	0,94–2,18	0,099	$< 0,001$
miR144-3p	T2	144	1,52	0,98–2,35	0,059	$< 0,001$

Es erfolgte eine Zusammenfassung der dichotomisierten Expressionslevel aller vier miRNA in einer kombinierten Variable (KmiR). Diese wurde in zwei Gruppen eingeteilt: (1) Patienten, bei denen alle vier miRNA Expressionslevel unterhalb des Medians aufweisen ($n = 66$) und (2) Patienten, bei denen mindestens eine miRNA Expressionslevel oberhalb des Medians zeigte ($n = 112$).

Während die Kombination der vier miRNA im Log-Rank-Test vor Beginn der Strahlentherapie keine prognostische Bedeutung aufwies, zeigte sich nach Bestrahlung mit 20 Gy (T1) ein Trend ($p = 0,079$) und nach Ende der Radiotherapie eine prognostische Bedeutung für das Gesamtüberleben ($p = 0,002$).

In Abbildung 23 ist das kumulative Überleben der Studienpopulation in Abhängigkeit der Kombination aller vier miRNA (KmiR) nach Ende der Bestrahlung (T2) für die Gruppen (1) und (2) dargestellt.

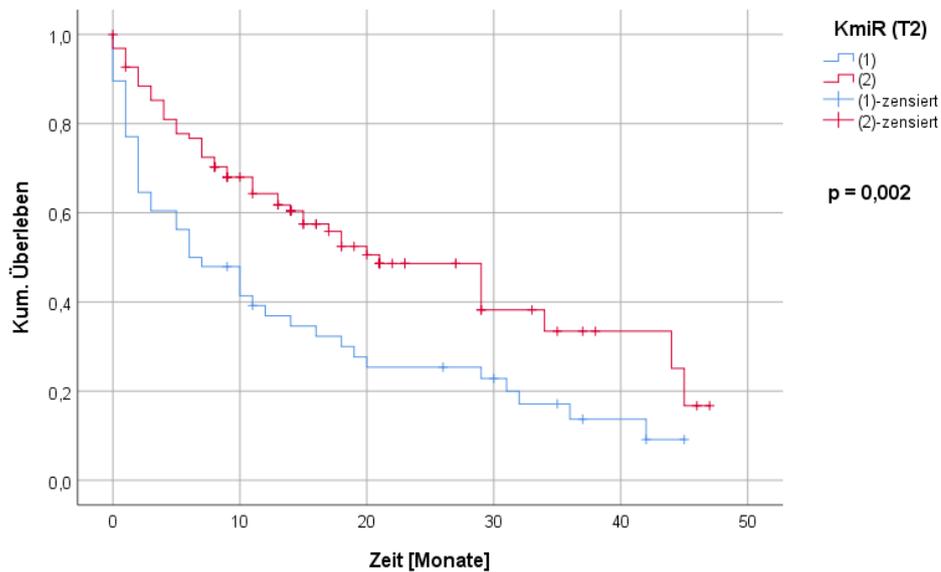


Abbildung 23. Überleben nach Kaplan-Meier nach KmiR zum Zeitpunkt T2

Tabelle 13. Patienten in den Gruppen (1) und (2) der KmiR zum Zeitpunkt T2

Monat	(1)		(2)	
	kumulative Ereignisse	verbliebene Fälle	kumulative Ereignisse	verbliebene Fälle
10	28	19	30	55
20	35	11	42	26
30	36	8	46	9
40	39	3	47	4
mediane Überlebenszeit [Mo]; (95 %-KI)	6; (1,2–10,6)		21; (13,2–28,8)	

Es zeigt sich ein signifikant besseres Überleben in der Gruppe (2), in welcher nach Ende der Bestrahlung mindestens eine miRNA Expressionslevel oberhalb des Medians aufwies.

Die Cox-Regression erbrachte eine Hazard-Ratio von 1,92 ($p = 0,002$; 95 %-KI = 1,26–2,93) für die dichotome Kombination der vier miRNA. Diese zeigte sich ebenfalls unabhängig von den Einflussfaktoren Hb-Wert, miRNA-Gesamtkonzentration und Lagerungsdauer.

In der multivariablen Cox-Regression ergab sich für die Kombination der miRNA eine von Alter, Geschlecht und UICC-Stadium unabhängige prognostische Bedeutung. Die Ergebnisse der Regressionsanalysen mit Adjustierung nach Alter (1), Geschlecht (2) und UICC-Stadium (3) sowie den drei Variablen gemeinsam (4) sind in Tabelle 14 dargestellt. Die Spalten geben jeweils die

Variable an, welche neben der Kombination der miRNA (KmiR) in die multivariable Regression aufgenommen wurde. In den Zeilen finden sich die jeweils berechneten Hazard Ratios und entsprechenden p-Werte.

Tabelle 14. Multivariable Cox-Regression der KmiR adjustiert für Alter, Geschlecht und UICC-Stadium

	1) Alter	2) Geschlecht	3) UICC-Stadium	4) Alter, Geschlecht, UICC-Stadium
KmiR T0	HR = 0,85	HR = 0,84	HR = 0,97	HR = 0,91
	p = 0,478	p = 0,424	p = 0,892	p = 0,690
KmiR T2	HR = 2,01	HR = 2,00	HR = 1,92	HR = 1,98
	p = 0,002	p = 0,002	p = 0,004	p = 0,002
Alter	HR = 0,99			HR = 1,01
	p = 0,906			p = 0,326
Geschlecht		HR = 0,62		HR = 0,56
		p = 0,066		p = 0,030
UICC-Stadium			HR = 1,50	HR = 1,61
			p < 0,001	p < 0,001
p (Modell)	p = 0,017	p = 0,003	p < 0,001	p < 0,001

Es zeigte sich, dass die Kombination der vier miRNA zum Zeitpunkt T2 sowohl einzeln von den Faktoren Alter, Geschlecht und UICC-Stadium als auch im Gesamtmodell prognostisch unabhängig ist. Patienten, in welchen nach Ende der Radiatio mindestens eine der vier einbezogenen miRNA Expressionslevel oberhalb des Medians aufwies (2), hatten ein etwa halb so großes Risiko zu versterben im Vgl. zu Patienten, in welchen alle miRNA Expressionslevel unterhalb des Medians aufwiesen (1).

Zusammenfassend zeigte sich nach Bestrahlung mit 20 Gy bzw. nach Ende der Radiotherapie eine prognostische Bedeutung sowohl einzelner miRNA als der Kombination der vier untersuchten miRNA. Patienten mit höheren miRNA-Expressionsleveln wiesen das bessere Gesamtüberleben auf. Im Gegensatz zu den einzelnen miRNA zeigte sich die Kombination der vier miRNA als vom UICC-Stadium unabhängiger Prognosemarker.

4.7 Analyse der miRNA-Expressionslevel in Abhängigkeit vom Therapiezeitpunkt

Im Patientenkollektiv lagen Proben von 178 Patienten vor Bestrahlung, von 130 Patienten nach der Bestrahlung mit 20 Gy und von 147 nach Ende der Bestrahlung vor. 110 Patienten wurden zu allen drei Messzeitpunkten erfasst.

Die folgenden Verlaufsanalysen der miRNA-Expressionslevel wurden an den Patienten durchgeführt, von welchen Daten zu allen drei Zeitpunkten erfasst wurden (n = 110). Für die miR-150-5p ergaben sich mittels Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben relevante

Unterschiede zwischen den drei Behandlungszeitpunkten. Es zeigte sich sowohl zwischen Zeitpunkt T0 und T1 ($p = 0,042$), T0 und T2 ($p < 0,001$) als auch zwischen T1 und T2 ($p < 0,001$) eine Abnahme der miR-150-5p. Für die miR-150-5p ergab sich ein medianer Fold Change (FC) von $FC_{T1/T0} = 0,82$ und von $FC_{T2/T0} = 0,58$ und von $FC_{T2/T1} = 0,57$. In Abbildung 24 ist der Verlauf der miR-150-5p für die 110 Patienten als Spaghetti-Plot dargestellt.

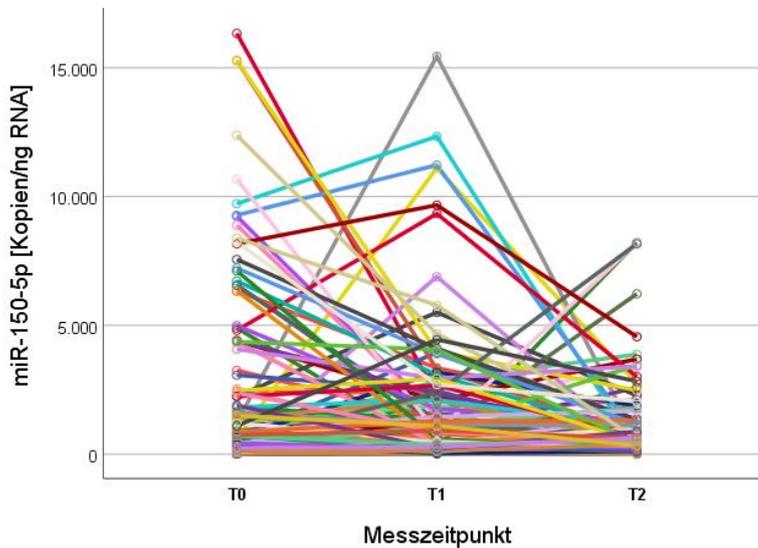


Abbildung 24. Spaghetti-Plot der Verteilung der miR-150-5p über die Messzeitpunkte T0, T1 und T2

Für die miR-16-5p, -29a-3p und -144-3p ergaben sich im Wilcoxon-Test keine relevanten Änderungen zwischen den Therapiezeitpunkten T0, T1 und T2. Der mediane Fold Change zwischen den Zeitpunkten T0 und T1 bzw. T0 und T2 lag bei $FC_{T1/T0} = 1,07$; $FC_{T2/T0} = 1,12$ für die miR-16-5p, bei $FC_{T1/T0} = 0,92$; $FC_{T2/T0} = 1,08$ für die miR-29a-3p und bei $FC_{T1/T0} = 1,21$; $FC_{T2/T0} = 1,26$ für die miR-144-3p. Zu sehen sind die Level der miR-16-5p, -29a-3p, -144-3p und -150-5p zu den drei Messzeitpunkten in den Abbildungen 25–28.

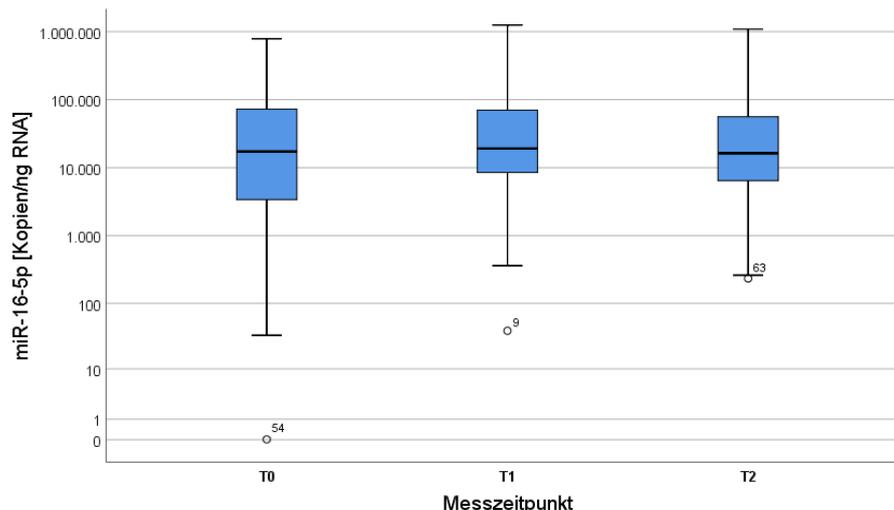


Abbildung 25. mediane Expressionslevel miR-16-5p im Therapieverlauf

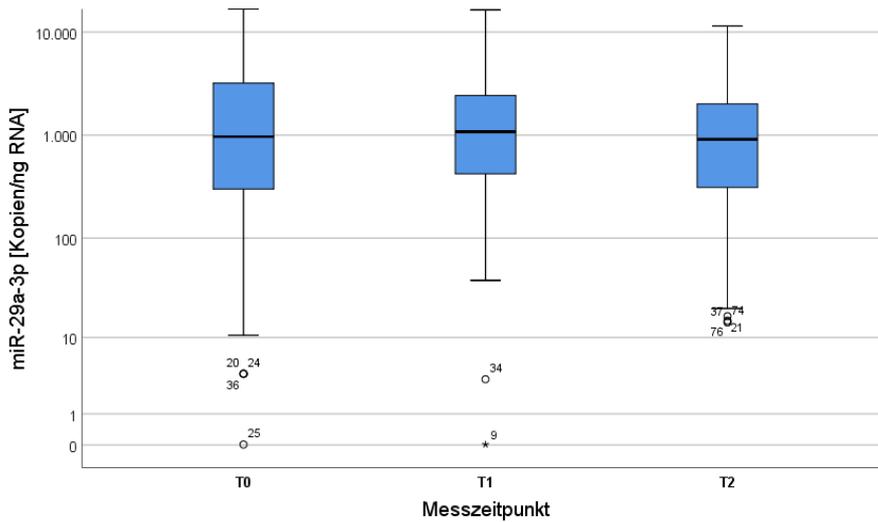


Abbildung 26. mediane Expressionslevel miR-29a-3p im Therapieverlauf

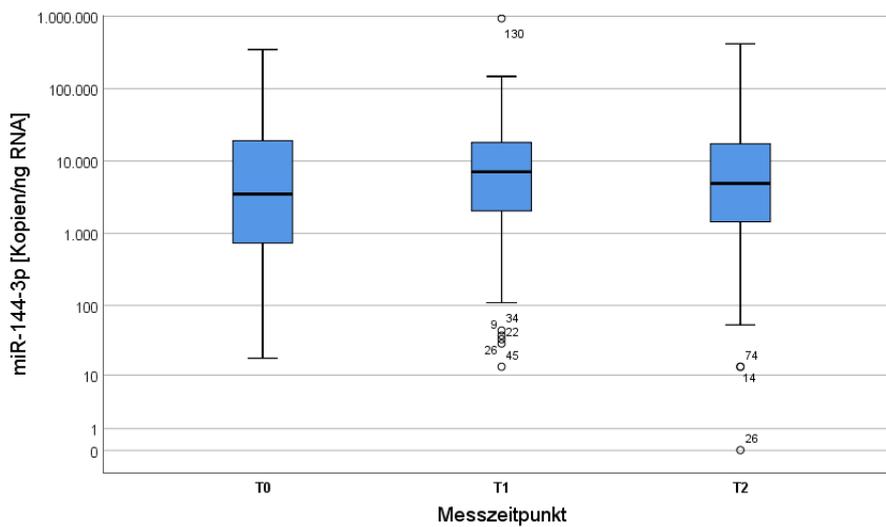


Abbildung 27. mediane Expressionslevel miR-144-3p im Therapieverlauf

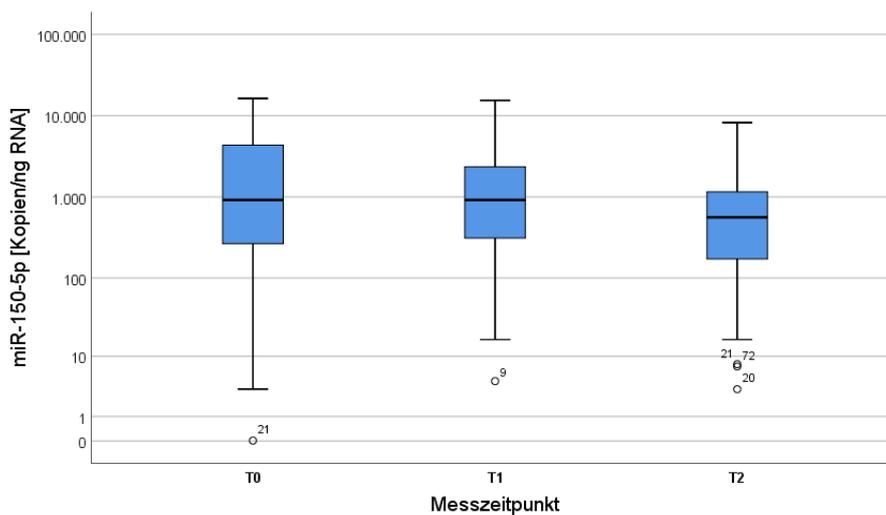


Abbildung 28. mediane Expressionslevel miR-150-5p im Therapieverlauf

Es erfolgte eine getrennte Auswertung der Veränderungen während der Radiotherapie in Abhängigkeit vom UICC-Stadium. Hierfür wurden alle Patientenproben einbezogen. Für die miR-29a-3p und -150-5p zeigte sich im Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben einen Abfall unter Bestrahlung besonders in den Patienten mit fortgeschrittenem UICC-Stadium. Die Ergebnisse für die Veränderungen nach UICC-Stadium für die miR-150-5p sind in der folgenden Tabelle dargestellt und es ist jeweils die Anzahl (n) der verbundenen Stichproben angegeben.

