

Aus der Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie,
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar

**Prognostische Wertigkeit der TNM-Klassifizierung nicht-kleinzelliger
Lungenkarzinome und der miRNA-Expression im Plasma
von Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2019

vorgelegt von: Mohamad Shadi Alzin

geb. am: 17.04.1977 in Homs / Syrien

Tag der Promotion: 27.05.2020

Dekan: Prof. Dr. med. Michael D. Menger

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Hanno Huwer
Prof. Dr. rer. nat. Eckart Meese

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	2
2	Zusammenfassung	3
3	Abstract	6
4	Einleitung	8
4.1	TNM-Klassifizierung	9
4.1.1	Geschichte der TNM-Klassifizierung.....	10
4.1.2	Die Faktoren des TNM-Systems	11
4.1.2.1	T (Tumor).....	11
4.1.2.2	N (Lymphknotenbefall).....	12
4.1.2.3	Naruke lymph node map vs. Mountain-Dresler lymph node map.....	12
4.1.2.4	M (Fernmetastasen beim Lungenkarzinom)	13
4.1.3	Siebente Auflage der TNM-Klassifizierung für das Lungenkarzinom (UICC, AJCC)	13
4.1.4	Achte Auflage der TNM-Klassifizierung für das Lungenkarzinom (UICC, AJCC)	15
4.2	Karzinogenese	16
4.3	MicroRNA.....	18
4.3.1	Definition, Geschichte	18
4.3.2	Nomenklatur	19
4.3.3	Biosynthese, Wirkmechanismen, Regulation der Biosynthese	20
4.3.4	Die Rolle der miRNAs bei Lungenkarzinomen und anderen malignen Tumoren.....	22
4.3.5	MiRNAs als diagnostische und prognostische Biomarker für Lungenkarzinome.....	23
4.3.6	Bestimmung der miRNA Zielgene und KEGG-Signalwege.....	27
4.3.7	Überblick über die wichtigen Signalwege beim nicht kleinzelligen Lungenkarzinom	27
4.3.7.1	P53-Signalweg.....	29
4.3.7.2	PI3K/AKT/mTOR-Signalweg.....	29
4.3.7.3	Wnt-Signalweg.....	29
4.3.7.4	TGF- β Signalweg	30
4.3.7.5	FOXO-Signalweg	30

4.3.7.6	AMPK-Signalweg	30
4.3.7.7	Ras-Raf-MEK-ERK-Signalweg	30
4.4	Ziel der Studie	31
5	Material und Methoden.....	32
5.1	Patientenpopulation	32
5.2	Verwendete Materialien und Equipment	34
5.3	RNA Extraktion.....	36
5.3.1	Blutprobengewinnung.....	36
5.3.2	Heparininaktivierung mittels Heparinase.....	36
5.3.3	Gesamt-RNA Isolierung, einschließlich miRNA.....	36
5.4	Microarray	37
5.5	Reverse Transkription - quantitative Echtzeit Polymerasekettenreaktion (RT-qPCR).....	38
5.6	Statistische Auswertung.....	39
5.7	Analyse der Zielgene und Signalwege.....	40
6	Ergebnisse.....	41
6.1	Klinische Daten	41
6.1.1	Überlebenszeiten in Abhängigkeit vom Geschlecht.....	41
6.1.2	Überlebenszeiten in Abhängigkeit von der Histologie.....	44
6.1.3	Überlebenszeiten in Abhängigkeit vom Resektionsverfahren.....	46
6.1.4	Überlebenszeiten in Abhängigkeit vom R-Status.....	48
6.1.5	Überlebenszeiten in Abhängigkeit von den Tumorstadien (UICC7)	50
6.1.6	Überlebenszeiten in Abhängigkeit von den Tumorstadien (UICC8)	53
6.1.7	Überlebenszeiten in Abhängigkeit vom Lymphknotenstatus	56
6.1.8	Überlebenszeiten in Abhängigkeit von der Lymphknoten-Subklassifizierung	58
6.2	Microarray-Ergebnisse	63
6.3	RT-qPCR-Ergebnisse	66
6.4	Signalweganalyse-Ergebnisse	66
7	Diskussion.....	70

7.1	Klinische Daten	70
7.1.1	Prognostische Wertigkeit des Geschlechts	70
7.1.2	Prognostische Wertigkeit der Histologie	70
7.1.3	Prognostische Wertigkeit der Resektionsverfahren.....	71
7.1.4	Prognostische Wertigkeit des R-Status	72
7.1.5	Prognostische Wertigkeit der Tumorstadien (UICC7)	72
7.1.6	Prognostische Wertigkeit der Tumorstadien (UICC8)	73
7.1.7	Prognostische Wertigkeit des Lymphknotenstatus.....	74
7.2	MiRNA.....	75
7.2.1	Hsa-miR-142-5p.....	78
7.2.2	Hsa-miR-126-3p.....	79
7.2.3	Hsa-miR-574-5p.....	79
7.2.4	Hsa-miR-26a-5p	80
7.2.5	Hsa-let-7f-5p	80
7.2.6	KEGG-Signalweg.....	81
7.2.7	MiRNA Zielgene	81
7.2.7.1	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (<i>KRAS</i>).....	82
7.2.7.2	Epidermal Growth Factor Receptor (<i>EGFR</i>).....	82
7.2.7.3	Rat fibrosarcoma protein B (<i>BRAF</i>)	83
7.2.7.4	Anaplastic lymphoma kinase (<i>ALK</i>).....	83
8	Literaturverzeichnis.....	84
9	Danksagung	98

1 Abkürzungsverzeichnis

UICC	Union for International Cancer Control
DNA	Desoxyribonukleinsäure
MiRNA, miR	MicroRNA
LTS	long time survivors
STS	short time survivors
RT-qPCR	Reverse transcription-quantitative real time polymerase chain reaction / Reverse Transkriptase – quantitative Echtzeit Polymerasekettenreaktion
R-Status	Resektionsstatus
KEGG-Signalwege	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes pathway
<i>KRAS</i>	Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog
<i>EGFR</i>	Epidermal Growth Factor Receptor
<i>EML4-ALK</i>	Echinoderm microtubule-associated protein-like 4-anaplastic lymphoma kinase
NSCLC	Non-small cell lung cancer
RKI	Robert Koch-Institut
GEKID	Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease / Chronische obstructive Lungenerkrankung
NLST	National Lung Screening Trial
AJCC	American Joint Committee on Cancer
IASLC	International Association for the Study of Lung Cancer
AGO2	Argonautenprotein 2
RISC	RNA-induced silencing complex
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
FGF	Fibroblast Growth Factor
cfDNA	Cell-free DNA
cfmiRNA	Cell-free microRNA
SCLC	Small Cell Lung Cancer
PEC	Plattenepithelkarzinom
Adeno-Ca	Adenokarzinom
DMSO	Dimethylsulfoxid
CIP	Calf Intestinal Phosphatase
RNA	Ribonukleinsäure
cDNA	complementary DNA / komplementäre Desoxyribonukleinsäure
MÜZ	Mittlere Überlebenszeit
SD	Standard Deviation / Standardabweichung
JÜR	Jahres Überlebensrate
FC	Fold Change
AUC	Area under the curve
CTCs	Circulating tumor cells

2 Zusammenfassung

In Deutschland ist das Lungenkarzinom bei Männern die zweithäufigste (13,9%) und bei Frauen die dritthäufigste (8,5%) Krebsneuerkrankung. Mit 80-85% stellt das nicht-kleinzellige Lungenkarzinom die Hauptform des Lungenkarzinoms dar. Die chirurgische Resektion des Tumors ist die Therapie der Wahl im Frühstadium und die multimodale Therapie im fortgeschrittenen Tumorstadium. Trotz der Fortschritte und der Weiterentwicklung der Therapie des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms ist die tumorbedingte Sterblichkeit hoch, sodass die 5-Jahresüberlebensrate bei Männern nur 15% und bei Frauen nur 18% beträgt.

Die TNM-Klassifizierung beschreibt die anatomische Ausbreitung des Tumors in Abhängigkeit von Tumorgroße, Lymphknotenbefall und Fernmetastasierung und bestimmt so Therapie und Prognose. Sie wird ständig weiterentwickelt, und die 8. Auflage ist seit 01.01.2017 gültig. In der vorliegenden Studie wird die TNM-Klassifizierung der 8. Auflage der Union for International Cancer Control (UICC) dargestellt und mit der 7. Auflage in Bezug auf die prognostische Aussagekraft verglichen. Dies geschieht anhand einer eigenen Patientenpopulation. Weitere potenzielle prognostische Faktoren wie Geschlecht, Histologie, Resektionsverfahren und Resektionsstatus werden untersucht, desweiteren die Bedeutung einer N1- und N2-Subklassifizierung.

Die Liquid Biopsy stellt eine Methode zur genetischen Frühdiagnose des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms dar. Sie ermöglicht die Untersuchung von Tumorzellen, DNA, und miRNA des Tumors.

Micro-RNAs sind kleinkettige, nichtkodierende Ribonukleinsäuremoleküle, die die Expression verschiedener Onkogene oder Tumorsuppressorgene regulieren können.

In der vorliegenden Studie wurden die miRNA-Profile in zwei Patientengruppen mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom, die entweder eine lange postoperative Überlebenszeit (long time survivors, LTS) oder eine kurze postoperative Überlebenszeit hatten (short time survivors, STS), mittels Microarray-Technik analysiert. Desweiteren wurden fünf miRNAs (hsa-miR-142-3p, hsa-miR-26a-5p, hsa-miR-126-3p, hsa-let-7f-5p, und hsa-miR-574-5p) mittels Reverse Transkriptase – quantitative Echtzeit Polymerasekettenreaktion (RT-qPCR) quantifiziert und werden als prognostische Biomarker für das postoperative Überleben diskutiert.

Es wurden von Juni 1998 bis Dezember 2011 operierte Patienten mit Lungenkarzinom eingeschlossen, von denen Plasmaproben vorhanden und deren Proben fünf Jahre oder älter sind. Überlebenszeiten und Todesursachen wurden eruiert. Alle Daten wurden statistisch analysiert.

Insgesamt wurden 430 Patienten in die Studie eingeschlossen. Die Anzahl der gesamten Sterbefälle beträgt 315 (73,3% aller untersuchten Patienten). Die 5-Jahresüberlebensraten unterscheiden sich statistisch nicht in Abhängigkeit vom Geschlecht (45,0% Frauen vs. 36,5% Männer) ($p > 0,05$), darüber hinaus sind die tumorbedingten postoperativen Sterblichkeitsraten bei Männern und Frauen gleich (58,2% vs. 60,5%), die mittleren Überlebenszeiten sind jedoch bei tumorbedingt verstorbenen Frauen länger (35,5 Monate vs. 24,5 Monate) ($p < 0,05$).

Die 5-Jahresüberlebensraten in Abhängigkeit von der Histologie sind 41,0% beim Adenokarzinom und 37,4% beim Plattenepithelkarzinom ($p > 0,05$), und die tumorbedingte postoperative Sterblichkeit ist 42,7% beim Adenokarzinom und 45,1% beim Plattenepithelkarzinom, d.h. die Histologieformen (Adenokarzinom vs. Plattenepithelkarzinom) spielen keine wesentliche Rolle für die postoperative Überlebenszeit und die Mortalität.

Bezüglich der Resektionsverfahren sind die 5-Jahresüberlebensraten nach Lobektomie (41,7%) und nach Lobektomie mit Bronchusmanschettenresektion (34,8%) höher als nach Pneumonektomie (21,2%) ($p < 0,05$), auch die tumorbedingte postoperative Sterblichkeit ist nach Pneumonektomie mit 77,8% höher als nach Lobektomie und Lobektomie mit Manschettenresektion ($p < 0,05$), die eine ähnliche Mortalität (57,1% bzw. 57,5%) haben. Dies zeigt, dass die Lobektomie mit Bronchusmanschettenresektion weiterhin ein gutes alternatives chirurgisches Verfahren für die Pneumonektomie darstellt.

Die Patienten mit makroskopisch tumorinfiltrierten Resektionsrändern (R2-Status) haben niedrige 5-Jahresüberlebensraten (25,8%) sowohl im Vergleich mit Patienten mit tumorfreien (R0-Status) als auch im Vergleich mit Patienten mit mikroskopisch tumorinfiltrierten Resektionsrändern (R1-Status) (41,3% bzw. 40,0%) ($p < 0,05$).

Die 5-Jahresüberlebensraten sind höher bei Patienten mit N0-Lymphknotenstatus (48,9%) im Vergleich zu N1-Status (32,5%) und N2-Status (14,9%) ($P < 0,001$). Die Patienten mit N2-Status haben eine höhere tumorbedingte postoperative Sterblichkeit (78,9%) im Vergleich mit Patienten mit N0-Status und N1-Status (50,8% bzw. 64,3%) ($p < 0,05$).

Nach Lymphknoten subclassifizierung des N1-Status und N2-Status zeigt sich trotz kleiner Patientengruppen ein Unterschied in den 5-Jahresüberlebensraten, sie sind bei single level-N1 (N1a) 37,9%, bei multilevel-N1 (N1b) 20,0%, bei single level-N2 (N2a) 10,3% und bei multilevel-N2 (N2b) 25,0% ($p < 0,001$), die medianen Überlebenszeiten bei single level N1-Status sind länger im Vergleich zu multilevel N1 (35 Monate vs. 25 Monate), ähnliches gilt für single level N2-Status und multilevel N2-Status (16 Monate vs. 12 Monate) ($p < 0,001$). Dies zeigt, dass eine Revision der Lymphknotenklassifizierung in der kommenden TNM-Klassifizierung erforderlich sein wird.

Die Analyse der UICC7- und UICC8-Klassifizierung der TNM-Stadien in der vorliegenden Studie zeigt, dass die Unterschiede zwischen gleichen Tumorstadien der UICC7- und UICC8-Einteilung hauptsächlich in Tumorstadium IIA und in IIIA liegen und die 8. Auflage homogenere Gruppen enthält.

Insgesamt wurden 2549 miRNAs mittels Microarray untersucht. Die statistische Analyse zeigt, dass die Expression von 52 miRNAs (2,0%) signifikant unterschiedlich in der LTS-Gruppe gegenüber der STS-Gruppe ist ($p < 0,05$). Die Validierung von fünf ausgewählten miRNAs (hsa-miR-142-3p, hsa-miR-26a-5p, hsa-miR-126-3p, hsa-let-7f-5p und hsa-miR-574-5p) mittels Reverse Transkription – quantitative Echtzeit Polymerasekettenreaktion (RT-qPCR) zeigt die fünf miRNAs in der STS-Gruppe im Vergleich mit der LTS-Gruppe unterexprimiert. Mit Hilfe von DIANA-miRPath v.3.0 Software konnten 57 KEGG-Signalwege identifiziert werden. Non-small cell lung cancer (hsa05223) ist der wichtigste Sig-

nalweg beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom, er wird von hsa-miR-142-3p, hsa-miR-26a-5p, hsa-miR-126-3p, hsa-let-7f-5p reguliert. Die hsa-miR-574-5p ist in der vorliegenden Studie ebenfalls in der STS-Gruppe unterexprimiert, sie reguliert den genannten Signalweg nicht. Es wurden mehrere miRNA Zielgene in dem genannten Signalweg identifiziert, von ihnen acht Gene, die häufig beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom mutiert sind (Treibermutationen). Als Onkogene sind es *KRAS*, *EGFR*, *BRAF* und *EML4-ALK* und als Tumorsuppressorgene *RAR β* , *FHIT*, *INK4a/ARF* und *p53*. Über diese Mutationen gibt es bereits medikamentöse Therapieansätze.

3 Abstract

Lung cancer is in Germany the second most common cancer type in males (13.9%) and the third one in females (8.5%). Non-small cell lung cancer (NSCLC) represents about 80-85% of all lung cancer cases. Surgical resection is the therapy of choice in the early stages of the disease, whereas a multimodal strategy is applied in advanced stages. Though significant progress in the therapeutic approaches of NSCLC has been achieved, the tumor-related mortality remains high resulting in five-year survival rates of about 15% in males and 18% in females.

The TNM-Classification describes the anatomical spread of the tumor in relation to tumor size, lymph node involvement and presence of metastases. In this manner, the TNM classification guides the therapeutic strategies and determines the prognosis of the disease. The classification is constantly evolving and the 8th edition is available since 01.01.2017. In our study, the 8th edition of the UICC TNM-classification has been used; moreover a comparison to the 7th edition concerning the overall prognosis has also been made. This has been performed on the basis of a selected patient population. Potential prognostic factors such as gender, histology, resection mode and resection margins, as well as the importance of N1- and N2-subclassification have been examined.

Liquid biopsy represents a useful method for the early diagnosis of NSCLC, enabling the examination of tumor cells and the respective DNA and miRNA. Micro-RNAs are small non-coding RNA molecules that regulate the expression of various oncogenes or tumorsuppressor genes.

In our study, we analyzed the miRNA-profile of two patient-groups with NSCLC using microarray technique. The first group included patients with long postoperative survival (long time survivors, LTS) and the second group patients with a short postoperative survival (short time survivors, STS).

Additionally, we quantified five different miRNAs using Reverse transcription-quantitative real time polymerase chain reaction (RT-qPCR) to determine their use as prognostic biomarkers for postoperative survival.

The study included patients with NSCLC operated from June 1998 until December 2011. Plasma samples obtained from these patients were at least 5 years old. A statistical analysis of all data, including survival and cause of death, was performed.

A total of 430 patients were included in the study. The number of cases of death was 315, accounting for 73.3% of all cases. The 5-year survival rate did not differ statistically between males (36,5%) and females (45,0%), furthermore the tumor-related postoperative mortality rates of males (58,2%) and females (60,5%) were equal. The mean survival time of tumor-related deceased females (35,5%) was longer as that of males (24,5%) ($p < 0,05$).

The 5-year survival was 41,0% for patients with adenocarcinomas and 37.4% for patients with squamous cell carcinomas ($p > 0,05$). The tumor-related postoperative mortality was 42.7% for adenocarcinoma and 45.1% for squamous cell carcinoma. These data imply that histology does not significantly influence postoperative survival and mortality.

Regarding the resection procedure, 5-year survival rates of 41.7% after lobectomy and 34.8% after lobectomy with bronchial sleeve resection were noted, which were significantly higher as the 21.2% survival rate after pneumonectomy ($p < 0,05$). The tumor-related mortality after pneumonectomy was also significantly higher as the mortality rates of the other two procedures, showing that a sleeve resection is more preferable to a pneumonectomy.

Patients with a macroscopically incomplete resection of the tumor (R2) had a lower 5-year survival rate (25,8%) in comparison to patients with complete resection (R0) or microscopic incomplete resection (R1) (41,3% and 40,0% respectively) ($p < 0,05$).

Five-year survival rates were higher in patients without lymph node involvement (N0) (48.9%) in comparison to N1 (32.5%) or N2 (14.9%) status ($p < 0.001$). Patients with N2-status had a significantly higher tumor-related postoperative mortality (78.9%) as those with N0 (50.8%) and N1 status (64.3%) ($p < 0.05$).

Further analysis of groups of patients according to a lymph node sub-classification could demonstrate statistically important differences between the various subgroups, despite smaller patient numbers. Five-year survival rate in N1 single level-subgroup (N1a) was 37.9%, in N1 multilevel-subgroup (N1b) 20%, in N2 single level-subgroup (N2a) 10.3% and in N2 multilevel-subgroup (N2b) 25% ($p < 0.001$). The median survival-time in single level N1 lymph node status was longer as in multilevel N1 (35 months vs 25 months); likewise survival rate in single level N2 status was longer as in multilevel N2 (16 months vs 12 months). All this implies that a revision of the lymph node classification in the coming TNM-edition would probably be reasonable.

The analysis of the UICC7- and 8- classification of the TNM-staging in the present study showed that the differences between these two editions were mainly observed in tumor stages IIA and IIIA; moreover the 8th edition contained more homogenous groups.

A total of 2549 miRNAs were studied using microarray. The statistical analysis showed that the expression of 52 miRNAs (2.0%) was significantly different in the LTS-group compared with the STS-group ($p < 0.05$). The validation of five selected miRNAs using RT-qPCR (hsa-miR-142-3p, hsa-miR-26a-5p, hsa-miR-126-3p, hsa-let-7f-5p and has-miR-574-5p) showed that the five miRNAs in the STS-group were under-expressed in comparison to the LTS-group. With the help of DIANA-miRPath v.3.0 Software, 57 KEGG-signal pathways were identified. Non-small cell lung cancer (hsa05223) is the most important pathway in NSCLC and is regulated by hsa-miR-142-3p, hsa-miR-26a-5p, hsa-miR-126-3p, hsa-let-7f-5p, but not by has-miR-574-5p. Several miRNA target-genes were identified in this specific pathway; eight of them are often mutated in NSCLC (driver-mutations): oncogenes *KRAS*, *EGFR*, *BRAF*, and *EML4-ALK*, and tumor-suppressor genes *RAR β* , *FHIT*, *INK4a/ARF*, and *p53*. Several therapeutic approaches already exist for such mutations.

4 Einleitung

In Deutschland lag nach Angaben des Robert Koch-Instituts (RKI) die Anzahl der Krebsneuerkrankungen im Jahr 2014 bei 476 pro 100 000 Personen, dabei fanden sich 53,8 pro 100 000 Personen mit Lungenkarzinom. Das Lungenkarzinom ist derzeit bei Männern die zweithäufigste (13,9%) und bei Frauen die dritthäufigste (8,5%) Krebsneuerkrankung. Es ist bei Männern die häufigste (24,4%) und bei Frauen die zweithäufigste (13,5%) Ursache tumorbedingter Sterblichkeit (RKI und GEKID, 2017). Aktives Rauchen ist die Hauptursache der Entstehung des Lungenkarzinoms (85%), darüber hinaus erhöht auch die passive Rauchexposition das Risiko für Lungenkrebs. Andere Risikofaktoren haben im Vergleich mit dem Rauchen eine untergeordnete Rolle. Es sind Ernährungsgewohnheiten, Lungenerkrankungen (COPD, α 1-Antitrypsinmangel und idiopathische Lungenfibrose), HIV-Infektion, berufliche Exposition gegenüber karzinogenen Stoffen und radioaktives Edelgas (Radon) (Nasim *et al.*, 2019).

Nach dem histologischen Befund wird das Lungenkarzinom in zwei Hauptformen eingeteilt, das nicht-kleinzellige Lungenkarzinom (80-85%) und das kleinzellige Lungenkarzinom (15-20%). Desweiteren wird das nicht-kleinzellige Lungenkarzinom in die zwei Hauptformen Adenokarzinom, welches ca. die Hälfte der Lungenkarzinome, und das Plattenepithelkarzinom, das ca. ein Viertel der Lungenkarzinome ausmacht, eingeteilt (Travis, 2011).

Das Lungenkarzinom gehört weltweit zu den häufigsten krebsbedingten Todesursachen. Dies ist u.a. dadurch bedingt, dass ein Großteil der Patienten mit Lungenkarzinom sich zum Zeitpunkt der Diagnose in einem fortgeschrittenen Tumorstadium befindet, und eine kurative Therapie nicht mehr möglich ist. Die 5-Jahresüberlebensrate der Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom beträgt bei Männern 15% und bei Frauen 18% (Jemal *et al.*, 2008).

Die Therapie der Patienten mit Lungenkarzinom ist abhängig vom Tumorstadium, das mittels TNM-Klassifizierung der Union for International Cancer Control (vormals Union internationale contre le cancer) (UICC) und des American Joint Committee on Cancer (AJCC) festgelegt wird. Das Tumorstadium beurteilt die anatomische Ausbreitung des Tumors in Abhängigkeit von Tumorgröße, Lymphknotenbefall und Fernmetastasierung und bestimmt damit Therapie und Prognose. Die TNM-Klassifizierung wird kontinuierlich modifiziert, die 8. Auflage ist aktuell und ab 01.01.2017 gültig.

Trotz Weiterentwicklung der Therapien verbesserte sich die Gesamt-5-Jahresüberlebensrate in den letzten Jahren nur um ca. 4% (Alberg *et al.*, 2013). Nur 30% der Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom sind bei der Diagnosestellung operabel.

Die Frühdiagnose des Lungenkarzinoms ist prognostisch sehr wichtig, sodass in den letzten Jahren zunehmend nach Screening-Verfahren zur Frühdiagnose gesucht wurde. Der National Lung Screening Trial (NLST) im Jahr 2010 zeigte, dass das Screening von Hochrisikopatienten mit Niedrigdosis-Computertomographie die Mortalität durch Lungenkarzinom um 20% reduzieren kann. Dies geht andererseits mit falsch positiven Ergebnissen und einer erhöhten Strahlenbelastung der Patienten einher (Goulart und Ramsey, 2013).

Die Prognose des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms wird von folgenden Faktoren mitbestimmt: Tumorstadium, Geschlecht, Allgemeinzustand, Komorbidität, Histologie, Resektionsverfahren, Resektionsstatus und Genotyp.

In den vergangenen Jahren wurden serologische Tumormarker wie Zytokeratinfragment 21-1 (CYFRA 21-1), Neuronen-spezifische Enolase (NSE), Pro-Gastrin-releasing Peptide (ProGRP), karzi-noembryonales Antigen (CEA) und Squamous Cell Carcinoma Antigen (SCCA) für die Differenzialdiagnose oder als Hinweis auf Tumorrezidiv, Metastase und Ansprechen auf multimodale Therapie beim Lungenkarzinom angewandt. Sie zeigten im Verlauf niedrige Sensitivität und Spezifität.

Es wurden darüber hinaus die genetischen Veränderungen der Malignome erforscht. Dies führte zur Entwicklung der Liquid Biopsy. Sie ist eine vielversprechende Methode zum Nachweis von Tumorzellen, DNA, miRNA oder sogar den Mutationen der Tumorzellen im Blut von Patienten mit Lungenkarzinom. Zunehmend werden die miRNAs, die eine Familie kleinkettiger nichtkodierender RNA darstellen, als Biomarker zur Frühdiagnose und Prognose des Lungenkarzinoms untersucht. Sie befinden sich in allen Körperflüssigkeiten und besitzen eine hohe Stabilität.

In der vorliegenden Studie wird die prognostische Wertigkeit der TNM-Klassifizierung nicht-kleinzelliger Lungenkarzinome diskutiert. Desweiteren werden die miRNA-Profile und die Rolle von fünf miRNAs als prognostische Biomarker für das postoperative Überleben im Plasma von Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom analysiert.

4.1 TNM-Klassifizierung

Die TNM-Klassifizierung ist weltweit die häufigste in der Medizin verwendete Methode zur Definition der anatomischen Ausbreitung bösartiger Tumoren und deren Einteilung in Stadien. Sie erlaubt prognostische Aussagen und kann die Therapie des Patienten entscheiden. T-Primärtumor, N-regionale Lymphknoten, und M-Fernmetasen sind die drei wichtigsten Parameter des TNM-Systems. Grundlage dieser Einteilung sind retrospektive Studien von Patientenkollektiven der jeweiligen Tumorrentität.

Sinn der TNM-Klassifizierung ist es, durch die Kombination der T-, N-, und M-Faktoren Stadien zu bilden, in denen Patienten signifikant unterschiedliche Prognosen haben.

Das Ziel ist, für die Patienten in den verschiedenen Stadien mit unterschiedlichen Prognosen unterschiedliche Therapien, insbesondere Therapiekombinationen, zu entwickeln, die zu einer Prognoseverbesserung führen.

Abbildung 1 zeigt die Tumorstadien der 8. Auflage der TNM-Klassifizierung für Lungenkarzinome. Die Überlebensraten der Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC) in den aus der TNM-Klassifizierung generierten Stadien sind signifikant unterschiedlich (Goldstraw *et al.*, 2016).

Die Einteilung der Tumoren in Stadien erlaubt die einheitliche und schnell nachvollziehbare Erfolgsbeurteilung durchgeführter Therapien und die internationale Vergleichbarkeit von Behandlungsergebnissen.

8. Auflage der TNM-Klassifizierung	2-Jahresüberlebensrate	5-Jahresüberlebensrate
IA1	97%	90%
IA2	94%	85%
IA3	92%	80%
IB	89%	73%
IIA	82%	65%
IIB	76%	56%
IIIA	65%	41%
IIIB	47%	24%
IIIC	30%	12%

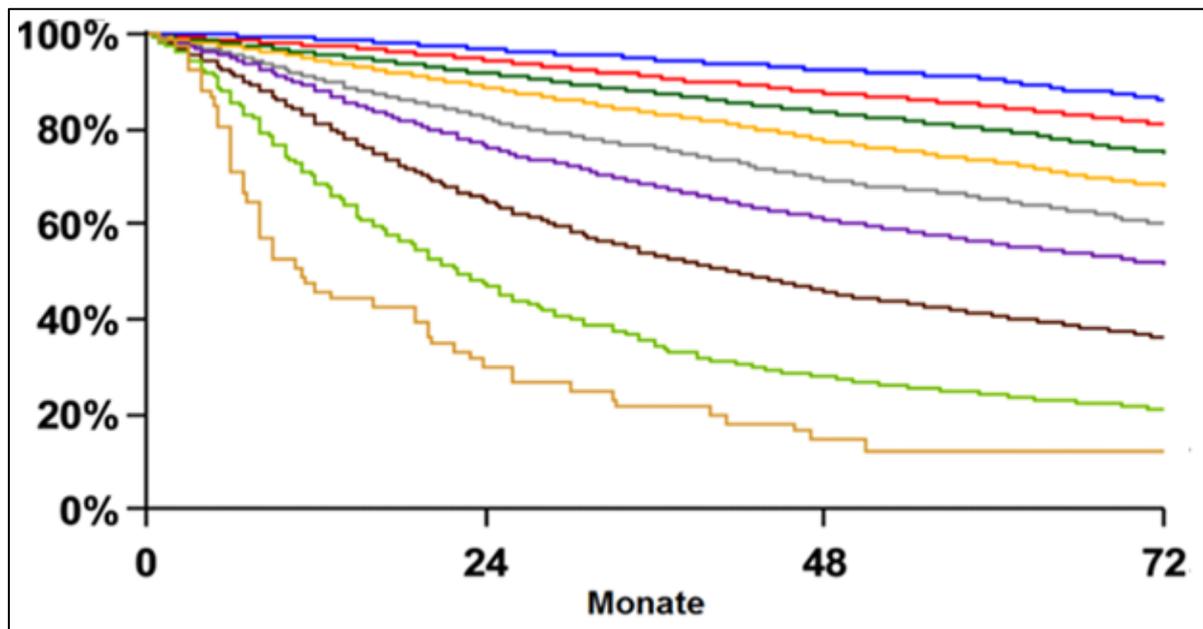


Abbildung 1: Überlebensraten in den verschiedenen Tumorstadien entsprechend der 8. Auflage der TNM-Klassifizierung (Goldstraw et al., 2016).

4.1.1 Geschichte der TNM-Klassifizierung

Die Geschichte der Etablierung der Tumorklassifizierung beginnt in den 1950er Jahren. P. Denoix, chirurgischer Onkologe im Gustave Roussy Institut in Paris, ist der Begründer der Tumorklassifizierung. Er beschrieb ein System zur Bewertung der anatomischen Ausdehnung maligner Tumoren anhand der T-, N-, M-Parameter (Denoix, 1952).

Die erste Tumor-Klassifizierung wurde nach Diskussionen und durch Konsensusmeinungen und ohne Datenbank durchgeführt.

Die 1. TNM-Auflage wurde im Jahr 1968 durch die Union internationale contre le cancer publiziert (UICC, 1968). Aktuell wird für UICC meist der Name Union for International Cancer Control benutzt. Clifton Mountain publizierte im Jahr 1973 eine Datenanalyse von 2155 Patienten mit Lungenkarzinom und schlug ein System zum Staging der Lungenkarzinome vor (Mountain et al., 1974). Seine Vorschläge wurden als TNM-System übernommen und bildeten die Grundlage für die 2. TNM-Auflage der

UICC, die im Jahr 1975 erschien (UICC, 1975), und die 1. Auflage des American Joint Committee on Cancer (AJCC) Staging Manual (AJCC, 1977).

Seit 1987 entwickeln und publizieren UICC und AJCC die Einteilung der Tumoren nach dem TNM-System zusammen.

Die 5. TNM-Auflage wurde im Jahr 1997 veröffentlicht (Hermanek *et al.*, 1997).

In einem Workshop der International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC) in London präsentierte Mountain im Jahr 1996 die Revision der 5. TNM-Auflage. Auf Grund der Konstellation kleine Datenmenge und alte Daten mit fast ausschließlicher Berücksichtigung chirurgischer Patienten wurde empfohlen, ein Staging Committee der IASLC zu etablieren. Das Staging Committee der IASLC entwickelte für UICC und AJCC die späteren Revisionen (Goldstraw, 1997; Mountain und Dresler, 1997).

Mountain führte die Entwicklung der TNM-Stadiierung bis zur 6. TNM-Auflage mit seiner Datenbank von zuletzt 5319 Fällen fort (Greene *et al.*, 2002)

Die 7. TNM-Auflage wurde erstmals von der IASLC entwickelt und von UICC und AJCC im September 2009 -die deutsche Version im Jahr 2010- publiziert. Sie enthält neue Klassifizierungen wie z.B. Gastrointestinale Stromatumoren (GIST) und wesentliche Veränderungen der vorherigen Klassifizierung von Ösophaguskarzinom, Lungenkarzinom und Kolonkarzinom (Wittekind und Meyer, 2010). Deutliche Änderungen entstanden im Bereich Lungenkarzinom. Sie basieren auf den Ergebnissen einer Datenanalyse der IASLC von über 80 000 Patienten mit Lungenkarzinom (Goldstraw *et al.*, 2007).

Auf Grund der Daten von fast 100 000 Patienten mit Beteiligung von 46 Zentren in 19 Ländern und nach Empfehlung des Stagingprojektes der IASLC wurde Ende 2015 die 7. TNM-Auflage von AJCC und UICC revidiert. Seit 01.01.2017 ist die 8. Auflage in Kraft (Goldstraw *et al.*, 2016).

4.1.2 Die Faktoren des TNM-Systems

4.1.2.1 T (Tumor)

Hier werden die Tumorausbreitung und das Verhalten des Primärtumors beschrieben.

- Größter Tumordurchmesser.
- Infiltrationstiefe des Primärtumors.
- Befall des Hauptbronchus.
- Tumoröse Hauptkarinainfiltration.
- Befall der Pleura visceralis.
- Assoziation mit Atelektase oder obstruktiver Pneumonitis.
- Assoziation mit anderen Tumorherden.
- Invasion des Primärtumors in die folgenden Strukturen: Thoraxwand, Nervus phrenicus, Perikard, Diaphragma, Mediastinum, Herz, große Gefäße, Trachea, Nervus recurrens, Ösophagus, Wirbelkörper.

4.1.2.2 N (Lymphknotenbefall)

Das lymphatische System der thorakalen Organe enthält eine Vielzahl von Lymphknoten. Die Lymphknoten werden in 14 topografische Stationen eingeteilt und von 1 bis 14 nummeriert. Die extrapulmonalen mediastinalen Lymphknotenstationen tragen einstellige Nummern (1 bis 9), und repräsentieren N2- und N3-Status. Die pulmonalen Lymphknotenstationen tragen zweistellige Nummern (10 bis 14) und stellen den N1-Status dar (Rusch *et al.*, 2007).

Gemäß den Empfehlungen der European Society of Thoracic Surgery (ESTS) werden die Lymphknoten als selektive Lymphknotenbiopsie bzw. Lymphknotensampling bei nicht resezierbaren Tumoren, als lungenlappenspezifische systematische Lymphknotendissektion für periphere T1-nicht-kleinzellige Lungenkarzinome, oder erweiterte Lymphknotendissektion oder systematische Lymphknotendissektion bei Patienten mit $T \geq 2$ cm nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom entnommen (De Leyn *et al.*, 2014). Bei der systematischen Lymphknotendissektion werden drei mediastinale Lymphknotenstationen entnommen, wobei immer die Station 7 mitentfernt wird. Dazu werden auch die hilären und intrapulmonalen Lymphknoten disseziert (Lardinois *et al.*, 2006).

Der Lymphknotenbefall wird beschrieben als:

- **Nx**= Lymphknotenbefall kann nicht bestätigt werden.
- **N0**= kein regionaler Lymphknotenbefall.
- **N1**= Befall der ipsilateralen peribronchialen und/oder ipsilateralen hilären und intrapulmonalen Lymphknotenstationen, einschließlich einer direkten Infiltration des Primärtumors in benachbarte Lymphknoten (Infiltration per continuitatem).
- **N2**= Befall der ipsilateralen mediastinalen und/oder der subkarinalen Lymphknotenstationen.
- **N3**= Befall der kontralateralen mediastinalen und hilären Lymphknotenstationen oder skaleni-schen oder supraklavikulären Lymphknotenstationen (ipsi- oder kontralateral).

Eine Lymphknotenmetastase wird endgültig durch histologische Untersuchung der intraoperativ gewonnenen Lymphknoten gesichert.

Sowohl die Zahl der befallenen Lymphknoten als auch deren Lokalisation besitzen eine wichtige prognostische Rolle beim Lungenkarzinom (Luzzi *et al.*, 2000).

In den Jahren 1986 und 1988 beschrieben Sawamura *et al.* bzw. Naruke *et al.*, dass die mittlere Überlebenszeit bei N2-Status und kompletter Resektion der mediastinalen Lymphknoten länger ist als nach einer nichtoperativen Therapie .

Rusch *et al.* zeigten, dass die Prognose deutlich schlechter bei multilevel N1-Lymphknotenbefall im Vergleich zu single level N1-Lymphknotenbefall ist (Rusch *et al.*, 2007).

4.1.2.3 Naruke lymph node map vs. Mountain-Dresler lymph node map

Die Lymphknoten werden entweder nach der Japan Lung Cancer Society als Naruke Lymphknotenkarte (Naruke *et al.*, 1978) oder nach der American Thoracic Society (ATS) und dem American Joint Committee on Cancer (AJCC) als Mountain-Dresler (MD-ATS) Lymphknotenkarte (Mountain und Dresler, 1997) benannt.

Der Hauptunterschied zwischen den Einteilungen liegt darin, dass in der Naruke Lymphknotenkarte die subkarinalen Lymphknoten entlang der inferioren Kante des Hauptbronchus als Station 10 d.h. N1-Status, aber in der MD-ATS Lymphknotenkarte als Station 7 d.h. N2-Status gerechnet werden. Dies führt dazu, dass in dem Datenpool, der der AJCC vorliegt, N1 und N2 verschieden definiert ist, und somit keine korrekte Statistik über die N-Stationen möglich ist.

Wegen der Diskrepanzen zwischen Naruke- und Mountain-Dresler Lymphknotenkarten wurde von der IASLC eine modifizierte Lymphknotenkarte veröffentlicht (Rusch *et al.*, 2009).

4.1.2.4 M (Fernmetastasen beim Lungenkarzinom)

Fernmetastasen sind Absiedlungen von Tumorgewebe in anderen Organen, die sich nicht in der Nähe des Primärtumors und des regionalen Lymphknotensystems befinden. Die Fernmetastasierungswege des Lungenkarzinoms können hämatogen und/oder lymphogen sein. Die häufigsten Metastasierungslokalisationen bei Lungenkarzinomen sind Hirn, Knochen, Nebennieren, Leber.

Fernmetastasen werden im TNM-System beschrieben als:

- **M0**= keine Fernmetastasierung des Primärtumors.
- **M1**= Fernmetastasierung des Primärtumors.
- **M1a**= Tumorherde in der anderen Lunge oder Pleurabefall oder maligner Pleura- oder Perikarderguss.
- **M1b**= Fernmetastasierung (7. Auflage) bzw. solitäre extrathorakale Fernmetastasierung (8. Auflage).
- **M1c**= mehrere extrathorakale Fernmetastasen in einem oder in multiplen Organen (8. Auflage).

4.1.3 Siebente Auflage der TNM-Klassifizierung für das Lungenkarzinom (UICC, AJCC)

Die 7. Auflage der TNM-Klassifizierung für das Lungenkarzinom wurde im Januar 2010 veröffentlicht (Wittekind, 2010).

Die Hauptänderungen im Vergleich mit der 6. Auflage betreffen die Größenabstufung des Primärtumors. Die Tumorgöße von 2 cm trennt T1a von T1b, die Tumorgöße von 5 cm trennt T2a von T2b, und die Tumorgöße von 7 cm trennt T2b von T3.

Getrennter Tumorherd (Satellit) im gleichen Lappen wird als T3 und ein Tumorherd in einem anderen ipsilateralen Lappen wird als T4 eingestuft.

Sowohl maligne Pleura- oder Perikardergüsse als auch getrennte Tumorherde in kontralateralen Lappen werden von T4 in M1a umgruppiert. Fernmetastasen werden zu M1b.

Die Lymphknotenklassifizierung blieb unverändert, und zum ersten Mal wurden die bronchopulmonalen Karzinoide nach TNM-System eingestuft (Travis *et al.*, 2008).

T	
Tx	Der Tumor kann nicht diagnostiziert werden oder Nachweis von bösartigen Zellen im Sputum oder in der bronchoalveolären Lavage ohne Lokalisation eines Tumors.
T0	Kein Primärtumor.
Tis	Carcinoma in situ.
T1	Tumorgröße ≤ 3 cm, umgrenzt von Lungengewebe oder Pleura viszeralis ohne Lappenbronchusinfiltration.
T1a	Tumorgröße ≤ 2 cm.
T1b	Tumorgröße > 2 cm und ≤ 3 cm.
T2	Tumorgröße > 3 cm und ≤ 7 cm oder Primärtumor mit Hauptbronchusinfiltration (≥ 2 cm Abstand von Hauptkarina) oder Infiltration der Pleura viszeralis oder Primärtumor mit Atelektase bzw. obstruktiver Pneumonie ohne Befall der gesamten Lunge.
T2a	Tumorgröße > 3 cm aber ≤ 5 cm.
T2b	Tumorgröße > 5 cm aber ≤ 7 cm.
T3	Tumorgröße > 7 cm oder Primärtumor mit Infiltration von Thoraxwand (einschl. Tumoren mit Pancoast-Syndrom), Zwerchfell, N. phrenicus, Pleura mediastinalis, Perikard oder Hauptbronchusinfiltration (< 2 cm Abstand von Hauptkarina ohne Hauptkarinainfiltration), oder Primärtumor mit Atelektase bzw. obstruktiver Pneumonie der gesamten Lunge oder mit separatem Tumorherd im selben Lungenlappen.
T4	Primärtumor jeder Größe mit Infiltration einer oder mehrerer Strukturen (Mediastinum, Herz, große Gefäße, Trachea, N. recurrens, Ösophagus, Wirbelkörper, Hauptkarina) oder separater Tumorherd in einem anderen Lungenlappen der gleichen Seite.

Tabelle 1: Größenabstufung des Primärtumors in der 7. Auflage der TNM-Klassifizierung (UICC, AJCC).

Stadium	T	N	M
Okkultes Karzinom	Tx	N0	M0
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium IA	T1a-T1b	N0	M0
Stadium IB	T2a	N0	M0
Stadium IIA	T1a-b, T2a	N1	M0
	T2b	N0	M0
Stadium IIB	T2b	N1	M0
	T3	N0	M0
Stadium IIIA	T1a-T3	N2	M0
	T3	N1	M0
	T4	N0-N1	M0
Stadium IIIB	T4	N2	M0
	T1a-T4	N3	M0
Stadium IV	jedes T	Jedes N	M1a oder M1b

Tabelle 2: 7. Auflage der TNM-Klassifizierung (UICC, AJCC), Stadieneinteilung.

4.1.4 Achte Auflage der TNM-Klassifizierung für das Lungenkarzinom (UICC, AJCC)

Die 8. Auflage der TNM-Klassifizierung für das Lungenkarzinom ist seit 01.01.2017 gültig. Es gibt Veränderungen in den T- und M-Parametern und in der Stadiengruppierung. Das minimalinvasive Adenokarzinom wird als T1mi aufgenommen. Die Tumorgöße bis 1 cm wird als T1a, > 1 cm bis 2 cm als T1b, > 2 cm bis 3 cm als T1c, > 3 bis 4 cm als T2a, und > 4 bis 5 cm als T2b eingestuft. T3 liegt zwischen 5 und 7 cm, und T4 ist jeder Tumor, der größer als 7 cm ist.

