

Aus der Klinik für Neurochirurgie  
der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Oertel

# **Über die Korrelation spezifischer micro-RNAs in Tumor und Plasma von Glioblastom Patienten**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES  
2022**

vorgelegt von

**Alexander Quiring**

geb. am: 15.10.1997 in Saarbrücken

*Für meine Eltern*

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>3</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>6</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>7</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS</b>	<b>8</b>
<b>1 ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>9</b>
<b>2 EINLEITUNG</b>	<b>13</b>
<b>2.1 Epidemiologie und Ätiologie</b>	<b>13</b>
<b>2.2 Klinik und Diagnose</b>	<b>13</b>
<b>2.3 Erkrankungsverlauf und Therapieoptionen</b>	<b>14</b>
2.3.1 Standardtherapie	15
2.3.2 Carmustin-Wafer	16
2.3.3 Tumortheraiefelder	16
2.3.4 Supportive Care	17
<b>2.4 Epigenetische Modifikationen</b>	<b>17</b>
2.4.1 DNA-Methylierung	17
2.4.1.1 Methylierung des MGMT-Promotors im Glioblastom	18
<b>2.5 MicroRNA</b>	<b>18</b>
2.5.1 Entdeckung und Biogenese	18
2.5.2 Bedeutung in der Tumorgenese	19
2.5.3 MicroRNAs im Glioblastom	19
2.5.3.1 MiRNA-26a	19
2.5.3.2 MiRNA-181d	20
<b>2.6 Liquid Biopsy</b>	<b>20</b>
<b>3 EIGENE FRAGESTELLUNG</b>	<b>22</b>
<b>4 MATERIAL UND METHODIK</b>	<b>23</b>

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>4</b>	
<hr/>		
<b>4.1</b>	<b>Untersuchungsmaterialien</b>	<b>23</b>
4.1.1	Blutproben	23
4.1.2	Gewebeproben	24
<b>4.2</b>	<b>Material- und Herstellernachweis</b>	<b>27</b>
<b>4.3</b>	<b>Plasmagewinnung aus Vollblut</b>	<b>28</b>
<b>4.4</b>	<b>Isolation der RNA inklusive miRNA aus Plasma</b>	<b>28</b>
<b>4.5</b>	<b>Isolation der RNA inklusive miRNA aus Tumorgewebe</b>	<b>30</b>
<b>4.6</b>	<b>Konzentrationsbestimmung der RNA mittels NanoDrop</b>	<b>32</b>
<b>4.7</b>	<b>Bestimmung der miRNA-Expression mittels quantitativer Real-Time PCR</b>	<b>33</b>
4.7.1	Reverse Transkription	33
4.7.2	Quantitative Real-Time PCR	35
<b>4.8</b>	<b>Auswertung der qPCR</b>	<b>38</b>
<b>4.9</b>	<b>Ausmessen des Tumolvolumens im MRT</b>	<b>38</b>
<b>4.10</b>	<b>Bestimmung des Methylierungsstatus des Promoters des <i>MGMT</i>-Gens</b>	<b>39</b>
<b>4.11</b>	<b>Bestimmung des Mutationsstatus des <i>IDH1</i>-Gens</b>	<b>40</b>
<b>4.12</b>	<b>Laboranalyse</b>	<b>40</b>
<b>4.13</b>	<b>Medikamentenanalyse</b>	<b>40</b>
<b>4.14</b>	<b>TCGH-Datensatz</b>	<b>40</b>
<b>4.15</b>	<b>Statistische Analyse</b>	<b>41</b>
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>42</b>
<b>5.1</b>	<b>Patientenkollektiv</b>	<b>42</b>
<b>5.2</b>	<b>miRNA-26a und -181d Expression im Plasma von GBM-Patienten und der Kontrollgruppe</b>	<b>43</b>
<b>5.3</b>	<b>Bestimmung des miRNA-Profiles in Tumor und Plasma</b>	<b>44</b>
<b>5.4</b>	<b>Korrelation der Expression von miRNA-181d im Tumor und Plasma</b>	<b>45</b>
<b>5.5</b>	<b>Korrelation der Expression von miRNA-26a im Tumor und Plasma</b>	<b>45</b>
<b>5.6</b>	<b>Korrelation der miRNA-Expressionen mit klinischen Variablen</b>	<b>46</b>

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>5</b>
<hr/>	
<b>5.7 Korrelation der miRNA Expression mit verschiedenen Plasma-Parametern</b>	<b>47</b>
<b>5.8 Korrelation der miRNA Expressionen im Plasma mit der Einnahme von Dexamethason</b>	<b>48</b>
<b>5.9 Vergleich der miRNA Expressionen im Plasma mit dem Tumolvolumen</b>	<b>48</b>
<b>5.10 Validierung mittels TCGA-Datensatz</b>	<b>48</b>
<b>6 DISKUSSION</b>	<b>50</b>
<b>6.1 Diskussion der Methodik</b>	<b>50</b>
6.1.1 Patientenkollektiv	50
6.1.2 miRNA Analyse	51
6.1.3 Methoden zur miRNA Expressionsanalyse	51
<b>6.2 Diskussion der Ergebnisse</b>	<b>52</b>
6.2.1 Expression von miRNA-181d und -26a im Plasma von GBM-Patienten und Kontrollprobanden	52
6.2.2 Große Spannweite der Expressionswerte im Plasma	53
6.2.3 Korrelation der miRNA-181d und -26a Expressionen in Plasmaproben und Tumorgewebe	53
6.2.4 Beeinflussung der miRNA Expression durch Komorbiditäten und Steroideinnahme	54
6.2.5 Einfluss der Tumorgröße auf die Expression von miRNA-181d und -26a im Plasma	55
6.2.6 Einfluss der Expressionen von miRNA-181d und -26a auf das Überleben der Patienten	56
6.2.7 Vergleich der Überlebensdaten mit den TCGA-Daten	56
6.2.8 Weitere klinische Parameter	56
<b>7 FAZIT</b>	<b>58</b>
<b>8 AUSBLICK</b>	<b>59</b>
<b>9 LITERATURVERZEICHNIS:</b>	<b>60</b>
<b>10 PUBLIKATIONEN</b>	<b>71</b>
<b>11 DANKSAGUNG</b>	<b>72</b>

## **Abkürzungsverzeichnis**

<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>BCNU</b>	Carmustin
<b>cDNA</b>	complementary DNA
<b>cfDNA</b>	cell free DNA
<b>C<sub>T</sub>-Wert</b>	Cycle of Threshold (Schwellenwertzyklus)
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>DNMT</b>	DNA-Methyltransferase
<b>dNTP</b>	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<b>FC</b>	Fold change
<b>GBM</b>	Glioblastoma multiforme
<b>GTR</b>	gross total resection
<b>Gy</b>	Gray
<b>IDH</b>	Isozitatdehydrogenase
<b>KM</b>	Kontrastmittel
<b>MGMT</b>	O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase
<b>miRNA</b>	microRNA
<b>MRT</b>	Magnetresonanztomographie
<b>OS</b>	overall survival (Gesamtüberleben)
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
<b>PFS</b>	progression-free survival
<b>PTEN</b>	phosphatase and tensin homolog
<b>RB1</b>	Retinoblastom-Protein 1
<b>RISC</b>	RNA-induced silencing complex
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>RT-qPCR</b>	quantitative Real-Time PCR
<b>Tab.</b>	Tabelle
<b>TCGA</b>	The Cancer Genome Atlas
<b>TMZ</b>	Temozolomid
<b>TTFields</b>	Tumor Treating Fields (Tumortheraiefelder)
<b>WHO</b>	World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 01:</b> MRT Bildgebung eines Glioblastoma multiforme	14
<b>Abb. 02:</b> Konkomitante Radiochemotherapie nach Stupp-Protokoll	15
<b>Abb. 03:</b> RNA-Isolation aus menschlichem Blutplasma mittels miRNeasy Serum/Plasma Kit	29
<b>Abb. 04:</b> RNA-Isolation aus menschlichem Tumormaterial mittels miRNeasy Mini Kit	31
<b>Abb. 05:</b> Absorptionsverlauf einer Nukleinsäuren-Probe und möglicher Kontaminationen	32
<b>Abb. 06:</b> PCR-Zyklus	33
<b>Abb. 07:</b> TaqMan™ miRNA-spezifische stem loop-Primer	34
<b>Abb. 08:</b> Funktionsprinzip der TaqMan™ Sonde	36
<b>Abb. 09:</b> Schema der 96-Well Platte	37
<b>Abb. 10:</b> Ausmessen des Tumordurchmessers mittels IDS 7	39
<b>Abb. 11:</b> Geschlechtsverteilung innerhalb der Patienten mit einer Glioblastom-Erkrankung	42
<b>Abb. 12:</b> Anteil der Patienten mit Progress, sowie der Verstorbenen zum Zeitpunkt der Erfassung der klinischen Daten	42
<b>Abb. 13:</b> Vergleich der Expressionen von miRNA-181d und -26a im Plasma der Kontrollgruppe und der GBM-Patienten	44
<b>Abb. 14:</b> Zusammenhang zwischen der Expression von miRNA-181d in Plasma und Tumor	45
<b>Abb. 15:</b> Zusammenhang zwischen der Expression von miRNA-26a in Plasma und Tumor	46
<b>Abb. 16:</b> TCGA-Referenzdaten zur Länge des Gesamtüberlebens in Bezug auf die Expression von miRNA-181d und -26a	49

---

**Tabellenverzeichnis**

<b>Tab. 01:</b> Blut- und Tumorgewebeproben von Glioblastom-Patienten	24
<b>Tab. 02:</b> Blutproben von gesunden Probanden	26
<b>Tab. 03:</b> Chemikalien, Enzyme, Kits und Verbrauchsmaterialien	27
<b>Tab. 04:</b> Geräte	27
<b>Tab. 05:</b> TaqMan™ MicroRNA Assay	34
<b>Tab. 06:</b> Ablauf der Reversen Transkription	34
<b>Tab. 07:</b> Zyklen der RT-qPCR	37
<b>Tab. 08:</b> Normalisierte Expression von miRNA-181d und -26a in Plasma und Tumorgewebe	44
<b>Tab. 09:</b> Details der Blutuntersuchungen	47

# 1 Zusammenfassung

Das Glioblastoma multiforme ist der häufigste primäre Hirntumor. Die Erkrankung verläuft oftmals sehr aggressiv und die Prognose der Patienten ist äußerst schlecht. Die seit Jahren unveränderte Standardtherapie besteht in einer möglichst radikalen Resektion in Kombination mit einer konkomitanten Radiochemotherapie. Zusätzlich steht die Implantation von Carmustin-Wafern zur Verfügung. Der Nutzen dieser Therapie ist jedoch umstritten. Die Expression der microRNAs-181d und -26a im Tumor korrelierte in Vorstudien mit dem Ansprechen auf eine derartige Therapie. Bislang war eine Bestimmung dieser Marker jedoch nur postoperativ möglich. Die Entscheidung für oder gegen die Implantation der Wafer muss jedoch zwangsläufig präoperativ erfolgen. Ziel der vorliegenden Arbeit war daher, die Expression jener microRNAs in präoperativen Blutproben im Vergleich zur Expression im Tumorgewebe zu untersuchen, da die präoperative Messbarkeit eine wichtige Grundlage zur Verwendung dieser microRNAs im Rahmen einer präoperative Therapie-Stratifizierung darstellt.

Es wurden 60 Patienten mit einem neu diagnostizierten Glioblastoma multiforme in die Untersuchungen eingeschlossen. Die Patienten wurden zwischen 2018 und 2020 therapiert und rekrutiert. Präoperativ wurde Blut abgenommen und das Plasma isoliert. Tumorproben wurden während der Tumorresektion gewonnen. Blutproben von 30 gesunden Individuen dienten als Referenzgruppe. MicroRNA-181d und -26a Expressionen in Plasma und Tumorgewebe wurden in Form von Fold Changes mittels quantitativer Real-Time PCR ermittelt. Die Ergebnisse wurden mit dem Resektionsumfang, dem Tumorumfang, sowie weiteren klinischen, demographischen, histopathologischen und molekulargenetischen Aspekten der Kohorte korreliert. Darüber hinaus wurden Korrelationen zwischen den Expressionen von miRNA-181d und -26a und verschiedenen Laborwerten, wie CRP, Leukozytenzahl, Leber- und Nierenwerten, Schilddrüsenwerten, Hämoglobin und Thrombozytenzahl untersucht. Auch ein Zusammenhang zwischen der präoperativen Einnahme von Dexamethason und der Expression jener miRNAs wurde betrachtet.

Im Vergleich mit gesunden Individuen zeigten Patienten mit einem Glioblastom eine signifikante Überexpression von microRNA-181d und -26a im Blutplasma ( $p = 0,029$ ;  $p = 0,042$ ). Die Fold Changes von miRNA-181d und -26a im Tumorgewebe betragen  $0,282 \pm 0,191$  und  $4,359 \pm 6,43$ . Die Fold Changes im Blutplasma der Glioblastom-Patienten betragen  $0,00039 \pm 0,00066$  und  $0,012 \pm 0,036$ . Es konnte eine signifikante Korrelation zwischen der miRNA-181d Expression in Tumorgewebe und Plasma gezeigt werden ( $p = 0,001$ ,  $R = 0,51$ ). Die miRNA-26a betreffend konnte keine derartige Korrelation beobachtet werden. Zwischen den Expressionen von miRNA-181d und -26a und den untersuchten Laborwerten konnte keine signifikante Korrelation festgestellt werden. Auch zwischen den microRNA

Expressionen und der Dexamethason-Einnahme, sowie der Tumorgröße konnten keine signifikante Korrelation detektiert werden.

Die MicroRNA-181d lässt sich reliabel in Blutproben von Patienten mit Glioblastoma multiforme detektieren und ihre Expression korreliert in Plasma und Tumorproben. Die Expression zeigt außerdem keinen Zusammenhang zu den weiteren untersuchten Laborparametern, welche auf Entzündungsprozesse oder Veränderungen in der Aktivität bestimmter Organe hindeuten können. Sie erfüllt damit wichtige Grundvoraussetzungen für einen potentiellen präoperativen Biomarker und sollte in einer weiteren prospektiven Studie auf ihre Anwendbarkeit zur Therapie-Stratifizierung von Carmustin-Wafern überprüft werden.

## Summary

Glioblastoma multiforme is the most common primary brain tumor. The disease progresses very aggressively and the prognosis of the patients is very poor. The standard therapy, which hasn't changed for years, consists of most radical resection in combination with concomitant radiochemotherapy. In addition, the implantation of carmustin-wafers is available. The use of this therapy however is controversial. In previous studies the expressions of microRNA-181d and -26a in tumor correlated with the response to such a therapy. The aim of the study at hand was to compare the expressions of those microRNAs in preoperative blood samples with the expressions in tumor specimens because the preoperative measurability is an important foundation for the usage of those microRNAs in the context of a preoperative therapy-stratification.

60 patients with a newly diagnosed glioblastoma multiforme were included in the investigations. The patients were treated and recruited between 2018 and 2020. Preoperatively blood was drawn and the plasma was isolated. Tumor specimens were collected during tumor resection. Blood samples from 30 healthy individuals served as reference group. Micro-RNA-181d and 26a expressions in plasma and tumor tissue were detected as fold change, using quantitative Real-Time PCR. The results were correlated with the extent of resection, the tumor volume, as well as other clinical, demographic, histopathological and molecular genetic aspects of the cohort. Furthermore, the expressions of microRNA-181d and -26a were correlated with various laboratory parameters such as CRP, leukocyte count, liver and kidney values, thyroid values, hemoglobin and platelet count. A relation between the preoperative intake of dexamethasone and the expressions of those microRNAs was also examined.

In comparison with healthy individuals, patients with glioblastoma showed a significant overexpression of miRNA-181d and -26a within blood plasma ( $p = 0,029$ ;  $p = 0,042$ ). Fold changes of miRNA-181d and -26a in tumor tissue were  $0,282 \pm 0,191$  and  $4,359 \pm 6,43$  respectively. Fold changes in blood plasma of glioblastoma patients were  $0,00039 \pm 0,00066$  and  $0,012 \pm 0,036$  respectively. Consecutively expression levels of both miRNAs in plasma were massively below the expression in the corresponding tumor samples. A significant correlation between miRNA-181d expression in tumor tissue and plasma ( $p = 0,001$ ,  $R = 0,51$ ) could be shown. Concerning miRNA-26a no such correlation could be observed. There was no significant correlation detected between the expressions of microRNA-181d and -26a and the analyzed laboratory parameters. In addition, no significant correlation between the microRNA expressions and the intake of dexamethasone or the tumor volume could be detected.

MicroRNA-181d can be reliably detected in blood samples of patients suffering from glioblastoma multiforme and its expression correlated between plasma and tumor samples. Furthermore, there was no

significant connection with the examined laboratory parameters, which can suggest inflammatory processes or a change in the activity of certain organs. Therewith it meets important prerequisites for a potential preoperative biomarker and should be examined in a prospective study for its usability in the therapy-stratification of carmustin-wafers.

## 2 Einleitung

### 2.1 Epidemiologie und Ätiologie

Das Glioblastoma multiforme (GBM) ist der häufigste hirneigene Tumor des Menschen [57]. Die Erkrankung verläuft häufig sehr aggressiv und hat eine schlechte Prognose [73]. Die Inzidenz liegt bei 3-4 pro 100,000 Einwohnern [107]. Das GBM kann in jedem Alter auftreten, häuft sich jedoch zwischen dem 50. und 60. Lebensjahr und tritt bei Männern öfter auf (1,2-1,9:1) [20]. en

Zur Entstehung des GBMs werden verschiedene Theorien diskutiert. Einige sehen den Ursprung in entarteten Astrozyten, andere in neuronalen Stamm- und Progenitorzellen im Sinne von Tumorstammzellen [79]. Nach der neuen Klassifikation der Tumoren des Zentralen Nervensystems der World Health Organisation (WHO) aus dem Jahr 2016 werden Glioblastome nach dem Mutationsstatus der Isozitatdehydrogenase1 (IDH1) und Isozitatdehydrogenase2 (*IDH2*) -Gene unterteilt. Ein Großteil der Tumoren (90%) weist einen *IDH* Wildtyp auf. Diese Gruppe korrespondiert mit dem klinisch definierten primären Glioblastom, welches „de novo“ entsteht. Darüber hinaus findet sich eine kleinere Gruppe an Tumoren (10%) mit einer Mutation dieser Gene. Diese Gruppe korreliert häufig mit den sogenannten sekundären Glioblastomen, welche sich aus weniger malignen Astrozytomen entwickeln [58]. Die meisten Glioblastome sind im Großhirn lokalisiert und bevorzugen Frontal- und Temporallappen als Entstehungsort [22]. Die Tumoren breiten sich infiltrativ wachsend aus und können auch auf die gegenüberliegende Großhirnseite übergreifen.

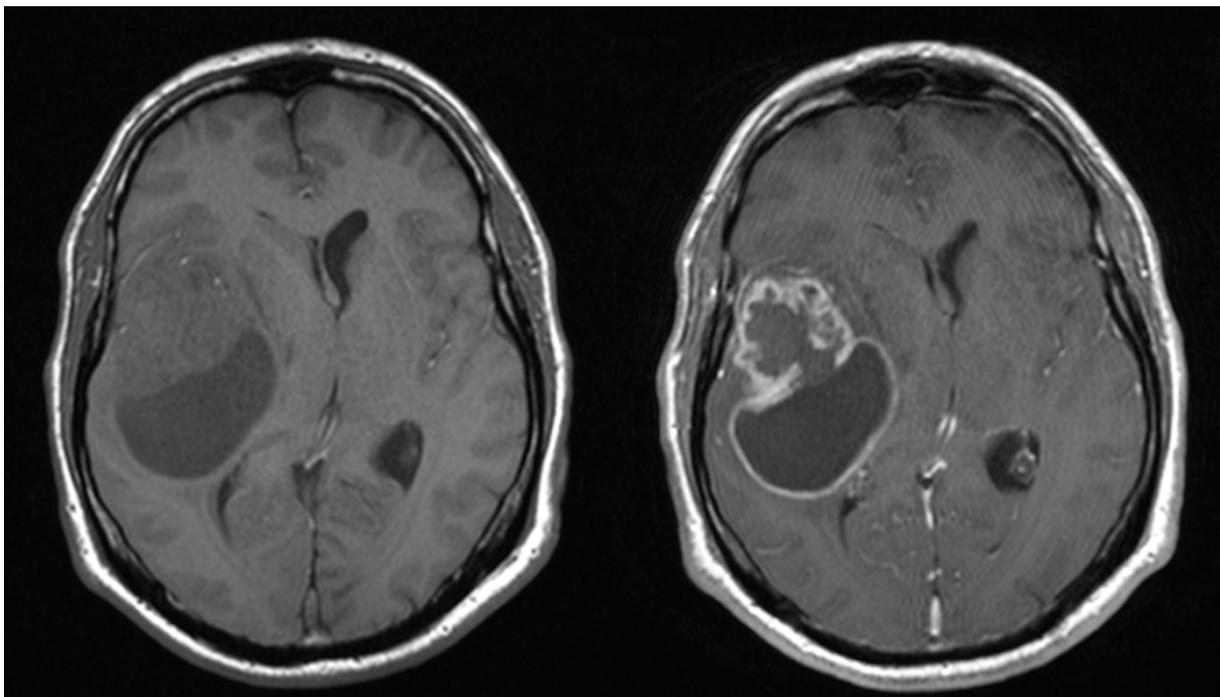
Eindeutige Risikofaktoren, welche zur Entstehung des GBMs beitragen, sind bislang weitgehend unbekannt. Einige Prädispositionen, welche mit einer erhöhten Inzidenz einhergehen könnten, wurden jedoch in verschiedenen Studien beschrieben. So prädisponieren beispielsweise bestimmte hereditäre Tumorsyndrome wie das Turcot- und das Li-Fraumeni-Syndrom für die Entstehung von Hirntumoren [72]. Ein Zusammenhang zwischen der Nutzung von Mobiltelefonen, wie er gelegentlich in den Medien thematisiert wird, konnte jedoch bisher nicht zweifelsfrei belegt werden [2,69]. Der einzige Risikofaktor, dessen Einfluss auf die Hirntumorgenese bisher sicher nachgewiesen werden konnte, ist die Anwendung von ionisierender Strahlung [72]. Gezeigt hat sich dies insbesondere bei Kindern und Jugendlichen, welche im Rahmen der Therapie einer akuten Lymphatischen Leukämie einer Ganzhirnbestrahlung unterzogen wurden. Die zeigten im Erwachsenenalter ein signifikant erhöhtes GBM-Risiko [71,72].

### 2.2 Klinik und Diagnose

Die initiale klinische Erscheinung ist vielfältig. Es können verschiedene neurologische Symptome wie Krampfanfälle, Dysarthrien, Aphasien, Lähmungen, Sehstörungen oder Wesensveränderungen

auftreten, welche von der Tumorlokalisation abhängig sind [4]. Zu Beginn präsentiert sich die Erkrankung gelegentlich auch nur mit Kopfschmerzen und Übelkeit. Als klassische Spätsymptome zeigen sich Hirndruckzeichen, wie Stauungspapillen oder morgendliches Nüchternbrechen.

Aktuell ist die Magnetresonanztomographie (MRT) die Methode der ersten Wahl zum Nachweis von Hirntumoren. In T1-gewichteten Sequenzen stellt sich das GBM hypointens zur weißen Substanz dar. Oftmals ist das Signal schlecht abgrenzbar und es kommen Nekrosen sowie Zysten zur Darstellung. Nach der Gabe eines Gadolinium-haltigen Kontrastmittels findet sich meist ein für das GBM typisches randständiges, girlandenförmiges Kontrastmittel (KM)-Enhancement als Zeichen der Destruktion der Blut-Hirn-Schranke (Abb. 1). Durch die raumfordernde Wirkung des Tumors kann es zu Mittellinienverlagerungen und Verlegungen der Liquorräume kommen.



**Abbildung 1: MRT Bildgebung eines Glioblastoma multiforme**

a) T1-gewichtete Aufnahme eines Patienten mit Glioblastoma multiforme

b) T1-gewichtete Aufnahme nach KM-Gabe desselben Patienten. Die Raumforderung ist nun deutlich besser abgrenz- und charakterisierbar.

Die Bestätigung der Verdachtsdiagnose erfolgt mittels neuropathologischer Begutachtung des entfernten Tumorgewebes anhand der WHO-Klassifikation der Hirntumore von 2016.