Tabelle 15. Änderung der Level der miR-150-5p zu den Messzeitpunkten in Abh. vom UICC-Stadium

UICC-Stadium		T0/T1	T0/T2	T1/T2
UICC I, II	n	13	25	10
	p-Wert	0,221	0,493	0,508
UICC III	n	53	52	46
	p-Wert	0,025	0,003	0,017
UICC IV	n	57	60	47
	p-Wert	0,036	< 0,001	0,016

Für die miR-150-5p ergab sich für Patienten mit UICC-Stadium III und IV zu allen untersuchten Zeitpunkten ein bedeutender Abfall der Expressionslevel, während sich für Patienten mit UICC-Stadium I und II keine relevanten Veränderungen unter Bestrahlung zeigten. Für die miR-29a-3p zeigte sich für Patienten mit UICC-Stadium IV ein Abfall unter Bestrahlung zwischen den Zeitpunkten T0 und T2 ($p = 0,015$; $n = 60$) und im Trend auch ein Abfall zwischen den Zeitpunkten T1 und T2 ($p = 0,054$; $n = 47$). Für Patienten mit UICC-Stadium I, II oder III ergab sich für die miR-29a-3p keine relevante Änderung der Expressionslevel. Dargestellt sind die Expressionslevel der miR-29a-3p zu den drei Messzeitpunkten für Patienten mit UICC-Stadium IV.

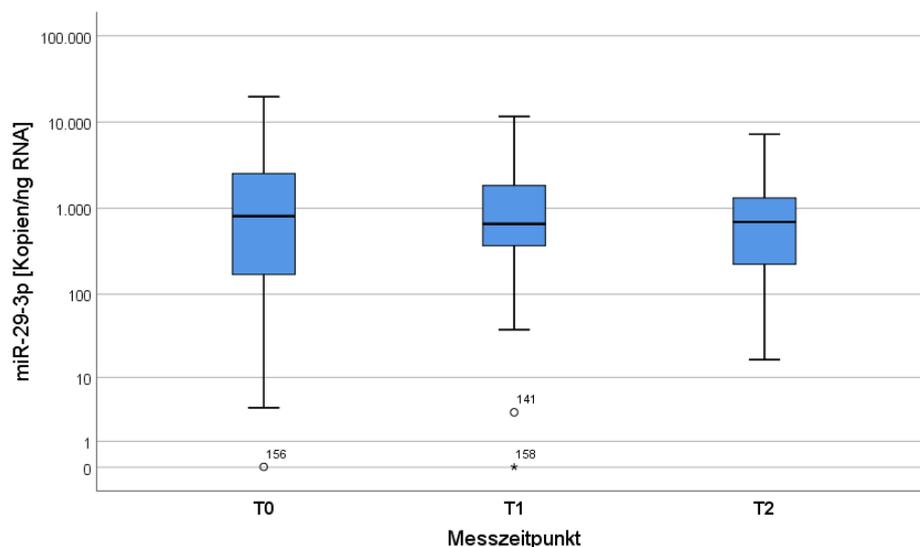


Abbildung 29. miR-29a-3p zu den drei Messzeitpunkten für Patienten mit UICC-Stadium IV (n = 47)

Für die miR-16-5p und -144-3p ergab sich keine relevante Änderung der Expressionslevel während einer Radiotherapie in der nach UICC-Stadium aufgetrennten Analyse.

Der Vergleich von NSCLC-Patienten mit ansteigenden, gleichbleibenden bzw. abfallenden miRNA-Leveln während bzw. nach einer Strahlentherapie erbrachte keinen Einfluss auf die prognostische Bedeutung der miRNA. Auch die Richtung der Änderung der Expressionslevel unter Radiotherapie selbst hatte keine prognostische Bedeutung für das Gesamtüberleben. Für die miR-150-5p ergab sich weder innerhalb der Patienten mit steigenden noch mit fallenden Expressionsleveln unter Therapie eine prognostische Bedeutung.

Insgesamt zeigte unter den untersuchten miRNA die miR-150-5p eine Änderung unter Radiatio mit abfallenden Expressionsleveln zwischen den Messzeitpunkten insbesondere innerhalb der Patienten mit fortgeschrittenem UICC-Stadium III und IV und für die miR-29a-3p ein Abfall der Expressionslevel innerhalb der Patienten mit UICC-Stadium IV.

5 Diskussion

5.1 Zusammensetzung des Studienkollektivs

Die Zusammensetzung des Studienkollektivs entspricht der Alters- und Geschlechtsstruktur der NSCLC-Patienten in Deutschland. Mit einem Frauenanteil von 30 % liegt es etwas unter dem Anteil von ca. 40 % aller Frauen unter den Neuerkrankten im Jahr 2019 in Deutschland. Das mediane Alter von 69 Jahren im Studienkollektiv spiegelt das mediane Erkrankungsalter von 69 bzw. 70 Jahren für Frauen bzw. Männer in Deutschland wider (Robert Koch-Institut 2016), (Zentrum für Krebsregisterdaten 2020). Die mediane Dosis von 60 Gy stimmt mit den aktuellen Richtlinien zur Strahlentherapie des NSCLC überein (S3-Leitlinie 2018). Der Anteil der Patienten mit UICC-Stadium III oder IV entspricht mit 75 % (34 % Stadium III; 41 % in Stadium IV) der Verteilung der NSCLC-Patienten in Deutschland (Stand 2013/2014) mit 73 % (22 % Stadium III; 51 % in Stadium IV) (Kraywinkel und Schönfeld 2018). Die Patientenkohorte kann somit als repräsentativ angesehen werden und es kann von einer Validität der Studienergebnisse für Patienten mit NSCLC in Deutschland ausgegangen werden.

5.2 Quantifizierung zirkulierender miRNA und Etablierung der ddPCR

In der vorliegenden Arbeit erfolgte innerhalb eines Kollektivs aus Bronchialkarzinompatienten unter Bestrahlung die Analyse zirkulierender miRNA mittels droplet digital PCR (ddPCR). Zu Beginn erfolgte die Etablierung der Methodik.

In verschiedenen Untersuchungen zu zirkulierenden miRNA wurde kein Unterschied zwischen Serum- und Plasma-Leveln gefunden und beide als potenzielle Medien der Charakterisierung von Biomarkern bewertet (Kroh et al. 2010), (Mitchell et al. 2008). Da Plasma generell die häufiger gewählte Ausgangssubstanz ist, bietet es die bessere Vergleichbarkeit mit anderen Studien und wurde daher in der vorliegenden Studie als Ausgangssubstanz gewählt.

Untersuchungen zirkulierender miRNA zeigten, dass der Schritt der miRNA-Extraktion aus dem Plasma besonders fehleranfällig ist, wobei die Autoren das *miRVana*[™] PARIS[™]-Kit (Ambion) nutzten (McDonald et al. 2011). In der vorliegenden Studie wurde zur miRNA-Isolation das Säulen-basierte miRNeasy Kit (Qiagen) verwendet, mit welchem im Vgl. zum *miRVana*[™] PARIS[™]-Kit höhere miRNA-Erträge erzielt werden konnten (Kroh et al. 2010). MiRNA liegen in Plasma und Serum nur in geringen Konzentrationen vor, sodass sich einige Studien auf eine definierte Menge an Plasma bzw. Serum beziehen (Mitchell et al. 2008), (Weber et al. 2010).

Die Messung der miRNA-Gesamtkonzentration erfolgte für die vorliegende Arbeit spektrometrisch am Nanodrop 2000c. Hierbei ist es möglich, auch sehr geringe Mengen an miRNA zu detektieren, für RNA wird die Nachweisgrenze bei 1,6 ng/μl angegeben (Thermo Fisher Scientific 2017). Die spektrometrische Konzentrationsbestimmung ist für zirkulierende

miRNA ein etabliertes Messverfahren (Garcia-Elias et al. 2017), (Jeong et al. 2011), (Templin et al. 2011).

In der vorliegenden Arbeit schwankte die miRNA-Ausbeute aus dem Plasma ca. um das 100-fache (1–100 ng/μl). Durch eine Einstellung der Proben auf eine Konzentration von 1 ng/μl konnte der Einfluss der miRNA-Gesamtkonzentration der extrahierten miRNA auf die gemessenen miRNA-Expressionslevel minimiert werden.

Zur Quantifizierung der zirkulierenden miR-16-5p, -21-5p, -29a-3p, -144-3p, -150-5p und -155-5p wurde die droplet digital PCR (ddPCR) eingesetzt. Diese PCR-Methode benötigt im Gegensatz zur RT-qPCR kein Referenzgen, da über eine Auftrennung der Probe in viele kleine Tröpfchen eine absolute Quantifizierung der gemessenen miRNA erfolgt.

Die miR-16-5p, -29a-3p, -144-3p und -150-5p ließen sich mit der angewendeten Methodik per ddPCR valide quantifizieren. Die miR-21-5p und -155-5p konnten in den aktuellen Untersuchungen per ddPCR nicht gemessen werden. Trotz Anwendung verschiedener Annealingtemperaturen und Verdünnungsstufen war keine valide Auftrennung der Proben in positive und negative Tröpfchen für die miR-21-5p möglich. Ähnliche Ergebnisse in Bezug auf die miR-21-5p erzielte B. Schmidt, welche wie in der vorliegenden Studie eine Annealingtemperatur von 58 °C verwendete (Schmidt 2020). Anderen Autoren hingegen gelang es, die miR-21 mittels ddPCR in Serum von NSCLC-Patienten im Frühstadium zu detektieren (Campomenosi et al. 2016). Es scheint, dass die eingesetzten Versuchsbedingungen, Chemikalien und Kits weiter zu optimieren sind. Aufgrund der geringen Konzentration der miR-155-5p im Plasma von NSCLC-Patienten ließen sich bei einer Verdünnung von 1:25 keine positiven Signale detektieren. Die Expressionslevel der miR-155-5p waren in diesem Studienkollektiv demnach zu niedrig, um sie per ddPCR zu detektieren. In einer Studie von Beheshti gelang es, die miR-155-5p erfolgreich per ddPCR in Serumproben von Lymphompatienten zu bestimmen (Beheshti et al. 2019). Für weitere Untersuchungen der miR-155-5p in NSCLC-Patienten sind größere Mengen an Ausgangsmaterial notwendig, um eine geringere Verdünnung einsetzen zu können. Von den sechs ausgewählten miRNA konnten in diesem Kollektiv somit vier miRNA mittels ddPCR im Plasma von NSCLC-Patienten bestimmt werden.

Zwischen der miR-16-5p, -29a-3p, -144-3p und -150-5p wurde im Studienkollektiv ein starker Zusammenhang mit Korrelationskoeffizienten von $r_s = 0,794–0,900$ festgestellt. Laut der Datenbank miRBASE sind bisher keine Korrelationen der vier untersuchten miRNA bekannt. Weitere Untersuchungen scheinen notwendig, um den Zusammenhang der hier analysierten miRNA zu bestätigen.

Es erfolgte ein Vergleich der Detektionsmethoden RT-qPCR und ddPCR. In der vorliegenden Studie wurde für die untersuchten miRNA ein exponentieller Zusammenhang zwischen den Ct-

Werten der RT-qPCR und den per ddPCR ermittelten Konzentrationen in den Patientenproben gefunden. Für die miR-29a-3p und -150-5p ergaben sich sehr starke Zusammenhänge ($R^2 = 0,93$ bzw. $0,96$; $p < 0,001$). Geringere Zusammenhänge zeigten sich für die miR-16-5p und -144-3p ($R^2 = 0,73$ bzw. $0,78$; $p < 0,001$).

Die eigenen Ergebnisse bestätigen den von anderen Autoren nachgewiesenen Zusammenhang zwischen beiden PCR-Methoden. Vergleichbare R^2 -Werte für den Zusammenhang zwischen RT-qPCR und ddPCR fanden Campomenosi et al. für 85 Serumproben von Bronchialkarzinompatienten und gesunden Kontrollen für die miR-21, -126 und let-7a mit R^2 -Werten von $0,95$ – $0,98$ ($p < 0,001$) (Campomenosi et al. 2016). Für die Messung der Viruslast in Plasmaproben von CMV-infizierten Patienten ergab sich ebenfalls ein starker Zusammenhang beider Messmethoden mit einem R^2 -Wert $\geq 0,93$ (Hayden et al. 2013). Dass die R^2 -Werte in der vorliegenden Arbeit nicht Werte $\geq 0,99$ erreichten, ist ein Hinweis auf die in der RT-qPCR notwendige Normierung der Ct-Werte mittels Referenzgen.

Eine absolute Quantifizierung in der RT-qPCR erfolgt i. d. R. nur nach Normierung mittels eines stabil exprimierten Referenzgens. Als Referenzgen für die RT-qPCR werden bspw. künstlich hinzugesetzte-Spike-In-Kontrollen, die mittlere Gesamt-miRNA oder einzelne, stabil exprimierte miRNA eingesetzt. Für zirkulierende miRNA konnte bisher keine einheitlich angewandte Referenz im Plasma gefunden werden. Da von unterschiedlichen Autoren verschiedene Methoden zur Normierung der Analysen zirkulierender miRNA mittels RT-qPCR eingesetzt wurden, ist die Vergleichbarkeit der Studien zu diesem Thema einschränkt. Die ddPCR besitzt gegenüber der RT-qPCR den großen Vorteil, keine Referenz für eine absolute Quantifizierung zu benötigen.

5.3 Eignung der miR-16-5p als Referenzgen

Ein häufig genutztes Referenzgen im Plasma für Untersuchungen zu miRNA in Krebspatienten mittels RT-qPCR ist die miR-16-5p (Chim et al. 2008), (Kroh et al. 2010), (Lawrie et al. 2008), (Song et al. 2012).

Gegen die Eignung der miR-16-5p als Referenzgen für miRNA-Analysen im Plasma spricht die Beeinflussung der Werte durch eine Hämolyse (Jacob et al. 2013), (Kirschner et al. 2013), (McDonald et al. 2011), (Pizzamiglio et al. 2017), (Yamada et al. 2014). Ein Referenzgen sollte unabhängig von äußeren Einflussfaktoren sein, da die Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Studien durch ein unterschiedliches Ausmaß an Hämolyse beeinträchtigt sein kann.

Sowohl in Patientinnen mit Mamma-Karzinom als auch in gesunden Spendern zeigte die miR-16 eine hohe interindividuelle Variabilität im Plasma (Cookson et al. 2012), (McDonald et al. 2011).

Auch die Tatsache, dass die miR-16-5p im Plasma von Tumorpatienten herunter- bzw. hochreguliert sein kann (s. u.), stellt ihre Eignung als Referenzgen weiter infrage.

Die Studienlage zur Eignung der miR-16-5p als Referenzgen der RT-qPCR im Plasma ist demnach sehr heterogen. In diesem Patientenkollektiv fand sich eine starke Korrelation der miR-16-5p zu den anderen untersuchten miRNA, was ebenfalls gegen die Eignung als Referenzgen spricht. Angesichts der starken Schwankung der Expression im Studienkollektiv, des Einflusses einer Hämolyse auf die miR-16-5p und eine mögliche Hoch- oder Herunterregulation in Tumorpatienten scheint sie als Referenzgen in diesem Kollektiv und für andere Studien zu zirkulierenden miRNA nicht geeignet zu sein.

Daher sind die Ergebnisse von Studien, welche die miR-16-5p als Referenz für die RT-qPCR nutzen, zu hinterfragen. Dieses Beispiel unterstreicht die Schwierigkeit, geeignete Referenzgene für Analysen von miRNA im Plasma zu finden. Auch angesichts von Einflussgrößen wie Hämolyse oder Lagerungszeiten auf die Ergebnisse von sowohl RT-qPCR als auch ddPCR liegt nur eine bedingte Aussagekraft und Vergleichbarkeit von verschiedenen Studien mit uneinheitlicher Methodik vor.