Der Befall des Hauptbronchus ist jetzt generell T2. Die Tumordinfiltration des Zwerchfells wird zu T4. Das Vorliegen von Atelektase oder Pneumonie wegen Tumor wird als T2 eingruppiert.

Die solitären extrathorakalen Fernmetastasen werden zu M1b und mehrere extrathorakale Metastasen in einem oder verschiedenen Organen zu M1c.

T	
Tx	Der Tumor kann nicht diagnostiziert werden oder Nachweis von bösartigen Zellen im Sputum oder in der bronchoalveolären Lavage ohne Lokalisation eines Tumors.
T0	Kein Primärtumor.
Tis	Carcinoma in situ.
T1	Tumorgöße ≤ 3 cm, umgrenzt von Lungengewebe oder Pleura viszeralis ohne Lappenbronchusinfiltration.
T1mi	minimalinvasives Adenokarzinom.
T1a	Tumorgöße ≤ 1 cm.
T1b	Tumorgöße > 1 cm aber ≤ 2 cm.
T1c	Tumorgöße > 2 cm aber ≤ 3 cm.
T2	Tumorgöße > 3 cm aber ≤ 5 cm oder Primärtumor mit Hauptbronchusinfiltration (unabhängig vom Abstand zur Hauptkarina) oder Infiltration der Pleura viszeralis oder Primärtumor mit Atelektase bzw. obstruktiver Pneumonitis.
T2a	Tumorgöße > 3 cm aber ≤ 4 cm.
T2b	Tumorgöße > 4 cm aber ≤ 5 cm.
T3	Tumorgöße > 5 cm aber ≤ 7 cm oder Primärtumor mit separaten Tumorherden im selben Lungenlappen oder Primärtumor mit Infiltration von Thoraxwand (einschl. Tumoren mit Pancoast-Syndrom), N. phrenicus, Perikard.
T4	Tumorgöße > 7 cm, oder Primärtumor mit separaten Tumorherden in einem anderen Lungenlappen der gleichen Seite, oder Infiltration des Primärtumors in eine oder mehrere Strukturen (Zwerchfell, Mediastinum, Herz, große Gefäße, Trachea, N. laryngeus recurrens, Ösophagus, Wirbelkörper, Hauptkarina).

Tabelle 3: Größenabstufung des Primärtumors in der 8. Auflage der TNM-Klassifizierung (UICC, AJCC) (Goldstraw et al., 2016).

Stadium	T-Kategorie	N-Kategorie	M-Kategorie
Okkultes Karzinom	Tx	N0	M0
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium IA	T1	N0	M0
Stadium IA1	T1mi, T1a	N0	M0
Stadium IA2	T1b	N0	M0
Stadium IA3	T1c	N0	M0

Stadium IB	T2a	N0	M0
Stadium IIA	T2b	N0	M0
Stadium IIB	T1a-c, T2a-b	N1	M0
	T3	N0	M0
Stadium IIIA	T1a-c, T2a-b	N2	M0
	T3	N1	M0
	T4	N0-N1	M0
Stadium IIIB	T3, T4	N2	M0
	T1a-c, T2a-b	N3	M0
Stadium IIIC	T3, T4	N3	M0
Stadium IV	jedes T	Jedes N	M1
Stadium IVA	jedes T	Jedes N	M1a, M1b
Stadium IVB	jedes T	Jedes N	M1c

Tabella 4: 8. Auflage der TNM-Klassifizierung (UICC, AJCC), Stadieneinteilung (Goldstraw et al., 2016).

4.2 Karzinogenese

Ein Karzinom entsteht durch eine komplexe Interaktion zwischen genetischen und epigenetischen Vorgängen. Die Änderungen, die zur Tumorzellentwicklung führen, betreffen Wachstumssignale, mangelnden Zelltod, unregelmäßige Zellproliferation, Vaskulogenese und Angiogenese, Widerstand gegen wachstumsinhibierende Signale und die Fähigkeit zur lokalen Invasion und Fernmetastasierung (Hanahan und Weinberg, 2000). Für das Lungenkarzinom sind typische genetische Veränderungen beschrieben. Sie betreffen Chromosomeninstabilität, abnorme Genexpression in der Zellzykluskontrolle, allelische Verluste und Genmutationen (Onko- und Tumorsuppressorgene) (Travis et al., 2015).

Am häufigsten tritt eine Aberration des *TP53*-Tumorsuppressorgens in Lungenkarzinomen auf (Pfeifer et al., 2002). Das p53 Protein wird vom *TP53*-Tumorsuppressorgen kodiert, spielt eine übergeordnete Rolle im Zellzyklus und fungiert als „Wächter des Genoms“. Seit langem ist bekannt, dass das mutierte p53 Protein ein kritischer Faktor bei der Entstehung verschiedener maligner Tumoren ist, denn es ändert in der mutierten Form seine Funktion vom Suppressorgen zum Onkogen. Es gibt derzeit noch keine Möglichkeit, das mutierte p53 zu eliminieren. Das könnte jedoch in Zukunft durch medikamentöse Beeinflussung von Masterregulatoren der p53 Expression, z.B. Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2), gelingen (Choi et al., 2019).

Das erste identifizierte und molekular definierte Tumorsuppressorgen ist das *RBI* Gen (retinoblastoma susceptibility protein gene). Mutationen des Gens sind in fast allen Formen des Retinoblastoms vorhanden und kommen auch in verschiedenen anderen Tumoren vor. Die Wirkung des Retinoblastomproteins (pRb) besteht in erster Linie in der Wachstumskontrolle von Zellen (Dyson, 2016).

Eine weitere karzinogene genetische Veränderung ist der Verlust der Heterozygotie auf dem kurzen Arm von Chromosom 3. Dieser Arm von Chromosom 3 hat Tumorsuppressorgene, die wahrscheinlich in der Lungenkarzinogenese eine Rolle spielen:

- *RASSF1* (Ras association domain family member 1) (Ren et al., 2017).

- *SEMA3B* (semaphorin 3B) (Loginov *et al.*, 2015).
- *FHIT* (fragile histidine triad) (Lee *et al.*, 2017).

Weitere Mutationen von Tumorsuppressorgenen treten beim *APC*-Gen (APC regulator of Wnt signaling pathway) auf. Es befindet sich auf Chromosom 5 und kodiert das APC-Protein, das als Antagonist im Wnt-Signalweg wirkt (Ohgaki *et al.*, 2004).

Darüber hinaus spielen die Amplifikationen des *MYC*-Gens (*MYC* proto-oncogene, bHLH transcription factor) eine Rolle beim Lungenkarzinom (Flacco *et al.*, 2015).

Innerhalb der verschiedenen histologischen Varianten der Lungenkarzinome gibt es weitere Untergruppen, die durch molekulare Veränderungen im Genom der Tumoren charakterisiert sind. Es handelt sich um Mutationen, Translokationen und Amplifikationen. Da sie für das maligne Wachstum der Zellen verantwortlich sind, heißen sie Treibermutationen (driver mutation) (Tabelle 5). Über die Beeinflussung der Genprodukte der mutierten Gene kann eine zielgerichtete Behandlung der Tumoren möglich sein.

Gen	Genetische Veränderungen
<i>EGFR</i> (epidermal growth factor receptor)	Exon 18-21 Mutationen
<i>ALK</i> (Anaplastic lymphoma kinase)	Translokationen
<i>ROS1</i> (proto-oncogene, receptor tyrosine kinase)	Translokationen
<i>KRAS</i> (proto-oncogene, GTPase)	Exon 2,3 Mutationen
<i>BRAF</i> (proto-oncogene, serine/threonine kinase)	V600E-Mutation
<i>MET</i> (proto-oncogene, receptor tyrosine kinase)	Exon 14 Mutationen, Amplifikationen
<i>PIK3CA</i> (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha)	Amplifikationen
<i>FGFR1</i> (fibroblast growth factor receptor 1)	Amplifikationen
<i>DDR2</i> (discoidin domain receptor tyrosine kinase 2)	R105S und N456S Mutationen
<i>PTEN</i> (phosphatase and tensin homolog)	Mutationen, Deletionen
<i>ERBB2</i> (erb-b2 receptor tyrosine kinase 2, auch HER2 genannt)	HER2/ERBB2-Amplifikationen HER2/ERBB2-Mutationen
<i>NTRK1</i> , <i>NTRK2</i> , <i>NTRK3</i> (neurotrophic receptor tyrosine kinase 1, 2, 3)	Translokationen

Tabelle 5: Übersicht über die häufigsten Treibermutationen, die bei den verschiedenen histologischen Formen der Lungenkarzinome auftreten und derzeit oder zukünftig zielgerichtet medikamentös therapiert werden können. Die genetischen Veränderungen sind Mutationen, Translokationen, Amplifikationen und Deletionen.

Die genetischen Veränderungen, die zur Tumorentstehung beitragen, sind meist Mutationen, die die Basenpaare der DNA betreffen. Es muss aber nicht immer die Basenfolge der DNA verändert werden, um z.B. Onkogene zu aktivieren oder Tumorsuppressorgene zu deaktivieren. Sogenannte epigenetische Veränderungen können einen ähnlichen oder gleichen Effekt haben. In den normalen Körperzellen bestimmen epigenetische Mechanismen, welche Gene aktiv sind. Gene, die in einer hochspezialisierten Zelle nicht benötigt werden, werden abgeschaltet. Es gibt drei Mechanismen, durch die auf diesem Weg die Genexpression beeinflusst werden kann (Portela und Esteller, 2010):

- DNA-Methylierung

- Histon-Modifizierung
- Gen-Silencing durch miRNAs

DNA-Methylierung ist die wichtigste epigenetische Maßnahme. Unter diesem Begriff versteht man die chemische Anlagerung von Methylgruppen (-CH₃) an bestimmte Nukleotide der DNA. Dieser Prozess wird durch das Enzym DNA Methyltransferase (DNMT) katalysiert (Shen und Waterland, 2007). Die DNA-Sequenz wird durch diese Methylierung nicht verändert, sondern die Genexpression wird modifiziert.

Die Methylierung der Cytosine in der Promotorregion eines Gens führt zur Inhibierung der Genexpression. Die Methylierungsmuster der DNA verschiedener Gene unterscheiden sich bei verschiedenen histologischen Formen des Lungenkarzinoms (Hanabata *et al.*, 2004). DNA-Methylierungsmuster als Biomarker zur Frühdiagnose der Lungenkarzinome wurden in verschiedenen Körperflüssigkeiten (Sputum, bronchiale Lavage und Blut) untersucht. Blutproben (Plasma oder Serum) zeigten die besten Ergebnisse (Sensitivität 84%, Spezifität 74%) (Zhang *et al.*, 2011b).

Histone sind alkalische Proteine, die von Albrecht Kossel im Jahr 1884 entdeckt wurden. Sie befinden sich im Zellkern und sind der Hauptbestandteil des Chromatins. Sie fungieren als Verpackung der DNA und bilden Spulen, um die sich die DNA wickelt, sind somit am Aufbau der Nukleosomen beteiligt. Sie spielen auch in der Genexpression eine wichtige Rolle. Histone werden durch unterschiedliche chemische Prozesse (Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung, Ubiquitinierung oder Sumoylierung) modifiziert. Histonmodifizierungen können die Bindung von regulierenden Faktoren fördern oder hemmen, sie können auch direkt die räumliche Struktur der DNA und somit die Genexpression beeinflussen. Es wurde in den letzten Jahren über verschiedene Histonmodifizierungen bei bösartigen Erkrankungen berichtet. Histonmodifizierungen wurden auch als Biomarker für Lungenkarzinome untersucht (Sawan und Herceg, 2010).

MicroRNAs sind kleine, nicht kodierende Ribonukleinsäuren, die die Expression von Zielgenen regulieren und dadurch eine Rolle auf der epigenetischen Ebene spielen (Garzon *et al.*, 2009).

4.3 MicroRNA

4.3.1 Definition, Geschichte

Micro-Ribonukleinsäuren (miRNAs) sind eine Familie von kurzkettigen, einsträngigen, hoch konservierten, nichtkodierenden RNAs, die aus 18 bis 24 Nukleotiden (nt) bestehen. Es gibt sie bei Pflanzen und Tieren. Sie repräsentieren 1-2% des menschlichen Genoms und binden an messenger-RNA-Moleküle (mRNA), regulieren damit die Genexpression (hauptsächlich durch Gen-Silencing). Es wird vermutet, dass die miRNAs mehr als 30% der menschlichen Gene regulieren. Sie können als Tumorsuppressor oder Onkogen in verschiedenen Tumoren wirken (Swanton und Beck, 2014). Durch die Überexpression onkogener miRNAs im Tumor werden die Expression von Tumorsuppressorgenen inhibiert und onkogene Transkriptionsfaktoren exprimiert. Suppressor miRNAs regulieren die Expression von Onkogenen (z.B. c-Myc) herunter (Biamonte *et al.*, 2019).

1993 entdeckten Lee *et al.* in *Caenorhabditis elegans* (Fadenwurm aus der Gruppe der Rhabditiden) die erste miRNA. Sie spielt eine wichtige Rolle in dessen Entwicklung (Lee *et al.*, 1993). Lee *et al.* identifizierten bei *C. elegans* das Gen *lin-4*, es ist an der *C. elegans* Entwicklung beteiligt und kodiert kein Protein, sondern zwei kurzkettige RNA-Moleküle mit 60 bzw. 20 Nukleotiden. Ersteres ist eine pre-microRNA, die zweite und kleinere RNA stellt die reife microRNA dar und reguliert das *lin-14* Gen und das *lin-28* Gen. Die *lin-4* miRNA verhindert die mRNA Translation durch Bindung an eine komplementäre Sequenz in der 3'UTR Region des *lin-14*- und des *lin-28*-Transkripts. Es wurde zunächst vermutet, dass dieses Gene-Silencing Regulationsphänomen mittels miRNA spezifisch für *C. elegans* sei. Eine weitere miRNA bei *C. elegans*, die durch Regulierung der Expression des Gens *lin-4* an der Entwicklung beteiligt ist, ist *let-7*. Es zeigte sich, dass die *let-7* miRNA in verschiedenen Tierspezies, einschließlich Fliegen und Säugetieren, in evolutionär hochkonservierte Form vorkommt.

Aktuell sind beim Menschen mehr als 2500 miRNAs bekannt (Kozomara und Griffiths-Jones, 2014).

4.3.2 Nomenklatur

Der Begriff „micro-RNA“ wurde erstmals 2001 benutzt (Ruvkun, 2001), und die einheitliche Nomenklatur der miRNAs wurde von Ambros *et al.* im Jahr 2003 vorgestellt (Ambros *et al.*, 2003). Mit Ausnahme von *let*- und *lin*-miRNAs werden die miRNAs nach bestimmten Regeln benannt. Die ersten drei Buchstaben sind spezifisch für jede Spezies. Sie entsprechen dem abgekürzten lateinischen Namen. Beispielsweise steht für Mensch (*Homo sapiens*) "hsa" (z.B. hsa-miR-142-3p), und für Ratte (*Rattus norvegicus*) "rno" (z.B. rno-mir-1). Dann folgt die Abkürzung „miR-“ mit Identifikationsnummer (z.B. miR-142).

Das miRNA-kodierende Gen wird mit der gleichen Buchstabenfolge benannt, aber in anderer Schreibweise, mit großen Buchstaben oder in kursiver Schrift (z.B. *mir-1* in *C. elegans*).

Die Identifikationsnummer wird sequentiell erstellt, d.h. unabhängig vom Organismus bekommen die komplett übereinstimmenden und die annähernd übereinstimmenden miRNAs die gleiche Nummer. Übereinstimmende miRNAs eines Organismus mit Ursprung von verschiedenen Genloci werden mit zusätzlichen Zahlen bezeichnet (z.B. „miR-23-1“, „miR-23-2“).

Mit zusätzlichen Buchstaben werden ähnliche miRNAs (Unterschied in einem oder in zwei Nukleotiden) bezeichnet (z.B. miR-181a und miR-181b).

Wenn zwei miRNAs von einer pre-miRNA (precursor-miRNA) stammen und miRNA-Klonierungsstudien die Differenzierung zwischen Leitstrang und Begleitstrang ermöglichen, wird der Begleitstrang mit Sternchen bezeichnet (z.B. Leitstrang miR-56 und Begleitstrang miR-56*). Falls die Identifizierung des Leitstrangs der miRNA nicht möglich ist, wird „-3p“ für miRNA vom 3'-Arm der pre-miRNA und „-5p“ für miRNA vom 5'-Arm der pre-miRNA eingesetzt (z.B. miR-142-3p und miR-574-5p).

4.3.3 Biosynthese, Wirkmechanismen, Regulation der Biosynthese

Die Biogenese der miRNA, ihr Wirkmechanismus und die Regulation der Biosynthese sind in Abbildung 2 dargestellt. Die Biosynthese der miRNA ist ein Prozess, der an eigenständigen miRNA Genen beginnt. Die miRNA-kodierenden Gene befinden sich auf Chromosomen in unterschiedlichen Lokalisationen, als eigenständiges intergenetisches miRNA-Gen oder in Introns oder Exons Protein kodierender Gene (Olena und Patton, 2010).

Als erster Schritt wird das miRNA-Gen mittels RNA-Polymerase II, oder bei einigen intergenischen miRNAs mittels RNA-Polymerase III (Borchert *et al.*, 2006) transkribiert. Die Transkripte sind einzelsträngig und bilden durch intramolekulare Basenpaarung Haarnadelstrukturen (hairpin). Sie bestehen aus 500 bis 3000 Nukleotiden und werden primäres miRNA-Transkript (primary microRNA, pri-miRNA) genannt. Die Reifung der miRNA erfolgt schrittweise durch die Prozessierung (posttranskriptionelle Modifizierung) der pri-miRNA. Das RNase-III-Enzym Drosha beginnt den Prozess im Zellkern. Es bildet mit dem Protein DiGeorge syndrome critical Region Gene (DGCR8, Pasha bei *Drosophila melanogaster*) den Mikroprozessor-Komplex. Durch den Mikroprozessor-Komplex werden 70–80 Nukleotide herausgeschnitten, das entstehende Produkt wird als precursor miRNA (pre-miRNA, Vorläufer-miRNA) bezeichnet.

Beim intronischen miRNA-Gen entsteht die pre-miRNA durch Spleißen der pri-miRNA und nicht durch Prozessieren mit dem Mikroprozessor-Komplex (Kim *et al.*, 2009).

Die pre-miRNA wird durch die Kernmembran ins Zytoplasma mit Hilfe von Exportin-5 (XPO5, Exportrezeptor) und Ras-related nuclear protein (RanGTP, auch GTP-binding nuclear protein Ran) transportiert (Bohnsack *et al.*, 2004). Dann verbindet sich das RNase-III-Enzym Dicer mit dem transactivation-responsive RNA-binding protein (TRBP) und schneidet die pre-miRNA in kurze doppelsträngige RNA (dsRNA) mit 17–24 Nukleotiden (miRNA-miRNA*-Duplex) (Ketting *et al.*, 2001).

Bei Säugetieren unterstützt manchmal das Argonautenprotein 2 (AGO2) die Dicer-Prozessierung, es entsteht so eine AGO2-cleaved precursor miRNA (ac-pre-miRNA). Als nächstes wird die doppelsträngige RNA in zwei einzelsträngige RNAs getrennt, wobei eine als Leitstrang (guide strand) miRNA und die andere als Begleitstrang (passenger strand) miRNA bezeichnet wird. Der Leitstrang bildet die reife miRNA und der Begleitstrang wird abgebaut, in manchen Fällen bilden jedoch beide Stränge reife miRNAs (Okamura *et al.*, 2008).

Die reife miRNA bildet mit dem RNA-induced silencing complex (RISC) den miRISC (Rana, 2007). Er wird auch miRNA-Protein-komplex (miRNP) genannt. Die Hauptkomponenten von RISC sind die Argonautenproteine (AGO1-4 bei Säugetieren), insbesondere AGO2, Glycin-Tryptophan Protein (GW182), Dicer, Protein ACTivator of the interferon-induced protein kinase (PACT) und transactivation-responsive RNA-binding protein (TRBP) (Macrae *et al.*, 2008).

MiRISC reguliert die Expression des Zielgens herunter. Dies ist abhängig vom Ausmaß der Komplementarität der Watson-Crick-Basenpaarung an der Zielstelle bei miRNA und mRNA. Die Bindung zwischen miRNA und mRNA geschieht im Bereich der „seed sequence“ der miRNA. Dies ist eine

hochkonservierte Sequenz, die im Bereich der Nukleotiden 2-8 lokalisiert ist (Brennecke *et al.*, 2005). Es kommt entweder zur Blockierung der mRNA Transkription (reversibel) oder zum Abbau der mRNA (nicht reversibel) durch Exoribonukleasen oder durch Deadenylierung (Perron und Provost, 2008). Die beiden beschriebenen Mechanismen werden als Slicer-abhängige oder Slicer-unabhängige Inhibierung der Expression des Zielgens bezeichnet (Coller und Parker, 2005). Unter „slicing“ versteht man die Endonuklease-Spaltung der Ziel-mRNA mittels AGO2 bei Komplementarität der Watson-Crick-Basenpaarung zwischen miRNA und mRNA im Bereich der „seed sequence“ (Valencia-Sanchez *et al.*, 2006).

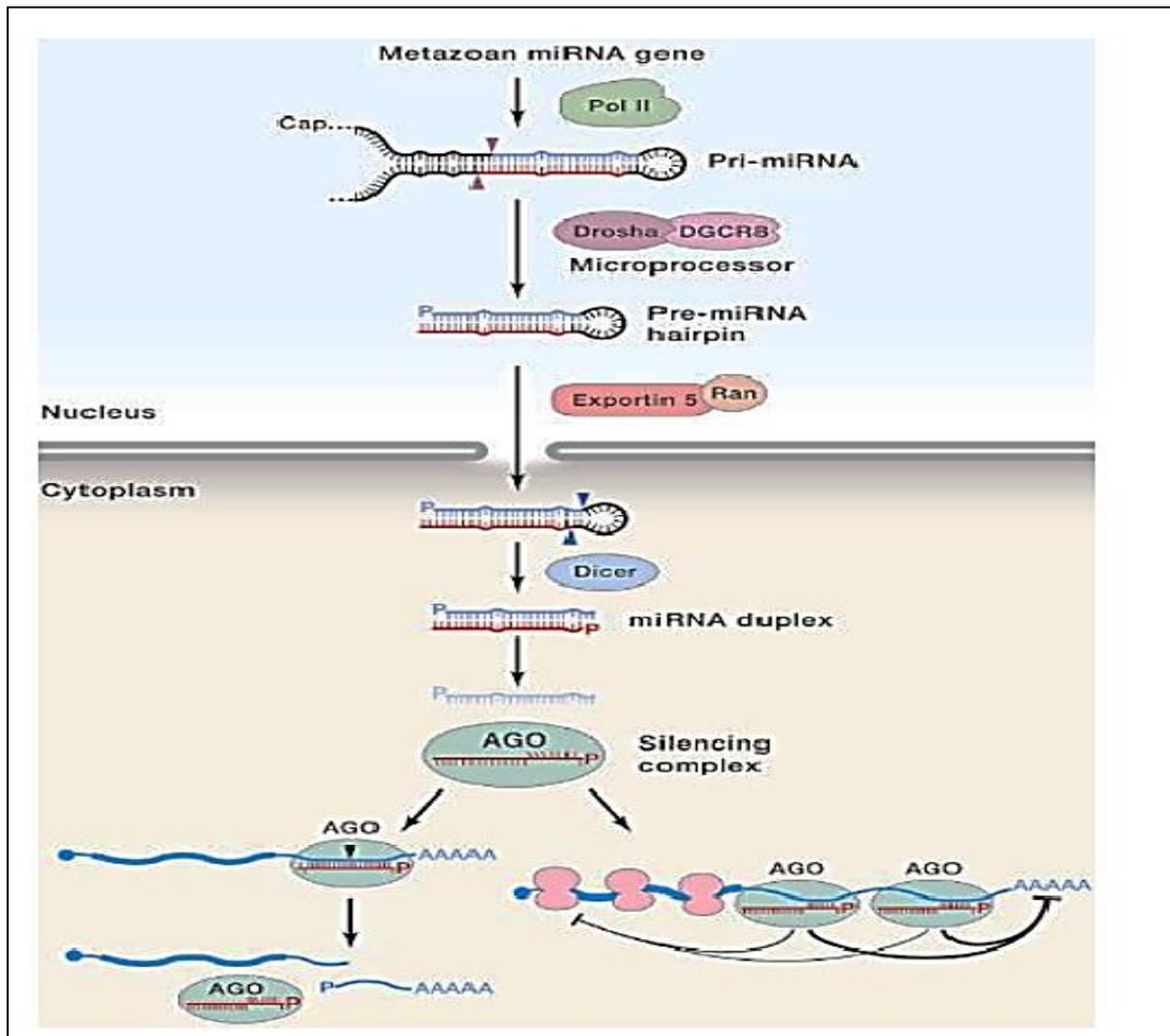


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Biogenese und des Wirkmechanismus der miRNA. Im Zellkern wird primary miRNA (pri-miRNA) von einem miRNA-Gen mit Hilfe von RNA-Polymerase II (Pol II) transkribiert. Die primary miRNA (pri-miRNA) hat eine Haarnadelstruktur mit 5'Cap und Poly(A)-Schwanz. Die Prozessierung der pri-miRNA erfolgt mittels Microprozessorkomplex, der aus RNase-III (Drosha) und Cofaktor DGCR8 besteht und führt zur Vorläufer-miRNA (pre-miRNA). Dann wird die pre-miRNA mittels Ran-GTP und Exportin-5 aus dem Nukleus ins Zytoplasma transportiert. Im Zytoplasma wird die pre-miRNA durch RNase-III (Dicer) zu einem miRNA-miRNA*-Duplex, der aus Leitstrang (guide strand) miRNA und Begleitstrang (passenger strand) besteht. Der Begleitstrang wird meistens abgebaut. Der Leitstrang bildet mit der AGO-Familie (AGO1-4) den RNA-induced silencing complex (miRISC). Der miRISC bindet mit der miRNA an die Target-mRNA in Abhängigkeit vom Ausmaß der Komplementarität der Watson-Crick-Basenpaarung und reguliert dadurch die Genexpression (Gen Silencing) (Bartel, 2018).

Einzelne oder kleine Gruppen (Cluster) von miRNAs regulieren die Expressionmuster von hunderten Ziel-mRNAs (Jeansonne *et al.*, 2015).

Die Regulierung der miRNA-Biosynthese ist ein Vorgang, der durch zusätzliche Proteine mit Protein-Protein oder Protein-RNA Interaktion erfolgt. Dieser Vorgang findet auf verschiedenen Ebenen (Transkription von miRNA-Genen oder miRNA-Prozessierung im Zellkern oder Zytoplasma) statt (Finnegan und Pasquinelli, 2013). Störungen in der miRNA Prozessierung im Zellkern und im Zytoplasma stellen die Ätiologie für miRNA-Reifungsdefekte dar. Sie spielen eine Rolle in der Entwicklung von Tumorerkrankungen.

4.3.4 Die Rolle der miRNAs bei Lungenkarzinomen und anderen malignen Tumoren

Die erste Korrelation zwischen miRNA-Dysregulation und einer malignen Erkrankung wurde 2002 bei der chronischen lymphatischen Leukämie (CLL) entdeckt (Calin *et al.*, 2002). Es ist derzeit bekannt, dass die miRNAs mehr als ein Drittel des Genoms regulieren, darüber hinaus kann eine einzelne miRNA gleichzeitig sehr viele Gene regulieren, wodurch sie mehrere biologische Prozesse einschließlich Proliferation, Apoptose, Entwicklung, Zelldifferentiation, Adhäsion, Migration, und Invasion kontrollieren.

Die Hälfte der menschlichen miRNA-Gene ist auf den Stellen der Chromosomen, die für Tumorentstehung bekannt sind, lokalisiert (Calin *et al.*, 2004). Aus den genannten Gründen können die miRNAs entweder als Onkogen (z.B. miR-21, miR-17-92 Cluster und miR-155) oder Tumorsuppressor fungieren (z.B. let-7 Familie, miR-200 Familie) (Chen, 2005).

Im Tiermodell mit Ratten, die mit karzinogenen tabakspezifischen Nitrosaminen behandelt werden, kommt es zur Dysregulation verschiedener miRNAs. Die Nitrosamine werden von Cytochrom P450 aktiviert und die Expression verschiedener miRNAs, insbesondere miR-126, wird reduziert (Kalscheuer *et al.*, 2008). Die Veränderungen sind auch in präinvasiven Läsionen der Lungenkarzinome wie Dysplasie oder Carcinoma in situ vorhanden (Mascaux *et al.*, 2009). Auf der anderen Seite wurde gezeigt, dass die Störungen der miRNA-Biosynthese nicht nur eine Rolle in der Karzinogenese spielen, sondern auch die Prognose beeinflussen, beispielsweise geht die reduzierte Dicer Expression mit einer schlechten Prognose bei Lungenkarzinomen einher (Karube *et al.*, 2005).

Da die miRNAs zahlreiche onkogene Wege modifizieren, können Veränderungen der miRNA-Expression zur Tumorentwicklung führen. Ein Beispiel ist der Retinoblastom Weg. Der Tumorsuppressor Retinoblastom-Protein (pRb) hemmt übermäßiges Zellwachstum, er kann sich an die Transkriptionsfaktoren der E2F Familie binden und die Fortführung des Zellzyklus inhibieren. Die überexprimierte miR-106a reguliert pRb herunter und kann so zur Tumorentwicklung beitragen (Volinia *et al.*, 2006).

Ein wachsender Tumor benötigt zur Sauerstoffversorgung Angiogenese und Vaskulogenese. Beides wird durch miRNAs beeinflusst, z.B. fördert miR-126 durch Regulation der vascular endothelial growth factor (VEGF)-Signalwege und fibroblast growth factor (FGF)-Signalwege die Angiogenese (Wang *et al.*, 2008).

Im Rahmen der Metastasierung spielt die miR-200-Familie eine Rolle, indem der Prozess der epithelial-mesenchymalen Transition beeinflusst wird (Gregory *et al.*, 2008).

Die miRNAs können, wie oben beschrieben, verschiedene molekulare Wege regulieren, die eine Rolle in Tumorentstehung, Wachstum des Tumors und Metastasierung spielen. Aus diesen Gründen können die miRNAs auch zur molekularen Zieltherapie dienen (Esquela-Kerscher und Slack, 2006). Diese Zieltherapie betrifft zwei Prinzipien, entweder eine Herunterregulierung „onkogener“ miRNA oder eine Hochregulierung von „Suppressor“ miRNA. Es gibt momentan zwei Methoden zur Inhibierung der Expression „onkogener“ miRNA, den Einsatz komplementärer Oligonukleotide für miRNAs (antagomir oder antimir) (Kruzfeldt *et al.*, 2005) oder den Einsatz synthetischer mRNAs (miRNA sponges), die spezifische endogene miRNAs kompetitiv binden (Ebert *et al.*, 2007). Die Therapie mit locked nucleic acid (LNA, chemisch modifizierte antagomir oder antimir) gegen miR-17-92 Cluster, miR-21 und miR-16 zeigte in verschiedenen Tumoren vielversprechende Ergebnisse (Stenvang *et al.*, 2008).

Die endogene „tumor suppressor“ miRNA Expression kann durch synthetische miRNAs oder spezifische miRNAs kodierende DNA erhöht werden. Der Transport wird mittels viraler Vektoren, Plasmiden und als Transposon durchgeführt. Zum Beispiel führt die Transfektion von miRNA let-7 mittels Adenovirus im Mausmodell zur Reduzierung der Lungenkarzinomentwicklung (Esquela-Kerscher *et al.*, 2008; Trang *et al.*, 2010). Ähnliche Ergebnisse wurden bei Menschen nach Gabe von miR-145 bei pulmonalem Adenokarzinom gezeigt (Cho *et al.*, 2009).

4.3.5 MiRNAs als diagnostische und prognostische Biomarker für Lungenkarzinome

Die frühe Diagnose des Lungenkarzinoms spielt eine bedeutende Rolle für die Behandlung und bei der Mortalität. Es ist erforderlich, neue und möglichst nichtinvasive Methoden zu entwickeln, die ein Screening von Risikopatienten erlauben.

Die Publikationen und Leitlinien der letzten Jahre stimmen darin überein, dass Röntgenaufnahme des Thorax und auch Sputumzytologie nicht zum Screening von Lungenkarzinomen geeignet sind (Manser *et al.*, 2003). Die Autofluoreszenz-Bronchoskopie (AFB) spielt in der Frühdiagnostik des Lungenkarzinoms auf Grund der Invasivität keine Rolle (Haussinger *et al.*, 2005). Das National Cancer Institute initiierte eine randomisierte Phase III National Screening Studie (NLST) in den USA, in der zum ersten Mal nachgewiesen werden konnte, dass eine low dose computertomographische Untersuchung (LDCT) die Lungenkarzinom spezifische Mortalität senken kann. Die randomisierte Studie wurde 2002 begonnen und 2009 beendet und zeigte eine Reduktion der Lungenkarzinom bedingten Mortalität um 20% nach LDCT-Screening.

Ein anderer Ansatz zur Diagnostik und möglicherweise zum Screening von Patienten mit Lungenkarzinomen ist der Nachweis von flüchtigen organischen Verbindungen (volatile organic compounds, VOCs) in der ausgeatmeten Luft. Mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie-Analysen konnten volatile organische Verbindungen bei Patienten mit Lungenkarzinomen nachgewiesen werden, deren Muster im Vergleich zu den Werten gesunder Probanden unterschiedlich waren. Verschiedene volatile Verbindungen konnten mit einer hohen Sensitivität und Spezifität Lungenkarzinomen zugeordnet wer-

den (Poli *et al.*, 2005). Derzeit sind „Elektronische Nasen“ in der Entwicklungsphase (Dent *et al.*, 2013). Nichtvolatile Verbindungen finden sich auch im Atemkondensat. Dabei handelt es sich auch um diagnostisch interessante Moleküle, z.B. Wachstumsfaktoren, miRNA und DNA, sodass Genmutationen wie *p53*-Mutationen nachgewiesen werden können (Gessner *et al.*, 2004).

Fragmente zellfreier DNA (cell-free DNA, cfDNA) wurden bereits 1948 intravasal entdeckt (Mandel und Metais, 1948). In den folgenden Jahrzehnten zeigten mehrere Studien, dass Patienten mit einer malignen Erkrankung höhere Spiegel an cfDNA im Blut haben als gesunde Probanden (Fleischhacker und Schmidt, 2007). Diese Fraktion von cfDNA konnte den Krebszellen zugeordnet werden (Stroun *et al.*, 1989). Sidransky *et al.* konnten in der cfDNA erstmals *TP53* Mutationen nachweisen (Sidransky *et al.*, 1991). Die cfDNA wird letztlich von Tumorzellen durch Apoptose, Nekrose und aktive Sekretion freigesetzt und unterscheidet sich dabei in erster Linie durch die Größe der Fragmente (Bronkhorst *et al.*, 2019).

Die Entnahme von Blut und Körperflüssigkeiten zur Nukleinsäurediagnostik wird heutzutage „liquid biopsy“ genannt. Die Liquid Biopsy kann zur Diagnose von Treibermutationen oder zur Früherkennung und zur Tumorrezidivdiagnose oder Zweittumordiagnose bei Lungenkarzinomen verwendet werden (Bettegowda *et al.*, 2014; Crowley *et al.*, 2013). Derzeit spielt die Liquid Biopsy in der Bestimmung der T790M-Resistenzmutation von *EGFR* beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom eine Rolle. Die Liquid Biopsy hat für diese tumorspezifische Mutationanalyse eine Sensitivität von 70% und eine Spezifität von 69%.

Tumormarker sind organische Verbindungen im Blut oder anderen Körperflüssigkeiten, deren erhöhte oder veränderte Konzentration in den Körperflüssigkeiten oder deren Mutation auf einen bestimmten Tumor schließen lässt oder prognostische Aussagen über den Tumor erlaubt. Der Nachweis dieser Biomarker stellt die am wenigsten invasive und eleganteste Methode der Tumordiagnostik dar.

MiRNAs gibt es in allen Geweben. Ihre Funktion besteht in der Regulation der Expression multipler Gene. Dies geschieht, indem sie einen „Silencing“-Prozess oder den Abbau ihrer Ziel-messenger RNAs in Gang setzen (Qin *et al.*, 2014). Die miRNA-Expressionmuster sind gewebsspezifisch und können auf Tumoren oder Metastasen in diesen Geweben oder Organen hinweisen (Keller *et al.*, 2014).

Cell-free microRNAs (cfmiRNAs) gewinnen an Wert als diagnostische und prognostische Biomarker wegen der hohen Stabilität und Lagerungsbeständigkeit in verschiedenen Körperflüssigkeiten (Weber *et al.*, 2010). Im Serum bleiben die miRNAs stabil trotz unphysiologischer Bedingungen wie Langzeitlagerung, hohe oder niedrige pH-Werte, Erhitzen, wiederholtes Einfrieren und Auftauen und chemische Fragmentierung (Chen *et al.*, 2008). Darüber hinaus kann das Serum zur mRNA-Diagnostik bis zu 10 Jahre gelagert werden (Zhu *et al.*, 2009).

Die Transportvehikel oder Exosomen (ca. 30 bis 90 nm große intrazelluläre Bläschen zur Ausschleusung von Zellbestandteilen) beinhalten miRNAs, mRNAs und Proteine und sind für die Stabilität der miRNAs verantwortlich (Valadi *et al.*, 2007).

CfmiRNAs werden entweder passiv aus den geschädigten Zellen (Gewebeverletzung, Nekrose) und kurzüberlebenden Zellen (Thrombozyten) (Turchinovich *et al.*, 2011) oder aktiv aus den Zellen mittels der Exosomen freigesetzt (Valadi *et al.*, 2007). Larrea *et al.* fassten in einem Review von 2016 den aktuellen Stand der miRNAs als diagnostische und prognostische Biomarker bei verschiedenen Tumor-erkrankungen zusammen. In der folgenden Tabelle wurden nur die miRNAs, die Biomarker bei Lungenkarzinomen sind, berücksichtigt .

CfmiRNAs	Körperflüssigkeiten	Histologie	Rolle als Biomarker
let-7a/b	Serum/Plasma	NSCLC	Diagnostischer und prognostischer Biomarker. let-7b geht mit schlechter Prognose einher.
let-7c	Plasma	NSCLC	Diagnostischer Biomarker.
let-7f	Plasma	NSCLC	Diagnostischer und prognostischer Biomarker. let-7f geht mit schlechter Prognose einher.
let-7i	Serum	NSCLC SCLC	Prognostischer Biomarker bei Rauchern.
miR-10	Serum	NSCLC SCLC	Diagnostischer Biomarker.
miR-19a	Serum	NSCLC	Diagnostischer und prognostischer Biomarker. miR-19a geht mit schlechter Prognose einher
miR-19b	Serum	NSCLC	Diagnostischer und prognostischer Biomarker. miR-19b geht mit schlechter Prognose und schlechter Reaktion auf Chemotherapie einher.
miR-20a	Plasma	NSCLC	Diagnostischer Biomarker.
miR-21	Plasma	NSCLC	Diagnostischer Biomarker.
	Serum	NSCLC	Diagnostischer und prognostischer Biomarker. miR-21 geht mit fortgeschrittenem Tumorstadium einher.
	Bronchiallavage Sputum	NSCLC	Diagnostischer Biomarker.
	Serum	NSCLC	Diagnostischer und prognostischer Biomarker. miR-21 geht mit schlechter Prognose und Tumorrezidiv einher.
miR-29c	Serum	NSCLC	Diagnostischer Biomarker.
miR-30a	Plasma	NSCLC	Diagnostischer Biomarker.
miR-30c	Serum	NSCLC	Diagnostischer Biomarker.
miR-30d	Serum	NSCLC	Prognostischer Biomarker. miR-30d geht mit schlechter Prognose einher.
miR-34a	Blut	NSCLC	Diagnostischer Biomarker.
miR-34c	Serum	NSCLC	Diagnostischer Biomarker.
miR-125a	Serum	NSCLC	Diagnostischer Biomarker.
miR-125b	Serum	NSCLC	Diagnostischer und prognostischer Biomarker. miR-125b geht mit schlechter Prognose einher.
miR-155	Serum	NSCLC	Diagnostischer Biomarker.
	Serum/Plasma	NSCLC	Diagnostischer Biomarker.
miR-200c	Serum	NSCLC	Diagnostischer und prognostischer Biomarker. miR-200c geht mit schlechter Prognose einher
miR-141	Serum	NSCLC SCLC	Diagnostischer Biomarker.

miR-429	Serum	NSCLC	Diagnostischer und prognostischer Biomarker. miR-429 geht mit schlechter Prognose einher.
miR-375	Plasma	NSCLC	Diagnostischer und prognostischer Biomarker. miR-375 geht mit schlechter Prognose einher.

Table 6: Übersicht über zirkulierende miRNAs in Plasma, Serum und BAL mit ihren Rollen als diagnostische oder prognostische Biomarker bei Lungenkarzinom (Larrea *et al.*, 2016).

Die unterschiedlichen miRNA-Profile ermöglichen die Identifizierung von histologischen Subtypen des nicht-kleinzelligen Karzinoms (Bishop *et al.*, 2010). Sie ermöglichen außerdem die Differenzierung zwischen primären und metastasierten Läsionen in der Lunge (Barshack *et al.*, 2010).

Derzeit gibt es keinen Konsens über die Zahl der miRNAs und die geeigneten miRNA Profile, die zur Diagnose und insbesondere zur Frühdiagnose der Lungenkarzinome geeignet sind.

Keller *et al.* fanden eine Dysregulation bei 24 miRNAs bei Lungenkarzinom-Patienten im Vergleich mit einer Kontrollgruppe von gesunden Patienten. Die Sensitivität des Testverfahrens war 92,5%, die Spezifität 98,1%. MiR-126, let-7d, let-7i und miR-423 zeigten hoch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen und es ist denkbar, dass sie in Zukunft als Teil eines Testes zur Frühdiagnose des Lungenkarzinoms fungieren (Keller *et al.*, 2009).

Es wurde von Keller *et al.* gezeigt, dass je nach Erkrankung beim Menschen unterschiedliche miRNA-Profile vorliegen. Diese Profile sind ähnlich wie Fingerabdrücke und man kann mit ihrer Hilfe z.B. die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) von einem Lungenkarzinom trennen bzw. beide Erkrankungen diagnostizieren (Keller *et al.*, 2011).

Bianchi *et al.* entwickelten einen Test zur Frühdiagnose des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms bei asymptomatischen Patienten mit Hochrisikoprofil. Der Test unterscheidet benigne von malignen Läsionen mittels Untersuchung von 34 miRNAs (Bianchi *et al.*, 2011). Ein neuerer Test wurde von Montani *et al.* entwickelt, in ihm werden 13 miRNAs untersucht. Er zeigt eine Sensitivität von 77.8% und eine Spezifität von 74.8% (Montani *et al.*, 2015).

MiRNAs spielen derzeit auch eine Rolle als Biomarker für das Ansprechen auf eine Behandlung. Die Überexpression von miR-135a geht in vivo und in vitro mit einer Resistenz des Tumors gegen Paclitaxel einher (Holleman *et al.*, 2011). Eine Überexpression von let-7a, miR-126 und miR-145 zeigt eine Reduktion der Gefitinib-verursachten Zytotoxizität bei nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom an (Zhong *et al.*, 2010). MiR-106b-5p und miR-26a zeigen das Ansprechen des Tumors auf Cisplatin an (Yu *et al.*, 2017). Ranade *et al.* fanden, dass die Patienten mit miR-92a-2* Überexpression bei kleinzelligem Lungenkarzinom eine Chemotherapieresistenz des Tumors haben (Ranade *et al.*, 2010). Bezüglich der Radiotherapie deuten die let-7-, miR-29c- und miR-200c-Überexpression auf eine hohe Strahlensensitivität des Tumors hin (Arechaga-Ocampo *et al.*, 2017). Eine andere Studie zeigte, dass sich die miRNA Profile nach der Resektion nicht-kleinzelliger Lungenkarzinome ändern, sie aber bei Patienten mit Metastasen unverändert bleiben (Leidinger *et al.*, 2015).