### 2.3 Erkrankungsverlauf und Therapieoptionen

Der Erkrankungsverlauf ist abhängig vom Alter bei Erstdiagnose und dem Ausmaß der Tumorresektion [86,98]. Außerdem beeinflusst der Mutationsstatus des *IDH1*-Gens die Prognose stark [34]. Besonders Patienten mit einer R132H-Mutation zeigen ein verlängertes Überleben. Ohne Therapie beträgt das

mittlere Überleben etwa drei Monate [45]. Unter aktueller Standardtherapie beträgt die mittlere Überlebensdauer etwa 15 Monate [9,96].

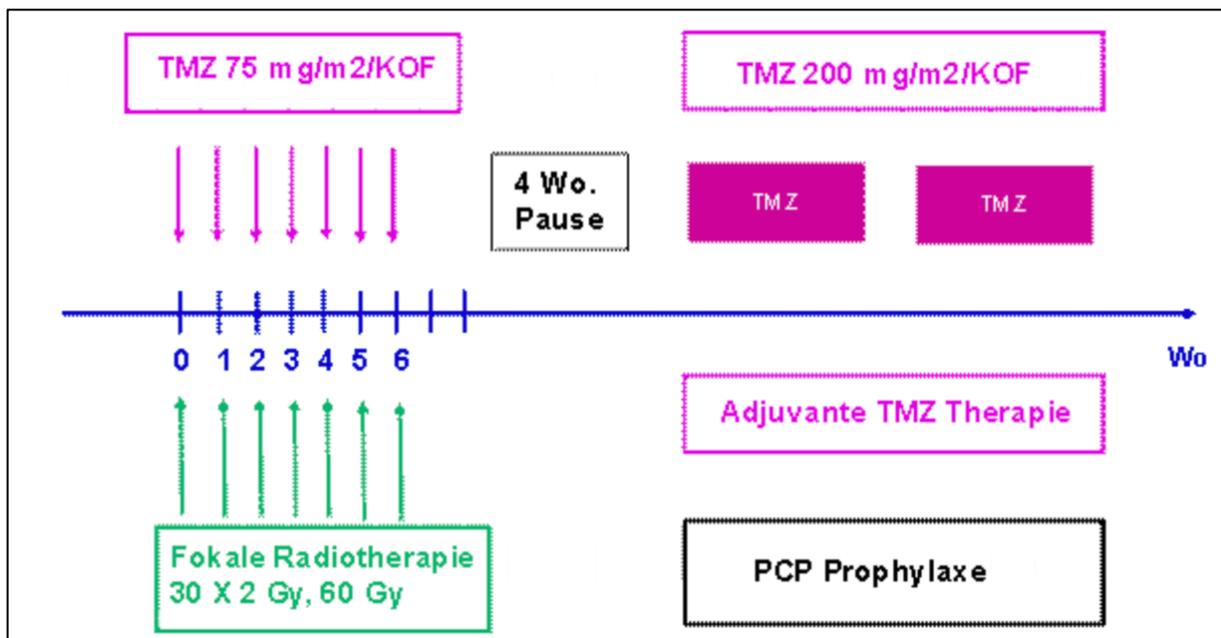
### 2.3.1 Standardtherapie

Die Standardtherapie basiert auf einem multimodalen Therapieregime, bestehend aus möglichst radikaler Tumorresektion und einer anschließenden konkomitanten Radiochemotherapie (Stupp-Schema) mit Temozolomid (TMZ), einem alkylierenden Zytostatikum [96].

Hierbei erfolgt zunächst eine postoperative Bestrahlung mit einer Gesamtdosis von 55 bis 60 Gray (Gy). Für diese Dosis konnte ein klarer Überlebensvorteil nachgewiesen werden [11,103]. Eine weitere Dosiseskala­tion brachte jedoch keine Vorteile [50,90]. Die Gesamtstrahlendosis wird in 30 Einzeldosen zu je 1,8-2 Gy über einen Zeitraum von sechs Wochen appliziert (5 Tage/Woche) [96]. Parallel dazu erhalten die Patienten eine Therapie mit niedrig dosiertem Temozolomid (75 mg/m<sup>2</sup>/KOF).

Nach einer vierwöchigen Pause erfolgen sechs Behandlungszyklen à 28 Tagen mit 150-200 mg/m<sup>2</sup>/KOF TMZ an jeweils 5 Behandlungstagen (5/23-Zyklus) (Abbildung 2).

Im Vergleich zur reinen Radiotherapie konnte die mediane Überlebenszeit der Patienten durch den Einsatz von TMZ und damit konkomitanter Therapie, von 12,1 auf 14,6 Monate gesteigert werden [96].



**Abbildung 2: Konkomitante Radiochemotherapie nach Stupp-Protokoll [66]**

Die Patienten werden zunächst über 6 Wochen mit insgesamt 60 Gy bestrahlt und konkomitant mit Temozolomid chemotherapiert. Nach einer 4-wöchigen Pause erfolgt eine adjuvante Temozolomid-Therapie.

### 2.3.2 Carmustin-Wafer

Als weitere Therapieoption steht die Implantation von Carmustin elutierenden Wafern zur Verfügung. Bei den Wafern handelt es sich um Polymerimplantate, die den Wirkstoff Bis-Chlorethyl-Nitrosourea (BCNU) freisetzen. Ähnlich wie TMZ gehört auch BCNU zur Gruppe der Alkylanzien. Ein solches Implantat hat eine Dicke von 1mm und einen Durchmesser von 14mm. Nach erfolgter Resektion werden bis zu acht solcher Implantate in die Resektionshöhle eingelegt, um den Effekt der Chemotherapie im an die Resektionshöhle angrenzenden Hirngewebe zu erhöhen [53]. Dieser Ansatz ermöglicht eine höhere Konzentration des Chemotherapeutikums durch Umgehen der Blut-Hirn-Schranke [111].

Der Nutzen dieser lokalen Carmustin-Therapie ist umstritten. Anfängliche Studien berichteten von einem verlängerten Gesamtüberleben [23,108]. Eine spätere multizentrische Studie konnte jedoch keine Unterschiede zwischen Patienten, die mit Stupp-Schema und Carmustin-Wafer-Implantation behandelt wurden und solchen, die nur nach Stupp-Schema behandelt wurden, im Hinblick auf das Überleben aufzeigen [74]. Zusätzlich kann die Wafer-Implantation Komplikationen wie Wund-Infektionen und zerebrale Ödeme hervorrufen [106]. In neueren Studien konnte für bestimmte Patienten in Abhängigkeit von verschiedenen molekulargenetischen Biomarkern ein Überlebensvorteil unter einer Carmustin-Wafer Therapie gezeigt werden. So zeigten Patienten mit Verlusten von Teilen der Chromosomen 10 und 13 ein verlängertes Gesamtüberleben im Zusammenhang mit einer solchen Therapie [100].

### 2.3.3 Tumortherapiefelder

Die Behandlung der Patienten mittels Tumortherapiefelder (TTFields) stellt ein relativ neues Verfahren in der Therapie des Glioblastoms dar. Hierbei werden Transducer Arrays direkt auf der Kopfhaut des Patienten angebracht, welche ein elektrisches Feld mit geringer Intensität und einer Frequenz von 200kHz erzeugen. Die erzeugten elektrischen Felder sorgen für eine Neuausrichtung der Microtubuli und eine abnorme Microtubuli-Polymerisation. Der Spindelapparat kann sich in der Mitose nicht ordnungsgemäß ausbilden. Es kommt zum Zelluntergang [30,46]. Darüber hinaus sind auch Effekte auf die Anordnung anderer Zellorganellen und die Bildung von multiplen Nuclei in der Zelle beschrieben, was zur Apoptose führt [30].

Stupp et al. konnten zeigen, dass die Kombination aus TTFields und Temozolomid das Gesamtüberleben im Vergleich zur Therapie mit Temozolomid alleine deutlich verlängert. So wiesen Patienten, die eine Therapie mit Temozolomid und TTFields erhielten, ein durchschnittliches Gesamtüberleben von 20,9 Monaten auf. Patienten, die nur mit Temozolomid behandelt wurden, zeigten ein signifikant geringeres Gesamtüberleben von 16 Monaten. [97].

### 2.3.4 Supportive Care

Unter supportive Care werden all jene Therapien zusammengefasst, welche sich nicht gegen das Tumorstadium selbst richten, sondern dazu dienen, Beschwerden und Symptome zu behandeln, welche durch die Grunderkrankung oder die Therapie entstehen.

Typische Indikationen für eine supportive Therapie sind durch den Tumor selbst und seine raumfordernde Wirkung verursachte Symptome (erhöhter Hirndruck, Hirnödeme, Kopfschmerzen, Krampfanfälle), Therapiekomplicationen (Schmerzen, Erbrechen, Thrombosen, Infekte, Blutbildveränderungen) oder psychische Probleme. Zu den häufig eingesetzten Medikamenten zählen Dexamethason, zur Ödemtherapie, Ondansetron zur Behandlung von Übelkeit, Levetiracetam und andere Medikamente zur Therapie und Sekundärprävention von Krampfanfällen, sowie diverse Schmerzmittel. Darüber hinaus ist eine psychoonkologische Anbindung sinnvoll.

Desweiteren haben Patienten die Möglichkeit im Rahmen der Studie Mobil mit Hirntumor, einer Sportstudie für Glioblastom-Patienten, der Neurochirurgischen Klinik des Universitätsklinikums des Saarlandes, eine sporttherapeutische Mitbetreuung zu erhalten. Ziele dieser Studie sind vornehmlich eine Steigerung der Lebensqualität, sowie eine Reduktion der Nebenwirkung durch die Standardtherapie.

## 2.4 Epigenetische Modifikationen

Sämtliche Erbinformationen des Menschen finden sich in der DNA gespeichert. Epigenetische Veränderungen beeinflussen die Expression bestimmter Gene und modifizieren so die Expression des Erbmaterials, ohne die Nukleotidsequenzen der Gene selbst zu verändern. Derartige Modifikationen können durch äußere Einflüsse reguliert bzw. induziert werden und sind teils vererblich. Zu den epigenetischen Mechanismen gehören unter anderem die Methylierung von DNA, die Acetylierung von Histonen, sowie die unterschiedlichen Funktionen der RNA - Interferenz [19,25,84].

### 2.4.1 DNA-Methylierung

Cytosin als Nukleinbase und somit Grundbaustein der DNA kann durch Methylierung enzymatisch modifiziert werden [42]. Dabei werden bei Säugetieren nur solche Cytosine methyliert, welche sich innerhalb von CpG-Dinukleotiden (Dinukleotid bestehend aus Desoxycytidin, Phosphorsäure und Desoxyguanosin) befinden. Cytosine außerhalb dieser Konfiguration werden durch menschliche DNA-Methyltransferasen (DNMT) nicht verändert [43]. Bei der Methylierung selbst erfolgt mittels einer DNMT die Übertragung einer Methylgruppe auf des Cytosin [80]. Es entsteht 5-Methylcytosin.

An dieses binden spezifische Methyl-bindende Proteine und es kommt zur Anlagerung weiterer spezifischer Proteine. Dies führt schließlich zur Verdichtung der Nukleosomen. Die RNA-Polymerase ist

folglich nicht mehr in der Lage, die DNA an diesen kondensierten Stellen abzulesen. Die Methylierung bewirkt die „Ausschaltung“ des Gens [89].

#### 2.4.1.1 Methylierung des MGMT-Promotors im Glioblastom

Die O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) ist ein Reparaturprotein des Zellkerns und dient der Fehlerkorrektur bei der DNA-Replikation und Transkription. MGMT „repariert“ die natürlich vorkommende DNA-Alkylierung des Guanins. Es überträgt die Methylgruppe des O6-Methylguanin auf sich selbst und sorgt für die eigene Inaktivierung. Man spricht auch von einer Selbstmordreaktion [99]. Der Methylierungsstatus der Promotorregion des *MGMT*-Gens entscheidet über die Expression des Proteins. Es kommt nur bei unmethyliertem Promotor zur suffizienten Expression [70]. Ein Nebeneffekt der Reparaturfunktion des MGMT ist die Wirkverminderung von alkylierenden Chemotherapeutika, wie Temozolomid oder Carmustin [102]. MGMT ist in der Lage, die erzeugten DNA-Schäden zu reparieren und somit den Effekt der Chemotherapeutika aufzuheben.

Daher können der Methylierungsstatus des Genpromotors und die Expression des *MGMT*-Gens als Prädiktoren des Ansprechens auf die Chemotherapie verwendet werden [35].

Patienten mit einem methylierten *MGMT*-Promotor profitieren besser von einer Therapie mit alkylierenden Chemotherapeutika [26]. Patienten ohne Promotor-Methylierung zeigen ein deutlich schlechteres Ansprechen auf die Therapie [36].

## 2.5 MicroRNA

### 2.5.1 Entdeckung und Biogenese

MicroRNAs (miRNAs) sind nicht-kodierende, einzelsträngige RNA-Moleküle mit einer Länge von 21 bis 25 Nukleotiden, welche in sämtlichen eukaryontischen Zellen zu finden sind [77,83]. Sie wurden erstmals im Jahr 1993 beschrieben [51]. Ihre genaue Zahl ist unbekannt. Bis heute wurden viele Tausend Gen-Loci identifiziert, welche miRNAs kodieren [1]. MiRNAs regulieren auf posttranskriptionaler Ebene die Expression von protein-kodierenden Genen.

Die Synthese der miRNAs beginnt im Nukleus mit der Transkription der für die miRNA-kodierenden Gene durch die RNA-Polymerase II. Die hierbei entstandene pri-miRNA besitzt einen Poly-A-Schwanz am 3' Ende und ein 7-Methylguanin-Cap am 5' Ende. Dieses Primärtranskript wird mittels eines Enzymkomplexes, bestehend aus der RNase III Endonuklease „Drosha“ und dem dsRNA-Bindeprotein DGCR8 (Pasha), in eine Vorläufer-miRNA (pre-miRNA) prozessiert. Pre-miRNAs weisen eine

typische „stem-loop“-Sekundärstruktur auf. Diese wird von Exportin-5 erkannt und die pre-miRNA wird aktiv ins Zytoplasma transportiert. Im Zytoplasma werden die pre-miRNAs durch der RNase III Endonuklease „Dicer“ in reife miRNAs prozessiert. Hierbei entsteht ein imperfektes, doppelsträngiges RNA-Molekül. Dieses beinhaltet sowohl die reife miRNA, als auch den komplementären Strang (miRNA\*). Dieses doppelsträngige Molekül wird danach durch eine Helikinase zu Einzelsträngen entwunden. Die energetisch weniger stabile miRNA wird in einem Ribonukleoprotein-Komplex, dem RISC (RNA-induced silencing complex), aufgenommen, die miRNA\* degradiert häufig [88]. Der miRNA-RISC-Komplex reguliert, abhängig vom Grad seiner Komplementarität mit der Ziel-RNA, die Aktivität der Zielgene. Bei partieller Komplementarität kommt es zu einer Hemmung der Translation, bei perfekter Komplementarität zu einem Schnitt oder der vollkommenen Degradierung der mRNA. Entsprechend führt eine hohe Konzentration einer spezifischen miRNA zur verminderten Konzentration ihrer regulierter mRNA und entsprechend zur verminderten Proteinexpression [119].

## 2.5.2 Bedeutung in der Tumorgenese

MiRNAs sind an komplexen Netzwerken beteiligt, die der Regulation von Prozessen wie Zell-Zyklus-Kontrolle [15], Apoptose [44] sowie der Entwicklung und Differenzierung von Zellen dienen [33]. Kommt es zu Störungen in diesem Netzwerk drohen erhöhte Zellproliferation, fehlende Kontrolle des Zell-Zyklus, verminderte Zelldifferenzierung und deregulierte Apoptose. Derartige Veränderungen bilden die Grundlage der Tumorgenese. Auf Grund dessen wird den miRNAs eine große Bedeutung bei der Entstehung und Progression von Tumoren zugesprochen. Man unterscheidet tumorsuppressive miRNAs und onkogene miRNAs, abhängig von den durch sie regulierten Zielgenen.

## 2.5.3 MicroRNAs im Glioblastom

### 2.5.3.1 MiRNA-26a

Durch genom-weite miRNA-Expressionsanalysen konnte belegt werden, dass die Dysregulation der Expression von miRNA-26a mit der Entstehung verschiedener Tumoren assoziiert ist [16]. Bei Lungen- und Mammakarzinomen sowie bei Adenokarzinomen des Ösophagus und Karzinomen des Nasopharynx wirkt sie im Sinne eines Tumorsuppressorgens und verlangsamt oder unterdrückt das Tumorstwachstum [60,117,120,123], in Gliomen hingegen fungiert sie in Form eines Onkogens [40].

MiRNA-26a wirkt regulierend auf die Zielgene *PTEN* (phosphatase and tensin homolog) [40,118] und *RBI* (Retinoblastom-Protein 1) [56,123] und fördert das Tumorstwachstum. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Expression von miRNA-26a mit einer vermehrten Angiogenese im Glioblastom assoziiert ist [82].

PTEN ist eine Phosphatase, welche als Tumorsuppressor agiert und auf den PI3K/Akt-Signalweg einwirkt. Sie nimmt hierbei hemmenden Einfluss auf die Serin/Threonin-Kinase Akt, wobei Akt selbst die Apoptose hemmt. Eine verringerte PTEN-Aktivität führt also letztlich zu weniger Apoptose und somit zu einem vermehrten Tumorwachstum.

Hyperphosphoryliertes *RBI* sorgt für die Freisetzung des aktiven Transkriptionsfaktors E2F, welcher wiederum die DNA-Replikation in der S-Phase des Zellzyklus initiiert. Dies ist auch jener Teil des Zellzyklus, in welchem die alkylierenden Chemotherapeutika angreifen. Hier konnte gezeigt werden, dass eine Korrelation zwischen der Expression von miRNA-26a dem Ansprechen auf eine Therapie mit Temozolomid [29] besteht. Des Weiteren konnte eine Korrelation zwischen der Expression von miRNA-26a im Tumorgewebe und dem Ansprechen auf eine Therapie mit Carmustin-Wafern nachgewiesen werden [92].

### 2.5.3.2 MiRNA-181d

MiRNA-181d nimmt Einfluss auf verschiedene für die Tumorentstehung und -progression wichtige Signalwege. Sie beeinflusst unter anderem die Onkogene *Bcl-2* und *K-Ras* beim Glioblastom und wirkt hier als Tumorsuppressor [105]. Außerdem beeinflusst sie den NF- $\kappa$ B-Signalweg und supprimiert dadurch Zellproliferation und Tumorwachstum [114]. Darüber hinaus ist ein Einfluss auf den Insulin-like growth factor (IGF1) beschrieben [37]. Die bedeutendste Interaktion ist jedoch vermutlich jene zwischen miRNA-181d und *MGMT*, wobei miRNA-181d ein direkter Regulator der *MGMT*-Expression ist [122]. Zusätzlich konnte ein Zusammenhang zwischen einer vermehrten Expression von miRNA-181d und einem verkürzten Überleben bei Patienten mit unmethyliertem *MGMT*-Promoter-Status gezeigt werden [17]. Darüber hinaus wurde ein Einfluss der miRNA-181d auf die Wirksamkeit einer Temozolomid-Therapie in Glioblastom-Zellen detektiert [55]. Des Weiteren konnte eine Korrelation zwischen der Expression von miRNA-181d und dem Ansprechen auf eine Therapie mit Carmustin-Wafern nachgewiesen werden [93].

## 2.6 Liquid Biopsy

Unter Liquid Biopsy (Flüssigbiopsie) versteht man die Entnahme und Analyse einer Probe aus nicht festem, biologischem Gewebe. Im Gegensatz zur herkömmlichen Biopsie handelt es sich um ein nicht-invasives Verfahren. Gängig ist hierbei die Analyse von Urin und Blut. Andere Körperflüssigkeiten wie Liquor cerebrospinalis werden seltener verwendet. Darüber hinaus stellt die Verwendung von Liquor aufgrund der deutlich höheren Invasivität der Probengewinnung einen Grenzbereich der Liquid Biopsy dar.

Untersucht werden die Proben zumeist auf zirkulierende Tumorzellen (Circulating tumor cells, CTCs), zirkulierende Tumor-DNA (Circulating free DNA, cfDNA) oder cell free (cf) miRNAs. Dies dient

zumeist diagnostischen oder prognostischen Zwecken. Im Sinne einer personalisierten Medizin wird es jedoch auch dazu genutzt, die für den jeweiligen Patienten optimale Behandlungsmethode zu finden.

Präklinische Anwendung findet die Liquid Biopsy bei Pankreaskarzinomen [112], Blasenkarzinomen [110], Brustkrebs [18], sowie bei vielen anderen Tumoren. Im klinischen Alltag wird die Liquid Biopsy bereits seit einiger Zeit in der Pränataldiagnostik angewandt [5].

Die Anwendung bei Hirntumoren gestaltet sich, vermutlich auf Grund der Bluthirnschranke, schwieriger. Frühere Studien konnten bei Patienten mit Gliomen nur in circa 10% der Fälle spezifische cfDNA nachweisen [10]. Neuere Studien an höhergradigen Tumoren konnten bei 51% der Glioblastom-Patienten Tumor-spezifische Veränderungen in der cfDNA nachweisen [126].

### **3 Eigene Fragestellung**

Trotz multimodaler, aggressiver Therapie ist die Prognose von Patienten mit GBM bis dato sehr schlecht. Die aktuelle Standardtherapie, bestehend aus möglichst radikaler Tumorresektion und konkomitanter Radiochemotherapie nach Stupp ist seit Jahren unverändert [96]. Eine mögliche Zusatzoption stellt die intraoperative Implantation von Carmustin-Wafern dar. Obwohl in früheren Studien kein genereller Vorteil durch diese Therapie gezeigt werden konnte, gibt es neue Ergebnisse, die zeigen, dass unter der Voraussetzung eines günstigen molekulargenetischen Profils im Tumorgewebe, gewisse Subpopulationen von einer lokalen Therapie mit Carmustin-Wafern profitieren können [100]. Dies gilt insbesondere für Patienten mit einer hohen Expression an miRNA 26a und einer niedrigen Expression an miRNA 181d [92,93]. In Abhängigkeit dieser Marker könnte die Therapie folglich im Sinne einer personalisierten Medizin angeboten werden.

Bisher ist die Bestimmung der Marker jedoch nur im Tumorgewebe möglich. Dieses wird während der Operation entnommen und die Expression beider miRNAs wird ermittelt. Die Information steht dadurch erst Stunden bis Tage nach der Operation zur Verfügung. Zielführender wäre es, beide miRNAs als prognostische Marker bereits vor der ersten Operation bestimmen zu können, um sich dann anhand des zu erwartenden Ansprechens für oder gegen die Implantation der Wafer zu entscheiden.

Möglich würde dies durch den Einsatz eines Liquid Biopsy Verfahrens und einer präoperativen Markerbestimmung im Patientenblut. Voraussetzung hierfür wäre allerdings eine Korrelation der miRNA Expressionswerte im Tumorgewebe und korrespondierenden Blutplasmaproben. Der Nachweis eines solchen Zusammenhanges könnte die Basis für eine potenzielle präoperative „Liquid-Biopsy“ Methode bei Glioblastom-Patienten bieten. Um eine derartige Untersuchung klinisch nutzbar zu machen, sollte untersucht werden, ob die Expressionslevel von miRNA-181d und -26a im Blut durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden. Hierzu sollten Parameter wie Hämoglobin, Leuko- und Thrombozytenzahl, Leber- und Nierenwerte, Schilddrüsen und Entzündungsparameter, sowie die Tumorgröße und die präoperative Einnahme von Dexamethason betrachtet werden.

Die Fragestellungen der vorliegenden Arbeit lauten daher:

- 1. Besteht ein Unterschied zwischen der Expression von miRNA-26a und -181d im Blutplasma von kreisfreien Individuen im Vergleich zum Blutplasma von Patienten mit Glioblastoma multiforme?**
- 2. Besteht eine Korrelation zwischen der Expression von miRNA-26a und -181d in Tumorgewebe und Blutplasma von an einem GBM erkrankten Patienten?**
- 3. Wird die Expression von miRNA-26a und -181d im Plasma durch weitere Faktoren beeinflusst?**

## 4 Material und Methodik

### 4.1 Untersuchungsmaterialien

Initial wurden 69 Patienten mit GBM verdächtigen radiologischen Befunden selektiert, welche zwischen 2018 und 2020 in der Klinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikums des Saarlandes behandelt wurden. Neun dieser Patienten wurden im Verlauf ausgeschlossen, da in der histologischen Diagnose kein GBM bestätigt werden konnte (7 Astrozytome Grad III, 2 Metastasen). Schlussendlich wurden 60 GBM-Patienten in die Arbeit eingeschlossen.