Insgesamt konnten mit der hier aufgezeigten methodischen Herangehensweise vier von sechs miRNA erfolgreich mittels ddPCR detektiert werden. Die ddPCR kann als geeignete Methode zur Erfassung zirkulierender miRNA angesehen werden und ist nicht darauf angewiesen, eine geeignete Referenz im Plasma zu finden. Sie bietet eine vielversprechende Perspektive für zukünftige Analysen.

5.4 Einflussfaktoren

Für die Analyse zirkulierender miRNA in klinischen Anwendungen sollten jedoch Faktoren beachtet werden, die die miRNA-Level in Patienten beeinflussen. Dies sind bspw. zirkadiane Schwankungen der Expressionslevel, Essens- bzw. Fastenzeiten, da der Fettsäuregehalt im Plasma die Effizienz der miRNA-Extraktion beeinflussen kann und der Durchmesser der zur Blutentnahme verwendeten Nadel, da der produzierte Hautlappen ebenfalls miRNA enthält. Auch Komorbiditäten des Patienten können die Ergebnisse verfälschen (Kroh et al. 2010), (Precazzini et al. 2021). Zigarettenrauchen, ein wichtiger Faktor bei Lungenkrebspatienten, kann ebenfalls die Plasmalevel einiger miRNA beeinflussen (Takahashi et al. 2013). Eigene Berechnungen zeigten im Studienkollektiv keinen Effekt von Tabakrauchen auf die miRNA-Expressionslevel (Daten nicht gezeigt). Für Faktoren wie Geschlecht und BMI konnte im Studienkollektiv kein wesentlicher Zusammenhang zu den miRNA-Leveln im Plasma gezeigt

werden. Dies bestätigt die Ergebnisse anderer Autoren, welche ebenfalls keinen Effekt der genannten Parameter auf miRNA-Plasmalevel feststellen konnten (Matias-Garcia et al. 2020). Eigene Untersuchungen von möglichen Einflussfaktoren ergaben einen Zusammenhang der miRNA-Expressionslevel zu Hb-Wert der Plasmaproben, miRNA-Gesamtkonzentration und der Lagerungsdauer der Proben.

5.4.1 Effekte des Hb-Werts der Plasmaproben

In dieser Studie wurde ein schwacher Zusammenhang zwischen dem Hb-Wert im Plasma und den Leveln der untersuchten miRNA mit Korrelationskoeffizienten von $r_s = 0,102-0,257$ gefunden.

Verschiedene Untersuchungen zeigten, dass die Expressionslevel zirkulierender miRNA durch eine Hämolyse beeinflusst werden können (Pritchard et al. 2012). Bei einem Zerfall der Erythrozyten werden die intrazellulären Bestandteile, u. a. miRNA, freigesetzt. Insbesondere die Plasmalevel von miRNA, welche intrazellulär gehäuft vorkommen, werden dabei beeinflusst. Für diese Untersuchungen wurden i. d. R. Proben mit einem gezielt zugesetzten Erythrozytenlysat und Hb-Werten von 0,25–10,0 g/L genutzt (Kirschner et al. 2013), (Koseoglu et al. 2011), (McDonald et al. 2011), (McLellan et al. 2014). Kosoglu et al. bewerteten Proben mit einem Hb-Wert von $Hb < 1,0$ g/L als nicht bis mild hämolytisch (Koseoglu et al. 2011). In diesem Studienkollektiv ist demnach bei Hb-Werten $< 1,0$ g/L nur von einer geringen Hämolyse auszugehen.

Weiterhin zeigte sich, dass der Einfluss einer Hämolyse auf verschiedene miRNA unterschiedlich stark ist. Besonders die miR-16-5p scheint in hoher Konzentration in Erythrozyten vorzuliegen, sodass sie bei deren Zerfall vermehrt freigesetzt wird (Kirschner et al. 2013), (McDonald et al. 2011), (Pizzamiglio et al. 2017). Auch im klinischen Alltag ist eine durch Blutentnahme oder Proben transport bzw. -lagerung bedingte Hämolyse nicht zu vermeiden und sollte daher als Einflussgröße bei der Verwendung der miRNA als Biomarker beachtet werden.

5.4.2 Effekte der miRNA-Gesamtkonzentration

Zwischen den Expressionsleveln der untersuchten miRNA und der miRNA-Gesamtkonzentration der Proben zeigte sich eine inverse Korrelation mit Korrelationskoeffizienten von $r_s = (-0,233)-(-0,262)$, welche ebenfalls als schwach bewertet werden kann. In der Literatur finden sich zu diesem Einflussfaktor keine Aussagen. Möglicherweise werden liegen in den isolierten miRNA-Proben Verunreinigungen vor, welche durch den Nanodrop detektiert werden und die

spektrometrisch gemessene Konzentration verfälschen. Weitere Untersuchungen bezüglich dieser Einflussgröße scheinen notwendig.

5.4.3 Lagerung, Einfrieren und Auftauen der Proben

Verschiedene Studien beschreiben einen Einfluss der Lagerungsdauer bzw. des vorangegangenen Auftauens der Proben auf die Plasma-Expressionslevel. Innerhalb des vorliegenden Studienkollektivs zeigte sich ein schwacher bis moderater Zusammenhang zwischen Lagerungsdauer der Proben und den Expressionsleveln der miRNA mit Korrelationskoeffizienten von $r_s = (-0,284)$ – $(-0,449)$. Dies bedeutet, dass in den länger gelagerten Proben tendenziell niedrigere miRNA-Level gefunden wurden. Die miR-144-3p wies hierbei den stärksten Abbau über die Zeit auf.

Einige Studien verweisen auf einen Abbau von bei -80 °C gelagerten Plasma-, miRNA- oder cDNA-Proben sowie einen Einfluss von mehrfachem Einfrieren und Auftauen (Bravo et al. 2007), (Glinge et al. 2017), (Sourvinou et al. 2013). Interessanterweise detektieren andere Studien jedoch stabile Expressionslevel auch nach längerer Lagerung von miRNA bzw. cDNA-Proben über mehrere Monate und Jahre bei Temperaturen zwischen -20 °C und -170 °C und mehrmaligem Auftauen und Einfrieren (Kroh et al. 2010), (Matias-Garcia et al. 2020), (Mitchell et al. 2008), (Mraz et al. 2009). Vorteilhaft ist die zeitnahe Isolation der miRNA und reverse Transkription von cDNA nach Gewinnung der Plasmaproben, da sich diese Medien als stabiler gegenüber einer längeren Lagerungsdauer erwiesen als reines Plasma (Sourvinou et al. 2013). Empfehlenswert kann auch eine zeitnahe Rekrutierung aller Patienten im Studienkollektiv sein, um eine längere Lagerungsdauer der Proben zu vermeiden. Diese war jedoch durch die Fallzahlen am Studienort begrenzt. Denkbar wäre eine multizentrische Rekrutierung in einem kurzen Zeitintervall, um längere Lagerungszeiten der Proben zu vermeiden.

Trotz geringer Hämolyse im Studienkollektiv, Lagerung der Proben bei -80 °C und einer einheitlichen Einstellung der miRNA-Konzentration zeigte sich ein schwacher bis moderater Zusammenhang zu den Expressionsleveln der untersuchten miRNA. Durch die Dichotomisierung der miRNA-Expressionslevel am Median konnte der Einfluss der genannten Faktoren auf die berechneten Prognosedaten minimiert werden. Eine Aufnahme der Lagerungsdauer, der miRNA-Gesamtkonzentration und des Hb-Wertes neben den miRNA-Leveln in der multivariablen Cox-Regression hatte keinen Einfluss auf die berechnete Hazard-Ratio für das Gesamtüberleben.

Weitere Untersuchungen sind notwendig, um genaueren Aufschluss über die Bedeutung dieser Faktoren zu geben.

5.5 Vergleich der miRNA-Expressionslevel von NSCLC-Patienten und Blutspendern

In eigenen Untersuchungen wiesen Patientenproben in der ersten Studienhälfte (April 2017 bis Januar 2019), die vor der aktuellen Analyse bereits bearbeitet worden waren, im Vgl. zu denen in der zweiten Studienhälfte (März 2019 bis September 2020) insgesamt niedrigere miRNA-Level auf. Auch in den Proben der Blutspender, welche im Vorfeld der vorliegenden Studie mehrfach analysiert worden waren, zeigten sich im Vgl. zu der Gruppe der in der zweiten Studienhälfte rekrutierten Patienten (NSCLC-2) niedrigere Expressionslevel, nicht jedoch im Vgl. zu den in der ersten Hälfte rekrutierten Patienten (NSCLC-1). Dies weist auf einen Abbau von miRNA aufgrund des mehrfachen Auftauens und längeren Lagerungsdauer der Proben hin.

Da die Lagerungsdauer, der Hb-Wert und die miRNA-Gesamtkonzentrationen zwischen Patienten- und Spenderproben differieren, ist keine direkte Vergleichbarkeit der Gruppen gegeben. Im vorliegenden Studienkollektiv können keine validen Aussagen über diesen Vergleich getroffen werden und die hier nachgewiesenen Unterschiede scheinen nicht auf klinische Parameter sondern auf präanalytische Einflussfaktoren zurückzuführen zu sein.

Zahlreiche Studien zeigen jedoch Unterschiede in den Plasma-Expressionsleveln von miRNA zwischen NSCLC-Patienten und gesunden Blutspendern. Jedoch zeigt sich in der Literatur ein hoher Grad an Inkonsistenz der vorhandenen Studien (Zhong et al. 2021). Dies kann (wie bereits beschrieben) z. T. durch unterschiedliche Detektionsmethoden und Normierungsmethoden bei Untersuchungen per-RT-qPCR bedingt sein. Uneinheitliche Zusammensetzungen der Patientenkollektive und unterschiedliche Versuchsabläufe können als weitere Ursachen angesehen werden.

Rabinowits et al. wiesen für NSCLC-Patienten ca. zweifach erhöhte Gesamtlevel von Plasma-miRNA im Vgl. zur gesunden Kontrollgruppe nach (Rabinowits et al. 2009).

Für die miR-16-5p zeigten einige Studien deutlich erhöhte miRNA-Expressionslevel im Plasma innerhalb von Tumorpatienten. P. Reis et al. stellten mittels Hybridisierung erhöhte Expressionslevel der miR-16-5p im Plasma von 78 NSCLC-Patienten im Vgl. zu 61 gesunden Spendern fest (Reis et al. 2020). Sromek et al. verglichen die Plasmalevel von 61 NSCLC-Patienten sowie 51 gesunden Kontrollen und stellten per RT-qPCR erhöhte Expressionslevel der miR-16 im Patientenkollektiv fest. Interessanterweise fielen die Expressionslevel ein Jahr nach operativer Entfernung des Primärtumors auf die Level der gesunden Kontrollen ab (Sromek et al. 2017). Gegensätzliche Entdeckungen wurden an einer Kohorte von chinesischen NSCLC-Patienten gemacht. Hier fanden sich erniedrigte Plasmalevel der miR-16-5p im Vgl. zu gesunden Probanden mittels RT-qPCR in 94 Patienten und per Microarray in 70 Patienten (Fan et al. 2016). Die Mehrzahl der Studien weist jedoch auf eine Erhöhung der Plasmalevel der miR-16-5p in

NSCLC-Patienten hin. In NSCLC-Zelllinien hingegen scheint die miR-16-5p herunterreguliert zu sein (Ke et al. 2013), (Wang et al. 2018a).

Auch für die miR-144-3p sind in der Literatur Unterschiede der Plasmalevel zwischen gesunden Spendern und NSCLC-Patienten beschrieben. In einem Kollektiv aus 40 therapienativen NSCLC-Patienten fanden sich erhöhte Level der miR-144-3p sowohl im Plasma als auch im Gewebe im Vgl. zu gesunden Normalspendern (n = 10) (Pu et al. 2016). Andererseits fanden sich für NSCLC-Gewebeproben in einer Metaanalyse über 125 gepaarte klinische Proben aus NSCLC-Gewebe per RT-qPCR niedrigere Expressionslevel der miR-144-3p in den Tumorproben (p < 0,001) (Chen et al. 2019).

In einem Review aus vier unabhängigen Reports und ca. 500 Patienten ergab sich eine hohe Inkonsistenz der vorhandenen Studien zu den Expressionsleveln der miR-150 bei NSCLC-Patienten. Für Gewebelevel wurde sowohl eine Hoch- als auch eine Herunterregulation der miR-150 in 400 bzw. 90 Patienten gefunden. Für die Plasmalevel der miR-150 zeigte sich eine Erhöhung in einem Kollektiv aus 11 NSCLC-Patienten im Vgl. zu 11 gesunden Kontrollen (Zhong et al. 2021).

In NSCLC-Zellen fanden sich erniedrigte Gewebelevel der miR-29a verbunden mit einer tumorsuppressiven Wirkung (Hu et al. 2016), (Li et al. 2017). Andere Autoren entdeckten, dass die miR-29a durch Bronchialkarzinomzellen aktiv sekretiert wird und eine proinflammatorische und prometastatische Rolle zu spielen scheint (Fabbri et al. 2012). Im Plasma fanden einige Autoren für das Bronchialkarzinom per Microarray und RT-qPCR erhöhte Plasmalevel der miR-29a-5p im Vergleich von 145 Patienten- und 55 Kontrollproben (He et al. 2019).

Insgesamt zeigt sich, dass die Studienlage hierzu beschränkt und z. T. widersprüchlich ist. Weitere Untersuchungen zum diagnostischen Einsatz zirkulierender miRNA unter standardisierten Bedingungen sind notwendig, um Erkenntnisse für den klinischen Einsatz zu gewinnen.

5.6 Analyse der miRNA-Expressionslevel in Abhängigkeit vom Therapiezeitpunkt

In diesem Kollektiv wurde eine Abnahme der Plasmalevel der miR-150-5p während der Strahlentherapie beobachtet (s. Abbildung 28). Es zeigte sich eine Reduktion der Expressionslevel der miR-150-5p um das 1,7-fache zwischen Beginn und Ende der Radiatio (FC = 0,58). Dies bestätigen Ergebnisse anderer Autoren. In einer Metaanalyse von 30 Studien zu Veränderungen zirkulierender miRNA unter Bestrahlung in verschiedenen Spezies zeigte die miR-150 ca. 2,5-fach reduzierte Plasmalevel während bzw. nach Bestrahlung und es zeigte sich gleichzeitig eine Korrelation zur Strahlendosis (Małachowska et al. 2020).

Dinh et al. beschrieben einen deutlichen Abfall der miR-150-5p im Plasma von 21 NSCLC-Patienten während einer Strahlentherapie. Es wurde diskutiert, dass erniedrigte miR-150-5p-Level im Plasma durch intrazelluläre Retention zustande kommen, da sich *in vitro* eine intrazelluläre Akkumulation der miR-150-5p unter Radiatio ergab (Dinh et al. 2016). In Mäusen führte eine Ganzkörperbestrahlung zu einer zeit- und dosisabhängigen Abnahme der zirkulierenden miR-150-5p (Gao et al. 2017), (Jacob et al. 2013), (Templin et al. 2011). Es wird vermutet, dass miRNA, welche mit einer Radioexposition assoziiert sind, in den Prozess der Reparatur von Strahlenschäden eingebunden sind, so auch die zirkulierende miR-150-5p (Małachowska et al. 2020). Eigene Untersuchungen ergaben, dass sich der Abfall der miR-150-5p-Level besonders innerhalb der Patienten mit fortgeschrittenem UICC-Stadium zeigte (s. Tabelle 15).

Die miR-29a-3p zeigte in diesem Kollektiv nur innerhalb der Patienten mit UICC-Stadium IV relevante Veränderungen unter Therapie mit einem Abfall der Expressionslevel zwischen T0 und T2 ($p = 0,015$) bzw. im Trend zwischen T1 und T2 ($p = 0,054$) (s. Abbildung 29). Für Patienten mit UICC-Stadium I–III ergaben sich keine bedeutenden Änderungen der miR-29a-3p.

In Übereinstimmung mit eigenen Untersuchungen in Patienten mit UICC-Stadium IV stellten Dinh et al. für die miR-29a-3p dosisabhängig abfallende Plasmaspiegel bei NSCLC-Patienten unter Bestrahlung fest (Dinh et al. 2016). In der Metaanalyse durch Malachowska et al. aus 30 unabhängigen Studien gehörte die miR-29a im Plasma zu den sieben miRNA, welche veränderte Expressionslevel unter Bestrahlung und eine Korrelation zur Strahlendosis zeigten. Für die miR-29a-3p ergaben sich hierbei sinkende Expressionslevel unter Bestrahlung (FC = 0,87; 95 %-KI: 0,79–0,96). Hierbei wurden 131 zirkulierende miRNA in verschiedenen Spezies je vor und nach einer Bestrahlung mit einer medianen Dosis von 8 Gy untersucht (Małachowska et al. 2020).