Nach den oben aufgeführten Ergebnissen muss angenommen werden, dass die miRNAs Biomarker für Lungenkarzinome sein können.

4.3.6 Bestimmung der miRNA Zielgene und KEGG-Signalwege

Es ist schwierig, das Zielgen einer miRNA zu identifizieren, da jede miRNA die Expression von hunderten Zielgenen beeinflussen kann (Friedman *et al.*, 2009). Derzeit gibt es verschiedene bioinformatische Algorithmen, die die potentiellen Zielgene der miRNA vorhersagen können.

MicroRNAs regulieren ihre Zielgene herunter, indem sie die 3'UTR-Region der mRNA-Produkte der Zielgene binden. Dies geschieht an der sog. seed Region am 5'Ende der miRNA. Die seed Region besteht aus 8 Nukleotiden. Das Ausmaß der Komplementarität bestimmt dabei die Festigkeit der Bindung. Darüber hinaus gibt es aber noch andere Faktoren, die diese beeinflussen, z.B. weitere Basenpaare am 3'Ende der miRNA u.a. (Kehl *et al.*, 2017).

Alle diese Faktoren sind in verschiedenen Ansätzen zur Bestimmung der Zielgene der miRNAs zusammengefasst.

Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG Database) ist eine Datenbank, die sich mit Genomen, biologischen Signalwegen, Krankheiten, Drogen und chemischen Substanzen befasst. Sie wurde von den Kanehisa Laboratories im Bioinformatikzentrum der Universität Kyoto und dem Human Genome Center der Universität Tokio im Jahr 1995 entwickelt (Kanehisa, 1997). „KEGG-Signalwege“ präsentiert die aktuelle Signalweg-Karte für molekulare Interaktionen und Netzwerke in verschiedenen Situationen.

Mit unterschiedlicher Vorhersagekraft sind DIANAmicroT (microT-CDS und microT v4), TargetScan, miRanda, mirSVR und starBase die am meisten verwendeten Algorithmen zur Bestimmung der miRNA Zielgene und KEGG-Signalwege (Lewis *et al.*, 2005; Maragkakis *et al.*, 2009; Sethupathy *et al.*, 2006). Andere Algorithmen wie DIANA-TarBase (TarBase v7.0) und miRTarBase werden zur Bestimmung der experimentell mittels Next-generation Sequencing (NGS), Western Blot und RT-qPCR validierten Zielgene der miRNAs verwendet (Vlachos *et al.*, 2015a).

Mit Hilfe von DIANA-miRPath v.3.0 Software wurden die KEGG-Signalwege in der vorliegenden Studie analysiert. Dies erfordert zuerst die Bestimmung von miRNA-Zielgenen mittels DIANA-TarBase Algorithmus (TarBase v7.0), welcher in die DIANA-miRPath v.3.0 Software integriert ist (Vlachos *et al.*, 2015b).

4.3.7 Überblick über die wichtigen Signalwege beim nicht kleinzelligen Lungenkarzinom

Beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom stellt der non-small cell lung cancer (hsa05223) KEGG-Signalweg der Hauptsignalweg dar (*Abbildung 3*). Er besteht aus verschiedenen Signalwegen, die zusammen interagieren und von Genmutationen und miRNAs beeinflusst werden, was zur Karzinogenese führt. In der Folge wird die Rolle der verschiedenen Signalwege erklärt.

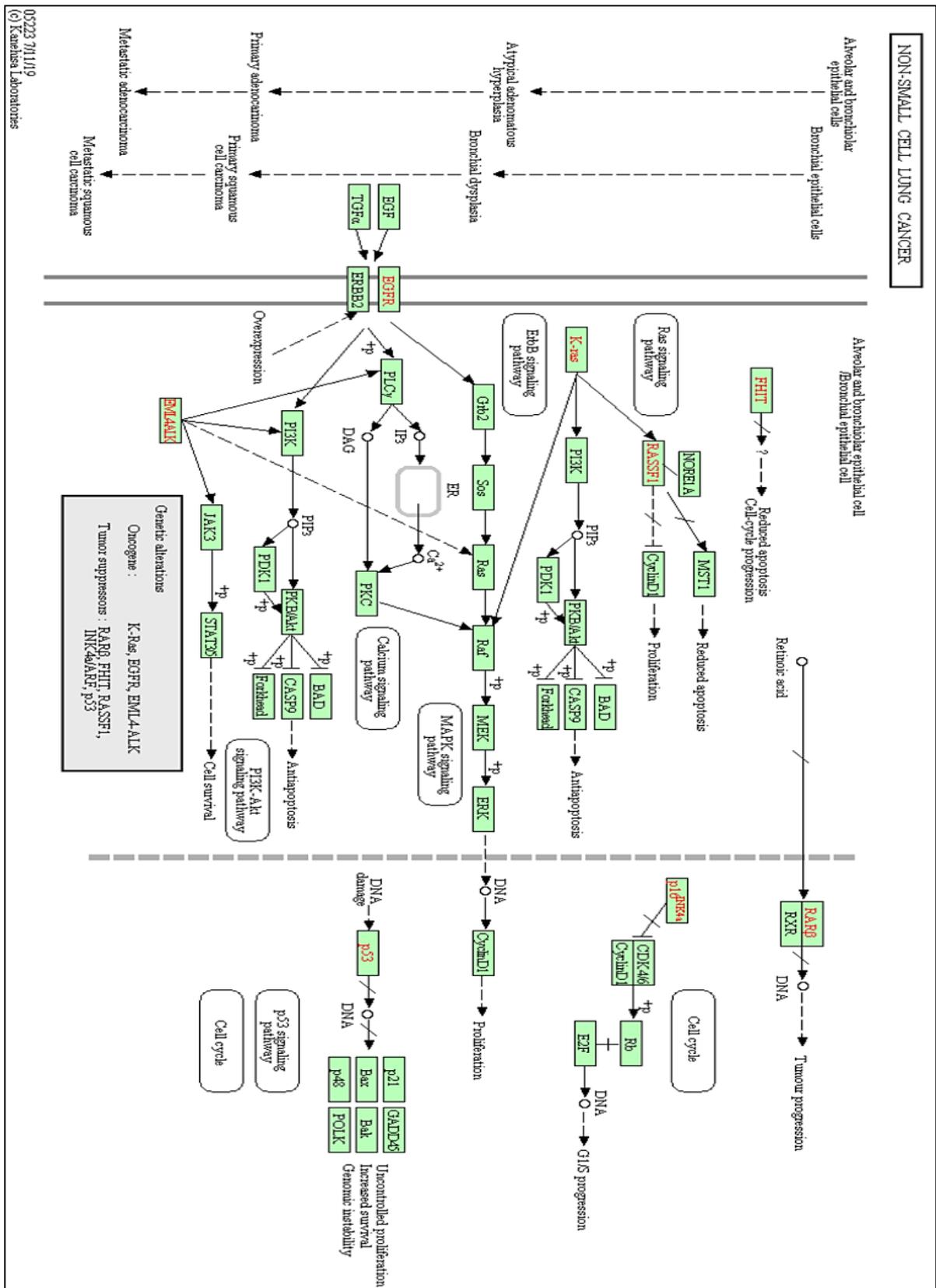


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Non-small cell lung cancer (hsa05223) Signalwegs. Verschiedene KEGG-Signalwege sind mitbeteiligt, interagieren und führen am Ende zur Entwicklung beider großer histologischer Gruppen des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms (Adenokarzinom und Plattenepithelkarzinom). Es wurden im Signalweg mehrere Zielgene als Onkogen oder Tumorsuppressor nachgewiesen. Die wichtigste Zielgene sind in Rot geschrieben und gerahmt. (https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?hsa05223).

4.3.7.1 P53-Signalweg

Das Protein p53 ist ein multifunktionelles Protein. Es wird vom Tumorsuppressorgen *TP53* kodiert. Es wurde im Jahr 1979 erstmalig von verschiedenen Forschungsgruppen beschrieben (Lane und Crawford, 1979; Linzer und Levine, 1979). P53 hat eine kurze Halbwertszeit von ca. 30 Minuten, es wird ständig gebildet. Als Transkriptionsfaktor reguliert es die Expression von verschiedenen Genen, die für DNA-Reparatur, Zellzyklus-Kontrolle und Apoptose zuständig sind. Deswegen wird p53 „Wächter des Genoms“ genannt. Die Aktivierung von p53 durch DNA-Schädigung führt durch verschiedene Mechanismen zu DNA-Reparatur und Zellzyklus-Inhibierung, falls dies nicht möglich ist, zur Einleitung der Apoptose. Die Mutationen im *TP53* gehen mit unterschiedlichen Erkrankungen einher, 50% der menschlichen Tumoren haben TP53 Mutationen.

Der p53 Signalweg ist ein Signalweg für Zellwachstum und Zelltod. Mutationen im *TP53* spielen insbesondere bei Rauchern eine Rolle in der Lungenkarzinomentwicklung. Sie treten in 46% der Adenokarzinome und 81% der Plattenepithelkarzinome auf (Liu *et al.*, 2014). Derzeit sind verschiedene Medikamente als Zieltherapie in der Entwicklungsphase.

4.3.7.2 PI3K/AKT/mTOR-Signalweg

Der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg spielt im Tiermodell eine Rolle in der Lungenentwicklung (Wang *et al.*, 2005). Deregulation des PI3K/AKT/mTOR-Signalweges ist eine der häufigsten molekularen Veränderungen beim Lungenkarzinom. Eine Aktivierung des Signalweges findet sich bei wenig differenzierten und fortgeschrittenen nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen (Scrima *et al.*, 2012). Es gibt verschiedene Mechanismen, die zur Deregulation des PI3K/AKT/mTOR Signalweges führen können, z.B. die Aktivierung von Rezeptor-Tyrosinkinase und PI3K, *PI3KCA*-Mutation oder Amplifikation, Mutationen in *KRAS* und *AKT*. Das Suppressorgen Phosphatase and Tensin homolog (*PTEN*) inhibiert den PI3K Signalweg. Eine Mutation von *PTEN* wird beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom gefunden.

4.3.7.3 Wnt-Signalweg

Der Wnt-Signalweg trägt zu der Entwicklung des Lungengewebes bei, und die Abwesenheit von beta-Catenin im Tiermodell mit β -Catenin Mutation führt zur abnormen Entwicklung des Lungengewebes und zum Tod nach Geburt auf Grund von Lungenversagen (Mucenski *et al.*, 2003). Mutationen in den Proteinen der Wnt-Signalwege führen zu Lungenkarzinomen, z.B. der allelische Verlust von *AXIN2*. Der Wnt-Signalweg spielt darüber hinaus eine Rolle in der Angiogenese im Lungenkarzinom (Dejana, 2010). Es gibt verschiedene Wnt-Signalweg Inhibitoren, wie die secreted frizzled-related proteins (sFRPs), die sich kompetitiv am Transmembranrezeptor Frizzled (Fz) binden und die Zellproliferation hemmen und die Apoptose fördern (Mazieres *et al.*, 2005). Beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom sind die Wnt-Signalweg-Inhibitoren herunterreguliert. Dies geht mit schlechter Prognose und Chemotherapieresistenz einher (Stewart, 2014). MiRNAs beeinflussen den Wnt-Signalweg. Die Überexpres-

sion der miR-574-5p verbessert die beta-Catenin Phosphorylierung und fördert die Metastasierung (Zhou *et al.*, 2016).

4.3.7.4 TGF- β Signalweg

Der TGF- β Signalweg reguliert während der embryonalen Entwicklung die kardiovaskuläre und die pulmonale Entwicklung (Wu und Hill, 2009). Eine Überexpression des TGF β -Signalwegs bei Lungenkarzinom geht mit schlechter Prognose und Chemotherapieresistenz einher. Dies wirkt kumulativ mit anderen genetischen und epigenetischen Änderungen und reicht allein nicht zur Karzinogenese aus (Eser und Janne, 2018).

4.3.7.5 FOXO-Signalweg

Der FOXO-Signalweg besitzt apoptotische und antiproliferative Eigenschaften und wirkt potenziell als Tumorsuppressor. Dysregulation des Signalweges oder Mutationen im *FOXO* Gen führen zu Karzinogenese. Mehrere Studien zeigen die Rolle der miRNAs in der Regulation des FOXO-Signalwegs in Zusammenhang mit Karzinogenese, z.B. kann beim Lungenkarzinom miR-411 den FOXO-Signalweg hemmen (Zhao *et al.*, 2016).

4.3.7.6 AMPK-Signalweg

Der AMPK-Signalweg spielt eine Rolle als Tumorsuppressor durch die Hemmung metabolischer Veränderungen im Tumor. Yang fand in einer Studie, dass der AMPK-Signalweg beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom im Vergleich mit gesunden Patienten unterexprimiert ist (Yang, 2018).

4.3.7.7 Ras-Raf-MEK-ERK-Signalweg

Der mitogen-activated protein kinases/ extracellular signal-regulated kinases (MAPK/ERK) Signalweg, auch Ras-Raf-MEK-ERK pathway genannt, spielt eine Rolle bei Zellwachstum, Zellüberleben, Zelldifferenzierung, Migration und Apoptose (Sun *et al.*, 2015). Das erste entdeckte Mitglied der „mitogen-activated“ Familie ist ERK1. MAPK/ERK besteht aus einer Kette von nachgeschalteten Proteinen, den kleinen GTPasen (auch kleine G-Proteine, Ras) und den Proteinkinasen (RAF, MEK, ERK). Proteinkinasen sind eine Gruppe von Enzymen, die bestimmte Proteine phosphorylieren, sodass sie aktiviert oder deaktiviert werden. Die Aktivierung des Signalweges beginnt durch die Bindung an die extrazellulären Liganden wie z.B. den Epidermal growth factor receptor (EGFR), Fibroblast growth factor receptor (FGFR) und Platelet-derived growth factor receptor (PDGFR), und an Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs). Nach Komplettierung der Phosphorylierung wird ERK aktiviert und in den Zellkern transferiert, wo es verschiedene Transkriptionsfaktoren regulieren kann (McCain, 2013). Mutationen in Protein-kodierenden Genen (EGFR, BRAFV600E, RAS) oder Dysregulation des MAPK/ERK Signalweges führen zu unkontrollierter Zellvermehrung und Wachstum und als Folge zur Karzinogenese.

4.4 Ziel der Studie

Am 01.01.2017 trat die 8. Auflage der TNM-Klassifizierung nicht-kleinzelliger Lungenkarzinome in Kraft. Sie wurde vom Staging Committee der International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC) entwickelt und von der Union for International Cancer Control (UICC, ehemals Union internationale contre le cancer) und vom American Joint Committee on Cancer (AJCC) publiziert.

In der 8. Auflage gibt es gegenüber der 7. Auflage wichtige Änderungen, und das letztendliche Ziel, eine Einteilung in prognostisch relevante Stadien, scheint in der 8. Auflage erreicht zu sein (*Abbildung 1*).

In der vorliegenden Studie wird versucht, die Ergebnisse der IASLC an einer kleineren Gruppe von Patienten mit nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen nachzuvollziehen.

Bei den Patienten liegt ein follow-up von mehr als 5 Jahren vor, und die TNM-Klassifizierung erfolgte sowohl gemäß der 7. Auflage als auch der 8. Auflage (UICC, AJCC).

Der Vorteil gegenüber der Patientengruppe der IASLC ist eine größere Homogenität insofern, dass die Lymphknotenentnahme immer als systematische Dissektion und die Klassifizierung immer nach dem Mountain-Dresler System erfolgte, sodass möglicherweise auch eine Subklassifizierung der N-Stationen prognostische Aussagen zulässt.

Derzeit stellt die histologische Untersuchung von Tumorgewebe, das endoskopisch, durch Punktion oder chirurgisch durch Resektion gewonnen wurde, die zuverlässigste Methode zur Diagnose der Lungenkarzinome dar. Diese Methode ist verschieden invasiv und manchmal ein Risiko für den Patienten. Es scheint erforderlich, neue und alternative nichtinvasive Verfahren zur Diagnose zu etablieren. Außerdem ist es notwendig, Biomarker, die das Ansprechen auf eine Therapie oder die Resistenz gegen eine Therapie zeigen, zu finden. Die miRNA scheint derzeit die Voraussetzungen als Biomarker für das Lungenkarzinom zu erfüllen. Seit der Entdeckung zirkulierender DNA (cfDNA) und danach auch zirkulierender miRNA (cfmiRNAs) hat die letztere wahrscheinlich die größere Bedeutung, und die sogenannte Liquid Biopsy stellt eine wenig invasive vielversprechende Methode beim Lungenkarzinom dar. In der vorliegenden Studie werden miRNA-Profile von Patienten mit nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen bestimmt. Die Plasmaprobe wurde unmittelbar vor der Operation entnommen. Die Untersuchung erfolgte jetzt nach einem Zeitraum von mehr als fünf Jahren.

Es wurden zwei Gruppen gebildet, eine mit Patienten, die mehr als fünf Jahre überlebten und eine mit Patienten, die früh, d.h. innerhalb von zwei Jahren nach der Operation tumorbedingt verstarben. Ziel der Studie ist es, Unterschiede in den miRNA-Profilen zu finden, die einen Schluss auf die Prognose nach potentiell kurativer Resektionsbehandlung zulassen.

5 Material und Methoden

5.1 Patientenpopulation

Die vorliegende Arbeit wurde von der thoraxchirurgischen Abteilung der SHG-Kliniken Völklingen und dem Institut für Humangenetik der Universität des Saarlandes erstellt. Die dabei erfassten Daten stammen aus dem Zeitraum von Juni 1998 bis Dezember 2011. Erfasst wurden operierte Patienten mit Lungenkarzinom (SCLC, NSCLC), die in andere Studien eingeschlossen waren und die Einschlusskriterien unserer Studie erfüllten.

Die primären Studien, für die die Patienten rekrutiert wurden, sind „Neue potenzielle Marker für Diagnose und Prognose nicht-kleinzelliger Bronchialkarzinome“ und „Seroreaktivitätsmuster (Autoantikörperprofile) zur minimal invasiven Diagnostik von Bronchialkarzinomen“. Die Genehmigung dieser Studien durch die Ethik-Kommission der Ärztekammer des Saarlandes liegt vor.

Aus der Gruppe der Patienten in diesen Studien wurden diejenigen ausgewählt, die folgende Bedingungen erfüllten:

- Die Proben sind 5 Jahre alt oder älter.
- Es ist eine Plasmaprobe vorhanden.

Die Patienten wurden über einen Zeitraum von 5-18 Jahren durch Kontakt in unserer Ambulanz oder telefonischen Kontakt (Patienten, Angehörige, Hausärzte und Fachärzte) nachbeobachtet. Bei den verstorbenen Patienten wurde die Todesursache als tumorbedingt oder nicht tumorbedingt festgelegt.

Die endgültige Diagnose des Lungentumors erfolgte durch die histopathologische Untersuchung des intraoperativ gewonnenen Gewebes. Die Tumoren wurden histologisch nach der WHO-Klassifikation für Lungenkrebs eingeteilt (Travis *et al.*, 2015). Am häufigsten waren nicht-kleinzellige Lungenkarzinome (n=419), gefolgt von kleinzelligen Lungenkarzinomen (n=11). Die operative Therapien wurden als anatomische Lungenresektionen durchgeführt, d.h. als Segmentresektion, Lobektomie, Lobektomie mit Manschettenresektion oder Pneumonektomie. Als primäres Ziel wird immer eine R0-Resektion, die vollständige Entfernung des Karzinoms mit mikroskopisch tumorfreien Resektaträndern, angestrebt.

Die Einteilung des Tumorstadiums erfolgte anhand der 7. Auflage der TNM-Klassifizierung der IASLC (gültig bis 31.12.2016) (Wittekind *et al.*, 2010). Die Stadien wurden nach Erscheinen der neuen 8. Auflage der TNM-Klassifizierung (gültig ab 01.01.2017) entsprechend umklassifiziert (Goldstraw *et al.*, 2016). Um die prognostische Wertigkeit der TNM-Klassifizierung der Lungenkarzinome zu zeigen, wurden die Patienten (n=430) nach Geschlecht, Histologie, Resektionsverfahren, R-Status, N-Status, und TNM-Klassifizierung (7.- und 8. Auflage) eingeteilt, danach wurden alle Daten statistisch analysiert.

Nach statistischer Analyse der klinischen Daten (TNM-Klassifizierung) wurden unabhängig vom Tumorstadium zwei Gruppen von Patienten in Bezug auf Überlebenszeiten gebildet. Die erste Gruppe enthält Patienten, die postoperativ mehr als fünf Jahre überlebten (long time survivors, LTS). Die zweite Gruppe schließt Patienten ein, die kurze Zeit postoperativ (innerhalb der ersten zwei postoperativen Jahre) tumorbedingt verstarben (short time survivors, STS). Um eine Korrelation zwischen den miRN-

As und der tumorbedingten Frühsterblichkeit bzw. dem Langzeitüberleben zu finden, wurde eine miRNA-Analyse bei den beiden Gruppen (37 Proben) durchgeführt.

Geschlecht	Alter bei Operation	operative Verfahren	Histologie	Stadium UICC 8	Überlebenszeit (Monate)
männlich	73	Lobektomie mit Bronchusmanschettenresektion	PEC	IIIB	57
männlich	60	Pneumonektomie	Adeno-Ca	IIIA	lebt >121
männlich	72	Lobektomie	PEC	IIIA	lebt >115
männlich	59	Lobektomie	Adeno-Ca	IIIB	lebt >103
weiblich	69	Lobektomie	PEC	IIIA	144
männlich	56	Lobektomie mit Bronchusmanschettenresektion	PEC	IIIA	lebt >88
männlich	72	Lobektomie	PEC	IIIA	lebt >76
männlich	73	Lobektomie	Adeno-Ca	IIIB	lebt >73
weiblich	65	Lobektomie mit Bronchusmanschettenresektion	PEC	IIIA	lebt >67
männlich	61	Lobektomie	Adeno-Ca	IIIA	62
weiblich	71	Lobektomie	Adeno-Ca	IIIB	lebt >51
männlich	72	Lobektomie mit Bronchusmanschettenresektion	PEC	IIIA	lebt >49

Tabelle 7: Die postoperativ langzeitüberlebenden Patienten, deren Plasma für die RT-qPCR verwendet wurde. LTS: long time survivors, PEC für Plattenepithelkarzinom, Adeno-Ca für Adenokarzinom. Alter in Jahren.

Geschlecht	Alter bei Operation	operative Verfahren	Histologie	Stadium UICC 8	Überlebenszeit (Monate)
männlich	65	Lobektomie	PEC	IA1	3
männlich	75	Lobektomie	PEC	IA3	15
männlich	67	Lobektomie mit Bronchusmanschettenresektion	PEC	IA1	3
männlich	49	Lobektomie	Adeno-Ca	IA3	8
männlich	55	Lobektomie	Adeno-Ca	IIIA	17
weiblich	59	Lobektomie	Adeno-Ca	IA3	24
männlich	70	Lobektomie	PEC	IA2	19
männlich	62	Lobektomie	Adeno-Ca	IA3	13
männlich	57	Lobektomie	Adeno-Ca	IA3	16
männlich	78	Lobektomie	PEC	IA3	13
weiblich	59	Lobektomie	Adeno-Ca	IA3	6
männlich	73	Lobektomie	Adeno-Ca	IA3	25
männlich	62	Lobektomie mit Bronchusmanschettenresektion	PEC	IIB	13
männlich	68	Lobektomie	PEC	IA1	15

Tabelle 8: Die postoperativ kurzzeitüberlebenden Patienten, deren Plasma für die RT-qPCR verwendet wurde. Todesursache ist das Lungenkarzinom. STS: short time survivors, PEC für Plattenepithelkarzinom, Adeno-Ca für Adenokarzinom. Alter in Jahren.

Es erfolgte zunächst die miRNA-Isolation mit anschließender Messung der miRNA-Expression mit Hilfe des Microarray Systems, danach wurden fünf signifikante miRNAs ausgewählt, die hohe Fold Change Werte zeigten. Diese ausgewählten miRNAs sind bei Lungenkarzinomen sowie anderen Erkrankungen in Studien gut erforscht, und ihr Verhalten ist mit Northern Blot bestätigt. Sie wurden mittels Reverse Transkription – quantitative Echtzeit Polymerasekettenreaktion (RT-qPCR) in 26 Proben

(Tabelle 7, Tabelle 8) validiert, da die Plasmaproben von 11 Patienten quantitativ nicht ausreichten. Schließlich wurden die Ergebnisse statistisch ausgewertet.

5.2 Verwendete Materialien und Equipment

Alle Geräte, Programme und biologische Materialien, die für diese Studie benutzt wurden, sind in folgenden Tabellen aufgeführt.

Geräte	Hersteller
2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
Bench-top refrigerated Zentrifuge	Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland
Bench-top Zentrifuge	Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland
Computer	DELL, Texas, USA
Gefrierschrank -20°C	Sanyo, Osaka, Japan
Gefrierschrank -70°C	Sanyo, Osaka, Japan
Hybridisationskammer	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
Hybridization oven and rotater	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
G2565BA Microarray Scanner	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
NanoDrop ND-2000c Spectrophotometer	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Pipetman Gilson	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
QIAcube robot	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAgility™	Qiagen, Hilden, Deutschland
StepOnePlus™ Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
TProfessional basic gradient 96 thermocycler	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Vacuumzentrifuge	Uniequip, Martinsried, Deutschland

Tabelle 9: Zusammenfassung aller verwendeten Apparate.

Programm	Hersteller
Agilent 2100 Expert software version B.02.02	Agilent Technologies, Inc., California, USA
Agilent AGW Feature Extraction software version 10.10.11	Agilent Technologies, Inc., California, USA
Agilent Scan Control software version 8.5.1	Agilent Technologies, Inc., California, USA
R Software	R Development Core Team
StepOnePlus™ Software version 2.2.2	Applied Biosystems, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 10: Zusammenfassung aller verwendeten Programme.

verwendete Sets	Hersteller
Gene Expression Wash Buffer Kit	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
Heparinase I from Flavobacterium heparinum	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
miScript SYBR Green Master Mix	Qiagen, Hilden, Deutschland
miScript Primer Assay	Qiagen, Hilden, Deutschland
miScript Reverse Transcriptase Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Primer Assay	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNase-Free DNase Set	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
SurePrint G3 Human r21 miRNA microarray	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland

Table 11: Zusammenfassung aller verwendeten Sets.

Materialien	Hersteller
S-Monovette® 7.5ml LH	SARSTEDT AG &Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Eppendorf PCR tubes 0.2ml	Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland
Eppendorf PCR tubes 1.5ml	Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland
Eppendorf PCR tubes 2.0ml	Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland
Genexpression Wasch-Paket	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
MicroAmp™ 96-well optical adhesive film	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
MicroAmp™ fast 8-tube strip	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
MicroAmp™ fast optical 96-well reaction plate	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
MicroAmp™ optical 8-cap strip	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pack of 5 Backings, 8 HD Arrays/Slide	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
QIAcube filter-tips 200µl	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAcube reagent bottle rack	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAcube reagent bottles 30 ml	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAcube rotor adapters (10 x 24)	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAcube sample tubes RB (2 ml)	Qiagen, Hilden, Deutschland
Sterile filter-tips 10 µl	Sorenson BioScience, Inc, UT, USA
Sterile filter-tips 1000 µl	Sorenson BioScience, Inc, UT, USA
Sterile filter-tips 20 µl	Sorenson BioScience, Inc, UT, USA
Sterile filter-tips 200 µl	Sorenson BioScience, Inc, UT, USA

Table 12: Zusammenfassung aller verwendeten Einmalmaterialien.

miRNA RT-qPCR Primer	miRNA Sequenz: 5'
hsa-miR-142-3p	UGUAGUGUUUCCUACUUUAUGGA
hsa-miR-126-3p	UCGUACCGUGAGUAAUAAUGCG
hsa-miR-574-5p	UGAGUGUGUGUGUGAGUGUGU
hsa-miR-26a-5p	UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCU
hsa-let-7f-5p	UGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUU
Spike-in cel-mir-39	Spike In Kontrolle

Tabelle 13: Zusammenfassung aller verwendeten miRNA-Primer in der qRT-PCR mit miRNA Sequenzierung (miRNA-seq).

5.3 RNA Extraktion

5.3.1 Blutprobengewinnung

Zur miRNA Isolierung wurde unmittelbar präoperativ vor Tumorresektion 7,5 ml Vollblut mit einer Lithium-Heparin-Monovette von SARSTEDT AG & Co. KG abgenommen. Zur Separation des Plasmas von den Blutzellen wurde das Blut mit 2000 Umdrehungen pro Minute für 10 Minuten zentrifugiert und bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert.

5.3.2 Heparininaktivierung mittels Heparinase

Heparin kann die miRNA-Quantifizierung durch Interaktion mit der DNA-Polymerase inhibieren (Kim *et al.*, 2012). Darüber hinaus wurde festgestellt, dass Heparin die Gewinnung, Isolierung und Extraktion der miRNAs aus Patientenblut stört (Boeckel *et al.*, 2013). Um diesen Prozess zu unterdrücken, wurde das Plasma vor der RNA-Isolierung mit Heparinase von Sigma-Aldrich versetzt, ein Enzym, das die Wirkung von Heparin hemmt und eine Interaktion zwischen Heparin und DNA-Polymerase unterbindet. Dadurch wird eine zuverlässige Isolierung der miRNAs aus den heparinisierten Plasmen erzielt (Kondratov *et al.*, 2016). Des Weiteren ist es nötig, die Wirkung der Ribonukleasen (RNasen) zu unterdrücken. Diese Enzyme führen durch hydrolytische Spaltung der Phosphodiesterbrücken der Ribonukleinsäuren zum Abbau der RNA. Um diesen Ablauf zu unterbrechen, wurde ein RNasen-Inhibitor (RNaseOUT™, Thermo Fisher Scientific) verwendet. Insgesamt wurden 100 µl Plasma mit 10 µl Heparinase (1mg/ml) und 2,5 µl RNaseOUT (40 U/µl) vermischt und bei 25 °C für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde das Volumen mit 87,5 µl Nuclease freiem Wasser gewaschen.

5.3.3 Gesamt-RNA Isolierung, einschließlich miRNA

Das miRNeasy Serum/Plasma Kit von Qiagen, ein Kit zur Purifikation von miRNA und anderen kleinen RNAs aus kleinen Volumina von Serum und Plasma, wurde eingesetzt. Zur Lyse von Fettgewebe wurde 1 ml Qiazol Reagens von Qiagen hinzugegeben, im Vortexmischer geschüttelt und bei Raumtemperatur (RT) für fünf Minuten inkubiert. Es folgte die Hinzugabe von 1µl Glykogen (20mg/ml Lösung) mit dem Ziel, sehr kleine Oligonukleotide auszufällen. 3,5 µl spike-in cel-mir-39, eine quantifizierte synthetische RNA zur Kalibrierung während des RNA-Extraktionsverfahrens, sowie 200 µl Chloroform wurden für drei Minuten bei Raumtemperatur hinzugegeben. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 14000 Umdrehungen pro Minute bei 4 °C wurden 600 µl wässrige Phase in ein neues Röhrchen

entnommen und die RNA mit dem vollautomatisierten QIAcube Roboter von Qiagen nach der Angabe des Herstellers isoliert. Am Ende der RNA Extraktion wurden die Röhrchen auf Eis gelagert. Mit Hilfe des Nano Drop-2000/2000c Spektrophotometer von Thermo Fisher Scientific wurden die Qualität und die Quantität der RNA validiert. Nach Kalibrierung des Gerätes erfolgte die Messung der RNA-Konzentration in ng/µl durch die photospektrometrischen Reaktionen und die Absorption der Wellenlängen von 230 nm, 260 nm und 280 nm. Die Integrität der RNA wurde mit Hilfe der 2100 Expert Software Version B.02.02 von Agilent beurteilt.

5.4 Microarray

Die Expression von 2549 miRNAs wurde mit Hilfe des Agilent SurePrint G3 miRNA Microarray Systems (basierend auf miRbase Version 21) von Agilent nach den Anweisungen des Herstellers gemessen. Die miRNA-Expression wurde in jeweils 37 Serumproben analysiert. Um fluoreszenzmarkierte miRNA zu erzeugen, wurde der miRNA Complete Labeling und Hyb Kit von Agilent verwendet. Diese Methode beinhaltet die Bindung einer Cyanin 3-pCp-Einheit mit mehr als 90% Wirkungsgrad an das 3'-Ende eines RNA-Moleküls. Die Verwendung von Calf Intestinal Phosphatase führt zur Dephosphorylierung der RNA, und die Verwendung von Dimethylsulfoxid (DMSO) zur RNA-Denaturierung. Es wurden 100 ng der im Voraus isolierten RNA auf ein Volumen von 2 µl gegeben, anschließend wurden 0,5 µl Calf Intestinal Phosphatase, 1,1 µl nucleasefreies H₂O und 0,4 µl Calf Intestinal Phosphatase Puffer hinzugefügt. Dann erfolgte die Inkubation im Thermocycler für 30 Minuten bei 37 °C. Als nächster Schritt wurden 2,8 µl DMSO (100%) hinzugegeben, schließlich wurden mittels Temperatursteigerung bis 99 °C für fünf Minuten die Calf Intestinal Phosphatase inhibiert und die Ribonukleinsäure denaturiert. Anschließend wurden die Proben auf Eis gelagert. Dann erfolgte die Präparation von Ligation-Master-Mix durch die Mischung von 0,5 µl T4-RNA-Ligase, 3 µl Cyanin3-pCp und 1 µl RNA Ligase Puffer. Diese Mischung wurde zu den denaturierten RNA-Proben hinzugefügt und bei einer Temperatur von 16 °C für zwei Stunden inkubiert. Durch die Verwendung des Enzyms T4-RNA-Ligase wird die ATP-abhängige Bildung von Phosphodiesterbindungen katalysiert, als Folge werden zwei RNA-Moleküle miteinander verbunden. Im Folgenden wurde die Probenpurifikation durchgeführt, um das übrige DMSO und freie Cyanin 3-pCp-Einheiten zu eliminieren. Hierzu wurde die Probe in einer Vakuumzentrifuge bei 45-55 °C getrocknet und schließlich in dem Hybridisierungspuffer, der aus der Mischung von 22,5 µl Hi-RPM Hybridisierungspuffer, 17 µl nucleasefreiem H₂O, 4,5 µl Blocking Agent, und 1 µl Hyb-Spike-In Lösung besteht, resuspendiert. Als nächstes wurde die Mischung bei 100 °C für fünf Minuten inkubiert und danach auf Eis gelagert. Anschließend wurden die Mikroarray Slides (SurePrint G3 Human miRNA, 8X60K Microarray von Qiagen) beladen. Die Slides wurden für 20 Stunden bei 55 °C und 20 Umdrehungen pro Minute inkubiert. Schließlich wurden die Mikroarray Slides mit Gene Expression Wash Buffer Kit von Agilent gespült und getrocknet, um zuverlässige Ergebnisse in der post-Hybridisierung Phase zu gewährleisten. Die Mikroarray Slides wurden in Slidehalter gebracht und mit dem Agilent G2565BA Microarray Scanner abgetastet. Es erfolgte

nun die Darstellung der miRNA mittels erstellter Slides. Die gemessenen Daten wurden auf eine Matrix übertragen, wodurch die Patientenplasmen in Zeilen und die miRNA in Spalten gefasst wurden.

5.5 Reverse Transkription - quantitative Echtzeit Polymerasekettenreaktion (RT-qPCR)

Die Evaluation der Microarray Ergebnisse wurde unter Verwendung der Reverse Transkription – quantitative Echtzeit Polymerasekettenreaktion (RT-qPCR) im ABI StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) von Life Technologies durchgeführt.

Im ersten Schritt wird hierbei die isolierte RNA durch das Enzym Reverse Transkriptase in eine komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA) umgeschrieben. Mit dem NanoDrop ND-2000c Spectrophotometer von Thermo Fisher Scientific wurden die verschiedenen RNA-Konzentrationen kalkuliert.

Mit Hilfe des miScript RT II Kit von Qiagen wurde die cDNA produziert. Zuerst wurde die Reverse Transkriptase Mischung vorbereitet. Diese Mischung enthält alle Komponenten, die für die Synthese des ersten Strangs der komplementären DNA (cDNA) erforderlich sind. Die Mischung wurde durch die Gabe von 4 µl 5x miScript HiSpec Buffer, 2 µl 10x miScript Nucleics Mix und 2 µl miScript Reverse Transcriptase Mix hergestellt. Zur Mischung wurden jeweils 100 ng extrahierter RNA gegeben und mit Nuklease-freiem Wasser auf ein Volumen von 20 µl verdünnt und für 60 Minuten bei 37 °C inkubiert, um die cDNA zu synthetisieren. Anschließend wurde die Temperatur für fünf Minuten bis 95 °C gesteigert, um die aktivierte miScript Reverse Transcriptase zu inhibieren, und bei -20 °C für die weitere Analyse gelagert. Mit Hilfe des vollautomatischen Pipettierungssystems QIAgility™ von Qiagen wurden jeweils 2 µl cDNA (verdünnt 1:10 mit DEPC-Wasser), 2 µl miScript Universal Primer, 2 µl miScript Primer Assay, 10 µl SYBR Green PCR Master Mix, und 4 µl RNase freies H₂O gemischt.

Das Ziel der RT-qPCR liegt darin, definierte Oligomere zu amplifizieren und in der Folge nachweisen zu können. In der vorliegenden Studie wurden miScript Primer Assays eingesetzt, die miRNA-spezifische Primer für folgende, schon durch Microarray definierte miRNAs enthielten: miR-142-3p, miR-126-3p, miR-574-5p, let-7f-5p und miR-26a-5p. Für die endogene Prüfung wurde Spike-in cel-mir-39 verwendet.

Zum Nachweis doppelsträngiger DNA in der real time quantitativen PCR wird der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green eingesetzt. Er ist ein asymmetrischer Cyanin-Farbstoff und wurde erstmalig 1995 als DNA-Farbstoff in der Gelelektrophorese benutzt (Schneeberger *et al.*, 1995). Mit der Zunahme der DNA-Moleküle in der PCR wird zunehmend SYBR Green angelagert und somit steigt die Fluoreszenz im Ansatz. SYBR Green hat einen Emissionsbereich zwischen 494 und 521 nm. Die Fluoreszenz wird nach jedem PCR Zyklus gemessen.

In der RT-qPCR wurden insgesamt 40 Zyklen durchgeführt. Jeder Zyklus besitzt drei Schritte:

- **Denaturierung:** Die Mischung wird für 15 Sekunden bis 94 °C erhitzt, bei dieser Temperatur trennen sich die beiden DNA-Stränge durch Zerstörung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen voneinander.

- Primerhybridisierung (primer annealing): Die Mischung wird schnell bis 55 °C für 30 Sekunden abgekühlt. Bei dieser Temperatur wird die erneute Bindung der DNA-Stränge verhindert, damit die Primer sich anlagern können.
- Elongation (Extending, Amplifikation): Die Mischung wird wieder für 30 Sekunden bis 70 °C erhitzt, Während der Elongation synthetisiert die Polymerase vom Primer aus in 5'-3'-Richtung den komplementären Strang.

Die emittierten fluoreszierenden Signale im Verlauf der PCR werden detektiert. Sie zeigen die vier Phasen der Amplifikation in der PCR. Die Signale in der Baseline Phase liegen unter der Detektionsschwelle. Die zweite Phase, die exponentielle Phase, beginnt mit der Detektion des ersten Signals (Schwellenwertzyklus) und schreitet fort bis zur maximalen exponentiellen Detektionsrate. Daraufhin folgt die lineare Phase, die in erster Linie durch Substratmangel und Denaturierung der DNA Polymerase bedingt ist. In der folgenden Plateauphase sinkt die Amplifizierung rasch ab.

5.6 Statistische Auswertung

Für die statistische Analyse der klinischen Daten wurde die frei verfügbare Entwicklungsumgebung „R“ verwendet (Version 3.3.2. für MacOS). Insgesamt 430 Patienten wurden eingeschlossen. Für die grundlegende Analyse der Patientendaten wurde eine Varianzanalyse (ANOVA, Analysis of variance, implementiert im R stats Paket und der aovFunktion) durchgeführt. Die Patienten wurden nach Geschlecht, Resektionsverfahren, Histologie, Tumorstadium, Lymphknotenbefall (N1, N2, single level, multilevel), und R-Status eingeteilt. Es soll untersucht werden, ob die Ergebnisse der IASLC an einer kleineren Gruppe von Patienten mit nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen nachzuvollziehen sind, u.a. ob der Lymphknotenbefall bezüglich single- bzw. multilevel- Subklassifizierung mit den Überlebenszeiten der Patienten korreliert. Um abzuschätzen, ob das Überleben signifikant von einem der Parameter abhängt, wurde eine Überlebenszeitanalyse (Kaplan-Meier) durchgeführt. Die zensierten Überlebensdaten wurden als Eingabe verwendet, um die Überlebenskurve zu berechnen (survfit Funktion aus dem R Paket survival). Um den Unterschied zwischen Kurven zu berechnen, wurde die survdiff Funktion aus dem R Paket survival verwendet. Als Signifikanzniveau wurde ein alpha-Level von 0,05 gewählt. Die Werte sind als Mittelwerte mit Standardabweichung (Mittelwert \pm SD) angegeben. Zur Darstellung der Daten wurden Boxplots und Kaplan-Meier Kurven verwendet.

In Bezug auf miRNA-Expression (Microarray) wurden die Differenzen im Plasma von Lungenkarzinompatienten mit der frei erhältlichen R Software v.2.14.2 (R Development Core Team, 2010) ausgewertet. Die Microarraydaten wurden entsprechend mit Varianz-stabilisierender Normalisierung (VSN) kalibriert, einer von Huber entwickelten Methode zur Reduktion der Messunterschiede innerhalb der Microarrays (Huber *et al.*, 2002). Des Weiteren wurden die Daten zur besseren Darstellung logarithmiert. In den Vergleichprozess wurden alle miRNAs einbezogen, die einen p-Wert $<0,05$ zeigten. In Bezug auf die miRNA-Expression (RT-qPCR) der ausgewählten miRNAs wurden alle RT-qPCR Daten

mit Hilfe von SDS Relative Quantification Software Version 2.3 analysiert. $P < 0,05$ und Fold Change (FC) $> 1,5$ werden als signifikant für RT-qPCR ausgewertet.

Zuerst wurden die Ct-Werte (thresholdcycle) für jede Probe einschließlich der Spike-In Kontrolle (miR-39) berechnet, dann wurde die Differenz zwischen jedem miRNA-Ct-Wert und einem Ct-Wert der Spike-In Kontrolle kalkuliert. Als Folge wurde ΔCt ($\Delta Ct = Ct_{\text{(jede untersuchte miRNA)}} - Ct_{\text{(Spike-In Kontrolle miR-39)}}$) gebildet. Um $\Delta\Delta Ct$ zu berechnen, wurden die Mittelwerte für jede ΔCt und dann $\Delta\Delta Ct$ mit der Gleichung $\Delta\Delta Ct = \text{Mittelwert}(\Delta Ct_{\text{(LTS-Gruppe)}}) - \text{Mittelwert}(\Delta Ct_{\text{(STS-Gruppe)}})$ berechnet.

Anschließend wurde der Fold Change (FC) mit der Gleichung $FC = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ kalkuliert (Livak und Schmittgen, 2001). In Abhängigkeit vom FC-Wert ($FC > 1,5$) wurde der t-Test durchgeführt. $P < 0,05$ wurde als signifikant bewertet.

5.7 Analyse der Zielgene und Signalwege

Mit Hilfe von DIANA-miRPath v.3.0 Software wurden die KEGG-Signalwege in der vorliegenden Studie analysiert. Die Bestimmung von experimentell validierten miRNA-Zielgenen wurde mittels DIANA-TarBase Algorithmus (TarBase v7.0) durchgeführt.

6 Ergebnisse

6.1 Klinische Daten

Die Anzahl aller untersuchten Patienten ist 430, die Zahl der gesamten Sterbefälle ist 315 (73,3% aller untersuchten Patienten). Die Anzahl der tumorbedingten Sterbefälle ist 253 (58,8% aller untersuchten Patienten). Tabelle 14 gibt einen Überblick über die tumorbedingte Sterblichkeit bei Patienten mit definierten Merkmalen bzw. bei Patienten mit Tumoren, die bestimmte Merkmale zeigen.