Vor der Tumorresektion wurde von jedem Patienten eine Blutprobe entnommen. Die korrespondierenden Tumorproben wurden nach der Entnahme schockgefrostet und bei -80 °C gelagert. Alle Patienten wurden mittels konkomitanter Radiochemotherapie behandelt [96]. Eine Carmustin-Wafer Implantation wurde bei keinem der Patienten durchgeführt.

Zu den Einschlusskriterien der Arbeit zählten die informierte Einwilligung der Patienten in die Teilnahme an der Studie, das Vorhandensein von präoperativen Plasmaproben, das Vorhandensein von ausreichend Tumormaterial, sowie die neuropathologisch bestätigte Diagnose eines primären GBM.

Die histopathologische Begutachtung der Tumorproben erfolgte durch das Institut für Neuropathologie des Universitätsklinikums des Saarlandes nach der WHO-Klassifikation von 2016. Entsprechend erfolgte eine Erhebung des Methylierungsstatus des Promoters des *MGMT*-Gens, sowie des Mutationsstatus der *IDH1*. Diese Daten wurden mit freundlicher Genehmigung des Direktors des Institutes für Neuropathologie Prof. Schulz-Schaeffer verwendet.

Weiterhin erfolgte die fortlaufende Erhebung klinischer Daten. Dies betrifft insbesondere das Patientengeschlecht, -alter, den Zeitpunkt der Erstdiagnose, die Therapiemodalität, das Resektionsausmaß, den initialen Karnofsky Index, die Tumorlokalisation und -größe, sowie die individuellen Überlebensdaten. Das Follow-up erfolgte von Januar 2018 bis März 2021.

Darüber hinaus wurden 30 Blutproben von gesunden Spendern ohne vorausgegangene Erkrankung an einem Glioblastom oder einer anderen Krebserkrankung gesammelt. Auch diese willigten informiert in die Teilnahme an der Studie ein und wurden als Kontrollgruppe verwendet.

Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes geprüft und bewilligt. (Nr.: 93/16).

#### 4.1.1 Blutproben

Die Entnahme der Blutproben erfolgte intraoperativ vor Eröffnung der Dura mater durch den Anästhesisten in 4,9 ml EDTA K Sarstedt Monovetten aus einem arteriellen Zugang. Zur optimalen

Durchmischung wurde das Blut nach Entnahme zehnfach invertiert. Innerhalb einer Stunde wurde das Plasma aus dem Blut abzentrifugiert und bei -20 °C gelagert.

#### 4.1.2 Gewebeproben

Bei den untersuchten Tumorproben handelt es sich um Gewebeproben, die nach der Entnahme nativ in Kryo-Tubes (Greiner Bio-one) asserviert und bei -80 °C gelagert wurden. Das operative Vorgehen wurde durch die Verwendung der Proben in unserer Studie nicht verändert.

**Tabelle 1: Blut- und Tumorgewebeproben von Glioblastom-Patienten**

Nr.	Geschlecht	Alter bei Erstdiagnose	MGMT-Status	IDH1-Status	Tumorlokalisation F: Frontallappen P: Parietallappen O: Okzipitallappen T: Temporallappen
1	M	61	0	0	T
2	W	67	0	0	P
3	M	73	0	0	O
4	W	58	1	0	O
5	M	86	0	0	F
6	M	58	0	0	F
7	M	45	0	0	P
8	W	80	0	0	F
9	W	71	0	0	T
10	M	57	0	0	T
11	M	70	0	0	T
12	M	59	0	0	F
13	M	78	0	0	T
14	M	85	0	0	P
15	M	63	0	0	F
16	M	47	0	0	T
17	M	69	1	0	T
18	W	71	0	0	T
19	M	62	0	0	T
20	M	72	0	0	O
21	M	62	0	0	T
22	M	78	0	0	F
23	W	80	0	0	F
24	W	67	0	0	T
25	M	63	1	0	F
26	W	52	1	0	T

Fortsetzung Tabelle 1:

Nr.	Geschlecht	Alter bei Erstdiagnose	MGMT-Status	IDH1-Status	Tumorlokalisation F: Frontallappen P: Parietallappen O: Okzipitallappen T: Temporallappen
27	M	61	0	0	F
28	W	64	1	0	F
29	W	88	1	0	O
30	W	66	1	0	T
31	M	83	1	0	T
32	M	61	0	0	T
33	M	56	1	0	P
34	W	78	0	0	F
35	M	68	0	0	P
36	M	37	0	0	T
37	W	49	0	0	F
38	W	79	1	0	T
39	W	70	0	0	F
40	W	61	0	0	T
41	W	79	0	0	T
42	W	63	0	0	F
43	M	87	1	0	F
44	M	48	1	0	T
45	W	58	0	0	T
46	M	75	0	0	T
47	M	74	0	0	T
48	M	68	0	0	F
49	M	67	1	0	F
50	M	60	1	0	T
51	M	80	1	0	O
52	M	77	0	0	O
53	W	57	1	0	F
54	M	71	0	0	F
55	M	39	0	1	F
56	M	57	1	0	F
57	W	79	1	0	F
58	M	78	1	0	T
59	M	68	0	0	P
60	M	56	-	0	P

**Tabelle 2: Blutproben von gesunden Probanden**

<b>Nr.</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Alter bei Probenentnahme</b>
1	M	50
2	M	23
3	M	32
4	W	24
5	W	23
6	M	33
7	W	23
8	M	26
9	M	29
10	W	22
11	W	29
12	M	26
13	M	28
14	M	22
15	W	23
16	W	57
17	M	37
18	W	64
19	M	33
20	M	30
21	W	28
22	M	25
23	M	66
24	W	51
25	W	29
26	M	33
27	M	53
28	W	24
29	W	59
30	W	57

## 4.2 Material- und Herstellernachweis

Tabelle 3: Chemikalien, Enzyme, Kits und Verbrauchsmaterialien

Chemikalien/Kits	Hersteller
Chloroform	Fisher Scientific, Schwerte
Ethanol 100%	Sigma Aldrich, Steinheim
PCR Wasser	Invitrogen, Thermo Fisher, Waltham, USA
Aqua ad injecta	Braun, Melsungen
miRNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
miRNeasy Serum/Plasma Kit	Qiagen, Hilden
Qiazol-Lysis-Reagenz	Qiagen, Hilden
RNase ZAP	Sigma Aldrich, Steinheim
TaqMan™ Gene Expression Mastermix	Applied Biosystems™ Life Technologies, Darmstadt
TaqMan™ Gene Expression Assays	
TaqMan™ MicroRNA Assays	
TaqMan™ Micro RNA Reverse Transcription Kit	

Tabelle 4: Geräte

Geräte/Software	Bezeichnung	Hersteller
Feinwaage	H110 und L2200S	Sartorius, Göttingen
Kühlzentrifuge	Fresco21	Heraeus, Hanau
	3-16PK	Sigma, Osterode am Harz
Minizentrifuge	Galaxy Ministar	VWR International, Radnor
Real-Time PCR plus Software	StepOnePlus™ Real-Time PCR System	Applied Biosystems™ Life Technologies, Darmstadt
	StepOne Software V2.3	
Spektrometer plus Software	NanoDrop ND-1000	NanoDrop Technologies Inc, Wilmington, USA
	ND-1000 Software V3.8.1	
Thermocycler	PTC-100	MJ Research, Hessisch Oldendorf
	PTC-200	
Tischzentrifuge	Minispin	Eppendorf AG, Hamburg
	Rotina 35, Typ 1705	Hettich, Tuttlingen
Vortexer	Minishaker MS1	IKA, Staufen
Ultraschallhomogenisator	Ultra-Turrax	Ika, Staufen im Breisgau

### 4.3 Plasmagewinnung aus Vollblut

Das intraoperativ in zwei 4,9 ml EDTA K Monovetten gewonnene Vollblut wurde zuerst bei 1900 g (3000rpm) und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert, sodass zwei verschiedene Phasen entstanden. In der unteren Phase befanden sich die Blutzellen (Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten), der Überstand enthielt die Plasmaflüssigkeit. Der Überstand wurde, ohne das Zellpellet zu berühren, in neue 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen überführt. Aus 10 ml Vollblut können 4-5 ml Plasma gewonnen werden. Die mit Plasma gefüllten 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen wurden bei 16000 g (13000rpm) und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Hierbei wurden zusätzlich Zelltrümmer und andere Störfaktoren aus der Suspension entfernt. Zuletzt wurden je 210 µl des Überstands in neue 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen überführt. Diese wurden bei -80 °C gelagert.

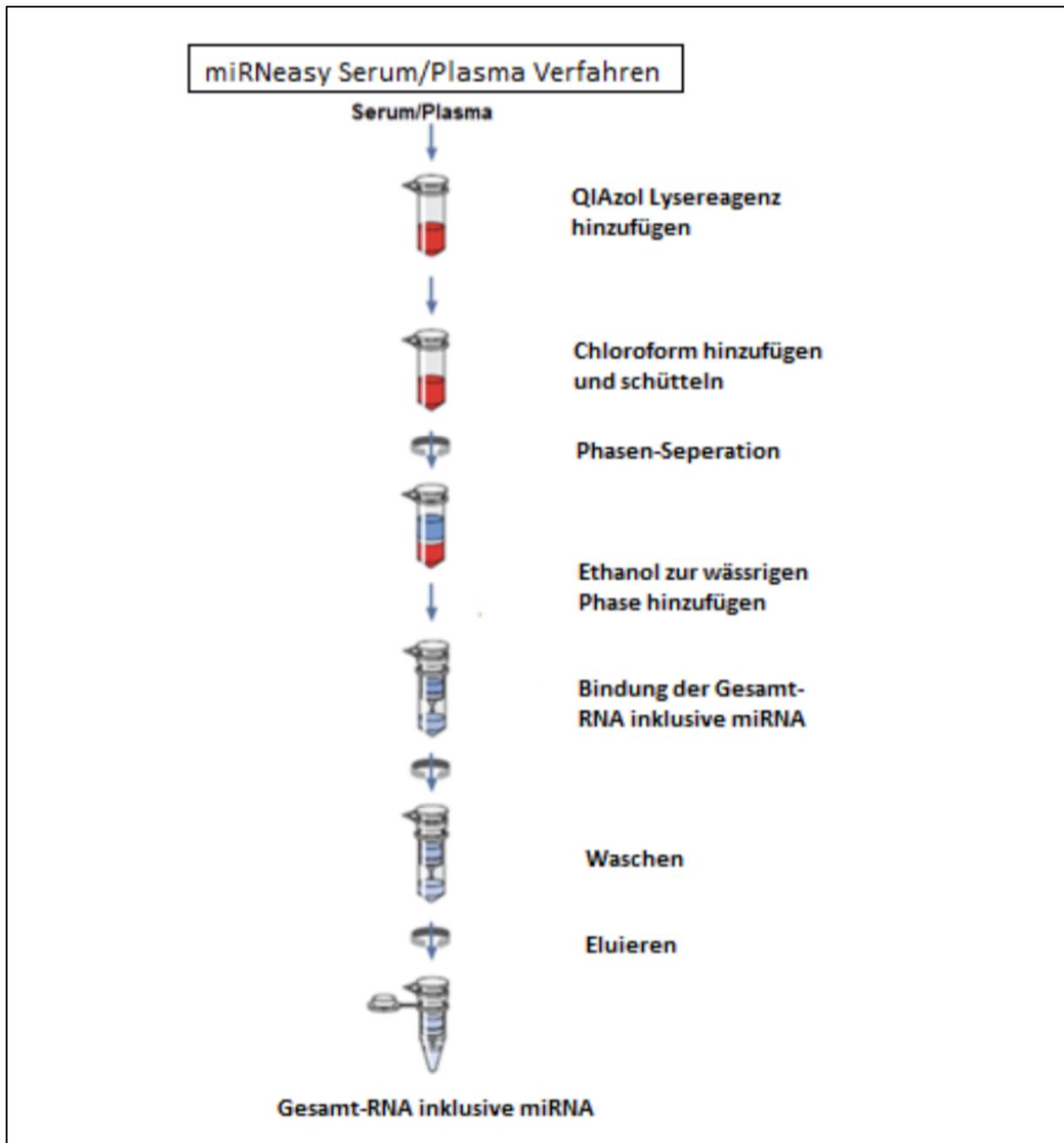
### 4.4 Isolation der RNA inklusive miRNA aus Plasma

Die gesamte RNA, inklusive der miRNA, wurde mit Hilfe des miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen) entsprechend der Herstellerangaben aus Plasma isoliert. Hierzu wurde zunächst das aliquotierte Plasma bei Raumtemperatur (15-25 °C) aufgetaut und bei 16000 g und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert, um Kryopräzipitate zu entfernen. Es wurden 1000 µl QIAzol-Lysis-Reagenz in ein steriles Mikrozentrifugenröhrchen vorgelegt. Diese monophasische Lösung führte zur kompletten Lyse von RNasen, zellulären DNA-Resten und Proteinkomplexen. Zum Lysis-Reagenz wurden 200 µl Plasma hinzugegeben, 15 Sekunden gevortext und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 200 µl Chloroform hinzugefügt und die Probe für weitere 15 Sekunden gevortext, sodass alle Komponenten komplett vermischt waren. Anschließend wurde die Probe 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann bei 12000 g und 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation waren drei verschiedene Phasen abzugrenzen. Eine untere rötliche, organische Phase bestehend aus Zelltrümmern, eine weißliche Interphase mit zellulärer DNA, sowie eine farblose, wässrige obere Phase. Diese beinhaltete die RNA-Moleküle. Von dieser oberen Phase wurden 600 µl in 900 µl 100%igem Ethanol gelöst.

Im nachfolgenden Schritt wurden 700 µl der entstanden Lösung in ein RNeasy MinElute Spin Column mit Auffanggefäß (collection tube) gegeben und für 15 Sekunden bei 10000 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Im Spin Column befindet sich eine Silikamembran mit sehr feinen Poren, welche dem Auffangen der RNA-Moleküle dient. Der letzte Schritt wurde so lange wiederholt, bis die gesamte Probe einmal über die Silikamembran gelaufen war. Daraufhin applizierte man 700 µl RWT-Puffer in die Spinnsäule und zentrifugierte diese für 15 Sekunden bei 10000 g. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule mit 500 µl RPE-Puffer gefüllt und erneut für 15 Sekunden

bei 10000 g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Die Säule wurde mit 500 µl 80%igem Ethanol befüllt und für zwei Minuten bei 10000 g zentrifugiert. Durchfluss und Auffanggefäß wurden verworfen. Das Spin Column mit neuem Auffanggefäß wurde mit offenem Deckel für 5 Minuten bei 18000 g zentrifugiert, um die Membran zu trocknen. Im letzten Schritt wurde die Säule in ein neues Mikrozentrifugenröhrchen plaziert und die RNA eluiert. Dazu wurde die Säule mit 17 µl RNase freiem Wasser gefüllt und bei 16000g für eine Minute zentrifugiert. Das Eluat enthielt die gesamte RNA inklusive miRNA. Dieses wurde bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  bis zur Messung der RNA-Konzentration gelagert.



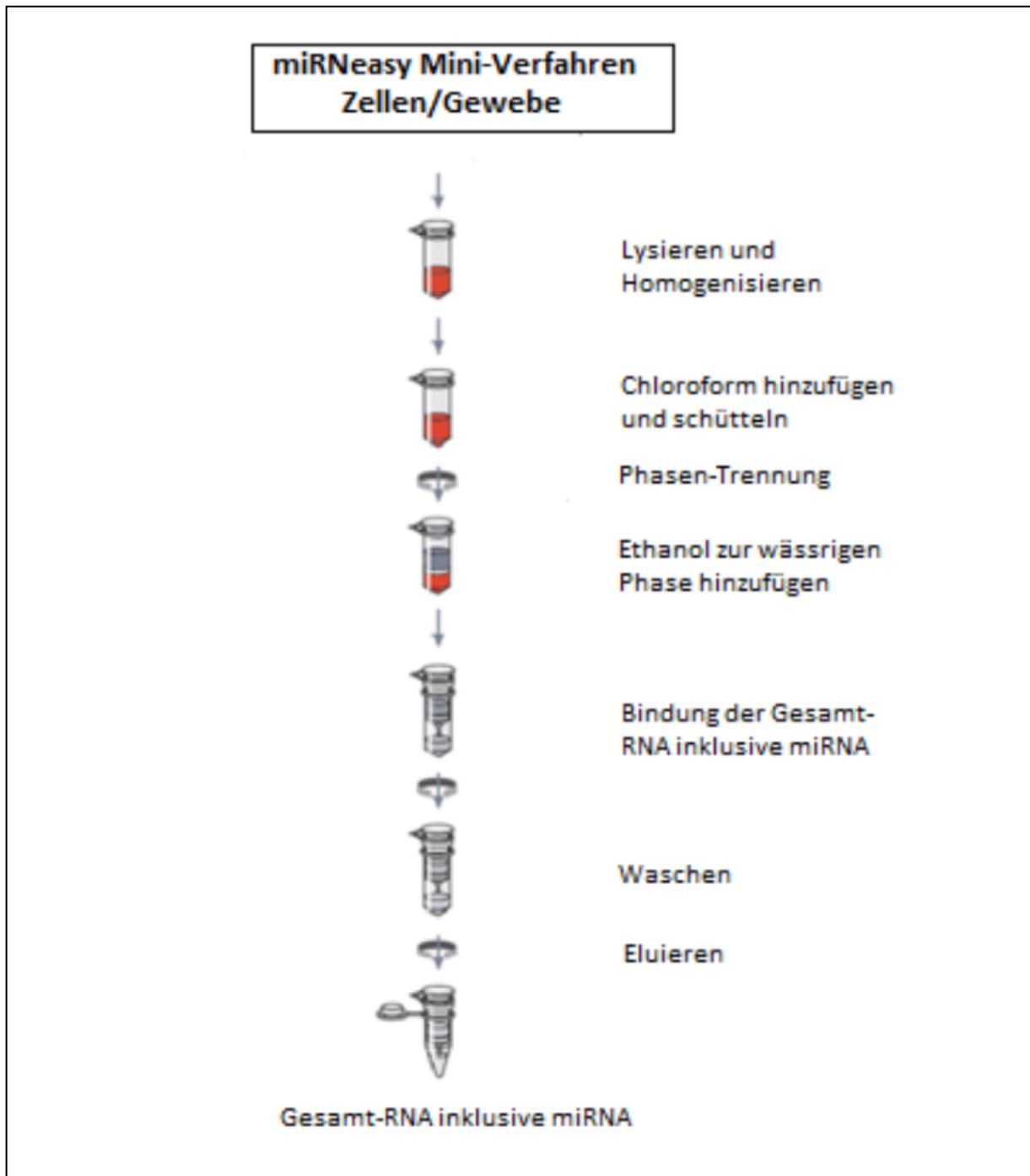
**Abbildung 3: RNA-Isolation aus menschlichem Blutplasma mittels miRNeasy Serum/Plasma Kit.** Abgebildet sind die einzelnen Isolationsschritte der RNA inklusive miRNA aus Blutplasma mit Hilfe von RNeasy MinElute Spin Columns und Auffanggefäßen.

#### 4.5 Isolation der RNA inklusive miRNA aus Tumorgewebe

Die Isolation des Tumorgewebes erfolgte mittels des miRNeasy Mini Kits (Qiagen). Die intraoperativ gesammelten und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagerten Tumorproben wurden auf Eis aufgetaut. Mittels steriler Pinzette und Skalpell wurde ein circa 30 mg schweres Stück Tumorgewebe von der Probe abgetrennt. In ein 50 ml Zentrifugenröhrchen wurden 700  $\mu\text{l}$  QIAzol -Lysis-Reagenz vorgelegt und das abgetrennte Gewebestück hineingegeben. Das konische Zentrifugenröhrchen wurde 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde das Gemisch mit Hilfe eines Homogenisators (Ultra-Turrax, Ika) in eine homogene Suspension verwandelt. Hierbei wurden Gewebstücke zerkleinert um eine vollständige Lyse von Zellverbänden, Proteinkomplexen und Zellmembranen durch das Lysis-Reagenz zu gewährleisten. Das entstandene Lysat wurde in ein 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen überführt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurden 140  $\mu\text{l}$  Chloroform hinzugefügt und die Mischung für 15 Sekunden gevortext. Nach Inkubation bei Raumtemperatur für 3 Minuten wurde die Probe bei 12000 g und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 15 Minuten zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation konnten drei Phasen abgegrenzt werden. Eine obere wässrige, klare Phase, eine weißliche Interphase sowie eine untere rötliche, organische Phase. Von der oberen, die RNA enthaltenden Phase, wurden 350  $\mu\text{l}$  in ein neues Mikrozentrifugenröhrchen überführt. Es wurden 525  $\mu\text{l}$  100%iges Ethanol hinzugefügt. Die Lösung wurde durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren vermischt.

700  $\mu\text{l}$  der Lösung wurden nachfolgend in ein RNeasy MinElute Spin Column mit Auffanggefäß gegeben und bei 10000 g und Raumtemperatur für 15 Sekunden zentrifugiert. Dieser Schritt wurde mit dem Rest der Probe wiederholt. Der Durchfluss wurde jeweils verworfen. Die sich im Spin Column befindende Silikamembran bindet die RNA. Es wurden 700  $\mu\text{l}$  RWT-Puffer in die Säule gegeben und bei 10000 g für 15 Sekunden zentrifugiert, der Durchfluss wurde verworfen. Dadurch wurden Verunreinigungen wie Phenol oder Guanidin-Thiocyanat aus dem Lysis-Reagenz abgewaschen. Danach wurde die Säule mit 500  $\mu\text{l}$  RPE-Puffer gefüllt und bei 10000 g für 15 Sekunden zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und der Schritt wiederholt. Die Probe wurde bei zweiten Mal jedoch für 2 Minuten bei 10000 g zentrifugiert. Vor der Elution wurde das Spin Column in ein neues Auffanggefäß überführt und bei 18000 g für 1 Minute zentrifugiert. Dies dient dem Trocknen der Membran. Zuletzt wurde die Säule in einem neuen sterilen Mikrozentrifugenröhrchen platziert und die RNA wurde mit RNase freiem Wasser eluiert. Hierzu wurde das Spin Column zunächst mit 40  $\mu\text{l}$  RNase freiem Wasser gefüllt und bei 16000 g für 1 Minute zentrifugiert. Dieser Schritt wurde mit 30  $\mu\text{l}$  RNase freiem Wasser wiederholt. Die gelöste RNA wurde bis zur Konzentrationsbestimmung bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.



**Abbildung 4: RNA-Isolation aus menschlichem Tumormaterial mittels miRNeasy Mini Kit.** Abgebildet sind die einzelnen Isolationsschritte der RNA inklusive der miRNA mit Hilfe von RNeasy MinElute Spin Columns und Auffanggefäßen.

#### 4.6 Konzentrationsbestimmung der RNA mittels NanoDrop

Die Bestimmung der Konzentration der RNA-Isolate sowohl aus Blutplasma als auch aus Tumorgewebe erfolgte mittels eines NanoDrop Mikrovolumen-Spektralphotometers (ThermoFisher Scientific). Zusätzlich erlaubte das Spektralphotometer eine Überprüfung auf Verunreinigungen der zuvor gewonnenen Nukleinsäuren.

Vor Beginn der RNA-Messung musste ein Leerwert bestimmt werden, um die Validität der Messplätze zu überprüfen und den Extinktionsbeitrag der Pufferlösungen zu ermitteln. Dies erfolgte mit 1  $\mu$ l RNase freiem Wasser, in welchem die RNA eluiert worden war. Schließlich wurde von jeder Probe 1  $\mu$ l gemessen und es wurden die Konzentration, sowie die Quotienten  $A_{260}/A_{280}$  und  $A_{260}/A_{230}$  bestimmt.

Die Konzentration wurde mittels eines spezifischen Umrechnungsfaktors aus der bei 260 nm gemessenen Absorption berechnet. Um Aussagen über die Reinheit der Proben treffen zu können wurden zusätzlich Absorptionsmessungen benötigt, da auch Salze, Proteine, andere Nukleinsäuren und Kohlenhydrate im UV-Bereich absorbieren [6]. Hierzu wurden die Absorption bei 230 nm (Detektion organischer Substanzen) und die Absorption bei 280 nm (Detektion von Proteinen und Phenolen) ermittelt (Abbildung 5). Daraus wurden der Quotient der Absorption bei 260 nm und 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ), welcher Auskunft über die Verunreinigung mit Proteinen gibt und der Quotient der Absorption bei 260 nm und 230 nm, welcher Auskunft über die Verunreinigung mit Salz-Rückständen gibt.