Eigene Untersuchungen ergaben keine Veränderung der Plasmalevel der miR-16-5p im untersuchten Kollektiv während einer Bestrahlung. Erste Untersuchungen lassen einen Zusammenhang der miR-16-5p in NSCLC-Zelllinien mit einer Radioresistenz erkennen. In radioresistenten Zellen fanden sich in NSCLC-Zelllinien niedrigere Expressionslevel der miR-16 (Wang et al. 2020). Weiterhin zeigte sich im Zellexperiment ein Abfall der Radiosensitivität unter Einbringen einer anti-miR-16-Sequenz (Du et al. 2021).

Für Ratten wurde ein Anstieg der rno-miR-144-3p zwei Wochen nach Thoraxbestrahlung im Plasma gemessen. Interessanterweise wurde kein Anstieg im Lungengewebe der bestrahlten Ratten nachgewiesen. Die miR-144-3p scheint dabei in die Prozesse von Entzündung, Immunantwort und Zellwachstum involviert zu sein, welche durch eine Bestrahlung aktiviert

werden (Gao et al. 2017). Eigene Untersuchungen konnten erstmalig zeigen, dass im Plasma von NSCLC-Patienten keine Änderung der miR-144-3p unter Bestrahlung zu sehen ist.

Insgesamt gibt es relativ wenige Studien, welche die Veränderung zirkulierender miRNA in Patienten mit NSCLC unter Radiotherapie untersuchen. Eigene Untersuchungen ergaben erstmals Hinweise auf einen Zusammenhang der Plasma-Expressionslevel einzelner miRNA, bspw. der miR-150-5p und -29a-3p, mit einer Radiotherapie. Weitere Untersuchungen insbesondere zu einer prädiktiven Bedeutung der miRNA unter Radiotherapie in Abhängigkeit vom UICC-Stadium der Patienten scheinen vielversprechend.

5.7 Korrelationen der miRNA-Expressionslevel mit klinischen Parametern

Es erfolgte die Messung der miRNA-Expressionslevel in 455 Patientenproben zu drei Zeitpunkten vor, während und nach einer Strahlentherapie und die Erfassung klinischer Parameter wie Alter, Geschlecht und UICC-Stadium.

Eigene Berechnungen im Studienkollektiv zeigten keinen wesentlichen Zusammenhang zwischen Patientenalter und -geschlecht mit den Expressionsleveln der untersuchten miRNA. Andere Studien wiesen in gesunden Spendern ebenfalls keine Unterschiede der Expressionslevel zwischen Männern und Frauen nach und fanden keinen Zusammenhang zwischen Spenderalter und miRNA-Expressionsleveln (Chen et al. 2008), (Matias-Garcia et al. 2020).

Im Studienkollektiv zeigten eigene Berechnungen zu den Zeitpunkten T0 und T1 keine Unterschiede der miRNA-Level zwischen Patienten mit unterschiedlichem UICC-Stadium. Erst nach Ende der Bestrahlung (T2) zeigten sich niedrigere Expressionslevel der miR-29a-3p, -144-3p und der miR-150-5p in Patienten mit fortgeschrittenem UICC-Stadium (s. Abbildung 18).

Die Zusammenhänge von miRNA-Expressionsleveln zum UICC-Stadium im Plasma von NSCLC-Patienten zu verschiedenen Behandlungszeitpunkten während einer Radiotherapie wurden bisher nicht untersucht.

Auch andere Autoren fanden einen Zusammenhang der Expressionslevel zirkulierender miRNA mit dem UICC-Stadium in NSCLC-Patienten. In einem Kollektiv aus 260 inoperablen NSCLC-Patienten vor einer Cisplatin-basierten Chemotherapie fanden Cui et al. erhöhte Plasma-Expressionslevel der miR-155 und -125b in Patienten mit UICC-Stadium IV im Vgl. zu Patienten mit Stadium IIIA bzw. IIIB (Cui et al. 2013).

Für die miR-150-5p fanden sich höhere Gewebelevel in 157 klinischen Proben von NSCLC-Patienten mit fortgeschrittenem TNM-Stadium III oder IV im Vgl. zu den Patienten mit TNM-Stadium I oder II ($p = 0,02$) (Yin et al. 2015). Dies steht in inversem Zusammenhang zu den hier gefundenen Verhältnissen im Plasma.

Andererseits wurde in Übereinstimmung mit den eigenen Untersuchungen für die miR-29a-3p in 62 klinischen Gewebeproben von NSCLC-Patienten ein Zusammenhang zwischen niedrigen Gewebeleveln und fortgeschrittenem TNM-Stadium ($p = 0,003$) und Metastasierung gefunden ($p = 0,02$) (Li et al. 2017). Der Zusammenhang zum UICC-Stadium konnte durch eigene Untersuchungen erstmals für Patientenmaterial unter Bestrahlung und im Plasma bestätigt werden.

Für die miR-144-3p wurden in 40 Patienten mit Plattenepithelkarzinom der Lunge per Microarray höhere Plasmalevel in den fortgeschrittenen Stadien festgestellt (Pu et al. 2016). Für Patienten mit Adenokarzinom der Lunge ($n = 445$) zeigten sich unter Nutzung der Datenbank TCGA (The Cancer Genome Atlas) höhere Expressionslevel der miR-144-3p im Gewebe in Patienten mit fortgeschrittenem Stadium ($p = 0,031$). Die selben Autoren entdeckten für Patienten mit Plattenepithelkarzinom der Lunge ($n = 332$) hingegen niedrigere Expressionslevel der miR-144-3p in Patienten mit fortgeschrittenem Stadium ($p = 0,040$) (Chen et al. 2019). Untersuchungen im eigenen Studienkollektiv fanden dagegen vor Bestrahlung (T0) keine Unterschiede der Plasma-miR-144-3p zwischen Patienten mit unterschiedlichem UICC-Stadium und zeigten und erst nach Bestrahlung niedrigere Expressionslevel in fortgeschrittenen UICC-Stadien. Für Patienten mit Adeno- bzw. Plattenepithelkarzinom ergaben sich hierbei keine Unterschiede.

Für die miR-16-5p fanden sich höhere Plasmalevel in 61 NSCLC-Patienten in niedrigem TNM-Stadium IA/IB im Vgl. zu fortgeschrittenen TNM-Stadien IIA–IV (Sromek et al. 2017). Dies konnte durch eigene Untersuchungen nicht bestätigt werden, welche vor, während und nach einer Radiotherapie keinen Zusammenhang der Plasmaexpressionslevel der miR-16-5p mit dem UICC-Stadium der Patienten fanden.

Eigene Ergebnisse weisen erstmals darauf hin, dass die Assoziation mit dem UICC-Stadium erst während bzw. nach Bestrahlung auftritt. Für die miR-150-5p zeigten die Patienten mit UICC-Stadium III oder IV im Vgl. zu den Patienten mit niedrigem UICC-Stadium einen Abfall der miRNA-Level im Plasma während der Radiotherapie zwischen allen drei Messzeitpunkten. Für die miR-29a-3p ergab sich nur innerhalb der Patienten mit UICC-Stadium IV ein relevanter Abfall zwischen den Zeitpunkten T0 und T2. Es ist also davon auszugehen, dass Patienten mit fortgeschrittenem UICC-Stadium einen stärkeren Abfall der Expressionslevel der miR-29a-3p und besonders der miR-150-5p unter Radiotherapie aufweisen. Für die miR-16-5p und -144-3p wurde hingegen kein stärkerer Abfall der Plasmalevel in Patienten mit fortgeschrittenen UICC-Stadien beobachtet.

Zusammenfassend finden andere Studien ebenfalls einen Zusammenhang von miRNA-Expressionsleveln mit dem UICC-Stadium in NSCLC-Patienten, welcher jedoch z. T. im Gegensatz

zu den eigenen Ergebnissen steht. Der Zusammenhang zwischen den Expressionsleveln der miR-16-5p, -29a-3p, -144-3p und -150-5p zum UICC-Stadium während bzw. nach einer Bestrahlung wurde bislang nicht untersucht.

5.8 Zusammenhang der miRNA-Expressionslevel mit dem Gesamtüberleben

Während sich vor Beginn der Radiotherapie kein Zusammenhang der miRNA-Expressionslevel mit dem Gesamtüberleben der Patienten ergab, bestand eine prognostische Wertigkeit einzelner miRNA während bzw. nach Bestrahlung. Zum Zeitpunkt T1 ergab sich eine prognostische Bedeutung der miR-29a-3p und zum Zeitpunkt T2 für die miR-144-3p und im Trend für die miR-16-5p und -29a-3p. Patienten mit hohen miRNA-Expressionsleveln wiesen das bessere Gesamtüberleben auf. In der multivariablen Cox-Regression erwiesen sich die einzelnen miRNA als vom UICC-Stadium abhängige prognostische Marker. Dies steht im Einklang mit dem gefundenen Zusammenhang der miRNA-Expressionslevel zum UICC-Stadium, welcher sich im vorliegenden Studienkollektiv nach Bestrahlung manifestierte.

Die miR-29a-3p zeigte schon nach Bestrahlung mit 20 Gy (T1) einen prognostischen Wert und im Trend auch nach Ende der Bestrahlung (T2) (s. Abbildungen 19, 21). Die miR-29a ist auch Teil einer von Joerger et al. per Microarray entwickelten prognostischen Signatur aus sechs zirkulierenden miRNA (miR-29a, -542-5p, -502-3p, -376a, -500a, -424) für NSCLC-Patienten unter Chemotherapie. Diese zeigte in 49 Patienten nach 10 Monaten eine Hazard-Ratio von HR = 0,66 (95 %-KI = 0,53–0,82). Im Gegensatz zu den eigenen Ergebnissen besaßen Patienten mit hohen Expressionsleveln der miR-29a-3p eine ungünstige Prognose (Joerger et al. 2014). Dabei sind die unterschiedliche Messmethodik, Therapieform, Beobachtungsdauer und geringe Fallzahlen der von Joerger et al. eingeschlossenen Patienten zu beachten, weshalb keine direkte Vergleichbarkeit gegeben ist.

Für die miR-29a wurde in NSCLC-Zelllinien ein suppressiver Effekt auf das proliferative und proinvasive Gen CDC42 nachgewiesen (Li et al. 2017). Ein tumorsuppressiver Effekt kann die in eigenen Untersuchungen gefundene schlechte Prognose von Patienten mit niedrigen Expressionsleveln der miR-29a-3p erklären. Weiterhin kann diese vom UICC-Stadium abhängige prognostische Bedeutung auch mit der in diesem Kollektiv nachgewiesenen, unter Radiatio aufgetretenen Assoziation der miR-29a-3p zum UICC-Stadium in Zusammenhang stehen.

Nach Bestrahlung (T2) ergab sich eine prognostische Aussagekraft der Expressionslevel der miR-144-3p-Level mit einem besseren Gesamtüberleben in Patienten mit höheren Plasma-Expressionsleveln (s. Abbildung 22). Dies bestätigen die Ergebnisse von Wu et al., welche in 129 Patienten mit Adenokarzinom der Lunge per RT-qPCR ein besseres Gesamtüberleben innerhalb

der Patienten mit höheren Plasmaleveln der miR-144-3p fanden ($p = 0,003$). Für Patienten mit Plattenepithelkarzinom der Lunge fanden die Autoren hingegen keinen Zusammenhang. In NSCLC-Zelllinien konnte ein antiproliferativer Effekt der miR-144-3p nachgewiesen werden (Wu et al. 2016). Die miR-144 scheint in verschiedenem Tumorgewebe eine tumorsuppressive Funktion auszuüben, so auch in Mamma-, Magen- hepatozellulären und Nierenzellkarzinomen (Liang et al. 2017), (Liu et al. 2015), (Liu et al. 2016), (Pan et al. 2016). In Tumoren mit einer höheren Wachstumsrate zeigte sich die miR-144 herunterreguliert (Boeri et al. 2011). Diese Studien unterstützen die eigenen Untersuchungen, welche niedrige miR-144-3p-Plasmaspiegel nach einer Bestrahlung mit einer schlechten Prognose identifizierten.

Ein weiterer Zusammenhang der miR-144-5p besteht zur Radiosensitivität. Sie förderte *in vitro* die Sensitivität von NSCLC-Zellen gegenüber Bestrahlung (Song et al. 2018). Dieser Zusammenhang könnte ebenfalls das bessere Überleben nach Radiotherapie bei höheren miR-144-3p-Leveln erklären. Möglicherweise ist die miR-144-3p als prädiktiver Marker für NSCLC-Patienten unter Radiotherapie anzusehen. In dem vorliegenden Studienkollektiv ergaben sich erstmals Hinweise auf eine solche Bedeutung der Plasmalevel der miR-144-3p in NSCLC-Patienten unter Radiotherapie.

In diesem Kollektiv ergab sich für die miR-16-5p im Trend eine prognostische Bedeutung nach Ende der Radiotherapie ($p = 0,061$). Für die miR-16-5p wurde *in vitro* ein tumorsuppressiver Effekt nachgewiesen (Ke et al. 2013), (Liu et al. 2019), (Wang et al. 2018a). Diese Befunde unterstützen ebenfalls das in eigenen Untersuchungen gefundene im Trend bessere Gesamtüberleben in Patienten mit höheren Expressionsleveln nach einer Radiotherapie.

Die drei miRNA miR-16-5p, -29a-3p und -144-3p zeigten erst nach einer Bestrahlung einen Zusammenhang der Plasmalevel zum Gesamtüberleben der Patienten. Es handelt sich dabei um eine vom UICC-Stadium abhängige prognostische Bedeutung. Die Bestrahlung scheint die prognostische Bedeutung zu verstärken, da sich vor Beginn der Radiotherapie kein Zusammenhang zum Gesamtüberleben zeigte. Auch der Zusammenhang zum UICC-Stadium zeigte sich erst unter Bestrahlung. Es scheint daher einen unterschiedlichen Mechanismus zwischen Patienten mit niedrigem und fortgeschrittenem Stadium in der molekularen Reaktion der miRNA auf eine Bestrahlung zu geben.

Obgleich die miR-150-5p eine bedeutende Änderung unter Radiotherapie zeigte, ergaben eigene Berechnungen keine prognostische Bedeutung der miR-150-5p zu allen untersuchten Zeitpunkten. Die bisherige Studienlage zur prognostischen Bedeutung der miR-150-5p ist heterogen. Es fand sich einerseits eine negative prognostische Bedeutung für hohe Gewebelevel der miR-150 (Yin et al. 2015). Andererseits wurde auch für niedrige Expressionslevel der miR-

150-5p in NSCLC-Zelllinien eine negative prognostische Bedeutung unter Nutzung der TCGA-Datenbank gefunden (Misono et al. 2019).

Für die gepoolte Variable aller vier miRNA (KmiR) ergab sich eine prognostische Bedeutung nach Ende der Radiotherapie mit einem besseren Gesamtüberleben der Patienten, in welchen mindestens eine der vier miRNA Expressionslevel oberhalb des Medians aufwies (s. Abbildung 23). Diese Variable erwies sich in der multivariablen Cox-Regression als vom UICC-Stadium unabhängiger Prognosemarker.

In der klinischen Anwendung erscheint die Zusammenfassung mehrerer miRNA angesichts der teilweise heterogenen Studienergebnisse geeigneter zu sein als die Anwendung einzelner miRNA. Ein gepooltes Tool kann Störfaktoren ausgleichen und scheint weniger fehleranfällig als einzelne miRNA zu sein. Verschiedene Studien haben diagnostische und prognostische miRNA-Signaturen entwickelt, welche jedoch keine einheitliche Zusammensetzung aufweisen. Hierbei fand sich eine Bedeutung von einerseits zellulären miRNA als auch zirkulierenden miRNA. Yu et al. entwickelten per RT-qPCR in einer Trainingskohorte aus 56 NSCLC-Patienten eine miRNA-Signatur aus fünf miRNA (miR-221, let-7a, miR-137, -372, -187) im Tumorgewebe, welche die Patienten in eine Hoch- und eine Niedrigrisikogruppe einteilte. In einer Testkohorte aus ebenfalls 56 NSCLC-Patienten ergab sich ein besseres medianes Gesamtüberleben der Patienten in der Niedrigrisikogruppe der miRNA-Signatur ($p = 0,008$) (Yu et al. 2008). In einer Kohorte aus 243 Patienten mit NSCLC entwickelten Hu et al. eine Signatur aus vier miRNA im Serum (miR-486, -30d, -1, -499), welche sich als unabhängiger Prognosemarker für das Gesamtüberleben erwies (Hu et al. 2010). Boeri et al. entwickelten in 38 Patienten mit NSCLC ein Tool aus den Ratios von 10 verschiedenen miRNA zur miR-486-5p im Plasma zur prognostischen Stratifizierung von NSCLC-Patienten bei Diagnosestellung. Durch die selben Autoren wurden miRNA-Signaturen für die Entdeckung von Hochrisikopatienten entwickelt (Boeri et al. 2011). Ein diagnostisches Panel aus 24 miRNA fanden Wozniak et al. in 100 Patienten mit NSCLC im Frühstadium, welches eine AUC von 0,92 erreichte (Wozniak et al. 2015). Eigene Untersuchungen konnten erstmals die Kombination der miR-16-5p, -29a-3p, -144-3p und 150-5p als unabhängigen prognostischen Marker für Patienten nach Radiotherapie nachweisen.