Patientenverteilung		operierte Patienten ($\Sigma 430$)	tumorbedingte Sterbefälle ($\Sigma 253$)	
		A	B	B/A(%)
Geschlecht	männlich	306	178	58,2
	weiblich	124	75	60,5
Histologie	Adeno-Ca	186	108	58,1
	PEC	194	114	58,8
	SCLC	11	10	90,9
	Sonstige Histologie	39	21	53,9
Resektionsverfahren	Lobektomie	340	194	57,1
	Bronchusmanschettenresektion	54	31	57,4
	Pneumonektomie	36	28	77,8
LK-Status	N0	256	130	50,8
	N1	98	63	64,3
	N2	76	60	78,9
LK-Subklassifizierung	N0	256	130	50,8
	N1a	69	41	59,4
	N1b	29	22	75,9
	N2a	53	44	83,0
	N2b	23	16	69,6
R-Status	R0	364	204	56,0
	R1	37	26	70,3
	R2	10	8	80,0
	Rx	19	15	78,9

Tabelle 14: Anzahl der Patienten mit verschiedenen Merkmalen. Berücksichtigt werden alle Patienten und die tumorbedingt verstorbenen Patienten. Adeno-Ca= Adenokarzinom, PEC= Plattenepithelkarzinom, SCLC= kleinzelliges Lungenkarzinom, R-Status= Resektionsstatus, A= Anzahl aller operierten Patienten, B= Anzahl der tumorbedingten Sterbefälle.

In der Folge werden die tumorbedingt bzw. nicht tumorbedingt verstorbenen Patienten und die zum Untersuchungszeitpunkt noch lebenden Patienten bezüglich der verschiedenen Merkmale Geschlecht, Histologie, Resektionsverfahren, R-Status, UICC7, UICC8, Lymphknotenstatus und Lymphknoten-subklassifizierung analysiert.

6.1.1 Überlebenszeiten in Abhängigkeit vom Geschlecht

Die gesamte Anzahl der tumorbedingten Sterbefälle ist 253 (58,8% aller operierten Patienten), davon sind 178 Patienten (70,4%) Männer und 75 Patienten (29,6%) Frauen. Die Tabelle 15 zeigt die mittleren Überlebenszeiten der Patienten, die tumorbedingt verstorben sind. Sie sind nach dem Geschlecht aufgeteilt. Der Unterschied ist statistisch signifikant ($p < 0,05$).

Geschlecht (tumorbedingt verstorbene Patienten)	n ($\Sigma 253$)	MÜZ (Monate)	SD	p
männlich	178	24,5	23,7	0,002
weiblich	75	35,5	30,8	

Tabelle 15: Mittlere Überlebenszeit der tumorbedingt verstorbenen Patienten in Abhängigkeit vom Geschlecht (MÜZ: mittlere Überlebenszeit, SD: Standardabweichung).

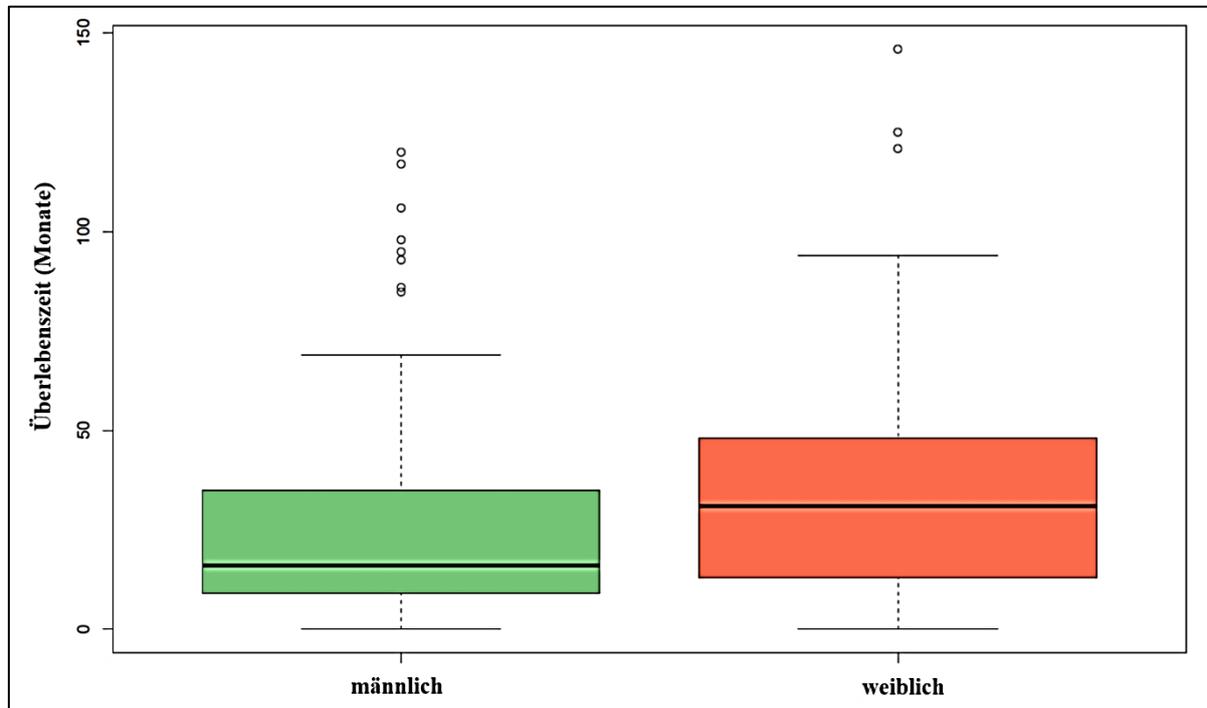


Abbildung 4: Boxplot der Überlebenszeiten der tumorbedingt verstorbenen Patienten, getrennt nach Geschlecht. Männer werden grün und Frauen rot dargestellt.

Abbildung 4 zeigt mittels Boxplot die Verteilung und die Überlebenszeiten der tumorbedingt verstorbenen Patienten, getrennt nach Geschlecht. Die mittleren und medianen Überlebenszeiten der Frauen sind signifikant länger als die der Männer.

Tabelle 16 zeigt den aktuellen Status aller operierten Patienten ($n=430$) abhängig vom Geschlecht. Zum Zeitpunkt der Untersuchung lebten von den Männern noch 26,8%, tumorbedingt verstorben sind 58,2%, nicht tumorbedingt verstorben sind 15,0%. Die entsprechenden Zahlen bei den Frauen sind 27,4%, 60,5%, 12,1%. Es gibt keinen signifikanten Unterschied der verschiedenen Gruppen „lebt“, „nicht tumorbedingt verstorben“ und „tumorbedingt verstorben“ (Fisher Test $p = 0,7$). Es ist deutlich, dass die Haupttodesursache tumorbedingt war, und es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Geschlechtern (58,2% vs. 60,5%).

Geschlecht (alle Patienten)	lebt		nicht tumorbedingt verstorben		tumorbedingt verstorben	
	n	%	n	%	n	%
männlich ($\Sigma 306$)	82	26,8	46	15,0	178	58,2
weiblich ($\Sigma 124$)	34	27,4	15	12,1	75	60,5

Tabelle 16: Geschlechtsverteilung aller operierten Patienten, Überleben und Todesursachen.

Die Anzahl der nicht tumorbedingt verstorbenen Patienten ist 61 (14,2% aller operierten Patienten). Die Anzahl dieser Patienten hat keinen signifikanten Einfluss auf die Überlebenszeiten (mediane Überlebenszeit) bzw. Überlebensraten (2-JÜR, 5-JÜR) (Tabelle 17, Tabelle 18), da sie prozentual mit 15,0% (m) bzw. 12,1% (w) annähernd gleich hoch ist. Das weibliche Geschlecht hat insgesamt höhere mediane Überlebenszeiten im Vergleich zu Männern.

Geschlecht (alle Patienten)	n (Σ430)	mediane Überlebenszeit (Monate)	2-JÜR (%)	5-JÜR (%)
männlich	306	30,5	55,6	34,3
weiblich	124	41,0	71,0	42,7

Tabelle 17: 2-JÜR, 5-JÜR und mediane Überlebenszeiten aller operierten Patienten, getrennt nach Geschlecht. JÜR= Jahres Überlebensrate.

Geschlecht (lebende und tumorbedingt verstorbene Patienten)	n (Σ369)	mediane Überlebenszeit (Monate)	2-JÜR (%)	5-JÜR (%)
männlich	260	31,5	55,0	36,5
weiblich	109	47,0	71,6	45,0

Tabelle 18: 2-JÜR, 5-JÜR und mediane Überlebenszeiten getrennt nach Geschlecht. Es sind nur die Patienten, die leben oder tumorbedingt verstorben sind, berücksichtigt. JÜR= Jahres Überlebensrate.

In der Kaplan-Meier Kurve (Abbildung 5) gibt es zwischen den beiden Geschlechtern keinen signifikanten Unterschied in den Überlebenszeiten ($p = 0,46$).

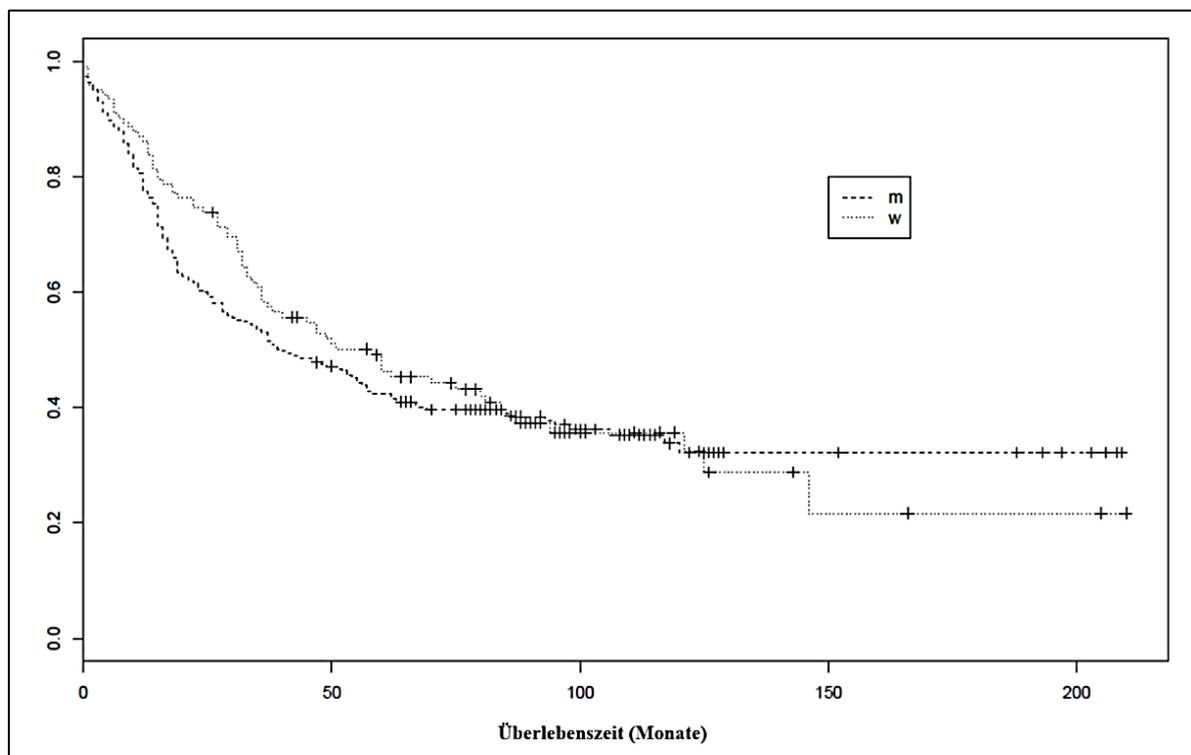


Abbildung 5: Kaplan-Meier Kurven der Überlebenszeit aller operierten Patienten mit Lungenkarzinom abhängig vom Geschlecht. m= männlich, w= weiblich.

6.1.2 Überlebenszeiten in Abhängigkeit von der Histologie

Von 253 Patienten mit tumorbedingtem Tod hatten 108 (42.7%) Adenokarzinome, 114 (45.1%) Plattenepithelkarzinome, 10 (3.9%) kleinzellige Lungenkarzinome, und 21 (8.3%) eine andere Histologie. Unter anderer Histologie werden großzelliges Lungenkarzinom, Karzinoid, adenosquamöses Karzinom, Sarkom, und andere seltene Lungenkarzinome gerechnet. In Tabelle 19 sieht man keine signifikante Differenz der mittleren Überlebenszeiten ($p = 0,32$).

Histologie (tumorbedingt verstorbene Patienten)	n ($\Sigma 253$)	MÜZ (Monate)	SD	p
Adenokarzinom	108	21,5	29	0,32
Plattenepithelkarzinom	114	16,5	24	
Kleinzelliges Karzinom	10	22,0	23	
Sonstige Histologie	21	25,5	32	

Tabelle 19: Verteilung der tumorbedingt verstorbenen Patienten nach Histologie des Tumors und ihre mittlere Überlebenszeiten.

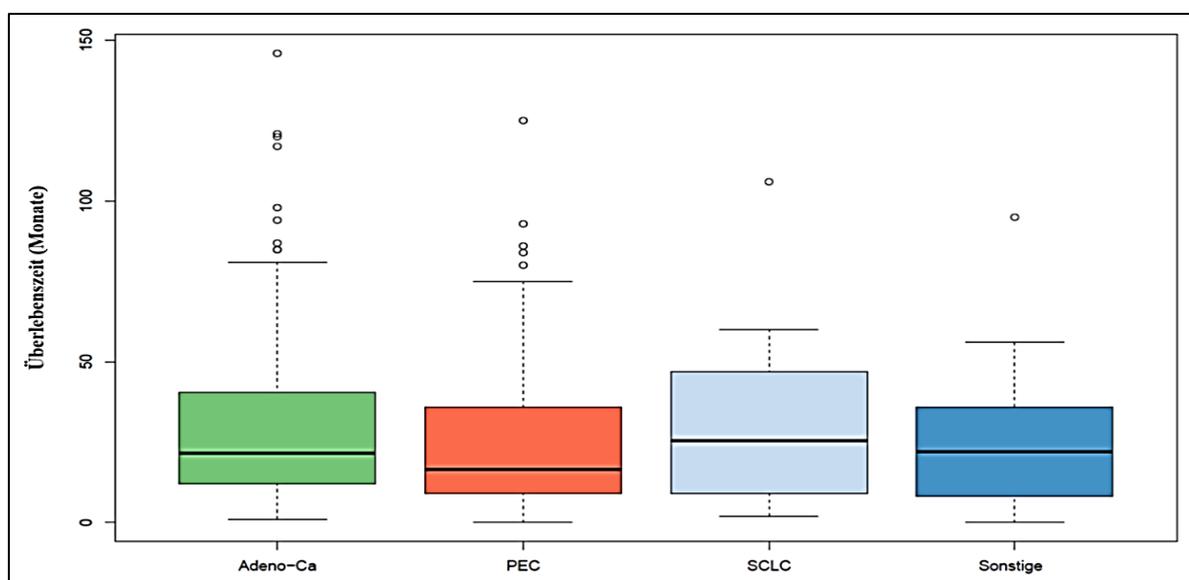


Abbildung 6: Boxplot der Überlebenszeiten der tumorbedingt verstorbenen Patienten in Abhängigkeit von der Histologie.

Es lässt sich in Tabelle 20 eine höhere tumorbedingte Sterblichkeit bei kleinzelligem Lungenkarzinom erkennen, die allerdings statistisch nicht signifikant ist ($p > 0,05$).

Histologie	Lebt		nicht tumorbedingt verstorben		tumorbedingt verstorben	
	n	%	n	%	n	%
Adenokarzinom ($\Sigma 186$)	53	28,5	25	13,4	108	58,1
Plattenepithelkarzinom ($\Sigma 194$)	49	25,3	31	16,0	114	58,8
Kleinzelliges Karzinom ($\Sigma 11$)	0	0,0	1	9,1	10	90,9
Sonstige Histologie ($\Sigma 39$)	14	35,9	4	10,3	21	53,8

Tabelle 20: Aktueller Status der Patienten („lebt“, „nicht tumorbedingt verstorben“ und „tumorbedingt verstorben“) abhängig von der Histologie des Tumors. Die höhere Mortalität des kleinzelligen Lungenkarzinoms ist nicht signifikant (Fischer Test $p = 0,25$).

Die Anzahl nicht tumorbedingt verstorbener Patienten (n=61, 14,2% aller operierten Patienten) hat keinen signifikanten Einfluss auf die Überlebenszeiten (mediane Überlebenszeit) bzw. Überlebensraten (2-JÜR, 5-JÜR) (Tabelle 21, Tabelle 22).

Histologie (alle Patienten)	n (Σ430)	mediane Überlebenszeit (Monate)	2-JÜR (%)	5-JÜR (%)
Adenokarzinom	186	35,5	63,4	37,1
Plattenepithelkarzinom	194	34,5	55,7	35,6
Kleinzelliges Karzinom	11	31,0	54,5	27,3
Sonstige Histologie	39	43,0	66,7	43,6

Tabelle 21: 2-JÜR, 5-JÜR und mediane Überlebenszeiten aller operierten Patienten, getrennt nach Histologie. JÜR= Jahres Überlebensrate.

Histologie (lebende und tumorbedingt verstorbene Patienten)	n (Σ369)	mediane Überlebenszeit (Monate)	2-JÜR (%)	5-JÜR (%)
Adenokarzinom	161	40,0	64,6	41,0
Plattenepithelkarzinom	163	32,0	54,6	37,4
Kleinzelliges Karzinom	10	25,5	50,0	20,0
Sonstige Histologie	35	40,0	65,7	42,9

Tabelle 22: 2-JÜR, 5-JÜR und mediane Überlebenszeiten abhängig von der Histologie. Es sind nur die Patienten, die leben oder tumorbedingt verstorben sind, berücksichtigt. JÜR= Jahres Überlebensrate.

Die Abbildung 7 zeigt, dass Patienten mit kleinzelligem Lungenkarzinom die kürzesten Überlebenszeiten hatten. Der Unterschied ist jedoch statistisch nicht signifikant ist ($p = 0,2$), wobei dies in erster Linie an der kleinen Zahl der Patienten mit kleinzelligem Lungenkarzinom liegt.

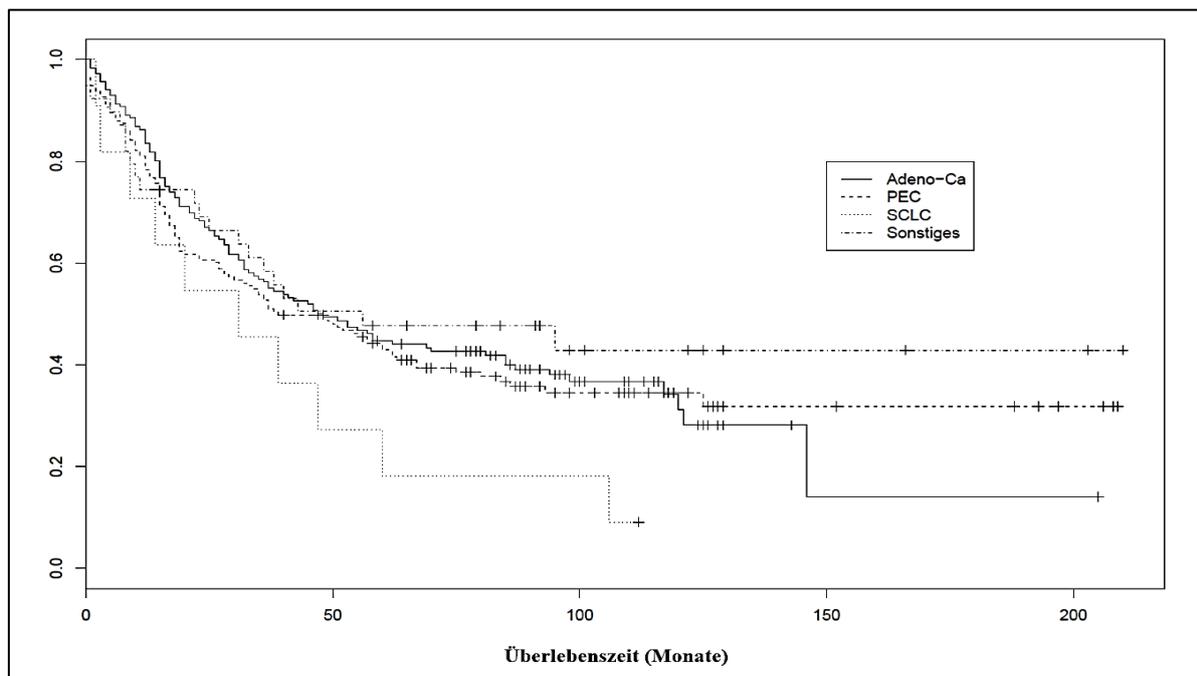


Abbildung 7: Kaplan-Meier Kurven der Überlebenszeit aller operierten Patienten mit Lungenkarzinom. Die Patienten wurden nach der Histologie in Gruppen eingruppiert. Adeno-Ca= Adenokarzinom, PEC= Plattenepithelkarzinom, SCLC=kleinzelliges Karzinom.

6.1.3 Überlebenszeiten in Abhängigkeit vom Resektionsverfahren

Die Anzahl der tumorbedingten Sterbefälle beträgt 253 (58,8% der Gesamtfälle), davon 194 nach Lobektomien, 31 nach Lobektomien mit Bronchusmanschettenresektion und 28 nach Pneumonektomien. Die mittleren Überlebenszeiten sind bei Patienten, die lobektomiert wurden und tumorbedingt verstarben, signifikant länger als bei Patienten, die pneumonektomiert wurden und tumorbedingt verstarben ($p < 0,05$) (Tabelle. 25).

Resektionsverfahren (tumorbedingt verstorbene Patienten)	n ($\Sigma 253$)	MÜZ (Monate)	SD	p
Lobektomie	194	21,5	27,5	0,03
Lobektomie mit Bronchusmanschettenresektion	31	14,0	16,5	
Pneumonektomie	28	11,0	26,1	

Tabelle 23: Mittlere Überlebenszeit in Abhängigkeit von der Resektionsart bei den Patienten, die tumorbedingt verstorben.

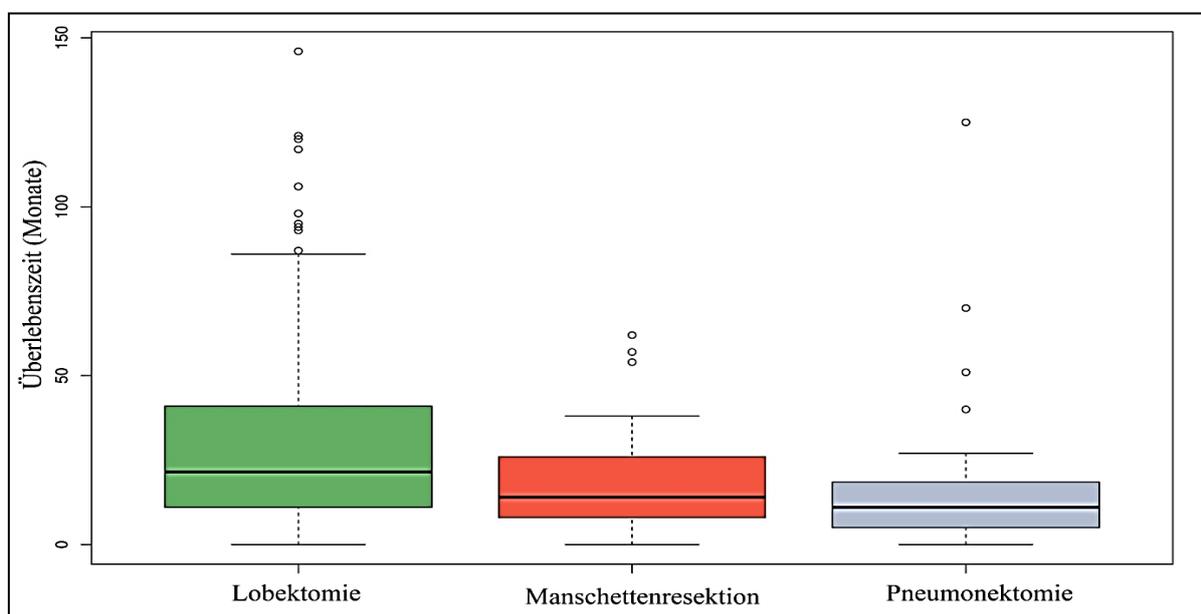


Abbildung 8: Boxplot der Überlebenszeiten der tumorbedingt verstorbenen Patienten in Abhängigkeit vom Resektionsverfahren.

Tabelle 24 zeigt den aktuellen Status aller operierten Patienten. Sie teilt ein in „lebt“, „nicht tumorbedingt verstorben“ und „tumorbedingt verstorben“. Die tumorbedingte Sterblichkeit ist nach Pneumonektomie am höchsten, ist aber nicht signifikant (Fischer Test $p = 0,2$).

Resektionsverfahren	lebt		nicht tumorbedingt verstorben		tumorbedingt verstorben	
	n	%	n	%	n	%
Lobektomie ($\Sigma 340$)	96	28,2	50	14,7	194	57,1
Lobektomie mit Bronchusmanschettenresektion ($\Sigma 54$)	15	27,8	8	14,8	31	57,4
Pneumonektomie ($\Sigma 36$)	5	13,9	3	8,3	28	77,8

Tabelle 24: Resektionsverfahren und aktueller Status der Patienten („lebt“, „nicht tumorbedingt verstorben“ und „tumorbedingt verstorben“).

Tabelle 25 zeigt die Überlebensraten und die medianen Überlebenszeiten aller operierten Patienten, getrennt nach Resektionsart und unabhängig von der Todesursache. Tabelle 26 zeigt die Überlebensraten und medianen Überlebenszeit der Patienten, die zum Untersuchungszeitpunkt noch lebten und der tumorbedingt verstorbenen, getrennt nach Resektionsart. Die lobektomierten Patienten haben höhere mediane Überlebenszeiten im Vergleich mit den Patienten mit anderen operativen Eingriffen ($p = 0,004$).

Resektionsverfahren (alle Patienten)	n ($\Sigma 430$)	mediane Überlebenszeit (Monate)	2-JÜR (%)	5-JÜR (%)
Lobektomie	340	39,0	63,8	38,8
Lobektomie mit Bronchialmanschetten- resektion	54	32,0	53,7	33,3
Pneumonektomie	36	15,5	33,3	22,2

Tabelle 25: 2-JÜR, 5-JÜR und mediane Überlebenszeiten aller operierten Patienten, getrennt nach den operativen Eingriffen.

Resektionsverfahren (lebende und tumorbedingt verstorbene Patienten)	n ($\Sigma 369$)	mediane Überlebenszeit (Monate)	2-JÜR (%)	5-JÜR (%)
Lobektomie	290	39,5	64,5	41,7
Lobektomie mit Bronchusmanschetten- resektion	46	26,0	50,0	34,8
Pneumonektomie	33	15,0	33,3	21,2

Tabelle 26: 2-JÜR, 5-JÜR und mediane Überlebenszeiten getrennt nach den operativen Eingriffen. Es sind nur die Patienten, die leben oder tumorbedingt verstorben sind, berücksichtigt. JÜR= Jahres Überlebensrate.

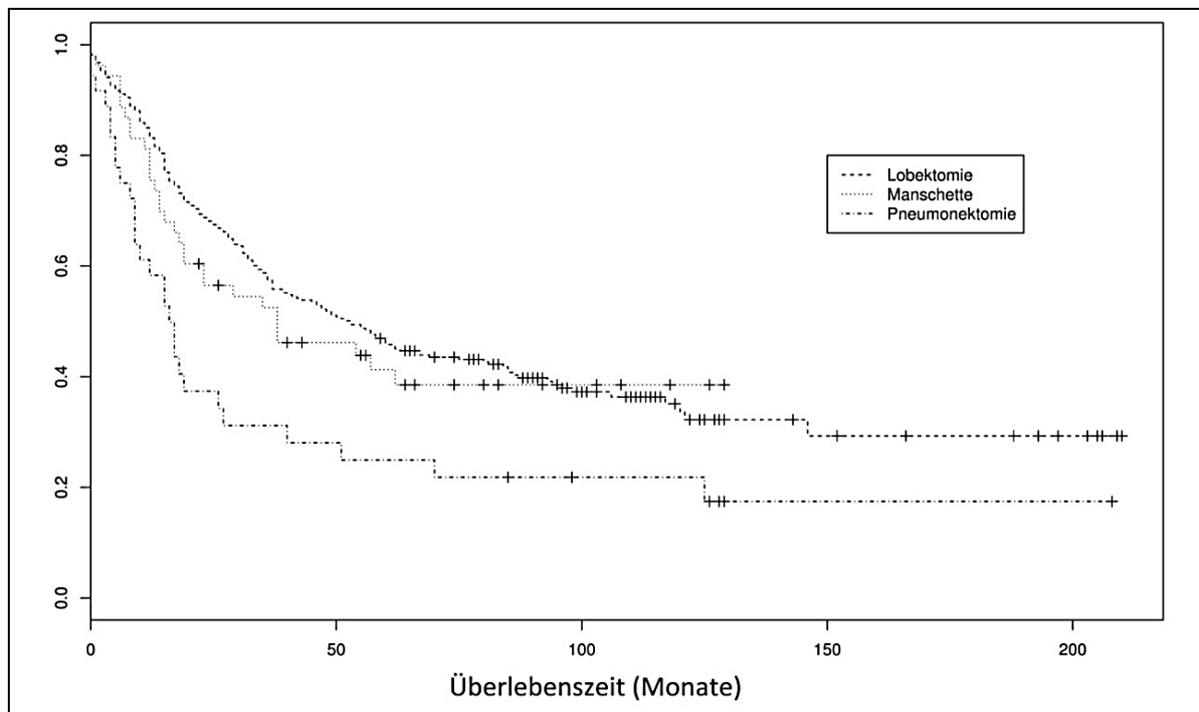


Abbildung 9: Kaplan-Meier Kurven der Überlebenszeiten aller operierten Patienten mit Lungenkarzinom. Die Patienten wurden nach Resektionsverfahren in Gruppen Lobektomie, Lobektomie mit Bronchusmanschettenresektion, und Pneumonektomie eingruppiert. Es lässt sich eine signifikant höhere Sterblichkeitsrate bei Pneumonektomie erkennen ($p < 0,05$).

Abbildung 9 zeigt, dass Pneumonektomie im Vergleich zu Lobektomie und Lobektomie mit Bronchusmanschettenresektion mit einem kürzeren Überleben einhergeht. Die Unterschiede sind signifikant ($p = 0,004$).

6.1.4 Überlebenszeiten in Abhängigkeit vom R-Status

Von 253 tumorbedingten Sterbefällen wurde bei 204 Patienten (80.6%) der Tumor potenziell kurativ reseziert (R0-Status), 26 (10.3%) hatten eine mikroskopisch nachgewiesene Tumorinfiltration der Resektionsränder (R1-Status), 8 (3.2%) eine makroskopisch nachgewiesene Tumorinfiltration der Resektionsränder (R2-Status), und 15 (5.9%) einen unsicheren o. nicht beschriebenen R-Status (Rx-Status). Die Patienten mit R0-Status, die tumorbedingt verstarben, überlebten am längsten und die Patienten mit R2-Status am kürzesten. Die Patienten mit R0-, R1-Status hatten ähnliche Überlebenszeiten (19, 17 Monate). Der Unterschied zwischen den Gruppen ist statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$).

R-Status (tumorbedingt verstorbene Patienten)	n ($\Sigma 253$)	MÜZ (Monate)	SD	p
R0	204	19	26,7	0,4
R1	26	17	27,5	
R2	8	12	20,9	
Rx	15	4	28,1	

Tabelle 27: Verteilung der tumorbedingt verstorbenen Patienten nach Resektionsstatus. MÜZ = mittlere Überlebenszeiten, SD = Standardabweichung, R-Status= Resektionsstatus.

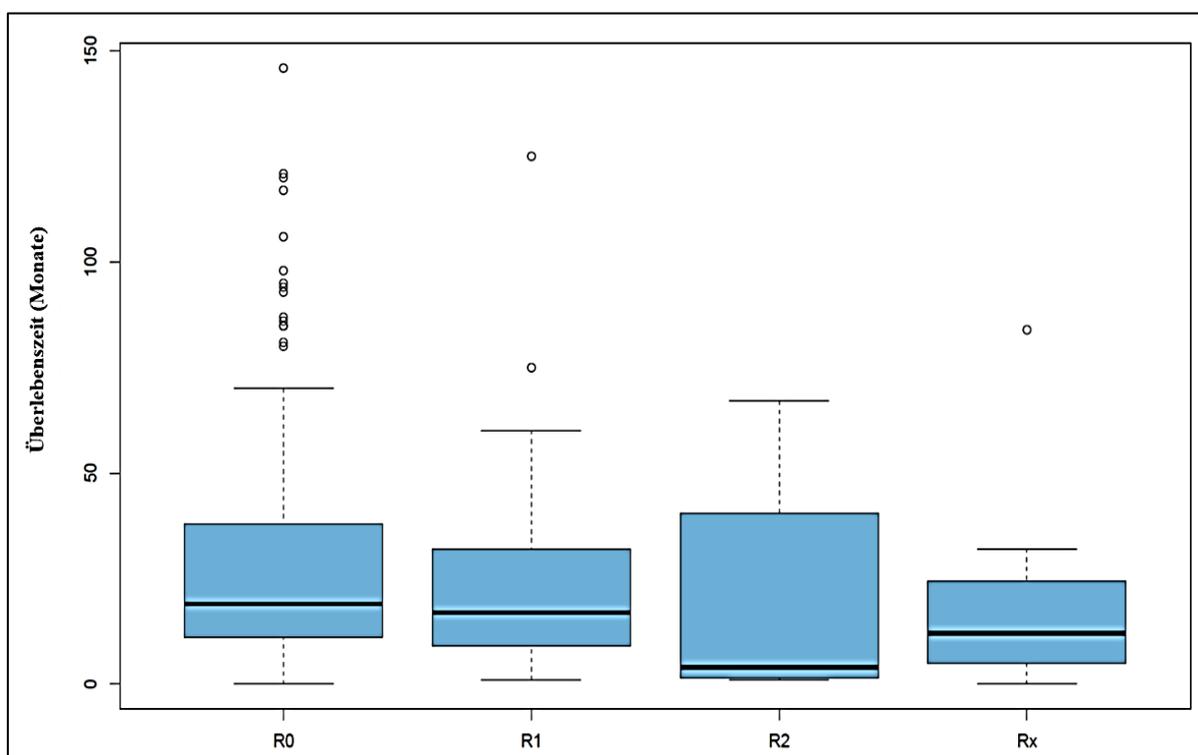


Abbildung 10: Boxplot für die Verteilung der tumorbedingten Sterbefälle nach R-Status. R0= tumorfreie Resektionsränder, R1= mikroskopisch tumorinfiltrierte Resektionsränder, R2= makroskopische tumorinfiltrierte Resektionsränder, Rx= Residualtumor kann nicht bestätigt werden.

In Tabelle 28 sieht man, dass die tumorbedingte Sterblichkeitsrate in der R2-Gruppe im Vergleich mit Patienten mit R1-, und R0-Status (80,0% vs. 70,3 vs. 56,0%) am höchsten ist, und dass die Patienten mit R0-Status ein längeres Überleben hatten. Die Unterschiede sind aber statistisch nicht signifikant ($p = 0,14$).

R-Status	lebt		nicht tumorbedingt verstorben		tumorbedingt verstorben	
	n	%	n	%	n	%
R0	106	29,1	54	14,8	204	56,0
R1	5	13,5	6	16,2	26	70,3
R2	2	20,0	0	0,0	8	80,0
Rx	3	15,8	1	5,3	15	78,9

Tabelle 28: Aktueller Status der Patienten („lebt“, „nicht tumorbedingt verstorben“ und „tumorbedingt verstorben“) in Abhängigkeit vom R-Status. R-Status= Resektionsstatus.

Die Anzahl nicht tumorbedingt verstorbenen Patienten ($n=61$, 14,2% aller operierten Patienten) hat keinen signifikanten Einfluss auf Überlebenszeiten (mediane Überlebenszeit) und Überlebensraten (2-JÜR, 5-JÜR) (Tabelle 29, Tabelle 30). Auch die Unterschiede in Überlebenszeit und in Überlebensraten (ohne nicht tumorbedingt verstorbenen Patienten) sind nicht signifikant. Dies liegt in erster Linie an der geringen Anzahl von Patienten in der Gruppe R1, R2 und Rx (Tabelle 30).

R-Status (alle Patienten)	n ($\Sigma 430$)	mediane Überlebenszeit (Monate)	2-JÜR (%)	5-JÜR (%)
R0	364	38,5	63,5	38,7
R1	37	22,0	43,2	24,3
R2	10	11,5	40,0	40,0
Rx	19	16,0	36,8	21,1

Tabelle 29: 2-JÜR, 5-JÜR und mediane Überlebenszeiten aller operierten Patienten, getrennt nach R-Status. JÜR= Jahres Überlebensrate.

R-Status (lebende und tumorbedingt verstorbene Patienten)	n ($\Sigma 369$)	mediane Überlebenszeit (Monate)	2-JÜR (%)	5-JÜR (%)
R0	310	38,5	63,5	41,3
R1	31	21,0	41,9	25,8
R2	10	11,5	40,0	40,0
Rx	18	18,5	38,9	22,2

Tabelle 30: 2-JÜR, 5-JÜR und mediane Überlebenszeiten in Abhängigkeit vom R-Status. Es sind nur die Patienten, die leben oder tumorbedingt verstorben sind, berücksichtigt. JÜR= Jahres Überlebensrate.

Die Abbildung 11 zeigt, dass die Überlebenszeiten abhängig vom R-Status sind. Dies ist statistisch signifikant ($p = 0,02$).

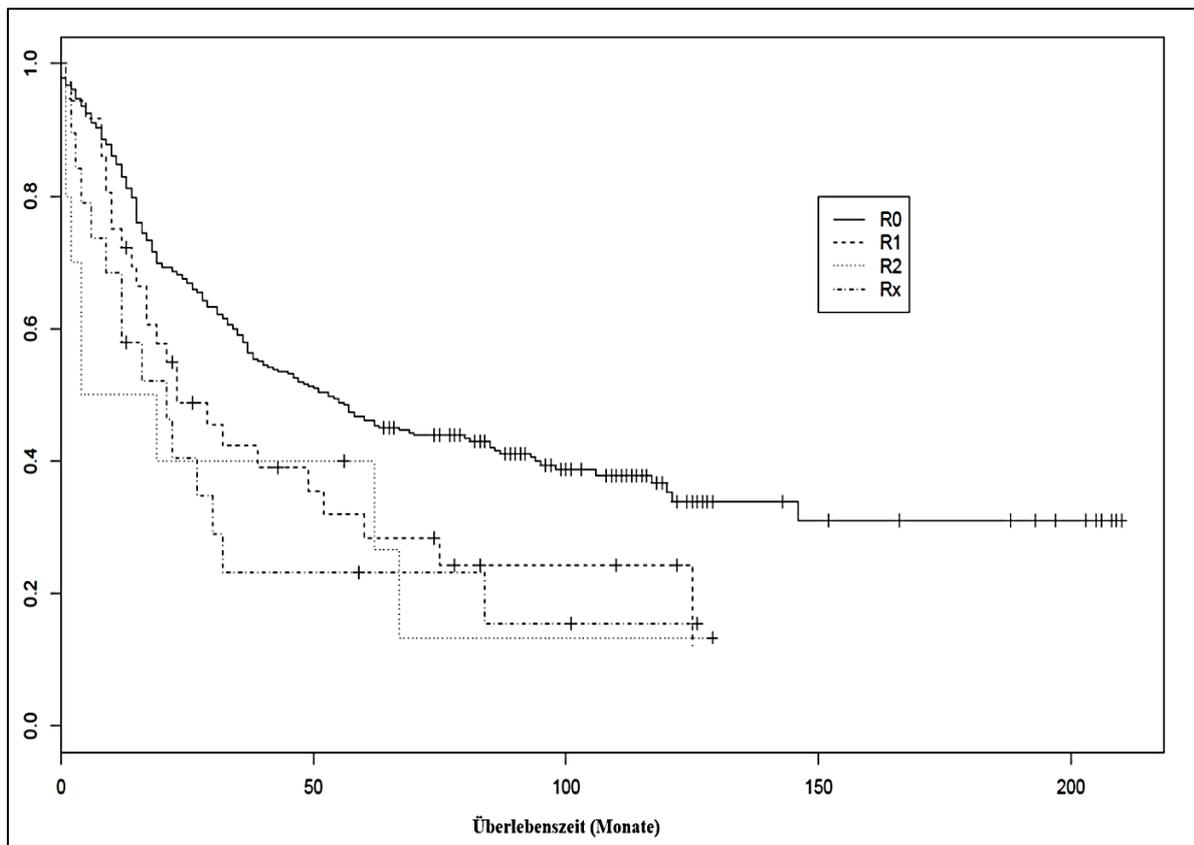


Abbildung 11: Kaplan-Meier Kurven der Überlebenszeit aller operierten Patienten mit Lungenkarzinom. Die Patienten wurden nach R-Status in Gruppen eingruppiert. R0= kein Resttumor an den Resektionsrändern, R1= mikroskopischer Resttumor an den Resektionsrändern, R2= makroskopischer Resttumor an den Resektionsrändern, und Rx= Resttumor an den Resektionsrändern kann nicht beurteilt werden. Der Unterschied ist signifikant $p < 0,05$.

6.1.5 Überlebenszeiten in Abhängigkeit von den Tumorstadien (UICC7)

Von 253 tumorbedingten Sterbefällen sind 0,8% im Stadium 0, 2% im Stadium IA, 11,1% im Stadium IB, 19,4% im Stadium IIA, 15,8% im Stadium IIB, 24,5% im Stadium IIIA, 9,5% im Stadium IIIB, und 1,9% im Stadium IV. Die Unterschiede der mittleren Überlebenszeiten sind statistisch signifikant ($p = 0,004$).

Tumorstadien UICC7 (tumorbedingt verstorbene Patienten)	n ($\Sigma 253$)	MÜZ (Monate)	SD	p
0	2	16,0	49,4	0,0036
IA	43	21,5	18,8	
IB	28	36,0	31,6	
IIA	49	14,5	29,8	
IIB	40	22,0	23,5	
IIIA	62	19,0	20,5	
IIIB	24	9,0	13,0	
IV	5	13,5	19,1	

Tabelle 31: Mittlere Überlebenszeiten der Patienten, die tumorbedingt verstorben sind. Tumorstadieneinteilung nach UICC7.

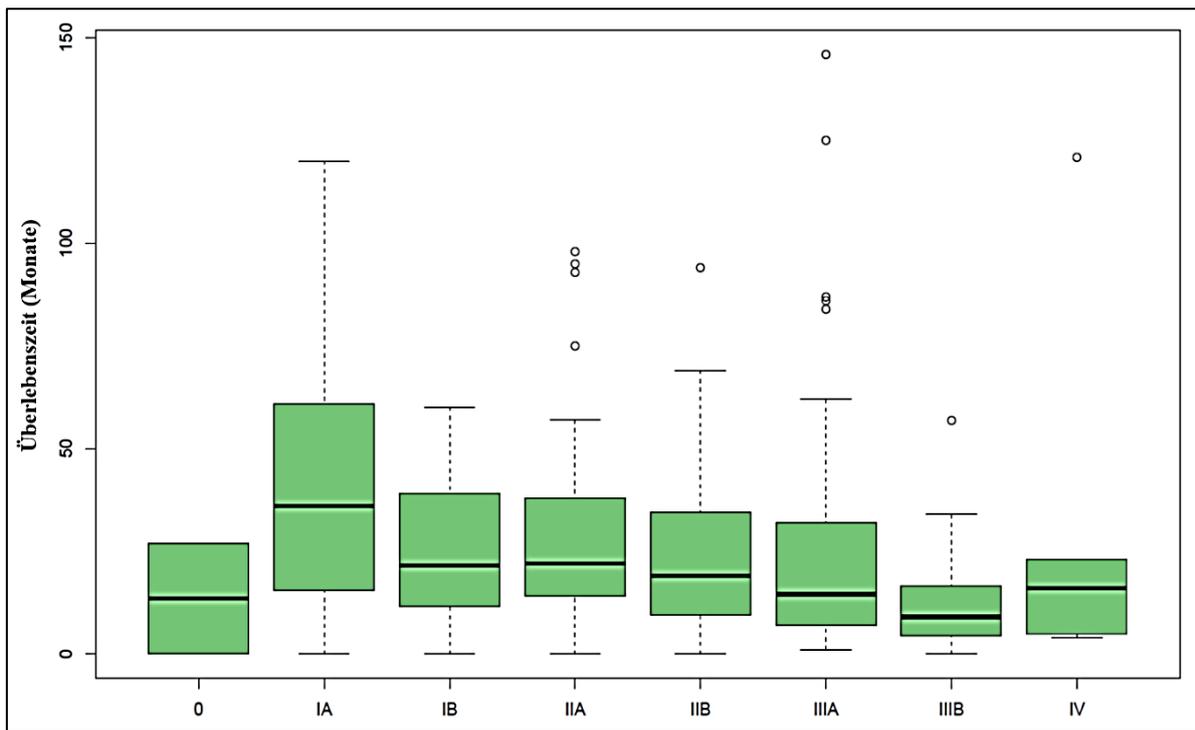


Abbildung 12: Boxplot der Überlebenszeiten der tumorbedingt verstorbenen Patienten in Abhängigkeit vom Tumorstadium nach UICC7.