Beide Quotienten sollten Werte von circa 2 besitzen [6].

Proben mit einer geringeren Konzentration als 20 ng/ $\mu$ l wurden nicht weiterverwendet.

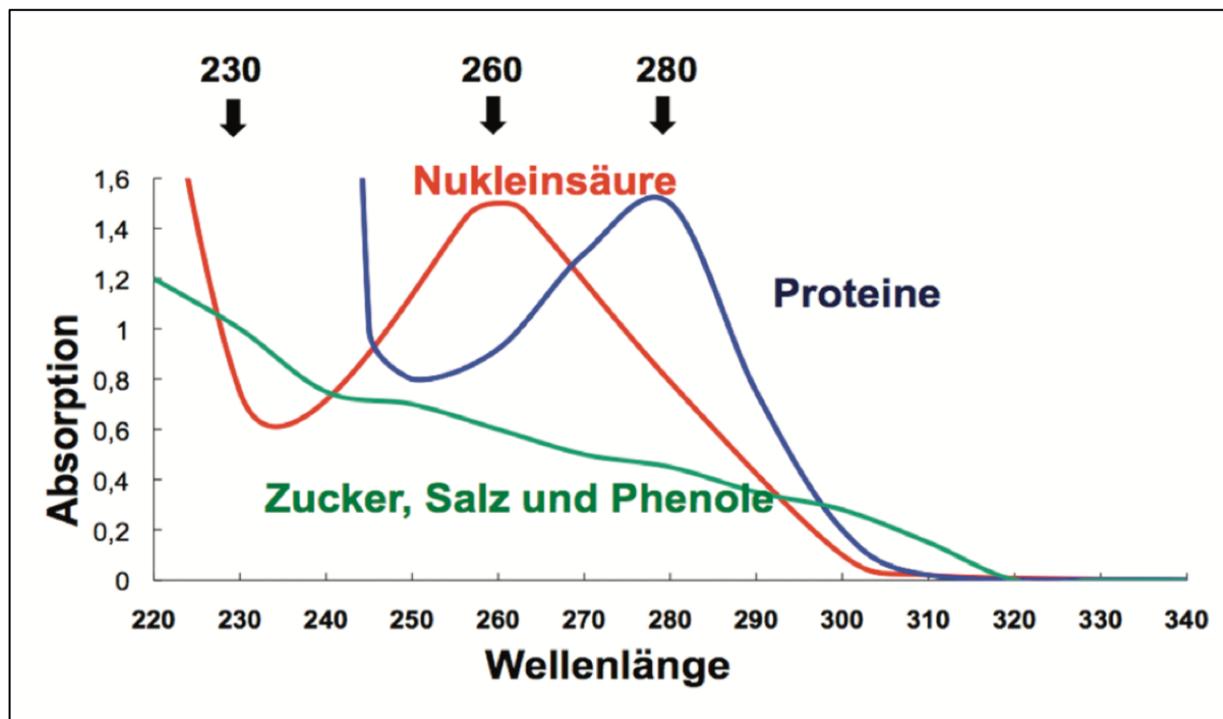
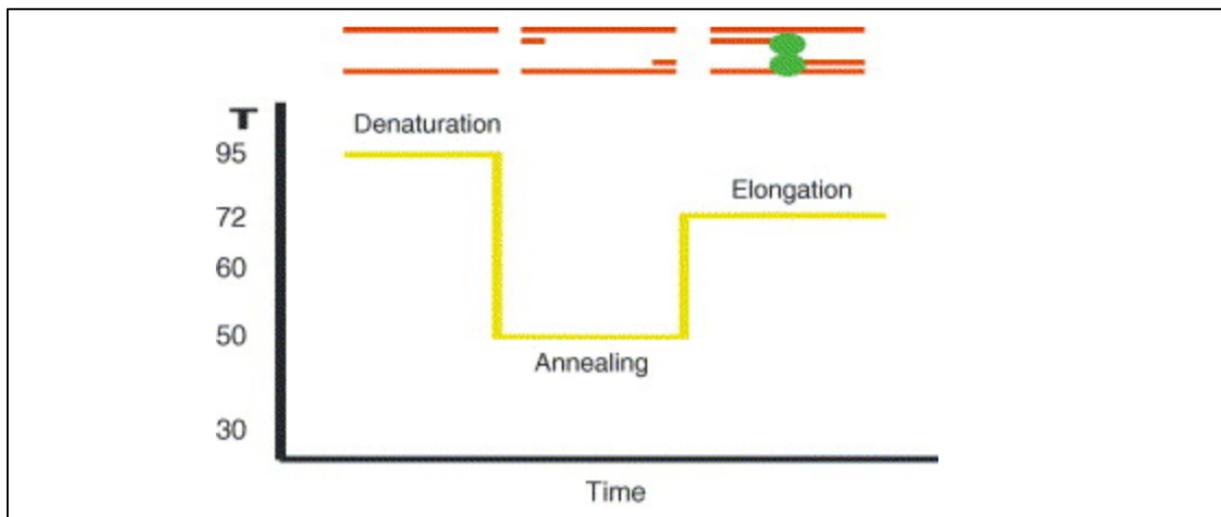


Abbildung 5: Absorptionsverlauf einer Nukleinsäuren-Probe und möglicher Kontaminationen [6].

#### 4.7 Bestimmung der miRNA-Expression mittels quantitativer Real-Time PCR

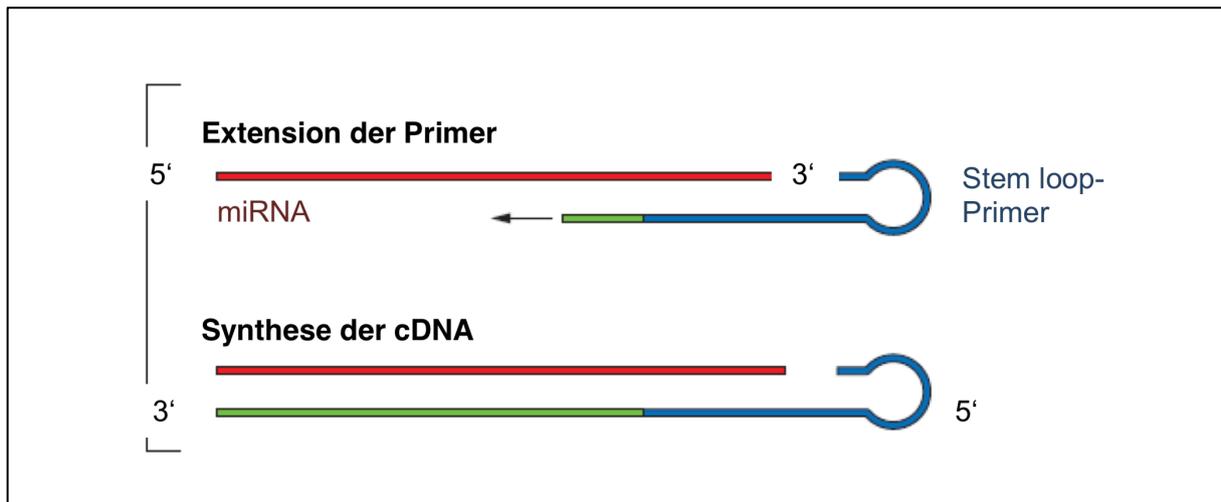
Die Methode der Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde 1987 von Kary B. Mullis entwickelt und 1993 mit dem Nobelpreis für Chemie prämiert. Das Verfahren ermöglicht *in vitro* eine gezielte Amplifikation bestimmter Nukleotidsequenzen mittels zyklischer Reaktionsschritte, welche sich in Denaturierung, Annealing (Primeranlagerung) und Extension (Strangverlängerung) unterteilen lassen [67]. Auf Basis der PCR wurden viele weitere Techniken entwickelt. Unter anderem die quantitative Real-Time PCR welche in dieser Arbeit Anwendung findet.



**Abbildung 6: PCR-Zyklus [48].** Im Denaturierungsschritt werden doppelsträngige DNA-Moleküle und Sekundärstrukturen durch eine Erhöhung der Temperatur auf 95 °C einzelsträngig gemacht. Im Annealing binden genspezifische Primer an komplementäre Basen der Ziel-DNA, welche amplifiziert werden soll. Im Elongationsschritt, welcher bei 70-72 °C stattfindet wird der Zielabschnitt durch eine geeignete DNA-Polymerase mit einer Geschwindigkeit von 100 Basen pro Sekunde verlängert.

##### 4.7.1 Reverse Transkription

Zur Expressionsanalyse wurden die isolierten miRNAs zunächst in cDNA (complementary DNA) transkribiert. Die Reverse Transkription erfolgte mittels des TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription Kit, sowie miRNA spezifischen Stem-loop-Primern. Die verwendeten TaqMan™ miRNA Assays bestehend aus Stem-loop-Primer für die reverse Transkription und dem Goldstandard TaqMan™ Primer- und Sonden-Set für die quantitative Real-time PCR sind in Tabelle 5 aufgeführt.



**Abbildung 7: TaqMan™ miRNA-spezifische stem loop-Primer** (modifiziert nach Custom TaqMan™ Small RNA Assay, Applied Biosystems Life Technologies, Darmstadt). Die stem loop-Primer lagern an die miRNA an und kommt es zur Extension und damit zur Synthese der cDNA.

**Tabelle 5: TaqMan™ MicroRNA Assay.**

Assay-Name	Assay-ID
RNU48	001006
hsa-miR-26a	001848
hsa-miR-181d	001023

Zur Herstellung der cDNA wurde aus einem Teil der jeweiligen isolierten RNA ein Reaktionsansatz mit einer Konzentration von 20 ng/μl in einem Probenvolumen von 5 μl hergestellt. Pro Reaktionsansatz wurde ein Mastermix bestehend aus 4,16 μl PCR-Wasser, 1,5 μl RT-Puffer, 1 μl Multiscribe™ Reverse Transkriptase, 0,19 μl RNase Inhibitor und 0,15 μl dNTP Mix (alle TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems™, Life Technologies, Darmstadt) angesetzt. Danach wurden 7 μl Mastermix, 5 μl verdünntes RNA-Isolat und 3 μl spezifischer Primer in ein Mikrozentrifugenröhrchen gegeben. Dieses wurde mehrfach invertiert und dann mittels Mikrozentrifuge (Galaxy MiniStar, VWR) zentrifugiert. Alle Schritte erfolgten auf Eis. Im letzten Schritt wurden sämtliche Proben unter den in Tabelle 6 aufgeführten Bedingungen im Thermocycler (PTC-200, MJ Research) inkubiert.

**Tabelle 6: Ablauf der Reversen Transkription**

Schritte	Zeit [min]	Temperatur [°C]	Zyklenzahl
Annealing	30	16	1
Extension	30	42	1
Denaturierung	5	85	1
Lagerung	∞	4	1

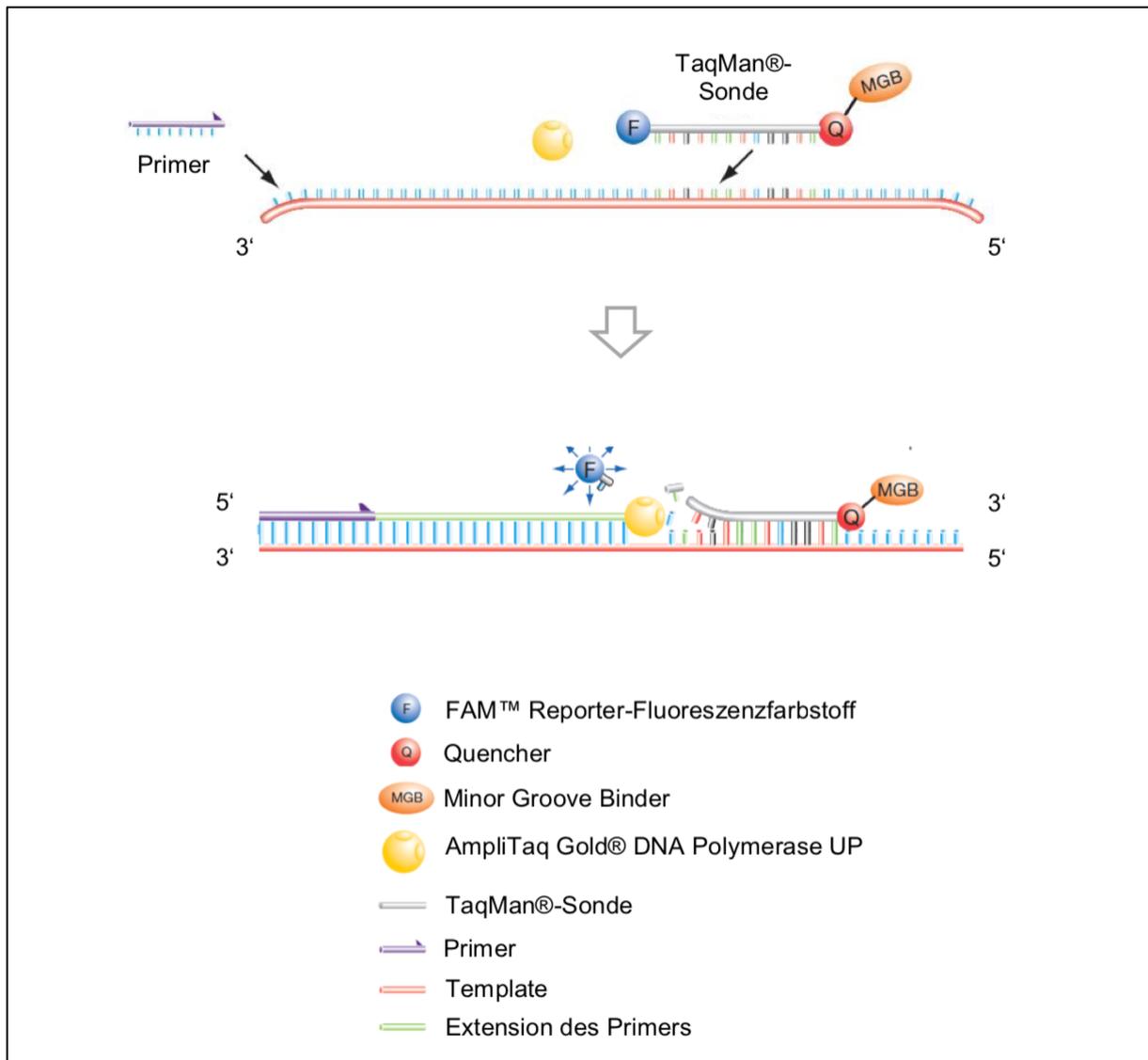
---

Nach Abschluss der 90-minütigen Inkubation wurde die synthetisierte cDNA bis zur Weiterverarbeitung auf -20°C gelagert.

#### 4.7.2 Quantitative Real-Time PCR

Die quantitative Real-Time PCR ist eine zuverlässige Methode zur Quantifizierung von Expressionswerten spezifischer Gene, welche multiple Anwendung in der klinischen und biologischen Grundlagenforschung findet [59]. Zusätzlich zur herkömmlichen PCR bietet sie die Möglichkeit zur Quantifizierung in Echtzeit, bei der die gemessene Fluoreszenz proportional zur Menge der PCR-Produkte zunimmt [39].

Die transkribierte cDNA diente als Ausgangsmaterial und wurde mittels Fluoreszenz markierter Primer amplifiziert. Zur Durchführung der qPCR wurde in dieser Arbeit der TaqMan™ Gene Expression Mastermix von Applied Biosystems verwendet. In diesem enthalten sind die hot-Start Taq-DNA Polymerase, dNTPs (Desoxyribonukleosidtriphosphate, inklusive dUTP), Uracil-DNA Glycosylase zu Minimierung von übertragbaren PCR-Verunreinigungen, sowie ein ROX™ Farbstoff für eine optimierte Präzision bei der Benutzung von Applied Biosystems Real-Time PCR Geräten. Zusätzlich wurden Sets bestehend aus miRNA spezifischen Primern und Sonden aus den TaqMan™ miRNA Assays (Tabelle 3) verwendet. Diese Sets bestehen aus Primern, welche am 5' und 3' Ende des DNA-Fragmentes binden und zusätzlich dazu aus spezifischen, fluoreszenzmarkierten Sonden, welche innerhalb der Sequenz binden. Hierbei handelt es sich um Hydrolisierungs sonden, die am 5' Ende den Reporter-Fluoreszenzfarbstoff 6-Carboxy-Fluorescein (F) tragen und an der 3' Ende der nicht fluoreszierende Quencher (Q) und der Minor-Groove-Binder (MGB) gebunden sind.



**Abbildung 8: Funktionsprinzip der TaqMan™ Sonde** (modifiziert nach Applied Biosystems StepOne und StepOne Plus von Applied Biosystems).

Zur Fluoreszenzmessung werden diese Sonden während der PCR mit Licht mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt. Zu Beginn des Prozesses sorgt die räumliche Nähe des Reporters zum Quencher für eine Unterdrückung der Fluoreszenz durch einen Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer. Nach Denaturierung der cDNA hybridisieren die Primer und die Sonde an den Matrizenstrang (Abbildung 8). In der darauffolgenden Extensionsphase treffen die im TaqMan™ Gene Expression Mastermix enthaltene AmpliTaq Gold® DNA Polymerase UP und die Sonde aufeinander, woraufhin die Polymerase damit beginnt die Sonde zu verdrängen. Dadurch entsteht eine Y-förmige Sekundärstruktur. Die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Polymerase bewirkt eine Hydrolyse der Sonde und es kommt zur Freisetzung des Reporters. Nun besteht keine räumliche Nähe mehr zwischen Reporter und Quencher und der Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer kommt zum Erliegen. Der Reporter emittiert Strahlung mit einer Wellenlänge von 520 nm, welche mit jedem PCR-Zyklus direkt proportional zu den freigesetzten Fluorophoren ansteigt. Dieses Signal ist strikt sequenzspezifisch, da Sonden welche nicht komplementär

gebunden sind verdrängt werden und freie, nicht hybridisierte Sonden nicht hydrolysiert werden und somit keine Strahlung emittieren.

Zur Durchführung der Real-Time PCR wurden zunächst 3 primerspezifische Mastermixe, bestehend aus 5 µl TagMan™ Gene Expression Mastermix, 0,5 µl TagMan™ miRNA-Primer und 3,5 µl Wasser (PCR-Grade), pro Probe angesetzt. Eine 96-Well-Platte (MicroAmp Fast 96 Well Reaction Plate 0,1 ml, Applied Biosystems) wurde nach untenstehendem Pippetierschema aufgeteilt. Anschließend wurden entsprechend dem Schema 9 µl Mastermix in jedes Well vorgelegt (Abbildung 9).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	9	9
B	2	2	2	2	2	2	2	2	2	9	9	9
C	3	3	3	3	3	3	3	3	3	9	9	9
D	4	4	4	4	4	4	4	4	4	10	10	10
E	5	5	5	5	5	5	5	5	5	10	10	10
F	6	6	6	6	6	6	6	6	6	10	10	10
G	7	7	7	7	7	7	7	7	7	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O
H	8	8	8	8	8	8	8	8	8			

**Abbildung 9: Schema der 96-Well Platte:** 1-9 entspricht den Tumorproben, H<sub>2</sub>O der Wasserkontrolle, die Farben der Felder den getesteten miRNAs **RNU48**, **miRNA 26a**, **miRNA 181d**.

Dann wurde 1 µl cDNA hinzupipettiert und die Platte wurde mit Folie (MicroAmp Optical Adhesive Film, Applied Biosystems) bedeckt. Anschließend wurde die Platte vorsichtig gevortext und bei 1000 Umdrehungen für eine Minute zentrifugiert. Daraufhin wurde die Real-Time qPCR (Tabelle 7) mit einem StepOne System (Applied Biosystems) durchgeführt.

**Tabelle 7: Zyklen der RT-qPCR**

Schritte	Zeit [min:s]	Temperatur [°]	Zyklenzahl
Enzymaktivierung	10:00	95	1
Denaturierung	00:15	95	45
Annealing + Extension	01:00	60	45

#### 4.8 Auswertung der qPCR

Die RT-qPCR wurde mittels relativer Quantifizierung ausgewertet. Diese ergibt sich aus einer Normalisierung der Expressionsergebnisse auf ein nicht dereguliertes Referenzgen. Hierdurch können Schwankungen in der RNA-Ausgangsmenge ausgeglichen werden (vergleichende Schwellenwertmethode, auch  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode).

Das Maß der relativen Quantifizierung der Menge an cDNA und somit miRNA, ist der sogenannte  $C_T$ -Wert (Cycle of Threshold, Schwellenwertzyklus), welcher jener Anzahl an PCR-Zyklen entspricht, bei der die Fluoreszenz erstmals signifikant über der Hintergrundfluoreszenz ansteigt. Dieser Wert liegt zu Beginn der exponentiellen Phase, welche zwischen Start- und Plateauphase einer PCR abläuft. Der  $C_T$ -Wert sinkt mit linear steigender Targetmenge und lässt somit eine Quantifizierung der cDNA zu. In die Auswertung wurden ausschließlich jene  $C_T$ -Werte mit einer Standardabweichung kleiner 0,16 eingeschlossen. Die in dieser Arbeit vorliegenden Expressionsdaten wurden mit RNU48, als nachweislich stabiler Referenz-RNA, berechnet [54]. Die Expressionen der miRNAs wurden auf die RNU48 Expression in der jeweils korrespondierenden Tumor-Probe normalisiert. Für die Expressionen der miRNA in Tumor und Plasma ergeben sich die errechneten Fold Changes (FC) wie folgt:

$$FC_{\text{tumor}} = 2^{-(CT\text{-miRNA tumor} - CT\text{-RNU48 tumor})}$$

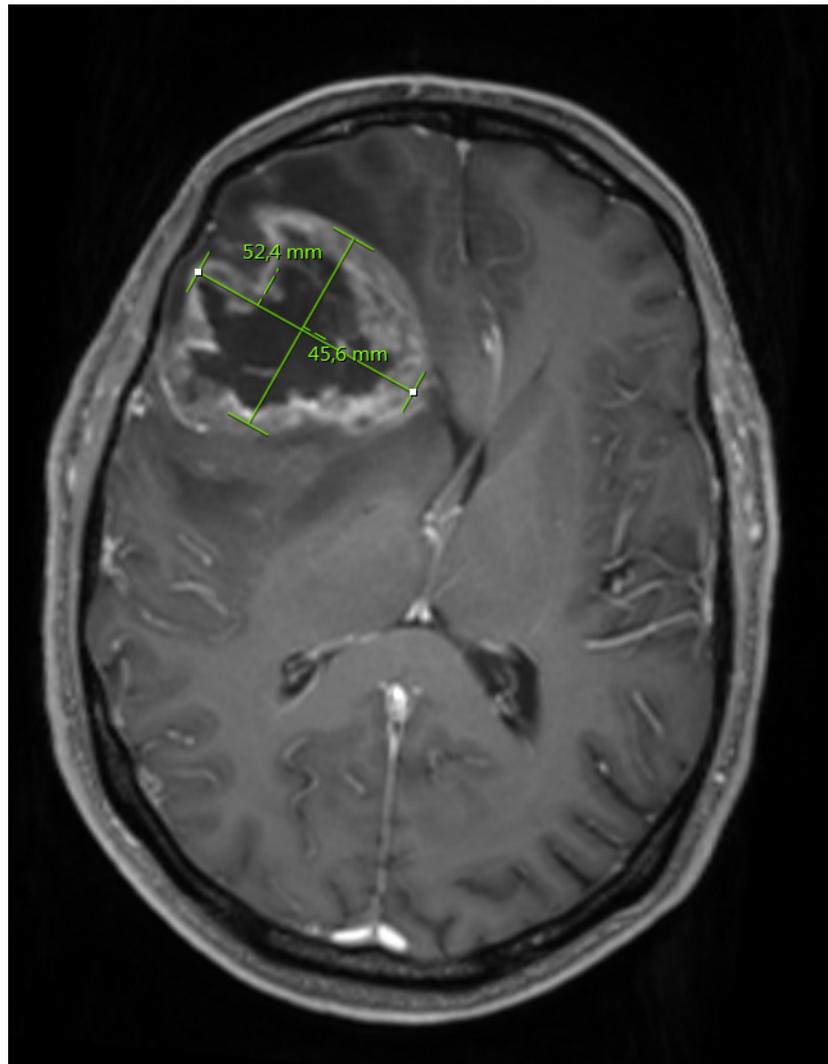
$$FC_{\text{plasma}} = 2^{-(CT\text{-miRNA plasma} - CT\text{-RNU48 tumor})}$$

#### 4.9 Ausmessen des Tumolvolumens im MRT

Zur Bestimmung der Tumorgöße wurde die modifizierte MacDonald Methode verwendet [61]. Hierzu wurden die T1 gewichteten Kontrastmittel-MRT-Aufnahmen verwendet, welche zu Navigationszwecken vor der Operation angefertigt wurden. Es wurde in axialer Schnittführung jener Schnitt mit der größten Tumorausdehnung aufgesucht und die beiden längsten, orthogonal aufeinander stehenden Durchmesser ausgemessen. Dann wurden die Schichten gezählt, in welchen der Tumor zu erkennen war. Das Tumolvolumen wurde mittels der Volumenformel des Ellipsoids berechnet:

$$\text{Tumolvolumen} = \frac{4}{3}\pi \times \frac{d1}{2} \times \frac{d2}{2} \times \left(\frac{s}{2} \times t\right) = \frac{1}{6}\pi \times d1 \times d2 \times (s \times t)$$

Hierbei stellen  $d1$  und  $d2$  die orthogonalen Durchmesser,  $s$  die Nummer der Schichten, in denen der Tumor sichtbar ist und  $t$  die Dicke der Schichten dar.