Eigene Untersuchungen zeigten im Einklang mit den Ergebnissen anderer Autoren, dass ein Zusammenhang zwischen den miRNA-Expressionsleveln mit dem Gesamtüberleben besteht, obgleich z. T. unterschiedliche Zusammenhänge gefunden wurden. Erstmals wurden in diesem Kollektiv Patienten unter bzw. nach Radiatio untersucht. Patienten mit höheren miRNA-Expressionsleveln wiesen hierbei das bessere Gesamtüberleben auf. Insbesondere die Kombination der vier miRNA (KmiR) erwies sich nach Ende der Radiotherapie als vom UICC-Stadium unabhängiger Prognosemarker.

Das prognostische und diagnostische Potenzial zirkulierender miRNA ist für NSCLC-Patienten bei Weitem nicht ausgeschöpft und besonders vielversprechend erscheint die Kombination mehrerer miRNA. Weitere Studien sind notwendig, um die Bedeutung der zirkulierenden miR-16-5p, -29a-3p, -144-3p und -150-5p für NSCLC-Patienten zu klären.

5.9 Fazit und Ausblick

Zirkulierende miRNA stellen leicht zugängliche, vielversprechende Biomarker mit prädiktiver, diagnostischer und prognostischer Wertigkeit dar (Cacheux et al. 2019), (Mitchell et al. 2008). MiRNA-basierte diagnostische Tools befinden sich für zahlreiche Erkrankungen wie bspw. Osteoporose, Alzheimer-Demenz und kardiovaskuläre Erkrankungen in der klinischen Testung (Bonneau et al. 2019). Für Patienten mit NSCLC fanden sich in zahlreichen Studien Unterschiede zwischen den miRNA-Expressionsleveln von Erkrankten und Gesunden. Ein großes Problem ist die geringe Konkordanz zwischen verschiedenen Studien (Lampignano et al. 2020), (Rijavec et al. 2019). Diese ergibt sich zum Teil aus der fehlenden Standardisierung der Quantifizierung insbesondere zirkulierender miRNA, welche eine große Herausforderung zur Nutzung im klinischen Alltag darstellt.

Auch zur prognostischen Stratifizierung von NSCLC-Patienten können die leicht zugänglichen miRNA im Plasma dienen. Verschiedene Studien und auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten ein Zusammenhang zwischen Plasma-miRNA-Expressionsleveln und dem Überleben der Patienten. Es besteht jedoch eine hohe Inkonsistenz der gefundenen Ergebnisse. In dem in dieser Studie untersuchten Kollektiv zeigte sich ein Zusammenhang einzelner miRNA zu klinischen Parametern wie dem UICC-Stadium und dem Gesamtüberleben während bzw. nach einer Radiotherapie. Insbesondere die Kombination der vier miRNA ergab einen vom UICC-Stadium unabhängigen Prognosemarker.

Einen Lösungsansatz für die einheitliche Quantifizierung zirkulierender miRNA bietet die ddPCR mit der Möglichkeit zur absoluten Quantifizierung ohne Notwendigkeit eines Referenzgens. Eigene Untersuchungen zeigten eine Eignung der Methode zur Messung zirkulierender miRNA in NSCLC-Patienten, obgleich im klinischen Alltag Einflussgrößen wie eine Hämolyse der Proben, unterschiedliche miRNA-Ausbeute aus dem Patientenplasma oder Lagerungszeiten des Materials berücksichtigt werden müssen.

Eine Bestrahlung kann Einfluss auf die zellulären und Plasma-Expressionslevel verschiedener miRNA haben. Diese können im Zusammenhang mit dem Therapieansprechen und der Radiosensitivität des Tumors stehen. Sie bieten ein vielversprechendes diagnostisches und prognostisches Tool in der Radiotherapie und wurden bisher nur in wenigen Studien untersucht. Erstmals wurden in der vorliegenden Studie zirkulierende miRNA in einem großen Kollektiv von

NSCLC-Patienten unter Radiatio (n = 178) mittels absoluter Quantifizierung per ddPCR zu drei Zeitpunkten im Therapieverlauf untersucht.

Auch ein therapeutischer Einsatz von miRNA ist bereits Gegenstand der Forschung. Tumorsuppressive miRNA kommen in Form sogenannter miRNA-Mimics für die Therapie von Erkrankungen, bei denen erniedrigte miRNA-Expressionslevel eine pathogenetische Rolle spielen, infrage. Ebenso ist bei onkogenen miRNA der Einsatz von miRNA-Inhibitoren, spezifisch-antagonistischen Sequenzen, denkbar. Probleme beim therapeutischen Einsatz stellen aktuell die geeignete Darreichung, die Stabilität der verabreichten miRNA-Therapeutika und Off-Target-Effekte wie eine Immunaktivierung und damit einhergehende Nebenwirkungen dar (Bader et al. 2011), (Forterre et al. 2020), (Li und Rana 2014).

Für die miR-144-5p als Biomarker für das Ansprechen auf eine Radiotherapie wurde bereits ein therapeutischer Ansatz als Mittel zur Steigerung der Radiosensitivität diskutiert (Song et al. 2018). Für die miR-29a wurde entdeckt, dass sie im Mäusemodell das Fortschreiten einer Bleomycin-induzierten Lungenfibrose hemmen kann, was einen präventiven Einsatz auch im Menschen denkbar macht (Xiao et al. 2012). Agonisten der miR-29-Familie, bspw. Remlarsen als miR-29b-Agonist, befinden sich in klinischen Untersuchungen zur Prävention profibrotischer Hauterkrankungen (Gallant-Behm et al. 2019). Auch die miR-150-5p bietet sich aufgrund ihrer Interaktion mit dem Tumorsuppressorgen *SRCIN1* als therapeutisches Ziel für NSCLC-Patienten an (Zhang et al. 2018). Der Einsatz von Cobomarsen als Antagonist der miR-155, einer weiteren onkogenen miRNA, für die Therapie von Leukämie- und Lymphompatienten befindet sich bereits in Phase-II-Studien (Seto et al. 2018). Für das Lungenkarzinom stellen die Tumorsuppressoren let-7 und miR-34 die am meisten untersuchten Studienobjekte dar und verschiedene Formen der miRNA-Mimics befinden sich in der klinischen Forschung, auch ein miR-21-Antagonist steht zur Debatte (Florczuk et al. 2017), (Forterre et al. 2020). Die miR-16 wurde als therapeutisches Ziel in Zellen des malignen Mesothelioms untersucht. *In vitro* führte die Gabe von miR-15/16-Agonisten zu einer Wachstumshemmung der Krebszellen und einer Sensitivierung für die Chemotherapeutika Permetrexed und Gemcitabine. *In vivo* führte eine intravenöse Applikation im Maus-Xenograft zu einer dosisabhängigen Verkleinerung des Tumors (Reid et al. 2013).

Am weitesten fortgeschritten ist der therapeutische Einsatz eines miR-122-Antagonisten zur Therapie der Hepatitis C (Lanford et al. 2010). Die Mittel Miravirsen (Roche Santaris) und RG-101 (Regulus Therapeutics) fußen auf diesem Prinzip und befinden sich zur Zeit in Phase-II-Studien (Bonneau et al. 2019), (Janssen et al. 2013).

Diese Beispiele zeigen, dass miRNA ein großes Potenzial für den diagnostischen, prognostischen und prädiktiven Einsatz nicht nur für Patienten mit NSCLC unter Radiotherapie aufweisen.

Aber fast 30 Jahre nach ihrer Entdeckung sind miRNA trotz ihres vielversprechenden Potenzials noch nicht in der klinischen Praxis angekommen. Für zukünftige Analysen zirkulierender miRNA scheint die allgemeine Etablierung eines standardisierten Vorgehens notwendig um die Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Studien zu gewährleisten. Hierfür sollten einheitliche Protokolle bezüglich Blutentnahme, Probenverarbeitung, miRNA-Isolation aus Plasma bzw. Serum, cDNA-Synthese und Amplifikation entwickelt werden. Die ddPCR als Methode zur absoluten Quantifizierung einzelner miRNA erwies sich in eigenen Untersuchungen als geeignet. Um weitere interessante miRNA zu entdecken, bieten sich Methoden wie bspw. Microarrays oder Sequenzierung an. Auch die molekularen Mechanismen der miRNA sollten zum besseren Verständnis weiter aufgeklärt werden.

6 Zusammenfassung

Das Bronchialkarzinom ist weltweit eine der häufigsten Krebserkrankungen mit den insgesamt meisten Krebstodesfällen und wird häufig erst im fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert. Um eine frühere Diagnosestellung zu ermöglichen und das Therapieansprechen für Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom (NSCLC) weiter zu verbessern, werden neue Biomarker mit diagnostischer, prognostischer und prädiktiver Aussagekraft benötigt.

Ein vielversprechendes Feld stellen mikro-RNA (miRNA) dar, welche auch als zirkulierende miRNA im Blut zu finden sind und Assoziationen zum Vorliegen und Fortschritt maligner Veränderungen zeigen können. Einige Studien zeigten den Einfluss einer Bestrahlung auf zirkulierende miRNA. Problematisch ist bei der Quantifizierung mittels RT-qPCR das Fehlen geeigneter Referenz-miRNA im Blut. Die droplet digital PCR (ddPCR) ist eine alternative PCR-Methode, mit der die Quantifizierung ohne Referenz-miRNA möglich ist.

In die Untersuchungen wurden 178 NSCLC-Patienten vor (T0, n = 178), nach Bestrahlung mit 20 Gy (T1, n = 130) und nach Ende der Strahlentherapie (T2, n = 147) sowie 30 gesunde Blutspender eingeschlossen. Aus Blutplasma wurde die Gesamt-miRNA mittels miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit (Qiagen) isoliert. Mittels RT-qPCR und ddPCR erfolgte die Messung von in der Literatur identifizierten miRNA mit tumorbiologischer bzw. strahlenbiologischer Bedeutung. Diese umfassten die miR-16-5p, -21-5p, -29a-3p, -144-3p, -150-5p und -155-5p. Die Expressionslevel von vier miRNA wurden im Verlauf der Strahlentherapie bzw. mit den klinischen Daten mittels Korrelationsanalyse nach Spearman-Rho, Kruskal-Wallis-Test, Mann-Whitney-U-Test und Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben statistisch untersucht. Zudem erfolgten Überlebensanalysen mittels Kaplan-Meier-Methode und per Cox-Regression und sowie die Messung und Analyse wichtiger Einflussgrößen wie Hb-Wert, miRNA-Gesamtkonzentration und Lagerungsdauer der Proben.

Der Vergleich der Detektionsmethoden RT-qPCR und ddPCR zeigte exponentielle Funktionen mit R^2 -Werten von 0,73–0,99, was auf eine Vergleichbarkeit hindeutet. Die miR-16-6p wies im Vergleich untereinander ca. 3-fach (miR-144-3p) bzw. 20-fach (miR-29a-3p, -150-5p) höhere mediane Expressionslevel auf. Es bestanden starke Korrelationen der vier miRNA untereinander mit Korrelationskoeffizienten von 0,79–0,90. Die miR-16-5p erwies sich in diesem Studienkollektiv durch eine starke Schwankung der Expression nicht als geeignete Referenz-miRNA für die RT-qPCR. Der Vergleich von Patienten und Blutspendern ergab deutliche Unterschiede der miR-16-5p ($p = 0,001$), -144-3p ($p < 0,001$) und -150-5p ($p < 0,001$). Die Wertung der Ergebnisse ist jedoch durch uneinheitliche präanalytische Faktoren wie die Lagerungsdauer eingeschränkt. Die Analyse im Therapieverlauf ergab reduzierte Expressionslevel der miR-150-5p zwischen T0 und T1 ($p = 0,042$), T0 und T2 ($p < 0,001$) sowie T1

und T2 ($p < 0,001$), insbesondere innerhalb der Patienten mit UICC-Stadium III und IV. Die miR-29a-3p zeigte nur innerhalb der Patienten mit UICC-Stadium IV sinkende Expressionslevel unter Bestrahlung zwischen T0 und T2 ($p = 0,015$). Die miR-16-5p und -144-3p zeigten keine relevanten Veränderungen im Therapieverlauf.

Prätherapeutisch untersuchte miRNA-Level wiesen keinen Zusammenhang zu prognostisch relevanten klinischen Parametern und dem Gesamtüberleben auf. Erst nach Strahlentherapie (T2) ergaben sich Zusammenhänge der Expressionslevel der miR-29a-3p, -144-3p und -150-5p zum UICC-Stadium. Patienten mit fortgeschrittenem Stadium wiesen niedrigere Level der untersuchten miRNA auf. Zum Gesamtüberleben ergab sich während bzw. nach Bestrahlung ein statistisch signifikanter Zusammenhang der untersuchten miRNA, wobei das Überleben der Gruppe mit höheren miRNA-Leveln günstiger war. Besonders die miR-29a-3p ($p = 0,034$) und -144-3p ($p = 0,026$) waren nach einer Bestrahlung (T1 bzw. T2) signifikant mit dem Gesamtüberleben assoziiert. Die Kombination aller vier miRNA (KmiR) nach Bestrahlung (T2) erwies sich als unabhängiger Prognosemarker.

Durch den Einsatz der ddPCR konnte die Problematik der heterogenen Normierung zirkulierender miRNA mittels RT-qPCR vermieden werden. Im Einklang mit anderen Autoren steht der Abfall der miRNA-Expressionslevel der miR-150-5p unter Strahlentherapie. Es ergaben sich klare prognostische Zusammenhänge der miRNA mit dem Gesamtüberleben und eine Assoziation mit klinischen und prognostischen Parametern besonders nach Bestrahlung. Dies betont die prädiktive Wertigkeit der miRNA. Anhaltspunkte zur diagnostischen Wertigkeit der miRNA wurden ebenfalls gefunden.

Die Möglichkeiten der zirkulierenden miRNA als Biomarker sind längst noch nicht ausgeschöpft und bieten eine vielversprechende Perspektive.