Neben dem Ergebnis, dass es in den höheren Tumorstadien mehr tumorbedingte Todesfälle gibt (Tabelle 32), lassen Tabelle 31 und Abbildung 12 den Schluss zu, dass die Patienten, die tumorbedingt sterben, dann, wenn sie sich in einem früheren Tumorstadium befinden, längere Überlebenszeiten hatten als die Patienten, die ein höheres Tumorstadium hatten und tumorbedingt verstorben sind. Tabelle 32 zeigt den aktuellen Status („lebt“, „nicht tumorbedingt verstorben“ und „tumorbedingt verstorben“) der Patienten mit Tumoren aller Histologien und eingeteilt in die Stadien 0-IV nach der 7. Auflage der UICC. Während die tumorbedingte Sterblichkeit mit höheren Stadien ansteigt, und die nicht tumorbedingte Sterblichkeit in allen Stadien nahezu gleich ist, sinkt die Anzahl der Überlebenden mit steigendem Tumorstadium. Auf Grund der kleinen Patientenzahl in jeder Gruppe konnten die p-Werte nicht gerechnet werden.

Tumorstadien UICC7	Lebt		nicht tumorbedingt verstorben		tumorbedingt verstorben	
	n	%	n	%	n	%
0 (Σ4)	2	50,0	0	0,0	2	50,0
IA (Σ91)	37	40,7	11	12,1	43	47,3
IB (Σ69)	30	43,5	11	15,9	28	40,6
IIA (Σ83)	19	22,9	15	18,1	49	59,0
IIB (Σ64)	12	18,8	12	18,8	40	62,5
IIIA (Σ84)	12	14,3	10	11,9	62	73,8
IIIB (Σ28)	3	10,7	1	3,6	24	85,7
IV (Σ7)	1	14,3	1	14,3	5	71,4

Tabelle 32: Aktueller Status der Patienten („lebt“, „nicht tumorbedingt verstorben“ und „tumorbedingt verstorben“) in Abhängigkeit von den Tumorstadien (UICC7).

Die Anzahl von nicht tumorbedingt verstorbenen Patienten (n=61, 14,2% aller operierten Patienten) hat keinen signifikanten Einfluss auf Überlebenszeiten (mediane Überlebenszeit) bzw. Überlebensraten (2-JÜR, 5-JÜR) (Tabelle 33, Tabelle 34).

Tumorstadien UICC7 (alle Patienten)	n (Σ430)	mediane Überlebenszeit (Monate)	2-JÜR (%)	5-JÜR (%)
0	4	93,0	75,0	50,0
IA	91	70,0	76,9	54,9
IB	69	57,0	71,0	46,4
IIA	83	36,0	65,1	34,9
IIB	64	31,0	53,1	29,7
IIIA	84	19,5	47,6	25,0
IIIB	28	11,0	21,4	10,7
IV	7	16,0	28,6	28,6

Tabelle 33: 2-JÜR, 5-JÜR und mediane Überlebenszeiten aller operierten Patienten, getrennt nach Stadien nach UICC7. JÜR= Jahres Überlebensrate.

Tumorstadien UICC7 (lebende und tumorbedingt verstorbene Patienten)	n (Σ369)	mediane Überlebenszeit (Monate)	2-JÜR (%)	5-JÜR (%)
0	4	93,0	75,0	50,0
IA	80	85,0	80,0	60,0
IB	58	57,0	74,1	53,4
IIA	68	34,0	61,8	33,8
IIB	52	28,5	51,9	28,8
IIIA	74	18,5	45,9	27,0
IIIB	27	10,0	22,2	11,1
IV	6	19,5	33,3	33,3

Tabelle 34: 2-JÜR, 5-JÜR und mediane Überlebenszeiten nach Stadieneinteilung nach UICC7. Es sind nur die Patienten, die leben oder tumorbedingt verstorben sind, berücksichtigt. JÜR= Jahres Überlebensrate.

Die Abbildung 13 zeigt, dass die Überlebenszeiten signifikant unterschiedlich und von den Tumorstadien abhängig sind ($p = 4,6 \times 10^{-10}$).

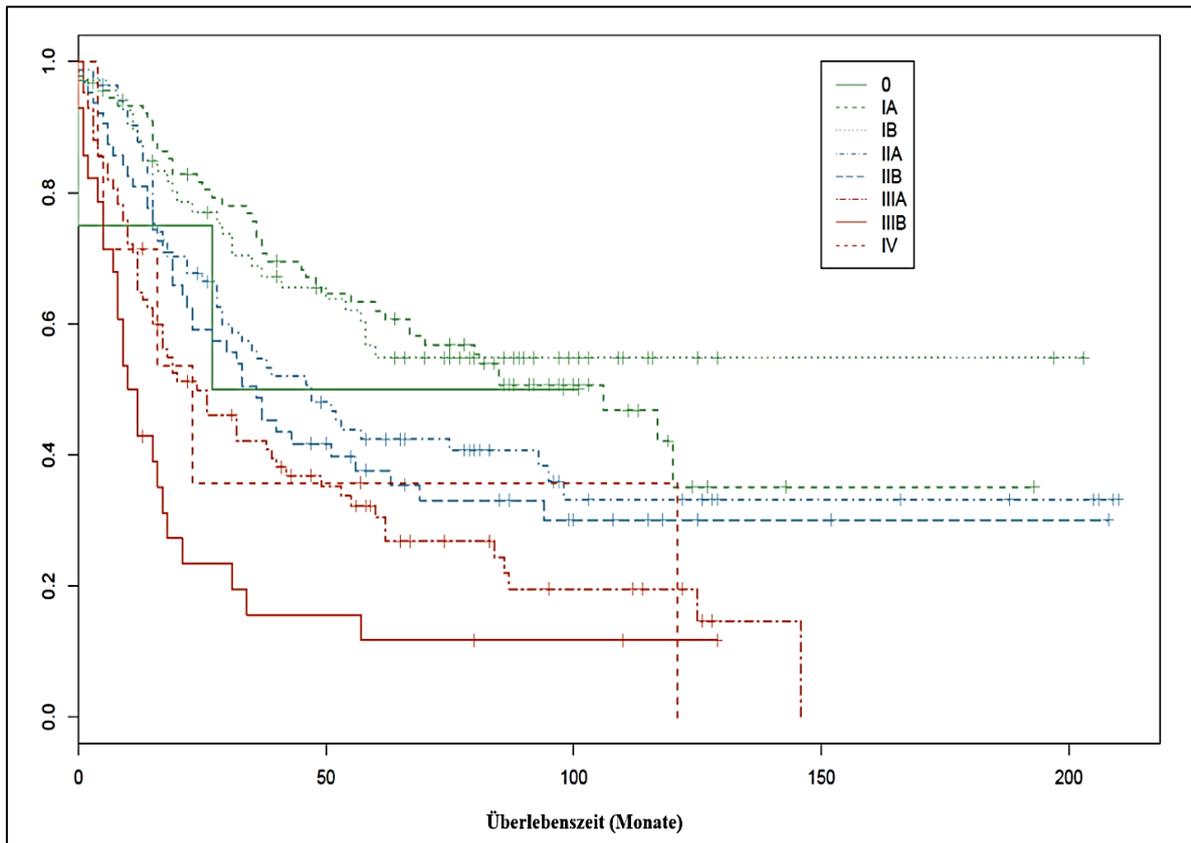


Abbildung 13: Kaplan-Meier Kurven der Überlebenszeiten der Patienten mit Lungenkarzinom. Die Patienten wurden nach UICC7 in Gruppen eingruppiert. Stadium 0, Stadium IA, Stadium IB, Stadium IIA, Stadium IIB, Stadium IIIA, Stadium IIIB, und Stadium IV. Die Unterschiede der Überlebenszeiten sind signifikant ($p = 4,6 \times 10^{-10}$).

6.1.6 Überlebenszeiten in Abhängigkeit von den Tumorstadien (UICC8)

Von 253 tumorbedingten Sterbefällen sind 0,8% im Stadium 0, 1,6% im Stadium IA1, 4,7% im Stadium IA2, 10,7% im Stadium IA3, 6,3% im Stadium IB, 4,4% im Stadium IIA, 25,3% im Stadium IIB, 28,5% im Stadium IIIA, 15,8% im Stadium IIIB, und 1,9% im Stadium IVA. Die Unterschiede zwischen den Tumorstadien sind statistisch hoch signifikant ($p = 5,9 \times 10^{-5}$).

Tumorstadien UICC8 (tumorbedingt verstorbene Patienten)	n ($\Sigma 253$)	MÜZ (Monate)	SD	p
0	2	16,0	49,4	5,9 x 10 ⁻⁵
IA1	4	12,5	17,6	
IA2	12	47,0	26,0	
IA3	27	17,0	28,5	
IB	16	34,0	32,3	
IIA	11	18,5	23,1	
IIB	64	10,0	14,0	
IIIA	72	35,0	17,3	
IIIB	40	7,5	27,4	
IVA	5	13,5	19,1	

Tabelle 35: Tumorstadieneinteilung nach UICC8 mit mittlerer Überlebenszeit der Patienten, die tumorbedingt verstorben sind.

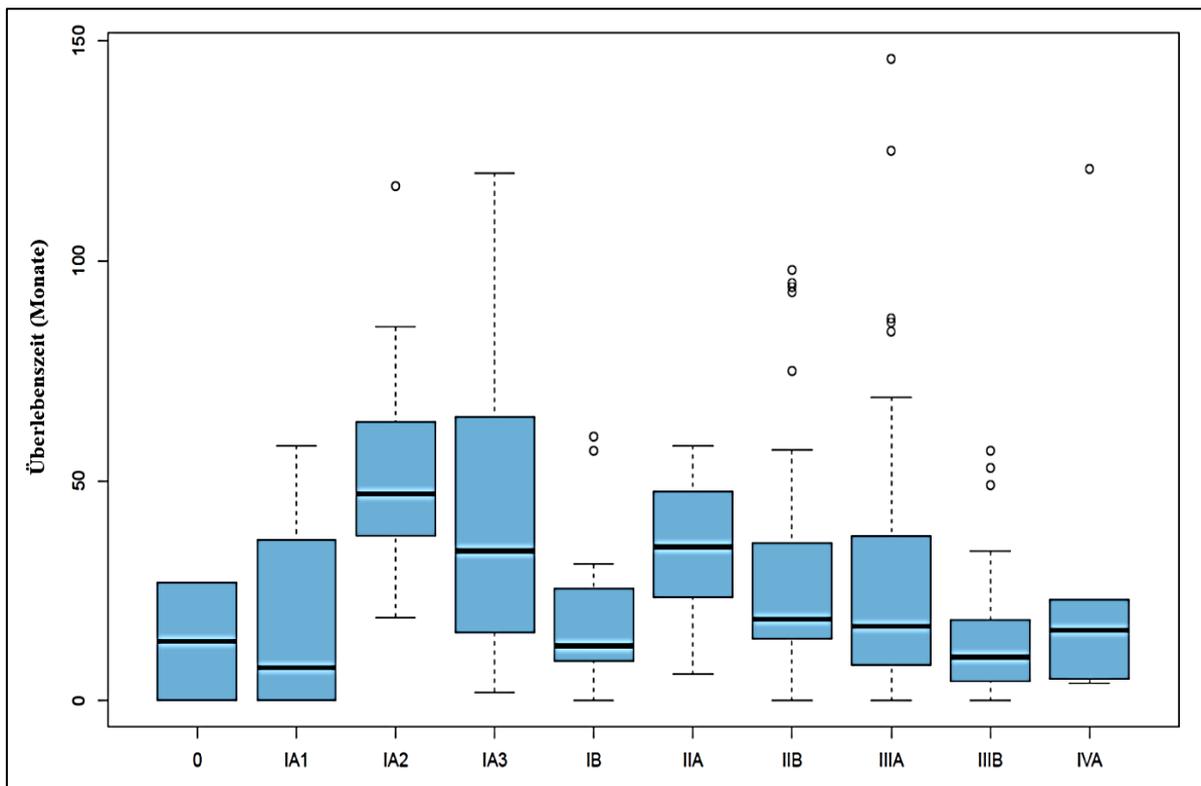


Abbildung 14: Boxplot der Überlebenszeiten der tumorbedingt verstorbenen Patienten in Abhängigkeit vom Tumorstadium (UICC8).

Wie bei der Stadieneinteilung nach UICC7 zeigt sich auch bei der Einteilung nach UICC8, dass es in den höheren Tumorstadien mehr tumorbedingte Todesfälle gibt (Tabelle 35, Tabelle 36, Abbildung 14). Entsprechend ist die mittlere Überlebenszeit und sind Kurz- und Langzeitüberleben (2-JÜR, 5-JÜR) bei Patienten mit früheren Tumorstadien länger als bei Patienten mit höheren Tumorstadien (Tabelle 37, Tabelle 38). Man sieht auch (wie bei der UICC7-Einteilung), dass Patienten, die tumorbedingt sterben, dann, wenn sie sich in einem früheren Tumorstadium befinden, längere Überlebenszeiten haben als die Patienten, die ein höheres Tumorstadium hatten und tumorbedingt verstorben sind.

Tumorstadien UICC8	Lebt		nicht tumorbedingt verstorben		tumorbedingt verstorben	
	n	%	n	%	n	%
0 (Σ4)	2	50,0	0	0,0	2	50,0
IA1 (Σ10)	6	60,0	0	0,0	4	40,0
IA2 (Σ26)	12	46,2	2	7,7	12	46,2
IA3 (Σ55)	19	34,5	9	16,4	27	49,1
IB (Σ43)	19	44,2	8	18,6	16	37,2
IIA (Σ26)	11	42,3	4	15,4	11	42,3
IIB (Σ104)	21	20,2	19	18,3	64	61,5
IIIA (Σ109)	20	18,3	17	15,6	72	66,1
IIIB (Σ46)	5	10,9	1	2,2	40	87,0
IVA (Σ7)	1	14,3	1	14,3	5	71,4

Tabelle 36: Aktueller Status der Patienten („lebt“, „nicht tumorbedingt verstorben“ und „tumorbedingt verstorben“) in Abhängigkeit von den Tumorstadien (UICC8).

Tabelle 36 zeigt den aktuellen Status („lebt“, „nicht tumorbedingt verstorben“ und „tumorbedingt verstorben“) der Patienten mit Tumoren aller Histologien und eingeteilt in die Stadien 0-IV nach der 8. Auflage der UICC. Während die tumorbedingte Sterblichkeit mit höheren Stadien ansteigt, und die nicht tumorbedingte Sterblichkeit in allen Stadien nahezu gleich ist, sinkt die Anzahl der Überlebenden mit steigendem Tumorstadium. Auf Grund der kleinen Patientenzahl in jeder Gruppe konnten die p-Werte nicht gerechnet werden.

Die Anzahl von nicht tumorbedingt verstorbenen Patienten (n=61, 14,2% aller operierten Patienten) hat keinen signifikanten Einfluss auf Überlebenszeiten (mediane Überlebenszeit) bzw. Überlebensraten (2-JÜR, 5-JÜR) (Tabelle 37, Tabelle 38).

Tumorstadien UICC8 (alle Patienten)	n (Σ430)	mediane Überlebenszeit (Monate)	2-JÜR (%)	5-JÜR (%)
0	4	93,0	75,0	50,0
IA1	10	93,0	70,0	60,0
IA2	26	101,0	88,5	61,5
IA3	55	62,0	76,4	50,9
IB	43	60,0	67,4	51,2
IIA	26	56,0	76,9	42,3
IIB	104	32,0	59,6	30,8
IIIA	109	27,0	53,2	31,2
IIIB	46	11,0	26,1	10,9
IVA	7	16,0	28,6	28,6

Tabelle 37: 2-JÜR, 5-JÜR und mediane Überlebenszeiten aller operierten Patienten in Abhängigkeit von Tumorstadien nach UICC8. JÜR= Jahres Überlebensrate.

Tumorstadien UICC8 (lebende und tumorbedingt verstorbene Patienten)	n (Σ369)	mediane Überlebenszeit (Monate)	2-JÜR (%)	5-JÜR (%)
0	4	93,0	75,0	50,0
IA1	10	93,0	70,0	60,0
IA2	24	117,0	95,8	66,7
IA3	46	75,0	78,3	56,5
IB	35	118,0	65,7	57,1
IIA	22	199,0	86,4	50,0
IIB	85	29,0	56,5	30,6
IIIA	92	26,5	53,3	32,6
IIIB	45	10,0	24,4	11,1
IVA	6	19,5	33,3	33,3

Tabelle 38: 2-JÜR, 5-JÜR und mediane Überlebenszeiten in Abhängigkeit von Tumorstadien nach UICC8. Es sind nur die Patienten, die leben oder tumorbedingt verstorben sind, berücksichtigt. JÜR= Jahres Überlebensrate.

Die Abbildung 15 zeigt, dass die Überlebenszeiten von den Tumorstadien abhängig sind, Sie nehmen zu, wenn das Tumorstadium abnimmt ($p = 6,8 \times 10^{-10}$).

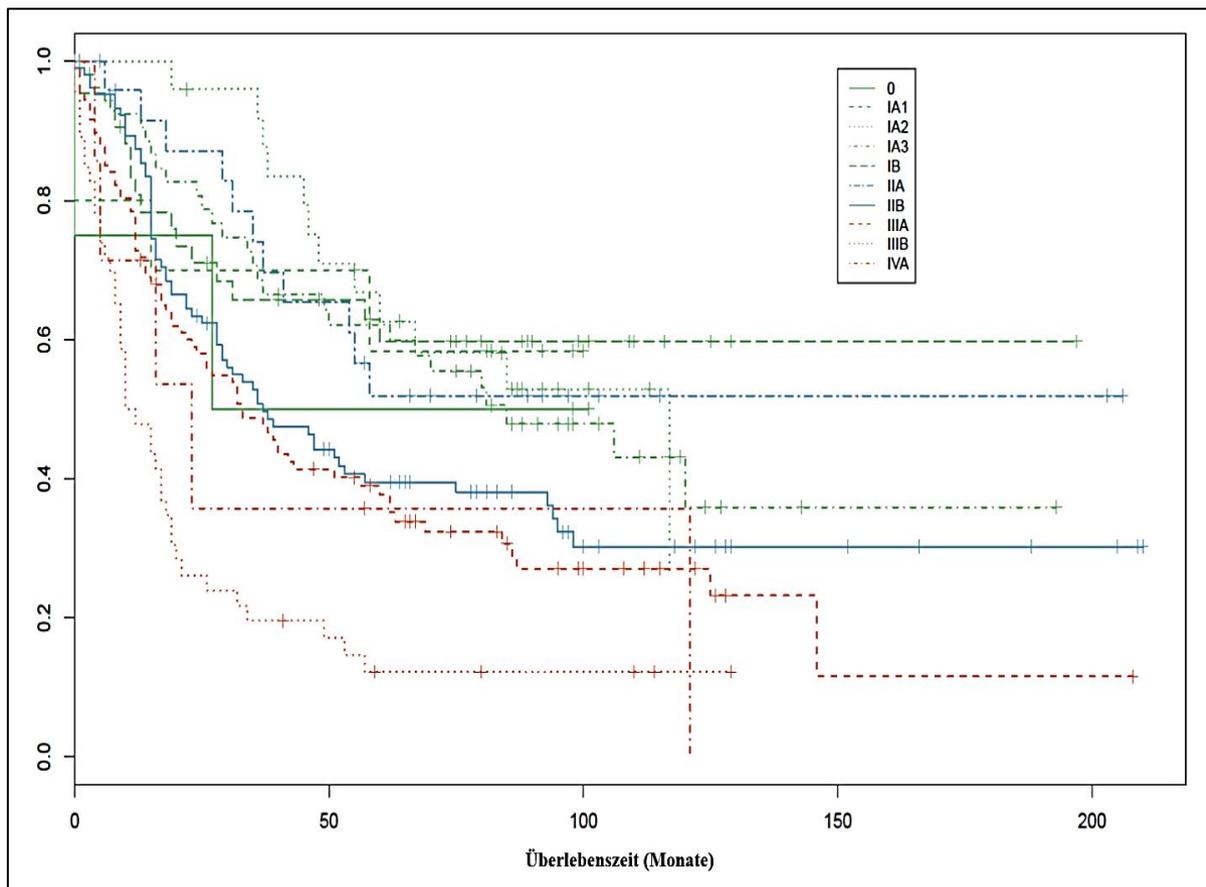


Abbildung 15: Kaplan-Meier Kurven der Überlebenszeit aller operierten Patienten mit Lungenkarzinom. Die Patienten wurden nach UICC8 in Gruppen eingruppiert. Stadium 0, Stadium IA1, Stadium IA2, Stadium IA3, Stadium IB, Stadium IIA, Stadium IIB, Stadium IIIA, Stadium IIIB, und Stadium IVA.

6.1.7 Überlebenszeiten in Abhängigkeit vom Lymphknotenstatus

Von 253 tumorbedingten Sterbefällen haben 130 (51,4%) einen N0-Status, 63 (24,9%) einen N1-Status und 60 (23,7%) einen N2-Status. Die Patienten im N0-Status überlebten länger als die Patienten in N1-, oder N2-Status. Insgesamt hatten die Patienten mit fehlender mediastinaler Lymphknotenerkrankung (N0-1) längere mittlere und mediane Überlebenszeiten. Der Unterschied in den mittleren Überlebenszeiten der Patienten, die tumorbedingt verstorben, ist signifikant ($p < 0,05$) (Tabelle 39).

Lymphknoten-Status (tumorbedingt verstorbene Patienten)	n ($\Sigma 253$)	MÜZ (Monate)	SD	p
N0	130	25	27.9	0.015
N1	63	12	25.2	
N2	60	17	23.3	

Tabelle 39: Verteilung der tumorbedingt verstorbenen Patienten nach Lymphknotenbefall mit mittleren Überlebenszeiten und Standardabweichung (SD).

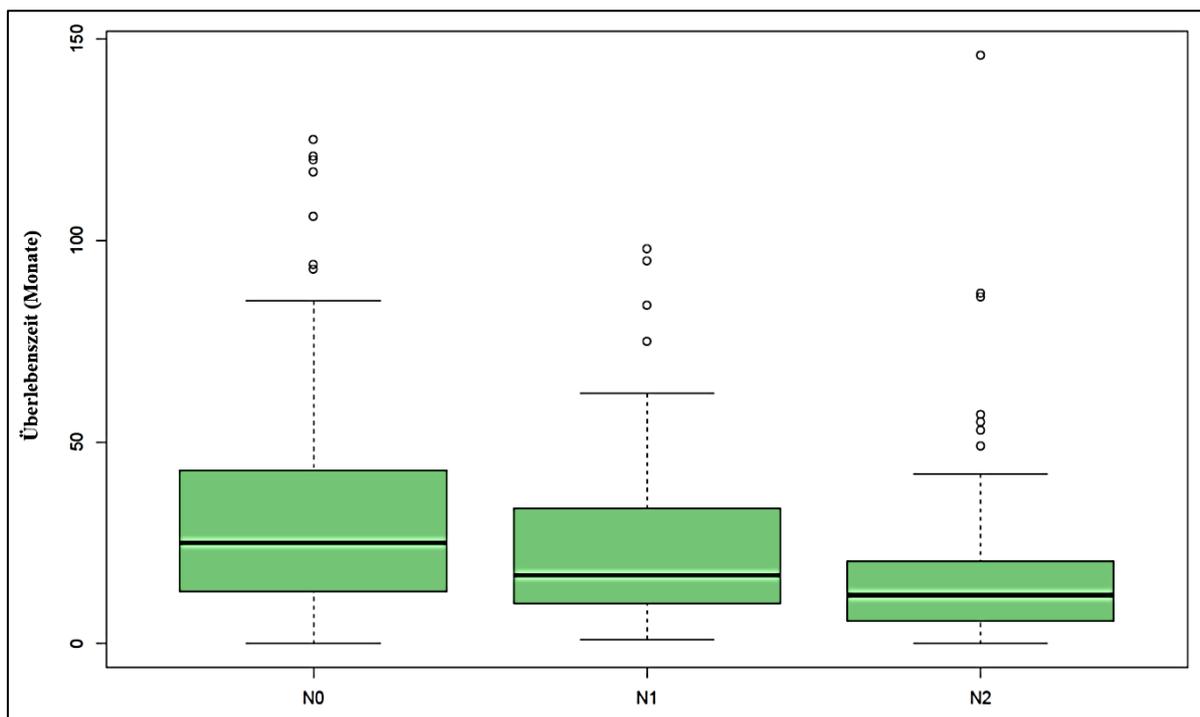


Abbildung 16: Boxplot für die Überlebenszeiten der tumorbedingt verstorbenen Patienten aufgeschlüsselt nach dem Lymphknotenbefall. Die mediane bzw. mittlere Überlebenszeit der N0-Patienten ist signifikant höher als die der N1- und N2-Patienten ($p = 0,015$).

Lymphknoten-Status (alle Patienten)	Lebt		nicht tumorbedingt verstorben		tumorbedingt verstorben	
	n	%	n	%	n	%
N0 ($\Sigma 256$)	89	34,8	37	14,5	130	50,8
N1 ($\Sigma 98$)	20	20,4	15	15,3	63	64,3
N2 ($\Sigma 76$)	7	9,2	9	11,8	60	78,9

Tabelle 40: Aktueller Status der Patienten („lebt“, „nicht tumorbedingt verstorben“ und „tumorbedingt verstorben“) in Abhängigkeit vom Lymphknotenstatus.

Der Tabelle 40 lässt sich entnehmen, dass die meisten operierten Patienten im N0-Status sind, und die tumorbedingte Sterblichkeitsrate bei Patienten mit N2-Lymphknotenbefall am höchsten ist (78,9%), im Vergleich mit Patienten mit N0-, N1-Lymphknotenbefall (50,8%, 64,3%). Dagegen ist die nicht-tumorbedingte Mortalität in den Gruppen N0, N1, N2 ähnlich (14,5% vs. 15,3% vs. 11,8%). Auf Grund der kleinen Patientenzahl in jeder Gruppe können die p-Werte nicht berechnet werden.

Lymphknoten-Status (alle Patienten)	n ($\Sigma 430$)	mediane Überlebenszeit (Monate)	2-JÜR (%)	5-JÜR (%)
N0	256	48,5	68,4	44,5
N1	98	30,0	57,1	33,7
N2	76	16,0	35,5	14,5

Tabelle 41: 2-JÜR, 5-JÜR und mediane Überlebenszeiten aller operierten Patienten, getrennt nach Lymphknotenstatus. JÜR= Jahres Überlebensrate.

Lymphknoten-Status (lebende und tumorbedingt verstorbene Patienten)	n ($\Sigma 369$)	mediane Überlebenszeit (Monate)	2-JÜR (%)	5-JÜR (%)
N0	219	57,0	70,8	48,9
N1	83	28,0	54,2	32,5
N2	67	15,0	31,3	14,9

Tabelle 42: 2-JÜR, 5-JÜR und mediane Überlebenszeiten getrennt nach Lymphknotenstatus. Es sind nur die Patienten, die leben oder tumorbedingt verstorben sind, berücksichtigt. JÜR= Jahres Überlebensrate.

Die Abbildung 17 zeigt, dass die Überlebenszeiten abhängig vom Lymphknotenstatus sind. Dabei hatten die Patienten im N0-Status die längsten Überlebenszeiten und die Patienten mit N2-Status die kürzesten Überlebenszeiten, dazwischen liegen die Patienten mit N1-Status. Der Unterschied ist hoch signifikant ($p = 6,8 \times 10^{-9}$).

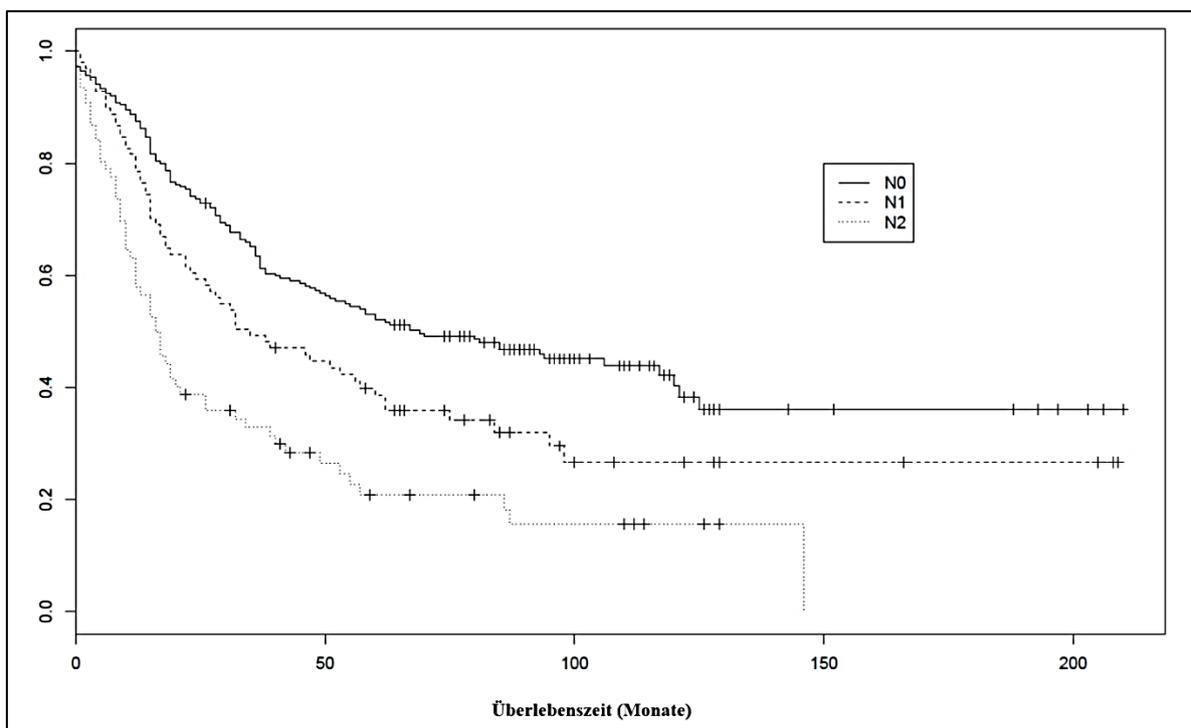


Abbildung 17: Kaplan-Meier Kurven der Überlebenszeit aller operierten Patienten mit Lungenkarzinom. Die Patienten wurden nach LK-Status in Gruppen eingruppiert. N0=kein Lymphknotenbefall, N1=ipsilateraler hilärer oder interlobärer Lymphknotenbefall, N2=ipsilateraler mediastinaler oder subkarinaler Lymphknotenbefall. Der Unterschied ist statistisch hoch signifikant ($p = 6,8 \times 10^{-9}$).

6.1.8 Überlebenszeiten in Abhängigkeit von der Lymphknoten-Subklassifizierung

Neben der Einteilung des Lymphknotenbefalls in N0, N1, und N2 kann man in der Annahme einer prognostischen Wertigkeit die N1-Gruppe in N1a (*i.e.* single level-Befall) und N1b (*i.e.* multilevel-Befall) einteilen. Entsprechend kann man auch die N2-Gruppe in N2a (single level-Befall) und N2b (multilevel-Befall) unterteilen. Ob diese Subklassifizierung von N1 und N2 wirklich prognostische Aussagen zulässt, ist aus mehreren Gründen noch nicht endgültig geklärt.

Von 253 tumorbedingten Sterbefällen sind 130 (51,4%) im N0-Status, 41 (16,2%) im N1a-Status, 22 (8,7%) im N1b-Status, 44 (17,4%) im N2a-Status, und 16 (6,3%) im N2b-Status. Die Patienten im N0-

Status, d.h. ohne Lymphknotenbefall hatten längere Überlebenszeiten als die Patienten mit N1-Erkrankung (N1a und N1b) bzw. N2-Erkrankung (N2a und N2b) (Tabelle 43). Die Unterschiede sind statistisch jedoch nicht signifikant ($p = 0,06$).

Lymphknoten-Status (tumorbedingt verstorbene Patienten)	n ($\Sigma 253$)	MÜZ (Monate)	SD	p
N0	130	25,0	27,8	0.06
N1a	41	9,0	34,8	
N1b	22	18,0	22,2	
N2a	44	14,0	21,2	
N2b	16	14,5	25,6	

Tabelle 43: Verteilung der tumorbedingt verstorbenen Patienten nach Lymphknotensubklassifizierung mit mittleren Überlebenszeiten und Standardabweichung (SD).

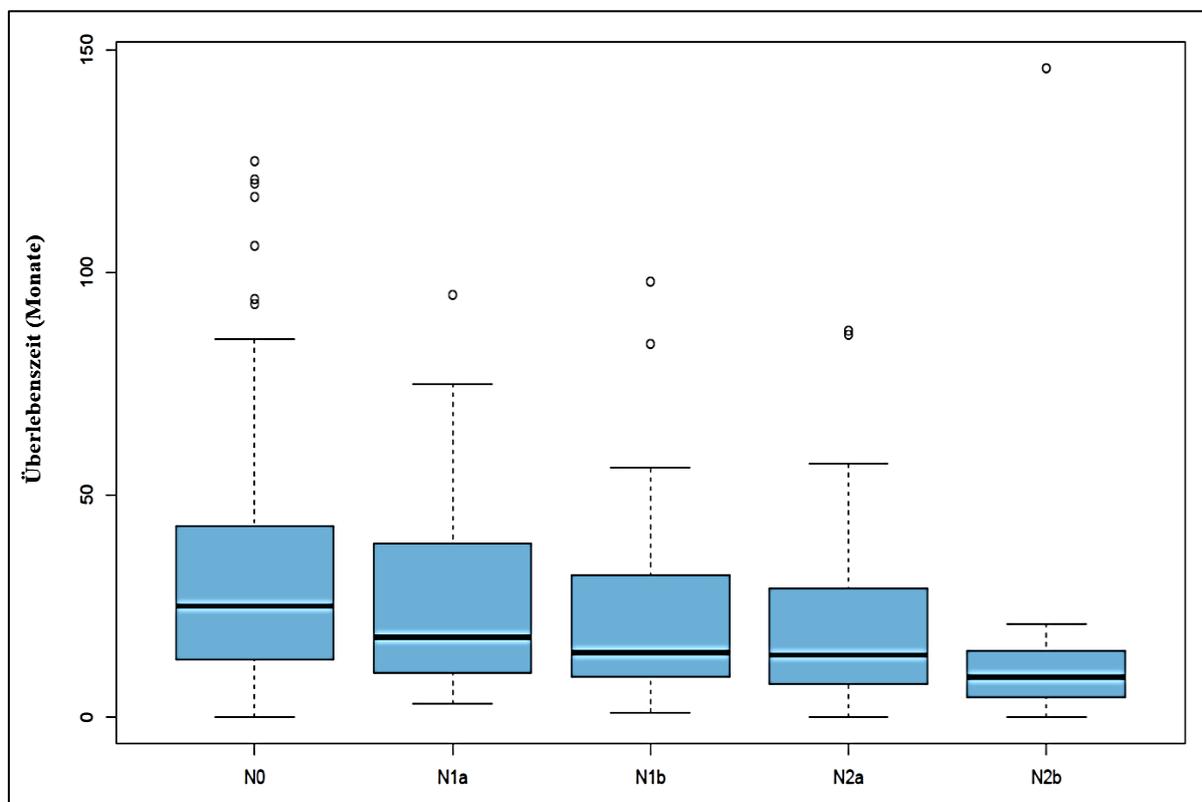


Abbildung 18: Boxplot für die Verteilung der tumorbedingten Sterbefälle in Abhängigkeit von der Lymphknotenklassifizierung.

Abbildung 18 zeigt die Verteilung der tumorbedingt verstorbenen Patienten nach Lymphknotenbefall in N0, N1a single level, N1b multilevel, N2a single level, und N2b multilevel. Die Patienten im N0-Status hatten längere Überlebenszeiten.

Die größte Gruppe der operierten Patienten hatte eine N0-Erkrankung ($n=256$), die wenigsten Patienten eine N1b-Erkrankung ($n=29$). Die tumorabhängige Sterblichkeitsrate steigt mit steigendem Lymphknotenbefall von N0 bis N2. Sie ist ähnlich hoch bei der N2a-Erkrankung (single level N2) und

der N1b-Erkrankung (multilevel N1) (83,0% bzw. 75,9%) (Tabelle 44). Auf Grund der kleinen Patientenzahl in jeder Gruppe ergibt sich kein signifikanter Unterschied.

Lymphknoten-Status	lebt		nicht tumorbedingt verstorben		tumorbedingt verstorben	
	n	%	n	%	n	%
N0(Σ256)	89	34,8	37	14,5	130	50,8
N1a(Σ69)	17	24,6	11	15,9	41	59,4
N1b(Σ29)	3	10,3	4	13,8	22	75,9
N2a(Σ53)	3	5,7	6	11,3	44	83,0
N2b(Σ23)	4	17,4	3	13,0	16	69,6

Tabelle 44: Aktueller Status der Patienten („lebt“, „nicht tumorbedingt verstorben“ und „tumorbedingt verstorben“) in Abhängigkeit von der Lymphknotensubklassifizierung. LK= Lymphknotenstatus.

Die Anzahl nicht tumorbedingt verstorbener Patienten (n=61, 14,2% aller operierten Patienten) hat keinen signifikanten Einfluss auf Überlebenszeiten (mediane Überlebenszeit) bzw. Überlebensraten (2-JÜR, 5-JÜR) (Tabelle 45, Tabelle 46). Die medianen Überlebenszeiten nehmen ab, wenn der Lymphknotenbefall von N0 bis N2b steigt. Der Unterschied ist statistisch signifikant $p < 0,05$.

Lymphknoten-Status (alle Patienten)	n (Σ430)	mediane Überlebenszeit (Monate)	2-JÜR (%)	5-JÜR (%)
N0	256	48,5	68,4	44,5
N1a	69	35,0	60,9	39,1
N1b	29	23,0	48,3	20,7
N2a	53	17,0	41,5	11,3
N2b	23	13,0	21,7	21,7

Tabelle 45: 2-JÜR, 5-JÜR und mediane Überlebenszeiten aller operierten Patienten, getrennt nach Lymphknotensubklassifizierung. JÜR= Jahres Überlebensrate.

Lymphknoten-Status (lebende und tumorbedingt verstorbene Patienten)	n (Σ369)	mediane Überlebenszeit (Monate)	2-JÜR (%)	5-JÜR (%)
N0	219	57	70,8	48,9
N1a	58	35	58,6	37,9
N1b	25	25	44,0	20,0
N2a	47	16	34,0	10,6
N2b	20	12	25,0	25,0

Tabelle 46: 2-JÜR, 5-JÜR und mediane Überlebenszeiten bezüglich der Lymphknotensubklassifizierung. Es sind nur die Patienten, die leben oder tumorbedingt verstorben sind, berücksichtigt. JÜR= Jahres Überlebensrate.

Abbildung 19 zeigt, dass die Überlebenszeiten vom Lymphknotenstatus abhängig sind. Sie nehmen von N0 nach N2b ab. Die Unterschiede sind signifikant ($p = 1,4 \times 10^{-8}$).

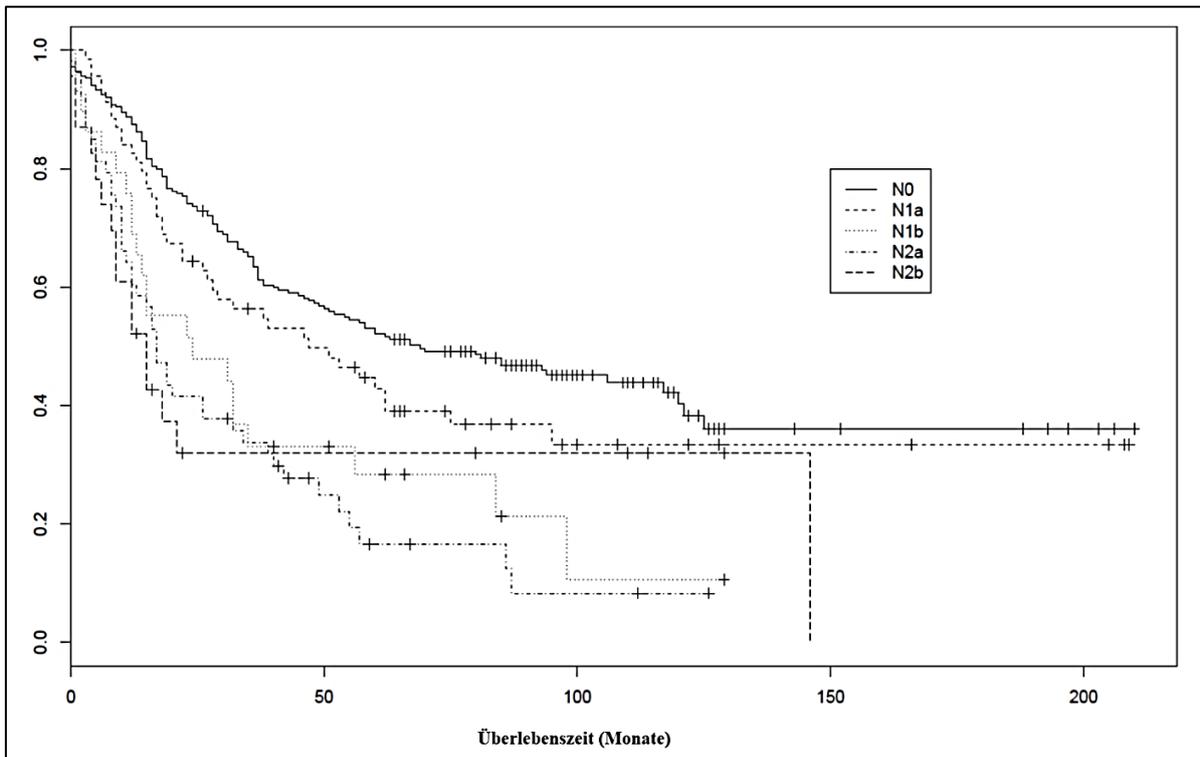


Abbildung 19: Kaplan-Meier Kurven der Überlebenszeiten aller operierten Patienten mit Lungenkarzinom. Die Patienten wurden nach N-Subklassifizierung in Gruppen eingruppiert. N0= kein Lymphknotenbefall, N1a= single level N1, N1b= multilevel N1, N2a= single level N2, und N2b= multilevel N2.

In der Abbildung 20 sieht man, dass die Überlebenszeiten in der N1a Gruppe länger als in N1b Gruppe sind. Die Unterschiede sind statistisch jedoch eben nicht signifikant ($p = 0,06$).