**Abbildung 10: Ausmessen des Tumordurchmessers mittels IDS 7 (Sectra AB, Linköping):** Kraniales MRT eines Patienten mit diagnostiziertem Glioblastoma multiforme in axialer Schnitfführung. Raumforderung mit randständiger Kontrastmittelanreicherung. Man erkennt in Grün die orthogonal aufeinander stehenden Durchmesser des Tumors die zur Volumenberechnung verwendet wurden.

#### 4.10 Bestimmung des Methylierungsstatus des Promoters des *MGMT*-Gens

Die Bestimmung des Methylierungsstatus des Promoters des *MGMT*-Gens wurde mittels methylierungsspezifischer Polymerase-Kettenreaktion (MS-PCR) durchgeführt. Hierbei wird ein bestimmter Abschnitt des *MGMT*-Gens jeweils für das methylierte und für das unmethylierte Gen mittels PCR vervielfältigt. Abhängig von den unterschiedlichen Signalen beider Reaktionsansätze ergibt sich der Grad der Methylierung. Als Primer für die MS-PCR wurden sowohl die von Esteller *et al.*, als auch die von Felsberg *et al.* in ihren Arbeiten eingesetzten Primer verwendet [26,28].

Sämtliche Untersuchungen des Promoters des *MGMT*-Gens wurden durch die Klinik für Neuropathologie durchgeführt und dem pathologischen Befund zum jeweiligen Tumorpräparat entnommen. Diese

Daten werden mit freundlicher Genehmigung des Direktors des Institutes für Neuropathologie Univ.-Prof. Schulz-Schaeffer verwendet.

#### 4.11 Bestimmung des Mutationsstatus des *IDH1*-Gens

Die Bestimmung des Mutationsstatus des *IDH1*-Gens erfolgte durch eine immunhistochemische Anfärbung des Tumorpräparats. Darüber hinaus wurde der Mutationsstatus mittels Pyrosequenzierung des entsprechenden Genabschnitts untersucht. Hierbei wird die zu untersuchende DNA zunächst in Einzelstränge aufgespalten, dann mittels PCR amplifiziert und anschließend mit einem spezifischen Sequenzierungsprimer hybridisiert. Dann werden nacheinander die jeweiligen dNTPs hinzugegeben. Falls das jeweils hinzugegebene dNTP komplementär zum Vorlagestrang ist, wird es durch die Polymerase eingebaut und es entsteht freies Pyrophosphat. Dieses Pyrophosphat wird in eine Reaktionskaskade eingeschleust, an deren Ende ein kleiner Lichtblitz entsteht. Diese Lichtblitze werden gemessen. Aus der Information, welches dNTP hinzugegeben wurde und ob das hinzugefügte dNTP komplementär zum Vorlagestrang war, errechnet ein Computerprogramm die DNA-Sequenz. Beide Untersuchungen wurden durch die Klinik für Neuropathologie durchgeführt und dem pathologischen Befund zum jeweiligen Tumorpräparat entnommen. Die Daten werden mit freundlicher Genehmigung des Direktors des Institutes für Neuropathologie Prof. Schulz-Schaeffer verwendet.

#### 4.12 Laboranalyse

Zusätzlich zur Analyse der miRNA Expressionen wurden alle entnommenen Blutproben einer standardisierten Laboranalyse unterzogen. Hierbei wurden Infektparameter wie CRP und Leukozytenzahl, Leber- und Nierenfunktionsparameter, sowie Schilddrüsenhormone, Hämoglobin und Thrombozytenzahl untersucht und auf eine Korrelation zu den miRNA Expressionen überprüft.

#### 4.13 Medikamentenanalyse

Bei sämtlichen Patienten wurde analysiert, ob sie präoperativ Dexamethason eingenommen hatten und ob eine Korrelation zwischen der Einnahme und den miRNA Expressionen bestand.

#### 4.14 TCGH-Datensatz

Zur Validierung der Ergebnisse anhand einer unabhängigen Kontrollgruppe wurde ein Referenzdatensatz aus der TCGA-Datenbank extrahiert.

Der „The Cancer Genome Atlas“ ist ein Projekt welches sich mit der Katalogisierung von molekularen Aberrationen auf DNA-, RNA-, Protein- und epigenetischer Ebene beschäftigt, die

Krebserkrankungen verursachen oder beeinflussen können. Es dient dem besseren Verständnis der molekularbiologischen Grundlage und soll dazu dienen Diagnostik und Therapie zu optimieren. In der Datenbank wurden 131 Datensätze von GBM-Patienten selektiert, die nach Stupp-Protokoll behandelt worden waren und von denen Daten in Hinblick auf die Expression von miRNA-181d und 26a vorlagen.

#### 4.15 Statistische Analyse

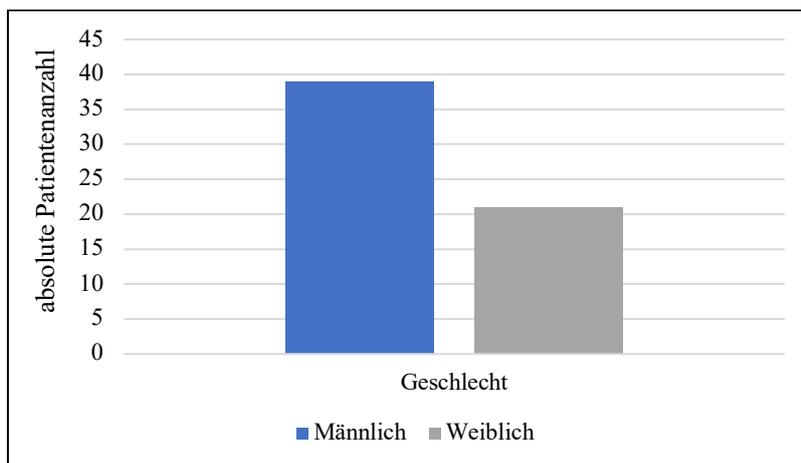
Alle statistischen Auswertungen wurden mittels SPSS v.25 (IBM, Armonk, USA) durchgeführt. Zur Analyse der Korrelation zwischen miRNA Expression in Tumor und Plasma wurde ein lineares Regressionsmodell verwendet. Auch zum Vergleich von Tumolvolumen und miRNA Expression im Plasma wurde selbiges Modell herangezogen. Klinische Parameter, wie progressionsfreies Überleben, Gesamtüberleben und Alter zu Beginn der Erkrankung wurden ebenfalls mit den Ergebnissen der molekulargenetischen Untersuchungen korreliert. Darüber hinaus wurden auch die Laboranalysen, sowie die Einnahme von Dexamethason mit den Ergebnissen der molekulargenetischen Untersuchungen korreliert. Ein Progress der Erkrankung wurde zum einen radiologisch als eine neue kontrastmittelanreiche Tumorformation definiert. Zum anderen wurden ein Abfall des Karnofsky-Index um mehr als 30 %, sowie der Tod als Progress angesehen.

Innerhalb von 48 Stunden postoperativ wurde ein MRT mit Kontrastmittel durchgeführt, anhand welchem das Resektionsausmaß bestimmt wurde. Zur Analyse von progressionsfreiem Überleben und Gesamtüberleben wurde die Cox Regression verwendet. Resektionsausmaß, Alter zu Beginn der Erkrankung, *MGMT*-Promoter-Methylierungsstatus, *IDH1*-Mutationsstatus, sowie der Karnofsky-Index wurden mit in die finale Analyse eingeschlossen. Ein  $p$ -Wert  $< 0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen. Ein  $p$ -Wert  $< 0,10$  wurde als statistischer Trend gewertet. Die Standardabweichung wird durch  $\pm$  angezeigt. Die Spannweite der Expressionen wird durch eckige Klammern [ ] präsentiert.

## 5 Ergebnisse

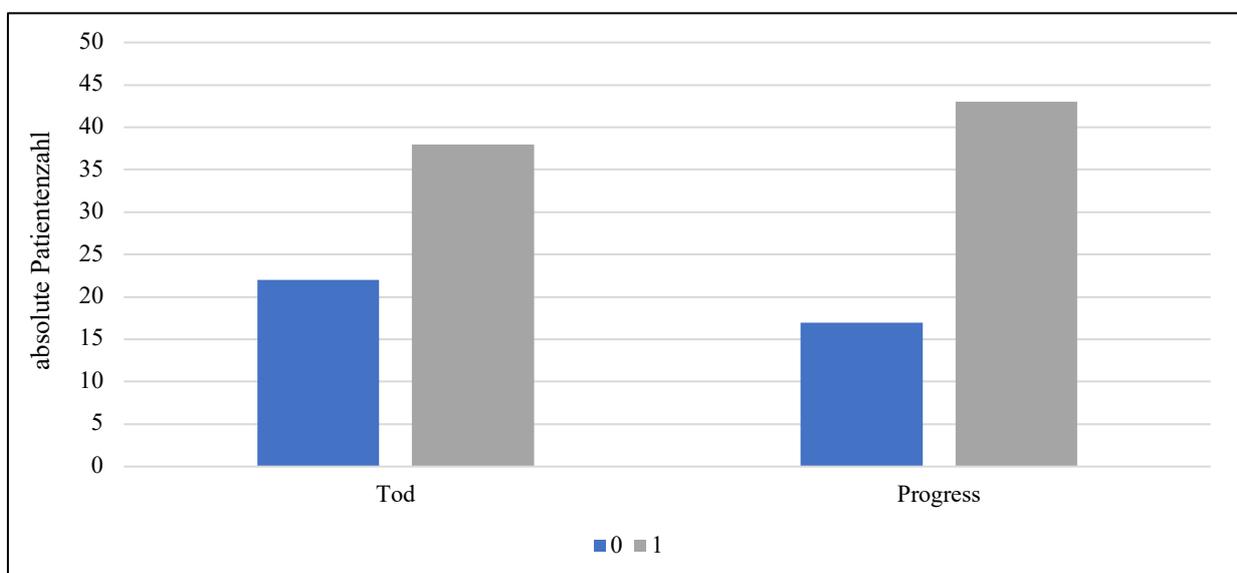
### 5.1 Patientenkollektiv

In dieser Arbeit wurden Blut- und Tumorproben von insgesamt 60 Patienten mit einem diagnostizierten Glioblastom untersucht. Davon waren 39/60 (65%) männlich und 21/60 (35%) weiblich. Das durchschnittliche Erkrankungsalter betrug  $65,7 \pm 11,9$  Jahre mit einer Altersspanne von 35 bis 87 Jahren.



**Abbildung 11: Geschlechtsverteilung innerhalb der Patienten mit einer Glioblastom-Erkrankung:** 39/60 (65%) der Patienten waren männlich, 21/60 (35%) waren weiblich.

Zum Zeitpunkt der Erfassung der klinischen Daten waren 38/60 (63,3%) Patienten verstorben. Bei 43/60 (71,7%) Patienten konnte ein Progress festgestellt werden.



**Abbildung 12: Anteil der Patienten mit Progress, sowie der Verstorbenen zum Zeitpunkt der Erfassung der klinischen Daten:** Am Ende des Nachbeobachtungszeitraums im März 2021 waren 38/60 (63,3%) der Patienten verstorben. Bei 43/60 (71,7%) Patienten war ein Progress zu verzeichnen.

Das progressionsfreie Überleben (PFS) der Kohorte betrug im Mittel  $9,7 \pm 4,5$  Monate, [2,4 Monate – 17,0 Monate]. Das Gesamtüberleben (OS) der Patienten betrug im Mittel  $11,3 \pm 5,7$  Monate, [2,4 Monate – 31,6 Monate].

Bei 40/60 (66,7%) Patienten konnte eine Methylierung des *MGMT*-Promoters nachgewiesen werden. Bei 19/60 (31,7%) Patienten konnte keine Methylierung nachgewiesen werden und bei einem Patienten (1,7%) Patient konnte technisch bedingt kein Methylierungs-Status des *MGMT*-Promoters erhoben werden. Bei Patienten mit Methylierung des *MGMT*-Promoters zeigte sich ein signifikant verlängertes OS ( $p = 0,05$ ).

Einer von 60 (1,7%) Patienten wies eine *IDH1* Mutation auf, 59/60 (98,3%) Patienten zeigten einen *IDH1* Wildtyp.

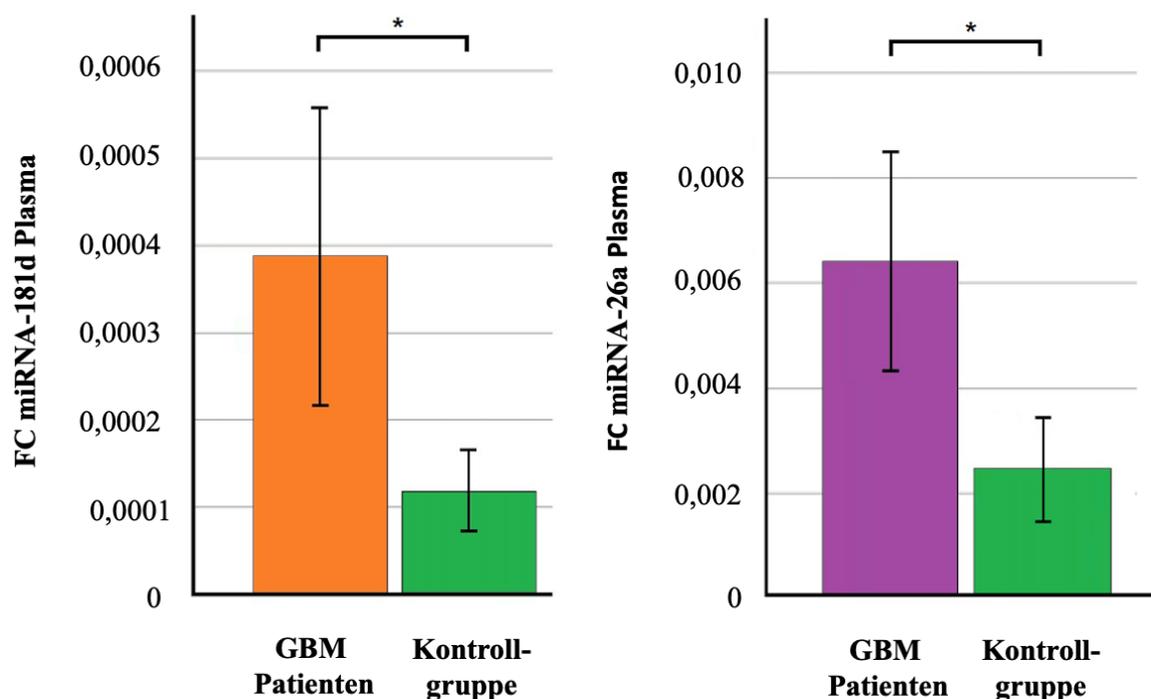
Die Gross total Resektion des Tumors (GTR) war bei 14/60 (23,3%) der Patienten möglich, bei den restlichen 46/60 (76,7%) Patienten konnte nur eine Teilresektion (STR) vorgenommen werden. Patienten bei denen eine GTR durchgeführt werden konnte zeigten eine Verlängerung von OS ( $p = 0,03$ ) und PFS ( $p = 0,01$ ).

Die durchschnittliche TumorgroÙe der Patienten betrug  $36,7 \text{ cm}^3 \pm 26,2 \text{ cm}^3$ , [0,48  $\text{cm}^3$ –99,66  $\text{cm}^3$ ]. Hierbei zeigte sich ein verlängertes OS bei Patienten mit kleinem Tumolvolumen ( $p = 0,07$ ).

Der mediane Karnofsky Performance Score bei Diagnose betrug 90, die erzielten Scores lagen zwischen 60 und 100. Ein höherer Karnofsky Performance Score war mit einem verlängerten OS vergesellschaftet.

## 5.2 miRNA-26a und -181d Expression im Plasma von GBM-Patienten und der Kontrollgruppe

Die Expressionen von miRNA-181d und -26a wurden als fold change angegeben. Die 30 Probanden der Kontrollgruppe, welche keine Krebsvorgeschichte aufwiesen, zeigten im Plasma eine miRNA-181d und -26a Expression von  $FC = 0,00012 \pm 0,00012$ , [0,00001-0,00049], respektive  $FC = 0,00226 \pm 0,00267$ , [0,00009-0,00938]. In den Plasmaproben der Glioblastom-Patienten fand sich eine Expression der miRNA-181d von  $FC = 0,00039 \pm 0,00066$ , [0,00001-0,0034], die Expression der miRNA-26a wurde mit  $FC = 0,012 \pm 0,036$ , [0,00001-0,247] gemessen. Sowohl die miRNA-181d, als auch die miRNA-26a waren im Plasma von GBM-Patienten, im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant überexprimiert ( $p = 0,029$ ;  $p = 0,042$ ; siehe Abbildung 13).



**Abbildung 13: Vergleich der Expressionen von miRNA-181d und -26a im Plasma der Kontrollgruppe und der GBM-Patienten**

Die Y-Achse repräsentiert die Expression von miRNA-181d (links) und -26a (rechts). Die X-Achse zeigt die Expression innerhalb der Kontrollgruppe (grün). Die miRNA-181d Expression wird in orange angezeigt, die miRNA-26a Expression in lila. Die Fehlerbalken zeigen das 95% Konfidenzintervall.

### 5.3 Bestimmung des miRNA-Profiles in Tumor und Plasma

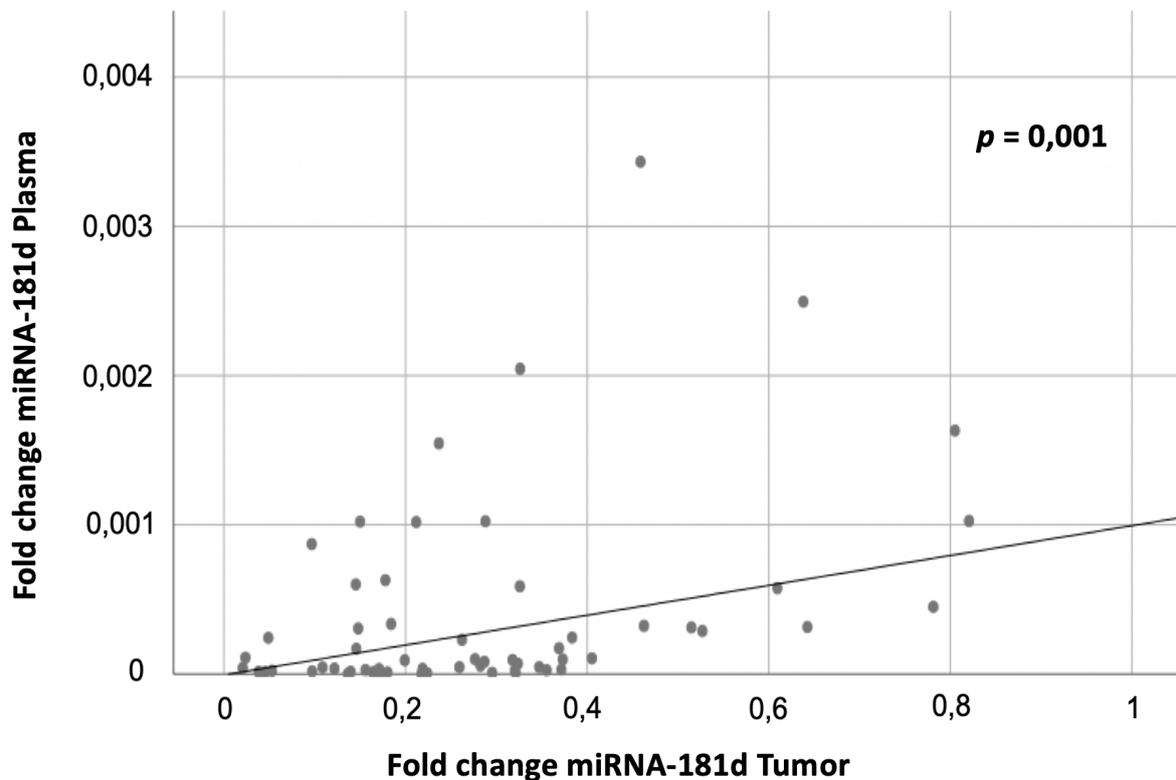
Die Expression von miRNA-181d in den Tumorproben betrug im Patientenkollektiv  $FC = 0,282 \pm 0,191$ , [0,021-0,821], die der miRNA-26a  $FC = 4,359 \pm 6,43$ , [0,003-27,868]. Wie in 5.2 dargelegt betrug die Expression der miRNA-181d in den Blutproben der GBM-Patienten  $FC = 0,00039 \pm 0,00066$ , [0,00001-0,0034], die Expression der miRNA-26a  $FC = 0,012 \pm 0,036$ , [0,00001-0,247]. Die Expressionlevel im Blut lagen um mehrere Größenordnungen unter denen im zugehörigen Tumorgewebe. Dieser Unterschied war sowohl für miRNA-181d also auch miRNA-26a in einem Mann-Whitney-U Test statistisch signifikant:  $p < 0,001$ .

**Tabelle 8: Normalisierte Expression von miRNA-181d und -26a in Plasma und Tumorgewebe.** Die Genexpression im Blut- und Tumorgewebe (n=60) wurde mittels quantitativer Real-Time PCR ermittelt und anschließend auf die endogene Kontrolle RNU 48 normalisiert.

miRNA	Tumorgewebe	Blutplasma
miR-181d	$0,282 \pm 0,191$ , [0,021-0,821]	$0,00039 \pm 0,00066$ , [0,00001-0,0034]
miR-26a	$4,359 \pm 6,43$ , [0,003-27,868]	$0,012 \pm 0,036$ , [0,00001-0,247]

#### 5.4 Korrelation der Expression von miRNA-181d im Tumor und Plasma

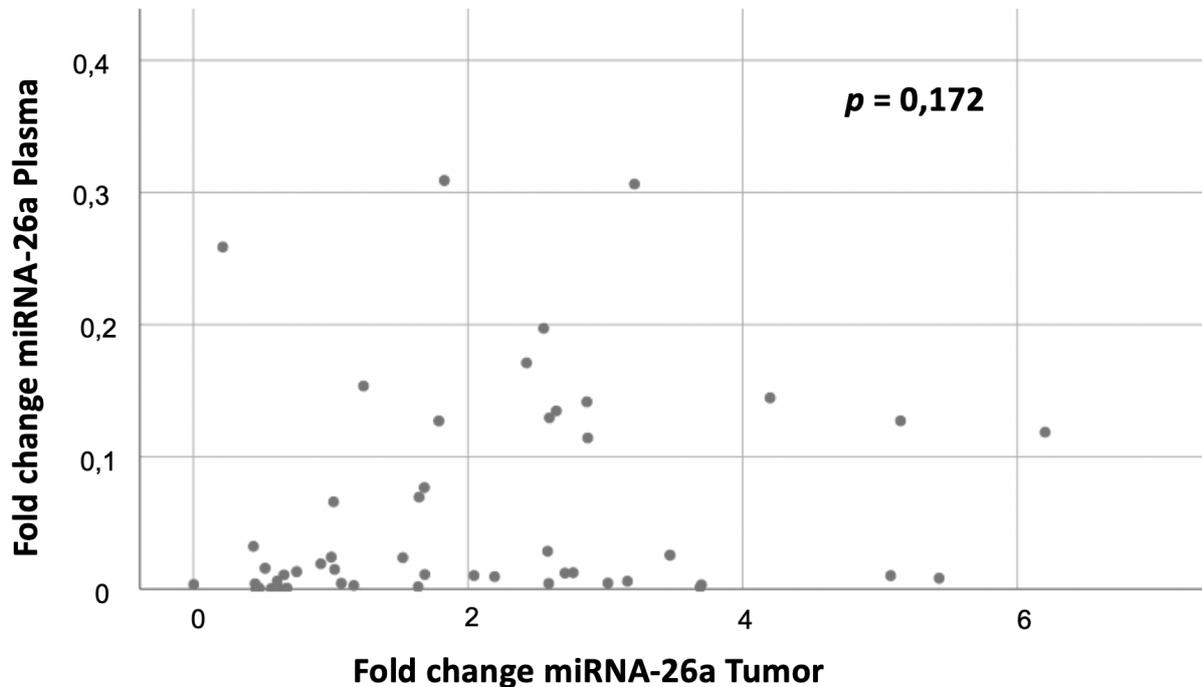
Die Korrelation zwischen der Expression der miRNA-181d im Tumorgewebe und der Expression der miRNA-181d im Blutplasma wurde mittels linearer Regressionsanalyse überprüft. Hierbei zeigte sich eine direkte signifikante Korrelation ( $p = 0,001$ ;  $R = 0,51$ ). Dieser lineare Zusammenhang ist im Punktdiagramm in Abbildung 14 deutlich zu erkennen.