7 Literatur

- Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, Mitchell PS, Bennett CF, Pogosova-Agadjanyan EL, Stirewalt DL, Tait JF, Tewari M (2011) Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108:5003–5008. doi:10.1073/pnas.1019055108
- Aushev VN, Zborovskaya IB, Laktionov KK, Girard N, Cros M-P, Herceg Z, Krutovskikh V (2013) Comparisons of microRNA patterns in plasma before and after tumor removal reveal new biomarkers of lung squamous cell carcinoma. *PLoS ONE* 8:e78649. doi:10.1371/journal.pone.0078649
- Babar IA, Czocho J, Steinmetz A, Weidhaas JB, Glazer PM, Slack FJ (2011) Inhibition of hypoxia-induced miR-155 radiosensitizes hypoxic lung cancer cells. *Cancer Biol Ther* 12:908–914. doi:10.4161/cbt.12.10.17681
- Bader AG, Brown D, Stoudemire J, Lammers P (2011) Developing therapeutic microRNAs for cancer. *Gene Ther* 18:1121–1126. doi:10.1038/gt.2011.79
- Bartel DP (2004) MicroRNAs. *Cell* 116:281–297. doi:10.1016/S0092-8674(04)00045-5
- Bartel DP (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136:215–233. doi:10.1016/j.cell.2009.01.002
- Bautista-Sánchez D, Arriaga-Canon C, Pedroza-Torres A, La Rosa-Velázquez IA de, González-Barríos R, Contreras-Espinosa L, Montiel-Manríquez R, Castro-Hernández C, Fragoso-Ontiveros V, Álvarez-Gómez RM, Herrera LA (2020) The Promising Role of miR-21 as a Cancer Biomarker and Its Importance in RNA-Based Therapeutics. *Mol Ther Nucleic Acids* 20:409–420. doi:10.1016/j.omtn.2020.03.003
- Beheshti A, Stevenson K, Vanderburg C, Ravi D, McDonald JT, Christie AL, Shigemori K, Jester H, Weinstock DM, Evens AM (2019) Identification of Circulating Serum Multi-MicroRNA Signatures in Human DLBCL Models. *Sci Rep* 9:17161. doi:10.1038/s41598-019-52985-x
- Bianchi F, Nicassio F, Marzi M, Belloni E, Dall'olio V, Bernard L, Pelosi G, Maisonneuve P, Veronesi G, Di Fiore PP (2011) A serum circulating miRNA diagnostic test to identify asymptomatic high-risk individuals with early stage lung cancer. *EMBO Mol Med* 3:495–503. doi:10.1002/emmm.201100154
- Bio-Rad Laboratories Droplet Digital PCR Applications-Guide. https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6407.pdf. Zugegriffen: 21. Oktober 2022
- Blondal T, Jensby Nielsen S, Baker A, Andreasen D, Mouritzen P, Wrang Teilum M, Dahlsveen IK (2013) Assessing sample and miRNA profile quality in serum and plasma or other biofluids. *Methods* 59:S1-6. doi:10.1016/j.ymeth.2012.09.015
- Boeri M, Verri C, Conte D, Roz L, Modena P, Facchinetti F, Calabrò E, Croce CM, Pastorino U, Sozzi G (2011) MicroRNA signatures in tissues and plasma predict development and prognosis of computed tomography detected lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:3713–3718. doi:10.1073/pnas.1100048108
- Bonneau E, Neveu B, Kostantin E, Tsongalis GJ, Guire V de (2019) How close are miRNAs from clinical practice? A perspective on the diagnostic and therapeutic market. *EJIFCC* 30:114–127
- Bradley JD, Paulus R, Komaki R, Masters G, Blumenschein G, Schild S, Bogart J, Hu C, Forster K, Magliocco A, Kavadi V, Garces YI, Narayan S, Iyengar P, Robinson C, Wynn RB, Koprowski C, Meng

- J, Beitler J, Gaur R, Curran W, Choy H (2015) Standard-dose versus high-dose conformal radiotherapy with concurrent and consolidation carboplatin plus paclitaxel with or without cetuximab for patients with stage IIIA or IIIB non-small-cell lung cancer (RTOG 0617): a randomised, two-by-two factorial phase 3 study. *Lancet Oncol* 16:187–199. doi:10.1016/S1470-2045(14)71207-0
- Bravo V, Rosero S, Ricordi C, Pastori RL (2007) Instability of miRNA and cDNAs derivatives in RNA preparations. *Biochem Biophys Res Commun* 353:1052–1055. doi:10.1016/j.bbrc.2006.12.135
- Brognaard J, Clark AS, Ni Y, Dennis PA (2001) Akt/protein kinase B is constitutively active in non-small cell lung cancer cells and promotes cellular survival and resistance to chemotherapy and radiation. *Cancer Res* 61:3986–3997
- Cacheux J, Bancaud A, Leichlé T, Cordelier P (2019) Technological Challenges and Future Issues for the Detection of Circulating MicroRNAs in Patients With Cancer. *Front Chem* 7:815. doi:10.3389/fchem.2019.00815
- Calin GA, Croce CM (2006) MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer* 6:857–866. doi:10.1038/nrc1997
- Campomenosi P, Gini E, Noonan DM, Poli A, D'Antona P, Rotolo N, Dominioni L, Imperatori A (2016) A comparison between quantitative PCR and droplet digital PCR technologies for circulating microRNA quantification in human lung cancer. *BMC Biotechnol* 16:60. doi:10.1186/s12896-016-0292-7
- Cerutti H, Casas-Mollano JA (2006) On the origin and functions of RNA-mediated silencing: from protists to man. *Curr Genet* 50:81–99. doi:10.1007/s00294-006-0078-x
- Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, Guo J, Zhang Y, Chen J, Guo X, Li Q, Li X, Wang W, Zhang Y, Wang J, Jiang X, Xiang Y, Xu C, Zheng P, Zhang J, Li R, Zhang H, Shang X, Gong T, Ning G, Wang J, Zen K, Zhang J, Zhang C-Y (2008) Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res* 18:997–1006. doi:10.1038/cr.2008.282
- Chen X, Liang H, Zhang J, Zen K, Zhang C-Y (2012) Secreted microRNAs: a new form of intercellular communication. *Trends Cell Biol* 22:125–132. doi:10.1016/j.tcb.2011.12.001
- Chen Y-J, Guo Y-N, Shi K, Huang H-M, Huang S-P, Xu W-Q, Li Z-Y, Wei K-L, Gan T-Q, Chen G (2019) Down-regulation of microRNA-144-3p and its clinical value in non-small cell lung cancer: a comprehensive analysis based on microarray, miRNA-sequencing, and quantitative real-time PCR data. *Respir Res* 20:48. doi:10.1186/s12931-019-0994-1
- Chim SSC, Shing TKF, Hung ECW, Leung T, Lau T, Chiu RWK, Lo YMD (2008) Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma. *Clin Chem* 54:482–490. doi:10.1373/clinchem.2007.097972
- Cookson VJ, Bentley MA, Hogan BV, Horgan K, Hayward BE, Hazelwood LD, Hughes TA (2012) Circulating microRNA profiles reflect the presence of breast tumours but not the profiles of microRNAs within the tumours. *Cell Oncol (Dordr)* 35:301–308. doi:10.1007/s13402-012-0089-1
- Creemers EE, Tijssen AJ, Pinto YM (2012) Circulating microRNAs: novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease? *Circ Res* 110:483–495. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.247452

- Cui Y, Su W-Y, Xing J, Wang Y-C, Wang P, Chen X-Y, Shen Z-Y, Cao H, Lu Y-Y, Fang J-Y (2011) MiR-29a inhibits cell proliferation and induces cell cycle arrest through the downregulation of p42.3 in human gastric cancer. *PLoS One* 6:e25872. doi:10.1371/journal.pone.0025872
- Cui E, Li H, Hua F, Wang B, Mao W, Feng X, Li J, Wang X (2013) Serum microRNA 125b as a diagnostic or prognostic biomarker for advanced NSCLC patients receiving cisplatin-based chemotherapy. *Acta Pharmacol Sin* 34:309–313. doi:10.1038/aps.2012.125
- Cushing L, Kuang PP, Qian J, Shao F, Wu J, Little F, Thannickal VJ, Cardoso WV, Lü J (2011) miR-29 is a major regulator of genes associated with pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 45:287–294. doi:10.1165/rcmb.2010-0323OC
- Dai F-Q, Li C-R, Fan X-Q, Tan L, Wang R-T, Jin H (2019) miR-150-5p Inhibits Non-Small-Cell Lung Cancer Metastasis and Recurrence by Targeting HMGA2 and β -Catenin Signaling. *Mol Ther Nucleic Acids* 16:675–685. doi:10.1016/j.omtn.2019.04.017
- D'Antona P, Cattoni M, Dominioni L, Poli A, Moretti F, Cinquetti R, Gini E, Daffrè E, Noonan DM, Imperatori A, Rotolo N, Campomenosi P (2019) Serum miR-223: A Validated Biomarker for Detection of Early-Stage Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 28:1926–1933. doi:10.1158/1055-9965.EPI-19-0626
- DGHO (2019) Lungenkarzinom, nicht-kleinzellig (NSCLC). <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/lungenkarzinom-nicht-kleinzellig-nsclc/@@guideline/html/index.html>. Zugegriffen: 21. Oktober 2022
- Di Leva G, Croce CM (2013) miRNA profiling of cancer. *Curr Opin Genet Dev* 23:3–11. doi:10.1016/j.gde.2013.01.004
- Dinh T-KT, Fendler W, Chałubińska-Fendler J, Acharya SS, O'Leary C, Deraska PV, D'Andrea AD, Chowdhury D, Kozono D (2016) Circulating miR-29a and miR-150 correlate with delivered dose during thoracic radiation therapy for non-small cell lung cancer. *Radiat Oncol* 11:61. doi:10.1186/s13014-016-0636-4
- Du R, Jiang F, Yin Y, Xu J, Li X, Hu L, Wang X (2021) Knockdown of lncRNA X inactive specific transcript (XIST) radiosensitizes non-small cell lung cancer (NSCLC) cells through regulation of miR-16-5p/WEE1 G2 checkpoint kinase (WEE1) axis. *Int J Immunopathol Pharmacol* 35:2058738420966087. doi:10.1177/2058738420966087
- Dutta PR, Maity A (2007) Cellular responses to EGFR inhibitors and their relevance to cancer therapy. *Cancer Lett* 254:165–177. doi:10.1016/j.canlet.2007.02.006
- Fabbri M, Paone A, Calore F, Galli R, Gaudio E, Santhanam R, Lovat F, Fadda P, Mao C, Nuovo GJ, Zanesi N, Crawford M, Ozer GH, Wernicke D, Alder H, Caligiuri MA, Nana-Sinkam P, Perrotti D, Croce CM (2012) MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:E2110-6. doi:10.1073/pnas.1209414109
- Fan L, Qi H, Teng J, Su B, Chen H, Wang C, Xia Q (2016) Identification of serum miRNAs by nano-quantum dots microarray as diagnostic biomarkers for early detection of non-small cell lung cancer. *Tumor Biol*. 37:7777–7784. doi:10.1007/s13277-015-4608-3
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806–811. doi:10.1038/35888

- Florczuk M, Szpechcinski A, Chorostowska-Wynimko J (2017) miRNAs as Biomarkers and Therapeutic Targets in Non-Small Cell Lung Cancer: Current Perspectives. *Target Oncol* 12:179–200. doi:10.1007/s11523-017-0478-5
- Forterre A, Komuro H, Aminova S, Harada M (2020) A Comprehensive Review of Cancer MicroRNA Therapeutic Delivery Strategies. *Cancers (Basel)* 12:1852. doi:10.3390/cancers12071852
- Fortina P, Surrey S (2008) Digital mRNA profiling. *Nat Biotechnol* 26:293–294. doi:10.1038/nbt0308-293
- Friedman RC, Farh KK-H, Burge CB, Bartel DP (2009) Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 19:92–105. doi:10.1101/gr.082701.108
- Gallant-Behm CL, Piper J, Lynch JM, Seto AG, Hong SJ, Mustoe TA, Maari C, Pestano LA, Dalby CM, Jackson AL, Rubin P, Marshall WS (2019) A MicroRNA-29 Mimic (Remlarsen) Represses Extracellular Matrix Expression and Fibroplasia in the Skin. *J Invest Dermatol* 139:1073–1081. doi:10.1016/j.jid.2018.11.007
- Gao F, Liu P, Narayanan J, Yang M, Fish BL, Liu Y, Liang M, Jacobs ER, Medhora M (2017) Changes in miRNA in the lung and whole blood after whole thorax irradiation in rats. *Sci Rep* 7:44132. doi:10.1038/srep44132
- Garcia-Elias A, Alloza L, Puigdecenet E, Nonell L, Tajés M, Curado J, Enjuanes C, Díaz O, Bruguera J, Martí-Almor J, Comín-Colet J, Benito B (2017) Defining quantification methods and optimizing protocols for microarray hybridization of circulating microRNAs. *Sci Rep* 7:7725. doi:10.1038/s41598-017-08134-3
- Gilad S, Meiri E, Yogev Y, Benjamin S, Lebanony D, Yerushalmi N, Benjamin H, Kushnir M, Cholakh H, Melamed N, Bentwich Z, Hod M, Goren Y, Chajut A (2008) Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS One* 3:e3148. doi:10.1371/journal.pone.0003148
- Glinge C, Clauss S, Boddum K, Jabbari R, Jabbari J, Risgaard B, Tomsits P, Hildebrand B, Kääh S, Wakili R, Jespersen T, Tfelt-Hansen J (2017) Stability of Circulating Blood-Based MicroRNAs - Pre-Analytic Methodological Considerations. *PLoS One* 12:e0167969. doi:10.1371/journal.pone.0167969
- Goldstraw P, Chansky K, Crowley J, Rami-Porta R, Asamura H, Eberhardt WEE, Nicholson AG, Groome P, Mitchell A, Bolejack V (2016) The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *J Thorac Oncol* 11:39–51. doi:10.1016/j.jtho.2015.09.009
- Gray LH, Conger AD, Ebert M, Hornsey S, Scott OC (1953) The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy. *Br J Radiol* 26:638–648. doi:10.1259/0007-1285-26-312-638
- Greiner S, Schaudt C (2016) IASCL 2016. file:///C:/Users/User/Downloads/iaslc-2016.pdf. Zugriffen: 21. Oktober 2022
- Grunnet M, Sorensen JB (2012) Carcinoembryonic antigen (CEA) as tumor marker in lung cancer. *Lung Cancer* 76:138–143. doi:10.1016/j.lungcan.2011.11.012
- Hayden RT, Gu Z, Ingersoll J, Abdul-Ali D, Shi L, Pounds S, Caliendo AM (2013) Comparison of droplet digital PCR to real-time PCR for quantitative detection of cytomegalovirus. *J Clin Microbiol* 51:540–546. doi:10.1128/JCM.02620-12

- He Q, Fang Y, Lu F, Pan J, Wang L, Gong W, Fei F, Cui J, Zhong J, Hu R, Liang M, Le Fang, Wang H, Yu M, Zhang Z-F (2019) Analysis of differential expression profile of miRNA in peripheral blood of patients with lung cancer. *J Clin Lab Anal* 33:e23003. doi:10.1002/jcla.23003
- Hindson CM, Chevillet JR, Briggs HA, Gallichotte EN, Ruf IK, Hindson BJ, Vessella RL, Tewari M (2013) Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR. *Nat Methods* 10:1003–1005. doi:10.1038/nmeth.2633
- Hsieh FY, Lavori PW (2000) Sample-Size Calculations for the Cox Proportional Hazards Regression Model with Nonbinary Covariates. *Control Clin Trials* 21:552–560. doi:10.1016/S0197-2456(00)00104-5
- Hu Z, Chen X, Zhao Y, Tian T, Jin G, Shu Y, Chen Y, Xu L, Zen K, Zhang C, Shen H (2010) Serum microRNA signatures identified in a genome-wide serum microRNA expression profiling predict survival of non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 28:1721–1726. doi:10.1200/jco.2009.24.9342
- Hu Z, Cui Y, Zhou Y, Zhou K, Qiao X, Li C, Wang S (2016) MicroRNA-29a plays a suppressive role in non-small cell lung cancer cells via targeting LASP1. *Onco Targets Ther* 9:6999–7009. doi:10.2147/OTT.S116509
- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans (2004) Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Volume 83 Tobacco Smoke and Involuntary Smoking. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 83:1-1438.
- Jacob NK, Cooley JV, Yee TN, Jacob J, Alder H, Wickramasinghe P, Maclean KH, Chakravarti A (2013) Identification of sensitive serum microRNA biomarkers for radiation biodosimetry. *PLoS One* 8:e57603. doi:10.1371/journal.pone.0057603
- Janssen HLA, Reesink HW, Lawitz EJ, Zeuzem S, Rodriguez-Torres M, Patel K, van der Meer AJ, Patick AK, Chen A, Zhou Y, Persson R, King BD, Kauppinen S, Levin AA, Hodges MR (2013) Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *N Engl J Med* 368:1685–1694. doi:10.1056/NEJMoa1209026
- Jenike AE, Halushka MK (2021) miR-21: a non-specific biomarker of all maladies. *Biomark Res* 9:18. doi:10.1186/s40364-021-00272-1
- Jeong HC, Kim EK, Lee JH, Lee JM, Yoo HN, Kim JK (2011) Aberrant expression of let-7a miRNA in the blood of non-small cell lung cancer patients. *Mol Med Rep* 4:383–387. doi:10.3892/mmr.2011.430
- Joerger M, Baty F, Früh M, Droege C, Stahel RA, Betticher DC, Moos R von, Ochsenbein A, Pless M, Gautschi O, Rothschild S, Brauchli P, Klingbiel D, Zappa F, Brutsche M (2014) Circulating microRNA profiling in patients with advanced non-squamous NSCLC receiving bevacizumab/erlotinib followed by platinum-based chemotherapy at progression (SAKK 19/05). *Lung Cancer* 85:306–313. doi:10.1016/j.lungcan.2014.04.014
- Ke Y, Zhao W, Xiong J, Cao R (2013) Downregulation of miR-16 promotes growth and motility by targeting HDGF in non-small cell lung cancer cells. *FEBS Lett* 587:3153–3157. doi:10.1016/j.febslet.2013.08.010
- Kirschner MB, Edelman JJB, Kao SC-H, Valley MP, van Zandwijk N, Reid G (2013) The Impact of Hemolysis on Cell-Free microRNA Biomarkers. *Front Genet* 4:94. doi:10.3389/fgene.2013.00094
- Koseoglu M, Hur A, Atay A, Cuhadar S (2011) Effects of hemolysis interference on routine biochemistry parameters. *Biochem Med (Zagreb)* 21:79–85. doi:10.11613/bm.2011.015