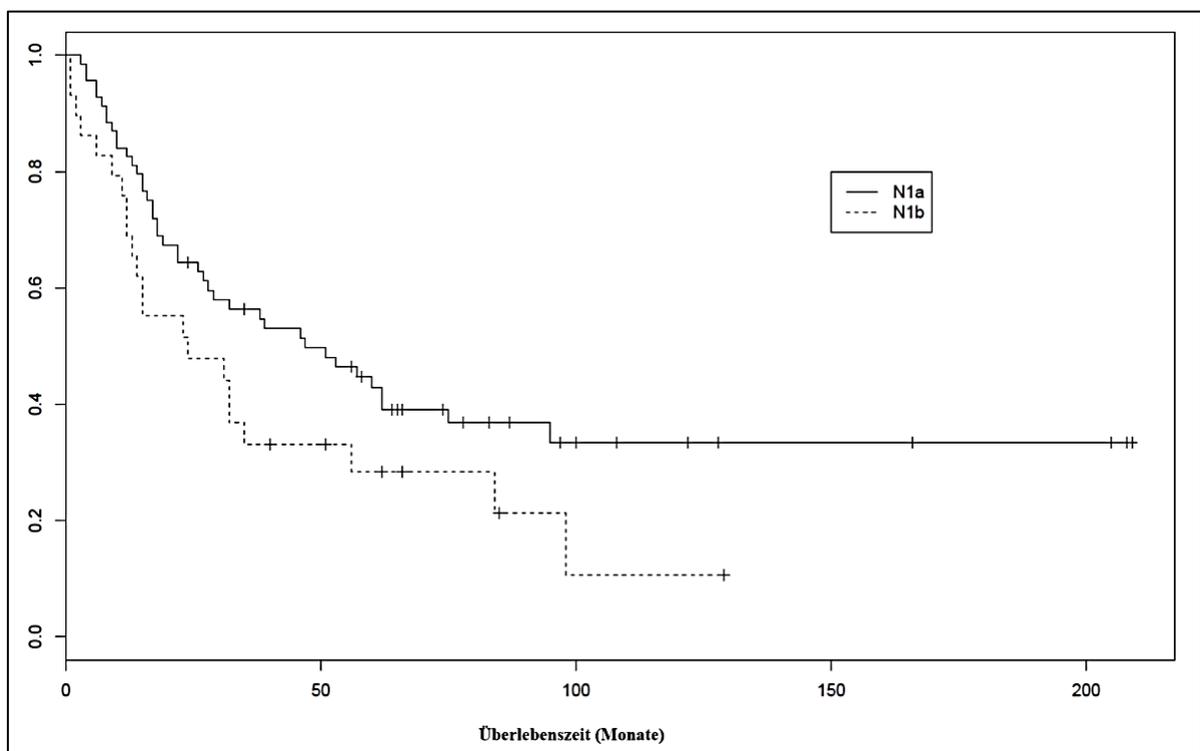


Abbildung 20: Kaplan-Meier Kurven der Überlebenszeiten der operierten Patienten mit Lungenkarzinom. Die Patienten wurden nach N-Subklassifizierung in Gruppen eingeteilt. N1a= single level N1, N1b= multilevel N1. Der Unterschied ist nicht signifikant ($p = 0,06$).

In der Abbildung 21 sieht man, dass es keinen Unterschied in den Überlebenszeiten zwischen multilevel N1 (N1b) Gruppe und single level N2 (N2a) Gruppe gibt ($p = 0,44$).

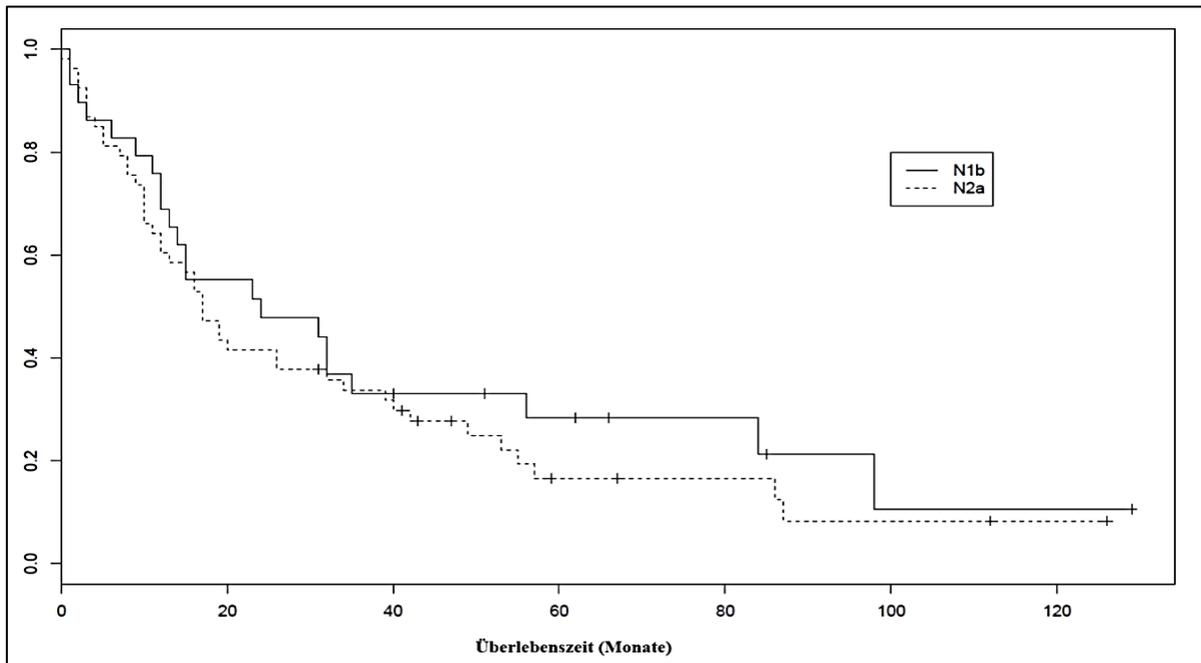


Abbildung 21: Kaplan-Meier Kurven der Überlebenszeiten der operierten Patienten mit Lungenkarzinom. Die Patienten wurden nach der N-Subklassifizierung in Gruppen eingeteilt. N1b= multilevel N1, N2a= single level N2. Der Unterschied ist statistisch nicht signifikant $p > 0,05$.

In der Abbildung 22 sieht man keine deutliche Differenz bezüglich der Überlebenszeiten zwischen der single level N2 Gruppe (N2a) und der multilevel N2 Gruppe (N2b) ($p = 0,62$). Allerdings ist die Anzahl der Patienten in N2b klein ($n=23$).

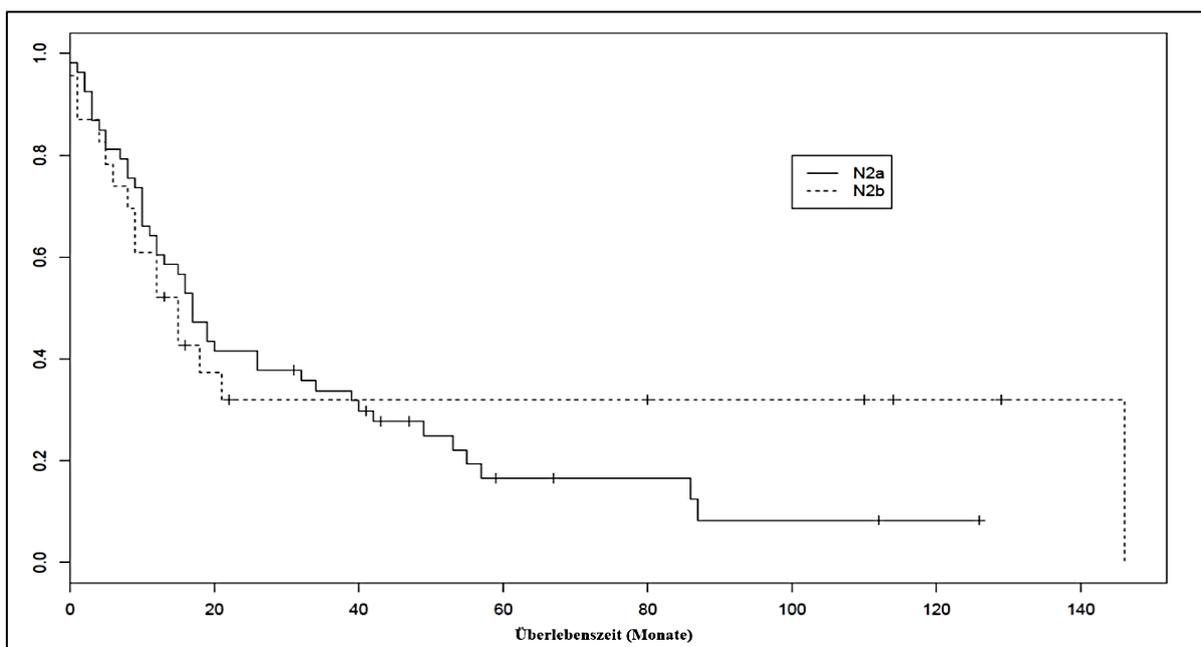


Abbildung 22: Kaplan-Meier Kurven der Überlebenszeiten der operierten Patienten mit Lungenkarzinom. Die Patienten wurden nach N-Subklassifizierung in Gruppen eingruppiert. N2a= single level N2, und N2b= multilevel N2. Der Unterschied ist nicht signifikant $p > 0,05$.

Die von der IASLC propagierte neue Einteilung der Lymphknotenbeteiligung beim Lungenkarzinom ist wahrscheinlich prognostisch relevant. Man sieht z.B. Unterschiede i.d. Überlebenszeiten zwischen N1a und N1b und keine Unterschiede zwischen N1b und N2a. Die Unterschiede sind in der Kaplan-Meier Analyse signifikant, obwohl die Patientenzahlen nicht groß sind.

6.2 Microarray-Ergebnisse

Die miRNA-Expression wurde im Plasma von Patienten (n=37) mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom untersucht. Zwei Gruppen von Patienten wurden gebildet, die erste Gruppe mit langzeitüberlebenden Patienten nach thoraxchirurgischem Eingriff (long time survivors, LTS, n=17) und die zweite Gruppe mit frühverstorbenen Patienten nach thoraxchirurgischem Eingriff (short time survivors, STS, n=20). Es wurden 2549 miRNAs mit Hilfe von SurePrint G3 miRNA Microarray von Agilent analysiert. Dabei zeigten sich Unterschiede der miRNA-Expression zwischen den beiden Gruppen. In der Abbildung 23 ist die Heatmap für 50 miRNAs dargestellt. Insgesamt zeigen sich 52 miRNAs (von 2549, d.h. 2,0%) als signifikant different exprimiert ($p < 0,05$).

Von diesen sind in der STS-Gruppe 26 miRNAs überexprimiert und 26 miRNAs unterexprimiert (Tabelle 47). Bei drei miRNAs ist der Fold Change (FC) $> 1,5$, davon eine miRNA in der STS-Gruppe überexprimiert und zwei miRNAs in der STS-Gruppe unterexprimiert. Bei 49 miRNAs ist der FC $< 1,5$, davon 25 miRNAs in der STS-Gruppe überexprimiert und 24 miRNAs in der STS-Gruppe unterexprimiert.

Die Area under the curve (AUC) ist die Fläche unter der Receiver-Operating-Characteristic-Kurve (Henn *et al.*). Sie beurteilt, ob eine miRNA die beiden Vergleichsgruppen unterscheiden kann, d.h. als Biomarker geeignet ist. Die AUC hat Werte zwischen Null und Eins. Die Werte in der Nähe von Null oder Eins sind die besten Werte. Sie zeigen, dass die Expression der miRNA in einer Gruppe im Vergleich zu der anderen Gruppe signifikant unterschiedlich ist. In der Tabelle 47 sind es die AUC-Werte größer 0,7 (die miRNA in der STS-Gruppe ist signifikant überexprimiert) oder kleiner 0,3 (die miRNA in der STS-Gruppe ist signifikant unterexprimiert). Beide Konstellationen lassen eine Aussage zur Prognose zu.

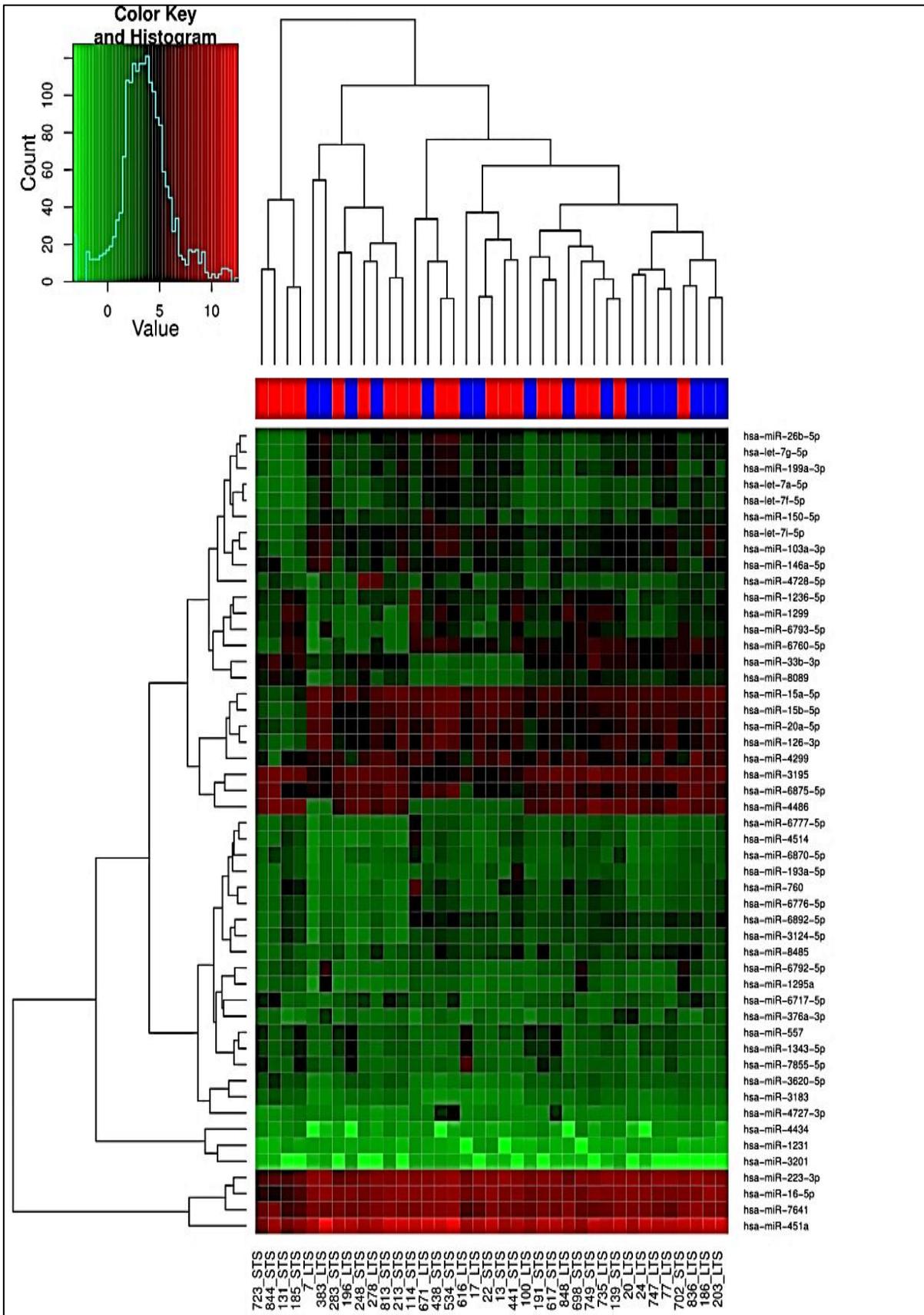


Abbildung 23: Clusterheatmap für 50 miRNAs, die mittels Microarray analysiert wurden und Expressionsunterschiede zwischen LTS-Gruppe und STS-Gruppe ($n=17$ vs. $n=20$) zeigen. In Grün sind die vermindert exprimierten miRNAs und in Rot die vermehrt exprimierten miRNAs dargestellt. STS steht für short time survivors (hellrot dargestellt), und LTS steht für long time survivors (blau dargestellt).

miRNA	Mittelwert LTS	Mittelwert STS	Fold Change	Expression	p-Wert	AUC
hsa-miR-6870-5p	10,60	16,41	1,55	Über	0,0098	0,73
hsa-miR-4646-5p	22,60	32,72	1,45	Über	0,0192	0,68
hsa-miR-3652	63,35	85,60	1,35	Über	0,0127	0,74
hsa-miR-3147	8,65	11,53	1,33	Über	0,0076	0,74
hsa-miR-6809-5p	39,26	51,92	1,32	Über	0,0499	0,69
hsa-miR-4721	32,05	41,61	1,30	Über	0,0406	0,69
hsa-miR-4689	21,98	27,97	1,27	Über	0,0487	0,64
hsa-miR-188-5p	46,36	57,96	1,25	Über	0,0403	0,66
hsa-miR-1587	22,03	27,19	1,23	Über	0,0408	0,68
hsa-miR-6745	10,18	12,53	1,23	Über	0,015	0,73
hsa-miR-3198	18,64	22,89	1,23	Über	0,0441	0,68
hsa-miR-765	60,42	73,98	1,22	Über	0,0487	0,69
hsa-miR-7851-3p	8,18	10,00	1,22	Über	0,0297	0,72
hsa-miR-371a-5p	13,95	16,89	1,21	Über	0,0473	0,67
hsa-miR-6133	10,42	12,60	1,21	Über	0,021	0,72
hsa-miR-4419a	22,64	27,10	1,20	Über	0,0275	0,65
hsa-miR-6791-5p	96,98	113,81	1,17	Über	0,047	0,69
hsa-miR-4667-5p	14,06	16,45	1,17	Über	0,0352	0,72
hsa-miR-6788-5p	8,15	9,50	1,17	Über	0,0253	0,73
hsa-miR-1273e	15,51	18,04	1,16	Über	0,0465	0,67
hsa-miR-6769b-5p	314,17	363,24	1,16	Über	0,0423	0,74
hsa-miR-345-3p	20,25	23,36	1,15	Über	0,0431	0,66
hsa-miR-2861	1272,75	1467,35	1,15	Über	0,0281	0,72
hsa-miR-6125	1625,61	1872,50	1,15	Über	0,0138	0,71
hsa-miR-378i	8,79	9,96	1,13	Über	0,03	0,72
hsa-miR-4690-5p	7,84	8,66	1,10	Über	0,0282	0,71
hsa-miR-6870-3p	10,40	9,54	1,09	Unter	0,0287	0,27
hsa-miR-4436b-5p	12,37	11,04	1,12	Unter	0,0289	0,30
hsa-miR-6824-3p	13,24	11,69	1,13	Unter	0,0374	0,29
hsa-miR-6851-3p	11,79	10,37	1,14	Unter	0,0378	0,30
hsa-miR-4741	376,13	329,65	1,14	Unter	0,0447	0,33
hsa-miR-3646	13,32	11,58	1,15	Unter	0,0048	0,21
hsa-miR-29b-3p	18,49	15,87	1,16	Unter	0,0499	0,30
hsa-miR-4758-3p	14,11	11,99	1,18	Unter	0,022	0,31
hsa-miR-425-3p	14,70	12,46	1,18	Unter	0,0346	0,31
hsa-miR-6872-3p	17,67	14,90	1,19	Unter	0,0315	0,34
hsa-miR-7975	1531,75	1262,68	1,21	Unter	0,0404	0,32
hsa-miR-7977	594,56	489,99	1,21	Unter	0,0433	0,30
hsa-miR-6515-3p	19,43	15,99	1,22	Unter	0,0485	0,32
hsa-let-7b-5p	57,16	46,47	1,23	Unter	0,0493	0,33
hsa-miR-6069	21,19	17,08	1,24	Unter	0,0363	0,30
hsa-miR-1304-3p	15,20	12,17	1,25	Unter	0,0295	0,30
hsa-miR-6889-3p	20,25	15,48	1,31	Unter	0,0248	0,30

hsa-miR-26b-5p	50,10	38,27	1,31	Unter	0,0492	0,29
hsa-miR-1908-3p	61,18	46,70	1,31	Unter	0,0436	0,31
hsa-miR-4767	96,99	72,44	1,34	Unter	0,0058	0,26
hsa-miR-142-3p	116,39	85,94	1,35	Unter	0,0377	0,31
hsa-miR-26a-5p	96,57	70,82	1,36	Unter	0,0461	0,31
hsa-miR-126-3p	122,88	88,44	1,39	Unter	0,0426	0,31
hsa-let-7f-5p	29,32	19,90	1,47	Unter	0,0399	0,30
hsa-miR-574-5p	112,67	69,55	1,62	Unter	0,0178	0,31
hsa-miR-4455	26,73	16,44	1,63	Unter	0,0357	0,31

Tabelle 47: Übersicht über die mittels Microarray untersuchten signifikant unterschiedlich über- und unterexprimierten miRNAs im Plasma von Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom ($p < 0,05$). „Über“ steht für überexprimiert in der STS-Gruppe, „Unter“ steht für unterexprimiert in der STS-Gruppe, und AUC steht für Area under the curve. Die fünf mittels RT-qPCR validierten miRNAs sind in fetter Schrift geschrieben.

6.3 RT-qPCR-Ergebnisse

Die Reverse Transkription – quantitative Echtzeit Polymerasekettenreaktion (RT-qPCR) ist eine zuverlässige Methode zur Überprüfung von Microarray-Expressionsdaten. Zur Validierung der Microarray-Daten wurden in der vorliegenden Studie insgesamt fünf signifikant unterschiedlich exprimierte miRNAs, hsa-miR-142-3p, hsa-miR-26a-5p, hsa-miR-126-3p, hsa-let-7f-5p, und hsa-miR-574-5p ausgewählt. Sie spielen eine Rolle bei verschiedenen Tumorerkrankungen und auch nicht tumorbedingten Krankheiten. Die RT-qPCR wurde wie die Microarrays in Plasma von zwei Patientengruppen, LTS-Gruppe (n=12) und STS-Gruppe (n=14) durchgeführt. In der Gesamtheit zeigen die fünf ausgewählten miRNAs eine signifikant verminderte Expression in der STS-Gruppe ($p \leq 0,01$) und einen Fold Change ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) $> 1,5$ (Tabelle 48). Eine ähnliche Expressionstendenz wurde in den Microarrays gezeigt. Die p-Werte wurden mit dem Student's t-Test ermittelt.

miRNAs	Mittelwert(ΔCt) \pm SD (LTS)	Mittelwert(ΔCt) \pm SD (STS)	$\Delta\Delta Ct$	FC	Expression	p-Wert
Let-7f-5p	-0,18 \pm 0,65	2,45 \pm 0,42	-2,62	6,16	Unter	0,00405
miR-126-3p	-0,07 \pm 0,54	3,01 \pm 0,59	-3,09	8,51	Unter	0,00111
miR-142-3p	3,79 \pm 0,81	6,69 \pm 0,68	-2,90	7,48	Unter	0,01499
miR-26a-5p	-0,40 \pm 0,80	3,06 \pm 0,64	-3,45	10,95	Unter	0,00372
miR-574-5p	1,70 \pm 0,35	3,49 \pm 0,55	-1,79	3,47	Unter	0,01461

Tabelle 48: Übersicht über die Expression der ausgewählten miRNAs in den beiden Patientengruppen (LTS-Gruppe vs. STS-Gruppe). Die fünf mit Hilfe der RT-qPCR validierten miRNAs sind signifikant oder hoch signifikant unterexprimiert in der STS-Gruppe ($p \leq 0,05$) mit einem Fold Change ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) $> 1,5$. Ct steht für threshold cycle. Die ΔCt -Werte werden für die beide Gruppen als Mittelwert \pm SD (Standardabweichung) angegeben. LTS steht für long time survivors, STS steht für short time survivors, FC steht für Fold Change.

6.4 Signalweganalyse-Ergebnisse

Zur Abklärung der Wertigkeit und der biologischen Rolle der mittels RT-qPCR validierten miRNAs wurden zuerst die experimentell validierten Zielgene mittels DIANA-TarBase (TarBase v7.0) bestimmt, dann wurden mittels DIANA-miRPath v.3.0 Software die KEGG-Signalwege analysiert. Für die fünf ausgewählten miRNAs wurden 57 signifikante KEGG-Signalwege identifiziert (p-Wert $<$

0,05, false discovery rate (FDR)) (Tabelle 49). Sie wirken durch verschiedene Mechanismen und können zur Lungenkarzinomentstehung beitragen.

In der Tabelle 49 sieht man, dass die Regulation der KEGG-Signalwege meistens durch die fünf ausgewählten miRNAs (hsa-miR-142-3p, hsa-miR-126-3p, hsa-miR-26a-5p, hsa-let-7f-5p und hsa-miR-574-5p) erfolgt. Darüber hinaus werden acht Signalwege mittels vier miRNAs reguliert.

KEGG-Signalweg	p-Wert	Zielgene	miRNAs
Metabolism / Amino acid metabolism			
Lysine degradation (hsa00310)	1,84.10 ⁻¹⁰	23	4
Metabolism / Glycan biosynthesis and metabolism			
Glycosaminoglycan biosynthesis-keratan sulfate (hsa00533)	1,41.10 ⁻⁰⁵	8	4
Metabolism / Carbohydrate metabolism			
Inositol phosphate metabolism (hsa00562)	0,01933	24	5
Human Diseases / Cancer: overview			
Viral carcinogenesis (hsa05203)	7,56.10 ⁻¹⁰	74	5
Proteoglycans in cancer (hsa05205)	6,60.10 ⁻⁰⁹	80	5
Pathways in cancer (hsa05200)	0,00034	128	5
Central carbon metabolism in cancer (hsa05230)	0,00338	26	5
Transcriptional misregulation in cancer (hsa05202)	0,01515	60	5
Human Diseases / Cancer: specific types			
Chronic myeloid leukemia (hsa05220)	3,94.10 ⁻⁰⁶	37	4
Colorectal cancer (hsa05210)	3,94.10 ⁻⁰⁶	31	5
Glioma (hsa05214)	5,91.10 ⁻⁰⁶	30	5
Small cell lung cancer (hsa05222)	2,27.10 ⁻⁰⁵	41	5
Renal cell carcinoma (hsa05211)	5,47.10 ⁻⁰⁵	33	5
Endometrial cancer (hsa05213)	0,00013	25	5
Melanoma (hsa05218)	0,00022	31	4
Pancreatic cancer (hsa05212)	0,00023	30	5
Prostate cancer (hsa05215)	0,00024	40	5
Non-small cell lung cancer (hsa05223)	0,00087	25	4
Thyroid cancer (hsa05216)	0,00249	15	4
Bladder cancer (hsa05219)	0,00934	19	4
Human Diseases / Infectious disease: viral			
Hepatitis B (hsa05161)	3,72.10 ⁻⁰⁵	59	5
HTLV-I infection (hsa05166)	0,00957	86	5
Epstein-Barr virus infection (hsa05169)	0,01718	72	5
Human Diseases / Infectious disease: bacterial			
Bacterial invasion of epithelial cells (hsa05100)	0,00115	31	5
Shigellosis (hsa05131)	0,00934	27	5
Environmental Information Processing / Signal transduction			
Hippo signaling pathway (hsa04390)	0,5328.10 ⁻⁷	60	5
FoxO signaling pathway (hsa04068)	0,9921.10 ⁻⁷	57	5
TGF-beta signaling pathway (hsa04350)	0,00040	35	5
Phosphatidylinositol signaling system (hsa04070)	0,00087	31	5

mTOR signaling pathway (hsa04150)	0,00263	28	4
Wnt signaling pathway (hsa04310)	0,00394	49	5
Sphingolipid signaling pathway (hsa04071)	0,00480	41	5
PI3K-Akt signaling pathway (hsa04151)	0,01371	105	5
AMPK signaling pathway (hsa04152)	0,01711	47	5
HIF-1 signaling pathway (hsa04066)	0,02297	38	5
TNF signaling pathway (hsa04668)	0,02648	41	5
Organismal Systems / Endocrine system			
Thyroid hormone signaling pathway (hsa04919)	4,50.10 ⁻⁰⁷	50	5
Estrogen signaling pathway (hsa04915)	0,00188	34	5
Prolactin signaling pathway (hsa04917)	0,00854	27	5
Insulin signaling pathway (hsa04910)	0,02180	49	5
Progesterone-mediated oocyte maturation (hsa04914)	0,03291	33	5
Organismal Systems / Immune system			
Fc gamma R-mediated phagocytosis (hsa04666)	0,02648	33	5
B cell receptor signaling pathway (hsa04662)	0,04301	26	5
Organismal Systems / Circulatory system			
Adrenergic signaling in cardiomyocytes (hsa04261)	0,00338	46	5
Nervous system / Organismal Systems			
Neurotrophin signaling pathway (hsa04722)	0,03709	42	5
Genetic Information Processing / Folding, sorting and degradation			
Protein processing in endoplasmic reticulum (hsa04141)	4,09.10 ⁻⁰⁶	67	5
Ubiquitin mediated proteolysis (hsa04120)	0,00977	50	5
RNA degradation (hsa03018)	0,01489	31	5
Genetic Information Processing / Translation			
RNA transport (hsa03013)	0,01967	55	5
Cellular Processes / Cellular community - eukaryotes			
Adherens junction (hsa04520)	4,09.10 ⁻⁰⁶	35	5
Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells (hsa04550)	1,10.10 ⁻⁰⁵	55	5
Focal adhesion (hsa04510)	0,01569	69	5
Cellular Processes / Cell growth and death			
Cell cycle (hsa04110)	1,02.10 ⁻⁰⁵	53	5
p53 signaling pathway (hsa04115)	1,16.10 ⁻⁰⁵	36	5
Oocyte meiosis (hsa04114)	3,39.10 ⁻⁰⁵	45	5
Cellular Processes / Cell motility			
Regulation of actin cytoskeleton (hsa04810)	0,01340	67	5
Cellular Processes / Transport and catabolism			
Endocytosis (hsa04144)	0,02990	63	5

Tabelle 49: Übersicht über die signifikanten KEGG-Signalwege und die betroffenen experimentell validierten Zielgene sowie die ausgewählten miRNAs im Plasma der zwei Patientengruppen LTS (n=12) und STS (n=14) mit nicht kleinzelligem Lungenkarzinom. Insgesamt wurden 57 KEGG-Signalwege verifiziert, die von vier oder fünf ausgewählten miRNAs reguliert werden können (p-Wert < 0.05).

Non-small cell lung cancer (hsa05223) ist der wichtigste Signalweg beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom, der unter Human Diseases / Cancer: specific types im KEGG pathway klassifiziert wird. Er

besteht aus anderen Signalwegen wie Ras-Signalweg, p53-Signalweg, ErbB-Signalweg, MAPK-Signalweg, PI3K-AKT-Signalweg und Calcium-Signalweg (*Abbildung 3*). Die Inhibierung oder Aktivierung dieser Signalwege ist ein Ansatz der Therapie des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms.

In diesem Signalweg sind verschiedene Zielgene betroffen und werden von vier miRNAs reguliert: hsa-miR-142-3p, hsa-miR-126-3p, hsa-miR-26a-5p und hsa-let-7f-5p. Die hsa-miR-574-5p spielt keine Rolle in der Regulation des Signalwegs. Jede miRNA reguliert mehrere Zielgene, hsa-miR-142-3p fünf Gene, hsa-miR-126-3p acht Gene, hsa-miR-26a-5p neun Gene und hsa-let-7f-5p 12 Gene (*Tabelle 50*). Die wichtigsten Genveränderungen betreffen hauptsächlich Onkogene wie *KRAS*, *EGFR* und *EML4-ALK* und Tumorsuppressorgene wie *RAR β* , *FHIT*, *RASSF1*, *INK4a/ARF* und *p53* (*Abbildung 3*).

miRNAs	Zielgene
hsa-miR-142-3p	<i>E2F2, PIK3R2, PIK3R5, AKT2, PIK3CD</i>
hsa-miR-126-3p	<i>E2F1, PIK3R2, PIK3CD, E2F3, AKT1, PIK3CA, APK1, RXRA</i>
hsa-miR-26a-5p	<i>NRAS, STK4, EML4, CDK6, ARAF, PIK3R3, E2F3, RB1, SOS1</i>
hsa-let-7f-5p	<i>BRAF, CDK4, NRAS, STK4, KRAS, CDK6, TP53, PLCG1, CCND1, E2F3, RB1, MAPK1</i>

Tabelle 50: Übersicht über die miRNAs und die mitbeteiligten Zielgene in der Regulation des Non-small cell lung cancer Signalwegs im Plasma von Patienten mit nicht kleinzelligem Lungenkarzinom.

Es gibt auch andere Signalwege beim nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom. Sie sind meistens Signalübertragungswege wie FoxO Signalweg (hsa04068), TGF-beta Signalweg (hsa04350), mTOR Signalweg (hsa04150), Wnt Signalweg (hsa04310) und AMPK Signalweg. Die anderen Signalwege in der Tabelle 49 spielen eine untergeordnete Rolle beim Lungenkarzinom.

7 Diskussion

7.1 Klinische Daten

Es werden weltweit jährlich ungefähr 1,8 Millionen neue Lungenkarzinomfälle und 1,6 Millionen Todesfälle durch Lungenkarzinome registriert (Ferlay *et al.*, 2015). Am höchsten ist die Inzidenz bei Männern in Südosteuropa und Westasien und bei Frauen in Nordamerika und Nordeuropa, am geringsten (weniger als ein Fall je 100 000 Einwohner) und unabhängig von den Geschlechtern ist sie in Mittelfrika und Westafrika (WHO, 2016). Die Inzidenz in Deutschland beträgt 83,7 pro 100 000 Männer und 52,9 pro 100 000 Frauen (RKI und GEKID, 2017).

7.1.1 Prognostische Wertigkeit des Geschlechts

Der Mortalitäts-Inzidenz-Index von 0,85 bei Männern und von 0,86 bei Frauen zeigt die schlechte Prognose der Patienten mit Lungenkarzinom. Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt 15% bei Männern und 20% bei Frauen (Ferlay *et al.*, 2015). Die Patienten unserer Studie sind alle potenziell kurativ operiert, befinden sich also in den meisten Fällen in den Tumorstadien I, II, IIIA. Die nicht tumorbedingte Sterblichkeit ist ähnlich bei Männern (15,0%) und Frauen (12,1%). Die 5-Jahresüberlebensraten sind 34,3% bei Männern und 42,7% bei Frauen, die mittlere Überlebenszeiten 30,5% bzw. 41,0% Monate und damit nicht signifikant unterschiedlich.

In der vorliegenden Studie sind 58,2% (n=178 von 306) der Männer und 60,5% (n=75 von 124) der Frauen tumorbedingt verstorben. Es gibt somit keinen Unterschied bezüglich der tumorbedingten postoperativen Sterblichkeit zwischen den beiden Geschlechtern ($p > 0,05$). Dagegen sind die mittleren Überlebenszeiten bei tumorbedingt verstorbenen Frauen im Vergleich zu Männern (35,5 vs. 24,5 Monate) länger ($p = 0,002$).

Mehrere Studien zeigen, dass die Überlebenszeiten bei Frauen nach chirurgischer oder nicht chirurgischer Therapie des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms im Vergleich zu Männern länger sind (Nakamura *et al.*, 2011; Watanabe *et al.*, 2018; Yoshida *et al.*, 2016). Dies lässt sich in der vorliegenden Studie nur über die mittleren Überlebenszeiten der tumorbedingt verstorbenen Frauen sagen.

7.1.2 Prognostische Wertigkeit der Histologie

Das Lungenkarzinom wird aktuell in über 50 Varianten aufgeteilt, die in einem Verhältnis von 1 zu 4 zu den zwei Hauptformen kleinzelliges Lungenkarzinom und nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom gehören (Arriagada *et al.*, 2010). Das nicht-kleinzellige Lungenkarzinom umfasst 80-85% der Fälle und wird weiter in Adenokarzinom (40-50%), Plattenepithelkarzinom (20-30%) und andere Formen wie großzelliges Lungenkarzinom (10-15%), adenosquamöses Lungenkarzinom (2-4%) und sarkomatoides Lungenkarzinom (0,5%) unterteilt (Siegel *et al.*, 2017). Das kleinzellige Lungenkarzinom umfasst 15-20% der Fälle.

In der vorliegenden Studie stellen die Plattenepithelkarzinome mit 45,1% (n=194) die häufigste histologische Form des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms dar. Dies ist sicher dadurch bedingt, dass zwei Drittel der Plattenepithelkarzinome zentral lokalisiert sind und früh diagnostiziert und operiert

werden. Es folgen Adenokarzinome mit 43,3% (n=186) und andere histologischen Subformen mit 9,1% (n=39).

Es gibt keinen signifikanten Unterschied in der tumorbedingten Sterblichkeitsrate bei Patienten mit Plattenepithelkarzinom (n=114, 45.1%) und mit Adenokarzinom (n=108, 42.7%) ($p = 0,25$), d.h. die Histologieformen spielen in unserer Patientenpopulation keine wesentliche Rolle bei der tumorbedingten Sterblichkeit. Es gibt keinen Unterschied in der 5-Jahres Überlebensrate und der medianen Überlebenszeit bei verschiedenen Subformen: Adenokarzinom vs. Plattenepithelkarzinom vs. sonstige Histologie (41,0% vs. 37,4% vs. 42,9% bzw. 40,0 vs. 32,0 vs. 40,0 Monate) ($p = 0,2$) (Abbildung 7, Tabelle 22).

7.1.3 Prognostische Wertigkeit der Resektionsverfahren

Die chirurgische Therapie stellt für die Patienten mit Lungenkarzinom in den frühen Tumorstadien die beste Therapieoption dar (Datta und Lahiri, 2003). Insgesamt sind bei der Erstdiagnose nur etwa 30% der nicht-kleinzelligen Lungenkarzinome und 5% der kleinzelligen Lungenkarzinome in einem resektablen Stadium. In der vorliegenden Studie wurden die Patienten mittels Lobektomie (n=340, 79,1%), Lobektomie mit Bronchusmanschettenresektion (n=54, 12,6%) und Pneumonektomie (n=36, 8,4%) chirurgisch behandelt.

Die tumorbedingte Sterblichkeit beträgt nach Lobektomie 57,1% (n=194 von 340), nach Lobektomie mit Bronchusmanschettenresektion 57,4% (n=31 von 54). Die tumorbedingte Sterblichkeit ist am höchsten nach Pneumonektomie 77,8% (n=28 von 36) ($p < 0,05$). Damit ist die tumorbedingte Sterblichkeit nach Lobektomie und nach Lobektomie mit Manschettenresektion gleich. Die Lobektomie mit Manschettenresektion wurde von Clement Price Thomas (1957) für Tumoren entwickelt, die zentral im Oberlappenbronchus, ggfs. mit Befall der Oberlappencarina, lokalisiert sind. Die Absetzungsränder im Bronchusbereich sind bei diesem Verfahren relativ kurz (Grosse-Brockhoff *et al.*, 1957).

Rein statistisch lässt sich in der vorliegenden Untersuchung somit darstellen, dass die Lobektomie mit Manschettenresektion ein adäquates Resektionsverfahren darstellt.

Infolge der Manschettenresektion wird die Zahl der Pneumonektomien reduziert. Diese erfolgen bei noch zentraleren und größeren Tumoren, so dass ein Will Rogers-Effekt entsteht, der die tumorbedingte Sterblichkeit nach Pneumonektomie zusätzlich erhöht (Park *et al.*, 2010).

Die Pneumonektomie hat von allen resezierenden Lungenoperationen die höchste perioperative Letalität, die je nach Autor zwischen 3,0 und 8,2 % liegt (Alexiou *et al.*, 2001; Margaritora *et al.*, 2013; Pricopi *et al.*, 2015; Qadri *et al.*, 2016).

Darüberhinaus führt sie auch im Langzeitverlauf zu einer größeren funktionellen Beeinträchtigung der Patienten, so dass von manchen Autoren von einem „Postpneumonektomiesyndrom“ gesprochen wird, das von sich aus im weiteren Verlauf zu einer höheren Sterblichkeit führt (Petrella und Spaggiari, 2018; Rakovich *et al.*, 2009).

Dies ist in unserer Patientengruppe nicht nachvollziehbar, denn die tumorunabhängigen postoperativen Sterblichkeiten sind annähernd gleich bei Pneumonektomie, Lobektomie und Lobektomie mit Manschettenresektion, allerdings ist die Anzahl der Pneumonektomien klein (n=36).

Deneffe *et al.* bestätigten, dass die 5-Jahresüberlebensrate nach Pneumonektomie signifikant niedriger ist als die 5-Jahresüberlebensrate nach Lobektomie (13,6% vs. 49,0%) (Deneffe *et al.*, 1988). Andere Studien zeigten, dass die 5-Jahresüberlebensrate nach Bronchusmanschettenresektion höher ist als nach Pneumonektomie (52,0% vs. 31,0%) (Bagan *et al.*, 2005; Deslauriers *et al.*, 2004; Okada *et al.*, 2000; Takeda *et al.*, 2006).

In der vorliegenden Studie sind die 5-Jahresüberlebensraten und mittleren Überlebensraten nach Lobektomie signifikant höher als nach Pneumonektomie. Dies stimmt mit anderen Studien überein. Dies zeigt sich in unserer Patientengruppe einerseits, wenn man nur die Todesursache „tumorbedingt“ als Endpunkt nimmt, andererseits wenn man nach Kaplan Meier eine Zensierung vornimmt.

7.1.4 Prognostische Wertigkeit des R-Status

Die komplette Resektion des Tumors ist als vollständige Resektion des Tumors mit tumorfreien Resektionsrändern definiert und wird als R0 bezeichnet. Persistenz von Tumorgewebe wird als inkomplette Resektion bezeichnet, dabei bedeuten R1 mikroskopische Tumordinfiltration und R2 makroskopische Tumordinfiltration in den Resektionsrändern. In unserem Patientengut erfolgte eine komplette Resektion des Tumors, d.h. R0-Status, in 84,7% (n=364), eine inkomplette Resektion als R1-Status in 8,6% (n=37) und als R2-Status in 2,4% (n=10).

Die tumorbedingte Sterblichkeit war am höchsten bei R2-Status (n= 8 von 10, 80,0%) gefolgt von R1-Status (n= 26 von 37, 70,3%) und R0-Status (n= 204 von 364, 56,0%). Die Unterschiede sind aber statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$). Die 5-Jahres-Überlebensraten sind am höchsten bei R0-Status (41,3%) im Vergleich mit den anderen R-Status ($p < 0,05$). Auch in der Kaplan Meier Kurve zeigt sich ein signifikanter Unterschied der Überlebenszeiten zwischen der Gruppe der Patienten mit R0-Resektion und der Gruppe der Patienten mit R1- und R2-Resektion.

7.1.5 Prognostische Wertigkeit der Tumorstadien (UICC7)

Die Einteilung des Lungenkarzinoms erfolgt weltweit durch die internationale TNM-Klassifizierung (UICC, AJCC). Die 7. Auflage wurde im Jahr 2010 eingeführt. In der vorliegenden Studie sind die Patienten nach dem endgültigen postoperativen pathologischen Befund in die verschiedenen Tumorstadien 0-IV klassifiziert. Die meisten Patienten sind im Stadium IA (n=91, 21,5%). Die wenigsten Patienten sind im Stadium IIIB (n=28, 6,5%) und Stadium IV (n=7, 1,6%). Die tumorbedingte Sterblichkeit war in den Stadien IIIB und IV (85,7% bzw. 71,4%) am höchsten. Die niedrigste tumorbedingte Sterblichkeit der Patienten war im Stadium IA und IB (47,3%, 40,6%). In der vorliegenden Studie sind die postoperativen 5-Jahresüberlebensraten am höchsten im Stadium IA (60,0%). Es gibt Unterschiede in den postoperativen 5-Jahresüberlebensraten zwischen vorliegender Studie und anderen Studien (Tabelle 51).

Tumorstadium (UICC7)	5-Jahresüberlebensrate	
	vorliegende Studie	andere Studien
IA	60,0%	75,0-80,0% (Rami-Porta <i>et al.</i> , 2011)
IB	53,4%	55,0-60,0% (Goldstraw <i>et al.</i> , 2011; Rami-Porta <i>et al.</i> , 2011)
IIA	33,8%	45,0-55,0% (Goldstraw <i>et al.</i> , 2011; Group <i>et al.</i> , 2010)
IIB	28,8%	35,0-45,0% (Goldstraw <i>et al.</i> , 2011; Group <i>et al.</i> , 2010)
IIIA	27,0%	15,0-40,0% (Goldstraw <i>et al.</i> , 2011; Group <i>et al.</i> , 2010)
IIIB	11,1%	5,0-10,0% (Goldstraw <i>et al.</i> , 2011; Group <i>et al.</i> , 2010)

Tabelle 51: Die postoperativen 5-Jahresüberlebensraten in der vorliegenden Studie und anderen Studien.