**Abbildung 14: Zusammenhang zwischen der Expression von miRNA-181d in Plasma und Tumor:** Die Genexpression im Blutplasma und Tumorgewebe wurde mittels quantitativer Real-Time PCR ermittelt, auf die endogene Kontrolle RNU48 normalisiert und anschließend mittels linearer Regression analysiert. Es zeigte sich eine direkte signifikante Korrelation zwischen der Expression von miRNA-181d in Tumor und Plasma.

#### 5.5 Korrelation der Expression von miRNA-26a im Tumor und Plasma

Die Korrelation zwischen der Expression der miRNA-26a im Tumorgewebe und der Expression der miRNA-26a im Blutplasma wurde mittels linearer Regressionsanalyse überprüft. Hierbei zeigte sich keine signifikante Korrelation ( $p = 0,707$ ). Auch nach Ausschluss der Extremwerte (hier definiert als Abweichung um 3 Standardabweichungen vom Mittelwert) konnte keine signifikante Korrelation nachgewiesen werden ( $p = 0,172$ ).



**Abbildung 15: Zusammenhang zwischen der Expression von miRNA-26a in Plasma und Tumor:** Die Genexpression im Blutplasma und Tumorgewebe wurde mittels quantitativer Real-Time PCR ermittelt, auf die endogene Kontrolle RNU48 normalisiert und anschließend mittels linearer Regression analysiert. Nach Ausschluss der Ausreißer zeigte sich keine signifikante Korrelation zwischen der Expression von miRNA-26a in Plasma und Tumorgewebe.

## 5.6 Korrelation der miRNA-Expressionen mit klinischen Variablen

Das durchschnittliche Überleben (OS) der Patienten in dieser Arbeit betrug  $11,3 \pm 5,7$  Monate, [2,4 Monate – 31,6 Monate]. Das progressionsfreie Überleben betrug im Mittel  $9,7 \pm 4,5$  Monate, [2,4 Monate – 17,0 Monate]. Der durchschnittliche Zeitraum des Follow-Ups betrug  $9,7 \pm 6,9$  Monate, [2,4 Monate – 31,6 Monate]. Zum Ende dieses Follow-Ups waren 22/60 (36,6%) Patienten noch am Leben. Cox-Regressionsanalysen der miRNA-181d Expression im Tumor verglichen mit OS ( $p = 0,33$ ) zeigten keine signifikante Korrelation. Auch der Vergleich der miRNA-26a Expression im Tumorgewebe mit den Überlebensparametern ( $p = 0,57$ ) zeigte keine signifikante Korrelation.

Die miRNA-181d Expression im Plasma zeigt keine signifikante Korrelation mit dem OS ( $p = 0,19$ ), es konnte jedoch ein Trend in Bezug auf das PFS festgestellt werden ( $p = 0,074$ ).

Bei Vergleich der miRNA-26a Expression im Plasma konnte keine signifikante Korrelation mit dem Überlebensparametern gezeigt werden (OS:  $p = 0,78$ ; PFS:  $p = 0,25$ ).

### 5.7 Korrelation der miRNA Expression mit verschiedenen Plasma-Parametern

Details bezüglich der Ergebnisse der Blutuntersuchungen sind in Tabelle 9 aufgeführt. Sämtliche untersuchten Infektparameter waren im Normalbereich oder zeigten sehr geringe Abweichungen von der Norm. In einigen Fällen konnten erhöhte Leukozytenzahlen festgestellt werden. In keinem dieser Fälle konnte eine akute Infektion festgestellt werden. Höchstwahrscheinlich lassen sich diese Werte auf eine präoperative Einnahme von Dexamethason zurückführen.

Für keinen der betrachteten Parameter konnte ein Einfluss auf die Plasmaexpression von miRNA-181d und -26a nachgewiesen werden. Weder Nieren- noch Leberwerte hatten einen signifikanten Einfluss. Auch für die Schilddrüsenwerte wurde keine Beeinflussung der miRNA Expressionen detektiert werden. Die betrachteten Parameter der zellulären Blutbestandteile konnten keinen Effekt auf die untersuchten miRNAs darlegen.

**Tabelle 9: Details der Blutuntersuchungen**

Parameter	Mittelwert $\pm$ SD, [Spannweite]	Korrelation mit der miRNA-181d Expression im Blutplasma	Korrelation mit der miRNA-26a Expression im Blutplasma
Hämoglobin	13.9 $\pm$ 1.43, [10.4 - 16.9]	$p = 0.74$	$p = 0.81$
Thrombozytenzahl	242 $\pm$ 67, [113 - 411]	$p = 0.39$	$p = 0.61$
Leukozytenzahl	10.3 $\pm$ 4.1, [2.1 - 22.8]	$p = 0.57$	$p = 0.38$
Alanin Aminotransferase (ALT)	33.1 $\pm$ 25.2, [6.0 - 149.1]	$p = 0.41$	$p = 0.87$
Aspartat Transaminase (AST)	25.8 $\pm$ 13.8, [11.0 - 103.0]	$p = 0.83$	$p = 0.43$
C-reaktives Protein (CRP)	2.9 $\pm$ 4.2, [0.3 - 21.0]	$p = 0.95$	$p = 0.23$
Thyreotropin (TSH)	1.5 $\pm$ 1.0, [0.1 - 5.0]	$p = 0.23$	$p = 0.21$
Glomeruläre Filtrationsrate (GFR)	81.5 $\pm$ 19.2, [30.9 - 135.0]	$p = 0.21$	$p = 0.48$
Kreatinin	0.96 $\pm$ 0.49, [0.52 - 4.3]	$p = 0.61$	$p = 0.75$

### 5.8 Korrelation der miRNA Expressionen im Plasma mit der Einnahme von Dexamethason

Um eine mögliche Beeinflussung der miRNA Expressionen im Plasma durch die Einnahme von Dexamethason beurteilen zu können, wurden die untersuchten Patienten anhand der erfolgten oder nicht erfolgten präoperativen Einnahme von Dexamethason in zwei Gruppen aufgeteilt. 40/60 (66,6%) Patienten hatten präoperativ Dexamethason erhalten, 20/60 (33,3%) Patienten hatten präoperativ keine Steroide eingenommen. Die Steroideinnahme hatte keinen signifikanten Zusammenhang mit den Expressionen von miRNA-181d und 26a im Plasma ( $p = 0,94$ ;  $p = 0,82$ ). Patienten welche präoperativ Steroide eingenommen hatten, wiesen eine signifikant geringere Leukozytenzahl auf ( $p = 0,01$ ). Eine signifikante Korrelation zwischen der Leukozytenzahl und den Expressionen von miRNA-181d und -26a im Plasma konnte jedoch nicht festgestellt werden ( $p = 0,57$ ;  $p = 0,38$ ).

### 5.9 Vergleich der miRNA Expressionen im Plasma mit dem Tumolvolumen

Weder die Expressionen von miRNA-181d noch von miRNA-26a korrelieren signifikant mit dem Tumolvolumen ( $p = 0,94$ ;  $p = 0,62$ ).

Des Weiteren wurde eine multivariate Analyse, die Expressionen von miRNA-181d und -26a in Tumor und Plasma betreffend, unter zusätzlicher Betrachtung des Tumolvolumens und der verschiedenen untersuchten Blutwerte durchgeführt. Hierbei war die Expression der miRNA-181d im Tumor der einzige signifikante Determinator der miRNA-181d Expression im Plasma ( $p = 0,005$ ). In einer ähnlichen multivariaten Analyse die miRNA-26a betreffend konnte kein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden ( $p = 0,97$ ).

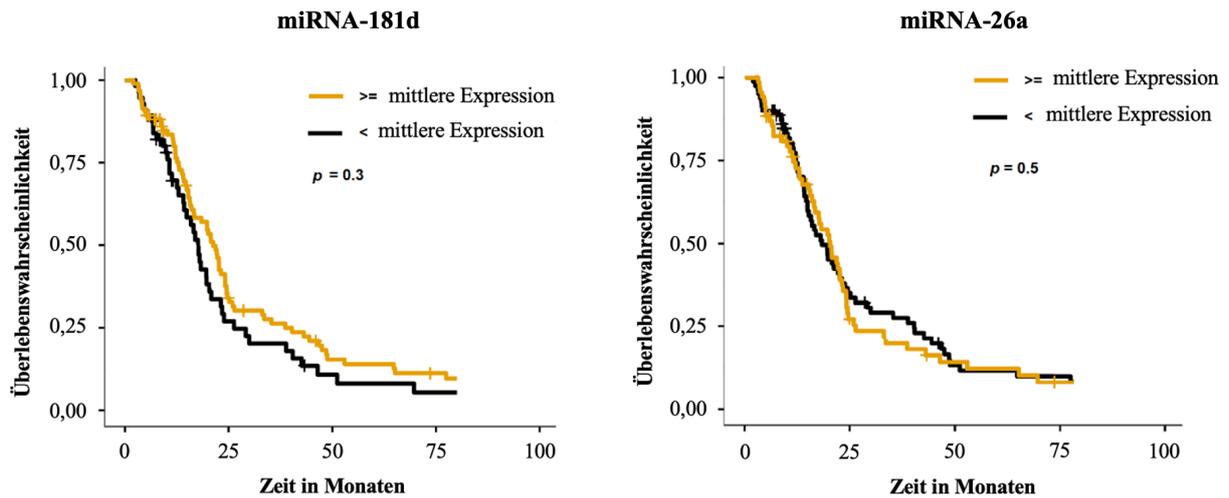
### 5.10 Validierung mittels TCGA-Datensatz

Zur Validierung der Ergebnisse wurden die aus der TCGA-Datenbank extrahierten Referenzdaten analysiert.

Die 131 extrahierten Datensätze wurden anhand der mittleren FC-Werte von miRNA-181d und -26a in je zwei Gruppen aufgeteilt und auf ihr Überleben hin betrachtet.

Es ergab sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen miRNA Expression und OS ( $p = 0,3$  und  $p = 0,5$ ; siehe Abbildung 16).

Eine TCGA basierte Korrelation zwischen den miRNA Leveln im Plasma und den Überlebensdaten konnte auf Grund mangelnder Plasma Expressions Level von miRNA-181d und -26a in der TCGA-Datenbank nicht durchgeführt werden.



**Abbildung 16: TCGA-Referenzdaten zur Länge des Gesamtüberlebens in Bezug auf die Expression von miRNA-181d und -26a:** Patienten mit einer überdurchschnittlichen Expression (gelb) von miRNA-181d (links) und -26a (rechts) zeigen im Vergleich mit Patienten mit einer unterdurchschnittlichen miRNA Expression (dunkelgrau) kein verlängertes oder verkürztes Überleben.

## 6 Diskussion

### 6.1 Diskussion der Methodik

#### 6.1.1 Patientenkollektiv

Zur Beantwortung der Fragestellung, wurden Blut- und Tumorproben einer Kohorte von Glioblastom-Patienten auf ihre miRNA-181d und miRNA-26a Expressionen untersucht. Um die hierbei erhobenen Daten reliabel vertreten zu können, ist eine Repräsentativität des untersuchten Kollektivs Grundvoraussetzung. Das durchschnittliche Erkrankungsalter der Patienten in dieser Arbeit lag bei 65,7 Jahren. Männern waren häufiger vertreten (1,85:1). Das in der Literatur beschriebene mediane Alter bei Diagnosestellung liegt bei 64 Jahren und die Erkrankung findet sich 1,2-1,9 mal häufiger bei Männern [20]. Es zeigt sich also sowohl das Erkrankungsalter als auch die Verteilung zwischen den Geschlechtern betreffend eine sehr gute Übereinstimmung mit der Literatur und es kann von einer Repräsentativität der Kohorte ausgegangen werden.

Bei Stellung der Diagnose betrug der mittlere Karnofsky Performance Score 90. Auch hier findet sich eine Übereinstimmung mit der Literatur, in welcher der mittlere Karnofsky Performance Score mit 80-90 beschrieben wird [49]. Auch den Karnofsky Performance Score betreffend kann eine Repräsentativität angenommen werden.

Eine Gross total Resektion des Tumors war bei 23,3% der Patienten möglich, bei den restlichen 76,7% erfolgte eine Teilresektion. In der Literatur werden Gross total Resektionen in 20-30% der Fälle beschrieben [3,8,47,91,95,101]. Das durchschnittliche Überleben der Patienten lag bei 11,3 Monaten. In der Literatur werden mediane Überlebenszeiten von 10 – 15 Monaten beschrieben [9,96,125]. Die Resektionsdaten sowie die Überlebenszeiten des untersuchten Kollektivs sind also ebenfalls als repräsentativ anzusehen.

Bei einem Patienten (1,7%) konnte eine Mutation des *IDHI*-Gens nachgewiesen werden, bei 40 Patienten (66,7%) konnte eine Methylierung des *MGMT*-Promotors gezeigt werden. In der Literatur werden bei circa 35-45% der Patienten eine *MGMT*-Promotor-Methylierung beschrieben [14,36], ungefähr bei 5-10% eine Mutation des *IDHI*-Gens [75]. Die Diskrepanzen bezüglich der Methylierungen des *MGMT*-Promotors sind wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die in dieser Arbeit zur Analyse des *MGMT*-Promotors verwendete methylierungsspezifische PCR (MS-PCR) mit zwei Primern durchgeführt wurde. Hierbei wurden sowohl die von Esteller *et al.* als auch die von Felsberg *et al.* in ihren Arbeiten verwendeten Primer eingesetzt [26,28]. Mit den Primern lassen sich unterschiedliche, sich jedoch leicht überlappende Abschnitte des besagten Promotors untersuchen. Der *MGMT*-Promotor wurde immer dann als methyliert angesehen, wenn in einer oder beiden durchgeführten MS-PCRs eine

Methylierung festgestellt werden konnte. In den meisten anderen Arbeiten wurde nur einer dieser Primer verwendet, was die geringeren Zahlen in der Literatur erklärt.

Insgesamt zeigt die Kohorte der vorliegenden Arbeit zur Literatur vergleichbare Charakteristika, sodass von einer Repräsentativität ausgegangen werden kann.

### 6.1.2 miRNA Analyse

In dieser Arbeit wurde Blutplasma als Trägermedium der miRNA verwendet. Zur Liquid Biopsy Analyse bei Patienten mit Glioblastoma multiforme eignen sich jedoch darüber hinaus prinzipiell auch Liquor cerebrospinalis und Vollblut.

MiRNAs werden von sämtlichen Zellen externalisiert - auch von Tumorzellen. Hierbei sind die miRNAs Teil des von den Zellen ins Blut abgegebenen Sekretoms [12,87]. Die miRNAs treten hierbei in verschiedenen Formen auf. Sie kommen in Exosomen verpackt, auf Proteine geladen oder auch frei flottierend vor [12,121]. Auf Grund verschiedener im Blut vorkommender RNasen ist die Lebenserwartung frei flottierender miRNAs im Blut mit einigen Stunden relativ kurz [65]. Um möglichst genaue Informationen über das GBM zu erhalten, muss das Medium gewählt werden, in welchem die aus dem Tumor stammenden miRNAs möglichst unverfälscht vorliegen. Hier eignen sich prinzipiell sowohl Blutplasma als auch Vollblut, da beide jene zirkulierenden miRNAs enthalten, die untersucht werden sollen [63]. Bei der Untersuchung von Vollblut, werden neben den zirkulierenden miRNAs verfahrensbedingt zusätzlich auch die miRNAs in den Blutzellen analysiert. Sämtliche Veränderungen im miRNom der Blutzellen würden also mit analysiert und könnten zu einer Veränderung beziehungsweise Verfälschung der eigentlich gesuchten Informationen aus dem Tumor führen [21,78,81]. Durch derartige Beeinflussungen wäre ein direkter Rückschluss auf den Tumor nur eingeschränkt möglich.

Neben der Analyse von Plasma, stellt auch die Verwendung von Liquor cerebrospinalis eine mögliche Option dar. Die Verwendung von Plasma bietet jedoch einige Vorteile. Zum einen werden Blutentnahmen im Rahmen des stationären Aufenthalts routinemäßig durchgeführt. Zum anderen sind Lumbalpunktionen deutlich invasiver und es bestehen gewisse Risiken, wie postpunktionelle Kopfschmerzen. Auch Blutungen und Schädigungen des Rückenmarks können auftreten [27].

Auf Grund dieser Überlegungen wurde die Entscheidung getroffen, Blutplasma als Trägermedium der Liquid Biopsy zu verwenden.

### 6.1.3 Methoden zur miRNA Expressionsanalyse

Zur Untersuchung der miRNA Expressionen wurde in dieser Arbeit die quantitative Real-Time PCR verwendet. Des Weiteren können zur Analyse von miRNAs auch Microarrays und Next-Generation Sequencing eingesetzt werden [13,52]. Welche der Techniken am besten geeignet ist, hängt von der jeweiligen Fragestellung ab.

Die Vorteile bei der Nutzung von Microarrays liegen in der Möglichkeit die Expression sehr vieler miRNAs gleichzeitig zu messen. Mittels vorgefertigter Arrays ist es möglich, über 1000 miRNAs gleichzeitig zu untersuchen [52,116]. Jedoch gilt hierbei zu beachten, dass die Anfertigung von Microarrays sehr zeitintensiv ist und nur vergleichsweise wenige Proben untersucht werden können. Darüber hinaus werden relative große Mengen an Probenmaterial benötigt [7].

Next-Generation Sequencing bietet die Möglichkeit der Untersuchung des gesamten RNomes, beziehungsweise miRNomes. Es ermöglicht die Identifikation neuer miRNAs, sowie die Untersuchung vieler miRNAs zur selben Zeit [13,32]. Auch können hierbei Veränderung in den miRNAs selbst festgestellt werden. Wie auch bei der Verwendung von Microarrays sind beim Next Generation Sequencing ein hoher Kosten- und Zeitaufwand notwendig. Darüber hinaus werden auch bei Next-Generation Sequencing große Probenmengen benötigt.

Die Vorteile der qPCR liegen in ihrer guten Reproduzierbarkeit und hohen Sensitivität. Sie wird daher oft als Goldstandard zur Quantifizierung von Genexpressionen angesehen [31]. Ferner sind bei der qPCR deutlich geringere Probenmengen erforderlich [7]. Zusätzlich ist die RT-qPCR kostengünstiger. Außerdem hat sich die Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Geweben gegenüber der Microarray-Technologie als überlegen erwiesen [31,85].

Die Wahl der RT-qPCR zur Bestimmung der Expressionen von miRNA-26a und -181d in dieser Arbeit erfolgte aus mehreren Gründen. Die zu untersuchenden Biomarker waren bereits zu Beginn der Studie klar identifiziert und es wurde eine gezielte Analyse angestrebt. Darüber hinaus war auch die limitierte Menge an Probenmaterial für die Auswahl entscheidend.

## 6.2 Diskussion der Ergebnisse

### 6.2.1 Expression von miRNA-181d und -26a im Plasma von GBM-Patienten und Kontrollprobanden

Der klinische Wert von blutbasierten Biomarkern bemisst sich an verschiedenen Kriterien. Er wird unter anderem daran beurteilt, wie exakt sie die Tumorbiologie widerspiegeln. Darüber hinaus müssen standardisierte Technologien zu ihrer Detektion zur Verfügung stehen [38,109]

In dieser Arbeit zeigte sich eine signifikant hochregulierte Expression von miRNA-26a und -181d im Plasma von GBM-Patienten im Vergleich zum Plasma von gesunden Probanden. Die erhöhte Expression beider miRNAs im Plasma kann als erster Anhaltspunkt für den Ursprung beider miRNAs im Tumorgewebe gewertet werden.

Ähnliches konnte von Hamidi *et al.* gezeigt werden. Sie untersuchten die Expressionen von miRNA-26a und -21 im Blut von 15 Glioblastom-Patienten, sowie 11 Plasma-Kontrollproben von gesunden Individuen. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit zeigte sich eine hochregulierte Expression der miRNA-26a im Plasma von GBM-Patienten im Vergleich zum Kontroll-Plasma [76]. Ein

möglicher Grund für diese Ergebnisse findet sich in der generellen Hochregulation von miRNA-26a im Vergleich zu normalem Hirngewebe [94].

Yang *et al.* und Zhi *et al.* konnten darüber hinaus zeigen, dass die Plasma Expressionslevel verschiedener dysregulierter miRNAs nach erfolgter Glioblastomresektion auf „normale“ Expressionslevel, wie sie bei gesunden Individuen zu finden sind, zurückgehen [113,124]. Hierdurch wird ein Zusammenhang zwischen der Zahl der vorhandenen GBM-Zellen und der Expression verschiedener miRNAs im Plasma impliziert.

Es gibt verschiedene mögliche Erklärungen für die erhöhte Expression von miRNA-26a und -181d im Blutplasma von GBM-Patienten im Vergleich zu Gesunden. Eine Theorie beruht auf einem bisher ungeklärten Sekretionsmechanismus, welcher gezielt miRNAs aus GBM-Zellen ausschleust. Darüber hinaus bietet auch die beim GBM zum Teil zerstörte Blut-Hirn-Schranke eine mögliche Erklärung. Ohne ihre Barrierefunktion gelangen vermehrt miRNAs aus den Tumorzellen in den Blutkreislauf.

Ferner bleibt zu diskutieren, ob zur zuverlässigen klinischen Verwendung eines blutbasierten Biomarkers, ein Unterschied zwischen dessen Expression im Plasma von Erkrankten und dem Plasma von Gesunden bestehen muss. Es erscheint auch denkbar, dass ein Marker auch ohne diese Eigenschaft verwendet werden kann, wenn er eine direkte Korrelation zwischen Plasma und Tumor aufweist.

### 6.2.2 Große Spannweite der Expressionswerte im Plasma

In dieser Arbeit konnte insbesondere bei der Analyse der Expression von miRNA-26a im Plasma eine sehr große Spannweite der Expressionslevel festgestellt werden. Die FC-Werte reichten von 0,00001 bis 0,247, der Mittelwert lag bei 0,012 und die Ergebnisse wiesen eine Standardabweichung von 0,036 auf. Bei der Untersuchung von miRNA-181d konnte eine Spannweite von 0,00001 bis 0,0034 mit einem Mittelwert von 0,00039 und einer Standardabweichung von 0,00066 festgestellt werden. Die Spannweite der Expression von miRNA-26a ist also deutlich größer als die Spannweite der Expression von miRNA-181d.

Die hier gezeigte große Spannweite der miRNA-26a Expressionen konnte auch in anderen Studien festgestellt werden [76]. Dies deckt sich mit den Ergebnissen zu Untersuchungen der miRNA-21 und scheint möglicherweise ein weiteres Beispiel für die Heterogenität des Glioblastoms zu sein [41].

### 6.2.3 Korrelation der miRNA-181d und -26a Expressionen in Plasmaproben und Tumorge-webe

Das Potential von miRNA-181d und -26a als präoperative Biomarker definiert sich nicht allein dadurch, dass ihre Expression im Blut von GBM-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden dysreguliert ist. Der entscheidende Aspekt ist, ob eine direkte Korrelation zwischen ihren Expressionsleveln im

Tumorgewebe und im Blutplasma besteht. Nur so ist ein Rückschluss von den im Blut ermittelten Werten auf die Situation im Tumor überhaupt möglich.