- Kraywinkel K, Schönfeld I (2018) Epidemiologie des nichtkleinzelligen Lungenkarzinoms in Deutschland. *Onkologie* 24:946–951. doi:10.1007/s00761-018-0480-2
- Kroh EM, Parkin RK, Mitchell PS, Tewari M (2010) Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). *Methods* 50:298–301. doi:10.1016/j.ymeth.2010.01.032
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Meyer J, Borkhardt A, Tuschl T (2003) New microRNAs from mouse and human. *RNA* 9:175–179. doi:10.1261/rna.2146903
- Lai Y-H, Chen W-N, Hsu T-C, Lin C, Tsao Y, Wu S (2020) Overall survival prediction of non-small cell lung cancer by integrating microarray and clinical data with deep learning. *Sci Rep* 10:4679. doi:10.1038/s41598-020-61588-w
- Lampignano R, Kloten V, Krahn T, Schlange T (2020) Integrating circulating miRNA analysis in the clinical management of lung cancer: Present or future? *Mol Aspects Med* 72:100844. doi:10.1016/j.mam.2020.100844
- Lanford RE, Hildebrandt-Eriksen ES, Petri A, Persson R, Lindow M, Munk ME, Kauppinen S, Ørum H (2010) Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science* 327:198–201. doi:10.1126/science.1178178
- Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, Pushkaran B, Liggins AP, Pulford K, Banham AH, Pezzella F, Boultonwood J, Wainscoat JS, Hatton CSR, Harris AL (2008) Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol* 141:672–675. doi:10.1111/j.1365-2141.2008.07077.x
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75:843–854. doi:10.1016/0092-8674(93)90529-Y
- Leyn P de, Dooms C, Kuzdzal J, Lardinois D, Passlick B, Rami-Porta R, Turna A, van Schil P, Venuta F, Waller D, Weder W, Zielinski M (2014) Revised ESTS guidelines for preoperative mediastinal lymph node staging for non-small-cell lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg* 45:787–798. doi:10.1093/ejcts/ezu028
- Li Z, Rana TM (2014) Therapeutic targeting of microRNAs: current status and future challenges. *Nat Rev Drug Discov* 13:622–638. doi:10.1038/nrd4359
- Li H, Ouyang R, Wang Z, Zhou W, Chen H, Jiang Y, Zhang Y, Liao M, Wang W, Ye M, Ding Z, Feng X, Liu J, Zhang B (2016) MiR-150 promotes cellular metastasis in non-small cell lung cancer by targeting FOXO4. *Sci Rep* 6:39001. doi:10.1038/srep39001
- Li Y, Wang Z, Li Y, Jing R (2017) MicroRNA-29a functions as a potential tumor suppressor through directly targeting CDC42 in non-small cell lung cancer. *Oncol Lett* 13:3896–3904. doi:10.3892/ol.2017.5888
- Li H, Liu J, Cao W, Xiao X, Liang L, Liu-Smith F, Wang W, Liu H, Zhou P, Ouyang R, Yuan Z, Liu J, Ye M, Zhang B (2019) C-myc/miR-150/EPG5 axis mediated dysfunction of autophagy promotes development of non-small cell lung cancer. *Theranostics* 9:5134–5148. doi:10.7150/thno.34887
- Liang H, Ye Z, Yin S, Mo W, Wang H, Zhao J, Liang G, Feng Z, Chen G, Luo D (2017) A comprehensive insight into the clinicopathologic significance of miR-144-3p in hepatocellular carcinoma. *Onco Targets Ther* 10:3405–3419. doi:10.2147/OTT.S138143

- Liu Z-L, Wang H, Liu J, Wang Z-X (2013) MicroRNA-21 (miR-21) expression promotes growth, metastasis, and chemo- or radioresistance in non-small cell lung cancer cells by targeting PTEN. *Mol Cell Biochem* 372:35–45. doi:10.1007/s11010-012-1443-3
- Liu J, Xue H, Zhang J, Suo T, Xiang Y, Zhang W, Ma J, Cai D, Gu X (2015) MicroRNA-144 inhibits the metastasis of gastric cancer by targeting MET expression. *J Exp Clin Cancer Res* 34:35. doi:10.1186/s13046-015-0154-5
- Liu F, Chen N, Xiao R, Wang W, Pan Z (2016) miR-144-3p serves as a tumor suppressor for renal cell carcinoma and inhibits its invasion and metastasis by targeting MAP3K8. *Biochem Biophys Res Commun* 480:87–93. doi:10.1016/j.bbrc.2016.10.004
- Liu G-P, Wang W-W, Lu W-Y, Shang A-Q (2019) The mechanism of miR-16-5p protection on LPS-induced A549 cell injury by targeting CXCR3. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 47:1200–1206. doi:10.1080/21691401.2019.1593998
- Löbrich M, Jeggo PA (2007) The impact of a negligent G2/M checkpoint on genomic instability and cancer induction. *Nat Rev Cancer* 7:861–869. doi:10.1038/nrc2248
- Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR (2005) MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435:834–838. doi:10.1038/nature03702
- Małachowska B, Tomasik B, Stawiski K, Kulkarni S, Guha C, Chowdhury D, Fendler W (2020) Circulating microRNAs as Biomarkers of Radiation Exposure: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 106:390–402. doi:10.1016/j.ijrobp.2019.10.028
- Marabita F, Candia P de, Torri A, Tegnér J, Abrignani S, Rossi RL (2016) Normalization of circulating microRNA expression data obtained by quantitative real-time RT-PCR. *Brief Bioinform* 17:204–212. doi:10.1093/bib/bbv056
- Matias-Garcia PR, Wilson R, Mussack V, Reischl E, Waldenberger M, Gieger C, Anton G, Peters A, Kuehn-Steven A (2020) Impact of long-term storage and freeze-thawing on eight circulating microRNAs in plasma samples. *PLoS One* 15:e0227648. doi:10.1371/journal.pone.0227648
- McDonald JS, Milosevic D, Reddi HV, Grebe SK, Algeciras-Schimnich A (2011) Analysis of circulating microRNA: preanalytical and analytical challenges. *Clin Chem* 57:833–840. doi:10.1373/clinchem.2010.157198
- McLellan SA, MacAulay C, Lam s, Garnis C (2014) Pre-profiling factors influencing serum microRNA levels. *BMC Clin Pathol* 14:27. doi:10.1186/1472-6890-14-27
- Mestdagh P, van Vlierberghe P, an de Weer, Muth D, Westermann F, Speleman F, Vandesompele J (2009) A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. *Genome Biol* 10:R64. doi:10.1186/gb-2009-10-6-r64
- Mestdagh P, Hartmann N, Baeriswyl L et al (2014) Evaluation of quantitative miRNA expression platforms in the microRNA quality control (miRQC) study. *Nat Methods* 11:809–815. doi:10.1038/nmeth.3014
- miRBase (21.11.2020) miRNA Entry for MI0000087; hsa-mir-29a. http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0000087. Zugegriffen: 21. November 2020
- Misono S, Seki N, Mizuno K, Yamada Y, Uchida A, Sanada H, Moriya S, Kikkawa N, Kumamoto T, Suetsugu T, Inoue H (2019) Molecular Pathogenesis of Gene Regulation by the miR-150 Duplex:

- miR-150-3p Regulates TNS4 in Lung Adenocarcinoma. *Cancers (Basel)* 11:601. doi:10.3390/cancers11050601
- Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB, Tewari M (2008) Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:10513–10518. doi:10.1073/pnas.0804549105
- Mraz M, Malinova K, Mayer J, Pospisilova S (2009) MicroRNA isolation and stability in stored RNA samples. *Biochem Biophys Res Commun* 390:1–4. doi:10.1016/j.bbrc.2009.09.061
- Niu Y, Su M, Wu Y, Fu L, Kang K, Li Q, Li L, Hui G, Li F, Gou D (2019) Circulating Plasma miRNAs as Potential Biomarkers of Non-Small Cell Lung Cancer Obtained by High-Throughput Real-Time PCR Profiling. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 28:327–336. doi:10.1158/1055-9965.EPI-18-0723
- Ostheimer C, Bache M, Güttler A, Reese T, Vordermark D (2014) Prognostic information of serial plasma osteopontin measurement in radiotherapy of non-small-cell lung cancer. *BMC Cancer* 14:858. doi:10.1186/1471-2407-14-858
- Palma J, Yaddanapudi SC, Pigati L, Havens MA, Jeong S, Weiner GA, Weimer KME, Stern B, Hastings ML, Duelli DM (2012) MicroRNAs are exported from malignant cells in customized particles. *Nucleic Acids Res* 40:9125–9138. doi:10.1093/nar/gks656
- Pan H-L, Wen Z-S, Huang Y-C, Cheng X, Wang G-Z, Zhou Y-C, Wang Z-Y, Guo Y-Q, Cao Y, Zhou G-B (2015) Down-regulation of microRNA-144 in air pollution-related lung cancer. *Sci Rep* 5:14331. doi:10.1038/srep14331
- Pan Y, Zhang J, Fu H, Shen L (2016) miR-144 functions as a tumor suppressor in breast cancer through inhibiting ZEB1/2-mediated epithelial mesenchymal transition process. *Onco Targets Ther* 9:6247–6255. doi:10.2147/OTT.S103650
- Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, Hayward DC, Ball EE, Degnan B, Müller P, Spring J, Srinivasan A, Fishman M, Finnerty J, Corbo J, Levine M, Leahy P, Davidson E, Ruvkun G (2000) Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature* 408:86–89. doi:10.1038/35040556
- Pfeffer S, Zavolan M, Grässer FA, Chien M, Russo JJ, Ju J, John B, Enright AJ, Marks D, Sander C, Tuschl T (2004) Identification of virus-encoded microRNAs. *Science* 304:734–736. doi:10.1126/science.1096781
- Pinheiro LB, Coleman VA, Hindson CM, Herrmann J, Hindson BJ, Bhat S, Emslie KR (2012) Evaluation of a droplet digital polymerase chain reaction format for DNA copy number quantification. *Anal Chem* 84:1003–1011. doi:10.1021/ac202578x
- Pizzamiglio S, Zanutto S, Ciniselli CM, Belfiore A, Bottelli S, Gariboldi M, Verderio P (2017) A methodological procedure for evaluating the impact of hemolysis on circulating microRNAs. *Oncol Lett* 13:315–320. doi:10.3892/ol.2016.5452
- Precazzini F, Detassis S, Imperatori AS, Denti MA, Campomenosi P (2021) Measurements Methods for the Development of MicroRNA-Based Tests for Cancer Diagnosis. *Int J Mol Sci* 22. doi:10.3390/ijms22031176

- Pritchard CC, Kroh E, Wood B, Arroyo JD, Dougherty KJ, Miyaji MM, Tait JF, Tewari M (2012) Blood cell origin of circulating microRNAs: a cautionary note for cancer biomarker studies. *Cancer Prev Res (Phila)* 5:492–497. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-11-0370
- Pu Q, Huang Y, Lu Y, Peng Y, Zhang J, Feng G, Wang C, Liu L, Dai Y (2016) Tissue-specific and plasma microRNA profiles could be promising biomarkers of histological classification and TNM stage in non-small cell lung cancer. *Thorac Cancer* 7:348–354. doi:10.1111/1759-7714.12317
- Pujol J-L, Molinier O, Ebert W, Daurès J-P, Barlesi F, Buccheri G, Paesmans M, Quoix E, Moro-Sibilot D, Szturmowicz M, Bréchet J-M, Muley T, Grenier J (2004) CYFRA 21-1 is a prognostic determinant in non-small-cell lung cancer: results of a meta-analysis in 2063 patients. *Br J Cancer* 90:2097–2105. doi:10.1038/sj.bjc.6601851
- Rabinowits G, Gerçel-Taylor C, Day JM, Taylor DD, Kloecker GH (2009) Exosomal microRNA: a diagnostic marker for lung cancer. *Clin Lung Cancer* 10:42–46. doi:10.3816/CLC.2009.n.006
- Redaktion Deutsches Ärzteblatt (2019) Diagnose und Therapie des Lungenkarzinoms: Umfassende und stringente Versorgung im Verbund. <https://www.aerzteblatt.de/archiv/209368/Diagnose-und-Therapie-des-Lungenkarzinoms-Umfassende-und-stringente-Versorgung-im-Verbund>. Zugegriffen: 04. Juli 2020
- Reid G, Pel ME, Kirschner MB, Cheng YY, Mugridge N, Weiss J, Williams M, Wright C, Edelman JJB, Vallely MP, McCaughan BC, Klebe S, Brahmabhatt H, MacDiarmid JA, van Zandwijk N (2013) Restoring expression of miR-16: a novel approach to therapy for malignant pleural mesothelioma. *Ann Oncol* 24:3128–3135. doi:10.1093/annonc/mdt412
- Reis PP, Drigo SA, Carvalho RF, Lopez Lapa RM, Felix TF, Patel D, Cheng D, Pintilie M, Liu G, Tsao M-S (2020) Circulating miR-16-5p, miR-92a-3p, and miR-451a in Plasma from Lung Cancer Patients: Potential Application in Early Detection and a Regulatory Role in Tumorigenesis Pathways. *Cancers (Basel)* 12:2071. doi:10.3390/cancers12082071
- Rijavec E, Coco S, Genova C, Rossi G, Longo L, Grossi F (2019) Liquid Biopsy in Non-Small Cell Lung Cancer: Highlights and Challenges. *Cancers (Basel)* 12:17. doi:10.3390/cancers12010017
- Robert Koch-Institut (2016) Krebs in Deutschland | Lunge. https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2019/kid_2019_c33_c34_lunge.pdf?__blob=publicationFile. Zugegriffen: 22.10.22
- S3-Leitlinie (2018) Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms. https://register.awmf.org/assets/guidelines/020-007OL_I_S3_Lungenkarzinom_2018-03.pdf. Zugegriffen: 22.10.22
- Schmidt B (2020) Einfluss eines pro-inflammatorischen Milieus auf die microRNA-Expression in Aorten septischer Mäuse, murinen Makrophagen und humanen Endothelzellen. Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Schober P, Boer C, Schwarte LA (2018) Correlation Coefficients: Appropriate Use and Interpretation. *Anesth Analg* 126:1763–1768. doi:10.1213/ANE.0000000000002864
- Schwarzenbach H, Nishida N, Calin GA, Pantel K (2014) Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 11:145–156. doi:10.1038/nrclinonc.2014.5
- Seto AG, Beatty X, Lynch JM, Hermreck M, Tetzlaff M, Duvic M, Jackson AL (2018) Cobomarsen, an oligonucleotide inhibitor of miR-155, co-ordinately regulates multiple survival pathways to reduce cellular proliferation and survival in cutaneous T-cell lymphoma. *Br J Haematol* 183:428–444. doi:10.1111/bjh.15547