7.1.6 Prognostische Wertigkeit der Tumorstadien (UICC8)

Die 8. Auflage der TNM-Klassifizierung wurde am 01.01.2017 eingeführt. Die hauptsächlichlichen Änderungen betreffen die Tumorgrößenabstufung und die Unterteilung der Fernmetastasen (Tabelle 3). In der vorliegenden Studie sind die Patienten nach dem endgültigen postoperativen pathologischen Befund in die verschiedenen Tumorstadien 0-IV klassifiziert. Die Tabelle 52 zeigt die tumorbedingte Sterblichkeit in den einzelnen Tumorstadien. Die tumorbedingte Sterblichkeit steigt mit steigendem Tumorstadium.

Die Tumorgrößenabstufung im Stadium IA (UICC8) in der vorliegenden Studie hat einen Einfluss auf die tumorbedingte Sterblichkeit, die tumorbedingte Sterblichkeit steigt von IA1 bis IA3. Die Unterschiede sind jedoch nicht signifikant.

Die Unterschiede zwischen gleichen Tumorstadien der UICC7 und UICC8-Einteilung liegen hauptsächlich in Tumorstadium IIA und in IIIA.

In der UICC7-Einteilung ist das Tumorstadium IIA eine heterogene Gruppe (T1a-b,T2a/N0, T2bN0), die eine Tumorgröße von 2 cm bis 7 cm und einen Lymphknotenbefall von N0 oder N1 enthalten. Im Gegensatz dazu enthält das Tumorstadium IIA in der UICC8 Einteilung eine homogene Gruppe von Patienten (T2bN0), die mit einer Tumorgröße von > 4 cm bis ≤ 5 cm und N0 einhergeht. IIA in UICC7 enthält somit größere Tumoren und im Gegensatz zu IIA in UICC8 auch N1-Befall, so dass eine schlechtere Prognose resultiert.

Das Tumorstadium IIIA (UICC7) ist auch eine heterogene Gruppe (T1a-T1b/N2, T2a-T2b/N2, T3/N1-N2, T4/N0-N1), mit verschiedenen Tumorgrößen (≤ 2 cm bis > 7 cm) und Lymphknotenbefall N0, N1 oder N2. Im Vergleich besteht das Tumorstadium IIIA (UICC8) aus den gleichen Gruppen außer T3N2, die in Tumorstadium IIIB hochgestuft wird. Dies kann für den Unterschied in der tumorbedingten Sterblichkeit verantwortlich sein.

UICC7	tumorbedingte Sterblichkeit 7. Auflage (%)	UICC8	tumorbedingte Sterblichkeit 8. Auflage (%)
IA	47,3	IA1	40,0
		IA2	46,2
		IA3	49,1
IB	40,6	IB	37,2

IIA	59,0	IIA	42,3
IIB	62,5	IIB	61,5
IIIA	73,8	IIIA	66,1
IIIB	85,7	IIIB	87,0
IV	71,4	IVA	71,4
		IVB	0,0

Table 52: Übersicht über die tumorbedingten Sterblichkeitsraten in den verschiedenen Stadien nach UICC7 und UICC8.

Die Tabelle 53 zeigt die 5-Jahresüberlebensraten der Patienten in der vorliegenden Studie im Vergleich zu Patienten der IASLC.

Tumorstadium 8. Auflage	5-Jahresüberlebensraten vorliegende Studie	5-Jahresüberlebensraten IASLC
IA1	60,0%	90,0%
IA2	66,7%	85,0%
IA3	56,5%	80,0%
IB	57,1%	73,0%
IIA	50,0%	65,0%
IIB	30,6%	56,0%
IIIA	32,6%	41,0%
IIIB	11,1%	24,0%

Table 53: Übersicht über die 5-Jahresüberlebensraten der Patienten in verschiedenen Tumorstadien nach UICC8 in der vorliegenden Studie und im IASLC-Projekt (Goldstraw et al., 2016).

7.1.7 Prognostische Wertigkeit des Lymphknotenstatus

In der TNM-Klassifizierung wird der Lymphknotenbefall in vier Kategorien eingeteilt: N0, N1, N2 und N3. In der vorliegenden Studie sind die meisten Patienten im N0-Status (n=256, 59,5%) gefolgt vom N1-Status (n=98, 22,8%) und N2-Status (n=76, 17,7%). Die tumorbedingte Sterblichkeit bei Patienten mit N0-Status ist 50,8% (n=130 von 256), bei N1-Status 64,3% (n=63 von 98) und bei N2-Status 78,9% (n=60 von 76), d.h. N0-Status hat die beste Prognose gefolgt von N1-Status und N2-Status. Die Überlebenszeiten zeigen sich i.d. Kaplan-Meier Kurven signifikant unterschiedlich zwischen N0, N1 und N2 ($p < 0,001$). Im Vergleich mit der Studie von Rusch *et al.* sind die 5-Jahresüberlebensraten in unserem Patientengut im N0-Status 48,9% vs. 56,0%, im N1-Status 32,5% vs. 38,0% und im N2-Status 14,9% vs. 22,0% (Rusch *et al.*, 2007). Dazu sind die medianen Überlebenszeiten im N0-Status (57,0 vs. 77,0 Monate), N1-Status (28,0 vs. 34,0 Monate) und N2-Status (15,0 vs. 21,0 Monate).

In der vorliegenden Studie sind die Lymphknoten nach Mountain-Dresler klassifiziert, d.h. in Bezug auf den Lymphknotenstatus zeigen unsere Gruppen Homogenität.

Rusch *et al.* zeigten, dass die Patienten mit N1- und N2-Metastasierung unterschiedliche Überlebenszeiten in Abhängigkeit von der Zahl der befallenen Lymphknotenstationen innerhalb der N1- bzw. der N2-Region (single level oder multilevel) haben. Sie präsentierten ein neues System zur Revision des

N-Faktors, in dem der N1-Status in single level N1 (N1a) und multilevel N1 (N1b) und der N2-Status in single level N2 (N2a) und multilevel N2 (N2b) subklassifiziert werden (Rusch *et al.*, 2007).

In die vorliegende Studie sind 256 Patienten mit N0-Status (59,5%), 69 Patienten mit N1a (16,0%), 29 Patienten mit N1b (6,8%), 53 Patienten mit N2a (12,3%) und 23 Patienten mit N2b (5,4%) eingeschlossen. Die tumorbedingte Sterblichkeit ist am geringsten im N0-Status (n=130 von 256, 50,8%) gefolgt von N1a (n=41 von 69, 59,4%), N1b (n=22 von 29, 75,9%), N2a (n=44 von 53, 8%) und N2b (n=16 von 23, 69,6%). Im Vergleich mit den Gruppen von Rusch sind die 5-Jahresüberlebensraten in unserem Patientengut in N1a-Status (37,9% vs. 48,0%), N1b-Status (20,0% vs. 35,0%), N2a-Status (10,6% vs. 34,0%) und N2b-Status (25,0% vs. 20,0%). Darüber hinaus sind die medianen Überlebenszeiten im N0-Status 57,0 vs. 77,0 Monate, im N1a-Status 35,0 vs. 52,0 Monate, im N1b-Status 25,0 vs. 31,0 Monate, im N2a-Status 16,0 vs. 35,0 Monate und im N2b-Status 12,0 vs. 19,0 Monate.

In unserem Patientengut sind die Überlebenszeiten vom Lymphknotenstatus abhängig, Sie nehmen von N0 nach N2b ab. Die Unterschiede sind signifikant ($p = 1,4 \times 10^{-8}$) (Abbildung 19). Die Überlebenszeiten sind in der N1a Gruppe länger als in N1b Gruppe, jedoch statistisch nicht signifikant ($p = 0,06$). Dies liegt an der kleinen Gruppengröße (Abbildung 20). Die Unterschiede zwischen den Überlebenszeiten der Patienten mit N1b und N2a sind nicht signifikant, d.h. eine N1-multilevel-Erkrankung entspricht prognostisch einer N2 single level-Erkrankung. In der Pilotstudie von Rusch *et al.* sind die Überlebenszeiten von Patienten mit N1a vs. N1b statistisch signifikant unterschiedlich ($p < 0,009$), jedoch nicht signifikant verschieden zwischen N1b und N2a ($p = 0,7$) und hoch signifikant verschieden zwischen N2a und N2b ($p = 0,0001$) (Rusch *et al.*, 2007).

Von der Tendenz her bestätigt die vorliegende Untersuchung trotz der kleinen Patientenzahl den Sinn einer Subklassifizierung von N1 und N2, wie sie von der IASLC vorgeschlagen wurde und wahrscheinlich in der nächsten (9.) Auflage der TNM-Klassifizierung der UICC/AJCC verwirklicht werden wird.

7.2 MiRNA

Die statistische Datenanalyse zeigt in der vorliegenden Studie, dass die Patienten in frühen Tumorstadien im Vergleich zu Patienten in fortgeschrittenen Tumorstadien postoperativ länger überleben. Dies entspricht den meisten anderen Studien und insbesondere den statistischen Analysen der IASLC (Goldstraw *et al.*, 2016) und schlägt sich in der TNM-Klassifizierung der UICC (Union for International Cancer Control, vormals Union Internationale Contre le Cancer) nieder.

Im Gegensatz zu diesen statistischen Daten fanden sich jedoch auch Patienten mit frühem (günstigem) Tumorstadium, bei denen innerhalb des ersten oder zweiten postoperativen Jahres Metastasen auftraten und wiederum andere Patienten mit fortgeschrittenem Tumorstadium, die eine lange postoperative Überlebenszeit hatten.

Kürzeres Überleben bei niedrigem Tumorstadium wird durch die Biologie des Tumors und eine Mikrometastasierung erklärt. Diese Patienten sollten postoperativ eine adjuvante Chemotherapie erhalten. Mit den heutigen Methoden kann man sie jedoch nicht identifizieren.

Langes Überleben trotz hohem Tumorstadium versucht man durch ein weniger aggressives biologisches Verhalten des Tumors zu erklären. Auch diese Gruppe der Patienten kann man nicht identifizieren. Die Patienten erhalten auf Grund des hohen Tumorstadiums eine adjuvante Chemotherapie.

Der Metastasierungsprozess verläuft in fünf Schritten. Zuerst lösen sich die Tumorzellen vom primären Tumor und wandern durch die Basalmembran in das Blut (Intravasation), dann verteilen sie sich im Blut (Dissemination). In den Blutgefäßen bleiben sie meist in Gabelungen hängen und wandern in das Interstitium (Extravasation). Hier können sie zunächst in einem Proliferationsstillstand verharren (Dormancy) oder sich zu Mikrometastasen entwickeln. Wenn die Mikrometastasen verschmelzen und es parallel zu den Gefäßen zur Kolonisierung des Organs kommt, ist zum weiteren Wachstum eine Angiogenese erforderlich (Chan und Wang, 2015). Da diese Prozesse großteils auch parallel verlaufen, und das Blut die Brücke vom Primärtumor zur Metastasenbildung darstellt, können Untersuchungen des Blutes zur Diagnostik beitragen.

Biomarker sind messbare und auswertbare Merkmale für biologische Vorgänge in physiologischen und pathologischen Situationen und auch im Verlauf nach Therapie oder Intervention. Es handelt sich um biologische Materialien wie Zellen, Proteine (Hormone, Enzyme), DNA, RNA und auch Veränderungen biologischer Strukturen.

Biomarker können die Verdachtsdiagnose einer Erkrankung absichern oder sogar erst ermöglichen (diagnostische Biomarker) oder haben eine prognostische Aussagekraft wie Vorhersage des Schweregrades oder des Verlaufes einer Erkrankung (prognostische Biomarker) oder können einen Hinweis auf die Entwicklung einer Erkrankung bzw. das Ansprechen auf Therapiemaßnahmen oder Interventionen geben (prädiktive Biomarker). Die idealen Biomarker sind Materialien, die nichtinvasiv gewonnen werden können und die eine hohe Sensitivität und Spezifität für bestimmte Erkrankungen besitzen.

In der Krebsforschung liegt derzeit das Augenmerk auf zirkulierenden Tumorzellen („circulating tumor cells“, CTCs), freier DNA (cell-free DNA, cfDNA) oder freier mikroRNA (cell-free microRNAs, cfmiRNAs). CTCs sind die abgelösten Tumorzellen aus dem Primärtumor oder einer Metastase, die sich im Blut oder Lymphsystem ausbreiten können (Hall *et al.*, 2016). Der Nachweis von mehr als fünf Tumorzellen in einer kleinen Menge Blut (5 CTC/7,5ml Blut) bei Patienten mit Mammakarzinom geht mit kurzem Überleben einher (Cristofanilli *et al.*, 2004).

Beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom wird cfDNA prinzipiell für das Erkennen der Mutationen verschiedener Gene (*EGFR*, *KRAS*) verwendet (Oxnard *et al.*, 2014).

Die cfDNA hat im Blut nach chirurgischer Tumorresektion eine kurze Halbwertszeit (114 min), was die Bearbeitung und die Lagerung von Blutproben schwierig macht (Dahl *et al.*, 2015). Die Studien zeigen gemeinsam, dass CTCs und cfDNA in gelagerten Plasmen wenig stabil sind. Dagegen sind die miRNAs lange Zeit stabil, sodass sie in dieser Hinsicht bessere Biomarker darstellen.

MiRNAs sind kleine nichtkodierende RNAs, die verschiedene biologische Prozesse im Körper regulieren. Sie spielen auch bei der Lungenkarzinomentstehung eine Rolle. Sie befinden sich hauptsächlich intrazellulär und können die Expression von Genen inhibieren.

Weber *et al.* zeigten, dass sich die miRNAs in verschiedenen Körperflüssigkeiten wie Plasma, Serum, Speichel, Tränen, Muttermilch, Bronchiallavage, Kolostrum, Samenflüssigkeit, Fruchtwasser, Pleuraflüssigkeit, Peritonealflüssigkeit, zerebrospinaler Flüssigkeit befinden. Die Körperflüssigkeiten unterscheiden sich durch verschiedene Konzentrationen der miRNAs. Plasma enthält dabei die höchste Konzentration (Weber *et al.*, 2010).

Es gibt verschiedene Erklärungen, wie die miRNAs aus den Körperzellen in die Körperflüssigkeiten gelangen. Einerseits werden die miRNAs durch Nekrose, Apoptose und chronische Entzündung passiv extrazellulär freigesetzt, andererseits werden die miRNAs aktiv mittels Exosomen aus den Zellen ausgeschleust (Hunter *et al.*, 2008). Im Plasma oder Serum befinden sich 10% der miRNAs in Exosomen, 90% bilden Komplexe mit Proteinen wie zB. mit Protein argonaute-2 (AGO2) (Arroyo *et al.*, 2011). Das RNA-bindende Protein Nucleophosmin 1 (NPM1) spielt eine Rolle beim miRNA-Transport aus den Zellen und schützt sie extrazellulär (Wang *et al.*, 2010). Vickers *et al.* fanden, dass zirkulierende miRNAs mit Hilfe von high-density lipoprotein (HDL) transportiert werden können (Vickers *et al.*, 2011). Durch die Bindung in Exosomen und mit Proteinen und HDL bleiben die miRNAs im Plasma und Serum für lang Zeit stabil. Dies wird durch die hohe Resistenz dieser Komplexe gegen Nukleasen und Proteasen erklärt (Arroyo *et al.*, 2011).

Skog *et al.* fanden, dass die freigesetzten Exosomen bei Glioblastom mRNAs, miRNAs und Proteine enthalten. Sie können die Tumorentwicklung in normalen Gliazellen fördern. Die Tumorpatienten haben höhere durch den Tumor freigesetzte Exosomenspiegel im Plasma als gesunde Patienten (Skog *et al.*, 2008). Kosaka *et al.* zeigten, dass die exosomalen miRNAs die Genexpression ähnlich wie die intrazellulären miRNAs inhibieren (Kosaka *et al.*, 2010). Die Ergebnisse zeigen, dass zirkulierende miRNAs eine Rolle bei der Zellkommunikation spielen.

In der vorliegenden Studie wurden die miRNAs als potenzielle prognostische Biomarker für das postoperative Überleben von Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom untersucht. Es wurde dazu Plasma verwendet. Das Plasma unserer Patienten wurde mindestens fünf Jahre bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert.

Insgesamt wurden 2549 miRNAs mit Hilfe der Microarray-Technik in zwei Gruppen von Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (langzeitüberlebende (LTS) vs. kürzeitüberlebende (STS)) untersucht. Die statistische Analyse zeigte, dass die Expression von 52 miRNAs (52 von 2549, 2,0%) in der LTS- und STS-Gruppe signifikant unterschiedlich war ($p < 0,05$). In der STS-Gruppe sind 26 miRNAs überexprimiert und 26 miRNAs unterexprimiert verglichen mit der LTS-Gruppe. Auf Grund der unterschiedlichen Fold Change Werte wurden für eine weitere Validierung mittels Reverse Transkription – quantitative Echtzeit Polymerasekettenreaktion (RT-qPCR) fünf miRNAs ausgewählt, die einen Fold Change Wert größer als 1,5 haben oder bei denen schon eine Korrelation mit dem Lungen-

karzinom beschrieben ist (Di Fazio *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2014; Song *et al.*, 2018; Xiao und Liu, 2015; Zhou *et al.*, 2016).

Pigati *et al.* zeigten, dass ca. 30% der zirkulierenden miRNAs *in vitro* und *in vivo* nicht mit dem miRNA-Profil der originalen Zellen übereinstimmen, d.h. die Freisetzung von miRNA aus den Zellen in das Blut stellt einen selektiven Prozess dar (Pigati *et al.*, 2010). Diese Selektion führt zu Schwierigkeiten in der Bestimmung des Ursprungs der zirkulierenden miRNA.

Zur Validierung der fünf ausgewählten miRNAs hsa-miR-142-3p, hsa-miR-126-3p, hsa-miR-574-5p, hsa-miR-26a-5p und hsa-let-7f-5p wurde jeweils eine RT-qPCR durchgeführt. Die RT-qPCR stellt ein zuverlässiges Verfahren zur Überprüfung von Microarray-Expressionsdaten dar. Insgesamt sind die fünf ausgewählten miRNAs bei den postoperativ kurzzeitüberlebenden Patienten (STS-Gruppe) unterexprimiert. Dies deutet darauf hin, dass die fünf ausgewählten miRNAs bei Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom eine Aussage über das postoperative Überleben zulassen.

7.2.1 Hsa-miR-142-5p

Die Sequenzierung der hsa-miR-142 (mir-142) erfolgte erstmalig bei Säugetieren (Maus) durch Lagos-Quintana *et al.* (Lagos-Quintana *et al.*, 2002). Hsa-miR-142-3p (miRNA vom 3' Arm der pre-miRNA) und hsa-miR-142-5p (miRNA vom 5' Arm der pre-miRNA) wurden im Jahr 2004 bei Patienten mit Leukämie entdeckt (Kasashima *et al.*, 2004).

Änderungen in der hsa-miR-142-Expression führen über verschiedene Mechanismen zur Veränderung der B-Zelldifferenzierung. Dies scheint die Lymphomentwicklung zu fördern (Kuriyama *et al.*, 2018). Eine Unterexpression von hsa-miR-142-3p wurde auch bei Kindern mit Hirntumoren nachgewiesen. Hsa-miR-142-3p spielt möglicherweise auch eine Rolle bei anderen benignen und malignen Erkrankungen. Beispielsweise geht die Überexpression von hsa-miR-142-3p mit Aortensklerose einher (Qin *et al.*, 2018), auch bei Asthma bronchiale ist hsa-miR-142-3p überexprimiert (Maes *et al.*, 2016).

Generell wirkt eine überexprimierte hsa-miR-142-3p als Tumorsuppressor durch Inhibierung des Zellzyklus am Übergang der G2 zur M-Phase. Dies führt zur Hemmung der Tumorzellproliferation (Cao *et al.*, 2016). Eine Rolle der hsa-miR-142-3p wurde bei verschiedenen Malignomen, wie Osteosarkom, Kolonkarzinom, hepatozellulärem Karzinom, Nasopharynxkarzinom, Schilddrüsenkarzinom, Pankreaskarzinom und Zervixkarzinom nachgewiesen (Hua *et al.*, 2018; Zhu *et al.*, 2018). Sie ist ein diagnostischer und prognostischer Biomarker und kann zum Beispiel zwischen mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) Lymphoma des Magens und Gastritis differenzieren (Fernandez *et al.*, 2017). Bei akuten Leukämien haben Patienten mit hsa-miR-142-3p Überexpression eine bessere Prognose (Dou *et al.*, 2013). Lin *et al.* dagegen berichten bei überexprimierter hsa-miR-142-3p bei Patienten mit Plattenepithelkarzinom des Ösophagus trotz kleiner Tumorgröße und negativem Lymphknotenstatus eine schlechte Prognose (Lin *et al.*, 2012).

Eine Unterexpression von hsa-miR-142-3p geht in unserem Patientengut mit kurzen postoperativen Überlebenszeiten (STS-gruppe) einher, was ihre Rolle als Tumorsuppressor und ihre Rolle als prognostischer Biomarker zu bestätigen scheint.

Xiao und Lin fanden, dass eine Überexpression der hsa-miR-142-3p die Zellproliferation beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom inhibiert und die Apoptose fördert. Dies wird durch die Hemmung von High mobility group box 1 protein (HMGB1) erklärt (Xiao und Liu, 2015). Das DNA-bindende Protein HMGB1 fördert die Zellmigration und Invasion beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom durch Regulation der Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) (Wang *et al.*, 2012). Darüber hinaus ist bei einer Überexpression der hsa-miR-142-3p die Chemotherapiesensitivität erhöht, was mittels Inhibierung von HMGB1 und Stimulierung des PI3K/Akt/mTOR Signalweges zustandekommt (Chen *et al.*, 2017). Die Rolle von hsa-miR-142-3p beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom ist sicher komplex und noch nicht geklärt.

7.2.2 Hsa-miR-126-3p

MicroRNA-126 (miR-126) ist eine spezifische endotheliale miRNA. Sie reguliert Angiogenese, Gefäßintegrität, Proliferation und Zellmigration (Fish *et al.*, 2008) und spielt eine Rolle in der Tumorentstehung (Meister und Schmidt, 2010).

MiR-126 wirkt als Tumorsuppressor beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom, sie inhibiert die Angiogenese und damit Tumorwachstum und -invasion durch die Regulation von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) (Wang *et al.*, 2017).

Klinisch geht die Unterexpression der miR-126 bei Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom mit kurzen Überlebenszeiten einher (Chen *et al.*, 2015). Kim *et al.* fanden, dass die miRNA-126 - Expression bei Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom und einer Tumorgroße ≤ 3 cm signifikant höher ist als bei Patienten mit einer Tumorgroße > 3 cm, und die Überexpression bei Patienten mit Adenokarzinom mit einer guten Prognose einhergeht (Kim *et al.*, 2014).

Diese Ergebnisse stimmen mit unseren Ergebnissen insofern überein, dass die Unterexpression von hsa-miR-126-3p mit kurzen Überlebenszeiten einhergeht (STS-Gruppe).

7.2.3 Hsa-miR-574-5p

In verschiedenen Studien wurde hsa-miR-574-5p eine onkogene Funktion zugeschrieben (Ji *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2013). Die Überexpression der hsa-miR-574-5p im Serum erlaubt die Differenzierung von Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom im frühen Tumorstadium (Stadium I, II) von gesunden Patienten (Foss *et al.*, 2011). Außerdem zeigt sich eine überexprimierte hsa-miR-574-5p beim kleinzelligen Lungenkarzinom im extensive disease Tumorstadium (ED). Die Überexpression korreliert mit kurzen Überlebenszeiten und Chemoresistenz des Tumors (Ranade *et al.*, 2010). Zhou *et al.* fanden, dass die hsa-miR-574-5p bei metastasiertem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom im Vergleich zum nicht metastasierten überexprimiert ist.

Sie fördert beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom Zellmigration und Metastasierung durch die Hemmung der Rezeptortyp Tyrosinphosphatase (PTPRU, auch Purkinje cell protein 2 (PCP2)), die die E-cadherin abhängige Zelladhäsion verstärkt (Zhou *et al.*, 2016).

Nach den beschriebenen Ergebnissen kann angenommen werden, dass die Überexpression der hsa-miR-574-5p ein Biomarker für die Metastasierung bei nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom sein dürfte.

In der vorliegenden Studie ist die hsa-miR-574-5p in der STS-Gruppe unterexprimiert. Sie spielt eine untergeordnete Rolle beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom, da sie prinzipiell den non-small cell lung cancer (hsa05223) KEGG-Signalweg nicht regulieren kann. Ihre Überexpression scheint sie als potenziellen Biomarker für Metastasierung beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom in Frage kommen zu lassen. Zum Zeitpunkt der Probenentnahme, d.h. unmittelbar vor der Operation, lagen bei keinem der Patienten klinisch Metastasen vor.

7.2.4 Hsa-miR-26a-5p

Die hsa-miR-26a ist ein potenzieller Tumorsuppressor bei verschiedenen Tumorentitäten, wie Mammakarzinom, Leberzellkarzinom und kolorektalem Karzinom (Cabrera und Szabo, 2013; Vishnubalaji *et al.*, 2015). Sie kann Zelldifferenzierung, Migration und Invasion beeinflussen (Zhang *et al.*, 2011a). Eine Unterexpression der miR-26a geht beim Osteosarkom mit erhöhter Rezidivrate und schlechter Prognose einher (Song *et al.*, 2014). Außerdem wurde eine Unterexpression der hsa-miR-26a-5p bei Patienten mit Hepatitis-B-Virus assoziiertem Leberzellkarzinom beschrieben (Cui *et al.*, 2018). In anderen Studien wurde hsa-miR-26a eine Rolle als Onkogen zugeschrieben, sie fördert die Proliferation z.B. beim Gliom (Kim *et al.*, 2010).

Beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom ist die hsa-miR-26a in Tumorgewebe und im Blut unterexprimiert (Leidinger *et al.*, 2016; Pastuszak-Lewandoska *et al.*, 2016; Yanaihara *et al.*, 2006). Song *et al.* zeigten, dass hsa-miR-26a-5p die Zellproliferation des Lungenkarzinoms zwar nicht beeinflusst, aber Tumorzellmigration und Invasion fördert (Song *et al.*, 2018).

In der vorliegenden Studie ist die hsa-miR-26a-5p in der STS-Gruppe unterexprimiert, dies stimmt mit den anderen Studien überein. Leidinger *et al.* zeigten, dass die hsa-miR-26a beim Lungenkarzinompatienten im Vergleich mit COPD-Patienten unterexprimiert ist, sodass sie mit anderen miRNAs die Differenzierung zwischen Lungenkarzinom und COPD ermöglichen kann (Leidinger *et al.*, 2011).

7.2.5 Hsa-let-7f-5p

Let-7 ist die zweite miRNA nach lin-4, die bei *Caenorhabditis elegans* entdeckt wurde und die erste beim Menschen entdeckte miRNA. Sie reguliert die Entwicklung dieses Fadenwurms (Lee *et al.*, 1993). Der Name let-7 steht für „letal-7“, da die Mutation des *let-7* Gens zu Störungen in der Entwicklung von *Caenorhabditis elegans* führt und entweder ein deformierter Wurm oder ein nicht lebensfähiger Wurm resultiert. Die let-7 Familie hat im Genom verschiedene Isoformen und zu ihrer Unterscheidung wird jede Isoform mit einem Buchstaben bezeichnet. Die let-7 Familie hat beim Menschen zehn Mitglieder (Roush und Slack, 2008). Sie reguliert verschiedene biologische Prozesse, z.B. reguliert sie die Differenzierung der Stammzellen bei *C. elegans*, das neuromuskuläre System bei Fliegen, die Entwicklung der Extremitäten bei Hühnern und Mäusen (Lancman *et al.*, 2005). Die let-7 Familie

ist eine potenzielle Tumorsuppressor miRNA, und eine Unterexpression wurde bei verschiedenen Tumorentitäten bestätigt, wie z.B. bei Lymphom und Magenkarzinom (Sampson *et al.*, 2007). Die Hemmung der Expression der let-7 Familie führt zur Steigerung der Zellproliferation beim Lungenkarzinom (Johnson *et al.*, 2007). Darüber hinaus reguliert sie negativ die Expression von Onkogenen wie *MYC* und *RAS*. Fassina *et al.* fanden, dass let-7a, let-7b, let-7c, let-7f, let-7g, let-7i und miR-98 beim Plattenepithelkarzinom im Vergleich zum Adenokarzinom unterexprimiert sind, sie können in Kombination mit anderen miRNAs, wie miR-205, eine Unterscheidung der beiden großen histologischen Gruppen des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms zulassen (Fassina *et al.*, 2011). Außerdem wurde in einer anderen Studie bestätigt, dass eine Unterexpression in der let-7 Familie mit kurzen Überlebenszeiten bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen einhergeht (Landi *et al.*, 2010).

Damit scheint die let-7 Familie ein diagnostischer und prognostischer Biomarker zu sein. In der vorliegenden Studie ist let-7f-5p in der STS-Gruppe unterexprimiert, d.h. die Unterexpression geht mit kurzen Überlebenszeiten einher.

7.2.6 KEGG-Signalweg

MiRNAs blockieren Genaktivität, indem sie sich an die 3'-nicht translatierten Regionen der mRNA anlagern. Sie steuern damit grundlegende biologische Prozesse und sind auch an Krankheiten beteiligt. Jede miRNA kann mehrere oder viele Gene regulieren und damit Einfluss auf verschiedene Signalwege nehmen.

In der vorliegenden Studie wurden mit Hilfe der DIANA-miRPath v.3.0 Software 57 KEGG-Signalwege beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom identifiziert. Sie beeinflussen hauptsächlich die Zellkommunikation und Signalübertragung auf einer oder auf mehreren nacheinander geschalteten Ebenen (Signalkaskaden) und regulieren dadurch z.B. Gentranskription, Zellproliferation oder Immunreaktion. Dies kann die Entstehung von Tumoren, Angiogenese, Vaskulogenese, Ansprechen auf eine Behandlung oder Metastasierung des Tumors beeinflussen. Bei Lungenkarzinomen sind die Signalwege noch nicht eindeutig geklärt.

Der non-small cell lung cancer (hsa05223) Signalweg ist der wichtigste Signalweg beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom und besteht aus verschiedenen Signalwegen.

7.2.7 MiRNA Zielgene

Der non-small cell lung cancer (hsa05223) Signalweg enthält verschiedene Zielgene, die von hsa-miR-142-3p, hsa-miR-126-3p, hsa-miR-26a-5p und hsa-let-7f-5p beeinflusst werden können. Die Genveränderungen betreffen hauptsächlich die Onkogene *KRAS*, *EGFR* und *EML4-ALK* oder Tumorsuppressorgene *RAR β* , *FHIT*, *INK4a/ARF*, und *p53* (Abbildung 3). Die Veränderungen in den folgenden Genen sind beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom gut erforscht.

7.2.7.1 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (*KRAS*)

Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (*KRAS*) ist ein Protoonkogen der rat sarcoma virus Genfamilie Harvey-Ras (*HRAS*), Kirsten-Ras (*KRAS*) und Neuroblastoma-Ras (*NRAS*), welche Anfang 1980 entdeckt wurde (Tsuchida *et al.*, 1982). Es kodiert vier Proteinisoformen *HRAS*, *KRAS4a*, *KRAS4b* und *NRAS* (Barbacid, 1987). RAS-Proteine sind GTPasen (small G-proteins). Sie liegen an der Innenseite der Zellmembran und regulieren die extrazelluläre Signalübertragung in das Zytoplasma. RAS-Proteine können hauptsächlich Ras-Raf-MEK-ERK und PI3K/AKT/mTOR Signalwege aktivieren (Roberts und Der, 2007). Die Mutationen im *KRAS* führen zur Dysregulation des Signalweges, sodass die RAS-Proteine in der aktiven Form bleiben, was zur persistierenden Stimulation der Signalwege und zur Karzinogenese führt (Riely *et al.*, 2009). *KRAS* Mutationen treten in 30% der Adenokarzinome (34% bei Rauchern, 6% bei Nichtrauchern) und in 5% der Plattenepithelkarzinome auf (Ding *et al.*, 2008), sodass sie die häufigsten Mutationen beim Lungenkarzinom sind. *KRAS*-Inhibitoren sind derzeit in der Entwicklungsphase (Chakraborty *et al.*, 2018).

7.2.7.2 Epidermal Growth Factor Receptor (*EGFR*)

Epidermal Growth Factor Receptor (*EGFR*) ist ein Transmembranrezeptor aus der Rezeptor-Tyrosinkinase-Familie (RTKs, auch ErbB Familie oder human epidermal growth factor receptor (HER)). Er gehört zu den Rezeptoren für Wachstumsfaktoren. Durch die extrazelluläre Bindung mit Epidermal Growth Factor (EGF) und Transforming Growth Factor ($TGF\alpha$) wird der *EGFR* aktiviert, und auf diese Weise können die extrazellulären Signale in das Zytoplasma übergeleitet werden. Darüber hinaus werden intrazelluläre Signalwege wie Ras-Raf-MEK-ERK oder PI3K/AKT/mTOR stimuliert. Dies führt zu Förderung des Zellwachstums und Inhibierung der Apoptose (Scaltriti und Baselga, 2006). Der *EGFR* hat drei Domänen, die extrazelluläre, die transmembrane und die intrazelluläre und wurde erstmalig von Cohen beschrieben (Cohen, 1965). Die Mutationen von *EGFR* betreffen insgesamt 32,3% der Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom. Dies ist von verschiedenen Merkmalen abhängig, wie z.B. Geographie (Asien vs. China vs. Europa: 50,0% vs. 38,4% vs. 14,1%), Geschlecht (Frauen vs. Männer: 43,7% vs. 24,0%), Raucherstatus (Nichtraucher vs. Raucher: 49,3% vs. 21,5%) und histologischer Typ (Adenokarzinom vs. Nicht-Adenokarzinom: 38,0% vs. 11,7%) (Boch *et al.*, 2013; Skov *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2016; Zimmer *et al.*, 2009). Die meisten Mutationen liegen zwischen Exon 18 und 21, und in 90% der Fälle sind es Exon 19-Deletionen (Del19) oder Exon 21 L858R-Punktmutationen, indem Leucin durch Arginin in Codon 858 ersetzt ist. Diese Mutationen sind sensitiv für die Therapie mit Tyrosinkinaseinhibitoren (TKIs). Die *EGFR*-T790M-Mutation, in der Threonin (T) durch Methionin (M) an Position 790 in Exon 20 ersetzt ist, bedeutet eine Resistenz gegen Tyrosinkinaseinhibitoren (TKIs) (Tan *et al.*, 2015).

7.2.7.3 Rat fibrosarcoma protein B (BRAF)

RAF ist eine Protein-Familie von Serin/Threonin-Kinasen. Sie aktiviert den Ras-Raf-MEK-ERK-Signalweg. Die Mutationen im *BRAF* codon 600 (*BRAFV600E*), betreffen 66% der Melanome (Davies *et al.*, 2002), und wurden bei 3% der Adenokarzinome nachgewiesen (Paik *et al.*, 2011).

7.2.7.4 Anaplastic lymphoma kinase (ALK)

ALK ist ein Enzym der Insulin receptor protein-tyrosine kinase Superfamilie. Es wurde im Jahr 1994 erstmalig beim anaplastisch-großzelligen Lymphom beschrieben (Morris *et al.*, 1994; Shiota *et al.*, 1994). ALK spielt eine Rolle in der Entwicklung und Funktion des Nervensystems. Durch verschiedene Mechanismen wird das *ALK* Gen in ein Onkogen umgewandelt, dies geschieht beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom durch Fusion von *ALK* mit Echinoderm microtubule-associated protein-like 4 (*EML4* gene) infolge einer Inversion im kurzen Arm von Chromosom 2. Dies tritt in 5% der nicht-kleinzelligen Lungenkarzinome auf und betrifft alle histologischen Gruppen (Wong *et al.*, 2009). Das Protein EML4-ALK kann verschiedene Signalwege wie PI3K/AKT und Ras-Raf-MEK-ERK aktivieren. ALK-Inhibitoren werden in der Therapie des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms eingesetzt.

8 Literaturverzeichnis

1. AJCC (1977). American Joint Committee on cancer staging and end result reporting. AJCC cancer staging manual (1st Edition)
2. Alberg AJ, Brock MV, Ford JG, Samet JM, Spivack SD (2013) Epidemiology of lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* 143:e1S-e29S
3. Alexiou C, Beggs D, Rogers ML, Beggs L, Asopa S, Salama FD (2001) Pneumonectomy for non-small cell lung cancer: predictors of operative mortality and survival. *Eur J Cardiothorac Surg* 20:476-480
4. Ambros V, Bartel B, Bartel DP, Burge CB, Carrington JC, Chen X, Dreyfuss G, Eddy SR, Griffiths-Jones S, Marshall M, Matzke M, Ruvkun G, Tuschl T (2003) A uniform system for microRNA annotation. *RNA* 9:277-279
5. Arechaga-Ocampo E, Lopez-Camarillo C, Villegas-Sepulveda N, Gonzalez-De la Rosa CH, Perez-Anorve IX, Roldan-Perez R, Flores-Perez A, Pena-Curiel O, Angeles-Zaragoza O, Rangel Corona R, Gonzalez-Barrios JA, Bonilla-Moreno R, Del Moral-Hernandez O, Herrera LA, Garcia-Carranca A (2017) Tumor suppressor miR-29c regulates radioresistance in lung cancer cells. *Tumour Biol* 39:1010428317695010
6. Arriagada R, Auperin A, Burdett S, Higgins JP, Johnson DH, Le Chevalier T, Le Pechoux C, Parmar MK, Pignon JP, Souhami RL, Stephens RJ, Stewart LA, Tierney JF, Tribodet H, van Meerbeeck J (2010) Adjuvant chemotherapy, with or without postoperative radiotherapy, in operable non-small-cell lung cancer: two meta-analyses of individual patient data. *Lancet* 375:1267-1277
7. 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 U S A* 108:5003-5008
8. Bagan P, Berna P, Pereira JC, Le Pimpec Barthes F, Foucault C, Dujon A, Riquet M (2005) Sleeve lobectomy versus pneumonectomy: tumor characteristics and comparative analysis of feasibility and results. *Ann Thorac Surg* 80:2046-2050
9. Barbacid M (1987) ras genes. *Annu Rev Biochem* 56:779-827
10. Barshack I, Lithwick-Yanai G, Afek A, Rosenblatt K, Tabibian-Keissar H, Zepeniuk M, Cohen L, Dan H, Zion O, Strenov Y, Polak-Charcon S, Perelman M (2010) MicroRNA expression differentiates between primary lung tumors and metastases to the lung. *Pathol Res Pract* 206:578-584
11. Bartel DP (2018) Metazoan MicroRNAs. *Cell* 173:20-51
12. Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, Bartlett BR, Wang H, Luber B, Alani RM, Antonarakis ES, Azad NS, Bardelli A, Brem H, Cameron JL, Lee CC, Fecher LA, Gallia GL, Gibbs P, Le D, Giuntoli RL, Goggins M, Hogarty MD, Holdhoff M, Hong SM, Jiao Y, Juhl HH, Kim JJ, Siravegna G, Laheru DA, Lauricella C, Lim M, Lipson EJ, Marie SK, Netto GJ, Oliner KS, Olivi A, Olsson L, Riggins GJ, Sartore-Bianchi A, Schmidt K, Shih I M, Oba-Shinjo SM, Siena S, Theodorescu D, Tie J, Harkins TT, Veronese S, Wang TL, Weingart JD, Wolfgang CL, Wood LD, Xing D, Hruban RH, Wu J, Allen PJ, Schmidt CM, Choti MA, Velculescu VE, Kinzler KW, Vogelstein B, Papadopoulos N, Diaz LA, Jr. (2014) Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med* 6:224ra224
13. Biamonte F, Santamaria G, Sacco A, Perrone FM, Di Cello A, Battaglia AM, Salatino A, Di Vito A, Aversa I, Venturella R, Zullo F, Costanzo F (2019) MicroRNA let-7g acts as tumor suppressor and predictive biomarker for chemoresistance in human epithelial ovarian cancer. *Sci Rep* 9:5668
14. 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

15. Bishop JA, Benjamin H, Cholakh H, Chajut A, Clark DP, Westra WH (2010) Accurate classification of non-small cell lung carcinoma using a novel microRNA-based approach. *Clin Cancer Res* 16:610-619
16. Boch C, Kollmeier J, Roth A, Stephan-Falkenau S, Misch D, Gruning W, Bauer TT, Mairinger T (2013) The frequency of EGFR and KRAS mutations in non-small cell lung cancer (NSCLC): routine screening data for central Europe from a cohort study. *BMJ Open* 3: e002560
17. Boeckel JN, Thome CE, Leistner D, Zeiher AM, Fichtlscherer S, Dimmeler S (2013) Heparin selectively affects the quantification of microRNAs in human blood samples. *Clin Chem* 59:1125-1127
18. Bohnsack MT, Czapinski K, Gorlich D (2004) Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA* 10:185-191
19. Borchert GM, Lanier W, Davidson BL (2006) RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol* 13:1097-1101
20. Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM (2005) Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol* 3:e85
21. Bronkhorst AJ, Ungerer V, Holdenrieder S (2019) The emerging role of cell-free DNA as a molecular marker for cancer management. *Biomol Detect Quantif* 17:100087
22. Cabrera R, Szabo G (2013) Another armed CD4(+) T cell ready to battle hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 58:1-3
23. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM (2002) Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:15524-15529
24. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM (2004) Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:2999-3004
25. Cao XC, Yu Y, Hou LK, Sun XH, Ge J, Zhang B, Wang X (2016) miR-142-3p inhibits cancer cell proliferation by targeting CDC25C. *Cell Prolif* 49:58-68
26. Chakraborty A, Linnane E, Ross S (2018) Ras proteins as therapeutic targets. *Biochem Soc Trans* 46:1303-1311
27. Chan SH, Wang LH (2015) Regulation of cancer metastasis by microRNAs. *J Biomed Sci* 22:9
28. Chen CZ (2005) MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *N Engl J Med* 353:1768-1771
29. Chen SW, Wang TB, Tian YH, Zheng YG (2015) Down-regulation of microRNA-126 and microRNA-133b acts as novel predictor biomarkers in progression and metastasis of non small cell lung cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 8:14983-14988
30. 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 CY (2008) Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res* 18:997-1006
31. Chen Y, Zhou X, Qiao J, Bao A (2017) MiR-142-3p Overexpression Increases Chemo-Sensitivity of NSCLC by Inhibiting HMGB1-Mediated Autophagy. *Cell Physiol Biochem* 41:1370-1382
32. Cho WC, Chow AS, Au JS (2009) Restoration of tumour suppressor hsa-miR-145 inhibits cancer cell growth in lung adenocarcinoma patients with epidermal growth factor receptor mutation. *Eur J Cancer* 45:2197-2206
33. Choi S, Chen M, Cryns VL, Anderson RA (2019) A nuclear phosphoinositide kinase complex regulates p53. *Nat Cell Biol* 21:462-475
34. Cohen S (1965) The stimulation of epidermal proliferation by a specific protein (EGF). *Dev Biol* 12:394-407