In dieser Arbeit korrelierte miRNA-181d im Tumorgewebe signifikant mit der Expression im korrespondierenden Plasma ( $p = 0,001$ ). Der Korrelationskoeffizient  $R$  betrug 0,51. Die Expression von miRNA-26a andererseits korrelierte nicht signifikant mit ihren Plasma-Leveln ( $p = 0,707$ ).

Auf Grundlagen der oben genannten Grundvoraussetzung eines direkten Zusammenhangs, eignet sich vor allem miRNA-181d als potentieller Plasmamarker für das Glioblastom. MiRNA-26a zeigt keine derartige Eignung als blutbasierte Biomarker.

Auch in der Literatur finden sich ähnliche Schwierigkeiten. Sowohl bei Untersuchungen der miRNA-21 als auch der miRNA-26a konnte keine direkte Korrelation zwischen Tumorproben und dazugehörigen Plasmaproben demonstriert werden [41,76]. Eine mögliche Erklärung mag in der geringen Zahl der dort untersuchten Probanden liegen. Hamidi *et al.* untersuchten miRNA-21 und -26a an 15 GBM-Patienten und 11 gesunden Kontroll-Probanden, Ilhan-Mutlu *et al.* untersuchten miRNA-21 an 10 Glioblastom-Patienten. Ein weiterer möglicher Grund könnte die generell sehr niedrige Expression von miRNA-181d und -26a im Blutplasma sein. Auch die oben bereits diskutierte große Spannweite der miRNA Expressionen, vor allem die miRNA-26a betreffend, mag deren prädiktiven Wert einschränken. Eine weitere mögliche Erklärung für die Ergebnisse liegt in der intratumoralen Heterogenität der Glioblastom-Erkrankung. Neuere Studien zeigen, dass beim GBM bezüglich verschiedener molekularer Parameter eine starke Heterogenität besteht. Es finden sich deutlich unterschiedliche Ausprägungen des selben Merkmals im gleichen Tumor [24,62]. So wäre es denkbar, dass an verschiedenen Stellen im Tumor verschiedene miRNA Expression vorliegen. Es wäre also denkbar, dass der gesamte Tumor einen Zusammenhang mit der miRNA Expression im Plasma aufweist, einige spezifische Stellen jedoch auf Grund einer Abweichung der Expressionen keine signifikante Korrelation zeigen.

Zurzeit werden in der Arbeitsgruppe, in welcher auch diese Arbeit entstanden ist, weitere Studien angestellt, die sich mit der Heterogenität von miRNA Expressionen im GBM auseinandersetzen.

#### **6.2.4 Beeinflussung der miRNA Expression durch Komorbiditäten und Steroideinnahme**

Ein weiterer wichtiger Aspekt, welcher untersucht werden sollte, bevor eine präoperative miRNA-basiertes Stratifizierungsmethode in der klinischen Praxis angewendet werden kann, ist die Frage, ob zumindest der Großteil der untersuchten miRNA, tatsächlich ihren Ursprung im Tumor hat. Komorbiditäten wie aktive Entzündungsprozesse sollten, wie bereits oben beschrieben, als potentieller Einflussfaktor auf die miRNA Expression angesehen werden [64].

Klassische klinische Infektparameter wie die Leukozytenzahl oder der CRP-Wert zeigten in der vorliegenden Arbeit keinen Einfluss auf die Expression von miRNA-181d und -26a im Plasma. Hierbei sollte allerdings beachtet werden, dass vor allem die CRP-Werte im Normalbereich waren oder nur geringe Abweichungen davon zeigten. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine stärkere

Inflamationsreaktion die Expressionen jener miRNAs beeinflusst. Nichtsdestotrotz sollte dies den präoperativen prognostischen Wert von miRNA-181d und -26a nicht beeinflussen: Schwere akute Infekte schließen eine elektive Operation, wie die Resektion eines Glioblastoms, normalerweise aus.

Im Kontext der Entzündungsreaktion wurde des Weiteren untersucht, ob eine präoperative Einnahme von Dexamethason, welche auf Grund von vasogenen Hirnödemen im klinischen Alltag nicht selten vorkommt, einen Einfluss auf die Expression von miRNA-181d und -26a im Plasma hat. Hierbei konnte jedoch kein signifikanter Zusammenhang nachgewiesen werden.

Ähnliches konnte in Bezug auf die Leber- und Nierenfunktion festgestellt werden. In der untersuchten Kohorte konnte kein Zusammenhang zwischen der Expression von miRNA-181d und -26a und ALT, AST, GFR und Kreatinin festgestellt werden. In der Literatur findet sich eine Beeinflussung der Plasmalevel bestimmter miRNAs durch Störungen der Leber- und Nierenfunktion [68,104,115]. Eine Beeinflussung der Expressionen von miRNA-181d und -26a kann also nicht gänzlich ausgeschlossen werden. In Zusammenschau mit den Ergebnissen dieser Arbeit erscheint es jedoch naheliegend, dass eine derartige Beeinflussung erst bei starker Einschränkung von Leber- und Nierenfunktion auftritt. Derartige Komorbidität schließen eine GBM-Resektion zumeist aus und schränken daher die Anwendung von miRNA-181d und -26a im klinischen Alltag kaum ein.

### 6.2.5 Einfluss der Tumorgröße auf die Expression von miRNA-181d und -26a im Plasma

Spekulativ könnte ein größerer Tumor aufgrund seiner größeren Tumorzellzahl zu einer höheren miRNA Expression im Plasma führen. Dies wird durch die Literatur insofern gestützt, dass bei Patienten mit GBM die miRNA Expression im Plasma nach erfolgter Tumorsektion auf das Niveau von Patienten ohne Glioblastom zurückgeht [113,124]. Für miRNA-26a konnte dieser Zusammenhang gezeigt werden, miRNA-181d ist in dieser Hinsicht in der Literatur nicht untersucht.

In dieser Arbeit konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Tumolvolumen und der Expression von miRNA-181d und -26a nachgewiesen werden ( $p = 0,94$ ;  $p = 0,62$ ). Ein Zusammenhang nach oben genannter Überlegung konnte entsprechend nicht gezeigt werden. Dies mag durch ein mangelndes Verständnis des Zusammenhangs zwischen miRNA Expression im Tumor und Plasma bedingt sein. Wie genau die miRNA aus dem Tumor ins Blut übergeht ist noch nicht abschließend geklärt.

Darüber hinaus mag auch die Pathologie des Tumors selbst dazu beitragen. Bei Glioblastomen kann ein großer Teil des Tumors aus Nekrosezone bestehen, in welcher kaum, beziehungsweise keine lebenden Zellen zu finden sind, die miRNAs produzieren. Somit muss in Betracht gezogen werden, dass sich nur sehr ungenau bestimmen lässt, wie viel aktiver Tumor tatsächlich vorhanden ist. Hierdurch ließe sich erklären, dass in dieser Arbeit kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Tumolvolumen und der Expression von miRNA-181d und -26a gezeigt werden konnte.

Darüber hinaus finden sich bei Glioblastomen häufig über das gesamte Gehirn verteilt Tumorzellen, die möglicherweise zur miRNA Ausschüttung ins Blutplasma beitragen, jedoch in der Bildgebung noch nicht zu finden sind und somit nicht zur Volumenbestimmung beitragen.

Die gezeigten Ergebnisse decken sich insofern mit der Literatur, dass auch Ilhan *et al.* keinen Zusammenhang zwischen der Plasma Expression von miRNA-21 und dem Tumolvolumen zeigen konnte [41]. Die Aussagekraft dieser Studie ist jedoch durch die Untersuchung von nur 10 Patienten eingeschränkt. In der vorliegenden Arbeit zeigte eine multivariate Analyse der Expression von miRNA-181d in Plasma und Tumor unter Einbezug der Tumorgröße jedoch einen signifikanten Zusammenhang ( $p = 0,005$ ). Selbiger Zusammenhang konnte für miRNA-26a nicht gezeigt werden ( $p = 0,97$ ).

### 6.2.6 Einfluss der Expressionen von miRNA-181d und -26a auf das Überleben der Patienten

Es konnte kein signifikanter Einfluss der Expressionen von miRNA-181d und -26a in Plasma und Tumorgewebe auf das Überleben der Patienten gezeigt werden ( $p = 0,33$ ;  $p = 0,97$ ). Dies ist nicht überraschend, da in der Literatur nur unter der Bedingung einer Implantation von Carmustin-Wafern ein Einfluss von miRNA-181d und -26a auf das Überleben von GBM-Patienten beschrieben ist [92,93]. Da zum Ende des durchschnittlich 9,7 Monate dauernden Follow-Up noch 22 von 60 Patienten am Leben waren, könnten die Überlebensdaten verzerrt sein, da potentielle „Langzeitüberleber“ nicht zum untersuchten Kollektiv beitragen konnten.

### 6.2.7 Vergleich der Überlebensdaten mit den TCGA-Daten

Um die Nachteile des kurzen Follow-Up auszugleichen und die vorhandenen Daten extern zu validieren wurden die Überlebensdaten mit unabhängigen TCGA-Daten verglichen. Hierzu wurden die Expressionsdaten von miRNA-181d und -26a von 131 GBM-Patienten auf das jeweilige Überleben der Patienten korreliert. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit zeigten die TCGA-Daten keinen Zusammenhang zwischen der Expression von miRNA-181d und -26a im Tumor und dem Überleben der Glioblastom-Patienten. Für die Plasma Expressionen waren keine Daten in der Datenbank vorhanden, weshalb ein Vergleich hier nicht möglich war. Dies zeigt wie wenig der Zusammenhang zwischen Tumor- und Plasmaexpression im GBM untersucht ist und unterstreicht die Aktualität der vorliegenden Arbeit.

### 6.2.8 Weitere klinische Parameter

Es konnte in Übereinstimmung mit der Literatur ein verlängertes Gesamtüberleben von Patienten mit einer Methylierung des *MGMT*-Promoters gezeigt werden ( $p = 0,05$ ). Dies ist höchstwahrscheinlich, wie auch in der Literatur beschrieben, auf ein besseres Ansprechen jener Patienten mit einer solchen

---

Methylierung, auf die Therapie mit Temozolomid zurückzuführen [35,36]. Die Transkription des *MGMT*-Gens ist vermindert und somit die Reparaturfunktion des daraus resultierenden Enzyms stark herunterreguliert. Alkylierungen der DNA durch Temozolomid werden weniger häufig repariert und es kommt zu einer verbesserten Wirkung.

Darüber hinaus konnte ein Zusammenhang zwischen dem Überleben der Patienten und dem Resektionsausmaß festgestellt werden. Patienten, bei denen eine Gross total Resektion durchgeführt werden konnte, zeigten ein verlängertes PFS ( $p = 0,01$ ) und ein verlängertes OS ( $p = 0,03$ ). Auch hier findet sich eine Übereinstimmung mit der Literatur, in welcher selbiger Zusammenhang einer möglichst radikalen Resektion mit einem verlängertem Überleben gezeigt werden konnte [3,8,91,95]. Die vermutliche Ursache liegt in der Verringerung der Zahl an aktiven Tumorzellen, die zu einem Fortschreiten der Krankheit beitragen können. Je weniger aktive Zellen vorhanden sind, desto langsamer wächst der Tumor und desto länger dauert es, bis ein Rezidiv auftritt.

## 7 Fazit

1. Die Expression von miRNA-181d und miRNA-26a ist im Plasma von Patienten mit Glioblastoma multiforme im Vergleich zum Plasma von gesunden Kontrollprobanden hochreguliert. Dies kann als ein Zeichen der Ausschüttung jener miRNAs aus dem Tumorgewebe ins Blut angesehen werden.
2. Es besteht eine direkte, signifikante Korrelation zwischen der Expression von miRNA-181d in Blutplasma und Tumorgewebe. Ein direkter Rückschluss vom miRNA-Gehalt im Blut auf den miRNA-Gehalt im Tumor ist möglich.  
Für miRNA-26a konnte keine derartige Korrelation gezeigt werden.
3. Es konnte keine Beeinflussung der Plasma Expression von miRNA-181d und -26a durch Tumolvolumen oder vorhandene Komorbiditäten gezeigt werden. Dies bedeutet eine gute Eignung der miRNAs für ein blutbasiertes Liquid Biopsy Verfahren, da die Marker vor allem einen Rückschluss auf den Tumor selbst zulassen und nicht durch Komorbiditäten verändert werden.
4. MiRNA-181d stellt durch seine Eigenschaften einen vielversprechenden präoperativen Biomarker zur Stratifizierung einer Carmustin-Wafer Therapie dar.
5. Ein Zusammenhang zwischen dem Überleben der Patienten und der Expression von miRNA-181d und -26a konnte nicht gezeigt werden. Diese Ergebnisse bestätigen die vorhandene Literatur.

## 8 Ausblick

Die vorliegende Arbeit zeigt einen direkten Zusammenhang zwischen der Tumor und Plasma Expression von miRNA-181d. Das kann als Grundvoraussetzung für deren Verwendung als stratifizierenden Marker für oder gegen eine Implantation von Carmustin-Wafern angesehen werden. Allerdings ist dies kein Beweis dafür, dass miRNA-181d als ein derartiger stratifizierender Marker eingesetzt werden kann. Zur besseren Erörterung ist eine prospektive Studie notwendig. In dieser sollten einer Gruppe von Patienten mit einer niedrigen miRNA-181d Expression im Plasma Carmustin-Wafer implantiert werden. Einer weiteren Gruppe mit niedriger Expression sollten keine Wafer implantiert werden. Danach sollte überprüft werden, ob ein tatsächlicher Überlebensvorteil vorhanden ist. Hiermit ist die Hoffnung verbunden, die Wirkung vorhersagen zu können und jene Patienten mit vermutlich gutem Ansprechen individuell zu therapieren.

Darüber hinaus bietet es sich an, andere miRNAs als Marker für GBM im Blut zu untersuchen. Hierbei sollten auch Marker für andere Therapien etabliert werden, um eine individualisierte Therapieplanung für jeden einzelnen Patienten durchführen zu können. Auch wäre es denkbar, die Expressionen von miRNAs im Plasma regelmäßig über den Therapieverlauf zu bestimmen. Dies könnte zur Rezidiverkennung oder zur Überprüfung der Wirksamkeit verschiedener Therapien dienen.

Während in der vorliegenden Arbeit alle Analysen an Blutplasma vorgenommen wurden und daher durch verschiedene Vorgänge in anderen Organen beeinflussbar sind, reflektieren zirkulierende miRNAs, die aktiv durch Tumorzellen in Exosomen verpackt ins Blut entlassen werden, vor allem das miRNOME des Tumorgewebes selbst. Dies bietet eine weitere Möglichkeit zum Erhalt von prognostischen und prädikativen Informationen und bietet die Möglichkeit zur Gewinnung spezifischerer Informationen. Darüber hinaus sind in miRNAs innerhalb von Exosomen weniger anfällig für Abbauprozesse. Daher liegt ein weiterer vielversprechender Ansatz in der Analyse von in Exosomen verpackten miRNAs.

An dieser Stelle sollte jedoch auch erwähnt werden, dass die analytischen Methoden für die Nutzung in Form einer klinischen Routine-Prozedur zunächst global standardisiert und reproduzierbar sein sollten. Des Weiteren sollten für ein klinisches Protokoll Komorbiditäten wie chronische Inflammation mituntersucht werden.

Nichtsdestotrotz bieten miRNAs enormes Potential für eine optimierte und personalisierte Therapie von Patienten mit Glioblastoma multiforme und sollten unbedingt weiter evaluiert werden.

## 9 Literaturverzeichnis:

1. Ahir BK, Ozer H, Engelhard HH, Lakka SS (2017) MicroRNAs in glioblastoma pathogenesis and therapy: A comprehensive review. *Crit Rev Oncol Hematol* 120:22–33.
2. Ahlbom A, Feychting M, Green A, Kheifets L, Savitz DA, Swerdlow AJ, ICNIRP (International Commission for Non-Ionizing Radiation Protection) Standing Committee on Epidemiology (2009) Epidemiologic evidence on mobile phones and tumor risk: a review. *Epidemiol Camb Mass* 20:639–652.
3. Albert FK, Forsting M, Sartor K, Adams HP, Kunze S (1994) Early postoperative magnetic resonance imaging after resection of malignant glioma: objective evaluation of residual tumor and its influence on regrowth and prognosis. *Neurosurgery* 34:45–60; discussion 60-61.
4. Alifieris C, Trafalis DT (2015) Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment. *Pharmacol Ther* 152:63–82.
5. Allyse M, Minear MA, Berson E, Sridhar S, Rote M, Hung A, Chandrasekharan S (2015) Non-invasive prenatal testing: a review of international implementation and challenges. *Int J Womens Health* 7:113–126.
6. Armbrecht M (2013) Detektion von Kontaminationen in DNA und Protein-Proben durch photometrische Messungen. *Eppendorf Appl Note* 279:1–6.
7. Baker M (2010) MicroRNA profiling: separating signal from noise. *Nat Methods* 7:687–692.
8. Barker FG, Prados MD, Chang SM, Gutin PH, Lamborn KR, Larson DA, Malec MK, McDermott MW, Sneed PK, Wara WM, Wilson CB (1996) Radiation response and survival time in patients with glioblastoma multiforme. *J Neurosurg* 84:442–448.
9. Batash R, Asna N, Schaffer P, Francis N, Schaffer M (2017) Glioblastoma Multiforme, Diagnosis and Treatment; Recent Literature Review. *Curr Med Chem* 24:3002–3009.
10. 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 S-M, Jiao Y, Juhl HH, Kim JJ, Siravegna G, Laheru DA, Lauricella C, Lim M, Lipson EJ, Marie SKN, Netto GJ, Oliner KS, Olivi A, Olsson L, Riggins GJ, Sartore-Bianchi A, Schmidt K, Shih le-M, Oba-Shinjo SM, Siena S, Theodorescu D, Tie J, Harkins TT, Veronese S, Wang T-L, 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 (2014) Detection of Circulating Tumor DNA in Early- and Late-Stage Human Malignancies. *Sci Transl Med* 6:224.
11. Bleehen NM, Stenning SP (1991) A Medical Research Council trial of two radiotherapy doses in the treatment of grades 3 and 4 astrocytoma. The Medical Research Council Brain Tumour Working Party. *Br J Cancer* 64:769–774.
12. Brown KJ, Seol H, Pillai DK, Sankoorikal B-J, Formolo CA, Mac J, Edwards NJ, Rose MC, Hathout Y (2013) The human secretome atlas initiative: implications in health and disease conditions.

Biochim Biophys Acta 1834:2454–2461.

13. Buermans HPJ, Ariyurek Y, van Ommen G, den Dunnen JT, 't Hoen PAC (2010) New methods for next generation sequencing based microRNA expression profiling. *BMC Genomics* 11:716.
14. Cankovic M, Nikiforova MN, Snuderl M, Adesina AM, Lindeman N, Wen PY, Lee EQ (2013) The role of MGMT testing in clinical practice: a report of the association for molecular pathology. *J Mol Diagn JMD* 15:539–555.
15. Carleton M, Cleary MA, Linsley PS (2007) MicroRNAs and cell cycle regulation. *Cell Cycle Georget Tex* 6:2127–2132.
16. Chen J, Zhang K, Xu Y, Gao Y, Li C, Wang R, Chen L (2016) The role of microRNA-26a in human cancer progression and clinical application. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med* 37:7095–7108.
17. Chen Y-Y, Ho H-L, Lin S-C, Ho TD-H, Hsu C-Y (2018) Upregulation of miR-125b, miR-181d, and miR-221 Predicts Poor Prognosis in MGMT Promoter-Unmethylated Glioblastoma Patients. *Am J Clin Pathol* 149:412–417.
18. Cheng J, Cuk K, Heil J, Golatta M, Schott S, Sohn C, Schneeweiss A, Burwinkel B, Surowy H (2017) Cell-free circulating DNA integrity is an independent predictor of impending breast cancer recurrence. *Oncotarget* 8:54537–54547.
19. Chuang JC, Jones PA (2007) Epigenetics and microRNAs. *Pediatr Res* 61:24–29.
20. Clarke J, Butowski N, Chang S (2010) Recent advances in therapy for glioblastoma. *Arch Neurol* 67:279–283.
21. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, Evdemon-Hogan M, Conejo-Garcia JR, Zhang L, Burow M, Zhu Y, Wei S, Kryczek I, Daniel B, Gordon A, Myers L, Lackner A, Disis ML, Knutson KL, Chen L, Zou W (2004) Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 10:942–949.
22. Davis ME (2016) Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment. *Clin J Oncol Nurs* 20:2–8.
23. De Bonis P, Anile C, Pompucci A, Fiorentino A, Balducci M, Chiesa S, Maira G, Mangiola A (2012) Safety and efficacy of Gliadel wafers for newly diagnosed and recurrent glioblastoma. *Acta Neurochir (Wien)* 154:1371–1378.
24. DeCordova S, Shastri A, Tsolaki AG, Yasmin H, Klein L, Singh SK, Kishore U (2020) Molecular Heterogeneity and Immunosuppressive Microenvironment in Glioblastoma. *Front Immunol* 11:1402.
25. Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA (2004) Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 429:457–463.
26. Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, Baylin SB, Herman JG (2000) Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med* 343:1350–1354.

27. Evans RW (1998) Complications of lumbar puncture. *Neurol Clin* 16:83–105.
28. Felsberg J, Rapp M, Loeser S, Fimmers R, Stummer W, Goepfert M, Steiger H-J, Friedensdorf B, Reifenberger G, Sabel MC (2009) Prognostic significance of molecular markers and extent of resection in primary glioblastoma patients. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 15:6683–6693.
29. Ge X, Pan M-H, Wang L, Li W, Jiang C, He J, Abouzid K, Liu L-Z, Shi Z, Jiang B-H (2018) Hypoxia-mediated mitochondria apoptosis inhibition induces temozolomide treatment resistance through miR-26a/Bad/Bax axis. *Cell Death Dis* 9:1128.
30. Giladi M, Schneiderman RS, Voloshin T, Porat Y, Munster M, Blat R, Sherbo S, Bomzon Z, Urman N, Itzhaki A, Cahal S, Shteingauz A, Chaudhry A, Kirson ED, Weinberg U, Palti Y (2015) Mitotic Spindle Disruption by Alternating Electric Fields Leads to Improper Chromosome Segregation and Mitotic Catastrophe in Cancer Cells. *Sci Rep* 5:18046.
31. Git A, Dvinge H, Salmon-Divon M, Osborne M, Kutter C, Hadfield J, Bertone P, Caldas C (2010) Systematic comparison of microarray profiling, real-time PCR, and next-generation sequencing technologies for measuring differential microRNA expression. *RNA* 16:991–1006.
32. Hafner M, Landgraf P, Ludwig J, Rice A, Ojo T, Lin C, Holoch D, Lim C, Tuschl T (2008) Identification of microRNAs and other small regulatory RNAs using cDNA library sequencing. *Methods San Diego Calif* 44:3–12.
33. Harfe BD (2005) MicroRNAs in vertebrate development. *Curr Opin Genet Dev* 15:410–415.
34. Hartmann C, Meyer J, Balss J, Capper D, Mueller W, Christians A, Felsberg J, Wolter M, Mawrin C, Wick W, Weller M, Herold-Mende C, Unterberg A, Jeuken JWM, Wesseling P, Reifenberger G, von Deimling A (2009) Type and frequency of IDH1 and IDH2 mutations are related to astrocytic and oligodendroglial differentiation and age: a study of 1,010 diffuse gliomas. *Acta Neuropathol (Berl)* 118:469–474.
35. Hegi ME, Diserens A-C, Godard S, Dietrich P-Y, Regli L, Ostermann S, Otten P, Van Melle G, de Tribolet N, Stupp R (2004) Clinical trial substantiates the predictive value of O-6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation in glioblastoma patients treated with temozolomide. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 10:1871–1874.
36. Hegi ME, Diserens A-C, Gorlia T, Hamou M-F, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JEC, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross JG, Janzer RC, Stupp R (2005) MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* 352:997–1003.
37. Ho K-H, Chen P-H, Hsi E, Shih C-M, Chang W-C, Cheng C-H, Lin C-W, Chen K-C (2017) Identification of IGF-1-enhanced cytokine expressions targeted by miR-181d in glioblastomas via an integrative miRNA/mRNA regulatory network analysis. *Sci Rep* 7:732.
38. Holdhoff M, Yovino SG, Boadu O, Grossman SA (2013) Blood-based biomarkers for malignant gliomas. *J Neurooncol* 113:345–352.