- Song J, Bai Z, Han W, Zhang J, Meng H, Bi J, Ma X, Han S, Zhang Z (2012) Identification of suitable reference genes for qPCR analysis of serum microRNA in gastric cancer patients. *Dig Dis Sci* 57:897–904. doi:10.1007/s10620-011-1981-7
- Song L, Peng L, Hua S, Li X, Ma L, Jie J, Chen D, Wang Y, Li D (2018) miR-144-5p Enhances the Radiosensitivity of Non-Small-Cell Lung Cancer Cells via Targeting ATF2. *Biomed Res Int* 2018:5109497. doi:10.1155/2018/5109497
- Sourvinou IS, Markou A, Lianidou ES (2013) Quantification of circulating miRNAs in plasma: effect of preanalytical and analytical parameters on their isolation and stability. *J Mol Diagn* 15:827–834. doi:10.1016/j.jmoldx.2013.07.005
- Sozzi G, Boeri M, Rossi M, Verri C, Suatoni P, Bravi F, Roz L, Conte D, Grassi M, Sverzellati N, Marchiano A, Negri E, La Vecchia C, Pastorino U (2014) Clinical utility of a plasma-based miRNA signature classifier within computed tomography lung cancer screening: a correlative MILD trial study. *J Clin Oncol* 32:768–773. doi:10.1200/JCO.2013.50.4357
- Sromek M, Glogowski M, Chechlinska M, Kulinczak M, Szafron L, Zakrzewska K, Owczarek J, Wisniewski P, Wlodarczyk R, Talarek L, Turski M, Siwicki JK (2017) Changes in plasma miR-9, miR-16, miR-205 and miR-486 levels after non-small cell lung cancer resection. *Cell Oncol (Dordr)* 40:529–536. doi:10.1007/s13402-017-0334-8
- Statistisches Bundesamt Deutschland (2020) Gestorbene: Deutschland, Jahre, Todesursachen. <https://www-genesis.destatis.de/genesis/online?operation=abruftabelleBearbeiten&levelindex=0&levelid=1667927880992&auswahloperation=abruftabelleAuspraegungAuswaehlen&auswahlverzeichnis=ordnungsstruktur&auswahlziel=werteabruf&code=23211-0001&auswahltext=&werteabruf=starten#abreadcrumb>. Zugegriffen: 08. November 2022
- Suetsugu T, Koshizuka K, Seki N, Mizuno K, Okato A, Arai T, Misono S, Uchida A, Kumamoto T, Inoue H (2018) Downregulation of matrix metalloproteinase 14 by the antitumor miRNA, miR-150-5p, inhibits the aggressiveness of lung squamous cell carcinoma cells. *Int J Oncol* 52:913–924. doi:10.3892/ijo.2017.4232
- Swensen SJ, Jett JR, Hartman TE, Midthun DE, Mandrekar SJ, Hillman SL, Sykes A-M, Aughenbaugh GL, Bungum AO, Allen KL (2005) CT screening for lung cancer: five-year prospective experience. *Radiology* 235:259–265. doi:10.1148/radiol.2351041662
- Takahashi K, Yokota S, Tatsumi N, Fukami T, Yokoi T, Nakajima M (2013) Cigarette smoking substantially alters plasma microRNA profiles in healthy subjects. *Toxicol Appl Pharmacol* 272:154–160. doi:10.1016/j.taap.2013.05.018
- Tang Y, Cui Y, Li Z, Jiao Z, Zhang Y, He Y, Chen G, Cheng G, Zhou Q, Wang W, Zhou X, Luo J, Zhang S (2016) Radiation-induced miR-208a increases the proliferation and radioresistance by targeting p21 in human lung cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res* 35:7. doi:10.1186/s13046-016-0285-3
- Templin T, Amundson SA, Brenner DJ, Smilenov LB (2011) Whole mouse blood microRNA as biomarkers for exposure to γ -rays and (56)Fe ion. *Int J Radiat Biol* 87:653–662. doi:10.3109/09553002.2010.549537
- The Medical Research Council (1957) Tobacco Smoking and Lung Cancer. *Br Med J* 1:1523–1524. doi:10.1136/bmj.1.5034.1523

- Thermo Fisher Scientific (2017) NanoDrop One User Guide. <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/3091-NanoDrop-One-User-Guide-v1.3-sw-GERMAN.pdf>. Zugegriffen: 22. Oktober 2022
- ThermoFisher Scientific (2010) Nucleid Acid Thermo Scientific NanoDrop Spectrophotometers. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/manuals/ts-nanodrop-nucleicacid-olv-r2.pdf>. Zugegriffen: 22. Oktober 2022
- Ulivi P, Foschi G, Mengozzi M, Scarpi E, Silvestrini R, Amadori D, Zoli W (2013) Peripheral blood miR-328 expression as a potential biomarker for the early diagnosis of NSCLC. *Int J Mol Sci* 14:10332–10342. doi:10.3390/ijms140510332
- Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO (2007) Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 9:654–659. doi:10.1038/ncb1596
- van Rooij E, Sutherland LB, Thatcher JE, DiMaio JM, Naseem RH, Marshall WS, Hill JA, Olson EN (2008) Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:13027–13032. doi:10.1073/pnas.0805038105
- Wang X-C, Du L-Q, Tian L-L, Wu H-L, Jiang X-Y, Zhang H, Li D-G, Wang Y-Y, Wu H-Y, She Y, Liu Q, Fan F-Y, Meng A-M (2011) Expression and function of miRNA in postoperative radiotherapy sensitive and resistant patients of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 72:92–99. doi:10.1016/j.lungcan.2010.07.014
- Wang H, Zhang Y, Wu Q, Wang Y-B, Wang W (2018a) miR-16 mimics inhibit TGF- β 1-induced epithelial-to-mesenchymal transition via activation of autophagy in non-small cell lung carcinoma cells. *Oncol Rep* 39:247–254. doi:10.3892/or.2017.6088
- Wang J, Zhang Q, Wang D, Yan W, Sha H, Zhao J, Yang S, Zhang H, Hou J, Xu H, He Y, Hu J, Zhong S, Tang J (2018b) MiR-29a: a potential therapeutic target and promising biomarker in tumors. *Biosci Rep* 38:BSR20171265. doi:10.1042/BSR20171265
- Wang F, Mao A, Tang J, Zhang Q, Yan J, Wang Y, Di C, Gan L, Sun C, Zhang H (2019) microRNA-16-5p enhances radiosensitivity through modulating Cyclin D1/E1-pRb-E2F1 pathway in prostate cancer cells. *J Cell Physiol* 234:13182–13190. doi:10.1002/jcp.27989
- Wang Q, Chen Y, Lu H, Wang H, Feng H, Xu J, Zhang B (2020) Quercetin radiosensitizes non-small cell lung cancer cells through the regulation of miR-16-5p/WEE1 axis. *IUBMB Life* 72:1012–1022. doi:10.1002/iub.2242
- Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, Galas DJ, Wang K (2010) The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem* 56:1733–1741. doi:10.1373/clinchem.2010.147405
- Wei J, Gao W, Zhu C-J, Liu Y-Q, Mei Z, Cheng T, Shu Y-Q (2011) Identification of plasma microRNA-21 as a biomarker for early detection and chemosensitivity of non-small cell lung cancer. *Chin J Cancer* 30:407–414. doi:10.5732/cjc.010.10522
- Weidhaas JB, Babar I, Nallur SM, Trang P, Roush S, Boehm M, Gillespie E, Slack FJ (2007) MicroRNAs as potential agents to alter resistance to cytotoxic anticancer therapy. *Cancer Res* 67:11111–11116. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-2858
- World Health Organization (2021) Cancer. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. Zugegriffen: 12. April 2021

- Wozniak MB, Scelo G, Muller DC, Mukeria A, Zaridze D, Brennan P (2015) Circulating MicroRNAs as Non-Invasive Biomarkers for Early Detection of Non-Small-Cell Lung Cancer. *PLoS One* 10:e0125026. doi:10.1371/journal.pone.0125026
- Wu C, Xu B, Zhou Y, Ji M, Zhang D, Jiang J, Wu C (2016) Correlation between serum IL-1 β and miR-144-3p as well as their prognostic values in LUAD and LUSC patients. *Oncotarget* 7:85876–85887. doi:10.18632/oncotarget.13042
- Xiao J, Meng X-M, Huang XR, Chung AC, Feng Y-L, Hui DS, Yu C-M, Sung JJ, Lan HY (2012) miR-29 inhibits bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Mol Ther* 20:1251–1260. doi:10.1038/mt.2012.36
- Xinying Xue, Yuxia Liu³, Yong Wang¹, Mingming Meng⁴, Kaifei Wang², Xuefeng Zang⁵, Sheng Zhao⁶, Xiaohua Sun⁷, Lei Cui⁸, Lei Pan¹, Sanhong Liu⁹ (2016) MiR-21 and MiR-155 promote non-small cell lung cancer progression by downregulating SOCS1, SOCS6, and PTEN. *Oncotarget* 7:84508–84519. doi:10.18632/oncotarget.13022
- Yamada A, Cox MA, Gaffney KA, Moreland A, Boland CR, Goel A (2014) Technical factors involved in the measurement of circulating microRNA biomarkers for the detection of colorectal neoplasia. *PLoS ONE* 9:e112481. doi:10.1371/journal.pone.0112481
- Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, Seike M, Kumamoto K, Yi M, Stephens RM, Okamoto A, Yokota J, Tanaka T, Calin GA, Liu C, Croce CM, Harris CC (2006) Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell* 9:189–198. doi:10.1016/j.ccr.2006.01.025
- Yin Q-W, Sun X-F, Yang G-T, Li X-B, Wu M-S, Zhao J (2015) Increased expression of microRNA-150 is associated with poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 8:842–846
- Yin Y, Liu H, Xu J, Shi D, Zhai L, Liu B, Wang L, Liu G, Qin J (2018) miR-144-3p regulates the resistance of lung cancer to cisplatin by targeting Nrf2. *Oncol Rep* 40:3479–3488. doi:10.3892/or.2018.6772
- Yu S-L, Chen H-Y, Chang G-C, Chen C-Y, Chen H-W, Singh S, Cheng C-L, Yu C-J, Lee Y-C, Chen H-S, Su T-J, Chiang C-C, Li H-N, Hong Q-S, Su H-Y, Chen C-C, Chen W-J, Liu C-C, Chan W-K, Chen WJ, Li K-C, Chen JJW, Yang P-C (2008) MicroRNA signature predicts survival and relapse in lung cancer. *Cancer Cell* 13:48–57. doi:10.1016/j.ccr.2007.12.008
- Zentrum für Krebsregisterdaten (2019) Krebsarten. https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/krebsarten_node.html. Zugegriffen: 25. August 2020
- Zentrum für Krebsregisterdaten (2020) Lungenkrebs (Bronchialkarzinom). <https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Lungenkrebs/lungenkrebs.html>. Zugegriffen: 25. August 2020
- Zha W, Cao L, Shen Y, Huang M (2013) Roles of Mir-144-ZFX pathway in growth regulation of non-small-cell lung cancer. *PLoS One* 8:e74175. doi:10.1371/journal.pone.0074175
- Zhang J, Wang J, Zhao F, Liu Q, Jiang K, Yang G (2010) MicroRNA-21 (miR-21) represses tumor suppressor PTEN and promotes growth and invasion in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Clin Chim Acta* 411:846–852. doi:10.1016/j.cca.2010.02.074

Zhang J, Song Y, Zhang C, Zhi X, Fu H, Ma Y, Chen Y, Pan F, Wang K, Ni J, Jin W, He X, Su H, Cui D (2015) Circulating MiR-16-5p and MiR-19b-3p as Two Novel Potential Biomarkers to Indicate Progression of Gastric Cancer. *Theranostics* 5:733–745. doi:10.7150/thno.10305

Zhang L, Lin J, Ye Y, Oba T, Gentile E, Lian J, Wang J, Zhao Y, Gu J, Wistuba II, Roth JA, Ji L, Wu X (2018) Serum MicroRNA-150 Predicts Prognosis for Early-Stage Non-Small Cell Lung Cancer and Promotes Tumor Cell Proliferation by Targeting Tumor Suppressor Gene SRCIN1. *Clin Pharmacol Ther* 103:1061–1073. doi:10.1002/cpt.870

Zhao Z, Wang L, Song W, Cui H, Chen G, Qiao F, Hu J, Zhou R, Fan H (2015) Reduced miR-29a-3p expression is linked to the cell proliferation and cell migration in gastric cancer. *World J Surg Onc* 13:101. doi:10.1186/s12957-015-0513-x

Zhong S, Golpon H, Zardo P, Borlak J (2021) miRNAs in lung cancer. A systematic review identifies predictive and prognostic miRNA candidates for precision medicine in lung cancer. *Transl Res* 230:164–196. doi:10.1016/j.trsl.2020.11.012

Zhu C-Q, Shih W, Ling C-H, Tsao M-S (2006) Immunohistochemical markers of prognosis in non-small cell lung cancer: a review and proposal for a multiphase approach to marker evaluation. *J Clin Pathol* 59:790–800. doi:10.1136/jcp.2005.031351

8 Thesen

1. Die ddPCR bietet mit der RT-qPCR vergleichbare Ergebnisse und ist im klinischen Alltag einsetzbar. Die miR-16-5p, -29a-3p, -144-3p und -150-5p lassen sich mittels ddPCR bestimmen, die miR-21-5p und -155-5p sind in diesem Kollektiv per ddPCR nicht messbar.
2. Die Expression der miR-16-5p zeigt starke Schwankungen der Expressionslevel im Studienkollektiv und ist keine geeignete Referenz-miRNA für die RT-qPCR im Plasma der untersuchten NSCLC-Patienten.
3. Die Expressionslevel der miR-16-5p, -29a-3p, -144-3p und -150-5p unterscheiden sich im Studienkollektiv deutlich voneinander, die miR-16-5p weist die höchsten Expressionslevel auf. Untereinander bestehen sehr starke Zusammenhänge der Level der miR-16-5p, -29a-3p, -144-3p und -150-5p mit positiven Korrelationen.
4. Die Level der miR-150-5p im Gesamtkollektiv sowie die Level der miR-29a-3p innerhalb der Patienten in UICC-Stadium IV fallen im Plasma im Verlauf der Strahlentherapie ab. Die Expressionslevel der miR-16-5p und -144-3p zeigen keine relevanten Veränderungen im Plasma unter Strahlentherapie.
5. Es gibt in diesem Studienkollektiv Unterschiede der Level zirkulierender miR-16-5p, -144-3p und -150-5p zwischen gesunden Blutspendern und NSCLC-Patienten, welche sich jedoch nicht auf klinische Charakteristika zurückführen lassen.
6. Vor Bestrahlung zeigen sich keine Zusammenhänge zu klinischen Parametern. Nach Bestrahlung ergeben sich Zusammenhänge zwischen den miRNA-Leveln im Plasma und dem UICC-Stadium.
7. Während bzw. nach Bestrahlung ergibt sich ein prognostischer Zusammenhang der miR-29a-3p und -144-3p-Level im Plasma zum Gesamtüberleben. Vor Bestrahlung ergibt sich kein Zusammenhang zum Gesamtüberleben.
8. Die Kombination der vier miRNA (KmiR) ist nach Bestrahlung ein unabhängiger prognostischer Marker.

Anhänge

Selbstständigkeitserklärung

Sehr geehrte Damen und Herren,

hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel genutzt habe. Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen habe ich als solche gekennzeichnet.

Ich versichere, bei der inhaltlichen Erstellung von niemandem eine entgeltliche oder geldwertige Leistung in Anspruch genommen zu haben.

A handwritten signature in blue ink that reads "F. Kadler". The signature is written in a cursive style and is placed on a light blue rectangular background.

Frauke Kadler, Halle (Saale), 11.10.2023

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Sehr geehrte Damen und Herren,

Ich versichere, dass ich die beigefügte Dissertation nur in diesem und keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht habe und dass diesem Promotionsverfahren keine endgültig gescheiterten Promotionsverfahren vorausgegangen sind.

A handwritten signature in blue ink that reads "F. Kadler". The signature is written in a cursive style with a large initial "F".

Frauke Kadler, Halle (Saale), 11.10.2023

Danksagung

Ich möchte mich gern bei allen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt und begleitet haben.

An die gesamte AG Molekulare Strahlenbiologie richtet sich mein Dank für die Unterstützung während der Durchführung der Laborarbeiten. Sehr viel zu verdanken habe ich Herr Dr. Bache, der mir stets mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat und mich sowohl bei der Planung der Laborversuche als auch bei deren Auswertung beraten hat. Auch Frau Thomas stand mir im Labor stets zur Seite und hat sich einiges an Zeit genommen, meine praktischen Versuche zu begleiten.

An Prof. Vordermark richtet sich mein Dank für die Ermöglichung dieser Promotion an der Universitätsklinik und Poliklinik für Strahlentherapie.

Und zuletzt möchte ich mich auch bei meiner Familie für den emotionalen Beistand während dieser Zeit bedanken und für die Hilfe, die Motivation zum Weitermachen auch im hektischen Alltag nicht aus den Augen zu verlieren. Mein herzlichster Dank gilt meinen Eltern, Sabine und Volker Kadler, dafür, dass sie mir das Medizinstudium und die Erstellung dieser Arbeit ermöglicht haben. Und auch meinem Großvater Dr. Gerhard Brauer möchte ich meine große Dankbarkeit für die stetige Zuwendung und Beratung ausdrücken.