35. Collier J, Parker R (2005) General translational repression by activators of mRNA decapping. *Cell* 122:875-886
36. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, Reuben JM, Doyle GV, Allard WJ, Terstappen LW, Hayes DF (2004) Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 351:781-791
37. Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakis F, Bardelli A (2013) Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. *Nat Rev Clin Oncol* 10:472-484
38. Cui XW, Qian ZL, Li C, Cui SC (2018) Identification of miRNA and mRNA expression profiles by PCR microarray in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *Mol Med Rep* 18:5123-5132
39. Dahl E, Jung A, Fassunke J, Hummel M, Penzel R, Dietmaier W, Lassmann S (2015) [Chances and risks of blood-based molecular pathological analysis of circulating tumor cells (CTC) and cell-free DNA (cfDNA) in personalized cancer therapy: positional paper from the study group on liquid biopsy of the working group for molecular pathology in the German Society of Pathology (DGP)]. *Pathologe* 36:92-97
40. Datta D, Lahiri B (2003) Preoperative evaluation of patients undergoing lung resection surgery. *Chest* 123:2096-2103
41. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA (2002) Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417:949-954
42. De Leyn P, 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
43. Dejana E (2010) The role of wnt signaling in physiological and pathological angiogenesis. *Circ Res* 107:943-952
44. Deneffe G, Lacquet LM, Verbeken E, Vermaut G (1988) Surgical treatment of bronchogenic carcinoma: a retrospective study of 720 thoracotomies. *Ann Thorac Surg* 45:380-383
45. Denoix PF (1952) Nomenclature des cancer. *Bull Inst nat Hyg, Paris*. 1952;7:743-8
46. Dent AG, Sutedja TG, Zimmerman PV (2013) Exhaled breath analysis for lung cancer. *J Thorac Dis* 5 Suppl 5:S540-550
47. Deslauriers J, Gregoire J, Jacques LF, Piroux M, Guojin L, Lacasse Y (2004) Sleeve lobectomy versus pneumonectomy for lung cancer: a comparative analysis of survival and sites or recurrences. *Ann Thorac Surg* 77:1152-1156; discussion 1156
48. Di Fazio P, Maass M, Roth S, Meyer C, Grups J, Rexin P, Bartsch DK, Kirschbaum A (2017) Expression of hsa-let-7b-5p, hsa-let-7f-5p, and hsa-miR-222-3p and their putative targets HMGA2 and CDKN1B in typical and atypical carcinoid tumors of the lung. *Tumour Biol* 39:1010428317728417
49. Ding L, Getz G, Wheeler DA, Mardis ER, McLellan MD, Cibulskis K, Sougnez C, Greulich H, Muzny DM, Morgan MB, Fulton L, Fulton RS, Zhang Q, Wendl MC, Lawrence MS, Larson DE, Chen K, Dooling DJ, Sabo A, Hawes AC, Shen H, Jhangiani SN, Lewis LR, Hall O, Zhu Y, Mathew T, Ren Y, Yao J, Scherer SE, Clerc K, Metcalf GA, Ng B, Milosavljevic A, Gonzalez-Garay ML, Osborne JR, Meyer R, Shi X, Tang Y, Koboldt DC, Lin L, Abbott R, Miner TL, Pohl C, Fewell G, Haipke C, Schmidt H, Dunford-Shore BH, Kraja A, Crosby SD, Sawyer CS, Vickery T, Sander S, Robinson J, Winckler W, Baldwin J, Chirieac LR, Dutt A, Fennell T, Hanna M, Johnson BE, Onofrio RC, Thomas RK, Tonon G, Weir BA, Zhao X, Ziaugra L, Zody MC,

- Giordano T, Orringer MB, Roth JA, Spitz MR, Wistuba, II, Ozenberger B, Good PJ, Chang AC, Beer DG, Watson MA, Ladanyi M, Broderick S, Yoshizawa A, Travis WD, Pao W, Province MA, Weinstock GM, Varmus HE, Gabriel SB, Lander ES, Gibbs RA, Meyerson M, Wilson RK (2008) Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature* 455:1069-1075
50. Dou L, Li J, Zheng D, Li Y, Gao X, Xu C, Gao L, Wang L, Yu L (2013) MicroRNA-142-3p inhibits cell proliferation in human acute lymphoblastic leukemia by targeting the MLL-AF4 oncogene. *Mol Biol Rep* 40:6811-6819
 51. Dyson NJ (2016) RB1: a prototype tumor suppressor and an enigma. *Genes Dev* 30:1492-1502
 52. Ebert MS, Neilson JR, Sharp PA (2007) MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells. *Nat Methods* 4:721-726
 53. Eser PO, Janne PA (2018) TGFbeta pathway inhibition in the treatment of non-small cell lung cancer. *Pharmacol Ther* 184:112-130
 54. Esquela-Kerscher A, Slack FJ (2006) Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 6:259-269
 55. Esquela-Kerscher A, Trang P, Wiggins JF, Patrawala L, Cheng A, Ford L, Weidhaas JB, Brown D, Bader AG, Slack FJ (2008) The let-7 microRNA reduces tumor growth in mouse models of lung cancer. *Cell Cycle* 7:759-764
 56. Fassina A, Cappellesso R, Fassan M (2011) Classification of non-small cell lung carcinoma in transthoracic needle specimens using microRNA expression profiling. *Chest* 140:1305-1311
 57. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F (2015) Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 136:E359-386
 58. Fernandez C, Bellosillo B, Ferraro M, Seoane A, Sanchez-Gonzalez B, Pairet S, Pons A, Barranco L, Vela MC, Gimeno E, Colomo L, Besses C, Navarro A, Salar A (2017) MicroRNAs 142-3p, miR-155 and miR-203 Are Deregulated in Gastric MALT Lymphomas Compared to Chronic Gastritis. *Cancer Genomics Proteomics* 14:75-82
 59. Finnegan EF, Pasquinelli AE (2013) MicroRNA biogenesis: regulating the regulators. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 48:51-68
 60. Fish JE, Santoro MM, Morton SU, Yu S, Yeh RF, Wythe JD, Ivey KN, Bruneau BG, Stainier DY, Srivastava D (2008) miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity. *Dev Cell* 15:272-284
 61. Flacco A, Ludovini V, Bianconi F, Ragusa M, Bellezza G, Tofanetti FR, Pistola L, Siggillino A, Vannucci J, Cagini L, Sidoni A, Puma F, Varella-Garcia M, Crino L (2015) MYC and human telomerase gene (TERC) copy number gain in early-stage non-small cell lung cancer. *Am J Clin Oncol* 38:152-158
 62. Fleischhacker M, Schmidt B (2007) Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer--a survey. *Biochim Biophys Acta* 1775:181-232
 63. Foss KM, Sima C, Ugolini D, Neri M, Allen KE, Weiss GJ (2011) miR-1254 and miR-574-5p: serum-based microRNA biomarkers for early-stage non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 6:482-488
 64. Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP (2009) Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 19:92-105
 65. Garzon R, Calin GA, Croce CM (2009) MicroRNAs in Cancer. *Annu Rev Med* 60:167-179
 66. Gessner C, Kuhn H, Toepfer K, Hammerschmidt S, Schauer J, Wirtz H (2004) Detection of p53 gene mutations in exhaled breath condensate of non-small cell lung cancer patients. *Lung Cancer* 43:215-222
 67. Goldstraw P (1997). Report on the international workshop on intrathoracic staging. London, October 1996. *Lung Cancer*, 18(1), 107-111

68. Goldstraw P, Crowley J, Chansky K, Giroux DJ, Groome PA, Rami-Porta R, Postmus PE, Rusch V, Sobin L, International Association for the Study of Lung Cancer International Staging C, Participating I (2007) The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM Classification of malignant tumours. *J Thorac Oncol* 2:706-714
69. Goldstraw P, Ball D, Jett JR, Le Chevalier T, Lim E, Nicholson AG, Shepherd FA (2011) Non-small-cell lung cancer. *Lancet* 378:1727-1740
70. Goldstraw P, Chansky K, Crowley J, Rami-Porta R, Asamura H, Eberhardt WE, Nicholson AG, Groome P, Mitchell A, Bolejack V, International Association for the Study of Lung Cancer S, Prognostic Factors Committee AB, Participating I, International Association for the Study of Lung Cancer S, Prognostic Factors Committee Advisory B, Participating I (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
71. Goulart BH, Ramsey SD (2013) Moving beyond the national lung screening trial: discussing strategies for implementation of lung cancer screening programs. *Oncologist* 18:941-946
72. Greene FL, Balch CM, Fleming ID, Fritz A, Haller DG, Morrow M, Page DL (eds) (2002) American Joint Committee on Cancer : AJCC Cancer Staging Manual: TNM Classification of Malignant Tumors. 6th ed. Springer, New York
73. Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, Barry SC, Tsykin A, Farshid G, Vadas MA, Khew-Goodall Y, Goodall GJ (2008) The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat Cell Biol* 10:593-601
74. Grosse-Brockhoff F, Krauss H, Brunn W.v., Köbcke H, Lange F (eds) (1957) *Der Lungenkrebs. Deutsche Medizinische Wochenschrift.* 82. Jahrgang, 2. Halbjahr. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
75. Arriagada R, Auperin A, Burdett S, Higgins JP, Johnson DH, Le Chevalier T, Le Pechoux C, Parmar MK, Pignon JP, Souhami RL, Stephens RJ, Stewart LA, Tierney JF, Tribodet H, van Meerbeeck J (2010) Adjuvant chemotherapy, with or without postoperative radiotherapy, in operable non-small-cell lung cancer: two meta-analyses of individual patient data. *Lancet* 375:1267-1277
76. Hall C, Valad L, Lucci A (2016) Circulating Tumor Cells in Breast Cancer Patients. *Crit Rev Oncog* 21:125-139
77. Hanabata T, Tsukuda K, Toyooka S, Yano M, Aoe M, Nagahiro I, Sano Y, Date H, Shimizu N (2004) DNA methylation of multiple genes and clinicopathological relationship of non-small cell lung cancers. *Oncol Rep* 12:177-180
78. Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70
79. Haussinger K, Becker H, Stanzel F, Kreuzer A, Schmidt B, Strausz J, Cavaliere S, Herth F, Kohlhauf M, Muller KM, Huber RM, Pichlmeier U, Bolliger Ch T (2005) Autofluorescence bronchoscopy with white light bronchoscopy compared with white light bronchoscopy alone for the detection of precancerous lesions: a European randomised controlled multicentre trial. *Thorax* 60:496-503
80. Henn D, Abu-Halima M, Wermke D, Falkner F, Thomas B, Kopple C, Ludwig N, Schulte M, Brockmann MA, Kim YJ, Sacks JM, Kneser U, Keller A, Meese E, Schmidt VJ (2019) MicroRNA-regulated pathways of flow-stimulated angiogenesis and vascular remodeling in vivo. *J Transl Med* 17:22
81. Hermanek P, Hutter R. V. P., Sobin L.H., Wagner G., Wittekind C. (eds) (1997) *Illustrated Guide to the TNM/pTNM-Classification of Malignant Tumours. TNM Atlas.* Springer-Verlag, Berlin
82. Holleman A, Chung I, Olsen RR, Kwak B, Mizokami A, Saijo N, Parissenti A, Duan Z, Voest EE, Zetter BR (2011) miR-135a contributes to paclitaxel resistance in tumor cells both in vitro and in vivo. *Oncogene* 30:4386-4398

83. Hua S, Liu C, Liu L, Wu D (2018) miR-142-3p inhibits aerobic glycolysis and cell proliferation in hepatocellular carcinoma via targeting LDHA. *Biochem Biophys Res Commun* 496:947-954
84. Huber W, von Heydebreck A, Sultmann H, Poustka A, Vingron M (2002) Variance stabilization applied to microarray data calibration and to the quantification of differential expression. *Bioinformatics* 18 Suppl 1:S96-104
85. Hunter MP, Ismail N, Zhang X, Aguda BD, Lee EJ, Yu L, Xiao T, Schafer J, Lee ML, Schmittgen TD, Nana-Sinkam SP, Jarjoura D, Marsh CB (2008) Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS One* 3:e3694
86. Jeansonne D, DeLuca M, Marrero L, Lassak A, Pacifici M, Wyczechowska D, Wilk A, Reiss K, Peruzzi F (2015) Anti-tumoral effects of miR-3189-3p in glioblastoma. *J Biol Chem* 290:8067-8080
87. Jemal A, Thun MJ, Ries LA, Howe HL, Weir HK, Center MM, Ward E, Wu XC, Ehemann C, Anderson R, Ajani UA, Kohler B, Edwards BK (2008) Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2005, featuring trends in lung cancer, tobacco use, and tobacco control. *J Natl Cancer Inst* 100:1672-1694
88. Ji S, Ye G, Zhang J, Wang L, Wang T, Wang Z, Zhang T, Wang G, Guo Z, Luo Y, Cai J, Yang JY (2013) miR-574-5p negatively regulates Qki6/7 to impact beta-catenin/Wnt signalling and the development of colorectal cancer. *Gut* 62:716-726
89. Johnson CD, Esquela-Kerscher A, Stefani G, Byrom M, Kelnar K, Ovcharenko D, Wilson M, Wang X, Shelton J, Shingara J, Chin L, Brown D, Slack FJ (2007) The let-7 microRNA represses cell proliferation pathways in human cells. *Cancer Res* 67:7713-7722
90. Kalscheuer S, Zhang X, Zeng Y, Upadhyaya P (2008) Differential expression of microRNAs in early-stage neoplastic transformation in the lungs of F344 rats chronically treated with the tobacco carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. *Carcinogenesis* 29:2394-2399
91. Kanehisa M (1997) A database for post-genome analysis. *Trends Genet* 13:375-376
92. Karube Y, Tanaka H, Osada H, Tomida S, Tatematsu Y, Yanagisawa K, Yatabe Y, Takamizawa J, Miyoshi S, Mitsudomi T, Takahashi T (2005) Reduced expression of Dicer associated with poor prognosis in lung cancer patients. *Cancer Sci* 96:111-115
93. Kasashima K, Nakamura Y, Kozu T (2004) Altered expression profiles of microRNAs during TPA-induced differentiation of HL-60 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 322:403-410
94. Kehl T, Backes C, Kern F, Fehlmann T, Ludwig N, Meese E, Lenhof HP, Keller A (2017) About miRNAs, miRNA seeds, target genes and target pathways. *Oncotarget* 8:107167-107175
95. Keller A, Leidinger P, Borries A, Wendschlag A, Wucherpfennig F, Scheffler M, Huwer H, Lenhof HP, Meese E (2009) miRNAs in lung cancer - studying complex fingerprints in patient's blood cells by microarray experiments. *BMC Cancer* 9:353
96. Keller A, Leidinger P, Bauer A, Elsharawy A, Haas J, Backes C, Wendschlag A, Giese N, Tjaden C, Ott K, Werner J, Hackert T, Ruprecht K, Huwer H, Huebers J, Jacobs G, Rosenstiel P, Dommisch H, Schaefer A, Muller-Quernheim J, Wullich B, Keck B, Graf N, Reichrath J, Vogel B, Nebel A, Jager SU, Staehler P, Amarantos I, Boisguerin V, Staehler C, Beier M, Scheffler M, Buchler MW, Wischhusen J, Haeusler SF, Dietl J, Hofmann S, Lenhof HP, Schreiber S, Katus HA, Rottbauer W, Meder B, Hoheisel JD, Franke A, Meese E (2011) Toward the blood-borne miRNome of human diseases. *Nat Methods* 8:841-843
97. Keller A, Leidinger P, Vogel B, Backes C, ElSharawy A, Galata V, Mueller SC, Marquart S, Schrauder MG, Strick R, Bauer A, Wischhusen J, Beier M, Kohlhaas J, Katus HA, Hoheisel J, Franke A, Meder B, Meese E (2014) miRNAs can be generally associated with human pathologies as exemplified for miR-144. *BMC Med* 12:224
98. Ketting RF, Fischer SE, Bernstein E, Sijen T, Hannon GJ, Plasterk RH (2001) Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev* 15:2654-2659

99. Kim DJ, Linnstaedt S, Palma J, Park JC, Ntrivalas E, Kwak-Kim JY, Gilman-Sachs A, Beaman K, Hastings ML, Martin JN, Duelli DM (2012) Plasma components affect accuracy of circulating cancer-related microRNA quantitation. *J Mol Diagn* 14:71-80
100. Kim H, Huang W, Jiang X, Pennicooke B, Park PJ, Johnson MD (2010) Integrative genome analysis reveals an oncomir/oncogene cluster regulating glioblastoma survivorship. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:2183-2188
101. Kim MK, Jung SB, Kim JS, Roh MS, Lee JH, Lee EH, Lee HW (2014) Expression of microRNA miR-126 and miR-200c is associated with prognosis in patients with non-small cell lung cancer. *Virchows Arch* 465:463-471
102. Kim VN, Han J, Siomi MC (2009) Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:126-139
103. Kondratov K, Kurapeev D, Popov M, Sidorova M, Minasian S, Galagudza M, Kostareva A, Fedorov A (2016) Heparinase treatment of heparin-contaminated plasma from coronary artery bypass grafting patients enables reliable quantification of microRNAs. *Biomol Detect Quantif* 8:9-14
104. Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, Takeshita F, Matsuki Y, Ochiya T (2010) Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *J Biol Chem* 285:17442-17452
105. Kozomara A, Griffiths-Jones S (2014) miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res* 42:D68-73
106. Krutzfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M, Stoffel M (2005) Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature* 438:685-689
107. Kuriyama K, Enomoto Y, Suzuki R, Watanuki J, Hosoi H, Yamashita Y, Murata S, Mushino T, Tamura S, Hanaoka N, Dyer M, Siebert R, Kiyonari H, Nakakuma H, Kitamura T, Sonoki T (2018) Enforced expression of MIR142, a target of chromosome translocation in human B-cell tumors, results in B-cell depletion. *Int J Hematol* 107:345-354
108. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T (2002) Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol* 12:735-739
109. Lancman JJ, Caruccio NC, Harfe BD, Pasquinelli AE, Schageman JJ, Pertsemliadis A, Fallon JF (2005) Analysis of the regulation of lin-41 during chick and mouse limb development. *Dev Dyn* 234:948-960
110. Landi MT, Zhao Y, Rotunno M, Koshiol J, Liu H, Bergen AW, Rubagotti M, Goldstein AM, Linnoila I, Marincola FM, Tucker MA, Bertazzi PA, Pesatori AC, Caporaso NE, McShane LM, Wang E (2010) MicroRNA expression differentiates histology and predicts survival of lung cancer. *Clin Cancer Res* 16:430-441
111. Lane DP, Crawford LV (1979) T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 278:261-263
112. Lardinois D, De Leyn P, Van Schil P, Porta RR, Waller D, Passlick B, Zielinski M, Lerut T, Weder W (2006) ESTS guidelines for intraoperative lymph node staging in non-small cell lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg* 30:787-792
113. Larrea E, Sole C, Manterola L, Goicoechea I, Armesto M, Arestin M, Caffarel MM, Araujo AM, Araiz M, Fernandez-Mercado M, Lawrie CH (2016) New Concepts in Cancer Biomarkers: Circulating miRNAs in Liquid Biopsies. *Int J Mol Sci* 17
114. 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
115. Lee TG, Jeong EH, Kim SY, Kim HR, Kim H, Kim CH (2017) Fhit, a tumor suppressor protein, induces autophagy via 14-3-3tau in non-small cell lung cancer cells. *Oncotarget* 8:31923-31937
116. Leidinger P, Keller A, Borries A, Huwer H, Rohling M, Huebers J, Lenhof HP, Meese E (2011) Specific peripheral miRNA profiles for distinguishing lung cancer from COPD. *Lung Cancer* 74:41-47

117. Leidinger P, Galata V, Backes C, Stahler C, Rheinheimer S, Huwer H, Meese E, Keller A (2015) Longitudinal study on circulating miRNAs in patients after lung cancer resection. *Oncotarget* 6:16674-16685
118. Leidinger P, Brefort T, Backes C, Krapp M, Galata V, Beier M, Kohlhaas J, Huwer H, Meese E, Keller A (2016) High-throughput qRT-PCR validation of blood microRNAs in non-small cell lung cancer. *Oncotarget* 7:4611-4623
119. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP (2005) Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120:15-20
120. Lin RJ, Xiao DW, Liao LD, Chen T, Xie ZF, Huang WZ, Wang WS, Jiang TF, Wu BL, Li EM, Xu LY (2012) MiR-142-3p as a potential prognostic biomarker for esophageal squamous cell carcinoma. *J Surg Oncol* 105:175-182
121. Linzer DI, Levine AJ (1979) Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 17:43-52
122. Liu X, Lin XJ, Wang CP, Yan KK, Zhao LY, An WX, Liu XD (2014) Association between smoking and p53 mutation in lung cancer: a meta-analysis. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 26:18-24
123. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) Method. *Methods* 25:402-408
124. Loginov VI, Dmitriev AA, Senchenko VN, Pronina IV, Khodyrev DS, Kudryavtseva AV, Krasnov GS, Gerashchenko GV, Chashchina LI, Kazubskaya TP, Kondratieva TT, Lerman MI, Angeloni D, Braga EA, Kashuba VI (2015) Tumor Suppressor Function of the SEMA3B Gene in Human Lung and Renal Cancers. *PLoS One* 10:e0123369
125. Luzzi L, Paladini P, Ghiribelli C, Voltolini L, Di Bisceglie M, D'Agata A, Cacchiarelli M, Gotti G (2000) Assessing the prognostic value of the extent of mediastinal lymph node infiltration in surgically-treated non-small cell lung cancer (NSCLC). *Lung Cancer* 30:99-105
126. MacRae IJ, Ma E, Zhou M, Robinson CV, Doudna JA (2008) In vitro reconstitution of the human RISC-loading complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:512-517
127. Maes T, Cobos FA, Schleich F, Sorbello V, Henket M, De Preter K, Bracke KR, Conicx G, Mesnil C, Vandesompele J, Lahousse L, Bureau F, Mestdagh P, Joos GF, Ricciardolo FL, Brusselle GG, Louis R (2016) Asthma inflammatory phenotypes show differential microRNA expression in sputum. *J Allergy Clin Immunol* 137:1433-1446
128. Mandel P, Metais P (1948). *C R Seances Soc Biol Fil* 142:241-243
129. Manser RL, Irving LB, Byrnes G, Abramson MJ, Stone CA, Campbell DA (2003) Screening for lung cancer: a systematic review and meta-analysis of controlled trials. *Thorax* 58:784-789
130. Maragkakis M, Reczko M, Simossis VA, Alexiou P, Papadopoulos GL, Dalamagas T, Giannopoulos G, Goumas G, Koukis E, Kourtis K, Vergoulis T, Koziris N, Sellis T, Tsanakas P, Hatzigeorgiou AG (2009) DIANA-microT web server: elucidating microRNA functions through target prediction. *Nucleic Acids Res* 37:W273-276
131. Margaritora S, Cesario A, Cusumano G, Dall'armi V, Porziella V, Meacci E, Lococo F, D'Angelillo R, Congedo MT, Granone P (2013) Pneumonectomy with and without induction chemo-radiotherapy for non-small cell lung cancer: short and long-term results from a single centre. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 17:29-40
132. Mascaux C, Laes JF, Anthoine G, Haller A, Ninane V, Burny A, Sculier JP (2009) Evolution of microRNA expression during human bronchial squamous carcinogenesis. *Eur Respir J* 33:352-359
133. Mazieres J, He B, You L, Xu Z, Jablons DM (2005) Wnt signaling in lung cancer. *Cancer Lett* 222:1-10
134. McCain J (2013) The MAPK (ERK) Pathway: Investigational Combinations for the Treatment Of BRAF-Mutated Metastatic Melanoma. *P T* 38:96-108

135. Meister J, Schmidt MHH (2010) miR-126 and miR-126*: new players in cancer. *ScientificWorldJournal* 10:2090-2100
136. Montani F, Marzi MJ, Dezi F, Dama E, Carletti RM, Bonizzi G, Bertolotti R, Bellomi M, Rampinelli C, Maisonneuve P, Spaggiari L, Veronesi G, Nicassio F, Di Fiore PP, Bianchi F (2015) miR-Test: a blood test for lung cancer early detection. *J Natl Cancer Inst* 107:djv063
137. Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB, Dittmer KG, Shapiro DN, Saltman DL, Look AT (1994) Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science* 263:1281-1284
138. Mountain CF, Carr DT, Anderson WA (1974) A system for the clinical staging of lung cancer. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med* 120:130-138
139. Mountain CF, Dresler CM (1997) Regional lymph node classification for lung cancer staging. *Chest* 111:1718-1723
140. Mucenski ML, Wert SE, Nation JM, Loudy DE, Huelsken J, Birchmeier W, Morrissey EE, Whitsett JA (2003) beta-Catenin is required for specification of proximal/distal cell fate during lung morphogenesis. *J Biol Chem* 278:40231-40238
141. Nakamura H, Ando K, Shinmyo T, Morita K, Mochizuki A, Kurimoto N, Tatsunami S (2011) Female gender is an independent prognostic factor in non-small-cell lung cancer: a meta-analysis. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 17:469-480
142. Naruke T, Suemasu K, Ishikawa S (1978) Lymph node mapping and curability at various levels of metastasis in resected lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 76:832-839
143. Nasim F, Sabath BF, Eapen GA (2019) Lung Cancer. *Med Clin North Am* 103:463-473
144. Ohgaki H, Kros JM, Okamoto Y, Gaspert A, Huang H, Kurrer MO (2004) APC mutations are infrequent but present in human lung cancer. *Cancer Lett* 207:197-203
145. Okada M, Yamagishi H, Satake S, Matsuoka H, Miyamoto Y, Yoshimura M, Tsubota N (2000) Survival related to lymph node involvement in lung cancer after sleeve lobectomy compared with pneumonectomy. *J Thorac Cardiovasc Surg* 119:814-819
146. Okamura K, Chung WJ, Lai EC (2008) The long and short of inverted repeat genes in animals: microRNAs, mirtrons and hairpin RNAs. *Cell Cycle* 7:2840-2845
147. Olena AF, Patton JG (2010) Genomic organization of microRNAs. *J Cell Physiol* 222:540-545
148. Oxnard GR, Paweletz CP, Kuang Y, Mach SL, O'Connell A, Messineo MM, Luke JJ, Butaney M, Kirschmeier P, Jackman DM, Janne PA (2014) Noninvasive detection of response and resistance in EGFR-mutant lung cancer using quantitative next-generation genotyping of cell-free plasma DNA. *Clin Cancer Res* 20:1698-1705
149. Paik PK, Arcila ME, Fara M, Sima CS, Miller VA, Kris MG, Ladanyi M, Riely GJ (2011) Clinical characteristics of patients with lung adenocarcinomas harboring BRAF mutations. *J Clin Oncol* 29:2046-2051
150. Park JS, Yang HC, Kim HK, Kim K, Shim YM, Choi YS, Kim J (2010) Sleeve lobectomy as an alternative procedure to pneumonectomy for non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 5:517-520
151. Pastuszak-Lewandoska D, Kordiak J, Czarnecka KH, Migdalska-Sek M, Nawrot E, Domanska-Senderowska D, Kiszalkiewicz JM, Antczak A, Gorski P, Brzezianska-Lasota E (2016) Expression analysis of three miRNAs, miR-26a, miR-29b and miR-519d, in relation to MMP-2 expression level in non-small cell lung cancer patients: a pilot study. *Med Oncol* 33:96
152. Perron MP, Provost P (2008) Protein interactions and complexes in human microRNA biogenesis and function. *Front Biosci* 13:2537-2547
153. Petrella F, Spaggiari L (2018) Postpneumonectomy syndrome: An old challenge for new technologies. *J Thorac Cardiovasc Surg* 155:e139-e140

154. Pfeifer GP, Denissenko MF, Olivier M, Tretyakova N, Hecht SS, Hainaut P (2002) Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers. *Oncogene* 21:7435-7451
155. Pigati L, Yaddanapudi SC, Iyengar R, Kim DJ, Hearn SA, Danforth D, Hastings ML, Duelli DM (2010) Selective release of microRNA species from normal and malignant mammary epithelial cells. *PLoS One* 5:e13515
156. Poli D, Carbognani P, Corradi M, Goldoni M, Acampa O, Balbi B, Bianchi L, Rusca M, Mutti A (2005) Exhaled volatile organic compounds in patients with non-small cell lung cancer: cross sectional and nested short-term follow-up study. *Respir Res* 6:71
157. Portela A, Esteller M (2010) Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol* 28:1057-1068
158. Pricopi C, Mordant P, Rivera C, Arame A, Foucault C, Dujon A, Le Pimpec Barthes F, Riquet M (2015) Postoperative morbidity and mortality after pneumonectomy: a 30-year experience of 2064 consecutive patients. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 20:316-321
159. Qadri SS, Chaudhry MA, Cale A, Cowen ME, Loubani M (2016) Short- and long-term outcomes of pneumonectomy in a tertiary center. *Asian Cardiovasc Thorac Ann* 24:250-256
160. Qin B, Shu Y, Long L, Li H, Men X, Feng L, Yang H, Lu Z (2018) MicroRNA-142-3p Induces Atherosclerosis-Associated Endothelial Cell Apoptosis by Directly Targeting Rictor. *Cell Physiol Biochem* 47:1589-1603
161. Qin X, Xu H, Gong W, Deng W (2014) The Tumor Cytosol miRNAs, Fluid miRNAs, and Exosome miRNAs in Lung Cancer. *Front Oncol* 4:357
162. Rakovich G, Bussieres J, Frechette E (2009) Postpneumonectomy syndrome. *Multimed Man Cardiothorac Surg* 2009:mmcts 2008 003475
163. Rami-Porta R, Bolejack V, Goldstraw P (2011) The new tumor, node, and metastasis staging system. *Semin Respir Crit Care Med* 32:44-51
164. Rana TM (2007) Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:23-36
165. Ranade AR, Cherba D, Sridhar S, Richardson P, Webb C, Paripati A, Bowles B, Weiss GJ (2010) MicroRNA 92a-2*: a biomarker predictive for chemoresistance and prognostic for survival in patients with small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 5:1273-1278
166. Ren M, Wang C, Sheng D, Shi Y, Jin M, Xu S (2017) Methylation analysis of SHOX2 and RASSF1A in bronchoalveolar lavage fluid for early lung cancer diagnosis. *Ann Diagn Pathol* 27:57-61
167. Riely GJ, Marks J, Pao W (2009) KRAS mutations in non-small cell lung cancer. *Proc Am Thorac Soc* 6:201-205
168. Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der Epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. Krebs in Deutschland 2013/2014. 11. Ausgabe, Berlin 2017. www.gekid.de
169. Roberts PJ, Der CJ (2007) Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* 26:3291-3310
170. Roush S, Slack FJ (2008) The let-7 family of microRNAs. *Trends Cell Biol* 18:505-516
171. Rusch VW, Crowley J, Giroux DJ, Goldstraw P, Im JG, Tsuboi M, Tsuchiya R, Vansteenkiste J, International Staging C, Cancer R, Biostatistics, Observers to the C, Participating I (2007) The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the N descriptors in the forthcoming seventh edition of the TNM classification for lung cancer. *J Thorac Oncol* 2:603-612
172. Rusch VW, Asamura H, Watanabe H, Giroux DJ, Rami-Porta R, Goldstraw P, Members of ISC (2009) The IASLC lung cancer staging project: a proposal for a new international lymph node map in the forthcoming seventh edition of the TNM classification for lung cancer. *J Thorac Oncol* 4:568-577
173. Ruvkun G (2001) Molecular biology. Glimpses of a tiny RNA world. *Science* 294:797-799

174. Sampson VB, Rong NH, Han J, Yang Q, Aris V, Soteropoulos P, Petrelli NJ, Dunn SP, Krueger LJ (2007) MicroRNA let-7a down-regulates MYC and reverts MYC-induced growth in Burkitt lymphoma cells. *Cancer Res* 67:9762-9770
175. Sawan C, Herceg Z (2010) Histone modifications and cancer. *Adv Genet* 70:57-85
176. Scaltriti M, Baselga J (2006) The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy. *Clin Cancer Res* 12:5268-5272
177. Schneeberger C, Speiser P, Kury F, Zeillinger R (1995) Quantitative detection of reverse transcriptase-PCR products by means of a novel and sensitive DNA stain. *PCR Methods Appl* 4:234-238
178. Scrima M, De Marco C, Fabiani F, Franco R, Pirozzi G, Rocco G, Ravo M, Weisz A, Zoppoli P, Ceccarelli M, Botti G, Malanga D, Viglietto G (2012) Signaling networks associated with AKT activation in non-small cell lung cancer (NSCLC): new insights on the role of phosphatidylinositol-3 kinase. *PLoS One* 7:e30427
179. Sethupathy P, Corda B, Hatzigeorgiou AG (2006) TarBase: A comprehensive database of experimentally supported animal microRNA targets. *RNA* 12:192-197
180. Shen L, Waterland RA (2007) Methods of DNA methylation analysis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 10:576-581
181. Shiota M, Fujimoto J, Semba T, Satoh H, Yamamoto T, Mori S (1994) Hyperphosphorylation of a novel 80 kDa protein-tyrosine kinase similar to Ltk in a human Ki-1 lymphoma cell line, AMS3. *Oncogene* 9:1567-1574
182. Sidransky D, Von Eschenbach A, Tsai YC, Jones P, Summerhayes I, Marshall F, Paul M, Green P, Hamilton SR, Frost P (1991) Identification of p53 gene mutations in bladder cancers and urine samples. *Science* 252:706-709
183. Siegel RL, Miller KD, Jemal A (2017) Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J Clin* 67:7-30
184. Skog J, Wurdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Sena-Estevés M, Curry WT, Jr., Carter BS, Krichevsky AM, Breakefield XO (2008) Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol* 10:1470-1476
185. Skov BG, Hogdall E, Clementsen P, Krasnik M, Larsen KR, Sorensen JB, Skov T, Mellempgaard A (2015) The prevalence of EGFR mutations in non-small cell lung cancer in an unselected Caucasian population. *APMIS* 123:108-115
186. Song Q, Liu B, Li X, Zhang Q, Cao L, Xu M, Meng Z, Wu X, Xu K (2018) MiR-26a-5p potentiates metastasis of human lung cancer cells by regulating ITGbeta8- JAK2/STAT3 axis. *Biochem Biophys Res Commun* 501:494-500
187. Song QC, Shi ZB, Zhang YT, Ji L, Wang KZ, Duan DP, Dang XQ (2014) Downregulation of microRNA-26a is associated with metastatic potential and the poor prognosis of osteosarcoma patients. *Oncol Rep* 31:1263-1270
188. Stenvang J, Silahatoglu AN, Lindow M, Elmen J, Kauppinen S (2008) The utility of LNA in microRNA-based cancer diagnostics and therapeutics. *Semin Cancer Biol* 18:89-102
189. Stewart DJ (2014) Wnt signaling pathway in non-small cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 106:djt356
190. Stroun M, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Beljanski M (1989) Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology* 46:318-322
191. Sun Y, Liu WZ, Liu T, Feng X, Yang N, Zhou HF (2015) Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis. *J Recept Signal Transduct Res* 35:600-604
192. Swanton C, Beck S (2014) Epigenetic noise fuels cancer evolution. *Cancer Cell* 26:775-776
193. Takeda S, Maeda H, Koma M, Matsubara Y, Sawabata N, Inoue M, Tokunaga T, Ohta M (2006) Comparison of surgical results after pneumonectomy and sleeve lobectomy for non-small cell

- lung cancer: trends over time and 20-year institutional experience. *Eur J Cardiothorac Surg* 29:276-280
194. Tan CS, Gilligan D, Pacey S (2015) Treatment approaches for EGFR-inhibitor-resistant patients with non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol* 16:e447-e459
 195. Trang P, Medina PP, Wiggins JF, Ruffino L, Kelnar K, Omotola M, Homer R, Brown D, Bader AG, Weidhaas JB, Slack FJ (2010) Regression of murine lung tumors by the let-7 microRNA. *Oncogene* 29:1580-1587
 196. Travis WD, Giroux DJ, Chansky K, Crowley J, Asamura H, Brambilla E, Jett J, Kennedy C, Rami-Porta R, Rusch VW, Goldstraw P, International Staging C, Participating I (2008) The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the inclusion of broncho-pulmonary carcinoid tumors in the forthcoming (seventh) edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *J Thorac Oncol* 3:1213-1223
 197. Travis WD (2011) Pathology of lung cancer. *Clin Chest Med* 32:669-692
 198. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JHM, Beasley MB, Chirieac LR, Dacic S, Duhig E, Flieder DB, Geisinger K, Hirsch FR, Ishikawa Y, Kerr KM, Noguchi M, Pelosi G, Powell CA, Tsao MS, Wistuba I, Panel WHO (2015) The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. *J Thorac Oncol* 10:1243-1260
 199. Tsuchida N, Ryder T, Ohtsubo E (1982) Nucleotide sequence of the oncogene encoding the p21 transforming protein of Kirsten murine sarcoma virus. *Science* 217:937-939
 200. Turchinovich A, Weiz L, Langheinz A, Burwinkel B (2011) Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res* 39:7223-7233
 201. UICC (1968). International Union Against Cancer: TNM Classification of malignant tumours. Geneva; 1968
 202. UICC (1975). TNM Classification of malignant tumors 2nd. (Geneva; 1975)
 203. Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO (2007) Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 9:654-659
 204. Valencia-Sanchez MA, Liu J, Hannon GJ, Parker R (2006) Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes Dev* 20:515-524
 205. Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT (2011) MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol* 13:423-433
 206. Vishnubalaji R, Hamam R, Abdulla MH, Mohammed MA, Kassem M, Al-Obeed O, Aldahmash A, Alajez NM (2015) Genome-wide mRNA and miRNA expression profiling reveal multiple regulatory networks in colorectal cancer. *Cell Death Dis* 6:e1614
 207. Vlachos IS, Paraskevopoulou MD, Karagkouni D, Georgakilas G, Vergoulis T, Kanellos I, Anastasopoulos IL, Maniou S, Karathanou K, Kalfakakou D, Fevgas A, Dalamagas T, Hatzigeorgiou AG (2015a) DIANA-TarBase v7.0: indexing more than half a million experimentally supported miRNA:mRNA interactions. *Nucleic Acids Res* 43:D153-159
 208. Vlachos IS, Zagganas K, Paraskevopoulou MD, Georgakilas G, Karagkouni D, Vergoulis T, Dalamagas T, Hatzigeorgiou AG (2015b) DIANA-miRPath v3.0: deciphering microRNA function with experimental support. *Nucleic Acids Res* 43:W460-466
 209. Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M, Prueitt RL, Yanaihara N, Lanza G, Scarpa A, Vecchione A, Negrini M, Harris CC, Croce CM (2006) A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:2257-2261
 210. Wang C, Fei G, Liu Z, Li Q, Xu Z, Ren T (2012) HMGB1 was a pivotal synergistic effector for CpG oligonucleotide to enhance the progression of human lung cancer cells. *Cancer Biol Ther* 13:727-736

211. Wang J, Ito T, Udaka N, Okudela K, Yazawa T, Kitamura H (2005) PI3K-AKT pathway mediates growth and survival signals during development of fetal mouse lung. *Tissue Cell* 37:25-35
212. Wang K, Zhang S, Weber J, Baxter D, Galas DJ (2010) Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 38:7248-7259
213. Wang K, Chen M, Wu W (2017) Analysis of microRNA (miRNA) expression profiles reveals 11 key biomarkers associated with non-small cell lung cancer. *World J Surg Oncol* 15:175
214. Wang S, Aurora AB, Johnson BA, Qi X, McAnally J, Hill JA, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN (2008) The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis. *Dev Cell* 15:261-271
215. Watanabe K, Sakamaki K, Nishii T, Yamamoto T, Maehara T, Nakayama H, Masuda M (2018) Gender Differences in the Recurrence Timing of Patients Undergoing Resection for Non-Small Cell Lung Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 19:719-724
216. 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
217. World Health Organization (WHO) (2016) Regional Office for Europe. Data and publications. European health for all database (HFA-DB)
218. Wittekind C (2010) [2010 TNM system: on the 7th edition of TNM classification of malignant tumors]. *Pathologie* 31:331-332
219. Wittekind CH, Meyer HJ (eds) (2010) TNM Klassifikation maligner Tumoren. 7th ed. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.KGaa, Weinheim
220. Wong DW, Leung EL, So KK, Tam IY, Sihoe AD, Cheng LC, Ho KK, Au JS, Chung LP, Pik Wong M, University of Hong Kong Lung Cancer Study G (2009) The EML4-ALK fusion gene is involved in various histologic types of lung cancers from nonsmokers with wild-type EGFR and KRAS. *Cancer* 115:1723-1733
221. Wu MY, Hill CS (2009) Tgf-beta superfamily signaling in embryonic development and homeostasis. *Dev Cell* 16:329-343
222. Xiao P, Liu WL (2015) MiR-142-3p functions as a potential tumor suppressor directly targeting HMGB1 in non-small-cell lung carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol* 8:10800-10807
223. Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, Seike M, Kumamoto K, Yi M, Stephens RM, Okamoto A, Yokota J, Tanaka T, Calin GA, Liu CG, Croce CM, Harris CC (2006) Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell* 9:189-198
224. Yang F (2018) The expression and mechanism of Sirt1 and AMPK in nonsmall cell lung cancer. *J BUON* 23:106-110
225. Yang M, Liu R, Sheng J, Liao J, Wang Y, Pan E, Guo W, Pu Y, Yin L (2013) Differential expression profiles of microRNAs as potential biomarkers for the early diagnosis of esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 29:169-176
226. Yoshida Y, Murayama T, Sato Y, Suzuki Y, Saito H, Nomura Y (2016) Gender Differences in Long-Term Survival after Surgery for Non-Small Cell Lung Cancer. *Thorac Cardiovasc Surg* 64:507-514
227. Yu S, Qin X, Chen T, Zhou L, Xu X, Feng J (2017) MicroRNA-106b-5p regulates cisplatin chemosensitivity by targeting polycystic kidney disease-2 in non-small-cell lung cancer. *Anticancer Drugs* 28:852-860
228. Zhang B, Liu XX, He JR, Zhou CX, Guo M, He M, Li MF, Chen GQ, Zhao Q (2011a) Pathologically decreased miR-26a antagonizes apoptosis and facilitates carcinogenesis by targeting MTDH and EZH2 in breast cancer. *Carcinogenesis* 32:2-9
229. Zhang Y, Wang R, Song H, Huang G, Yi J, Zheng Y, Wang J, Chen L (2011b) Methylation of multiple genes as a candidate biomarker in non-small cell lung cancer. *Cancer Lett* 303:21-28

230. Zhang YL, Yuan JQ, Wang KF, Fu XH, Han XR, Threapleton D, Yang ZY, Mao C, Tang JL (2016) The prevalence of EGFR mutation in patients with non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget* 7:78985-78993
231. Zhao Z, Qin L, Li S (2016) miR-411 contributes the cell proliferation of lung cancer by targeting FOXO1. *Tumour Biol* 37:5551-5560
232. Zhong M, Ma X, Sun C, Chen L (2010) MicroRNAs reduce tumor growth and contribute to enhance cytotoxicity induced by gefitinib in non-small cell lung cancer. *Chem Biol Interact* 184:431-438
233. Zhou R, Zhou X, Yin Z, Guo J, Hu T, Jiang S, Liu L, Dong X, Zhang S, Wu G (2016) MicroRNA-574-5p promotes metastasis of non-small cell lung cancer by targeting PTPRU. *Sci Rep* 6:35714
234. Zhu W, Qin W, Atasoy U, Sauter ER (2009) Circulating microRNAs in breast cancer and healthy subjects. *BMC Res Notes* 2:89
235. Zhu X, Ma SP, Yang D, Liu Y, Wang YP, Lin T, Li YX, Yang SH, Zhang WC, Wang XL (2018) miR-142-3p Suppresses Cell Growth by Targeting CDK4 in Colorectal Cancer. *Cell Physiol Biochem* 51:1969-1981
236. Zimmer S, Kahl P, Buhl TM, Steiner S, Wardelmann E, Merkelbach-Bruse S, Buettner R, Heukamp LC (2009) Epidermal growth factor receptor mutations in non-small cell lung cancer influence downstream Akt, MAPK and Stat3 signaling. *J Cancer Res Clin Oncol* 135:723-730

9 Danksagung

Ich möchte mich auf diesem Wege bei allen Beteiligten bedanken, ohne deren Mithilfe die Anfertigung dieser Dissertation nicht zustande gekommen wäre:

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. H. Huwer für die Überlassung des Promotionsthemas, für die Betreuung und für seine wissenschaftliche und methodische Unterstützung.

Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr. rer. nat. Eckart Meese für die Bereitstellung des Laborplatzes im Institut für Humangenetik der Universität des Saarlandes in Homburg.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. Masood Abu-Halima für Betreuung und Unterstützung in der Bearbeitung der Blutproben und der Auswertung der Ergebnisse.

Ich danke Frau Dr. rer. nat. Nicole Ludwig für die Hilfe bei der Durchführung der Microarrays. Ebenfalls möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Andreas Keller für die statistische Auswertung der klinischen Daten bedanken.

Auch meinen Freunden und Kollegen bin ich dankbar für alle Hilfe und Unterstützung.

Ein besonderer Dank gilt meiner lieben Familie, meinen Kindern, meiner Frau, meinen Eltern und meiner Schwester für ihre Unterstützung und ihr Verständnis.