39. Holzapfel B, Wickert L (2007) Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete. *Biol Unserer Zeit* 37:120–126.
40. Huse JT, Brennan C, Hambardzumyan D, Wee B, Pena J, Rouhanifard SH, Sohn-Lee C, le Sage C, Agami R, Tuschl T, Holland EC (2009) The PTEN-regulating microRNA miR-26a is amplified in high-grade glioma and facilitates gliomagenesis in vivo. *Genes Dev* 23:1327–1337.
41. Ilhan-Mutlu A, Wagner L, Wöhrer A, Furtner J, Widhalm G, Marosi C, Preusser M (2012) Plasma MicroRNA-21 concentration may be a useful biomarker in glioblastoma patients. *Cancer Invest* 30:615–621.
42. Jeltsch A (2002) Beyond Watson and Crick: DNA methylation and molecular enzymology of DNA methyltransferases. *Chembiochem Eur J Chem Biol* 3:274–293.
43. Jeltsch A (2006) Molecular enzymology of mammalian DNA methyltransferases. *Curr Top Microbiol Immunol* 301:203–225.
44. Jovanovic M, Hengartner MO (2006) miRNAs and apoptosis: RNAs to die for. *Oncogene* 25:6176–6187.
45. Khosla D (2016) Concurrent therapy to enhance radiotherapeutic outcomes in glioblastoma. *Ann Transl Med* 4:54.
46. Kirson ED, Dbalý V, Tovaryš F, Vymazal J, Soustiel JF, Itzhaki A, Mordechovich D, Steinberg-Shapira S, Gurvich Z, Schneiderman R, Wasserman Y, Salzberg M, Ryffel B, Goldsher D, Dekel E, Palti Y (2007) Alternating electric fields arrest cell proliferation in animal tumor models and human brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:10152–10157.
47. Kowalczyk A, Macdonald RL, Amidei C, Dohrmann G, Erickson RK, Hekmatpanah J, Krauss S, Krishnasamy S, Masters G, Mullan SF, Mundt AJ, Sweeney P, Vokes EE, Weir BK, Wollman RL (1997) Quantitative imaging study of extent of surgical resection and prognosis of malignant astrocytomas. *Neurosurgery* 41:1028–1036; discussion 1036-1038.
48. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Ståhlberg A, Zoric N (2006) The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 27:95–125.
49. Lamborn KR, Chang SM, Prados MD (2004) Prognostic factors for survival of patients with glioblastoma: recursive partitioning analysis. *Neuro-Oncol* 6:227–235.
50. Laperriere N, Zuraw L, Cairncross G, Cancer Care Ontario Practice Guidelines Initiative Neuro-Oncology Disease Site Group (2002) Radiotherapy for newly diagnosed malignant glioma in adults: a systematic review. *Radiother Oncol J Eur Soc Ther Radiol Oncol* 64:259–273.
51. 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.
52. Li W, Ruan K (2009) MicroRNA detection by microarray. *Anal Bioanal Chem* 394:1117–1124.
53. Limentani SA, Asher A, Heafner M, Kim JW, Fraser R (2005) A phase I trial of surgery,

- Gliadel wafer implantation, and immediate postoperative carboplatin in combination with radiation therapy for primary anaplastic astrocytoma or glioblastoma multiforme. *J Neurooncol* 72:241–244.
54. 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 San Diego Calif* 25:402–408.
55. Lizarte Neto FS, Rodrigues AR, Trevisan FA, de Assis Cirino ML, Matias CCMS, Pereira-da-Silva G, Peria FM, Tirapelli DP da C, Carlotti CG (2019) microRNA-181d associated with the methylation status of the MGMT gene in Glioblastoma multiforme cancer stem cells submitted to treatments with ionizing radiation and temozolomide. *Brain Res* 1720:146302.
56. López-Urrutia E, Coronel-Hernández J, García-Castillo V, Contreras-Romero C, Martínez-Gutierrez A, Estrada-Galicia D, Terrazas LI, López-Camarillo C, Maldonado-Martínez H, Jacobo-Herrera N, Pérez-Plasencia C (2017) MiR-26a downregulates retinoblastoma in colorectal cancer. *Tumor Biol* 39.
57. Louis DN (2006) Molecular pathology of malignant gliomas. *Annu Rev Pathol* 1:97–117.
58. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW (2016) The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol (Berl)* 131:803–820.
59. Lü J, Yang C, Zhang Y, Pan H (2018) Selection of Reference Genes for the Normalization of RT-qPCR Data in Gene Expression Studies in Insects: A Systematic Review. *Front Physiol* 9:1560.
60. Lu Y-Y, Lin Y, Ding D-X, Su S, Chi Q-Q, Zhang Y-C, Sun J, Zhang X, Zhu H-M, Huang Q-S, Chi Y-L, Ye G-Z, Tao S, Dong S-J (2018) MiR-26a functions as a tumor suppressor in ambient particulate matter-bound metal-triggered lung cancer cell metastasis by targeting LIN28B-IL6-STAT3 axis. *Arch Toxicol* 92:1023–1035.
61. M D, J M, M R, C C, Jr M (2013) Validation study of a fast, accurate, and precise brain tumor volume measurement. *Comput Methods Programs Biomed* 111:480–487.
62. Ma Q, P V, C V, Ss S, J M, C S, Sk S (2017) Intratumoral heterogeneity: pathways to treatment resistance and relapse in human glioblastoma. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* 28:1448–1456.
63. Ma R, Jiang T, Kang X (2012) Circulating microRNAs in cancer: origin, function and application. *J Exp Clin Cancer Res CR* 31:38.
64. Marques-Rocha JL, Samblas M, Milagro FI, Bressan J, Martínez JA, Marti A (2015) Noncoding RNAs, cytokines, and inflammation-related diseases. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 29:3595–3611.
65. Marzi MJ, Ghini F, Cerruti B, de Pretis S, Bonetti P, Giacomelli C, Gorski MM, Kress T, Pelizzola M, Muller H, Amati B, Nicassio F (2016) Degradation dynamics of microRNAs revealed by a novel pulse-chase approach. *Genome Res* 26:554–565.
66. Mirimanoff R-O, Gorlia T, Mason W, Van den Bent MJ, Kortmann R-D, Fisher B, Reni M, Brandes AA, Curschmann J, Villa S, Cairncross G, Allgeier A, Lacombe D, Stupp R (2006)

Radiotherapy and temozolomide for newly diagnosed glioblastoma: recursive partitioning analysis of the EORTC 26981/22981-NCIC CE3 phase III randomized trial. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 24:2563–2569.

67. Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155:335–350.
68. Muralidharan J, Ramezani A, Hubal M, Knoblach S, Shrivastav S, Karandish S, Scott R, Maxwell N, Ozturk S, Beddhu S, Kopp JB, Raj DS (2017) Extracellular microRNA signature in chronic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 312:982–991.
69. Muscat JE, Malkin MG, Thompson S, Shore RE, Stellman SD, McRee D, Neugut AI, Wynder EL (2000) Handheld cellular telephone use and risk of brain cancer. *JAMA* 284:3001–3007.
70. Nakagawachi T, Soejima H, Urano T, Zhao W, Higashimoto K, Satoh Y, Matsukura S, Kudo S, Kitajima Y, Harada H, Furukawa K, Matsuzaki H, Emi M, Nakabeppu Y, Miyazaki K, Sekiguchi M, Mukai T (2003) Silencing effect of CpG island hypermethylation and histone modifications on O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) gene expression in human cancer. *Oncogene* 22:8835–8844.
71. Neglia JP, Meadows AT, Robison LL, Kim TH, Newton WA, Ruymann FB, Sather HN, Hammond GD (1991) Second neoplasms after acute lymphoblastic leukemia in childhood. *N Engl J Med* 325:1330–1336.
72. Ohgaki H, Kleihues P (2005) Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol (Berl)* 109:93–108.
73. Ostrom QT, Gittleman H, Farah P, Ondracek A, Chen Y, Wolinsky Y, Stroup NE, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS (2013) CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006-2010. *Neuro-Oncol* 15 Suppl 2:ii1-56.
74. Pallud J, Audureau E, Noel G, Corns R, Lechapt-Zalcman E, Duntze J, Pavlov V, Guyotat J, Hieu PD, Le Reste P-J, Faillot T, Litre C-F, Desse N, Petit A, Emery E, Voirin J, Peltier J, Caire F, Vignes J-R, Barat J-L, Langlois O, Dezamis E, Parraga E, Zanello M, Nader E, Lefranc M, Bauchet L, Devaux B, Menei P, Metellus P, Club de Neuro-Oncologie of the Société Française de Neurochirurgie (2015) Long-term results of carmustine wafer implantation for newly diagnosed glioblastomas: a controlled propensity-matched analysis of a French multicenter cohort. *Neuro-Oncol* 17:1609–1619.
75. Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC-H, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Siu I-M, Gallia GL, Olivi A, McLendon R, Rasheed BA, Keir S, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Busam DA, Tekleab H, Diaz LA, Hartigan J, Smith DR, Strausberg RL, Marie SKN, Shinjo SMO, Yan H, Riggins GJ, Bigner DD, Karchin R, Papadopoulos N, Parmigiani G, Vogelstein B, Velculescu VE, Kinzler KW (2008) An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* 321:1807–1812.
76. ParvizHamidi M, Haddad G, Ostadrahimi S, Ostadrahimi N, Sadeghi S, Fayaz S, Fard-Esfahani P (2019) Circulating miR-26a and miR-21 as biomarkers for glioblastoma multiforme. *Biotechnol*

Appl Biochem 66:261–265.

77. Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, Hayward DC, Ball EE, Degnan B, Müller P, Spring J, Srinivasan A, Fishman M, Finnerty J, Corbo J, Levine M, Leahy P, Davidson E, Ruvkun G (2000) Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature* 408:86–89.
78. Patnaik SK, Yendamuri S, Kannisto E, Kucharczuk JC, Singhal S, Vachani A (2012) MicroRNA expression profiles of whole blood in lung adenocarcinoma. *PloS One* 7:e46045.
79. Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, Forrest WF, Soriano RH, Wu TD, Misra A, Nigro JM, Colman H, Soroceanu L, Williams PM, Modrusan Z, Feuerstein BG, Aldape K (2006) Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell* 9:157–173.
80. Pradhan S, Esteve P-O (2003) Mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases and their expression. *Clin Immunol Orlando Fla* 109:6–16.
81. Pritchard CC, Kroh E, Wood B, Arroyo JD, Dougherty KJ, Miyaji MM, Tait JF, Tewari M (2012) Blood cell origin of circulating microRNAs: a cautionary note for cancer biomarker studies. *Cancer Prev Res Phila Pa* 5:492–497.
82. Qian X, Zhao P, Li W, Shi Z-M, Wang L, Xu Q, Wang M, Liu N, Liu L-Z, Jiang B-H (2013) MicroRNA-26a promotes tumor growth and angiogenesis in glioma by directly targeting prohibitin. *CNS Neurosci Ther* 19:804–812.
83. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G (2000) The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403:901–906.
84. Saito Y, Liang G, Egger G, Friedman JM, Chuang JC, Coetzee GA, Jones PA (2006) Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer Cell* 9:435–443.
85. Sato F, Tsuchiya S, Terasawa K, Tsujimoto G (2009) Intra-platform repeatability and inter-platform comparability of microRNA microarray technology. *PloS One* 4:e5540.
86. Sawaya R (1999) Extent of Resection in Malignant Gliomas: a Critical Summary. *J Neurooncol* 42:303–305.
87. Schaaaj-Visser TBM, de Wit M, Lam SW, Jiménez CR (2013) The cancer secretome, current status and opportunities in the lung, breast and colorectal cancer context. *Biochim Biophys Acta* 1834:2242–2258.
88. Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD (2003) Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115:199–208.
89. Seisenberger S, Peat JR, Hore TA, Santos F, Dean W, Reik W (2013) Reprogramming DNA methylation in the mammalian life cycle: building and breaking epigenetic barriers. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 368:20110330.

90. Selker RG, Shapiro WR, Burger P, Blackwood MS, Arena VC, Gilder JC, Malkin MG, Mealey JJ, Neal JH, Olson J, Robertson JT, Barnett GH, Bloomfield S, Albright R, Hochberg FH, Hiesiger E, Green S, Brain Tumor Cooperative Group (2002) The Brain Tumor Cooperative Group NIH Trial 87-01: a randomized comparison of surgery, external radiotherapy, and carmustine versus surgery, interstitial radiotherapy boost, external radiation therapy, and carmustine. *Neurosurgery* 51:343–355; discussion 355-357.
91. Simpson JR, Horton J, Scott C, Curran WJ, Rubin P, Fischbach J, Isaacson S, Rotman M, Asbell SO, Nelson JS (1993) Influence of location and extent of surgical resection on survival of patients with glioblastoma multiforme: results of three consecutive Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) clinical trials. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 26:239–244.
92. Sippl C, Ketter R, Braun L, Teping F, Schoeneberger L, Kim YJ, List M, Nakhoda A, Wemmer S, Oertel J, Urbschat S (2019) miRNA-26a expression influences the therapy response to carmustine wafer implantation in patients with glioblastoma multiforme. *Acta Neurochir (Wien)* 161:2299–2309.
93. Sippl C, Ketter R, Bohr L, Kim YJ, List M, Oertel J, Urbschat S (2019) MiRNA-181d Expression Significantly Affects Treatment Responses to Carmustine Wafer Implantation. *Neurosurgery* 85:147–155.
94. Sippl C, Teping F, Ketter R, Braun L, Tremmel L, Schulz-Schaeffer W, Oertel J, Urbschat S (2019) The Influence of Distinct Regulatory miRNAs of the p15/p16/RB1/E2F Pathway on the Clinical Progression of Glioblastoma Multiforme. *World Neurosurg* 132:900–908.
95. Stummer W, Reulen H-J, Meinel T, Pichlmeier U, Schumacher W, Tonn J-C, Rohde V, Opperl F, Turowski B, Woiciechowsky C, Franz K, Pietsch T, ALA-Glioma Study Group (2008) Extent of resection and survival in glioblastoma multiforme: identification of and adjustment for bias. *Neurosurgery* 62:564–576.
96. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO, European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups, National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 352:987–996.
97. Stupp R, Taillibert S, Kanner A, Read W, Steinberg D, Lhermitte B, Toms S, Idubai A, Ahluwalia MS, Fink K, Di Meo F, Lieberman F, Zhu J-J, Stragliotto G, Tran D, Brem S, Hottinger A, Kirson ED, Lavy-Shahaf G, Weinberg U, Kim C-Y, Paek S-H, Nicholas G, Bruna J, Hirte H, Weller M, Palti Y, Hegi ME, Ram Z (2017) Effect of Tumor-Treating Fields Plus Maintenance Temozolomide vs Maintenance Temozolomide Alone on Survival in Patients With Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* 318:2306–2316.
98. Takeuchi K, Hoshino K (1977) Statistical analysis of factors affecting survival after

- glioblastoma multiforme. *Acta Neurochir (Wien)* 37:57–73.
99. Tano K, Shiota S, Collier J, Foote RS, Mitra S (1990) Isolation and structural characterization of a cDNA clone encoding the human DNA repair protein for O6-alkylguanine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:686–690.
100. Urbschat S, Sippl C, Engelhardt J, Kammers K, Oertel J, Ketter R (2017) Importance of biomarkers in glioblastoma patients receiving local BCNU wafer chemotherapy. *Mol Cytogenet* 10:16.
101. Vecht CJ, Avezaat CJ, van Putten WL, Eijkenboom WM, Stefanko SZ (1990) The influence of the extent of surgery on the neurological function and survival in malignant glioma. A retrospective analysis in 243 patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 53:466–471.
102. Wait SD, Prabhu RS, Burri SH, Atkins TG, Asher AL (2015) Polymeric drug delivery for the treatment of glioblastoma. *Neuro-Oncol* 17 Suppl 2:ii9–ii23.
103. Walker MD, Strike TA, Sheline GE (1979) An analysis of dose-effect relationship in the radiotherapy of malignant gliomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 5:1725–1731.
104. Wang X, He Y, Mackowiak B, Gao B (2020) MicroRNAs as regulators, biomarkers and therapeutic targets in liver diseases. *Gut* 70:784–795.
105. Wang X-F, Shi Z-M, Wang X-R, Cao L, Wang Y-Y, Zhang J-X, Yin Y, Luo H, Kang C-S, Liu N, Jiang T, You Y-P (2012) MiR-181d acts as a tumor suppressor in glioma by targeting K-ras and Bcl-2. *J Cancer Res Clin Oncol* 138:573–584.
106. Weber EL, Goebel EA (2005) Cerebral edema associated with Gliadel wafers: two case studies. *Neuro-Oncol* 7:84–89.
107. Wen PY, Kesari S (2008) Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med* 359:492–507.
108. Westphal M, Hilt DC, Bortey E, Delavault P, Olivares R, Warnke PC, Whittle IR, Jämskeläinen J, Ram Z (2003) A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma. *Neuro-Oncol* 5:79–88.
109. Westphal M, Lamszus K (2015) Circulating biomarkers for gliomas. *Nat Rev Neurol* 11:556–566.
110. Wong YNS, Joshi K, Khetrpal P, Ismail M, Reading JL, Sunderland MW, Georgiou A, Furness AJS, Ben Aissa A, Ghorani E, Oakes T, Uddin I, Tan WS, Feber A, McGovern U, Swanton C, Freeman A, Marafioti T, Briggs TP, Kelly JD, Powles T, Peggs KS, Chain BM, Linch MD, Quezada SA (2018) Urine-derived lymphocytes as a non-invasive measure of the bladder tumor immune microenvironment. *J Exp Med* 215:2748–2759.
111. Wu MP, Tamada JA, Brem H, Langer R (1994) In vivo versus in vitro degradation of controlled release polymers for intracranial surgical therapy. *J Biomed Mater Res* 28:387–395.
112. Yadav DK, Bai X, Yadav RK, Singh A, Li G, Ma T, Chen W, Liang T (2018) Liquid biopsy in pancreatic cancer: the beginning of a new era. *Oncotarget* 9:26900–26933.
113. Yang C, Wang C, Chen X, Chen S, Zhang Y, Zhi F, Wang J, Li L, Zhou X, Li N, Pan H, Zhang J, Zen K, Zhang C-Y, Zhang C (2013) Identification of seven serum microRNAs from a

genome-wide serum microRNA expression profile as potential noninvasive biomarkers for malignant astrocytomas. *Int J Cancer* 132:116–127.

114. Yang F, Liu X, Liu Y, Liu Y, Zhang C, Wang Z, Jiang T, Wang Y (2017) miR-181d/MALT1 regulatory axis attenuates mesenchymal phenotype through NF- $\kappa$ B pathways in glioblastoma. *Cancer Lett* 396:1–9.

115. Yavropoulou MP, Vaios V, Makras P, Georgianos P, Batas A, Tsalikakis D, Tzallas A, Ntritsos G, Roumeliotis S, Eleftheriadis T, Liakopoulos V (2020) Expression of Circulating MicroRNAs Linked to Bone Metabolism in Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder. *Bio-medicines* 8:601.

116. Yin JQ, Zhao RC, Morris KV (2008) Profiling microRNA expression with microarrays. *Trends Biotechnol* 26:70–76.

117. Yu L, Lu J, Zhang B, Liu X, Wang L, Li S-Y, Peng X-H, Xu X, Tian W-D, Li X-P (2013) miR-26a inhibits invasion and metastasis of nasopharyngeal cancer by targeting EZH2. *Oncol Lett* 5:1223–1228.

118. Yu N, Yang Y, Li X, Zhang M, Huang J, Wang X, Long X (2016) MiR-26a inhibits proliferation and migration of HaCaT keratinocytes through regulating PTEN expression. *Gene* 594:117–124.

119. Zeng Y, Yi R, Cullen BR (2003) MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:9779–9784.

120. Zhang B, Liu X-X, He J-R, Zhou C-X, Guo M, He M, Li M-F, Chen G-Q, Zhao Q (2011) Pathologically decreased miR-26a antagonizes apoptosis and facilitates carcinogenesis by targeting MTDH and EZH2 in breast cancer. *Carcinogenesis* 32:2–9.

121. Zhang J, Li S, Li L, Li M, Guo C, Yao J, Mi S (2015) Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 13:17–24.

122. Zhang W, Zhang J, Hoadley K, Kushwaha D, Ramakrishnan V, Li S, Kang C, You Y, Jiang C, Song SW, Jiang T, Chen CC (2012) miR-181d: a predictive glioblastoma biomarker that downregulates MGMT expression. *Neuro-Oncol* 14:712–719.

123. Zhang Y-F, Zhang A-R, Zhang B-C, Rao Z-G, Gao J-F, Lv M-H, Wu Y-Y, Wang S-M, Wang R-Q, Fang D-C (2013) MiR-26a regulates cell cycle and anoikis of human esophageal adenocarcinoma cells through Rb1-E2F1 signaling pathway. *Mol Biol Rep* 40:1711–1720.

124. Zhi F, Shao N, Wang R, Deng D, Xue L, Wang Q, Zhang Y, Shi Y, Xia X, Wang S, Lan Q, Yang Y (2015) Identification of 9 serum microRNAs as potential noninvasive biomarkers of human astrocytoma. *Neuro-Oncol* 17:383–391.

125. Zhu P, Du XL, Lu G, Zhu J-J (2017) Survival benefit of glioblastoma patients after FDA approval of temozolomide concomitant with radiation and bevacizumab: A population-based study. *Oncotarget* 8:44015–44031.

---

126. Zill OA, Banks KC, Fairclough SR, Mortimer SA, Vowles JV, Mokhtari R, Gandara DR, Mack PC, Odegaard JI, Nagy RJ, Baca AM, Eltoukhy H, Chudova DI, Lanman RB, Talasz A (2018) The Landscape of Actionable Genomic Alterations in Cell-Free Circulating Tumor DNA from 21,807 Advanced Cancer Patients. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 24:3528–3538.

## 10 Publikationen

Sippl C, Quiring A, Teping F, Schulz-Schaeffer W, Urbschat S, Ketter R, Oertel J

### **MiRNA-181d Expression Correlates in Tumor versus Plasma of Glioblastoma Patients – the Base of a Preoperative Stratification Tool for Local Carmustine Wafer Use**

World Neurosurg. 2021 Dec 20:S1878-8750(21)01897-0. doi: 10.1016/j.wneu.2021.12.053.  
Epub ahead of print.

## 11 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Univ.-Prof. Dr. med Joachim Oertel für die Überlassung dieses spannenden Themas, sowie für die mannigfaltigen Anregungen für diese Arbeit.

Darüber hinaus möchte ich mich bei der Leiterin des neurochirurgischen Forschungslabors Frau Prof. Dr. rer. nat. Steffi Urbschat für die vielfältige Unterstützung, ständige Diskussionsbereitschaft und die unbürokratische Vermittlung meiner Doktorarbeit bedanken.

Meinem Betreuer Dr. med. Christoph Sippl gebührt besonderer Dank. Er war mir stets eine große Hilfe. Sein Engagement und sein jederzeit verfügbarer Rat haben enorm zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen und ohne ihn wäre sie womöglich nie zustande gekommen.

Weiterhin bedanke ich mich bei Frau Dr. rer. nat. Silke Wemmert, Herrn M. Sc. Florian Bochen und dem Institut für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde unter der Leitung von Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Bernhard Schick für die Anleitung zur Durchführung der RT-qPCR und die Nutzung der hierfür notwendigen Geräte. Frau Sigrid Welsch danke ich für die Einarbeitung in die Labortätigkeit.

Für die Bestimmung des IDH1-Mutationsstatus, sowie des MGMT-Promoter-Methylierungsstatus bedanke ich mich beim Institut für Neuropathologie des Universitätsklinikums des Saarlandes unter der Leitung von Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Walter J. Schulz-Schaeffer.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Herrn Benjamin Landau für die Unterstützung beim Sammeln der Blut- und Tumorproben.

Ein herzliches Dankeschön geht an Stefanie Stengel-Rutkowski, Tobias Kaspers und Johannes Koch für ihre Hilfe beim Gegenlesen der Arbeit. Meiner Freundin Maike Hornef gebührt größter Dank dafür, dass sie ständig an mich und das Gelingen dieser Arbeit geglaubt hat.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken. Bei meinem Vater Frank Quiring, der selbst 2014 an einem Glioblastom verstarb und bei meiner Mutter Ilka Quiring, die mich durch jede, noch so schwere Phase begleitet und mich immer unterstützt hat. Diese Arbeit ist euch gewidmet.

Tag der Promotion: 04.07.2022  
Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Michael D. Menger  
Berichterstatter: Prof. Dr. med. Joachim Oertel  
PD Dr. med. Lorenz Thruner